



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Design, synthesis, and evaluation of antigenic peptide conjugates containing Toll-like receptor agonists

Ende, T.C. van den

Citation

Ende, T. C. van den. (2023, February 21). *Design, synthesis, and evaluation of antigenic peptide conjugates containing Toll-like receptor agonists*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3564186>

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/1887/3564186>

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

Nederlandse samenvatting

Pathogeen herkende receptoren (PRRs) behoren tot de eerste verdedigingslinie van gewervelde dieren ter bestrijding van invasies van pathogenen door de initiatie van het aangeboren immuunsysteem. De PRRs van antigeen-presenterende cellen (APCs) spelen een belangrijke rol bij het herkennen van pathogenen wanneer die het lichaam binnendringen. Er bestaan verschillende typen PRRs en elk type receptor is geëvolueerd om een pathogeen specifiek moleculair patroon (PAMP) te herkennen en te binden. Wanneer een PAMP bindt aan de bijbehorende receptor op een APC, stimuleert dit de APC om te matureren en zijn cytokineproductie te verhogen. Daarnaast begint de APC meer materiaal uit de omgeving op te nemen doormiddel van endocytose. Binnenin de APCs wordt dit materiaal afgebroken waarbij uit eiwitten korte oligopeptiden worden gevormd die als epitooop kunnen dienen. Na maturatie begint de APC epitopen te presenteren op de major histocompatibiliteit complexen (MHCs) op de buitenkant van deze cellen. Vervolgens migreren de APCs richting de dichtstbijzijnde lymfeklier waar ze aan een complementaire receptor van een T-cel binden waardoor het aangeboren immuunsysteem wordt geactiveerd. Er wordt veel onderzoek verricht naar de mogelijkheid om met behulp van specifieke epitopen en gedefinieerde PAMPs voor specifieke PRRs het immuunsysteem zodanig te manipuleren dat nieuwe vaccins kunnen worden ontwikkeld. Wanneer zowel een epitooop als een PRR-ligand in een enkele moleculaire entiteit aanwezig is kan dit leiden naar een zogenoemd zelf-adjuverend vaccin dat mogelijk ziekten kan bestrijden waarvoor nog geen vaccin beschikbaar is. **Hoofdstuk 1** illustreert de recente vooruitgang op het gebied van zelf-adjuverende vaccins door de bespreking van negen artikelen over dit ontwerp en de synthese van conjugaten, bestaande uit één (of meerdere) peptide antigen(en) en één (of meerdere) Toll-like receptor 2 (TLR 2) ligand(en).

Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd omvat het ontwerp en de synthese van verschillende zelf-adjuverende vaccins en het onderzoek naar hun immunologische potentie. Onderzoekresultaten uit het verleden hebben aangetoond dat wanneer antigenen covalent gebonden worden aan een TLR-ligand, zowel de antigeen presentatie als de T-cel activatie van zo'n conjugaat verbeterd in vergelijking met een mengsel van de losse moleculaire onderdelen. **Hoofdstuk 2** presenteert de synthese van een groep van negentien conjugaten, waarin een antigeen bevattende peptide covalent gekoppeld is aan 1-tetradecyl-urea-Cys((RS)-2,3-di(palmitoyloxy)-propyl)-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys, een artificieel TLR2 ligand, UPam genaamd. De antigenen kunnen in drie groepen verdeeld worden op basis van het type epitooop dat ze bevatten namelijk humane neoantigenen (MHC I), muizen neoantigenen (MHC I en MHC II) en T-cel epitopen relateert aan peptide verwerking. Daarnaast is in een deel van de muizen neoantigenen het natuurlijke C-terminale einde van het peptide verwijderd terwijl bij anderen het natuurlijke N-terminale einde is vervangen door Ala₅Lys of Lys₆. Met deze modificaties kan men onderzoeken of verschillende peptiden die eenzelfde epitooop bevatten, in staat zijn om vergelijkbare presentatie op MHCs en proliferatie van T-cellen te induceren. Op het ogenblik zijn deze op muizen gerichte conjugaten alleen getest op hun vermogen DC maturatie te induceren, waarbij het vervangen van de natuurlijke flankerende regio's weinig

tot geen effect bleek te hebben op de activiteit van UPam. In de toekomst moeten de verschillende conjugaten getest en vergeleken worden op hun vermogen om T-cellen te activeren om vast te kunnen stellen of de aanpassingen getolereerd worden door het immuunsysteem. De resultaten die verkregen zijn voor de conjugaten met een humane epitooop bevattende peptide worden in **Hoofdstuk 4** besproken.

Hoofdstuk 3 beschrijft de synthese van een bibliotheek van zestien chiraal zuivere UPam derivaten. Deze zijn getest op hun TLR-2 activiteit om de huidige consensus omtrent het ontwerpen van lipopeptides als ligand voor TLR2 te bevestigen en UPam verder te optimaliseren. Volgens de huidige theorie past het aminozuur serine van UPam in een kleine holte van de TLR2 receptor en zou het vervangen van serine door een aminozuur met een groter zijketen de activiteit van Upam moeten verminderen. Tevens is een R-geconfigureerde glycerol noodzakelijk voor activiteit van het ligand. De bibliotheek kan opgesplitst worden in 3 groepen UPam derivaten op basis van het verwachtte effect van de modificatie op de activiteit en de functie, namelijk positief, negatief en controle verbindingen. Alle derivaten zijn succesvol verkregen doormiddel van vaste fase peptide synthese en zuivering met HPLC. De gehele bibliotheek aan derivaten is getest op hun vermogen om dendritische cellen (DCs) te matureren door de IL-12 productie te bepalen. De resultaten kwamen overeen met de huidige paradigma's. Conjugaten die een S-georiënteerde glycerol of een aminozuur met een grote zijgroep bevatten vertoonden praktisch geen activiteit. Over het algemeen waren de UPam derivaten die kleine aminozuren bevatten actiever met als beste kandidaat 2,4-L-diaminoboterzuur.

Hoofdstuk 4 beschrijft het ontwerp, de synthese en de evaluatie van humane neoantigenen bevattende peptiden die gefunctionaliseerd zijn met mini-UPam, een vereenvoudigde versie van UPam. Ondanks een versimpelde structuur met maar één enkele lipide staart en een glycerol linker vertoont mini-UPam een superieure TLR2 activiteit ten opzichte van Upam. Dit hoofdstuk behandelt de procedure om dit soort conjugaten te synthetiseren en hun vermogen om een T-cel proliferatie te induceren. Zeven van de acht doelverbindingen zijn succesvol gesynthetiseerd door middel van vaste fase peptide synthese, waarvan twee conjugaten vergeleken zijn met hun Upam tegenhanger en het mengsel met hun individuele onderdelen. DCs activatie is vastgesteld aan de hand van IL-8 productie in HEK cellen en IL-12 productie en CD86 expressie in myeloïde afgeleide dendritische cellen. Alle mini-Upam conjugaten toonde superieure TLR-2 activiteit ten opzichte van hun UPam tegenhanger op basis van de gemeten factoren. Het vermogen van de conjugaten om T-cellen te activeren is onderzocht door de expressie van CD4 en CD137 te volgen op T-cellen. Alleen het zelf-adjuverende vaccin waarin een MHC-I epitooop verwerkt is, liet verbeterde T-cel proliferatie zien. Het verschil in proliferatie ten opzichte van de MHC-II bevattende conjugaten wordt verklaard aan de hand van de verschillende wegen in de cel die beide conjugaten volgen voordat het epitooop op een MHC geladen wordt.

Het verwerken van verschillende klasse TLR-liganden in een enkele moleculaire entiteit heeft de potentie om synergistische effect te hebben op de immunologische eigenschappen. Vier dual gefunctionaliseerde conjugaten zijn ontworpen om dit potentieel synergistische effect vast te stellen met verbeterde antigeen presentatie en T-cel activatie. Alle conjugaten

bevatten een TLR-2 ligand, een TLR-7 ligand en een peptide waarin een muizen epitoom is verwerkt. Het ontwerp, de synthese en de evaluatie van deze conjugaten wordt beschreven in **Hoofdstuk 5**. Door eerst de peptiden te synthetiseren door middel van geautomatiseerde vaste drager peptide synthese, beide liganden te installeren, de conjugaten van de drager af te splitsen en tenslotte zuivering met HPLC, zijn alle vier de duale conjugaten succesvol verkregen. Door de CD40, CD70, CD80, CD86 en MHCII-expressie en de productie van IL-12 van de duale conjugaten in vergelijking met referentie conjugaten te meten in D1 DCs is het effect van de aanwezigheid van deze twee liganden bepaald. De resultaten laten zien dat DCs meer IL-12 produceren wanneer ze blootgesteld worden aan een duaal conjugaat. Echter, er wordt geen significant verschil geobserveerd in de expressie van de CD40, CD70, CD80, CD86 en MHCII. In **Hoofdstuk 6** tenslotte worden de onderzoeksresultaten samengevat en aanbevelingen gegeven voor toekomstig onderzoek.