



Universidad de la República  
Facultad de Química  
Departamento de Biociencias  
Cátedra de Bioquímica

*“Desarrollo de sistemas de transglicosilación  
enzimática como herramienta para la generación  
de compuestos bioactivos”*

DIANA CECILIA PORCIÚNCULA GONZÁLEZ

Noviembre de 2014.

Montevideo

Uruguay

“Desarrollo de sistemas de transglicosilación enzimática  
como herramienta para la generación de compuestos  
bioactivos”

DIANA CECILIA PORCIÚNCULA GONZÁLEZ

Tesis entregada para la obtención del título de:

**MAESTRÍA EN QUÍMICA**

Universidad de la República

Facultad de Química

Departamento de Biociencias

Cátedra de Bioquímica

Directoras de Tesis:

Dra. Cecilia Giacomini

Dra. Gabriela Irazoqui

Dra. Beatriz M. Brena

(Ante PEDECIBA-Química)

*Esta Tesis está dedicada a:*

*Andrés, mi amor, Franco mi bebe y a Diana mi madre*

## Resumen

Los glicósidos son moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza, que han demostrado poseer variadas actividades biológicas. En algunos casos esa actividad viene dada por la estructura global de la molécula; en otros, el residuo glicosídico puede ser importante para la actividad biológica, ya sea para aumentar la potencia de la misma o para mejorar los parámetros farmacocinéticos de la molécula cuando es utilizada como fármaco. La glicosilación enzimática es una potente herramienta para la generación de glicósidos. Las glicosidasas, usadas en las condiciones adecuadas, son capaces de transferir una unidad de grupo glicosilo de una molécula dadora a otra que lo acepta.

En esta tesis, con el fin de sintetizar glicósidos con potencial actividad biológica, se estudiaron sistemas de transglicosilación utilizando como catalizadores la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y la  $\beta$ -glucosidasa de almendras. Como moléculasceptoras de grupo glicosilo se seleccionaron dos alcoholaminas (3-amino-1-propanol y 1-amino-2-propanol) e hidroxurea.

Se logró sintetizar, purificar e identificar el compuesto 3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido utilizando lactosa como dador de grupo galactosilo, 3-amino-1-propanol como aceptor y  $\beta$ -galactosidasa (6 UE/mL), a pH 5.5, 50°C y 24 hs de reacción. Las concentraciones óptimas seleccionadas fueron 100 mM de lactosa y 500 mM de 3-aminopropanol. La lactosa también demostró ser aceptor del sistema de transglicosilación dando lugar a la formación de un trisacárido que fue identificado como  $\alpha$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido. Si bien los dos productos formados no mostraron ser mejores inhibidores de galectina 1 que la lactosa, lo que los descarta como posibles agentes antitumorales, el 3-amino-propil- $\beta$ -D-galactopiranosido es una molécula muy interesante desde el punto de vista químico, dado que constituye una galactosa funcionalizada con un grupo amino de alta reactividad.

Tanto el 1-amino-2-propanol como la hidroxurea no pudieron ser glicosilados utilizando los sistemas de transglicosilación propuestos, lo que hace pensar que no son buenos aceptores para el sistema. El 1-amino-2-propanol es un alcohol secundario lo que estaría confirmando el hecho de que esta  $\beta$ -galactosidasa tiene alta selectividad para alcoholes primarios que son más reactivos. El hecho de que la hidroxurea no sea buen aceptor en ambos sistemas de transglicosilación podría estar relacionado con su estructura, ya que es probable que la cercanía del grupo amino, afecte la nucleofilia del hidroxilo. A su vez, es posible que el grupo carbonilo fuertemente electrófilo limite la electronegatividad del grupo hidroxilo disminuyendo así su nucleofilia. En estos casos, ambos aceptores, el 2-amino-1-propanol y la hidroxurea demostraron ser inhibidores de la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Sin embargo ésta no es la causa de que no sea posible la glicosilación de los mismos, ya que los valores de las constantes de inhibición son muy elevados y en ambos casos se observó la síntesis del trisacárido antes mencionado.

El desarrollo de esta tesis generó un mayor conocimiento de los sistemas de transglicosilación estudiados, lo que constituye un insumo para el diseño de próximas síntesis de glicósidos catalizadas por estas enzimas.

## Abstract

Glycosides are molecules widely distributed in nature, which have proved to possess diverse biological activities. Sometimes these activities are given by the global molecule structure; in other cases the glycosidic moiety is critical for the biological activity, either to enhance it or to improve the pharmacokinetics parameters of the molecule, when the glycoside is used as a drug. Enzymatic glycosylation is a powerful tool to generate glycosides. Under appropriated conditions, they are able to transfer one unit of glycosyl moiety from a donor molecule to an acceptor one.

In this thesis we studied the transglycosylation system catalyzed by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and almond  $\beta$ -glucosidase, with the aim of synthesize potential bioactive glycosides. Two alcoholamines (3-amino-1-propanol and 1-amino-2-propanol) and hydroxyurea were selected as glycosyl acceptors. We were able to synthesize, purify and identify the compound 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside using lactose as galactosyl donor, 3-amino-1-propanol as the acceptor and  $\beta$ -galactosidase (6 EU/mL) at pH 5.5, 50°C and 24 h of reaction time. The optimum concentrations selected were 100 mM lactose and 500 mM 3-amino-1-propanol. Lactose also operated as an acceptor of the transglycosylation system, leading to the formation of a trisaccharide identified as *o*- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\alpha$ -D-glucopyranoside.

Both synthesized compounds were not better galectin-1 inhibitors than lactose, this excluded them as possible antitumor agents. Nevertheless, the 3-aminopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside is a very interesting molecule from the chemical point of view, since it constitutes a galactose moiety, functionalized with a high reactive amine group.

Both, 1-amino-2-propanol and hydroxyurea could not be glycosylated using the proposed transglycosylation systems. The fact that 1-amino-2-propanol is a secondary alcohol confirmed the high selectivity of this  $\beta$ -galactosidase for the more reactive primary alcohols. On the other hand, the bad performance of hydroxyurea as an acceptor in both of the transglycosylation systems studied might be related to its structure. Probably the proximity of the amino group affects the nucleophilicity of the hydroxyl group. Moreover, it is also possible that the carbonyl group, highly electrophile, lowers down the electronegativity of the hydroxyl group reducing its nucleophilicity.

Both acceptors, 2-amino-1-propanol and hydroxyurea, proved to be inhibitors of the *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. However, this is not the cause why they could not be glycosylated, since the values of the inhibition constants are very high and trisaccharide synthesis was possible in both cases.

The development of this thesis contributed to a better understanding of the transglycosylation systems studied, which is an input for the design of future synthesis of glycosides catalyzed by these enzymes.

**Capítulo 1:**

**Introducción General y Objetivos**

### 1.1.- Importancia de los glicosidos

En las últimas décadas, como consecuencia del desarrollo de la glicobiología, la investigación relacionada con la química de carbohidratos se ha incrementado considerablemente. El interés en este tipo de moléculas obedece a su participación en múltiples procesos biológicos entre los que se pueden destacar la migración intracelular y secreción de glicoproteínas, interacciones célula-célula, oncogénesis, al igual que interacciones entre células y patógenos (Faber, 2011; Varki, 1999). En las plantas, los carbohidratos forman parte tanto del metabolismo primario como secundario. Aquellos que participan en el metabolismo secundario cumplen un rol importante en la defensa de las mismas contra microorganismos, insectos y otros organismos patógenos (Sepúlveda, 2003). Dentro de la gran diversidad de carbohidratos de interés biológico se encuentran los glicósidos. Estos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ha demostrado que poseen propiedades antimicrobianas, cardioprotectoras, antiinflamatorias, antitumorales, entre otras (Sepúlveda, 2003; Sarry, 2004; Willits, 2005). Sin embargo su purificación es una tarea compleja y los rendimientos obtenidos son muy bajos debido a la baja concentración de los glicósidos en la muestra de partida. Su obtención mediante procedimientos de síntesis ha sido una solución ampliamente utilizada, la que a su vez ha permitido la generación de glicósidos con diversas aplicaciones. A modo de ejemplo en el área de la salud se ha descrito el uso de glicósidos en la producción de vacunas (Seeberger, 2008); en el desarrollo de métodos de diagnóstico no invasivos (Hermida, 2007; Celen, 2009); en la generación de prodrogas (Sorg, 2005; Thomas, 2007; Sivakumar, 2009; Yoon, 2010); como agentes antioxidantes (Hayder, 2008; Eun, 2009; Yi, 2009; Rajaganesh, 2010; Sheikh, 2011); como agentes antitumorales (Colombo, 1996; Colombo, 2000; Sorg, 2005; Rabinovich, 2006).

Se han encontrado glicósidos con propiedades prebióticas que pueden ser utilizados en alimentos funcionales (Sako, 1999; Tzortzis, 2004; Tzortzis, 2005; Sanz, 2005). Se han sintetizado galactósidos aplicables en la producción de biomateriales

(Jia, 2007). También se ha reportado el uso de alquilglicósidos como detergentes no iónicos, entre otras múltiples aplicaciones (Das-Bradoo, 2004).

En particular ciertos  $\beta$ -galactósidos son capaces de inhibir la unión de las lectinas a sus ligandos naturales (Salameh, 2005; Tejler, 2005; Giguière, 2008). Las galectinas son lectinas cuyo dominio de reconocimiento para carbohidratos presenta especificidad por los  $\beta$ -galactósidos, particularmente por glicanos conteniendo N-acetil-lactosamina. La galectina-1 (Gal-1) en especial es secretada en forma abundante por las células de la mayoría de los tumores malignos y se ha demostrado que participa en numerosos procesos relacionados con el cáncer incluyendo inmuno-supresión, angiogénesis, hipoxia y metástasis. Esto la convierte en un blanco prometedor para la terapia contra el cáncer y a sus inhibidores en potenciales agentes antitumorales (Hasan, 2007; Guigère, 2008; Ito, 2012). En este contexto se han reportado glicósidos de bajo peso molecular aminados que presentan cierta capacidad inhibitoria de galectina 1 (Rabinovich, 2006).

Por otra parte, la glicosilación de compuestos constituye una herramienta interesante para la generación de prodrogas, ya que aumenta la solubilidad y/o la selectividad de moléculas biológicamente activas lo cual muchas veces mejora su biodisponibilidad y biodistribución (Erlund, 2004; Sorg, 2005; Bertrand, 2006). Particularmente la glucosilación de drogas quimioterápicas resulta un mecanismo novedoso para aumentar la selectividad de las mismas hacia los tejidos tumorales. Esto se basa en el hecho de que la velocidad de captación de glucosa y de la vía glicolítica es diez veces mayor en células de tumores sólidos que en las células normales, debido al alto requerimiento de energía en condiciones de hipoxia. En estos casos la administración de la prodroga debería ir acompañada con la administración de una glicosidasa conjugada a anticuerpos específicos para antígenos tumorales que permitieran la liberación de la droga activa en la célula tumoral, estrategia denominada *Antibody Direct Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT) (Bagshawe, 1994; Sorg, 2005; Mahato, 2011).

La obtención de glicósidos mediante síntesis química tradicional ha sido ampliamente reportada (Wimmer, 2004; Murakami, 2011; Rajput, 2014). Sin embargo la misma es compleja ya que requiere numerosos pasos de protección y

desprotección debido a la presencia de múltiples hidroxilos de reactividad similar. La especificidad y estereoselectividad de las enzimas permite la síntesis de glicósidos en un solo paso de reacción lo cual resulta una alternativa muy interesante (Ichikawa, 1992; Rye, 2000; Bajorová, 2009).

## 1.2.- Síntesis enzimática de glicósidos

### 1.2.1.- Enzimas

Las reacciones químicas necesarias para mantener la vida deben transcurrir en una escala de tiempo conveniente y compatible con los ritmos biológicos, por lo cual las mismas deben ser catalizadas. Las enzimas son los catalizadores de las reacciones de los sistemas biológicos. La mayoría de ellas son de carácter proteico y tienen un extraordinario poder catalítico, generalmente muy superior al de los catalizadores sintéticos o inorgánicos. Poseen un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos, funcionan en soluciones acuosas en condiciones muy suaves de temperatura y pH. Se conocen muy pocos catalizadores no biológicos que tengan estas propiedades.

Estas características han permitido utilizar estos biocatalizadores en muchos procesos a nivel de la industria alimentaria, química, médica entre otras, al igual que en el tratamiento de efluentes. En especial, debido a su alta especificidad las enzimas son muy atractivas para su uso en síntesis química, especialmente para la síntesis de productos farmacéuticos, intermediarios quirales y productos bioquímicos (Tanaka, 1993; Buchholz, 2012). En particular las enzimas han resultado ser una potente herramienta en la síntesis de nuevos glicósidos. El hecho de que las mismas sean estereoselectivas permite la obtención de glicósidos anoméricamente puros en un solo paso de reacción (Ichikawa, 1992; Van Rantwijk, 1999; Bojarová, 2009).

Dentro de las enzimas que participan en el procesamiento de carbohidratos se encuentran las glicosiltransferasas (E.C. 2.4.1.--), las glicosidasas (E.C. 3.2.1.--), y

hacia finales de la década del 90 mediante mutagénesis dirigida de glicosidasas surgen las glicosintasas.

Las glicosiltransferasas permiten una transferencia regioselectiva al igual que altos rendimientos de glicosilación, pero su aplicación está restringida por la exigencia de usar como dadores de grupo glicosilo azúcares activados (nucleótidos) de alto costo, ó de su generación in situ mediante la utilización de una compleja maquinaria adicional. Son altamente selectivas respecto a los aceptores y la glicosilación raramente ocurre sobre sustratos exógenos o modificados, lo que limita su uso para la generación de nuevos glicósidos (Daines, 2004; Hancock, 2006; Bojarová, 2009).

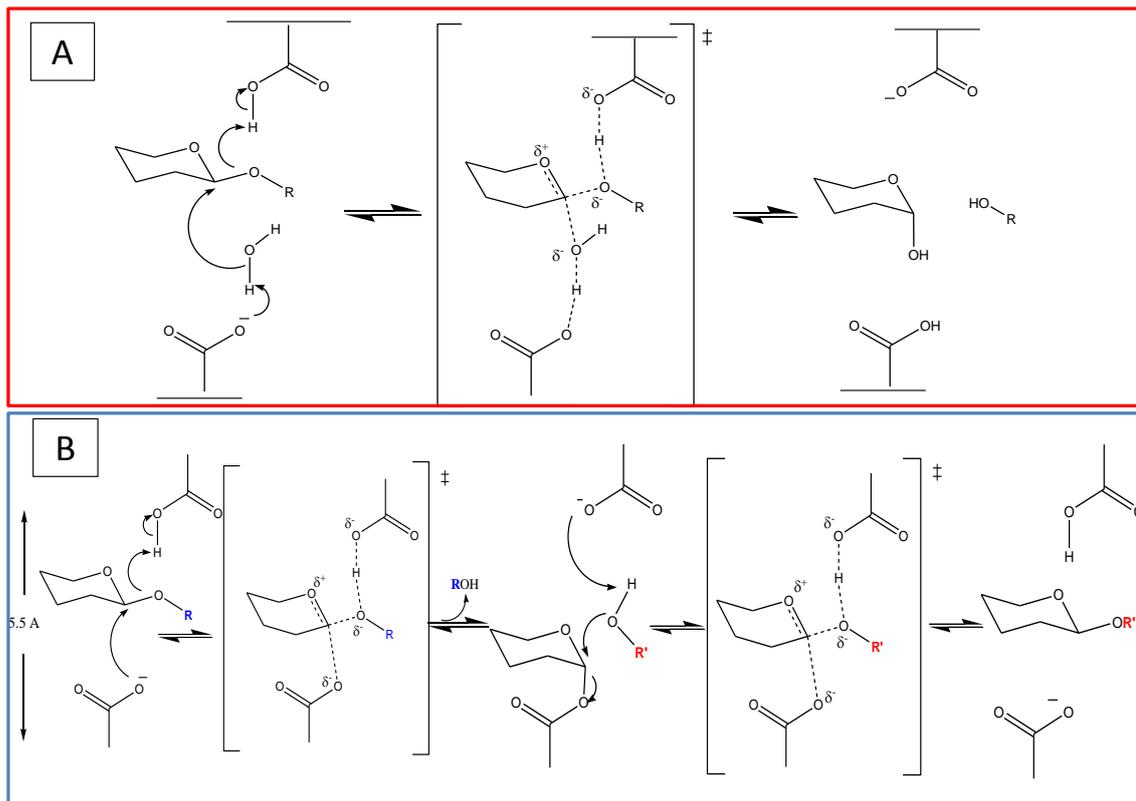
Las glicosidasas pertenecen al grupo de las hidrolasas. Ellas presentan la ventaja de estar ampliamente distribuidas en la naturaleza y por lo tanto son fácilmente accesibles, a su vez son robustas, no requieren la presencia de nucleótidos como cofactores como es el caso de las glicosiltransferasas, ni de modificación genética como en el caso de las glicosintasas (Daines, 2004; Hancock, 2006; Bojarová, 2009).

### 1.2.2.- Glicosidasas: Herramientas para la generación de glicósidos

Si bien las glicosidasas en la naturaleza actúan como hidrolasas catalizando la ruptura de enlaces glicosídicos, en condiciones adecuadas pueden actuar como transferasas. Estas transfieren una unidad de grupo glicosilo de un compuesto dador (glicósido u oligosacárido) a un nucleófilo que actúa como aceptor. De hecho cuando el aceptor es el agua tiene lugar la hidrólisis del dador. Existen glicosidasas que preservan la estereoquímica del centro anomérico del glicósido y otras que lo invierten. Sin embargo la mayoría de las glicosidasas utilizadas con fines sintéticos mantienen la configuración del carbono anomérico. Ejemplos de este caso son las enzimas  $\beta$ -galactosidasa, invertasa y lisozima. Las glicosidasas que invierten la configuración como la trehalasa y la  $\alpha$ -amilasa raramente han sido utilizadas para la síntesis de glicósidos (Crout, 1990; Ichikawa, 1992; Bucke, 1996; Vic, 1996; Palcic, 1999; Scigelova, 1999; Van Rantwijk, 1999).

Ambos mecanismos involucran la formación de un estado de transición con formación de un oxocarbonio y un par de ácidos carboxílicos de residuos

aminoácidos presentes en el sitio activo de la enzima (Figura 1.1). En las glicosidasas que invierten la configuración del centro anomérico estos dos residuos carboxílicos se encuentran a una distancia de enlace de aproximadamente 10 Å (+/- 2 Å) y la ruptura del enlace glicosídico tiene lugar mediante un mecanismo de desplazamiento simple donde un ácido carboxílico actúa como base y el otro como ácido (Figura 1.1A).

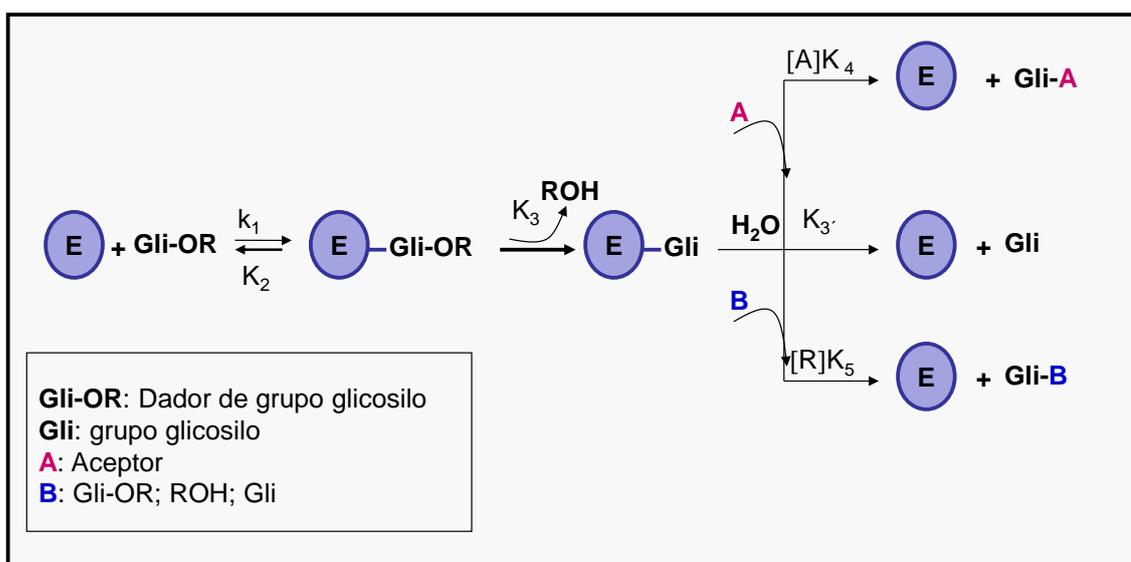


**Figura 1.1.-** Mecanismo catalítico de las glicosidasas: A) Glicosidasas que invierten la configuración y B) Glicosidasas que retienen la configuración (Adaptado de Rye, C.S., Withers, S.G. (2000) *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 573-580).

En el mecanismo catalítico de las glicosidasas que conservan la configuración del centro anomérico los residuos aminoácidos conteniendo los ácidos carboxílicos se encuentran a una distancia aproximada de 5.5 Å y el mecanismo involucrado es de doble desplazamiento (Figura 1.1 B) (Rye, 2000; Hancock, 2006; Bojarová, 2009).

Transglicosilación enzimática

La reacción de transglicosilación catalizada por las glicosidasas tiene lugar en dos pasos (Figura 1.2). En una primera etapa el sustrato (glicósido u oligosacárido) reacciona con la enzima formando el intermediario glicosil-enzima, liberando la aglicona del dador, primer producto de la reacción. En un segundo paso un nucleófilo reacciona con el intermediario glicosil-enzima actuando como aceptor del grupo glicosilo. Se libera el glicósido formado (segundo producto de la reacción) y se regenera la enzima (Figura 1.2) (Viratelle, 1973; Lopez, 1994; Richard, 1995). Una característica del sistema a ser tomada en cuenta, es que tanto el sustrato como los productos de hidrólisis liberados (si alcanzan concentraciones suficientes) pueden actuar como aceptores dando origen a otros glicósidos Gli-B (glicooligosacáridos).



**Figura 1.2.-** Esquema del funcionamiento del sistema de transglicosilación catalizado por glicosidasas

Un segundo aspecto a considerar es que el glicósido de interés Gli-A puede a su vez, ser sustrato de la enzima y por lo tanto existe la posibilidad de que el mismo sea hidrolizado disminuyendo el rendimiento de la reacción de transglicosilación. Por lo tanto en este tipo de sistemas el tiempo de reacción es un parámetro que debe ser tenido en cuenta a los efectos de obtener buenos rendimientos de síntesis.

En el caso de las  $\beta$ -D-galactosidasas los sustratos pueden ser lactosa (sustrato natural) o un sustrato artificial como el o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG).

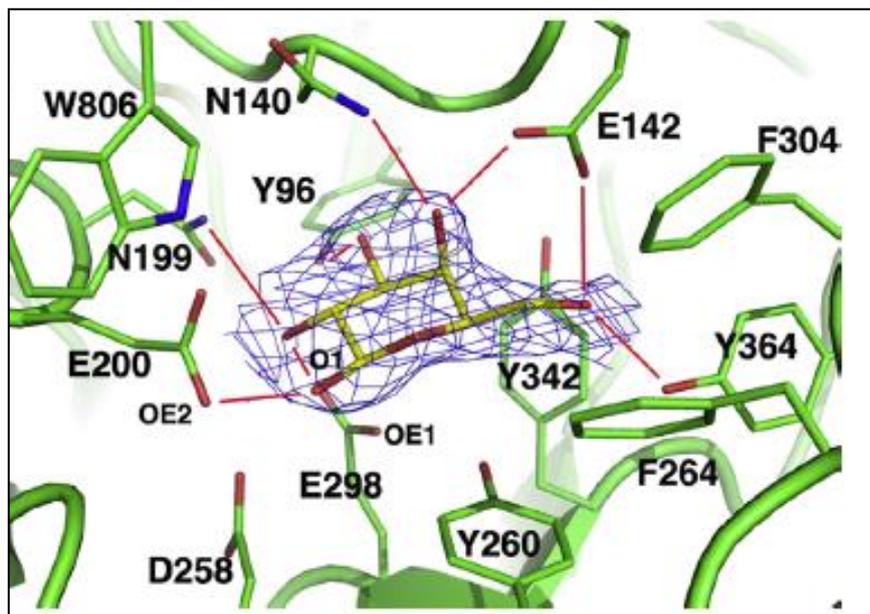
En el primer paso se libera la aglicona correspondiente (glucosa u o-nitrofenol) y en el segundo el galactósido sintetizado, ó galactosa libre cuando tiene lugar la reacción de hidrólisis. Cuando la glicosidasa utilizada es una  $\beta$ -D-glucosidasa el sustrato puede ser la celobiosa o p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido liberándose en el primer paso glucosa o p-nitrofenol y en el segundo el glucósido sintetizado ó una segunda molécula de glucosa cuando tiene lugar la reacción de hidrólisis.

Esta tesis de Maestría se enfocó en el estudio de dos sistemas de transglicosilación catalizados por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y la  $\beta$ -glucosidasa de almendras, como herramientas para ser aplicadas a la glicosilación enzimática de moléculas de bajo peso molecular.

#### 1.2.2.1.- $\beta$ -D-Galactosidasa

La  $\beta$ -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23), proveniente del hongo *Aspergillus oryzae* es una enzima monomérica extracelular, constituida por 1005 residuos aminoacídicos, con un peso molecular de 112 KDa. La misma ha sido recientemente cristalizada permitiendo determinar su estructura. Se ha clasificado como glicosido-hidrolasas (GH), perteneciente a la superfamilia GH-35, las cuales poseen como característica la presencia de 8 barriles ( $\alpha/\beta$ ) en su sitio catalítico, así como dos residuos de ácido glutámico que actúan uno como catalizador acido/base (E200) y otro como nucleófilo (E298) dentro del barril (Maksimainen, 2013) (Figura 1.3.).

El hongo *Aspergillus oryzae* es considerado un microorganismo GRAS (Generally recognized as safe). Además de presentar excelentes propiedades de transglicosilación, dicha enzima es estable en un amplio rango de temperaturas y pH, y en presencia de una serie de co-solventes orgánicos. Todas estas características la hacen una excelente elección para la síntesis de galactósidos (Park, 1979; Binder, 1994; Binder, 1995; Yoon, 1996; Scheckermann, 1997; Okahata, 1998; Reuter, 1999; Giacomini, 2007; Irazoqui, 2007; Irazoqui, 2009).



**Figura 1.3.-** Molécula de galactosa en el sitio activo de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Los puentes de hidrógeno se encuentran representados como líneas rojas (Tomado de Maksimainen et.al., *International Journal of Biological Macromolecules* (2013); 60; 109– 115).

#### 1.2.2.2.- $\beta$ -D-Glucosidasa

La  $\beta$ -glucosidasa proveniente del fruto del almendro (*Prunus amygdalus* variedad: *Dulces*) (E.C. 3.2.1.21) es una enzima homodimérica de 135 kDa de peso molecular, con un punto isoeléctrico de 7,1 (Grover, 1977). La misma ha sido utilizada en la síntesis de glucósidos con buenos rendimientos (Basso, 2002; Ducret, 2006). Es una hidrolasa capaz de catalizar reacciones de síntesis de glicósidos en presencia de baja actividad de agua (Wang, 2009).

#### 1.3.- Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue la aplicación y estudio de dos sistemas de transglicosilación para la obtención de glicósidos con dos potenciales aplicaciones:

- i) síntesis de galactósidos de bajo peso molecular con potencial actividad para actuar como inhibidores de galectinas;

- ii) glicosilación de fármacos antitumorales que les permitan aumentar su selectividad hacia los tejidos blancos.

Objetivos específicos:

En función de lo anterior se seleccionaron tres moléculas modelo que actuaran como potenciales aceptores del grupo glicosilo: 3-amino-1-propanol y 1-amino-2-propanol para la síntesis de inhibidores de galectina 1, e hidroxurea (hidroxicarbamida) para la glicosilación de drogas quimioterápicas.

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado se propuso el siguiente plan:

- i. Síntesis enzimática de 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido y 1-aminopropil-2- $\beta$ -D-galactopiranosido utilizando 3-amino-1-propanol y 1-amino-2-propanol como aceptores. Optimización de las condiciones de síntesis
- ii. Síntesis enzimática de los glicosidos de hidroxurea (galactósido y glucósido). Optimización de las condiciones de síntesis.
- iii. Purificación e Identificación de todos los compuestos sintetizados enzimáticamente.
- iv. Evaluación de los galactósidos de alcoholaminas obtenidos como potenciales inhibidores de Galectina-1.

***Capítulo 2:***

***Materiales y Métodos***

## 2.1.- MATERIALES

### 2.1.1.- Enzimas

$\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -D-galactósido galactohidrolasa; 3.2.1.23) de *Aspergillus oryzae* (G-5160);  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasa 3.2.1.21) de almendras (G-4511). Ambas enzimas fueron adquiridas en Sigma (St.Louis, MO, USA).

### 2.1.2.- Reactivos

*o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucósido (PNPG), lactosa, D-galactosa, D-glucosa,  $\alpha$ -D-galactopiranosil- $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-galactopiranosil- $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-galactopiranosido, 3-amino-1-propanol, 1-amino-2-propanol, orcinol, 1-ciano-4-dimetilaminopiridinio tetrafluoroborato (CDAP-BF<sub>4</sub>) y la trietilamina fueron adquiridos en Sigma (St.Louis, MO, USA).

El reactivo ninhidrina se adquirió de Merck (USA).

Los geles Sephadex G-10 y G-25, Sepharose 4B y las columnas PD-10 fueron adquiridos en General Electric (Buckinghamshire, UK).

Las placas de sílica para cromatografía en capa fina fueron adquiridas de Machery Nagel (Duren, Alemania). Los reactivos para el ensayo de determinación de proteínas por BCA fueron adquiridos de Pierce (Rockford, Illinois, USA).

El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

## 2.2.- Métodos

### 2.2.1.- Preparación del extracto de enzima $\beta$ -galactosidasa

Se realizó una suspensión de enzima a partir de 2.0 g de enzima en 15 mL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5 con agitación suave durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C, descartando el sólido remanente en el tubo.

### 2.2.2.- Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de concentración de proteínas para las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith, 1985).

### 2.2.3.- Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa

Se incubaron 100  $\mu$ L de una dilución adecuada de enzima con 2.0 mL de ONPG 25 mM en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,5 (buffer de actividad) a temperatura ambiente. La velocidad de formación de ONP se determinó espectrofotométricamente a 405 nm utilizando un coeficiente de extinción de  $0.75 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  a pH 5.5.

Se definió la unidad de enzima como: *“la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de ONP (o-nitrofenol) por minuto a pH 5.5 y temperatura ambiente”*. La actividad enzimática se expresó como UE/mL.

### 2.2.4.- Ensayo de actividad $\beta$ -glucosidasa

Se incubaron 2.0 mL de pNPG 20 mM en presencia 100  $\mu$ L de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en de una dilución adecuada en buffer acetato de sodio 100 mM pH 5.5 (buffer de actividad) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se tomaron alícuotas de 0.5 mL de mezcla reactiva a los siguientes tiempos: 0, 5, 10 y 15 minutos. Para detener la reacción se les adicionó al instante 0.5 mL de una solución de bicarbonato de sodio 0.10 M pH 10. La velocidad de formación de p-nitrofenol (pNP) de determinó espectrofotométricamente a 405 nm utilizando un coeficiente de extinción  $18.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a pH 10.0.

La unidad de enzima se definió como: *“la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de p-nitrofenol por minuto a temperatura ambiente y pH 5.5”*. La actividad enzimática se expresó como UE/mL.

#### 2.2.5.- Preparación de los clorhidratos de 3-amino-1-propanol y 1-amino-2-propanol

A una solución 1.0 M del correspondiente aceptor, se le adicionó gota a gota ácido clorhídrico concentrado hasta lograr pH ácido. Posteriormente, se diluyó al medio en buffer acetato de sodio 1.0 M pH 5.5. Se verificó que el pH final de la solución fuera 5.5.

La formación del clorhidrato de aminopropanol correspondiente fue necesaria para poder trabajar al pH óptimo de la enzima (pH 5.5).

#### 2.2.6.- Estabilidad de la enzima $\beta$ -galactosidasa en distintas condiciones

Se preparó una solución de enzima (6 UE/mL finales) en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5 y en una solución 500 mM de cada uno de los aceptores (3-amino-1-propanol, 1-amino-2-propanol e hidroxurea) en buffer acetato de sodio 0.5 M pH 5.5 (alcoholaminas) y 0.1 M pH 5.5 (hidroxurea). Se incubaron 5 ml de cada una de estas soluciones a 50 °C durante 24 hs. A tiempos determinados se tomaron alícuotas de 0.1 mL de dicha solución y se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa.

#### 2.2.7.- Estudio de inhibición de la enzima $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* por los aceptores en estudio (3-amino-1-propanol y 1-amino-2-propanol, hidroxurea)

Se determinó la actividad enzimática a distintas concentraciones de ONPG (1.0 mM – 15.0 mM) en presencia de diferentes concentraciones de aceptor (0.1 M- 1.0 M) a temperatura ambiente. Los parámetros cinéticos fueron determinados por el método de Hanes (Cornish-Bowden, 1995).

### 2.2.8.- Síntesis de los galactósidos de alcoholaminas

Para llevar a cabo la síntesis se prepararon 10.0 mL de una solución conteniendo lactosa (0.10-0.35 M) como dador de grupo galactosilo y el aceptor seleccionado (clorhidratos de 3-amino-1-propanol ó 1-amino-2-propanol), en distintas concentraciones (0.10 M- 0.50 M) en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5. Se adicionó al medio la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (6 UE/mL concentración final) previamente gel filtrada en columnas PD10 (Sephadex G25) y se incubó a 50°C. Se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L a tiempos predeterminados durante 24 hs, y se detuvo la reacción enzimática por calentamiento durante 5 minutos a 100 °C en baño de agua hirviendo.

### 2.2.9.- Síntesis de galactósido de hidroxurea.

Se incubaron 10.0 mL de una solución conteniendo lactosa en concentración variable (70 mM- 347 mM) como dador de grupo galactosilo e hidroxurea (500 mM) como aceptor en buffer acetato de sodio 50 mM pH. 5.5. Se adicionó al medio la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (6 UE/mL concentración final) previamente gel filtrada en columnas PD10 (Sephadex G25) y se incubó a 50°C. Se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L a tiempos predeterminados durante 24 hs, y se detuvo la reacción enzimática por calentamiento durante 5 minutos a 100 °C en baño de agua hirviendo.

### 2.2.10.- Síntesis de glucósido de hidroxurea

Se incubaron 10 mL de una solución conteniendo 0.35 M celobiosa como dador de grupo galactosilo y 0.5 M hidroxurea como aceptor en buffer acetato de sodio 100 mM pH. 5.5. Se adicionó al medio la enzima  $\beta$ -glucosidasa de almendras en concentración final 6 UE/mL y se incubó a temperatura de 50 °C durante 24 horas. Se tomaron alícuotas a tiempos predeterminados deteniéndose la reacción

enzimática por calentamiento durante 5 minutos a 100 °C en baño de agua hirviendo.

#### 2.2.11.- Evaluación de las síntesis enzimáticas

Se siguió el avance de la reacción de síntesis, tanto de transgalactosilación como de transglucosilación, por métodos de cromatografía en capa fina (TLC) y por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

##### 2.2.11.1.- Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

Las TLC analíticas se desarrollaron en placas de Sílica Gel 60 de 0.25 mm. Las muestras y estándares (glucosa, galactosa, lactosa, celobiosa, 3-amino-1-propanol, 1-amino-2-propanol e hidroxiourea) fueron sembrados en placa. Se sembraron 5 µL de muestra o de estándar en banda de 1 cm en forma cuantitativa. Todas las muestras fueron diluídas al cuarto previo a la siembra. La cromatografía se desarrolló hasta un frente de 10 cm, en una cámara de dimensiones 22 cm x 22 cm x 6 cm (previamente saturada durante 30 minutos por en la siguiente fase móvil: Metanol; Cloroformo; Acetona; Hidróxido de amonio; 42: 16: 25: 16 v/v).

La placa fue secada al aire, asperjada con orcinol 0.2 % (p/v) en una mezcla etanol: ácido sulfúrico (90:10), o asperjada con ninhidrina para determinar presencia de grupo amino libre (0.2% (p/v) en una mezcla 1-butanol: ácido acético al 10% v/v; 95:5 v/v). En ambos casos posteriormente a la aplicación del revelador, se calentó la placa durante 2 minutos (110° C) (Garófalo, 2011).

##### 2.2.11.2.- Análisis por HPLC

Los galactósidos obtenidos se evaluaron utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Waters, equipado con detector de índice de refracción. Se utilizó una columna Shodex Asahiapak NH2P50 4E, 4.6 mm d.i. x 250 mm de largo, a 25 °C, con la siguiente fase móvil: acetonitrilo: agua (75:25) y un flujo de 1 ml/min.

### 2.2.12.- Purificación de los glicósidos

La purificación de los glicósidos se llevó a cabo por cromatografía de exclusión molecular utilizando un equipo Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Pharmacia equipado con una columna preparativa (16 mm d.i. x 700 mm de largo) de Sephadex G10, con agua bidestilada como fase móvil y un flujo de 0.06 mL/min (1.8 cm /h) acoplado a un detector de índice de refracción. En una segunda etapa de la purificación se realizó TLC preparativa a las fracciones eluidas de interés, como ya fue descrito. Se revelaron los bordes de las placas con orcinol para ubicar los carbohidratos.

La sílica de la zona correspondiente al carbohidrato de interés fue removida y el compuesto se extrajo por sonicación durante 10 minutos en una mezcla metanol: agua (20: 80 v/v). Posteriormente la suspensión fue centrifugada por 10 minutos a 8700 g. El procedimiento se repitió tres veces. Los sobrenadantes fueron recolectados, se rotaevaporó el metanol y posteriormente se liofilizó.

### 2.2.13.- Identificación de los glicósidos

#### *2.2.13.1.- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR)*

Los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN fueron realizados a frecuencias de 400 y 100 MHz respectivamente a 30 °C en un instrumento Bruker Avance DPX 400 NMR usando como solvente metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Los desplazamientos químicos se reportaron en ppm, usando TMS y ( $\delta_{\text{H}}$  0.00) y  $\text{Me}_2\text{CO}$  ( $\delta_{\text{C}}$  31.00) como referencia interna. Los experimentos bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) fueron realizados de acuerdo con las secuencia de pulsos estándares del software del instrumento. La preparación de las muestras se llevó a cabo tres ciclos de disolución en  $\text{D}_2\text{O}$  y liofilizado.

### *2.2.13.2.- Espectrometría de masa*

Los estudios de espectrometría de masa se realizaron en un espectrómetro equipado por una fuente de iones de tipo electrospray y un detector de trampa iónica lineal (LTQ Velos, Thermo). La muestra se resuspendió en una solución 30% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico y se introdujo por inyección directa a 4  $\mu\text{l}/\text{min}$ . La detección se realizó en modo positivo (I voltaje 5kV, temperatura capilar 275°C).

### *2.2.14.- Evaluación biológica de los galactósidos*

#### *2.2.14.1.- Preparación de la suspensión de glóbulos rojos de conejo*

Se partió de sangre heparinizada de conejo, previamente centrifugada (1500 g, 3 minutos). Se descartó el plasma y el pellet se lavó con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.4; 0.15 M NaCl (PBS), se le agregó 1.0 mL de una solución de tripsina 1 mg/mL en PBS y se incubó durante una hora a 37 °C. Los glóbulos rojos tripsinados se lavaron 4 veces con PBS por centrifugación a 1500 g durante 3 minutos. La fijación de los eritrocitos se realizó con 1.0 mL de glutaraldehído 1% e incubando durante 1h a temperatura ambiente. Se realizaron varios lavados con glicina 0,1 M y finalmente con PBS. A partir de ese pellet se prepararon las suspensiones de glóbulos rojos al 4% para los ensayos de hemaglutinación.

#### *2.2.14.2.- Ensayo de Hemaglutinación (HAG)*

Se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en Franco Fraguas 2003 a. En una placa de microtitulación de fondo redondo se incubaron 25  $\mu\text{L}$  de 0,15 M NaCl, 25  $\mu\text{L}$  1 % BSA en 0,15 M NaCl, 25  $\mu\text{L}$  de galectina 1 de bazo bovino purificada en nuestro laboratorio de acuerdo a lo reportado por Ahmed et. al. (1996) con algunas modificaciones (Rodríguez, 2011) y 25  $\mu\text{L}$  de una suspensión al 4 % de glóbulos rojos de conejo tripsinados. Se homogenizó y se incubó durante 30 minutos bajo agitación suave a temperatura ambiente. Se observó presencia o ausencia de aglutinación.

La actividad HAG se cuantificó por el método de la dilución seriada al medio. Una Unidad de Lectina (UL) se define como el inverso de la máxima dilución en la que se observa aglutinación.

#### 2.2.14.3.- *Ensayo de Inhibición de HAG*

Se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado previamente en Franco Fraguas 2003a y en Giguére 2008. Para ello se sustituyó en el ensayo de HAG descrito anteriormente, los 25  $\mu$ L de 0,15 M NaCl por 25  $\mu$ L de los galactósidos a evaluar, utilizándose diluciones seriadas al medio de los mismos.

La concentración de lectina utilizada para estos estudios fue aquella capaz de causar un 50 % de hemaglutinación (la dilución previa a la última que permite ver hemaglutinación a simple vista).

Se definió la mínima concentración inhibitoria (MIC) como la mínima concentración de galactósidos capaz de inhibir la hemaglutinación. La potencia inhibitoria relativa se definió como el cociente entre la MIC de la galactosa y la MIC del galactósido a ser evaluado.

Todos los experimentos detallados en el presente capítulo fueron realizados al menos por triplicado.

**Capítulo 3:**

**Estudio del sistema de transgalactosilación aplicado a la síntesis de galactosil-alcoholaminas.**

### 3.1 INTRODUCCIÓN

El avance de la glicobiología en los últimos años, ha demostrado el rol de los carbohidratos en múltiples procesos biológicos tanto normales como patológicos. Por esta razón profundizar en el conocimiento de los mecanismos que involucran la interacción entre carbohidratos y proteínas, es importante tanto para el estudio y diagnóstico de ciertas patologías, así como para lograr el diseño racional de drogas para su tratamiento.

El estudio de las interacciones entre carbohidratos y lectinas es una de las áreas de investigación más prometedoras para develar los mecanismos de los procesos biológicos mediados por glicanos, para lo cual es esencial disponer de glicósidos y oligosacáridos de estructura definida (Ito, 2012; Sunasee, 2013; Ogiso, 2013). Las lectinas son proteínas que presentan un dominio de reconocimiento para carbohidratos (DRC); en particular las galectinas reconocen en forma específica  $\beta$ -galactósidos. Una de las más estudiadas es la Galectina-1 (Gal-1) (Rabinovich, 2005), la cual es secretada de forma abundante por la mayoría de las células tumorales malignas. Participa en el desarrollo del cáncer, promoviendo la adhesión de las células tumorales, angiogénesis, metástasis, hipoxia y la generación de un ambiente inmunosupresor que favorece el crecimiento del tumor (Hasan, 2007; Ito, 2012). Por tal motivo esta proteína constituye un blanco molecular en la terapia del cáncer, lo que convierte a sus inhibidores en potenciales agentes antitumorales.

Se ha reportado la capacidad de ciertos galactósidos de unirse al DRC de las galectinas inhibiendo la unión de sus ligandos naturales. Por esta razón, la disponibilidad de galactósidos sintéticos de bajo peso molecular con estructura definida, pasibles de ser evaluados como inhibidores de galectina, sería fundamental para el diseño de nuevos agentes antitumorales (Rabinovich 2006).

La mayoría de los galactósidos sintéticos reportados en bibliografía han sido obtenidos

por síntesis química tradicional, proceso que requiere de numerosos pasos de protección y desprotección de los grupos hidroxilos (Ingrassia, 2006; Giguère, 2006; Hasan, 2007; Guigère, 2008; Ito, 2012). En este sentido, la glicosilación enzimática, permite la generación de glicósidos anoméricamente puros en un solo paso de reacción, utilizando condiciones de reacción moderadas, lo que constituye una excelente alternativa.

En particular, la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, es una glicosidasa ampliamente utilizada para la generación de galactósidos mediante el mecanismo de transglicosilación (Ismail, 1999; Giacomini, 2002; Irazoqui, 2009; Yoon, 2010; Porciúncula González, 2013).

El objetivo de este capítulo fue estudiar el sistema de transglicosilación catalizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* como herramienta para la síntesis enzimática de galactósidos de bajo peso molecular y su evaluación como inhibidores de Gal-1. En particular se estudió la síntesis de los compuestos 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido y 1-aminopropil-2- $\beta$ -D-galactopiranosido, usando lactosa como dador de galactosilo y la alcoholamina correspondiente como aceptor.

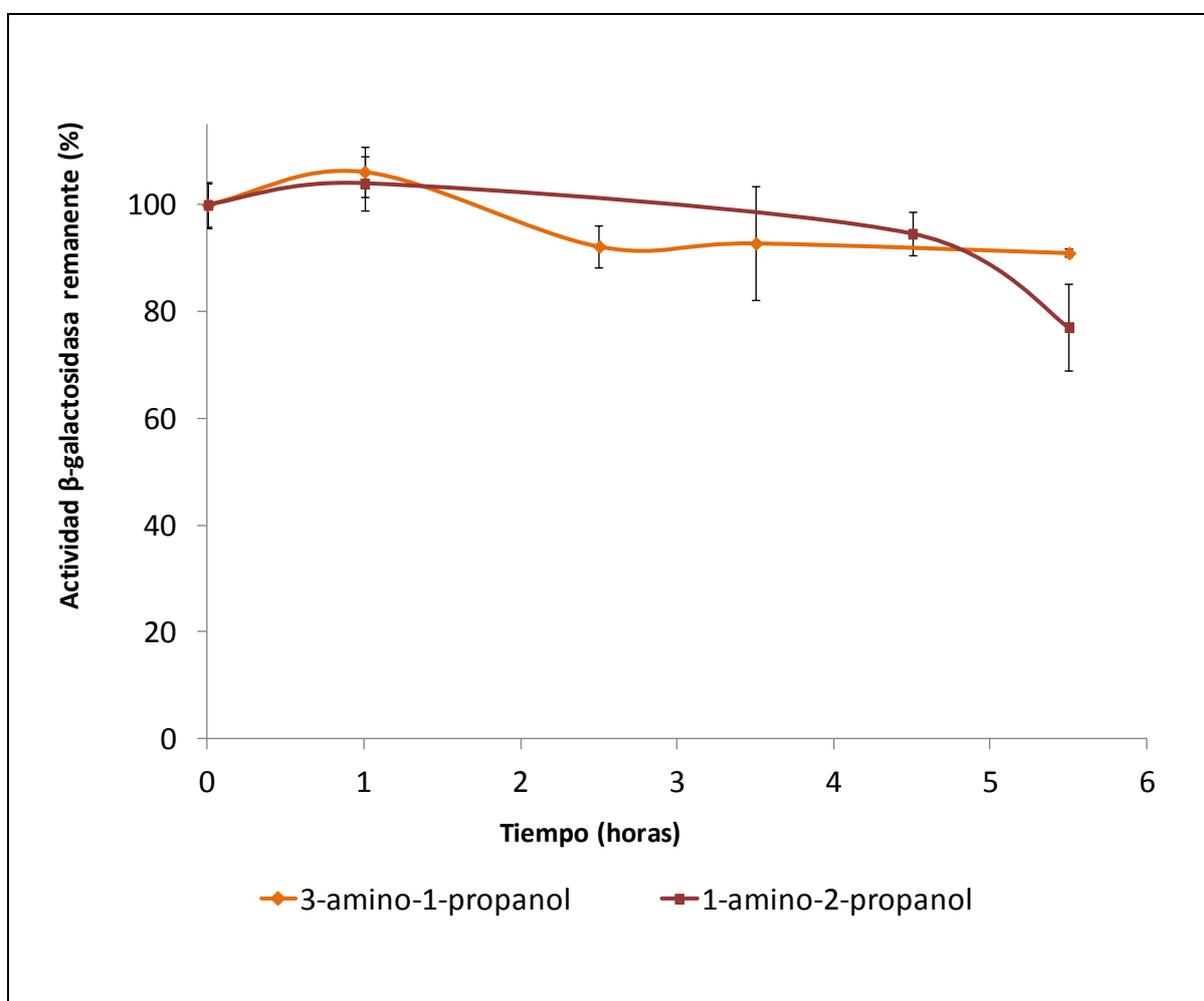
## 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.2.1. Estudio de estabilidad de la $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en las condiciones de trabajo

La síntesis enzimática de los galactósidos propuestos requiere del uso de alcoholaminas como aceptores. Dada la naturaleza orgánica de las mismas y considerando que la estabilidad de las glicosidasas en estos solventes es dependiente de su concentración (Brena, 2003) es necesario estudiar la estabilidad de la enzima en las condiciones de reacción. Por lo tanto se realizó el estudio de estabilidad en las condiciones más drásticas a ser utilizadas, 500 mM de aceptor (3-amino-1-propanol ó 1-amino-2-propanol), pH 5.5, 50°C durante 24 hs. Tanto la temperatura (50°C) como el pH (5.5) seleccionados fueron

los reportados como óptimos para esta enzima (Park, 1979).

Tal como se puede apreciar en la Figura 3.1, en presencia tanto de 3-amino-1-propanol como de 1-amino-2-propanol, la enzima mantuvo una actividad residual superior al 75% durante las primeras 5,5 horas. Posteriormente decayó paulatinamente hasta un 45 % al cabo de 24 horas de incubación. La enzima incubada a 50 °C en ausencia de aceptor, demostró al cabo de 24 horas mantener una actividad residual superior al 90 %, por lo que el decaimiento observado cuando se incubaba con la alcoholamina se debió mayormente a la presencia de esta.



**Figura 3.1:** Estabilidad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en presencia de los aceptores propuestos a 50 °C y pH 5.5.

En función de estos resultados, es posible trabajar en estas condiciones a tiempos cercanos a las 5.5 horas manteniendo una actividad enzimática residual adecuada para que se desarrolle la catálisis.

### 3.2.2. Estudio de inhibición de la enzima por el aceptor

Se ha reportado que el aceptor del sistema de transgalactosilación puede actuar como inhibidor de la enzima (López, 1994; Irazoqui, 2013; Porciúncula-González, 2013). Por esta razón se estudió la inhibición de la enzima por parte de los aceptores 3-amino-1-propanol y 1-amino-2-propanol, a temperatura ambiente y utilizando ONPG como sustrato de la enzima, de manera de facilitar la determinación de la actividad enzimática.

Como se observa en la Tabla 3.1 ni la constante catalítica ( $k_{cat}$ ), ni la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), y en consecuencia tampoco la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) de la enzima, se vieron afectadas en forma significativa en presencia de 3-amino-1-propanol en las concentraciones estudiadas (0 – 1.0 M), por lo cual se puede concluir que este aceptor no es inhibidor de la enzima.

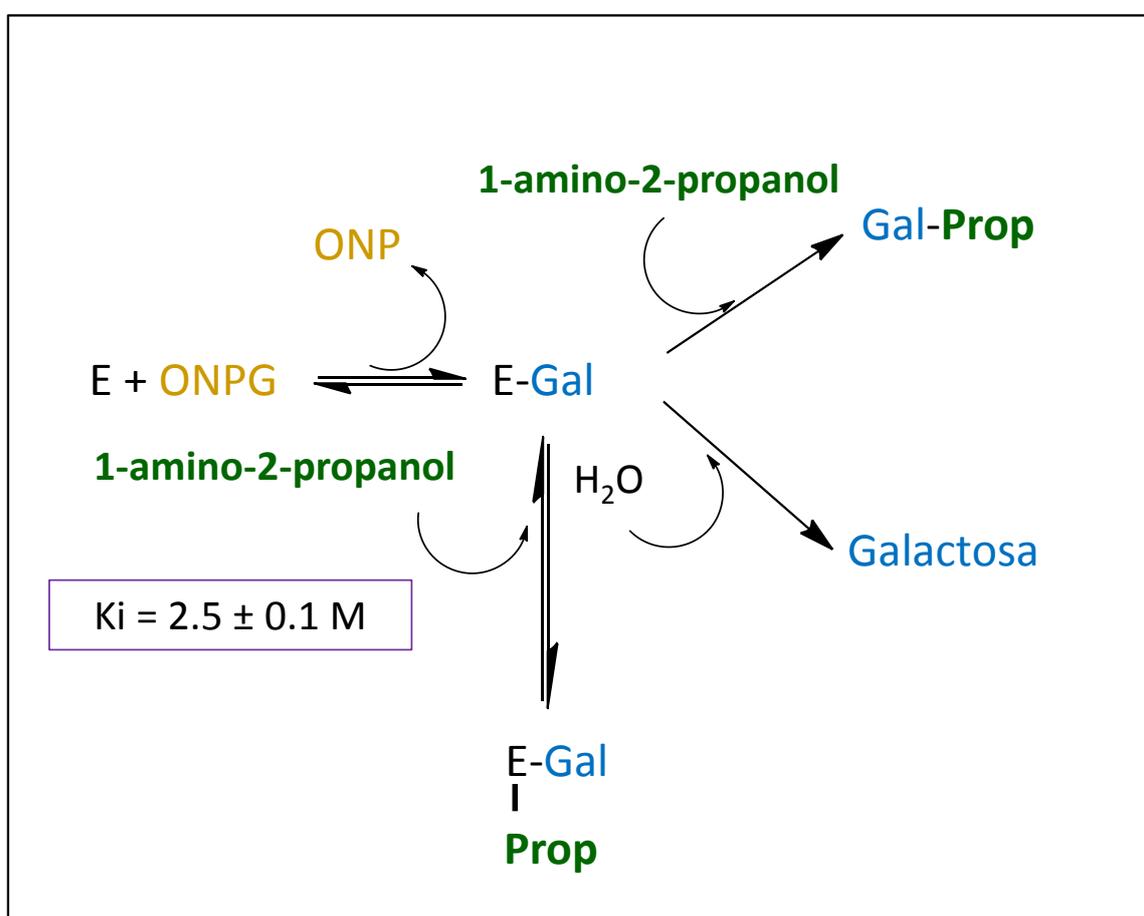
**Tabla 3.1.** Estudio de inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* por 3-amino-1-propanol

[3-amino-1-propanol] (M)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
0	2.6 ± 0.2	(5.7 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup>	(2.2 ± 0.4) × 10 <sup>3</sup>
0.1	2.8 ± 0.1	(6.1 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup>	(2.2 ± 0.1) × 10 <sup>3</sup>
0.3	3.0 ± 0.1	(6.3 ± 0.6) × 10 <sup>3</sup>	(2.1 ± 0.3) × 10 <sup>3</sup>
0.5	3.4 ± 0.3	(7.0 ± 0.7) × 10 <sup>3</sup>	(2.1 ± 0.4) × 10 <sup>3</sup>
1.0	3.7 ± 0.7	(7.3 ± 1.1) × 10 <sup>3</sup>	(2.0 ± 0.7) × 10 <sup>3</sup>

Sin embargo, los resultados obtenidos con 1-amino-2-propanol demostraron que este aceptor ejerció un leve efecto inhibidor sobre la enzima (Tabla 3.2). Como se puede apreciar en dicha tabla, tanto la  $k_{cat}$  como el  $K_m$  disminuyeron en la misma proporción al aumentar la concentración de esta alcoholamina lo cual es característico de la inhibición acompetitiva (Esquema 3.1). Se determinó la constante de inhibición obteniéndose un valor de 2.5 ± 0.1 M.

**Tabla 3.2.** Estudio de inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* con 1-amino-2-propanol

[1-amino-2-propanol] (M)	Km (mM)	Kcat (min <sup>-1</sup> )	Kcat/Km (mM <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
0	2.6 ± 0.2	(5.7 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup>	(2.2 ± 0.4) × 10 <sup>3</sup>
0.1	3.2 ± 0.2	(4.8 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup>	(1.5 ± 0.2) × 10 <sup>3</sup>
0.3	2.4 ± 0.2	(3.8 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup>	(1.5 ± 0.3) × 10 <sup>3</sup>
0.5	2.6 ± 0.1	(4.0 ± 0.3) × 10 <sup>3</sup>	(1.5 ± 0.2) × 10 <sup>3</sup>
1.0	2.0 ± 0.1	(3.4 ± 0.3) × 10 <sup>3</sup>	(1.7 ± 0.2) × 10 <sup>3</sup>



**Esquema 3.1:** Mecanismo de inhibición acompetitiva ejercida por 1-amino-2-propanol sobre la enzima (ONPG: o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido; Prop: 1-amino-2-propanol; Gal: galactosa).

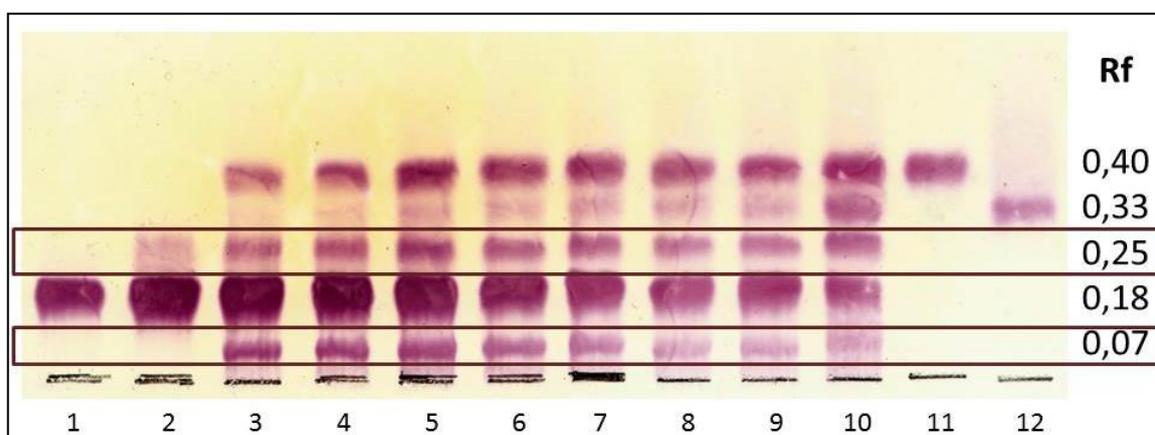
El alto valor de la  $K_i$  para el 1-amino-2-propanol indica que el efecto inhibitorio del mismo sobre la enzima es muy leve. Si bien a los efectos de facilitar el diseño experimental de este estudio se utilizaron un sustrato (ONPG) y una temperatura (25°C) diferentes a las utilizadas en la reacción de síntesis de los galactósidos de interés (lactosa y 50°C), los

resultados obtenidos pueden utilizarse como una aproximación válida para suponer que el grado de inhibición ejercido por el aceptor 1-amino-2-propanol sobre la enzima en esas condiciones también sería de muy bajo impacto.

### 3.2.3. Síntesis de 3-aminopropil-1-β-D-galactopiranosido

Se estudió la síntesis enzimática del compuesto 3-aminopropil-1-β-D-galactopiranosido, a partir de lactosa (347 mM) como sustrato dador y 3-amino-1-propanol (500 mM) como aceptor, durante 24 horas a 50°C y pH 5.5, utilizando 6 UE/mL. Se siguió el avance de la reacción por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando un revelador específico para carbohidratos (orcinol) y otro para detección de grupo amino libre (ninhidrina).

En la Figura 3.2 se observa que a medida que la reacción avanza disminuye la concentración de lactosa ( $R_f$  0,18) y aumenta la concentración de sus productos de hidrólisis glucosa ( $R_f$  0,40) y galactosa ( $R_f$  0,33).



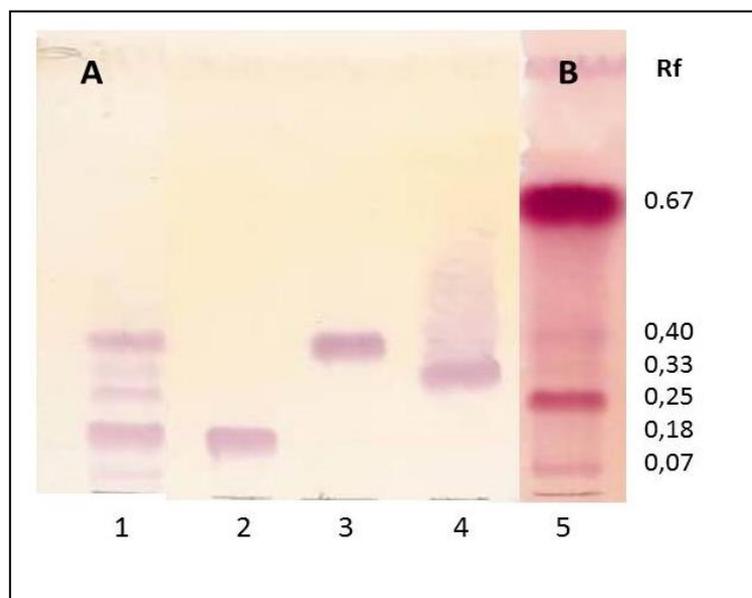
**Figura 3.2.-** Avance de la reacción de transglucosilación evaluada por TLC, utilizando lactosa 347 mM, 3-amino-1-propanol 500 mM (6 UE/mL, 50° C y pH 5.5)  
Siembra: **1:** Lactosa 50 mM; **2:** 0 hs.; **3:** 0.25 hs.; **4:** 0.5 hs.; **5:** 1 hs.; **6:** 2 hs.; **7:** 3 hs.; **8:** 4 hs.; **9:** 5 hs.; **10:** 24 hs.; **11:** Glucosa 50 mM; **12:** Galactosa 50 mM.

Durante las primeras cinco horas de reacción el incremento de la concentración de glucosa fue más pronunciado que el de galactosa. Esto puede ser un indicio de la coexistencia de los procesos de transgalactosilación e hidrólisis, ya que la glucosa se libera en el primer paso de reacción en ambos procesos, independientemente del aceptor involucrado. Sin embargo la galactosa solo se libera en el segundo paso de reacción

cuando el aceptor es el agua (Esquema 1.2).

Por otra parte, aparecieron dos nuevas bandas, cuyos  $R_f$  de 0,25 (compuesto 1) y de 0,07 (compuesto 2) no coincidieron ni con los sustratos ni con los productos de hidrólisis lo que implicaría que estos compuestos serían productos de transgalactosilación. Cabe destacar que al cabo de 24 horas la intensidad de la banda del compuesto 2 disminuyó notoriamente mientras que la intensidad de la banda correspondiente al compuesto 1 permaneció constante. Esto estaría indicando que el compuesto 2 se hidroliza a tiempos prolongados mientras que el compuesto 1 o bien no se hidroliza, o mantiene un equilibrio entre las velocidades de síntesis y de hidrólisis.

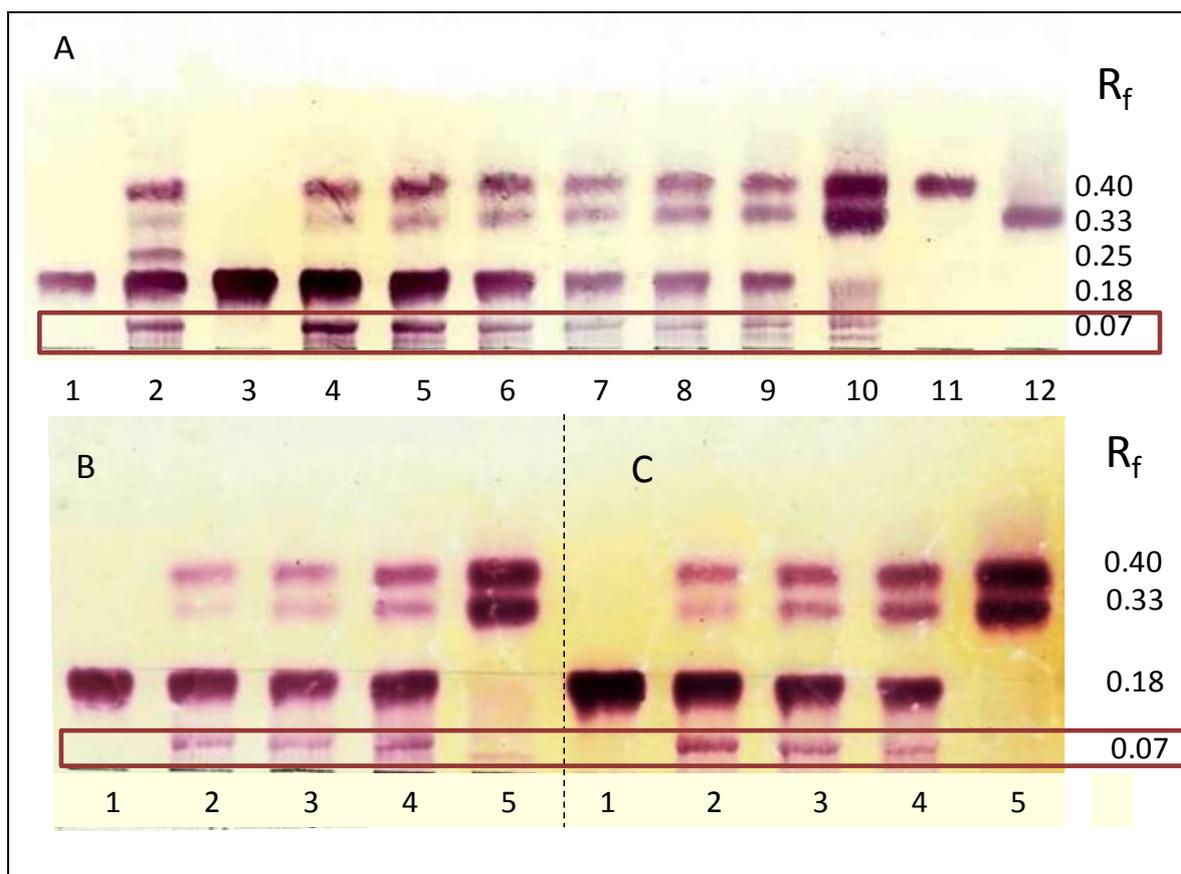
Para determinar la presencia de grupos amino libre en los nuevos compuestos se realizó una TLC y se reveló con ninhidrina. Como se aprecia en la Figura 3.3 las bandas correspondientes a los dos compuestos nuevos fueron reveladas con orcinol, por lo que se trata en ambos casos de carbohidratos; sin embargo solo el compuesto 1 y la banda correspondiente al 3-amino-1-propanol ( $R_f$  0.67) revelaron con ninhidrina, lo que pone de manifiesto que los mismos poseen en su estructura un grupo amino primario, siendo un primer indicio de que el compuesto 1 podría ser el galactósido buscado, es decir 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido.



**Figura 3.3.** Evaluación de la reacción de transgalactosilación a las 2 hs de reacción (lactosa 347mM, 3-amino-1-propanol 500 mM, 6UE/mL pH: 5.5 y 50 °C. **A)** revelado con orcinol. **B)** revelado con ninhidrina. Siembra: 1- Síntesis de 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido; 2- Lactosa 50 mM; 3- Glucosa 50 mM ; 4- Galactosa 50 mM ; 5- Síntesis de 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido.

### 3.2.4. Reacción de síntesis en ausencia del aceptor (control)

Con el objetivo de evaluar el comportamiento del sistema de transglicosilación en ausencia del aceptor (3-amino-1-propanol ó 1-amino-2-propanol) se incubó la enzima con tres concentraciones de lactosa diferentes (100, 200 y 347mM). En la Figura 3.4 se observa la formación de glucosa y galactosa, así como también del compuesto 2 ( $R_f$  0.07) en todas las concentraciones de lactosa estudiadas.



**Figura 3.4.** Avance de la reacción de transglicosilación evaluada por TLC utilizando diferentes concentraciones lactosa en ausencia de aceptor (6UE/mL, 50°C, pH 5.5)

**A) Lactosa 347 mM:** 1- Lactosa 50 mM, 2- síntesis con 3-amino-1-propanol 500 mM 2 hs de reacción, 3- 0 h, 4- 0.25 h, 5- 0.5 h, 6- 1 h, 7- 2 h, 8- 3 h, 9- 4 h, 10- 24 h, 11- Glucosa 50 mM, 12- Galactosa 50 mM.

**B) Lactosa 200 mM:** 1- 0 h, 2- 0.25 h, 3- 0.5 h, 4- 1 h, 5- 24 h.

**C) Lactosa 100 mM:** 1- 0 h, 2- 0.25 h, 3- 0.5 h, 4- 1 h, 5- 24 h.

El hecho de que el compuesto 2 se sintetice en ausencia de 3-amino-1-propanol confirma que el mismo no es producto de la transferencia de una unidad de galactosa al 3-amino-1-propanol. La formación del compuesto 2 podría estar dada por la reacción de

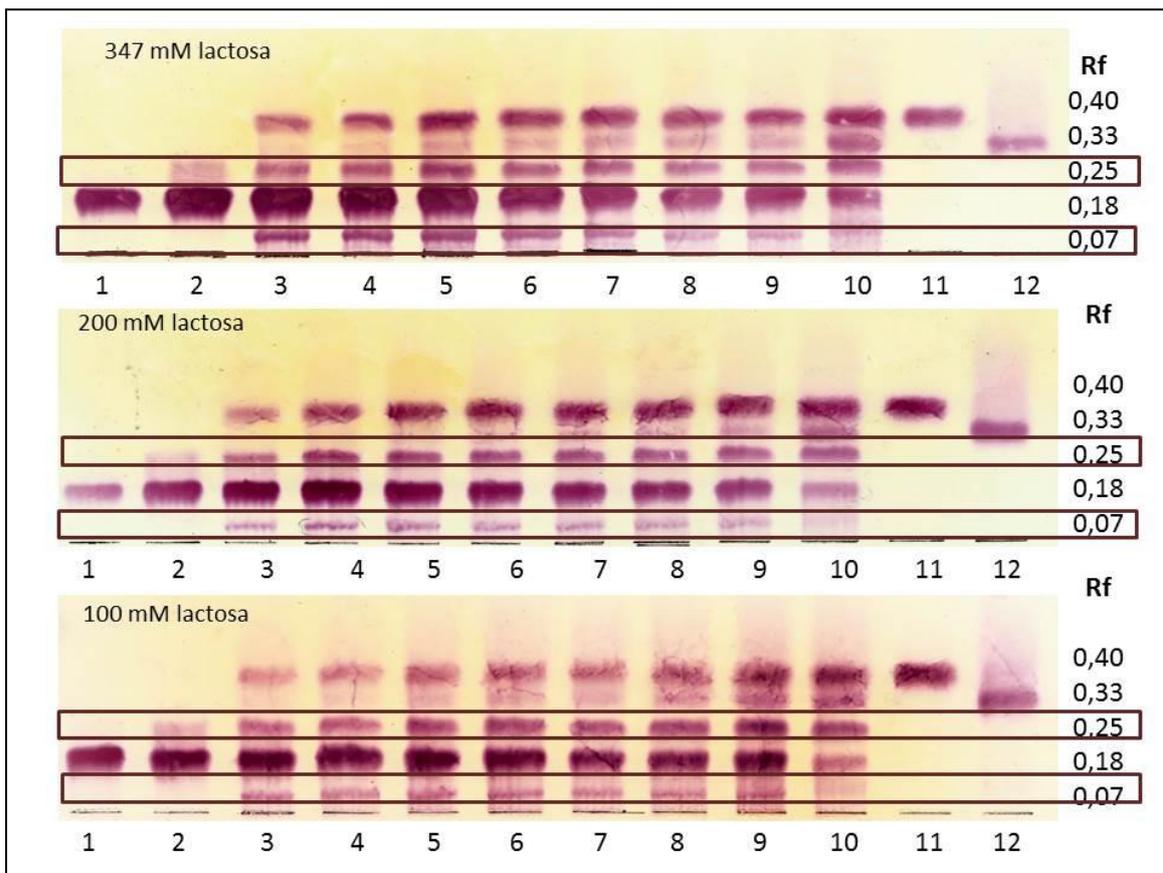
transglucosilación donde la lactosa actúa en forma simultánea como dador y aceptor del grupo galactosilo. A su vez es interesante destacar, que dicha reacción es capaz de competir con la reacción de hidrólisis aún en baja concentración de lactosa.

Además el hecho de que el compuesto 1 no se sintetice en ausencia de 3-amino-1-propanol reafirma la teoría de que el mismo podría ser 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido. Otro punto a tener en cuenta es que cuando la concentración inicial de lactosa fue 100 y 200 mM la conversión de la misma a las 24 horas de reacción fue total, y casi completa cuando la concentración inicial de lactosa fue 347mM.

### 3.2.5. Evaluación de las condiciones óptimas de reacción

Se evaluaron diferentes condiciones de reacción con el objetivo de incrementar el rendimiento de producción de 3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido. Para ello se estudió la síntesis en presencia de distintas concentraciones de aceptor y de dador a lo largo de 24 horas de reacción, manteniendo constantes la otras condiciones: 50°C, pH 5.5 y 6 UE/mL. En una primera instancia se evaluó la influencia de la concentración de lactosa manteniendo fija la concentración de 3-amino-1-propanol en 500 mM. Como se puede observar en la Figura 3.5. tanto el compuesto 1 como el 2 se sintetizaron de manera apreciable en las tres concentraciones de lactosa estudiadas.

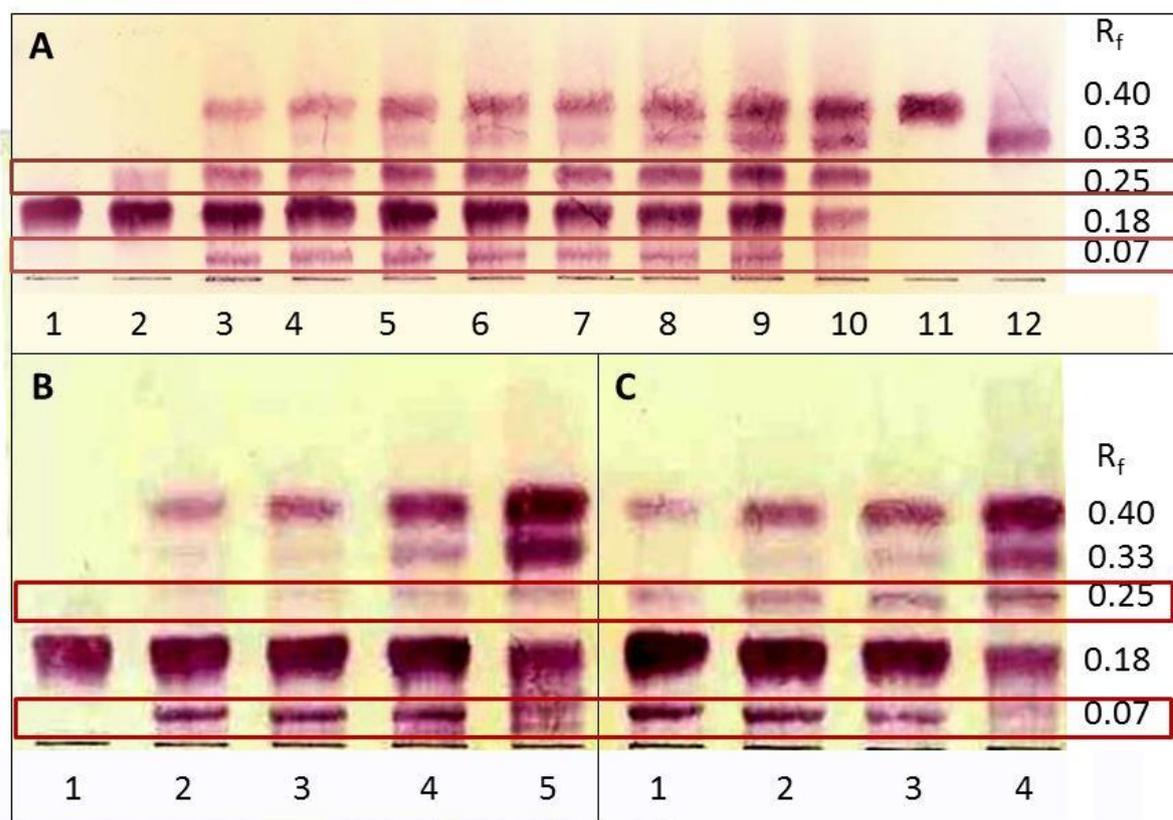
Esto demuestra que en el rango estudiado (100-347 mM) la concentración de lactosa no es un parámetro crítico en la síntesis del galactósido.



**Figura 3.5.** Avance de reacción de transglucosilación evaluada por TLC utilizando 3-amino-1-propanol 500 mM y concentración variable de lactosa (6UE/mL, 50 °C, pH 5.5). Siembra: 1- Lactosa 50 mM; 2- 0 hs; 3- 0.25 hs; 4- 0.5 hs; 5- 1 hs; 6- 2 hs; 7- 3 hs; 8- 4 hs; 9- 5 hs; 10- 24 hs; 11- Glucosa 50 mM; 12- Galactosa 50 mM.

Posteriormente se estudió el comportamiento del sistema de transgalactosilación en función de la concentración de aceptor (100, 250 y 500 mM de 3-amino-1-propanol) a una concentración fija de lactosa (200 mM). En la Figura 3.6 se observa que a mayor concentración de 3-amino-1-propanol, mayor intensidad de la banda correspondiente al compuesto 1. Por lo tanto la concentración de aceptor, sí es un parámetro crítico para la generación del compuesto 1, favoreciendo la reacción de transgalactosilación.

Al comparar la Figura 3.6. con la Figura 3.4. se observa cómo la velocidad de conversión de la lactosa se enlentece en presencia de 3-amino-1-propanol. Tal como fue discutido anteriormente en la sección 3.2.2, se descarta inhibición de la enzima por 3-amino-1-propanol, como explicación de este comportamiento.



**Figura 3.6:** Avance de la reacción de transglucosilación evaluada por TLC utilizando lactosa 200 mM y distintas concentraciones de 3-amino-1-propanol (100 mM, 250 mM y 500 mM).

**A) 3-amino-1-propanol 500 mM:** 1- Lactosa 50 mM; 2- 0 h, 3- 0.25 h, 4- 0.5 h, 5- 1h, 6- 2h, 7- 3h, 8- 4h, 9- 5h, 10- 24h, 11- Glucosa 50 mM, 12- Galactosa 50 mM

**B) 3-amino-1-propanol 100 mM:** 1- 0 h; 2- 0.5 h; 3- 1 h; 4- 3h; 5- 24h.

**C) 3-amino-1-propanol 250 mM:** 1- 0.5 h; 2- 1 h; 3- 3 h; 4- 24 h.

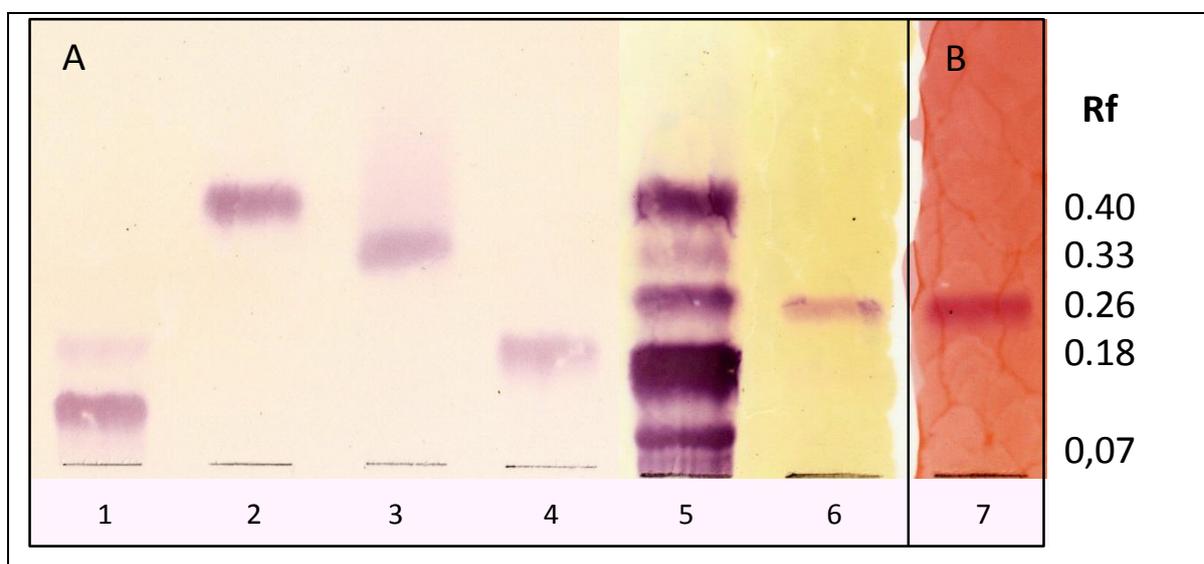
Dado que la enzima mantuvo un porcentaje de actividad residual cercana al 45% al cabo de 24 hs de incubación a 50°C en presencia de 3-amino-1-propanol (sección 3.2.1), es posible que la inactivación parcial de la enzima sea la causa de dicho enlentecimiento. Más aun dado que la enzima mostró ser estable durante 24 hs a 50°C (en ausencia de aceptor) la disminución de la velocidad de conversión de lactosa puede parcialmente atribuirse a la presencia de 3-amino-1-propanol en el medio de reacción.

Ya que la concentración de lactosa no fue un parámetro crítico para la síntesis del galactósido, considerando que una concentración baja de la misma facilita la purificación del mismo, y que la mayor producción de galactósido se observó con la concentración mas alta de aceptor estudiada, las condiciones seleccionadas para la síntesis fueron: concentraciones 100 mM de lactosa y 500 mM de 3-amino-1-propanol; 50°C de temperatura; pH 5.5 y 6 UE/mL. Se seleccionó el tiempo de 24 horas de reacción dado

que la conversión de lactosa es casi total, lo que es un hecho muy favorable para el proceso de purificación a la vez que no se observó disminución del compuesto de interés en ese período.

### 3.2.6. Purificación de los compuestos 1 y 2

La purificación de los compuestos 1 y 2 se llevó a cabo en dos etapas utilizando como muestra de partida la síntesis realizada en las condiciones seleccionadas. En la primera etapa se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna empaquetada con Sephadex G-10, en la que el compuesto 2 eluye primero y se obtiene prácticamente puro, mientras que el compuesto 1 co-eluye con lactosa en un volumen de elución mayor. En una segunda etapa se realizó una TLC preparativa de la fracción que contiene el compuesto 1 y lactosa, a través de la cual se logró obtener el compuesto 1 puro (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Análisis por TLC de la pureza de los compuestos 1 y 2 purificados por cromatografía de exclusión molecular y posterior TLC preparativa. **A)** revelado con orcinol. **B)** revelado con ninhidrina.

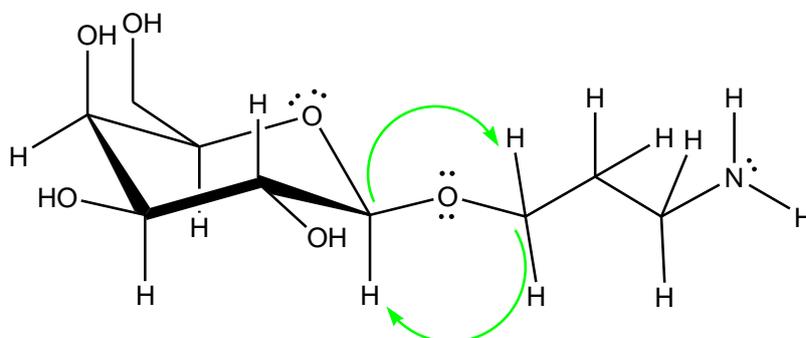
**1-** Compuesto 2, **2-** Glucosa 50 mM, **3-** Galactosa 50 mM, **4-** Lactosa 50 mM, **5-** Síntesis enzimática de 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido **6-** Compuesto 1 purificado, **7-** Compuesto 1 purificado.

### 3.2.7. Identificación del Compuesto 1

#### 3.2.7.1. Resonancia magnética nuclear

El espectro de  $^1\text{H}$ -RMN realizado en agua deuterada a  $30^\circ\text{C}$  del compuesto 1 mostró un único doblete a 4.32 ppm ( $^3J_{\text{H1-H2}} = 8.0$  Hz) que corresponde al protón anomérico (Figura A.1.1. del Anexo). En el Esquema 3.2 se muestra la estructura postulada y la numeración utilizada en la elucidación. Por su parte la Tabla 3.3 resume los desplazamientos y constantes de acoplamiento determinados.

Los spins de los protones del anillo piranósico fueron asignados mediante la correlación H-H observada en el experimento de COSY (Figura A.1.3. del Anexo). Estos datos junto con la correlación protón-carbono de los experimentos HSQC permitieron asignar las señales de los carbonos (Figura A.1.4. del Anexo). En función de esta información, los valores de  $^3J_{\text{H1-H2}}$  para el protón anomérico y los datos de desplazamientos químicos reportados para residuos de monosacáridos, hizo posible asignar el sistema de spin a un residuo de galactosa con conformación  $\beta$ -piranosa (Jansson, 1989; Agrawal, 1992).



**Esquema 3.2:** Estructura postulada para el compuesto 1  
(3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranósido)

**Tabla 3.3.** Desplazamientos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN para el Compuesto 1 (ppm)

	Galactosa							3-amino-1-Propanol		
	1'	2'	3'	4'	5'	6'	6''	1	2	3
$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	4.32d*	3.42 dd	3.60dd	3.83d	3.58d	3.72	3.95m	3.63t	1.87m	3.07 t
$J$ (Hz)	8.0	8.0; 8.0	3.2;3.6	3.2						
$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	102.80	70.71	72.67	68.59	75.17	67.81	67.81	60.98	26.64	37.64

\*Multiplicidad (doblete (d) doble doblete (dd), triplete (t) o multiplete (m)

En espectro  $^{13}\text{C}$  NMR (Figura A.1.2. del Anexo) se observan nueve señales correspondientes a los nueve carbonos de la estructura planteada, de los cuales tres provienen de la aglicona.

El espectro HSQC se utilizó para correlacionar las señales de los protones con las de los carbonos correspondientes indicando la presencia de cuatro carbonos metilénicos y cinco carbonos metínicos (Figura A.1.4 del Anexo), lo que confirma la presencia de la aglicona y del residuo monosacárido.

Además de las señales correspondientes al residuo monosacárido, el espectro  $^1\text{H}$  NMR del compuesto 1 mostró señales correspondientes a los protones del  $\text{C}_2$  del 3-amino-1-propanol unido al amino terminal a través de un carbono metilénico a  $\delta_{\text{H}}$  1.87 ppm (m), y dos señales importantes a  $\delta_{\text{H}}$  3.63 ppm (t) and  $\delta_{\text{H}}$  3.07 (t) correspondientes a los protones de otros dos carbonos del mismo tipo (metilénicos). Por otra parte se puede apreciar a través del acoplamiento del carbono 6' con dos señales distintas, que los protones  $\text{H}_{6'}$  y  $\text{H}_{6''}$  no son equivalentes, ya que ambos poseen desplazamientos diferentes.

La ausencia de correlación entre los carbonos y el multiplete observado en el experimento de  $^1\text{H}$ -NMR a 2.15 ppm confirmó que dicha señal corresponde a los protones del grupo amino. El enlace glicosídico entre la galactosa y la aglicona se confirmó por la fuerte correlación observada entre el protón  $\text{H}_1$   $\delta_{\text{H}}$  3.63 y el carbono anomérico ( $\delta_{\text{C}}$  102.8) en el experimento HBMC (Figura A.1.5. del Anexo). Esto, sumado a la ausencia de correlación entre los átomos de carbono o hidrógeno de la posición 3 de la aglicona con los de la galactosa, confirma la ausencia del *N*-glicósido y la formación específica del *O*-glicósido.

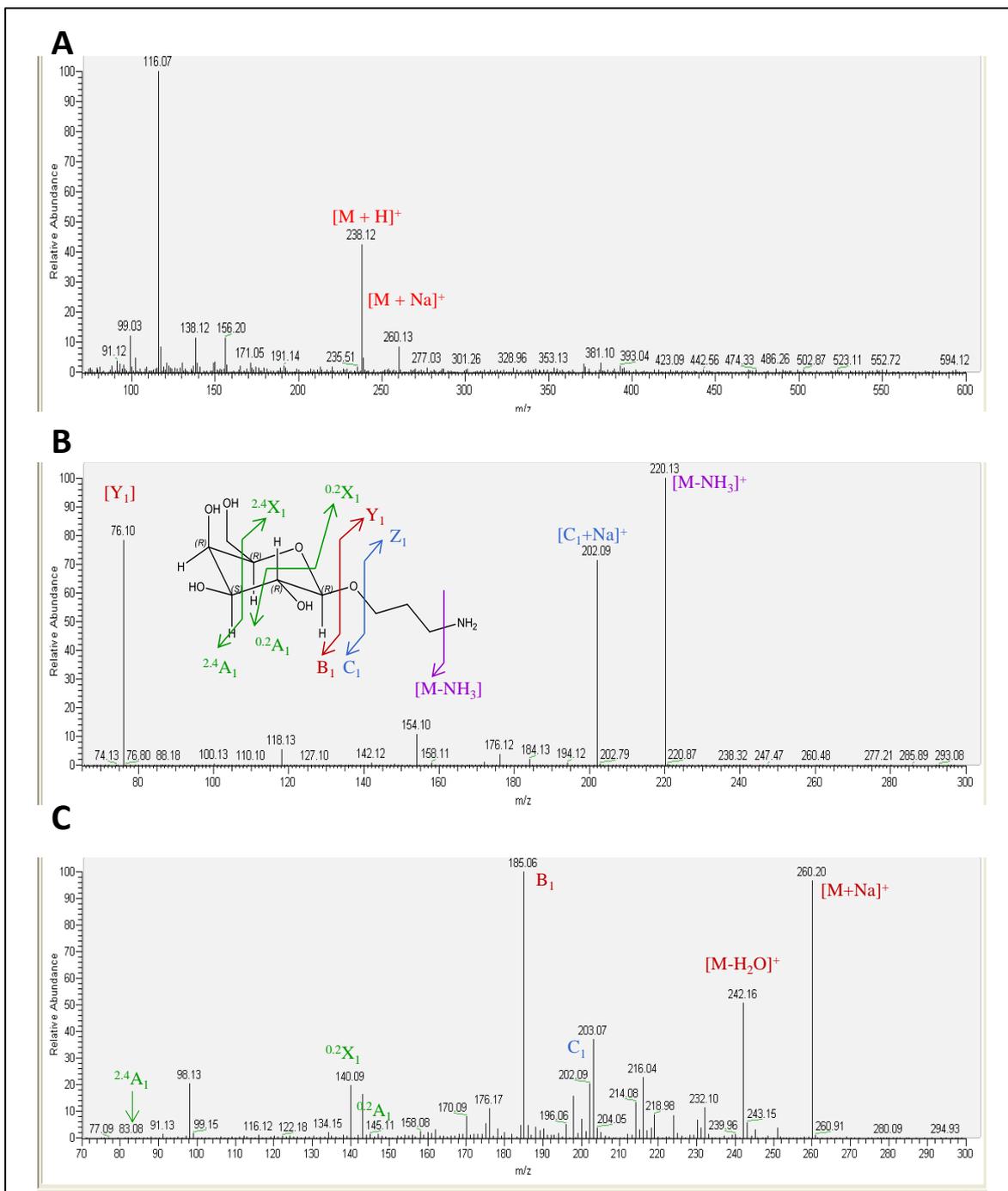
### 3.2.7.2. Espectrometría de masas

En la Figura 3.8.A. se muestra el experimento ESI-MS del compuesto 1, que reveló la presencia de los iones  $m/z= 238.12$  y  $260.13$  correspondientes a las especies monocargadas  $[M+H]^+$  y  $[M+Na]^+$  respectivamente, los que coinciden con el peso molecular esperado para el galactósido propuesto. Para usar una nomenclatura unificada, las fragmentaciones posteriores se nombraron según la nomenclatura de Domon y Costello (1988).

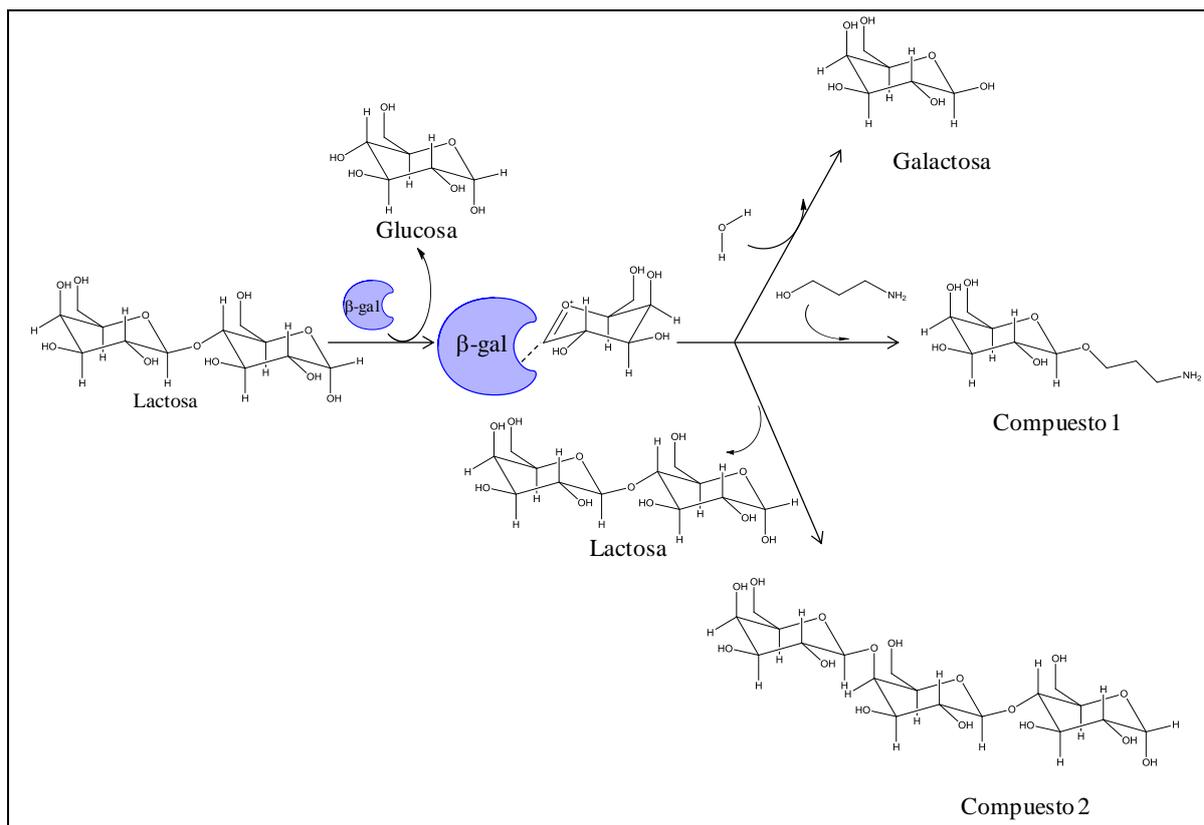
En la ionización posterior de la especie  $[M-H]^+$  (MS/MS) (Figura 3.8.B.), se observó el ion  $m/z= 76.10$  ( $Y_1$ ), coincidiendo con la masa molecular de la molécula de 3-amino-1-propanol. También fueron identificados los fragmentos  $m/z= 202.09$  ( $C_1$ ) y  $m/z=220.13$  ( $[M-NH_3]^+$ ), correspondiendo este último a la pérdida del amino terminal en forma de amoníaco, lo que coincide con un compuesto polifuncional (McLafferty, 1980).

Si analizamos el espectro correspondiente a la fragmentación MS/MS del ion  $m/z 260.12$  (Figura 3.8.C.) encontramos varios de los iones característicos esperados para la estructura propuesta para el compuesto 1. Dicho espectro reveló la presencia de los iones correspondientes a la pérdida de una molécula de agua  $[M-H_2O+Na]^+$ ,  $m/z= 242.16$ . Los iones  $m/z=83.08$  ( $^{2.4}A_1$ ),  $m/z=143.0$  ( $^{0.2}A_1$ ) y  $m/z=140.09$  ( $^{0.2}X_1$ ) confirmaron que se trata de una molécula de galactosa. Finalmente, la ruptura del enlace glicosídico es confirmada por la presencia de los iones  $m/z= 185.06$  ( $B_1$ ) y  $m/z= 202.09$  ( $C_1$ ).

Basado en el mecanismo de acción de la enzima (Esquema 3.2) y en toda la evidencia aportada por el análisis estructural detallado anteriormente, se puede confirmar que el Compuesto 1 sintetizado enzimáticamente es el 3-aminopropil- $\beta$ -1-D-galactopiranosido.



**Figura 3.8.** Análisis por espectrometría de masas del *Compuesto 1*. **A)** Espectro MS.; **B)** Espectro MS/MS del ion  $m/z = 238$ ; **C)** Espectro MS/MS del ion  $m/z = 260$ .



**Esquema 3.2:** Mecanismo de transglucosilación catalizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa usando lactosa como dador de galactosilo y 3-amino-1-propanol como aceptor.

### 3.2.8. Identificación del Compuesto 2

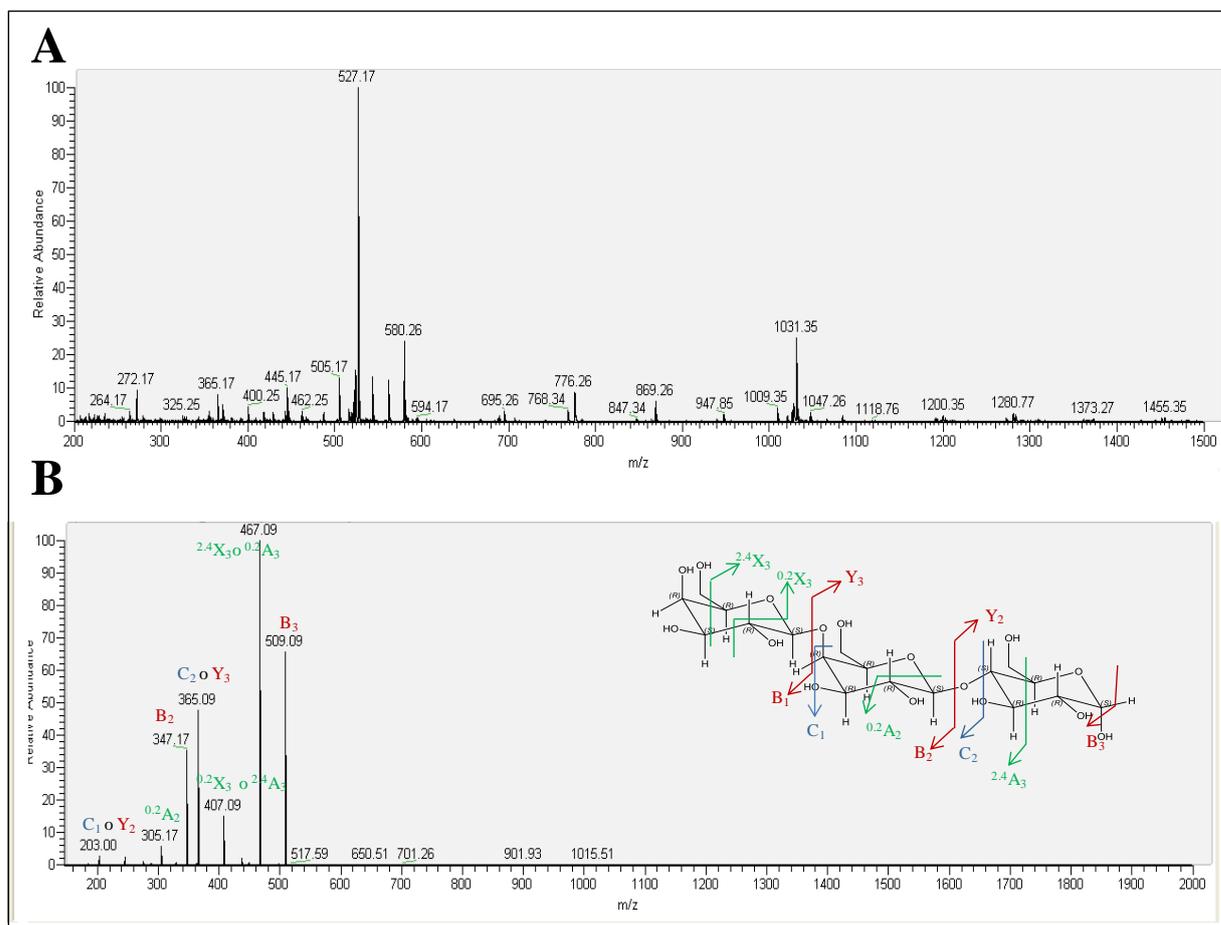
#### 3.2.8.1. Espectrometría de masa

El espectro ESI-MS del compuesto 2 reveló la presencia de un ion intenso en  $m/z$  527.17 ( $[M+Na]^+$ ) que coincide con el peso molecular de un trisacárido (Figura 3.9.A).

A su vez el patrón de fragmentación del espectro MS-MS de dicho ion muestra los iones característicos de un trisacárido (Figura 3.9 B).

La generación de los iones correspondientes a la ruptura de los enlaces glicosídicos ( $m/z=203.00$  ( $C_1$  o  $Y_2$ ),  $m/z=365.09$  ( $C_2$  o  $Y_3$ ),  $m/z=347.17$  ( $B_2$ ),  $m/z=509.09$  ( $B_3$ )), al igual que los asignados a la ruptura interna de los anillos piranósicos ( $m/z=305.17$  ( $^{0.2}A_2$ ),  $m/z=407.09$  ( $^{0.2}X_3$  o  $^{2.4}A_3$ ) and  $m/z=467.09$  ( $^{0.2}A_3$  o  $^{2.4}X_3$ )), evidencian que el trisacárido está conformado por una galactosa unida por enlace  $\beta$  1-4 a una molécula de lactosa. La presencia de los iones  $^{0.2}A_n$  en ausencia de los iones  $^{0.3}A_n$  y  $^{0.4}A_n$  es característica de

enlaces  $\beta$  1-4 entre monosacáridos (Hofmaister, 1991; Spengler, 1990).



**Figura 3.9.** Análisis por espectrometría de masas del *Compuesto 2*. **A)** Espectro MS.; **B)** Espectro MS/MS del ion  $m/z = 527$ .

### 3.2.8.2. Resonancia magnética nuclear

A los efectos de confirmar la estructura propuesta para el compuesto 2 de acuerdo a los experimentos de MS/MS se realizó un breve análisis por RMN.

En el experimento de  $^1\text{H}$ -RMN se detectó la presencia de tres protones anoméricos a  $\delta_{\text{H}}$  4.35 ppm ( $J$  7.6 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  4.53 ppm ( $J$  8.0 Hz) y  $\delta_{\text{H}}$  5.10 ppm ( $J$  3.6 Hz), lo que es consistente con la estructura de un trisacárido. Las constantes de acoplamiento evidencian la presencia de dos residuos monosacáridicos con conformación  $\beta$  ( $J$  7.6,  $J$  8.0) y un tercero

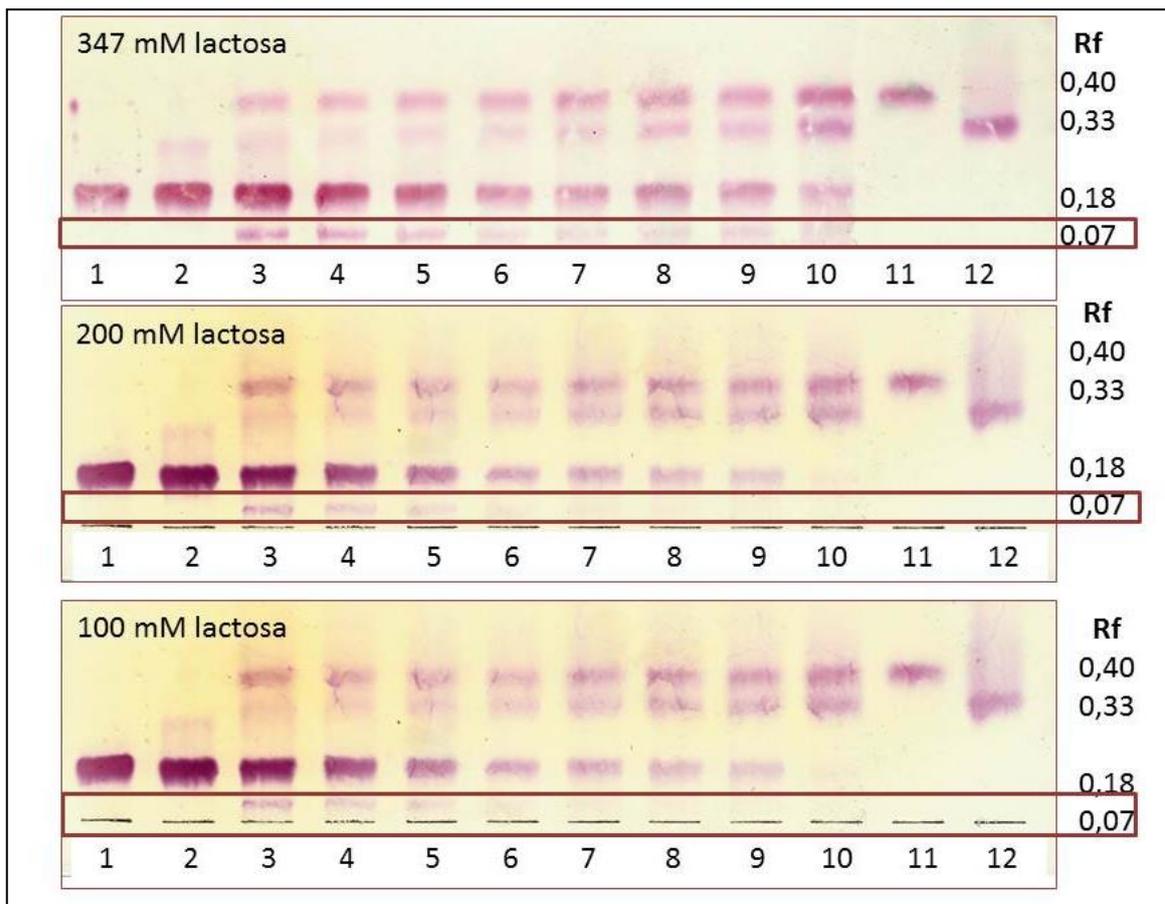
con configuración  $\alpha$  (J 3.6) (Figura A.2.1 del Anexo).

El experimento de HSQC confirmó la presencia de tres carbonos anoméricos a  $\delta_c$  103.32 ppm,  $\delta_c$  95.74 ppm y  $\delta$  91.81 ppm respectivamente (Figura A.2.3 del Anexo). Estos resultados permitieron concluir que los residuos de galactosa se encuentran en conformación  $\beta$ -piranosa mientras que el residuo de glucosa se encuentra en conformación  $\alpha$ -piranosa (Jansson, 1989; Agrawal, 1992).

Por todo lo anterior, basados en los resultados experimentales, el mecanismo enzimático (Esquema 3.2) y el hecho de que las  $\beta$ -galactosidasas mantienen la configuración del centro anomérico en las reacciones de transgalactosilación, se propone la siguiente estructura para el trisacárido:  $O$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $O$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido.

### 3.2.9.- Síntesis de 1-aminopropil-2- $\beta$ -D-galactopiranosido

Para evaluar la síntesis del 1-aminopropil-2- $\beta$ -D-galactopiranosido, se procedió experimentalmente de la misma forma que en el caso anterior, pero usando como aceptor 1-amino-2-propanol. En la Figura 3.10 se pueden observar el avance de la reacción enzimática seguida por TLC, partiendo de distintas concentraciones de lactosa (100- 200- 347 mM) y de una concentración fija de 1-amino-2 propanol (500 mM) como aceptor (50°C, pH 5.5, 6 UE/mL).



**Figura 3.10.** Avance de reacción de transglucosilación evaluada por TLC, utilizando 1-amino-2-propanol 500 mM y concentración variable de lactosa (50 °C, pH: 5.5 y 6 UE/mL). Siembra: 1- Lactosa 50 mM; 2-0 hs; 3- 0.25 hs; 4- 0.5 hs; 5- 1 hs; 6- 2 hs; 7- 3 hs; 8- 4 hs; 9- 5 hs; 10- 24 hs; 11- Glucosa 50 mM; 12- Galactosa 50 mM.

En las condiciones evaluadas, se apreció la formación de una banda nueva de  $R_f$  0,07 en relación a los reactivos y los productos de hidrólisis. Este nuevo compuesto se purificó por cromatografía de exclusión molecular y se analizó por espectrometría de masas y RMN, llegando a la conclusión de que se trata del mismo trisacárido obtenido en el caso anterior. Se observa además el aumento paulatino del producto de hidrólisis glucosa, acompañado del descenso en la lactosa. En relación a la galactosa ( $R_f$  0.33) el aumento es menos pronunciado con el transcurso del tiempo que el observado para la glucosa, debido a la formación del trisacárido.

Sin embargo, no se observó ninguna otra banda adicional, que evidenciara la síntesis de la galactosil-alcoholamina buscada. El hecho de que no se forme el galactósido no sería atribuible al efecto inhibitor del aceptor 1-amino-2-propanol, dado que sí se observa la

síntesis del trisacárido, así como conversión de la lactosa. Este hecho reafirma lo ya reportado en literatura para la  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae* acerca de su preferencia en el proceso de transgalactosilación por los hidroxilos primarios sobre los secundarios (Irazoqui, 2009; Woudenberg-van Oosterom, 1998).

### 3.2.10. Evaluación biológica de los glicósidos

Se estudió la capacidad del 3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido y del trisacárido O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido, de inhibir Galectina-1 de bazo bovino mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HAG).

Este ensayo ha sido reportado como una herramienta válida para evaluar la interacción entre lectinas y carbohidratos. El mismo consiste en realizar el ensayo de HAG de Galectina-1 en presencia del galactósido de interés. Si la galectina presenta afinidad por el galactósido evaluado, el mismo se unirá al dominio de reconocimiento de carbohidratos inhibiendo la aglutinación de los glóbulos rojos.

El ensayo se llevó a cabo con diferentes concentraciones de carbohidratos permitiendo establecer la Concentración Mínima de Inhibición (CMI) que se define como la mínima concentración de carbohidrato a la cual se inhibe la hemaglutinación. Además se definió la Potencia Inhibitoria Relativa (PIR) respecto a la Galactosa, calculándose como el cociente entre la CMI de la Galactosa y la CMI del carbohidrato de interés.

**Tabla 3.4.** Propiedades inhibitoras de los compuestos 1 y 2 sobre la Galectina-1

Compuesto	CMI (mM)	PIR
Galactosa	50.0	1
Lactosa	3.1	16
Compuesto 1 (3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido)	25.0	2
Compuesto 2 (O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido)	6.3	8

En la Tabla 3.4 se muestran los resultados de la evaluación biológica de los galactósidos

sintetizados como potenciales inhibidores de galectina. Se puede observar que si bien el 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido y el trisacárido O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido presentan una capacidad de unión a la galectina mayor que para la galactosa, no superan la de un ligando de alta afinidad como lactosa. El trisacárido, mostró mayor actividad inhibitoria que el galactósido, hecho que podría ser interesante para el diseño en la búsqueda de otros posibles inhibidores.

### 3.3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que la síntesis enzimática de 3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido es posible mediante el sistema de transgalactosilación catalizado por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. Las condiciones óptimas seleccionadas para llevar a cabo la síntesis, minimizando las reacciones secundarias no deseadas (hidrólisis de lactosa y síntesis del trisacárido) y facilitando la purificación del galactósido fueron: concentraciones iniciales de lactosa y de 3-amino-1-propanol de 100 mM y 500 mM respectivamente, concentración inicial de enzima de 6 UE/mL, temperatura de reacción 50°C, pH de la mezcla reactiva 5.5, y tiempo de reacción de 24 horas.

El hecho de que no haya sido posible sintetizar 1-aminopropil-2- $\beta$ -D-galactopiranosido cuando se utilizó el 1-amino-2-propanol como molécula aceptor del grupo galactosilo, sumado al hecho de que no se haya sintetizado el *N*-glicósido demuestra que la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* utilizada es completamente selectiva para la síntesis de *o*-glicósidos y tiene alta especificidad para alcoholes primarios.

Si bien el galactósido generado no mostró buenas propiedades como inhibidor de galectinas, el mismo constituye un residuo de galactosa funcionalizado, con un brazo espaciador de 3 carbonos unidos a un grupo amina primario de alta reactividad. Esto implica que el sistema de transglicosilación catalizado por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, puede constituir una interesante herramienta para el desarrollo y generación de bloques construcción en la síntesis química de otras moléculas (Ito, 2012; Sunasee, 2013; Ogiso, 2013).

Junto con la síntesis del galactósido objetivo se logró la cogeneración de un trisacárido

cuya estructura elucidada por experimentos de RMN y MS fue:  $\alpha$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ ,4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido.

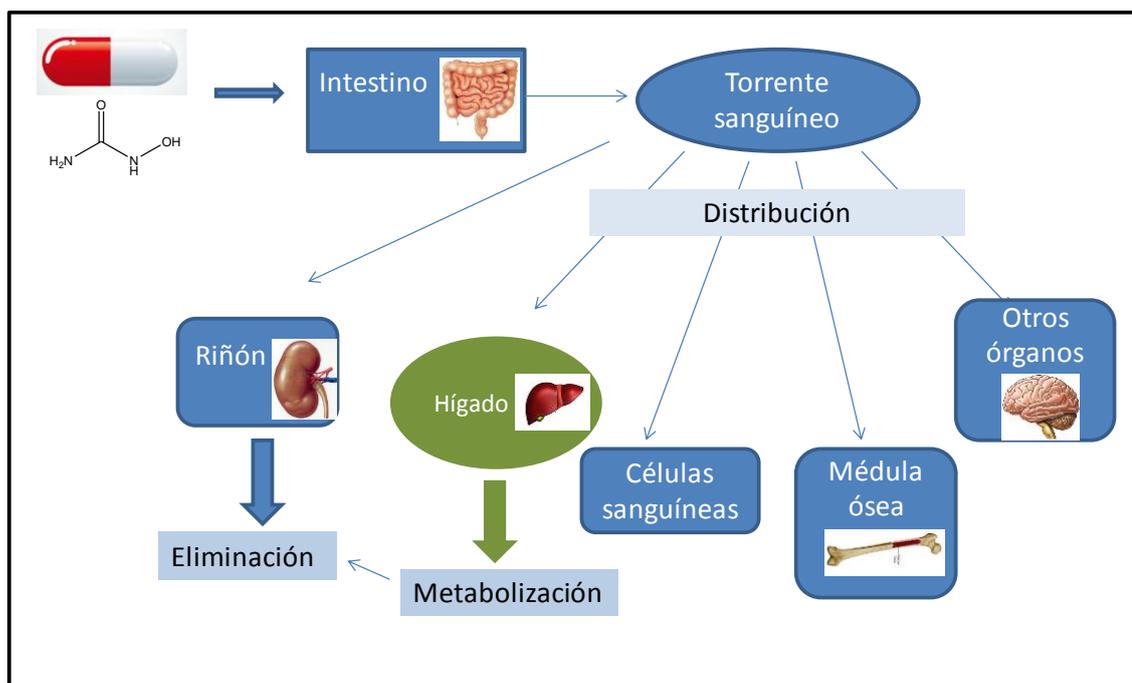
La formación de este compuesto no es una sorpresa ya que es conocida la propiedad de esta  $\beta$ -galactosidasa de producir galactooligosacáridos de diferente composición (Toba, 1985; Huerta, 2011), aunque hasta el momento no se había reportado la síntesis de este trisacárido con unión  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 entre galactosa y lactosa. Otro aspecto interesante en este caso fue que la actividad biológica ensayada como potencial inhibidor de galectina 1, si bien no fue superior a la lactosa, demostró ser cuatro veces mayor que la observada para el 3-aminopropil-1- $\beta$ -D-galactopiranosido. Las diferencias estructurales entre ambos compuestos deberían tomarse en cuenta a la hora de diseñar nuevos inhibidores de galectina 1.

**Capítulo 4:**

**Glicosilación enzimática de hidroxurea**

## 4.1.- INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos tratamientos para el cáncer y por lo tanto la síntesis de nuevas drogas quimioterápicas con efecto antitumoral han sido objeto de estudio en las últimas décadas. Si bien la quimioterapia ha resultado exitosa en muchos casos, aún presenta enormes desventajas tales como baja selectividad y alta toxicidad de los fármacos utilizados. Estos fármacos actúan mediante mecanismos antiproliferativos o deteniendo una etapa determinada del ciclo celular. Al ser poco selectivas afectan todas las células de rápido crecimiento como los glóbulos rojos, las células del epitelio intestinal, de la médula ósea y del sistema linfático entre otras, lo cual las hace inadecuadas para tratamientos prolongados (Figura 4.1.).

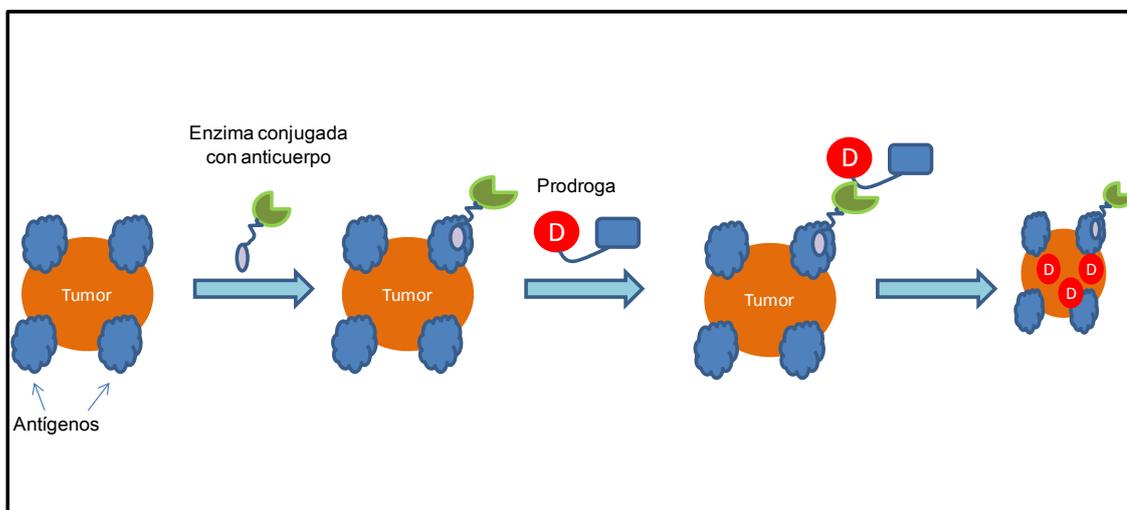


**Figura 4.1.:** Biodistribución de una droga quimioterápica no selectiva (hidroxiurea).

(Adaptado de A.L. Walker et.al. 2011.)

Con el objetivo de mejorar la selectividad de estos fármacos quimioterápicas se han estudiado diversas estrategias. Entre las más prometedoras se encuentran el diseño de prodrugs que puedan ser direccionadas a las células tumorales en forma selectiva. En particular la glicosilación de los fármacos quimioterápicas puede aumentar su selectividad mediante el siguiente mecanismo: i) el mayor consumo de monosacáridos de las células tumorales respecto a las células normales

permitiría una captación selectiva de la droga glicosilada, direccionándola hacia esos tejidos; ii) la liberación de la droga activa puede ser realizada por glicosidasas previamente dirigidas hacia las células tumorales mediante anticuerpos específicos (Figura 4.2.) (Sorg, 2005; Mahato, 2011).



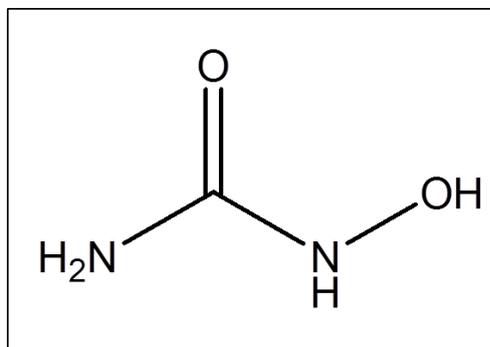
**Figura 4.2.:** Esquema de ADEPT (Antibody directed enzyme prodrug therapy)

Como se mencionó en el Capítulo 1, las glicosidasas han demostrado ser excelentes herramientas para la glicosilación de moléculas hidroxiladas (Giacomini, 2002; Irazoqui, 2009; Porciúncula González, 2013; Sivakumar, 2009) mediante mecanismos de transglicosilación. Por esta razón, resulta interesante aplicar esta herramienta biocatalítica en la glicosilación de antineoplásicos con grupos hidroxilo en su estructura.

La hidroxycarbamida o hidroxiaurea, es un antineoplásico de amplio uso en la terapia antitumoral, fundamentalmente en determinados tipos de leucemia. Estructuralmente, la hidroxiaurea es un derivado de la urea, en el cual se ha sustituido un hidrógeno de uno de los grupos amino por un hidroxilo (Figura 4.3.). Las características de esta molécula, pequeña y con un grupo hidroxilo, la convierten en un modelo de aceptor potencialmente adecuado para ser usado en un sistema de transglicosilación enzimático.

Hasta el momento el único antecedente de la síntesis de este fármaco glicosilado fue reportado por Sorg et al. (2005). Dicha síntesis se realiza químicamente, mediante una secuencia de múltiples pasos sintéticos. Lograr la glicosilación

mediante un sistema de transglicosilación enzimático, permitiría la glicosilación estereoselectiva de la hidroxiiurea en un solo paso de reacción, lo que resulta una alternativa interesante a la síntesis química previamente mencionada.



**Figura 4.3.:** Estructura del compuesto antineoplásico hidroxiiurea (hidroxicarbamida)

En este capítulo se proponen dos alternativas de glicosilación enzimática: la glucosilación de la hidroxiiurea utilizando el sistema de transglucosilación catalizado por la  $\beta$ -glucosidasa de almendras; y la galactosilación catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.

## 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

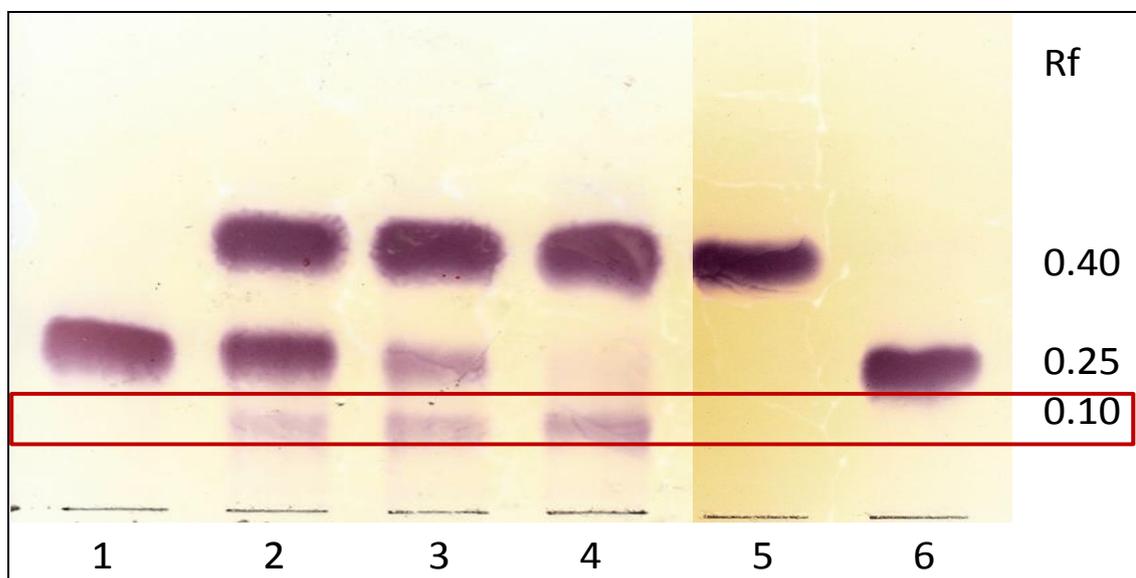
### 4.2.1.- Estudio de la síntesis del glucósido de hidroxiiurea

Dado el alto consumo de glucosa que desarrollan las células tumorales en condiciones de hipoxia para obtener energía a través de la vía glucolítica, resulta interesante el estudio de la glucosilación de hidroxiiurea. Por tal motivo se seleccionó la  $\beta$ -glucosidasa de almendras para llevar a cabo la reacción.

La  $\beta$ -glucosidasa de almendras (E.C. 3.2.1.21) es una enzima homodimérica de 135 kDa que cataliza la hidrólisis de los residuos  $\beta$ -D-glucosilos no reductores en posición terminal provocando la liberación de  $\beta$ -D-glucosa. Se ha reportado el uso de esta enzima también en la síntesis de glucósidos (Basso, 2002; Ducret, 2006).

Se estudió la glucosilación de hidroxiiurea utilizando celobiosa 347 mM como dador de grupo glucosilo, hidroxiiurea 500 mM como aceptor, 6 UE/mL de  $\beta$ -glucosidasa

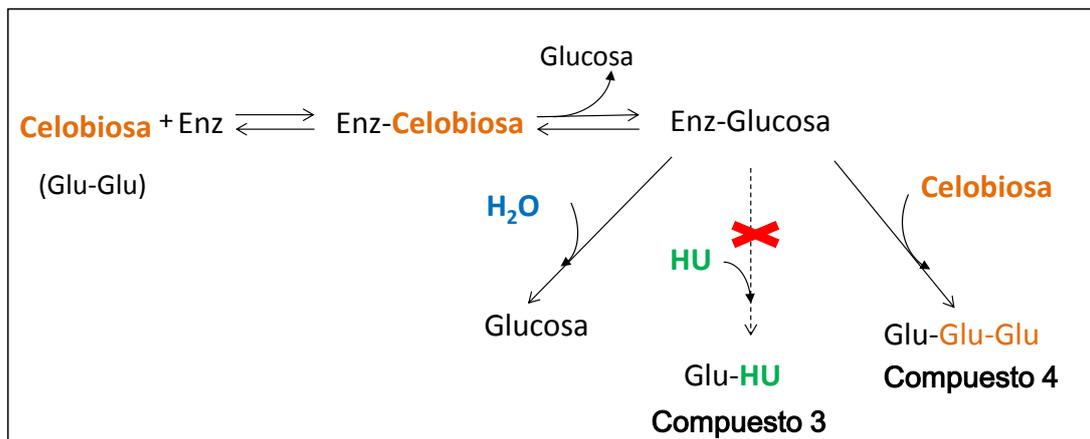
de almendras, a 50°C y pH 5.5. El avance de la reacción enzimática se siguió por cromatografía en capa fina (TLC) (Figura 4.4.)



**Figura 4.4.:** Avance de la reacción de transglucosilación con la enzima  $\beta$ -glucosidasa de almendras evaluado por TLC, revelado con orcinol (6UE/mL, celobiosa 347 mM, hidroxiurea 500 mM, 50°C). Siembra: **1:** 0 hora; **2:** 1 hora; **3:** 3 horas; **4:** 24 horas; **5:** Glucosa 50 mM; **6:** Celobiosa 50 mM

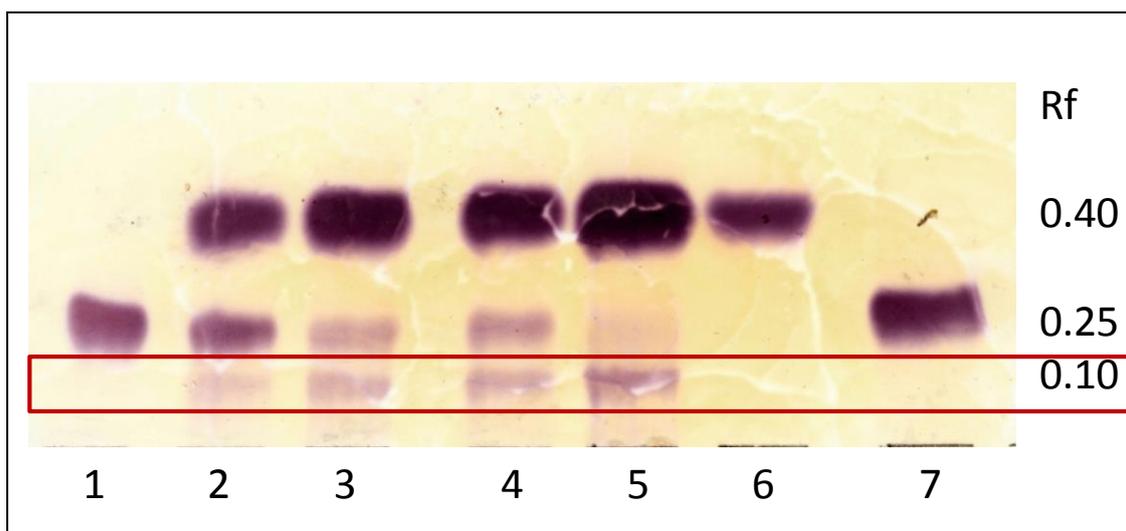
A medida que transcurrió la reacción se observó una rápida disminución de la intensidad de la banda de celobiosa ( $R_f$  0.25) hasta su desaparición completa al cabo de 24 horas; en forma simultánea se observó la aparición de la banda correspondiente al producto de reacción glucosa ( $R_f$  0.40). La presencia de glucosa en el medio de reacción puede deberse a su liberación en el primer paso de la reacción, independientemente de si la reacción es de hidrólisis o de transglucosilación, y en el segundo paso de la reacción cuando el aceptor es agua (Esquema 4.1). A su vez se observó una banda con  $R_f$  0.10, que no coincide con ninguno de los sustratos ni con el producto de hidrólisis.

Se realizó un control de la síntesis en las mismas condiciones, pero en ausencia de hidroxiurea (celobiosa 347 mM, 6 UE/mL de  $\beta$ -glucosidasa de almendra, 50 °C y pH 5.5) (Figura 4.5.) donde también se observó la formación el compuesto con  $R_f$  0.10. Esto indicaría que el mismo no corresponde a la hidroxiurea glucosilada, pero podría corresponder a un trisacárido (Compuesto 4) producto de la reacción de transglucosilación donde la celobiosa es el aceptor (Esquema 4.1).



**Esquema 4.1.:** Mecanismo de transglucosilación catalizado por  $\beta$ -glucosidasa de almendras (Enz: Enzima  $\beta$ -glucosidasa de almendras; Glu: Glucosa; HU: hidroxiurea).

El hecho de que su  $R_f$  sea muy cercano al correspondiente para otros trisacáridos tales como el reportado en el capítulo 3 ( $R_f$  0.07), la rafinosa ( $R_f$  0.13) o el  $O$ - $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-galactopiranosil- $O$ - $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-galactopiranosil-  $\beta$ -D-galactopiranosido ( $R_f$ : 0.07) refuerza esta hipótesis. Es interesante destacar que dicho compuesto, no es hidrolizado por la enzima con el avance del tiempo, (al menos hasta las 24 hs de reacción) por lo que no sería sustrato de ésta, a diferencia del  $O$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $O$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido (capítulo 3), el cual sí es hidrolizado con el transcurso de la reacción.



**Figura 4.5.:** Avance de la reacción de transglucosilación con la enzima  $\beta$ -glucosidasa de almendras evaluada por TLC, revelado con orcinol (6 UE/mL, celobiosas 347 mM, en ausencia de hidroxiurea, 50°C) Siembra: 1: 0 h; 2: 1 h; 3: 2 hs; 4: 3 hs; 5: 24 hs; 6: Glucosa 50 mM; 7: Celobiosa 50 mM

El seguimiento de la reacción de transglucosilación por TLC no evidenció la aparición de ninguna banda que pueda asignarse al glucopiranosido de hidroxurea, lo que indicaría que la glucosilación enzimática de hidroxurea no fue posible.

Si bien la  $\beta$ -glucosidasa de almendra no fue capaz de catalizar la transferencia de una molécula de glucosa de la celobiosa a una molécula de hidroxurea, si catalizó la reacción de transglucosilación donde el aceptor es la celobiosa. Esto resulta particularmente interesante ya que no existen numerosos reportes sobre su capacidad para catalizar este tipo de procesos.

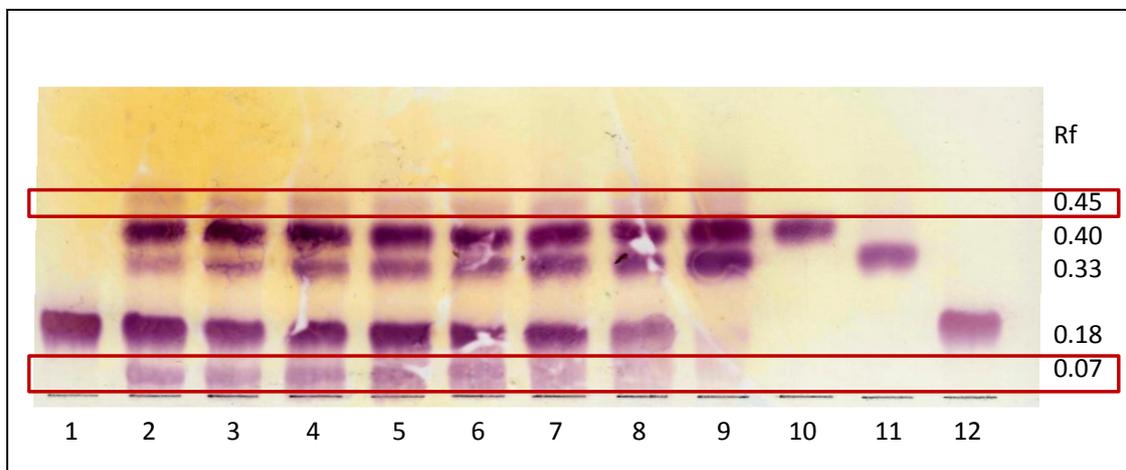
Los resultados obtenidos permitirían concluir que si bien la glucosidasa estudiada es capaz de catalizar reacciones de transglucosilación, la hidroxurea no es un buen aceptor para dicho sistema. A los efectos de confirmar estos resultados se resuelve estudiar la funcionalidad de la hidroxurea como aceptor del sistema de transgalactosilación catalizado por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* ampliamente estudiado por nuestro grupo de investigación (Giacomini, 2002; Irazoqui, 2009; Porciúncula González, 2013).

#### 4.2.2. Estudio de la síntesis del galactósido de hidroxurea

Se estudió la galactosilación enzimática de hidroxurea a partir de lactosa 347 mM como dador de grupo galactosilo y de hidroxurea 500 mM como aceptor, utilizando 6 UE/mL de  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* a 50°C y pH 5.5. El avance de reacción se siguió por TLC y HPLC.

En el análisis de la reacción por TLC se observaron las bandas correspondientes a lactosa ( $R_f$  0.18), glucosa ( $R_f$  0.40) y galactosa ( $R_f$  0.33), pero también se observan dos bandas nuevas con  $R_f$  de 0.45 y 0.07 denominadas compuesto 5 y compuesto 2 respectivamente (Figura 4.6). A medida que transcurre la reacción la intensidad de la banda correspondiente a la lactosa ( $R_f$  0.18) disminuye hasta su desaparición completa al cabo de 24 hs mientras que la intensidad de la banda correspondiente a la glucosa ( $R_f$  0.40) aumenta en mayor medida que la intensidad de la banda correspondiente a la galactosa ( $R_f$  0.33). Este hecho es indicativo de la coexistencia de la reacción de transgalactosilación junto con la hidrólisis; sin embargo,

comparando con las síntesis en presencia de 3-amino-1-propanol como aceptor (Capítulo 3) la diferencia entre las intensidades de las bandas de glucosa y galactosa es mucho menos pronunciada indicando que la reacción de transglicosilación es de menor preponderancia en este sistema.



**Figura 4.6.:** Avance de la reacción de transgalactosilación catalizada por la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*, evaluada por TLC utilizando orcinol como revelador (6 UE/mL, lactosa 347 mM, hidroxiiurea 50 mM, 50°C y pH 5.5)

Siembra: **1-** 0 hora; **2-** 10 minutos; **3-** 20 minutos; **4-** 30 minutos; **5-** 45 minutos; **6-** 60 minutos; **7-** 120 minutos; **8-** 180 minutos; **9-** 24 horas ; **10-** Glucosa 50 mM; **11-** Galactosa 50 mM; **12-** Lactosa 50 mM.

En el capítulo 3 ya se reportó la aparición de una banda que presentaba un  $R_f$  0.07 cuando se realizó la TLC correspondiente a la reacción de síntesis control (en ausencia de aceptor), Figura 3.4. Por lo que una hipótesis factible sería que se tratara del mismo tipo de compuesto (trisacárido) producto de la transgalactosilación cuando el aceptor es lactosa.

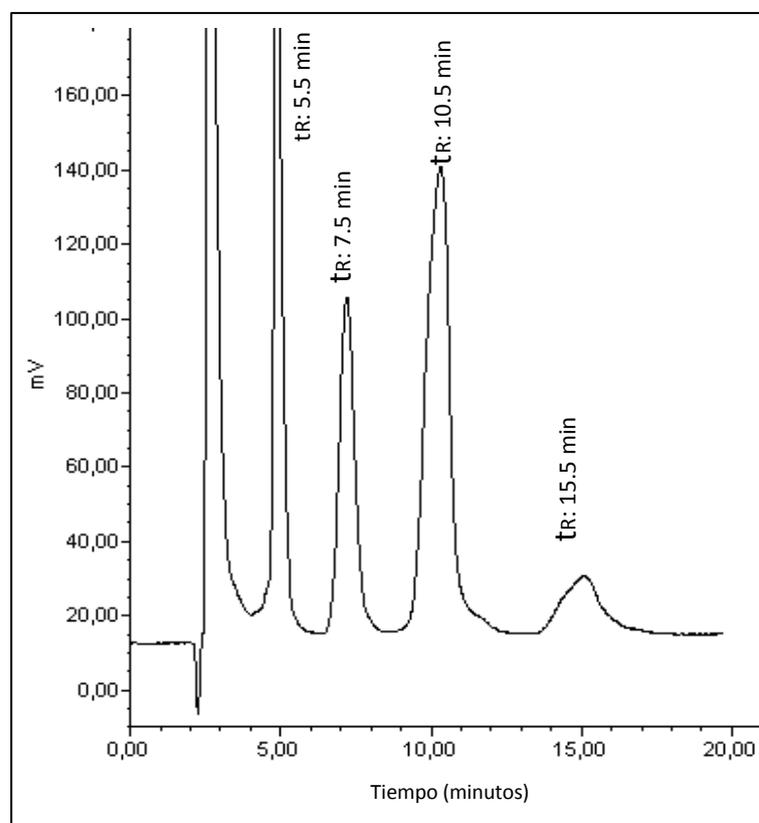
La banda con  $R_f$  0.45 podría corresponder al compuesto buscado (el galactopiranosido de hidroxiiurea); sin embargo dado que la misma es muy tenue se resolvió analizar esta misma síntesis por HPLC de forma de verificar la presencia de un nuevo compuesto.

En la Figura 4.7. se muestra un cromatograma de HPLC correspondiente a los 60 minutos de la reacción enzimática en el que se observó la presencia de los picos correspondientes a hidroxiiurea ( $t_R$  5.5 minutos) y lactosa ( $t_R$  10.5 minutos), así como un pico a los 7.5 minutos que corresponde a la co-elución de glucosa y galactosa. A

su vez se observó un pico con un tiempo de retención de 15.5 minutos que no puede ser asignado ni a los sustratos ni a los productos de hidrólisis. Teniendo en cuenta el tiempo de retención del trisacárido utilizado como estándar ( $t_R$  15.5 minutos, tabla 4.1) podemos suponer que este pico se trata de un trisacárido. No se observó ningún otro pico que pudiera sugerir la formación del galactósido buscado.

**Tabla 4.1.** Tiempos de retención de los compuestos utilizados como estándares de HPLC.

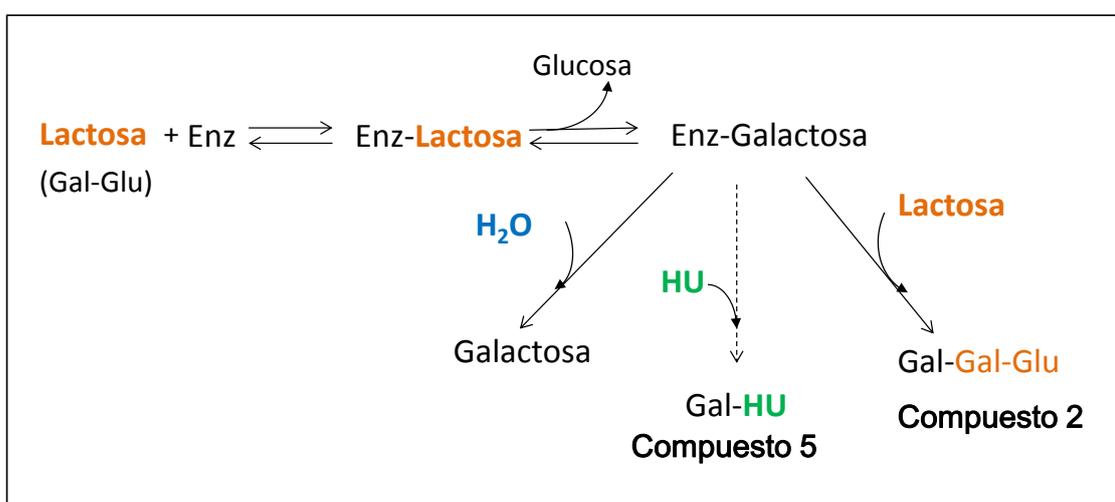
Compuesto	Tiempo de retención (minutos)
D-glucosa	7.5 ± 0.6
D-galactosa	7.5 ± 0.6
Lactosa	10.5 ± 0.7
Hidroxiurea	5.5 ± 0.5
$o\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)}o\text{-}\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)}\text{-}\alpha\text{-D-Glc}$	15.5 ± 1.0



**Figura 4.7.:** Cromatograma de HPLC de la reacción de síntesis utilizando  $\beta$ -galactosidasa de *A.oryzae* a tiempo 60 minutos (lactosa 347 mM, hidroxiurea 500 mM, 6 UE/mL y 50° C)

Comparando los resultados obtenidos a través del análisis por TLC y por HPLC podemos afirmar que la banda de  $R_f$  0.07 asignada como compuesto 2 se correspondería con el pico de  $t_R$  15.5, ya que en ambas técnicas analíticas los parámetros estudiados ( $R_f$  y  $t_R$ ) coinciden con el del estándar de trisacárido utilizado.

En función de estos resultados se propone la formación del compuesto 2 como producto de la reacción de transgalactosilación donde el aceptor es lactosa (Esquema 4.2).



**Esquema 4.2.:** Mecanismo de transgalactosilación catalizado por  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Enz: Enzima  $\beta$ -galactosidasa de *A. oryzae*; Glu: Glucosa; Gal: Galactosa; HU: hidroxiurea).

Si bien en el cromatograma de HPLC no se observa ningún pico que pueda asignarse al galactopiranosido de hidroxiurea (compuesto 5), en la TLC aparece una banda muy tenue con un  $R_f$  de 0.45 que podría corresponder a este compuesto. Esto podría deberse a que el compuesto 5 co-eluyera con alguno de los otros compuestos o que su relación concentración-respuesta para el detector utilizado en el HPLC, sea tan pequeña que en la concentración en que se encuentra, no sea detectable.

Dado que la banda correspondiente al compuesto 5 es muy tenue se estudiaron varias condiciones de síntesis (diferentes concentraciones de dador y aceptor, temperatura y tiempo de reacción) con el objetivo de mejorar su rendimiento, sin tener éxito en nuestro cometido.

#### 4.2.3. Purificación e identificación de los compuestos 2 y 5 por cromatografía de exclusión molecular

Con el objetivo de confirmar que el compuesto con  $R_f$  0.07 corresponde al compuesto 2, (*O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido) ya reportado e identificado en el capítulo 3 de esta tesis, y de identificar el compuesto 5 se llevó a cabo la purificación de estos compuestos por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Sephadex G10. Se utilizó una alícuota de la síntesis utilizando lactosa 347 mM, hidroxiurea 500 mM, 6 UE/mL y 50° C correspondiente a 60 minutos de reacción. Se recogieron fracciones de 0.5 ml, se liofilizaron, se retomaron en el mínimo volumen y se analizaron por TLC.

El compuesto 2 eluyó con un volumen de elución de 61.2 mL y su pureza fue verificada por TLC. Este compuesto purificado fue analizado por espectrometría de masas, lo que permitió confirmar que su masa y patrón de fraccionamiento son idénticos a los del trisacárido identificado en el capítulo 3, lo que sugiere que probablemente sea el mismo compuesto (*O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido).

El compuesto 5 no fue recuperado en ninguna de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular, probablemente debido a que se encontraba en muy baja concentración. Por lo cual se concluye que en las condiciones estudiadas no fue posible la galactosilación de hidroxiurea utilizando el mecanismo de transgalactosilación catalizado por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.

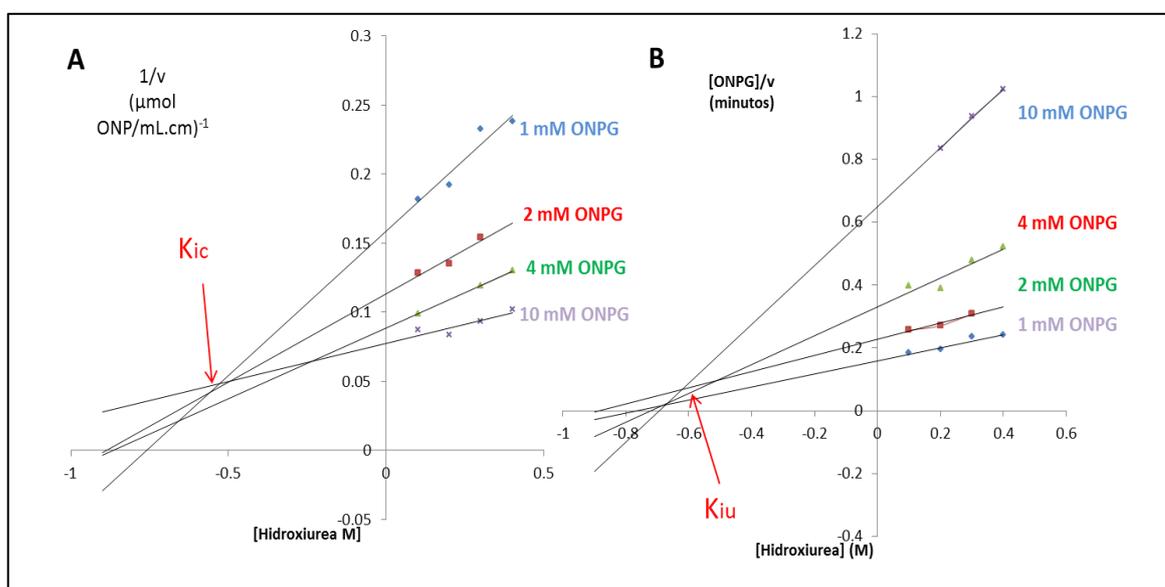
#### 4.2.4. Inhibición de la enzima $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* por hidroxiurea

El sistema de transgalactosilación catalizado por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* ha demostrado ser una herramienta útil para la galactosilación de distintos grupos de moléculas hidroxiladas. Sin embargo la hidroxiurea no funcionó como aceptor del sistema. Se descartó que la hidroxiurea causara inactivación

significativa, ya que la enzima mantuvo un 100 % de actividad residual al cabo de 24 horas de incubación en las condiciones de estudio (hidroxiurea 500 mM, 50 °C , 6 UE/mL, pH 5.5). Se ha demostrado que algunos de los aceptores estudiados son inhibidores de la enzima, afectando los rendimientos del sistema de transgalactosilación.

Por esta razón se decidió estudiar si la hidroxiurea ejerce algún tipo de inhibición sobre esta galactosidasa. Los ensayos de inhibición se realizaron utilizando el sustrato artificial de la enzima o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) a temperatura ambiente para simplificar el ensayo. Con los datos de velocidad inicial obtenidos se construyeron las siguientes dos graficas:

- i) recíproco de la velocidad inicial vs la concentración de hidroxiurea (Figura 4.8.A)
- ii) cociente entre la concentración de ONPG y la velocidad inicial vs la concentración de hidroxiurea (Figura 4.8.B).

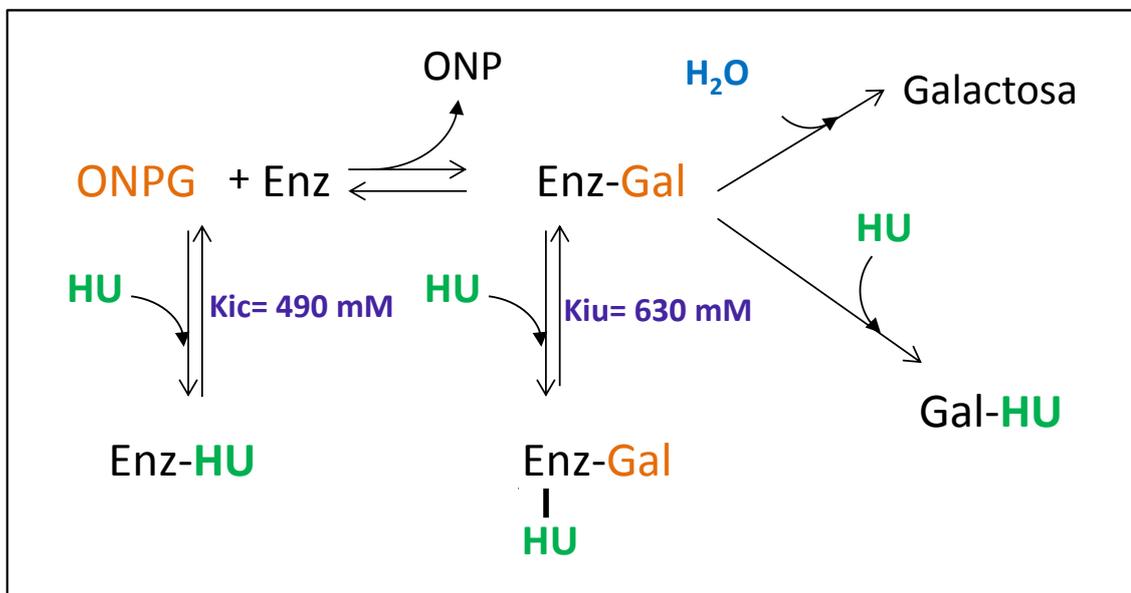


**Figura 4.8.:** Determinación de las constantes de inhibición de la enzima en presencia de hidroxiurea.

El perfil obtenido, fue compatible con una inhibición reversible de tipo mixta (Esquema 4.3).

Este tipo de inhibición implica un mecanismo en el cual el inhibidor se une tanto a la enzima libre, formando un complejo enzima-inhibidor (Enz-HU) con constante de

disociación  $K_{ic}$ , como con el complejo enzima-sustrato formando un complejo enzima-sustrato-inhibidor (Gal-E-HU) con una constante de disociación  $K_{iu}$ . Las constantes determinadas fueron  $K_{ic}$  490 mM y  $K_{iu}$  630 mM.



**Esquema 4.3.:** Mecanismo de inhibición mixta por hidroxiiurea

A pesar de que las constantes de disociación para el inhibidor fueron determinadas a temperatura ambiente y las reacciones de síntesis fueron realizadas a  $50^{\circ}C$ , nos permiten afirmar que la hidroxiiurea es inhibidor del sistema de transgalactosilación.

### 4.3.- CONCLUSIONES

Si bien no fue posible la glicosilación enzimática de la hidroxiiurea mediante los mecanismos de transglicosilación propuestos, se lograron avances importantes en el conocimiento de estos sistemas.

Evidentemente no cualquier molécula hidroxilada es capaz de competir con el agua y funcionar como aceptor del sistema. Es posible que la cercanía del grupo carbonilo disminuya la nucleofilia del hidroxilo de la hidroxiiurea reduciendo su reactividad por el complejo galactosil-enzima. Sería interesante ampliar el estudio a aceptores con estructuras similares para poder confirmar esta teoría.

Por otro lado la incapacidad de la hidroxurea de funcionar como aceptor del sistema se podría atribuir a su efecto inhibidor de la enzima, sin embargo otras moléculas tales como etilenglicol, glicerol, etanolamina han demostrado ser inhibidores de la enzima sin que esto fuera un obstáculo para que funcionaran como buenos aceptores (Irazoqui, 2013; Porciúncula González, 2013). Asimismo se reafirmó lo que ya se había observado en el capítulo anterior en relación a la capacidad de los dadores de grupo glicosilo de funcionar como aceptores del sistema al menos en concentraciones superiores a 100 mM, ya que se observó la formación de un trisacárido.

***Capítulo 5:***

***Conclusiones finales y perspectivas***

### 5.1.- Conclusiones finales

En esta tesis se planteó el estudio de dos sistemas de transglicosilación catalizados por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y por la  $\beta$ -glucosidasa de almendra, como un herramienta para la glicosilación de dos grupos de moléculas: i) alcoholaminas (3-amino-1-propanol y 1-amino-2-propanol) con el objetivo de obtener glicósidos con potencial actividad como inhibidores de galectina 1, y ii) glicosilación de hidroxurea con el objetivo de mejorar su selectividad hacia tejidos tumorales.

El 3-amino-1-propanol demostró ser un buen aceptor de grupo galactosilo con el sistema de transglicosilación catalizado por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, lográndose la síntesis de 3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido. Paralelamente a esta reacción de transglicosilación tuvo lugar como era previsible, la reacción de hidrólisis de lactosa, y una segunda reacción de transglicosilación donde el aceptor fue la propia lactosa, dando lugar a la formación del trisacárido  $\alpha$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido.

Las mejores condiciones, a los efectos de minimizar las reacciones secundarias, aumentar los rendimientos de síntesis y facilitar la purificación del galactósido de interés, fueron lactosa 100 mM, 3-amino-1-propanol 500 mM, pH 5.5, 50 °C y 24 horas de reacción.

Por otra parte se evaluó la actividad biológica del 3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido como inhibidor de galectina-1 el que presentó una concentración mínima inhibitoria de 25 mM, dos veces inferior a la concentración mínima inhibitoria mostrada por la galactosa (50 mM). Sorprendentemente el trisacárido  $\alpha$ - $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopiranosido demostró tener una potencia inhibitoria relativa mayor que el galactósido, siendo 8 veces más potente que la galactosa.

El 3-aminopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido no resultó ser mejor inhibidor de galectina-1 que la lactosa, lo cual lo descarta como potencial agente antitumoral. Sin embargo es una molécula que desde el punto de vista químico es muy interesante, dado que constituye una galactosa funcionalizada con un grupo amino de alta reactividad. El mismo puede ser utilizado como bloque de construcción en síntesis orgánica tradicional al igual que puede ser fácilmente inmovilizado sobre soportes sólidos y nanopartículas lo cual es de gran interés en el desarrollo de biosensores.

La síntesis del galactósido con el compuesto 1-amino-2-propanol no fue posible. Esto reafirma la alta especificidad reportada previamente por la  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* con respecto a los alcoholes primarios (Faber, 2011; Irazoqui, 2009). Una posible explicación a este comportamiento es que la cercanía del grupo amino con respecto al hidroxilo, podría ejercer algún efecto sobre el mismo disminuyendo su nucleofilia.

En relación a la glicosilación de hidroxurea, no fue posible confirmar que con los dos sistemas de transglicosilación seleccionados, y en las condiciones estudiadas se produjera la formación ni del galactósido ni del glucósido correspondiente. En función de estos resultados se concluye que la hidroxurea no es un aceptor adecuado. Una posible explicación sería una disminución de la nucleofilia del hidroxilo de la hidroxilamida generada por la cercanía de un grupo electrófilo como el carbonilo. Otra posible explicación sería que las características estructurales de la hidroxurea no sean adecuadas para que se dé la interacción con los residuos aminoácidos del sitio activo responsables del acercamiento y fijación de la molécula al complejo galactosil-enzima, así como la interacción necesaria con los residuos glutámicos encargados de la catálisis ácido-base en el sitio activo.

Otro punto a destacar es el efecto inhibidor que presentaron dos de los aceptores evaluados sobre la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*. El 1-amino-2-propanol presentó una inhibición acompetitiva, mientras que la hidroxurea resultó ser un inhibidor de tipo mixto. Este efecto inhibidor debería considerarse al

momento de fijar la concentración del aceptor de forma de minimizarlo. De hecho en las concentraciones seleccionadas para las síntesis el mismo no fue de relevancia ya que, si bien los galactósidos buscados no fueron logrados, sí se observan las reacciones secundarias coexistentes (hidrólisis y generación del trisacárido). Cabe destacar que otros aceptores utilizados, ya han demostrado poseer un efecto inhibitorio sobre la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (etanolamina, glicerol, etilenglicol), sin que esto impidiera la formación de los galactósidos propuestos (Irazoqui, 2013; Porciúncula-González, 2013). No se ha podido establecer un patrón que relacione los mecanismos de inhibición observados con la estructura de los aceptores. De hecho es interesante que dos moléculas muy similares como el 3-amino-1-propanol y el 1-amino-2-propanol, (que se diferencian únicamente en la posición de un grupo hidroxilo) demuestran ser sumamente distintas tanto en su capacidad de funcionar como aceptores del grupo galactosilo, así como en su capacidad de inhibición sobre la enzima.

Con ambos sistemas de transglicosilación se logró la generación de oligosacáridos, (en particular trisacáridos) lo que puso de manifiesto la posibilidad de las moléculas dadoras de grupo glicosilo (lactosa, celobiosa) de actuar también como aceptores. Si bien esto se encuentra reportado ampliamente para las galactosidasas, no es así en el caso de la  $\beta$ -glucosidasa, convirtiéndola en una potente herramienta biotecnológica para la generación de oligosacáridos formados por glucosa.

En esta tesis se demostró que no cualquier molécula es posible de ser glicosilada y que la especificidad por el aceptor presenta ciertas restricciones. Aspectos tales como la posición del hidroxilo, la cercanía de otros grupos que afecten la densidad electrónica del mismo, el efecto inhibitorio del aceptor sobre la enzima, entre otros factores, son determinantes a la hora de evaluar la factibilidad de la glicosilación, y deben ser tenidos en cuenta.

Finalmente, se logró aportar al conocimiento de los sistemas de transglicosilación estudiados, que constituye un insumo para el diseño de próximas síntesis de glicósidos catalizadas por estos sistemas.

## 5.2.- Perspectivas

En el caso de las moléculas que no resultaron buenos aceptores, sería importante evaluar qué aspectos de las mismas, fueron los que afectaron a la reacción.

Para ello se podría estudiar el funcionamiento del sistema de transglicosilación utilizando análogos estructurales de la hidroxiiurea y del 1-amino-2-propanol, con el fin de valorar realmente en qué grado afectan la presencia de determinados grupos a la nucleofilia y a la interacción de la molécula con los residuos del sitio activo.

Por último una posibilidad muy interesante a explotar en el futuro, sería la incorporación de herramientas bioinformáticas, con el fin de evaluar la influencia de distintos aceptores a la reacción de transglicosilación de las glicosidasas evaluadas en la presente tesis.

## **Bibliografía**

Agrawal, P.K.; (1992); *NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides*; Phytochemistry; 31; 3307–3330.

Ahmad, N., Gabius, H., Sabesan, S., Oscarson, S., Brewer, F.; (2004); *Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and carbohydrate recognition domain of galectin-3*; Glycobiology; 14; 817-825.

Ahmed, H., Fink, N.E., Pohl, J., Vasta, G.R.; (1996); *Galectin-1 from Bovine Spleen: Biochemical characterization, carbohydrate Specificity and Tissue Specific Isoform Profiles*; Journal of Biochemistry; 120; 1007-1019.

Bagshawe, K.D.; (1994); *Antibody-Direct Enzyme Prodrug Therapy (Adept)*; Journal of Controlled Release; 28; 187-193.

Basso, A., Ducret, A., Gardossi, L., Lortie, R.; (2002); *Synthesis of octyl glucopyranoside by almond  $\beta$ -glucosidase adsorbed onto Celite R-64*; Tetrahedron Letters; 43; 2005-2008.

Bertrand, A., Morel, S., Lefoulon, F., Rolland, Y., Monsan, P., Remaud-Simeon, M.; (2006); *Leuconostoc mesenteroides glucansucrase synthesis of flavonoide glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents*; Carbohydrate Research; 341; 855-863.

Binder, W.H., Kählig, H., Schmid, W.; (1994); *Galactosylation by Use of  $\beta$ -Galactosidase: Chemo-Enzymatic Synthesis of Di- and Trisaccharides*; Tetrahedron Letters; 50; 10407-10418.

Binder, W.H., Kählig, H., Schmid, W.; (1995); *Galactosylation by Use of  $\beta$ -galactosidase: Enzymatic Synthesis of Disaccharide Nucleosides*; Tetrahedron: Asymmetry; 6; 1703-1710.

Bojarová, P., Kren, V.; (2009); *Glycosidases: a Key to tailored carbohydrates*; Trends in Biotechnology; 27; 199-209.

Brena, B., Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F.; (2003); *Effect of increasing co-solvent concentration on the stability of soluble and immobilized  $\beta$ -galactosidase*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 21; 25–29.

Bucke, C.; (1996); *Oligosaccharide synthesis using glycosidasas*; Journal Chemical Technology and Biotechnology; 67; 217-220.

Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.; (2012); *Application of Enzymes in Solution: Soluble Enzymes and Enzyme Systems, in: Biocatalysts and Enzyme Technology*; p. 275.,Wheinheim, Wiley-Blackwell.

Celen, S., Cleynhens, J., Deroose, C., de Groot, T., Ibrahimi, A., Gijssbers, R., Debyser, Z., Mortelmans, L., Verbruggen, A., Bormans, G.; (2009); *Synthesis and biological evaluation of  $^{11}\text{C}$ -labeled  $\beta$  -galactosyl triazoles as potential PET tracers for in vivo LacZ reporter gene imaging*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; 17; 5117-5125.

Colombo, D., Scala, A., Taino, I.M., Toma, L., Ronchetti, F., Tokuda, H., Nishino, H., Nagatsu, A., Sakakibara, J.; (1996); *1-O-, 2-O- and 3-O- $\beta$ -glycosyl-sn-glycerols: Structure-anti-tumor-promoting activity relationship*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; 6; 1187-1190.

Colombo, D., Compostella, F., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L., Kuchide, M., Tokuda, H., Nishino, H.; (2000); *Anti-tumor-promoting effects of glyco-glycerolipid analogues on two-stage mouse skin carcinogenesis*; Cancer Letters; 161; 201-205.

Cornish-Bowden A.T.; (1995); *Fundamentals of Enzyme Kinetics*; Portland Press; London.

Crout, D.H.G., MacManus, D.A.; (1990); *Enzymatic synthesis of glycosides using the  $\beta$ -galactosidase of Escherichia coli: Regio- and Stereo-chemical studies*; Journal Chemical Society Perkin Transactions; 1; 1865-1868.

Daines, A.M., Maltman, B.A., Flitsch, S.L.; (2004); *Synthesis and modifications of carbohydrates, using biotransformations*; Current Opinion in Chemical Biology; 8; 106-113.

Das-Bradoo, S., Svensson, I., Santos, J., Plieva, F., Mattiansson, B., Hatti-Kaul, R.; (2004); *Synthesis of alkylgalactosides using whole cells of Bacillus pseudofirmus species as catalysts*; Journal of Biotechnology; 110; 194-211.

Domon, B., Costello, C.E.; (1988); *A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates*; Journal Glycoconjugate; 5; 397-409.

Ducret, A., Trani, M., Lortie, R.; (2006); *Comparison between various commercial sources of almond  $\beta$ -glucosidase for the production of alkyl glucosidases*; Journal of molecular catalysis B: Enzymatic; 38; 91-94.

Erlund, I.; (2004) *Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology*, Nutrition Research; 24; 851-874.

Eun, S-S.; Kang, J.; Lee, J-H; Kim, G-H.; Kim, G-J.; Kim, D.; (2009) *Synthesis and characterization of hydroquinone glucoside using Leuconostoc mesenteroides*; Enzyme & Microbial Technology; 45; 355-360.

Faber, K.; (2011); Glycosyl Transfer Reactions, in: *Biotransformations in Organic Chemistry*. A textbook. 6<sup>th</sup> Edition. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 242-254.

Franco Fraguas, L., Plá, F., Ferreira, F., Massaldi, H., Suárez, N., Batista-Viera, F.; (2003a); *Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation.*; *Journal of Chromatography B*; 790; 365-372.

Garófalo, L., Vázquez, D., Ferreira, F., Soule, S.; (2011); *Wheat flour non-starch polysaccharides and their effect on dough rheological properties*; *Industrial Crops & Productions*; 34; 1327 - 1331.

Giacomini, C., Irazoqui, G., González, P., Batista-Viera, F., Brena, B.M.; (2002); *Enzymatic synthesis of galactosyl-xylose by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase*; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 19-20; 159 -165.

Giacomini, C., Irazoqui, G., Batista-Viera, F., Brena, B.M.; (2007); *Chemical thiolation strategy: A determinant factor in the properties of thiol bound biocatalysts*; *Biocatalysis and Biotransformations*; 25 (5); 373 - 381.

Giguère D., Sato, S., St-Pierre, Ch., Sirois, S., Roy, R.; (2006); *Aryl O- and S-galactosides and lactosides as specific inhibitors of human galectins-1 and -3: Role of electrostatic potential at O-3*, *Bioinorganic & Medical Chemistry*; 16; 1668-1672.

Giguère D., Bonin, M.A., Cloutier, P., Patnam, R., St-Pierre, Ch., Sato, S., Roy, R.; (2008); *Synthesis of stable and selective inhibitors of human galectins-1 and -3*; *Bioinorganic & Medical Chemistry*; 16; 7811-7823.

Grover, A. K., MacMurchie, D.D., Cushley, R.J.; (1977); *Studies on almond emulsion  $\beta$ -D-glucosidase I. Isolation and characterization of a bifunctional isozyme*;

Biochimica et Biofisica Acta (BBA) – Enzymology; 482; 98-108.

Hancock, S.M., Vaughan, M.D., Withers, S.G.; (2006); *Engineering of glycosidases and glycosyltransferases*; Current Opinion Chemical Biology; 10; 509-519.

Hasan, S.S., Ashraf, G.M., Banu, N.; (2007); *Galectins- potential targets for cancer therapy*; Cancer Letters; 253; 25-33.

Hayder, N., Bouhlel, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steinman, R., Guiraud, P., Mariotte, A-M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M-G., Chekir-Ghedira, L.; (2008); *In Vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-O-galactoside and myricetin-3-O-rhamnoside from Myrtus communis: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray*; Toxicology in Vitro; 22; 567-581.

Hermida, C., Corrales, G., Cañad, F.J., Aragón, J.J., Fernández-Mayoralas, A.; (2007); *Optimizing the enzymatic synthesis of  $\beta$  -D-galactopyranosyl-D-xyloses for their use in the evaluation of lactase activity in vivo*; Bioorganic & Medicinal Chemistry; 15; 4836-4840.

Hofmeister, G.E., Zhou, Z., Leary, J.; (1991); *Linkage position determination in lithium-cationized disaccharides: tandem mass spectrometry and semiempirical calculations*; Journal of American Chemical Society; 113; 5964-5970.

Huerta, L. M., Vera, C., Guerrero, C., Wilson, L., Illanes, A.; (2011); *Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized  $\beta$ -galactosidases from Aspergillus oryzae*; Process Biochemistry; 46; 245-252.

Ichikawa, Y., Look, G.C., Wong, C.H.; (1992) *Enzyme-Catalyzed Oligosaccharide synthesis*; Analytical Biochemistry; 202; 215-238.

Ingrassia, L., Camby, I., Lefranc, F., Mathieu, V., Nshimyumukiza, P., Darro, F., Kiss, R.; (2006); *Anti Galectin Compounds as Potential Anti Cancer Drugs*; Current Medical Chemistry; 13; 3513-3527

Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Brena, B.M.; (2007) *Hydrophilization of immobilized model enzymes suggests a widely applicable method for enhancing protein stability in polar organic co-solvents*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 46; 43 - 51.

Irazoqui, G., Giacomini, C., Batista-Viera, F., Brena, B.M., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Jimeno, M.L.; (2009); *Characterization of Galactosyl Derivatives obtained by transgalactosylation of lactose and different polyols using immobilized beta-galactosidase from Aspergillus oryzae*; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 57; 11302-11307.

Irazoqui, G., Bustamante, M.J., Castilla, A., Villagrán, L.V., Batista-Viera, F., Brena, B.M., Giacomini, C.; (2013); *Substrate-like inhibition of the transgalactosylation reaction catalyzed by b-galactosidase from Aspergillus oryzae*; Biocatalysis and Biotransformation; 31: 57–65.

Ismail, A., Sultani, S., Ghou, M.; (1999); *Enzymatic-catalyzed synthesis of alkylglycosides in monophasic and biphasic systems I: The transglycosilation reaction*; Journal Biotechnology; 69; 135-143.

Ito, K., Stannard, K., Gabutero, E., Clark, A.M., Neo, S-Y., Onturk, S., Blanchard, H., Ralph, S.J.; (2012); *Galectin-1as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment*; Cancer Metastasis Reviews; 31; 763-778.

Jansson, P.E., Kenne, L. and Widmalm, G.; (1989); *Computer-assisted structural-analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data*; Carbohydrate Research; 188; 169-191.

Jia, H.; Wang, P.; (2007); *Enzymatic synthesis of galactosyl lactic ethyl ester and its polymer for use as biomaterials*; Journal of Biotechnology; 132; 314-317.

Lopez, R., Fernandez-Mayoralas, A.; (1994); *Enzymatic  $\beta$  -galactosidation of modified monosaccharides: study of the enzyme selectivity for the acceptor and its application to the synthesis of disaccharides*; Journal of Organic Chemistry; 59; 737-745.

McLafferty, F.W. In: *Interpretation of mass spectra*. 3<sup>rd</sup> ed; Turro, N. Ed; University Science Books. California USA. 1980, p 221.

Mahato, R., Tai, W., Cheng, K.; (2011); *Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency*; Advanced Drug Delivery Reviews; 63; 659-670.

Maksimainen, M., Lampio, A., Mertanen, M., Ossi, T., Rouvinen, J.; (2013); *The crystal structure of acidic  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae**; International Journal of Biological Macromolecules; 60; 109-115.

Murakami, T., Yoshioka, K., Sato, Y., Tanaka, M., Niwa, O., Yabuki, S.; (2011); *Synthesis and galectin-binding activities of mercaptododecyl glycosides containing a terminal  $\beta$ -galactosyl group*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; 21; 1265-1269.

Ogiso, M., Kobayashi, J., Imai, T., Matsuoka, K., Itoh, M., Imamura, T., Okada, T., Miura, H., Nishiyama, T., Hatanaka, K., Minoura, N.; (2013); *Carbohydrate immobilized on a dendrimer-coated colloidal gold surface for fabrication of a lectin-sensing device based on localized surface plasmon resonance spectroscopy*; Biosensors and Bioelectronics; 41; 465-470.

Okahata, Y., Mori, T.; (1998); *Transglycosylation catalyzed by a lipid-coated  $\beta$ -D-galactosidase in a two-phase aqueous-organic system*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 5; 119-123.

Palcic, M.C.; (1999); *Biocatalytic synthesis of oligosaccharides*; Current opinion in Biotechnology; 10; 616-624.

Park, Y.K., De Santi, M.S.S., Pastore, G.M.; (1979); *Production and characterization of  $\beta$ -Galactosidase from *Aspergillus oryzae**; Journal of Food Science; 44; 100-103.

Porciúncula-González, C., Castilla, A., Garófalo, L., Soulé, S., Irazoqui, G., Giacomini, C.; (2013); *Enzymatic synthesis of 2-aminoethyl- $\beta$ -D-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase*; Carbohydrate research; 368; 104-110.

Rabinovich, G.; (2005); *Galectin-1 as a potential cancer target*; British Journal of Cancer; 92; 1188-1192.

Rabinovich, G.A., Cumashi, A., Bianco, G.A., Ciavardelli, D., Lurisci, I., D'Egidio, M., Piccolo, E., Tinari, N., Nifantiev, N.; Iacobelli, S.; (2006); *Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis*; Glycobiology ; 16, 3; 210 - 220.

Rajaganesh, R., Jayakumar, J., Sivaraj, Ch., Raaman, N., Das, T.M.; (2010) *Synthesis and antioxidant activity of a novel class of 4,6-o-protected o-glycosides and their utility in disaccharide synthesis*; Carbohydrate Research; 345; 1649-1657.

Rajput, V.K., Leffler, H., Nilsson, U.J., Mukhopadhyay, B.; (2014); *Synthesis and evaluation of iminocoumaril and coumaril derivatized glycosides as galectin antafoanists*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; 24 (5); 3516-3520.

Reuter, S., Nygaard, A.R., Zimmermann, W.; (1999);  *$\beta$ -galactooligosaccharide synthesis with  $\beta$ -galactosidases from *Sulfolobus solfataricus*, *Aspergillus oryzae* and *Escherichia coli**; Enzyme Microb. Technol.; 25; 509-516.

Richard, J.P., Westerfeld, J.G., Lin, S., Beard, J.; (1995) *Structure-Reactivity relationship for  $\beta$ -galactosidase (*Escherichia coli*, *lacZ*). 2. Reactions of the Galactosyl-Enzyme Intermediate with alcohols and azide ion*; Biochemistry; 34; 11713-11724.

Rodríguez, E.; (2011); *Síntesis enzimática de  $\beta$ -Galactósidos y evaluación de su actividad biológica como inhibidores de galectinas*; Trabajo experimental correspondiente a la Licenciatura en Química, Facultad de Química, UdelAR.

Rye, C.S., Withers, S.G. (2000) *Glycosidase mechanisms*, Current Opinion in Chemical Biology, 4, 573-580.

Salameh, B.A., Leffler, H., Nilsson, U.J.; (2005); *3-(1,2,3-Triazol-1-yl)-1 $\beta$ -thio-galactosides as small, efficient, and hydrolytically stable inhibitors of galectin-3*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.; 15; 3344-3346.

Sanz, M.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A.; (2005); *Influence of disaccharide structure on Prebiotic Selectivity in vitro*; Journal of Agricultural & Food Chemistry; 53; 5192-5199.

Sarry, J.M., Günata, Z.; (2004); *Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors*; Food Chemistry; 87; 509-521.

Sako, T., Matsumoto, K., Tanaka, R.; (1999); *Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides*; International Dairy Journal; 9; 69-80.

Scigelova, M., Singh, S., Crout, D.H.G.; (1999) *Glycosidases- a great synthetic tool*; Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic; 6; 483-494.

Scheckermann, C., Wagner, F., Fischer, L.; (1997); *Galactosylation of antibiotics using  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae**; Enzyme Microbial Technology; 20; 629-634.

Seeberger, P.H.; (2008); *Automated carbohydrate synthesis as a platform to address fundamental aspects of glycobiology- current status and future challenges*; Carbohydrate Research; 343; 1889-1896.

Sepúlveda, G., Porta, H., Sosa, M.; (2003); *La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas*; Revista Mexicana de Fitopatología; 21; 355-363.

Sheikh, J., Parvez, A., Juneja, H., Ingle, V., Chohan, Z., Youssoufi, M., Hadda, T.B.; (2011); *Synthesis, biopharmaceutical characterization, antimicrobial and antioxidant activities of 1-(4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyloxy-2'-hydroxyphenyl)-3-aryl-propane-1,3-diones*; European Journal of Medicinal Chemistry; 46; 1390-1399.

Sivakumar, R., Divagar, S.; (2009); *Enzymatic synthesis of dopamine glycosides*; Enzyme Microbial Technology; 44; 33-39.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C.; (1985); *Measurments of protein using bicinchoninic acid*; Analytical Biochemistry; 150; 76-85.

Sorg, B.L., Hull, W.E., Kliem, H-C., Mier, W., Wiessler, M.; (2005); *Synthesis and NMR characterization of hydroxyurea and mesylglycol glycoconjugates as drug candidates for targeted cancer chemoteraphy*; Carbohydrate Research; 340;181-189.

Spengler, B., Dolce, J.W., Cotter, R.J.; (1990); *Infrared Laser Desorption Mass Spectrometry of oligosaccharides: Fragmentation mechanisms and isomer analysis*; Analytical Chemistry; 62; 1731-1737.

Sunasee, R., Narain, R.; (2013); *Glycopolymers and Glyco-nanoparticles in Biomolecular Recognition Processes and Vaccine Development*; Macromolecular Journals; 13; 9-27.

Tanaka, A., Tosa, T., Kobashashi, T.; (1993); in: *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*, (Ed) Bioprocess Technology, Marcel Dekker, INC, N.York.

Tejler, J., Leffler, H., Nilsson, U.J.; (2005); *Synthesis of O-galactosyl-aldoximes as potent LacNac-mimetic galectin 3 inhibitors*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; 15; 2343-2345.

Thomas, M., Rivault, F., Tranoy-Opalinski, I., Roche, J., Gesson J.P., Papot, S.; (2007); *Synthesis and biological evaluation of the suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)  $\beta$ -glucuronide and  $\beta$ -galactoside for application in selective prodrug chemotherapy*; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters; 17; 983-986.

Toba, T., Yokota, A., Adachi, S.; (1985); *Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactosa by Aspergillus oryzae  $\beta$ -galactosidase.*; Food Chemistry; 16; 147-162.

Tzortzis, G., Goulas, A.K., Baillion, M.L.A., Gibson, G.R., Rastall, R.A.; (2004); *In vitro evaluation of the fermentation properties of galactooligosaccharides synthesised by  $\beta$ -galactosidase from Lactobacillus reuteri*; Applied Microbiology & Biotechnology; 64; 106-111.

Tzortzis, G., Goulas, A.K., Gibson, G.R.; (2005); *Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, Bifidobacterium bifidum NCIMB 41171*; Applied Microbiology & Biotechnology; 68; 412-416

Van Rantwijk, F., Woudenberg-van Oosterom, M., Sheldon, R.A.; (1999); *Glycosidase-catalysed synthesis of alkyl glycosides*; Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic; 6; 511-532

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J.; (1999); *Chapter 27: S-Type Lectins (Galectins) in: Essentials Of Glycobiology*; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 417-426.

Vic, G., Hastings, J.J., Howarth, O.W., Crout, D.H.G.; (1996); *Chemoenzymatic synthesis of ethyl 1-thio-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-O- $\beta$ -D-glycopyranosyl disaccharides using the  $\beta$ -galactosidase from Bacillus circulans*; Tetrahedron: Asymmetry; 7 (3): 709-720.

Viratelle, O.M., Yon, J.M.; (1973), *Nucleophilic competition in some  $\beta$ -galactosidase-Catalyzed Reactions*; European Journal of Biochemistry; 33; 110-116.

Walker, A.L., Franke, R.M., Sparreboom, A., Ware, R.E.; (2011); *Transcellular movement of hydroxyurea is mediated by specific solute carriers*; Experimental Hematology; 39; 446-456.

Wang, R., Yang, X., Gao, R., Yang, Y., Wang, X., Cao, S.; (2009); *Enzymatic synthesis of cyclohexyl- $\alpha$  and  $\beta$ -D-glucosides catalyzed by  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidase in a biphasic system*; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 56; 131-135.

Willits, M.G., Giovanni, M., Prata, R. T., Kramer, C. M., De Luca, V., Steffens, J.C., Graser, G.; (2004); *Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites*; Phytochemistry; 65; 31-41.

Wimmer, Z., Pechová, L., Saman, D.; (2004); *Koenigs-Knorr Synthesis of Cycloalkyl Glycosides*; *Molecules*; 9; 902- 912.

Woudenberg-van Oosterom, M., van Belle, H.J.A., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.; (1998); *Immobilised  $\beta$ -galactosidases and their use in galactoside synthesis*; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*; 134; 267-274.

Yi, W., Cao, R., Wen, H., Yan, Q., Zhou, B., Ma, L., Song, H.; (2009); *Discovery of 4-functionalized phenyl- $\alpha$ -D-glycosides as a new class of mushroom tyrosinase inhibitors*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 19; 6157-6160.

Yoon, J-H., Ajisaka, K.; (1996); *The Synthesis of galactopyranosyl derivatives with  $\beta$ -galactosidases of different origins*; *Carbohydrate Research*; 292; 153-163.

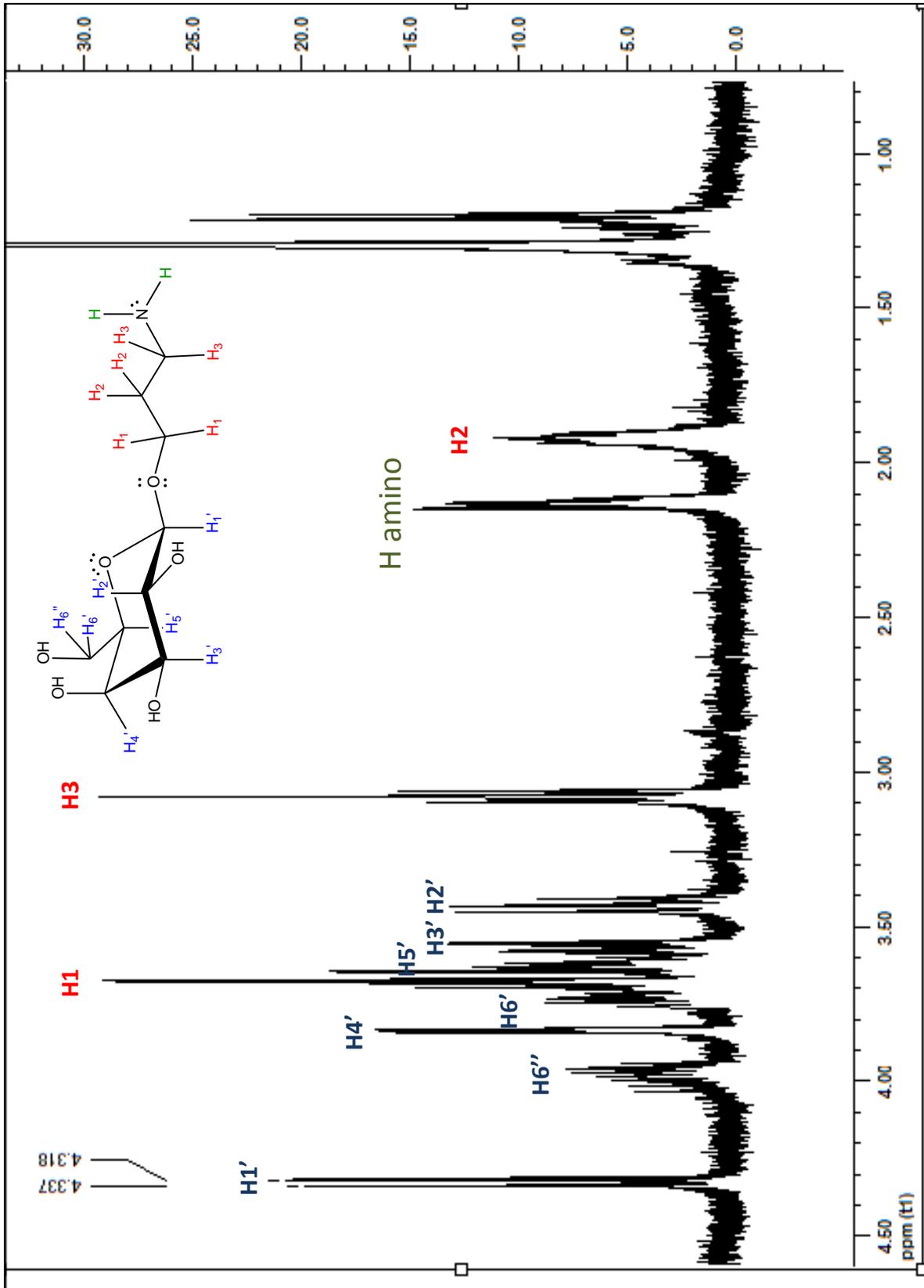
Yoon, S-H., Fulton, D.B., Robyt, J.F.; (2010); *Enzymatic synthesis of L-DOPA  $\beta$ -glycosides by reaction with sucrose catalyzed by four different glucansucrases from four strains of *Leuconostoc mesenteroides*.*; *Carbohydrate Research*; 345; 1730-1735.

**ANEXO:**

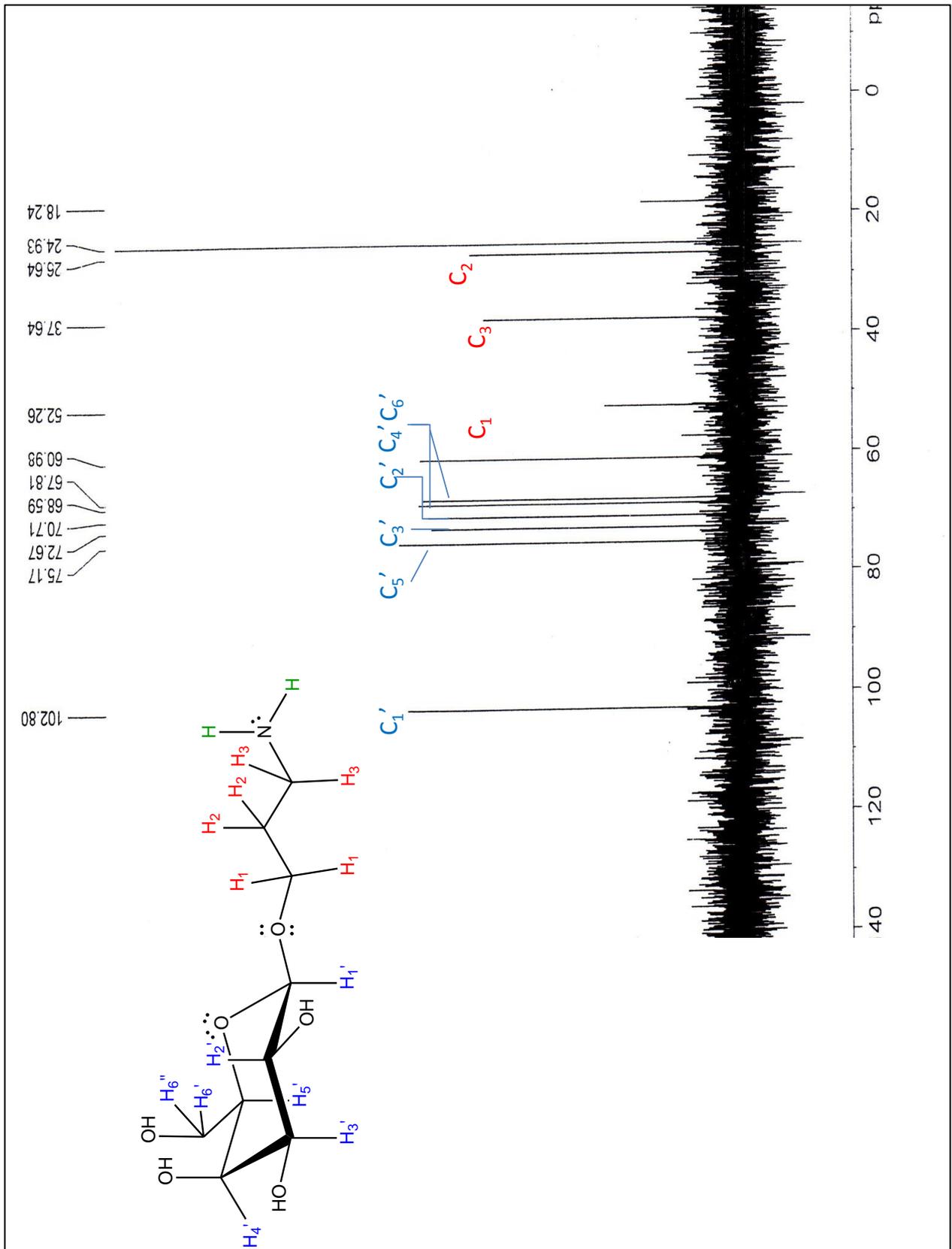
**Identificación espectroscópica de los compuestos 1 y 2 por Resonancia Magnética Nuclear**

### A.1.- Compuesto 1

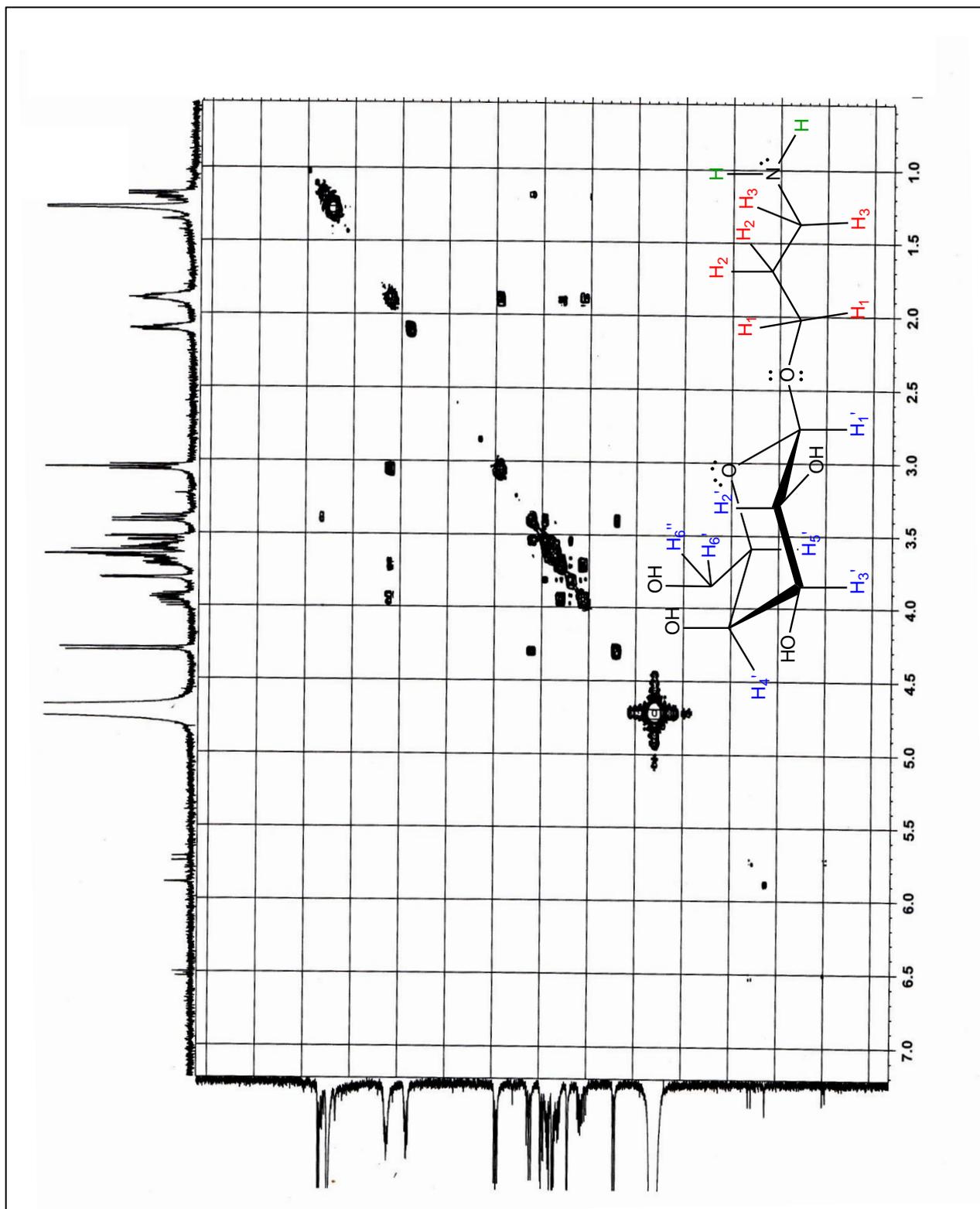
#### A.1.1: Espectro $^1\text{H}$ RMN



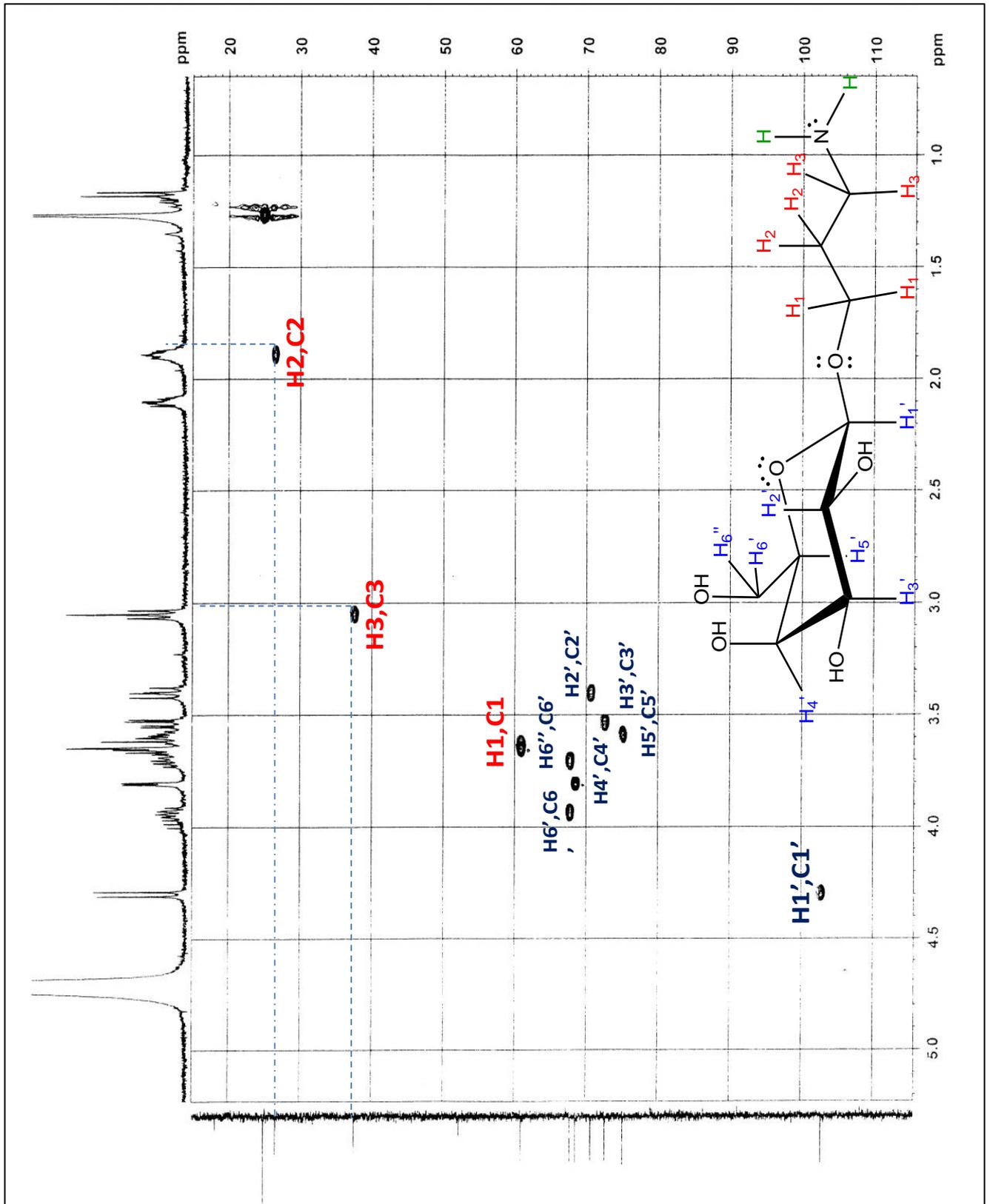
A.1.2: Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN



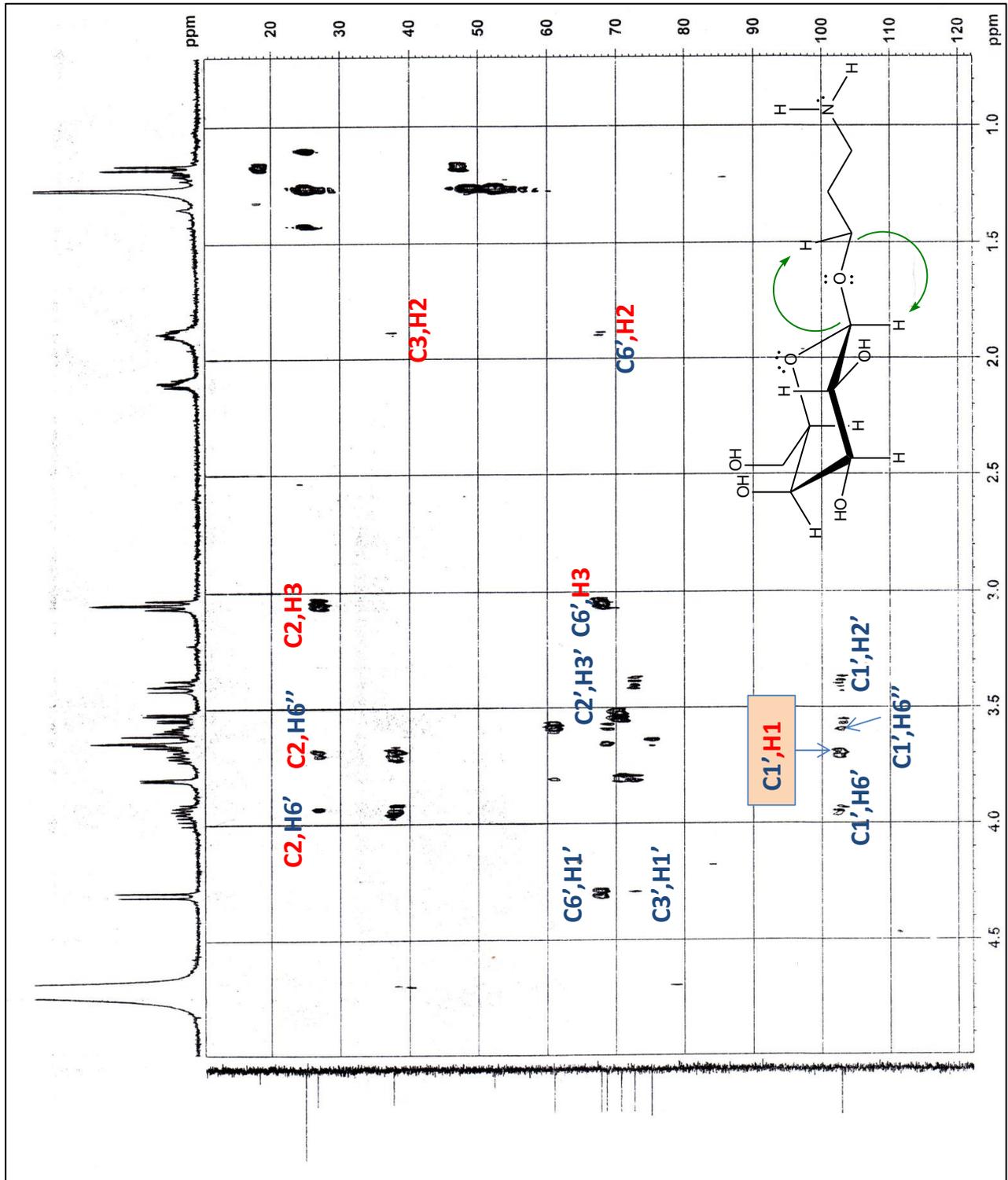
A.1.3: Espectro COSY



A.1.4: Espectro HSQC

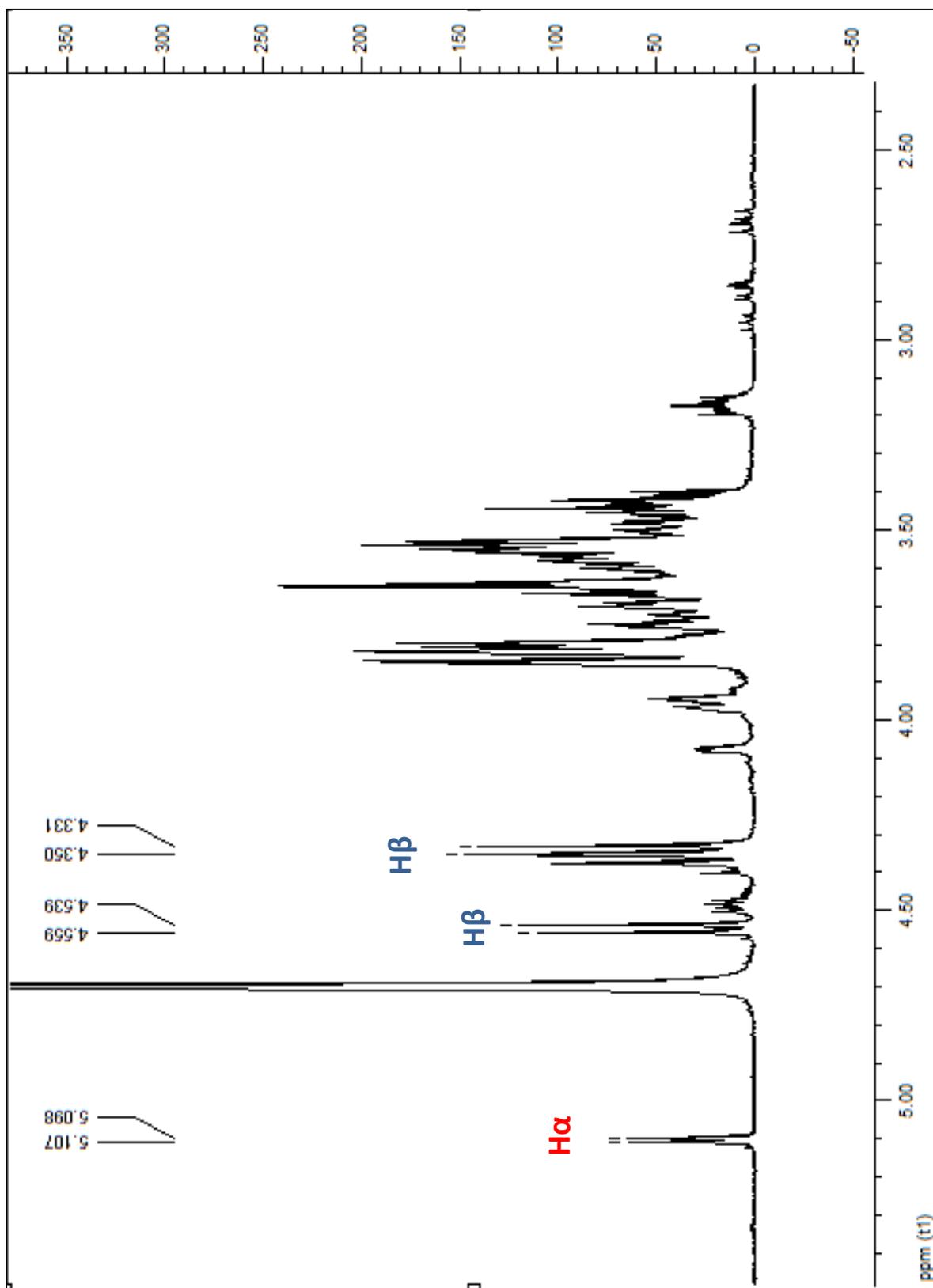


A.1.5.:Espectro HMBC

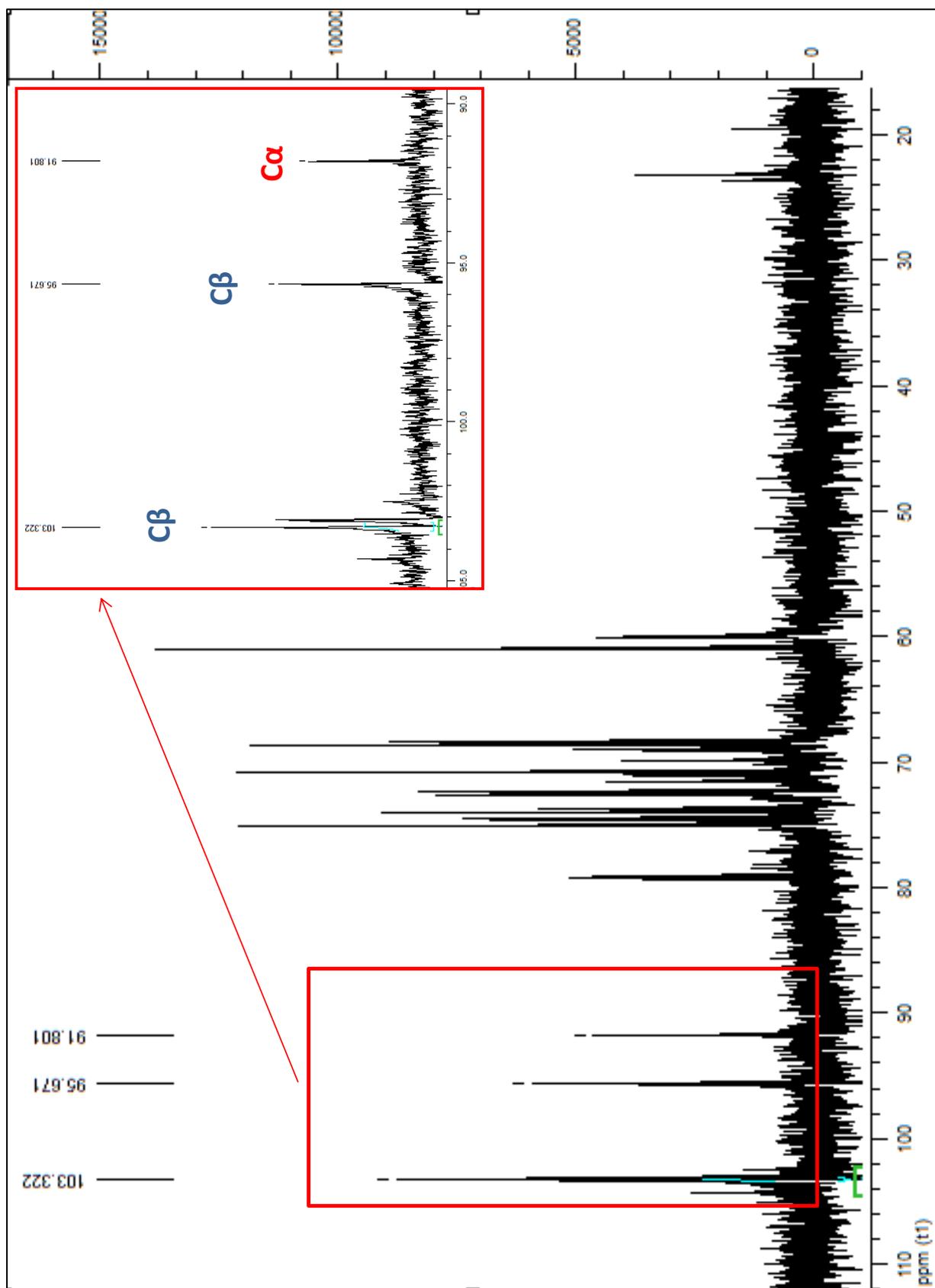


## A.2. Compuesto 2

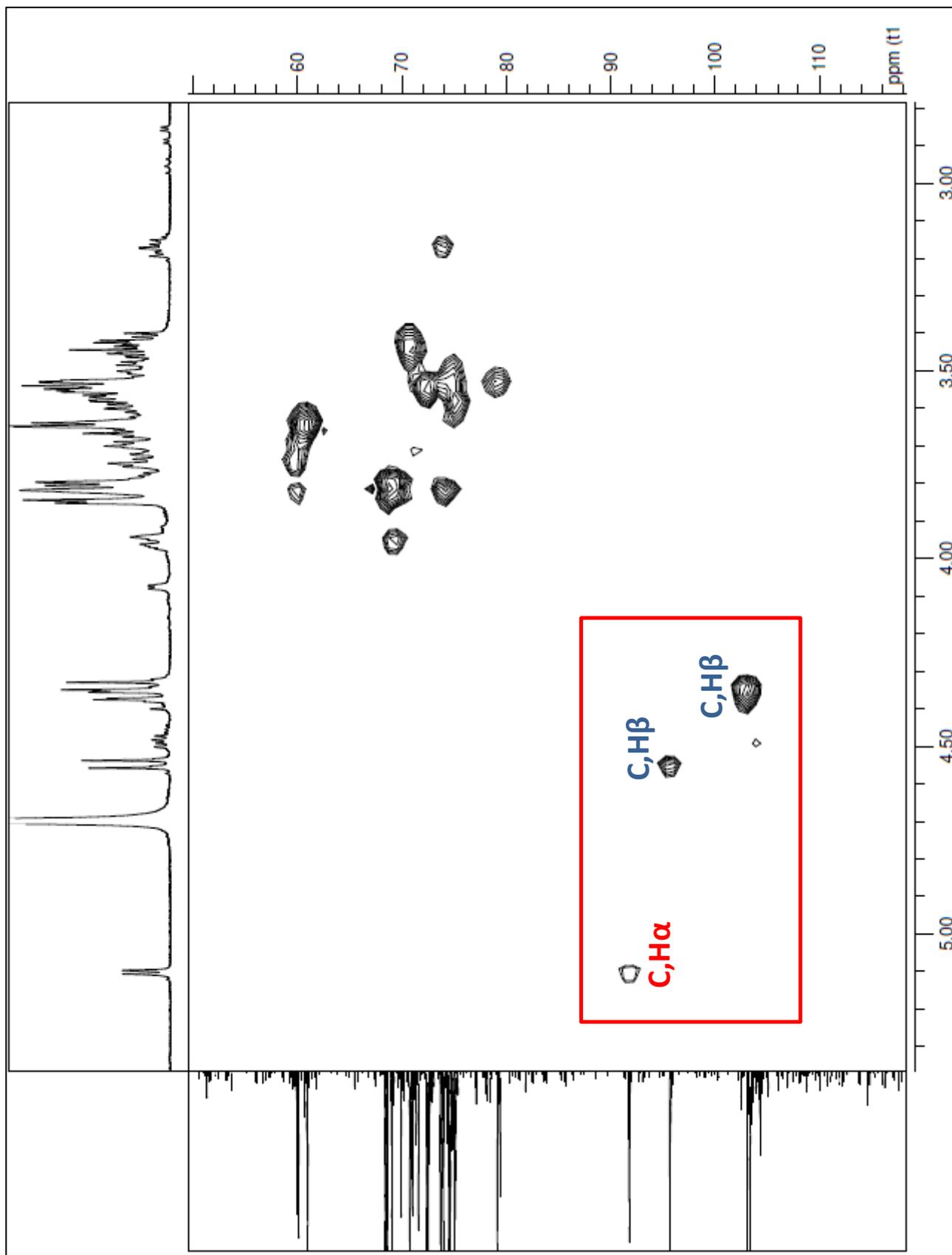
### A.2.1: Espectro $^1\text{H}$ RMN



A.2.2: Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN



A.2.3: Espectro HSQC



## AGRADECIMIENTOS

A todos los que directa o indirectamente colaboraron para que esta tesis fuera posible.

A mi familia, por su apoyo durante toda mi carrera, por cuidarme y valorarme.

- A mi esposo **Andrés**, por ser mi soporte, mi consejero, mi amigo, mi amor, por postergar muchas veces sus prioridades por las mías....
- A mi bebe, **Francolino**, por hacerme sentir tanta felicidad, por ser tan pillito, por esa sonrisa que me ilumina y me alegra hasta el momento más amargo....
- A mi madre **Diana**, por ser incondicional, por estar siempre, por ser una madraza.
- A mis hermanos **Martín, Diego y Victoria** por quererme y aguantarme.
- A mi tía **Iris**, por impulsarme a ingresar en Facultad, por ser muchas veces el "padre" de mi familia
- A **Elida y Billy**, mis suegros, por su cariño, y por su invaluable ayuda, por quererme y cuidar de nosotros.

A mis amigos y compañeros de Cátedra y de la vida

- A mis tutoras **Gabi, Ceci y Bea**, por el aguante, y por la confianza. Gracias por haberme iniciado en este mundo tan apasionante y complejo de las enzimas. Por las charlas constructivas (y por algunos de los rezongos también), por tratar de sacar lo mejor de mi y tener claras mis debilidades y fortalezas. Por apoyarme en este camino, que no siempre estuvo fácil, pero fue de mucho aprendizaje.
- A los compañeros de la **Cátedra de Bioquímica**, por su cariño y su compañerismo y sus múltiples y enriquecedores aportes a lo largo de todo este proceso.
- A mis amigos del alma, **Gabi. P, Lari, Majo, Gabi L. y Laura** por ser mi soporte, por las risas y llantos que hemos compartido. Por darme fuerza para seguir cuando las circunstancias del momento no eran las más favorables. A **Ernesto, Agustín y Miriam**, gracias por tantos momentos compartidos. A **Ernesto** un agradecimiento adicional por su invaluable ayuda con el ensayo de actividad biológica.
- A la Dra. **Silvia Soulé**, por compartir generosamente sus conocimientos y permitirme realizar una pasantía en su laboratorio de incalculable valor para mí.
- A las instituciones que facilitaron las condiciones para poder realizar esta Tesis, la **Facultad de Química**, la **Universidad de la República**.
- Al programa **PEDECIBA** y a la **ANII**, por los apoyos económicos brindados sin cuyo aporte no hubiese sido posible esta Tesis.
- A **Dios** por bendecirme con tan linda familia y amigos y por darme la posibilidad de realizar esta Maestría.

## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS**

Manuscrito para ser sometido a publicacion;

**“Enzymatic synthesis of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus*  
*oryzae*  $\beta$ -galactosidase”**

1 **Enzymatic synthesis of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus***  
2 ***oryzae*  $\beta$ -galactosidase**

3 Cecilia Porciúncula González<sup>a</sup>, Ernesto Rodríguez<sup>a</sup>, Silvia Soule<sup>b</sup>, Laura Franco Fraguas<sup>a</sup>,  
4 Beatriz M. Brena<sup>a</sup>, Cecilia Giacomini<sup>a</sup>, Gabriela Irazoqui<sup>a</sup> \*.

5 <sup>a</sup>Cátedra de Bioquímica, Dpto. Biociencias, Facultad de Química, UdelaR, Gral. Flores 2124, CC  
6 1157, Montevideo, Uruguay.

7 <sup>b</sup> Laboratorio de Carbohidratos, DQO, Facultad de Ciencias/Facultad de Química, UdelaR  
8 Alfredo Navarro 3051, Montevideo, Uruguay.

9

10 \*Corresponding author

11

12 Authors e-mail:

13 Diana Cecilia Porciúncula Gonzalez: [dcp@fq.edu.uy](mailto:dcp@fq.edu.uy)

14 Juan Ernesto Rodriguez Camejo: [erodriguez@fmed.edu.uy](mailto:erodriguez@fmed.edu.uy)

15 Silvia Soule: [ssoule@fq.edu.uy](mailto:ssoule@fq.edu.uy)

16 Laura Franco Fraguas: [lfranco@fq.edu.uy](mailto:lfranco@fq.edu.uy)

17 Beatriz Brena: [bbrena@fq.edu.uy](mailto:bbrena@fq.edu.uy)

18 Cecilia Giacomini: [cgiacomini@fq.edu.uy](mailto:cgiacomini@fq.edu.uy)

19 Gabriela Irazoqui: [mgidrv@fq.edu.uy](mailto:mgidrv@fq.edu.uy)

20

21

22

23 **Abstract**

24 Progress in glycobiology has revealed the role of carbohydrates in multiple biological processes,  
25 both normal and pathologic, that is why a thorough understanding of these mechanisms is  
26 necessary for the study, diagnosis and design of drugs for several pathologies. Glycosidases are  
27 an excellent green chemistry alternative for the synthesis of glycosides, particularly their  
28 stereoselectivity allows the generation of anomerically pure glycosides, in only one reaction step  
29 using mild reaction conditions. Here we report the enzymatic synthesis and structural  
30 characterization of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside. Optimal reaction conditions for the  
31 transgalactosylation reaction were 100 mM lactose, 500 mM 3-amino-1-propanol and 24 hours  
32 of incubation at 50°C with 6 U/mL of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. The fact that the  
33 synthesis of 1-aminopropyl-2- $\beta$ -D-galactopyranoside using 1-amino-2-propanol as acceptor was  
34 not achieved, and that N-glycoside formation was not observed, reveals the selectivity of  $\beta$ -  
35 galactosidase for the synthesis of O-glycosides, and particularly for primary alcohols. The  
36 synthesized galactosides were evaluated for their ability to interact with bovine spleen galectin-1  
37 (Gal-1) by using the hemagglutination inhibition assay; results demonstrated that 3-aminopropyl-  
38  $\beta$ -D-galactopyranoside may be considered as a functionalized galactose moiety more than an  
39 efficient galectin-1 inhibitor. The proposed approach constitutes a promising tool for the  
40 generation of glycopolymers and glyconanoparticles with potential applications in the  
41 development of biosensors as well as construction blocks in chemical synthesis.

42

43 **Key words**

44 Transglycosylation; Galactoside;  $\beta$ -Galactosidase; Glycosidases; Galectins.

## 45 **1. Introduction**

46 Progress in glycobiology in recent years has revealed the role of carbohydrates in multiple  
47 biological processes, both normal and pathologic. Therefore, a thorough understanding of these  
48 mechanisms is necessary for the diagnosis and design of therapeutic drugs for several  
49 pathologies. Along these lines, the study of carbohydrate-lectin interactions is one of the most  
50 promising research areas for unveiling the mechanism of biological processes mediated by  
51 glycans, for which the availability of glycosides and oligosaccharide of defined structure is  
52 essential.<sup>1-3</sup>

53 Lectins are proteins that possess a carbohydrate recognition domain (CRD) with the ability to  
54 interact specifically and reversibly with glycoconjugates. Those with specificity towards  $\beta$ -  
55 galactosyl- containing glycoconjugates are known as galectins.<sup>4-7</sup> Particularly galectin-1 (Gal-  
56 1), is abundantly secreted by almost all malignant tumor cells, and it has been reported its  
57 participation in several processes related to cancer development, including immune suppression,  
58 angiogenesis, hypoxia and metastasis.<sup>1,8</sup> So, the blockade of the carbohydrate recognition  
59 domain of Gal-1 with glycosides that compete with its natural ligands may convert Gal-1 in a  
60 potential target for cancer therapy.<sup>1, 8-9</sup> In this sense, in literature was reported several glycosides  
61 capable of inhibiting binding between galectins and their natural ligands.<sup>1,5, 8-11</sup>

62 Glycosidases are an excellent alternative for synthetic purposes as their stereoselectivity allow  
63 the generation of anomerically pure glycosides, in only one reaction step using mild reaction  
64 conditions.<sup>12-14</sup> These enzymes catalyze the transference of a glycosyl-moiety from a donor  
65 compound (glycoside or oligosaccharide) to a nucleophile that works as an acceptor molecule.  
66 The potential of transglycosylation for synthetic chemistry is enormous, and it has not been fully  
67 exploited so far. However, the systems are complex and critically dependant on the enzyme  
68 specificity, the acceptor molecule and reaction conditions so that the synthesis of new products is  
69 a challenging objective.

70 In this work we studied the transgalactosylase activity of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase  
71 using two aliphatic alcoholamines (3-amino-1-propanol and 1-amino-2-propanol) as acceptors  
72 and lactose as the galactosyl donor. Their interaction with bovine spleen galectin-1 (Gal-1) was  
73 evaluated using the hemagglutination inhibition assay. A thorough structural analysis of the  
74 obtained products was performed by spectrometric and spectroscopy methods.

75

## 76 **2. Results and discussion**

### 77 *2.1. Synthesis of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside*

78 The time course of the enzymatic reaction using lactose (347 mM), 3-amino-1-propanol  
79 (500mM) and 6 U/mL of *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase in 0.5 M sodium acetate buffer pH 5.5 at  
80 50°C is shown in Figure 1A. As expected, the release of glucose ( $R_f$  0.40) by hydrolysis is  
81 proportional to the decrease of lactose ( $R_f$  0.18). However, during the first five hours of reaction,  
82 the concentration of galactose released ( $R_f$  0.33) was notoriously less pronounced than that of  
83 glucose. This is an indication of the coexistence of a transgalactosylation reaction in addition to  
84 the hydrolysis, as glucose is released in the first reaction step of both processes and galactose is  
85 released during the second reaction step, only when water is the galactosyl acceptor (Scheme 1).  
86 On the other hand, two new spots with  $R_f$  of 0.25 (compound 1) and 0.07 (compound 2) were  
87 observed and they could not be assigned neither to the substrate nor to lactose hydrolysis  
88 products, inferring that they may correspond to transgalactosylation products. It should be  
89 highlighted that at 24 hours of reaction the intensity of the spot corresponding to compound 2  
90 notoriously decreases, while that of the compound 1 remains unchanged. This could point to  
91 enzymatic hydrolysis of compound 2 and compound 1 either could not be hydrolyzed, or  
92 equilibrium between hydrolysis and synthesis rate was achieved.

93 In order to detect the presence of free amino groups in the new compounds, the TLC was  
94 developed with ninhydrin (specific developer for primary amine groups). Figure 1B shows that

95 only compound 1 ( $R_f$  0.25) and 3-amino-1-propanol ( $R_f$  0.67) were revealed by ninhydrin. This  
96 was the first evidence that compound 1 could be preliminarily identified as the galactoside: 3-  
97 aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside.

98

### 99 *2.2. Synthesis reaction in the absence of the alcoholamine*

100 The performance of the transgalactosylation system was also evaluated in the absence of the  
101 acceptor (3-amino-1-propanol) and for this purpose the enzyme (6U/mL) was incubated with  
102 different lactose concentrations (100, 200 and 347 mM) in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.5  
103 at 50°C for 24 hours. Spots corresponding to hydrolysis products, glucose and galactose, as well  
104 as to compound 2 could be observed for all the lactose concentrations studied (Figure 2).

105 The fact that compound 2 ( $R_f$  0.07) could be synthesized in the absence of 3-amino-1-propanol,  
106 denotes that it could be the result of a transglycosylation reaction where lactose fulfilled the  
107 double role of galactosyl donor and of acceptor, resulting in the formation of a trisaccharide  
108 (Scheme 1). Interestingly, this transglycosylation reaction took place in aqueous medium even at  
109 low lactose concentrations (Figure 2C). On the other hand the fact that compound 1 was not  
110 generated in the absence of 3-amino-1-propanol, reinforced the hypothesis that it could be the 3-  
111 aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside. A point to be considered is that total lactose conversion  
112 was achieved after 24 hours of reaction, when initial lactose concentrations were 100 and 200  
113 mM (Figure 2C and 2B), and almost completely achieved when lactose concentration was 347  
114 mM (Figure 2A).

### 115 *2.3. Study of the optimal reaction conditions for the synthesis of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D- 116 galactopyranoside*

117 The performance of the transgalactosylation system for the synthesis of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-  
118 galactopyranoside was evaluated under different conditions. The synthesis of both, compound 1

119 (Rf 0.25) and 2 (Rf 0.07) was achieved at all lactose concentrations studied (100-347 mM) at a  
120 constant 3-amino-1-propanol concentration (500 mM) (data not shown). These results evidenced  
121 that lactose concentration was not a critical parameter for the galactoside synthesis, in the  
122 concentrations range studied. Nevertheless, an increase in 3-amino-1-propanol concentration  
123 from 100 mM to 500 mM at a fixed lactose concentration (200 mM) resulted in an increase of  
124 the amount of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside synthesized, evidenced by the higher  
125 intensity of the TLC spots with Rf 0.25 (Figure 3). This performance shows that the presence of  
126 3-amino-1-propanol favors transglycosylation towards hydrolysis.

127 The comparison between the reaction synthesis at 24 hs in the absence of acceptor (Figure 2),  
128 and in the presence all the 3-amino-1-propanol concentrations studied (Figure 3), at the same  
129 lactose concentration (200mM), clearly showed that lactose conversion was lower in the last  
130 cases. The inhibition enzyme experiments performed with 3-amino-1-propanol showed that the  
131 acceptor did not have an inhibitor effect on the enzyme under assayed conditions (data not  
132 shown), whereby it was discarded as the cause of the lactose conversion slowing-down.

133 On other hand, since  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* showed to be relatively stable in  
134 the most drastic conditions assayed (50°C, 500 mM 3-amino-1-propanol) keeping near to 50% of  
135 residual enzyme activity upon 24 hours, this could be the cause of the decreased rate of the  
136 lactose conversion. Moreover, given that the enzyme was completely stable at 50°C during 24 hs  
137 in the absence of the acceptor, this decrease may be partially attributed to the presence of the 3-  
138 amino-propanol in the bulk reaction.

139 Despite this enzyme inactivation, 500mM of 3-amino-1-propanol was selected as the optimal  
140 condition as it was the one that provided the highest production of galactoside. Taking into  
141 account that the galactoside purification process was easier at low residual lactose concentration,

142 and considering that initial lactose concentration was a parameter that had low significance over  
143 in the amount of the synthesized galactoside, the optimal conditions selected for the synthesis  
144 were 100 mM lactose, 500 mM 3-amino-1-propanol, 6 U/mL, 50°C, 24 hours.

#### 145 *2.4. Galactoside purification and structural characterization*

146 The purification of the galactoside was performed in two chromatographic steps. The first one  
147 consisted of size exclusion chromatography using Sephadex G10 column; compound 2 was  
148 isolated while compound 1 co-eluted with lactose. In a second step compound 1 was purified by  
149 preparative thin layer chromatography. The degree of purity of both compounds was analyzed by  
150 TLC (Figure 4).

151 Structural elucidation of the purified compounds 1 and 2 was performed combining the use of  
152 mono ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) and bidimensional (COSY, HSQC, HMBC) techniques of nuclear  
153 magnetic resonance as well as mass spectrometry.

##### 154 *2.4.1. Structural characterization of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside*

###### 155 *2.4.1.1. NMR analysis*

156 The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 in water- $d_2$  at 30°C showed only one anomeric proton at  
157  $\delta_{\text{H}}$  4.32 ppm ( $J$  8 Hz), confirming the presence of a monosaccharide moiety. Proton decoupled  
158 HSQC experiments allowed the assignment of the corresponding carbon signal (Table 1). This  
159 information, together with the values of  $^3J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$  for the anomeric proton and published chemical  
160 shift data for sugar residues allowed the assignment of the spin system for a specific sugar  
161 residue and the determination of the anomeric configuration. The data showed that the galactose  
162 residue was a  $\beta$ -pyranoside.<sup>15-16</sup>

163 The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 showed, in addition to the signals of the monosaccharide  
164 residue, signals corresponding to the 3-amino-1-propanol  $\text{C}_2$  protons bonded to the amino  
165 terminal through a methylene carbon at  $\delta_{\text{H}}$  1.87 ppm ( $m$ ), and two important signals at  $\delta_{\text{H}}$  3.63

166 ppm ( $t$ ) and  $\delta_{\text{H}}$  3.07 ( $t$ ) corresponding to two methylene carbons.  
167 Moreover the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum showed signals for nine carbons, three of which arose from the  
168 aglycone moiety. Signals observed in the HSQC spectrum indicated the presence of four  
169 methylene and five methine carbons, which confirmed the presence of the aminopropyl aglycone  
170 and a sugar residue. The proton spin of the pyranoside ring was assigned by H-H correlation  
171 COSY. These data together with the proton-carbon correlation from the HSQC experiment,  
172 allowed the assignment of the carbon signals. The absence of a correlation of the proton signal at  
173  $\delta_{\text{H}}$  2.5 with a carbon signal confirmed that it corresponds to the amino protons. The glycosidic  
174 linkage between both molecules was evidenced by the strong correlation observed among the  $\text{H}_1$   
175 proton  $\delta_{\text{H}}$  3.63 and the anomeric carbon ( $\delta_{\text{C}}$  102.8) by the HBMC experiment.

176

#### 177 2.4.1.2. MS analysis

178 Compound 1 ESI-MS spectrum revealed the presence of intense ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  at  
179  $m/z$  238.12 and 260.13 respectively, which are in accordance to the molecular weight of the  
180 proposed galactoside. According to the Domond and Costello (1988)<sup>17</sup> nomenclature we  
181 analyzed the MS-MS spectrum of the  $[\text{M}+\text{H}]^+$  showed in Figure 5A. It can be observed the ion  
182  $m/z = 76.10$  ( $\text{Y}_1$ ) generated due to the release of the galactose moiety lacking the oxygen atom of  
183 the glycosidic bond, which correspond to the molecular weight of the 3-amino-1-propanol. The  
184 fragments  $m/z = 202.09$  ( $\text{C}_1$ ) and  $m/z = 220.13$  were also identified. The latter was assigned to the  
185  $[\text{M}-\text{NH}_3]^+$  ion which evidenced the loss of terminal amino as an ammonium molecule according  
186 of a polyfunctional compound.<sup>18</sup> The  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  /MS-MS spectrum (Figure 5B) showed the ions  
187  $m/z = 242.16$  aroused as a consequence of the loss of a water molecule  $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]$ . The  
188 fragments assigned to the split of the pyranoside ring  $^{2,4}\text{A}_1$  ( $m/z = 83.08$ ),  $^{0,2}\text{A}_1$  ( $m/z = 143.0$ ), and  
189  $^{0,2}\text{X}_1$  ( $m/z = 140.09$ ) confirmed the presence of a galactose moiety.<sup>19-20</sup> Finally, the glycosidic  
190 bond excision was supported by the ions  $m/z = 185.06$  ( $\text{B}_1$ ) and  $m/z = 202.09$  ( $\text{C}_1$ ).

191 Consequently the structure 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside was deduced for compound  
192 1.

#### 193 2.4.2. Structural characterization of $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)- $\alpha$ - 194 D-glucose

##### 195 2.4.2.1- MS analysis

196 Compound 2 ESI-MS spectrum revealed the presence of an intense ion  $[M+Na]^+$  at  $m/z$  527.17,  
197 which is in accordance with the molecular weight of a trisaccharide (Figure 6A). This was  
198 reinforced by the MS-MS fragmentation pattern of this ion (Figure 6B). The generation of the  
199 ions corresponding to the cleavage of the glycosidic bonds ( $m/z=203.00$  ( $C_1$  o  $Y_2$ ),  $m/z=365.09$   
200 ( $C_2$  o  $Y_3$ ),  $m/z=347.17$  ( $B_2$ ),  $m/z=509.09$  ( $B_3$ )), as well as those assigned to the pyranoside rings  
201 internal cleavage ( $m/z=305.17$  ( $^{0.2}A_2$ ),  $m/z=407.09$  ( $^{0.2}X_3$  o  $^{2.4}A_3$ ) and  $m/z=467.09$  ( $^{0.2}A_3$  o  
202  $^{2.4}X_3$ )), evidenced that the trisaccharide was formed by a galactose bonded to lactose moiety  
203 through a  $\beta$  1-4 bond (Keeler, 1985). The presence of ion  $^{0.2}A_n$  in the absence of the ions  $^{0.3}A_n$  y  
204  $^{0.4}A_n$  is characteristic of  $\beta$  1-4 bonds between monosaccharide moieties.<sup>19-21</sup>

##### 205 2.4.2.2. NMR analysis

206 In order to confirm the structure proposed for compound 2 according to MS-MS experiments we  
207 included a brief analysis by NMR.

208 The  $^1H$  NMR spectrum of compound 2 showed three signals corresponding to three anomeric  
209 protons at  $\delta_H$  4.35 ppm ( $J$  7.6 Hz),  $\delta_H$  4.53 ppm ( $J$  8.0 Hz) and  $\delta_H$  5.10 ppm ( $J$  3.6 Hz), this  
210 information is consistent with a trisaccharide structure assigned to three anomeric protons. The  
211 coupling constant, evidenced the presence of two  $\beta$  anomers ( $J$  7.6,  $J$  8.0) and one  $\alpha$  anomer ( $J$   
212 3.6). The HSQC experiment showed the corresponding anomeric carbons at  $\delta_C$  103.32,  $\delta_C$  95.64  
213 and  $\delta_C$  91.81 ppm respectively. This information, together with the values of  $^3J_{H1, H2}$  for each  
214 anomeric protons and published chemical shift data for the sugars residues allowed the

215 determination of each anomeric configuration. The data showed that galactose residues were  $\beta$ -  
216 pyranosides forms; instead the glucoside residue was a  $\alpha$ -pyranoside.<sup>15-16</sup>

217 So, based on the experimental data, the enzyme mechanism (Scheme 1) as well as the fact that  
218 galactosidases preserve the anomeric center configuration, we propose that the trisaccharide  
219 structure is  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl -(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranoside

#### 220 2.5. Study of 1-amino-2-propanol as acceptor

221 The use of 1-amino-2-propanol as acceptor in the transgalactosylation system was explored  
222 using identical reaction conditions as those previously described for 3-amino-1-propanol. In this  
223 case only one new spot with rf 0.07 was observed when the reaction performance was followed  
224 by TLC. This compound was purified by molecular exclusion chromatography, analyzed by  
225 mass spectrometry and RMN, which confirmed it was a trisaccharide with the same chemical  
226 structure as compound 2 reported in section 2.4.2. No additional spots which pointed to the  
227 synthesis of the 1-amino-2-propanol galactoside was observed, reinforcing the hypothesis that  
228  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae* exhibited preference for primary hydroxyl as previously  
229 reported.<sup>21-22</sup>

#### 230 2.6. Interaction between galactosides and bovine spleen Galectin-1(Gal-1)

231 The interaction between Compound 1 and 2 and Gal-1 was evaluated by using the  
232 hemagglutination (HAG) inhibition assay. This is reported as a useful tool for the study of  
233 carbohydrate-lectin interactions. The HAG inhibition assay was performed as described in the  
234 experimental section, in the presence of the potential inhibitors; those with affinity for Gal-1 will  
235 bind to its carbohydrate recognition domain (CRD), thus inhibiting the HAG. Minimal Inhibition  
236 Concentration (MIC) and Relative Inhibitor Power (RIP) were determined (Table 2). The MIC  
237 for 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside (compound 1) and for  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-  
238  $\beta$ -D-galactopyranosyl -(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucopyranoside (compound 2) were higher than the MIC for

239 galactose, being lower than for the case of lactose, a natural ligand for Gal-1.

### 240 **3. Conclusions**

241 Transgalactosylation system catalyzed by the *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase demonstrated to  
242 be a useful tool for the enzymatic synthesis of 3-aminopropyl-1- $\beta$ -D-galactopyranoside. Optimal  
243 reaction conditions for transgalactosylation and higher purification levels were achieved with 100  
244 mM lactose, 500 mM 3-amino-1-propanol and 6 U/mL incubated during 24 hours at 50°C.

245 As the synthesis of 2-aminopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside was not achieved when using 1-  
246 amino-2-propanol as acceptor, and as no *N*-glycoside formation was observed, both results may  
247 evidence the selectivity of  $\beta$ -galactosidase for the synthesis of *O*-glycosides and in particular, the  
248 enzyme from *A. oryzae* showed selectivity towards primary alcohols.<sup>23</sup>

249 The synthesized galactoside did not show better inhibitor properties for Gal-1 than the natural  
250 inhibitors, yet the 3-aminopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside may be considered as a functionalized  
251 galactose moiety. This is very interesting for the generation of glycopolymers and  
252 glyconanoparticles for the development of biosensors, as well as for construction blocks in  
253 chemical synthesis.<sup>1-3</sup>

### 254 **4. Experimental**

#### 255 *4.1. Materials*

256 *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), lactose, galactose, 3-amino-1-propanol, orcinol,  
257  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase; EC 3.2.1.23) from *A.oryzae*, fetuin from calf  
258 fetal serum, 1-cyano-4- dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate (CDAP-BF<sub>4</sub>), triethylamine  
259 and DEAE-cellulose were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Chloroform, 2-  
260 amino-1-propanol and ninhydrin were from Merck (USA). TLC plates were from Machery  
261 Nagel (Duren, Germany). Sepharose 4B and PD-10 (Sephadex G25) columns were from GE  
262 Health Care (Buckinghamshire, UK). BCA protein assay reagents were from Pierce (Rockford,

263 Illinois, USA). Heparinized rabbit blood was gently supplied by the Unidad de Reactivos y  
264 Biomodelos Experimentales, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Bovine Spleen  
265 was gently donated by Frigorífico Carrasco, Uruguay. All other chemicals used were of  
266 analytical grade.

#### 267 4.2. Enzymatic activity assay

268 Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  of suitably diluted *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase solution were added to 2.0 mL  
269 of 25 mM ONPG in 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.5 (activity buffer), at room  
270 temperature. The rate of formation of free *o*-nitrophenol (ONP) was recorded  
271 spectrophotometrically at 405 nm using a 1 cm path length. One enzyme unit (U) was defined as  
272 the amount of enzyme hydrolyzing 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per minute in the above defined  
273 conditions. The extinction coefficient used for ONP at pH 5.5 was  $7.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Enzyme  
274 activity was expressed as U/mL.

#### 275 4.3. Protein Determination Assay

276 Protein was determined by the bicinchoninic acid (BCA) assay.<sup>24-25</sup>

#### 277 4.4. Galactosides enzymatic synthesis

278 Volumes of 10 mL of reaction mixtures containing lactose (100 -347mM) and 3-amino-1-  
279 propanol hydrochloride or 1-amino-2-propanol hydrochloride (100-500 mM) in activity buffer  
280 were supplemented with soluble *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase to a final concentration of 6 U/mL.  
281 The reaction mixtures were incubated at 50°C and gently stirred. Aliquots of the mixture were  
282 taken at regular intervals and the reaction was stopped by heating at 100°C for 5 minutes. The  
283 samples were analyzed for carbohydrates by thin layer chromatography (TLC).

#### 284 4.5. TLC analysis

285 Quantitative analytical TLC was performed on Silica Gel TLC plates. Aliquots of 5  $\mu\text{L}$  of  
286 samples (fourth diluted) and standards (glucose, galactose, lactose,) were spotted onto the TLC

287 plates and developed to 10 cm in an 22.0 cm × 11.0 cm × 6.2 cm chamber (saturation time 30  
288 minutes), using MeOH:CHCl<sub>3</sub>:C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O:NH<sub>4</sub>OH (42:17:25:17) as mobile phase. The TLC plates  
289 were air-dried, sprayed with orcinol 0.2% (w/v) in EtOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (90:10), then heated 2 minutes  
290 at 110 °C or sprayed with ninhydrin spray reagent (0.2 % (w/v) in 1-butanol: 10% (v/v) acetic  
291 acid 95:5) for free amino group detection.<sup>26</sup>

#### 292 *4.6. Galactoside-purification*

293 Synthesized galactosides were purified in two steps. The first one consisted of size exclusion  
294 chromatography in a Sephadex G10 column (1.6 cm id x 83 cm height) and isocratically eluted  
295 with deionized water at a flow rate of 0.06 mL/min (1.8 cm.h<sup>-1</sup> linear flow rate). Fractions were  
296 collected, lyophilized and analyzed by TLC as described previously in (Section 4.5). The second  
297 purification step consisted in a preparative TLC performed in the same conditions as the  
298 analytical TLC (see section 4.5). In order to identify the area of the plate containing the  
299 compound of interest, the edges of the plate were stained with orcinol. The silica from the zone  
300 containing the compound of interest was removed and the compound extracted by sonication  
301 during 10 minutes in methanol: water (20:80 v/v) solution. Then the suspension was centrifuged  
302 for 10 minutes at 8700g. The extraction procedure was repeated three times. The supernatants  
303 were pooled, the methanol was rotary evaporated and the sample was further lyophilized and the  
304 purity was checked by analytical TLC as described in section 4.5.

#### 305 *4.7. MS analysis*

306 ESI-MS analyses were performed using a Thermo LTQ Velos spectrometer equipped with a  
307 lineal ionic trap detector. The electrospray-ionization ion source was operated in the positive-  
308 ion mode. The capillary conditions were: voltage 5 kV and temperature 275°C. The sample was  
309 diluted in a 30% acetonitrile (v/v), 0.1% formic acid (v/v) aqueous solution and introduced in  
310 direct injection mode at 4 µL/min.

#### 311 *4.8 NMR experiments*

312 The chemical structures of synthesized galactosides were identified by an extensive  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$   
313 NMR study. NMR spectra were recorded at 30 °C at 400 and 100 MHz respectively, using  
314 deuterated methanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) as solvent on a Bruker Avance DPX 400 NMR.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$   
315 chemical shifts were expressed in ppm using TMS ( $\delta$  0.00) and  $\text{Me}_2\text{CO}$  ( $\delta$  31.00) as internal  
316 reference. 2D experiments [correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear single-quantum  
317 coherence (HSQC) and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC)] were carried out  
318 according to the standard pulse sequences of the instrument software. Proton signals were  
319 assigned based on COSY spectra.  $^{13}\text{C}$  signals were assigned with HSQC spectra, based on the  
320 assignment of proton signals. Finally, the linkage position in each structure was determined by  
321 detecting interfering cross peaks in HMBC spectrum

#### 322 *4.9. Enzyme Inhibition constant determinations*

323 Inhibition constants were determined using ONPG as galactose donor (1.0 - 15.0 mM) and 3-  
324 amino-1-propanol (100-2000 mM) in activity buffer at 25°C. The rate of ONP formation was  
325 determined as previously described in section 4.2. Results were analyzed using Lineweaver Burk  
326 linearization.<sup>27</sup>

#### 327 *4.10. Purification of Gal-1*

328 Galectin-1 was purified from bovine spleen as previously reported by Ahmed et al. (1996)<sup>28</sup> with  
329 the followed modifications. The bovine spleen membrane was removed and the organ cut into  
330 small pieces and suspended in 75 mM sodium phosphate buffer pH 7.2 containing 75 mM NaCl,  
331 2 mM EDTA, 4 mM mercaptoethanol, 0.3M lactose (buffer B) in a ratio of 2 mL/g of spleen.  
332 The mixture was homogenized at 4°C and then was centrifuged at 26000g for 60 minutes at 4°C.  
333 Aliquots of 30 mL of clarified extract twice diluted in buffer were incubated with 30 g of DEAE-  
334 cellulose previously swollen in 75 mM Sodium phosphate buffer pH 7.2 containing 75 mM  
335 NaCl, 2 mM EDTA, 4 mM mercaptoethanol (buffer A) under mild stirring for 4 hours at room  
336 temperature. The non-bound material of the ionic exchange was gel filtered in PD-10 columns

337 pre-equilibrated in buffer A. The void volume fraction containing lectin activity was applied to  
338 the asialofetuin (ASF)-sepharose affinity column, previously equilibrated in buffer A, at a flow  
339 rate of 0.25 mL/min. The column was washed with buffer A until the  $A_{280}$  of the eluate was  
340 lower than 0.05, then Gal-1 was eluted with buffer B. The ASF-sepharose was synthesized in our  
341 laboratory as previously described by Plá et al. (2003).<sup>29</sup>

#### 342 *4.11. Hemagglutination assay (HAG)*

343 Galectin-1 activity was determined by the HAG assay using rabbit red cells and estimated by the  
344 twofold serial dilution assay, as previously reported by Franco Fraguas et al. (2003).<sup>30</sup>  
345 Erythrocytes were prepared from fresh blood collected in heparin and washed four times with  
346 sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.4, containing 0.15 M NaCl (PBS buffer) by centrifugation  
347 during 3 minutes at 1500 g. Glutaraldehyde-fixed and trypsin-treated red cells were prepared as  
348 described by Nowak et al. (9)<sup>31</sup> and diluted to give a 4 % suspension in PBS. In the experiment,  
349 25  $\mu$ l NaCl 0.15M, 25  $\mu$ l 1% BSA in 0.15 M NaCl, 25 $\mu$ l Gal-1 and 25  $\mu$ l 4% suspension of the  
350 glutaraldehyde-fixed and trypsin-treated rabbit red cells were homogenized and incubated in a  
351 U-shaped microtiter plate at room temperature during 30 minutes.

#### 352 *4.12. HAG inhibition assay*

353 The ability of the synthesized galactosides to interact with Galectin-1 was determined by the  
354 HAG inhibition assay. The lectin dilution used for the end point was the highest dilution able to  
355 cause 50% HAG (dilution before to the last able to cause visible HAG) defined as HAG<sub>50%</sub>.<sup>30</sup>  
356 The minimum inhibitory concentration (MIC) of the galactosides that inhibits the HAG<sub>50%</sub> was  
357 determined by using a serial two-fold dilution of the 100 mM galactosides in the HAG inhibition  
358 assay. Relative inhibitory power (RIP) was defined as the ratio between the galactose MIC and  
359 the galactoside MIC.

360

#### 361 **Acknowledgments**

362 This work was supported by Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA),  
363 Project I+D 408 (CSIC, UdelaR) and Agencia Nacional de Investigación e innovación (ANII,  
364 M.Sci. fellowship POS\_2011\_1\_3311). Authors thank to Dra. Rosario Durán (Institut Pasteur  
365 Montevideo, Uruguay) for performing MS analyses.

## 366 References

- 367 1- Ito, K.; Stannard, K.; Gabutero, E.; Clark, A.M.; Neo, S-Y.; Onturk, S.; Blanchard, H.; Ralph, S.J.  
368 *Cancer Metastasis Rev*, **2012**, 31, 763-778.
- 369 2- Sunasee, R.; Narain, R. *Macromol Biosci*, **2013**, 13, 9-27.
- 370 3- Ogiso, M.; Kobayashi, J.; Imai, T.; Matsuoka, K.; Itoh, M.; Imamura, T.; Okada, T.; Miura, H.;  
371 Nishiyama, T.; Hatanaka, K.; Minoura N. *Biosens Bioelectron*, **2013**, 41, 465-470.
- 372 4- Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. S-Type Lectins (Galectins). In  
373 *Essentials of Glicobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1999; pp 417–427.
- 374 5- Rabinovich, G.A. *Br J Cancer*, **2005**, 92, 1188-1192.
- 375 6- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., Kiss, R. *Glycobiology*, **2006**, 16, 137R-157R.
- 376 7- Boscher, C., Dennis, J.W., Nabi, I.R. *Curr Opin Cell Biol*, **2011**, 23, 383-392.
- 377 8- Hasan, S. S.; Ashraf, G. M.; Banu, N. *Cancer Lett.* **2007**, 253, 25–33.
- 378 9- Guiguère, D.; Bonin, M-A.; Cloutier, P.; Patnam, R.; St-Pierre, C.; Sato, S.; Roy, R. *Bioorg Med*  
379 *Chem*, **2008**, 16, 7811-7823.
- 380 10- Ingrassia, L.; Camby, I.; Lefranc, F.; Mathieu, V.; Nshimyumukiza, P.; Darro, F.; Kiss, R. *Curr. Med*  
381 *Chem*, **2006**, 13, 3513–3527.
- 382 11- Guiguère, D.; Sato, S.; St-Pierre, C.; Sirois, S.; Roy, R. *Bioorg Med Chem Lett*, **2006**, 16, 1668-1672.
- 383 12- Ichikawa, Y.; Look, G.C.; Wong, C.H. *Anal. Biochem.*, **1992**, 202, 215-238.
- 384 13- Van Rantwijk, F.; Woudenberg-van Oosterom, M.; Sheldon, R.A. *J Molec Catal B:Enzym*, **1999**, 6,  
385 511-532.
- 386 14- Bojarová, P.; Kren, V. *Trends Biotechnol*, **2008**, 27, 199–209.
- 387 15- Jansson, P.E.; Kenne, L. *Carbohydr Res*, **1989**, 188,169-191.
- 388 16- Agrawal, P. K., *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3307-3330.
- 389 17- Domon, B.; E Costello, C. *Glycoconjugate*, **1988**, 5, 397-409.
- 390 18- McLafferty, F.W. In: *Interpretation of mass spectra*. 3<sup>rd</sup> ed. Turro, N. Ed; University Science  
391 Books. California, USA, 1980, p 221.
- 392 19- Hofmeister, G.E.; Zhou, Z.; Leary, J. *J Am Chem Soc*, **1991**, 113, 5964-5970.
- 393 20- Matamoros Fernández, L.; Obel, N.; Vibe-Scheller, H.; Roepstorff, P. *Carbohydr Res*, **2004**, 339;  
394 655-664.
- 395 21- Irazoqui, G.; Giacomini, C.; Batista-Viera, F.; Brena, B.M.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Jimeno,  
396 M.L. *J Agric Food Chem*, **2009**, 57, 11302-11307.
- 397 22- Woudenberg-van Oosterom, M.; van Belle, H.J.A.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R.A. *J Mol Catal A:*  
398 *Chem*, **1998**, 134, 267-274.
- 399 23- Porciúncula González C.; Castilla, A.; Garófalo, L.; Soule, S.; Irazoqui, G.; Giacomini, C. *Carbohydr*  
400 *Res*, **2013**, 368, 104–110.
- 401 24- Giacomini, C.; Villarino, A.; Franco-Fraguas, L.; Batista-Viera, F. *J Mol Catal B: Enzym*, **1998**, 4,  
402 313–327.
- 403 25- Smith, P.K.; Khron, R.I.; Hermanson, G.F.; Mallia, A.K. Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto,  
404 E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. *Anal Biochem*, **1985**, 150, 76-85.
- 405 26- Garófalo, L.; Vázquez, D.; Ferreira, F; Soule, S. *Ind Crops Prod*, **2011**, 34, 1327 - 1331.
- 406 27- Cornish-Bowden, A. Introduction of enzyme kinetics. In *Fundamentals of enzyme kinetics*,  
407 Cornish-Bowden, A., Ed; Portland Press: London, 1995; pp. 31-32.

- 408 28- Ahmed, N.; Fink, J.; Pohl; Vasta, G. *J Biochem*, **1996**, 120, 1007-1019.  
409 29- Plá, A.; Alonso, E.; Batista-Viera, F.; Franco Fraguas, L. *Braz J Med Biol Res*, **2003**, 36, 851-860.  
410 30- Franco Fraguas, L.; Batista-Viera, F.; Carlsson, J. *Braz J Med Biol Res*, **2003**, 36, 447-457.  
411 31- Nowak, T.P.; Haywood, P.L.; Barondes, S.H. *Biochem Biophys Res Commun*, **1976**, 68: 650-657.

412  
413  
414  
415

416 **Figures captions:**

417

418 **Scheme 1.** Transglycosylation mechanism for  $\beta$ -galactosidase using lactose as galactosyl donor  
419 and 3-amino-1-propanol as acceptor

420

421 **Figure 1. Time course reaction using 3-amino-1-propanol 500 mM, lactose 347 mM, 6U/mL**  
422 **at 50°C and pH 5.5.**

423 **A) Lines:** 1- lactose standard (50 mM), 2- 0h, 3- 0.25h, 4- 0.5h, 5- 1h, 6- 2h, 7- 3h, 8- 4h, 9- 5h,  
424 10- 24h, 11- glucose standard (50 mM), 12- galactose standard (50 mM). Orcinol was used as  
425 developer.

426 **B) Lines:** 1- 2h time reaction, 2- lactose standard (50 mM), 3- glucose standard (50 mM), 4-  
427 galactose standard (50 mM); lines 1 to 4 developed with orcinol. **Line 5-** 2h time reaction  
428 developed with ninhydrin

429

430 **Figure 2. Time course reactions using different lactose concentrations, 6 U/mL at 50°C, pH**  
431 **5.5, in absence of 3-amino-1-propanol**

432 **A) Lactose 347 mM, Lines:** 1- lactose standard (50 mM), 2- 2 hs of reaction synthesis with 500  
433 mM 3-amino-1-propanol (as control), 3- 0h, 4- 0.25h, 5- 0.5h, 6- 1h, 7- 2h, 8- 3h, 9- 4h, 10- 24h,  
434 11- glucose standard (50 mM), 12- galactose standard (50 mM)

435 **B) Lactose 200 mM: Lines:** 1- 0h, 2- 0.25h, 3- 0.5h, 4- 1h, 5- 24h.

436 **C) Lactose 100mM: Lines:** 1- 0h, 2- 0.25h, 3- 0.5h, 4- 1h, 5- 24h.

437

438 **Figure 3. Time course reaction using lactose 200 mM, 6U/mL at 50°C and pH 5.5, and**  
439 **different 3-amino-1-propanol concentrations:**

440 **A) 3-amino-1-propanol 500 mM; Lines:** 1 - lactose standard (50 mM), 2 - 0h, 3 - 0.25h, 4 -  
441 0.5h, 5 - 1h, 6 - 24h, 7 - 3h, 8 - 4h, 9 - 5h, 10 - 24h, 11 - glucose standard (50 mM), 12 -  
442 galactose standard (50 mM)

443 **B) 3-amino-1-propanol 100 mM; Lines:** 1 - 0 h; 2 - 0.5 h; 3 - 1 h; 4 - 3 h; 5 - 24 h.

444 **C) 3-amino-1-propanol 250 mM; Lines:** 1 - 0.5 h; 2 - 1 h; 3 - 3 h; 4 - 24 h.

445

446 **Figure 4. Thin layer chromatography of purified compound 1 and 2.**

447 **A) Lines:** 1- Purified compound 2; 2- glucose standard (50 mM); 3- galactose standard (50 mM);  
448 4- lactose standard (50 mM); 5- 2 hs of reaction synthesis with 347 mM lactose, 500 mM 3-  
449 amino-1-propanol, 50°C, 6U/mL; 6- purified compound 1. All lines developed with orcinol.

450 **B) Lines:** 7- purified compound 1 developed with ninhydrin.

451

452 **Figure 5. 3- aminopropyl- $\beta$ -1-D-galactopyranoside MS-Analysis**

453 **A) Ion  $m/z$  =238 MS/MS Spectrum; B) Ion  $m/z$  = 260 MS/MS Spectrum**

454

455 **Figure 6.  $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1-4)- $\alpha$ -D-glucose MS-Analysis.**

456 **A) Compound 2 MS; B) Compound 2 Ion  $m/z$  = 527 MS/MS**

457

458 **Table 1.- <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Chemical Shift Values of Compound 1**

459

460

Galactose							3-amino-1-Propanol		
1'	2'	3'	4'	5'	6'	6''	1	2	3
4.32 d	3.42 dd	3.60 dd	3.83 d	3.58 d	3.72	3.95 m	3.63 t	1.90 m	3.07 t
(8.0) <sup>a</sup>	(8.0, 8.0) <sup>a</sup>	(3.2, 3.6) <sup>a</sup>	(3.2) <sup>a</sup>						
102.80	70.71	72.67	68.59	75.17	67.81		60.98	26.64	37.64

461 Multiplicity: d-doublet; dd- double doublet; t-triplet; m-multiplet

462 <sup>a</sup> J(Hz) in brackets

463

464 **Table 2.** Galectin-1 inhibitory properties of compounds 1 and 2  
465

Compound	MIC (mM)	RIP
Galactose	50.0	1
Lactose	3.1	16
1	25.0	2
2	6.3	8

466  
467 **MIC**: Minimal inhibition concentration, defined as the minimal inhibitor concentration that cause hemagglutination  
468 inhibition, **RIP**: Relative inhibitor, defined as the quotient between Galactose MIC and compound MIC.

**Figure 1**

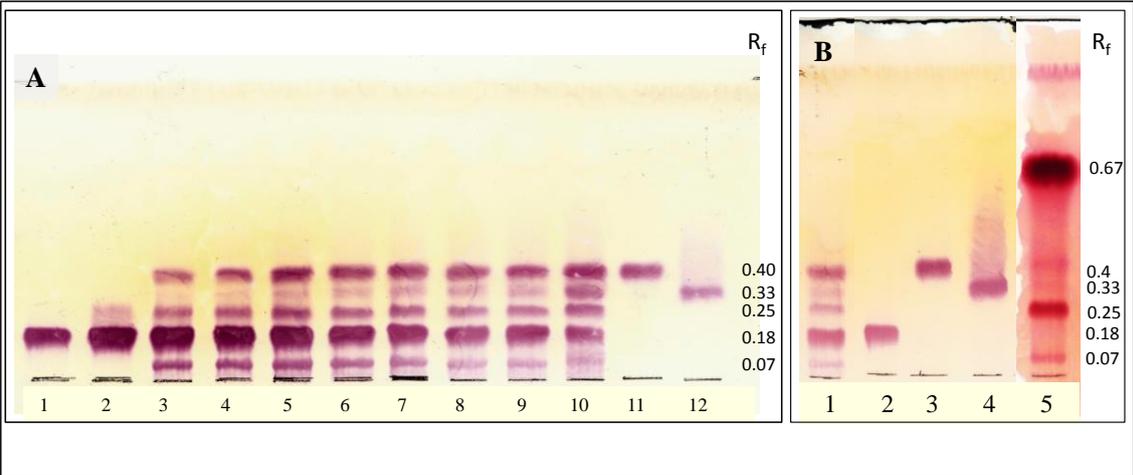
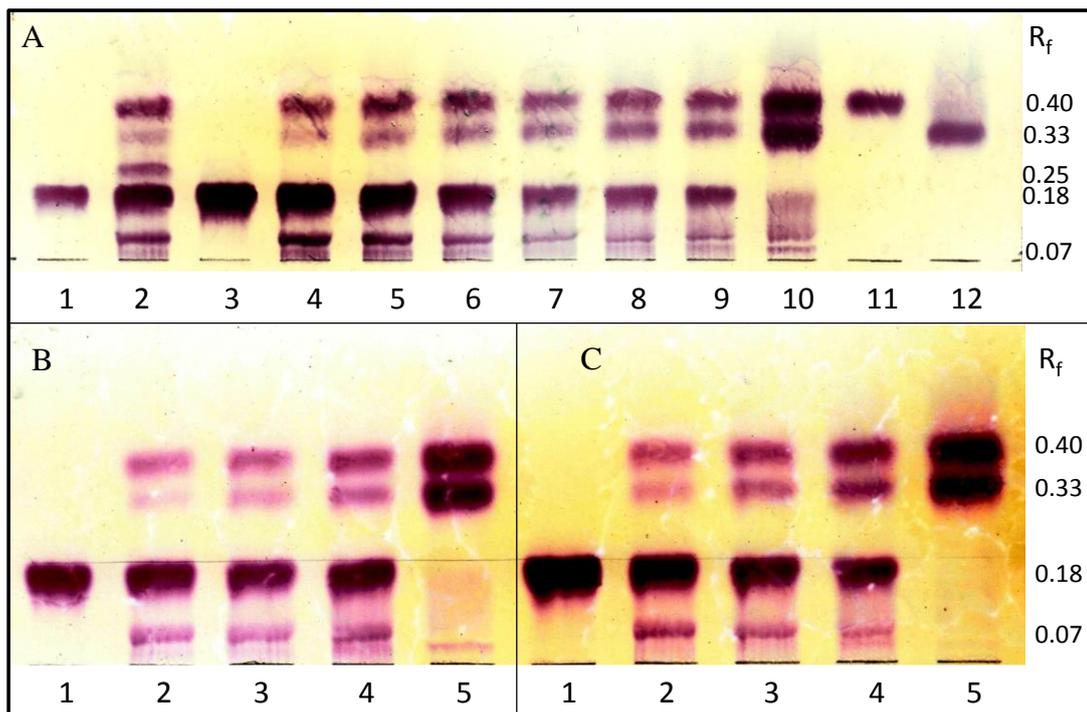


Figure 2



**Figure 3**

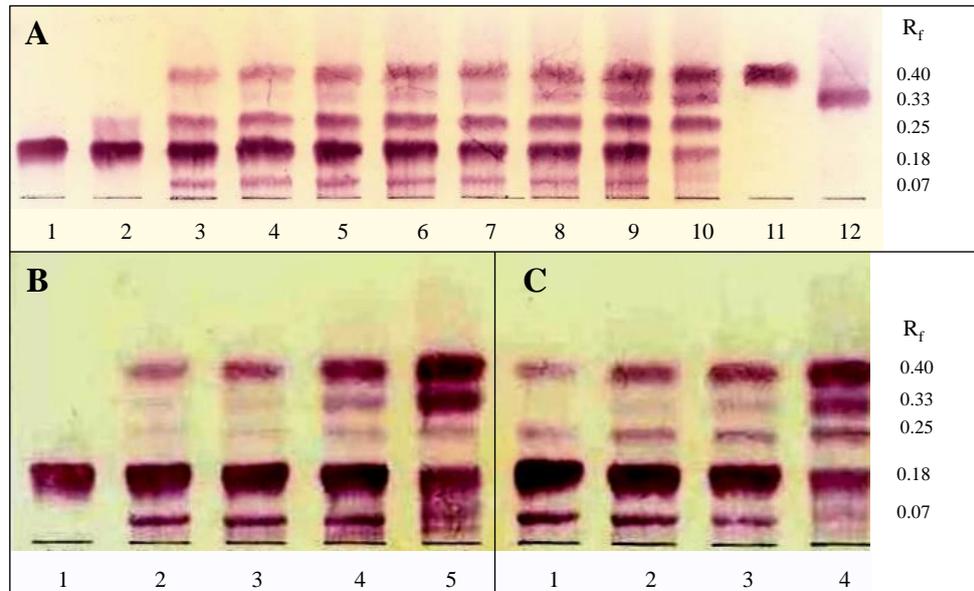


Figure 4

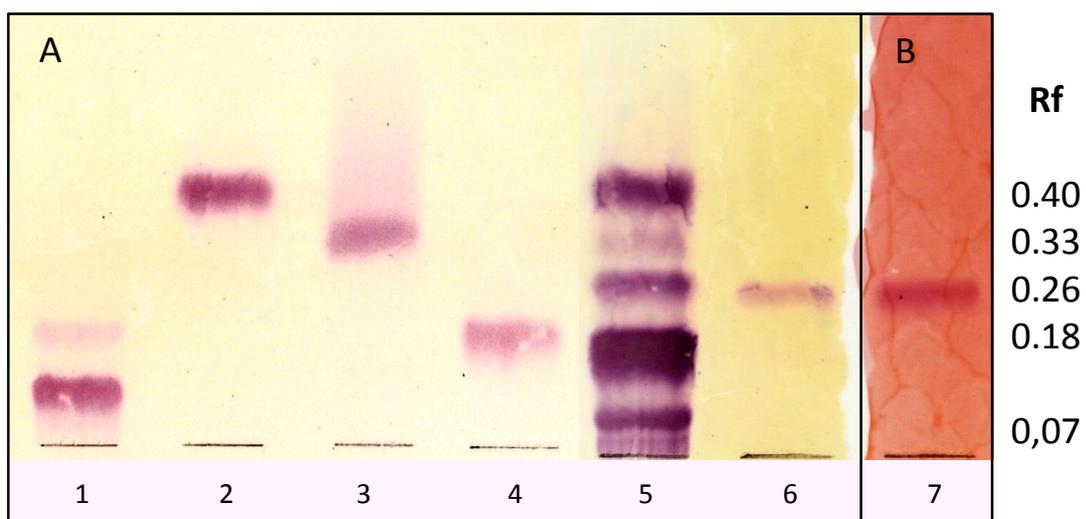


Figure 5

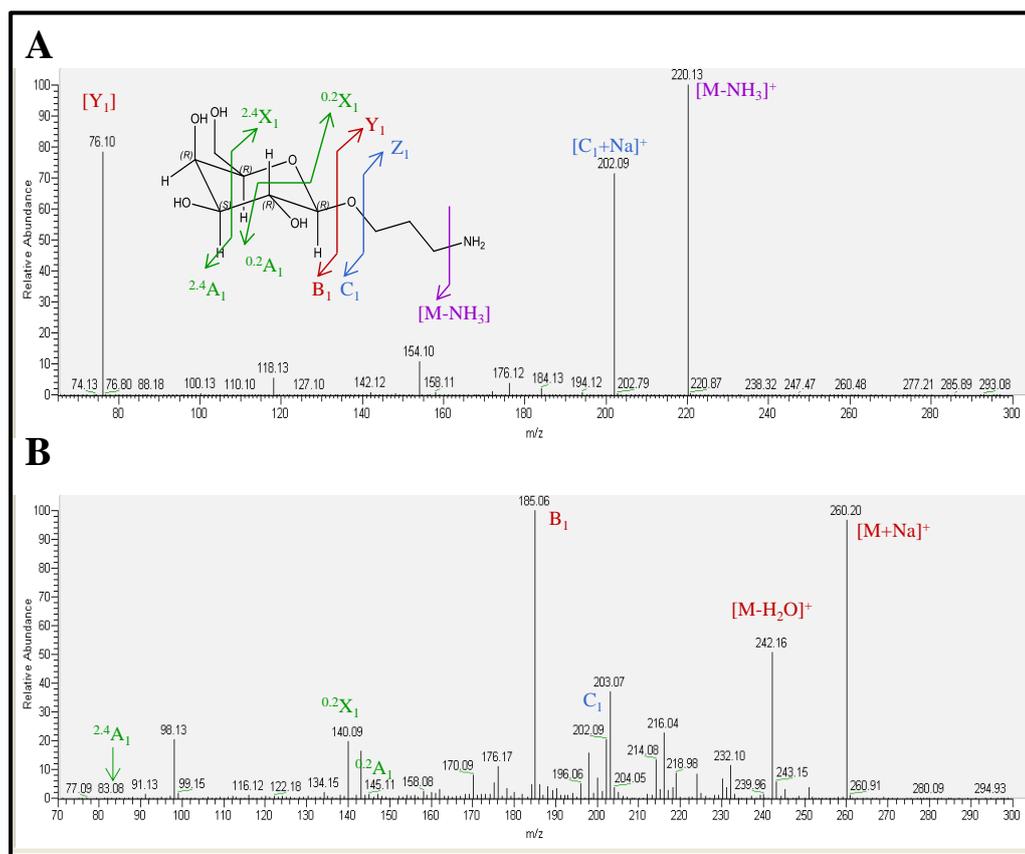
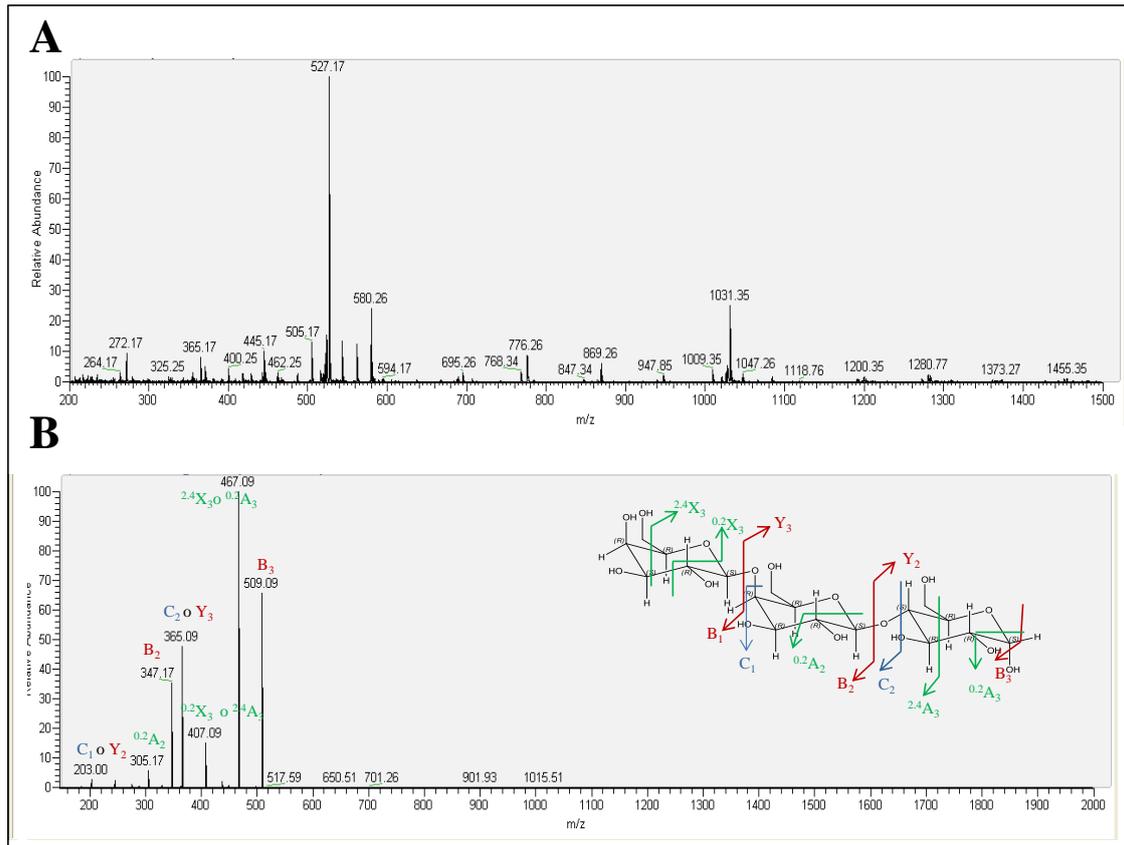


Figure 6



Scheme 1

