DISS. ETH NO. 18760

SYNTHESIS OF CELL SURFACE CARBOHYDRATE ANTIGENS

A dissertation submitted to

ETH ZÜRICH

for the degree of

Doctor of Science

Presented by

MATTHIAS ALEXANDER OBERLI

Dipl. Chem. Universität Zürich

Date of birth
22.08.1977

citizen of
Lenzburg (Ag)

accepted on the recommendation of

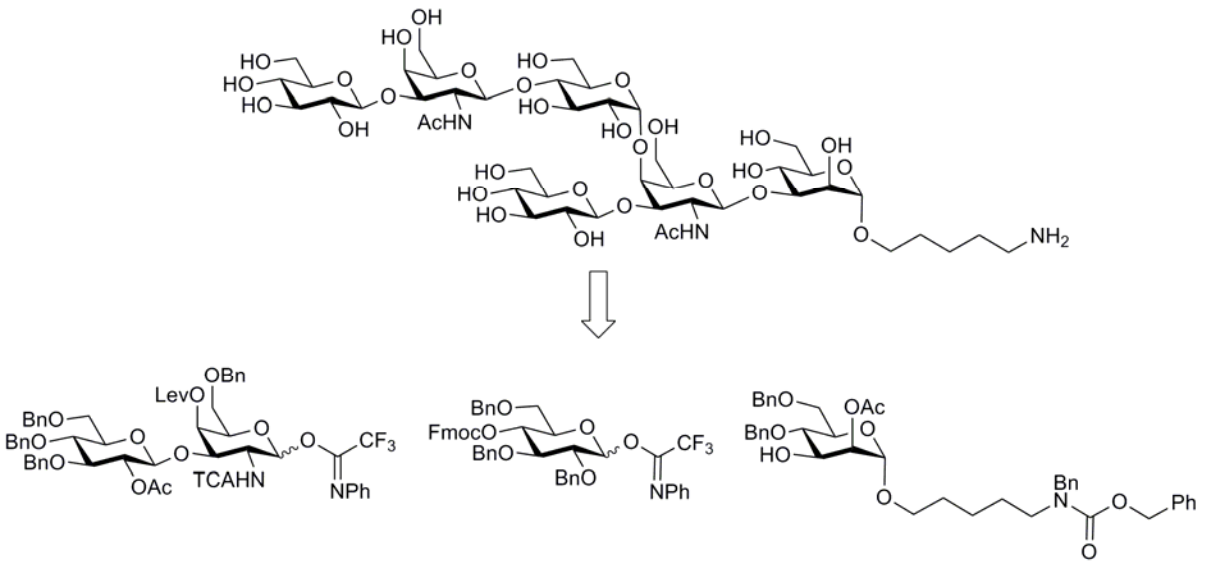
Professor Dr. Peter H. Seeberger
Professor Dr. Dario Neri

2010

Summary

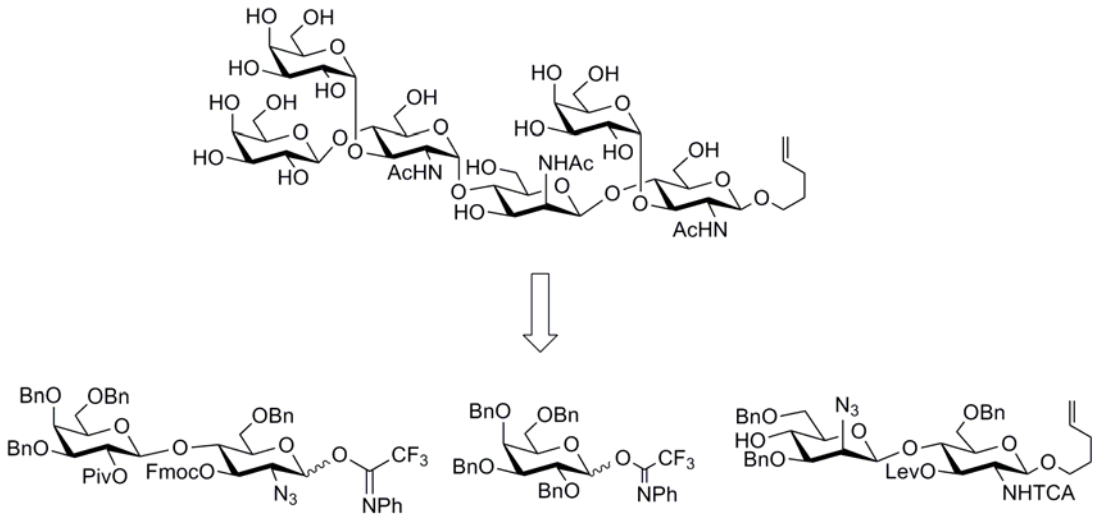
The development of new vaccines is stimulated by increased bacterial resistance to antibiotics and difficulties in developing adequate drugs for the treatment of tropical disease caused by parasites. In principle, various types of cell surface epitopes, characteristic for the invading organism or related to aberrant growth of cells, can be applied to develop vaccines. Various pathogenic bacteria have coats of polysaccarides, many with repeating epitopes, containing unique connectivity's or even unique monosaccharide units. These structures represent attractive targets for potential vaccines without the risk of generating self immunity.
This dissertation dedicates five chapters to the solution phase synthesis of cell surface oligosaccharides in. Each chapter describes an independent project. The synthetic oligosaccharides are naturally occurring cell surface structures or modifications thereof with high biological relevance.

Clostridium difficile is the most prominent cause of hospital associated diarrhea. In the **second chapter**, the synthesis of the repeating unit of a *C. difficile* cell wall polysaccharide is described. The hexasaccharide was assembled by the glycosylation of mannose with an elaborate disaccharide building block. The α-glucose, tethering the two disaccharide motives was installed subsequently, followed by a second glycosylation with the disaccharide building block. The hexasaccharide was deprotected and glycoconjugates with immunogenic carrier proteins were produced for initial immunological investigations.

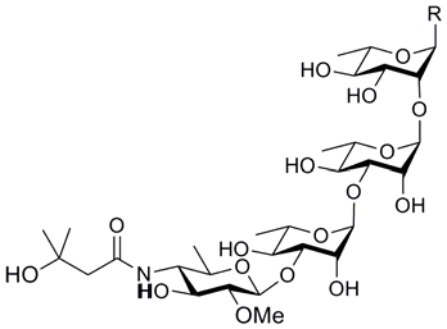


In **Chapter 3**, the first synthesis of a hexasaccharide repeating unit of the *Bacillus anthracis* major cell wall polysaccharide is described. *B. anthracis* is the cause of the devastating

disease anthrax and is also used as biowarfare agent. The assembly starts with a glycosylation of two elaborate disaccharide building blocks to provide the α-linked tetrasaccharide in high selectivity. The two α-galactosidic residues are introduced sequentially thereafter. All three glycosylations rely on *N*-phenyltrifluoroacetimidate glycosylating agents. Glycoconjugates were prepared after successful deprotection. The glycoconjugates showed high immunogenicity and antibody titers in first animal experiments.



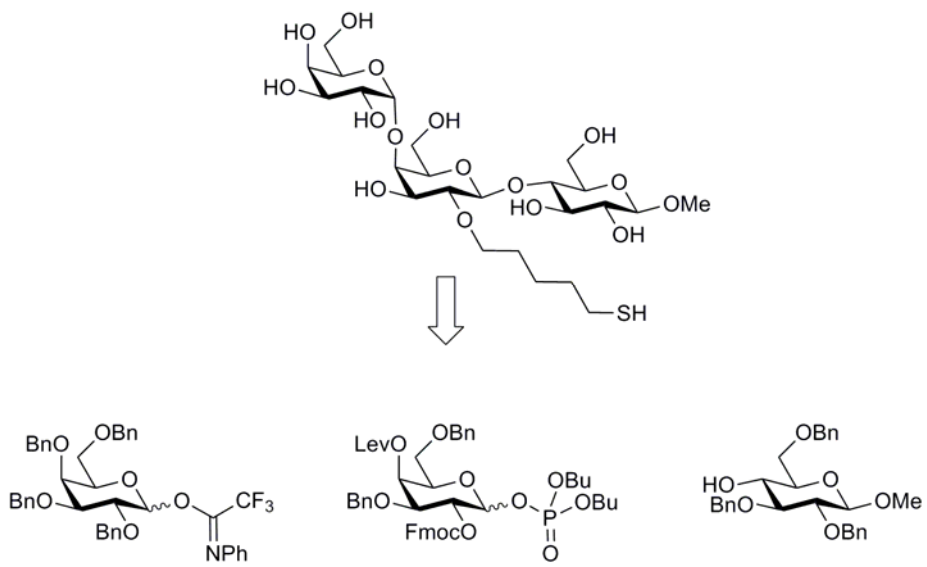
For the in depth analysis of the immunological role of the tetrasaccharide occurring on the spores of *Bacillus anthracis* a library of deletion sequences and modified analogues were synthesized as described in **Chapter 4**. These compounds were used for STD-NMR investigations and for the preparation of microarrays to investigate the antibody binding fine specificity. For animal challenge- and further immunization-studies glycoconjugates with immunogenic proteins were prepared.



Chapter 5 describes the synthesis of a library of the most common β-galactoside containing mammalian motives bearing thiol handles for the preparation of microarray chips. A linear sequential approach was used for the synthesis of the oligosaccharides. This microarray will

be used for comparative evaluation of galectin binding preferences. Galectins are a family of β-galactoside binding lectins, that are widespread in the animal kingdom. They have various biological functions. A unifying picture is still lacking. We hope that comparison of the binding preferences enables the elucidation of a connection between the binding preferences and the biological functions of the galectins.

Finally, **Chapter 6** describes the solution phase synthesis of Gb-3 trisaccharide equipped with a thiol handle, using a monosaccharide based coupling approach. Gb-3 is a receptor for Shiga-like toxins and has recently been shown to play a role in the entry of HIV-1 into cells. The deprotection and functionalization of the handle was achieved in high yield.

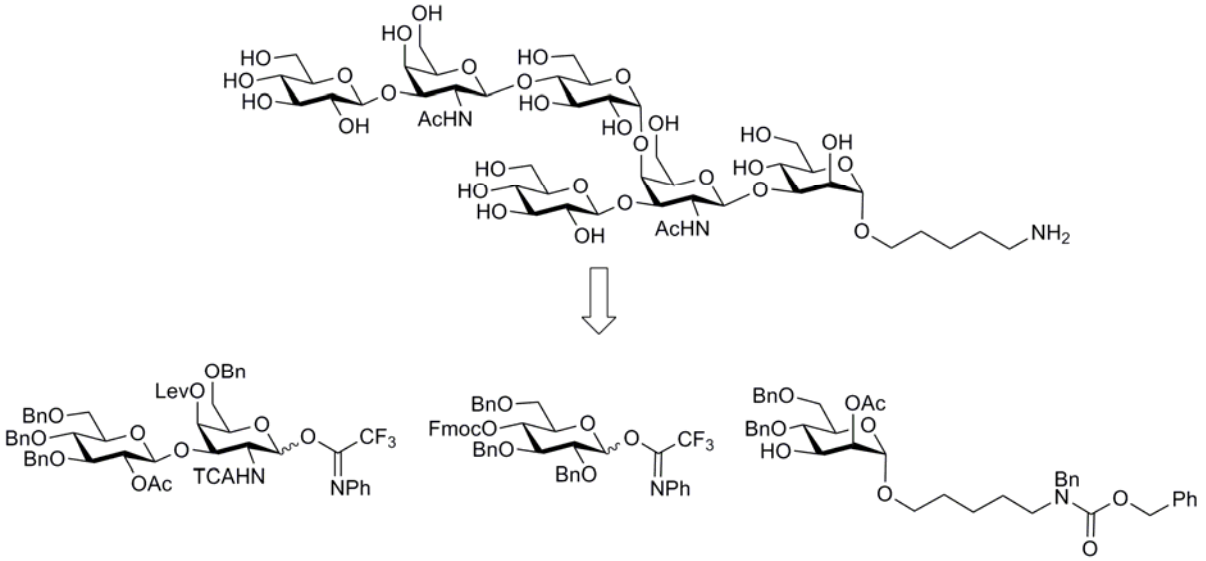


Zusammenfassung

Das Interesse an neuen Impfstoffen ist aufgrund der steigenden Gesundheitskosten, des vermehrten Auftretens von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen und der Schwierigkeit parasitäre Tropenkrankheiten zu bekämpfen, stark angestiegen. Im Prinzip können unterschiedlichste Strukturen, die auf Zelloberflächen charakteristisch für infektiöse Keime oder sich unkontrolliert teilende Zellen sind, für die Entwicklung von Impfstoffen genutzt werden. Viele Bakterien tragen eine spezifische Polysaccharidummantelung mit oft einzigartigen Verknüpfungen oder Zuckerbausteinen. Diese Strukturen stellen attraktive Antigene für die Entwicklung von Impfstoffen dar, ohne das Risiko Autoimmunität zu generieren.

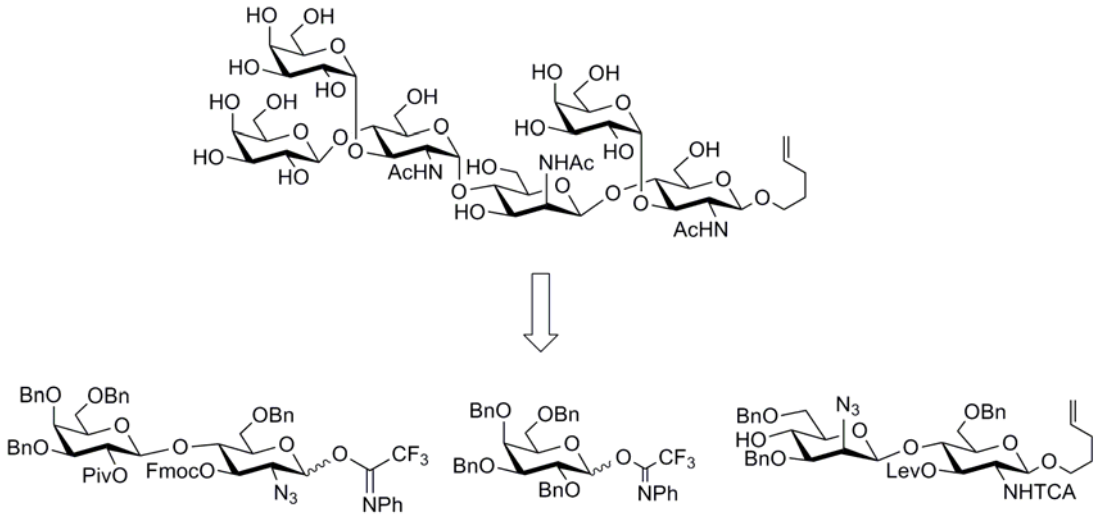
Diese Doktorarbeit beschreibt die Synthese von Zelloberflächenoligosacchariden in Lösung. Diese Arbeit ist in fünf unabhängige Kapitel unterteilt. Es wurden natürlich vorkommende oder modifizierte Strukturen von hoher biologischer Relevanz hergestellt.

Clostridium difficile Infektionen sind eine gefürchtete Komplikation der Antibiotikatherapie und sind die Hauptursache für nosokomiale Infektionen und Epidemien. Das **zweite Kapitel** beschreibt die Synthese einer repetitiven Hexasaccharideinheit eines Polysaccharides auf der Zelloberfläche von *C. difficile*. Der Zusammenbau des Oligosaccharides begann mit der Glykosilierung der Mannose mit einem Disaccharidbaustein. Nachfolgen wurde die α-Glucose, die die zwei Disaccharid-Einheiten verknüpft, eingebaut. Nach der zweiten Glykosilierung mit dem Disaccharidbaustein wurde das Hexasaccharid entschützt. Für erste immunologische Untersuchungen wurden Glycokonjugate mit einem immunogenen Trägerprotein hergestellt.

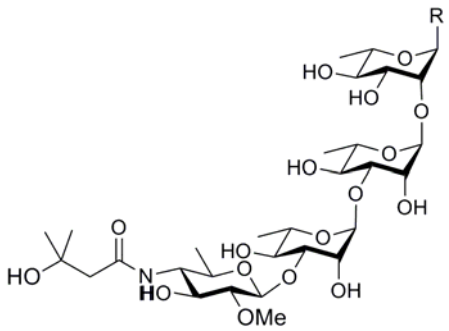


In **Kapitel 3** wird die erste Synthese einer repetitiven Hexasaccharideinheit des wichtigsten Polysaccharides, das auf der Zelloberfläche der vegetativen Form von *Bacillus anthracis* gefunden wurde, beschrieben. *B. anthracis* ist das Bakterium welches die Krankheit Anthrax

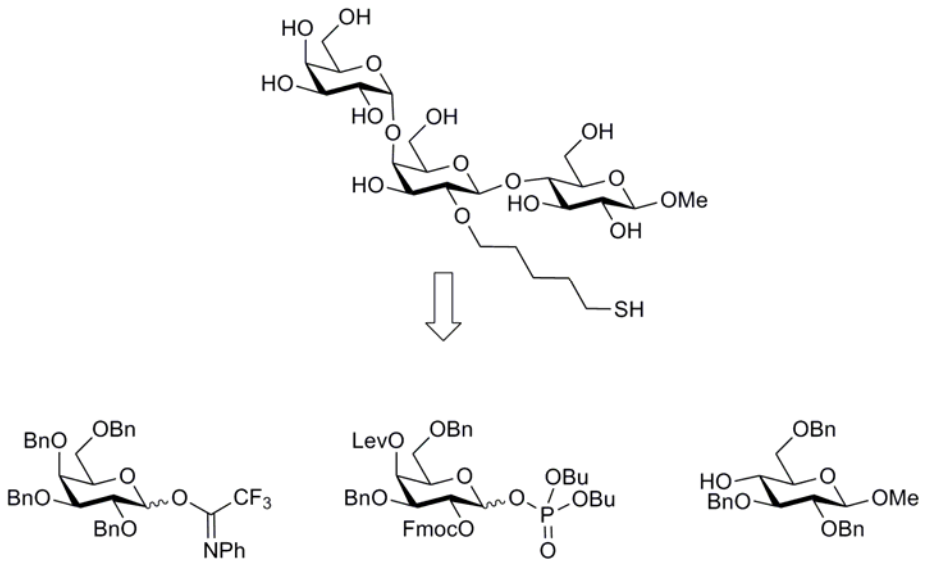
hervorruft und auch als biologische Waffe verwendet wird. Die Struktur wurde aus zwei Disaccharidbausteinen, gefolgt von zwei α-Galactosylierungen, aufgebaut. Für alle drei Glycosylierung wurden *N*-Phenyltrifluoroacetimidatbausteine benutzt. Nach der Entschützung wurden Glycokonjugate hergestellt. Die Konjugate zeigten eine hohe Immunogenität und liferten hohe Antikörpertiter in ersten Mausexpermineten.



Für die genaue Analyse der Rolle des Tetrasaccharides, das auf den Sporen von *Bacillus anthracis* gefunden wurde, in der Immunantwort gegen Anthrax, wurde eine Bibliothek von kürzerer- und modifizierter-Analoga hergestellt. **Kapitel 4** beschreibt die Synthese der Strukturen, die für STD-NMR Untersuchungen und zur Herstellung von Microarray Chips gebraucht wurden. Für Impfstudien wurden ausserdem Glycokonjugate mit Mono-, Di- und Tetrasaccharid hergestellt.



Kapitel 5 beschreibt die Synthese einer Auswahl der gänigsten, β-Galactose enthaltenden Strukturen, die auf Zelloberflächen von Säugetieren vorkommen. Diese Strukturen wurden einer lineren Strategie folgend, sequentiell aufgebaut und mit einem Thiollinker an Microarraychips gebunden. Diese Microarrays werden genutzt um die Bindungspräferenzen

verschiedener Galektine zu untersuchen und zu vergleichen. Galektine sind β-Galactose-bindende Proteine, die im gesammten Tierreich vorkommen. Zahlreiche biologische Funktionen wurden den Galektinen bereits zugeordnet, aber ein generelles Verständnis fehlt noch. Wir hoffen mit den gewonnenen Daten Rückschlüsse auf mögliche weitere Funktionen der Galektine ziehen zu können.

Kapitel 6 beschreibt abschliessend die, auf einer Monosaccharid-Strategie basierenden Synthese eines Linker-bestückten Gb-3 Trisaccharides in Lösung. Synthese, Entschützung und Funktionalisierung des Linkers konnten in guter Ausbeute und hoher Selektivität ausgeführt werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Gb-3, ein Rezeptor für Shiga-ähnliche Toxine, eine Rolle beim Eintritt von HIV-1 in T-Zellen spielt.