



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Synthesis, structure and epitope mapping of well-defined *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides

Østerlid, K.E.

Citation

Østerlid, K. E. (2025, May 22). *Synthesis, structure and epitope mapping of well-defined Staphylococcus aureus capsular polysaccharides*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4246935>

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/1887/4246935>

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

Samenvatting in het Nederlands

Synthese, structuur en epitooop studies van goed-gedefinieerde *Staphylococcus aureus* capsulaire polysacchariden

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is een grampositieve bacterie die deel uitmaakt van het menselijke microbioom en ernstige infecties kan veroorzaken bij immuun gecompromitteerde personen, zoals gehospitaliseerde patiënten, ouderen en pasgeborenen. De opkomst van antibioticaresistente stammen dringt aan op de ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën, waarbij vaccinatie een belangrijke methode is. Eerdere glycoconjugaat vaccins om *S. aureus*-infecties te bestrijden, die gebruikmaakten van de geïsoleerde capsulaire polysacchariden CP5 en CP8, voldeden niet tijdens de eindfase van klinische proeven, wat de focus in dit proefschrift op goed gedefinieerde synthetische materialen heeft doen ontstaan. De celwand van *S. aureus* bestaat uit verschillende glycopolymeren welke allemaal als antigenen kunnen worden beschouwd, waaronder de capsulaire polysaccharide (CP's). Tot op heden zijn alleen trisaccharide-eenheden van CP1, CP5 en CP8, samen met een beschermd hexasaccharide van CP8, gesynthetiseerd, wat de synthetische uitdagingen van deze moleculen onderschrijft. Dit proefschrift beschrijft de synthese en evaluatie van verschillende typen capsulaire polysacchariden van verschillende lengtes en substitutiepatronen.

Hoofdstuk 1 introduceert de capsulaire polysacchariden van *S. aureus* om de context voor het onderzoek te bieden welke in dit proefschrift wordt beschreven. De biologische syntheseroutes van de twee meest klinisch voorkomende stammen, CP5 en CP8, worden gepresenteerd en de werkprincipes van glycoconjugaat vaccins worden geïntroduceerd. Verschillende modi voor de generatie van glycoconjugaat vaccins worden gepresenteerd en synthetische precedenten voor de assemblage van goed gedefinieerde CP5- en CP8-trisaccharidefragmenten worden beschreven.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese van een set CP8-oligosacchariden die in lengte variëren van een trisaccharide tot een dodecasaccharide. De oligosacchariden werden gesynthetiseerd in een $[3+3n]$ -structuur die voortkomt uit een belangrijk trisaccharide-intermediair. Het synthetische plan was gebaseerd op het introduceren van de zuur functionaliteit en de *O*-acetylering van de ManN₃A-bouwsteen voorafgaand aan de assemblage van de trisaccharide-herhalende eenheid om de post-glycosyleringsmodificatiestappen te minimaliseren. Deprotectie werd in slechts twee stappen gefaciliteerd om zuiver materiaal te verkrijgen. De

gesynthetiseerde fragmenten werden geconjugeerd aan het CRM₁₉₇-dragereiwit en geëvalueerd op diens vermogen om een antilichaamrespons te induceren. Western Blot- en ELISA-experimenten toonden aan dat de trisacharide slecht werd herkend door anti-CP8-antilichamen, terwijl een duidelijke concentratieafhankelijke competitie voor de hexa-, nona- en dodecasaccharide werd gedetecteerd. Structurele en conformationele studies onthulden een lineaire conformatie met de acetamiden van de herhalende eenheden georiënteerd in dezelfde richting. STD-NMR onthulde dat het bindende epitoop zich uitstrekt over twee herhalende eenheden (HE's). Ten slotte bevestigden immunisatiestudies de lengteafhankelijke herkenning waarbij de synthetische oligosachariden (met een minimum van drie HE's) de antigeniciteit van de natuurlijke polysacharide goed nabootsten.

Hoofdstuk 3 beschrijft een set CP5-oligosaccharide variërend in lengte van een trisacharide tot een nonasaccharide. Dezelfde synthetische principes als geïmplementeerd in Hoofdstuk 2 werden toegepast, met het kleine verschil dat de *O*-acetylgroepen in een later stadium op grotere fragmenten werden geïnstalleerd om de selectiviteit in de glycosyleringen te beïnvloeden. De synthetische oligosachariden werden geëvalueerd door Western Blot-analyse en SPR-experimenten, en opnieuw werd een oligosacharide lengte-activiteitsrelatie gevonden, hoewel deze minder uitgesproken was dan deze voor CP8 was. De trisacharide bleek te kort om een antilichaamrespons te induceren, en de langere hexasaccharide en nonasaccharide vertoonden een gelijk antilichaambindend vermogen en vergelijkbare IC₅₀-waarden. Conformatie-analyse onthulde een lineaire conformatie voor de oligomeren, waarbij de acetylen binnen een HE dezelfde richting aanhielden en de HE's ~180° werden omgedraaid ten opzichte van de flankerende HE's.

Hoofdstuk 4 beschrijft de synthese van alle mogelijke geframeshifte trisachariden van CP5 en CP8. De synthetische methodes uit Hoofdstuk 2 en 3 werden geïmplementeerd met het verschil dat de linker voorafgaand aan de glycosylering werd geïnstalleerd om waardevol trisacharide materiaal te sparen. Over het algemeen waren de opbrengsten lager en was de selectiviteit van de gebruikte glycosyleringsreacties slechter dan in Hoofdstuk 2 en 3, maar de set van vier geframeshifte trisachariden kon uiteindelijk worden gesynthetiseerd. De CP8 geframeshifte bonden niet aan anti-CP 8 antilichamen in Western Blot, ELISA of STD-NMR experimenten, terwijl een van de CP5 trisachariden relatief goed bleek te binden aan een anti-CP5 antilichaam met een binding die vergelijkbaar was met de hexasaccharide in de gebruikte SPR experimenten. Dit suggereert dat een minimaal bindend epitoop zou kunnen bestaan uit het D-Fuc – D-Man – L-Fuc frame.

Hoofdstuk 5 beschrijft drie verschillende CP1 trisachariden met een verschillend taurine-amidepatroon en een CP1 hexasaccharide zonder taurine. In tegenstelling tot het werk in hoofdstukken 2-4 werden grote modificaties uitgevoerd op de grotere sachariden om verschillende redenen. Ten eerste werden 2-azidogalactose bouwstenen gebruikt die beschermd waren met een 4,6-di-*tert*-butyl silyleengroep om α -selectiviteit te verkrijgen in de glycosyleringsreacties. Ten tweede kon het taurine substitutiepatroon gecontroleerd worden door gebruik te maken van orthogonale C-6-OH beschermende groepen. Een vierstaps modificatie/deprotectie sequentie gaf het niet-getaurineerde trisacharide, terwijl een vijfstaps sequentie leidde tot het dubbelgetaurineerde trimeer, en een zevenstaps modificatie/deprotectie sequentie twee trisachariden opleverde welke een enkel taurine amide op een van de galactosaminuronische zuren gekoppeld hadden. Voor de assemblage van de hexasaccharide werd een [3+3]-strategie geïmplementeerd, wat de hexasaccharide in goede opbrengst en stereoselectiviteit opleverde. Implementatie van een vierstaps deprotectiesequentie resulteerde in de taurine-vrije hexasaccharide.