



Síntesis Enzimática de Oligosacáridos y Glicoconjugados de Interés Terapéutico

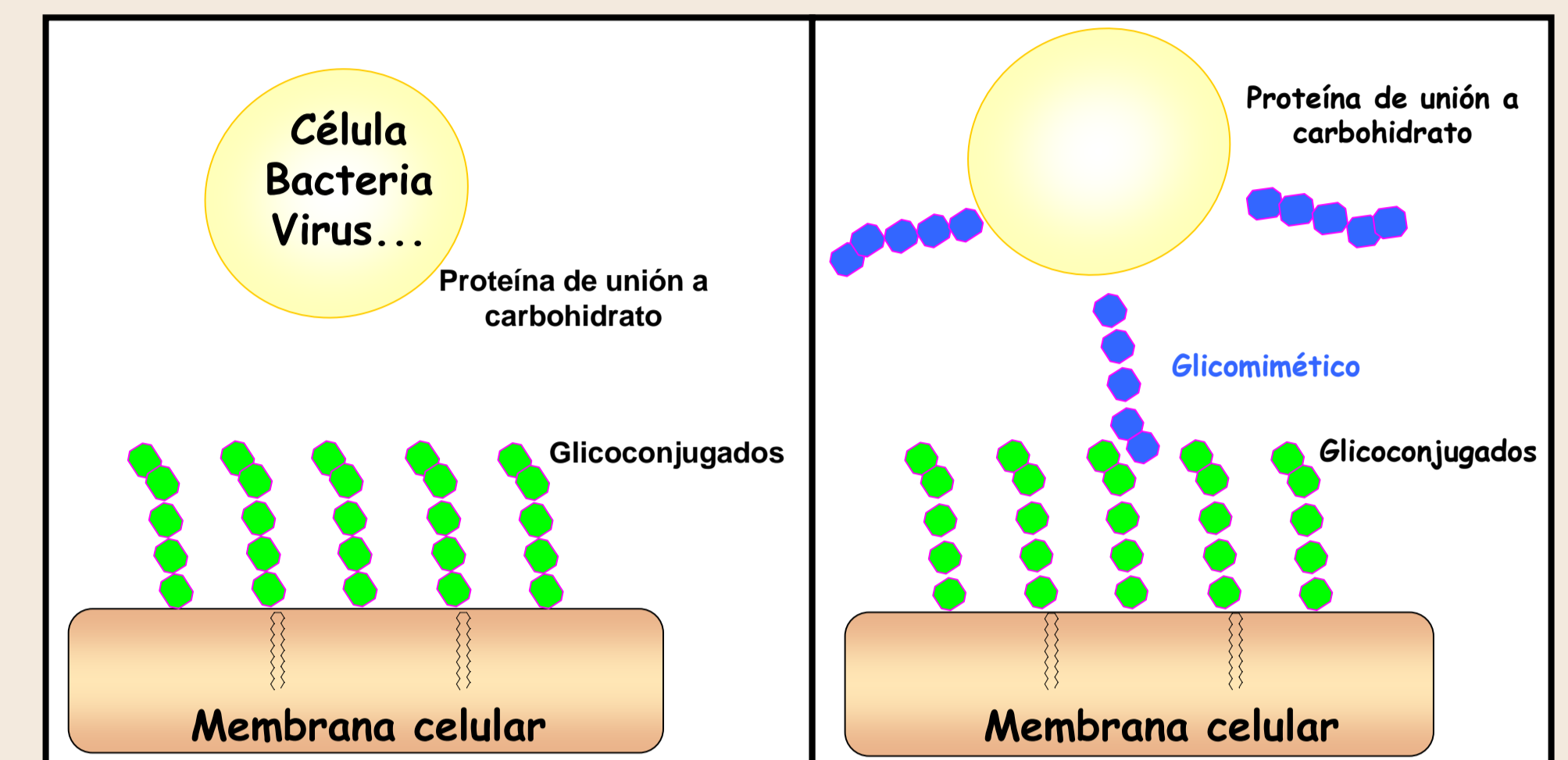


Autores: Sergio Navarrete Serradilla: Laura Ruiz Ruiz: Paolo Zambelli: Manuel Sandoval Barrantes: Carlos Bayón Sánchez.
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
sergionavarrete@gmail.com

Tutores: María José Hernáiz Gómez-Dégano. Antonio Aires Trapote.
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid
mjhernai@farm.ucm.es.

Introducción:

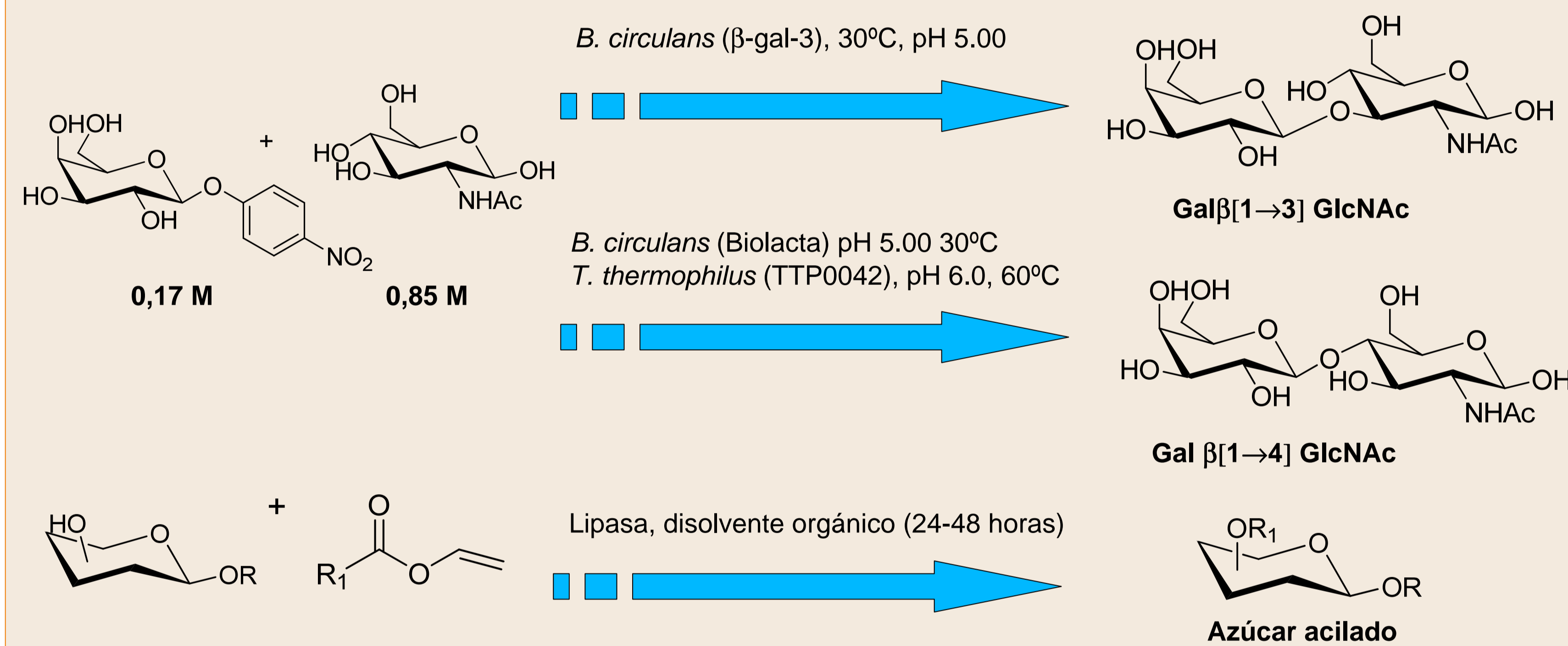
Los glicoconjugados presentes en las membranas celulares desempeñan un papel muy importante en los procesos de reconocimiento y comunicación celular a través de su interacción con diversas proteínas y carbohidratos específicos. Por otra parte, estos oligosacáridos se pueden comportar como puntos de anclaje de diferentes bacterias y partículas virales. Para prevenir este primer contacto es necesario disponer de análogos de elevada pureza que inhiban los procesos de adhesión de organismo patógenos. Esta necesidad, y la dificultad de obtener estos compuestos puros de sus fuentes naturales, ha hecho que en los últimos años se haya realizado un gran avance en el desarrollo de aproximaciones químicas y enzimáticas para la síntesis de estos compuestos. En este sentido, la metodología enzimática se presenta como una buena alternativa para la síntesis de oligosacáridos. Hay dos grupos principales de enzimas que se emplean en la síntesis de oligosacáridos y glicoconjugados: glicosidasas y lipasas. El objetivo del presente trabajo es obtener oligosacáridos y glicoconjugados de interés terapéutico mediante procesos biotecnológicos. Para ello se ha utilizado dos tipos de enzimas; glicosidasas y lipasas en forma libre e inmovilizada.



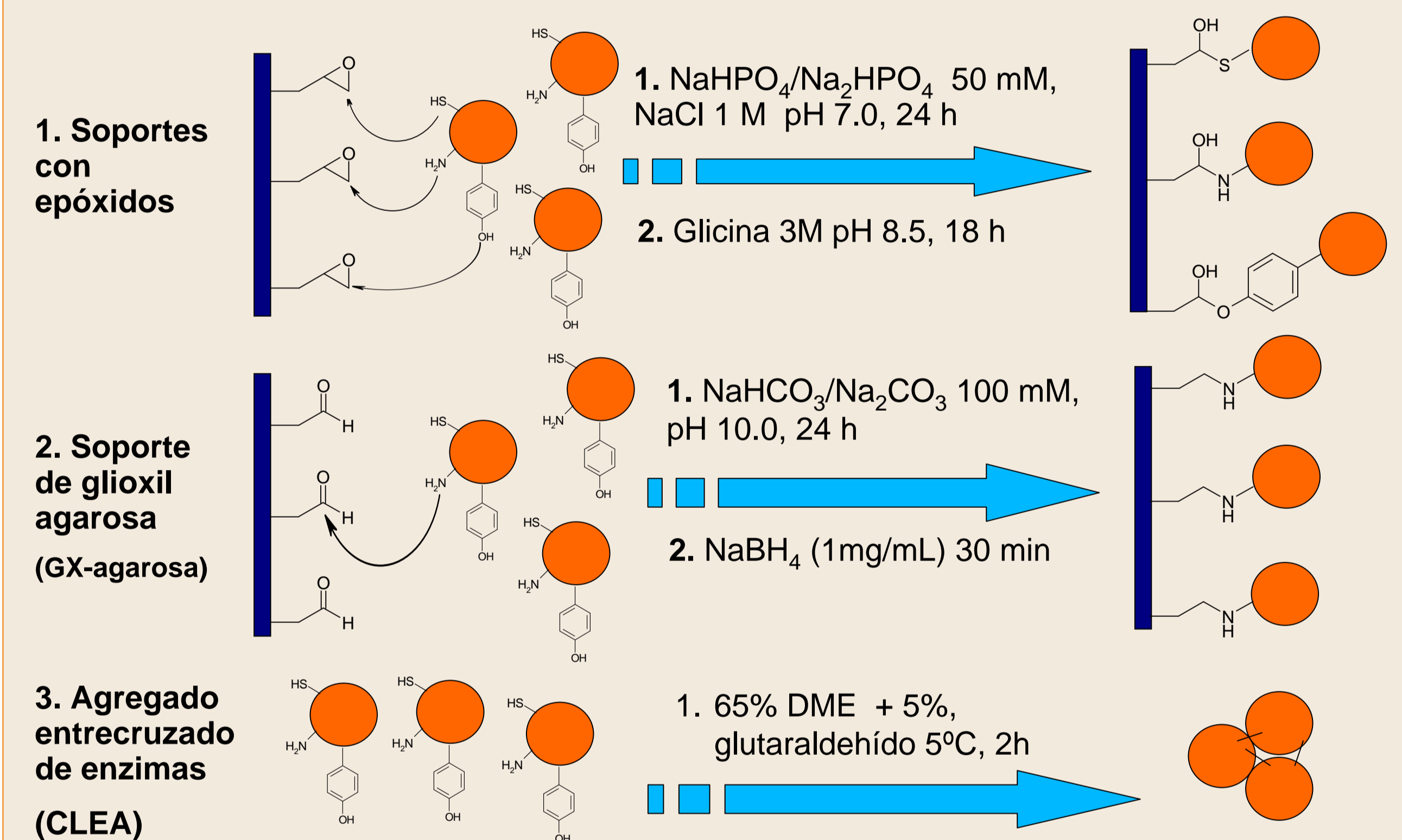
Métodos y materiales:

Para obtener oligosacáridos y glicoconjugados de interés terapéutico se ha utilizado enzimas (libres e inmovilizadas) de diferentes orígenes: β -galactosidasas de *Thermus thermophilus* HB27¹ (TTP0042 y mutantes diseñados: TTP0042 C167V y TTP0042 C167S), *Bacillus circulans* ATCC 31382 (β -gal-3)² ambas con un extremo His₆tag y *B. circulans* comercial (Biolacta N°5).³ Lipasas comerciales de *Candida antarctica* (CAL), *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas fluorescens*.

Síntesis de disacáridos y glicoconjugados



Inmovilización de enzimas



Resultados y Discusión:

Glicosidasas

Tabla 1. Inmovilización de β -galactosidasas sobre polímeros funcionalizados con grupos epóxidos.

Enzima	Actividad ^a enzima libre	Actividad ^a Enzima inmovilizada	Actividad Relativa (%)
TTP42	76,19	4,57	6
TTP42 C167V	19,24	5,84	30
TTP42 C167S	2,34	N/D	N/D
β -gal-3	93,22	N/D	N/D
Biolacta	3,50	2,90	82

Los valores de actividad se expresan como unidades enzimáticas (micromoles de *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido hidrolizado por minuto) por miligramo de proteína en condiciones iniciales.

Tabla 2. Síntesis de azúcares con enzimas libres e inmovilizadas.

Enzima	Soporte/ inmovilización	Disacárido sintetizado	Rendimiento
TTP42	Enzima libre	Galβ[1→4]GlcNAc	20%
TTP42	Epóxidos	Galβ[1→4]GlcNAc	39%
TTP42	GX-agarosa	Galβ[1→4]GlcNAc	34%
TTP42	CLEA	Galβ[1→4]GlcNAc	16%
β -gal-3	Enzima libre	Galβ[1→3]GlcNAc	95%
β -gal-3	Enzima libre	Galβ[1→3]GalNAc	95%
Biolacta N°5	Enzima libre	Galβ[1→6]GlcNAc	89%
Biolacta N°5	Epóxidos	Galβ[1→6]GlcNAc	11%
Biolacta N°5	Epóxidos	Galβ[1→6]GlcNAc	100%
Biolacta N°5	Epóxidos	Galβ[1→6]GlcNAc	0%

Lipasas

Tabla 3. Inmovilización de lipasas sobre polímeros funcionalizados con grupos epóxidos.

Enzima	Actividad enzima libre	Actividad Enzima inmovilizada	Actividad Relativa (%)
CAL	47.3	53.1	112%
<i>P. Stutzeri</i>	165	137	83%
<i>P. cepacia</i>	231	194	84%
<i>P. fluorescens</i>	700	595	85%

Los valores de actividad se expresan como unidades enzimáticas (micromoles de *p*-nitrofenil palmitato hidrolizado por minuto) por miligramo de proteína en condiciones iniciales. La actividad inmovilizada se refiere al mejor soporte de los estudiados en el screening de 24 soportes.

Tabla 4. Síntesis de glicoconjugados por acilación de azúcares con lipasas (libres).

Enzima	Medio de síntesis	Aceptor	Rendimiento (producto monoacilado)
CAL	THF	<i>p</i> NF- β -Gal	63%
<i>P. fluorescens</i>	TEDE 60%/ T-BuOH 40%	Glucosa	70%
<i>P. Stutzeri</i>	TEDE 60%/ T-BuOH 40%	Glucosa	80%
<i>P. fluorescens</i>	Me-THF	<i>p</i> NF- β -Gal	55%
<i>P. Stutzeri</i>	DMF 60% T-BuOH 40%	<i>p</i> NF- β -Gal	62%

El inóculo en todos los casos fue el butirato de vinilo. Los rendimientos presentados son los mejores obtenidos de un screening de 27 disolventes y mezclas de éstos.

Conclusiones

➤ La inmovilización mediante epóxidos permite obtener inmovilizados muy estables, excepto por la β -galactosidasa de TTP0042, probablemente por que afecta la cisteína cercana al centro activo. Las lipasas son especialmente resistentes a este tipo de inmovilización y por lo general mejoran sus propiedades catalíticas.

➤ El uso de aldehídos es la mejor aproximación para inmovilizar la enzima TTP0042 de *T. thermophilus*, ya que retiene un alto porcentaje de la actividad presente en la enzima libre y la síntesis de disacárido es mucho mejor que con la enzima libre.

➤ Se ha puesto a punto en nuestro laboratorio la metodología necesaria para la síntesis enzimática de oligosacáridos y glicoconjugados específicos de interés biológico mediante la utilización de glicosidasas y lipasas. Las enzimas utilizadas presentan una alta regioselectividad y esta depende del origen y el tipo de enzima utilizada.

Bibliografía

- Dion, M., Fourage, L., Hallet, J.-N. & Colas, B. *Glycoconj. Jour.* 16, 27-37 (1999).
- Ito, Y. & Sasaki, T. *Biosc. Biotech. Biochem.* 61, 1270-1276 (1997).
- Usui, T. et al. *Carb. Res.* 285, 29-39 (1996).

Agradecimientos:

-Carlos Bayón es beneficiario de un Contrato Predoctoral UCM, Manuel Sandoval agradece la beca de Doctorado otorgada por la Universidad Nacional de Costa Rica.

-Sergio Navarrete y Laura Ruiz son beneficiarios de una beca de colaboración.

-Proyecto de Investigación: MICINN, CTQ2009-11801