



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthetic carbohydrate ligands for immune receptors

Reintjens, N.R.M.

Citation

Reintjens, N. R. M. (2020, February 27). *Synthetic carbohydrate ligands for immune receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/85676>

Version: 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/1887/85676>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/85676> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Reintjens, N.R.M.

Title: Synthetic carbohydrate ligands for immune receptors

Issue Date: 2020-02-27

Nederlandse samenvatting

Synthetische koolhydraat liganden voor immuunreceptoren

Het onderzoek, dat in dit proefschrift wordt beschreven, richt zich op de synthese van specifieke koolhydraten en conjugaten daarvan, die gebruikt kunnen worden voor de ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen kanker. Bij deze veelbelovende immunotherapie wordt het immuunsysteem zodanig geactiveerd dat tumorcellen worden aangevallen en gedood. Noodzakelijk is dat het immuunsysteem niet alleen wordt getraind om de tumor te herkennen maar dat er tevens een cellulaire immuunrespons opgewekt wordt, waarbij cytotoxische T-cellen en helper T-cellen worden geactiveerd om de kankercellen te doden. Het antigeen is de component in een vaccin, dat zorgt voor de specificiteit terwijl een adjuvant zorg draagt, dat het immuunsysteem geactiveerd wordt en er een cellulaire immuunrespons wordt opgewekt. Centraal hierbij staan dendritische cellen, die ziekteverwekkers zoals bacteriën en virussen kunnen herkennen, en het immuunsysteem kunnen activeren om deze pathogenen te bestrijden. Dendritische cellen bezitten een aantal receptoren, zoals Toll-like receptoren (TLRs) en NOD-like receptoren (NLRs), die elk specifieke moleculaire structuren, die behoren bij ziekteverwekkers, kunnen herkennen. Zodra zo'n moleculaire structuur, ook wel ligand genoemd, aan een van de receptoren van de dendritische cellen bindt, wordt een alarmsignaal afgegeven wat een proces op gang brengt dat de twee typen T-cellen kan activeren en daarmee de cellulaire immuunrespons op gang brengt. Deze moleculaire structuren werken dus om de vaccins te verbeteren en worden ook wel adjuvans (van het Latijnse *adjuvare*, dat helpen betekent) genoemd. Door het ontwerpen en synthetiseren van conjugaten, waarin een peptide antigeen covalent is gebonden met één of meerdere liganden voor receptoren op dendritische cellen, kunnen nieuwe vaccins worden verkregen.

Een andere manier om dendritische cellen te activeren, is het gebruik van antilichaam-recruterende moleculen. Deze moleculen vormen met al aanwezige antilichamen een immuuncomplex dat vervolgens kan binden aan Fc-receptoren op dendritische cellen. Door het ontwerpen en synthetiseren van conjugaten waarin een peptide antigeen covalent gebonden is aan antilichaam-recruterende moleculen kan een vaccin worden verkregen dat de gewenste immuunrepons opwekt. **Hoofdstuk 1** behandelt verschillende voorbeelden van adjuvanten en immunologisch actieve conjugaten als mogelijke vaccins.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese en de immunologische evaluatie van vier TLR4-ligand peptide-conjugaten. Het TLR4-ligand CRX-527 is een potent lipide A analogon (een molecuul dat sterk lijkt op een stukje van de bacteriële celwand van een ziekteverwekker), dat geschikt kan worden gemaakt voor conjugatie met een antigeen peptide. Hiervoor werd niet alleen de syntheseroute naar CRX-527 geoptimaliseerd, maar ook een efficiënte multi-gram synthese van de bijbehorende vetstaart ontwikkeld. Het bleek dat er gebruik gemaakt moest worden van een speciale silylidene beschermgroep om de vetstaarten goed te kunnen introduceren in het molecuul. Om te kunnen conjugeren werd CRX-527 uitgerust met een hydrofobe of een hydrofiele linker, die door middel van een ester of een amide binding op de C-6 positie van glucosamine werd geïnstalleerd. Bij de immunologische evaluatie van de losse CRX-527 liganden werd aangetoond dat de linker een belangrijk effect kan hebben. Zo zorgde de hydrofobe linker ervoor dat het er geen pro-inflammatoire cytokines werden geproduceerd, wat er op duidt dat het gemaakte CRX-527 ligand niet goed bindt aan de TLR4 receptor. Op grond hiervan werd de hydrofiele linker gekozen om CRX-527 covalent te binden met het DEVA₅K modelpeptide, dat een MHC-I epitoom bevat. Het ligand werd door middel van thiol/maleimide chemie geconjugerd aan de *N*-terminus of de *C*-terminus van dit antigene peptide. Uit de immunologische evaluatie bleek dat de ester conjugaten beter zijn in het activeren van de dendritische cellen dan de amide conjugaten, maar dat laatstgenoemden daarentegen voor een betere antigeen presentatie zorgen.

Hoofdstuk 3 beschrijft de synthese van vier conjugaten, waarbij het NOD2-ligand, muramyl dipeptide (MDP, een molecuul dat veel voorkomt in de bacteriële celwand) covalent is gebonden aan de *N*-terminus van een HPV-16 peptide epitoom, afkomstig van het human papilloma virus (HPV), dat baarmoederhalskanker veroorzaakt. Er zijn vier bisconjugaten gesynthetiseerd, waarbij naast MDP aan de *N*-terminus het TLR2-ligand, Pam₃CSK₄, aan de *C*-terminus van het HPV-16 peptide is geconjugerd. Voor de eerste generatie (bis)conjugaten werd een *O*-MDP bouwsteen met een *N*-acetyl of *N*-glycolyl groep gekoppeld via een isoglutaminezuur aan het antigene peptide met behulp van vaste drager chemie. Voor de synthese van de tweede generatie (bis)conjugaten werden twee bouwstenen, bestaande uit een MDP analogon met een *C*-glycosidische binding en voorzien van een *N*-acetyl of *N*-glycolyl groep, bereid. Belangrijke reacties in de synthese van deze *C*-MDP bouwstenen zijn: 1. Het introduceren van een anomere allyl; 2. een alkeenmetathese en 3. het reduceren van de verkregen alkeen. Het MDP *C*-analogon is stabiel onder de zure condities die behoren bij de geautomatiseerde vaste drager peptide chemie, waardoor de MDP

bouwstenen konden worden gekoppeld aan het vaste drager gebonden peptide en er geen extra conjugatie stappen nodig zijn na het assembleren van het peptide.

De mannose-6-fosfaat receptoren (MPR) zijn P-type lectines, die mannose-6-fosfaat glycanen binden, die aanwezig zijn op eiwitten in het Golgicomplex, waarna deze eiwitten naar de endosomen worden getransporteerd. Deze lectines komen ook voor op de buitenkant van cellen en kunnen dus gebruikt worden om een lading, voorzien van een mannose-6-fosfaat, de cel in te brengen. **Hoofdstuk 4** beschrijft de synthese van twee mannose-6-fosfonaat (M6Po) bouwstenen, die beide in plaats van een fosfaat monoëster een gestabiliseerde C-fosfonaat functie hebben, waardoor defosforylering door fosfatase enzymen wordt verhinderd. Bij de introductie van de C-fosfonaat functie bleek het gebruik van de isopropylidene beschermgroep in het mannose derivaat essentieel om ongewenste intramoleculaire cyclisatie te voorkomen. De *O*-M6Po bouwsteen is een *O*-mannoside met een anomere *O*-propargyl groep, die gebruikt wordt voor koper-gekatalyseerde azide-alkyn cycloadditie (een “klik-reactie”). De *C*-M6Po bouwsteen is een *C*-mannoside, die via een *C*-glycosidische band is uitgerust met een lysine spacer en daardoor gebruikt kan worden in een geautomatiseerd vaste drager peptide synthese protocol. Omdat lectines meestal meerdere bindingsdomeinen voor koolhydraat structuren bezitten zijn de liganden in een multivalente manier ingebouwd in de doelmoleculen. Zowel de *O*-M6Po als de *C*-M6Po bouwsteen is zes keer gekoppeld op de *N*- of de *C*-terminus van een antigeen peptide met behulp van respectievelijk “klik” chemie en vaste drager chemie. De aldus verkregen conjugaten kunnen door de MPR gebonden en opgenomen worden en zo een verbeterde immuunreactie opwekken. Daarnaast zijn er ook vier bisconjugaten met een TLR7-ligand gemaakt wat de immuunrepons verder kan verbeteren.

Hoofdstuk 5 beschrijft de synthese van twee *C*-rhamnose gefunctionaliseerde lysine bouwstenen, die met behulp van vaste drager chemie eenmaal, tweemaal, driemaal, of zesmaal covalent gebonden zijn aan het antigeen peptide LEQLESIINFELKAAAAAK, dat een MHC-I klasse epitoom bevat. De multivalente presentatie van rhamnose in deze conjugaten kan de binding met anti-rhamnose antilichamen bewerkstelligen waardoor een immuuncomplex wordt gevormd dat vervolgens aan de Fc-receptor op dendritische cellen kan binden met een verhoogde immuunreactie tot gevolg. De gebruikte bouwstenen verschillen in de linker maar hebben een zuur-stabiele *C*-glycosidische binding en zijn beschermd met de zuur-labele *p*-methoxybenzyl groepen waardoor ze uitermate geschikt zijn voor vaste drager peptide chemie.

Hoofdstuk 6 beschrijft de synthese van vier C-glycosides: α -mannose, β -N-acetylglucosamine, β -galactose en α -galactose, die beschermd zijn met zuur-labiele beschermgroepen en gekoppeld zijn aan lysine. Deze bouwstenen kunnen worden gebruikt om glycopeptiden te synthetiseren met behulp van geautomatiseerde peptide synthese op een vaste drager, want de C-glycosidische bindingen zijn zuurstabiel terwijl de verwijdering van de beschermgroepen samen met de afsplitsing van het glycopeptide van de vaste drager kan plaatsvinden. Tijdens de synthese van deze bouwstenen zijn de volgende reacties belangrijk: de alkeenmetathese met behulp van een Grubbs katalysator, de reductie van het gevormde alkeen en de verzeeping van de methyl ester om koppeling met de zijketen van de lysine te kunnen bewerkstelligen.