



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Design and synthesis of NLR and TLR based ligand-antigen conjugates

Willems, M.M.J.H.P.

Citation

Willems, M. M. J. H. P. (2012, November 1). *Design and synthesis of NLR and TLR based ligand-antigen conjugates*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20082>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20082>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift beschrijft het ontwerp, de synthese en de immunologische evaluatie van nieuwe NOD1, NOD2, TLR2 liganden en conjugaten van deze liganden met een peptide epitoom. Het immuunsysteem van zoogdieren bestaat uit een aangeboren en verworven component. Deze componenten werken samen om bescherming te bieden tegen ziekteverwekkers en/of deze effectief te bestrijden. Het aangeboren immuunsysteem wordt gekenmerkt door receptoren die moleculaire structuren, die uniek en afkomstig zijn van ziekteverwekkers, kunnen herkennen. Voorbeelden van deze receptoren zijn NOD1, NOD2 en TLR2, terwijl de moleculen die deze receptoren herkennen liganden worden genoemd. Nadat een receptor een ligand heeft herkend worden alarmsignalen afgegeven die de verworven component van het immuunsysteem activeren.

Het inleidende **Hoofdstuk 1** beschrijft beknopt de NOD1 en NOD2 receptoren, die in het cytosol voorkomen en de TLR2 receptor, die zich op het celmembraan van immuun cellen bevindt. Het hoofdstuk geeft verder een beknopt overzicht van structuur en activiteits-relatie studies van NOD1, NOD2 en TLR2 liganden. Ook wordt ingegaan op de mogelijke samenwerking of zelfs synergie van deze liganden, wat betreft hun effect op het immuunsysteem. Tenslotte worden er voorbeelden besproken van zogenoemde conjugaten, die bestaan uit een ligand en een daarmee covalent gebonden antigeen. Deze conjugaten worden beschouwd als voorlopers van toekomstige volledig synthetische vaccines.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese en immunologische evaluatie van conjugaten, die bestaan uit het NOD2 ligand muramyldipeptide (MDP) en een model peptide epitoom. Voor de verschillende conjugaten werd gevarieerd in de wijze waarop het MDP ligand met het peptide covalent kan worden gebonden. Het MDP is gebonden aan het *N*- of *C*-terminale uiteinde van het antigeen peptide, gebruikmakend van zowel de anomere positie als het *isoglutamine* zuur van het MDP. De verschillende conjugaten werden met behulp van een geautomatiseerde peptide synthese bereid. De anomere positie van MDP bleek onder zure condities labieler te zijn dan verwacht en bij de zure ontscherming en afsplitsing condities na afloop van de vaste dragersynthese bleek glycosidische bandbreuk op te zijn opgetreden. Ondanks deze nevenreactie werden de conjugaten zuiver in handen verkregen. Door acetylering van de 4,6-positie van

glucosamine in MDP werd de zuurstabiliteit verhoogd, maar de hydrolyse van het anomere centrum werd niet geheel verholpen. De immunologische evaluatie van de conjugaten liet zien dat NOD2 specifieke cellen nauwelijks werden geactiveerd en dendritische cellen weinig maturatie vertoonden. Daarentegen bleek de antigen presentatie van de conjugaten niet te zijn verminderd in vergelijking met het losse antigen peptide.

Hoofdstuk 3 beschrijft dat de activiteit van MDP kan worden verhoogd door de introductie van een lipofiele vetstaart. MDP derivaten met op de C-6-positie en de anomere positie van de glucosamine eenheid een vetstaart en een lysine verlengd MDP derivaat voorzien van een vetstaart werden gesynthetiseerd. Deze synthetische modificaties resulteerden in een NOD2 ligand met een verbeterd immunologisch profiel. Stimulatie van NOD2 specifieke cellen en een DC maturatie assay resulteerden in een toegenomen cytokine productie voor alle liganden. Op grond hiervan werd het C-6-gemodificeerde MDP derivaat gebruikt voor conjugatie doeleinden. Door middel van 'click' chemie werd dit MDP derivaat covalent aan het antigen peptide gebonden. Immunologische evaluatie van dit conjugaat resulteerde in een profiel vergelijkbaar met het zeer actieve TLR2-L Pam₃CSK₄-DEVA₅K conjugaat.

Hoofdstuk 4 behandelt de synthese en immunologische evaluatie van bis-conjugaten voorzien van een NOD2-ligand, een TLR2-ligand en een peptide epitoom. Er werd een set van verbindingen gesynthetiseerd die het NOD2 ligand MDP, het TLR2 ligand Pam₃CSK₄ en een model peptide epitoom bevatten maar die variëren in de bezetting door de liganden op de C- en N-terminale posities van het antigen. Voor de bereiding van de bis-conjugaten werd gebruik gemaakt van verschillende conjugatie technieken met als doel de zure hydrolyse van de glycosidische binding te onderdrukken en de invloed van de linker tussen epitoom en ligand op immunologische activiteit te onderzoeken. Alle conjugaten laten een positief immunologisch profiel zien. Er werd echter geen additief of synergetisch effect van de twee liganden in de conjugaten, betreffende DC maturatie en antigen presentatie, gevonden. De gebruikte conjugatie methoden bleken nauwelijks van invloed op de activiteit. Wel zijn er indicaties dat de positie van de liganden een effect heeft: de beste resultaten werden verkregen met het TLR2 ligand op de C-terminus en NOD2 ligand op de N-terminus.

In **hoofdstuk 5** wordt de synthese en evaluatie van conjugaten van het NOD1 ligand *iE-DAP* besproken. Op basis van gerapporteerde structuur-activiteitsrelaties werd de ligand *iE-DAP* als een stereo-isomeer mengsel ingebouwd in een set van NOD1 en NOD1/TLR2 mono- en bis-conjugaten. Het immunologisch profiel van de conjugaten bleek teleurstellend. De losse liganden bleken wel herkend te worden maar induceerden een lage cytokine productie.

In **hoofdstuk 6** is de synthese en evaluatie van een gemodificeerd TLR2 ligand, het urea-derivaat UPam₃CSK₄, beschreven. Deze modificatie blijkt actiever te zijn dan het gevestigde TLR2 ligand Pam₃CSK₄. De synthese van het overeenkomstig conjugaat UPam₃CSK₄-DEVA₅K laat een vergelijkbaar profiel als het Pam₃CSK₄-conjugaat zien. In een structuur-activiteitsrelatie studie wordt de serine positie van het urea-derivaat gevarieerd en blijken 2-aminobutane zuur (**X2**), propargyl glycine (**X7**) en allyl glycine (**X5**) de meest belovende modificaties te zijn voor verder onderzoek.

