



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthesis of oligosaccharide libraries from GBS capsular polysaccharides for structure-based selection of vaccine candidates

Del Bino, L.

Citation

Del Bino, L. (2020, October 28). *Synthesis of oligosaccharide libraries from GBS capsular polysaccharides for structure-based selection of vaccine candidates*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137932>

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/1887/137932>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137932> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Del Bino, L.

Title: Synthesis of oligosaccharide libraries from GBS capsular polysaccharides for structure-based selection of vaccine candidates

Issue date: 2020-10-28

Italian Summary (Riassunto)

Il design di nuovi vaccini glicoconiugati, per i quali sia possibile stabilire una correlazione fra immunogenicità e struttura dell'epitopo, richiede la disponibilità di frammenti oligosaccaridici con una struttura ben definita. In alcuni casi, questi oligosaccaridi possono essere ottenuti per depolimerizzazione del polisaccaride capsulare (CPS) e successiva selezione dei frammenti più corti. In altri casi invece, questo approccio non può essere applicato per la mancanza di metodi chimica e/o enzimatici per depolimerizzare il CPS. Questo problema viene riscontrato, per esempio, con i serotipi Ia e Ib di Group B streptococcus (GBS o *Streptococcus agalactiae*), per i quali la sintesi chimica è l'unico modo per ottenere oligosaccaridi corti e definiti da impiegare per mappare l'epitopo minimo.

Nel Capitolo 1 di questa tesi viene presentata una panoramica sui vaccini glicoconiugati, sulla loro efficacia e sul loro meccanismo d'azione in confronto con i vaccini polisaccaridici, e vengono descritti gli approcci tradizionali per la loro preparazione. Infine si fa riferimento a metodi chimici ed enzimatici che sono stati applicati con successo per accelerare la sintesi di antigeni oligosaccaridici.

Nel Capitolo 2 viene descritta l'epidemiologia di GBS, con particolare riferimento ai sintomi, alle differenze fra le manifestazioni cliniche che si presentano entro la prima settimana di vita del neonato (Early On-Set Diseases, EOD) e quelle che compaiono invece successivamente (Late On-Set Diseases, LOD), alle principali strategie di prevenzione e alla diffusione dei vari serotipi sulla base dell'età del paziente. Si sottolinea come un vaccino multivalente che comprenda i serotipi maggiormente diffusi (Ia, Ib, II, III, IV, V) sia necessario per prevenire la comparsa di patologie causate da GBS sia in neonati che in pazienti anziani o immunocompromessi. Il capitolo si conclude con una revisione delle sintesi pubblicate delle unità ripetenti di GBS Ia e III: metodi chemo-enzimatici, reazioni one-pot e strategie regioselettive sono approcci impiegati per ottenere gli oligosaccaridi complessi di GBS e ciò sta a sottolineare come i progressi nella chimica dei carboidrati possono dare accesso a strutture biologicamente rilevanti per migliorare vaccini glicoconiugati che sono già in commercio oppure per svilupparne di nuovi.

Nel capitolo 3 si descrive una strategia di glicosilazione regioselettiva per la sintesi del sintone GlcNAc β 1-3Gal, che è presente in molti saccaridi di interesse biologico, fra cui i polisaccaridi di GBS Ia e Ib. Vari tentativi sono stati fatti per ottimizzare la glicosilazione regioselettiva del 3-OH del galattosio allo scopo di ottenere il disaccaride desiderato con alte rese e completa regioselettività e avere di conseguenza una sintesi più rapida delle strutture ramificate di GBS Ia e Ib. Infatti, i polisaccaridi capsulari di GBS Ia e Ib presentano una struttura molto simile, dato che l'unità ripetente di entrambi è un pentasaccaride composto dagli stessi residui monosaccaridici con l'unica differenza del legame fra il galattosio della catena laterale e la glucosammina che è di

tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) nell'Ia e β -(1 $\rightarrow$ 3) nell'Ib. Data questa analogia strutturale, con un numero limitato di building block e un design sintetico comune si possono preparare glicani di entrambi i serotipi. Per ottimizzare la glicosilazione regioselettiva è stato effettuato uno screening su diverse condizioni di reazione usando come donatori glucosammine con vari gruppi protettivi ortogonali al C-3 e al C-4. Esteri benzoilici e eteri benzilici sono stati invece installati come gruppi protettivi sul galattosio accettore per studiare il loro effetto stereo-elettronico. I risultati hanno mostrato che, quando il 2,6-di-benzoil galattosio è stato usato come glicosil accettore, solo il disaccaride β (1 $\rightarrow$ 3) desiderato è stato isolato, indicando che l'effetto elettron-attrattore del gruppo benzoile (OBz) ha un effetto positivo sulla regioselettività della reazione. Inoltre, il risultato della glicosilazione sembra beneficiare anche della tensione torsionale del anello benzilidenico, che, bloccando gli ossidrili in posizione 4 e 6 della glucosammina, ha un effetto disattivante. Sintoni disaccaridici che possono essere allungati alla posizione C-4 del galattosio e al C-3 o C-4 della glucosammina sono stati così ottenuti e il loro uso come intermedi per la sintesi di glicani derivanti dalla capsula di GBS è discusso nei successivi capitoli.

Il disaccaride GlcNAc β 1-3Gal recante un gruppo protettivo temporaneo al C-4 della glucosammina e che è stato ottenuto con la resa più alta e con completa regioselettività, è stato quindi selezionato come intermedio per la sintesi di vari frammenti derivanti dal CPS del serotipo Ia, come riportato nel Capitolo 4. La libreria di oligosaccaridi sintetizzata comprende l'unità ripetente pentasaccaridica (sia nella forma lineare che ramificata), un tetrasaccaride non-sialilato, due esasaccaridi e un eptasaccaride. Tutti i composti sono stati sintetizzati usando un approccio convergente e un linker amminopropilico è stato installato all'estremità non riducente in modo da poterlo sfruttare per ulteriori manipolazioni del saccaride finale o per la coniugazione alle proteine.

Grazie all'approccio regioselettivo che è stato sviluppato, la sintesi dell'unità ripetente di GBS Ia è stata ottimizzata in termini di numero di reazioni e gruppi protettivi usati. Inoltre, frammenti più lunghi di una singola unità ripetente sono stati preparati con elevata efficienza e usando un numero limitato di building block.

La stessa strategia sintetica è stata poi applicata alla sintesi di glicani derivanti dal GBS Ib e, a tale scopo, un disaccaride GlcNAc β (1 $\rightarrow$ 3)Gal recante un gruppo protettivo temporaneo al C-3 della glucosammina è stato selezionato per essere allungato come descritto nel Capitolo 5. Formare il legame β (1 $\rightarrow$ 3) fra il disaccaride Neu5Aca2-3Gal e il 3-OH della glucosammina si è dimostrato particolarmente impegnativo. Per questo motivo, la reattività di questo ossidrile è stata modulata tramite l'utilizzo di gruppi protettivi differenti sull'ammina vicinale e sugli altri gruppi -OH della glucosammina. In particolare, il gruppo *N*-ftaloil, precedentemente utilizzato per i saccaridi di GBS Ia, è stato sostituito con l'*N*-tricloroetossi carbonil, avente minor carattere elettron attrattore, mentre il sililidene, più flessibile del corrispondente benzilidene, è stato

installato per bloccare i 4,6-OH della glucosammina. Queste modifiche hanno permesso quindi di sintetizzare l'unità ripetente, sia nella forma lineare che ramificata, del serotipo Ib di GBS.

Le unità ripetenti ramificate di GBS Ia e Ib sono state usate per studi strutturali tramite un approccio combinato di NMR e Dinamica Molecolare per investigare le preferenze conformazionali dei polisaccaridi corrispondenti. L'analisi conformazionale, intrapresa a partire dalle singole unità ripetenti, ha evidenziato come differenza principale fra i due serotipi la presentazione del disaccaride Neu5Ac- α -(2 $\rightarrow$ 3)-Gal, con una popolazione prevalente *exo-anti- Φ* per l'Ia e *exo-syn- Φ* per l'Ib.

Entrambi i polisaccaridi hanno uno scheletro a forma di elica rilassata, con una struttura più rigida e ripetitiva per il polisaccaride Ia. Il polisaccaride Ib ha invece una conformazione preferita meno definita e un'area esposta al solvente più ampia. Queste differenze potrebbero determinare l'esposizione di epitopi differenti da parte dei due polisaccaridi e ciò giustificerebbe la risposta immunitaria serotipo-specifica che è stata osservata per GBS Ia e Ib.

Per verificare quest'ipotesi, è stato intrapreso uno studio delle interazioni fra due anticorpi monoclonali (uno anti-PS Ia e l'altro anti-PS Ib) e gli oligosaccaridi sintetici preparati, i cui risultati sono descritti nel Capitolo 6. Esperimenti di competizione tramite SPR hanno mostrato l'affinità dei frammenti saccaridici per gli anticorpi funzionali serotipo-specifici. Mentre per il serotipo Ia i glicani sintetizzati non hanno mostrato un'alta affinità per il corrispondente monoclonale (anche se gli esasaccaridi presentano una migliore interazione rispetto alla singola unità ripetente), il pentasaccaride ramificato di GBS Ib ha inibito completamente il legame fra il coniugato HSA-PS Ib immobilizzato sul chip e il monoclonale anti PS Ib. Partendo da questo risultato, esperimenti di STD-NMR hanno permesso di mappare a livello atomico le interazioni di questo pentasaccaride con l'anticorpo, evidenziando in particolare un'alta saturazione per i protoni del disaccaride sialico-galattosio e del glucosio. Tali posizioni sembrano pertanto essere coinvolte nel legame con il monoclonale. Lo stesso può essere detto anche per i protoni dell'acetammide dell'acido sialico che, in confronto con l'acetammide della glucosammina, presenta un segnale STD più intenso.

Per testare l'immunogenicità degli oligosaccaridi sintetici e confermare i risultati delle analisi strutturali, è necessario coniugare i glicani a una proteina carrier, la quale fornisce gli epitopi che, attivando le cellule T, sono necessari per lo sviluppo della memoria immunologica. I frammenti sintetici di GBS Ia e Ib sono stati quindi coniugati al classico carrier CRM₁₉₇ per vedere la loro capacità di indurre una risposta immunitaria *in vivo*. I coniugati sono stati preparati in modo da avere un rapporto molare saccaride/proteina di almeno 10:1, in quanto un maggior grado di glicosilazione è spesso fondamentale per ottenere una risposta immunitaria con oligosaccaridi corti, come è stato recentemente dimostrato per GBS III. I glicoconiugati sono stati caratterizzati con SDS-Page, Western Blot e microBCA per misurare il contenuto in proteina, mentre la quantifica del saccaride, e di conseguenza il rapporto saccaride/proteina, è stata effettuata tramite HPAEC-PAD. Lo studio animale in corso dirà se l'esposizione multivalente di questi saccaridi corti

permette loro di assumere caratteristiche antigeniche tipiche dei polisaccaridi. Inoltre i glicoconiugati così preparati saranno usati per completare la mappatura dell'epitopo minimo, studiando la loro affinità in termini di cinetica con gli anticorpi monoclonali serotipo-specifici.

Allo scopo di dimostrare che identificare l'epitopo minimo di polisaccaridi molto complessi è propedeutico al design razionale di glicoconiugati basati su carboidrati sintetici, il Capitolo 7 riporta un approccio strutturale per ottenere un vaccino glicoconiugato contro il serotipo III di GBS. Un esasaccaride di GBS III è stato progettato e sintetizzato a partire dalla struttura cristallografica di un frammento semisintetico di GBS III (due unità ripetenti, DP2, ottenuto per idrolisi del PSIII) con il Fab. Questo esasaccaride comprende tutte le porzioni coinvolte nell'interazione con il Fab e consiste di una unità ripetente ramificata più una seconda glucosammina. Studi strutturali e conformazionali hanno confermato che l'esasaccaride è riconosciuto da un anticorpo monoclonale funzionale anti PS III in modo simile al dimero ottenuto per depolimerizzazione. La coniugazione dell'esasaccaride alla proteina carrier CRM₁₉₇ ha portato ad ottenere due glicoconiugati con grado di glicosilazione diverso. Quando sono stati testati in vivo, solo il coniugato con un rapporto saccaride /proteina di circa 8 ha indotto una risposta immunitaria robusta e funzionale, non inferiore a quella del coniugato del PS III, confermando che questa struttura è l'epitopo minimo di GBS III.

E' inoltre da notare che il coniugato dell'esasaccaride ha mostrato una produzione predominante di IgG rispetto alle IgM, cosa importante per un vaccino che ha lo scopo di indurre la formazione soprattutto di IgG in grado di attraversare la placenta. Mentre in letteratura è suggerito che GBS III sia un esempio di epitopo conformazionale molto complesso, per il quale strutture lunghe sono richieste per presentare epitopi immunogenici, l'approccio descritto nel Capitolo 7 cambia questa visione, dimostrando che un saccaride sintetico corto può essere progettato per contenere tutte le caratteristiche strutturali necessarie a indurre una risposta immunitaria.