



# **ENTWICKLUNG EINES HIV-INHIBIERENDEN PEPTIDS MIT VERMINDERTER IMMUNOGENITÄT**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Biologie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Frances Brauer  
aus Gera

Frankfurt (2015)  
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Biologie und Pharmazie der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek  
Prof. Dr. Heinfried H. Radeke

Datum der Disputation: 09. November 2015

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>Das Humane Immundefizienz Virus .....</b>	<b>7</b>
2.1.1	Pathogenese der HIV-1 Infektion.....	8
2.1.2	Morphologie der HIV-Partikel.....	9
2.1.3	Replikationszyklus von HIV .....	10
2.1.4	Eintritt von HIV in seine Zielzellen .....	11
<b>2.2</b>	<b>Gp41 und Fusionsinhibitoren .....</b>	<b>13</b>
2.2.1	Transmembranes HIV-1 Hüllprotein gp41 .....	13
2.2.2	Gp41-abgeleitete Fusionsinhibitoren .....	16
<b>2.3</b>	<b>Adaptive Immunantwort des humanen Immunsystems .....</b>	<b>20</b>
2.3.1	Humorale Immunantwort.....	20
2.3.2	Zelluläre Immunantwort.....	23
2.3.3	HIV-1-spezifische adaptive Immunantwort .....	25
<b>2.4</b>	<b>Immunogenität von therapeutischen Proteinen/Peptiden .....</b>	<b>28</b>
2.4.1	Einflussfaktoren auf die Immunogenität .....	28
2.4.2	Analyse der Immunogenität .....	29
<b>3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Geräte .....	33
4.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	34
4.1.3	Chemikalien .....	34
4.1.4	Standardlösungen, Puffer und Nährmedien.....	35
4.1.5	Zelllinien.....	37
4.1.6	Primäre und sekundäre Antikörper .....	37
4.1.7	Verwendete Kits.....	38
4.1.8	Plasmide und Vektoren.....	38
4.1.9	Peptide.....	39
4.1.10	Membranen für die Epitopkartierung .....	41
4.1.11	Biologisches Material von gesunden Probanden und HIV-Patienten .....	42
<b>4.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>46</b>
4.2.1	Präparative Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i> .....	46
4.2.2	Konzentrationsbestimmung und Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA .....	46
4.2.3	Allgemeine Methoden der Zellkultur.....	46
4.2.4	Isolierung mononukleärer Blutzellen (PBMCs).....	47
4.2.5	Durchflusszytometrie.....	48
4.2.6	Herstellung retro- und lentiviraler Vektoren .....	49
4.2.7	Transduktion eukaryotischer Zelllinien mit retroviralen Vektoren .....	51
4.2.8	Neutralisationsassay mit synthetischen Peptiden .....	51
4.2.9	Infektionsassay mit Peptid-exprimierenden Zelllinien .....	51

---

4.2.10	IFN- $\gamma$ ELISpot.....	52
4.2.11	Dot Blot.....	54
4.2.12	Kartierung der Antikörperbindungsstelle.....	55
4.2.13	Effektorfunktionen von Antikörpern: ADCC und CDC .....	56
4.2.14	Internetprogramme und Datenbanken.....	57
4.2.15	Graphikerstellung und Statistik .....	58
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Vergleichende Analyse ausgewählter C-Peptide .....</b>	<b>61</b>
5.1.1	Antivirale Aktivität der synthetischen C-Peptide.....	61
5.1.2	Antivirale Aktivität von membranständigem C46-EHO .....	64
5.1.3	Antikörperreaktivität von HIV Seren.....	67
5.1.4	Identifizierung immundominanter Bereiche in C46 und C46-EHO.....	70
5.1.5	Analyse der Effektormechanismen der C46-spezifischen Antikörper .....	74
5.1.6	<i>In silico</i> Analysen zur Vorhersage potentieller MHC-I-Epitope.....	77
<b>5.2</b>	<b>Die C46-EHO-abgeleiteten Peptidvarianten V1, V2, V3 und V4 .....</b>	<b>82</b>
5.2.1	Verminderung der zellulären Immunogenität <i>in silico</i> .....	82
5.2.2	Antivirale Aktivität der Peptidvarianten .....	87
5.2.3	<i>In vitro</i> Analyse der vorhergesagten MHC-I-Epitope .....	90
5.2.4	Einfluss der Ankerpositionen auf die CTL-Stimulation .....	92
5.2.5	Einfluss der Mutationen auf die Antigenität .....	94
<b>5.3</b>	<b>Das optimierte Peptid V2o .....</b>	<b>96</b>
5.3.1	Verringerung der zellulären Immunantwort <i>in silico</i> .....	97
5.3.2	Analyse der IFN- $\gamma$ Sekretion von HIV-1 PBMCs nach Peptidzugabe .....	100
5.3.3	Untersuchung der Seroreaktivität von HIV Patienten .....	102
5.3.4	Inhibitorische Wirksamkeit von V2o.....	103
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>105</b>
6.1	Verminderung der zellulären Immunogenität .....	108
6.2	Verstärkung der antiviralen Aktivität .....	112
6.3	Verminderung der humoralen Antigenität/Immunogenität .....	117
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>142</b>
9.1	IC <sub>50</sub> -Werte der antiviralen C-Peptide .....	142
9.2	Seroreaktivität der antiviralen C-Peptide.....	142
9.3	<i>In silico</i> Vorhersagen.....	144
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>161</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>162</b>
<b>12</b>	<b>Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....</b>	<b>164</b>
<b>13</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>166</b>



# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Applikation von therapeutischen Peptiden oder Proteinen kann im Patienten durch Mechanismen des Immunsystems zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, die die biologische Wirksamkeit vermindern können. Dies geht mit einer erhöhten Wirkstoffgabe oder einer Therapieresistenz einher und stellt damit ein Sicherheitsrisiko für den Patienten dar. In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel HIV-inhibitorischer Peptide eine Möglichkeit aufgezeigt, mit der die peptidspezifische humorale und zelluläre Immunogenität vermindert, die Wirksamkeit indes beibehalten werden kann.

Als Ausgangspunkt wurden die bereits publizierten Peptide T-20, C46, SC35EK, T-1249 und C34-EHO ausgewählt, welche äußerst effektiv den Eintritt von HIV in dessen Zielzellen verhindern. Alle fünf Peptide sind von der Aminosäuresequenz des transmembranen Hüllproteins gp41 des HIV-1 (T-20, C46, SC35EK), HIV-2 (C34-EHO) bzw. HIV-1/-2/SIV (T-1249) abgeleitet. In dieser Arbeit wurde das HIV-2 Peptid C34-EHO C-terminal um 12 Aminosäuren des HIV-1 verlängert (neue Bezeichnung: C46-EHO).

Für die Initiierung einer zellulären Immunantwort muss unter anderem ein Peptidfragment (sog. MHC-I-Epitop) über Ankeraminosäuren an ein MHC-I-Molekül binden. Die *in silico* Analyse der Aminosäuresequenzen der Peptide ergab diesbezüglich für das Hybridpeptid C46-EHO die geringste potentielle zelluläre Immunogenität, wobei insgesamt fünf starke potentiell immunogene MHC-I-Epitope von den Vorhersageprogrammen BIMAS und SYFPEITHI identifiziert wurden. Die *in vitro* Analyse der humoralen Antigenität zeigte zudem, dass die überwiegende Mehrheit der HIV-1-infizierten Patienten Antikörper gegen die HIV-1-abgeleiteten Peptide C46 und T-20 im Serum aufwies, nicht jedoch gegen C46-EHO, T-1249 und SC35EK. Die Antikörper waren überwiegend gegen die am C-Terminus lokalisierte HIV-1 MPER (*membrane-proximale external region*) gerichtet. In den Seren von HIV-2-infizierten Patienten waren hingegen Antikörper gegen T-1249 und C46-EHO detektierbar.

Die Peptide T-20, C46, SC35EK, T-1249 und C46-EHO verhinderten spezifisch die Infektion von HIV-1 im nanomolaren Konzentrationsbereich. C46-EHO hemmte überdies den

Eintritt von SIVmac251 als auch T-20- und C46-resistenter HI-Viren. T-Zelllinien wurden durch die membranständige Expression von C46-EHO effektiver vor einer HIV-1 Infektion geschützt im Vergleich zu membranständigen C46 Peptid. Aufgrund der geringen Immunogenität und der äußerst breiten und effektiven antiviralen Wirksamkeit wurde C46-EHO für die weitere Optimierung verwendet.

Im C46-EHO wurden Aminosäuren an Hauptankerpositionen der MHC-I-Epitope gegen weniger stark bindende Aminosäuren bei fünf potentiellen 9mer MHC-I-Epitopen ausgetauscht. Dies resultierte in den Peptidvarianten V1, V2, V3 und V4, wobei V2 die aussichtsreichsten Eigenschaften aufwies: 1) niedrigste humorale Antigenität in HIV-1 Patientenseren; 2) potente antivirale Wirksamkeit; 3) verringerte potentielle zelluläre Immunogenität.

Abschließend wurde basierend auf V2 die optimierte Peptidvariante V2o generiert. Die Glykosylierungsstelle im V2 Peptid wurde an die entsprechende C46 Position verschoben, wodurch die *in silico* vorhergesagte zelluläre Immunogenität weiter vermindert wurde. Zudem wurde das HIV-1-abgeleitete MPER-Motiv durch die Aminosäuresequenz des HIV-2 Stammes EHO ersetzt, so dass V2o nicht mehr von prä-existierenden Antikörpern in HIV-1 Patientenseren erkannt wurde. Im ELISpot Assay wiesen weder Patienten mit einer HIV-1 bzw. HIV-2 Infektion noch SIV-infizierte Rhesus Makaken eine zelluläre Immunantwort gegen C46-EHO, V2 oder V2o auf. V2o verhinderte den Eintritt von diversen HIV-1 Viren im pikomolaren Konzentrationsbereich und wies somit eine deutlich verbesserte antivirale Wirksamkeit auf.

Somit konnte in dieser Arbeit durch Austausch von Aminosäuren die intrinsische Immunogenität des HIV-inhibitorischen Peptids C46-EHO vermindert und zugleich die biologische Wirksamkeit verstärkt werden. Das hieraus resultierende Peptid V2o steht nunmehr für die weitere klinische Entwicklung als Präventativ oder Therapeutikum für die subkutane oder gentherapeutische Applikation zur Verfügung.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Das Humane Immundefizienz Virus

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) ist der Erreger von AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*). HIV gehört in der Familie der Retroviren zur Gattung der Lentiviren. Charakteristisch ist das langsame Fortschreiten der Krankheit durch die kontinuierliche Vermehrung der Viren und eine starke Abnahme der CD4+ T-Zellen des Immunsystems. Die Immunschwäche führt zu opportunistischen Infektionen, die durch Viren, Bakterien oder Pilze verursacht werden, in gesunden Menschen jedoch harmlos sind.

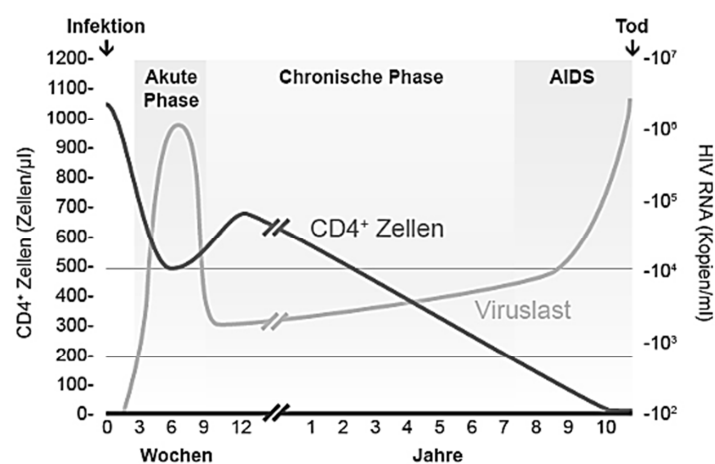
1983/84 isolierten zwei Arbeitsgruppen die bis dahin unbekanntes AIDS-auslösenden Retroviren (VAHLNE 2009). 1983 wurde ein Virus von Luc Montagnier (Institut Pasteur, Frankreich) aus den Lymphknoten eines Patienten isoliert und als LAV (*lymphadenopathy-associated virus*) bezeichnet (BARRE-SINOUISSI *et al.* 1983; BARRE-SINOUISSI *et al.* 1985). 1984 wurde in den USA ein weiteres Virus (*human T-lymphotropic retroviruses*, HTLV III) von Robert Gallo (*National Institutes of Health* (NIH), USA) beschrieben (GALLO *et al.* 1984). Aufgrund der Übereinstimmung wurde es ab 1986 einheitlich als HIV-1 bezeichnet (COFFIN *et al.* 1986). Kurz darauf wurde ein ähnliches Virus aus dem Blut zweier Westafrikaner isoliert (CLAVEL *et al.* 1986). Dieses wies morphologische Gemeinsamkeiten mit HIV-1 auf, unterschied sich jedoch deutlich in den Hüllproteinen und wurde als HIV-2 bezeichnet. 2008 erhielten Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi für die Entdeckung des HIV-Virus den Nobelpreis für Medizin.

HIV-1 und HIV-2 sind eng mit den Immundefizienzviren der Affen (SIV, *simian immunodeficiency virus*) verwandt. Vermutlich wurde HIV durch mehrere Transmissionen verschiedener SIV-Subtypen auf den Menschen übertragen (HAHN *et al.* 2000; REEVES and DOMS 2002). Phylogenetische Analysen ergaben eine enge Verwandtschaft zwischen HIV-1 und SIV des Schimpansen *Pan troglodytes* (SIVcpz, *chimpanzees*) (GAO *et al.* 1999; WOROBAY *et al.* 2008). HIV-2 entstand vermutlich durch Übertragung des SIV der Halsbandmangabey *Cercocebus atys* (SIVsm, *sooty mangabey*) auf den Menschen (GAO *et al.* 1992; SHARP *et al.* 1995).

### 2.1.1 Pathogenese der HIV-1 Infektion

HIV ist eine Infektion des Immunsystems, da CD4+ T-Zellen die Hauptzielzellen des Virus darstellen (WALKER and McMICHAEL 2012). Die Krankheit kann sehr unterschiedlich verlaufen, wobei bei einigen Patienten AIDS innerhalb eines Jahres ausbricht (*rapid progressors*) und andere wiederum jahrzehntelang ohne Therapie auskommen (LTNPs (*long-term non-progressors*) und *Elite controllers*) (DEEKS and WALKER 2007).

Kurz nach der Infektion kann ein akutes HIV-Syndrom, wie z.B. Fieber oder Lymphknotenschwellung, auftreten. In dieser Phase von meist vier Wochen kommt es zu einem starken Anstieg der Viruslast und einer deutlichen Abnahme der CD4+ T-Zellzahl (Abbildung 2.1.1). Gleichzeitig reagiert das Immunsystem mit einer HIV-spezifischen Immunantwort, wodurch die Viruslast bis zum viralen Setpoint, der maßgeblich die Progression der Krankheit beeinflusst, sinkt. Es folgt eine Periode von mehreren Jahren, in denen die meisten Patienten keine Symptome aufweisen (chronische Phase). Die Zahl der CD4+ T-Zellen stabilisiert sich, nimmt jedoch allmählich im weiteren Verlauf ab. Sinkt die CD4+ T-Zellzahl unter 200 Zellen/ $\mu$ l und wird zugleich ein Anstieg der Viruslast detektiert, muss mit AIDS-definierenden Erkrankungen gerechnet werden, die ohne Behandlung in kurzer Zeit zum Tod führen. Zu diesen zählen opportunistische Infektionen, die durch Viren, Bakterien oder Pilze ausgelöst werden, aber auch Kaposi-Sarkome und Lymphome.

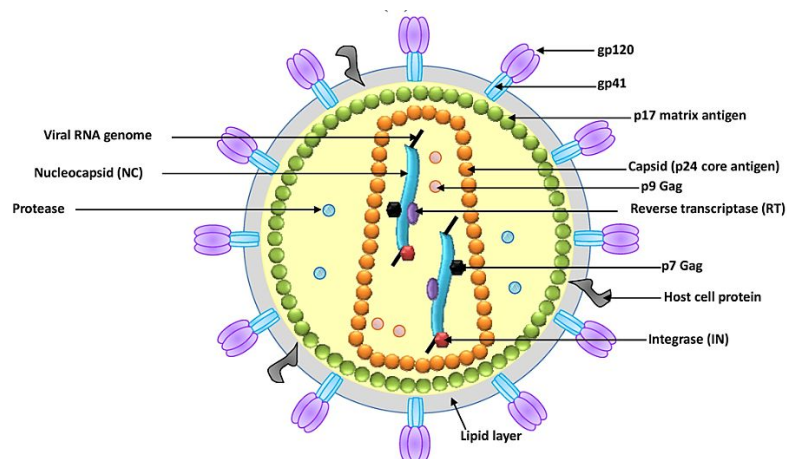


**Abbildung 2.1.1 Schematischer Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion.**

Zeitlicher Zusammenhang zwischen Anzahl der CD4+ T-Zellen pro  $\mu$ l und Viruslast (HIV RNA (Kopien pro ml Blutplasma)). Quelle: (HOFFMANN CHRISTIAN 2014)

### 2.1.2 Morphologie der HIV-Partikel

Die HIV-Partikel haben einen Durchmesser von ca. 100 nm und sind von einer Lipidmembran umhüllt, die von der Wirtszelle abstammt (Abbildung 2.1.2). In die Lipidmembran sind 10-30 trimere Proteinkomplexe eingebettet (CHERTOVA *et al.* 2002; ZHU *et al.* 2003; ZHU *et al.* 2006), die aus den zwei nicht-kovalent miteinander verbundenen Glykoproteinen gp41 und gp120 bestehen (WHITE *et al.* 2010). Direkt unter der Virushülle liegen die mit der Lipidmembran assoziierten Matrixproteine p17. Im Partikelinneren befinden sich das konisch geformte p24 Kapsid. Dieses enthält das virale Genom in Form zweier identischer einzelsträngiger RNA-Moleküle, die mit den Nukleokapsidproteinen p7 und der reversen Transkriptase komplexiert sind. Im HI-Virus sind zudem die viralen Enzyme Integrase und Protease enthalten, die für die HIV Replikation unerlässlich sind.

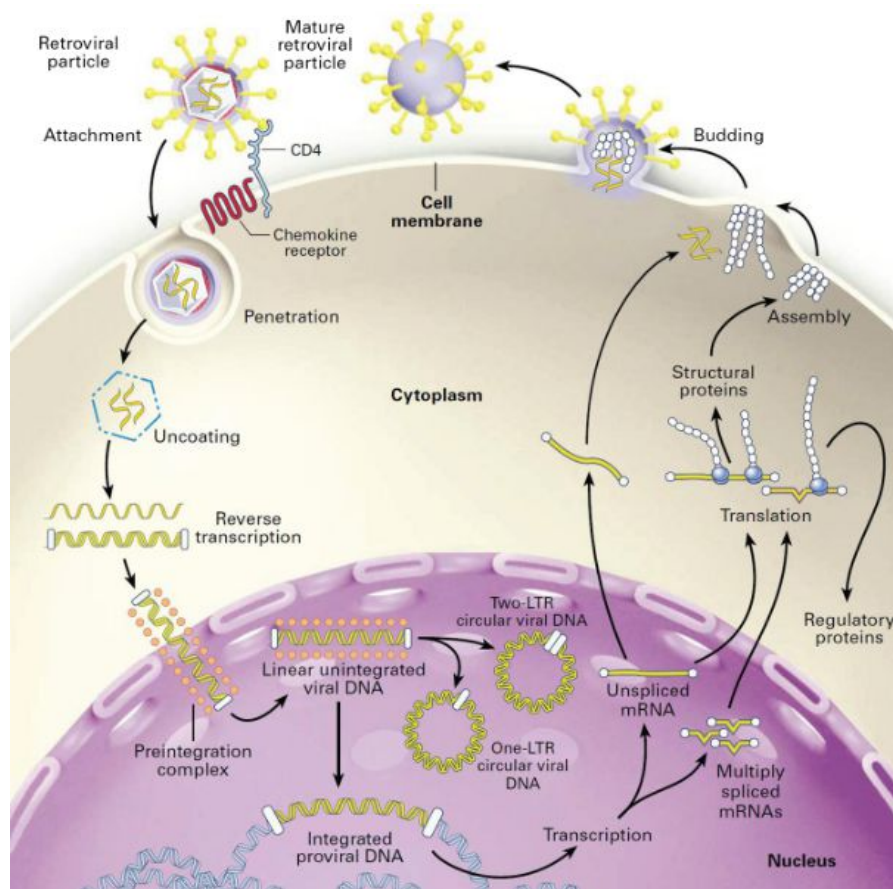


**Abbildung 2.1.2 Schemata reifer HIV-Partikel.**

Das HI-Virus ist von einer Lipidmembran (*lipid layer*) umgeben, in welche die viralen Hüllproteine gp120 und gp41 eingebettet sind. Die Innenseite der Membran ist mit den Matrixproteinen p17 ausgekleidet. Im Virion befindet sich das Kapsid p24, das zwei RNA-Moleküle, die mit den Nukleokapsidproteinen p7 verbunden sind, sowie die reverse Transkriptase, Integrase und Protease enthält. Quelle: (SHUM *et al.* 2013)

### 2.1.3 Replikationszyklus von HIV

Der Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des viralen, trimeren Hüllproteins gp120 an den primären CD4-Rezeptor und einen Chemokinkorezeptor (CXCR4 oder CCR5) (Abbildung 2.1.3) (MADDON *et al.* 1986; McDOUGAL *et al.* 1986; SATTENTAU and WEISS 1988). Zielzellen von HIV-1 sind daher jegliche CD4+ Zellen, wie T-Helferzellen, dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen. Die sequentiellen Rezeptorbindungen induzieren konformationelle Änderungen im Glykoprotein gp120 gefolgt von gp41 und bedingen die Verschmelzung von viraler und zellulärer Lipidmembran, wodurch das Kapsid samt Inhalt ins Zytoplasma gelangt (CHAN and KIM 1998; ECKERT and KIM 2001). Der Eintrittsprozess wird detailliert in Kapitel 2.1.4 erläutert. Möglicherweise findet jedoch die Fusion nicht an der äußeren Zellmembran, sondern nach Endozytose im Zellinneren statt (MELIKYAN 2008; MIYAUCHI *et al.* 2009a; MIYAUCHI *et al.* 2009b; SLOAN *et al.* 2013). Im Zytoplasma wird die reverse Transkriptase aktiviert, die einen HIV-RNA-Strang in komplementäre, doppelsträngige DNA (cDNA) umschreibt. Die cDNA wird in den Zellkern transportiert (MILLER *et al.* 1997). Das virale Enzym Integrase baut die virale cDNA in die chromosomale DNA der Zelle ein (BROWN *et al.* 1989; MILLER *et al.* 1997; WU 2004). Das nun als integriertes Provirus vorliegende Genom weist einen charakteristischen Aufbau auf: die kodierenden Bereiche sind auf beiden Seiten von identischen regulatorischen Sequenzen, den sog. LTRs (*long terminal repeats*), flankiert und weisen Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren auf (NABEL and BALTIMORE 1987; JONES and PETERLIN 1994). Die mRNAs werden in das Zytoplasma transportiert und in Proteine translatiert. Anschließend setzen sich virale Vorläuferproteine mit der HIV-RNA an der Innenseite der Lipidmembran zusammen (*assembly*) und unreife Virionen werden unter Mitnahme des zellulären Membrananteils freigesetzt (*budding*). Die virale Protease spaltet die Vorläuferproteine in Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsid-Proteine sowie reverse Transkriptase und Integrase für die Reifung zu infektiösen Viren (*maturation*) (BUKRINSKAYA 2004).



**Abbildung 2.1.3** Replikationszyklus von HIV-1.

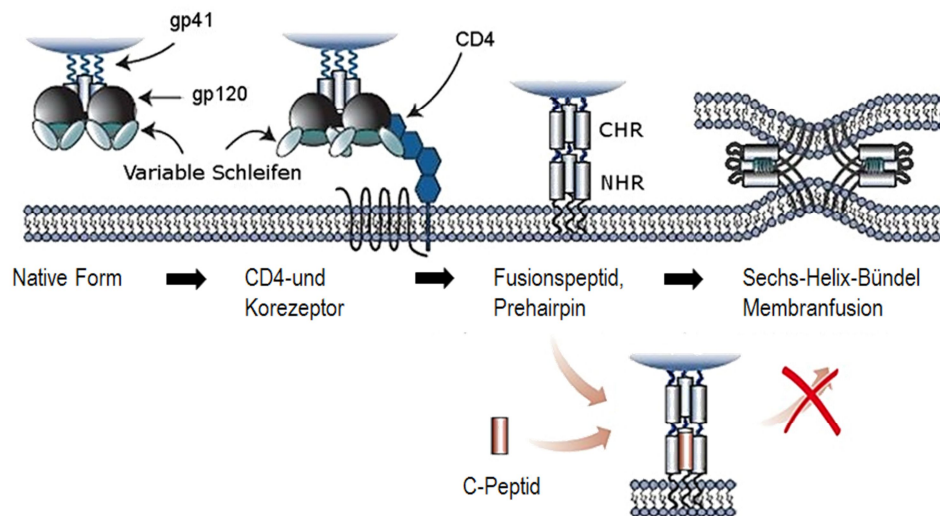
Die viralen Glykoproteine gp120 und gp41 binden den CD4-Rezeptor und einen Chemokinkorezeptor der Zielzelle. Durch die nachfolgende Membranfusion gelangt das virale Kapsid in das Zellinnere (*uncoating*). Anschließend katalysiert die reverse Transkriptase die Synthese von zur viralen RNA komplementärer cDNA, die durch die viruseigene Integrase in das Wirtsgenom eingebaut wird. Die viralen Gene werden transkribiert und translatiert. Abschließend werden die HIV Proteine und das RNA-Transkript an der Lipidmembran zusammengebaut (*assembly*), freigesetzt (*budding*) und reifen zu infektiösen HI-Viren (*maturation*). Quelle: (PASTERNAK *et al.* 2013)

### 2.1.4 Eintritt von HIV in seine Zielzellen

Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit einer unspezifischen Anlagerung des Virions an Heparansulfate oder Integrine der zu infizierenden Zelle (SAPHIRE *et al.* 2001; CICALA *et al.* 2009). Die trimeren Hüllproteine gp120 und gp41 vermitteln den Eintritt von HIV-1 in dessen Zielzellen (Abbildung 2.1.4) (WYATT and SODROSKI 1998). Gp120 bindet zunächst den CD4-Rezeptor der Zielzellen (DALGLEISH *et al.* 1984; KLATZMANN *et al.* 1984; MADDON *et al.* 1986). Der CD4-Rezeptor besteht aus hintereinander angeordneten Immunglobulinomänen und ist für HIV-1 und HIV-2 der primäre Rezeptor. Dennoch

können einige HIV-Isolate ihre Zielzellen auch unabhängig von CD4 infizieren (REEVES *et al.* 1999). Die CD4-Bindung induziert eine Konformationsänderung im gp120, insbesondere kommt es zu einer Umlagerung der V3 Schleife des gp120 und zur Bildung der gp120 "*Bridging sheet*", wodurch die Bindungsepitope für die nachfolgende Korezeptorbindung exponiert werden (Abbildung 2.1.4) (KWONG *et al.* 1998; LIU *et al.* 2008). Die wichtigsten Korezeptoren sind die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4. Diese gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus sieben Transmembrandomänen. Die Aminosäuresequenz der gp120 V3-Schleife bestimmt wesentlich den Tropismus von HIV und damit die Art des verwendeten Chemokinrezeptor, d. h. ob CXCR4, CCR5 oder beide verwendet werden (BERSON *et al.* 1996; CHOE *et al.* 1996; DENG *et al.* 1996; DORANZ *et al.* 1996; FENG *et al.* 1996). Die Bindung des gp120 an den Korezeptor verursacht Konformationsänderungen im transmembranen Glykoprotein gp41 (Abbildung 2.1.4). Zunächst erfährt der N-terminale Teil des trimeren gp41 eine Konformationsänderung, wodurch gp41 in einen fusionsaktivierten Zustand versetzt wird (CHAN and KIM 1998). Hierbei inseriert das hydrophobe N-terminale Fusionspeptid in die Membran der Zielzelle und induziert die Bildung einer transienten Haarnadelschleife (*prehairpin*) (CHAN and KIM 1998; FURUTA *et al.* 1998; DOMS and TRONO 2000). Bei der folgenden Oligomerisierung der drei N- mit den drei C-terminalen Heptadwiederholungen entsteht das Sechs-Helix-Bündel (6-HB) (CHAN *et al.* 1997; TAN *et al.* 1997; WEISSENHORN *et al.* 1997; CAFFREY *et al.* 1998), wodurch zelluläre und virale Lipidmembran in räumliche Nähe gebracht werden und die Energiebarriere für die Membranfusion überwunden wird (HUGHSON 1997; MELIKYAN *et al.* 2000). Nach der sog. Hemifusion bilden sich zunächst kleine Poren in der Membran, die zu einer großen Pore expandieren, wodurch der Inhalt des Virus in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangt (MUNOZ-BARROSO *et al.* 1998; MELIKYAN 2008).





**Abbildung 2.1.4** Postulierter Mechanismus des Eintritts von HIV und Inhibition durch C-Peptide.

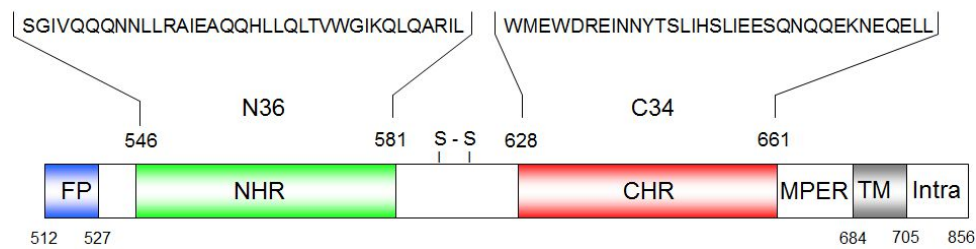
Native Form des trimeren gp120/gp41-Glykoproteinkomplexes auf der Oberfläche freier Virionen (links in der Abbildung). Nach Interaktion des gp120 mit den Rezeptoren der Zielzelle (CD4- und Korezeptor) führt eine Konformationsänderung im gp41 zur Insertion des N-terminalen Fusionspeptides in die Zellmembran und zur Ausbildung der „Prehairpin“ Struktur. Durch Umlagerung der N- und C-terminalen Heptadwiederholungen (NHR, CHR) kommt es zur Bildung des Sechshelix-Bündels (6-HB), wodurch sich virale und zelluläre Membran nähern und fusionieren. C-Peptide, die auf der Aminosäuresequenz der CHR basieren, verhindern die Bildung des 6-HBs. Adaptiert nach (MOORE and DOMS 2003).

## 2.2 Gp41 und Fusionsinhibitoren

### 2.2.1 Transmembranes HIV-1 Hüllprotein gp41

Das Glykoprotein gp41 wird in drei Bereiche unterteilt (Abbildung 2.2.1): Ektodomäne (Aminosäuren (AS) 512-683), transmembrane Domäne (TM, AS 684-705) und intrazellulärer Bereich (Intra, AS 706-856). Die Nummerierung basiert auf der HIV-1 HXB2 Aminosäuresequenz des gp160 (LEITNER T *et al.* 2005). Die Ektodomäne ist stark konserviert und besteht ihrerseits aus verschiedenen Regionen (Abbildung 2.2.1) (MONTERO *et al.* 2008; GARG *et al.* 2011):

- das N-terminale hydrophobe, Glycin-reiche Fusionspeptid (FP) (AS 512-527)
- polare Region (AS 528-545)
- zwei  $\alpha$ -helikale Heptadwiederholungen (*heptad repeat*, HR): N-terminal (NHR) (AS 546-581) und C-terminal (CHR) (AS 628-661)
- eine hydrophile Schleife, die durch eine Disulfidbrücke gebildet wird (AS 598-604)
- die Tryptophan-reiche MPER (*membran-proximal external region*, AS 662-683).



**Abbildung 2.2.1 Das transmembrane Glykoprotein gp41 des HIV-1.**

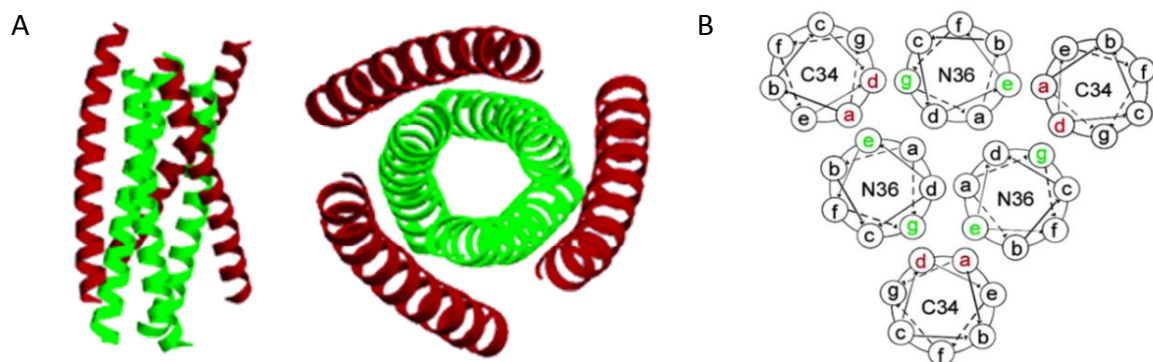
Die transmembrane Domäne (TM) unterteilt das gp41 in eine Ektodomäne und eine Endodomäne (intrazellulärer Bereich, Intra). Die Ektodomäne besteht aus dem hydrophoben Fusionspeptid (FP) und zwei  $\alpha$ -helikalen Bereichen (NHR, N-Heptadwiederholung; CHR, C-Heptadwiederholung), die über eine flexible Gelenkregion miteinander verbunden sind. Adaptiert nach (HE *et al.* 2008).

Während des HIV-1 Eintritts in die Zielzelle wird durch Konformationsänderungen im gp41 das 6-HB ausgebildet (Abbildung 2.1.4, Abbildung 2.2.2 A und B). Hierbei oligomerisieren drei NHRs zu einem verdrehten Bündel (trimere Coiled-Coil-Struktur). Anschließend lagert sich jeweils eine CHR in antiparalleler Orientierung an die hydrophobe Bindungstasche an, die durch zwei benachbarte NHRs gebildet wird. Auf diese Weise entsteht die fusionsaktive Struktur von sechs verdrehten Helices (CHAN *et al.* 1997; TAN *et al.* 1997; WEISSENHORN *et al.* 1997). Beide Heptadwiederholungen weisen folgende strukturelle Eigenschaften auf. NHR und CHR bestehen aus einem Wiederholungsmuster von sieben Aminosäuren ((abcdefg)<sub>n</sub>), die charakteristisch für  $\alpha$ -Helices ist (PAULING and COREY 1953; WATSON and CRICK 1953; O'SHEA *et al.* 1989). Die  $\alpha$ -Helix ist eine rechtshändige, gedrehte Spirale mit 3,6 Aminosäuren pro Umdrehung. Stabilisiert wird sie durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonylsauerstoff der n-ten und dem Amidproton der (n+4)-ten Aminosäure desselben Moleküls. Die hydrophoben Aminosäuren der Heptadwiederholungen nehmen die Positionen a und d ein, d. h. sie finden sich alternierend aller drei oder vier Positionen voneinander entfernt. Da eine Helixwindung genau 3,6 Aminosäuren enthält, vereinen sich die a und d gelegenen, d.h. 4,3-Reste, zu einer hydrophoben Kontaktfläche. Die Abfolge der Aminosäuren lässt sich im sog. Helixrad darstellen (Abbildung 2.2.2 B) (SCHIFFER and EDMUNDSON 1967).

Die NHR besteht aus 36 Aminosäuren (N36) mit einem hohen Anteil der Aminosäuren Leucin/Isoleucin und hat die Form eines Isoleucin-Reißverschlusses (HARBURY *et al.* 1994). Während der Oligomerisierung bilden sich hydrophobe Kräfte zwischen den Positionen a

und d von drei Helices aus (Abbildung 2.2.2 B), die sich umeinander winden und die Struktur einer Superhelix (Coiled-Coil-Struktur) annehmen (Abbildung 2.2.2 A). Insbesondere lagern sich die Helices in einer „knobs-into-holes-Form“ zusammen (WATSON and CRICK 1953; CHAN *et al.* 1997). Die hydrophoben Aminosäuren der Positionen a und d (*knobs*) inserieren hierbei in die Grube (*hole*), die durch vier Aminosäuren der benachbarten Helix gebildet wird.

Die amphipathische CHR besteht aus 34 Aminosäuren (C34) und hat einen hohen Anteil von Tryptophanresten. Während der Fusion lagern sich die CHRs in antiparalleler Orientierung in die von den NHRs gebildeten Furchen ein, wodurch das Sechs-Helix-Bündel entsteht (Abbildung 2.2.2 A) (LU *et al.* 1995). Die hydrophoben Aminosäuren an den Positionen e und g der NHR interagieren hierbei mit den Aminosäuren an den Positionen a und d der CHR (Abbildung 2.2.2 B) (CHAN *et al.* 1997).



**Abbildung 2.2.2** Das transmembrane Glykoprotein gp41 des HIV-1.

(A) Kristallstruktur des N36/C34-Komplexes. Drei NHRs (grün) bilden eine trimere Coiled-Coil-Struktur, welche von drei CHRs (rot) umschlossen wird und als Sechs-Helix-Bündel bezeichnet wird. Seitenansicht (links) und Aufsicht (rechts). Modifiziert mit PyMol nach (CHAN *et al.* 1997). (B) Helikale Raddarstellung des Sechs-Helix-Bündels. Die hydrophoben Aminosäuren der NHR an den Positionen a und d bilden ein hydrophobes Band, wodurch die trimere Coiled-Coil-Struktur entsteht. Die Aminosäuren der Positionen e und g der NHR formen die hydrophobe Furche für die Interaktion mit den Aminosäuren an den Positionen a und d der CHR. Quelle: (CHAN *et al.* 1997)

### 2.2.2 Gp41-abgeleitete Fusionsinhibitoren

Der virale Eintritt bietet eine attraktive Angriffsmöglichkeit für therapeutische Interventionen, da dieser extrazellulär ablaufende Prozess für antivirale Substanzen zugänglich ist. Peptide, die von der Aminosäuresequenz der HIV CHR abgeleitet sind, sog. C-Peptide, können durch Bindung der NHR die Bildung des 6-HBs und somit Fusion und Eintritt von HIV verhindern (Abbildung 2.1.4) (WILD *et al.* 1994; FURUTA *et al.* 1998).

### Synthetisch-hergestellte Fusionsinhibitoren

Der weltweit erste zugelassene Fusionsinhibitor für die Behandlung von HIV-1 Patienten war das synthetisch-hergestellte C-Peptid T-20 (Enfuvirtide, Fuzeon®, Hoffmann-La Roche & Trimeris, 2003) (ROBERTSON 2003; MATTHEWS ET AL. 2004). T-20 besteht aus 36 Aminosäuren und ist von der Aminosäuresequenz der CHR des HIV-1 HXB2 abgeleitet (AS 638-673) (Tabelle 2.2.1) (WILD *et al.* 1993). T-20 hemmt *in vitro* Labor- und Primärisolate im nanomolaren Konzentrationsbereich (WILD *et al.* 1994). Es reduziert die Viruslast *in vivo*, wodurch die CD4+ T-Zellzahl signifikant zunimmt (LAZZARIN *et al.* 2003). Bei der Verabreichung des Fusionsinhibitors entstehen keine bedeutsamen Nebenwirkungen (KILBY *et al.* 1998). Folgende Nachteile verhindern indes eine weitreichende Applikation:

- T-20 muss als Peptid chemisch synthetisiert werden und verursacht angesichts seiner Größe hohe Herstellungskosten (MATTHEWS *et al.* 2004). Es wird bereits versucht die Herstellungskosten zu minimieren (KOSANA *et al.* 2014).
- Aufgrund der fehlenden oralen Bioverfügbarkeit und der geringen Halbwertszeit im Plasma (ca. 2h) müssen 2x täglich 90mg subkutan appliziert werden (KILBY *et al.* 1998).
- Die hohe Replikationsrate und die Ungenauigkeit der reversen Transkriptase bedingen bei einer Monotherapie innerhalb von 14 Tagen T-20-resistente Viren (WEI *et al.* 2002). Insbesondere treten Mutationen in der NHR-Sequenz <sup>547</sup>GIV<sup>549</sup> auf (WEI *et al.* 2002; GREENBERG and CAMMACK 2004).

Eine Weiterentwicklung des Fusionsinhibitors T-20 ist das C-Peptid C46 (EGELHOFER *et al.* 2004). Dieses besteht aus 46 Aminosäuren und basiert auf der Aminosäuresequenz der CHR des HIV-1 HXB2 (AS 628-673) (Tabelle 2.2.1). Die zehn zusätzlichen Aminosäuren am

N-Terminus minimieren das Risiko der Entstehung resistenter HI-Viren (EGELHOFFER *et al.* 2004; CHANG and HSU 2007). Um die Nachteile synthetischer Peptide zu umgehen, wurde durch genetische Veränderung der Zielzellen von HIV-1 das Peptid C46 auf der äußeren Zellmembran verankert (EGELHOFFER *et al.* 2004). Nach längerer *in vitro* Passagierung in Gegenwart steigender Peptidkonzentrationen konnte zwar gegen das membranverankerte C46 ein HIV-Isolat mit verminderter C46-Sensitivität selektioniert werden, dieses wies jedoch keine vollständige Resistenz auf (HERMANN 2007).

T-1249 (Tifuvirtide, Hoffmann-La Roche & Trimeris) ist ein Peptid der zweiten Generation der Fusionsinhibitoren (DE CLERCQ 2002). T-1249 umfasst 39 Aminosäuren, abgeleitet von der Aminosäuresequenz der CHR von HIV-1, HIV-2 und SIV (AS 628-673) (Tabelle 2.2.1) (SCHNEIDER *et al.* 2005). Diesem Peptid fehlt eine Heptadwiederholung (AS 637-643). T-1249 weist im Vergleich zu T-20 eine bessere antivirale Aktivität sowie eine längere Halbwertszeit auf. Zudem ist es gegen HIV-2 und SIV aktiv (ERON *et al.* 2004; LALEZARI *et al.* 2005). 2004 wurde die klinische Weiterentwicklung aufgrund von Problemen im Herstellungsprozess abgebrochen (MARTIN-CARBONERO 2004). In Anwesenheit steigender T-1249-Konzentrationen wurden *in vitro* resistente Viren generiert, die Mutationen im GIV-Motiv aufwiesen und zugleich T-20-kreuzresistent waren (EGGINK *et al.* 2008).

SC35EK ist ein Repräsentant der dritten Generation der Fusionsinhibitoren. Dieses künstliche Peptid besteht aus 35 Aminosäuren und ist eine lösliche Peptidvariante des C34 von gp41 (Tabelle 2.2.1) (OTAKA *et al.* 2002). SC35EK besteht aus fünf Wiederholungen des Motivs Z-EE-ZZ-KK. Konservierte Aminosäuren des HIV-1 HXB2 (Z) wurden beibehalten, da diese essentiell für die Interaktion mit der NHR sind (Positionen a, d und e in Abbildung 2.2.2 C). Nichtkonservierte Aminosäuren, die im Sechs-Helix-Bündel nach außen zeigen, wurden durch die hydrophilen Aminosäuren Glutamat (E) und Lysin (K) ersetzt. Dies ermöglicht die Ausbildung intramolekularer Salzbrücken zwischen den Aminosäuren der Position n und n+4. Folglich wird die  $\alpha$ -helikale Peptidstruktur stabilisiert und die Löslichkeit erhöht (MARQUSEE and BALDWIN 1987). SC35EK weist eine 10x höhere antivirale Aktivität im Vergleich zu T-20 auf (OTAKA *et al.* 2002).

Gustchina *et al.* verglichen und charakterisierten die fusionshemmenden Eigenschaften von C34-abgeleiteten Peptiden (AS 628-661) diverser lentiviraler Stämme (GUSTCHINA *et al.*

2005). Das C34 Peptid, welches vom HIV-2 Stamm EHO abgeleitet ist (C34-EHO), hemmte sehr effektiv den Eintritt von HIV und SIV in die Zielzelle. Das HIV-2 Isolat EHO wurde 1989 von einem AIDS-Patienten der Elfenbeinküste isoliert und als äußerst pathogen beschrieben (REY *et al.* 1989; REY-CUILLE *et al.* 1994; GALABRU *et al.* 1995). Bei der näheren Charakterisierung von HIV-2 EHO zeigte sich, dass obwohl weniger Viruspartikel im Virusstock vorhanden waren, weit mehr infektiöse Viren produziert wurden (REY-CUILLE *et al.* 1994). Infektionen mit HIV-2 sind üblicherweise weniger pathogen als HIV-1 Infektionen. Somit stellt das HIV-2 EHO Isolat mit der erhöhten Virulenz und des stärkeren zytopathischen Effekts eine Besonderheit dar (REY-CUILLE *et al.* 1994; McCCLURE *et al.* 2000).

**Tabelle 2.2.1 HIV-inhibitorische C-Peptide (- = Deletion).**

Name	Aminosäuresequenz (AS 628-673)	Ursprung
C46	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	HIV-1 HXB2
T-20	-----YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	HIV-1 HXB2
T-1249	WQEWQKIT-----ALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF	HIV-1/-2, SIV
SC35EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKNEEELKK-----	HIV-1 HXB2
C34-EHO	WQQWERQVRFLDANITKLLLEEAQIQQEKNMVELQ-----	HIV-2 EHO

### **Expression von Fusionsinhibitoren im biologischen System**

Seit den frühen Neunzigerjahren wird eine Kombination verschiedener antiretroviraler Medikamente (cART, *combined anti-retroviral therapy*) zur Behandlung der HIV Infektion eingesetzt, wodurch die Lebenserwartung der Patienten deutlich verbessert wurde (DEEKS *et al.* 2013). Bislang ist eine vollständige Genesung der HIV-1 Patienten nicht möglich, da durch die Etablierung eines latenten proviralen Stadiums das Virus jahrelang persistieren kann und die Funktionalität des Immunsystem nicht wiederherstellbar ist (CHUN *et al.* 1997; FINZI *et al.* 1999; DEEKS 2011; CHUN and FAUCI 2012; BUZON *et al.* 2014). Ferner treten durch die hohe Mutationsrate HI-Viren auf, die gegen die Medikamente resistent sind (KOZAL 2009).

Eine Alternative für HIV Patienten könnte die gentherapeutische Behandlung sein (WOLKOWICZ and NOLAN 2005; ROSSI *et al.* 2007; DIDIGU and DOMS 2014). Durch eine funktionelle Heilung wird die HIV Infektion des Patienten eingedämmt, wohingegen bei einer sterilisierenden Heilung das Virus vollständig aus dem Patienten entfernt werden würde (KATLAMA *et al.* 2013). Eine funktionelle Heilung kann durch intrazelluläre Immunisierung der Zielzellen von HIV mittels Expression antiviraler Gene erreicht werden (BALTIMORE 1988), wobei die Hemmung früher Schritte im Replikationszyklus vorteilhaft ist (VON LAER 2001). Der gammaretrovirale Vektor M87o kodiert für das antivirale C-Peptid C46 in membranständiger Form (*membrane-anchored C46*, maC46) (EGELHOFER *et al.* 2004). Während des HIV-Eintritts interagiert maC46, welches auf transduzierten Zellen exprimiert wird, mit der Prehairpin-Struktur des viralen gp41 und verhindert die Infektion der HIV Zielzellen (Abbildung 2.1.4). Diese Strategie bietet gegenüber synthetisch-hergestellten Peptiden den Vorteil, dass auf die teure chemische Peptidsynthese verzichtet und die fehlende orale Bioverfügbarkeit umgangen werden kann. In *in vitro* Mischkulturen von nativen T-Zellen mit M87o-transduzierten T-Zellen (Anteil <1%) reichern sich die geschützten T-Zellen während einer HIV-Infektion in der Kultur an (KIMPEL *et al.* 2010). In einer *ex vivo* gentherapeutischen Studie der klinischen Phase I mit dem M87o-Vektor wurde ein transienter Anstieg der CD4+ T-Zellen bei konstant bleibender Viruslast beobachtet, wobei die erhoffte Anreicherung der maC46-exprimierenden T-Zellen in den zehn AIDS Patienten in diesem Fall ausblieb (VAN LUNZEN *et al.* 2007). Dagegen akkumulierten maC46-genetisch modifizierte Stammzellen vermutlich aufgrund des hohen Anteils Transgen-modifizierter Zellen in SHIV-infizierten Makaken (YOUNAN *et al.* 2013). Die Verwendung von genetisch-modifizierten Stammzellen könnte zudem zu einer sterilisierenden Heilung führen, da diese das hämatopoetische System repopulieren und HIV-infizierte Zellen verdrängen könnten (KATLAMA *et al.* 2013).

Aufgrund der hohen Anzahl von ca.  $1 \times 10^9$  können nicht alle T-Zellen im Patienten genetisch modifiziert werden. Eine Alternative bietet die Sekretion von C-Peptiden in den Extrazellularraum durch genetisch-modifizierte Zellen, so dass auch unveränderte Zellen vor einer HIV Infektion geschützt sind (sog. *bystander effect*) (EGERER and VON 2009) (EGERER *et al.* 2011).

## 2.3 Adaptive Immunantwort des humanen Immunsystems

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Krankheitserregern wie Bakterien und Viren. Es besteht aus zwei Systemen: angeborene und adaptive Immunantwort. Pathogene, die die physiologischen Barrieren der Körperoberflächen überwinden, treffen zunächst auf die Effektormechanismen des angeborenen Immunsystems. Dies umfasst phagozytierende Zellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen sowie Zytokine und das Komplementsystem. Reicht diese Abwehr nicht aus, werden Antigen-spezifische Effektorzellen des adaptiven Immunsystems rekrutiert. Diese Immunantwort beruht auf der klonalen Expansion Antigen-spezifischer T- und B-Zellen, die initial durch professionelle APCs (*antigen presenting cells*, z.B. dendritische Zellen) des angeborenen Immunsystems aktiviert wurden. Bei der adaptiven Immunantwort werden infizierte Zellen durch zytotoxische CD8+ T-Zellen zerstört (zelluläre Immunantwort). CD4+ T-Zellen unterstützen durch die Ausschüttung von Zytokinen sowohl CD8+ T-Zellen als auch B-Zellen, welche extrazellulär vorhandene Pathogene durch sezernierte Antikörper binden und beseitigen (humorale Immunantwort).

### 2.3.1 Humorale Immunantwort

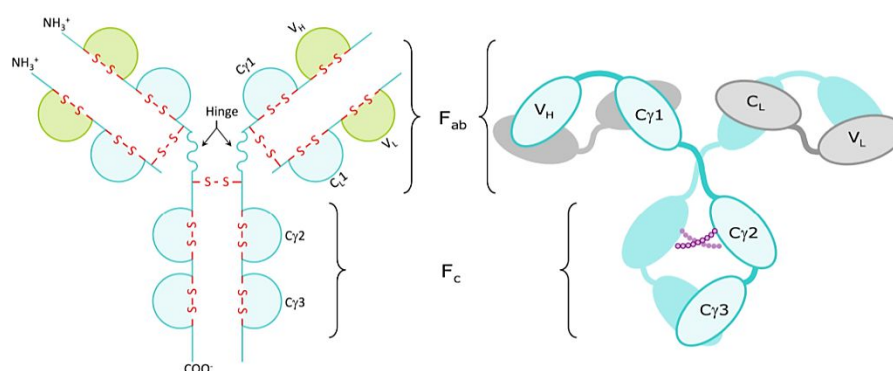
Bei der humoralen Immunantwort werden B-Zellen durch zwei Signale aktiviert. Das erste Signal entsteht durch die Bindung löslicher Antigene an den membranständigen B-Zell-Rezeptor (BZR). Das zweite Signal erhält die B-Zelle von einer aktivierten CD4+ T-Helferzelle. Der Antigen-BZR-Komplex wird internalisiert, die Antigene werden aufbereitet und im Komplex mit einem MHC-II-Molekül auf der Zelloberfläche präsentiert. Das präsentierte Antigen wird vom T-Zell-Rezeptor (TZR) der T-Helferzellen erkannt und führt zur Zytokinausschüttung. Nach klonaler Expansion differenziert die B-Zelle zu einer Antikörper-produzierenden Plasmazelle oder langlebigen Gedächtniszelle.

### Struktur eines IgG-Antikörpers

Antikörper (Synonym: Immunglobulin (Ig)) kommen entweder membranständig in Form des BZRs oder als freie Moleküle im Blut vor. Sie weisen eine Y-förmige Grundstruktur auf und bestehen aus zwei leichten (L, *light*) und zwei schweren (H, *heavy*) Polypeptidketten



(Abbildung 2.3.1). Anhand der schweren Ketten werden Antikörper in die Klassen IgM, IgG, IgD, IgE und IgA mit jeweils unterschiedlichen Strukturen und Funktionen eingeteilt. IgG wird zudem in die vier Subklassen IgG1 bis IgG4 unterteilt. Die leichte Kette besteht aus einer variablen ( $V_L$ ) und einer konstanten ( $C_L1$ ) Domäne. Die schwere Kette weist eine variable ( $V_H$ ) Domäne und drei konstante ( $C\gamma1$ ,  $C\gamma2$ ,  $C\gamma3$ ) Domänen auf. Disulfidbrücken stabilisieren die einzelnen Domänen und verbinden die Ketten miteinander. Die variablen Bereiche der L- und H-Ketten bilden die Fab-Fragmente (*fragment antigen binding*) für die Bindung eines Antigens. Die schweren Ketten bilden das Fc-Fragment (*fragment crystallizable*). Die Gelenkregion (*hinge*) verbindet den Fc-Teil mit den Fab-Teilen. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper basiert auf elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waals Kräften und hydrophoben Interaktionen.



**Abbildung 2.3.1 Aufbau eines Immunglobulin  $\gamma$  (IgG) Antikörpers.**

Immunglobuline sind symmetrisch aufgebaut und bestehen aus dem Fab-Fragment, welches die Antigen-Bindungsstelle enthält, und dem Fc-Fragment. Das Fab-Fragment umfasst je eine leichte und schwere Kette; das Fc-Fragment besteht nur aus schweren Ketten. Leichte und schwere Ketten bestehen aus variablen (V) und konstanten (C) Domänen. Die Gelenkregion (*hinge*) verbindet beide H-Ketten. Quelle: (VAL *et al.* 2012)

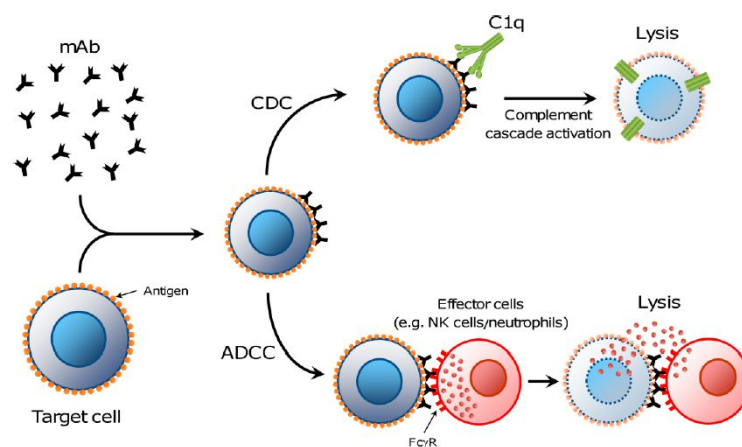
### Funktionen der IgG-Antikörper

Antikörper sind bifunktionelle Moleküle. Die hochvariablen Domänen der Fab-Fragmente können theoretisch mit jedem Antigen interagieren. Zudem besitzen Antikörper einen Fc-Teil über den zwei wichtige Effektorfunktionen vermittelt werden.

Infizierte Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche fremde Proteine/Peptide. Die Bindung dieser Antigene durch IgG Antikörper kann eine Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) auslösen (Abbildung

2.3.2). Hierbei interagiert der Fc-Teil des Antikörpers (Subklasse IgG1, IgG3) mit dem Fc-Rezeptor (FcγRIII Rezeptor (CD16)) der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die ihre lytische Granula bestehend aus den zytotoxischen Proteinen Perforin und Granzym freisetzen. Perforin bildet Poren in der Zellmembran, wodurch Granzym in die Zielzelle eindringt und die Apoptose der Zelle induziert.

Eine weitere Antikörperfunktion stellt das Komplementsystem bestehend aus verschiedenen, hitzeempfindlichen Proteinen dar (*complement-dependent cellular cytotoxicity*, CDC, Abbildung 2.3.2). Nach Bindung inaktiver Komplementproteasen (Zymogen) an den Fc-Teil des Antigen-gebundenen Antikörpers erfolgt eine Aktivierung durch proteolytische Spaltung, wobei das größere Spaltprodukt kovalent haften bleibt und das kleinere Spaltprodukt in das Blutplasma abgegeben wird. Die weitere Bindung und Aktivierung inaktiver Zymogene führt über eine Reaktionskaskade zur Bildung eines Membran-attackierenden Komplexes und zur osmotischen Lyse der Zelle.



**Abbildung 2.3.2: Effektorfunktionen von Antikörpern.**

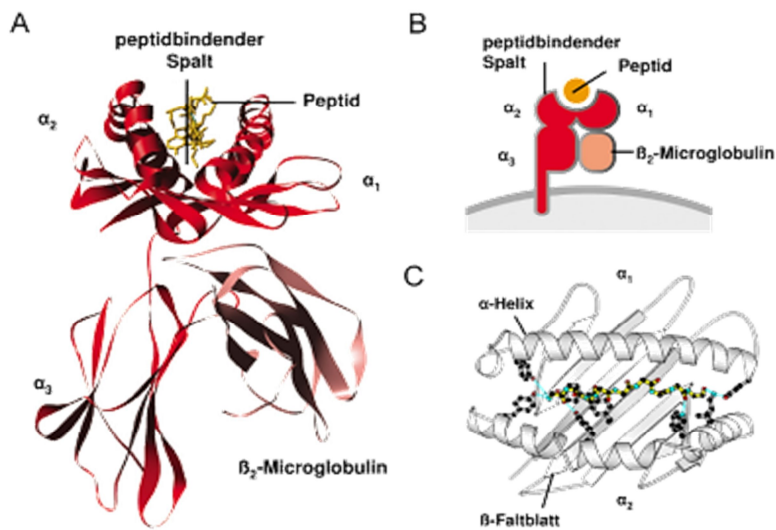
Antikörper binden das Antigen der Targetzellen. Bei der CDC-Antwort (*complement-dependent cellular cytotoxicity*) werden Komplementfaktoren, wie C1q, am Fc-Teil des Antikörpers fixiert und induzieren die osmotische Zelllyse. Bei der ADCC-Antwort (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) bindet der FcR-Rezeptor der Effektorzellen den Antikörper und induziert über die Ausschüttung von Perforin/Granzym die Apoptose. Quelle: (VAL *et al.* 2012).

### 2.3.2 Zelluläre Immunantwort

Bei der T-Zell-vermittelten zellulären Immunantwort werden zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CTL) gebildet, die sich gegen infizierte und entartete Zellen richten. CTLs exprimieren auf der Zelloberfläche den T-Zell-Rezeptor (TZR), der kurze Peptidfragmente im Komplex mit MHC-I-Molekülen erkennt (sog. MHC-Restriktion). Die vollständige CTL-Aktivierung durch kostimulierende Signale induziert über die Sekretion von Perforin/Granzym die Apoptose der Zelle. Zudem sezernieren aktivierte CTLs das Zytokin Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), das in benachbarten Zellen die Expression von MHC-I-Molekülen und somit die Präsentation von intrazellulär abgebauten Peptiden verstärkt.

#### MHC-I-Moleküle

MHC-Moleküle (auch als HLA (*human leukocyte antigen*) bezeichnet) zählen zu den Proteinen mit dem größten Polymorphismus, was sich in einer Vielfalt von mehr als 3500 unterschiedlichen Allelen widerspiegelt (FALK *et al.* 1991). Die von den verschiedenen Allelen kodierten Proteine unterscheiden sich in mindestens einer Aminosäure, wodurch die Art des gebundenen Antigens beeinflusst wird. Es existieren zwei Typen der MHC-Moleküle (WILLIAMS 2001; CHOO 2007). MHC-II-Moleküle werden ausschließlich auf APCs exprimiert und aktivieren CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Hingegen befinden sich MHC-I-Moleküle ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen und aktivieren CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die membranständigen Glykoproteine machen Peptide von degradierten Proteinen aus dem Zytosol (MHC-I-Moleküle) oder dem extrazellulären Raum (MHC-II-Moleküle) für die Erkennung durch T-Zellen zugänglich. Bis zu sechs verschiedene MHC-I-Moleküle können simultan von einer Zelle exprimiert werden. MHC-I-Moleküle sind aus unterschiedlichen Polypeptidketten zusammengesetzt (Abbildung 2.3.3) (WILLIAMS 2001; HOLLÄNDER 2006; CHOO 2007) und präsentieren auf der Zelloberfläche kurze Peptide, die im Zytoplasma durch das Proteasom degradiert wurden (TROMBETTA and MELLMAN 2005). Nach N-terminaler Verkürzung wird im endoplasmatischen Retikulum das Peptidfragment mit dem MHC-I-Molekül zusammengesetzt (YEWDELL and BENNINK 2001; SERWOLD *et al.* 2002; ROCK *et al.* 2004). Die Peptid-beladenen MHC-I-Moleküle gelangen über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche für die Erkennung durch den TZR der CTLs.



**Abbildung 2.3.3 Struktur des MHC-I-Moleküls.**

(A) Bänderdarstellung. Die  $\alpha$ -Kette besteht aus den drei Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$  und ist mit dem monomorphen  $\beta_2$ -Microglobulin assoziiert. (B) Schematische Darstellung von (A). (A),(B) modifiziert nach (ANTHONY L DEFRANCO *et al.* 2008). (C) Polypeptidketten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  bilden die peptidbindende Grube. Modifiziert nach (JANEWAY *et al.* 2002).

### Peptidbindung von MHC-I-Molekülen

MHC-I-Moleküle binden Peptidfragmente in einer länglichen Grube, die von vier gegenläufigen  $\beta$ -Faltblättern und zwei  $\alpha$ -Helices gebildet wird und an den Enden geschlossen ist (Abbildung 2.3.3 C) (BJORKMAN *et al.* 1987; JEREMY M. BERG *et al.* 2002). Die Bindung basiert auf Wasserstoffbrücken, ionischen Wechselwirkungen und hydrophoben Interaktionen (FREMONT *et al.* 1992). Innerhalb der Bindungsgrube sind Taschen lokalisiert, die je nach HLA-Allel unterschiedliche chemische Eigenschaften sowie verschiedene Tiefen bzw. Größen aufweisen. Je nach Beitrag einer Aminosäure zur Bindung des Peptids wird zwischen Haupt- und Nebenkern unterschieden (MATSUMURA *et al.* 1992; ZHANG *et al.* 1998). Die Hauptankeraminosäuren befinden sich vorwiegend am N- und C-Terminus der Peptide, enthalten meist eine spezifische Aminosäure und tragen am stärksten zur Interaktion bei (FALK *et al.* 1991; HUNT *et al.* 1992). HLA-A\*02 bindet z.B. bevorzugt Nonamere mit Leucin oder Methionin an der 2. Position sowie Leucin oder Valin an der 9. Position (HUNT *et al.* 1992; ROTZSCHKE *et al.* 1992). Im Gegensatz zu Hauptankern haben Nebenkern eine geringere Präferenz gegenüber einer Aminosäure (FALK *et al.* 1991; RUPPERT *et al.* 1993; CHEN *et al.* 1994). Die restlichen Positionen sind variabel, wobei jede Tasche bestimmte Aminosäuren bevorzugt. Die Seitenketten der Aminosäuren zeigen nach außen, wo sie durch den TZR der zytotoxischen T-Zellen gebunden werden können.

### 2.3.3 HIV-1-spezifische adaptive Immunantwort

Während der akuten Phase der HIV-1 Infektion kommt es mit dem Anstieg der Viruslast zu einer enormen Ausschüttung verschiedener Zytokine (STACEY *et al.* 2009) sowie durch den hohen Anteil HIV-infizierter Zellen zu einer Expansion zytotoxischer CD8+ T-Zellen, die HIV-1-infizierte Zellen eliminieren oder Zytokine und Chemokine produzieren (WALKER *et al.* 1987; WILSON *et al.* 2000). Die Bildung HIV-1-spezifischer CD8+ T-Zellen korreliert dabei direkt bis zum Erreichen des viralen Setpoints mit der Abnahme der Viruslast (BORROW *et al.* 1994; KOUP *et al.* 1994). Rhesus Makaken mit depletierten CD8+ T-Zellen können die initiale Infektion durch SIV nicht kontrollieren (SCHMITZ *et al.* 1999), wohingegen Vakzin-induzierte CD8+ T-Zellantworten vor einer SIV Infektion schützen (HANSEN *et al.* 2011; FUKAZAWA *et al.* 2012). Die CTL Antwort ist vorwiegend gegen die hoch-variablen Epitope in den viralen Hüllproteinen sowie dem Nef und Gag Protein gerichtet (LICHTERFELD *et al.* 2004; TURNBULL *et al.* 2009). Zu Beginn der Infektion wird lediglich eine geringe Anzahl von CTL Epitopen detektiert, wohingegen die CTL Antwort während der chronischen Phase gegen wesentlich mehr Epitope gerichtet ist (DALOD *et al.* 1999; ALTFELD *et al.* 2001b; ADDO *et al.* 2003). Während der chronischen Phase wurde keine Korrelation zwischen Viruslast und CTL-Antwort festgestellt, jedoch persistieren HIV-1-spezifische CD8+ T-Zellen mit hoher Frequenz (FRAHM *et al.* 2004). Dies ist allerdings von einer kontinuierlichen Stimulation mit Antigenen abhängig, da bei einer antiretroviralen Therapie die Viruslast sowie die Anzahl der HIV-1-spezifischen CD8+ T-Zellen vermindert wird (GRAY *et al.* 1999; KALAMS *et al.* 1999). Die Effektorfunktion der CD8+ T-Zellen nimmt zudem im Verlauf der Krankheit ab, so dass HIV-infizierte Zellen nicht mehr effizient eliminiert werden (DRAENERT *et al.* 2004).

Die HLA-Allele des Patienten haben einen starken Einfluss auf den Krankheitsverlauf (KASLOW *et al.* 1996; GAO *et al.* 2001; CARRINGTON and O'BRIEN 2003; ALTFELD *et al.* 2006). Die HLA-Allele B-27 oder B-57 sind beispielsweise mit einem verlangsamten Krankheitsverlauf aufgrund stärkerer Immunantworten assoziiert (KASLOW *et al.* 2001; SCHNEIDEWIND *et al.* 2007; INTERNATIONAL *et al.* 2010). Im Gegensatz hierzu weisen Patienten mit dem HLA-Allel B-35 oder B-07 eine beschleunigte Progression auf (ITESCU *et al.* 1992; O'BRIEN *et al.* 2001). Die CD8+ T-Zellantwort gegen virale Epitope kann die Vermehrungsfähigkeit von HIV stark

einschränken. Dieser Druck des Immunsystems kann zu einer Änderung der HIV Sequenz (sog. Escape-Mutation) führen (PHILLIPS *et al.* 1991), die entweder die Replikationsfähigkeit wieder herstellt oder zur Kontrolle der Infektion führt (GOULDER *et al.* 1997; LESLIE *et al.* 2004). Der Einfluss der HLA-Allele kann allerdings nicht generalisiert werden, da in Individuen mit gleichen HLA-Allelen die Antigenprozessierung verschieden verläuft (CARLSON and BRUMME 2008). Zudem unterscheiden sich die T-Zellrezeptoren zwischen den Individuen (ARSTILA *et al.* 1999).

Der Krankheitsverlauf geht mit einem Verlust der CD4+ T-Zellen einher, welche für die Initiierung, Aufrechterhaltung und das Abklingen der humoralen und zellulären Immunantwort notwendig sind (ALIMONTI *et al.* 2003; SOGHOIAN *et al.* 2012; MATRAJT *et al.* 2014). Insbesondere folliculäre T-Helferzellen scheinen Zielzellen von HIV und wichtig für die HIV-spezifische humorale Immunantwort zu sein (PETROVAS *et al.* 2012; CUBAS *et al.* 2013; PERREAU *et al.* 2013; PETROVAS and KOUP 2014). Während der akuten Phase kommt es zu einem hohen Verlust von infizierten CD4+ T-Gedächtniszellen sowie aktivierten HIV-1-spezifischen CD4+ T-Zellen (DOUEK *et al.* 2002; DOUEK *et al.* 2009; DOITSH *et al.* 2014). Zudem werden während der akuten und chronischen Phase nicht nur CD4+ T-Zellen des peripheren Blutes, sondern auch des Darmassoziierten Immunsystems (GALT, *gut associated lymphoid tissue*), eliminiert (GUADALUPE *et al.* 2003; COSTINIUK and ANGEL 2012; CAVARELLI and SCARLATTI 2014). In einem geringen Anteil der CD4+ T-Gedächtniszellen etabliert HIV-1 sein latentes Reservoir, von dem aus jahrelang HI-Viren freigesetzt werden (CHUN and FAUCI 2012; BUZON *et al.* 2014). HIV-1-infizierte Patienten mit einem äußerst verlangsamten Krankheitsverlauf weisen eine starke CD4+ T-Zellantwort auf (ROSENBERG *et al.* 1997). Bei einer HIV-1 Infektion ist die CD8+ T-Zellantwort meist stärker ausgebildet im Vergleich zur CD4+ T-Zellantwort (RAMDUTH *et al.* 2005). Die Eliminierung von CD4+ T-Zellen im Mausmodell verschlechtert deutlich die CD8+ T-Zellantwort und hat damit direkt Auswirkungen auf die CTL Antwort (RAMDUTH *et al.* 2005). CD4+ T-Zellen werden gegen alle viralen HIV-1 Proteine gebildet, wobei Gag und Nef Epitope vermehrt detektiert werden (KAUFMANN *et al.* 2004). Analog zur CTL-Antwort wurde auch bei MHC-II-Epitopen ein Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf beobachtet (JULG *et al.* 2011; RANASINGHE *et al.* 2013).

Kurz nach der akuten Phase der Infektion werden HIV-1-spezifische Antikörper gegen die Matrixproteine p17 und die Hüllproteine gp120/gp41 im Plasma der Patienten detektiert (BINLEY *et al.* 1997; FIEBIG *et al.* 2003). HIV-1 neutralisierenden Antikörper sind meist gegen ein früheres Virusisolat gerichtet (MOOG *et al.* 1997; RICHMAN *et al.* 2003; AASA-CHAPMAN *et al.* 2004). Die Hüllproteine gp120 und gp41 sind aufgrund ihrer oligomeren Form, starken Glykosylierung und sterischen Behinderung für neutralisierende Antikörper schwer zugänglich (WYATT and SODROSKI 1998; HUBER and TRKOLA 2007). Neutralisierende Antikörper gegen gp120 (CD4-Bindungsdomäne, Schleifen (V1, V2, V3)) und gp41 MPER entstehen im späten Krankheitsverlauf bei einem Teil der Patienten (SCHEID *et al.* 2011; WALKER *et al.* 2011; WU *et al.* 2011), müssen jedoch einen Reifungsprozess durch erneute Antigenbindung durchlaufen (KWONG *et al.* 2013). Passiver Transfer neutralisierender Antikörper kann im Tiermodell vor einer Infektion schützen (MASCOLA *et al.* 2000; MOLDT *et al.* 2012). Jedoch können auch nicht-neutralisierende Antikörper über Effektormechanismen, wie z.B. ADCC, CDC oder Opsonisierung, zur Beseitigung des Virus beitragen (HUBER and TRKOLA 2007). Analog zur CD8+ T-Zellantwort kommt es auch hier durch den Druck des Immunsystems zu Escape-Mutationen im HIV Genom (RICHMAN *et al.* 2003; FROST *et al.* 2005).

Die starke Variabilität in der HIV-1 Aminosäuresequenz beeinflusst die humorale und die zelluläre Immunantwort und macht es schwierig einen breit wirkenden Wirkstoff zu entwickeln. Zum einen existieren innerhalb eines Patienten sog. HIV Quasispezies, da die reverse Transkriptase etwa eine Mutation pro Replikationszyklus einfügt (SHANKARAPPA *et al.* 1999; MALIM and EMERMAN 2001). Zum anderen wirkt das Immunsystem des Wirtes als treibende Kraft für die Evolution des Virus im Patienten. Durch die kontinuierliche Mutation der RNA entsteht eine hohe antigene Variabilität der viralen Glykoproteine und führt zu Mutationen in den Antikörperepitopen und den HLA-restringierten Epitopen, die folglich nicht mehr gebunden werden können (BORROW *et al.* 1997; GOULDER *et al.* 1997; STAMATATOS *et al.* 2009). Der Verlust der CD4+ T-Zellen sowie die chronische Immunaktivierung, entzündliche Prozesse, Eliminierung nicht-infizierter Zellen sowie die verschlechterte T-Zellregeneration beeinträchtigen maßgeblich die humorale und zelluläre Immunantwort (DEEKS 2011; CHOWDHURY and SILVESTRI 2013; MIEDEMA *et al.* 2013).

## 2.4 Immunogenität von therapeutischen Proteinen/Peptiden

### 2.4.1 Einflussfaktoren auf die Immunogenität

In Abhängigkeit von der Art des Therapeutikums unterscheiden sich die Immunantworten. Bei Applikation eines synthetisch-hergestellten, löslichen Therapeutikums werden vornehmlich Antikörper produziert, wohingegen bei intrazellulärer Expression zusätzlich eine zelluläre Immunantwort auftreten kann.

Eine unerwünschte Immunantwort kann gegen Peptidtherapeutika durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden und bedingt eventuell einen negativen Effekt bezüglich Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Therapeutikums (PORTER 2001; SCHELLEKENS and CASADEVALL 2004; SCHELLEKENS 2005; HOLLÄNDER 2006; CHIRMULE *et al.* 2012). Aus diesem Grund wurde von der EU-Behörde EMA die Richtlinie "Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins" (2008) sowie von der FDA die Richtlinie "Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products" (2014) herausgegeben. Hierbei werden zwischen patienten- und krankheitsbedingten Faktoren sowie intrinsischen produktbedingten Risikofaktoren unterschieden.

Ob ein Protein/Peptid das Immunsystem stimuliert, hängt zunächst von dessen strukturellen Eigenschaften ab, wie z.B. Glykosylierung und Aminosäuresequenz („self“ versus „non-self“) (GRIBBEN *et al.* 1990; MCCORMACK *et al.* 1997). Bei wiederholter Gabe über einen längeren Zeitraum kommt es häufig zur Auslösung einer Immunantwort, z.B. gegen die Koagulationsfaktoren VIII und IX (PORTER 2001; SCHELLEKENS and CASADEVALL 2004). Eine verstärkte Immunantwort wurde für Interferone bei häufiger Applikation und höherer Dosierung beobachtet (BRAUN *et al.* 1997; ROSS *et al.* 2000). Ferner beeinflussen genetische Faktoren wie der HLA Typ die Antigenpräsentation (JOOSS *et al.* 1998; FAKHARZADEH and KAZAZIAN 2000; SCHELLEKENS 2005; BARBOSA *et al.* 2006). Ebenso spielt die Applikationsroute (BRAUN *et al.* 1997; BROCKSTEDT *et al.* 1999; ROSS *et al.* 2000; SCHELLEKENS 2010) und der Formulierungspuffer des Therapeutikums eine Rolle (CLELAND *et al.* 1993; JABER and BAKER 2007). Eine starke Korrelation zwischen Immunogenität und Proteinaggregaten wurde in diversen Studien gefunden (BRAUN *et al.* 1997; RYFF 1997; ROSENBERG 2006). Die Applikation von Adenoviren induziert Antikörper gegen das



Transgen, wie z.B. den Koagulationsfaktor FIX oder Ovalbumin (BROCKSTEDT *et al.* 1999; FIELDS *et al.* 2000).

Im Rahmen gentherapeutischer Anwendungen spielen nicht nur die Generierung von Antikörpern bei der Neutralisierung des Vektors oder des Transgens eine Rolle, sondern ebenso die Eliminierung der Transgen-exprimierenden Zellen durch zytotoxische T-Zellen und der damit einhergehende Expressionsverlust (GHAZIZADEH *et al.* 2003; ZHOU *et al.* 2004). Die zelluläre Immunogenität wird neben genetischen Faktoren und dem Applikationsort direkt vom Transgen, der Expressionshöhe und dem Vektor beeinflusst (YANG *et al.* 1994; BROMBERG *et al.* 1998; KAFRI *et al.* 1998; JOOSS and CHIRMULE 2003). Nach Applikation von Adenoviren mit einem Transgen für die Expression des Koagulationsfaktors IX wurde eine zelluläre und humorale Immunantwort gegen das Transgen in Mäusen beobachtet (DAI *et al.* 1995; CHEN *et al.* 2006). Auch das in der Gentherapie weit verbreitete Modelltransgen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) induziert eine CTL Antwort in Mäusen (STRIPECKE *et al.* 1999; GAMBOTTO *et al.* 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden nach transgener Expression von humanem Erythropoetin in Mäusen, nicht jedoch unter Verwendung von murinem Erythropoetin gefunden (TRIPATHY *et al.* 1996), wobei somit auch der verwendete Vektor wichtig sein kann (KAFRI *et al.* 1998). Auch die transduzierten Zellen können ein Angriffspunkt des Immunsystems sein (GAGANDEEP *et al.* 1999).

#### **2.4.2 Analyse der Immunogenität**

Für die Analyse der Immunogenität eines Proteins oder Peptids können *in vivo* oder *in vitro* Methoden eingesetzt werden (DE GROOT *et al.* 2008; BAKER *et al.* 2010; BRINKS *et al.* 2011). Eine Möglichkeit für die Untersuchung der potentiellen Immunogenität besteht in der Verwendung von herkömmlichen Tiermodellen. Allerdings unterscheiden sich die Aminosäuresequenzen der MHC-I-Moleküle von Maus, Ratte und Primaten von denen des Menschen und folglich die Art des präsentierten Epitops, so dass die hierbei induzierte Immunantwort nicht unbedingt mit der entsprechenden Immunantwort im Menschen übereinstimmt. Für die Evaluation der Immunogenität können ebenso transgene Mäuse verwendet werden, die humane HLA-Moleküle exprimieren. HLA-A\*0201-exprimierende

Mäuse wurden für die Analyse von CTL-Epitopen von HIV, HCV und Influenza eingesetzt (MAN *et al.* 1995; SHIRAI *et al.* 1995; PETER *et al.* 2001). Hierbei wurde eine direkte Korrelation zwischen der CTL-Antwort in infizierten Patienten und immunisierten transgenen Mäusen beobachtet. Die Ergebnisse der Immunisierung HLA-transgener Mäuse mit dem deimmunisierten Gerinnungsfaktor VIII stimmten mit den *in silico* Vorhersagen überein (MOISE *et al.* 2012). Nachteilig bei der Verwendung genetisch-modifizierter Mäuse ist die begrenzte Auswahl an HLA-Allelen, so dass nur häufig auftretende HLA-Allele analysiert werden können, sowie die Unterschiede zwischen Tier und Mensch bezüglich T-Zellrezeptorvielfalt. Ferner können NOD-SCID Mäuse zum Einsatz kommen, denen aufgrund eines genetischen Defekts die Fähigkeit zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort fehlt (ITO *et al.* 2002). Durch Repopulation dieser Mäuse mit humanen Immunzellen (hämatopoetische Stammzellen oder PBMCs) kann ein humanes Immunsystem generiert und für Immunogenitätsstudien genutzt werden (TRAGGIAI *et al.* 2004; ISHIKAWA *et al.* 2005). Allerdings weisen nicht alle Zellen eine zum humanen System vergleichbare Funktionalität auf; zudem wurde eine hohe Variabilität der Immunantwort beobachtet (WATANABE *et al.* 2009). Der Einsatz von *in vivo* Testsystemen ist aufgrund des Aufwands, der Kosten und der Unterschiede zum humanen System beschränkt.

*In vitro* Kulturen von T-Zellen oder auch HLA-Bindungsassays bieten eine günstigere und weniger teure Alternative zu *in vivo* Methoden. PBMCs oder isolierte T-Zellen werden mit dem zu analysierenden Protein/Peptidfragment inkubiert. Die Proliferation der Zellen oder eine Zytokinausschüttung geben Hinweise auf eine Immunogenität. Analog zu den Tiermodellen muss aber auch hier eine Vielzahl von Spendern aufgrund der unterschiedlichen HLA-Allele untersucht werden.

Für MHC-I- und II-Moleküle wurden eine Reihe von Algorithmen für die Vorhersage der Immunogenität eines Epitops entwickelt (NIELSEN *et al.* 2010; PATRONOV and DOYTCHINOVA 2013). Diese Methoden unterstützen die Auffindung immunogener Bereiche in Proteinen/Peptiden, da die Anzahl der zu analysierenden Peptide reduziert werden kann (TONG *et al.* 2007; DE GROOT *et al.* 2008; DE GROOT and MARTIN 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Algorithmen für die Vorhersage von MHC-I-Epitopen benutzt. Beide Programme generieren von einer gewünschten Aminosäuresequenz kurze

Peptidfragmente und ermitteln spezifisch für ein HLA-Allel für die potentiellen MHC-I-Epitope Punktwerte basierend auf dem Bindungsvermögen.

Die Datenbank SYFPEITHI zählt zu den Motiv-basierten Methoden. SYFPEITHI basiert auf publizierten T-Zell- und MHC-Epitopen und umfasst ca. 7000 Peptidsequenzen, die von MHC-I- und II-Molekülen gebunden werden (RAMMENSEE *et al.* 1995; RAMMENSEE *et al.* 1999). Die Vorhersage berücksichtigt Haupt- und Nebenankerpositionen. Der verwendete Algorithmus ermittelt für jede Aminosäure einen Punktwert in Abhängigkeit von der Art (Haupt- oder Nebenanker) und der Häufigkeit des Vorkommens (RAMMENSEE *et al.* 1999): häufig auftretende Aminosäuren an Hauptankerpositionen erhalten zehn Punkte. Acht Punkte werden für Aminosäuren vergeben, die bei einer signifikanten Anzahl von Liganden vorkommen und sechs Punkte für seltene. Aminosäuren als Nebenanker oder anderen Positionen erhalten weniger als sechs Punkte. Aminosäuren, die eine negative Auswirkung auf die Bindung haben, werden mit negativen Punkten bewertet. Die Punktwerte der einzelnen Aminosäuren werden aufsummiert. Abschließend wird von SYFPEITHI eine Liste mit MHC-I-Epitopen ausgegeben, die mit unterschiedlich hoher Wahrscheinlichkeit von MHC-I-Molekülen präsentiert werden.

Das Vorhersageprogramm BIMAS gehört in die Gruppe der Matrix-basierten Methoden. BIMAS verwendet Koeffiziententabellen, die durch experimentelle Stabilitätsmessungen zwischen HLA-Allel, Peptidfragment und  $\beta$ 2-Mikroglobulin erstellt wurden und sagt damit die relative Bindungsstärke zwischen Peptidfragment und HLA-Allel vorher (PARKER *et al.* 1992; PARKER *et al.* 1994). Die Vorhersage berücksichtigt ebenso wie SYFPEITHI Haupt- und Nebenankerpositionen. Die von BIMAS verwendeten Koeffiziententabellen enthalten 180 Koeffizienten für ein HLA-Allel (20 Aminosäuren x 9 Positionen für ein Nonamer). In Abhängigkeit vom Einfluss werden unterschiedliche Punktwerte für die Aminosäuren des MHC-I-Epitops vergeben. Dieser Punktwert wird entsprechend dem HLA-Allel mit einer Konstante multipliziert. Zum Schluss werden die potentiellen MHC-I-Epitope der Rangstufe entsprechend in einer Liste ausgegeben.

### 3 ZIELSETZUNG

Die Gentherapie stellt neben der herkömmlichen antiviralen Therapie eine alternative Behandlungsmethode der HIV-Infektion dar. Insbesondere weist das membranständige C-Peptid maC46 aufgrund seines starken protektiven Effektes *in vitro* und im Affenmodell ein großes Potential auf (EGELHOFER *et al.* 2004; YOUNAN *et al.* 2013). In einer gentherapeutischen *ex vivo* Studie der Phase I wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen von zehn AIDS Patienten genetisch modifiziert und autologe maC46-exprimierende T-Zellen reinfundiert, wobei die Akkumulation der T-Zellen ausblieb (VAN LUNZEN *et al.* 2007). Allerdings wurde in den Begleituntersuchungen der Studie eine prä-existierende humorale Immunantwort gegen das Peptid maC46 ermittelt. Zudem könnte sich die zelluläre Immunantwort gegen die genetisch-modifizierten T-Zellen richten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war somit die Entwicklung eines HIV-inhibitorischen Peptids mit verminderter humoraler und zellulärer Immunogenität. Als Ausgangspunkt wurden die publizierten HIV-inhibitorischen Peptide T-20, C46, SC35EK, T-1249 und C34-EHO ausgewählt. Für die Analyse der zellulären Immunogenität sollten Vorhersageprogramme eingesetzt werden, die potentielle MHC-I-Epitope in beliebigen Aminosäuresequenzen identifizieren. Durch Aminosäuremutationen sollte zunächst *in silico* die zelluläre Immunogenität verringert werden. Zudem sollten die Effektormechanismen der anti-maC46 Antikörper der AIDS Patientenseren der gentherapeutischen Studie untersucht werden, um Aufschluss über die Funktionalität der Antikörper und die Ursache der fehlenden Anreicherung zu erhalten. Für die Analyse der humoralen Immunogenität gegen die fünf antiviralen Peptide sollten diverse HIV Patientenseren verwendet werden. Die immunogenen Peptidbereiche sollten kartiert und sodann durch Austausch der für die Bindung kritischer Aminosäuren mutiert werden. Die Funktionalität der Ausgangspeptide sowie der abgeleiteten Peptidvarianten sollte in Neutralisationsassays verglichen werden. Mutation und Reanalyse der immunologischen und antiviralen Eigenschaften der Peptide sollte so lang durchgeführt werden bis ein geeignetes Peptid mit vergleichbarer Wirksamkeit, jedoch verminderter Immunogenität verfügbar ist.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Agarosegelkammer, SubCell GT	BioRad (München)
Analysenwaage	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Ausschwingzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)
Brutschrank für Zellkulturen, Cellstar	Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer FACSCalibur™ und FACScan™ mit CellQuestPro Software	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektrophoreseapparatur	Biometra (Göttingen)
Lichtmikroskop	Leica (Bensheim)
Magnetrührer	IKA-Werke (Staufen)
NanoDrop ND-1000 Spektrometer	Wilmington (USA)
PCR-Thermocycler T-personal combi	Biometra (Göttingen)
pH-Meter Mettler Toledo M220	Mettler (Gießen)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Röntgenfilmentwickler Optimax Typ TR	Schroeder und Henke (Wiesloch)
Schüttler Duomax 2030	Heidolph (Kelkheim)
Spannungsquelle Power-Pac 1000	BioRad (München)
Stereomikroskop MZ 16F5 mit Application Suite VS 2.8.1	Leica Microsystems (Wetzlar)
Sterilbank für Zellkulturen	HERAsafe HS12 von Heraeus (Hanau)
UV-Dokumentationssystem; Gel Doc 2000	BioRad (München)
Vortex Genie 2	Bender und Hobein (Zürich, Schweiz)
Wippschüttler	Bühler GmbH (Hechingen)
Zellzahlbestimmung: Casy TT	Casy (Reutlingen)

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
EDTA-Röhrchen für Blutabnahme	Sarstedt (Nümbrecht)
FACS-Röhrchen (14ml)	Becton Dickson (Heidelberg)
Filtereinheiten (d=0,45µm)	Millipore (Eschborn)
Hypercassette™	Amersham Biosciences (Freiburg)
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kryoröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Kulturflaschen	Becton Dickson (Heidelberg)
Kulturschalen (d=10cm)	Greiner (Frickenhausen)
Neubauer-Zählkammer	Hycor Biomedical
Nitrozellulosemembran	VWR International (Darmstadt)
Pipetten (5ml/10ml/25ml)	Costar (Corning, NY, USA)
Pipettenspitzen (10µl/200µl/1000µl)	Greiner (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (0,2ml/1,5ml/2ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsröhrchen (15ml/50ml)	Becton Dickson (Heidelberg)
Sterilfilter (d=0,22µm/0,45µm)	Millipore (Eschborn)
TC-Mikrotiterplatten (96-/48-/24-Loch)	Costar (Corning, NY, USA)
Zellsiebe (70µm)	Becton Dickson (Heidelberg)

#### 4.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth (Karlsruhe)
Bacto-Trypton	AppliChem (Darmstadt)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Chloroquin	Sigma (Deisenhofen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva (Heidelberg)
Ethanol (rein bzw. vergällt)	Roth (Karlsruhe)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Formaldehyd, 37%ig	ICN Biomedicals, Inc. (Ohio, USA)
Geneticin G418	Roth (Karlsruhe)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	AppliChem (Darmstadt)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)	Sigma (Deisenhofen)
Ionomycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol ( $\geq 99,7\%$ )	Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol ( $> 99,8\%$ )	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
tris(Hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem (Darmstadt)
Tween® 20	ICN Biomedicals Inc. (Ohio, USA)
Xylencyanol	Roth (Karlsruhe)

#### 4.1.4 Standardlösungen, Puffer und Nährmedien

Puffer und Nährmedien wurden steril bezogen oder mittels feuchter Hitze (20 min, 121°C) sterilisiert. Im Falle der Hitzeinstabilität wurden die Lösungen und Puffer sterilfiltriert. Sämtliche Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Name	Zusammensetzung, Hersteller
0,5% Blockierlösung	5ml POD-Stocklösung (Flasche 3), 95ml TBS (Roche, Mannheim)
1% Blockierlösung	10ml POD-Stocklösung (Flasche 3), 90ml TBS (Roche, Mannheim)
5% MPBST	5% (w/v) Magermilchpulver in PBST
AB-Serum	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ampicilin-Lösung	100mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2,5M in ddH <sub>2</sub> O

CASY®ton-Puffer	Casy, Reutlingen
Chloroquin-Lösung	25mM in ddH <sub>2</sub> O
D5 (DMEM Standard Medium)	5% (v/v) FCS, 2% (v/v) L-Glutamin-Lösung, 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x)
DMEM	BioWhittaker (Verviers, Belgien)
DNA-Probenauftragspuffer (6x)	50% (v/v) Glycerin, 0,2% (v/v) SDS, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol. 10mM EDTA
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO in FCS
Ethidiumbromidlösung	1% (w/v) in ddH <sub>2</sub> O gelöst
FACS-Puffer	3% (v/v) FCS in 1x PBS
FCS (Fötale Kälberserum)	PAN Biotech (Aidenbach, Österreich)
Fixierlösung	4% (v/v) Formaldehyd in 1x PBS
G418-Stammlösung	100mg/ml in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
Hasenkomplement	Merck (Darmstadt)
HEPES-Puffer (2x)	100mM HEPES, 281mM NaCl, 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH=7,1
Human PANCOLL (Ficoll)	$\rho = 1,077$ g/ml von PAN Biotech (Aidenbach, Österreich)
Humanes Interleukin-2 (IL-2)	10 <sup>4</sup> Units/ml von Roche (Mannheim)
LB-Medium	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, auf pH 7,0 einstellen, autoklaviert
L-Glutamin-Lösung (100x)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
PBS, 10x	Bio Whittaker (Verviers, Belgien)
PBS, 1x	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
PBST	0,1% (v/v) Tween® 20 in 1x PBS
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
R5 (RPMI Standard Medium)	5% (v/v) FCS, 2% (v/v) L-Glutamin-Lösung, 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x)
Regenerationspuffer	62,5mM Tris, 2% SDS, pH=6.7, 70 $\mu$ l $\beta$ -Mercaptoethanol pro 10ml SDS-Lösung
RPMI 1640	BioWhittaker (Verviers, Belgien)
TBS	50mM Tris, 137mM KCl, 2,7mM NaCl, pH=8.0
Trypanblau-Stocklösung (4x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin, 0,25% / EDTA 1mM	Invitrogen (Karlsruhe)



T-TBS	0,05% (v/v) Tween® 20 in TBS
X5 (X-Vivo 15 Standard Medium)	5% (v/v) hu AB-Serum, 2% (v/v) L-Glutamin-Lösung, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)
X-Vivo 15	BioWhittaker (Verviers, Belgien)

#### 4.1.5 Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz	Medium
PM-1	Humane T-Zelllinie, exprimiert die Rezeptoren CD4, CXCR4 und CCR5.	NIH AIDS Research, 3038 (LUSO <i>et al.</i> 1995)	R5
293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie, enthält das large T-Antigen des SV40.	ATCC Nr. CRL-11268 (PEAR <i>et al.</i> 1993)	D5
HL-60	Humane promyeloblaste Blutzelllinie.	ATCC Nr. CCL-240 (GALLAGHER <i>et al.</i> 1979)	R5

#### 4.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Beschreibung	Hersteller
2F5	Human	Monoklonaler Antikörper gegen HIV-1 gp41 (ELDKWA) (MUSTER <i>et al.</i> 1993)	Polymun Scientific (Wien)
Rituximab (RTX)	Human / Maus	Chimärer monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen CD20 auf B-Zellen	Roche (Basel)
Tritest	na	Antikörpermischung aus $\alpha$ -CD4-FITC, $\alpha$ -CD8-PE und $\alpha$ -CD3-PerCP	BD (Heidelberg)
$\alpha$ -c-myc	Maus	Monoklonaler Antikörper (IgG1) gegen das c-myc Epitop (EQKLISEEDL)	Abcam (Cambridge)
$\alpha$ -human-HLA-A2-FITC	Maus	FITC-gekoppelter Antikörper gegen HLA-A*02	BD (Heidelberg)
$\alpha$ -human-IgG1-FITC	Maus	FITC-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen humanes IgG1	Sigma-Aldrich (Steinheim)
$\alpha$ -human-IgG2-FITC	Maus	FITC-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen humanes IgG2	Sigma-Aldrich (Steinheim)
$\alpha$ -human-IgG3-FITC	Maus	FITC-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen humanes IgG3	Sigma-Aldrich (Steinheim)
$\alpha$ -human-IgG4-FITC	Maus	FITC-gekoppelter monoklonaler Antikörper gegen humanes IgG4	Sigma-Aldrich (Steinheim)
$\alpha$ -human-IgG-Cy5	Ziege	Cy5-gekoppelter Antikörper gegen humanes IgG (H- und L-Kette)	Dianova (Hamburg)

$\alpha$ -human-IgG-HRP	Ziege	HRP-gekoppelter Antikörper gegen humanes IgG (H- und L-Kette)	Dianova (Hamburg)
$\alpha$ -human-IgG-PE	Ziege	PE-gekoppelter Antikörper gegen humanes IgG (H- und L-Kette)	Dianova (Hamburg)
$\alpha$ -maus-IgG-HRP	Ziege	HRP-gekoppelter Antikörper gegen murines IgG (H- und L-Kette)	Dianova (Hamburg)
$\alpha$ -maus-IgG-PE	Ziege	PE-gekoppelter Antikörper gegen murines IgG (H- und L-Kette)	Dianova (Hamburg)

#### 4.1.7 Verwendete Kits

Name	Hersteller
BM Chemilumineszenz Blotting Substrat (POD)	Roche (Mannheim)
Cell Viability Kit	Becton Dickinson (Heidelberg)
ECL™ Western Blotting Analysis	Amersham Biosciences (Freiburg)
ECL Plus™ Western Blotting Analysis	Amersham Biosciences (Freiburg)
ELISpotPlus für humanes IFN- $\gamma$	Mabtech (Hamburg)
Plasmid Maxi Prep Kit, Nucleo Bond AX PC500	Macherey Nagel (Düren)
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

#### 4.1.8 Plasmide und Vektoren

Name	Nummer	Beschreibung	Referenz
VSV-G	M5	Expressionsplasmid für das Hüllprotein VSV-G	(BEYER <i>et al.</i> 2002)
JR-FL	M118	Expressionsplasmid für das HIV-1 Hüllprotein JR-FL (R5-trop)	M. Dittmar, Heidelberg
HXB2_T-20-R(SIM)	M191	Expressionsplasmid für HXB2, wobei GIV zu SIM in der gp41 NHR mutiert ist	(RIMSKY <i>et al.</i> 1998)
HXB2_T-20-R(DTV)	M192	Expressionsplasmid für HXB2, wobei GIV zu DTV in der gp41 NHR mutiert ist	(RIMSKY <i>et al.</i> 1998)
maC46 <sup>+++</sup>	M218	Retroviraler Transfervektor für ein hohes Expressionsniveau von maC46	(EGELHOFER <i>et al.</i> 2004)
Lenti GagPol	M334	Expressionsplasmid für HIV Gagpol, Rev (publizierte Bezeichnung: pCMV-dR8.91)	(NALDINI <i>et al.</i> 1996)
EGFP	M420	Lentiviraler SIN Vektor mit EGFP als Transfervektor	(DEMAISON <i>et al.</i> 2002)

HXB2	M421	Expressionsplasmid für das HIV-1 Hüllprotein HXB2 (X4-trop)	G.Melikyan, Chicago
Retro GagPol	M579	Expressionsplasmid für HIV Gagpol, (Publizierte Bezeichnung: M57-DAW)	(SCHAMBACH <i>et al.</i> 2006)
maC46 <sup>+</sup>	M603	Retroviraler Transfervektor für eine niedriges Expressionsniveau von maC46	(HERMANN <i>et al.</i> 2009b)
SIVmac251	M640	Expressionsplasmid für das Hüllprotein SIVmac251	(ZAHN <i>et al.</i> 2008)
CD20	M741	Retroviraler Transfervektor für CD20 und trunkiertes CD34	I. Vogler, Frankfurt
Ba-L	M749	Expressionsplasmid für das HIV-1 Hüllprotein Ba-L (R5-trop)	(LOHRENGEL <i>et al.</i> 2005)
Ba-L_C46-R	M750	Expressionsplasmid für das C46-resistente Ba-L (publizierte Bezeichnung: BaL_C46)	(HERMANN <i>et al.</i> 2009a)
maC46-EHO <sup>+++</sup>	M842	Retroviraler Transfervektor für ein hohes Expressionsniveau von maC46-EHO	A. Hubert, Frankfurt
maC46-EHO <sup>+</sup>	M843	Retroviraler Transfervektor für ein niedriges Expressionsniveau von maC46-EHO	A. Hubert, Frankfurt

#### 4.1.9 Peptide

Der CEF Peptid Pool (Firma Mabtech (Hamburg)) umfasst 23 9mer Peptide von CMV, EBV und Influenza (Elu) spezifisch für bestimmte HLA-Allele (CURRIER *et al.* 2002). Die Konzentration jedes Peptids betrug 200µg/ml. Das Peptid T-20 (Firma Roche (Nutly, USA)) wurde in Aqua dest. rekonstituiert (45µg/µl (10mM)) und aliquotiert bei -70°C gelagert. Alle folgenden Peptide wurden von der Firma GeneCust (Dudelange, Luxemburg) synthetisiert, in 50% DMSO/H<sub>2</sub>O rekonstituiert und aliquotiert bei -70°C gelagert:

- Die C-Peptide wurden im Neutralisationsassay analysiert (Tabelle 4.1.1).
- Die PBMCs von HIV-1 Patienten wurden im ELISpot mit 9mer Peptiden von C46-EHO (wt-) und V2 (mut-) (Tabelle 4.1.2) oder mit 15mer Peptiden (versetzt um 4 Aminosäuren) von C46-EHO (EHO-) und V2o (V2o) (Tabelle 4.1.3) inkubiert.
- Der generelle Immunstatus der HIV-1 Patienten wurde mit HLA-A\*02-restringierten HIV-1-abgeleiteten 9mer Peptiden untersucht: gag<sub>77-85</sub> (SLYNTVATL), RT<sub>309-317</sub> (ILKEPVHGV) und vpr<sub>59-67</sub> (AIIRILQQL) (ALTFELD *et al.* 2005).

- Die PBMCs gesunder Probanden wurden im ELISpot mit einem CMV oder EBV Peptid (9mer) inkubiert (Tabelle 4.1.4).

**Tabelle 4.1.1 Aminosäuresequenz und Molekulargewicht der antiviralen C-Peptide. AS: Gesamtanzahl Aminosäuren; MW: Molekulargewicht; - = Deletion; . = gleiche Aminosäure wie C46-EHO**

Name	Aminosäuresequenz (AS 628-673)	MW [kDa]	AS
T-20	-----YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	4451	36
C46	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	5825	46
T-1249	WQEWQK-----ITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWQWF	4996	39
SC35EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKNEEELKKEQKLISEEDL-	4495	45
C46-EHO	WQQWERQVRFLDANITKLEEAQIQQEKKNMYELQELDKWASLWNWF	5885	46
V1	..T.....N.W.....V.....N.....K.....V....	5846	46
V2	..T.....N.W.....A.....N.....K.....A....	5789	46
V3	..T.....N.A.....A.....N.....A.....A....	5617	46
V4	.....W.....V.....K.....V....	5929	46
V2o	..T.....DNITQTIS.A.....N.....KLNQWDIFSNWF	5746	46

**Tabelle 4.1.2 Peptidfragmente (9mere) von C46-EHO (x-wt) und V2 (x-mut) mit x=Epitopnummer.**

C46-EHO		V2	
Name	Aminosäuresequenz	Name	Aminosäuresequenz
2-wt	QQWERQVRF	2-mut	QTWERQVNF
8-wt	VRFLDANIT	8-mut	VNFWDANIT
10-wt	FLDANITKL	10-mut	FWDANITKA
25-wt	QQEKNMYEL	25-mut	QNEKNMYEL
34-wt	QELDKWASL	34-mut	QKLDKWASA

**Tabelle 4.1.3 Peptidfragmente (15mere) von C46-EHO (EHO-x) und V2o (V2o-x) mit x=Epitopnummer.**

C46-EHO		V2o	
Name	Aminosäuresequenz	Name	Aminosäuresequenz
EHO-1	WQQWERQVRFLDANI	V2o-1	WQTWERQVDNITQTI
EHO-2	ERQVRFLDANITKLL	V2o-2	ERQVDNITQTISKAL
EHO-3	RFLDANITKLLLEEAQ	V2o-3	DNITQTISKALEEAQ
EHO-4	ANITKLLLEEAQIQQE	V2o-4	QTISKALEEAQIQNE
EHO-5	KLLEEAQIQQEKMY	V2o-5	KALEEAQIQNEKMY
EHO-6	EAQIQQEKMYELQE	V2o-6	EAQIQNEKMYELQK
EHO-7	QQEKMYELQELDKW	V2o-7	QNEKMYELQKLNQW
EHO-8	NMYELQELDKWASLW	V2o-8	NMYELQKLNQWDIFS
EHO-9	ELQELDKWASLWNWF	V2o-9	ELQKLNQWDIFSNNWF

**Tabelle 4.1.4 Aminosäuresequenzen der Peptide CMV/CMV-mut und EBV/EBV-mut.**

Name	Aminosäuresequenz	Name	Aminosäuresequenz
CMV	NLVPMVATV	EBV	GLCTLVAML
CMV-mut	NWVPMVATA	EBV-mut	GWCTLVAMA

#### 4.1.10 Membranen für die Epitopkartierung

Für die Antikörperepitopkartierung wurden fertige Peptid-gespottete Membranen der Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) erworben. JPT verwendete hierfür lineare Peptidfragmente von maC46 (C46 und IgG2-Linker), C46 und C46-EHO bestehend aus 15 Aminosäuren, versetzt um 3 AS (maC46) bzw. 2 AS (C46, C46-EHO) (Tabelle 4.1.5).

**Tabelle 4.1.5 Exemplarische Darstellung der 15mer C46-Peptide, versetzt um 2 AS (=Aminosäure).**

Lfd. Nr.	AS	Aminosäuresequenz
1	1-15	WMEWDREINNYTSLI
2	3-17	EWDREINNYTSLIHS
3	5-19	DREINNYTSLIHSLI
4	7-21	EINNYTSLIHSLIEE
5	9-23	NNYTSLIHSLIEESQ
6	11-25	YTSLIHSLIEESQNQ
7	13-27	SLIHSLIEESQNQQE
8	15-29	IHSLIEESQNQQEKN
9	17-31	SLIEESQNQQEKNEQ
10	19-33	IEESQNQQEKNEQEL
11	21-35	ESQNQQEKNEQELLE
12	23-37	QNQQEKNEQELLELD
13	25-39	QQEKNEQELLELDKW
14	27-41	EKNEQELLELDKWAS
15	29-43	NEQELLELDKWASLW
16	31-45	QELLELDKWASLWNW
17	32-46	ELLELDKWASLWNWF

#### 4.1.11 Biologisches Material von gesunden Probanden und HIV-Patienten

Alle nachfolgend aufgeführten Patientenseren wurden für die Analyse der anti-Peptid Antikörper verwendet (Dot Blot, Epitopkartierung):

- Als Negativkontrolle wurde AB-Serum der Firma PAA verwendet.
- Von den zehn genterapeutisch-behandelten HIV-1 Patientenseren (VAN LUNZEN *et al.* 2007) wurde die humorale Immunogenität sowie die Effektormechanismen der Antikörper (ADCC, CDC) bestimmt (klinische Werte siehe Tabelle 4.1.6).

- Von Prof. Schlomo Staszewski (HIV Ambulanz, Frankfurt am Main) wurden 25 Seren von HIV-1 Patienten, die bereits eine antivirale Therapie (ART) erhalten hatten, zur Verfügung gestellt (klinische Werte siehe Tabelle 4.1.6)
- Dr. Jan van Lunzen (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) stellte 34 Seren unbehandelter HIV-1 Patienten bereit (klinische Werte siehe Tabelle 4.1.6).
- Dr. Ursula Dietrich (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main) offerierte jeweils 10 HIV-2 und LTNP Seren.

**Tabelle 4.1.6 Klinische Werte von antiretroviral behandelten (ART) und unbehandelten HIV-1 Patienten mit Angabe des Medianwertes und der Spannweite.**

	ART	Unbehandelt
Gesamtanzahl	35	34
Alter in Jahren bei Probennahme	43 (25 – 64)	36,5 (18 – 75)
CD4+ T-Zellzahl/ $\mu$ l	237 (45 – 1284)	358,5 (91 – 852)
CD8+ T-Zellzahl/ $\mu$ l	949 (299 – 3076)	940,5 (379 – 4089)
CD4/CD8 Verhältnis	0,226 (0,053 – 1,017)	0,370 (0,112 – 1,179)
HIV-RNA (log Genome/ml)	4,041 (0 – 5,509)	4,382 (2,398 – 5,875)

Vor erstmaliger Benutzung der Patientenserum wurden HI-Viren bei 56°C für 30min im Wasserbad inaktiviert. Die Seren wurden in Aliquots bei -20°C gelagert.

PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) eines gesunden Probanden (AG Dietrich, GSH, Frankfurt am Main) wurden für die Analyse der ADCC-Antwort eingesetzt. Die Blutabnahme erfolgte mittels EDTA-Röhrchen, die Aufarbeitung entsprechend Kapitel 4.2.4. PBMCs gesunder Probanden wurden auch als „Buffy Coats“ vom Blutspendedienst Hessen, Frankfurt am Main bereitgestellt. Aufgereinigte PBMCs (Kapitel 4.2.4) wurden für die Untersuchung der zellulären Immunantwort gegen CMV bzw. EBV verwendet. Dr. Jan van Lunzen (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) stellte eingefrorene PBMCs von HIV-1 Patienten für die Analyse der zellulären Immunantwort zur Verfügung. 9mer Peptide (C46-EHO, V2, Tabelle 4.1.2) wurden mit den Patienten PBMCs (Tabelle

4.1.7) inkubiert, hingegen wurden die Patienten PBMCs der Tabelle 4.1.8 mit 15mer Peptiden (C46-EHO, V2o, Tabelle 4.1.3) versetzt.

**Tabelle 4.1.7 HLA-Allele der HIV-1 Patienten für die Analyse der zellulären Immunantwort gerichtet gegen 9mer Peptide von C46-EHO und V2. n.b.: nicht bekannt**

Patient ID	HLA-A		HLA-B		HLA-C
Pt.90	A0201	A6802	B35	B5301	n.b.
Pt.91	A0201	n.b.	B1501	n.b.	n.b.
Pt.92	A01	A03	B08	B60	n.b.
Pt.93	A24	A29	B08	B07	n.b.
Pt.94	A03	A25	B18	B35	n.b.
Pt.95	A11	A25	B18	B35	n.b.
Pt.96	A02	A24	B07	B27	n.b.
Pt.97	A01	A03	B39	B57	n.b.
Pt.98	A31	A03	B39	B39	n.b.
Pt.99	A03	n.b.	B44	B57	n.b.
Pt.100	A25	A32	B4402	B5108	n.b.
Pt.101	A01	A02	B50	B52	n.b.
Pt.102	A31	A03	B60	B62	n.b.
Pt.103	A01	A03	B44	B62	n.b.
Pt.104	A03	A30	B27	B62	n.b.
Pt.105	A30	A33	B57	B53	Cw04
Pt.106	A02	A03	B35	n.b.	Cw04



**Tabelle 4.1.8 HLA-Allele der HIV-1 Patienten für die Analyse der zellulären Immunantwort gerichtet gegen 15mer Peptide von C46-EHO und V2o. n.b.: nicht bekannt**

Patient ID	HLA-A		HLA-B	
Pt.124	A01	A02	B08	B60
Pt.125	A01	A02	B41	B56
Pt.126	A01	A03	B08	B60
Pt.127	A02	A68	B27	B66
Pt.128	A0201	A2402	B0801	B4402
Pt.129	A25	A32	B4402	B5108
Pt.130	A02	A29	B27	B44
Pt.131	A31	A32	B44	B51
Pt.132	A01	A28	B07	B44
Pt.133	A24	n.b.	B44	B62
Pt.134	A02	A24	B35	B44
Pt.135	A0201	A6802	B35	B5301
Pt.136	A02	A24	B27	B56
Pt.137	A02	n.b.	B08	B62
Pt.138	A02	A03	B08	B62
Pt.139	A02	n.b.	B08	B44
Pt.140	A01	A03	B07	B08
Pt.141	A01	A03	B07	n.b.
Pt.142	A01	A24	B07	B44
Pt.143	A01	A28	B60	B62
Pt.140	A01	A02	B08	B60

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Präparative Plasmidisolierung aus *E.coli*

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden gewonnen, indem 250ml LB-Medium mit transformierten *E.coli* Kryokulturen angeimpft und für ca. 12h bei 37°C geschüttelt wurde. Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem Maxipräp Kit nach Herstellerangaben.

### 4.2.2 Konzentrationsbestimmung und Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm im UV-Spektrometer bestimmt. Hierzu wurde 1µl der DNA-Lösung auf das Probenhaltesystem des NanoDrop Spektrophotometers aufgetragen.

Für die Restriktionsanalyse der DNA wurde 1µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20µl mit 5-10 Units der entsprechenden Restriktionsendonuklease für ca. 1h bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel. Für die Herstellung des 1%-igen Agarosegels wurde die Agarose in TAE-Puffer gelöst und erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid (0,5g/l) hinzu pipettiert und die Lösung in eine Flachbettform gegossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V. In dieser Zeit lagerte sich Ethidiumbromid zwischen die DNA und konnte anschließend durch UV-Strahlung sichtbar gemacht werden.

### 4.2.3 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten wurden an den „Sterilbänken für Zellkulturen, Microflow und HERAsafe HS12“ durchgeführt. Verpackungen, Medienflaschen und Plastikmaterialien wurden vor Gebrauch mit 70%igem (v/v) Ethanol abgesprüht, um Kontaminationen vorzubeugen. Hitzelabile Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert.

Alle Zelllinien wurden in begasten (5% CO<sub>2</sub>) Brutschränken bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90% kultiviert. Suspensionszelllinien und adhärente Zelllinien wurden alle 2-3 Tage subkultiviert. Suspensionszellen wurden in einer Dichte von ca. 1-2x10<sup>5</sup> Zellen/ml ausgesät. Die Passage erfolgte bei einer Zelldichte von ca. 1-2x10<sup>6</sup> Zellen/ml, in dem ein Teil der Zellen verworfen und die verbliebenen Zellen in frischem R5-Medium aufgenommen wurden.

Adhärenz Zelllinien wurden bis zu ca. 80%iger Konfluenz kultiviert. Nach Entfernung des verbrauchten Mediums wurde der Zellrasen mit sterilem PBS gewaschen und die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung benetzt, wodurch sich der Zellrasen vom Flaschenboden ablöste. Eine geringe Menge frisches D5-Medium wurde zugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Je nach Wachstum wurde eine gewisse Zellmenge in Kulturflaschen überführt und frisches D5-Medium zugegeben.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Zellzahl wurde mit Einfriermedium auf  $5-10 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. In ein Kryoröhrchen wurde 1ml der Zelllösung gegeben und bei  $-70^\circ\text{C}$  für ca. 24h gelagert (MR. FROSTY von Nalgene). Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in der Gasphase von flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad erwärmt und in 5-10 ml vorgewärmten Medium aufgenommen. Das für die Zellen toxische DMSO wurde somit verdünnt und durch Zentrifugation (1500rpm, 5 min, RT) vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde in 4-5 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

Die Zelldichte wurde quantitativ mit dem CASY-Zellzähler bestimmt. Hierfür wurden 10-100µl einer homogenen Zellsuspension in ein mit Casyton-Puffer gefülltes Messgefäß pipettiert und in die CASY-Apparatur gestellt. Das Prinzip beruht auf der Messung des elektrischen Widerstandes. Da lebende Zellen einen höheren Widerstand als tote Zellen aufweisen, kann über den spezifischen Widerstand die Zelldichte bestimmt werden. Alternativ wurde die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die homogene Zellsuspension wurde hierfür 1:2 mit Trypanblau, welches tote Zellen blau färbt, gemischt. Für die Bestimmung der Zelldichte wurden ca. 10µl des Trypanblau-Zell-Gemisches in die Zählkammer gegeben. Vier Großquadrate wurden ausgezählt, gemittelt und die Zellzahl/ml (gemittelte Zellzahl\*Verdünnungsfaktor\* $10^4$ ) berechnet.

#### **4.2.4 Isolierung mononukleärer Blutzellen (PBMCs)**

Humanes Blut kann mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert werden (BOYUM 1984). Ficoll bewirkt eine Separation der Blutzellen und eine Agglutination der Erythrozyten, so dass diese am Gefäßboden pelletieren. Indes reichern sich die PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) aufgrund der Dichteunterschiede in

der Interphase an. Zur Gewinnung der PBMCs wurde das Blut mindestens 1:2 mit PBS verdünnt. In einem 50ml-Falcon-Röhrchen wurden 25ml der Ficoll-Lösung vorgelegt und vorsichtig mit 25ml des verdünnten Blutes überschichtet. Nach der Zentrifugation (45min, 2000rpm, RT, ohne Bremse) wurde die Interphase abgenommen und dreimal mit sterilem PBS gewaschen (Zentrifugation für 10min, 1200rpm, RT). Das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl/ml entsprechend Kapitel 4.2.3 bestimmt.

#### **4.2.5 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist ein Verfahren zur Unterscheidung mikroskopisch kleiner Partikel in einer Suspension anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung. Durch die Anregung mit Laserlicht können zum einen die unterschiedlichen Streulichteigenschaften von Zellen detektiert werden, die durch Größe (Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC)) und Granularität (Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC)) hervorgerufen werden. Zum anderen können durch Expression fluoreszierender Proteine (z.B. EGFP) oder durch Markierung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern die Fluoreszenzintensitäten einzelner Zellen detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur Anzahl der Fluorochrommoleküle. Ein nachgeschalteter Digital-Analogwandler und ein Computer mit der entsprechenden Software (z.B. CellQuestPro) ermöglichen die Analyse der Messung. Ferner kann das FACS-Gerät zum Sortieren von Zellen verwendet werden.

Für die Bestimmung von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie wurden Antikörper verwendet, welche kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Bei einer direkten Immunfärbung wird die Probe mit dem fluoreszierenden Antigen-spezifischen Antikörper versetzt und kann sogleich am FACS Gerät analysiert werden. Hingegen sind bei einer indirekten Immunfärbung zwei Färbeschritte notwendig: auf den primären Antikörper folgt ein kompatibler Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper. In beiden Fällen wurden für jede Probe ca.  $2-5 \times 10^5$  Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden gewaschen, indem 2ml FACS-Puffer zugegeben, zentrifugiert (1500rpm, 5min, RT) und der Überstand dekantiert wurde. Für die Immunfärbung wurde das Sediment der Zellen in 50 $\mu$ l der Antikörperlösung resuspendiert und bei 4°C für 30min

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 2ml FACS-Puffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Im Falle einer direkten Immunfärbung wurden die Zellen sogleich in 200µl Fixierungslösung aufgenommen, resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Im Falle einer indirekten Immunfärbung wurde jede Probe mit 50µl des Sekundäantikörpers für 30min bei 4°C inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschstschritte mit je 2ml FACS-Puffer. Auch diese Zellen wurden für die Analyse im Durchflusszytometer mit 200µl Fixierlösung versetzt.

Das Durchflusszytometer FACS Aria (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde für die Sortierung und Anreicherung von Zellen aus Massenkulturen verwendet, die keine selektierbare Antibiotikaresistenz koexprimierten (HL-60-maC46-CD20, PM-1-maC46-EHO<sup>+++</sup>). Für die Sortierung wurden etwa  $1 \times 10^7$  native (HL-60, PM-1) und Transgen-exprimierende Zellen jeweils in ein steriles FACS-Röhrchen überführt und auf Expression gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in 1ml sterilen FACS-Puffer aufgenommen, zur Vereinzelung auf ein Zellsieb (70µm) gegeben, mit 1ml sterilen FACS-Puffer gewaschen und mittels Durchflusszytometer sortiert.

#### **4.2.6 Herstellung retro- und lentiviraler Vektoren**

Replikationsinkompetente Vektoren wurden mit Hilfe von drei verschiedenen Plasmiden (sog. drei-Plasmid-System) hergestellt (NALDINI *et al.* 1996):

- Der Transfervektor kodiert für das Transgen und das Verpackungssignal.
- Das Hilfsplasmid *GagPol* enthält die Gene für virale Strukturproteine und Enzyme.
- Das Hilfsplasmid *Env* kodiert für die Hüllproteine.

Das drei-Plasmid-System minimiert die Wahrscheinlichkeit der homologen Rekombination und damit die Entstehung replikationskompetenter Viren. Dem Transfervektor fehlte die genetische Information der viralen Proteine, so dass nur ein Infektionszyklus stattfinden kann. Vektoren wurden durch transiente Transfektion der Verpackungszelllinie 293T hergestellt. Einen Tag vor der Transfektion wurden  $6 \times 10^6$  293T Zellen in 8ml D5-Medium pro 10cm-Schale ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium gegen frisches D5-Medium (9ml pro Schale) ausgetauscht, welches Chloroquin (25µM), jedoch kein FCS, enthielt. Chloroquin verhindert den enzymatischen Abbau der DNA im Lysosom

und steigert die Transfektionseffizienz. Die Plasmide wurden mit Calciumphosphat inkubiert, so dass die DNA komplexierte und endozytiert werden konnte. Der Transfektionsansatz (Tabelle 4.2.1) wurde mit 500µl 2xHEPES gemischt und 20min bei RT inkubiert. Die DNA-Lösung wurde vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach ca. 6h im Brutschrank wurde das Medium durch 6ml frisches D5-Medium ersetzt. 24h und 48h nach dem Mediumwechsel wurden die virushaltigen Überstände gesammelt, gepoolt, sterilfiltriert (0,22µm) und bei -70°C eingefroren oder bis zur Aufkonzentrierung bei 4°C gelagert.

**Tabelle 4.2.1 Transfektionsansatz für eine 10cm-Zellkulturschale.**

Plasmid	Lentiviraler Vektor	Retroviraler Vektor	DNA-Menge [µg]
GagPol	M334	M579	12,5
Transfervektor	M420	M741, M842, M843, M218	7,5
Env	HIV, SIV, VSV-G	VSV-G	1,0
H <sub>2</sub> O			Ad 450µl
CaCl <sub>2</sub>			50µl

Für die Aufkonzentrierung der Vektoren wurden 40ml in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben und bei 5000xg und 4°C zentrifugiert (Avanti J-12, Beckmann). Nach ca. 15-stündiger Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, das Viruspellet in 200-400µl D5-Medium aufgenommen und für 4h bei 4°C geschüttelt. Die Überstände wurden gepoolt und aliquotiert bei -70°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der infektiösen Partikel erfolgte durch Titration auf PM-1 Zellen. Hierfür wurden 2x10<sup>4</sup> PM-1 Zellen in 100µl R5-Medium pro Loch in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nach Zugabe von 100µl der verdünnten Vektoren in Duplikaten erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 2000rpm und 31°C für 60min. Die Zellen wurden mit den Viren in einer Feuchtekammer im Brutschrank für fünf Tage inkubiert. Abschließend wurden alle Proben in jeweils ein FACS-Röhrchen überführt, durchflusszytometrisch der Anteil der EGFP-positiven PM-1 Zellen und der Titer (=infektiöse Partikel/ml) bestimmt.

#### 4.2.7 Transduktion eukaryotischer Zelllinien mit retroviralen Vektoren

Für die Herstellung Transgen-exprimierender Zellen (maC46-EHO auf PM-1 und maC46-CD20 auf HL-60) wurden  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro Loch in 500  $\mu$ l R5-Medium einer 24-Lochschale ausgesät. Unterschiedliche Mengen der vektorhaltigen Überstände wurden zugegeben, mit R5-Medium auf 1ml aufgefüllt und bei 2000rpm, 31°C für 60min zentrifugiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C kultiviert und am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach ca. einer Woche wurde die Zellen gefärbt und die Transgenexpression durchflusszytometrisch ermittelt. Mischkulturen, die das Transgen zu etwa 10% exprimierten, wurden sodann mittels Durchflusszytometer sortiert, um eine nahezu 100%ig reine Zelllinie zu erhalten.

#### 4.2.8 Neutralisationsassay mit synthetischen Peptiden

Die antivirale Aktivität der Peptide wurde in Neutralisationsassays untersucht. PM-1 Zellen wurden hierzu mit replikationsinkompetenten Vektoren in Anwesenheit der Peptide transduziert. Die Vektoren enthielten EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) als Transgen, so dass transduzierte Zellen im Durchflusszytometer analysiert werden konnten. Sofern die Peptide den Eintritt der Vektoren verhindern, wird der prozentuale Anteil der EGFP-positiven PM-1 geringer verglichen mit dem inhibitorfreien Ansatz.

$2 \times 10^4$  PM-1 Zellen wurden in 50  $\mu$ l R5-Medium pro Kavität einer 96-Loch-Platte ausgesät. Die Peptide wurden in 100  $\mu$ l R5-Medium angesetzt (Duplikate). Eine Transduktionshöhe der PM-1 Zellen von ca. 15% wurde angestrebt, um Mehrfachintegrationen der Vektoren zu vermeiden (FEHSE *et al.* 2004). 50  $\mu$ l der verdünnten Vektoren wurden zu den Proben pipettiert. Das Gesamtvolumen betrug somit 200  $\mu$ l für einen Ansatz. Die Transduktion erfolgte bei 31°C, 2000rpm für 60min. Die PM-1 Zellen wurden vier Tage in einer Feuchtekammer bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Am fünften Tag wurden alle Zellen einer Kavität in ein FACS-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometrie der Anteil EGFP-positiver PM-1 bestimmt.

#### 4.2.9 Infektionsassay mit Peptid-exprimierenden Zelllinien

Der protektive Effekt genetisch-modifizierter Zellen, die inhibitorische Peptide auf der Zelloberfläche exprimieren, wurde in einem Infektionsassay untersucht.  $1-2 \times 10^4$  native

oder Peptid-exprimierende PM-1 Zellen (in 100µl R5-Medium) wurden mit 100µl der lentiviralen EGFP-kodierenden Vektoren pro Kavität in einer 96-Loch-Platte inkubiert (Duplikate, 200 µl Gesamtvolumen pro Ansatz). Die Transduktionseffizienz der nativen PM-1 betrug ca. 15%. Die Transduktion erfolgte bei 31°C, 2000rpm für 60min. Nach Kultivierung der PM-1 Zellen für fünf Tage in einer Feuchtekammer bei 37°C wurden alle Zellen einer Kavität in ein FACS-Röhrchen überführt. Da die Peptid-exprimierenden PM-1 ca. 5% untransduzierte PM-1 enthielten, erfolgte zunächst eine Immunfärbung hinsichtlich Peptidexpression mittels mAk 2F5 und einem Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper. Im Durchflusszytometer wurde der prozentuale Anteil EGFP-exprimierender PM-1 und Peptid-exprimierender PM-1 bestimmt und der Anteil der EGFP-positiven sowie Peptid-positiven PM-1 Zellen bestimmt.

#### **4.2.10 IFN-γ ELISpot**

Mittels ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) kann die Immunantwort der stimulierten CTLs auf Einzelzellebene quantifiziert werden (MIYAHIRA *et al.* 1995; MASHISHI and GRAY 2002). Zytotoxische CD8+ T-Zellen (CTL), die durch Antigene aktiviert werden, setzen das Zytokin IFN-γ frei. Die Methode ähnelt einem Zytokin-spezifischem Sandwich ELISA. Die Kavitäten der 96-Loch-Platte sind mit einem anti-IFN-γ Antikörper beschichtet, der durch die CTL Aktivierung freigesetzte IFN-γ-Moleküle bindet und zellnah fixiert.

Die PBMCs der Spender wurden mit den Antigenen direkt auf der anti-IFN-γ-beschichteten 96-Loch-Platte (Firma Mabtech) inkubiert. Für den Auftauprozess wurde X5-Medium (X5spez) supplementiert mit DNase (2Units/ml Endkonzentration) verwendet, um die Verklumpung der PBMCs zu verhindern. Nach dem Auftauen wurden die PBMCs in 5ml des X5spez-Mediums resuspendiert, zentrifugiert (5min, 1500rpm, RT) und der Überstand dekantiert. Nach Aufnahme der PBMCs in 10ml frischem X5spez-Medium ruhten diese für drei Stunden bei 37°C im Brutschrank, um die unspezifische IFN-γ Sekretion zu minimieren (LETSCH and SCHEIBENBOGEN 2003). Während dieser Inkubationszeit wurden die 96-Loch-Platten 4x mit je 200µl PBS gewaschen und mit 200µl X5-Medium für mind. 30min bei RT geblockt. Nach der Ruhephase wurden die PBMCs pelletiert (5min, 1500rpm, RT) und in frischem X5spez aufgenommen. Die mittels Neubauer-Zählkammer



ermittelte Zelldichte wurde auf  $0,5 \cdot 3 \times 10^6$ /ml eingestellt und  $100 \mu\text{l}$ /Kavität in Duplikaten ausgesät. Hinzu kamen  $50 \mu\text{l}$  X5-Medium oder  $50 \mu\text{l}$  der in X5-verdünnten Antigene:

- PMA/Ionomycin (Endkonzentration:  $10 \text{ ng PMA/ml}$  und  $1 \mu\text{g Ionomycin/ml}$ )
- CEF Peptid Pool (Endkonzentration jedes Peptids:  $6,67 \mu\text{g/ml}$ ) (CURRIER *et al.* 2002)
- 9mer/15mer Peptide von C46-EHO/V2/V2o, CMV/EBV (Endkonzentration:  $5 \mu\text{g/ml}$ )

Antigene und PBMCs wurden für 20h bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank in einer Feuchtekammer kultiviert. Die Visualisierung der einzelnen IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen erfolgte im Lichtmikroskop nach Angaben des Herstellers. Die Verwendung der sog. Matrix-Methode reduzierte die Probenanzahl (MASHISHI and GRAY 2002). Hierzu wurden Peptidmischungen mit jeweils drei unterschiedlichen Peptiden hergestellt (C46-EHO Peptidmischungen A-F (Tabelle 4.2.2), V2o Peptidmischungen I-VI (Tabelle 4.2.3)). Jedes Peptid war in zwei Ansätzen vorhanden (z.B. WQQWERQVRFLDANI in Peptidmischung A und D). Wurde für zwei Peptidmischungen (z.B. A und D) eine IFN-Sekretion detektiert, konnte das immundominante Epitop (z.B. WQQWERQVRFLDANI) ermittelt werden.

**Tabelle 4.2.2 C46-EHO-Peptidmischungen für den ELISpot.**

	A	B	C
D	WQQWERQVRFLDANI	ERQVRFLDANITKLL	RFLDANITKLLLEEAQ
E	ANITKLLLEEAQIQQE	KLLEEAQIQQEKMY	EAQIQQEKMYELQE
F	QQEKMYELQELDKW	NMYELQELDKWASLW	ELQELDKWASLWNWF

**Tabelle 4.2.3 V2o-Peptidmischungen für den ELISpot.**

	I	II	III
IV	WQTWERQVDNITQTI	ERQVDNITQTISKAL	DNITQTISKALEEAQ
V	QTISKALEEAQIQNE	KALEEAQIQNEKMY	EAQIQNEKMYELQK
VI	QNEKMYELQKLNQW	NMYELQKLNQWDIFS	ELQKLNQWDIFS NWF

#### 4.2.11 Dot Blot

Der Dot Blot ist ein semiquantitativer Immunoassay mit dem Antikörper gegen die antiviralen Peptide in HIV Patientenseren detektiert wurden. Im Unterschied zum Western Blot werden die Peptidlösungen hierbei nicht elektrophoretisch aufgetrennt, sondern direkt als punktförmige Fläche (*dot*) auf eine Membran aufgebracht. Die Peptide haften durch hydrophobe Wechselwirkungen und behalten ihre Struktur bei.

Für den Dot Blot wurde eine Nitrozellulosemembran in Streifen geschnitten und zweimal mit 10xPBS gewaschen. 1µl einer Peptidlösung (0,5g/l, verdünnt mit 1xPBS) wurde auf die Membran aufgetragen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden freie Bindungsstellen der Membran mit 5%MPBST für 2h bei RT auf dem Schüttler geblockt. 10µl eines Patientenserums bzw. 0,5µg der mAbs ( $\alpha$ -c-myc, 2F5, huIgG, muIgG) wurden mit einem Membranstreifen in 2ml frischer 5%MPBST-Lösung für 1h bei RT geschüttelt. Nicht-gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 2ml PBST für jeweils 10min entfernt. Der Sekundärantikörper ( $\alpha$ -human/maus-IgG HRP) wurde 1:1000 in 5%MPBST verdünnt, 1ml zu den Membranstreifen gegeben und für 1h bei RT geschüttelt. Durch drei weitere PBST Waschschrte wurden freie Antikörper entfernt. Der Sekundärantikörper ist mit einer Merrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, die Luminol oxidiert. Diese Lichtsignale waren nach Exposition auf einen Röntgenfilm als schwarze Punkte sichtbar.

Des Weiteren wurde ein kompetitiver Dot Blot durchgeführt. C46 wurde auf die Membran gespottet und mit dem Patientenserum oder mit dem Patientenserum in Anwesenheit von T-20 inkubiert. Auf die Nitrozellulosemembran wurde hierfür C46 (1µl einer 0,5g/l Lösung) getropft, getrocknet und mit der 5%MPBST-Lösung geblockt. Zwei verschiedene Ansätze der jeweiligen Probe wurden mit der Membran in 2ml frischer 5%MPBST-Lösung inkubiert. Zum einen wurden 5µl der Seren bzw. 0,5µg von 2F5 verwendet. Zum anderen wurde der gleiche Ansatz mit T-20 (5µl einer 250µM Lösung) gemischt und auf die Membran gegeben. Beide Ansätze wurden 1h auf dem Schüttler inkubiert. Die weitere Durchführung des Assays erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise.

#### 4.2.12 Kartierung der Antikörperbindungsstelle

Antikörperepitope können durch eine Epitopkartierung lokalisiert werden. Hierzu werden überlappende Peptidfragmente vom Peptid synthetisiert und auf eine Oberfläche aufgebracht (z.B. Zellulosemembran). Die zu analysierenden Antikörper (monoklonal oder polyklonal) werden mit der Peptid-gespotteten Membran inkubiert und analog dem Dot Blot System detektiert. Positive Peptid-Antikörper-Reaktionen resultieren in mindestens einem schwarzen Punkt auf der Membran, wodurch die Bindungsstelle des Antikörpers auf dem Peptid lokalisiert werden kann.

Für die Epitopkartierung wurden fertige Peptid-gespottete Membranen von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) erworben. Es wurden lineare Peptidfragmente von maC46 (C46 und IgG2-Linker), C46 und C46-EHO bestehend aus 15 Aminosäuren, versetzt um 3 AS (maC46) bzw. 2 AS (C46, C46-EHO) verwendet (vgl. Tabelle 4.1.5). Die Membran wurde mit 5ml Methanol für 5min und mit 5ml TBS für 10min gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation der Membran in 5ml der 1%igen Blockierlösung über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler geblockt. Der Primärantikörper wurde in der 0,5%igen Blockierlösung verdünnt, so dass die Endkonzentration von mAk 2F5 0,01-0,025µg/5ml bzw. der Patientenseren 10-25µl/5ml betrug. Nach 3h wurde überschüssiger Primärantikörper durch Waschen mit T-TBS (5ml, 5min) entfernt. Der Sekundärantikörper  $\alpha$ -human-IgG HRP wurde in 0,5%iger Blockierlösung verdünnt (Endkonzentration 0,5µl/ml) und für 2h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Ungebundener Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen (5ml TBS, 5min) entfernt. Die Detektion erfolgte analog zum Dot Blot.

Die Peptid-gespotteten Membranen können 4-5-mal verwendet werden. Für die Entfernung der gebundenen Antikörper wurde die Membran mit jeweils 5ml der folgenden Lösungen gewaschen: Aqua dest. (3x, 10min, RT), Regenerationspuffer (4x, 30min, 50°C), 10xPBS (3x, 20min, RT), T-TBS (3x, 20min, RT) und TBS (3x, 20min, RT). Die erfolgreiche Entfernung der Antikörper wurde überprüft, indem die Membran mit dem Sekundärantikörper und der ECL-Lösung inkubiert wurde (wie im obigen Abschnitt beschrieben). Falls noch Antikörper detektiert wurden, musste das Regenerationsprotokoll wiederholt werden.

#### 4.2.13 Effektorfunktionen von Antikörpern: ADCC und CDC

Die Untersuchung der ADCC- und CDC-Antwort erfolgte im Wesentlichen nach publizierten Protokollen (VAN MEERTEN *et al.* 2006a; VAN MEERTEN *et al.* 2006b). Für beide Testsysteme wurden HL-60 als Targetzellen eingesetzt, die zugleich maC46 und CD20 exprimierten (HL-60-maC46-CD20). Als Positivkontrolle wurde das CD20-Rituximab-System verwendet (VAN MEERTEN *et al.* 2006a). Der chimäre mAk Rituximab (RTX) bindet CD20 (REFF *et al.* 1994) und ist in Anwesenheit von Komplement und/oder NK-Zellen zytotoxisch (FLIEGER *et al.* 2000; PESCOVITZ 2006). Native HL-60 wurden für die Bestimmung der Antikörper-unabhängigen Zelllyse eingesetzt. Für die Untersuchung der CDC-Antwort wurde frisch angesetztes Hasenkomplement verwendet, für die ADCC-Antwort frische Ficoll-aufgereinigte PBMCs eines gesunden Spenders.

**CFSE-FÄRBUNG DER TARGETZELLEN:** Für die Unterscheidung der Targetzellen von den Effektorzellen (ADCC) bzw. Komplementresten (CDC) wurden die Targetzellen mit CFDA-SE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) versetzt, welches intrazellulär durch Esterasen in das fluoreszierende Molekül CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*) umgewandelt wird (WESTON and PARISH 1990; LYONS and PARISH 1994).  $1 \times 10^7$  Targetzellen wurden hierfür in ein FACS-Röhrchen überführt, bei 1500rpm für 5min zentrifugiert und in 1ml 1xPBS aufgenommen. Nach Zugabe von 5 $\mu$ l der 0,1mM CFDA-Stocklösung (Endkonzentration 0,5 $\mu$ M) erfolgte eine Inkubation für 15min bei 37°C im Brutschrank unter mehrmaligem Schütteln. Die Zellen wurden zentrifugiert (1500rpm, 5min) und in 1ml vorgewärmten R5-Medium aufgenommen. Nach 30min bei 37°C wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 1ml R5-Medium resuspendiert.

**ADCC-ASSAY:** Von den CFSE-positiven Targetzellen wurden pro Ansatz  $2,5 \times 10^4$  in 200 $\mu$ l R5-Medium eingesetzt. Als Effektorzellen kamen Ficoll-aufgereinigte PBMCs eines gesunden Spenders (GSH, Frankfurt am Main) zum Einsatz (Kapitel 4.2.4). Für den ADCC-Assay wurde ein 1:50 Verhältnis der Target- zu Effektorzellen eingesetzt. Die Antikörper wurden in R5-Medium verdünnt. Von mAk RTX wurde eine Stocklösung von 50 $\mu$ g/ml und von den Patientenseren bzw. dem AB-Serum eine Stocklösung von 50 $\mu$ l/ml (=1:20 Verdünnung) angefertigt. Für den dreifachen Ansatz wurden 600 $\mu$ l der Targetzellen mit 600 $\mu$ l der Effektorzellen sowie 300 $\mu$ l der Antikörperlösung gemischt. Von dieser Lösung

wurden zweimal 500µl in die 48-Loch-Platte und jeweils 100µl in zwei FACS-Röhrchen für die Bestimmung der Ausgangszellzahl überführt. Nach vierstündiger Inkubation der 48-Loch-Platte bei 37°C wurden die Zellen resuspendiert und für jeweils 2x100µl die Zellzahl im Durchflusszytometer ermittelt.

**CDC-Assay:** Für alle Ansätze wurde FCS-freies R5-Medium verwendet. Von den CFSE-positiven Targetzellen wurden 2,5x10<sup>5</sup> pro Ansatz in 200µl R5-Medium eingesetzt. Ein Vial des lyophilisierten Hasenkomplements wurde mit 5ml Aqua dest. rekonstituiert. Die Endkonzentration des Hasenkomplements betrug 10% pro Ansatz. Von dem Hasenkomplement wurde eine Stocklösung von 250µl/ml R5-Medium hergestellt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog dem ADCC-Assay, wobei lediglich die Effektorzellen durch 600µl des Hasenkomplements ersetzt wurden.

**DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER TARGETZELLZAHL:** Die absolute Zellzahl wurde durch Zugabe einer definierten Menge von Zählbeads ermittelt. Die Lebend-Tot-Unterscheidung der Targetzellen erfolgte durch Propidiumiodid (*propidium iodide*, PI). In einem FACS-Röhrchen wurden 100µl der Zellsuspension mit 400µl FACS-Puffer gemischt. Unmittelbar vor der Probenanalyse wurden 5µl einer 1/10 verdünnten PI-Lösung sowie 20µl der Zählbeads zugegeben und die Probe im Durchflusszytometer analysiert. Von den vier erhaltenen Zellpopulationen wurden ausschließlich die lebenden Targetzellen analysiert (PI-, CFSE+) und hiermit unter Verwendung der Zählbeads die absolute Targetzellzahl ermittelt. Für die Berechnung der prozentualen Zelllyse wurde die Zellzahl nach der vierstündigen Inkubationszeit auf die Ausgangszellzahl normalisiert.

#### 4.2.14 Internetprogramme und Datenbanken

In dieser Arbeit wurden zwei kommerziell erhältliche Internetprogramme verwendet, um die MHC-Bindungseigenschaften in einer beliebigen Aminosäuresequenz vorherzusagen:

- BIMAS: [http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) (PARKER *et al.* 1994)
- SYFPEITHI: <http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm>  
(RAMMENSEE *et al.* 1999)

Ferner wurde die Los Alamos Datenbank für die Analyse der HIV Immunogenität verwendet ([www.hiv.lanl.gov/content/index](http://www.hiv.lanl.gov/content/index)). Die V2o Aminosäuresequenz wurde mittels

der HIV Sequenzdatenbank optimiert ([www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html)), die sämtliche Aminosäuresequenzen von HIV-1, HIV-2 und SIV enthält (LEITNER T *et al.* 2005). Für die Identifizierung von Antikörper- und CTL-Epitopen wurde die immunologische Datenbank [www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html) verwendet. Die Häufigkeit des Auftretens der HLA-Allele für diverse Bevölkerungsgruppen ist in der Datenbank dbMHC (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/main.cgi?cmd=init>) gelistet.

#### **4.2.15 Graphikerstellung und Statistik**

Mit Hilfe des Programms GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) wurden die Graphiken erstellt. Die Ergebnisse der Neutralisationsassays wurden als arithmetischer Mittelwert angegeben. Die Streuung wurde als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) dargestellt. Die Analyse der Dosis-Wirkungskurven hinsichtlich konzentrationsabhängiger Effekte der antiviralen Peptide erfolgte durch logistische Regression, anhand dessen die halbmaximale Hemmkonzentration ( $IC_{50}$ ) berechnet wurde.

## 5 ERGEBNISSE

Der Eintritt von HIV-1 wird durch Peptide gehemmt, die von der Aminosäuresequenz der HIV CHR abgeleitet sind und mit der HIV NHR interagieren (sog. C-Peptide) (WILD *et al.* 1994). Derzeit stehen unterschiedliche Produktionsarten für therapeutische C-Peptide zur Verfügung:

- Synthetisch-hergestellte lösliche Peptide:
  - Der Prototyp ist T-20 (C36 Peptid, Enfuvirtid, Fuzeon), welches 2003 von der FDA für die klinische Anwendung an HIV Patienten zugelassen wurde (ROBERTSON 2003; MATTHEWS *et al.* 2004).
- Expression im biologischen System:
  - Membranständig: Nach viraler Transduktion wird das Peptid C46 membranständig auf Zellen (*membrane-anchored*, maC46) exprimiert (Egelhofer *et al.* 2004). T-Zelllinien, primäre T-Lymphozyten und Stammzellen sind hierbei vor einer HIV-1-Infektion geschützt (EGELHOFER *et al.* 2004; VAN LUNZEN *et al.* 2007; KIMPEL *et al.* 2010; YOUNAN *et al.* 2013).
  - Sezerniert: Nach viraler Transduktion werden antivirale Peptide wie C46 in den Extrazellularraum sezerniert (*secreted*, sC46) (Egerer *et al.* 2011). Hierdurch können modifizierte als auch unmodifizierte Zellen vor einer HIV Infektion geschützt werden (sog. *bystander effect*). Die Multimerisierung des Peptids C46 ermöglichte ebenfalls eine stabile Expression als Heptamer im eukaryotischen System (DERVILLEZ *et al.* 2006).

HIV-1-infizierte Patienten werden in diesem Fall mit natürlichen vorkommenden HIV-1 Peptiden behandelt. Alle Behandlungsmöglichkeiten weisen jedoch die gleiche Problematik auf: bedingt durch die langjährige HIV-1 Infektion wurden virale Hüllproteine dem Immunsystem bereits präsentiert und haben somit eine adaptive Immunantwort induziert. Dies kann durch diverse Mechanismen zu einer verminderten therapeutischen Wirkung führen. Frühere Untersuchungen zeigten z.B., dass HIV-1 Patienten bereits vor Reinfusion von maC46-exprimierenden T-Zellen eine humorale Immunantwort gegen das

antivirale Peptid C46 entwickelt hatten (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007). Diese Antikörper könnten eine antiretrovirale Therapie mit C-Peptiden blockieren, indem Effektormechanismen der Antikörper die genetisch-modifizierten Zellen lysieren oder den antiviralen Effekt des Peptids neutralisieren. Die intrazelluläre Expression antiviraler Peptide kann zusätzlich eine zelluläre Immunantwort auslösen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein Peptid entwickelt werden, welches eine geringe Immunogenität aufweist und mit hoher Wirksamkeit den HIV-1 Eintritt unterbindet.

C46, T-20, T-1249, SC35EK und C34-EHO verhindern den Eintritt diverser HIV-Isolate (WILD *et al.* 1994; OTAKA *et al.* 2002; EGELHOFER *et al.* 2004; GUSTCHINA *et al.* 2005; SCHNEIDER *et al.* 2005). Diese Peptide imitieren einen Abschnitt des gp41 (CHR/C34, MPER), divergieren jedoch in der Aminosäuresequenz (Tabelle 4.2.1). C46 und T-20 basieren auf der gp41 Sequenz des HIV-1 Isolates HXB2. T-1249 besteht aus Aminosäuresequenzen des HIV-1, HIV-2 und SIV. SC35EK enthält lediglich die konservierten Aminosäuren des HIV-1 HXB2, wobei die Detektion von SC35EK durch C-terminale Erweiterung um das c-myc Epitop (EQKLISEEDL) ermöglicht wurde. C34-EHO ist von der CHR des HIV-2 Isolates EHO abgeleitet. Für dessen Nachweis wurden C-terminal zwölf Aminosäuren der HIV-1 HXB2 MPER angehängt, welche das Epitop ELDKWA des monoklonalen Antikörpers (mAk) 2F5 enthält (neue Bezeichnung: C46-EHO). Die Peptide T-20, C46 und T-1249 wurden aufgrund des bereits enthaltenen ELDKWA Epitops ebenfalls durch mAk 2F5 detektiert.

**Tabelle 4.2.1 Antivirale C-Peptide als Ausgangspunkt der Entwicklung. - = Deletion, unterstrichene Aminosäuren = angehängte Epitope für den Peptidnachweis**

Peptid	Aminosäuresequenz (AS 628-673)	Ursprung
C46	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	HIV-1
T-20	-----YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	HIV-1
T-1249	WQEWQKIT-----ALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEIF	HIV-1/-2, SIV
SC35EK	WEEWDKKIEEYTKKIEELIKKSEEQQKKNEEELKKE <u>EQKLISEEDL</u> -	HIV-1, <u>c-myc</u>
C46-EHO	WQQWERQVRFLDANITKLLLEEAQIQQEKMYELQ <u>ELDKWASLWNWF</u>	HIV-2, <u>HIV-1</u>



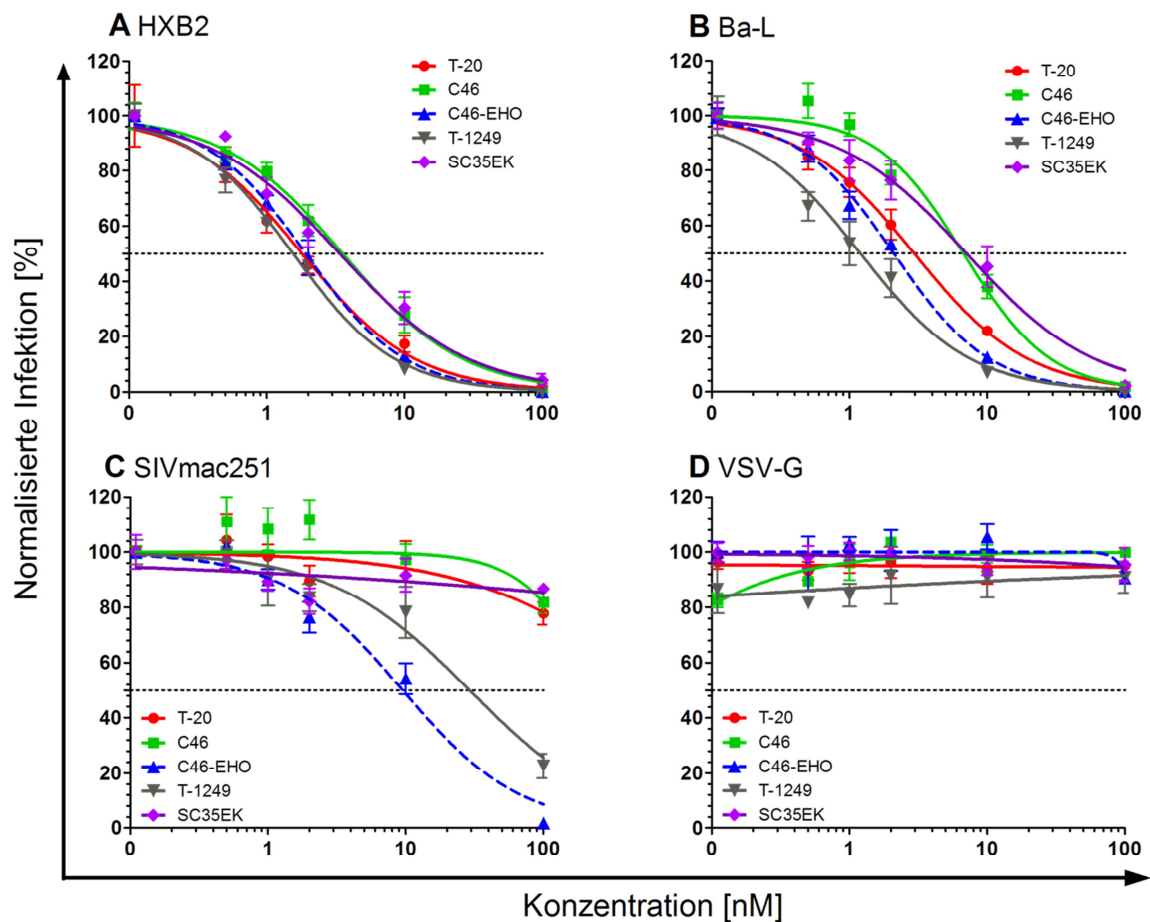
## 5.1 Vergleichende Analyse ausgewählter C-Peptide

### 5.1.1 Antivirale Aktivität der synthetischen C-Peptide

Der Vergleich der antiviralen Aktivität der Peptide erfolgte in einem Neutralisationsassay (Kapitel 4.2.8). Hierfür wurden PM-1 Zellen in Anwesenheit inhibitorischer Peptide mit einer definierten Menge replikationsinkompetenter Vektoren, die virale Hüllproteine auf der Oberfläche exprimierten, transduziert. Zudem kodierten die Vektoren für das Markergen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), so dass nach Transduktion durchflusszytometrisch der relative Anteil EGFP-positiver PM-1 Zellen bestimmt werden konnte. Erfolgt die Transduktion in Anwesenheit antiviraler Peptide reduziert sich der Anteil EGFP-positiver Zellen. Durch Verwendung unterschiedlicher Peptidkonzentrationen wird der  $IC_{50}$ -Wert (*half-maximal inhibitory concentration*) ermittelt, welcher der Wirkstoffkonzentration für eine 50%ige Infektionshemmung entspricht.

Alle synthetischen Peptide neutralisierten konzentrationsabhängig Vektoren, die mit dem Glykoprotein von HIV-1 HXB2 (X4-trop), HIV-1 Ba-L (R5-trop) bzw. SIVmac251 (R5-trop) umhüllt waren (Abbildung 5.1.1, Anhang 9.1). Die Infektion der HXB2-Env-umhüllten Vektoren wurde von allen Peptiden gleichermaßen unterbunden. Die  $IC_{50}$ -Werte lagen hierbei im Bereich von 2,1-6,1nM (Abbildung 5.1.1 A). Deutliche Unterschiede traten bei Verwendung der Ba-L-Env-umhüllten Vektoren auf (Abbildung 5.1.1 B). Obwohl die Aminosäuresequenz von C46-EHO und T-1249 lediglich zu etwa 59% bzw. 54% mit der des C46 übereinstimmt, inhibierten C46-EHO und T-1249 auch die HIV-1-Env-umhüllten Vektoren. T-20, C46 und SC35EK wiesen keine antivirale Wirkung gegenüber SIVmac251-Env-umhüllten Vektoren auf, im Gegensatz zu C46-EHO ( $IC_{50}=13,1nM$ ) und T-1249 ( $IC_{50}=22,6nM$ ) (Abbildung 5.1.1 C).

Die Spezifität der Neutralisation wurde mit dem Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) nachgewiesen. VSV-G weist keine Sequenzhomologien mit lentiviralen Hüllproteinen auf. VSV-G infizierte die Zellen in Anwesenheit der Peptide zu 100%. Die Infektionshemmung war somit spezifisch für HIV (Abbildung 5.1.1 D).



**Abbildung 5.1.1 Die synthetischen Peptide neutralisieren spezifisch SIV- und HIV-1-Env-umhüllte Vektoren im nanomolaren Konzentrationsbereich.**

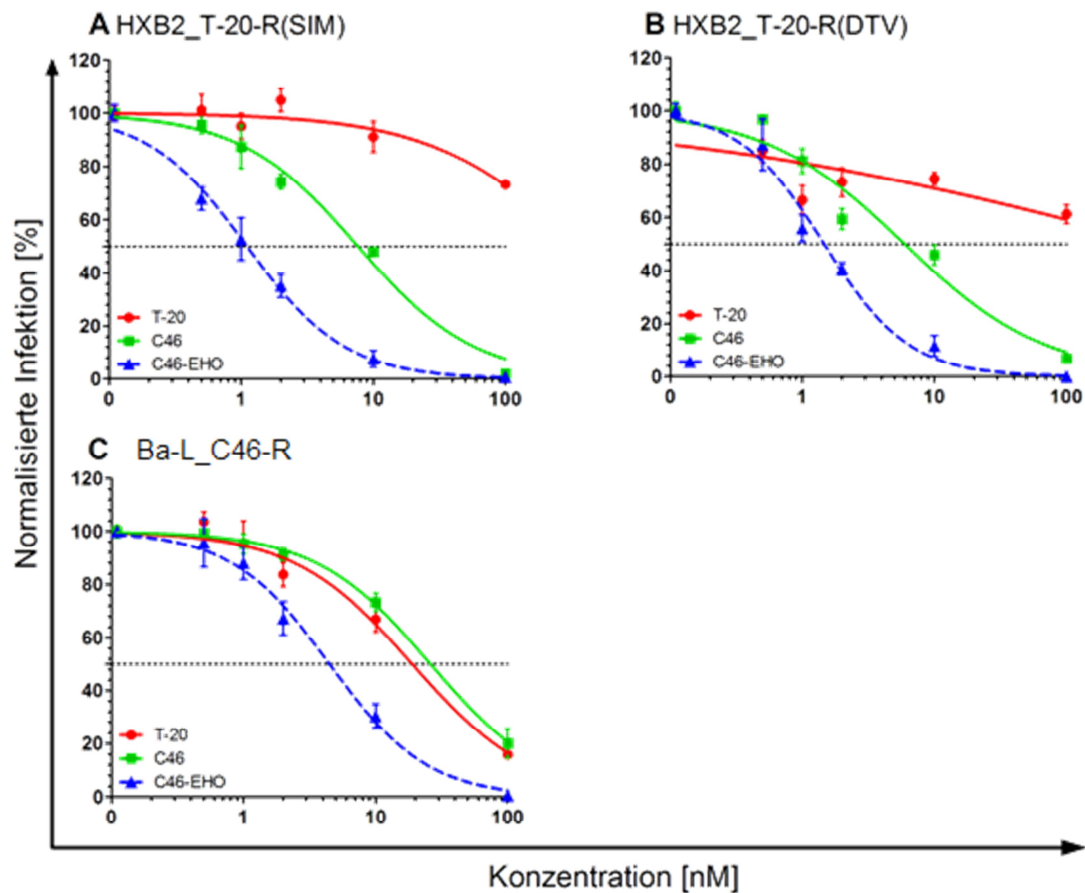
PM-1 Zellen wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen von T-20, C46, C46-EHO, T-1249 oder SC35EK mit lentiviralen Vektoren transduziert, die mit diversen Glykoproteinen umhüllt worden waren und für das EGFP-Markergen kodierten ((A) HIV-1 HXB2 (X4-trop), (B) HIV-1 Ba-L (R5-trop), (C) SIVmac251 (R5-trop), (D) VSV-G). Nach fünf Tagen wurde durchflusszytometrisch der Anteil EGFP-positiver PM-1 bestimmt. Dargestellt ist die Infektion normalisiert auf die Infektion peptidfreier PM-1 (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von zwei unabhängigen Versuchen mit Duplikaten. Die logistischen Regressionskurven wurden mit GraphPadPrism 5 erstellt und hierdurch die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt.

Inhibitorische Peptide müssen den Eintritt von T-20- und C46-resistenten Viren verhindern, um einen Wirkungsverlust zu vermeiden. In verschiedenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* HIV-1-Isolate selektiert werden können, die durch Mutationen in der gp41 NHR ( $^{547}GIV^{549}$ ) resistent gegenüber der antiviralen Wirkung von T-20 sind (RIMSKY *et al.* 1998; WEI *et al.* 2002; SISTA *et al.* 2004). Ferner führte die *in vitro* Passagierung von HIV-1 in Anwesenheit von T-1249 zu resistenten Isolaten, die ebenfalls Mutationen im GIV-Motiv aufwiesen und zugleich T-20-

kreuzresistent waren (MELBY *et al.* 2007; EGGINK *et al.* 2008). Indessen ergab die Passagierung von HIV-1 auf maC46-exprimierenden PM-1 Zellen ein Isolat, welches lediglich eine verminderte Wirkung gegenüber C46 aufwies (HERMANN 2007; HERMANN *et al.* 2009a). In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen zwei T-20-resistente Hüllproteine verwendet, die auf der Aminosäuresequenz des HIV-1 HXB2 basierten und jeweils eine Doppelmutation in dem Motiv <sup>547</sup>GIV<sup>549</sup> der gp41 NHR aufwiesen (SIM im HXB2\_T-20-R(SIM) bzw. DTV im HXB2\_T-20-R(DTV)) (RIMSKY *et al.* 1998). Zum anderen wurde das HIV-1 Ba-L Hüllprotein benutzt, welches 10-fach weniger sensitiv gegenüber dem synthetischem C46-Peptid ist (Ba-L\_C46-R) (HERMANN 2007; HERMANN *et al.* 2009a). Dieses Hüllprotein weist drei Mutationen im gp120 (I184T, N302Y, E351K) und jeweils eine Mutation in der NHR (A582T) und der CHR (N637K) des gp41 auf.

Wie erwartet, hatte T-20 nur einen geringen antiviralen Effekt auf die Infektion der HXB2\_T-20-R-Env-umhüllten Vektoren (Abbildung 5.1.2 A und B, Anhang 9.1). Das C46-Peptid zeigte bei beiden Mutanten eine nahezu unveränderte Aktivität ( $IC_{50}=7,0nM$  für HXB2\_T-20-R(SIM) bzw.  $IC_{50}=6,0nM$  HXB2\_T-20-R(DTV)) im Vergleich zum Hüllprotein des HXB2-Wildtyps ( $IC_{50}=6,1nM$ ). Hingegen hemmte C46-EHO die HXB2\_T-20-R-Env-umhüllten Vektoren minimal besser im Vergleich zum HXB2-Hüllprotein ( $1,3nM$  für HXB2\_T-20-R(SIM),  $1,5nM$  für HXB2\_T-20-R(DTV),  $2,1nM$  für HXB2).

Die synthetischen Peptide T-20, C46 und C46-EHO verhinderten die Infektion der Vektoren umhüllt mit dem C46-resistenten Glykoprotein Ba-L\_C46-R (Abbildung 5.1.2 C). Allerdings wiesen alle drei Peptide eine verminderte Wirksamkeit verglichen mit dem Hüllprotein des Ba-L-Wildtyps auf. Die Neutralisationsfähigkeit von C46 bzw. T-20 war hierbei 3,4-fach ( $IC_{50}=27,7nM$ ) bzw. 7,6-fach ( $IC_{50}=19,1nM$ ) geringer im Vergleich zum Hüllprotein des Ba-L-Wildtyps. Auch für C46-EHO stellte sich eine 1,7-fach verminderte Aktivität heraus ( $IC_{50}=4,5nM$ ). C46-EHO hatte somit eine bessere antivirale Aktivität gegenüber den T-20- und C46-resistenten Viren, im Vergleich zu den Peptiden T-20 und C46.



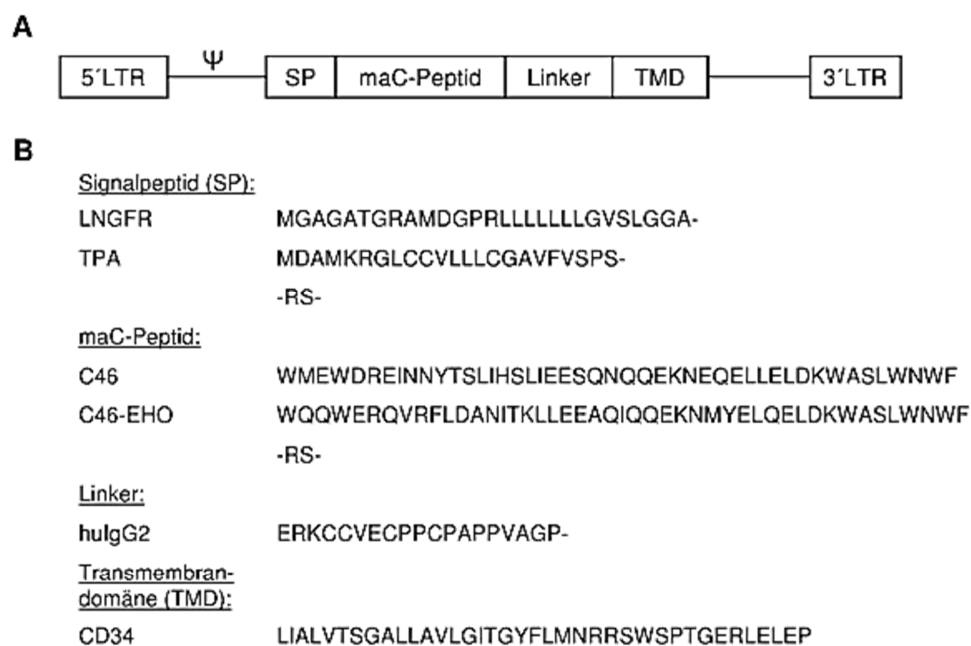
**Abbildung 5.1.2 Das synthetische Peptid C46-EHO inhibiert T-20- und C46-resistenten Vektoren.**

PM-1 Zellen wurden in Anwesenheit steigender Peptidkonzentrationen von T-20, C46 oder C46-EHO mit lentiviralen Vektoren transduziert, die mit HIV-1 T-20-resistenten ((A) HXB2\_T-20-R(SIM), (B) HXB2\_T-20-R(DTV)) oder HIV-1 C46-resistenten ((C) Ba-L\_C46-R) Glykoproteinen umhüllt worden waren und das Markergen für EGFP trugen. Nach fünf Tagen wurde der prozentuale Anteil EGFP-positiver PM-1 mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt ist die Infektion normalisiert auf die Infektion peptidfreier PM-1 (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von zwei unabhängigen Versuchen mit Duplikaten. Die logistischen Regressionskurven wurden mit GraphPadPrism 5 erstellt und hierdurch die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt.

### 5.1.2 Antivirale Aktivität von membranständigem C46-EHO

Aus den bisherigen Experimenten ging hervor, dass das C-Peptid C46-EHO in synthetischer Form die virale Infektion verschiedener Env-umhüllter Vektoren unterbindet. Aufgrund der Nachteile synthetisch-hergestellter Peptide sollte evaluiert werden, ob membranständiges C46-EHO (neue Bezeichnung: maC46-EHO) analog zu membranständigen C46 (maC46) HIV-1-empfindliche Zellen vor einer Infektion schützt.

Im Gegensatz zu synthetischem Peptid kann die Menge membranständiger Peptide nicht variabel eingesetzt werden. Die Expressionsstärke der membranständigen Peptide wurde durch einen unterschiedlichen Aufbau im Vektorrückgrat variiert (HERMANN 2007; HERMANN *et al.* 2009b). Die Klonierung der Vektoren erfolgte durch Dr. Anne Hubert (GSH, Frankfurt am Main). Der schematische Aufbau der Konstrukte ist in Abbildung 5.1.3 aufgezeigt. Die LTRs (*long terminal repeats*) sind für die Integration des Gens in das zelluläre Genom notwendig. Zusätzlich enthalten die Vektoren das Verpackungssignal  $\psi$  zum Einbau in replikationsinkompetente Vektoren. Das Signalpeptid wird für den Transport zur Zelloberfläche benötigt. Die Transmembrandomäne verankert das Peptid in der Zellmembran. Die Gelenkregion (Linker) verleiht dem C-Peptid Flexibilität und Abstand zur Zellmembran.

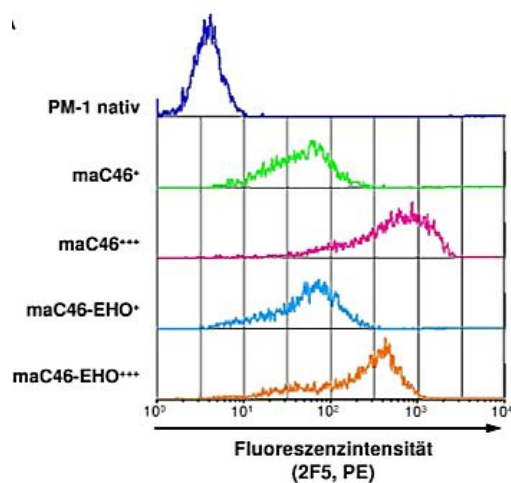


**Abbildung 5.1.3 Schematischer Aufbau der gammaretroviralen Vektoren für die Expression membranständiger C-Peptide.**

(A) Der gammaretrovirale Vektor wurde von sog. LTRs (*long terminal repeats*) flankiert, die für die Integration des therapeutischen Gens in das zelluläre Genom notwendig sind. Die membranständigen C-Peptide (maC-Peptid) C46 oder C46-EHO wurden ferner von verschiedenen Gerüstelementen flankiert: Am N-Terminus befindet sich das Signalpeptid, um den Transport zur Zelloberfläche zu ermöglichen. Eine flexible Gelenkregion (Linker) verbindet das maC-Peptid mit der C-terminalen Transmembrandomäne (TMD). Das Verpackungssignal  $\psi$  wurde für den Einbau in replikationsinkompetente Vektoren benötigt. (B) Aminosäuresequenzen der Vektorelemente. LNGFR: *human low affinity nerve growth factor receptor*, TPA: *human tissue-type plasminogen activator*, hulG2: humanes Immunglobulin G der Subklasse 2, RS: Restriktionsschnittstelle.

Durch die Transduktion mit unterschiedlichen gammaretroviralen Vektoren wurde maC46-EHO in zwei unterschiedlichen Stärken auf der Zelloberfläche der jeweiligen Zelllinie exprimiert („+“ (niedrig) bzw. „+++“ (hoch)). Für die Herstellung der maC46-EHO-exprimierenden Zelllinien wurden native PM-1 Zellen zu ca. 5% mit den gammaretroviralen Vektoren transduziert und mittels Durchflusszytometrie zu einer reinen Peptid-exprimierenden Zelllinie angereichert (Kapitel 4.2.6 und 4.2.7). PM-1 Zellen mit maC46 in zwei Expressionsstärken wurden von Dr. Felix Hermann (GSH, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Die hierbei verwendeten Vektoren wiesen eine zum maC46-EHO-Konstrukt identische Transgenkonfiguration auf (Abbildung 5.1.3).

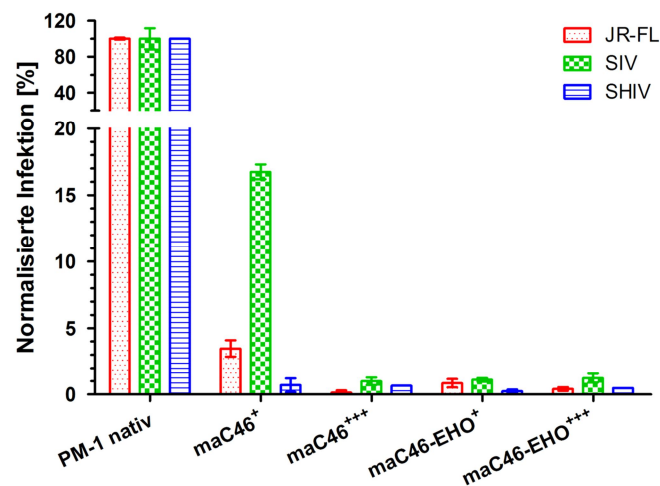
Der Nachweis von maC46 und maC46-EHO erfolgte durch indirekte FACS-Färbung mittels mAk 2F5 (Kapitel 4.2.5). In Abbildung 5.1.5 sind die unterschiedlichen Expressionsstärken für ma-C46 und maC46-EHO in einem Histogramm im Vergleich zu nativen PM-1 gegenübergestellt. Die hohen und niedrigen Expressionshöhen von maC46 entsprachen denen von maC46-EHO und waren somit vergleichbar.



**Abbildung 5.1.4 Expressionsstärken der membranständigen Peptide maC46/maC46-EHO auf PM-1 Zellen.**

Native PM-1 wurden mit gammaretroviralen Vektoren transduziert, die für maC46 oder maC46-EHO in niedriger (+) oder hoher (+++) Expression kodierten. Die Expressionsstärke wurde durch indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung des mAks 2F5 und eines PE-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung sind als Histogramm (Y-Achse: relative Ereignisse; X-Achse: Fluoreszenzintensität) dargestellt.

Um die Wirksamkeit des membranständigen C46-EHO zu analysieren, wurden die maC46- bzw. maC46-EHO-exprimierenden PM-1 Zelllinien in einem Infektionsassay mit replikationsinkompetenten Viren eingesetzt (Abbildung 5.1.5, Kapitel 4.2.9). MaC46-EHO-exprimierende PM-1 waren unabhängig von der Expressionshöhe vollständig vor der Infektion mit JR-FL-, SIV- oder SHIV-Env-umhüllten Vektoren geschützt. Hingegen gewährte die geringe Expression von maC46 keinen vollständigen Schutz vor der JR-FL Infektion (4% der maC46<sup>+</sup> PM-1 Zellen wurden infiziert). Ebenso infizierten SIV-Env-umhüllte Vektoren ca. 17% dieser Zellen. C46-EHO war in membranständiger Form somit biologisch potenter im Vergleich zu C46 und bedingt zudem niedrigere Expressionslevel.



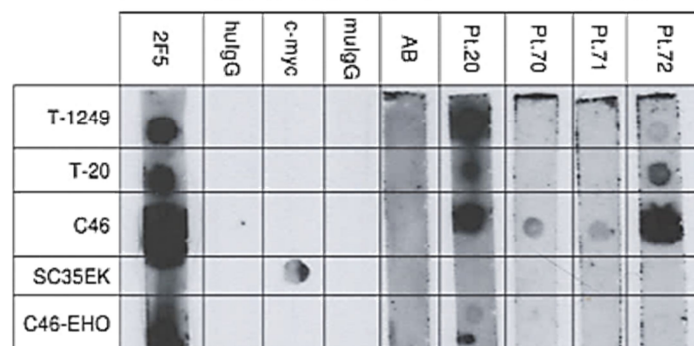
**Abbildung 5.1.5** Eine geringe Expression von maC46-EHO verhindert vollständig die Infektion durch SIV- bzw. JR-FL-Env-umhüllte Vektoren, im Gegensatz zu maC46.

In einem Infektionsassay wurden maC46- bzw. maC46-EHO-exprimierende PM-1 Zelllinien mit Env-umhüllten Vektoren (JR-FL (R5-trop), SIV (R5-trop) oder SHIV) transduziert. Nach fünf Tagen wurde der Anteil an EGFP- und Peptid-positiven PM-1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist die Infektion normalisiert auf native PM-1 (Mittelwert  $\pm$  Stabw) von einem repräsentativen Versuch.

### 5.1.3 Antikörperreaktivität von HIV Seren

Die Untersuchung anhand einer Kohorte von zehn AIDS Patienten zeigte, dass 80% der Patienten maC46-spezifische Antikörper im Serum aufwiesen (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007). Zunächst sollten die Resultate für C46 in einer Kohorte von 79 Patientenseren verifiziert werden. Zudem sollte die Antikörperreaktivität gegen T-20, T-1249, SC35EK und C46-EHO analysiert werden. Anti-Peptid Antikörper im Serum der Patienten wurden

mittels Dot Blot bestimmt (Abbildung 5.1.6, Kapitel 0). Als Positivkontrolle wurde mAk 2F5 eingesetzt, da dessen Epitop in den Peptiden T-1249, T-20, C46 und C46-EHO vorhanden ist. Hingegen wurde SC35EK durch einen anti-c-myc Antikörper nachgewiesen. Ein schwarzer Punkt (*dot*) auf der Membran repräsentiert positive Peptid-Antikörper-Reaktionen. Humanes und murines IgG diente als Negativkontrolle für die Detektion unspezifischer Bindungen. Das HIV-1 Patientenserum Pt.20 wies Antikörper gegen alle Peptide, außer SC35EK, auf und wurde als positives Kontrollserum eingesetzt. Von den drei beispielhaft dargestellten Patientenseren reagierten Pt.70 und Pt.71 ausschließlich mit C46. Das Serum von Pt.72 wies überdies Antikörper gegen T-1249 und T-20 auf.



**Abbildung 5.1.6 Exemplarische Ergebnisse eines Dot Blots.**

Auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Peptidlösungen (T-20, C46, SC35EK, T-1249, C46-EHO) aufgetropft und mit den Positivkontrollen (mAk 2F5, mAk c-myc), Negativkontrollen (huIgG, humanes IgG; muIgG, murines IgG; AB, anti-HIV Antikörper-negatives Serum) oder dem Patientenserum (Pt.) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemilumineszenz. Die Expositionszeit betrug 10sec.

Für die Analyse der bestehenden humoralen Immunantwort gerichtet gegen die antiviralen Peptide wurden 79 Patientenseren mittels Dot Blot analysiert:

- 35 therapierte HIV-1 Patientenseren (ART = antiretrovirale Therapie)
- 34 therapienaive HIV-1 Patientenseren (keine ART)
- 10 HIV-2 Patientenseren

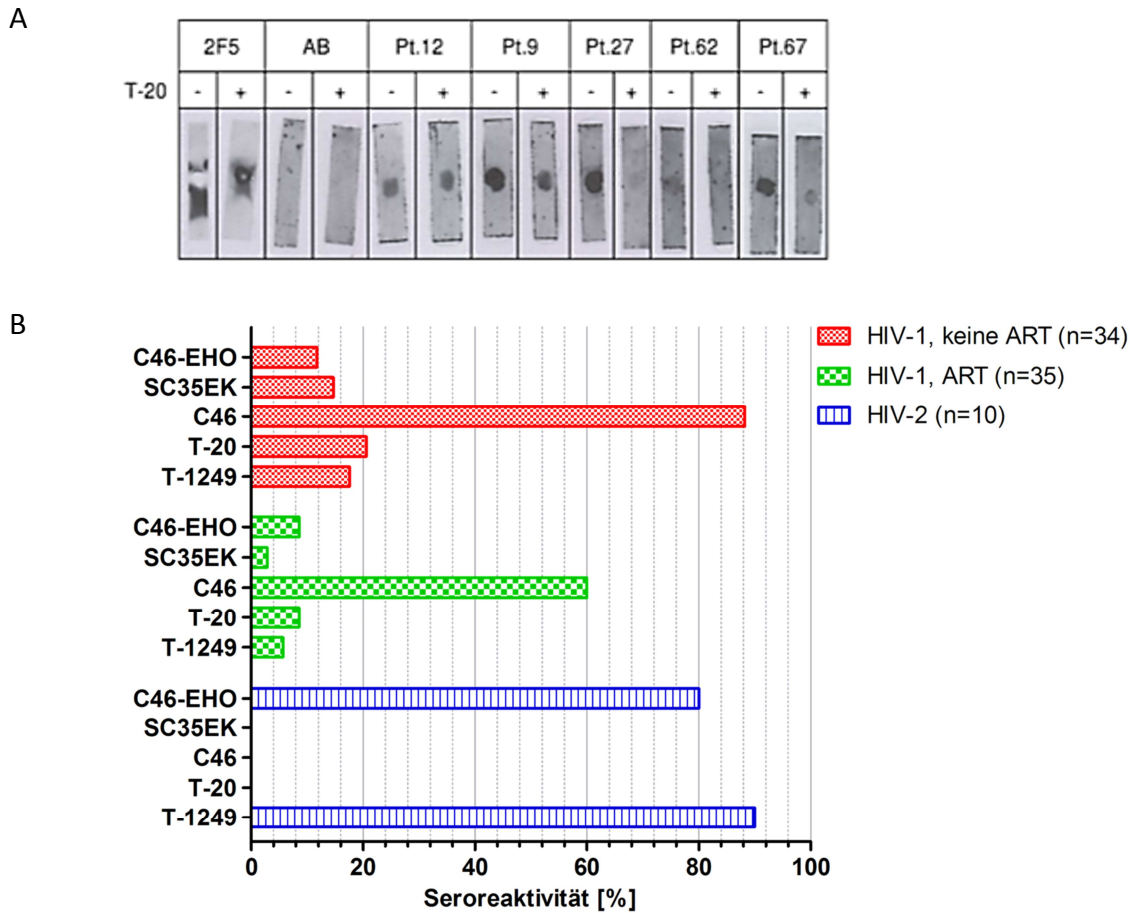
In Abbildung 5.1.7 B und Anhang 9.2 ist der prozentuale Anteil der Patienten dargestellt, die Antikörper im Serum gegen die Peptide aufwiesen (sog. Seroreaktivität). Generell war die Seroreaktivität der therapienaiven HIV-1 Patienten höher im Vergleich zu ART-Patienten und war vergleichbar mit LTNP Patientenseren. Die Mehrheit der HIV-1



Patienten wies Serumantikörper auf, die gegen das C46-Peptid gerichtet waren (88% der therapienaiven bzw. 60% der ART-Patienten). Diese Frequenz entsprach den Ergebnissen, welche bereits im Rahmen der klinischen Studie unter Verwendung einer maC46-exprimierenden T-Zelllinie ermittelt wurden (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007).

Ogleich die Aminosäuresequenz von C46 und T-20 weitgehend übereinstimmen, kamen T-20-spezifische Antikörper lediglich bei 9% der ART-behandelten Patienten bzw. 21% der therapienaiven Patienten vor (Abbildung 5.1.7 B). Diese geringe Frequenz ist durch den hier verwendeten Dot Blot bedingt. In einem kompetitiven Dot Blot wurden C46-gespottete Membranen mit dem HIV-1 Patientenserum inkubiert (Kapitel 0). Lösliches T-20 wurde parallel als Kompetitor hinzugegeben, um T-20-spezifische Antikörper zu detektieren. Die Inkubation von 2F5 mit den C46-gespotteten Membran ergab eine sehr starke Reaktion, vermutlich durch einen hohen Überschuss an C46 oder 2F5, konnte aber trotzdem durch Zugabe von T-20 kompetitiert werden (ersichtlich an der verminderten Intensität des Dots) (Abbildung 5.1.7 A). Demnach bindet 2F5 sowohl T-20 als auch C46. AB-Serum (anti-HIV Antikörper-negatives Serum) und das Serum von Pt.12 wiesen keine anti-T-20 Antikörper auf. Hingegen konnten die C46-spezifischen Antikörper im Serum der Patienten Pt.9, Pt.27, Pt.62 und Pt.67 durch Zugabe von löslichem T-20 kompetitiert werden. Die Analyse von insgesamt 15 HIV-1 Patientenseren ergab, dass 80% dieser Seren C46 und T-20 erkannten und entsprach somit der C46-Reaktivität.

SC35EK-spezifische Antikörper traten bei sehr wenigen HIV-1 Patienten auf (15% der therapienaiven Patienten, 3% der ART-Patienten) (Abbildung 5.1.7 B). Im SC35EK sind alle variablen nicht-konservierten Aminosäuren gegen Lysin oder Glutamat ausgetauscht (OTAKA *et al.* 2002), wodurch vermutlich die Antikörperpitope verändert wurden. Die Seroreaktivität von SC35EK war vergleichbar zu den Peptiden T-1249 und C46-EHO. T-1249-spezifische Antikörper kamen bei 18% der unbehandelten bzw. 6% der therapierten Patienten vor. 9% der therapierten bzw. 12% der unbehandelten HIV-1 Patienten wiesen anti-C46-EHO Antikörper im Serum auf. C46-EHO basiert auf der Aminosäuresequenz des HIV-2 Isolates EHO, so dass im Dot Blot ebenso HIV-2 Patientenseren untersucht wurden (Abbildung 5.1.7 B). Die Antikörper im Serum dieser HIV-2 Patienten reagierten zu 90% mit T-1249 und zu 80% mit C46-EHO, jedoch nicht mit T-20, C46 oder SC35EK.



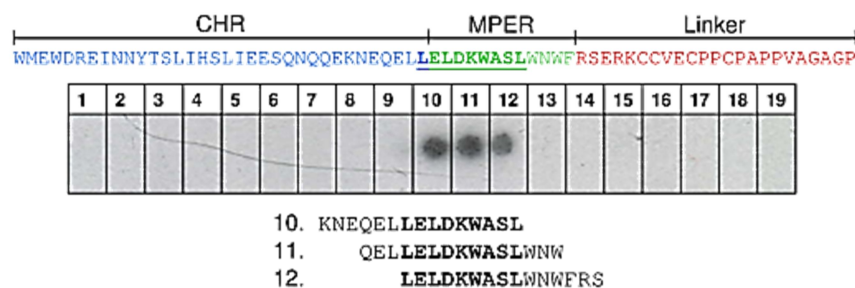
**Abbildung 5.1.7 Die Mehrheit der HIV-1 Patienten weist prä-existierende Antikörper im Serum auf, die gegen das C-Peptid C46 gerichtet sind.**

(A) Anti-T-20 Antikörper in HIV-1 Seren. Für den kompetitiven Dot Blot wurden die Patientenseren entweder mit (+) oder ohne (-) T-20 auf C46-gespotteten Membranen inkubiert. Die Expositionszeit betrug 1min. (B) HIV Seren wurden mittels Dot Blot analysiert. Dargestellt ist die Seroreaktivität in Prozent. ART, antiretrovirale Therapie.

### 5.1.4 Identifizierung immundominanter Bereiche in C46 und C46-EHO

Für die Identifizierung der immunogenen Region in den Aminosäuresequenzen von maC46, C46 und C46-EHO wurde eine Epitopkartierung durchgeführt (Kapitel 4.2.12). Die Firma JPT (Berlin) synthetisierte 15mer Peptide (überlappend um 12 Aminosäuren) von der Aminosäuresequenz des maC46 Peptids (CHR, MPER und IgG2-abgeleiteter Linker) und brachte diese auf Membranen auf. Diese fertigen Peptid-gespotteten Membranen wurden mit den antikörperhaltigen Seren inkubiert. Der Bindungsnachweis erfolgte durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemilumineszenz.

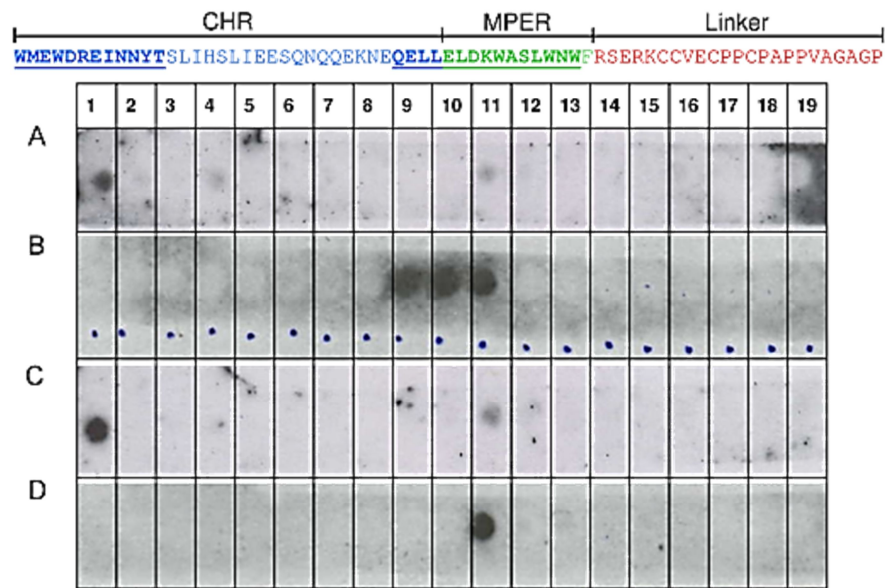
MAk 2F5 wurde aufgrund des bekannten Epitops als Positivkontrolle verwendet. Muster et al. ordnete das 2F5-Epitop der Aminosäuresequenz <sup>662</sup>ELDKWA<sup>667</sup> zu (MUSTER et al. 1993). In dieser Arbeit wurden Peptidfragmente der Nummer 10, 11 und 12 durch mAk 2F5 gebunden. Dies entsprach der Aminosäuresequenz <sup>661</sup>LELDKWASL<sup>669</sup> (Abbildung 5.1.8), welche mit dem publizierten Epitop <sup>662</sup>ELDKWASL<sup>669</sup> übereinstimmte (MUSTER et al. 1993; PURTSCHER et al. 1994; TIAN et al. 2002).



**Abbildung 5.1.8 Der monoklonale Antikörper 2F5 bindet das Epitop LELDKWASL.**

Für die Kartierung der Bindungsstelle des mAk 2F5 auf dem maC46-Peptid (CHR, MPER und IgG2-abgeleiteter Linker) wurden Peptid-gespottete Membranen verwendet (15mer Peptidfragmente, überlappend um 12 Aminosäuren, lfd. Nr. 1-19) und mit mAk 2F5 inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemilumineszenz. Die Expositionszeit betrug 2min. Das Epitop ist in der Aminosäuresequenz unterstrichen. CHR, C-Heptadwiederholung; MPER, Membranproximale externe Region.

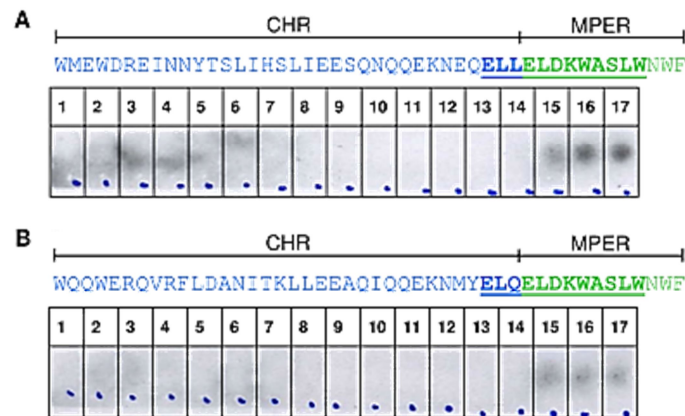
Die maC46-gespotteten Membranen wurden mit vier zufällig ausgewählten Patientenseren der gentherapeutischen Studie inkubiert (Abbildung 5.1.9). Alle Seren wiesen Antikörper gegen den C-Terminus von C46 auf. Die Antikörper im Serum der Patienten Pt.2, Pt.8 und Pt.9 erkannten die Aminosäuresequenz <sup>658</sup>QELLELDKWASLWNNW<sup>672</sup> (lfd. Nr.11) (Abbildung 5.1.9 A, C und D). Das minimal kürzere Epitop <sup>658</sup>QELLELDKW<sup>666</sup> wurde von den Antikörpern des Patienten Pt.4 gebunden (Abbildung 5.1.9 B). Diese Epitope überlappten demnach mit dem 2F5-Epitop <sup>661</sup>LELDKWASL<sup>669</sup>. Das Serum der Patienten Pt.2 und Pt.8 wies überdies Antikörper auf, die das am N-Terminus von C46 lokalisierte Epitop <sup>628</sup>WMEWDREINNYT<sup>639</sup> binden konnten (Abbildung 5.1.9 A und C). Wie zu erwarten wurde der IgG2-abgeleitete Linker von keinem Serum gebunden.



**Abbildung 5.1.9 Antikörper der HIV-1 Patienten binden den N-/C-terminalen Bereich des Peptids maC46.**

Für die Epitopkartierung auf dem maC46-Peptid (CHR, MPER und IgG2-abgeleiteter Linker) wurden Peptid-gespottete Membranen verwendet (15mere, versetzt um 3 Aminosäuren, lfd. Nr. 1-19) und beispielhaft mit vier Seren der HIV-1 Patienten der gentherapeutischen Studie inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemilumineszenz. (A) Pt.2 (Expositionszeit: 10min). (B) Pt.4 (Expositionszeit: 1min). (C) Pt.8 (Expositionszeit: 10min). (D) Pt.9 (Expositionszeit: 1min). Die Aminosäuresequenz QELLELDKWASLWNWF (lfd. Nr.11) wurde durch die Antikörper von Pt.2, Pt.8 und Pt.9 gebunden. Die Antikörper von Pt.4 erkannten das Epitop QELLELDKW (lfd. Nr. 9, 10 und 11). Die Seren von Pt.2 und Pt.8 wiesen überdies Antikörper gegen das Epitop WMEWDREINNYT (lfd. Nr. 1) auf. Die immunogenen Epitope sind in der Aminosäuresequenz unterstrichen. CHR, C-Heptadwiederholung; MPER, Membran-proximale externe Region.

Wie in Kapitel 5.1.3 mittels Dot Blot festgestellt, wiesen viele HIV-1 Patientenserum C46-spezifische Antikörper auf, so dass nun eine erweiterte Epitopkartierung vorgenommen wurde. Von der Firma JPT wurden Membranen erworben, die mit Peptidfragmenten von C46 oder C46-EHO (15mer Peptidfragmente, überlappend um 13 Aminosäuren) gespottet waren. MAk 2F5 wurde aufgrund der bekannten Bindungsstelle erneut als Positivkontrolle eingesetzt. Diesem Antikörper wurde die Aminosäuresequenz <sup>659</sup>ELLELDKWASLW<sup>670</sup> im C46 und <sup>659</sup>ELQELDKWASLW<sup>670</sup> im C46-EHO zugewiesen (Abbildung 5.1.10, Tabelle 5.1.1). Der Aminosäureaustausch (Leucin in C46, Glutamin in C46-EHO) beeinflusste die Bindungsfähigkeit nicht.



**Abbildung 5.1.10** MAk 2F5 bindet das Epitop ELLELDKWASLW des C46 und ELQELDKWASLW des C46-EHO.

Für die Kartierung der 2F5 Bindungsstelle auf den Peptiden C46 (A) und C46-EHO (B) bestehend aus CHR und MPER wurden Peptid-gespottete Membranen verwendet (15mere, versetzt um 13 Aminosäuren, lfd. Nr. 1-17) und mit mAk 2F5 inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemilumineszenz. Die Expositionszeit betrug 3min. Das Epitop ist unterstrichen. CHR, C-Heptadwiederholung; MPER, Membran-proximale externe Region.

Für 10 HIV-1 Patientenseren wurde eine Epitopkartierung der anti-C46 Antikörper durchgeführt. Zudem wurden für die Epitopkartierung drei zufällig ausgewählte Seren verwendet, die im Dot Blot mit C46 und C46-EHO reagierten. Für diese Seren wurde eine Epitopkartierung unter Verwendung der C46- und C46-EHO-gespotteten Membranen durchgeführt. In allen getesteten Seren wurden ausnahmslos Antikörper nachgewiesen, die gegen den C-Terminus von C46 gerichtet waren (CHR, MPER) (Tabelle 5.1.1). Dieser Bereich ist dementsprechend ein sehr potentes B-Zell-Epitop. Alle Patienten, mit Ausnahme von Pt.20, wiesen <sup>659</sup>ELLELDKW<sup>666</sup>-bindende Antikörper auf, so dass dieser Bereich als immundominantes Kernepitop betrachtet werden kann. Dieses Epitop überlappt mit der Bindungsstelle <sup>662</sup>ELDKWA<sup>667</sup> des Antikörpers 2F5.

Die HIV-1 Patienten Pt. 22 und Pt. 36 wiesen, wie auch Pt.59, anti-C46-EHO Antikörper im Serum auf. Die Antikörper dieser Patienten waren ausschließlich gegen den C-terminalen Bereich des C46-EHO-Peptids gerichtet (Tabelle 5.1.1). Da diese Antikörper lediglich die HIV-1-abgeleitete MPER erkannten, konnte eine Kreuzreaktivität der HIV-1 Seren mit der HIV-2-abgeleiteten CHR ausgeschlossen werden.

**Tabelle 5.1.1 Epitopkartierung für die Antikörper im Serum von HIV-1 Patienten für die Peptide C46 (n=10) und C46-EHO (n=3). n.a. = nicht analysiert; Pt = Patient**

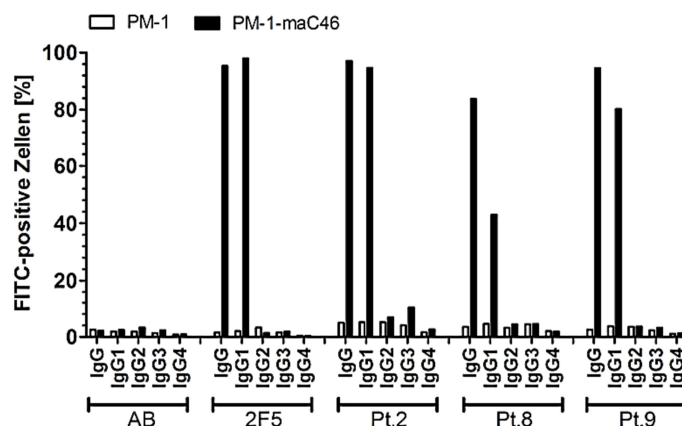
Patienten ID	C46	C46-EHO
mAk 2F5	ELLELDKWASLW	ELQEELDKWASLW
Pt.12	ELLELDKWASLWNW	n.a.
Pt.20	EKNEQEELLELD	n.a.
Pt.22	ELLELDKWASLW	ELQEELDKWASLW
Pt.31	NEQEELLELDKW	n.a.
Pt.36	ELLELDKWASLWNW	ELQEELDKWASLWNWF
Pt.42	ELLELDKWASLW	n.a.
Pt.48	ELLELDKWAS	n.a.
Pt.51	ELLELDKWAS	n.a.
Pt.57	ELLELDKWASLWNWF	n.a.
Pt.59	ELLELDKW	ELQEELDKWASLWNW

### 5.1.5 Analyse der Effektormechanismen der C46-spezifischen Antikörper

Da die Möglichkeit besteht, dass Effektormechanismen der Antikörper maC46- oder auch maC46-EHO-exprimierende T-Zellen eliminieren könnten, wurde die bestehende anti-maC46 Antikörperreaktivität eingehender analysiert. Im Rahmen der gentherapeutischen Studie mit HIV-1-geschützten T-Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten in den Seren der Studienpatienten der anti-maC46 Antikörpertiter bestimmt (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007). Bereits vor T-Zell-Reinfusion wiesen 80% dieser Patienten anti-C46 Antikörper im Serum auf. Im Verlauf der Studie kam es weder zu einer humoralen Immunantwort, noch zu der erwarteten Akkumulation der maC46-exprimierenden T-Zellen (VAN LUNZEN *et al.* 2007). Antikörper binden Antigene über ihren N-Terminus und können zugleich über ihren C-Terminus diverse Effektorfunktionen vermitteln. In diesem Kontext spielen die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) und die Antikörper-

abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) eine entscheidende Rolle. Beide Mechanismen könnten ursächlich für die fehlende Anreicherung der maC46-exprimierenden T-Zellen sein.

Humane Antikörper, insbesondere der Subklasse IgG1 und IgG3, können zytotoxisch wirken. Von drei zufällig ausgewählten Patientenseren (Pt.2, Pt.8 und Pt.9) der klinischen Studie wurde die IgG-Subklasse der maC46-spezifischen Antikörper mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Kapitel 4.2.5). Als Positivkontrolle wurde mAk 2F5 verwendet. Die bereits bekannte IgG1-Subklasse des 2F5 wurde bestätigt (Abbildung 5.1.11). Die Seren der drei Patienten enthielten anti-C46 Antikörper des IgG1-Subtyps (Abbildung 5.1.11) und konnten somit prinzipiell zytotoxische Funktionen ausüben.



**Abbildung 5.1.11** Das Serum der HIV-1 Studienpatienten enthält anti-maC46 Antikörper des IgG1-Subtyps.

Native PM-1 und maC46-exprimierende PM-1 Zellen (PM-1-maC46) wurden mit einer 1/100 Verdünnung des Patientenserums und entweder mit einem IgG-spezifischen oder einem IgG-Subtyp-spezifischen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper versetzt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind als prozentualer Anteil der FITC-positiven Zellen dargestellt. AB, anti-HIV Antikörper-negatives Serum.

Für die Untersuchung der CDC- bzw. ADCC-Antwort wurden HL-60 Zellen verwendet, die sowohl das maC46-Peptid als auch das CD20-Molekül auf der Zelloberfläche exprimierten (sog. HL-60-maC46-CD20, Kapitel 4.2.13). Die erfolgreiche Durchführung der zytotoxischen Assays wurde durch das CD20-Rituximab-System verifiziert (VAN MEERTEN *et al.* 2006a). Der chimäre mAk Rituximab (RTX) bindet CD20 (REFF *et al.* 1994) und ist in Anwesenheit von Komplement (CDC) und/oder NK-Zellen (ADCC) zytotoxisch (FLIEGER *et*

al. 2000; PESCOVITZ 2006). Zusätzlich wurden native HL-60 eingesetzt, um eine Antikörper-unabhängige Zelllyse auszuschließen.

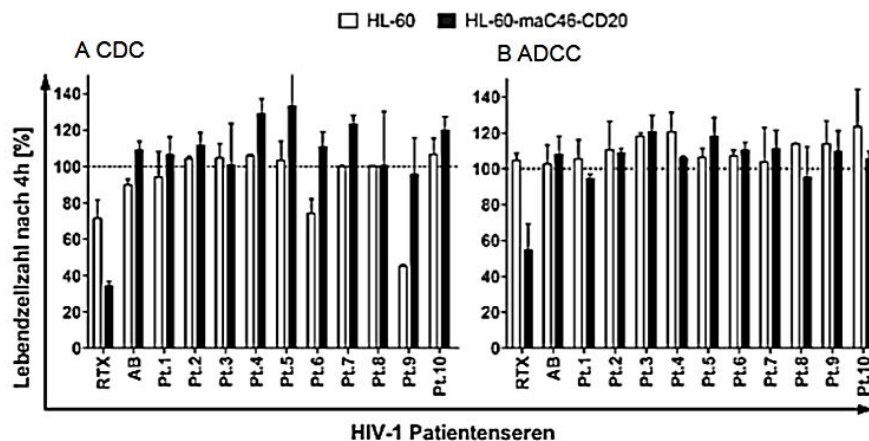
Die zytotoxischen Untersuchungen erfolgten ausschließlich unter Verwendung der Seren der Studienpatienten, die vor Reinfusion der maC46-exprimierenden T-Zellen entnommen worden waren. Für die zytotoxischen Assays wurden alle Patientenseren in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt. Die entsprechenden anti-maC46 Antikörpertiter sind in Tabelle 5.1.2 dargestellt (Quelle: (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007)).

Nach Inkubation der HL-60-maC46-CD20 Zellen mit RTX und dem Hasenkomplement betrug die Lebendzellzahl etwa 34% (Abbildung 5.1.12 A). Eine 100%ige Zelllyse konnte nicht erreicht werden, da lediglich 78% der Targetzellen das CD20-Molekül auf der Oberfläche exprimierten (Daten nicht gezeigt). Eine unspezifische Zelllyse von ca. 30% ergab sich, wenn native HL-60-Zellen mit RTX und Komplement versetzt wurden. Wie in Abbildung 5.1.12 A aufgezeigt, hatte weder die Zugabe von AB-Serum (anti-HIV Antikörper-negativ) noch der Seren der Studienpatienten Auswirkungen auf die Zahl der HL-60 oder HL-60-maC46-CD20 Zellen. Nur die Seren der Patienten Pt.6 und Pt.9 wiesen eine unspezifische Lyse von nativen HL-60 Zellen auf (Lebendzellzahl von 74% bzw. 45%). Analoge Ergebnisse wurden bei der Untersuchung der ADCC-Antwort erzielt (Abbildung 5.1.12 B). NK-Zellen induzierten eine spezifische RTX-abhängige Zelllyse der HL-60-maC46-CD20 Zellen von etwa 55%. Entsprechend dem CDC-Assay konnte auch hierbei eine 100%ige Zelllyse nicht erreicht werden. Bei Verwendung von AB-Serum oder der Patientenseren nahm der Anteil der lebenden Zellen (HL-60 sowie HL-60-maC46-CD20) nicht ab. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die anti-C46 Antikörper im Serum dieser Studienpatienten keine zytotoxische Effektormechanismen vermittelten und demnach nicht die Ursache für die unterbliebene Anreicherung der maC46-exprimierenden T-Zellen im Verlauf der gentherapeutischen Studie waren.

**Tabelle 5.1.2 Reziproker anti-C46 Antikörpertiter der zehn Studienpatientenseren vor Reinfusion der maC46-exprimierenden T-Zellen. Quelle: (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007).**

Pt.1	Pt.2	Pt.3	Pt.4	Pt.5	Pt.6	Pt.7	Pt.8	Pt.9	Pt.10
640	1280	<10	160	160	<10	160	>1280	>1280	160





**Abbildung 5.1.12 Anti-C46 Serumantikörper der Studienpatienten vermitteln keine Effektorfunktionen.**

(A) Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC). HL-60-maC46-CD20 bzw. native HL-60 Zellen wurden mit zehn Studienpatientenseren (1:20 Verdünnung) und Hasenkomplement für 4h im Brutschrank inkubiert. Die Anzahl der lebenden Targetzellen wurde mit Propidiumiodid und Zählbeads vor und nach der Inkubationszeit quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Lebendzellzahl normalisiert auf die Ausgangszellzahl von zwei unabhängigen Versuchen. (B) Antikörper-abhängige Zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Die Durchführung des ADCC-Assays erfolgte analog zum CDC-Assay, wobei PBMCs als Effektorzellen eines gesunden Spenders mit einem 1:50 Target/Effektor Verhältnis anstelle von Komplement verwendet wurden. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Lebendzellzahl normalisiert auf die Ausgangszellzahl von zwei unabhängigen Versuchen. RTX, Rituximab; AB, anti-HIV Antikörper-negatives Serum.

### 5.1.6 *In silico* Analysen zur Vorhersage potentieller MHC-I-Epitope

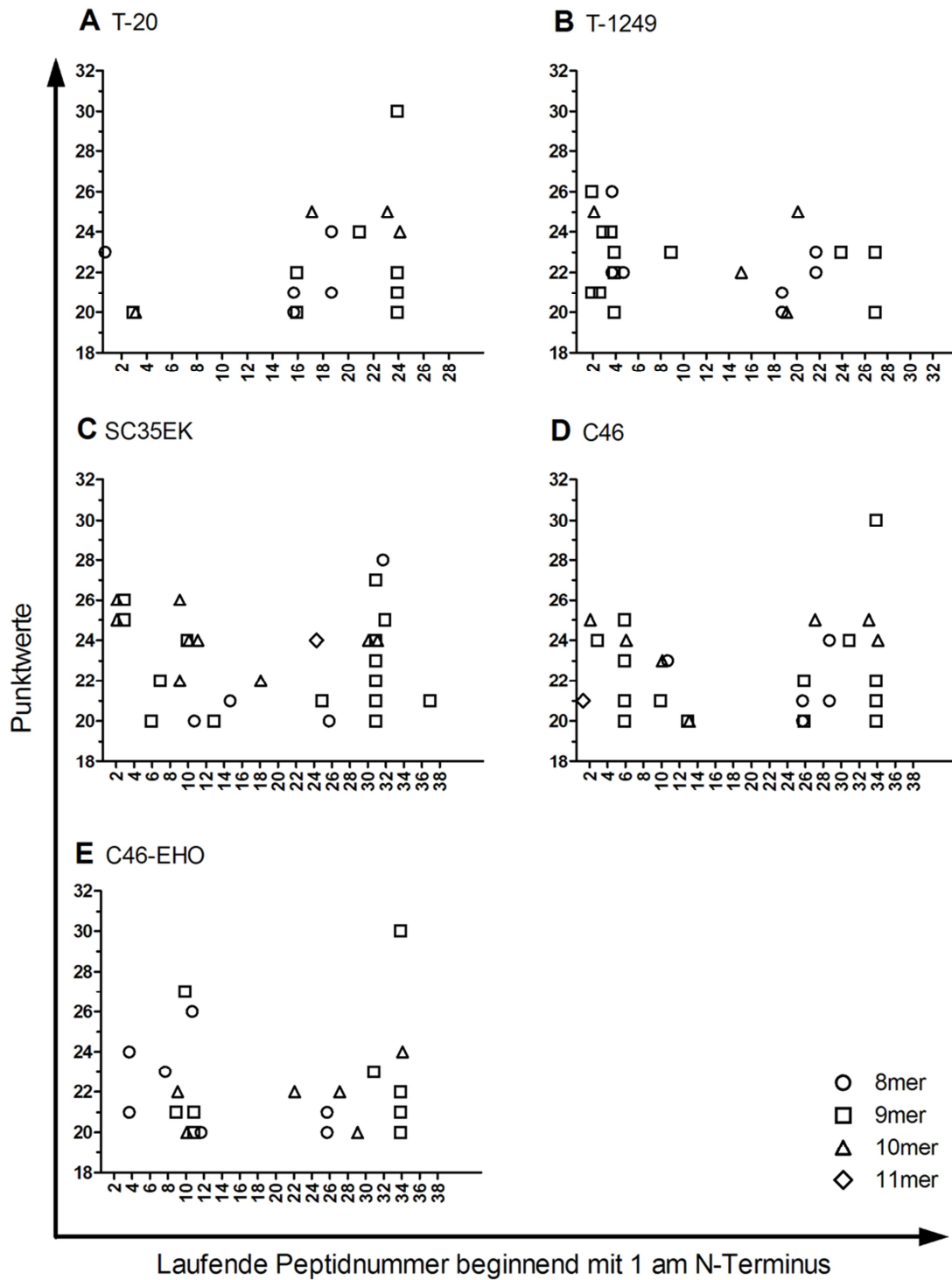
Die zelluläre Immunantwort wird durch prozessierte Peptidfragmente induziert, die im Komplex mit MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche den zytotoxischen T-Zellen präsentiert werden. Die Bindung eines Peptidfragments an ein MHC-I-Molekül kann *in silico* mit speziellen Programmen/Algorithmen vorhergesagt werden (PARKER *et al.* 1994; RAMMENSEE *et al.* 1999; TONG *et al.* 2007). Unter Verwendung von SYFPEITHI (RAMMENSEE *et al.* 1999) sollten in den Peptiden potentielle MHC-I-Epitope identifiziert und mit BIMAS (PARKER *et al.* 1994) verifiziert werden (Kapitel 4.2.14).

In der Datenbank SYFPEITHI werden Affinitätsmatrizen verwendet, die durch *in vitro* Experimente gewonnen wurden, um das Bindungsvermögen von Peptiden an MHC-I-Moleküle vorherzusagen (RAMMENSEE *et al.* 1999). SYFPEITHI generiert von der Aminosäuresequenz kurze Peptidfragmente (8,- 9,- 10,- und 11mere) und testet jedes Peptidfragment hinsichtlich der Bindung an diverse HLA-Allele. Der hierbei verwendete Algorithmus ermittelt HLA-spezifisch für jede einzelne Aminosäure abhängig von der Art

(Haupt- oder Nebenanker) und der Häufigkeit des Vorkommens einen Punktwert und gibt anschließend die Summe aller Punktwerte als Gesamtpunkt看wert wieder (RAMMENSEE *et al.* 1999). Die Vorhersagen von SYFPEITHI für T-20, C46, C46-EHO, SC35EK und T-1249 sind in Abbildung 5.1.13 graphisch sowie tabellarisch im Anhang 9.3 dargestellt. Die SYFPEITHI-Punktwerte wurden für jedes Peptidfragment (beginnend mit der lfd. Nr. 1 am N-Terminus) aufgezeigt (Punktwerte < 20 wurden nicht berücksichtigt).

Am C-Terminus von T-20 und C46 befindet sich das 9mer Epitop LE<sup>1</sup>LDKWASL (lfd. Nr. 24 in T-20 bzw. 34 in C46), welches sehr häufig für sechs HLA-Allele vorhergesagt wurde (A\*0201, B\*08, B\*18, B\*37, B\*4001, B\*4402) und mit 30 den höchsten Punktwert für HLA-B\*37 erhielt (Abbildung 5.1.13 A bzw. D). Im C46-EHO kommt dieses Epitop mit einem Aminosäureaustausch ebenfalls vor (lfd. Nr. 34, QELDKWASL), wobei es nun nicht mehr für HLA-A\*0201 vorhergesagt wurde (Abbildung 5.1.13 D). Ebenso ist im T-1249 das Epitop QKLDKWASL (lfd. Nr. 27) mit zwei differenten Aminosäuren vorhanden (Abbildung 5.1.13 B). Dies verminderte die starke Interaktion mit dem HLA-B\*37 (Punktwert 20) und reduzierte die Vorhersagehäufigkeit auf drei HLA-Allele (B\*08, B\*37, B\*3902).

Aufgrund der Sequenzhomologie von T-20 und C46 wurden die gleichen Vorhersagen getroffen (Abbildung 5.1.13 A und D). SYFPEITHI ermittelte das 9mer QE<sup>1</sup>KNEQELL bzw. das 8mer QE<sup>1</sup>KNEQEL (lfd. Nr. 16 in T-20 bzw. 26 in C46) für vier HLA-Allele in einem Punktwertbereich von 20-22. Ferner wurde im C46 das 9mer RE<sup>1</sup>INNYTSL (lfd. Nr. 6) für vier HLA-Allele mit relativ hohen Punktwerten (20-25) vorhergesagt. Im Vergleich zu T-20 und C46 wurden für T-1249 insgesamt eine geringere Anzahl an MHC-I-Epitopen mit niedrigerer Bindungsstärke vorhergesagt (Abbildung 5.1.13 B). Im Gegensatz dazu wurde für SC35EK eine hohe Anzahl an Epitopen mit hohen Punktwerten prognostiziert (Abbildung 5.1.13 C). Insbesondere das 9mer Epitop EEL<sup>1</sup>KKEQKL (lfd. Nr. 31) war ein dominantes MHC-I-Epitop für sieben HLA-Allele und erhielt überdies einen Punktwert von 27 für HLA-B\*37. Zusätzlich zu dem bereits erwähnten Epitop (lfd. Nr. 34, QELDKWASL) wurde für C46-EHO das MHC-I-Epitop FL<sup>1</sup>DANITKL (lfd. Nr. 10) prognostiziert, welches einen Punktwert von 27 für HLA-A\*0201 erhielt. 27% aller Europäer exprimieren HLA-A\*0201 auf ihren Zellen. Die Vorhersagen für C46-EHO ergaben ferner einen minimal immunogenen Bereich im N-Terminus (lfd. Nr. 8-12) (Abbildung 5.1.13 E).



**Abbildung 5.1.13** Das Vorhersageprogramm SYFPEITHI identifizierte vermehrt MHC-I-Epitope im N- und C-Terminus der antiviralen Peptide.

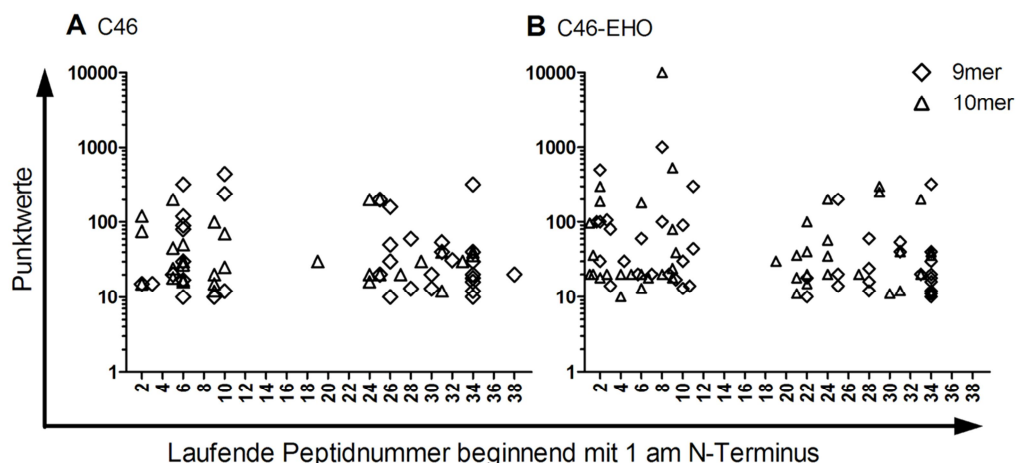
Die Aminosäuresequenzen von T-20 (A), T-1249 (B), SC35EK (C), C46 (D) und C46-EHO (E) wurden mit SYFPEITHI gemäß der Bindung an diverse HLA-Allele analysiert. Die Nummerierung der Peptidfragmente beginnt am N-Terminus mit der laufenden Peptidnummer 1. Dargestellt sind die Punktwerte für jedes einzelne 8-, 9-, 10- und 11mer. Punktwerte < 20 wurden nicht berücksichtigt.

Um die Vorhersagequalität zu erhöhen, wurden die Ergebnisse von SYFPEITHI für C46 und C46-EHO mit dem Vorhersageprogramm BIMAS verifiziert. Die Vorhersage von BIMAS basiert auf der Dissoziationszeit des MHC-Peptid-Komplexes (PARKER *et al.* 1994). Der hier eingesetzte Algorithmus beruht auf HLA-spezifischen Koeffiziententabellen: abhängig vom Einfluss der Aminosäure werden unterschiedliche Punktwerte vergeben, die nachfolgend mit einem Koeffizienten multipliziert werden.

Insbesondere zwei Regionen wurden mittels BIMAS für C46 und C46-EHO vorhergesagt: die Peptidfragmente 1-11 und 22-34 (Abbildung 5.1.14, Anhang 9.3). Diese Vorhersagen waren weitgehend identisch mit denen von SYFPEITHI. Allerdings identifizierte BIMAS für C46-EHO wesentlich mehr potentielle MHC-I-Epitope als für C46.

Das 9mer Epitop mit der lfd. Nr. 34 (LELDKWASL in C46 bzw. in QELDKWASL C46-EHO) ist, wie bereits durch SYFPEITHI ermittelt, auch bei BIMAS ein bevorzugtes Epitop. Dieses Epitop wurde für neun verschiedene HLA-Allele vorhergesagt. Der von BIMAS ermittelte Dissoziationswert betrug 320 für das sehr seltene HLA-B\*60, war für die übrigen HLA-Allele jedoch kleiner als 40. Die Vorhersagen von BIMAS ergaben im C46-EHO das 9mer VRFLDANIT (lfd. Nr. 8) mit einem sehr hohen Punktwert von 1000 für HLA-B\*2705, welches jedoch nur in 2,5% der europäischen Bevölkerung auftritt. (Abbildung 5.1.14 B). Das gleiche Epitop erhielt überdies als 10mer (VRFLDANITK) einen Punktwert von 10.000 für HLA-B\*2705. SYFPEITHI prognostizierte für FLDANITKL (lfd. Nr. 10) ebenfalls einen hohen Punktwert von 27 für das wesentlich häufigere HLA-Allel HLA-A\*0201 (Abbildung 5.1.13 E). Im C46-EHO identifizierte BIMAS das 9mer QQWERQVRF (lfd. Nr. 2) bzw. das entsprechende 10mer QQWERQVRFL als potentielle Epitope für acht verschiedene HLA-Allele mit einem sehr hohen Punktwert von 500 für HLA-B\*2705 (Abbildung 5.1.14 B). Ebenso erhielt das 9mer QQEKNMYEL (lfd. Nr. 25) einen Punktwert von 200 für dasselbe HLA-Allel.

In Übereinstimmung mit SYFPEITHI wurde im C46 das 9mer QEKNEQELL (lfd. Nr. 26) und auch REINNYTSL (lfd. Nr. 6) vermehrt als potentielle MHC-I-Epitope vorhergesagt (Abbildung 5.1.14 A). BIMAS identifizierte zusätzlich das Epitop NYTSLIHS (lfd. Nr. 10) im C46.



**Abbildung 5.1.14** Das Vorhersageprogramm BIMAS prognostizierte eine höhere Anzahl und stärker bindende MHC-I-Epitope in dem Peptid C46-EHO im Vergleich zu C46.

Die Aminosäuresequenzen der Peptide C46 (A) und C46-EHO (B) wurden mit BIMAS analysiert, um potentielle MHC-I-Epitope ausfindig zu machen. Die Nummerierung der Peptidfragmente beginnt am N-Terminus mit der laufenden Peptidnummer 1. Die von BIMAS ermittelten Punktwerte sind für die einzelnen Epitope (9- und 10mere) aufgetragen. Punktwerte < 10 wurden nicht berücksichtigt.

Die MHC-I-Epitope mit der lfd. Nr. 2, 8, 10, 25 und 34 wurden besonders häufig für diverse HLA-Allele von SYFPEITHI und BIMAS vorhergesagt oder wiesen eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit auf (Tabelle 5.1.3). Diese Epitope wurden folglich mutiert, um die potentielle zelluläre Immunogenität zu vermindern.

**Tabelle 5.1.3** Zusammenfassung der vorhergesagten 9mer MHC-I-Epitope im C46-EHO.

Epitop Lfd. Nr.	Aminosäure- sequenz	HLA-Allel (Punktwert)	
		SYFPEITHI	BIMAS
2	QQWERQVRF	-	B*2705 (500), B*62 (106), B*2702 (100), B*5201 (30)
8	VRFLDANIT	-	B*2705 (1000), B*2702 (100), Cw*0401 (20)
10	FLDANITKL	A*0201 (27)	A*0201 (90), B*2705 (30), A*0205 (17), B*3901 (14), Cw*0401 (13)
25	QQEKNMYEL	-	B*2705 (200), B*3902 (20), B*3901 (14)
34	QELDKWASL	B*37 (30), B*4402 (22), B*4001 (21), B*08 (20), B*18 (20)	B*60 (320), B*40 (40), B*2705 (30), Cw*0301 (20), A*0205 (18), B*61 (16), B*4403 (12), A*0201 (11), B*3701 (10)

## 5.2 Die C46-EHO-abgeleiteten Peptidvarianten V1, V2, V3 und V4

### 5.2.1 Verminderung der zellulären Immunogenität *in silico*

Der erste Teil der Arbeit befasste sich mit dem Vergleich der Peptide T-20, C46, SC35EK, T-1249 und C46-EHO hinsichtlich antiviraler Aktivität sowie humoraler und zellulärer Immunogenität. Hierbei zeigte das Peptid C46-EHO die vielversprechendsten Eigenschaften:

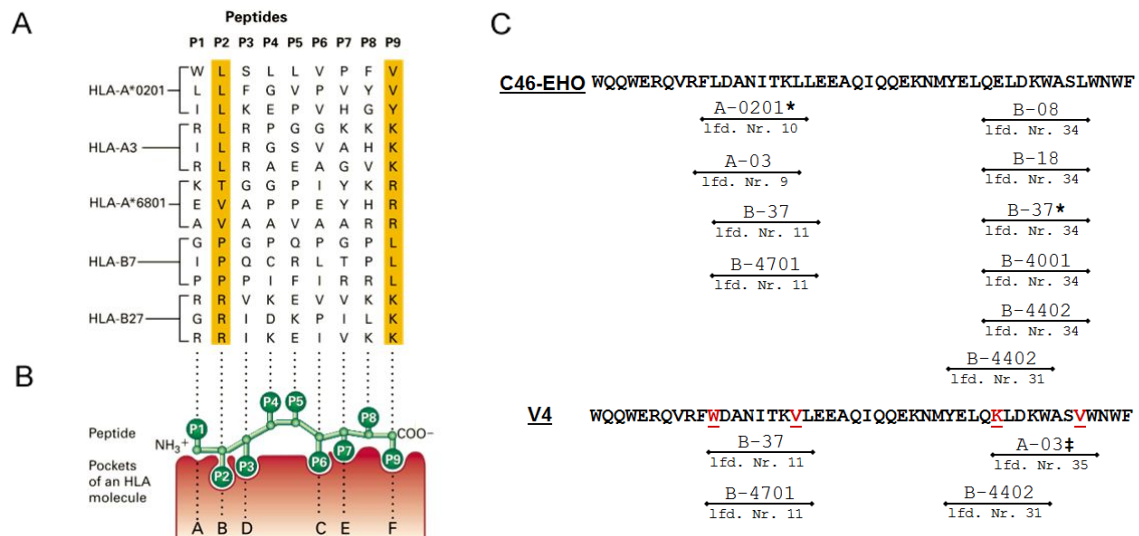
- Antivirale Aktivität: C46-EHO wies als synthetischer und membranständiger Inhibitor die vergleichsweise beste antivirale Aktivität auf.
- Humorale Immunantwort: Lediglich bei etwa 10% der HIV-1 Patienten wurden Antikörper im Serum detektiert, die gegen C46-EHO gerichtet waren.
- Zelluläre Immunogenität: SYFPEITHI und BIMAS identifizierten *in silico* fünf starke potentielle MHC-I-Epitope im C46-EHO.

C46-EHO wurde als Leitstruktur für die Entwicklung von Peptidvarianten mit vergleichbarer antiviraler Wirksamkeit und verminderter zellulärer/humorale Immunogenität verwendet. Dies sollte durch Aminosäuresubstitutionen, die relevant für die Bindung von MHC-I-Molekülen oder Antikörpern sind, erreicht werden.

Insbesondere zwei immunogene Bereiche wurden im Peptid C46-EHO von SYFPEITHI vorhergesagt (Abbildung 5.2.1 C). Im ersten Schritt wurde daher in den 9mer Epitopen der lfd. Nr. 10 (FLDANITKL) und 34 (QELDKWASL) alle Aminosäuren einzeln durch Alanin ausgetauscht und erneut mit SYFPEITHI analysiert (Kapitel 4.2.14). Wie zu erwarten, bestimmten die Positionen zwei und neun die Bindung an die MHC-I-Moleküle. Diese werden als Hauptankerpositionen bezeichnet, da die Seitenketten dieser Aminosäuren am stärksten mit der Bindungsspalte des MHC-Moleküls interagieren (Abbildung 5.2.1 A und B) (FALK *et al.* 1991). Folglich wurde das Epitop FLDANITKL in FADANITKA und QELDKWASL in QALDKWASA umgewandelt. Dies ging mit einer verminderten zellulären Immunogenität einher: der Alaninaustausch reduzierte die Anzahl der potentiell bindenden HLA-Allele von zehn auf fünf (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist der Einfluss von Alanin auf die Peptidstruktur und somit auf den antiviralen Effekt unbekannt.

Zwei Strategien wurden verfolgt, um die helikale Peptidstruktur so wenig wie möglich zu verändern. Einerseits wurde das erste Alanin in Peptidfragment mit der lfd. Nr. 10 (FADANITKA) durch eine Aminosäure ersetzt, die vergleichbare biologische Eigenschaften wie die ursprüngliche Aminosäure aufwies. Diese Position war ursprünglich mit der großen, hydrophoben Aminosäure Leucin belegt, die durch Tryptophan ersetzt wurde: FWDANITKA. Ferner wurde das erste Alanin im Peptidfragment mit der lfd. Nr. 34 (QALDKWASA) gegen die Aminosäure Lysin ausgetauscht, welche im Peptid T-1249 an dieser Position vorhanden ist. Wie bereits beschrieben, wies das T-1249-Epitop QKLDKWASL (lfd. Nr. 27) eine verminderte Interaktion mit HLA-B\*37 auf und wurde lediglich für drei HLA-Allele vorhergesagt (Kapitel 5.1.6).

Abschließend wurde das Alanin der neunten Position in FWDANITKA und QKLDKWASA mutiert. Anfänglich war an dieser Stelle in beiden Peptidfragmenten die Aminosäure Leucin, welche eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen spielt (BLAGDON and GOODMAN 1975; RICHARDSON and RICHARDSON 1988). Alanin wurde durch Valin ersetzt. Valin ist durch den zusätzlichen CH-CH<sub>3</sub>-Rest etwas größer als Alanin, weist aber ansonsten identische Eigenschaften zu Alanin und auch Leucin auf. Dies resultierte in dem Peptid V4 mit den neu generierten Epitopen FWDANITKV und QKLDKWASV. Wie in Abbildung 5.2.1 C veranschaulicht, prognostizierte SYFPEITHI für die Peptidvariante V4 vier potentielle MHC-I-Epitope, verglichen mit zehn für C46-EHO. Ebenso wurde die starke Interaktion mit den HLA-Allelen A\*0201 und B\*37 unterbunden. Indes wurde ein Epitop mit geringer Bindungsstärke für HLA-A\*03 generiert.



**Abbildung 5.2.1** Die Mutation von vier Hauptankeraminosäuren im Peptid C46-EHO reduzierte *in silico* die Anzahl und Bindungsstärke potentieller MHC-I-Epitope.

(A) Peptidbindungsmotive verschiedener HLA-Allele (gelb: Hauptankeraminosäuren). (B) Längsschnitt durch die MHC-Peptidbindungstasche. Die Aminosäureseitenketten orientieren sich nach unten in Richtung Bindungstasche oder nach oben in Richtung T-Zell-Rezeptor. (A) und (B) aus: (KLEIN and SATO 2000). (C) Die Aminosäuresequenzen von C46-EHO und V4 wurden mit dem Vorhersageprogramm SYFPEITHI analysiert. Die Nummerierung der Peptidfragmente beginnt am N-Terminus mit der Peptidnummer 1. \* SYFPEITHI-Punktwert > 25. Bei allen anderen Epitopen lag der Punktwert zwischen 20 und 25. Mutierte Aminosäuren sind unterstrichen. ‡ neu generiertes MHC-I-Epitop.

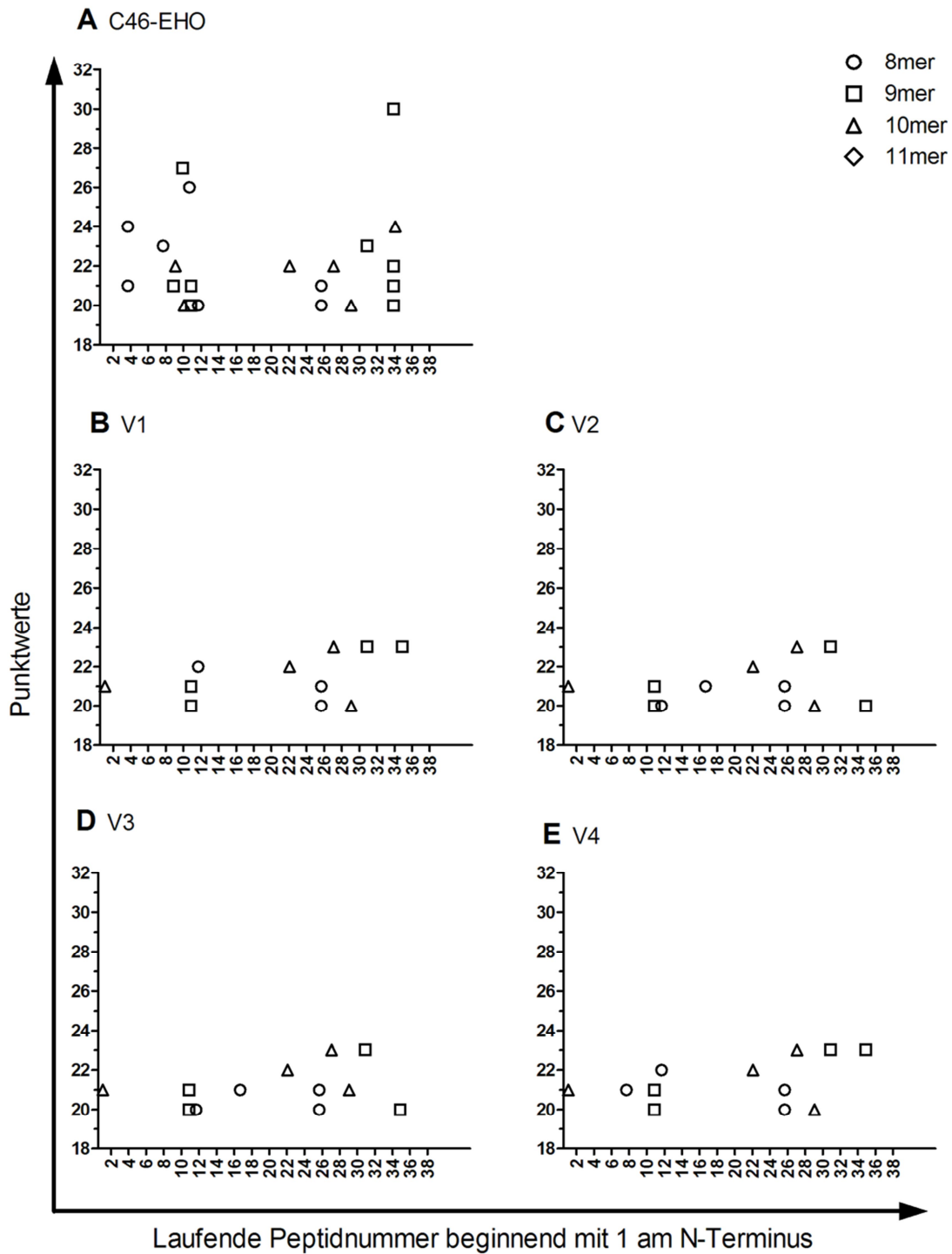
Zusätzlich zu der Peptidvariante V4 wurden drei weitere Peptidvarianten basierend auf C46-EHO mit Hilfe des Programms BIMAS generiert (PARKER *et al.* 1994) (Kapitel 4.2.14). Dieses Programm nutzt Koeffizienten-Tabellen: Aminosäuren erhalten einen hohen Punktwert, wenn sie eine hohe Affinität für die MHC-Bindungsspalte aufweisen bzw. einen niedrigen Punktwert bei schwacher Interaktion (PARKER *et al.* 1994). Mittels dieser Tabellen wurden bevorzugte Aminosäuren durch weniger stark bindende Aminosäuren substituiert.

BIMAS hatte im C46-EHO folgende Peptidfragmente für diverse HLA-Allele vorhergesagt (Kapitel 5.1.6): QQWERQVRF (Ifd. Nr. 2), VRFLDANIT (Ifd. Nr. 8) und QQEK<sup>4</sup>NMYEL (Ifd. Nr. 25). Durch Alaninsubstitution und Reanalyse erwiesen sich die zweite und neunte Position erneut als Hauptankerpositionen.

Um die helikale Struktur von C46-EHO nicht zu beeinträchtigen, wurden Aminosäuren mit ähnlichen biologischen Eigenschaften eingesetzt (QTWERQVRF (Ifd. Nr. 2) und



QNEKNMYEL (Ild. Nr. 25)) oder Aminosäuren verwendet, die im C46 an dieser Position auftreten (VNFLDANIT (Ild. Nr. 8)). Die Kombination dieser Peptidfragmente mit den mutierten V4-Fragmenten (Ild. Nr. 10 und 34) ergab das Peptid V1 (Tabelle 5.2.1). SYFPEITHI sagte für V1, ebenso wie für V4, eine verminderte Anzahl an MHC-I-Epitopen hervor (Abbildung 5.2.2). Für die Entwicklung der V1-abgeleiteten Peptidvarianten V2 und V3 wurde ein Alaninaustausch der Peptidfragmente der Ild. Nr. 10 und 34 durchgeführt. Die Peptidvariante V3 enthält an der zweiten und neunten Position die Aminosäure Alanin in den Peptidfragmenten FADANITKA und QALDKWASA (Tabelle 5.2.1). Hingegen wurde in V2 ausschließlich die neunte Position durch Alanin ersetzt: FLDANITKA und QELDKWASA (Tabelle 5.2.1). Die Vorhersagen von SYFPEITHI für die C46-EHO-abgeleiteten Peptidvarianten V1, V2, V3 und V4 sind in Abbildung 5.2.2 dargestellt, unterschieden sich jedoch lediglich minimal.



**Abbildung 5.2.2 SYFPEITHI prognostiziert für die C46-EHO-abgeleiteten Peptidvarianten V1, V2, V3 und V4 eine verminderte Anzahl an potentiellen MHC-I-Epitopen, im Vergleich zu C46-EHO.**

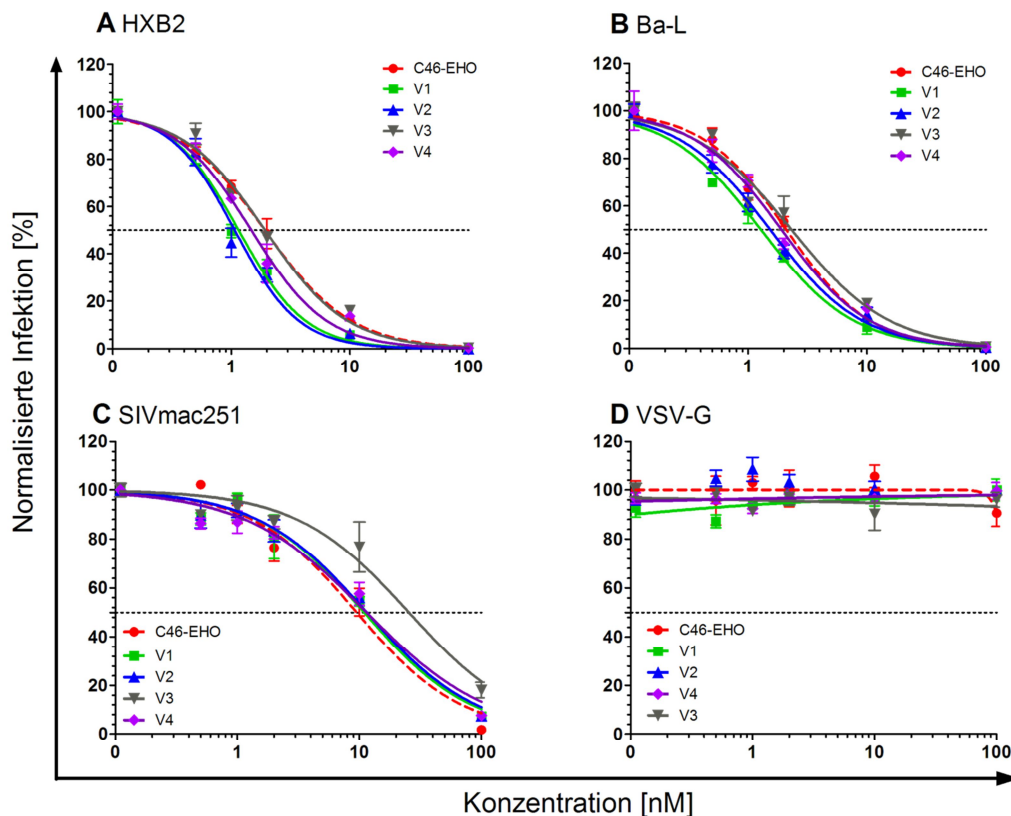
Die Aminosäuresequenzen von C46-EHO (A), V1 (B), V2 (C), V3 (D) und V4 (E) wurden *in silico* mit dem Vorhersageprogramm SYFPEITHI hinsichtlich der Bindung an diverse HLA-Allele untersucht. Die Nummerierung der Peptidfragmente beginnt am N-Terminus mit der laufenden Peptidnummer 1. Dargestellt sind die Punktwerte für jedes einzelne 8-, 9-, 10- und 11mer. Punktwerte < 20 wurden nicht berücksichtigt.

**Tabelle 5.2.1 Aminosäuresequenzen der Peptidvarianten V1, V2, V3 und V4 im Vergleich zu C46-EHO (. = identische Aminosäure wie C46-EHO).**

Peptid	Aminosäuresequenz (AS 628-673)
C46-EHO	WQQWERQVRFLDANITKLLLEEAQIQQEKNMYELQELDKWASLWNWF
V1	..T.....N.W.....V.....N.....K.....V....
V2	..T.....N.W.....A.....N.....K.....A....
V3	..T.....N.A.....A.....N.....A.....A....
V4	.....W.....V.....K.....V....

### 5.2.2 Antivirale Aktivität der Peptidvarianten

Alle Peptidvarianten V1-V4 inhibierten konzentrationsabhängig im Neutralisationsassay den Eintritt der HXB2-, Ba-L- und SIVmac251-Env-umhüllten Vektoren, im Gegensatz zu den VSV-G-Env-umhüllten Kontrollvektoren (Kapitel 4.2.8, Abbildung 5.2.3 und Anhang 9.1). Die Peptidkonzentrationen, die für die 50%ige Hemmung der HXB2- und Ba-L-Env-umhüllten Vektoren notwendig waren ( $IC_{50}$ : 1,0-1,9nM für HXB2 bzw.  $IC_{50}$ : 1,5-2,5nM für Ba-L), waren minimal niedriger im Vergleich zu den  $IC_{50}$ -Werten von C46-EHO ( $IC_{50}$ =2,1nM für HXB2 bzw.  $IC_{50}$ =2,7nM für Ba-L) (Abbildung 5.2.3 A und B). Entsprechend Kapitel 5.1.1 waren für eine 50%ige SIVmac251-Env-Inhibition 13,1nM des C46-EHO-Peptids erforderlich. Minimal geringere Konzentrationen waren von V1 ( $IC_{50}$ =10,9nM), V2 ( $IC_{50}$ =10,7nM) und V4 ( $IC_{50}$ =11,6nM) erforderlich (Abbildung 5.2.3 C). Indes war der  $IC_{50}$ -Wert von Peptid V3 um den Faktor 2,3 erhöht ( $IC_{50}$ =30,3nM). Lediglich V3 wies somit eine geringere antivirale Aktivität gegenüber dem SIVmac251-Hüllprotein auf.



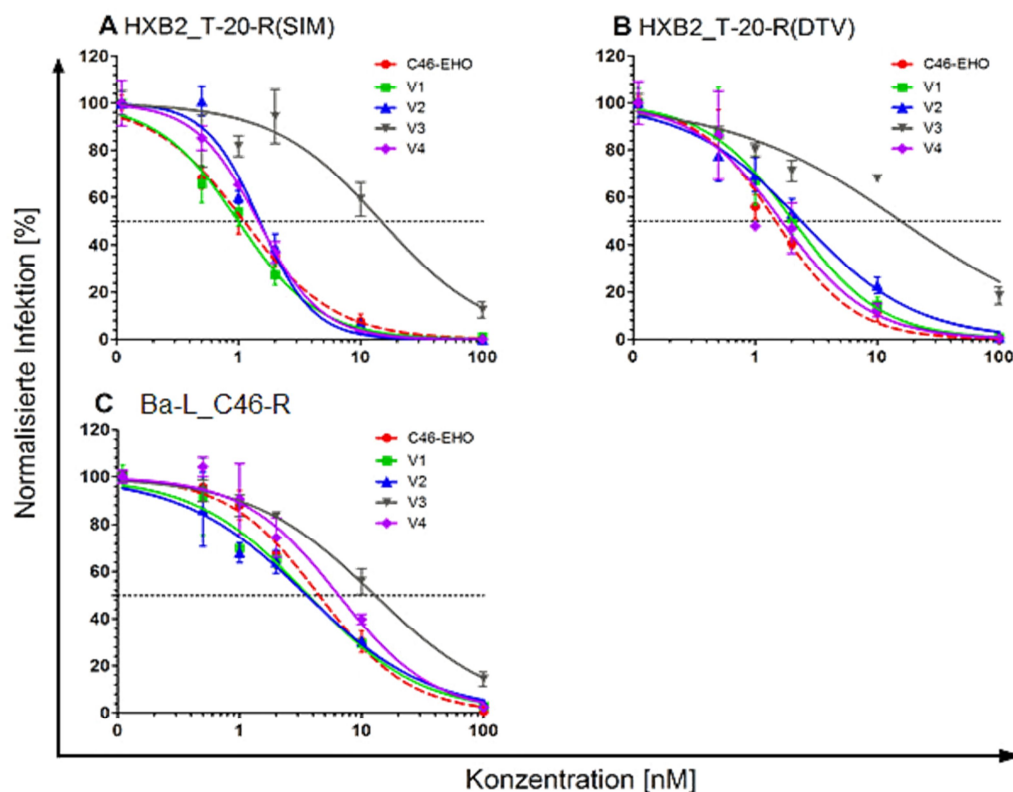
**Abbildung 5.2.3** Die Peptidvarianten V1, V2, V3 und V4 neutralisierten wie C46-EHO die Vektoren HIV/SIV im nanomolaren Konzentrationsbereich.

PM-1 Zellen wurden in Gegenwart steigender Peptidkonzentrationen (C46-EHO, V1, V2, V3, V4) mit EGFP-kodierenden Env-umhüllten Vektoren transduziert ((A) HXB2, (B) Ba-L, (C) SIVmac251, (D) VSV-G). Nach fünf Tagen wurde der prozentuale Anteil der EGFP-positiven PM-1 mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist die Infektion normalisiert auf die Infektion peptidfreier PM-1 (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von zwei unabhängigen Versuchen mit Duplikaten. Die logistischen Regressionskurven wurden mit GraphPadPrism 5 erstellt und hierdurch die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt.

Alle Peptidvarianten verhinderten die Infektion der T-20-resistenten (HXB2\_T-20-R(SIM) und HXB2\_T-20-R(DTV)) und C46-resistenten (Ba-L\_C46-R) Vektoren (Abbildung 5.2.4 und Anhang 9.1). Für die Inhibition der HXB2\_T-20-R(SIM)-Env-umhüllten Vektoren lagen die  $IC_{50}$ -Werte der Peptide V1, V2 und V4 ( $IC_{50}=1,0nM$ ,  $1,4nM$ ,  $1,4nM$ ) im gleichen Bereich wie des C46-EHO-Peptids ( $IC_{50}=1,3nM$ ) (Abbildung 5.2.4 A). Im Gegensatz hierzu war von V3 für die 50%ige Neutralisation eine 11,8-fach höhere Konzentration ( $IC_{50}=15,4nM$ ) erforderlich. Für die Hemmung der HXB2\_T-20-R(DTV)-Env-umhüllten Vektoren ergab sich folgende Hierarchie der  $IC_{50}$ -Werte: C46-EHO ( $1,5nM$ ) = V4 ( $1,5nM$ ) < V1 ( $2,0nM$ ) < V2 ( $2,2nM$ ) < V3 ( $15,8nM$ ) (Abbildung 5.2.4 B). V4 neutralisierte vergleichbar wie C46-EHO,

indes war die antivirale Aktivität von V1 und V2 geringfügig schlechter. Das Peptid V3 wies abermals einen 10,5-fach erhöhten  $IC_{50}$ -Wert auf. Bei Verwendung der Ba-L\_C46-R-Env-umhüllten Vektoren wiesen V1 bzw. V2 ( $IC_{50}=3,7nM$  bzw.  $IC_{50}=3,2nM$ ) eine minimal bessere Wirksamkeit verglichen zu C46-EHO ( $IC_{50}=4,5nM$ ) auf (Abbildung 5.2.4 C). Von den Peptiden V3 und V4 musste jedoch eine höhere Konzentration eingesetzt werden ( $IC_{50}=12,9nM$  bzw.  $IC_{50}=6,7nM$ ).

Die Peptidvarianten V1, V2 und V4 hatten eine vergleichbare antivirale Wirksamkeit wie das Ausgangspeptid C46-EHO. Dagegen verminderte die Kombination der substituierten Aminosäuren in der Peptidvariante V3 deutlich dessen Aktivität.



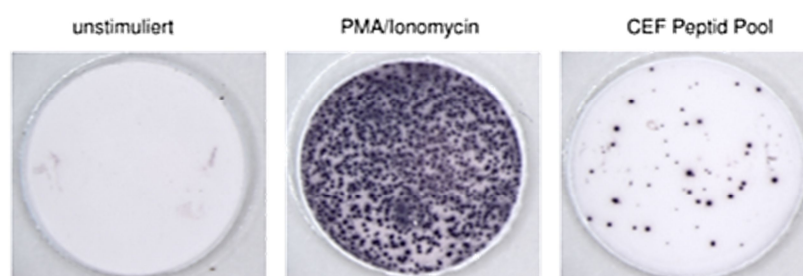
**Abbildung 5.2.4 Die Peptidvariante V3 wies eine deutlich verminderte antivirale Wirksamkeit gegenüber den mutierten HIV-1 Hüllproteinen auf.**

PM-1 Zellen wurden in Anwesenheit steigender Peptidkonzentrationen (C46-EHO, V1, V2, V3, V4) mit lentiviralen Vektoren transduziert, die mit T-20-resistenten ((A) HXB2\_T-20-R(SIM), (B) HXB2\_T-20-R(DTV)) oder C46-resistenten ((C) Ba-L\_C46-R) Glykoproteinen umhüllt waren und das Markergen für EGFP trugen. Nach fünf Tagen wurde der prozentuale Anteil EGFP-positiver PM-1 mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt ist die relative Infektion normalisiert auf die Infektion peptidfreier PM-1 (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von zwei unabhängigen Versuchen mit Duplikaten. Die logistischen Regressionskurven wurden mit GraphPadPrism 5 erstellt und hierdurch die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt.

### 5.2.3 *In vitro* Analyse der vorhergesagten MHC-I-Epitope

Fünf potentielle MHC-I-Epitope wurden *in silico* mittels SYFPEITHI und BIMAS im C46-EHO identifiziert, die nun experimentell mit den mutierten Epitopen mittels ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) (MIYAHIRA *et al.* 1995) verglichen werden sollten (Kapitel 4.2.10).

Für den ELISpot wurden die PBMCs von HIV-1 Patienten mit Antigenen inkubiert und die IFN- $\gamma$  Sekretion ermittelt. Als Antigene wurden die fünf potentiellen Peptidfragmente von C46-EHO und V2 verwendet (Ifd. Nr. 2, 8, 10, 25 und 34; Tabelle 5.1.3). Der allgemeine Immunstatus der Patienten wurde durch den CEF Peptid Pool ermittelt, welcher insgesamt 23 9mere des Cytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Influenzavirus beinhaltet (CURRIER *et al.* 2002). Weiterhin wurden drei bekannte HIV-1 Epitope eingesetzt: p17 Gag ( $^{77}$ SLYNTVATL $^{85}$ ), RT ( $^{309}$ ILKEPVHGV $^{317}$ ) und vpr ( $^{59}$ AIIRILQQL $^{67}$ ) (ALTFELD *et al.* 2005). PMA (*Phorbol 12-Myristat 13-Acetat*) und Ionomycin wurde als Färbekontrolle verwendet. Die PBMCs der HIV-1 Patienten wurden im ELISpot so eingesetzt, dass das zu testende MHC-I-Epitop mit dem HLA-Allel des Patienten übereinstimmte. Nach Inkubation der PBMCs mit dem Antigen und entsprechender Detektion war das sezernierte IFN- $\gamma$  als blauer Punkt (*spot*) sichtbar, welcher indikativ für eine IFN- $\gamma$ -produzierende Zelle ist. Die PBMCs des Patienten Pt.106 wurden ohne Antigen kultiviert (unstimuliert), mit PMA/Ionomycin oder dem CEF Peptid Pool stimuliert (Abbildung 5.2.5). Die blauen Punkte wurden ausgezählt, auf eine eingesetzte Zellzahl von  $1 \times 10^5$  normalisiert und als Spot-formende Units (SFU) im Diagramm angegeben.



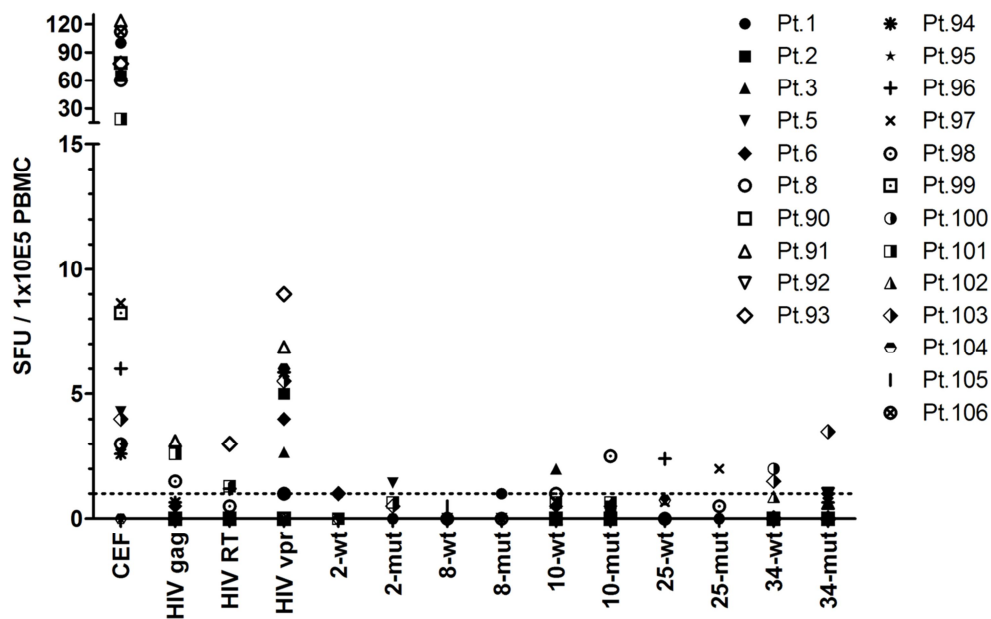
**Abbildung 5.2.5 Exemplarische Ergebnisse eines ELISpot Assays.**

Für den ELISpot Assay wurden HIV-1 PBMCs für 20h mit verschiedenen Antigenen versetzt. Sezerniertes IFN- $\gamma$  wurde mit einem anti-IFN- $\gamma$  und Enzym-markierten Sekundärantikörper und anschließend durch Zugabe eines chromogenen Substrats visualisiert. Exemplarische Darstellung der Stimulation der HIV-1 PBMCs von Patient 106. Die PBMCs wurden ohne Antigen (unstimuliert), mit PMA/Ionomycin oder dem CEF Peptid Pool (Peptidmischung von EBV, CMV und Influenza) inkubiert. Ein blauer Punkt entspricht einer IFN- $\gamma$ -produzierende Zelle.

Der allgemeine Immunstatus der HIV-1 Patienten war detektierbar, im Gegensatz zu einer HIV-1-spezifischen Immunaktivität. Nach Zugabe des CEF Peptid Pools sezernierten die meisten PBMCs der 23 getesteten HIV-1 Patienten IFN- $\gamma$  (Abbildung 5.2.6). Diese IFN- $\gamma$ -Antwort variierte stark zwischen den Patienten und lag in einem Bereich von 3-124 SFUs. Lediglich für die PBMCs der Patienten Pt.95 und Pt.104 war keine IFN- $\gamma$ -Antwort detektierbar. Der Immunstatus bezüglich der HIV-1 Infektion wurde durch die HIV-1 Peptide gag, RT und vpr untersucht, wobei jedoch eine geringe Stimulation der PBMCs gefunden wurde. 68,7% der getesteten Patienten produzierten IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit dem vpr (1-9 SFUs). Hingegen induzierten gag und RT eine IFN- $\gamma$ -Antwort unter 5 SFUs, überdies lediglich bei einer geringen Patientenzahl (38,9% bei gag, 33,3% bei RT). In früheren Arbeiten wurde indes gezeigt, dass 60-70% bzw. 45% der HIV-1 Patienten eine zelluläre Immunantwort gegen die Peptide gag bzw. RT aufwiesen und 20-30% der Patienten gegen vpr (BETTS *et al.* 2000; ALTFELD *et al.* 2001a; ALTFELD *et al.* 2005; ZIDOVEC LEPEJ *et al.* 2006).

Aufgrund der verminderten vorhergesagten Immunogenität von V2 wurde die Aktivierung der HIV-1 Patienten PBMCs durch die Peptidfragmente von C46-EHO mit V2 im ELISpot verglichen. Die Patienten PBMCs wurden mit den einzelnen 9mer Peptiden des C46-EHO (-wt) oder des V2 (-mut) inkubiert (Abbildung 5.2.6). Die IFN- $\gamma$ -Antwort der HIV-1 PBMCs war hierbei <5 SFUs für alle Patienten und Peptide.

Die Nachweisgrenze wird für den ELISpot Assay mit 1 SFU pro  $1 \times 10^5$  CTLs angegeben (SCHMITTEL *et al.* 1997). Allerdings schwankt die Frequenz spontan-sekretierender CTLs zwischen 1-10 SFUs (HERR *et al.* 1996). Die Ergebnisse zeigten, dass in HIV-1 Patienten keine bzw. nur sehr wenige T-Zellen existieren, die spezifisch für HIV-1 Peptide wie gag und RT oder die 9mer Peptide C46-EHO oder V2 sind. Dies entspricht dennoch den Erwartungen, da C46-EHO von der Aminosäuresequenz des HIV-2 abgeleitet ist und für den ELISpot die PBMCs von HIV-1 Patienten verwendet wurden. Zwar basiert das Peptid 34-wt auf der HIV-1 Sequenz, eine Stimulation der CTLs wurde jedoch nicht detektiert. Somit war in keinem der Patienten eine Immunantwort gegen die vorhergesagten MHC-I-Epitope nachweisbar, so dass keine Aussage über eine mögliche Deimmunisierung der Peptide getroffen werden konnte.



**Abbildung 5.2.6** Die PBMCs HLA-typisierter HIV-1 Patienten wurden nur minimal durch Inkubation mit 9mer Peptiden von C46-EHO oder V2 stimuliert.

Für den ELISpot Assay wurden HIV-1 PBMCs für 20h mit verschiedenen Antigenen versetzt. Sezerniertes IFN- $\gamma$  wurde mit einem anti-IFN- $\gamma$  und Enzym-markierten Sekundärantikörper und anschließend durch Zugabe eines chromogenen Substrats visualisiert. Die PBMCs von 23 HIV-1 Patienten wurden mit 9mer Peptiden des CEF Peptid Pools, der HIV-1 Proteine (gag, RT, vpr) oder des C46-EHO (-wt) bzw. V2 (-mut) inkubiert. Die Ergebnisse des ELISpots sind als SFUs (Spot-formende Units) pro  $1 \times 10^5$  PBMCs angegeben. Die punktierte Linie gibt die Nachweisgrenze an (SCHMITTEL *et al.* 1997).

### 5.2.4 Einfluss der Ankerpositionen auf die CTL-Stimulation

Die vorhergehenden Experimente machten deutlich, dass in den untersuchten HIV-1 Patienten eine zelluläre Immunantwort weder gegen C46-EHO noch V2 existierte. Indes kann bei einer genetischen Modifikation von Targetzellen eine zelluläre Immunantwort induziert werden, indem Peptidfragmente des Transgenprodukts im Komplex mit MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Der experimentelle Nachweis der Deimmunisierung der antiviralen Peptide wurde anhand von zwei bekannten viralen CTL-Epitopen beispielhaft erbracht (Tabelle 5.2.2) (CURRIER *et al.* 2002). Das Peptid des CMV Matrixproteins pp65 mit der Aminosäuresequenz  $^{495}$ NLVPMVATV $^{503}$  wird *in vivo* von HLA-A\*0201 gebunden (WILLS *et al.* 1996) und *in silico* als MHC-I-Epitop für die HLA-Allele A\*0201 und A\*03 vorhergesagt (Tabelle 5.2.2). Das EBV Peptid  $^{259}$ GLCTLVAML $^{267}$  des frühen lytischen Proteins BMLF1

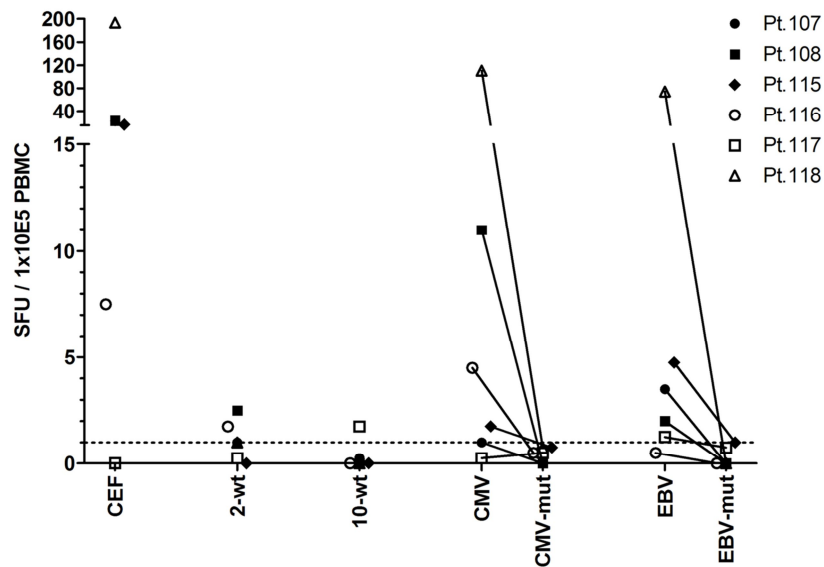


wird *in vivo* von HLA-A\*0201 präsentiert (STEVEN *et al.* 1997) und *in silico* für dasselbe Allel vorhergesagt (Tabelle 5.2.2). Die zelluläre Immunogenität wurde durch Mutation der Aminosäuren an den Hauptankerpositionen P2 und P9 vermindert. Dies resultierte in den Peptiden CMV-mut und EBV-mut mit einer geringen vorhergesagten Bindungsstärke für HLA-A\*0201 und HLA-A\*03 (Tabelle 5.2.2).

**Tabelle 5.2.2 *In silico* Vorhersagen und Substitutionen für die Peptide CMV und EBV (. = gleiche Aminosäure wie Originalpeptid; k.V. = keine Vorhersage).**

Name	Aminosäuresequenz	SYFPEITHI		BIMAS	
		A*0201	A*03	A*0201	A*03
CMV	NLVPMVATV	30	20	160	1,35
CMV-mut	.W.....A	14	10	0,002	0,001
EBV	GLCTLVAML	28	k.V.	49	k.V.
EBV-mut	.W.....A	12	k.V.	0,002	k.V.

Die Aktivität der Peptide CMV-mut und EBV-mut wurde im ELISpot mit sechs gesunden Probanden mit HLA-A\*0201 experimentell verifiziert (Abbildung 5.2.7, Kapitel 4.2.10). Die Inkubation der PBMCs mit dem CEF Peptid Pool bestehend aus 23 9mer Peptiden von EBV, CMV und Influenza führte wie auch schon bei den HIV-1 Patienten zu einer unterschiedlich starken Stimulation der T-Zellen (7-194 SFUs). Als Negativkontrolle wurden C46-EHO Peptidfragmente verwendet: 2-wt (nicht für HLA-A\*0201 vorhergesagt) und 10-wt (für HLA-A\*0201 vorhergesagt). Die Inkubation mit 2-wt oder 10-wt führte zu einer geringen Stimulation der PBMCs (<2,5 SFUs). Die viralen Peptide CMV und EBV induzierten die Sekretion von IFN- $\gamma$ , welche in einem Bereich von 0,25-111 SFUs für CMV bzw. 0,5-74 SFUs für EBV lag. Im Gegensatz hierzu wurde durch die mutierten Peptide CMV-mut und EBV-mut bei keinem Probanden IFN- $\gamma$  detektiert (<1SFU). Die prinzipielle Anwendbarkeit der *in silico* Mutation von HLA-Epitopen wurde bestätigt.

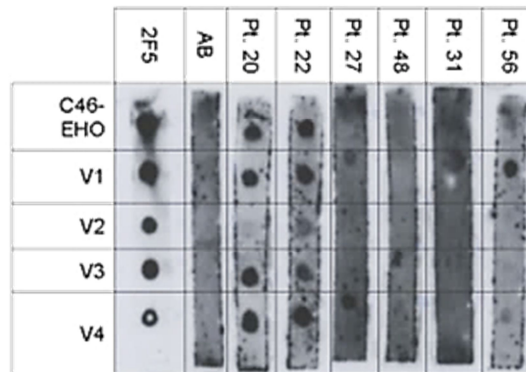


**Abbildung 5.2.7 Die Mutation von Aminosäuren in den Ankerpositionen unterbindet die Stimulation der CTLs gesunder Probanden.**

PBMCs sechs gesunder Probanden (HLA-A\*02-positiv) wurden *in vitro* für 20h mit 9mer Peptiden des CEF Pools (EBV, CMV, Influenza), C46-EHO Peptiden als Negativkontrolle (2-wt, 10-wt), den Wildtyp- (CMV und EBV) bzw. mutierten Peptiden (CMV-mut, EBV-mut) versetzt. Sezerniertes IFN- $\gamma$  wurde mit einem anti-IFN- $\gamma$  und Enzym-markierten Sekundärantikörper und anschließend durch Zugabe eines chromogenen Substrats visualisiert. Die Ergebnisse des ELISpot Assays sind als SFUs (Spot-formende Units) pro 1x10E5 PBMCs angegeben.

### 5.2.5 Einfluss der Mutationen auf die Antigenität

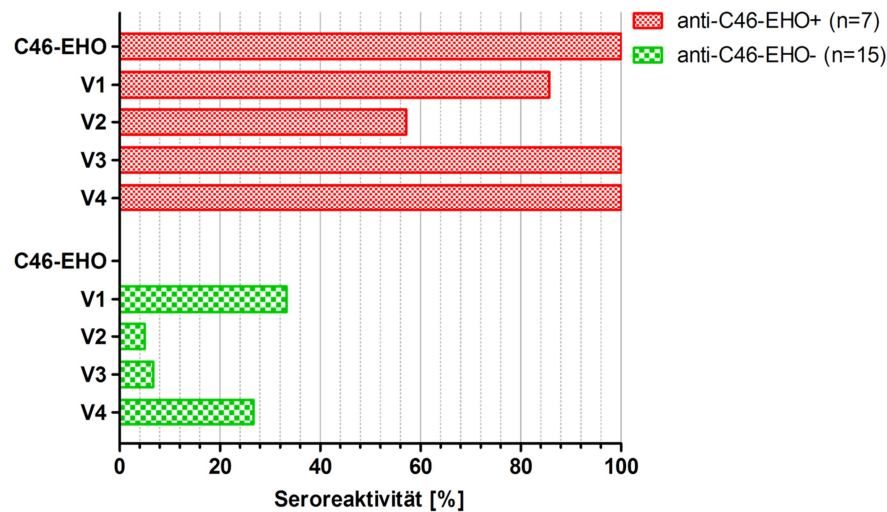
Im immunogenen C-Terminus des C46-EHO Peptids wurden Aminosäuren ausgetauscht, so dass hierdurch auch die Interaktion der Patientenantikörper mit den Peptiden beeinflusst werden könnte. Hierfür wurde ein Dot Blot mit den Seren von HIV-1 Patienten durchgeführt, die in den vorherigen Untersuchungen entweder als anti-C46-EHO Antikörper-positiv oder -negativ bestimmt worden waren (Kapitel 5.1.3 und 0). Die Mutationen beeinflussten die Bindung des Antikörpers 2F5 nicht (Abbildung 5.2.8). Die Seren der Patienten Pt.20, Pt.22 und Pt.27 wiesen C46-EHO-spezifische Antikörper auf und konnten zwar die Peptide V1, V4 und/oder V3 binden, nur mit geringer Stärke jedoch V2. Hingegen enthielten die Seren der Patienten Pt.48, Pt.31 und Pt.56 keine Antikörper gegen C46-EHO, erkannten aber teilweise V1 und/oder V4.



**Abbildung 5.2.8 Exemplarische Abbildung eines Dot Blots.**

Auf die Streifen einer Nitrozellulosemembran wurden Peptidlösungen (C46-EHO, V1, V2, V3 und V4) aufgetropft und mit der Positivkontrolle mAk 2F5, der Negativkontrolle (AB, anti-HIV Antikörper-negatives Serum) oder den HIV-1 Patientenseren inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemilumineszenz. Die Expositionszeit betrug 30sec.

Alle anti-C46-EHO Antikörper-positiven HIV Seren erkannten die Peptide V3 und V4 (Abbildung 5.2.9 und Anhang 9.2). Für die Varianten V1 und V2 war der Anteil an Patientenseren mit entsprechenden Antikörpern vermindert. 86% dieser HIV-1 Patientenseren wiesen Antikörper gegen V1, lediglich 57% gegen V2 auf. Die Analyse von anti-C46-EHO Antikörper-negativen Patientenseren ergab, dass die Antikörper dieser Patienten verstärkt die Peptide V1 bzw. V4 erkannten (33% bzw. 27% der HIV-1 Patientenseren) (Abbildung 5.2.9). Hingegen wiesen lediglich 5% der HIV-1 Seren anti-V2 Antikörper auf. Analoge Ergebnisse wurden für das Peptid V3 erhalten, so dass diese Veränderungen in der Seroreaktivität als geringfügig eingestuft wurden. Die Antikörper in HIV-2 Seren detektierten sowohl das Ausgangspeptid C46-EHO als auch alle Peptidvarianten. Das Peptid V2 wies demnach die geringste Antigenität im Vergleich zu den übrigen Peptidvarianten auf.



**Abbildung 5.2.9 Das Peptid V2 weist eine verringerte HIV-1 Seroreaktivität auf.**

Verschiedene HIV-1 Patientenseren mit (anti-C46-EHO+) oder ohne (anti-C46-EHO-) C46-EHO-spezifischen Antikörpern im Serum wurden mittels Dot Blot analysiert. Dargestellt ist die Seroreaktivität in Prozent.

### 5.3 Das optimierte Peptid V2o

Für die *in vivo* Anwendung antiviraler Peptide sind derzeit drei Applikationsformen möglich: synthetisch hergestellt, membranständig oder sezerniert. In dieser Arbeit konnte bisher dargelegt werden, dass das Peptid C46-EHO als synthetischer und membranständiger Inhibitor im nanomolaren Konzentrationsbereich den Eintritt von HIV hemmte. Zeitgleich zu diesen Experimenten wurde von Dr. Lisa Egerer (GSH, Frankfurt am Main) ein retroviraler Vektor für die extrazelluläre Sekretion des C46 Peptids konzipiert (EGERER 2009). Zudem untersuchte Dr. Lisa Egerer die antivirale Wirksamkeit von C46-EHO in sezernierter Form (Bezeichnung: EHO-GAFur<sub>0</sub>GA) in einem Neutralisationsassay. Der IC<sub>50</sub>-Wert des sezernierten C46-EHO Peptids war 2,5-fach niedriger im Vergleich zum sezernierten C46 Peptid (Daten nicht gezeigt).

Das Peptid V2 sollte aufgrund der überzeugenden immunologischen und antiviralen Eigenschaften für die Anwendung als sezernierter Inhibitor weiter optimiert werden. 1) Die intrazelluläre Peptidsynthese umfasst Transkription, Translation sowie posttranslationelle Modifizierungen, wie z.B. Glykosylierung. C46 und V2 weisen eine N-Glykosylierungsstelle auf (Tabelle 5.3.1). Bei einer N-Glykosylierung wird ein Zuckerrest an die Aminosäure Asparagin der konservierten Aminosäuresequenz N-X-S/T (X: beliebige

Aminosäure) angehängt (HEBERT *et al.* 2005). Allerdings befindet sich die Glykosylierungsstelle beim C46 an der Position c im Helixrad, im Gegensatz zu g im V2 (Abbildung 2.2.2 B). Die Position des Zuckerbaumes könnte die post-translationelle Prozessierung und ferner die antivirale Aktivität beeinflussen. Daher wurde die Glykosylierungsstelle im V2 an die Position des C46-Peptids verschoben. 2) Die zwölf C-terminalen Aminosäuren von V2 basieren auf der HIV-1 MPER und weisen Bindungsstellen für mAk 2F5 und die HIV-1 Patientenseren auf (Tabelle 5.3.1). Da dieses Epitop eine hohe Immunogenität aufweist, sollte die Antikörperreaktivität gegen V2 durch Mutation in diesem Bereich vermindert werden.

**Tabelle 5.3.1 Aminosäuresequenzen von C46 und V2. Die N-Glykosylierungsstelle ist eingerahmt, das B-Zellepitop unterstrichen.**

Peptid	Aminosäuresequenz (AS 628-673)
C46	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF
V2	WQTWERQVNFWDANITKALEEEAQIQNEKNMYELQKLDKWASAWNWF

### 5.3.1 Verringerung der zellulären Immunantwort *in silico*

Die Konsensussequenz für die N-glykosidische Bindung ist in den Peptiden C46 (NYT) und V2 (NIT) enthalten. Zunächst wurde die Sequenz NFWDANIT des V2-Peptids durch NNYTSLIH des C46-Peptids substituiert (Tabelle 5.3.2). Für dieses Peptid V2.1 ermittelte SYFPEITHI eine höhere Anzahl an MHC-I-Epitopen sowie höhere Punktwerte für diverse HLA-Allele. Im zweiten Schritt wurde das Peptid V2.2 mit dem Epitop NNYTANIH generiert, welches sich aus Teilen von C46 und V2 zusammensetzte. Die Prognosen von SYFPEITHI für V2.2 ergaben jedoch ebenfalls eine Zunahme der Epitope (Tabelle 5.3.2). Im dritten Schritt wurde zum einen die Aminosäure Tyrosin (Y<sup>638</sup>) der Glykosylierungsstelle durch Isoleucin (I<sup>638</sup>) ersetzt, die ursprünglich im C46-EHO vorhanden war (Tabelle 5.3.2). Zum anderen wurde die Datenbank Los Alamos hinzugezogen, welche Aminosäuresequenzen diverser HIV-1, HIV-2 und SIV Isolate enthält. Daher können bekannte Sequenzen miteinander verglichen und insofern häufig vorkommende

Aminosäuren an einer gewünschten Position ermittelt werden. Demzufolge wurde die Aminosäure Asparagin (N<sup>636</sup>) gegen Aspartat (D<sup>636</sup>) ausgetauscht, da jene an dieser Position am häufigsten in der HIV-2 Sequenz (55,7%) und am zweithäufigsten bei HIV-1 Viren (31,79%) auftritt (Tabelle 5.3.2). Die stark variable Position 640 wurde durch Glutamat (Häufigkeit bei HIV-1: 9,3%) ersetzt. Threonin (T<sup>641</sup>) und Isoleucin (I<sup>642</sup>) sind häufig in der Aminosäuresequenz der HIV-1 Viren enthalten (27,6% bzw. 99,4%/100% bei HIV-1/HV-2). Hingegen kommt Serin (S<sup>643</sup>) ausschließlich in der Aminosäuresequenz von HIV-2 mit einer Häufigkeit von 25,7% vor. Durch die Substitutionen wurde die Anzahl der Peptidfragmente verringert, obgleich die Punktwerte des V2.3 unverändert blieben.

**Tabelle 5.3.2 *In silico* Vorhersagen von SYFPEITHI für die Peptidvarianten V2.1 bis V2.3. Dargestellt ist lediglich der differente Aminosäurebereich; die N-Glykosylierungsstelle ist unterstrichen.**

Peptid	Aminosäuresequenz (AS 636-643)	8mer	9mer	10mer
		Anzahl der MHC-I-Epitope (Punktwertbereich)		
V2	NFW <u>D</u> ANIT	5 (20-21)	4 (20-23)	4 (20-23)
V2.1	NNY <u>T</u> SLIH	5 (20-22)	6 (20-25)	8 (20-24)
V2.2	NNY <u>T</u> TANIH	5 (20-22)	3 (20-25)	7 (20-24)
V2.3	<u>D</u> NITQTIS	4 (20-21)	2 (20-23)	3 (20-23)

Die immunogene Region am C-Terminus von V2 wurde zunächst gegen zwei bekannte Markierungsepitope ausgetauscht. Zum einen wurde in der Peptidvariante V2.3 die Aminosäuresequenz <sup>666</sup>WASAWNWF<sup>673</sup> durch das FLAG Epitop DYKDDDDK ersetzt (HOPP *et al.* 1988) (Tabelle 5.3.3). Im Gegensatz zu V2 wurde für diese Variante V2.3a eine geringere Anzahl an 8- und 9meren, jedoch drei zusätzliche 10mer und ein 11mer Peptidfragmente mit SYFPEITHI vorhergesagt. Zum anderen wurden in der Peptidvariante V2.3 die Aminosäuren <sup>664</sup>DKWASAWNWF<sup>673</sup> durch das c-myc Epitop EQKLISEEDL ausgetauscht (EVAN *et al.* 1985) (Peptidvariante V2.3b in Tabelle 5.3.3). Die SYFPEITHI Analyse für V2 und V2.3b ergab, dass bei vergleichbaren Punktwerten weniger MHC-I-Epitope vorhergesagt wurden.

**Tabelle 5.3.3 *In silico* Vorhersagen von SYFPEITHI für die Peptidvarianten von V2.3a und V2.3b. (unterstrichen: FLAG (DYKDDDDK) und c-myc (EQKLISEEDL)).**

Peptid	Aminosäuresequenz (AS 662-673)	8mer	9mer	10mer	11mer
		Anzahl der MHC-I-Epitope (Punktwertbereich)			
V2	ELDKWASAWNWF	5 (20-21)	4 (20-23)	4 (20-23)	-
V2.3a	ELDK <u>DYK</u> DDDDK	4 (20-21)	1 (21)	6 (20-23)	1 (24)
V2.3b	ELE <u>QKLISEEDL</u>	5 (20-21)	3 (20-21)	3 (22-23)	-

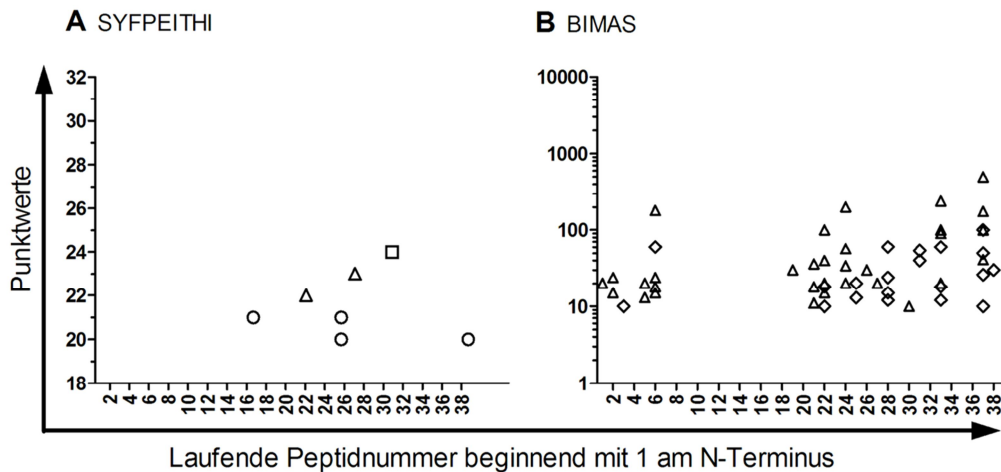
Das c-myc Epitop der Peptidvariante V2.3b enthält überwiegend geladene Aminosäuren, wodurch der C-Terminus hydrophile Eigenschaften erhält. Liu et al. zeigte allerdings, dass die hydrophoben Bereiche am C- und N-Terminus der gp41 CHR/MPER maßgeblich am Eintrittsprozess beteiligt sind (Liu *et al.* 2007). Daher wurde angenommen, dass der Austausch dieser Lipid-bindenden gegen eine hydrophile Region die antivirale Wirksamkeit vermindern würde. Letztendlich wurde im V2.3 die Aminosäuresequenz <sup>664</sup>DKWASAWNWF<sup>673</sup> durch NQWDIFSNWF des HIV-2 Stammes EHO substituiert (LEITNER T *et al.* 2005) und somit das optimierte Peptid V2o generiert (Tabelle 5.3.4).

**Tabelle 5.3.4 Aminosäuresequenzen der Peptide V2 und V2o. (unterstrichene Aminosäuren = Unterschied zu C46-EHO, doppelt unterstrichene Aminosäuren = Veränderungen im V2o gegenüber V2, eingrahmt: N-Glykosylierungsstelle, kursiv: substituiertes HIV-2 EHO Epitop).**

Peptid	Aminosäuresequenz (AS 628-673)
V2	WQTWERQVNFWDANITKALEEEAQIQNEKNMYELQKLDKWASAWNWF
V2o	WQTWERQVDNITQTISKALEEEAQIQNEKNMYELQKLNQWDIFSNWF

Die vergleichende Analyse mittels SYFPEITHI von V2 und V2o ergab für V2o lediglich ein 9mer und zwei 10mer MHC-I-Epitope (Abbildung 5.3.1 A). Die Peptidsequenz von V2o wurde ferner mit dem Vorhersageprogramm BIMAS überprüft (Abbildung 5.3.1 B). Im Gegensatz zu V2 wurden für den N-Terminus von V2o (Ifd. Nr. 1 bis 12) lediglich vereinzelt MHC-I-Epitope vorhergesagt (22 im V2, 11 im V2o). Indes prognostizierte BIMAS für die

10mer Peptidfragmente mit der lfd. Nr. 37 bzw. 24 einen hohen Punktwert von 500 bzw. 200, jedoch für das niedrig-frequentierte HLA-B\*2705. Zusammenfassend wurde für das optimierte Peptid V2o eine geringere Anzahl von Peptidfragmenten mit geringen Punktwerten für diverse HLA-Allele verglichen mit V2 vorhergesagt.



**Abbildung 5.3.1** Für das Peptid V2o wurde *in silico* eine geringe Immunogenität vorhergesagt.

Die Aminosäuresequenz von V2o wurde mit den Vorhersageprogrammen SYFPEITHI (A) und BIMAS (B) hinsichtlich der Bindung an diverse HLA-Allele untersucht. Die Nummerierung der Peptidfragmente beginnt am N-Terminus mit der laufenden Peptidnummer 1. Dargestellt sind die Punktwerte für jedes einzelne 8-, 9-, 10- und 11mer. Nicht berücksichtigt wurden Punktwerte < 20 bei SYFPEITHI und < 10 bei BIMAS.

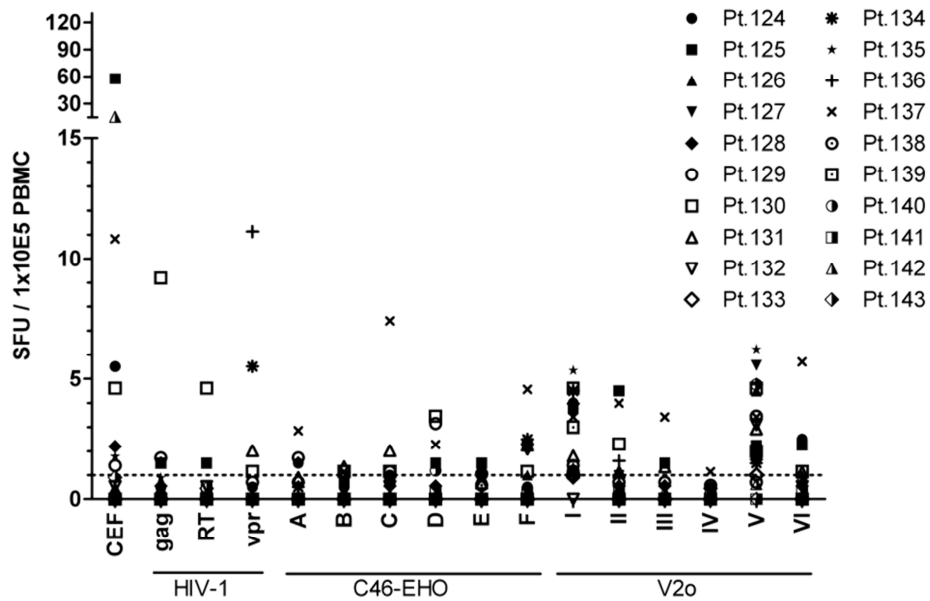
### 5.3.2 Analyse der IFN- $\gamma$ Sekretion von HIV-1 PBMCs nach Peptidzugabe

Die Analyse der zellulären Immunogenität von 20 HIV-1 Patienten gegen C46-EHO und V2o erfolgte *in vitro* mittels ELISpot (Abbildung 5.3.2, Kapitel 4.2.10). Der CEF Peptid Pool wurde als Positivkontrolle eingesetzt, wobei 55% der Patienten auf die Stimulation mit dem CEF Peptid Pool reagierten. Die IFN- $\gamma$  Antwort lag in einem Bereich von 0,5-58 SFUs. Hingegen induzierten die HIV-1 Proteine gag, RT und vpr bei lediglich ca. einem Drittel der HIV-1 Patienten IFN- $\gamma$  und war ferner <12 SFUs.

Aufgrund der geringen vorhergesagten zellulären Immunogenität für V2o wurde nun die Aktivierung der HIV-1 PBMCs unter Verwendung der vollständigen Aminosäuresequenzen (15mere, überlappend um 11 Aminosäuren) von C46-EHO und V2o im ELISpot verglichen. Hierbei wurde die sog. Matrix-Methode angewandt (MASHISHI and GRAY 2002) (Kapitel



4.2.10). Für C46-EHO und V2o wurden je fünf Peptidmischungen (A bis F für C46-EHO, I bis VI für V2o) hergestellt, die sich aus jeweils drei Peptidfragmenten zusammensetzten (Tabelle 4.2.2 und Tabelle 4.2.3). Jedes Peptidfragment war zweimal vertreten, so dass retrospektiv das immunogene MHC-I-Epitop ermittelt werden konnte. Die IFN- $\gamma$ -Antwort der HIV-1 PBMCs nach Stimulation mit den Peptidmischungen von C46-EHO war bei allen Patienten <5 SFUs (Abbildung 5.3.2). Lediglich die PBMCs von Pt.137 reagierten minimal auf die C46-EHO-Peptidmischungen C (7 SFUs) und F (5 SFUs) sowie die V2o-Peptidmischungen III (3 SFUs) und VI (6 SFUs). Dies entsprach der C46-EHO Aminosäuresequenz <sup>659</sup>ELQELDKWASLWNWF<sup>673</sup> bzw. <sup>659</sup>ELQKLNQWDIFSNWFW<sup>673</sup> des V2o. Ansonsten war die IFN- $\gamma$  Antwort <7 SFUs für die HIV-1 PBMCs gegen die V2o Peptidmischungen. Auffallend war die Reaktion aller PBMCs gegen das Peptidfragment <sup>640</sup>QTISKALEEAQIQNE<sup>654</sup> der V2o Peptidmischungen I und V. Diese Kavitäten wiesen eine starke Hintergrundfärbung auf. Präzipitate oder Nebenprodukte der Peptidsynthese können eine unspezifische Reaktion verursachen (ANTHONY and LEHMANN 2003).

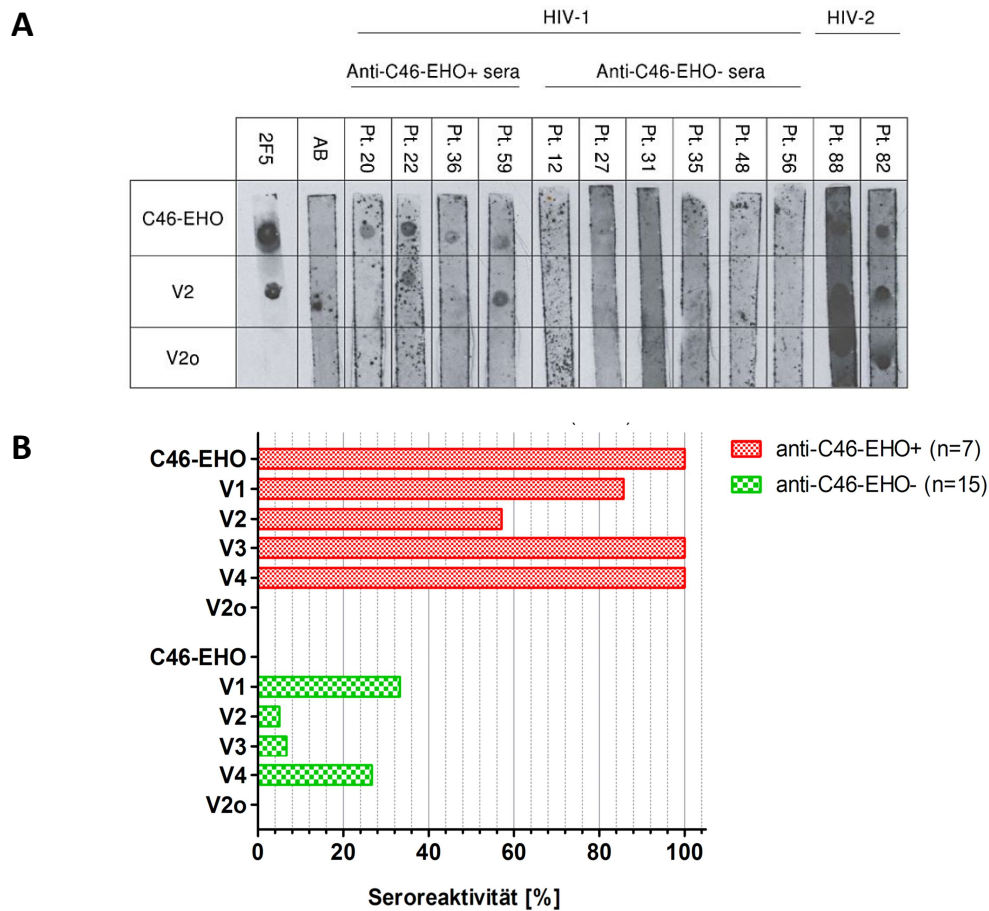


**Abbildung 5.3.2** PBMCs von HIV-1 Patienten werden nicht durch Peptidfragmente von C46-EHO oder V2o zur Sekretion von IFN- $\gamma$  stimuliert.

Die PBMCs von 20 HIV-1 Patienten wurden für 20h mit 9mer Peptiden des CEF Peptid Pools, der HIV-1 Proteine (gag, RT, vpr) oder 15mer Peptiden von C46-EHO (A bis F) bzw. V2o (I bis VI) auf einer ELISpot-Platte inkubiert. Sezerniertes IFN- $\gamma$  wurde mit einem anti-IFN- $\gamma$ , gefolgt von einem Enzym-markierten Sekundärantikörper und anschließend durch Zugabe eines chromogenen Substrats visualisiert. Die Ergebnisse des ELISpots sind als SFUs (Spot-formende Units) pro  $1 \times 10^5$  PBMCs angegeben. Die punktierte Linie gibt die Nachweisgrenze an (SCHMITTEL *et al.* 1997).

### 5.3.3 Untersuchung der Seroreaktivität von HIV Patienten

Da der C-Terminus von V2o die Aminosäuresequenz des HIV-2 EHO anstelle der HIV-1 MPER enthält, konnte der HIV-1 MPER-bindende Antikörper 2F5 nicht mehr zur Detektion eingesetzt werden. Wie erwartet, unterblieb die Reaktion von 2F5 mit V2o im Dot Blot (Abbildung 5.3.3, Kapitel 0). Indes konnte das Peptid V2o eindeutig durch die Zugabe von HIV-2 Seren der Patienten Pt.88 und Pt.82 nachgewiesen werden. Acht weitere HIV-2 Patientenserum reagierten ebenfalls mit V2o (Anhang 9.2). Die HIV-1 Patientenserum reagierten hingegen nicht mit V2o. Ferner wurden anti-C46-EHO/-V2 Antikörper-negative HIV-1 Seren eingesetzt, wobei auch hier die V2o Bindung unterblieb. Folglich wurde die Antikörperreaktivität in HIV-1 Patienten gegen C46-EHO durch Austausch des immunogenen Epitops unterbunden.



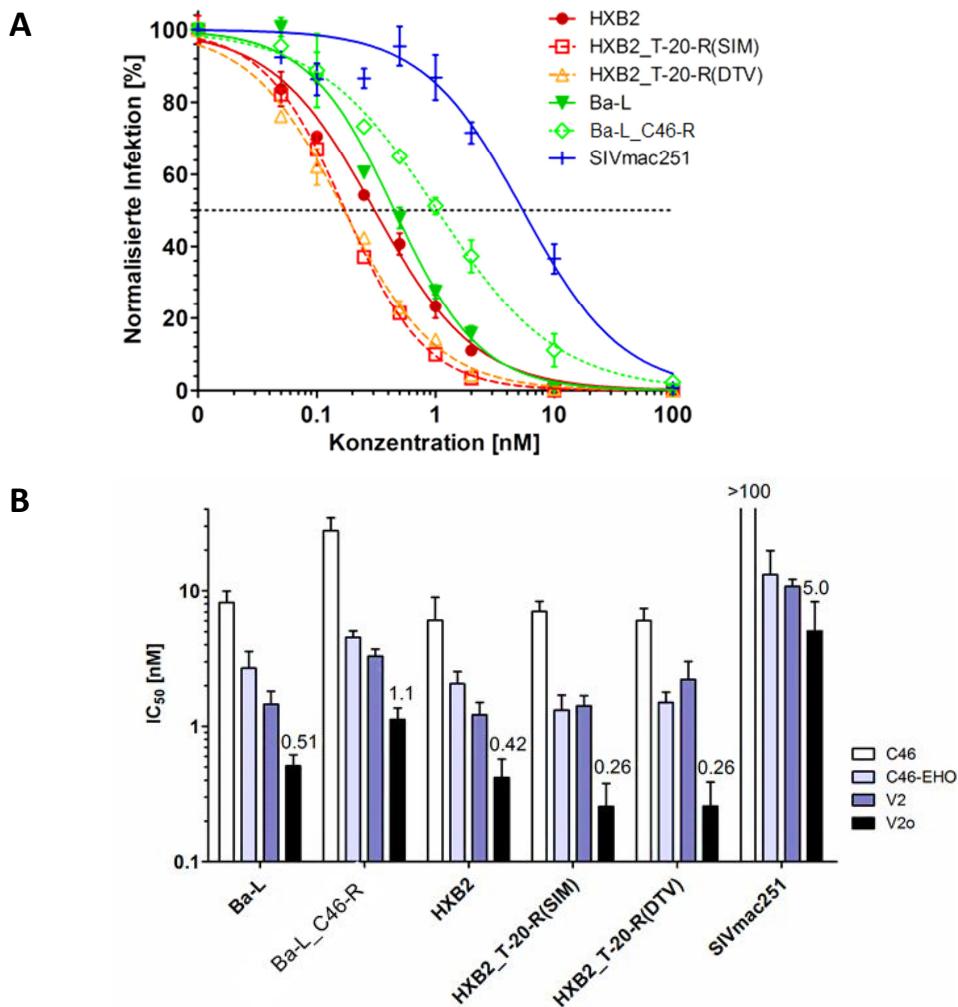
**Abbildung 5.3.3 Das Peptid V2o weist keine prä-existierende HIV-1 Seroreaktivität auf.**

(A) Auf die Streifen einer Nitrozellulosemembran wurden die Peptide (C46-EHO, V2 und V2o) aufgetropft und mit der Positivkontrolle mAk 2F5, der Negativkontrolle (AB, anti-HIV Antikörper-negatives Serum) oder einem Patientenserum (HIV-1 oder HIV-2) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch einen HRPO-gekoppelten Sekundärantikörper und Chemilumineszenz. Die Expositionszeit betrug 1min. (B) Verschiedene HIV-1 Patientenseren mit (anti-C46-EHO+) oder ohne (anti-C46-EHO-) C46-EHO-spezifischen Antikörpern im Serum wurden mittels Dot Blot analysiert. Dargestellt ist die Seroreaktivität in Prozent.

### 5.3.4 Inhibitorische Wirksamkeit von V2o

Das Peptid V2o wies im Neutralisationsassay unabhängig vom getesteten Vektor eine deutlich verbesserte antivirale Wirksamkeit im Vergleich zu V2 auf (Kapitel 4.2.8, Abbildung 5.3.4 A und Anhang 9.1). Die geringste Menge war für die Hemmung der T-20-resistenten Vektoren T-20-R(SIM) und T-20-R(DTV) notwendig ( $IC_{50}=260pM$ ). Die antivirale Aktivität gegenüber den HXB2-Env-umhüllten Vektoren war im Vergleich zu V2 um den Faktor 2,9 höher ( $IC_{50}=420pM$ ). Für die 50%ige Inhibition der Vektoren Ba-L bzw. C46-R wurde relativ zu V2 eine 2,9- bzw. 3,0-fache Verminderung der Konzentration

erreicht. Ferner wies V2o eine ca. 2,1-fach gesteigerte Wirksamkeit gegenüber den SIV-Env-umhüllten Vektoren auf ( $IC_{50}=5,0nM$ ). Der schrittweise Aminosäureaustausch verbesserte deutlich die antivirale Wirksamkeit (Abbildung 5.3.4 B).



**Abbildung 5.3.4 Das lösliche Peptid V2o weist eine verbesserte antivirale Wirksamkeit auf.**

(A) PM-1 Zellen wurden in Anwesenheit steigender Konzentrationen von V2o mit lentiviralen Vektoren transduziert, die EGFP als Markergen trugen und mit diversen Hüllproteinen umhüllt waren (HXB2 (X4-trop), Ba-L (R5-trop), SIVmac251 (R5-trop) bzw. T-20-resistent (HXB2\_T-20-R(SIM) und HXB2\_T-20-R(DTV)) oder C46-resistent(Ba-L\_C46-R)). Nach fünf Tagen wurde durchflusszytometrisch der prozentuale EGFP-positive Anteil der PM-1 bestimmt. Dargestellt ist die relative Infektion normalisiert auf die Infektion peptidfreier PM-1 (Mittelwerte  $\pm$  SEM) von zwei unabhängigen Versuchen in Duplikaten. Die logistischen Regressionskurven wurden mit GraphPadPrism 5 erstellt und hierdurch die  $IC_{50}$ -Werte ermittelt. (B)  $IC_{50}$ -Werte der löslichen Peptide C46-EHO, V2 und V2o im Vergleich zum Referenzpeptid C46. Die mittleren  $IC_{50}$ -Werte  $\pm$  Standardabweichung in nM von mindestens zwei, höchstens neun Experimenten sind angegeben.

## 6 DISKUSSION

In den frühen Neunzigerjahren wurde für die Behandlung der HIV Infektion eine Kombinationstherapie bestehend aus verschiedenen antiretroviralen Medikamenten eingeführt. Diese Therapie reduziert die HIV-1 Viruslast und vermindert die Entstehung resistenter HI-Viren, die äußerst schnell aufgrund der fehlenden Korrekturlesefunktion der reverse Transkriptase von HIV-1 auftreten (SHANKARAPPA *et al.* 1999; MALIM and EMERMAN 2001; KOZAL 2009; CHABRIA *et al.* 2014). Die Medikamente haben jedoch eine Reihe von Nebenwirkungen (TROTTA *et al.* 2002; AL-DAKKAK *et al.* 2013). Mit den momentan zur Verfügung stehenden Medikamenten wird der Ausbruch von AIDS verzögert. Eine Heilung ist bislang nicht in Sicht.

Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit dem Andocken an zelluläre Rezeptoren der HIV Zielzellen und führt zur Fusion von viraler und zellulärer Membran, wodurch das RNA-enhaltene Kapsid in das Zytoplasma eindringen kann. Eintrittsinhibitoren, die diese ersten Schritte im Replikationszyklus unterbinden, haben gegenüber den klassischen antiretroviralen Medikamenten (z.B. Hemmstoffe der reversen Transkriptase oder Protease) den Vorteil, dass keine neue Infektionsrunde stattfinden kann und aufgrund der extrazellulär-ablaufenden Wirkung diese Substanzen nicht in die Zelle eindringen müssen. Eintrittsinhibitoren können auf drei Ebenen wirken: (i) Bindung des gp120 an den CD4-Rezeptor, (ii) Interaktion des gp120 mit dem Korezeptor oder (iii) Ausbildung des 6-HBs (ESTE 2003; ESTE and TELENTI 2007; LOBRITZ *et al.* 2010). Das synthetisch-hergestellte Peptid T-20 war 2003 der erste FDA-zugelassene Eintrittsinhibitor (ROBERTSON 2003; MATTHEWS *et al.* 2004). Seit 2007 ist der CCR5-Korezeptor-Antagonist Maraviroc für die Behandlung multiresistenter HI-Viren zugelassen (DORR *et al.* 2005; LIEBERMAN-BLUM *et al.* 2008).

Peptide haben ein großes Potential für Therapie und Diagnostik (AHRENS *et al.* 2012; DIETRICH *et al.* 2013). Der größte Vorteil liegt in ihrer geringen Größe, einer hohen Selektivität verbunden mit einer hohen Affinität sowie einer geringen Toxizität (ALBERICIO and KRUGER 2012). Nachteilig sind die fehlende orale Bioverfügbarkeit verursacht durch einen raschen Abbau im Gastrointestinalsystem, eine geringe Halbwertszeit im Blut

aufgrund proteolytischer Spaltung sowie die hohen Herstellungskosten bei synthetisch-hergestellten Peptiden (VLIEGHE *et al.* 2010). Dies verursacht insgesamt wiederholte tägliche Einnahmen, die mit unerwünschten Nebenwirkungen an der Injektionsstelle einhergehen können. Zudem entstehen speziell im Fall von T-20 sehr schnell resistente HIV-1 Isolate, die durch eine weitere Gabe von T-20 nicht mehr gehemmt werden (WEI *et al.* 2002; GREENBERG and CAMMACK 2004). Demnach müssen neue Strategien entwickelt werden, um Verfügbarkeit, Stabilität und Halbwertszeit der Peptide zu verbessern. Dies kann beispielsweise durch Depotmedikamente mit einer langsamen Wirkstoffabgabe oder durch eine direkte Konjugation mit einem zweiten Molekül wie PEG (*polyethylene glycol*) realisiert werden (CHAPMAN 2002; MAINARDES and SILVA 2004; DAI *et al.* 2005; WERLE and BERNKOP-SCHNURCH 2006; HOLT *et al.* 2008).

In der Gruppe von Laer (GSH, Frankfurt am Main) wurde eindrucksvoll gezeigt, dass die Expression des membranständigen antiviralen C-Peptids C46 (maC46, 46 Aminosäuren) die HIV-1 Zielzellen vor einer Infektion schützt (EGELHOFER *et al.* 2004). Hierdurch wurden zwei Probleme des löslichen T-20 Peptids (36 Aminosäuren) umgangen. Zum einen wurde durch die N-terminale Verlängerung das Risiko der Entstehung T-20-resistenter HI-Viren minimiert. Zum anderen wurde durch die intrazelluläre Expression die kurze Serumhalbwertszeit umgangen. Im Rahmen einer klinischen Phase I Studie erhielten zehn HIV-1 Patienten autologe T-Zellen, die durch genetische Modifikation das vor der HIV-Infektion schützende Peptid maC46 auf der Zelloberfläche präsentierten (VAN LUNZEN *et al.* 2007). Eine Anreicherung der T-Zellen wurde in den Patienten nicht beobachtet, wobei das fortgeschrittene AIDS Stadium der Patienten ursächlich gewesen sein kann. Auch könnte die erforderliche *in vitro* Stimulation der T-Zellen negative Auswirkungen auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen haben (FERRAND *et al.* 2000). Die Begleituntersuchungen der gentherapeutischen Studie ergaben ferner, dass 80% der Patienten prä-existierende maC46-spezifische Antikörper aufwiesen (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu akkumulierten maC46 genetisch-modifizierte Stammzellen in SHIV-infizierten Makaken vermutlich auch aufgrund des hohen Anteils Transgen-modifizierter Zellen (YOUNAN *et al.* 2013). In der Gruppe von Laer wird überdies an der genetischen Modifikation von Zellen für eine kontinuierlichen Sekretion des antiviralen Wirkstoffes in

den Extrazellularraum, um hierdurch sowohl die genetisch-modifizierten Zellen als auch ungeschützte Nachbarzellen vor einer HIV Infektion zu schützen. (EGERER *et al.* 2011).

Die Verminderung einer unerwünschten humoralen und zellulären Immunogenität (sog. Deimmunisierung) von peptidischen Therapeutika spielt ebenso eine wichtige Rolle, da die Aktivität des Immunsystems die Wirksamkeit biologischer Therapeutika, zum Beispiel durch die Bildung von anti-Drug Antikörpern (ADA), reduzieren und dies mit einem Verlust der Wirksamkeit, veränderter Pharmakokinetik oder mit einer Therapieresistenz einhergehen kann (SCHELLEKENS and CASADEVALL 2004; SCHELLEKENS 2005; DE GROOT and SCOTT 2007; PURCELL and LOCKEY 2008; RATHORE and WINKLE 2009; BAKER *et al.* 2010; SCHELLEKENS 2010; CHIRMULE *et al.* 2012). ADAs wurden nach Applikation von Insulin, Erythropoietin, Interferon alpha, Botulinumtoxin oder dem Gerinnungsfaktor VIII detektiert (SCHELLEKENS and CASADEVALL 2004; PURCELL and LOCKEY 2008). Im Rahmen gentherapeutischer Anwendungen kann überdies eine zelluläre Immunantwort induziert werden, die sich gegen Zellkulturkomponenten, den Vektor oder das Transgenprodukt richtet und zur Eliminierung der genetisch-modifizierten Zellen führt (MUUL and CANDOTTI 2007). Beispielsweise induzierte der Transfer von Zellen, die mit dem Markergen für die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins EGFP transduziert worden waren, im Maus- und Affenmodell eine spezifische zelluläre Immunantwort und im Affenmodell eine humorale Immunantwort (ROSENZWEIG *et al.* 2001; HAN *et al.* 2008).

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von HIV-inhibitorischen C-Peptiden mit verbesserten Eigenschaften wie Löslichkeit, helikaler Struktur, 6HB Stabilität und antiviraler Aktivität entwickelt (OTAKA *et al.* 2002; DWYER *et al.* 2007; HE *et al.* 2008; NAITO *et al.* 2008; XIAO and TOLBERT 2013; CHONG *et al.* 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Deimmunisierung am Beispiel peptidischer Eintrittsinhibitoren durchgeführt, wobei Struktur und Funktion beibehalten werden sollte. Das Peptid sollte hinsichtlich humoraler und zellulärer Immunogenität deimmunisiert werden. Einerseits wurden in der gentherapeutischen Studie maC46-spezifische prä-existierende Antikörper in HIV-1 Patienten detektiert (BRAUER 2005; VAN LUNZEN *et al.* 2007). Andererseits soll das Peptid in einem gentherapeutischen Ansatz als sezernierter Inhibitor zukünftig in HIV Patienten eingesetzt werden.

Als Ausgangspunkt wurden fünf publizierte antivirale Peptide hinsichtlich Immunogenität und antiviraler Aktivität verglichen. Die eingesetzten Peptide basierten auf der Aminosäuresequenz des HIV und sind aufgrund ihrer Körperfremdheit immunogen (HOLLÄNDER 2006). In dieser Arbeit wurde das publizierte Peptid C34-EHO (GUSTCHINA *et al.* 2005) C-terminal um 12 Aminosäuren des HIV-1 verlängert (Bezeichnung: C46-EHO). C46-EHO ist von der CHR Aminosäuresequenz der Isolate HIV-2 EHO und HIV-1 HXB2 abgeleitet und wies von den fünf getesteten Peptiden die geringste Immunogenität bei zugleich stärkster antiviraler Wirksamkeit auf. Die Deimmunisierung von C46-EHO basierte auf rationalem Design: (1) mittels bioinformatischer Werkzeuge und experimenteller Methoden wurden die immunogenen Epitope in der Aminosäuresequenz lokalisiert; (2) diverse Aminosäuren wurden in den Epitopen mutiert bis zum Austausch eines kompletten Epitopes und (3) Reanalyse der Wirksamkeit und Immunogenität. Basierend auf dem Peptid C46-EHO wurde durch sukzessiven Austausch von Aminosäuren in T- und B-Zell-Epitopen das optimierte Peptid V2o mit potenter antiviraler Wirksamkeit bei zugleich deutlich verminderter intrinsischer Immunogenität entwickelt.

### **6.1 Verminderung der zellulären Immunogenität**

Eine Vielzahl mathematischer Algorithmen stehen derzeit zur Verfügung, um *in silico* anhand der Aminosäuresequenz die zelluläre Immunantwort zu analysieren (BRUSIC *et al.* 2004; TONG *et al.* 2007). Dies umfasst Matrizen-basierte Vorhersageprogramme wie SYFPEITHI und BIMAS (PARKER *et al.* 1994; RAMMENSEE *et al.* 1999). Hierzu zählen jedoch ebenso lernfähige Vorhersageprogramme, wie künstliche neuronale Netzwerke (ANN, *artificial neuronal network*) und „Support Vector Machines“, aber auch stochastische „Hidden Markov Modelle“. In dieser Arbeit wurden die beiden Vorhersageprogramme SYFPEITHI und BIMAS verwendet. SYFPEITHI gehört zu den Motiv-basierten Methoden. Als Motiv wird das HLA Allel-spezifische Aminosäuremuster der Ankerpositionen bezeichnet (RAMMENSEE *et al.* 1999). SYFPEITHI arbeitet sehr spezifisch, wenn das Muster in einem Peptid vorhanden ist (Alles-oder-Nichts-Prinzip). Vorhersageprogramme wie BIMAS ermitteln die relative Bindungsstärke, indem der Beitrag jeder einzelnen Aminosäure an jeder Position quantifiziert wird (PARKER *et al.* 1994). Diese weisen



gegenüber Motiv-basierten eine höhere Vorhersagequalität auf (LARSEN *et al.* 2005; GOMEZ-NUNEZ *et al.* 2006; PETERS *et al.* 2006; TROST *et al.* 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde aus der Vielzahl der vorhergesagten MHC-I-Epitope lediglich die für die Deimmunisierung ausgewählt, welche von beiden Algorithmen für mehrere HLA Allele, für häufig vorkommende HLA Allele oder mit einem hohen Punktwert vorhergesagt wurden. Es ist bekannt, dass Vorhersageprogramme deutlich mehr Epitope in einer gegebenen Aminosäuresequenz identifizieren als *in vivo* relevant sind (RAMMENSEE *et al.* 1999; PELTE *et al.* 2004; TROST *et al.* 2007). Die Wahrscheinlichkeit für ein MHC-I-Epitop steigt jedoch je häufiger das Peptid von unterschiedlichen Programmen vorhergesagt wird (LARSEN *et al.* 2005; TROST *et al.* 2007).

In den vorhergesagten MHC-I-Epitopen wurden Aminosäuren gegen Reste ausgetauscht, die weniger gut in die Bindungstasche des jeweiligen HLA Moleküls passten. Aminosäureaustausche gegen weniger bevorzugte Reste destabilisieren den MHC-Peptid-Komplex aufgrund verstärkter Dissoziation und/oder niedrigerer Bindungsaffinität (CHEN *et al.* 1994; LIPFORD *et al.* 1995; CHEN *et al.* 2000). Die Immunogenität von Peptiden korreliert direkt mit der Fähigkeit der Ausbildung eines stabilen MHC-Peptid-Komplexes (SETTE *et al.* 1994; VAN DER BURG *et al.* 1996; BUSCH and PAMER 1998; BORBULEVYCH *et al.* 2005). Für eine stabile Bindung eines Peptids in der MHC-Bindungstasche werden meist hydrophobe Aminosäuren an den Hauptankerpositionen benötigt (BOUVIER and WILEY 1994; BOUVIER *et al.* 1998), wobei jedes HLA-Allel unterschiedliche Aminosäuren bevorzugt. Beispielsweise ist die Aminosäure Leucin an der zweiten und neunten Position des in dieser Arbeit vorhergesagten Nonamers FLDANITKL (Ifd. Nr.8) eine Ankeraminosäure für HLA-A\*02 (FALK *et al.* 1991; SCHMITZ *et al.* 1999). Leucin kann durch seine lange hydrophobe Seitenkette mit der hydrophoben Bindungstasche intensive Wechselwirkungen eingehen. Der Austausch gegen eine Aminosäure mit kürzerer Seitenkette, wie Alanin oder Valin, reduzierte die vorhergesagte zelluläre Immunogenität. Die Aminosäureseitenkette kann vermutlich nicht mehr vollständig in die Bindungstasche inserieren und vermindert die Peptid-MHC-Bindungsaffinität. Obgleich auch sekundäre Nebenanker die Bindungsaffinität beeinflussen (P1, P3 und P7 bei HLA-A\*0201) (POGUE *et al.* 1995), wurden diese in der hier vorliegenden Arbeit außer Acht gelassen.

Das MHC-I-Peptid wird außerdem durch eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen MHC-Molekül und dem Peptidrückgrat am N- und C-Terminus in der Bindungstasche stabilisiert (BOUVIER and WILEY 1994; MENG *et al.* 1997). Aminosäuren wie Glutamin können aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften an der Ausbildung der Wasserstoffbrücken beteiligt sein. Der Austausch gegen eine kürzere sowie weniger hydrophile Aminosäure wie Asparagin oder Threonin minimierte beispielsweise in den MHC-I-Epitopen QQWERQVRF und QQEKNMYEL (Ifd. Nr. 2 und 25) die zelluläre Immunogenität des Peptids V2o.

Obwohl *in silico* die zelluläre Immunogenität des optimierten Peptides V2o signifikant im Vergleich zum Ausgangspeptid C46-EHO reduziert wurde, konnte die erfolgreiche Entfernung der MHC-I-Epitope experimentell mittels ELISpot nicht bestätigt werden. Die Inkubation der vorhergesagten C46-EHO Epitope mit den PBMCs von HIV-1 Patienten oder gesunder Probanden produzierte im ELISpot nur sehr geringe IFN- $\gamma$  Mengen, die an der Nachweisgrenze des Assays lagen (HERR *et al.* 1996; SCHMITTEL *et al.* 1997). Vergleichbare Ergebnisse wurden durch die Stimulation der PBMCs eines HIV-2-infizierten Patienten sowie von sieben SIV-infizierten Rhesus Makaken erzielt (Daten nicht gezeigt, in Kooperation mit Roland Zahn, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts). Demnach wiesen weder HIV-1-/HIV-2-infizierte Patienten noch SIV-infizierte Rhesus Makaken eine bestehende zelluläre Immunantwort gegen C46-EHO bzw. V2o auf. Dieser gp41 Bereich scheint somit keine zytotoxische T-Zellantwort zu stimulieren. Dies wird durch die HIV immunologische Datenbank (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>) unterstützt, obwohl eine Dominanz gp41-spezifischer CTLs bereits beschrieben wurde (ZHUANG *et al.* 2008). HIV-spezifische CTLs sezernieren zudem zwar IFN- $\gamma$ , produzieren jedoch weniger Perforin und Granzym, wodurch ebenso die zytotoxische Aktivität minimiert ist (APPAY *et al.* 2000).

Die prinzipielle Anwendbarkeit der Strategie wurde anhand zweier dominanter viraler MHC-I-Peptide des CMV ( $^{495}$ NLVPMVATV $^{503}$ ) (WILLS *et al.* 1996) und des EBV ( $^{259}$ GLCTLVAML $^{267}$ ) (STEVEN *et al.* 1997) gezeigt. Hier führten die Aminosäureaustausche an den Hauptankerpositionen P2 und P9 *in vitro* zu einer deutlichen Abnahme der CTL Aktivierung. Die Ergebnisse waren konsistent mit den *in silico* Vorhersagen.

Vorhersageprogramme wurden bereits erfolgreich mit experimentellen Methoden für die Identifizierung von T-Zell-Epitopen kombiniert (WARMERDAM *et al.* 2002; DE GROOT *et al.* 2005). Mittels BIMAS wurden in der Aminosäuresequenz des Gerinnungsfaktors VIII und EGFP potentielle MHC-I-Epitope identifiziert, wobei nach Immunisierung von Mäusen eine spezifische CTL-Antwort gegen ein Epitop detektiert wurde (WANG *et al.* 2005; HAN *et al.* 2008). Ebenso konnten mittels *in silico* Methoden im Nukleoprotein des Ebola Virus (SUNDAR *et al.* 2007), im M2-Protein des Respiratorischen-Synzytial-Virus (LEE *et al.* 2007) und dem Glykoprotein des Lassa Virus (BOESEN *et al.* 2005) potentielle MHC-I-Epitope aufgespürt und ein Teil dieser Epitope experimentell bestätigt werden. Die Behinderung der Peptid-MHC-Bindung ist unter anderem auch ein natürlicher Prozess, der von HIV benutzt wird, um dem Druck des Immunsystems auszuweichen (CARLSON and BRUMME 2008). Ein einziger Aminosäureaustausch von Threonin zu Alanin führte aufgrund eines instabilen Peptid-MHC-Komplexes im Mamu-A\*01-restringierten CTL-Epitop CTPYDINQM zu einer SIV-Fluchtmutante (CHEN *et al.* 2000).

Pelte und Kollegen zeigten in einer Untersuchung der CMV Strukturproteine, dass von 261 vorhergesagten Epitopen für HLA-A\*0201 (SYFPEITHI und BIMAS) lediglich ein Peptid *in vitro* eine Freisetzung von IFN- $\gamma$  induzierte (PELTE *et al.* 2004). Nur eine geringe Anzahl von potentiellen MHC-I-Epitopen löst demnach eine zelluläre Immunantwort in Abhängigkeit eines bestimmten HLA-Alles aus (YEWDELL and BENNINK 1999; REITS *et al.* 2003). Yewdell *et al.* kalkulierte, dass 1 von 2000 Epitopen eine messbare CTL-Antwort hervorruft (YEWDELL and BENNINK 1999): neben einer ausreichenden Affinität für einen stabilen Peptid-MHC-Komplex müssen die Peptide zunächst im Proteasom abgebaut werden und überdies in die Bindungstasche des T-Zellrezeptors der CD8<sup>+</sup> T-Zellen passen. Die Bindung zwischen MHC-I-Epitop und MHC-Molekül ist somit nur ein Faktor, der die zelluläre Immunantwort beeinflusst (GOLDBERG *et al.* 2002; PELTE *et al.* 2004; ASSARSSON *et al.* 2007; LE GALL *et al.* 2007; LAZARO *et al.* 2011).

Der Einsatz von *in silico* Methoden kann die Immunogenität von Proteinen/Peptiden durch Aminosäureaustausch vermindern (DE GROOT and MARTIN 2009; BRYSON *et al.* 2010; LUNDEGAARD *et al.* 2010). Eine Verifizierung mittels *in vitro* oder *in vivo* Methoden ist unerlässlich (ROIDER *et al.* 2014), verhindert allerdings nicht die Entstehung einer *de novo*

Immunantwort. Eine Transgen-induzierte zelluläre Immunantwort kann auch durch Fusion des Transgens mit der Glycin-Alanin-Wiederholung (GAR) des Proteins EBNA-1 (*Epstein-Barr virus nuclear antigen-1*) vermindert werden (LEVITSKAYA *et al.* 1997; OSSEVOORT *et al.* 2003). GAR verhindert die intrazelluläre Antigenpräsentation durch MHC-I-Moleküle und folglich die CTL-Erkennung (OSSEVOORT *et al.* 2006). Desgleichen kann das zu EBNA-1 homologe LANA-1 (*latency-associated nuclear antigen-1*) des humanen Herpes Virus 8 verwendet werden (ZALDUMBIDE *et al.* 2007).

## 6.2 Verstärkung der antiviralen Aktivität

Im Hinblick auf die immunologischen Eigenschaften weist das optimierte Peptid V2o eine Vielzahl an substituierten Aminosäuren im Vergleich zum Ausgangspeptid C46-EHO auf. Dennoch konnte durch das rationale Design nicht nur die antivirale Wirksamkeit beibehalten, sondern sogar verstärkt werden. V2o verhinderte den Eintritt diverser HIV-1 Vektoren einschließlich T-20- und C46-resistenter Stämme sowie das Affenvirus SIVmac251 im niedrig nanomolaren Konzentrationsbereich. Eine vergleichbare biologische Wirksamkeit wurde für das Ausgangspeptid C46-EHO, allerdings mit einer 2- bis 6-fachen geringeren antiviralen Aktivität, ermittelt. Indes konnte die Infektion von SIVmac251 weder durch T-20 noch durch C46 bei der höchsten getesteten Konzentration von 100nM gehemmt werden. Die effiziente Neutralisation von SIV durch antivirale Fusionsinhibitoren ist eine äußerst vorteilhafte Eigenschaft, da dies präklinische Wirksamkeitsstudien im Tiermodell (z.B. Rhesusaffen) ermöglicht.

V2o neutralisierte die beiden HIV-1 Isolate HXB2 (X4-trop) und Ba-L (R5-trop). Die Neutralisation war unabhängig vom verwendeten Chemokinkorezeptor CXCR4 bzw. CCR5, wobei für die Hemmung von HXB2 eine geringere Peptidkonzentration notwendig war. R5-trope Viren weisen generell eine verminderte Sensitivität gegenüber antiviralen Peptiden auf. Ursächlich hierfür ist die starke Affinität zum CCR5-Rezeptor sowie das höhere Expressionsniveau des CCR5-Rezeptors auf der Zellmembran (DERDEYN *et al.* 2000; DERDEYN *et al.* 2001; REEVES *et al.* 2002; ABRAHAMYAN *et al.* 2005), kann aber auch durch eine niedrigere Stöchiometrie der viralen Glykoproteine bedingt sein (BRANDENBERG *et al.* 2015). Dies resultiert in einer schnelleren Fusionskinetik der R5 Viren im Vergleich zu X4-

tropen Isolaten und bedingt ein kürzeres Zeitfenster, in dem das gp41 Hüllprotein für das antivirale Peptid zugänglich ist (FURUTA *et al.* 1998; MIYAUCHI *et al.* 2009b). Daher sind höhere Peptidkonzentrationen für die Neutralisation der R5-tropen Viren notwendig.

Die Unterschiede in der Primärsequenz und in der Konformation führen beim Peptid V2o vermutlich zu einer höheren Affinität zur NHR und bedingen die bessere antivirale Wirksamkeit insbesondere auch gegen HIV-2/SIV und T-20- und C46-resistenten Viren im Vergleich zu HIV-1-abgeleiteten Peptiden. V2o besteht aus HIV-2 Aminosäuresequenzen, die phylogenetisch sehr eng mit SIV verwandt sind (GAO *et al.* 1992; SHARP *et al.* 1995). Aufgrund der Sequenzhomologien kann V2o die SIV Infektion verhindern (MALASHKEVICH *et al.* 1998). Die Bindung der CHR mit der NHR für die Bildung des gp41 6-Helix-Bündels findet hauptsächlich über hoch-konservierte Aminosäuren statt: Aminosäuren an den Positionen a und d der CHR interagieren mit Aminosäuren an den Positionen e und g der NHR (CHAN *et al.* 1997; MALASHKEVICH *et al.* 1998). V2o ist von der Aminosäuresequenz des hoch-pathogenen Isolates HIV-2 EHO abgeleitet (REY *et al.* 1989; REY-CUILLE *et al.* 1994; GUSTCHINA *et al.* 2005). Die Aminosäuresequenz der CHR ist für die beschleunigte Fusionskinetik hoch-pathogener HI-Viren verantwortlich (SIVARAMAN *et al.* 2009). Gallo und Kollegen bestimmten eine Fusionshalbwertszeit von ca. 25min für HIV-2 Hüllproteine, indes betrug diese für HIV-1 Hüllproteine ca. 60min (GALLO *et al.* 2006). Das Zeitfenster währenddessen die Pre-Hairpin-Struktur für inhibitorischen C-Peptide zugänglich ist, ist demnach bei SIV/HIV-2 wesentlich kürzer als bei HIV-1 (GALLO *et al.* 2004). Die Langlebigkeit der Pre-Hairpin-Struktur beeinflusst die Sensibilität gegenüber dem antiviralen Peptid (MIYAUCHI *et al.* 2009b). Hierdurch ist es äußerst schwierig, bzw. nur mit höheren Konzentrationen möglich, die SIV/HIV-2 Infektion durch HIV-1-abgeleitete C-Peptide zu hemmen. Das auf maC46-exprimierenden PM-1 selektierte C46-resistente Virus wies ebenfalls eine höhere Eintrittsgeschwindigkeit auf (HERMANN 2007; HERMANN *et al.* 2009a). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurden T-20 als auch T-1249-resistente Viren selektiert, die Mutationen im GIV-Motiv aufwiesen, welche eine geringere Bindungsaffinität zum antiviralen Peptid verursachen (RIMSKY *et al.* 1998; WEI *et al.* 2002; MELBY *et al.* 2007; EGGINK *et al.* 2008). Durch die hohe Bindungsaffinität von V2o wurden dagegen auch T-20- und C46-resistente Stämme sowie SIVmac251 im niedrig

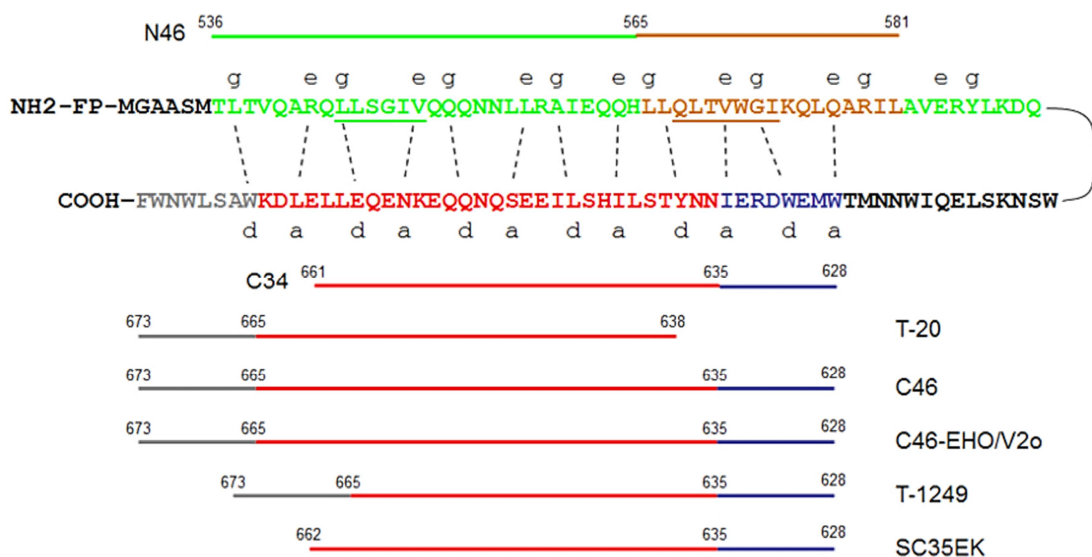
nanomolaren Konzentrationsbereich gehemmt. Gustchina et al. ermittelte für anti-HIV Peptide eine direkte Korrelation zwischen der Wirksamkeit und der  $\alpha$ -helikalen Struktur und zeigte, dass das C34 Peptid des HIV-2 Isolates EHO daher ein äußerst potenter HIV/SIV-Inhibitor war (GUSTCHINA *et al.* 2005). In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass die antivirale Wirksamkeit durch Verbesserung der Helizität verstärkt werden kann (JUDICE *et al.* 1997; JIN *et al.* 2000; OTAKA *et al.* 2002; SIA *et al.* 2002).

Die deutlich verbesserte antivirale Wirksamkeit von V2o könnte aber ebenso durch die Aminosäuresequenz und die Struktur der MPER des HIV-2 Isolates bedingt sein. Die MPER ist essentiell für den Eintritt der HIV-Partikel und die Zell-Zell-Fusion (MUNOZ-BARROSO *et al.* 1999; SALZWEDEL *et al.* 1999). Sowohl HIV-1 als auch HIV-2 weisen die für die Neutralisation wichtige Aminosäuresequenz  $^{671}\text{NWF}^{673}$  im MPER Bereich auf (PEISAJOVICH *et al.* 2003), die allerdings nicht mit der gp41 NHR interagiert (WEXLER-COHEN *et al.* 2006; CHAMPAGNE *et al.* 2009). Über die Struktur des MPER-Bereichs wird noch spekuliert; sie wurde in einigen Studien als  $\alpha$ -Helix (GALLAHER *et al.* 1989; CHAN *et al.* 1997; SCHIBLI *et al.* 2001; BUZON *et al.* 2010; SHI *et al.* 2010; REARDON *et al.* 2014), in anderen wiederum als ausgestreckte  $\beta$ -Schleife beschrieben (OFEK *et al.* 2004). Ebenso ist die genaue Wirkungsweise der MPER unbekannt; sie kann jedoch die Aggregation der gp41 Trimere, die Destabilisierung der Lipidmembran sowie Membranausstülpungen beinhalten (SUAREZ *et al.* 2000; HARRISON 2008; MONTERO *et al.* 2008; VISHWANATHAN and HUNTER 2008). T-1249 und T-20 tauchen in die äußere Schicht der Lipidmembran ein, zudem reichert sich T-1249 in cholesterolreichen Regionen an (VEIGA *et al.* 2004a; VEIGA *et al.* 2004b). Der MPER Bereich im T-20 bildet ein unstrukturiertes Knäuel, jedoch keine alpha-helikale Struktur (QIU *et al.* 2012). Im Gegensatz zu T-20 bildet T-1249 Wasserstoffbrückenbindungen mit der Lipidmembran aus, die eine stärkere Adsorption mit der Membran bedingt (MARTINS DO CANTO *et al.* 2012).

Bislang wurde angenommen, dass C-Peptide in dominant negativer Weise gp41 NHR binden, die Ausbildung des 6-Helix-Bündels und folglich die Membranfusion blockieren (CHAN and KIM 1998; KILBY *et al.* 1998; KILBY and ERON 2003; MOORE and DOMS 2003). Allerdings bestehen erhebliche Unterschiede im Wirkmechanismus der Peptide (TRIVEDI *et al.* 2003; CHANG and HSU 2007; LIU *et al.* 2007; QI *et al.* 2008; SHI *et al.* 2008). Eine

detaillierte Untersuchung ergab, dass die gp41 CHR aus drei Bereichen besteht, die unterschiedliche Funktionen haben und zugleich den Wirkmechanismus der antiviralen Peptide bestimmen (LIU *et al.* 2007; HE *et al.* 2008) (Abbildung 6.2.1):

- (i) Die Taschen-bindende Domäne (PBD, *pocket-binding domain*) bindet die Taschen-formende Domäne für die Bildung der fusionsaktiven Struktur (CHAN *et al.* 1997; WEISSENHORN *et al.* 1997; CHAN *et al.* 1998).
- (ii) Während der Fusion interagiert die CHR mit der NHR (NBD, *NHR-binding domain*) und es entsteht eine Haarnadelstruktur (*hairpin*).
- (iii) Die Lipid-bindende Domäne (LBD, *lipid-binding domain*) umfasst einen Teil der MPER, die einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren enthält und essentiell für den Eintritt der HIV-Partikel und die Zell-Zell-Fusion ist (MUNOZ-BARROSO *et al.* 1999; SALZWEDEL *et al.* 1999).



**Abbildung 6.2.1 Funktionelle Domänen des Hüllproteins gp41 und der inhibitorischen Peptide.**

Die gp41 C-Heptadwiederholung (CHR) besteht aus drei Bereichen: N46-bindende Domäne (NBD, AS 636-665, rot), Taschen-bindende Domäne (PBD, AS 628-635, blau) und Lipid-bindende Domäne (LBD, AS 666-673, grau). Während des Fusionsprozesses interagiert die CHR mit der NHR (AS 536-581, grün und braun). Insbesondere die Interaktion der PBD mit der Taschen-formenden Domäne der NHR (PFD, AS 565-581, braun) ist essentiell für die Stabilisierung des 6-HBs. Die gestrichelten Linien zwischen NHR und CHR zeigen die interagierenden Aminosäuren im 6-HB. Die Aminosäuren an der Position e und g der NHR binden die a und d Reste der CHR. Die antiviralen Peptide mit den diversen funktionellen Bereichen sind unterhalb dargestellt. Adaptiert nach (HE *et al.* 2008).

Der trifunktionelle Aufbau bestehend aus PBD-NBD-LBD von V2o ist vermutlich für die äußerst potente Wirksamkeit verantwortlich und minimiert zugleich das Risiko der Entstehung V2o-resistenter HI-Viren. Peptide ohne PBD/LBD weisen eine moderate antivirale Wirksamkeit im mikromolaren Konzentrationsbereich auf (WILD *et al.* 1994; LIU *et al.* 2007; QI *et al.* 2008; SHI *et al.* 2008). Die NBD dient vermutlich als strukturelle Domäne, um Länge und Konformation für die Interaktion der LBD und PBD mit ihren Zielstrukturen bereitzustellen (SHI *et al.* 2008). Peptide mit zwei funktionellen Domänen weisen eine verbesserte Aktivität auf (z.B. C34 (PBD-NBD) oder T-20 (NBD-LBD)) (QI *et al.* 2008). T-20 bindet die NHR und interagiert mittels LBD mit der Lipidmembran, wohingegen C34 mittels PBD ein stabiles 6-HB generiert und die Bildung der Fusionspore verhindert (KLIGER *et al.* 2001; CHANG and HSU 2007; LIU *et al.* 2007). Die Aminosäurereste Trp<sup>628</sup>, Trp<sup>631</sup> und Ile<sup>635</sup> der PBD sind äußerst wichtig für die Stabilisierung des 6-HBs und formieren eine hydrophobe Tasche (CHAN *et al.* 1997; WEISSENHORN *et al.* 1997; CHAN *et al.* 1998). T-20 und C34 wirken synergistisch aufgrund unterschiedlicher Zielstrukturen (LIU *et al.* 2005; LIU *et al.* 2007; LU *et al.* 2012). T-1249 enthält zwar alle drei funktionellen Bereiche, indes fehlen sieben Aminosäuren in der NBD (Abbildung 6.2.1). Daher ist es möglicherweise zu kurz, um zugleich mit der hydrophoben Tasche der NHR und der Lipidmembran zu interagieren (QI *et al.* 2008). Das C-Peptid C46 hatte vermutlich trotz trifunktionellem Aufbau aufgrund der Konformation eine geringere Wirksamkeit als V2o. Die Kombination der drei Domänen PBD-NBD-LBD mit der starken  $\alpha$ -helikalen Konformation bedingt höchstwahrscheinlich die potente antivirale Wirksamkeit von V2o. Entweder ist die Änderung der Aminosäuresequenz im Bereich 636-643, der HIV-2 EHO-abgeleitete MPER-Bereich oder die Kombination beider Änderungen für die deutlich bessere antivirale Aktivität von V2o verantwortlich. Zudem ist zu erwarten, dass die Wahrscheinlichkeit für die Generierung resistenter HI-Viren gering ist. Resistente HI-Viren gegen T2635, ein peptidischer HIV Inhibitor der dritten Generation mit verbesserter Stabilität und Helizität, sind deutlich schwieriger zu selektieren und bedingen Mutationen sowohl im gp41 als auch im gp120 (EGGINK *et al.* 2009; EGGINK *et al.* 2011).

Die Wirksamkeit von V2o kann möglicherweise durch z.B. N-terminale Verlängerung mit den beiden Aminosäuren <sup>626</sup>MT<sup>627</sup> gesteigert werden, da Peptide hierdurch zu äußerst



effektiven Inhibitoren werden (CHONG *et al.* 2012; CHONG *et al.* 2014a; CHONG *et al.* 2014b). Ferner könnte V2o entweder als membran-exprimiertes oder sezerniertes Peptid in einen lentiviralen Vektor eingebaut werden, um bifunktionell mit einem Inhibitor der CCR5-Expression zu wirken (BURKE *et al.* 2014).

### 6.3 Verminderung der humoralen Antigenität/Immunogenität

60% der therapierten sowie 90% der unbehandelten HIV-1 Patienten wiesen prä-existierende anti-maC46 Antikörper im Serum auf, die mehrheitlich den C-terminal lokalisierten MPER Bereich erkannten. Hingegen wurde das HIV-2-abgeleitete Peptid C46-EHO lediglich durch <12% der HIV-1 Patientenseren detektiert, wobei auch hier der C-terminal angehängte MPER-Bereich <sup>662</sup>ELDKWASLWNWF<sup>673</sup> ursächlich für die Interaktion war. Allerdings fehlten im C46-EHO die Aminosäuren <sup>659</sup>ELL<sup>661</sup>, welche Bestandteil des Kernepitops der Patientenantikörper im C46 Peptid waren und daher vermutlich zu der verminderten Bindung führten. Ebenso kann aufgrund der starken Helizität von C34-EHO (GUSTCHINA *et al.* 2005) im MPER Bereich eine differente Konformation induziert werden, wodurch die ursprünglichen Antikörperepitope unzugänglich sind.

In den meisten HIV-1 Patienten werden im Laufe der HIV Infektion Antikörper gegen diverse Bereiche des gp41 entwickelt (HORAL *et al.* 1991; BINLEY *et al.* 1996; CALAROTA *et al.* 1996; WALMSLEY *et al.* 2003; OPALKA *et al.* 2004; HUANG *et al.* 2012), wobei auch die initiale humorale Immunantwort gegen gp41 gerichtet ist (ALAM *et al.* 2008; TOMARAS *et al.* 2008). Insbesondere die Region der CHR/MPER stimuliert in HIV-1 Patienten die humorale Immunantwort (MONTERO *et al.* 2008).

Im Rahmen der Peptiddeimmunisierung wurden unter anderem die Aminosäuren an den Positionen 662 und 669 (<sup>661</sup>QELDKWASL<sup>669</sup>) mutiert. Die Peptidvariante V2 wies im Vergleich zu V1, V3 und V4 die geringste Antigenität im Dot Blot auf. Einerseits war die Seroreaktivität anti-C46-EHO Antikörper-positiver Seren vermindert. Andererseits war die Antigenität von anti-C46-EHO Antikörper-negativen Seren nur minimal höher verglichen zu C46-EHO. Durch zwei Mutationen in der C46-EHO Aminosäuresequenz wurde die Antikörperreaktivität der Patientenseren moduliert. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch elektrostatische Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van

der Waals Kräfte, Salzbrücken, Komplementarität der Oberflächen, etc. stabilisiert (COLMAN 1988; GETZOFF *et al.* 1988). Allerdings trägt nur eine geringe Anzahl von zentral im Epitop gelegener Aminosäuren aktiv zur Bindungsenergie bei (NOVOTNY *et al.* 1989; BOGAN and THORN 1998). Die Substitution solch energetisch kritischer Aminosäuren moduliert Antigenität und Immunogenität (ALEXANDER *et al.* 1992).

Durch den Austausch des HIV-1 MPER Epitops gegen das entsprechende HIV-2 EHO Epitop wurde das Peptid V2o durch keines der getesteten HIV-1 Seren mehr gebunden. Interessanterweise erkannten 80% der HIV-2 Patientenseren das C46-EHO Peptid, obwohl der in HIV-1 Patienten äußerst immunogene MPER Bereich nicht enthalten ist. Dies ist in Übereinstimmung mit den Resultaten von Norrby *et al.*, welcher eine HIV-2 Seroreaktivität von 92,5% gegen das MPER-vorgelagerte Peptid <sup>634</sup>EQAQIQQEKNMYELQK<sup>649</sup> ermittelte (NORRBY *et al.* 1991). Hingegen wurde gegen das MPER-Peptid <sup>644</sup>MYELQKLNSWDVFGN<sup>658</sup> eine HIV-2 Seroreaktivität von 93% detektiert (SKOTT *et al.* 1999). Durch den Austausch der HIV-1 MPER gegen die HIV-2 EHO MPER wurde das optimierte Peptid V2o zu 100% von HIV-2 Patientenseren gebunden, jedoch nicht mehr durch die HIV-1 Patientenseren (0%). Auch ergab die Analyse von neun Seren SIV-infizierter Rhesus Makaken, dass 78% Antikörper gegen C46-EHO sowie 89% Antikörper gegen V2o aufwiesen (in Kooperation mit Roland Zahn, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, Anhang 9.2). Durch Austausch des hoch-immunogenen MPER Bereichs wurde die Antigenität des V2o Peptids in HIV-1 Patientenseren, nicht jedoch in HIV-2 oder SIV-infizierter Rhesus Makaken, vermindert. In wie weit der HIV-2 MPER Bereich in HIV-1 Patienten immunogen ist, kann nur in weiteren Studien beurteilt werden., obgleich eine Immunantwort gegen die HIV-2 MPER in Ratten induziert werden konnte (BEHRENDT *et al.* 2012).

Durch einfache Aminosäuresubstitution können, wie in dieser Arbeit gezeigt, potente B-Zell-Epitope zerstört werden. Das die Mutation der B-Zell-Epitope in therapeutisch angewandten Peptiden/Proteinen die humorale Immunantwort minimiert, wurde beispielhaft für den Gerinnungsfaktor VIII gezeigt: der Austausch von Aminosäuren in den B-Zell-Epitopen reduzierte die Immunogenität (BARROW *et al.* 2000; PARKER *et al.* 2004). Ebenso führte die gerichtete Aminosäuresubstitution im bakteriellen Streptavidin (MEYER

*et al.* 2001), bei der Humanisierung monoklonaler muriner sowie chimärer Antikörper (YANG *et al.* 2001; TSURUSHITA *et al.* 2005; HARDING *et al.* 2010), dem Immunotoxin (ONDA *et al.* 2008), der Staphylokinase (LAROCHE *et al.* 2000; WARMERDAM *et al.* 2002), der antileukämischen L-Asparaginase (RAMYA and PULICHERLA 2015) sowie bei Erythropoetin (TANGRI *et al.* 2005) zu einer verminderten humoralen Immunantwort.

Die Mutation von Antikörperepitopen für die Deimmunisierung von Proteinen ist prinzipiell anwendbar (NAGATA and PASTAN 2009; MOISE *et al.* 2012). Allerdings wird die Bildung neuer Peptid-spezifischer Antikörper nicht verhindert. Es wird angenommen, dass das Repertoire der Antikörper eines Menschen einen Bereich von  $10^{10}$  bis  $10^{11}$  umfasst (FANNING *et al.* 1996; JANEWAY *et al.* 2002; GLANVILLE *et al.* 2009). Dies macht es unmöglich alle potentiellen Antikörperepitope zu mutieren ohne neue Epitope zu generieren.

Die Entfernung der MHC-II-Epitope ist eine alternative Strategie, da MHC-II-Moleküle aus nur wenigen tausend Allelen bestehen (ROBINSON *et al.* 2011). Die Präsentation internalisierter, prozessierter Peptide im Komplex mit MHC-II-Molekülen auf der APC Oberfläche induziert die Aktivierung der CD4+ T-Helferzellen und nachfolgend die Antikörperproduktion durch aktivierte B-Zellen (JANEWAY *et al.* 2002; TROMBETTA and MELLMAN 2005). Die Entwicklung der Antikörperantwort korreliert dabei direkt mit der Stärke der CD4+ T-Zellantwort (BAKER and JONES 2007). Durch Mutation der für die Bindung mit dem MHC-II-Molekül wichtigen Aminosäuren, kann somit ebenfalls das immunogene Epitop zerstört werden (YEUNG *et al.* 2004).

Für die Vorhersage der Bindungswahrscheinlichkeit eines Peptides mit einem MHC-II-Molekül stehen diverse Algorithmen zur Verfügung (NIELSEN *et al.* 2010), wie z.B. ProPred (SINGH and RAGHAVA 2001), SMM-align (NIELSEN *et al.* 2007) oder EpiSweep (PARKER *et al.* 2013). Die meisten Algorithmen beruhen auf der Vorhersage der Peptid-MHC-Bindungsaffinität (NIELSEN *et al.* 2010). *In silico* Vorhersagen wurden bereits für die Deimmunisierung von Proteinen eingesetzt (TANGRI *et al.* 2005; CANTOR *et al.* 2011; OSIPOVITCH *et al.* 2012; SALVAT *et al.* 2015). Qualitative hochwertige Vorhersagen für MHC-II-Epitope sind im Vergleich zu MHC-I-Epitopvorhersagen schwieriger zu treffen. Von der MHC-II-Bindungstasche werden neun Aminosäuren direkt in der Bindungsgrube des MHC-II-Moleküls gebunden, wohingegen die restlichen Aminosäuren des insgesamt 12-25

Aminosäuren langen Peptids beidseitig aus der Tasche herausragen (JANEWAY *et al.* 2002). Aufgrund dieser stark variablen Peptidlänge durch die flankierenden Aminosäuren ist es deutlich schwieriger zuverlässige Vorhersagen zu treffen verglichen zu MHC-I-Molekülen mit einer an beiden Enden geschlossenen Bindungstasche für Peptide mit 8-11 Aminosäuren (GODKIN *et al.* 2001; EL-MANZALAWY *et al.* 2008; GOWTHAMAN and AGREWALA 2008; WANG *et al.* 2008; DORMER *et al.* 2009; NIELSEN *et al.* 2010). *In silico* identifizierte MHC-II-Epitope induzierte nur in 37% der Patienten eine Antikörperantwort (KOREN *et al.* 2007). Zusätzlich zu *in silico* Methoden können experimentelle *in vitro/in vivo* Methoden verwendet werden, die jedoch zeitintensiv und teuer sind. *In silico* aber auch *in vitro* Methoden überschätzen die Anzahl MHC-bindender Peptide, die *in vivo* eine T-Zell-Antwort stimulieren (PERRY *et al.* 2008; BRINKS *et al.* 2013). Dies ist bedingt durch die einseitige Analyse und die fehlende Betrachtung von z.B. der Peptid/Protein Prozessierung oder der Bindung durch den TZR der CD4+ T-Helferzellen. *In silico* Methoden können verwendet werden, um die Anzahl potentieller Epitope einzugrenzen, sollten aber durch experimentelle Methoden verifiziert werden.

Des Weiteren kann durch eine gewebspezifische Expression therapeutischer Gene die humorale Immunantwort nahezu vollständig vermieden werden. Follenzi *et al.* beobachtete in verschiedenen Mausstämmen eine adaptive zelluläre und humorale Immunantwort nach systemischer Injektion von lentiviraler cDNA zur Sekretion des Gerinnungsfaktors IX unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promotors (Follenzi *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde bei Verwendung eines hepatozyten-spezifischen Promotors die Langzeitexpression des Gerinnungsfaktors IX erreicht und zugleich nur eine geringe Antikörperbildung detektiert.

## 7 LITERATUR

- 2008 Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, pp. European Medicines Agency.
- 2014 Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, pp. in *Guidance for Industry*. Food and Drug Administration, US.
- Aasa-Chapman, M. M., A. Hayman, P. Newton, D. Cornforth, I. Williams *et al.*, 2004 Development of the antibody response in acute HIV-1 infection. *Aids* 18: 371-381.
- Abrahamyan, L. G., S. R. Mkrтчyan, J. Binley, M. Lu, G. B. Melikyan *et al.*, 2005 The cytoplasmic tail slows the folding of human immunodeficiency virus type 1 Env from a late prebundle configuration into the six-helix bundle. *J Virol* 79: 106-115.
- Addo, M. M., X. G. Yu, A. Rathod, D. Cohen, R. L. Eldridge *et al.*, 2003 Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol* 77: 2081-2092.
- Ahrens, V. M., K. Bellmann-Sickert and A. G. Beck-Sickinger, 2012 Peptides and peptide conjugates: therapeutics on the upward path. *Future Med Chem* 4: 1567-1586.
- Al-Dakkak, I., S. Patel, E. McCann, A. Gadkari, G. Prajapati *et al.*, 2013 The impact of specific HIV treatment-related adverse events on adherence to antiretroviral therapy: a systematic review and meta-analysis. *AIDS Care* 25: 400-414.
- Alam, S. M., R. M. Searce, R. J. Parks, K. Plonk, S. G. Plonk *et al.*, 2008 Human immunodeficiency virus type 1 gp41 antibodies that mask membrane proximal region epitopes: antibody binding kinetics, induction, and potential for regulation in acute infection. *J Virol* 82: 115-125.
- Albericio, F., and H. G. Kruger, 2012 Therapeutic peptides. *Future Med Chem* 4: 1527-1531.
- Alexander, H., S. Alexander, E. D. Getzoff, J. A. Tainer, H. M. Geysen *et al.*, 1992 Altering the antigenicity of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3352-3356.
- Alimonti, J. B., T. B. Ball and K. R. Fowke, 2003 Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* 84: 1649-1661.
- Altfeld, M., M. M. Addo, R. L. Eldridge, X. G. Yu, S. Thomas *et al.*, 2001a Vpr is preferentially targeted by CTL during HIV-1 infection. *J Immunol* 167: 2743-2752.
- Altfeld, M., T. M. Allen, E. T. Kalife, N. Frahm, M. M. Addo *et al.*, 2005 The majority of currently circulating human immunodeficiency virus type 1 clade B viruses fail to prime cytotoxic T-lymphocyte responses against an otherwise immunodominant HLA-A2-restricted epitope: implications for vaccine design. *J Virol* 79: 5000-5005.
- Altfeld, M., E. T. Kalife, Y. Qi, H. Streeck, M. Lichterfeld *et al.*, 2006 HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med* 3: e403.
- Altfeld, M., E. S. Rosenberg, R. Shankarappa, J. S. Mukherjee, F. M. Hecht *et al.*, 2001b Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 193: 169-180.
- Anthony, D. D., and P. V. Lehmann, 2003 T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. *Methods* 29: 260-269.
- Anthony L DeFranco, Richard M Locksley and M. Robertson, 2008 *Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease* New science Press Ltd.
- Appay, V., D. F. Nixon, S. M. Donahoe, G. M. Gillespie, T. Dong *et al.*, 2000 HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 192: 63-75.
- Arstila, T. P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos *et al.*, 1999 A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286: 958-961.
- Assarsson, E., J. Sidney, C. Oseroff, V. Paschetto, H. H. Bui *et al.*, 2007 A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection. *J Immunol* 178: 7890-7901.
- Baker, M. P., and T. D. Jones, 2007 Identification and removal of immunogenicity in therapeutic proteins. *Curr Opin Drug Discov Devel* 10: 219-227.
- Baker, M. P., H. M. Reynolds, B. Lumicisi and C. J. Bryson, 2010 Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself* 1: 314-322.
- Baltimore, D., 1988 Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature* 335: 395-396.

- Barbosa, M. D., J. Vielmetter, S. Chu, D. D. Smith and J. Jacinto, 2006 Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN-beta) immunogenicity. *Clin Immunol* 118: 42-50.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret *et al.*, 1983 Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Barre-Sinoussi, F., U. Mathur-Wagh, F. Rey, F. Brun-Vezinet, S. R. Yancovitz *et al.*, 1985 Isolation of lymphadenopathy-associated virus (LAV) and detection of LAV antibodies from US patients with AIDS. *Jama* 253: 1737-1739.
- Barrow, R. T., J. F. Healey, D. Gailani, D. Scandella and P. Lollar, 2000 Reduction of the antigenicity of factor VIII toward complex inhibitory antibody plasmas using multiply-substituted hybrid human/porcine factor VIII molecules. *Blood* 95: 564-568.
- Behrendt, R., U. Fiebig, R. Kurth and J. Denner, 2012 Induction of Antibodies Binding to the Membrane Proximal External Region of gp36 of HIV-2. *Intervirology*.
- Berson, J. F., D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik *et al.*, 1996 A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 70: 6288-6295.
- Betts, M. R., J. P. Casazza, B. A. Patterson, S. Waldrop, W. Trigona *et al.*, 2000 Putative immunodominant human immunodeficiency virus-specific CD8(+) T-cell responses cannot be predicted by major histocompatibility complex class I haplotype. *J Virol* 74: 9144-9151.
- Beyer, W. R., M. Westphal, W. Ostertag and D. von Laer, 2002 Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. *J Virol* 76: 1488-1495.
- Binley, J. M., H. J. Ditzel, C. F. Barbas, 3rd, N. Sullivan, J. Sodroski *et al.*, 1996 Human antibody responses to HIV type 1 glycoprotein 41 cloned in phage display libraries suggest three major epitopes are recognized and give evidence for conserved antibody motifs in antigen binding. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 911-924.
- Binley, J. M., P. J. Klasse, Y. Cao, I. Jones, M. Markowitz *et al.*, 1997 Differential regulation of the antibody responses to Gag and Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 71: 2799-2809.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger *et al.*, 1987 The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
- Blagdon, D. E., and M. Goodman, 1975 Letter: Mechanisms of protein and polypeptide helix initiation. *Biopolymers* 14: 241-245.
- Boesen, A., K. Sundar and R. Coico, 2005 Lassa fever virus peptides predicted by computational analysis induce epitope-specific cytotoxic-T-lymphocyte responses in HLA-A2.1 transgenic mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 1223-1230.
- Bogan, A. A., and K. S. Thorn, 1998 Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* 280: 1-9.
- Borbulevych, O. Y., T. K. Baxter, Z. Yu, N. P. Restifo and B. M. Baker, 2005 Increased immunogenicity of an anchor-modified tumor-associated antigen is due to the enhanced stability of the peptide/MHC complex: implications for vaccine design. *J Immunol* 174: 4812-4820.
- Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw and M. B. Oldstone, 1994 Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68: 6103-6110.
- Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Peffer *et al.*, 1997 Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 3: 205-211.
- Bouvier, M., H. C. Guo, K. J. Smith and D. C. Wiley, 1998 Crystal structures of HLA-A\*0201 complexed with antigenic peptides with either the amino- or carboxyl-terminal group substituted by a methyl group. *Proteins* 33: 97-106.
- Bouvier, M., and D. C. Wiley, 1994 Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* 265: 398-402.
- Boyum, A., 1984 Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Methods Enzymol* 108: 88-102.
- Brandenberg, O. F., C. Magnus, P. Rusert, R. R. Regoes and A. Trkola, 2015 Different infectivity of HIV-1 strains is linked to number of envelope trimers required for entry. *PLoS Pathog* 11: e1004595.
- Brauer, F., 2005 Analyse der humoralen Immunantwort gegen ein antivirales Transgen-Produkt im Rahmen einer Phase-I-Gentherapiestudie der HIV-Infektion, pp. 100 in *Fachbereich 1*. Fachhochschule Bingen, Bingen.
- Braun, A., L. Kwee, M. A. Labow and J. Alsenz, 1997 Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. *Pharm Res* 14: 1472-1478.

- Brinks, V., W. Jiskoot and H. Schellekens, 2011 Immunogenicity of therapeutic proteins: the use of animal models. *Pharm Res* 28: 2379-2385.
- Brinks, V., D. Weinbuch, M. Baker, Y. Dean, P. Stas *et al.*, 2013 Preclinical models used for immunogenicity prediction of therapeutic proteins. *Pharm Res* 30: 1719-1728.
- Brockstedt, D. G., G. M. Podsakoff, L. Fong, G. Kurtzman, W. Mueller-Ruchholtz *et al.*, 1999 Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* 92: 67-75.
- Bromberg, J. S., L. A. Debruyne and L. Qin, 1998 Interactions between the immune system and gene therapy vectors: bidirectional regulation of response and expression. *Adv Immunol* 69: 353-409.
- Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus and J. M. Bishop, 1989 Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2525-2529.
- Brusic, V., V. B. Bajic and N. Petrovsky, 2004 Computational methods for prediction of T-cell epitopes--a framework for modelling, testing, and applications. *Methods* 34: 436-443.
- Bryson, C. J., T. D. Jones and M. P. Baker, 2010 Prediction of immunogenicity of therapeutic proteins: validity of computational tools. *BioDrugs* 24: 1-8.
- Bukrinskaya, A. G., 2004 HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol* 149: 1067-1082.
- Burke, B. P., M. P. Boyd, H. Impey, L. R. Breton, J. S. Bartlett *et al.*, 2014 CCR5 as a natural and modulated target for inhibition of HIV. *Viruses* 6: 54-68.
- Busch, D. H., and E. G. Pamer, 1998 MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol* 160: 4441-4448.
- Buzon, M. J., H. Sun, C. Li, A. Shaw, K. Seiss *et al.*, 2014 HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat Med* 20: 139-142.
- Buzon, V., G. Natrajan, D. Schibli, F. Campelo, M. M. Kozlov *et al.*, 2010 Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog* 6: e1000880.
- Caffrey, M., M. Cai, J. Kaufman, S. J. Stahl, P. T. Wingfield *et al.*, 1998 Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J* 17: 4572-4584.
- Calarota, S., M. Jansson, M. Levi, K. Broliden, O. Libonatti *et al.*, 1996 Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type 1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 705-713.
- Cantor, J. R., T. H. Yoo, A. Dixit, B. L. Iverson, T. G. Forsthuber *et al.*, 2011 Therapeutic enzyme deimmunization by combinatorial T-cell epitope removal using neutral drift. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 1272-1277.
- Carlson, J. M., and Z. L. Brumme, 2008 HIV evolution in response to HLA-restricted CTL selection pressures: a population-based perspective. *Microbes Infect* 10: 455-461.
- Carrington, M., and S. J. O'Brien, 2003 The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med* 54: 535-551.
- Cavarelli, M., and G. Scarlatti, 2014 HIV-1 infection: the role of the gastrointestinal tract. *Am J Reprod Immunol* 71: 537-542.
- Chabria, S. B., S. Gupta and M. J. Kozal, 2014 Deep sequencing of HIV: clinical and research applications. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 15: 295-325.
- Champagne, K., A. Shishido and M. J. Root, 2009 Interactions of HIV-1 Inhibitory Peptide T20 with the gp41 N-HR Coiled Coil. *J Biol Chem* 284: 3619-3627.
- Chan, D. C., C. T. Chutkowski and P. S. Kim, 1998 Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15613-15617.
- Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger and P. S. Kim, 1997 Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89: 263-273.
- Chan, D. C., and P. S. Kim, 1998 HIV entry and its inhibition. *Cell* 93: 681-684.
- Chang, D. K., and C. S. Hsu, 2007 Biophysical evidence of two docking sites of the carboxyl heptad repeat region within the amino heptad repeat region of gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res* 74: 51-58.
- Chapman, A. P., 2002 PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 531-545.
- Chen, J., Q. Wu, P. Yang, H. C. Hsu and J. D. Mountz, 2006 Determination of specific CD4 and CD8 T cell epitopes after AAV2- and AAV8-hFIX gene therapy. *Mol Ther* 13: 260-269.

- Chen, W., S. Khilko, J. Fecondo, D. H. Margulies and J. McCluskey, 1994 Determinant selection of major histocompatibility complex class I-restricted antigenic peptides is explained by class I-peptide affinity and is strongly influenced by nondominant anchor residues. *J Exp Med* 180: 1471-1483.
- Chen, Z. W., A. Craiu, L. Shen, M. J. Kuroda, U. C. Iroku *et al.*, 2000 Simian immunodeficiency virus evades a dominant epitope-specific cytotoxic T lymphocyte response through a mutation resulting in the accelerated dissociation of viral peptide and MHC class I. *J Immunol* 164: 6474-6479.
- Chertova, E., J. W. Bess, Jr., B. J. Crise, I. R. Sowder, T. M. Schaden *et al.*, 2002 Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* 76: 5315-5325.
- Chirmule, N., V. Jawa and B. Meibohm, 2012 Immunogenicity to therapeutic proteins: impact on PK/PD and efficacy. *AAPS J* 14: 296-302.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins *et al.*, 1996 The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85: 1135-1148.
- Chong, H., Z. Qiu, Y. Su, L. Yang and Y. He, 2015 Design of a highly potent HIV-1 fusion inhibitor targeting the gp41 pocket. *AIDS* 29: 13-21.
- Chong, H., Z. Qiu, J. Sun, Y. Qiao, X. Li *et al.*, 2014a Two M-T hook residues greatly improve the antiviral activity and resistance profile of the HIV-1 fusion inhibitor SC29EK. *Retrovirology* 11: 40.
- Chong, H., X. Yao, Z. Qiu, B. Qin, R. Han *et al.*, 2012 Discovery of critical residues for viral entry and inhibition through structural insight of HIV-1 fusion inhibitor CP621-652. *J Biol Chem* 287: 20281-20289.
- Chong, H., X. Yao, Z. Qiu, J. Sun, Y. Qiao *et al.*, 2014b The M-T hook structure increases the potency of HIV-1 fusion inhibitor sifuvirtide and overcomes drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 69: 2759-2769.
- Choo, S. Y., 2007 The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 48: 11-23.
- Chowdhury, A., and G. Silvestri, 2013 Host-pathogen interaction in HIV infection. *Curr Opin Immunol* 25: 463-469.
- Chun, T. W., and A. S. Fauci, 2012 HIV reservoirs: pathogenesis and obstacles to viral eradication and cure. *AIDS* 26: 1261-1268.
- Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican *et al.*, 1997 Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13193-13197.
- Cicala, C., E. Martinelli, J. P. McNally, D. J. Goode, R. Gopaul *et al.*, 2009 The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20877-20882.
- Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey *et al.*, 1986 Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346.
- Cleland, J. L., M. F. Powell and S. J. Shire, 1993 The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10: 307-377.
- Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan *et al.*, 1986 What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10.
- Colman, P. M., 1988 Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition. *Adv Immunol* 43: 99-132.
- Costiniuk, C. T., and J. B. Angel, 2012 Human immunodeficiency virus and the gastrointestinal immune system: does highly active antiretroviral therapy restore gut immunity? *Mucosal Immunol* 5: 596-604.
- Cubas, R. A., J. C. Mudd, A. L. Savoye, M. Perreau, J. van Grevenynghe *et al.*, 2013 Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nat Med* 19: 494-499.
- Currier, J. R., E. G. Kuta, E. Turk, L. B. Earhart, L. Loomis-Price *et al.*, 2002 A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 260: 157-172.
- Dai, C., B. Wang and H. Zhao, 2005 Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces* 41: 117-120.
- Dai, Y., E. M. Schwarz, D. Gu, W. W. Zhang, N. Sarvetnick *et al.*, 1995 Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1401-1405.
- Dalglish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves *et al.*, 1984 The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767.
- Dalod, M., M. Dupuis, J. C. Deschemin, C. Goujard, C. Deveau *et al.*, 1999 Weak anti-HIV CD8(+) T-cell effector activity in HIV primary infection. *J Clin Invest* 104: 1431-1439.



- De Clercq, E., 2002 New anti-HIV agents and targets. *Med Res Rev* 22: 531-565.
- De Groot, A. S., P. M. Knopp and W. Martin, 2005 De-immunization of therapeutic proteins by T-cell epitope modification. *Dev Biol (Basel)* 122: 171-194.
- De Groot, A. S., and W. Martin, 2009 Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clin Immunol* 131: 189-201.
- De Groot, A. S., J. McMurry and L. Moise, 2008 Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates. *Curr Opin Pharmacol* 8: 620-626.
- De Groot, A. S., and D. W. Scott, 2007 Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol* 28: 482-490.
- Deeks, S. G., 2011 HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* 62: 141-155.
- Deeks, S. G., S. R. Lewin and D. V. Havlir, 2013 The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet* 382: 1525-1533.
- Deeks, S. G., and B. D. Walker, 2007 Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27: 406-416.
- Demaison, C., K. Parsley, G. Brouns, M. Scherr, K. Battmer *et al.*, 2002 High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13: 803-813.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz *et al.*, 1996 Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
- Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, X. Wu, W. A. O'Brien *et al.*, 2000 Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol* 74: 8358-8367.
- Derdeyn, C. A., J. M. Decker, J. N. Sfakianos, Z. Zhang, W. A. O'Brien *et al.*, 2001 Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *J Virol* 75: 8605-8614.
- Dervillez, X., A. Huther, J. Schuhmacher, C. Griesinger, J. H. Cohen *et al.*, 2006 Stable expression of soluble therapeutic peptides in eukaryotic cells by multimerisation: application to the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46. *ChemMedChem* 1: 330-339.
- Didigu, C., and R. Doms, 2014 Gene therapy targeting HIV entry. *Viruses* 6: 1395-1409.
- Dietrich, U., R. Durr and J. Koch, 2013 Peptides as drugs: from screening to application. *Curr Pharm Biotechnol* 14: 501-512.
- Doitsh, G., N. L. Galloway, X. Geng, Z. Yang, K. M. Monroe *et al.*, 2014 Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505: 509-514.
- Doms, R. W., and D. Trono, 2000 The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* 14: 2677-2688.
- Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson *et al.*, 1996 A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158.
- Dormer, A., C. V. Pauleus, M. N. Syverin, C. Dacil and P. G. Smile, 2009 Challenges in the use of in silico tools for predicting peptides binding to HLA-class II molecules of HCV E1, E2, and P7. *In Silico Biol* 9: 391-406.
- Dorr, P., M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine *et al.*, 2005 Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4721-4732.
- Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill *et al.*, 2002 HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417: 95-98.
- Douek, D. C., M. Roederer and R. A. Koup, 2009 Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 60: 471-484.
- Draenert, R., C. L. Verrill, Y. Tang, T. M. Allen, A. G. Wurcel *et al.*, 2004 Persistent recognition of autologous virus by high-avidity CD8 T cells in chronic, progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 78: 630-641.
- Dwyer, J. J., K. L. Wilson, D. K. Davison, S. A. Freel, J. E. Seedorff *et al.*, 2007 Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12772-12777.
- Eckert, D. M., and P. S. Kim, 2001 Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70: 777-810.

- Egelhofer, M., G. Brandenburg, H. Martinius, P. Schult-Dietrich, G. Melikyan *et al.*, 2004 Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J Virol* 78: 568-575.
- Egerer, L., 2009 Sezernierte antivirale Eintrittsinhibitoren (iSAVE) zur Gentherapie der HIV-Infektion, pp. 153 in *Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie*. Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Egerer, L., A. Volk, J. Kahle, J. Kimpel, F. Brauer *et al.*, 2011 Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. *Mol Ther* 19: 1236-1244.
- Egerer, L., and L. D. P. D. Von, 2009 Secretable HIV entry inhibitory peptides for therapy of HIV infection, pp.
- Eggink, D., C. E. Baldwin, Y. Deng, J. P. Langedijk, M. Lu *et al.*, 2008 Selection of T1249-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. *J Virol* 82: 6678-6688.
- Eggink, D., I. Bontjer, J. P. Langedijk, B. Berkhout and R. W. Sanders, 2011 Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to a third-generation fusion inhibitor requires multiple mutations in gp41 and is accompanied by a dramatic loss of gp41 function. *J Virol* 85: 10785-10797.
- Eggink, D., J. P. Langedijk, A. M. Bonvin, Y. Deng, M. Lu *et al.*, 2009 Detailed mechanistic insights into HIV-1 sensitivity to three generations of fusion inhibitors. *J Biol Chem* 284: 26941-26950.
- El-Manzalawy, Y., D. Dobbs and V. Honavar, 2008 On evaluating MHC-II binding peptide prediction methods. *PLoS One* 3: e3268.
- Eron, J. J., R. M. Gulick, J. A. Bartlett, T. Merigan, R. Arduino *et al.*, 2004 Short-term safety and antiretroviral activity of T-1249, a second-generation fusion inhibitor of HIV. *J Infect Dis* 189: 1075-1083.
- Este, J. A., 2003 Virus entry as a target for anti-HIV intervention. *Curr Med Chem* 10: 1617-1632.
- Este, J. A., and A. Telenti, 2007 HIV entry inhibitors. *Lancet* 370: 81-88.
- Evan, G. I., G. K. Lewis, G. Ramsay and J. M. Bishop, 1985 Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5: 3610-3616.
- Fakharzadeh, S. S., and H. H. Kazazian, Jr., 2000 Correlation between factor VIII genotype and inhibitor development in hemophilia A. *Semin Thromb Hemost* 26: 167-171.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung and H. G. Rammensee, 1991 Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290-296.
- Fanning, L. J., A. M. Connor and G. E. Wu, 1996 Development of the immunoglobulin repertoire. *Clin Immunol Immunopathol* 79: 1-14.
- Fehse, B., O. S. Kustikova, M. Bubenheim and C. Baum, 2004 Poisson--it's a question of dose. *Gene Ther* 11: 879-881.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger, 1996 HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.
- Ferrand, C., E. Robinet, E. Contassot, J. M. Certoux, A. Lim *et al.*, 2000 Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Hum Gene Ther* 11: 1151-1164.
- Fiebig, E. W., D. J. Wright, B. D. Rawal, P. E. Garrett, R. T. Schumacher *et al.*, 2003 Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids* 17: 1871-1879.
- Fields, P. A., D. W. Kowalczyk, V. R. Arruda, E. Armstrong, M. L. McClelland *et al.*, 2000 Role of vector in activation of T cell subsets in immune responses against the secreted transgene product factor IX. *Mol Ther* 1: 225-235.
- Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick *et al.*, 1999 Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5: 512-517.
- Flieger, D., S. Renoth, I. Beier, T. Sauerbruch and I. Schmidt-Wolf, 2000 Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol* 204: 55-63.
- Frahm, N., B. T. Korber, C. M. Adams, J. J. Szinger, R. Draenert *et al.*, 2004 Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J Virol* 78: 2187-2200.
- Fremont, D. H., M. Matsumura, E. A. Stura, P. A. Peterson and I. A. Wilson, 1992 Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science* 257: 919-927.
- Frost, S. D., T. Wrin, D. M. Smith, S. L. Kosakovsky Pond, Y. Liu *et al.*, 2005 Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18514-18519.

- Fukazawa, Y., H. Park, M. J. Cameron, F. Lefebvre, R. Lum *et al.*, 2012 Lymph node T cell responses predict the efficacy of live attenuated SIV vaccines. *Nat Med* 18: 1673-1681.
- Furuta, R. A., C. T. Wild, Y. Weng and C. D. Weiss, 1998 Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol* 5: 276-279.
- Gagandeep, S., M. Ott, R. P. Sokhi and S. Gupta, 1999 Rapid clearance of syngeneic transplanted hepatocytes following transduction with E-1-deleted adenovirus indicates early host immune responses and offers novel ways for studying viral vector, target cell and host interactions. *Gene Ther* 6: 729-736.
- Galabru, J., M. A. Rey-Cuille and A. G. Hovanessian, 1995 Nucleotide sequence of the HIV-2 EHO genome, a divergent HIV-2 isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 873-874.
- Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn *et al.*, 1979 Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713-733.
- Gallaher, W. R., J. M. Ball, R. F. Garry, M. C. Griffin and R. C. Montelaro, 1989 A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 5: 431-440.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan *et al.*, 1984 Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.
- Gallo, S. A., J. D. Reeves, H. Garg, B. Foley, R. W. Doms *et al.*, 2006 Kinetic studies of HIV-1 and HIV-2 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Retrovirology* 3: 90.
- Gallo, S. A., K. Sackett, S. S. Rawat, Y. Shai and R. Blumenthal, 2004 The stability of the intact envelope glycoproteins is a major determinant of sensitivity of HIV/SIV to peptidic fusion inhibitors. *J Mol Biol* 340: 9-14.
- Gambotto, A., G. Dworacki, V. Cicinnati, T. Kenniston, J. Steitz *et al.*, 2000 Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* 7: 2036-2040.
- Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg *et al.*, 1999 Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 397: 436-441.
- Gao, F., L. Yue, A. T. White, P. G. Pappas, J. Barchue *et al.*, 1992 Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358: 495-499.
- Gao, X., G. W. Nelson, P. Karacki, M. P. Martin, J. Phair *et al.*, 2001 Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* 344: 1668-1675.
- Garg, H., M. Viard, A. Jacobs and R. Blumenthal, 2011 Targeting HIV-1 gp41-induced fusion and pathogenesis for anti-viral therapy. *Curr Top Med Chem* 11: 2947-2958.
- Getzoff, E. D., J. A. Tainer, R. A. Lerner and H. M. Geysen, 1988 The chemistry and mechanism of antibody binding to protein antigens. *Adv Immunol* 43: 1-98.
- Ghazizadeh, S., R. S. Kalish and L. B. Taichman, 2003 Immune-mediated loss of transgene expression in skin: implications for cutaneous gene therapy. *Mol Ther* 7: 296-303.
- Glanville, J., W. Zhai, J. Berka, D. Telman, G. Huerta *et al.*, 2009 Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20216-20221.
- Godkin, A. J., K. J. Smith, A. Willis, M. V. Tejada-Simon, J. Zhang *et al.*, 2001 Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J Immunol* 166: 6720-6727.
- Goldberg, A. L., P. Cascio, T. Saric and K. L. Rock, 2002 The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39: 147-164.
- Gomez-Nunez, M., J. Pinilla-Ibarz, T. Dao, R. J. May, M. Pao *et al.*, 2006 Peptide binding motif predictive algorithms correspond with experimental binding of leukemia vaccine candidate peptides to HLA-A\*0201 molecules. *Leuk Res* 30: 1293-1298.
- Goulder, P. J., R. E. Phillips, R. A. Colbert, S. McAdam, G. Ogg *et al.*, 1997 Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 3: 212-217.
- Gowthaman, U., and J. N. Agrewala, 2008 In silico tools for predicting peptides binding to HLA-class II molecules: more confusion than conclusion. *J Proteome Res* 7: 154-163.
- Gray, C. M., J. Lawrence, J. M. Schapiro, J. D. Altman, M. A. Winters *et al.*, 1999 Frequency of class I HLA-restricted anti-HIV CD8+ T cells in individuals receiving highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Immunol* 162: 1780-1788.
- Greenberg, M. L., and N. Cammack, 2004 Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 54: 333-340.

- Gribben, J. G., S. Devereux, N. S. Thomas, M. Keim, H. M. Jones *et al.*, 1990 Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet* 335: 434-437.
- Guadalupe, M., E. Reay, S. Sankaran, T. Prindiville, J. Flamm *et al.*, 2003 Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 77: 11708-11717.
- Gustchina, E., G. Hummer, C. A. Bewley and G. M. Clore, 2005 Differential inhibition of HIV-1 and SIV envelope-mediated cell fusion by C34 peptides derived from the C-terminal heptad repeat of gp41 from diverse strains of HIV-1, HIV-2, and SIV. *J Med Chem* 48: 3036-3044.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock and P. M. Sharp, 2000 AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287: 607-614.
- Han, W. G., W. W. Unger and M. H. Wauben, 2008 Identification of the immunodominant CTL epitope of EGFP in C57BL/6 mice. *Gene Ther* 15: 700-701.
- Hansen, S. G., J. C. Ford, M. S. Lewis, A. B. Ventura, C. M. Hughes *et al.*, 2011 Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* 473: 523-527.
- Harbury, P. B., P. S. Kim and T. Alber, 1994 Crystal structure of an isoleucine-zipper trimer. *Nature* 371: 80-83.
- Harding, F. A., M. M. Stickler, J. Razo and R. B. DuBridge, 2010 The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs* 2: 256-265.
- Harrison, S. C., 2008 Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 690-698.
- He, Y., Y. Xiao, H. Song, Q. Liang, D. Ju *et al.*, 2008 Design and evaluation of sifuvirtide, a novel HIV-1 fusion inhibitor. *J Biol Chem* 283: 11126-11134.
- Hebert, D. N., S. C. Garman and M. Molinari, 2005 The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol* 15: 364-370.
- Hermann, F. G., 2007 Selektion und Analyse von Fusionsinhibitor-resistenten HIV-1-Varianten pp. 149 in *Fachbereich 15 - Biowissenschaften*. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- Hermann, F. G., L. Egerer, F. Brauer, C. Gerum, H. Schwalbe *et al.*, 2009a Mutations in gp120 contribute to the resistance of human immunodeficiency virus type 1 to membrane-anchored C-peptide maC46. *J Virol* 83: 4844-4853.
- Hermann, F. G., H. Martinus, M. Egelhofer, T. Giroglou, T. Tonn *et al.*, 2009b Protein scaffold and expression level determine antiviral activity of membrane-anchored antiviral peptides. *Hum Gene Ther* 20: 325-336.
- Herr, W., J. Schneider, A. W. Lohse, K. H. Meyer zum Buschenfelde and T. Wolfel, 1996 Detection and quantification of blood-derived CD8+ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J Immunol Methods* 191: 131-142.
- Hoffmann Christian, R. J. K., 2014 HIV 2014/2015, pp., Medizin Fokus Verlag.
- Holländer, G. A., 2006 *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*. Elsevier, München.
- Holt, L. J., A. Basran, K. Jones, J. Chorlton, L. S. Jespers *et al.*, 2008 Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs. *Protein Eng Des Sel* 21: 283-288.
- Hopp, T. P., K. S. Prickett, V. L. Price, R. T. Libby, C. J. March *et al.*, 1988 A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. *Bio/Technology*: 1204 - 1210
- Horal, P., B. Svennerholm, S. Jeansson, L. Rymo, W. W. Hall *et al.*, 1991 Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol* 65: 2718-2723.
- Huang, J., G. Ofek, L. Laub, M. K. Louder, N. A. Doria-Rose *et al.*, 2012 Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature* 491: 406-412.
- Huber, M., and A. Trkola, 2007 Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *J Intern Med* 262: 5-25.
- Hughson, F. M., 1997 Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr Biol* 7: R565-569.
- Hunt, D. F., R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel *et al.*, 1992 Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255: 1261-1263.
- International, H. I. V. C. S., F. Pereyra, X. Jia, P. J. McLaren, A. Telenti *et al.*, 2010 The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330: 1551-1557.
- Ishikawa, F., M. Yasukawa, B. Lyons, S. Yoshida, T. Miyamoto *et al.*, 2005 Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. *Blood* 106: 1565-1573.

- Itescu, S., U. Mathur-Wagh, M. L. Skovron, L. J. Brancato, M. Marmor *et al.*, 1992 HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5: 37-45.
- Ito, M., H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata *et al.*, 2002 NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182.
- Jaber, A., and M. Baker, 2007 Assessment of the immunogenicity of different interferon beta-1a formulations using ex vivo T-cell assays. *J Pharm Biomed Anal* 43: 1256-1261.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik, 2002 *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer and N. D. Clarke, 2002 *Biochemistry*. Michelle Julet.
- Jin, B. S., J. R. Ryu, K. Ahn and Y. G. Yu, 2000 Design of a peptide inhibitor that blocks the cell fusion mediated by glycoprotein 41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1797-1804.
- Jones, K. A., and B. M. Peterlin, 1994 Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* 63: 717-743.
- Jooss, K., and N. Chirmule, 2003 Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther* 10: 955-963.
- Jooss, K., H. C. Ertl and J. M. Wilson, 1998 Cytotoxic T-lymphocyte target proteins and their major histocompatibility complex class I restriction in response to adenovirus vectors delivered to mouse liver. *J Virol* 72: 2945-2954.
- Judice, J. K., J. Y. Tom, W. Huang, T. Wrin, J. Vennari *et al.*, 1997 Inhibition of HIV type 1 infectivity by constrained alpha-helical peptides: implications for the viral fusion mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13426-13430.
- Julg, B., E. S. Moodley, Y. Qi, D. Ramduth, S. Reddy *et al.*, 2011 Possession of HLA class II DRB1\*1303 associates with reduced viral loads in chronic HIV-1 clade C and B infection. *J Infect Dis* 203: 803-809.
- Kafri, T., D. Morgan, T. Krahl, N. Sarvetnick, L. Sherman *et al.*, 1998 Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11377-11382.
- Kalams, S. A., P. J. Goulder, A. K. Shea, N. G. Jones, A. K. Trocha *et al.*, 1999 Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 73: 6721-6728.
- Kaslow, R. A., M. Carrington, R. Apple, L. Park, A. Munoz *et al.*, 1996 Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 2: 405-411.
- Kaslow, R. A., C. Rivers, J. Tang, T. J. Bender, P. A. Goepfert *et al.*, 2001 Polymorphisms in HLA class I genes associated with both favorable prognosis of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection and positive cytotoxic T-lymphocyte responses to ALVAC-HIV recombinant canarypox vaccines. *J Virol* 75: 8681-8689.
- Katlama, C., S. G. Deeks, B. Autran, J. Martinez-Picado, J. van Lunzen *et al.*, 2013 Barriers to a cure for HIV: new ways to target and eradicate HIV-1 reservoirs. *Lancet* 381: 2109-2117.
- Kaufmann, D. E., P. M. Bailey, J. Sidney, B. Wagner, P. J. Norris *et al.*, 2004 Comprehensive analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4 responses reveals marked immunodominance of gag and nef and the presence of broadly recognized peptides. *J Virol* 78: 4463-4477.
- Kesavardhana, S., and R. Varadarajan, 2014 Stabilizing the native trimer of HIV-1 Env by destabilizing the heterodimeric interface of the gp41 postfusion six-helix bundle. *J Virol* 88: 9590-9604.
- Kilby, J. M., and J. J. Eron, 2003 Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N Engl J Med* 348: 2228-2238.
- Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud *et al.*, 1998 Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 4: 1302-1307.
- Kimpel, J., S. E. Braun, G. Qiu, F. E. Wong, M. Conolle *et al.*, 2010 Survival of the fittest: positive selection of CD4+ T cells expressing a membrane-bound fusion inhibitor following HIV-1 infection. *PLoS One* 5: e12357.
- Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard *et al.*, 1984 T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768.
- Klein, J., and A. Sato, 2000 The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 702-709.
- Kliger, Y., S. A. Gallo, S. G. Peisajovich, I. Munoz-Barroso, S. Avkin *et al.*, 2001 Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage. *J Biol Chem* 276: 1391-1397.
- Koren, E., A. S. De Groot, V. Jawa, K. D. Beck, T. Boone *et al.*, 2007 Clinical validation of the "in silico" prediction of immunogenicity of a human recombinant therapeutic protein. *Clin Immunol* 124: 26-32.
- Kosana, R. R., C. Bajji, R. M. Kanumuri, K. Panati, L. N. Mangamoori *et al.*, 2014 Recombinant approach for the production of HIV fusion inhibitor Enfuvirtide using *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 95: 136-142.

- Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod *et al.*, 1994 Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68: 4650-4655.
- Kozal, M. J., 2009 Drug-resistant human immunodeficiency virus. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 1: 69-73.
- Kwong, P. D., J. R. Mascola and G. J. Nabel, 2013 Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat Rev Immunol* 13: 693-701.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski *et al.*, 1998 Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648-659.
- Lalezari, J. P., N. C. Bellos, K. Sathasivam, G. J. Richmond, C. J. Cohen *et al.*, 2005 T-1249 retains potent antiretroviral activity in patients who had experienced virological failure while on an enfuvirtide-containing treatment regimen. *J Infect Dis* 191: 1155-1163.
- Laroche, Y., S. Heymans, S. Capaert, F. De Cock, E. Demarsin *et al.*, 2000 Recombinant staphylokinase variants with reduced antigenicity due to elimination of B-lymphocyte epitopes. *Blood* 96: 1425-1432.
- Larsen, M. V., C. Lundegaard, K. Lamberth, S. Buus, S. Brunak *et al.*, 2005 An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur J Immunol* 35: 2295-2303.
- Lazaro, E., C. Kadie, P. Stamegna, S. C. Zhang, P. Gourdain *et al.*, 2011 Variable HIV peptide stability in human cytosol is critical to epitope presentation and immune escape. *J Clin Invest* 121: 2480-2492.
- Lazzarin, A., B. Clotet, D. Cooper, J. Reynes, K. Arasteh *et al.*, 2003 Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* 348: 2186-2195.
- Le Gall, S., P. Stamegna and B. D. Walker, 2007 Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest* 117: 3563-3575.
- Lee, S., S. A. Miller, D. W. Wright, M. T. Rock and J. E. Crowe, Jr., 2007 Tissue-specific regulation of CD8+ T-lymphocyte immunodominance in respiratory syncytial virus infection. *J Virol* 81: 2349-2358.
- Leitner T, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F *et al.*, 2005 *HIV Sequence Compendium 2005*. Published by Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR 06-0680.
- Leslie, A. J., K. J. Pfafferott, P. Chetty, R. Draenert, M. M. Addo *et al.*, 2004 HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* 10: 282-289.
- Letsch, A., and C. Scheibenbogen, 2003 Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods* 31: 143-149.
- Levitskaya, J., A. Sharipo, A. Leonchiks, A. Ciechanover and M. G. Masucci, 1997 Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12616-12621.
- Lichterfeld, M., X. G. Yu, D. Cohen, M. M. Addo, J. Malenfant *et al.*, 2004 HIV-1 Nef is preferentially recognized by CD8 T cells in primary HIV-1 infection despite a relatively high degree of genetic diversity. *AIDS* 18: 1383-1392.
- Lieberman-Blum, S. S., H. B. Fung and J. C. Bandres, 2008 Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clin Ther* 30: 1228-1250.
- Lipford, G. B., S. Bauer, H. Wagner and K. Heeg, 1995 In vivo CTL induction with point-substituted ovalbumin peptides: immunogenicity correlates with peptide-induced MHC class I stability. *Vaccine* 13: 313-320.
- Liu, J., A. Bartsaghi, M. J. Borgnia, G. Sapiro and S. Subramaniam, 2008 Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455: 109-113.
- Liu, S., W. Jing, B. Cheung, H. Lu, J. Sun *et al.*, 2007 HIV gp41 C-terminal heptad repeat contains multifunctional domains. Relation to mechanisms of action of anti-HIV peptides. *J Biol Chem* 282: 9612-9620.
- Liu, S., H. Lu, J. Niu, Y. Xu, S. Wu *et al.*, 2005 Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem* 280: 11259-11273.
- Lobritz, M. A., A. N. Ratcliff and E. J. Arts, 2010 HIV-1 Entry, Inhibitors, and Resistance. *Viruses* 2: 1069-1105.
- Lohrengel, S., F. Hermann, I. Hagmann, H. Oberwinkler, L. Scrivano *et al.*, 2005 Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides. *J Virol* 79: 10237-10246.
- Lu, L., P. Tong, X. Yu, C. Pan, P. Zou *et al.*, 2012 HIV-1 variants with a single-point mutation in the gp41 pocket region exhibiting different susceptibility to HIV fusion inhibitors with pocket- or membrane-binding domain. *Biochim Biophys Acta* 1818: 2950-2957.

- Lu, M., S. C. Blacklow and P. S. Kim, 1995 A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 2: 1075-1082.
- Lundegaard, C., I. Hoof, O. Lund and M. Nielsen, 2010 State of the art and challenges in sequence based T-cell epitope prediction. *Immunome Res* 6 Suppl 2: S3.
- Lusso, P., F. Cocchi, C. Balotta, P. D. Markham, A. Louie *et al.*, 1995 Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol* 69: 3712-3720.
- Lyons, A. B., and C. R. Parish, 1994 Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171: 131-137.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss *et al.*, 1986 The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47: 333-348.
- Mainardes, R. M., and L. P. Silva, 2004 Drug delivery systems: past, present, and future. *Curr Drug Targets* 5: 449-455.
- Malashkevich, V. N., D. C. Chan, C. T. Chutkowski and P. S. Kim, 1998 Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core: conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 9134-9139.
- Malim, M. H., and M. Emerman, 2001 HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell* 104: 469-472.
- Man, S., M. H. Newberg, V. L. Crotzer, C. J. Luckey, N. S. Williams *et al.*, 1995 Definition of a human T cell epitope from influenza A non-structural protein 1 using HLA-A2.1 transgenic mice. *Int Immunol* 7: 597-605.
- Marqusee, S., and R. L. Baldwin, 1987 Helix stabilization by Glu-...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8898-8902.
- Martin-Carbonero, L., 2004 Discontinuation of the clinical development of fusion inhibitor T-1249. *AIDS Rev* 6: 61.
- Martins do Canto, A. M., A. J. Palace Carvalho, J. P. Prates Ramalho and L. M. Loura, 2012 Molecular dynamics simulation of HIV fusion inhibitor T-1249: insights on peptide-lipid interaction. *Comput Math Methods Med* 2012: 151854.
- Mascola, J. R., G. Stiegler, T. C. VanCott, H. Katinger, C. B. Carpenter *et al.*, 2000 Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 6: 207-210.
- Mashishi, T., and C. M. Gray, 2002 The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin Chem Lab Med* 40: 903-910.
- Matrajt, L., P. M. Younan, H. P. Kiem and J. T. Schiffer, 2014 The majority of CD4+ T-cell depletion during acute simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P infection occurs in uninfected cells. *J Virol* 88: 3202-3212.
- Matsumura, M., D. H. Fremont, P. A. Peterson and I. A. Wilson, 1992 Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257: 927-934.
- Matthews, T., M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi *et al.*, 2004 Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* 3: 215-225.
- McClure, J., A. M. Schmidt, M. A. Rey-Cuille, J. Bannink, L. Misher *et al.*, 2000 Derivation and characterization of a highly pathogenic isolate of human immunodeficiency virus type 2 that causes rapid CD4+ cell depletion in Macaca nemestrina. *J Med Primatol* 29: 114-126.
- McCormack, J. E., D. Martineau, N. DePolo, S. Maifert, L. Akbarian *et al.*, 1997 Anti-vector immunoglobulin induced by retroviral vectors. *Hum Gene Ther* 8: 1263-1273.
- McDougal, J. S., M. S. Kennedy, J. M. Slish, S. P. Cort, A. Mawle *et al.*, 1986 Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231: 382-385.
- Melby, T., R. Demasi, N. Cammack, G. D. Miralles and M. L. Greenberg, 2007 Evolution of genotypic and phenotypic resistance during chronic treatment with the fusion inhibitor T-1249. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 1366-1373.
- Melikyan, G. B., 2008 Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 5: 111.
- Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert *et al.*, 2000 Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* 151: 413-423.
- Meng, W. S., H. von Grafenstein and I. S. Haworth, 1997 A model of water structure inside the HLA-A2 peptide binding groove. *Int Immunol* 9: 1339-1346.
- Meyer, D. L., J. Schultz, Y. Lin, A. Henry, J. Sanderson *et al.*, 2001 Reduced antibody response to streptavidin through site-directed mutagenesis. *Protein Sci* 10: 491-503.

- Miedema, F., M. D. Hazenberg, K. Tesselaar, D. van Baarle, R. J. de Boer *et al.*, 2013 Immune activation and collateral damage in AIDS pathogenesis. *Front Immunol* 4: 298.
- Miller, M. D., C. M. Farnet and F. D. Bushman, 1997 Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71: 5382-5390.
- Miyahira, Y., K. Murata, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, M. Esteban *et al.*, 1995 Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 181: 45-54.
- Miyauchi, K., Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov and G. B. Melikyan, 2009a HIV enters cells via endocytosis and dynamine-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137: 433-444.
- Miyauchi, K., M. M. Kozlov and G. B. Melikyan, 2009b Early steps of HIV-1 fusion define the sensitivity to inhibitory peptides that block 6-helix bundle formation. *PLoS Pathog* 5: e1000585.
- Moise, L., C. Song, W. D. Martin, R. Tassone, A. S. De Groot *et al.*, 2012 Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clin Immunol* 142: 320-331.
- Moldt, B., E. G. Rakasz, N. Schultz, P. Y. Chan-Hui, K. Swiderek *et al.*, 2012 Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 18921-18925.
- Montero, M., N. E. van Houten, X. Wang and J. K. Scott, 2008 The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 54-84, table of contents.
- Moog, C., H. J. Fleury, I. Pellegrin, A. Kirn and A. M. Aubertin, 1997 Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 71: 3734-3741.
- Moore, J. P., and R. W. Doms, 2003 The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10598-10602.
- Munoz-Barroso, I., S. Durell, K. Sakaguchi, E. Appella and R. Blumenthal, 1998 Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J Cell Biol* 140: 315-323.
- Munoz-Barroso, I., K. Salzwedel, E. Hunter and R. Blumenthal, 1999 Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J Virol* 73: 6089-6092.
- Muster, T., F. Steindl, M. Purtscher, A. Trkola, A. Klima *et al.*, 1993 A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67: 6642-6647.
- Muul, L. M., and F. Candotti, 2007 Immune responses to gene-modified T cells. *Curr Gene Ther* 7: 361-368.
- Nabel, G., and D. Baltimore, 1987 An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326: 711-713.
- Nagata, S., and I. Pastan, 2009 Removal of B cell epitopes as a practical approach for reducing the immunogenicity of foreign protein-based therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 977-985.
- Naito, T., K. Izumi, E. Kodama, Y. Sakagami, K. Kajiwara *et al.*, 2008 SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced {alpha}-helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide. *Antimicrob Agents Chemother*.
- Naldini, L., U. Blomer, P. Gally, D. Ory, R. Mulligan *et al.*, 1996 In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267.
- Nielsen, M., O. Lund, S. Buus and C. Lundegaard, 2010 MHC class II epitope predictive algorithms. *Immunology* 130: 319-328.
- Nielsen, M., C. Lundegaard and O. Lund, 2007 Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics* 8: 238.
- Norrbj, E., P. Putkonen, B. Bottiger, G. Utter and G. Biberfeld, 1991 Comparison of linear antigenic sites in the envelope proteins of human immunodeficiency virus (HIV) type 2 and type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 7: 279-285.
- Novotny, J., R. E. Bruccoleri and F. A. Saul, 1989 On the attribution of binding energy in antigen-antibody complexes McPC 603, D1.3, and HyHEL-5. *Biochemistry* 28: 4735-4749.
- O'Brien, S. J., X. Gao and M. Carrington, 2001 HLA and AIDS: a cautionary tale. *Trends Mol Med* 7: 379-381.
- O'Shea, E. K., R. Rutkowski and P. S. Kim, 1989 Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243: 538-542.
- Ofek, G., M. Tang, A. Sambor, H. Katinger, J. R. Mascola *et al.*, 2004 Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J Virol* 78: 10724-10737.



- Onda, M., R. Beers, L. Xiang, S. Nagata, Q. C. Wang *et al.*, 2008 An immunotoxin with greatly reduced immunogenicity by identification and removal of B cell epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 11311-11316.
- Opalka, D., A. Pessi, E. Bianchi, G. Ciliberto, W. Schleif *et al.*, 2004 Analysis of the HIV-1 gp41 specific immune response using a multiplexed antibody detection assay. *J Immunol Methods* 287: 49-65.
- Osipovitch, D. C., A. S. Parker, C. D. Makokha, J. Desrosiers, W. C. Kett *et al.*, 2012 Design and analysis of immune-evading enzymes for ADEPT therapy. *Protein Eng Des Sel* 25: 613-623.
- Ossevoort, M., B. M. Visser, D. J. van den Wollenberg, E. I. van der Voort, R. Offringa *et al.*, 2003 Creation of immune 'stealth' genes for gene therapy through fusion with the Gly-Ala repeat of EBNA-1. *Gene Ther* 10: 2020-2028.
- Ossevoort, M., A. Zaldumbide, S. J. Cramer, E. I. van der Voort, R. E. Toes *et al.*, 2006 Characterization of an immune 'stealth' derivative of the herpes simplex virus thymidine-kinase gene. *Cancer Gene Ther* 13: 584-591.
- Otaka, A., M. Nakamura, D. Nameki, E. Kodama, S. Uchiyama *et al.*, 2002 Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 2937-2940.
- Parker, A. S., Y. Choi, K. E. Griswold and C. Bailey-Kellogg, 2013 Structure-guided deimmunization of therapeutic proteins. *J Comput Biol* 20: 152-165.
- Parker, E. T., J. F. Healey, R. T. Barrow, H. N. Craddock and P. Lollar, 2004 Reduction of the inhibitory antibody response to human factor VIII in hemophilia A mice by mutagenesis of the A2 domain B-cell epitope. *Blood* 104: 704-710.
- Parker, K. C., M. A. Bednarek and J. E. Coligan, 1994 Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol* 152: 163-175.
- Parker, K. C., M. DiBrino, L. Hull and J. E. Coligan, 1992 The beta 2-microglobulin dissociation rate is an accurate measure of the stability of MHC class I heterotrimers and depends on which peptide is bound. *J Immunol* 149: 1896-1904.
- Pasternak, A. O., V. V. Lukashov and B. Berkhout, 2013 Cell-associated HIV RNA: a dynamic biomarker of viral persistence. *Retrovirology* 10: 41.
- Patronov, A., and I. Doytchinova, 2013 T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biol* 3: 120139.
- Pauling, L., and R. B. Corey, 1953 Structure of the nucleic acids. *Nature* 171: 346.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott and D. Baltimore, 1993 Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8392-8396.
- Peisajovich, S. G., S. A. Gallo, R. Blumenthal and Y. Shai, 2003 C-terminal octylation rescues an inactive T20 mutant: implications for the mechanism of HIV/SIMIAN immunodeficiency virus-induced membrane fusion. *J Biol Chem* 278: 21012-21017.
- Pelte, C., G. Cherepnev, Y. Wang, C. Schoenemann, H. D. Volk *et al.*, 2004 Random screening of proteins for HLA-A\*0201-binding nine-amino acid peptides is not sufficient for identifying CD8 T cell epitopes recognized in the context of HLA-A\*0201. *J Immunol* 172: 6783-6789.
- Perreau, M., A. L. Savoye, E. De Crignis, J. M. Corpataux, R. Cubas *et al.*, 2013 Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J Exp Med* 210: 143-156.
- Perry, L. C., T. D. Jones and M. P. Baker, 2008 New approaches to prediction of immune responses to therapeutic proteins during preclinical development. *Drugs R D* 9: 385-396.
- Pescovitz, M. D., 2006 Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant* 6: 859-866.
- Peter, K., Y. Men, G. Pantaleo, B. Gander and G. Corradin, 2001 Induction of a cytotoxic T-cell response to HIV-1 proteins with short synthetic peptides and human compatible adjuvants. *Vaccine* 19: 4121-4129.
- Peters, B., H. H. Bui, S. Frankild, M. Nielson, C. Lundegaard *et al.*, 2006 A community resource benchmarking predictions of peptide binding to MHC-I molecules. *PLoS Comput Biol* 2: e65.
- Petrovas, C., and R. A. Koup, 2014 T follicular helper cells and HIV/SIV-specific antibody responses. *Curr Opin HIV AIDS* 9: 235-241.
- Petrovas, C., T. Yamamoto, M. Y. Gerner, K. L. Boswell, K. Wloka *et al.*, 2012 CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest* 122: 3281-3294.
- Phillips, R. E., S. Rowland-Jones, D. F. Nixon, F. M. Gotch, J. P. Edwards *et al.*, 1991 Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 354: 453-459.
- Pogue, R. R., J. Eron, J. A. Frelinger and M. Matsui, 1995 Amino-terminal alteration of the HLA-A\*0201-restricted human immunodeficiency virus pol peptide increases complex stability and in vitro immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8166-8170.

- Porter, S., 2001 Human immune response to recombinant human proteins. *J Pharm Sci* 90: 1-11.
- Purcell, R. T., and R. F. Lockey, 2008 Immunologic responses to therapeutic biologic agents. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18: 335-342.
- Purtscher, M., A. Trkola, G. Gruber, A. Buchacher, R. Predl *et al.*, 1994 A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 1651-1658.
- Qi, Z., W. Shi, N. Xue, C. Pan, W. Jing *et al.*, 2008 Rationally designed anti-HIV peptides containing multifunctional domains as molecule probes for studying the mechanisms of action of the first and second generation HIV fusion inhibitors. *J Biol Chem* 283: 30376-30384.
- Qiu, S., H. Yi, J. Hu, Z. Cao, Y. Wu *et al.*, 2012 The binding mode of fusion inhibitor T20 onto HIV-1 gp41 and relevant T20-resistant mechanisms explored by computational study. *Curr HIV Res* 10: 182-194.
- Ramduth, D., P. Chetty, N. C. Mngquandaniso, N. Nene, J. D. Harlow *et al.*, 2005 Differential immunogenicity of HIV-1 clade C proteins in eliciting CD8+ and CD4+ cell responses. *J Infect Dis* 192: 1588-1596.
- Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor and S. Stevanovic, 1999 SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
- Rammensee, H. G., T. Friede and S. Stevanovic, 1995 MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228.
- Rama, L. N., and K. K. Pulicherla, 2015 Studies on Deimmunization of Antileukaemic L-Asparaginase to have Reduced Clinical Immunogenicity- An in silico Approach. *Pathol Oncol Res*.
- Ranasinghe, S., S. Cutler, I. Davis, R. Lu, D. Z. Soghoian *et al.*, 2013 Association of HLA-DRB1-restricted CD4(+) T cell responses with HIV immune control. *Nat Med* 19: 930-933.
- Rathore, A. S., and H. Winkle, 2009 Quality by design for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 27: 26-34.
- Reardon, P. N., H. Sage, S. M. Dennison, J. W. Martin, B. R. Donald *et al.*, 2014 Structure of an HIV-1-neutralizing antibody target, the lipid-bound gp41 envelope membrane proximal region trimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 1391-1396.
- Reeves, J. D., and R. W. Doms, 2002 Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 83: 1253-1265.
- Reeves, J. D., S. A. Gallo, N. Ahmad, J. L. Miamidian, P. E. Harvey *et al.*, 2002 Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16249-16254.
- Reeves, J. D., S. Hibbitts, G. Simmons, A. McKnight, J. M. Azevedo-Pereira *et al.*, 1999 Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J Virol* 73: 7795-7804.
- Reff, M. E., K. Carner, K. S. Chambers, P. C. Chinn, J. E. Leonard *et al.*, 1994 Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83: 435-445.
- Reits, E., A. Griekspoor, J. Neijssen, T. Groothuis, K. Jalink *et al.*, 2003 Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18: 97-108.
- Rey-Cuille, M. A., J. Galabru, A. Laurent-Crawford, B. Krust, L. Montagnier *et al.*, 1994 HIV-2 EHO isolate has a divergent envelope gene and induces single cell killing by apoptosis. *Virology* 202: 471-476.
- Rey, M. A., B. Krust, A. G. Laurent, D. Guetard, L. Montagnier *et al.*, 1989 Characterization of an HIV-2-related virus with a smaller sized extracellular envelope glycoprotein. *Virology* 173: 258-267.
- Richardson, J. S., and D. C. Richardson, 1988 Amino acid preferences for specific locations at the ends of alpha helices. *Science* 240: 1648-1652.
- Richman, D. D., T. Wrin, S. J. Little and C. J. Petropoulos, 2003 Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4144-4149.
- Rimsky, L. T., D. C. Shugars and T. J. Matthews, 1998 Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* 72: 986-993.
- Robertson, D., 2003 US FDA approves new class of HIV therapeutics. *Nat Biotechnol* 21: 470-471.
- Robinson, J., K. Mistry, H. McWilliam, R. Lopez, P. Parham *et al.*, 2011 The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 39: D1171-1176.
- Rock, K. L., I. A. York and A. L. Goldberg, 2004 Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* 5: 670-677.

- Roider, J., T. Meissner, F. Kraut, T. Vollbrecht, R. Stirner *et al.*, 2014 Comparison of experimental fine-mapping to in silico prediction results of HIV-1 epitopes reveals ongoing need for mapping experiments. *Immunology* 143: 193-201.
- Rosenberg, A. S., 2006 Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 8: E501-507.
- Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, A. M. Caliendo, S. L. Boswell, P. E. Sax *et al.*, 1997 Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447-1450.
- Rosenzweig, M., M. Connoles, R. Glickman, S. P. Yue, B. Noren *et al.*, 2001 Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood* 97: 1951-1959.
- Ross, C., K. M. Clemmesen, M. Svenson, P. S. Sorensen, N. Koch-Henriksen *et al.*, 2000 Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol* 48: 706-712.
- Rossi, J. J., C. H. June and D. B. Kohn, 2007 Genetic therapies against HIV. *Nat Biotechnol* 25: 1444-1454.
- Rotzschke, O., K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung and H. G. Rammensee, 1992 Peptide motifs of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences. *Eur J Immunol* 22: 2453-2456.
- Ruppert, J., J. Sidney, E. Celis, R. T. Kubo, H. M. Grey *et al.*, 1993 Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 74: 929-937.
- Ryff, J. C., 1997 Clinical investigation of the immunogenicity of interferon-alpha 2a. *J Interferon Cytokine Res* 17 Suppl 1: S29-33.
- Salvat, R. S., A. S. Parker, Y. Choi, C. Bailey-Kellogg and K. E. Griswold, 2015 Mapping the Pareto optimal design space for a functionally deimmunized biotherapeutic candidate. *PLoS Comput Biol* 11: e1003988.
- Salzwedel, K., J. T. West and E. Hunter, 1999 A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol* 73: 2469-2480.
- Saphire, A. C., M. D. Bobardt, Z. Zhang, G. David and P. A. Gallay, 2001 Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol* 75: 9187-9200.
- Sattentau, Q. J., and R. A. Weiss, 1988 The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52: 631-633.
- Schambach, A., D. Mueller, M. Galla, M. M. Verstegen, G. Wagemaker *et al.*, 2006 Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther* 13: 1524-1533.
- Scheid, J. F., H. Mouquet, B. Ueberheide, R. Diskin, F. Klein *et al.*, 2011 Sequence and structural convergence of broad and potent HIV antibodies that mimic CD4 binding. *Science* 333: 1633-1637.
- Schellekens, H., 2005 Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant* 20 Suppl 6: vi3-9.
- Schellekens, H., 2010 The immunogenicity of therapeutic proteins. *Discov Med* 9: 560-564.
- Schellekens, H., and N. Casadevall, 2004 Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. *J Neurol* 251 Suppl 2: i14-9.
- Schibli, D. J., R. C. Montelaro and H. J. Vogel, 2001 The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry* 40: 9570-9578.
- Schiffer, M., and A. B. Edmundson, 1967 Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys J* 7: 121-135.
- Schmittel, A., U. Keilholz and C. Scheibenbogen, 1997 Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood. *J Immunol Methods* 210: 167-174.
- Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon *et al.*, 1999 Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283: 857-860.
- Schneider, S. E., B. L. Bray, C. J. Mader, P. E. Friedrich, M. W. Anderson *et al.*, 2005 Development of HIV fusion inhibitors. *J Pept Sci* 11: 744-753.
- Schneidewind, A., M. A. Brockman, R. Yang, R. I. Adam, B. Li *et al.*, 2007 Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 81: 12382-12393.
- Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob and N. Shastri, 2002 ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419: 480-483.

- Sette, A., A. Vitiello, B. Rehman, P. Fowler, R. Nayarsina *et al.*, 1994 The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J Immunol* 153: 5586-5592.
- Shankarappa, R., J. B. Margolick, S. J. Gange, A. G. Rodrigo, D. Upchurch *et al.*, 1999 Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 73: 10489-10502.
- Sharp, P. M., D. L. Robertson and B. H. Hahn, 1995 Cross-species transmission and recombination of 'AIDS' viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349: 41-47.
- Shi, W., J. Bohon, D. P. Han, H. Habte, Y. Qin *et al.*, 2010 Structural characterization of HIV gp41 with the membrane-proximal external region. *J Biol Chem* 285: 24290-24298.
- Shi, W., Z. Qi, C. Pan, N. Xue, A. K. Debnath *et al.*, 2008 Novel anti-HIV peptides containing multiple copies of artificially designed heptad repeat motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 767-772.
- Shirai, M., T. Arichi, M. Nishioka, T. Nomura, K. Ikeda *et al.*, 1995 CTL responses of HLA-A2.1-transgenic mice specific for hepatitis C viral peptides predict epitopes for CTL of humans carrying HLA-A2.1. *J Immunol* 154: 2733-2742.
- Shum, K. T., J. Zhou and J. J. Rossi, 2013 Aptamer-based therapeutics: new approaches to combat human viral diseases. *Pharmaceuticals (Basel)* 6: 1507-1542.
- Sia, S. K., P. A. Carr, A. G. Cochran, V. N. Malashkevich and P. S. Kim, 2002 Short constrained peptides that inhibit HIV-1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14664-14669.
- Singh, H., and G. P. Raghava, 2001 ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 17: 1236-1237.
- Sista, P. R., T. Melby, D. Davison, L. Jin, S. Mosier *et al.*, 2004 Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *Aids* 18: 1787-1794.
- Sivaraman, V., L. Zhang, E. G. Meissner, J. L. Jeffrey and L. Su, 2009 The heptad repeat 2 domain is a major determinant for enhanced human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion and pathogenicity of a highly pathogenic HIV-1 Env. *J Virol* 83: 11715-11725.
- Skott, P., A. Achour, M. Norin, R. Thorstensson and E. Bjorling, 1999 Characterization of neutralizing sites in the second variable and fourth variable region in gp125 and a conserved region in gp36 of human immunodeficiency virus type 2. *Viral Immunol* 12: 79-88.
- Sloan, R. D., B. D. Kuhl, T. Mesplede, J. Munch, D. A. Donahue *et al.*, 2013 Productive entry of HIV-1 during cell-to-cell transmission via dynamin-dependent endocytosis. *J Virol* 87: 8110-8123.
- Soghoian, D. Z., H. Jessen, M. Flanders, K. Sierra-Davidson, S. Cutler *et al.*, 2012 HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Sci Transl Med* 4: 123ra125.
- Stacey, A. R., P. J. Norris, L. Qin, E. A. Haygreen, E. Taylor *et al.*, 2009 Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J Virol* 83: 3719-3733.
- Stamatatos, L., L. Morris, D. R. Burton and J. R. Mascola, 2009 Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15: 866-870.
- Steven, N. M., N. E. Annels, A. Kumar, A. M. Leese, M. G. Kurilla *et al.*, 1997 Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 185: 1605-1617.
- Stripecke, R., M. Carmen Villacres, D. Skelton, N. Satake, S. Halene *et al.*, 1999 Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther* 6: 1305-1312.
- Suarez, T., W. R. Gallaher, A. Agirre, F. M. Goni and J. L. Nieva, 2000 Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion. *J Virol* 74: 8038-8047.
- Sundar, K., A. Boesen and R. Coico, 2007 Computational prediction and identification of HLA-A2.1-specific Ebola virus CTL epitopes. *Virology* 360: 257-263.
- Tan, K., J. Liu, J. Wang, S. Shen and M. Lu, 1997 Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12303-12308.
- Tangri, S., B. R. Mothe, J. Eisenbraun, J. Sidney, S. Southwood *et al.*, 2005 Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity. *J Immunol* 174: 3187-3196.
- Tian, Y., C. V. Ramesh, X. Ma, S. Naqvi, T. Patel *et al.*, 2002 Structure-affinity relationships in the gp41 ELDKWA epitope for the HIV-1 neutralizing monoclonal antibody 2F5: effects of side-chain and backbone modifications and conformational constraints. *J Pept Res* 59: 264-276.

- Tomaras, G. D., N. L. Yates, P. Liu, L. Qin, G. G. Fouda *et al.*, 2008 Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 82: 12449-12463.
- Tong, J. C., T. W. Tan and S. Ranganathan, 2007 Methods and protocols for prediction of immunogenic epitopes. *Brief Bioinform* 8: 96-108.
- Traggiai, E., L. Chicha, L. Mazzucchelli, L. Bronz, J. C. Piffaretti *et al.*, 2004 Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304: 104-107.
- Tripathy, S. K., H. B. Black, E. Goldwasser and J. M. Leiden, 1996 Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2: 545-550.
- Trivedi, V. D., S. F. Cheng, C. W. Wu, R. Karthikeyan, C. J. Chen *et al.*, 2003 The LLSGIV stretch of the N-terminal region of HIV-1 gp41 is critical for binding to a model peptide, T20. *Protein Eng* 16: 311-317.
- Trombetta, E. S., and I. Mellman, 2005 Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.
- Trost, B., M. Bickis and A. Kusalik, 2007 Strength in numbers: achieving greater accuracy in MHC-I binding prediction by combining the results from multiple prediction tools. *Immunome Res* 3: 5.
- Trotta, M. P., A. Ammassari, S. Melzi, M. Zaccarelli, N. Ladisa *et al.*, 2002 Treatment-related factors and highly active antiretroviral therapy adherence. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31 Suppl 3: S128-131.
- Tsurushita, N., P. R. Hinton and S. Kumar, 2005 Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax. *Methods* 36: 69-83.
- Turnbull, E. L., M. Wong, S. Wang, X. Wei, N. A. Jones *et al.*, 2009 Kinetics of expansion of epitope-specific T cell responses during primary HIV-1 infection. *J Immunol* 182: 7131-7145.
- Vahlne, A., 2009 A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology* 6: 40.
- Val, I. J. d., S. Kyriakopoulos, C. Kontoravdi, P. M. Jedrzejewski, K. Exley *et al.*, 2012 *Application of Quality by Design Paradigm to the Manufacture of Protein Therapeutics*.
- van der Burg, S. H., M. J. Visseren, R. M. Brandt, W. M. Kast and C. J. Melief, 1996 Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *J Immunol* 156: 3308-3314.
- van Lunzen, J., T. Glaunsinger, I. Stahmer, V. von Baehr, C. Baum *et al.*, 2007 Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Mol Ther* 15: 1024-1033.
- van Meerten, T., M. J. Claessen, A. Hagenbeek and S. B. Ebeling, 2006a The CD20/alphaCD20 'suicide' system: novel vectors with improved safety and expression profiles and efficient elimination of CD20-transgenic T cells. *Gene Ther* 13: 789-797.
- van Meerten, T., R. S. van Rijn, S. Hol, A. Hagenbeek and S. B. Ebeling, 2006b Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 12: 4027-4035.
- Veiga, A. S., N. C. Santos, L. M. Loura, A. Fedorov and M. A. Castanho, 2004a HIV fusion inhibitor peptide T-1249 is able to insert or adsorb to lipidic bilayers. Putative correlation with improved efficiency. *J Am Chem Soc* 126: 14758-14763.
- Veiga, S., S. Henriques, N. C. Santos and M. Castanho, 2004b Putative role of membranes in the HIV fusion inhibitor enfuvirtide mode of action at the molecular level. *Biochem J* 377: 107-110.
- Vishwanathan, S. A., and E. Hunter, 2008 Importance of the membrane-perturbing properties of the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to viral fusion. *J Virol* 82: 5118-5126.
- Vlieghe, P., V. Lisowski, J. Martinez and M. Khrestchatsky, 2010 Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* 15: 40-56.
- von Laer, D. a. B., G., 2001 Gene Therapy for HIV infection by intracellular immunization with antiviral genes. *AIDS Rev* 3: 61-69.
- Walker, B., and A. McMichael, 2012 The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- Walker, B. D., S. Chakrabarti, B. Moss, T. J. Paradis, T. Flynn *et al.*, 1987 HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328: 345-348.
- Walker, L. M., M. Huber, K. J. Doores, E. Falkowska, R. Pejchal *et al.*, 2011 Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477: 466-470.
- Walmsley, S., K. Henry, C. Katlama, M. Nelson, A. Castagna *et al.*, 2003 Enfuvirtide (T-20) cross-reactive glycoprotein 41 antibody does not impair the efficacy or safety of enfuvirtide. *J Infect Dis* 188: 1827-1833.

- Wang, P., J. Sidney, C. Dow, B. Mothe, A. Sette *et al.*, 2008 A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput Biol* 4: e1000048.
- Wang, W., M. Merchlinsky, J. Inman and B. Golding, 2005 Identification of a novel immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitope derived from human factor VIII in a murine model of hemophilia A. *Thromb Res* 116: 335-344.
- Warmerdam, P. A., S. Plaisance, K. Vanderlick, P. Vandervoort, K. Brepoels *et al.*, 2002 Elimination of a human T-cell region in staphylokinase by T-cell screening and computer modeling. *Thromb Haemost* 87: 666-673.
- Watanabe, Y., T. Takahashi, A. Okajima, M. Shiokawa, N. Ishii *et al.*, 2009 The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/gammac(null) (NOG) mice (hu-HSC NOG mice). *Int Immunol* 21: 843-858.
- Watson, J. D., and F. H. Crick, 1953 Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171: 737-738.
- Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani *et al.*, 2002 Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1896-1905.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel and D. C. Wiley, 1997 Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387: 426-430.
- Werle, M., and A. Bernkop-Schnurch, 2006 Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 30: 351-367.
- Weston, S. A., and C. R. Parish, 1990 New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 133: 87-97.
- Wexler-Cohen, Y., B. T. Johnson, A. Puri, R. Blumenthal and Y. Shai, 2006 Structurally altered peptides reveal an important role for N-terminal heptad repeat binding and stability in the inhibitory action of HIV-1 peptide DP178. *J Biol Chem* 281: 9005-9010.
- White, T. A., A. Bartsaghi, M. J. Borgnia, J. R. Meyerson, M. J. de la Cruz *et al.*, 2010 Molecular architectures of trimeric SIV and HIV-1 envelope glycoproteins on intact viruses: strain-dependent variation in quaternary structure. *PLoS Pathog* 6: e1001249.
- Wild, C., T. Greenwell and T. Matthews, 1993 A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9: 1051-1053.
- Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal and T. J. Matthews, 1994 Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9770-9774.
- Williams, T. M., 2001 Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn* 3: 98-104.
- Wills, M. R., A. J. Carmichael, K. Mynard, X. Jin, M. P. Weekes *et al.*, 1996 The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70: 7569-7579.
- Wilson, J. D., G. S. Ogg, R. L. Allen, C. Davis, S. Shaunak *et al.*, 2000 Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *Aids* 14: 225-233.
- Wolkowicz, R., and G. P. Nolan, 2005 Gene therapy progress and prospects: novel gene therapy approaches for AIDS. *Gene Ther* 12: 467-476.
- Worobey, M., M. Gemmel, D. E. Teuwen, T. Haselkorn, K. Kunstman *et al.*, 2008 Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455: 661-664.
- Wu, X., T. Zhou, J. Zhu, B. Zhang, I. Georgiev *et al.*, 2011 Focused evolution of HIV-1 neutralizing antibodies revealed by structures and deep sequencing. *Science* 333: 1593-1602.
- Wu, Y., 2004 HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 1: 13.
- Wyatt, R., and J. Sodroski, 1998 The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280: 1884-1888.
- Xiao, J., and T. J. Tolbert, 2013 Modular assembly of dimeric HIV fusion inhibitor peptides with enhanced antiviral potency. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 6046-6051.
- Yang, X. D., X. C. Jia, J. R. Corvalan, P. Wang and C. G. Davis, 2001 Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 38: 17-23.
- Yang, Y., F. A. Nunes, K. Berencsi, E. E. Furth, E. Gonczol *et al.*, 1994 Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4407-4411.

- Yeung, V. P., J. Chang, J. Miller, C. Barnett, M. Stickler *et al.*, 2004 Elimination of an immunodominant CD4+ T cell epitope in human IFN-beta does not result in an in vivo response directed at the subdominant epitope. *J Immunol* 172: 6658-6665.
- Yewdell, J. W., and J. R. Bennink, 1999 Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* 17: 51-88.
- Yewdell, J. W., and J. R. Bennink, 2001 Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 13: 13-18.
- Younan, P. M., P. Polacino, J. P. Kowalski, C. W. Peterson, N. J. Maurice *et al.*, 2013 Positive selection of mC46-expressing CD4+ T cells and maintenance of virus specific immunity in a primate AIDS model. *Blood* 122: 179-187.
- Zahn, R. C., F. G. Hermann, E. Y. Kim, M. D. Rett, S. M. Wolinsky *et al.*, 2008 Efficient entry inhibition of human and nonhuman primate immunodeficiency virus by cell surface-expressed gp41-derived peptides. *Gene Ther* 15: 1210-1222.
- Zaldumbide, A., M. Ossevoort, E. J. Wiertz and R. C. Hoeben, 2007 In cis inhibition of antigen processing by the latency-associated nuclear antigen I of Kaposi sarcoma herpes virus. *Mol Immunol* 44: 1352-1360.
- Zhang, C., A. Anderson and C. DeLisi, 1998 Structural principles that govern the peptide-binding motifs of class I MHC molecules. *J Mol Biol* 281: 929-947.
- Zhou, H. S., D. P. Liu and C. C. Liang, 2004 Challenges and strategies: the immune responses in gene therapy. *Med Res Rev* 24: 748-761.
- Zhu, P., E. Chertova, J. Bess, Jr., J. D. Lifson, L. O. Arthur *et al.*, 2003 Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15812-15817.
- Zhu, P., J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J. D. Lifson *et al.*, 2006 Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* 441: 847-852.
- Zhuang, Y., Y. Sun, S. Zhai, D. Huang, S. Zhao *et al.*, 2008 Relative dominance of Env-gp41-specific cytotoxic T lymphocytes responses in HIV-1 advanced infection. *Curr HIV Res* 6: 239-245.
- Zidovec Lepej, S., E. Kosor, A. Gagro, A. Vince, A. Remenar *et al.*, 2006 Persistent immunodominant anti-gag SLYNTVATL responses in HIV-patients with up to 7 years of HAART. *Coll Antropol* 30 Suppl 2: 33-38.

## 8 ABKÜRZUNGEN

ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Ag	Antigen
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle ( <i>antigen-presenting cell</i> )
Aqua dest.	destilliertes Wasser ( <i>Aqua destillata</i> )
ART	Antiretrovirale Therapie
AS	Aminosäure
BZR	B-Zell-Rezeptor
C-	Carboxy-
CCR5	Chemokinrezeptor, Korezeptor für HIV-1
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
CDC	<i>complement-dependent cellular cytotoxicity</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEF	Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, Influenzavirus
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHR	C-terminale Heptadwiederholung ( <i>C-terminal heptad repeat</i> )
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Zytotoxische CD8 <sup>+</sup> T-Zelle ( <i>cytotoxic CD8+ T cell</i> )
CXCR4	Chemokinrezeptor, Korezeptor für HIV-1
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELISpot	Enzyme-linked immunospot
Env	<i>Envelope</i> , Hüllprotein
Fab-Teil	Bindungsstelle im Antikörper für ein Antigen ( <i>fragment antigen binding</i> )
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>Fetal calf serum</i> )
Fc-Teil	Konstanter Teil im Antikörper ( <i>fragment crystallizable</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
gp	Glykoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus ( <i>human immunodeficiency virus</i> )
HLA	Human leukocyte antigen
HR	Heptadwiederholung ( <i>heptad repeat</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IC <sub>50</sub>	Konzentration für eine 50%ige Eintrittshemmung ( <i>inhibitory concentration</i> )
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin



kDa	Kilodalton
LTR	lange terminale Sequenzwiederholung ( <i>long terminal repeat</i> )
ma	Membranständig ( <i>membrane-anchored</i> )
mAk	Monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MPER	Membran-nahe externe Region ( <i>membrane-proximale external region</i> )
mRNA	Messenger RNA
MW	Molare Masse ( <i>molecular weight</i> )
N-	Amino-
NHR	N-terminale Heptadwiederholung ( <i>N-terminal heptad repeat</i> )
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphat buffered saline</i> )
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RTX	Rituximab, mAk gegen CD20
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of mean</i> )
SFU	<i>Spot-forming units</i>
SIV	Affenimmundefizienzvirus ( <i>simian immunodeficiency virus</i> )
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> )
T:E	Verhältnis Targetzellen zu Effektorzellen
TM	Transmembrane Region ( <i>transmembrane region</i> )
TZR	T-Zell-Rezeptor
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg
UV	Ultraviolettstrahlung
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen ( <i>volume per volume</i> )
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen ( <i>weight per volume</i> )

### Buchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## 9 ANHANG

Folgende Abkürzungen wurden im Anhang verwendet: NA = nicht analysiert; ART, antiretrovirale Therapie; LTNP, *long-term non-progressor*; k.A., keine Angabe. Für ausgegraute Felder bei den *in silico* Vorhersagen wurden keine MHC-I-Epitope vorhergesagt.

### 9.1 IC<sub>50</sub>-Werte der antiviralen C-Peptide

Tabelle 9.1.1 IC<sub>50</sub>-Werte der antiviralen C-Peptide. Die IC<sub>50</sub>-Werte (in nM) geben den Mittelwert mit der Standardabweichung von mindestens zwei Experimenten an.

	HIV-1 (X4-trop)			HIV-1 (R5-trop)		SIVmac251	VSV-G
	HXB2	T-20-R(SIM)	T-20-R(DTV)	BaL	C46-R		
T-20	2,7 ± 1,6	>100	>100	2,5 ± 0,8	19,1 ± 8,9	>100	>100
C46	6,1 ± 2,9	7,0 ± 1,3	6,0 ± 1,4	8,2 ± 1,7	27,7 ± 6,8	>100	>100
C46-EHO	2,1 ± 0,5	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,3	2,7 ± 0,9	4,5 ± 0,5	13,1 ± 6,7	>100
T-1249	4,1 ± 3,5	NA	NA	1,3 ± 0,8	NA	22,6 ± 15,4	>100
SC35EK	3,7 ± 1,8	NA	NA	8,0 ± 5,9	NA	>100	>100
V1	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,4	2,0 ± 1,0	1,1 ± 0,4	3,7 ± 0,8	10,9 ± 0,6	>100
V2	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,3	2,2 ± 0,8	1,5 ± 0,3	3,3 ± 0,4	10,7 ± 1,4	>100
V3	1,9 ± 0,5	15,4 ± 10,8	15,8 ± 3,3	2,5 ± 0,4	12,9 ± 2,3	30,3 ± 23,9	>100
V4	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,0	1,5 ± 0,9	1,8 ± 0,4	6,7 ± 2,5	11,6 ± 3,0	>100
V2o	0,42 ± 0,15	0,26 ± 0,12	0,26 ± 0,13	0,51 ± 0,11	1,1 ± 0,2	5,0 ± 3,2	>100

### 9.2 Seroreaktivität der antiviralen C-Peptide

**Tabelle 9.2.1 Seroreaktivität der antiviralen C-Peptide. Die Seroreaktivität ist angegeben als absolute Anzahl sowie prozentualer Anteil der Patientenseren, die mit dem Peptid im Dot Blot reagierten.**

	HIV-1					HIV-2 (n=10)	SIVmac251 (n=9)
	ART (n=35)	keine ART (n=34)	LTNP (n=10)	anti-C46-EHO+ (n=7)	anti-C46-EHO- (n=15, *n=20)		
T-20	3 (8.6%)	7 (20.6%)	1 (10.0%)	NA	NA	0 (0.0%)	NA
C46	21 (60.0%)	30 (88.2%)	8 (80.0%)	NA	NA	0 (0.0%)	0 (0.0%)
C46-EHO	3 (8.6%)	4 (11.8%)	1 (10.0%)	7 (100.0%)	0 (0.0%)	8 (80.0%)	7 (77.8%)
T-1249	2 (5.7%)	6 (17.6%)	1 (10.0%)	NA	NA	9 (90.0%)	NA
SC35EK	1 (2.9%)	5 (14.7%)	0 (0.0%)	NA	NA	0 (0.0%)	NA
V1	NA	NA	NA	6 (85.7%)	5 (33.3%)	10 (100.0%)	NA
V2	NA	NA	NA	4 (57.1%)	1 (5.0%)*	10 (100.0%)	7 (77.8%)
V3	NA	NA	NA	7 (100.0%)	1 (6.7%)	8 (80.0%)	NA
V4	NA	NA	NA	7 (100.0%)	4 (26.7%)	10 (100.0%)	NA
V2o	NA	NA	NA	0 (0.0%)	0 (0.0%)	10 (100.0%)	8 (88.9%)

### 9.3 *In silico* Vorhersagen

Tabelle 9.3.1 C46 (SYFPEITHI)

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	8mer	Punktwert	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*0201	27,2				13	SLIHSLEE	20	33	LLELDKWASL	25
					34	LELDKWASL	20	13	SLIHSLEES	20
A*2402	8,2				10	NYTSLIHSL	21	10	NYTSLIHSLI	23
A*26	2,7				3	EWDREINNY	24	27	EKNEQELLEL	25
B*08	12,0	26	QEKNEQEL	20	26	QEKNEQELL	20			
					34	LELDKWASL	20			
B*18	4,4	29	NEQELLEL	24	34	LELDKWASL	20			
B*37	1,6	11	YTSLIHSL	23	34	LELDKWASL	30			
		26	QEKNEQEL	21	6	REINNYTSL	23			
		29	NEQELLEL	21						
B*4001	4,9				26	QEKNEQELL	22			
					6	REINNYTSL	21			
					34	LELDKWASL	21			
B*4402	10,6				6	REINNYTSL	25	2	MEWDREINNY	25
					31	QELLELDKW	24	6	REINNYTSLI	24
					26	QEKNEQELL	22	34	LELDKWASLW	24
					34	LELDKWASL	22			
B*4901	1,2				6	REINNYTSL	20			

Tabelle 9.3.2 T-20 (SYFPEITHI)

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	8mer	Punktwert	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*0201	27,2				3	SLIHSLEE	20	23	LLELDKWASL	25
					24	LELDKWASL	20	3	SLIHSLEES	20
A*26	2,7							17	EKNEQELLEL	25
B*08	12,0	26	QEKNEQEL	20	16	QEKNEQELL	20			
					24	LELDKWASL	20			
B*18	4,4	19	NEQELLEL	24	24	LELDKWASL	20			
B*37	1,6	1	YTSLIHSL	23	24	LELDKWASL	30			
		16	QEKNEQEL	21						
		19	NEQELLEL	21						
B*4001	4,9				16	QEKNEQELL	22			
					24	LELDKWASL	21			
B*4402	10,6				21	QELLELDKW	24	24	LELDKWASLW	24
					16	QEKNEQELL	22			
					24	LELDKWASL	22			

Tabelle 9.3.3 T-1249 (SYFPEITHI)

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	8mer	Punktwert	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*03	14,4							19	QEKNEYELQK	20
A*26	2,7				3	EWEQKITAL	24	20	EKNEYELQKL	25
B*08	12,0	5	EQKITALL	22	3	EWEQKITAL	24			
		19	QEKNEYEL	20	27	QKLDKWASL	20			
B*1501	4,8							15	AQIQQEKNEY	22
B*18	4,4	4	WEQKITAL	22						
		22	NEYELQKL	22						
B*37	1,6	22	NEYELQKL	23	4	WEQKITALL	20			
		4	WEQKITAL	26	27	QKLDKWASL	20			
		19	QEKNEYEL	21						
B*3902	< 0,1				27	QKLDKWASL	23			
B*4001	4,9				4	WEQKITALL	22			
B*4101	0,6				2	QEWEQKITA	26			
B*4402	10,6				4	WEQKITALL	23	2	QEWEQKITAL	25
					24	YELQKLDKW	23			
B*4501	0,5				2	QEWEQKITA	21			
B*5001	1,2				2	QEWEQKITA	21			
					9	TALLEQAQI	23			

Tabelle 9.3.4 SC35EK (SYFPEITHI)

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	8mer	Punktwert	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*01	16,4				3	EWDKKIEEY	26			
A*0201	27,2				7	KIEEYTKKI	22			
A*03	14,4							18	LIKSEEQQK	22
A*1101	7,1							11	YTKKIEELIK	24
A*2402	8,2				10	EYTKKIEEL	24	10	EYTKKIEELI	24
A*26	2,7				3	EWDKKIEEY	25	2	EEWDKKIEEY	25
					10	EYTKKIEEL	24	9	EEYTKKIEEL	22
					31	EELKKEQKL	20			
B*08	12,0	32	ELKKEQKL	28	32	ELKKEQKLI	25			
		11	YTKKIEEL	20	10	EYTKKIEEL	24			
		26	QKKNEEEL	20	31	EELKKEQKL	22			
					25	QKKNEEEL	21			
B*18	4,4				31	EELKKEQKL	20			
B*2705	2,8				6	KKIEEYTKK	20			
					13	KKIEELIKK	20			
B*37	1,6	15	IEELIKKS	21	31	EELKKEQKL	27			
B*3902	< 0,1				37	QKLISEEDL	21			
B*4001	4,9				31	EELKKEQKL	23			

B*4402	10,6				31	EELKKEQKL	24	2	EEWDKKIEEY	26	
								9	EEYTKKIEEL	26	
									30	EEELKKEQKL	24
									31	EELKKEQKLI	24
B*4901	1,2				31	EELKKEQKL	21				

**Tabelle 9.3.5 C46-EHO (SYFPEITHI)**

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	8mer	Punktwert	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*0201	27,2				10	FLDANITKL	27	10	FLDANITKLL	20
A*03	14,4				9	RFLDANITK	21			
A*1101	7,1							29	NMYELQELDK	20
A*2402	8,2							9	RFLDANITKL	22
A*26	2,7							27	EKNMYELQEL	22
B*08	12,0	26	QEKNMYEL	20	34	QELDKWASL	20			
B*1402	3,1	8	VRFLDANI	23						
B*1501	4,8							22	AQIQQEKNMY	22
								1	WQQWERQVRF	21
B*18	4,4	4	WERQVRFL	21	34	QELDKWASL	20			
B*37	1,6	11	LDANITKL	26	34	QELDKWASL	30			
		4	WERQVRFL	24	11	LDANITKLL	20			
		26	QEKNMYEL	21						
B*4001	4,9				34	QELDKWASL	21			



B*4402	10,6				31	YELQELDKW	23	34	QELDKWASLW	24
					34	QELDKWASL	22			
B*4701	0,3				11	LDANITKLL	21			
B*5101	5,2	12	DANITKLL	20						

**Tabelle 9.3.6 V2 (SYFPEITHI)**

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	8mer	Punktwert	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*03	14,4				35	KLDKWASAW	20			
A*1101	7,1							29	NMYELQKLDK	20
A*26	2,7							27	EKNMYELQKL	23
B*08	12	26	NEKNMYEL	20						
B*1501	4,8							22	AQIQNEKNMY	22
								1	WQTWERQVNF	21
B*18	4,4	26	NEKNMYEL	20						
B*37	1,6	26	NEKNMYEL	21						
					11	WDANITKAL	20			
B*4402	10,6				31	YELQKLDKW	23			
B*4701	0,3				11	WDANITKAL	21			
B*5101	5,2	17	KALEEAQI	21						
		12	DANITKAL	20						

**Tabelle 9.3.7 V2o (SYFPEITHI)**

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	8mer	Punktwert	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*26	2,7							27	EKNMYELQKL	23
B*08	12	26	NEKNMYEL	20						
B*1501	4,8							22	AQIQNEKNMY	22
B*18	4,4	26	NEKNMYEL	20						
B*37	1,6	26	NEKNMYEL	21						
		39	WDIFSNWF	20						
B*4402	10,6				31	YELQKLNQW	24			
B*5101	5,2	17	KALEEAQI	21						

**Tabelle 9.3.8 C46 (BIMAS)**

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*0201	27,2	32	ELLELDKWA	31,09			
		34	LELDKWASL	18,2			
A*0205	1,1	34	LELDKWASL	30	24	NQQEKNEQEL	16,8
A*01	16,4	30	EQELLELDK	13,5			
A*24	8,3	10	NYTSLIHSL	240	10	NYTSLIHSLI	70
		28	KNEQELLEL	13,2			
A*6801	2,9	30	EQELLELDK	13,5			

B*14	4,5				5	DREINNYTSL	18
					9	NNYTSLIHSL	15
B*2702	0,5				5	DREINNYTSL	18
					2	MEWDREINNY	15
B*2705	2,8	25	QKEKNEQEL	200	25	QKEKNEQELL	200
		6	REINNYTSL	90	24	NQKEKNEQEL	200
		28	KNEQELLEL	60	5	DREINNYTSL	200
		34	LELDKWASL	30	9	NNYTSLIHSL	100
		26	QEKNEQELL	30	2	MEWDREINNY	75
		30	EQELLELDK	20	33	LLELDKWASL	30
		5	DREINNYTS	20	29	NEQELLELDK	30
		2	MEWDREINN	15	19	IEESQNQKEK	30
		9	NNYTSLIHS	10	6	REINNYTSLI	27
B*3701	1,6	26	QEKNEQELL	50	6	REINNYTSLI	50
		34	LELDKWASL	10			
		6	REINNYTSL	10			
B*3901	1	28	KNEQELLEL	13,5	5	DREINNYTSL	45
B*3902	<0,1	25	QKEKNEQEL	20	27	EKNEQELLEL	20
					25	QKEKNEQELL	20
					24	NQKEKNEQEL	20

B*40	5,9	6	REINNYTSL	80	34	LELDKWASLW	40
		34	LELDKWASL	40	31	QELLELDKWA	40
		31	QELLELDKW	40	6	REINNYTSLI	16
		26	QEKNEQELL	10			
B*4403	4,9	31	QELLELDKW	54	2	MEWDREINNY	120
		6	REINNYTSL	30	34	LELDKWASLW	36
		34	LELDKWASL	12	6	REINNYTSLI	30
					31	QELLELDKWA	12
B*60	k.A.	34	LELDKWASL	320	6	REINNYTSLI	16
		6	REINNYTSL	320			
		26	QEKNEQELL	160			
B*61	k.A.	6	REINNYTSL	17,6	31	QELLELDKWA	40
		34	LELDKWASL	16	6	REINNYTSLI	17,6
Cw*0301	k.A.	6	REINNYTSL	120	5	DREINNYTSL	24
		34	LELDKWASL	20	9	NNYTSLIHSL	20
Cw*0401	10,1	10	NYTSLIHSL	440	10	NYTSLIHSLI	25
		38	KWASLWNWF	20			
		3	EWDREINNY	15			
Cw*0602	9,1	10	NYTSLIHSL	12	9	NNYTSLIHSL	12

Tabelle 9.3.9 C46-EHO (BIMAS)

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*0201	27,2	10	FLDANITKL	90	2	QQWERQVRFL	187
		34	QELDKWASL	11	10	FLDANITKLL	39
					24	IQQEKNMYEL	35
A*0205	1,1	34	QELDKWASL	18	24	IQQEKNMYEL	57
A*0205	1,1	10	FLDANITKL	17	2	QQWERQVRFL	20
A*03	14,4				29	NMYELQELDK	300
A*24	8,3	28	KNMYELQEL	16	9	RFLDANITKL	79
B*14	4,5	5	ERQVRFLDA	30			
B*2702	0,5	8	VRFLDANIT	100	8	VRFLDANITK	20
		2	QQWERQVRF	100	22	AQIQQEKNMY	20
					1	WQQWERQVRF	20
					6	RQVRFLDANI	18

B*2705	2,8	8	VRFLDANIT	1000	8	VRFLDANITK	10000
		2	QQWERQVRF	500	2	QQWERQVRFL	300
		25	QQEKNMYEL	200	29	NMYELQELDK	250
		1	WQQWERQVR	100	24	IQEKNMYEL	200
		6	RQVRFLDAN	60	33	LQELDKWASL	200
		28	KNMYELQEL	60	6	RQVRFLDANI	180
		34	QELDKWASL	30	22	AQIQEKNMY	100
		10	FLDANITKL	30	1	WQQWERQVRF	100
		5	ERQVRFLDA	20	19	LEEAIQQEK	30
		33	LQELDKWAS	20	5	ERQVRFLDAN	20
		22	AQIQEKNM	18			
		B*3701	1,6	11	LDANITKLL	300	
34	QELDKWASL			10			
B*3901	1	3	QWERQVRFL	14	9	RFLDANITKL	18
		10	FLDANITKL	14	2	QQWERQVRFL	18
		25	QQEKNMYEL	14			
B*3902	<0,1	25	QQEKNMYEL	20	24	IQEKNMYEL	20
		22	AQIQEKNM	10	27	EKNMYELQEL	20
					2	QQWERQVRFL	20
					33	LQELDKWASL	20

B*40	5,9	34	QELDKWASL	40	34	QELDKWASLW	40
		31	YELQELDKW	40	31	YELQELDKWA	40
					4	WERQVRFLDA	10
B*4403	4,9	31	YELQELDKW	54	34	QELDKWASLW	36
		34	QELDKWASL	12	22	AQIQQEKNMY	15
					31	YELQELDKWA	12
B*5101	5,2				21	EAQIQQEKNM	36
B*5102	0,1				21	EAQIQQEKNM	18
					6	RQVRFLDANI	13
B*5103	k.A.				21	EAQIQQEKNM	11
B*5201	0,6	2	QQWERQVRF	30	2	QQWERQVRFL	36
					6	RQVRFLDANI	20
B*60	k.A.	34	QELDKWASL	320			
		11	LDANITKLL	44			
B*61	k.A.	34	QELDKWASL	16	31	YELQELDKWA	40
					4	WERQVRFLDA	20
B*62	k.A.	2	QQWERQVRF	106	1	WQQWERQVRF	96
					22	AQIQQEKNMY	40
B*07	1,1	7	QVRFLDANI	20			
		28	KNMYELQEL	12			

Cw*0301	k.A.	28	KNMYELQEL	24	9	RFLDANITKL	24
		34	QELDKWASL	20			
Cw*0401	10,1	3	QWERQVRFL	80	9	RFLDANITKL	528
		8	VRFLDANIT	20	30	MYELQELDKW	11
		10	FLDANITKL	13			

**Tabelle 9.3.10 V2 (BIMAS)**

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*0201	27,2				24	IQNEKNMYEL	35
A*0205	1,1				24	IQNEKNMYEL	57
A*03	14,4				29	NMYELQKLDK	300
A*24	8,3	28	KNMYELQKL	16			
B*2702	0,5				22	AQIQNEKNMY	20
					1	WQWVERQVNF	20
					6	RQVNFWDANI	18



B*2705	2,8	1	WQWTERQVN	20	29	NMYELQKLDK	250
		2	QWTERQVNF	25	24	IQNEKNMYEL	200
		5	ERQVNFWDA	20	6	RQVNFWDANI	180
		6	RQVNFWDAN	60	8	VNFWDANIT	100
		8	VNFWDANIT	10	22	AQIQNEKNMY	100
		22	AQIQNEKNM	18	1	WQWTERQVNF	100
		25	QNEKNMYEL	20	19	LEEAAIQNEK	30
		28	KNMYELQKL	60	26	NEKNMYELQK	30
		33	LQKLDKVAS	20	5	ERQVNFWDA	20
					33	LQKLDKVAS	20
B*3701	1,6	11	WDANITKAL	60			
B*3901	1	25	QNEKNMYEL	14			
B*3902	<0,1	22	AQIQNEKNM	10	24	IQNEKNMYEL	20
					27	EKNMYELQEL	20
B*40	5,9	31	YELQKLDKW	40	31	YELQKLDKWA	40
					4	WERQVNFWDA	10
B*4403	4,9	31	YELQKLDKW	81	22	AQIQNEKNMY	15
					31	YELQKLDKWA	12
B*5101	5,2				21	EAQIQNEKNM	36
B*5102	0,1				21	EAQIQNEKNM	18
					6	RQVNFWDANI	13

B*5103	k.A.				21	EAQIQNEKNM	11
B*5201	0,6				6	RQVNFWDANI	10
B*5801	0,2	2	QWTERQVNF	88	2	QWTERQVNFV	211
B*60	k.A.	11	WDANITKAL	44			
B*61	k.A.				31	YELQKLDKWA	40
					4	WERQVNFWDVA	20
B*62	k.A.				1	WQWTERQVNF	96
					22	AQIQNEKNMY	40
					33	LQKLDKWAS	12
B*07	1,1	28	KNMYELQKL	12			
Cw*0301	k.A.	28	KNMYELQKL	24			
Cw*0401	10,1	38	KWASAWNWF	22	10	FWDANITKAL	60
					9	NFWDANITKA	13
					30	MYELQKLDKW	11

Tabelle 9.3.11 V2o (BIMAS)

HLA-Allel	Phänotyp in Europa [%]	lfd. Nr.	9mer	Punktwert	lfd. Nr.	10mer	Punktwert
A*0201	27,2				24	IQNEKNMYEL	34,7
A*0205	1,1				24	IQNEKNMYEL	57,1
B*07	1,1	28	KNMYELQKL	12			
B*14	4,5				5	ERQVDNITQT	13,5
B*2702	0,5	37	NQWDIFSNW	50	6	RQVDNITQTI	18
					22	AQIQNEKNMY	20
					33	LQKLNQWDIF	20
					37	NQWDIFSNUF	100
B*2705	2,8	6	RQVDNITQT	60	1	WQWVERQVDN	20
		22	AQIQNEKNM	18	2	QWVERQVDNI	15
		25	QNEKNMYEL	20	5	ERQVDNITQT	20
		28	KNMYELQKL	60	6	RQVDNITQTI	180
		33	LQKLNQWDI	60	19	LEEAQIQNEK	30
		37	NQWDIFSNUF	100	22	AQIQNEKNMY	100
					24	IQNEKNMYEL	200
					26	NEKNMYELQK	30
					33	LQKLNQWDIF	100
					37	NQWDIFSNUF	500
B*3901	1	25	QNEKNMYEL	13,5			

B*3902	<0,1	22	AQIQNEKNM	10	24	IQNEKNMYEL	20
					27	EKNMYELQKL	20
B*40	5,9	31	YELQKLNQW	40			
B*4403	4,9	31	YELQKLNQW	54	22	AQIQNEKNMY	15
B*5101	5,2				21	EAQIQNEKNM	36,3
B*5102	0,1				2	QWERTQVDNI	24,2
					6	RQVDNITQTI	15,97
					21	EAQIQNEKNM	18,15
B*5103	k.A.				21	EAQIQNEKNM	11
B*5201	0,6	33	LQKLNQWDI	18	6	RQVDNITQTI	24,2
		37	NQWDIFSND	10	33	LQKLNQWDIF	90
					37	NQWDIFSNDWF	41,2
B*62	k.A.	33	LQKLNQWDI	12	22	AQIQNEKNMY	40
		37	NQWDIFSND	26,4	33	LQKLNQWDIF	240
					37	NQWDIFSNDWF	176
Cw*0301	k.A.	28	KNMYELQKL	24			
Cw*0401	10,1	3	TWERTQVDNI	10	30	MYELQKLNQW	10
		38	QWDIFSNDWF	30			

## 10 DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde während meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Georg-Speyer-Haus, Paul-Ehrlich-Straße 42-44 in 60596 Frankfurt am Main angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dorothee Holm-von Laer für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe zu arbeiten. Ihre Betreuung und ständige Gesprächsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Marschalek möchte ich mich für die unkomplizierte Bereitschaft bedanken, diese Arbeit seitens der Universität Frankfurt am Main zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Radeke und Frau Prof. Dr. Ulrike Köhl danke ich herzlichst für die stete Ko-Betreuung sowie die konstruktiven Diskussionen während der Promotionszeit.

Ein besonderer Dank gilt dem von der DFG geförderten Graduiertenkolleg 1172 für die Finanzierung des Projektes sowie für die Möglichkeit des Austausches mit anderen Promotionsstipendiaten. Dies gewährte mir zudem Einblick in fremde Forschungsgebiete und bot Chancen für wertvolle Diskussionen.

Zudem danke ich allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses für fachliche und technische Hilfen, vor allem aber für die freundschaftliche Atmosphäre des Instituts. Insbesondere danke ich Dr. Shweta Pahujani, Dr. Lisa Egerer, Dr. Anne Hubert, Dr. Christoph Leder, Dr. Felix Hermann, Roswitha Seyd, Patricia Schult-Dietrich, Tefik Mervoci sowie den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dietrich für die stete Hilfsbereitschaft und Kooperation.

Für die Geduld, Unterstützung und Motivation möchte ich schließlich noch besonders Erik Reichert und seiner Familie danken.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

## 11 LEBENS LAUF

### FRANCES BRAUER

---

Geburtsdatum: 13.03.1979

Geburtsort: Gera

Staatsangehörigkeit: deutsch

### SCHULBILDUNG

---

1985 – 1989 Helene-Fleischer Oberschule, Gera

1989 – 1990 32. Oberschule, Gera

1990 – 1991 33. Oberschule, Gera

1991 – 1997 Karl-Theodor-Liebe-Gymnasium, Gera

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### BERUFS AUSBILDUNG

---

08/1997 – 06/1999 Berufskolleg Olsberg des Hochsauerlandkreises, Olsberg

Abschluss: Staatlich geprüfte biologisch-technische Assistentin

03/1999 Betriebspraktikum, Forschungsinstitut und Naturmuseum  
Senckenberg, Wilhelmshaven

### STUDIUM

---

09/1999 – 07/2005 Biotechnologiestudium, Fachhochschule Bingen, Bingen am Rhein

Abschluss: Diplom-Ingenieurin (FH)

03/2004 – 10/2004 Praxissemester, Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. von Laer, Georg-Speyer-  
Haus, Frankfurt am Main

Thema: „Detektion von M87o Antikörpern in HIV-Patienten“

11/2004 – 07/2005 Diplomandin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Holm-von Laer Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main  
Thema: „Analyse der humoralen Immunantwort gegen ein antivirales Transgen-Produkt im Rahmen einer Phase-I-Gentherapiestudie der HIV-Infektion“

## **PROMOTION**

---

09/2005 – 08/2006 Qualifizierungsjahr für FH-Absolventen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Holm-von Laer Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main

09/2005 – 08/2006 Qualifizierungsstipendium, Graduiertenkolleg GRK1172 Erforschung, Entwicklung und Sicherheit von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln - „Biologicals“

09/2006 – 09/2009 Doktorandin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Holm-von Laer, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main, Mitglied im Graduiertenkolleg GRK1172 Erforschung, Entwicklung und Sicherheit von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln - „Biologicals“

2006 – 2007 Doktorandensprecherin Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main

09/2006 Auslandsaufenthalt, Arbeitsgruppe Prof. Peter G. Stockley, “The Astbury Centre for Structural Molecular Biology”, University of Leeds, England

## 12 WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

### PUBLIKATIONEN

---

- Brauer, F., Schmidt, K., Zahn, R.C., Richter, C., Radeke, H.H., Schmitz, J.E., von Laer, D., Egerer, L.: A rationally engineered anti-HIV peptide fusion inhibitor with greatly reduced immunogenicity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Feb;57(2):679-88.
- Egerer L., Volk A., Kahle J., Kimpel J., Brauer F., Hermann F., von Laer D.: Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. *Mol Ther.* 2011 Jul;19(7):1236-44.
- Hermann, F.G., Egerer, L., Brauer, F., Dietrich, U. von Laer, D.: Mutations in gp120 contribute to reduced sensitivity to the membrane-anchored fusion inhibitor maC46. *J Virol.* 2009 May;83(10):4844-53.
- Van Lunzen, J., Glaunsinger, T., Stahmer, I., von Baehr, V., Baum, C., Schilz, A., Kuehlcke, K., Naundorf, S., Martinius, H., Hermann, F., Giroglou, T., Newrzela, S., Choi, I., Brauer, F., Brandenburg, G., Alexandrov, A., von Laer, D.: Transfer of autologous gene-modified T lymphocytes in HIV-infected patients with severe immunodeficiency. *Mol Ther.* 2007 May;15(5):1024-33.

### POSTERPRÄSENTATIONEN

---

- Egerer, L., Kahle, J., Brauer, F., Kimpel, J., Hermann, F. G. & von Laer D. (2009). Secretable antiviral C peptides for HIV gene therapy expressed from retroviral vectors exhibit substantial antiviral activity. Keystone Symposium: Prevention of HIV/AIDS, Keystone, Colorado, USA
- Brauer, F., Leder, C., Egerer, L., Hermann, H. & von Laer, D. (2008). Development of non-immunogenic HR2-derived peptides for HIV-1 entry inhibition. Deutsche Gesellschaft für Gentherapie, Berlin
- Müller, I., Bunka, D., Schult-Dietrich, P., Brauer, F., Adler, A., Stiegler, G., Katinger, H., Stockley, P. & von Laer, D. (2007). Isolation of RNA aptamers directed against HIV-1 Envelope-derived surface epitopes. Deutsch-Österreichischer AIDS Kongress, Frankfurt am Main
- Brauer, F., Müller-Choi, I., Hermann, F., Katinger, H., Bochennek K. & von Laer, D. (2006). Analysis of the humoral immune response against an HIV-1 transgene within a phase 1 clinical trial. Gesellschaft für Virologie, München



- Brauer, F., Müller-Choi, I., Hermann, F., Katinger, H. & von Laer, D. (2005). Analysis of the humoral immune response against an antiviral HIV transgene product within a phase 1 clinical trial. Gesellschaft für Virologie, Hannover

## **SONSTIGES**

---

Die in dieser Arbeit enthaltenen C-Peptidaminosäuresequenzen sind in folgenden Patentanmeldungen enthalten: Europäische Patentanmeldung am 09.01.2008 (Anmeldungsnummer: 08000298.3; Veröffentlichungsnummer EP2078726 A1) und PCT-Anmeldung am 09.01.2009 mit dem Titel „Secretable HIV entry inhibitory peptides for therapy of HIV infection“. Erfinder: von Laer, D. & Egerer, L. Veröffentlichung der Patentanmeldung am 15.07.2009

## **13 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Entwicklung eines HIV-inhibierenden Peptids mit verminderter Immunogenität“ von mir selbständig und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Frankfurt am Main, im Mai 2015

---

Frances Brauer