

Diss. ETH Nr. 12570

**Nonapeptide Analogues Containing
(*R*)-3-Hydroxybutanoate or β -Homoalanine Oligomers:
Synthesis and Binding Affinity to a Class I MHC Protein**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

Sorana Poenaru
Dipl. Ing. Chem.
(European High Institute of Chemistry, Strasbourg)

born January 16, 1971
in Strasbourg (France)

Accepted on the recommendation of:

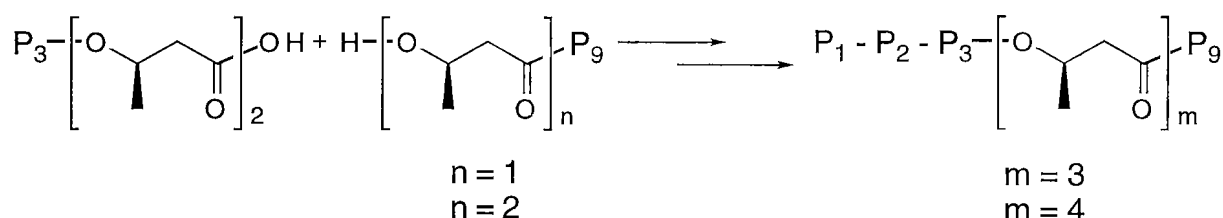
Prof. Dr. Gerd Folkers, examiner
Prof. Dr. Dieter Seebach, co-examiner
Dr. Didier Rognan, co-examiner

Zürich 1998

A. Thesis Summary

The trimolecular complex consisting of the T-cell receptor (TCR), the antigenic peptide and the major histocompatibility complex protein (MHC) is at the centre of the immune system. The natural antigens can be considered as promising initial targets for the design of new generations of immunomodulators. The aim of this work was to synthesise non-peptidic analogues of the natural MHC ligand. The synthesis by *Seebach et al.* of entirely monodisperse 3-hydroxybutyrate oligomers ((3-HB)_n) and the physical properties of poly(3-hydroxybutyrate) (P(3-HB)) have opened some new opportunities in the use of polyalkanoates in medicinal chemistry applications. The fact that such oligomers are known to be part of ion channels and adopt conformations similar to those found for peptides, suggests that 3-HB oligomers may be useful in the construction of peptide mimetics. The structural data and the length of the oligomers (3-HB)₃ and (3-HB)₄ closely resemble those of the flexible part of the HLA B-27 protein antigenic ligand. Peptide analogues containing these oligomers, incorporated as spacers in the middle of a peptide (to replace the P₄-P₈ section in the natural MHC ligand), have been synthesised (Fig. A).

Fig. A: Schematic representation of the synthetic route to obtain the 3-HB containing analogues. P_n represent amino acids

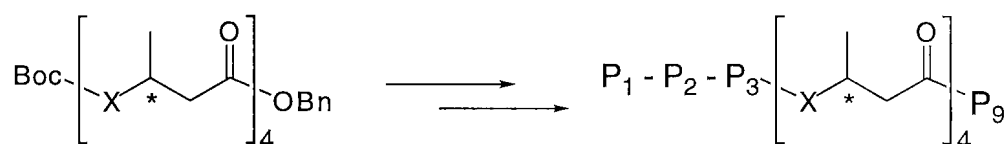


The amino acids P₁, P₂, P₃ and P₉ were chosen after consideration of molecular modelling studies performed by *Folkers et al.* Of the many possible synthetic strategies we used the fragment coupling procedure, whereby the acid terminus of a (3-HB)₂ segment was coupled with lysine (P₉), whereas the hydroxy terminus of another 3-HB or (3-HB)₂ segment was coupled with leucine (P₃). Coupling, using standard methods, of the two compounds shown above resulted in a peptide analogue with the (3-HB)₃ or (3-HB)₄ oligomers covalently bound to two amino acid

residues. The coupling of the amino acids P_1 (Gln or Ala) and P_2 (Arg) was achieved by traditional peptide coupling methods.

The recent results on β -peptides, such as their stability to peptidases, led us to the hypothesis that a spacer containing β -homoalanine (β -HAla) and 3-HB or only β -homoalanine oligomers might also be good candidates for inclusion in nonapeptide analogues that may bind HLA-B27. Such compounds have been synthesised, using a stepwise coupling strategy for the introduction of the α -amino acids at the N and C termini of the oligomers.

Fig. B: Schematic representation of the synthetic route to obtain the β -HAla containing analogues. P_n represent amino acids; $X = O$ or NH



All synthesised analogues bind to the HLA-B27 with a high affinity. It was very surprising to find that the nonapeptide analogues, containing four HB units, binds five times more tightly than the natural ligand.

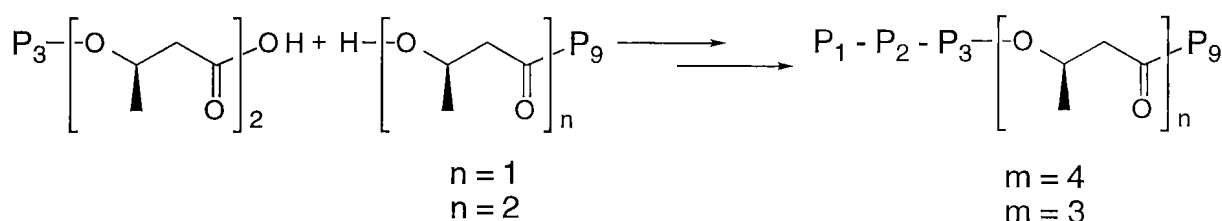
Consequently, the replacement of (3-HB), β -HAla-HB and β -HAla oligomers for a pentameric peptidic sequence of the class I MHC binding peptide is synthetically feasible, and does not impair the binding affinity of the host protein. Such modifications of the natural peptide might lead to a novel class of selective immunosuppressors.

B. Résumé de la Thèse

L'élaboration de traitements contre les maladies auto-immunes nécessite la compréhension et la connaissance des mécanismes immunologiques intervenant dans ces maladies. Le système trimoléculaire constitué du récepteur des lymphocytes T (TCR), du peptide antigénique et de la protéine du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) est au centre des relations entre les cellules cibles et les cellules effectrices du système immunitaire. Grâce aux connaissances acquises sur les interactions CMH-peptide-TCR, une pharmacologie du récepteur des lymphocytes T et de ses ligands est née et leur utilisation en immunothérapie de maladies auto-immunes s'est fortement développée. Dans cette optique, notre désir était de synthétiser des analogues de peptides ligands de HLA-B27. L'identification des peptides associés au CMH, l'analyse radiocristallographique des complexes peptide-CMH et la modélisation moléculaire effectuée par le groupe Folkers, ont permis de déterminer les résidus d'ancrage avec le CMH (P_1, P_2, P_3, P_9 ; P_n étant des acides α -aminés) et les résidus de contact avec le TCR (partie à modifier) ont été déterminés. Ainsi, le travail développé pendant ma thèse a été de synthétiser des analogues de ligand d'une famille de protéines CMH de classe I en vue d'inhiber une réponse immune.

La présence de poly(3-hydroxybutyrate) (P(3-HB)) dans les membranes de cellules eukaryotiques et le fait que ces oligomères peuvent adopter une conformation similaire à celle trouvée pour les peptides ont suggéré l'utilisation d'oligomères contenant 3 ou 4 unités de 3-HB dans la synthèse d'analogues de nonapeptides se liant aux CMH de classe I (Fig. C).

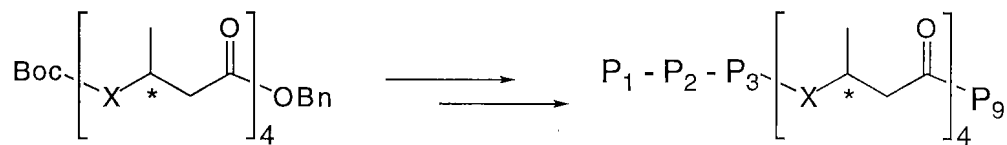
Fig. C: Représentation schématique de la synthèse d'analogues de nonapeptides contenant des oligomères du 3-HB. P_n sont des acides α -aminés



Notre but a été de synthétiser de telles analogues de nonapeptides (dont la partie central P₄-P₈ du ligand naturel a été remplacée par des oligomères du 3-HB) en utilisant les méthodes de synthèse développées par le groupe *Seebach* ainsi que les méthodes de la synthèse peptidique classique. L'une des voies de synthèse utilisée, a été de coupler, dans un premier temps, l'acide terminal d'un segment (3-HB)₂ à la lysine (P₉), tandis que le groupe hydroxy d'un autre segment 3-HB ou (3-HB)₂ a été lié à la leucine (P₃). Les analogues de nonapeptides ont été obtenus par un couplage intramoléculaire des deux segments, puis par l'introduction des acides α-aminés P₁ et P₂.

Les résultats récemment publiés sur le β-peptides, comme par exemple leur plus grande stabilité (que les α-peptides) vis-à-vis des peptidases, nous ont encouragé à synthétiser d'autres analogues de nonapeptides dont la partie "espaceuse" était remplacée par des β-peptides constitués de β-Homoalanine (β-HAla) ou des oligomères alternés de 3-HB et β-HAla (Fig. D).

Fig. D: Représentaion schematique de la synthèse d'analogues de nonapeptides contenant des oligomères de β-HAla. P_n sont des acides α-aminés; X = O ou NH



Ainsi nous avons synthétisé plusieurs analogues de nonapeptides dont l'affinité pour HLA-B27 se sont avérés être, dans le meilleur des cas, quatre fois supérieurs à ceux obtenus pour le ligand naturel.

Par conséquent, la synthèse de telles analogues de nonapeptides est réalisable et ces analogues n'affectent pas les valeurs d'affinité avec la protéine du CMH. Ainsi, Ce type de modification de peptides naturels peut donc mener à une nouvelle classe d'immunosupresseurs selectifs.