



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).

Resume på dansk

Syntese, struktur og epitop studier af veldefinerede *Staphylococcus aureus* kapselpolysakkarider

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) er en Gram-positiv bakterie, der er en del af menneskets mikrobiom, som kan forårsage alvorlige infektioner hos immun-kompromitterede personer, som for eksempel indlagte patienter, ældre og nyfødte. Stigningen af antibiotikaresistente varianter fremmer udviklingen af nye terapeutiske strategier, hvor vaccination er en vigtig tilgang. Tidligere glycoconjugatvaccinekandidater til bekæmpelse af *S. aureus*-infektioner, med brug af isolerede kapselpolysakkarider (capsular polysakkarides (CP'er)) type 5 og type 8, har alle fejlet i sene kliniske forsøg. Derfor fokuserer denne afhandling på at syntetisere og evaluere veldefineret syntetisk materiale som grundstenen til en vaccinekandidat. Cellevæggen hos *S. aureus* består af forskellige glycopolymerer, som alle kan betragtes som antigener, blandt andet kapselpolysakkarider. Til dags dato er kun trisakkarid-enheder af CP1, CP5 og CP8 sammen med et beskyttet hexasakkarid af CP8 blevet syntetiseret, hvilket viser de syntetiske udfordringer. Denne afhandling beskriver syntesen og evalueringen af forskellige typer kapselpolysakkarider af varierende længde og substitutionsmønster.

I **Kapitel 1** introduceres kapselpolysakkarider af *S. aureus* for at give konteksten for den forskning, der er beskrevet i denne afhandling. Biosyntesevejene for de to mest klinisk udbredte viranter, CP5 og CP8, præsenteres, og principperne for glycoconjugatvacciner introduceres. Forskellige metoder til produktion af glycoconjugatvacciner præsenteres, og syntetisk præcedens for samling af veldefinerede CP5- og CP8-trisakkaridfragmenter beskrives.

Kapitel 2 beskriver syntesen af et sæt CP8-oligosakkarider, der varierer i længde fra et trisakkarid til et dodecasakkarid. Oligosakkariderne blev syntetiseret ud fra en $[3+3n]$ -strategi, med udgangspunkt i et trisakkarid-mellemprodukt som nøgle-element. Det syntetiske arbejde afhang af introduktionen af syrefunktionaliteten og *O*-acetyleringen af ManN₃A-byggeblokken før samling af trisakkarid-gentagelsesenheden for at minimere post-glykosylerings-modifikationstrinene. Afbeskyttelse blev udført i kun to trin for at give rent materiale. De syntetiske fragmenter blev konjugeret til et CRM₁₉₇-bærerprotein og deres evne til at inducere antistofrespons evalueret. Western Blot og ELISA eksperimenter viste, at trisakkaridet var dårligt genkendt af CP8-antistoffer, mens en klar koncentrationsafhængig konkurrence for hexa-, nona- og dodecasakkaridet blev påvist. Strukturelle og konformationelle undersøgelser afslørede en lineær konformation med

acetamiderne af de gentagne enheder orienteret i samme retning. STD-NMR afslørede, at bindingsepitopen spænder over 2 gentagne enheder (GE'er). Endelig bekræftede immuniserings-undersøgelser den længdeafhængige genkendelse, hvor de syntetiske oligosakkarider (med et minimum af 3 GE 'er) på tilfredsstillende vis efterlignede antigeniciteten af det naturlige polysakkarid.

Kapitel 3 beskriver et sæt CP5-oligosakkarider, der varierer i længde fra et trisakkarid til et nonasakkarid. De samme syntetiske principper som implementeret i kapitel 2 blev anvendt, dog med den forskel, at *O*-acetylerne blev installeret på et senere tidspunkt på større fragmenter for at sikre selektiviteten i glykosyleringerne. De syntetiske oligosakkarider blev evalueret med Western Blot og SPR-eksperimenter, og igen blev det fundet at et oligosakkarid længdeafhængige genkendelse, selvom det var mindre udtalt end for CP8. Trisakkaridet var for kort til at inducere et antistofrespons, og det længere hexasakkarid og nonasakkarid viste ens antistofbindingsevne og lignende IC50-værdier. Konformationel analyse afslørede en lineær konformation for oligomererne, hvor acetylerne inden for en GE pegede i samme retning, og GE'erne blev vendt $\sim 180^\circ$ i forhold til de flankerende GE'er.

Kapitel 4 beskriver syntesen af alle mulige trisakkarid-rammeforskydninger (såkaldte frameshifts) af CP5 og CP8. De syntetiske principper fra kapitel 2 og 3 blev implementeret med den forskel, at linkeren blev installeret før forlængelse for at spare værdifuldt trisakkaridmateriale. Generelt var udbytterne lavere, og selektiviteten af de anvendte glycosyleringsreaktioner værre end i kapitel 2 og 3, men sættet af fire rammeforskudte trisakkarider kunne til sidst syntetiseres. CP8-rammeforskydningerne bandt ikke til CP8-antistoffer i hverken Western Blot, ELISA- eller STD-NMR-eksperimenter, mens et af CP5-trisakkariderne blev fundet til at binde relativt godt til CP5-antistof med binding svarende til hexasakkaridet i SPR-forsøgene. Dette indikerer, at en minimal bindingsepitope kunne bestå af en D-Fuc – D-Man – L-Fuc ramme.

Kapitel 5 beskriver tre forskellige CP1-trisakkarider med et forskelligt taurinamidmønster og et ikke-taurineret CP1-hexasakkarid. I modsætning til arbejdet i kapitel 2-4 blev større modifikationer udført på de store sakkarider af følgende årsager. For det første, for at opnå α -selektivitet i glykosyleringsreaktionerne, blev der brugt 2-azidogalactose-byggeblokke, der var beskyttet med en 4,6-di-*tert*-butylsilylengruppe. For det andet kunne taurin-substitutionsmønsteret kontrolleres ved brug af ortogonale C-6-OH-beskyttelsesgrupper. En fire-trins modifikation/afbeskyttelsessekvens gav det ikke-taurinerede trisakkarid, mens en

fem-trins sekvens førte til den dobbelt taurinerede trimer, og en syv-trins modifikation/afbeskyttelsessekvens gav to trisakkarider, der bar et enkelt taurinamid på en af galactosaminuronsyrerne. Til samlingen af hexasakkaridet blev der implementeret en [3+3]-strategi, der gav hexasakkaridet i godt udbytte og stereoselektivitet. Implementering af en fire-trins afbeskyttelsessekvens gav det ikke-taurinerede hexasakkarid.