

Tesis Doctoral

Síntesis y evaluación de sustratos e inhibidores de trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*, agente del mal de Chagas

Giorgi, María Eugenia

2012-12-21

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Giorgi, María Eugenia. (2012-12-21). Síntesis y evaluación de sustratos e inhibidores de trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*, agente del mal de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Giorgi, María Eugenia. "Síntesis y evaluación de sustratos e inhibidores de trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*, agente del mal de Chagas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-12-21.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica

Síntesis y evaluación de sustratos e inhibidores de trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*, agente del mal de Chagas.

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Área Química Orgánica

María Eugenia Giorgi

Directora de Tesis

Dra. Rosa Muchnik de Lederkremer

Consejera de estudios

Dra. Rosa Muchnik de Lederkremer

Lugar de trabajo

**Departamento de Química Orgánica
CIHIDECAR-CONICET**

Buenos Aires, Noviembre de 2012.

A mis padres,
todo lo que soy se lo debo a ellos.

A Cristian,
mi faro en la ciudad.

A la Dra. Rosa M. de Lederkremer,
Por haberme dado la oportunidad de
realizar esta Tesis. Por guiarme,
enseñarme y apoyarme en todo
momento, tanto a nivel científico
como humano.

Quiero agradecer además a:

A mis hermanas, tíos y abuelas, por su amor y apoyo incondicional.

A Cristian, por sus consejos, ayuda técnica, soporte cotidiano, apoyo psicológico, y varios etc.

A mis amigas crónicas, Natalia, Eleonora, Malisa, María y Julia, por estar en todo momento y ser “la familia” que uno elige.

A mis compañeros del Labo 6, Rosalía Agusti y Carlos Lima, mezcla de hermanos, padres y amigos.

A Verónica Mendoza, Mercedes Perez-Recalde y Karina Mariño, por su amistad y charlas filosóficas.

A Luciana Baldoni, Melisa Lamanna, Olga Tarzi, Verónica Manzano, Diego Navarro, Fernando Durán, por la buena onda.

A los compañeros de Laboratorio: Dra. Carla Marino, Dra Carola Gallo-Rodriguez, Gustavo Kashiwagi, Mariano Tilve, Gabriel Gola, Andrea Bordoni, Lucía Gandolfi, por hacerme grata la tarea cotidiana.

A Carina Peña, por su cariño y su colaboración en la síntesis del compuesto **99**.

A Laura Ratier y Dr. Alberto Frasch, por proporcionar gentilmente la enzima y por los trabajos en colaboración que hemos realizado.

A Dra. Norma D' Accorso y Melisa Lamanna, por su ayuda y asesoramiento para las pruebas de SEC.

A Dra. Cristina Matulewicz, por su cariño y buena onda.

A Juana Inés Maggi de Donadío y Lucía Gandolfi-Donadío por donar gentilmente el calostro bovino.

A Laboratorios ELEA SACIFyA, por donarme gentilmente el oseltamivir.

Al Dr. Ola Blixt y Dr. James Paulson de Carbohydrate Synthesis/Protein Expression Core of The Consortium for Functional Glycomics (USA) por donar gentilmente los oligosacáridos conteniendo ácido *N*-glicolilneuramínico.

A todo el plantel docente del Departamento de Química Orgánica.

A todo el personal no docente del mismo, en particular María del Carmen, Sergio, Nancy, Mabel, Hernan y Diego Quintana, por su amabilidad y ayuda.

A ANPCyT, por la beca otorgada durante mis tres primeros años.

A CONICET, por la beca otorgada para finalizar la tesis.

Síntesis y evaluación de sustratos e inhibidores de trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi*, agente del mal de Chagas.

La trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* (TcTS) cataliza la transferencia de ácido siálico desde los glicoconjugados del hospedero a β -galactopiranosidos terminales en las mucinas del parásito. Esta enzima no tiene equivalentes en mamífero y durante la infección se secreta activamente induciendo alteraciones hematológicas. Se había demostrado que en cepas menos infectivas las cadenas O-glicosídicas de las mucinas contenían β -galactofuranosa además del aceptor β -galactopiranososa.

El propósito de esta tesis es contribuir al conocimiento de la acción de la TcTS sobre sustratos aceptores o donores de ácido siálico y la síntesis y evaluación de inhibidores de la enzima.

Se estudiaron las propiedadesceptoras de los oligosacáridos sintéticos que son componentes de las mucinas para correlacionar su estructura con la habilidad de actuar como sustratos. Se calcularon los valores de K_m para los azúcares libres, los oligosacáridos alditoles y los bencil glicósidos. Todos los compuestos resultaron buenos aceptores de ácido siálico, o sea que la galactofuranosa no afectaría la sialilación de las unidades de Galp presentes en los mismos oligosacáridos. Se llevó a cabo la sialilación preparativa del bencil glicósido del hexasacárido β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galf(1 \rightarrow 2)- β -D-Galf(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc utilizando una enzima recombinante y sialilactosa como donador. El aislamiento del producto sialilado permitió determinar por espectros RMN mono y bidimensionales que el ácido siálico se incorpora selectivamente a la Galp terminal unida (β 1 \rightarrow 3).

Con respecto a sustratos donores en la reacción de TcTS se determinó su capacidad de transferir N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) desde oligosacáridos sintéticos a lactosa y análogos con igual o mejor eficiencia que el ácido siálico común (Neu5Ac).

Por otra parte, con el fin de aumentar la vida media en la circulación sanguínea de inhibidores de la reacción de trans-sialilación, se sintetizaron conjugados con polietilenglicol (PEG), en particular derivados con PEG de 8-brazos de análogos de lactosa. La multivalencia se confirmó por RMN y se evaluó la biodisponibilidad de los conjugados en plasma de ratones. Se encontró que la misma mejoró considerablemente con respecto a conjugados lineales que también fueron sintetizados en este trabajo de tesis.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, trans-sialidasa, mucinas, inhibidores, PEGilación.

The trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* (TcTS) catalyzes the transfer of sialic acid from host glycoconjugates to terminal β -galactopyranosides in the mucins of the parasite. The enzyme has no equivalent in mammals and during infection is actively shed to the medium inducing hematological alterations. In less infective strains, the O-linked chains may contain β -galactofuranose in addition to the acceptor β -galactopyranose units.

This Tesis is a contribution to the knowledge of the action of TcTS on acceptor and donor substrates. Also, inhibitors have been synthesized and evaluated.

The acceptor properties of the chemically synthesized oligosaccharides, components of the mucins, were now studied in order to correlate their structure with the ability to act as substrates. The K_m values were calculated for the free sugars, the sugar alditols and the benzyl glycosides. All the compounds showed to be good acceptors of sialic acid. Thus, the introduction of galactofuranose in the mucins would not affect sialylation of the Galp units in the same oligosaccharides. Preparative sialylation of the benzyl glycoside of the hexasaccharide β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)-[β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)]- β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Galf(1 \rightarrow 2)]- β -D-Galf(1 \rightarrow 4)]-D-GlcNAc, with a recombinant TcTS and sialyllactose as donor afforded the sialylated oligosaccharide. NMR spectroscopic analysis showed that selective monosialylation occurred at the terminal (β 1 \rightarrow 3) linked Galp.

With respect to donors in the TcTS reaction it was shown that *N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) may be transferred even better than the common sialic acid (Neu5Ac) from synthetic oligosaccharides to lactose or analogs.

Also, with the aim to improve the circulating half-lives *in vivo* of inhibitors of TcTS, we synthesized covalent conjugates of polyethyleneglycol (PEG), in particular eight arm-PEG of lactose analogs. Substitution of all arms was proven by ^1H NMR spectroscopy. The bioavailability of the conjugates in mice plasma was considerably improved with respect to the linear PEG conjugates which were also synthesized in this Tesis.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Trans-sialidase, mucins, inhibitors, PEGylation.

Abreviaturas

Ac	acetilo
AcOH	ácido acético
Anh.	anhidro
Bn	bencilo
BnOH	alcohol bencílico
BSA	albúmina de suero bovino
Bz	benzoílo
ccd	cromatografía en capa delgada
COSY	espectro de correlación homonuclear H-H
CTP	citidina trifosfato
δ	desplazamiento químico
DANA	ácido 2,3-dehidro-3-desoxi- <i>N</i> -acetilneuramínico
DHO	agua deuterada
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DTU	unidades discretas de tipificación
ESI -TOF	ionización por electrospray-tiempo de vuelo
EtOH	etanol
Gal f	galactofuranosa
Gal p	galactopiranososa
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	hora/s
HSQC	correlación heteronuclear mediada por coherencias de simples cuantos
HPAEC-PAD	cromatografía de intercambio aniónico de alta presión con detección por pulso amperométrico
Hz	Hertz
IBCF	isobutil cloroformiato
IPD	índice de polidispersidad
J	constante de acoplamiento spin-spin
LNAc	<i>N</i> -acetilactosamina
Lol	lactitol

L	lactosa
MALDI	desorción/ionización por laser asistida por matriz
MeOH	metanol
MHz	megahertz
M_n	peso molecular numérico
M_p	peso molecular del pico principal
M_w	peso molecular másico
MU	metilumbeliferil
m/z	relación masa/carga
NaOMe	metóxido de sodio
Neu5Ac	ácido siálico; ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
Neu5Ac2en	ver DANA
Neu5Gc	ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
n-BuOH	<i>n</i> -butanol
n-PrOH	<i>n</i> -propanol
PBS	buffer fosfato salino
PEG	polietilenglicol
pf	punto de fusión
PI-PLC	fosfatidilinositol fosfolipasa C
<i>p</i> NP	para nitrofenil
ppm	partes por millón
<i>R_f</i>	relación de frente
RMN	resonancia magnética nuclear
SAPA	shed acute phase antigen (antígeno liberado en fase aguda)
SEC	cromatografía de exclusión por tamaño
SL	sialillactosa
SLNAc	sialil <i>N</i> -acetillactosamina
TcGALE	genes de <i>T. cruzi</i> que codifican para UDP-glucose-4'-epimerasa
TcTS	trans-sialidasa de <i>T. cruzi</i>
TEA	triethylamino
TcMUC	genes que codifican para mucinas de <i>T. cruzi</i>
TFA	ácido trifluoroacético
TrSA	sialidasa de <i>Trypanosoma Rangeli</i>
THF	tetrahidrofurano
TOCSY	espectro de correlación homonuclear total

tr	tiempo de retención
UDP	uridina 5'-difosfato
UV	ultravioleta

ÍNDICE

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

<i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
Mucinas: Glicoconjugados de superficie de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Estructuras glicosídicas en mucinas del <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Sialidasas, sialiltransferasas y trans-sialidasas.....	10
Trans-sialidasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcTS).....	11
Estructura proteica y mecanismo de reacción.....	14
Especificidad de donores y aceptores de la trans-sialidasa de TcTS.....	18
I. Donores naturales.....	18
II. Donores no naturales.....	19
III. Donores de ácido siálico modificados.....	22
Inhibidores de TcTS.....	24
I. Compuestos estudiados como inhibidores del sitio específico del ácido siálico.....	24
II. Derivados de lactosa como inhibidores competitivos de la TcTS.....	26

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DE SUSTRATOS EN LA REACCIÓN DE TRANS-SIALIDACIÓN

Evaluación de sustratos en la reacción de trans-sialidación.....	27
Purificación de 3'sialillactosa de calostro bovino.....	27
Sialilación de oligosacáridos sintéticos de mucinas: cinética de reacción y de inhibición de la trans-sialidación.....	29
Separación de los oligosacáridos alditoles de mucinas de <i>T. cruzi</i> por HPAEC-PAD.....	29
Estudio del comportamiento de los oligosacáridos sintéticos cómo aceptores de ácido siálico en la reacción de trans-sialidasa.....	30

Estudios del comportamiento de los oligosacáridos sintéticos como inhibidores de la sialilación de <i>N</i> -acetillactosamina en la reacción de la trans-sialidasa.	37
Trans-sialilación de bencil β-D-galactopiranosil-(1→2)-[β-D-galactopiranosil-(1→3)]-β-D-galactopiranosil-(1→6)-[β-D-galactofuranosil-(1→2)-β-D-galactofuranosil-(1→4)]-2-acetamido-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (42 Bn) y caracterización del producto obtenido.....	37
Análisis del bencil β-D-galactopiranosil-(1→2)-[β-D-galactopiranosil-(1→3)]-β-D-galactopiranosil-(1→6)-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-β-D-galactofuranosil-(1→4)]-2-acetamido-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (43 Bn) y β-D-galactopiranosil-(1→2)-[β-D-galactopiranosil-(1→3)]-β-D-galactopiranosil-(1→6)-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-β-D-galactofuranosil(1→4)]-2-acetamido-2-desoxi-α-D-glucitol (43 ol) como aceptores de ácido siálico en la reacción catalizada por TcTS.	42
Estudio de la transferencia de <i>N</i> -glicolilneuramínico (Neu5Gc) desde oligosacáridos hacia sustratos aceptores, mediada por TcTS.....	48
Estudio de la transferencia competitiva de Neu5Gc respecto de Neu5Ac mediada por TcTS.....	52
Discusión.....	53

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE DE DERIVADOS PEGilados

Derivados de polietilenglicol (PEG) y su evaluación.....	57
Síntesis de bencil β-D-galactopiranosil-(1→6)-2-amino-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (59).....	67
Conjugación de análogos de lactosa con PEGs lineales.....	72
I. PEGilación del bencil β-D-galactopiranosil-(1→6)-2-amino-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (59).....	73
II. PEGilación de lactobiono 1,5-lactona.....	78
III. PEGilación de la lactosa.....	83
Conjugación de análogos de lactosa con PEGs multibrazos.....	86
I. PEGilación del bencil β-D-galactopiranosil-(1→6)-2-amino-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (59).....	87
II. PEGilación de lactobiono 1,5-lactona.....	92
Inhibición de la sialilación de <i>N</i> -acetillactosamina por acción de los PEG-conjugados.....	97

Prueba de estabilidad en sangre.....	100
Conclusiones.....	102

CAPÍTULO 4

SUSTRATOS BIFUNCIONALES COMO INHIBIDORES POTENCIALES PARA TcTS.

Sustratos bifuncionales.....	103
Síntesis de los sustratos bifuncionales.....	108
Síntesis de (3R, 4R, 5S) Etil 4-acetamido- <i>N</i> -(1'-desoxilactitol-1'-il)-5-amino-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxilato (92).....	110
Síntesis de ácido (3R, 4R, 5S) 4-acetamido- <i>N</i> -(1'-desoxilactitol-1'-il)-5-amino-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxílico (93).....	113
Síntesis de (3R, 4R, 5S) Etil 4-acetamido-5-lactobionamida-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxilato (94).....	115
Síntesis de ácido (3R, 4R, 5S) 4-acetamido-5-lactobionamida-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxílico (95 y 96).....	117
Obtención del ácido ω -lactobionamidohexanoico (97).....	119
Conjugación de ácido ω - lactobionamidohexanoico con oseltamivir	122
Conjugación de lactobiono1,5-lactona con el dipéptido AlaTyr	125
Análisis de los sustratos bifuncionales como inhibidores de TcTS.....	127

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 5

Instrumental y métodos generales.....	131
Purificación de solventes.....	134
Materiales.....	135
Reactivos para trans-sialidaciones.....	135
Reactivos para PEGilación.....	135

Obtención de 3'sialillactosa (3'SL).....	136
Glicosidaciones.....	136
Ensayos de cinética enzimática.....	137
Inhibición de la sialilación de la <i>N</i> -acetillactosamina.....	137
Ensayos de cinética enzimática utilizando Neu5Gc-disacáridos como donores de ácido <i>N</i> -glicolilneuramínico.....	138
Transferencia competitiva de Neu5Gc respecto de Neu5Ac mediada por TcTS.....	138
Bencil 5- <i>N</i> -acetil- α -neuraminil-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[β -D-galacto-furanosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopiranosido (42 Bn).....	139
Síntesis de bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (59).....	140
Conjugados con PEG lineales.....	144
Conjugación con PEG multibrazos.....	149
Ensayos de estabilidad de los PEG-conjugados en sangre y orina.....	152
Estudios de actividad para TcTS <i>in vitro</i>	153
Síntesis de sustratos bifuncionales.....	154
RESUMEN	163
BIBLIOGRAFÍA	171

Capítulo 1

Introducción

Trypanosoma cruzi.

El *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, trypanosomiasis americana, la cual es transmitida a animales, incluyendo humanos, por medio de insectos vectores de la familia *Reduviidae* (Brenner, 1973; Moncayo, 2003), siendo la vinchuca (*Triatoma infestans*) (**Figura 1-1**) el principal transmisor en Argentina.



Figura 1-1. Vinchuca (*triatoma infestans*), principal transmisor del mal de Chagas en la Argentina.

El mal de Chagas es una enfermedad endémica de Latinoamérica: entre 10 y 12 millones de personas se encuentran afectadas, y cerca de 15000 mueren por año (Clayton, 2010). El *T. cruzi* puede ser transmitido también por transfusión de sangre, por trasplantes de órganos y desde la madre al feto. Recientemente, la enfermedad se ha propagado debido a la inmigración hacia otros lugares tales como América del Norte, Europa, Australia y Japón (Coura y Vinas, 2010). En Europa, por ejemplo, se han descrito cerca de 80000 casos de pacientes que contienen el parásito.

Estos parásitos entran al cuerpo a través de lesiones en la piel, o por la membrana mucosa y en algunos casos la infección causa fiebre, hinchazón de los ganglios linfáticos y otras lesiones en otros tejidos y piel (Clayton, 2010). La enfermedad presenta diversas manifestaciones clínicas; usualmente una fase aguda inicial, en algunos casos asintomática, que se caracteriza por elevados niveles de parasitemia en el organismo, seguida de una fase crónica que puede permanecer indetectable por varios años, hasta que surgen complicaciones graves que pueden

conducir a insuficiencia cardíaca y dilatación del tracto digestivo (megacolon o megaesófago) y luego a la muerte temprana del individuo.

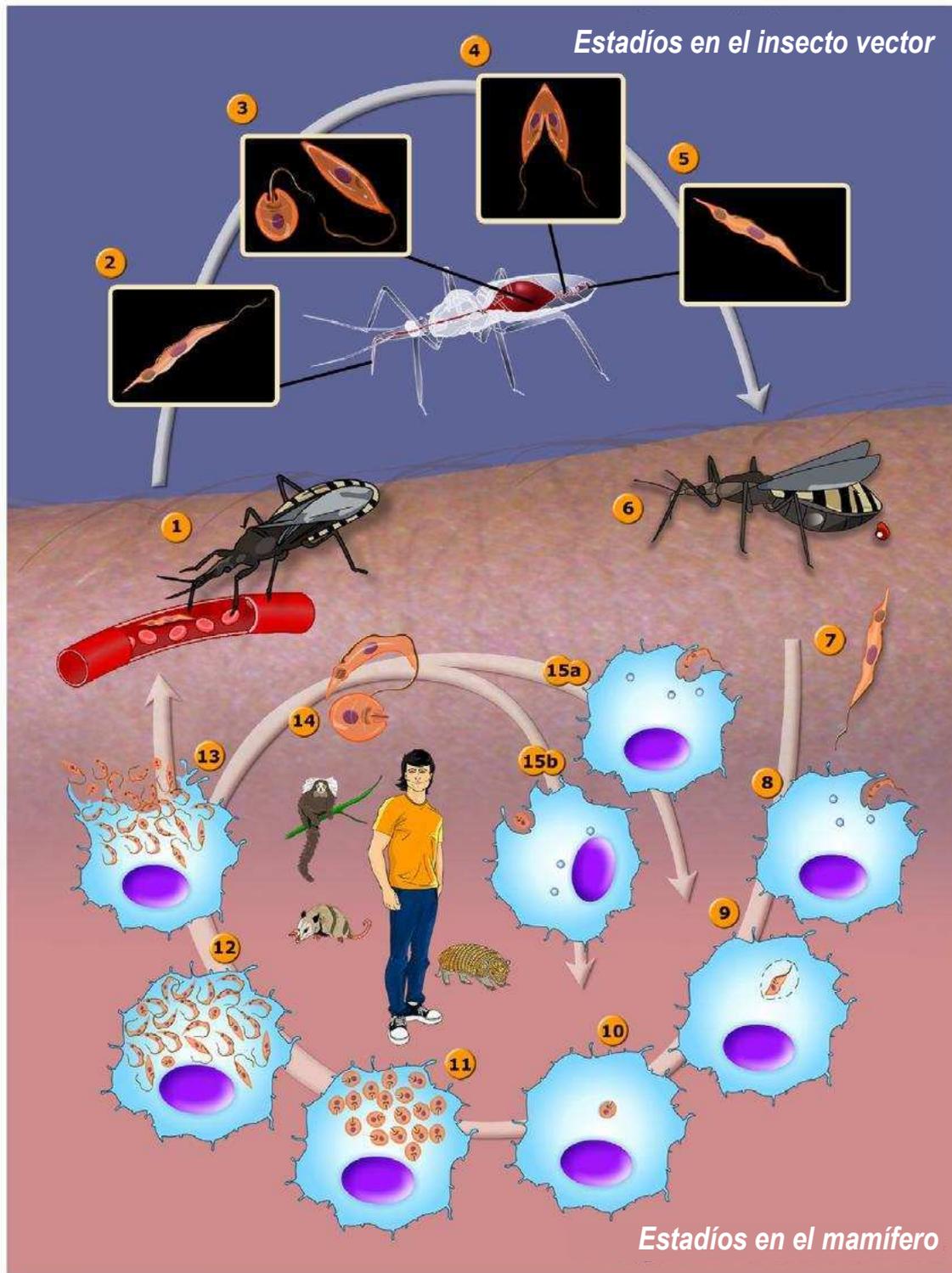
El diagnóstico de la enfermedad de Chagas es posible, incluida la fase silente, por los anticuerpos del suero y reacciones de PCR. A pesar de que ha sido realizada la secuenciación del genoma de *Trypanosoma cruzi*, que codificaría para 23000 proteínas (El-Sayed *et al.*, 2005), todavía no se han desarrollado vacunas o drogas efectivas para el control eficaz de la enfermedad. Las terapias actuales se basan en dos nitroheterociclos llamados nifurtimox y benznidazol, que presentan limitaciones que incluyen efectos secundarios y en algunos casos mutagénicos y el hecho de que son más efectivas en estadios tempranos de la enfermedad y no en la fase crónica. Además ciertas cepas de *T. cruzi* son resistentes al tratamiento (Urbina *et al.*, 2003; Viotti, *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2007). Estas drogas actúan de manera inespecífica a través de la formación de radicales libres altamente reactivos que reaccionan con oxígeno formando especies reactivas o por modificaciones covalentes de macromoléculas orgánicas las cuales explicarían algunos de los efectos tóxicos observados en mamíferos (Diaz-Urrutía *et al.*, 2012). Por todo esto se continúa la búsqueda e identificación de proteínas y metabolismos específicos que puedan actuar como blancos terapéuticos.

La diversidad biológica, bioquímica y genética de las cepas de *T. cruzi* llevaron en el año 1999 al reconocimiento de dos grupos mayoritarios, I y II (Anonymous, 1999). El primero denominado Linaje I, comprende las cepas cuyo ciclo de vida e infección ocurre entre vectores y mamíferos salvajes. Los parásitos incluidos en este grupo son menos infectivos que los que pertenecen al Linaje II, que afecta a insectos, humanos y animales domésticos. Recientemente, por consenso internacional, las cepas fueron reclasificadas en 6 unidades discretas de tipificación (DTU I-VI). Estas son definidas como conjuntos de poblaciones que están genéticamente más relacionados entre sí que a cualquier otra población y que son identificables por marcadores genéticos comunes, moleculares o inmunológicos (Zingales *et al.*, 2009). En general, las cepas incluídas en la primera clasificación en el Linaje I, se reclasificaron en 2009 como DTU I.

Ciclo de vida del Trypanosoma cruzi.

T. cruzi se diferencia durante su ciclo de vida desde el insecto hacia el humano, sobrellevando cambios químicos y morfológicos (**Figura 1-2**). Presenta cuatro estadios morfológicos principales: epimastigote y trypomastigote metacíclico, que se encuentran en el insecto vector, y trypomastigote sanguíneo y amastigote que se encuentran en el hospedero mamífero. El insecto vector pica al mamífero infectado e ingiere los trypomastigotes de la sangre (1) que ingresan al organismo del insecto (2). En el intestino medio los trypomastigotes se transforman en epimastigotes y algunos esferomastigotes (3) donde luego se replican (4) y se transforman en trypomastigotes metacíclicos no-proliferativos que pasan desde el intestino posterior hacia las heces (5). La transmisión del parásito no se produce por infección directa del vertebrado durante la picadura del insecto infectado, sino que cuando el insecto hematófago se alimenta, simultáneamente deposita heces conteniendo trypomastigotes infectivos (6). El rascado, reacción a la picadura, y la consecuente lesión en la piel, favorece el ingreso del parásito al hospedero. Este también puede ingresar por la membrana mucosa. El trypomastigote infectivo entra al hospedero vertebrado (7), e infecta las células (8) donde se diferencia en amastigote (9). El amastigote es liberado de la vacuola parasitófora (10). Luego de varios ciclos de división binaria (11), se vuelve a diferenciar nuevamente a trypomastigote (12). Esta forma no-replicativa es liberada al torrente sanguíneo por ruptura de la célula del hospedero (13). Los trypomastigotes y algunos amastigotes no transformados pueden infectar otras células (14, 15a y 15b), o ser ingeridas por el insecto vector cerrando el ciclo (1).

Los diferentes estadios de diferenciación de *T. cruzi*, además de diferir en su morfología celular, poseen diferentes estructuras moleculares en la superficie celular. Un denso glicocalix cubre la superficie del parásito y su composición es característica de cada estadio de diferenciación (de Lederkremer *et al.*, 2009).



Teixeira et al, 2012.

Figura 1-2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

Mucinas: Glicoconjugados de superficie de Trypanosoma cruzi.

El conocimiento de la biología de la superficie celular de *T. cruzi* contribuyó de manera significativa a la identificación de enzimas blanco, responsables de la biosíntesis de estas moléculas de superficie y al diseño y análisis de inhibidores específicos de las mismas. La mayoría de estos estudios estructurales se han desarrollado con la especie epimastigote que es fácil de replicar y cultivar. Los componentes mayoritarios son los glicoinositolfosfolípidos libres (GIPLs), junto con las mucinas que, al igual que otras proteínas de *T. cruzi*, se encuentran ancladas a la membrana superficial del parásito mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (de Lederkremer *et al.*, 2009; Previato *et al.*, 2004). Estas mucinas son ricas en Thr, Ser y Pro y se encuentran altamente glicosiladas (Pereira-Chioccola *et al.*, 2000; Schenkman *et al.*, 1993; Acosta-Serrano *et al.*, 2001). Los primeros en describirlas fueron Alves y Colli y las denominaron glicoproteínas A, B y C (Alves y Colli, 1975). Su localización sobre la superficie y la presencia de unidades de Galp en el glicano se demostró por marcación celular utilizando galactosa oxidasa-NaB³H₄ (Zingales *et al.*, 1982). Estas estructuras luego fueron encontradas en otros estadios del ciclo de vida del parásito (Campo *et al.*, 2006).

Estructuras glicosídicas en mucinas del Trypanosoma cruzi.

Es notable el repertorio de genes de mucinas de *T. cruzi* por su complejidad y versatilidad. Se sugiere que la variación del “core” del polipéptido de las mucinas expresadas en los diferentes estadios en el mamífero es uno de los mecanismos por los cuales *T. cruzi* evade la respuesta del sistema inmune (Buscaglia *et al.*, 2006). Tanto la forma epimastigote como trypomastigote infeccioso tienen aproximadamente el mismo número de moléculas de mucinas por área superficial (Pereira-Chioccola *et al.*, 2000), aunque sus estructuras dependen del estadio. Se han identificado dos grupos de mucinas en *T. cruzi*. Las glicoproteínas del primer grupo tienen una masa molecular que oscila entre 35-50 kDa y son expresadas en las formas del parásito en el insecto vector (epimastigote y trypomastigote metacíclico) (Schenkman *et al.*, 1993; Previato *et al.*, 1994). Las glicoproteínas del segundo grupo presentan un tamaño variable (80-200 kDa), y son expresadas en las formas de trypomastigote sanguíneo en el mamífero (Almeida *et al.*, 1994; Schenkman *et al.*, 1991). Las funciones esenciales de las glicoproteínas consisten en la adhesión del parásito al macrófago y protección de

la superficie celular (Acosta-Serrano *et al.*, 2001) y tienen la función crucial de ser aceptores de ácido siálico (SA) en la reacción catalizada por la enzima trans-sialidasa (TcTS), molécula necesaria por el parásito para construir un ambiente cargado negativamente que protege al trypomastigote de los anticuerpos anti- α -galactopiranosilo del hospedador. De hecho, la estructura α -Gal ρ es una unidad estructural característica que distingue a los carbohidratos del trypomastigote (Almeida *et al.*, 1994; Couto *et al.*, 1990).

Los oligosacáridos de las mucinas unidos *O*-glicosídicamente constituyen más del 60 % de la masa molecular. Se han observado variaciones en las estructuras de los carbohidratos dependiendo del estadio del parásito. También, se encontraron diferencias en los carbohidratos de las mucinas, entre distintas cepas de epimastigote (de Lederkremer *et al.*, 2009). Comparando los resultados estructurales obtenidos de las mucinas pertenecientes a cepas diferentes se sugirió que estas derivaban de dos “cores” o núcleos principales: D-Galf(β 1 \rightarrow 4)-GlcNAc o D-Galp(β 1 \rightarrow 4)-GlcNAc (**Figura 1-3**). Los “cores” de los dos tipos se encuentran ramificados con varias unidades de Galf y/o Galp.

Un hecho interesante es que aunque la galactosa es muy común en la naturaleza, en *T. cruzi*, dependiendo de la cepa, puede encontrarse en la configuración furanósica mientras que en mamíferos solo se presenta en la configuración piranósica. La galactofuranosa se describió primeramente en mucinas de parásitos de la cepa G del Linaje I, reclasificado en DTU I, menos infectivos (Acosta-Serrano *et al.*, 1995; Previato *et al.*, 1994), luego se encontró en las cepas Dm 28c (Agrellos *et al.*, 2003) y Colombiana, (Todeschini *et al.*, 2009) pertenecientes al mismo grupo. En parásitos de las cepas Y del Linaje II, reclasificado en DTU II, más infectivas, la galactosa solo se encuentra en su forma piranosa (Previato *et al.*, 1995). También solo se encontró Galp en las mucinas de las cepas CL14 y CL-Brener (Salto *et al.*, 2000; Pollevick *et al.*, 2000; Todeschini *et al.*, 2001), previamente incluídas en el Linaje II, y ahora reclasificadas en DTU VI (Zingales *et al.*, 2009). Por otro lado, las cepas Tulahuen, ahora incluídas en el nuevo híbrido tipo VI expresa mucinas con GlcNAc sustituida con Galf y/o Galp (Jones *et al.*, 2004). Llama la atención que en DTU VI estén incluídas cepas que contienen Galf y Galp como la Tulahuen y otras en las que solo se encuentra Galp como las cepas CL. La galactofuranosa, que no es biosintetizada por el mamífero hospedador, es un epítoto antigénico (de Arruda *et al.*, 1989) y la respuesta inmunológica podría inhibir la interacción del parásito con las

células del hospedero. Los pasos biosintéticos por los cuales se incorpora Gal f en *T. cruzi* aún no se conocen.

Aunque la galactosa es una unidad constitutiva de todos los oligosacáridos de mucinas, el transportador de hexosas de la superficie expresado por *T. cruzi*, es incapaz de transportar galactosa (Tetaud *et al.*, 1997). Este monosacárido no es incorporado por el parásito del medio extracelular sino que el mismo tiene la capacidad de transformar la glucosa, a través del correspondiente nucleótido, en el nucleótido donador de galactosas. La enzima responsable de esto es la UDP-Glc 4'-epimerasa (Roper *et al.*, 2003). La acción de la UDP-Gal p mutasa sobre la UDP-Gal p (Beverley *et al.*, 2005; Bakker *et al.*, 2005) da lugar a UDP-Gal f necesario para la construcción de los glicoconjugados del parásito. La enzima UDP-Glc 4'-epimerasa esta codificada por el gen TcGALE (MacRae *et al.*, 2006). No se han podido obtener mutantes null de estos genes, sugiriendo que los mismos son esenciales para la vida del parásito; de hecho, clones de un alelo "knock-out" generaron aberraciones bioquímicas y morfológicas en los parásitos. Con la disminución del suministro de UDP-Gal p , la incorporación de Gal p a las mucinas se vio más afectada que la biosíntesis de los GPIs que contienen Gal f , sugiriendo que estos últimos juegan un rol importante para la supervivencia del parásito en el medio de cultivo.

Otra característica notable de estas cadenas O-glicosídicas es que están unidas a la proteína por medio de una unidad de α -GlcNAc, en lugar de α -GalNAc, unidad común en mucinas del vertebrados. De hecho, no se ha encontrado GalNAc en ningún glicoconjugado de *T. cruzi*. La incapacidad de la UDP-Glc-4'-epimerasa de *T. cruzi* para convertir UDP-GlcNAc en UDP-GalNAc, en contraste con la epimerasa humana, explica estos resultados (Roper *et al.*, 2003). También es inusual para glicoproteínas de superficie que, en algunas cepas, se haya encontrado una cantidad significativa de GlcNAc no sustituida unida O-glicosidicamente (Acosta-Serrano *et al.*, 1995; Salto *et al.*, 2000). Se ha caracterizado la enzima que transfiere la primera unidad de GlcNAc desde UDP-GlcNAc, (Previato *et al.*, 1998), pero las glicosiltransferasas que construyen las cadenas O-glicosídicas de las mucinas de *T. cruzi* no han sido descritas. Las estructuras de los azúcares de las mucinas de los estadíos del mamífero (mucinas tGPI) han sido menos estudiadas. Por β -eliminación reductiva de mucinas de trypomastigote se obtuvo una mezcla compleja de oligosacáridos alditoles (Almeida *et al.*, 1994). La estructura más pequeña resultó ser el trisacárido alditol Gal $p(\alpha 1 \rightarrow 3)$ -Gal $p(\beta 1 \rightarrow 4)$ -GlcNAc-ol. Las estructuras de mayor tamaño se encuentran ramificadas y derivan de sustituir la posición 4 o 4/6 de la

GlcNAc, con cadenas con número variable de residuos Galp (no se encontró Galf). A excepción del trisacárido, algunas de estas estructuras se encontraban sialiladas, lo que indicaría, como vamos a ver, la presencia de unidades β -Galp terminales en algunas ramificaciones. La diferencia principal entre los oligosacáridos de mucinas del insecto y los del mamífero es la presencia de epítopes Galf(β 1 \rightarrow 3) en el insecto y Galp(α 1 \rightarrow 3)- β -Galp en mamífero (Almeida *et al.*, 1994). Estos α -galactosil oligosacáridos son altamente inmunogénicos y son blanco de los anticuerpos líticos anti- α -galactosilo presentes en el suero de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. La sialilación de estas mucinas catalizada por la trans-sialidasa del parásito (TcTS), tendría la función de evitar la lisis celular de los trypomastigotes (Pereira-Chiocola *et al.*, 2000).

La transición entre estadíos presentes en el insecto y aquellos presentes en el mamífero resulta en la expresión de diferentes conjuntos de genes que codifican para las mucinas. En consecuencia, cuando el parásito pasa del insecto al mamífero remodela su superficie celular, que pasa de estar conformada por mucinas de composición polipeptídica bastante homogénea a mucinas de composición polipéptidica heterogénea. Una posible explicación sería que las proteínas tipo mucinas (TcMUC) de estructura variable funcionen como receptores redundantes que faciliten la interacción y/o invasión de diferentes tipos de células y, por lo tanto, la infección de células del mamífero hospedador. Inclusive, su expresión secuencial podría ayudar al parásito a evitar la respuesta inmune del hospedador (Buscaglia *et al.*, 2006; Frasch, 2000).

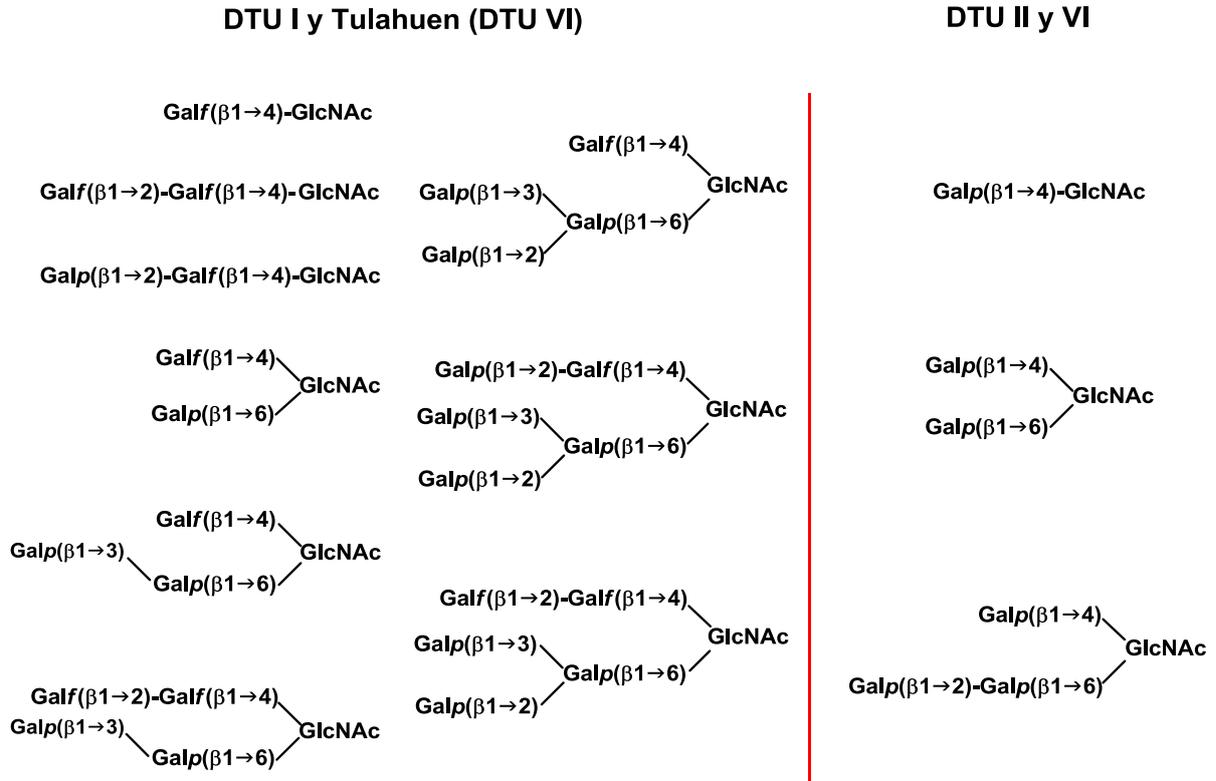


Figura 1-3 Oligosacáridos unidos *O*-glicosidicamente en las mucinas de *T. cruzi*. Estructuras determinadas en estadios del insecto de cepas pertenecientes a DTU I y Tulahuen y grupo (DTU II y VI).

Sialidasas, sialiltransferasas y trans-sialidasas.

Las sialidasas son glicosidasas presentes en virus, microorganismos procariotas, eucariotas y en animales, especialmente aquellos del linaje de los deuterostomados. La mayoría son del tipo exo-glicosidasas que liberan residuos terminales de ácido siálico desde enlaces glicosídicos tipo ($\alpha 2 \rightarrow 3$), ($\alpha 2 \rightarrow 6$), ($\alpha 2 \rightarrow 8$) y/o ($\alpha 2 \rightarrow 9$) (Schauer, 1982; Schauer y Kamerling, 1997; Kamerling y Gerwig, 2007). En las células de vertebrados, las sialidasas tienen un rol catabólico, y están involucradas en eventos celulares fisiológicos y patológicos específicos (Schauer y Kamerling, 1997; Monti *et al.*, 2010; Miyagi, 2010). En los microorganismos, estas enzimas son a menudo los factores de virulencia que permiten la difusión y la infección de las células del hospedero (Corfield, 1992; Vimr *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011). Estas pueden tener también un propósito nutricional en las bacterias, para consumir ácido siálico del hospedero o de la comida presente en el intestino.

La reacción de la sialidasa es en teoría reversible, al igual que la mayoría de las reacciones enzimáticas. Esto ha sido explotado para la sialilación de oligosacáridos en posición ($\alpha 2 \rightarrow 3$) o ($\alpha 2 \rightarrow 6$) en el paso final de una síntesis química, utilizando sialidasas bacterianas y virales bajo condiciones adecuadas (Schauer y Kamerling, 1997; Monti *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). Ejemplos típicos son las sialidasas de *Arthrobacter ureafaciens*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, entre otros (Maru *et al.*, 1992; Ajisaka *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 2000a; Thiem *et al.*, 1991; Schmidt *et al.*, 2000b). Se ha aislado una sialidasa de plasma humano que tiene actividad para romper y formar enlaces ($\alpha 2 \rightarrow 3$), ($\alpha 2 \rightarrow 6$) y ($\alpha 2 \rightarrow 8$) (Tertov *et al.*, 2001; Nikonova *et al.*, 2004). También se ha encontrado que numerosas sialiltransferasas bacterianas tienen actividad sialidasa/sialiltransferasa, por ejemplo, la sialiltransferasa recombinante de *Pasteurella multocida* (transfiere uniones ($\alpha 2 \rightarrow 3$)) (Yu *et al.*, 2005), *Campylobacter jejuni* (transfiere uniones ($\alpha 2 \rightarrow 8$)) (Cheng *et al.*, 2008) y *Photobacterium damsela* (transfiere uniones ($\alpha 2 \rightarrow 6$)) (Cheng *et al.*, 2010).

Además de las sialidasas y sialiltransferasas mencionadas arriba, se ha encontrado una particular clase de sialidasas en algunas especies de trypanosomátidos que se comportan como sialidasas normales cuando tienen presente solo agua como aceptor, sin embargo, preferentemente transfieren residuos de ácido siálico de una cadena de un glicano a un residuo galactosa terminal de otro oligosacárido o glicoconjugado no sialilado. En consecuencia, son ideales para

sialilación de glicanos. Estas, también llamadas trans-sialidasas, ganaron una especial atención ya que juegan un rol crucial en la patogenia de algunas especies de trypanosomas, tales como *Trypanosoma cruzi* en América del Sur y *Trypanosoma brucei* en África.

Trans-sialidasa de Trypanosoma cruzi (TcTS).

T. cruzi es incapaz de incorporar ácido siálico desde el nucleótido donador, CMP-siálico, aunque el proceso de sialilación de moléculas de superficie del parásito juega un rol fundamental en la infección (Schenkman *et al.*, 1991). Las glicoproteínas ancladas a la membrana por GPI o liberadas al torrente sanguíneo pueden unirse a receptores de células del mamífero y comenzar el proceso de infección (Chuenkova *et al.*, 1995). También cumplen un rol importante en la resistencia hacia la respuesta del sistema inmune del mamífero (Tomlinson *et al.*, 1998).

Para adquirir ácido siálico, *T. cruzi* expresa en su superficie una enzima particular, la trans-sialidasa (TcTS) la cual cataliza la transferencia de ácido siálico desde glicoconjugados del hospedador hacia glicanos presentes en la superficie del parásito, en particular mucinas. La actividad específica de TcTS en epimastigote es un 17 % de la encontrada en trypomastigote (Zingales *et al.*, 1987). La enzima es expresada en la fase estacionaria de epimastigote y presenta una estructura diferente a la expresada en trypomastigote (Chaves *et al.*, 1993). Por otro lado, la menor sialilación de la superficie del parásito en el insecto se debe a la baja concentración de donores de ácido siálico en el lumen intestinal del insecto vector. Una sialidasa en el interior del intestino medio es responsable de la hidrólisis de residuos de ácido siálico unidos α -(2→3)- β -Galp y por lo tanto, estos residuos estarían menos disponibles para la TcTS (Amino *et al.*, 1995).

Las trans-sialidasas están ancladas en la superficie celular del parásito mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Agusti *et al.*, 1997 y 1998). A diferencia de las sialidasas clásicas, la trans-sialidasa trypanosomal cataliza la transferencia reversible de ácido siálico unido preferentemente (α 2→3) desde un glicano donador hacia una molécula aceptora que contenga β -Galp terminal, dando lugar a un nuevo enlace glicosídico (α 2→3)(Figura 1-4 a y b) (Vandekerckhove *et al.*, 1992; Ferrero-García *et al.*, 1993; Schrader *et al.*, 2006). En ausencia de un aceptor apropiado, esta enzima

actúa como una sialidasa que transfiere una molécula de ácido siálico glicosídicamente unido hacia una molécula de agua en lugar de transferirla a un residuo β -Galp terminal, sin embargo, esta actividad es mucho más lenta que la reacción de transferencia. Evidentemente, la trans-sialidasa representa una especie de sialiltransferasa que puede formar un nuevo enlace glicano-ácido siálico sin necesidad de activar previamente el ácido siálico con citidina trifosfato (CTP).

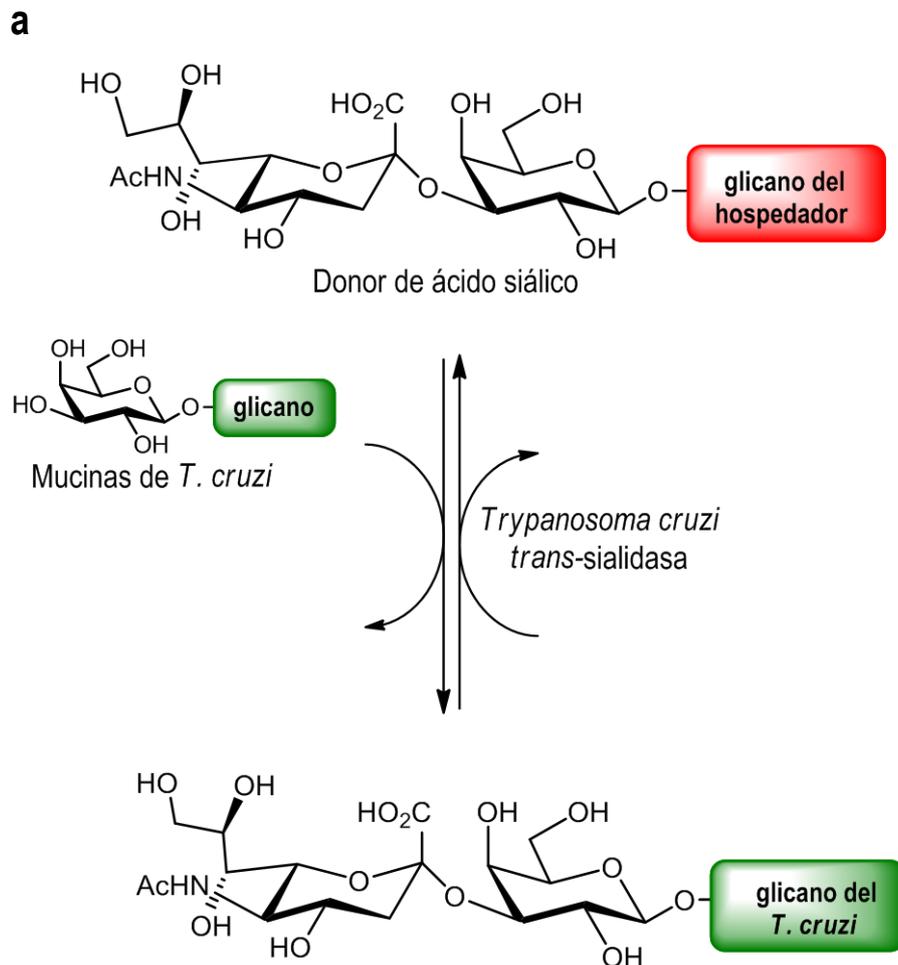


Figura 1-4 a. Trans-glicosilación reversible de Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3) entre un glicano sialilado del hospedador y un glicano del parásito, catalizada por TcTS.

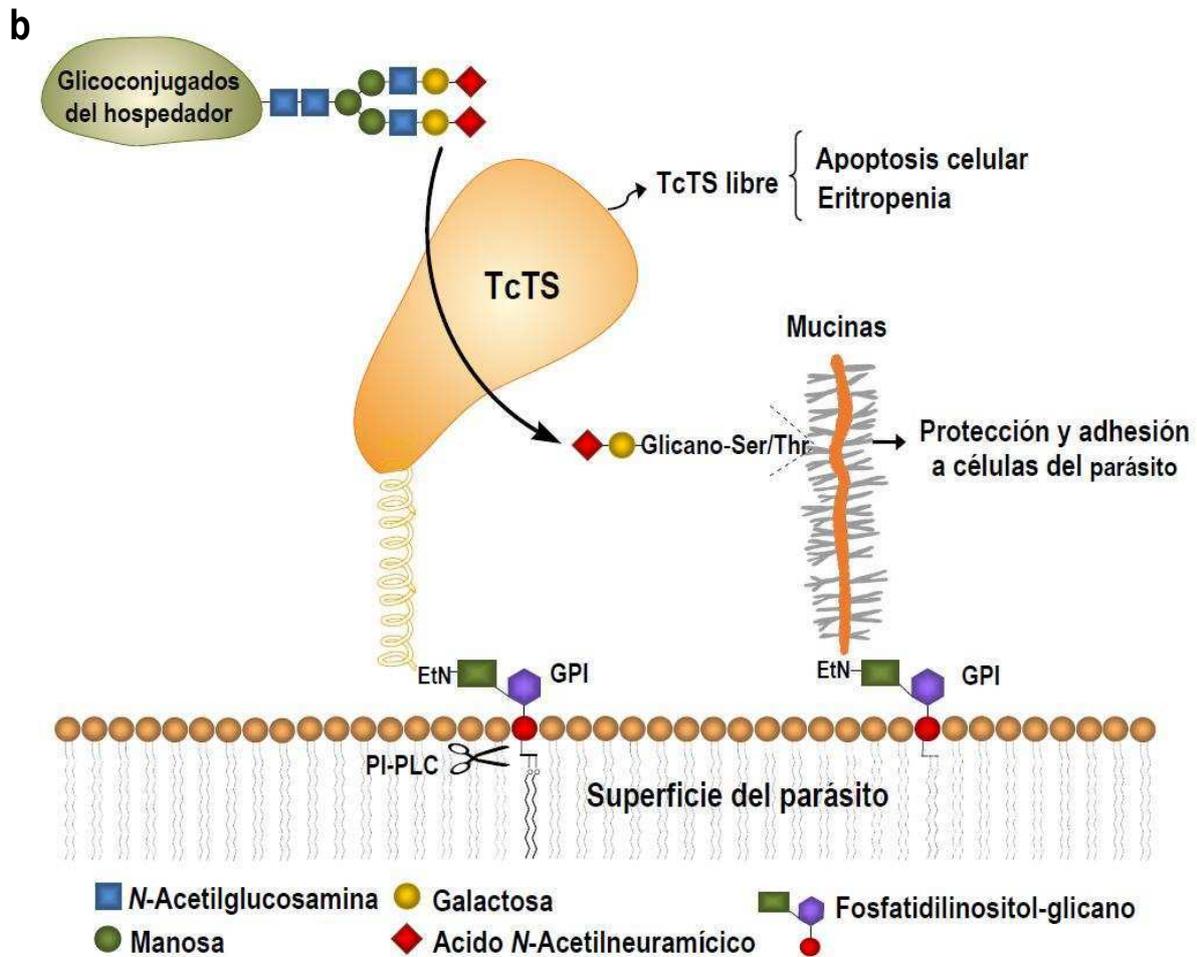


Figura 1-4 b. La trans-sialidasa de *T. cruzi*, anclada por GPI (glicosilfosfatidilinositol) transfiere ácido siálico desde glicoconjugados del hospedador hacia mucinas de la superficie del parásito. TcTS es liberada al medio por PI-PLC (fosfatidilinositol fosfolipasa C). Se indican algunos de los efectos de TcTS en circulación.

La actividad enzimática está localizada en el antígeno conocido como SAPA (“shed acute-phase antigen”) (Pollevick *et al.*, 1991) presente en el suero de pacientes infectados con *T. cruzi*, que consiste en un extremo N-terminal que presenta la actividad enzimática, y un extremo C-terminal altamente antigénico, que posee en “tándem” doce unidades repetitivas de aminoácidos (Parodi *et al.*, 1992). Inmediatamente luego de la infección, en humanos o ratones, se generan anticuerpos anti-SAPA (Affranchino *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1990).

El genoma de *T.cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) revela una super-familia de genes que codifican para cientos de trans-sialidasas de entre 80-200 kDa de tamaño, aunque no todas muestran actividad enzimática. Sólo un grupo de 70 genes codificarían productos con actividad trans-sialidasa (Alves y Colli, 2008; Buscaglia *et al.*, 2006; Schenkman *et al.*, 1994; Gazzulo *et al.*, 1992), mientras que un segundo grupo, con la misma cantidad de genes, codificaría para productos que carecen de actividad enzimática debido a una mutación en un residuo clave de Tyr, pero que mantiene la afinidad por la unidad β -Galp (Cremona *et al.*, 1999). Estos dos grupos contienen secuencias SAPA y están presentes en trypomastigote. Por otra parte, en la superficie de epimastigote se expresa un tercer grupo que carece de la secuencia repetitiva pero que contiene la región catalítica.

La porción C-terminal de la TcTS permite la oligomerización y el enlace de la enzima a la superficie del parásito e induce la producción de anticuerpos para el antígeno SAPA. Se sugiere que el dominio C-terminal de la TcTS actuaría en la primera fase de la infección estabilizando la actividad TcTS en la sangre, aumentando su vida media en la circulación. En una segunda fase de la infección, se induciría la generación de anticuerpos que inhibirían la enzima.

Existe un tercer grupo de glicoproteínas, gp85, incluidas en la super-familia que se las denomina proteínas tipo trans-sialidasa (Buscaglia *et al.*, 2006; Frasch, 2000), pues poseen secuencias de aminoácidos que tienen un 30-40% de homología con las de TcTS, pero que carecen de actividad. La Tc-85, específica para trypomastigotes fue la primera descrita de este grupo (Katzin y Colli, 1983). La adhesión celular y otras interacciones de las gp85 con estructuras del hospedero fue publicada (Alves y Colli, 2008; Tonelli *et al.*, 2010). En resumen, la familia de trans-sialidasas reviste interés, pues sus miembros se expresan en la superficie del parásito y cumplen una función fundamental en la infección.

Estructura proteica y mecanismo de reacción.

La estructura tridimensional de TcTS se determinó por estudios cristalográficos sobre una enzima TcTS activa mutante (Buschiazzi *et al.*, 2002; Amaya *et al.*, 2003). Esta consiste en dos dominios: el dominio catalítico N-terminal el cual forma seis láminas β , característico de sialidasas microbiales, conectada a través de una α -hélice al dominio C-terminal tipo lectina, el cual no participa en la reacción enzimática.

Estudios realizados con complejos cristalinos de TcTS unida a diferentes ligandos como, por ejemplo, lactosa como sustrato aceptor y ácido 2,3-dehidro-3-desoxi-*N*-acetilneuramínico (DANA, Nau5Ac2en), análogo del ácido siálico e inhibidor de sialidasas virales (Amaya *et al.*, 2004) muestran dos (sub)sitios catalíticos en el sitio activo: un sitio donador específico para el ácido siálico y otro para la β -galactopiranososa aceptor (Amaya *et al.*, 2003; Buschiazzo *et al.*, 2002). El (sub)sitio que une ácido siálico, presente en todas las sialidasas, es diferente en TcTS pues, a diferencia de ellas, el azúcar debe entrar en una posición inclinada, lo que explicaría en parte la baja inhibición observada con DANA. Por otra parte, en las sialidasas comunes, el (sub)sitio que une la lactosa está ausente y en las TcTS se forma al unirse el sustrato donador. La **Figura 1-5** muestra las interacciones entre TcTS y DANA. El sitio activo de TcTS muestra características conservadas de sialidasas microbianas incluyendo la presencia de una tríada de arginina (Arg35, Arg245 y Arg314) las cuales interactúan con la carga negativa del grupo carboxilato del ácido siálico, la presencia de dos residuos importantes para la estabilización del estado de transición (Tyr342 y Glu230), un ácido aspártico esencial para la catálisis (Asp59) y un espacio hidrofóbico capaz de acomodar el grupo acetilo del ácido siálico definido por Trp120, Val203, y Trp312 (**Figura 1-5**).

Los aminoácidos Tyr119 y Trp312 son cruciales para el proceso de transglicosilación y los aminoácidos Asp59 (común a ambos sitios) y Glu362 interactúan directamente con la β -galactosa aceptor (Buschiazzo *et al.*, 2002) (**Figura 1-6**). La unión de TcTS con lactosa está estabilizada por puentes de hidrógeno de los dos monosacáridos constituyentes, galactosa y glucosa, mediados por agua. El OH-3 de la Gal está convenientemente situado para un ataque nucleofílico al intermediario sialilado y a una distancia de un enlace de hidrógeno del residuo catalítico Asp59 como se muestra en la **Figura 1-6**.

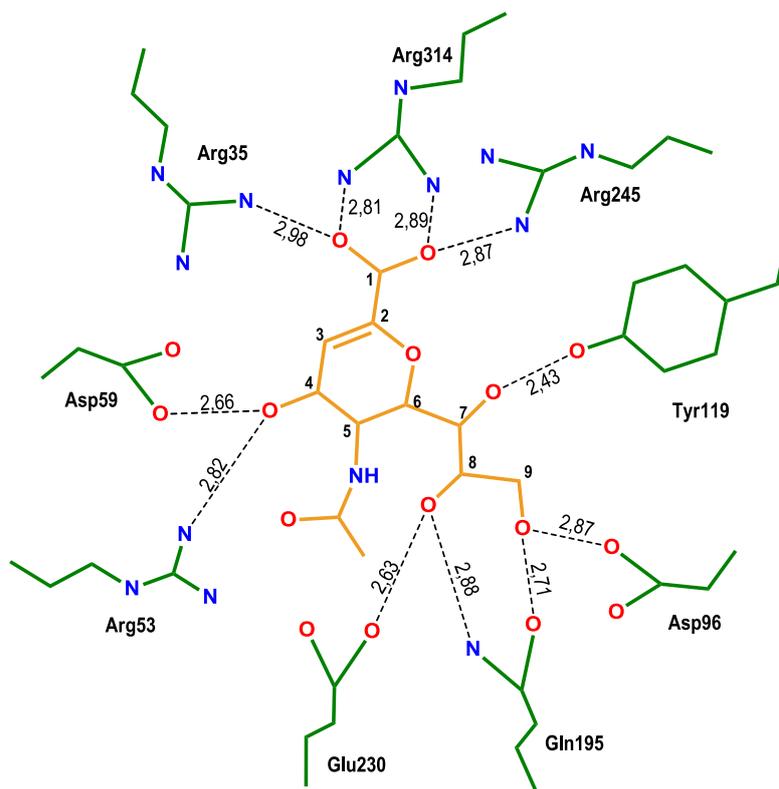


Figura 1-5 Diagrama esquemático que muestra las interacciones entre DANA y TcTS.

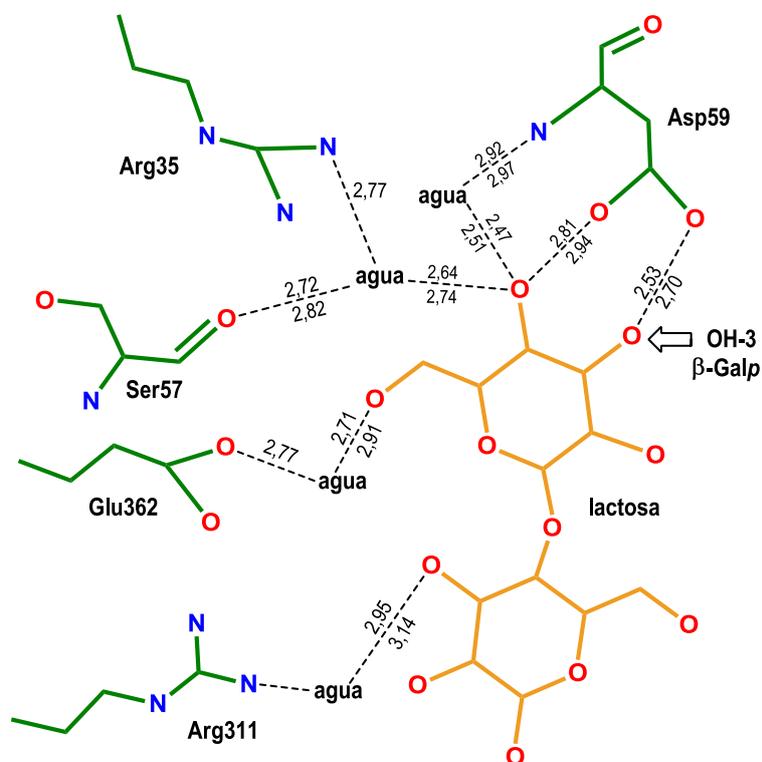
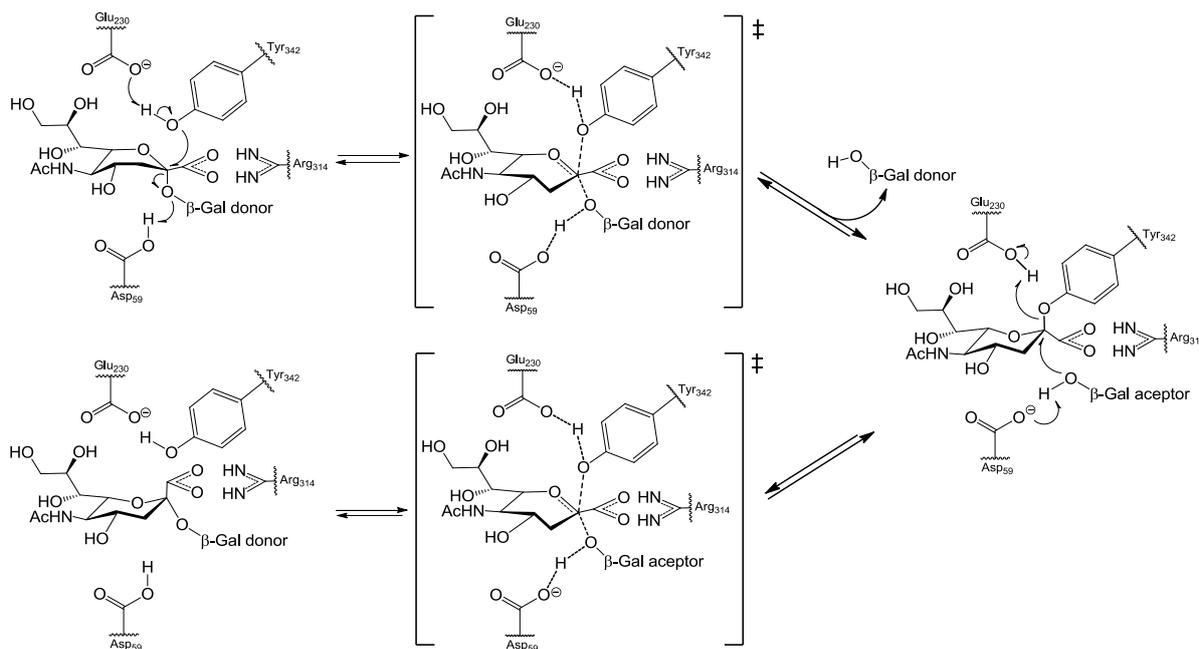


Figura 1-6 Diagrama esquemático mostrando las interacciones entre lactosa y TcTS.

El modo de acción de la TcTS implica dos funciones catalíticas: hidrólisis del ácido siálico desde un sustrato donador seguido de la transferencia del mismo ácido siálico hacia un sustrato aceptor. La unión de ácido siálico del sustrato donador con el centro activo de TcTS desencadena un cambio conformacional que genera el sitio de unión para la β -Galp terminal aceptor. En el bolsillo catalítico de la enzima libre, el residuo Tyr119 apunta hacia el piso de bolsillo, relleno de este espacio. Luego de la unión con el sustrato donador, la cadena que contiene al residuo de Tyr119 se desplaza y se establece una fuerte interacción de la enzima con la lactosa, la cual se ubica frente al Trp312. La unión a ácido siálico ocurrida en primer lugar además de crear el sitio de reconocimiento del aceptor produce un cambio conformacional del residuo de Tyr342, que actúa como nucleófilo catalítico dando lugar al enlace covalente con el ácido siálico en el intermediario de la reacción, con catálisis ácido-base por Glu230. (**Esquema 1-1**). (Watts *et al.*, 2003; Buchini *et al.*, 2008). El glicano saliente se protona por Asp59 y se produce el ataque por el OH-3 del β -galactopiranosido aceptor, obteniéndose un nuevo sialósido con retención de la configuración.

La prueba del enlace covalente fue realizada por ES/MS de péptidos obtenidos por digestión de la enzima luego de la incubación con fluoruro de 3-F- α -Neu5Ac. La presencia de F en el C-3 adyacente al anomérico disminuye la velocidad de reacción permitiendo la obtención del intermediario covalente (Watts *et al.*, 2003). La formación del mismo se confirmó por rayos X (Amaya *et al.*, 2004).

O sea que TcTS actúa a través de un mecanismo tipo “ping-pong” bisustrato en el cual se forma un intermediario covalente sialil-TcTS con Tyr 342 (Damager *et al.*, 2008). En ausencia de un carbohidrato aceptor, la TcTS funciona como sialidasa, catalizando la hidrólisis (Scudder *et al.*, 1993).



Esquema 1-1 Mecanismo de acción de TcTS para la transferencia de ácido siálico entre glicoconjugados conteniendo β -galactopiranosidos terminales.

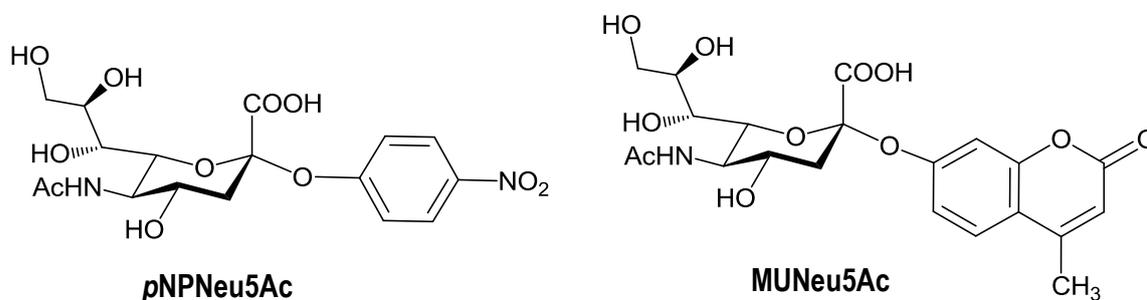
Especificidad de donores y aceptores de la trans-sialidasa de TcTS

I. Donores naturales.

Se analizaron potenciales donores naturales de ácido siálico (gangliósidos y oligosacáridos) utilizando $[^{14}\text{C}]$ -lactosa como unidad aceptora, a pH 7,2 y 37° C. Cuando se compararon Neu5Ac unido ($\alpha 2 \rightarrow 3$), ($\alpha 2 \rightarrow 6$) o ($\alpha 2 \rightarrow 9$), se encontró que sólo el Neu5Ac unido ($\alpha 2 \rightarrow 3$) se transfirió con un alto rendimiento hacia el residuo β -Gal p terminal para dar Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$) ^{14}C -Gal p ($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc, demostrando de esta manera la especificidad de la TcTS (Vandekerckhove *et al.*, 1992). Donores de ácido siálico con secuencia tipo Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)-Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)-R resultaron ser donores más eficientes que aquellos con secuencia Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)-Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)-R. Modificaciones en la estructura de Neu5Ac (desoxi o metoxi) en el C-9 (9d-Neu5Ac) o (Neu5Ac9Me) no afectan la reacción de transferencia, mientras que si la modificación ocurría en el C-4 (4d-Neu5Ac) o (Neu5Ac4Me), C-7 (7d-Neu5Ac) y C-8 (8d-Neu5Ac) o (Neu5Ac8Me), se obtenía como resultado la inactivación de la molécula como donador.

II. Donores no naturales

Donores no naturales tales como α -sialósidos conteniendo *p*-nitrofenil (*p*NP) o metilumbeliferil (MU) (**Esquema 1-2**) muestran mucha menor actividad en la reacción de TcTS si se la compara con 3'SL (Scudder *et al.*, 1993). En contraste, la velocidad de hidrólisis de 2'-*O*-(4-metilumbeliferil)- α Neu5Ac (MUNeu5Ac) resulto mayor comparada con la de 3'SL (Ribeirao *et al.*, 1997). Sin embargo, se utilizó 2'-*O*-(*p*-nitrofenil)- α Neu5Ac (*p*NPNeu5Ac) y su análogo MU para la preparación de oligosacáridos sialilados, con la ventaja de que la reacción es irreversible.



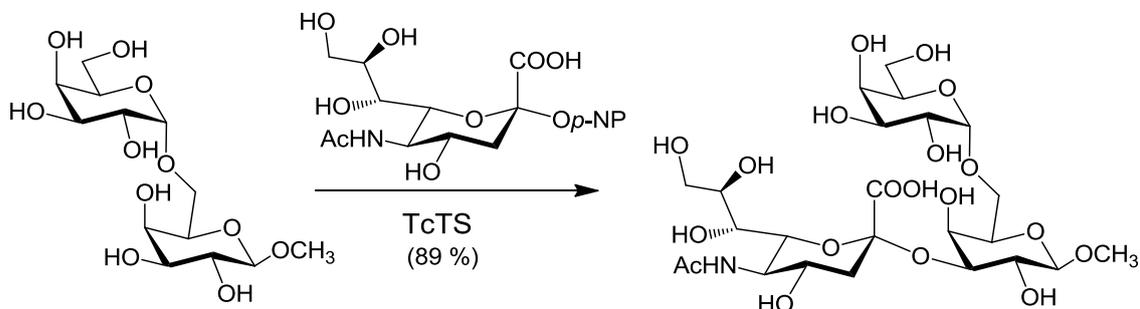
Esquema 1-2

Se analizó la habilidad de Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)- β GalO-*p*NP para actuar como sustrato donador usando Gal β (1 \rightarrow 3)- β GlcNAc-1-octil como sustrato aceptor (Harrison *et al.*, 2001). Se observó que la transferencia resulto ser cuatro veces mayor respecto de la actividad de hidrólisis, valor intermedio de la observada para 3'SL (13:1) (Scudder *et al.*, 1993) y para MUNeu5Ac (Ribeirao *et al.*, 1997).

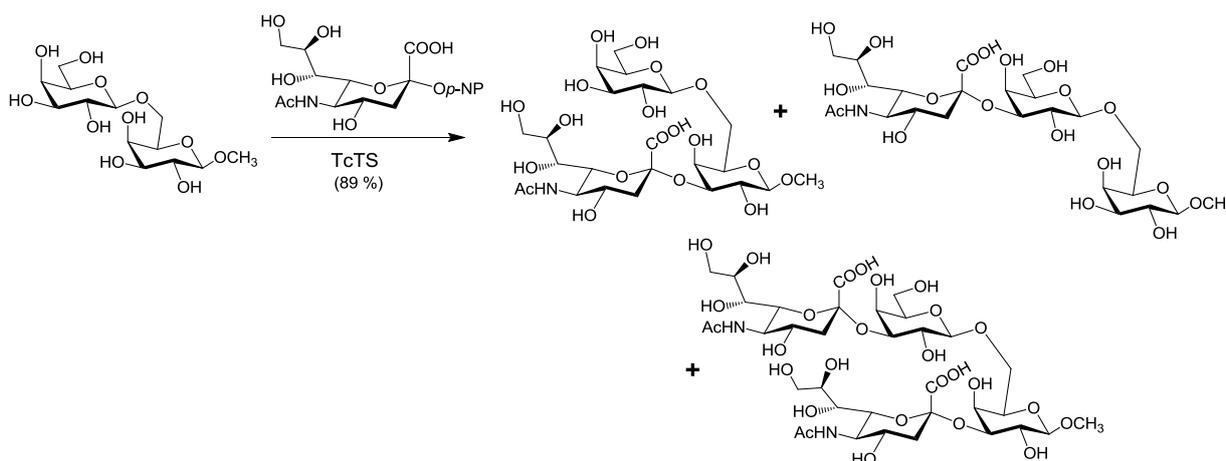
Vetere y colaboradores usaron MUNeu5Ac y TcTS recombinante para la síntesis de Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)-Gal β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc (Vetere *et al.*, 1996) y Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)-Gal β (1 \rightarrow 3)-GlcNAc (Vetere *et al.*, 2000) con 60 y 35 % de rendimiento respectivamente. En la primera síntesis el autor describe que el rendimiento resultó considerablemente más alto al rendimiento obtenido cuando utilizó 3'SL como donador.

Singh *et al.* (2000) obtuvieron un 85 % de rendimiento cuando utilizaron (*p*NPNeu5Ac) como donador y TcTS recombinante para la sialilación de lactosa y

lactosamina (Singh *et al.*, 2000). Sin embargo, en el mismo trabajo los autores describieron algunos resultados controvertidos. Por un lado publican que el metil- α -D-Galp podía ser sialilado con un 54 % de rendimiento y que Galp(α 1 \rightarrow 6)- β Galp-OMe se sialiló para dar el trisacárido ramificado Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)-[Galp(α 1 \rightarrow 6)]- β Galp-OMe con buen rendimiento (**Esquema 1-3**). Por otro lado, describieron que Galp(β 1 \rightarrow 6)- β Galp-OMe daba una mezcla 1:1 de los productos monosialilados con un 88 % de rendimiento y que cada uno podía ser convertido en el producto disialilado (**Esquema 1-4**). Sin embargo, no se dio información acerca de las condiciones para que esto ocurra, como tampoco se mostró la caracterización completa de los compuestos obtenidos.



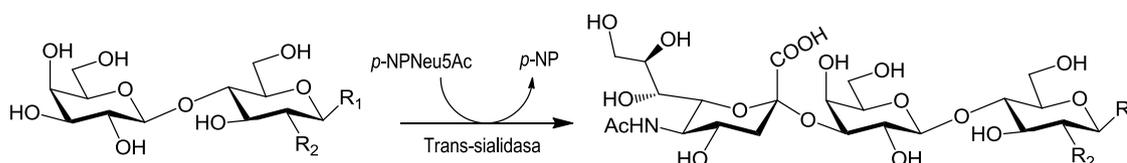
Esquema 1-3



Esquema 1-4

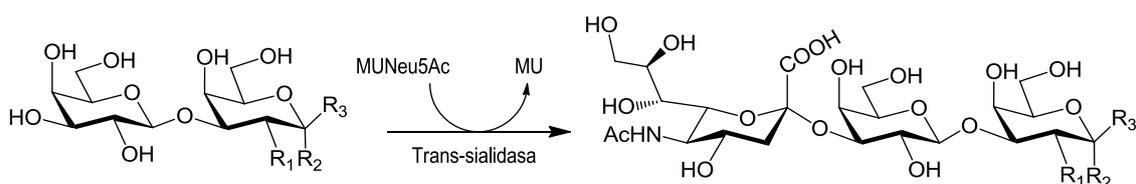
El trisacárido GM₃ marcado, Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)-Galp(β 1 \rightarrow 4), se preparó mediante la sialilación de [U-¹³C]-lactosa usando *p*NPNeu5Ac como donador y TcTS recombinante (Probert *et al.*, 1997). Los mismos autores sintetizaron, por trans-sialilación enzimática de lactosamina seguida de fucosilación enzimática, el tetrasacárido Lewis X sialilado, Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)-Galp(β 1 \rightarrow 4)-Fuc(α 1 \rightarrow 3)-GlcNAc. También se sintetizó un glicopolímero soluble en agua conteniendo 3'sialil-*N*-acetillactosamina uniendo GlcNAc a poli(acrilamida) por β -galactosidación secuencial, utilizando galactosiltransferasa bovina seguido de sialilación con TcTS y *p*NPNeu5Ac como sustrato donador. Un análisis del contenido de ácido siálico mostró un 35 % de transferencia (Nishimura *et al.*, 1994). Thiem y colaboradores usaron *p*NPNeu5Ac y MUNeu5Ac para estudios de TcTS (Neubacher *et al.*, 2005 y 2006) para lo cual sialilaron varios derivados de lactosa (**1-4**), con rendimientos en el rango de 30-60 % (**Esquema 1-5**). También se sialilaron derivados de Galp(β 1 \rightarrow 3)-Gal (**5-8**) pero con bajo rendimiento (**Esquema 1-6**). De esta manera se preparó el antígeno asociado a tumor Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)-Galp(β 1 \rightarrow 3)-GalpNAc(α 1 \rightarrow 3)-treonina (**S5**) y su análogo conteniendo serina (**S6**).

Un análisis acerca de la influencia de los grupos hidroxilos en el anillo de galactosa aceptora mostró que tanto el 2- o 6- desoxi, o incluso el reemplazo de β -Gal por β -Ara, no afectaba la reacción, aunque se obtuvo menor rendimiento (30 %) cuando se utilizó el disacárido conteniendo fucosa (Kroger *et al.*, 2006).



Compuesto	R ₁	R ₂	Producto	Rendimiento (%)
1	SPh	N ₃	S1	32
2	OH	OH	S2	49
3	OAll	OH	S3	61
4	OMe	NHAc	S4	42

Esquema 1-5

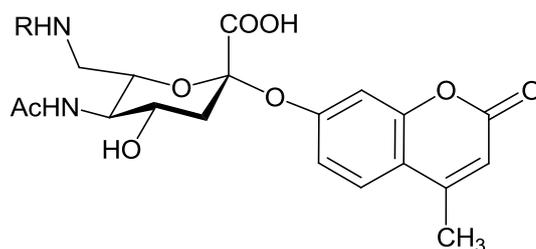


Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Producto	Rendimiento (%)
5	NHAc	Thr	H	S5	25
6	NHAc	Ser	H	S6	22
7	H	OMe	H	S7	16
8	N ₃	H	OAll	S8	31

Esquema 1-6

III. Donores de ácido siálico modificados

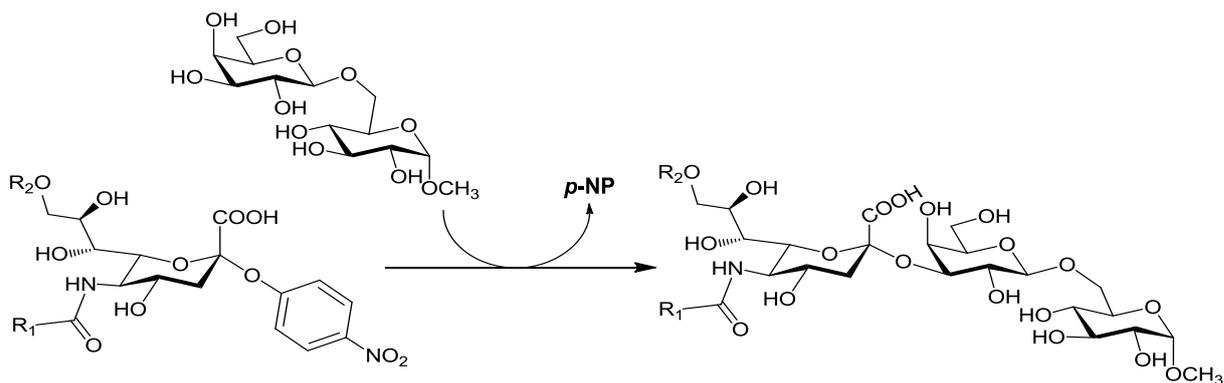
Uno de los primeros trabajos acerca de la especificidad como donores de sustratos no-naturales describe la transferencia usando derivados de MUNeu5Ac, lactosa como sustrato aceptor y TcTS nativa (Lee *et al.*, 1994). Se prepararon derivados de C-7 MUNeu5Ac, por oxidación con periodato de la MUNeu5Ac, y luego acoplado por aminación reductiva el aldehído obtenido en C-7 con distintas aminas primarias. La reacción de TcTS de los compuestos obtenidos (**Figura 1-7, 9-17**) y analizados por HPAEC-PAD mostraron que solo los compuestos **10, 11** y **16** actuaron como donores pero con rendimiento bajo si se los compara con MUNeu5Ac (~50 % de transferencia). También se ha sialilado con TcTS r, *N*-oligosacáridos liberados de glicoproteínas y derivatizados con 2-aminopiridina usando MUNeu5Ac como donador aunque no se dieron datos respecto a rendimientos en la reacción (Takahashi *et al.*, 1995).



Compuesto	R
9	H
10	PhCH ₂
11	MeOPhCH ₂
12	PhCH ₂ O
13	NH ₂ (CH ₂) ₂
14	Dansil-NH-(CH ₂)
15	Dansil-NH
16	CF ₃ CO
17	CF ₃ CONH(CH ₂) ₂

Figura 1-7 Trans-sialilación usando MUNeu5Ac derivados, preparados por oxidación con periodato seguido de una aminación reductiva con varias aminas primarias.

Trabajos más recientes mostraron que los análogos C-7 o C-8 de *p*NPNeu5Ac obtenidos por oxidación con periodato del *p*-nitrofenil α -sialósido, resultaron donores eficientes para la sialilación del metil β -lactósido, indicando que no es fundamental la presencia de la cadena exocíclica para la reacción enzimática (Neubacher *et al.*, 2006). También se analizaron donores de ácidos siálicos *N*-acil modificados (**18-23**), usando Gal β (1 \rightarrow 6)- α Glc-OMe como aceptor; cuando el sustituyente era de mayor tamaño que el propanoil no funcionaban como donores (**Esquema 1-7**) (Schroven *et al.*, 2007).



Compuesto	R ₁	R ₂	Rendimiento (%)
18	CH ₃	H	80
19	CH ₃	C ₂ H ₇ O	78
20	C ₂ H ₅	H	32
21	C ₃ H ₄	H	0
22	CH(CH ₃) ₂	H	0
23	CH ₂ OH	H	60

Esquema 1-7

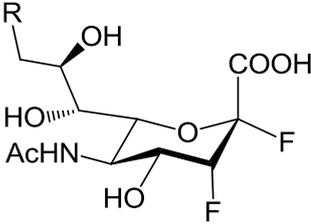
Inhibidores de TcTS

La TcTS tiene uno de los requerimientos principales para ser blanco quimioterapéutico: es una enzima específica del parásito sin equivalentes en el mamífero hospedador. De acuerdo a la estructura en 3D de la enzima, los inhibidores pueden ser dirigidos hacia el sitio específico del ácido siálico y/o al sitio específico para la β -Galp aceptora.

I. Compuestos estudiados como inhibidores del sitio específico del ácido siálico.

Withers y colaboradores sintetizaron inhibidores covalentes (**24-29**) (Watts *et al.*, 2003; Buchini *et al.*, 2008). Como ya se menciona, el uso del 3-F-sialil fluoruro **24** como sustrato donador permitió identificar el mecanismo covalente de la TcTS. El compuesto **24** inactiva completamente la enzima, aunque se requieren

concentraciones mayores a 20 mM, y por otro lado cuando se quita el exceso, la enzima recupera su actividad. Como la estructura 3 D mostró que el sitio donador es más espacioso e hidrofóbico que el de sialidasas humanas, se sintetizaron derivados en el C-9 del compuesto **24** por un método quimioenzimático y se probaron como inhibidores (**Figura 1-8**). La inhibición se analizó con ácido trifluorometilumbeliferil siálico midiendo la actividad hidrolasa. Sin embargo, los autores consideraron que el sitio para la transferencia es el mismo y extrapolaron los resultados para la actividad de trans-sialidasa. Los valores de inhibición de los compuestos analizados se encontraron del mismo orden de magnitud que para **24**, pero en contraste, se necesitaron mayores concentraciones de lactosa para promover la reactivación. Los mejores inhibidores resultaron ser los compuestos **25** y **29**.



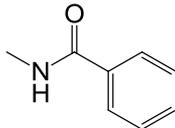
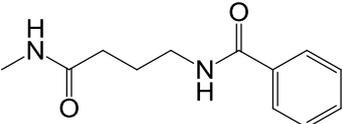
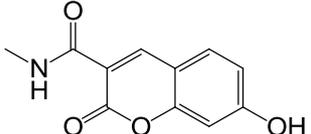
Compuesto	R ₁	K _i /k _d x 10 ⁻³ (min ⁻¹ mM ⁻¹)
24	OH	8,0
25	N ₃	14,0
26	NH ₂	n.d
27		2,9
28		3,2
29		14,0

Figura 1-8 Compuestos analizados como inhibidores de TcTS

II. Derivados de lactosa como inhibidores competitivos de la TcTS.

Como otras sialidasas carecen de un sitio aceptor para la β -Galp, inhibidores de TcTS dirigidos a ese sitio deberían ser más específicos. La lactosa es normalmente utilizada para medir la actividad de trans-sialidasa y como unidad aceptor en estudios cristalográficos. La estructura 3D mostró enlaces de hidrógeno mediados por agua, no solo entre la galactosa y la enzima, sino también con el OH-3 de la unidad glucosa del extremo reductor (**Figura 1-6**). Por esta razón, se probaron derivados de lactosa como sustratos e inhibidores competitivos de la reacción de TcTS (**Figura 1-9, 30-35**) (Agusti *et al.*, 2004). Se obtuvieron datos cuantitativos analizando las reacciones por cromatografía aniónica de alta resolución con detector por pulso amperométrico (HPAEC-PAD). Todos los compuestos resultaron ser buenos aceptores de ácido siálico transferido desde 3'SL, con excepción del lactotetrazol **35**. El lactitol mostró ser mejor aceptor que la lactosa y *N*-acetillactosamina, lo cual indica que la estructura abierta permite una mayor interacción entre el sustrato y la enzima. También se demostró que cuando el lactitol estaba presente, la transferencia de ácido siálico entre la 3'SL y la *N*-acetillactosamina, se inhibía un 75 %, mostrando ser el mejor inhibidor competitivo. El uso de inhibidores para el sitio aceptor permite diferenciar la actividad hidrolasa de la actividad trans-sialidasa, como responsable de eventos biológicos.

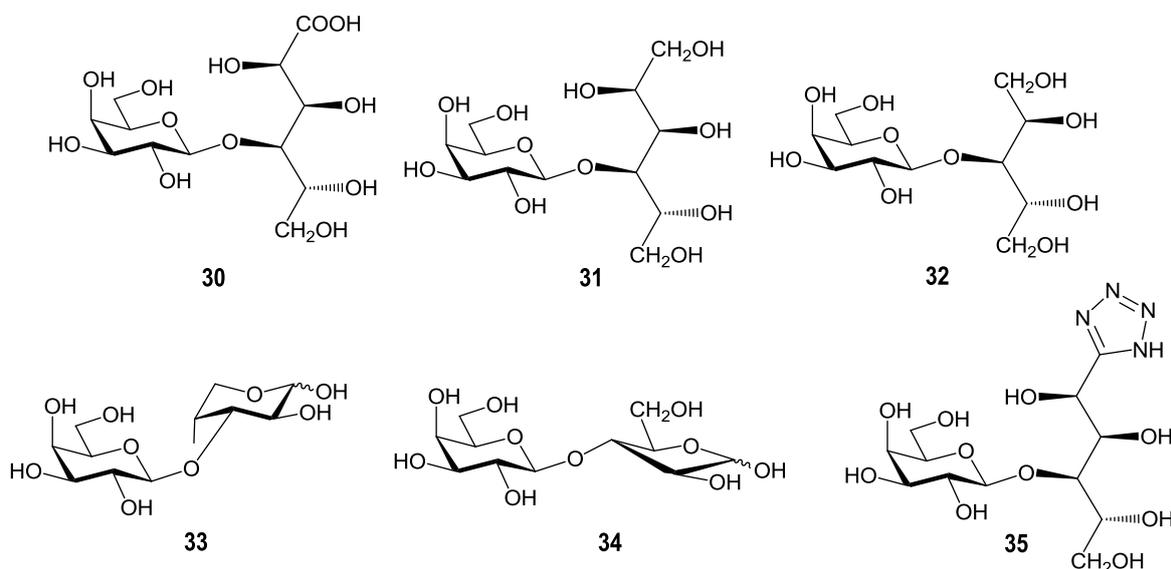


Figura 1-9 Derivados de lactosa analizados como sustratos e inhibidores competitivos en la reacción de TcTS.

En el capítulo 4 de esta Tesis se muestran otros ejemplos de inhibidores, dirigidos al sitio del ácido siálico, al de la β -Galp, o a ambos.

Resultados y Discusión

Capítulo 2

Evaluación de sustratos en la reacción de Trans-sialidación.

Evaluación de sustratos en la reacción de trans-sialidación

Para los ensayos de trans-sialidación (**Figura 2-1**) se utilizó como donador 3'sialilactosa (3'SL) que, dado el alto precio del producto comercial, se obtuvo para esta tesis, a partir del calostro bovino. Este material, especialmente cuando se colecta en tiempos cercanos al parto, es una buena fuente de sialooligosacáridos (Veh *et al.*, 1981), en particular de 3'SL que es el componente mayoritario de los mismos, segundo por 6'sialil-*N*-acetillactosamina (6'SLNAc) y 6'sialilactosa (6'SL), presentes en proporciones considerablemente menores.

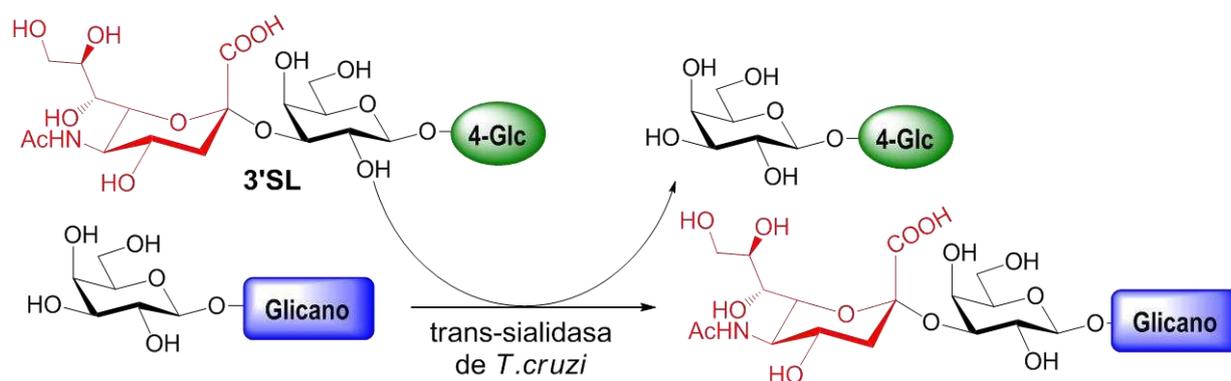
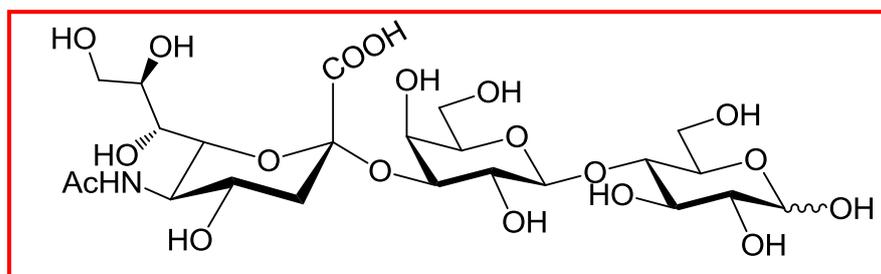
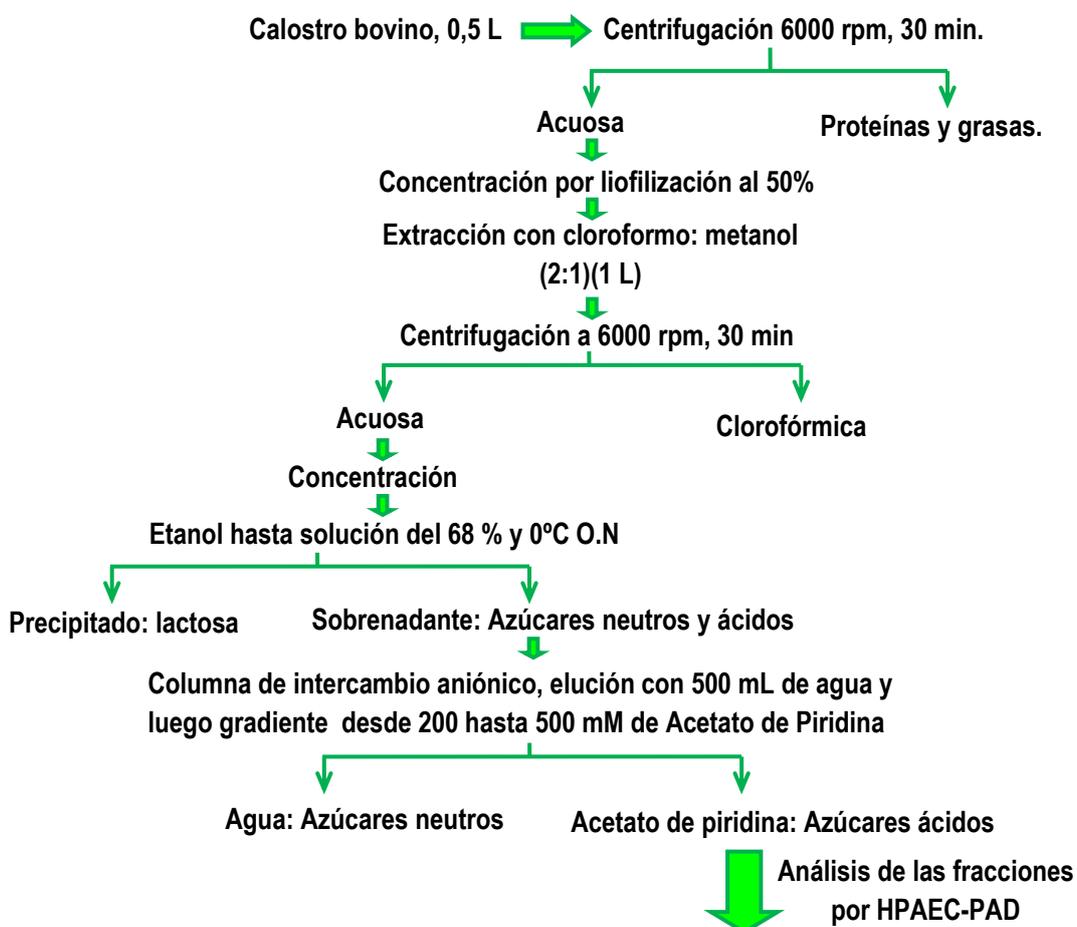


Figura 2-1 Transferencia de ácido siálico desde 3'SL hacia glicanos conteniendo β -Galp en el extremo no reductor.

Purificación de 3'sialilactosa

Para la obtención de 3'SL se optimizó el método de Veh *et al.*, (1981) según **Esquema 2-1**. La purificación se siguió por HPAEC-PAD en condición de elución 4 y se obtuvo 3'SL con trazas de 6'SL que no superan el 1 %. De todas maneras los derivados 6' sustituidos no interfieren en la reacción pues no son donores de ácido siálico y se diferencian en el análisis cromatográfico de los productos de trans-sialidación. Por otra parte, en todos los ensayos comparativos se utilizó la 3'SL proveniente de la misma partida.

Se utilizó la enzima TcTS recombinante (Agusti *et al.*, 2004) proporcionada por el laboratorio del Dr. Frasch (UNSAM). Los productos sialilados se cuantificaron por HPAEC-PAD, condición de elución 4, como se indica en la parte experimental.



Rend: 40 mg de 3'SL puro

Precio comercial: 1 mg aprox 300 USD

Esquema 2-1. Purificación de 3'SL a partir del calostro bovino.

Sialilación de oligosacáridos sintéticos de mucinas: cinética de reacción y de inhibición de la trans-sialidación.

En nuestro laboratorio se habían sintetizado oligosacáridos de las mucinas aisladas de cepas de *T. cruzi* pertenecientes al grupo I conteniendo de 2 a 6 unidades de azúcares (**Figura 1-3**) (Gallo-Rodriguez *et al.*, 1996 y 1998; Mendoza *et al.*, 2006; Mendoza, Tesis 2009); Kashiwagi *et al.*, 2012).

Separación de los oligosacáridos alditoles de mucinas de T. cruzi por HPAEC-PAD.

Los oligosacáridos de las mucinas se obtienen como alditoles mediante una reacción de β -eliminación reductiva. El perfil obtenido en el análisis por HPAEC-PAD permitiría conocer el origen, selvático o doméstico, de la cepa de *T. cruzi*, por la presencia o ausencia de Galf.

En la **Figura 2-2** se muestra el análisis de los compuestos alditoles sintetizados (**37ol - 43ol**, **Figura 2-3**), incluyendo el disacárido Galp(β 1 \rightarrow 6)-GlcNAcol (**36ol**) y el trisacárido Galp(β 1 \rightarrow 2)[Galp(β 1 \rightarrow 3)]-Galol (**39ol**), utilizando una columna CarboPac PA-20 en condiciones isocráticas. Los compuestos se pudieron resolver perfectamente en menos de 30 minutos y se observaron algunos tiempos de retención inesperados. El pentasacárido **41ol** se diferencia estructuralmente del tetrasacárido **40ol** en que el primero contiene una Galp externa adicional y sin embargo presentó un tiempo de retención menor que el alditol **40ol** en las condiciones utilizadas. Este mismo comportamiento se observó con el hexasacárido hexaGalp **43ol**, que sale antes que el tetrasacárido **40ol**, aunque después que el pentasacárido **41ol**. Esto podría ser resultado de la combinación de dos factores, la estructura más ramificada y comprimida y la menor proporción de Galf en el pentasacárido **41ol** y hexaGalp **43ol** comparados con la del tetrasacárido **40ol**. En cambio, el hexaGalf **42ol** que contiene dos unidades de Galf siendo una de ellas externa, sale más tarde que el tetrasacárido **40ol**. Se había observado que la presencia de Galf retarda la elución de oligosacáridos respecto a análogos con Galp en un sistema de intercambio aniónico (Salto *et al.*, 2000). Esto también resulta evidente cuando se comparan los tiempos de retención de los dos tipos de trisacáridos ramificados, **38ol**, que contiene Galf, y **39ol** sin Galf. Comparando los dos trisacáridos que contienen Galf **37ol** y **38ol** se observa que el

38ol, que presenta una estructura ramificada conteniendo una *Gal*f externa, eluye más tarde que el análogo lineal **37ol** que contiene una *Gal*f interna.

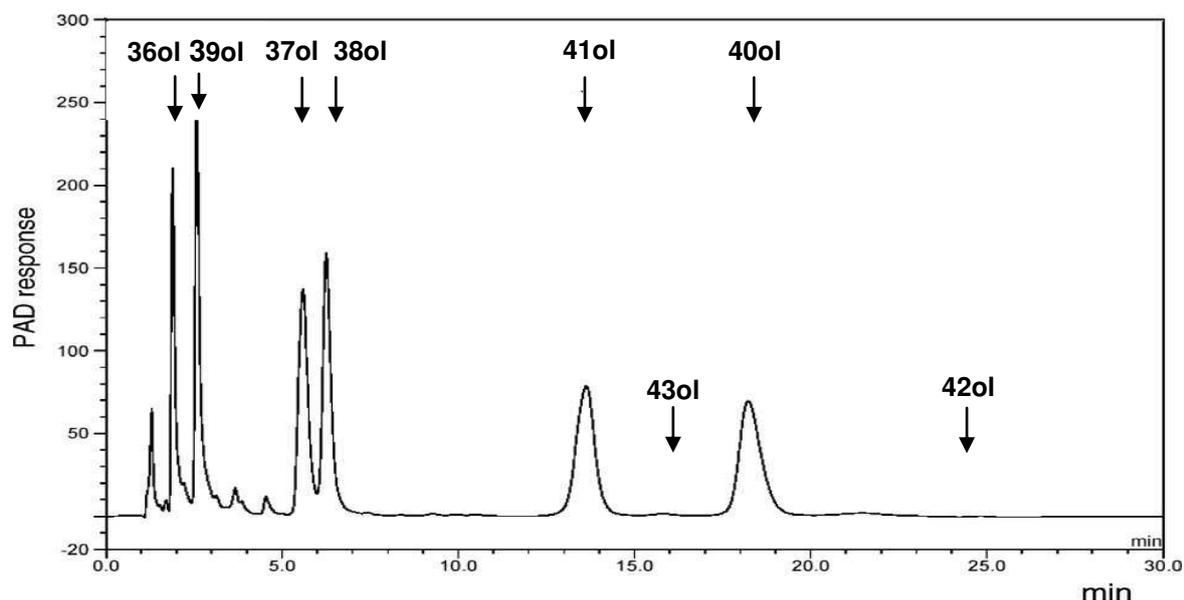


Figura 2-2 Cromatografía por HPAEC-PAD, CarboPac PA-20 eluída con 80 mM de NaOH (condición 1 de elución) de una mezcla de los oligosacáridos alditos químicamente sintetizados. Se marcan las posiciones de **42ol** y **43ol** que fueron analizadas respecto de **40 ol** y **41 ol** en otra cromatografía.

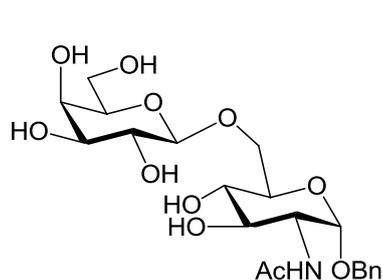
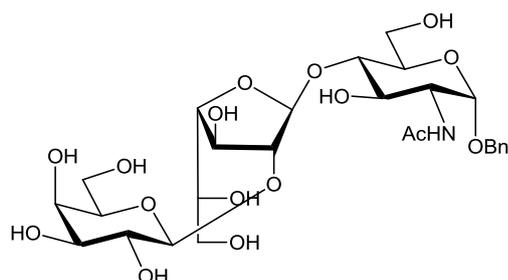
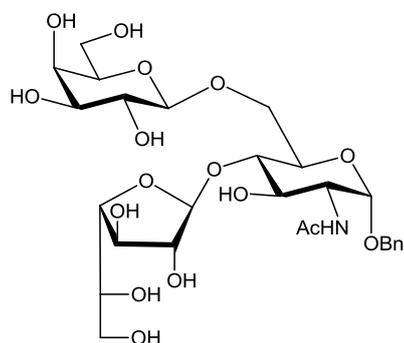
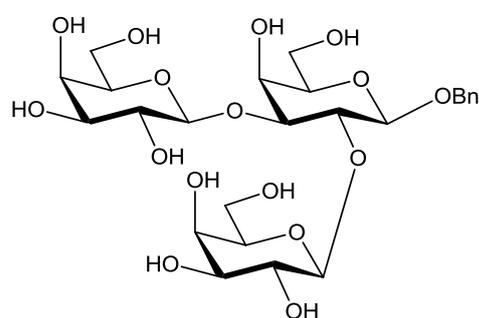
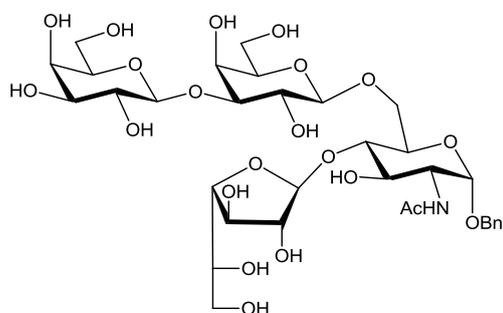
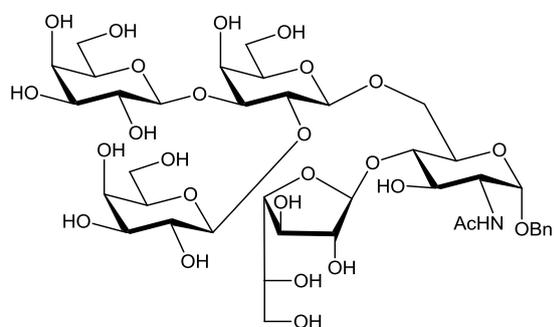
Resultados comparables para los tiempos de retención relativos se obtuvieron para los derivados sialilados producto de la reacción con TcTS, con algunas excepciones (**Tabla 2-1**).

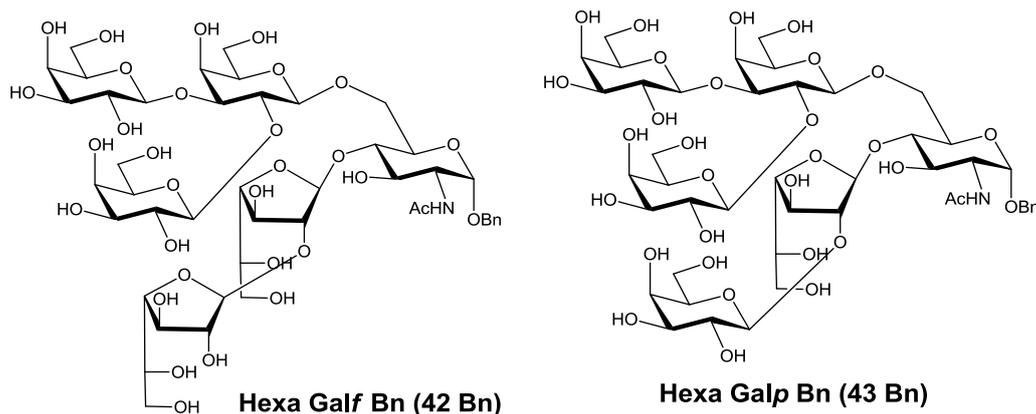
Estudio del comportamiento de los oligosacáridos sintéticos como aceptores de ácido siálico en la reacción de trans-sialidasa.

Como ya se mencionó los parásitos pertenecientes a las cepas del grupo DTU I son menos infectivos que los que pertenecen a otros grupos (por ejemplo DTU II) y se caracterizan por la presencia de *Gal*f, además de *Gal*p, como extremos terminales no reductores. Dado que solo la galactosa en configuración piranósica es aceptora de ácido siálico y la sialilación estaría relacionada con la infectividad se planteó la hipótesis de que la presencia de *Gal*f podría interferir la sialilación de las mucinas.

En este capítulo se describen los resultados de los estudios cinéticos en la reacción de sialilación de los oligosacáridos (**36-41**, **Figura 2-3**) (los hexasacáridos no fueron analizados en su forma libre). El valor de K_m para el disacárido $Galp(\beta 1 \rightarrow 6)-GlcNAc$ (**43**) también fue estudiado para comparación. En un trabajo previo se había

demostrado que el lactitol es un mejor aceptor de ácido siálico que la lactosa y la *N*-acetilactosamina y es un buen inhibidor en la reacción de trans-sialidasa (Agustí *et al.*, 2004) por lo cual también fueron calculados los K_m aparentes de los azúcares alditoles (**36ol-43ol**, **Figura 2-3**) y los bencil glicósidos (**36Bn-43Bn**, **Figura 2-3**). Estos oligosacáridos también fueron ensayados como inhibidores competitivos de la reacción de transferencia de ácido siálico desde la 3'sialilactosa (3'SL) hacia el sustrato aceptor convencional *N*-acetilactosamina. Las reacciones fueron analizadas por HPAEC-PAD bajo dos condiciones diferentes (**Tabla 2-1**).

**Di Bn (36 Bn)****Tri-l Bn (37 Bn)****Tri-r Bn (38 Bn)****Tri-Galp Bn (39 Bn)****Tetra Bn (40 Bn)****Penta Bn (41 Bn)**



Di	36	Gal β (1 \rightarrow 6)GlcNAc
	36 ol	Gal β (1 \rightarrow 6)GlcNAcol
	36 Bn	Gal β (1 \rightarrow 6)GlcNAcOBn
Tri-l	37	Gal β (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc
	37 ol	Gal β (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAcol
	37 Bn	Gal β (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAcOBn
Tri-r	38	Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAc
	38 ol	Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcol
	38 Bn	Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcOBn
Tri Galp	39	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal
	39 ol	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Galol
	39 Bn	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]GalOBn
Tetra	40	Gal β (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAc
	40 ol	Gal β (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcol
	40 Bn	Gal β (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcOBn
Penta	41	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAc
	41 ol	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcol
	41 Bn	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcOBn
HexaGalf	42 ol	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcol
	42 Bn	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcOBn
HexaGalp	43 ol	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcol
	43 Bn	Gal β (1 \rightarrow 2)[Gal β (1 \rightarrow 3)]Gal β (1 \rightarrow 6)[Gal β (1 \rightarrow 2)Gal β (1 \rightarrow 4)]GlcNAcOBn

Figura 2-3 Estructuras y abreviaturas de los oligosacáridos, alditoles y bencil glicósidos analizados en este trabajo.

En la mayoría de los casos, la reacción de transferencia resultó rápida y alcanzó el equilibrio luego de 15 minutos, excepto para los derivados de hexaGalp **43ol** y **43Bn** que mostraron una cinética diferente debido a la obtención de más de un producto monosialilado (ver sección posterior en este capítulo). En la **tabla 2-1** se registran los tiempos de retención relativos a la 3´SL de todos los oligosacáridos sialilados obtenidos en la reacción de TcTS. Como se esperaba, todos los alditoles y los bencil glicósidos sialilados resultaron menos retenidos que los oligosacáridos libres sialilados. De los tres trisacáridos sialilados, aquel que contiene solo Galp (StriGalp (**S39**): Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)-Galp($\beta 1 \rightarrow 2$)-[Galp($\beta 1 \rightarrow 3$)]-Galp) eluyó antes que los otros dos que contienen Galf (Stri-l (**S37**): Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)-Galp($\beta 1 \rightarrow 2$)-Galf($\beta 1 \rightarrow 4$)-GlcNAc) y Stri-r (**S38**): Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$)-Galp($\beta 1 \rightarrow 6$)-[Galf($\beta 1 \rightarrow 4$)]-GlcNAc). A su vez, los derivados sialilados del tri-r **38** que contienen una Galf externa eluyeron a tiempos de retención mayores que aquellos derivados sialilados del tri-l **37** que contiene una Galf interna, con excepción del alditol **38ol** sialilado bajo la condición 2 de elución. Es interesante que una posterior ramificación del tetrasacárido **40** para dar el pentasacárido **41**, causara una disminución en los tiempos de retención para todos sus derivados sialilados en ambas condiciones de elución. La adición de otra unidad de Galp para dar los hexaGalp **43** no modificaba significativamente los tiempos de retención de los derivados monosialilados respecto de los tiempos de los derivados sialilados del pentasacáridos **41**.

Para los dos hexasacáridos isómeros la sialilación se estudió solo para sus alditoles (**42ol-43ol**) y sus bencil glicósidos (**42Bn-43Bn**). Como puede observarse para el caso de los derivados del hexasacárido que contiene 3 Galp externas, se pudieron detectar 3 compuestos sialilados, lo cual se discutirá más adelante. Como era de esperar, los tiempos de retención de los derivados sialilados del hexaGalf son bastante mayores que los del hexaGalp en las condiciones utilizadas. Los mayores tiempos de retención para el último caso (**43ol y 43 Bn**) corresponden a derivados disialilados.

Tabla 2-1 Tiempos de retención relativos a 3'SL (tr= 7,8-8,3 min (condición 2) y 13,6-14,3 min (condición 3)), de los oligosacáridos sintéticos sialilados de mucinas de *T. cruzi* en HPAEC-PAD bajo 2 condiciones diferentes.

Compuesto		Tiempos de retención	
		Condición 2	Condición 3
Di	S36	0,95	0,94
	S36 ol	0,45	0,50
	S36 Bn	0,55	0,58
Tri-l	S37	2,94	1,39
	S37 ol	1,26	0,92
	S37 Bn	1,13	0,90
Tri-r	S38	3,71	1,55
	S38 ol	0,88	0,94
	S38 Bn	1,55	1,07
TriGalp	S39	1,34	1,10
	S39 ol	0,54	0,60
	S39 Bn	0,72	0,75
Tetra	S40	3,91	1,65
	S40 ol	2,29	1,15
	S40 Bn	2,46	1,20
Penta	S41	2,95	1,39
	S41 ol	0,81	0,97
	S41 Bn	0,87	0,95
HexaGalf	S42 ol	2,91	1,31
	S42 Bn	2,73	1,33
HexaGalp	S43 ol	0,71, 0,78, 1,89	0,94, 0,96, 1,49
	S43 Bn	0,68, 0,74, 2,02	0,89, 0,91, 1,49

Con el fin de cuantificar la afinidad relativa de la TcTS hacia los sustratos estimamos el K_m aparente para cada oligosacárido aceptor (**Tabla 2-2**). Galp($\beta 1 \rightarrow 6$)-GlcNAcol (**36ol**), Galp($\beta 1 \rightarrow 2$)-Gal $f(\beta 1 \rightarrow 4)$ -GlcNAcol (**37ol**) y Galp($\beta 1 \rightarrow 6$)-[Gal $f(\beta 1 \rightarrow 4)$]-GlcNAol (**38ol**) presentaron valores de K_m similares dentro del mismo rango que el lactitol (0,05mM) e incluso mejores que triGalp **39ol** que no tiene Gal f . En la **Figura 2-4** se ejemplifica el análisis realizado. El grado de reacción enzimática se analizó midiendo por HPAEC-PAD la cantidad de producto sialilado que se obtuvo en 15 minutos de reacción, cuando se incubó 1 mM de 3'SL, distintas concentraciones del oligosacárido a analizar y 300 ng de enzima. Luego se determinaron los K_m gráficamente por el método de Lineweaver-Burk.

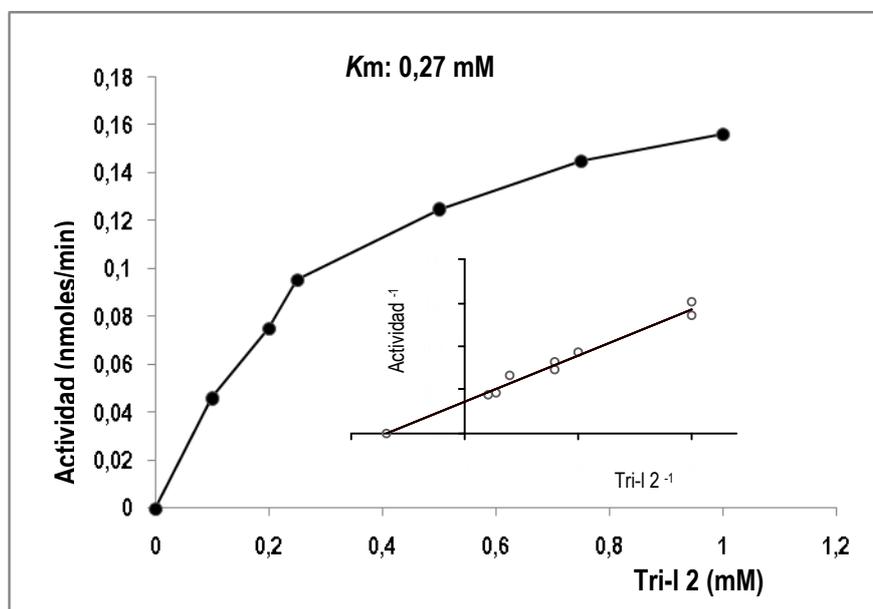


Figura 2-4 Constante de Michaelis-Menten para el Tri-I **37**. Diferentes concentraciones de sustrato se incubaron con TcTS y 1 mM de 3'SL y se analizaron por HPAEC-PAD. Los valores de K_m aparentes fueron calculados por los gráficos de Lineweaver-Burk

Estos resultados mostraron que la presencia de Gal f tanto interna como externa, no interfirió con la reacción. Estos compuestos también mostraron una alta eficiencia catalítica determinada por el valor relativo de V_{max}/K_m . El tetrasacárido alditol **40ol**, pentasacárido alditol **41ol**, y los hexasacáridos alditoles hexaGal f **42ol** y hexaGalp **43ol**, también conteniendo Gal f externa o interna, resultaron ser aceptores más débiles que los alditoles más pequeños.

Tabla 2-2 Parámetros cinéticos en la reacción de TcTS de los oligosacáridos de las mucinas.

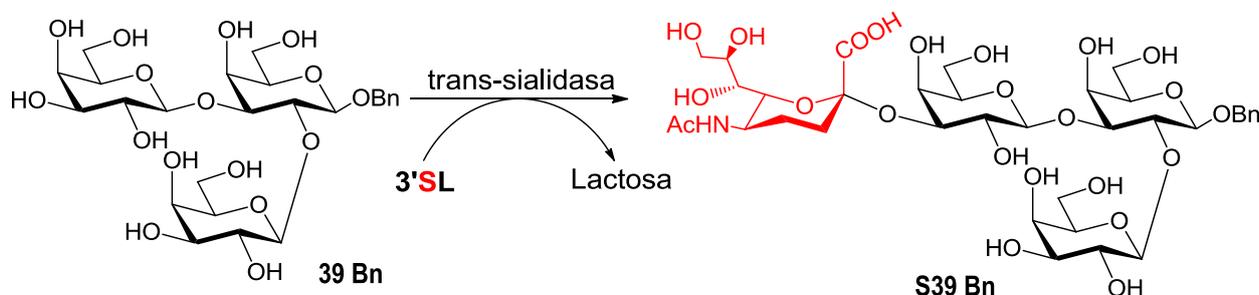
Compuesto		<i>K_m</i> (mM)	<i>V</i> máx (nmoles/mg.min)	Relative <i>V</i> max ^a	Relative <i>V</i> max/ <i>K_m</i>	<i>IC</i> ₅₀ (mM)
Di	36	0,17 ± 0,03	0,409 ± 0,031	1	5,88	2,22 ± 0,17
	37ol	0,08 ± 0,02	0,077 ± 0,005	0,19	2,35	0,98 ± 0,03
	38Bn	0,05 ± 0,01	0,132 ± 0,047	0,32	6,46	1,11 ± 0,01
Tri-l	37	0,27 ± 0,01	0,217 ± 0,006	0,53	1,96	4,43 ± 0,15
	37ol	0,09 ± 0,01	0,260 ± 0,024	0,64	7,07	1,67 ± 0,09
	37Bn	0,31 ± 0,03	0,225 ± 0,001	0,55	4,23	0,85 ± 0,01
Tri-br	38	0,15 ± 0,01	0,091 ± 0,003	0,22	1,48	1,33 ± 0,12
	38ol	0,08 ± 0,01	0,476 ± 0,020	1,16	14,56	0,94 ± 0,10
	38Bn	0,15 ± 0,02	0,009 ± 0,001	0,02	0,15	0,86 ± 0,08
TriGalp	39	0,08 ± 0,01	0,121 ± 0,001	0,30	3,71	0,86 ± 0,03
	39ol	0,25 ± 0,03	0,129 ± 0,008	0,31	1,26	0,93 ± 0,01
	39Bn	0,17 ± 0,01	0,089 ± 0,070	0,22	1,28	1,13 ± 0,05
Tetra	40	2,35 ± 0,50	0,223 ± 0,017	0,55	0,23	0,76 ± 0,08
	40ol	0,18 ± 0,01	0,084 ± 0,007	0,21	1,14	1,26 ± 0,12
	40Bn	1,07 ± 0,05	0,055 ± 0,003	0,13	0,13	1,14 ± 0,10
Penta	41	0,17 ± 0,01	0,070 ± 0,003	0,17	1,01	0,85 ± 0,07
	41ol	0,82 ± 0,05	0,146 ± 0,001	0,36	0,44	0,61 ± 0,02
	41Bn	0,10 ± 0,01	0,071 ± 0,003	0,17	1,73	0,70 ± 0,03
HexaGal_f	42ol	0,32 ± 0,21	0,058 ± 0,014	0,14	0,43	0,49 ± 0,05
	42Bn	0,12 ± 0,01	0,251 ± 0,002	0,61	5,12	0,34 ± 0,09
HexaGal_p	43ol	0,46 ± 0,06	0,501 ± 0,098	1,22	2,66	n.d
	43Bn	0,40 ± 0,01	0,969 ± 0,034	2,34	5,85	n.d

Estudios del comportamiento de los oligosacáridos sintéticos como inhibidores de la sialilación de *N*-acetillactosamina en la reacción de la *trans*-sialidasa.

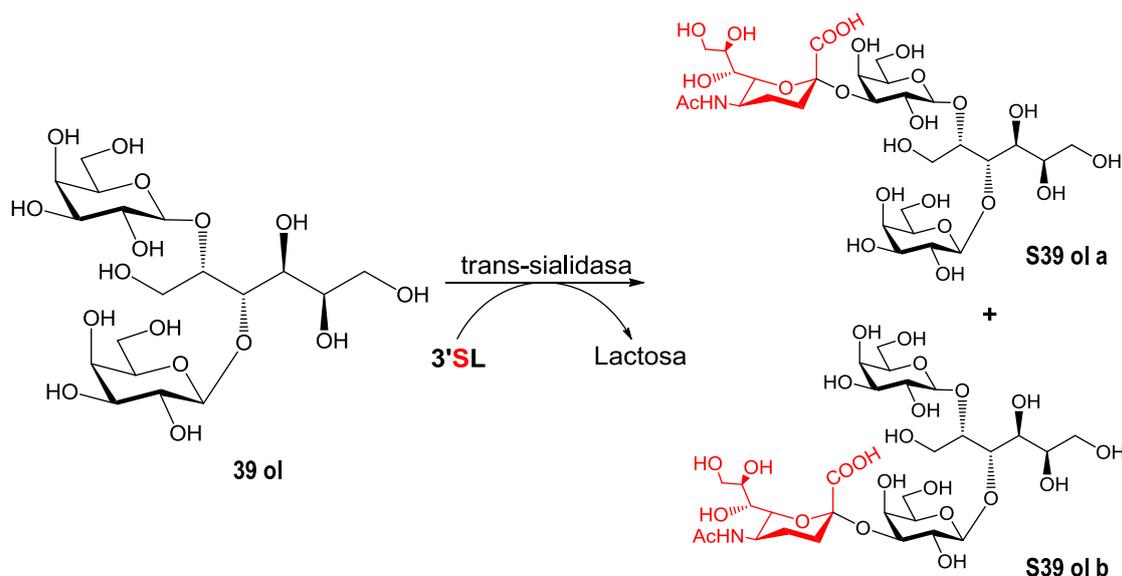
Se estudió la inhibición de la sialilación del sustrato natural *N*-acetillactosamina en presencia de los oligosacáridos sintéticos y sus derivados (**Tabla 2-2**). Todos los compuestos resultaron ser inhibidores débiles con valores de IC_{50} entre 0,34 y 4,43 mM siendo el mejor el hexaGal f **42**, tanto el alditol como el bencilado. También el pentasacárido **41** y derivados mostraron valores de IC_{50} del mismo orden. Este oligosacárido es el más abundante en las mucinas del parásito en las formas epimastigote y metacíclico (Acosta Serrano *et al.*, 1995). Al igual que lo indicado anteriormente, no se pudo observar correlación entre los valores de inhibición mostrados y la presencia de Gal f .

***Trans*-sialilación de bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**42 Bn**) y caracterización del producto obtenido.**

En nuestro laboratorio se había demostrado la sialilación selectiva del trisacárido bencilado triGal p (**39Bn**) (Agustí *et al.*, 2005). Este trisacárido presenta dos unidades β -D-Gal p aceptoras de ácido siálico y se había demostrado que la sialilación ocurría en la unidad β -D-Gal p (1 \rightarrow 3) menos impedida (**Esquema 2-2**). En cambio cuando se utilizaba el trisacárido **39ol**, este podía sialilarse en una u otra unidad y esto podría deberse a que al tener el extremo abierto, la conformación zig-zag adoptada permite que ambas unidades se encuentren menos impedidas y disponibles para TcTS (**Esquema 2-3**).

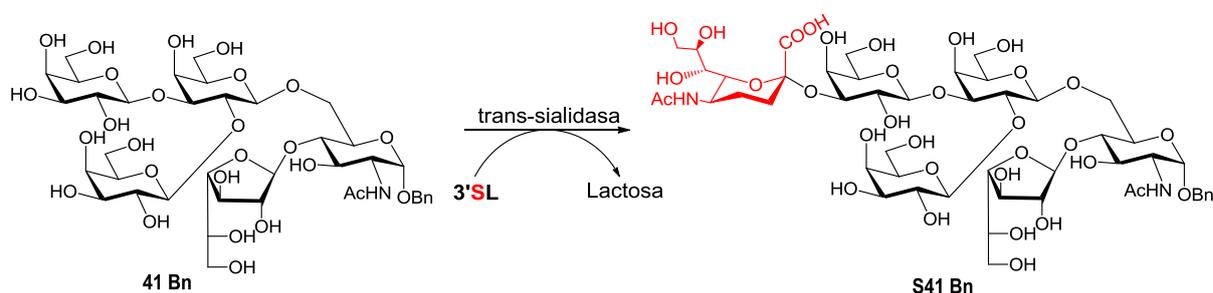


Esquema 2-2



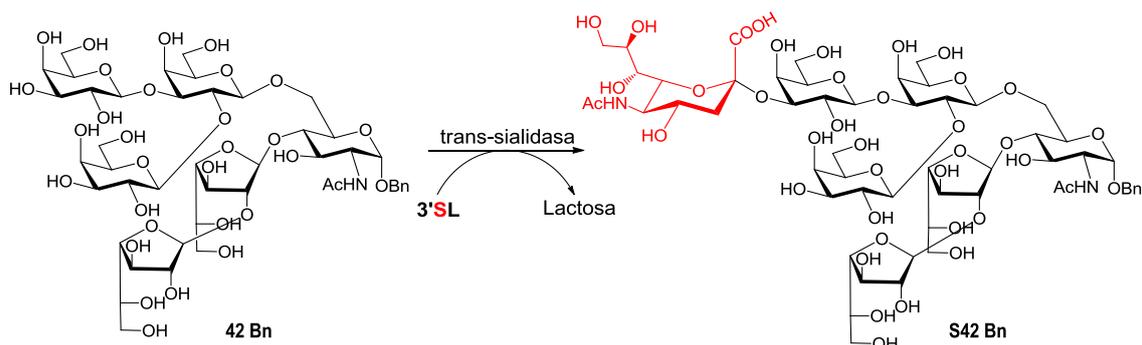
Esquema 2-3

Por otro lado, el pentasacárido **41 Bn**, que tiene triGalp como unidad terminal, también dió un único producto sialilado como resultado de la reacción con TcTS, aceptando ácido siálico en la unidad menos impedida β -D-Galp(1 \rightarrow 3) (Mendoza *et al.*, 2006) (**Esquema 2-4**).



Esquema 2-4

Con el fin de determinar si el sitio de unión de ácido siálico en el hexasacárido hexaGalf coincidía con el sitio observado para el caso del trisacárido triGalp **39 Bn** y el del pentasacárido **41 Bn**, se llevó a cabo la reacción de sialilación preparativa, empleando como sustrato aceptor el bencil glicósido de hexaGalf **42 Bn** sintetizado por Kashiwagi (Kashiwagi *et al.*, 2012). En este caso también se utilizó **3'SL** como sustrato donador de ácido siálico (**Esquema 2-5**).



Esquema 2-5

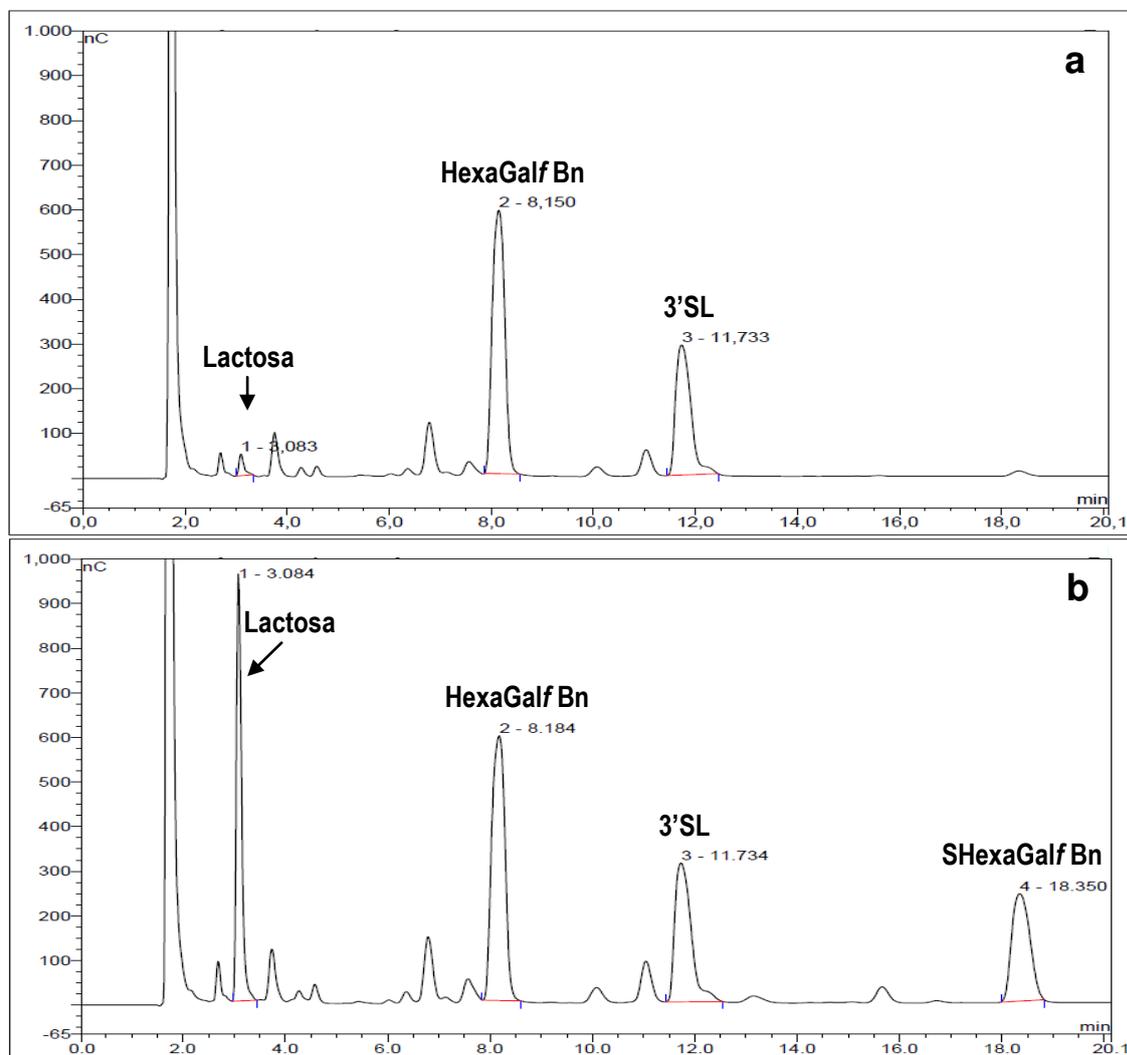


Figura 2-5 Análisis de la reacción de TcTS usando hexaGal f Bn **42Bn** como oligosacárido aceptor de ácido siálico. Condiciones de elución 4. **a.** Control sin enzima. **b.** con TcTS.

Se eligió el compuesto bencilado pues la presencia de la aglicona hidrofóbica facilita la purificación y por otro lado fija la configuración del extremo reductor. La reacción, analizada por HPAEC-PAD, mostró la obtención de un único producto de sialilación (**Figura 2-5**) y no se evidenció producto disialilado. El producto de reacción se purificó con resina AG1X2 (forma acetato) y el bencil hexaGal*f* sialilado **S42 Bn** se eluyó con buffer de acetato de piridinio 200 mM, pH 5,0. Por evaporación de solvente se obtuvo **S42 Bn** el cual se caracterizó por espectrometría de masa y por espectroscopía RMN mono y bidimensional.

El peso molecular obtenido por espectrometría de masa de alta resolución (ESI-TOF), confirmó que **ShexaGal*f* Bn** era el producto de monosialilación, por el valor de m/z del pico que correspondía a $[M + Na]^+$: 1435,4804. También se observaron los picos correspondientes a $[M + Na - Gal*f*]^+$, $[M - Gal*f* - OBn]^+$ y $[M + Na - Gal*f* - S]^+$ a 1273,4354; 1144,3876 y 982,3339 respectivamente.

El espectro de RMN 1H de **ShexaGal*f* Bn** (**Figura 2-6**) mostró, entre otros picos, las señales correspondientes a los protones anoméricos a δ 5,47 ppm (H-1**B**), δ 5,24 ppm (H-1**C**), δ 4,96 ppm (H-1**A**), δ 4,85 ppm (H-1**E**), δ 4,71 ppm (H-1**F**) y δ 4,54 ppm (H-1**D**), valores similares al del hexaGal*f* Bn sin sialilar caracterizado recientemente (Kashiwagi *et al*, 2012), difiriendo en la señal correspondiente al H-1**F** que aparecía a δ 4,66 ppm en el hexasacárido y se desplazó hacia campos más bajos (δ 4,71 ppm) como resultado de la sialilación. Conjuntamente se observaron dos señales diagnósticas que indicaban la presencia de una única unidad de ácido siálico: el triplete a δ 1,81 ppm (H-3 axial) con $J=12,1$ Hz y el doblete a δ 2,76 ppm con $J_{3,3}= 12,4$ Hz y $J_{3,4}= 4,6$ Hz (H-3 ecuatorial) característicos del grupo desoxi en C-3, ambas integrando para 1 H. Por otro lado, la presencia del singulete a δ 2,02 ppm que integraba para 3 H correspondiente al acetamido del C-5 del ácido siálico también confirmó la monosialilación.

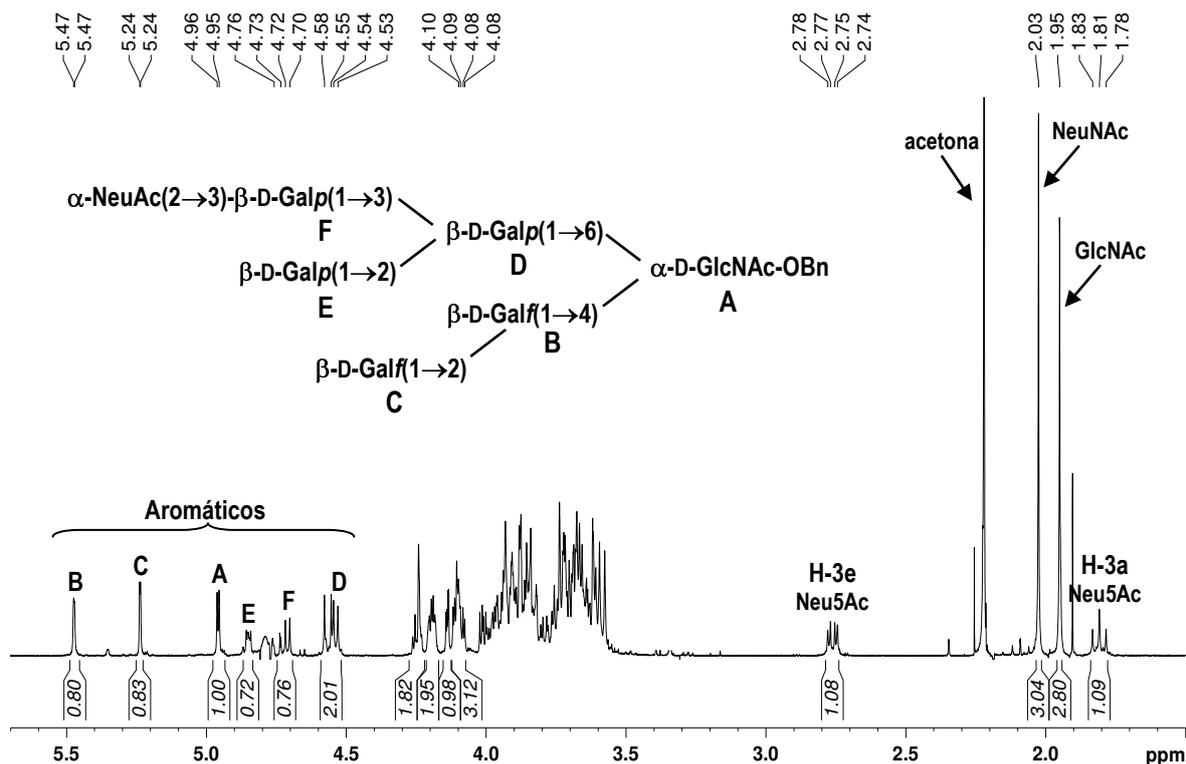


Figura 2-6 Espectro de RMN ^1H para ShexaGalF Bn.

La selectividad de la transferencia de ácido siálico hacia la unidad Galp menos impedida se determinó por experimentos de RMN bidimensionales (COSY, TOCSY y HSQC). Estos mostraron como el H-3 de la unidad **F**, se desplazó desde δ 3,68-3,59 ppm (Kashiwashi *et al.*, 2012) hacia δ 4,09 ppm con valores de constantes de acoplamiento típicas ($J_{2,3} = 8$ Hz y $J_{3,4} = 3,4$ Hz) como resultado de la sialilación en esa posición. Asimismo, este H-3 **F** de la unidad sialilada correlacionó en el espectro de TOCSY con la señal del H-1 **F** y H-2 **F** a δ 3,64 ppm (Figura 2-7). Estos desplazamientos son similares a los encontrados por Agusti *et al.*, para el pentasacárido **41 Bn** sialilado (Agusti *et al.*, 2005).

Se demostró así que al igual que lo observado para el trisacárido bencilado triGalp **39 Bn** y para el pentasacárido bencilado **41 Bn**, el sitio de sialilación es el C-3 de la unidad $\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow3)$, que se encontraría menos impedida y, por lo tanto, más accesible al sitio de reconocimiento de la TcTS.

Por extensión se puede concluir que la sialilación del hexasacárido hexaGalF/Bn **42 Bn** es selectiva y como producto solo se obtendría el compuesto monosialilado.

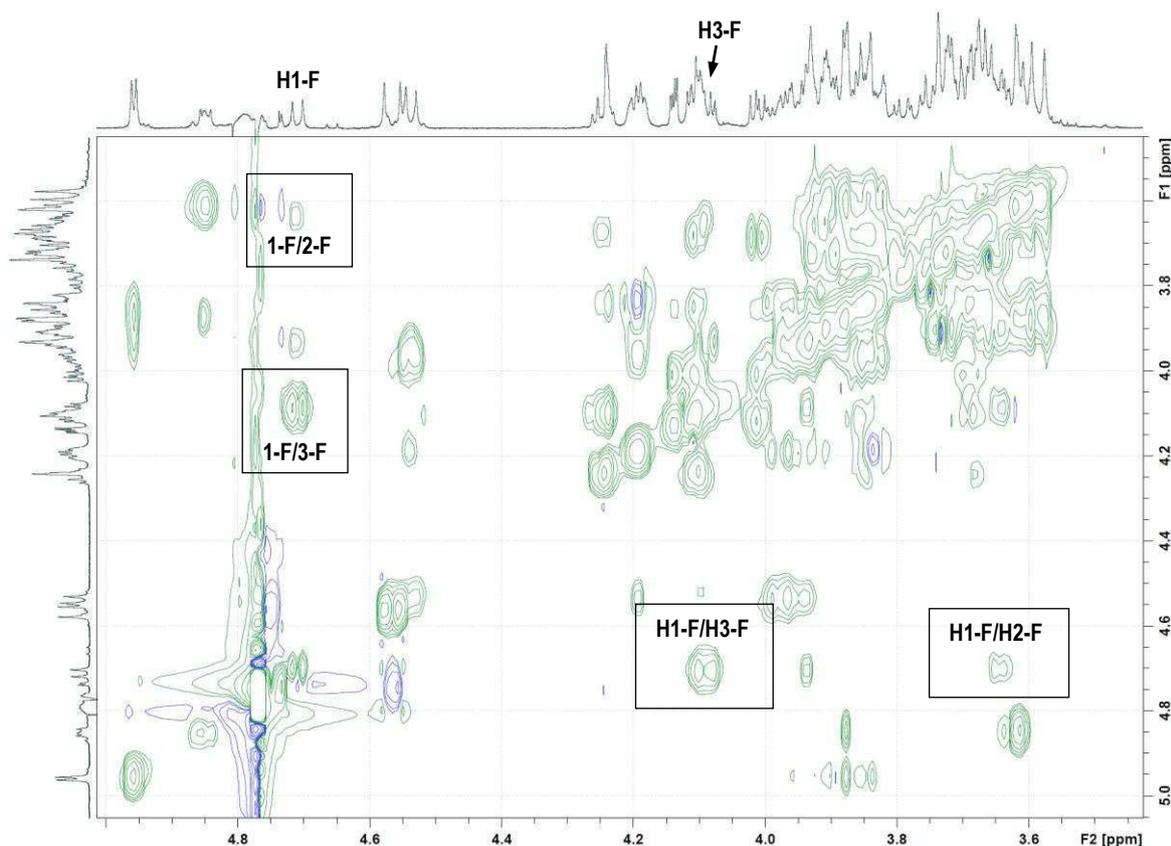


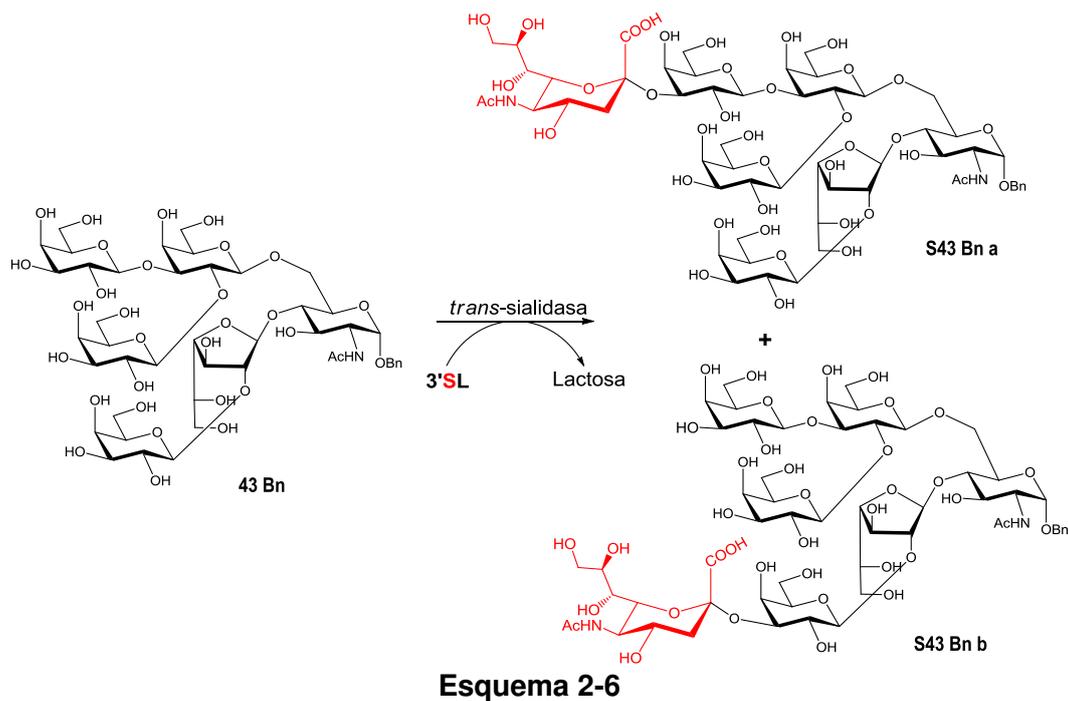
Figura 2-7 Fragmento del espectro TOCSY de **ShexaGal/Bn S42 Bn**. Las correlaciones entre protones correspondientes a la unidad Galp aceptora que se desplazaron luego de la reacción de sialilación aparecen recuadradas.

Análisis del bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (43Bn) y β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactofuranosil(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucitol (43ol) como aceptores de ácido siálico en la reacción catalizada por TcTS.

El hexasacárido hexaGalp (**43**) contiene el trisacárido triGalp (**39**): Galp(β 1 \rightarrow 2)[Galp(β 1 \rightarrow 3)]-Galp unido (β 1 \rightarrow 6) al trisacárido lineal bencilado **37 Bn**: Galp(β 1 \rightarrow 2)-Galp(β 1 \rightarrow 4)-GlcNAcOBn, ambos buenos sustratos aceptores de ácido siálico en la reacción de TcTS (**Tabla 2-2**). Teniendo en cuenta esta información, se

previeron dos productos monosialilados y uno disialilado como probables productos de sialilación en la reacción de TcTS. Dentro de los monosialilados podemos encontrar uno en el cual una unidad de ácido siálico se une selectivamente a la Galp externa menos impedida del extremo triGalp, y otro en el cual el ácido siálico se une al extremo Galp externo que se encuentra unido ($\beta 1 \rightarrow 2$) a Galf (**Esquema 2-6**). El producto disialilado sería aquel que tenga una unidad de ácido siálico en las unidades más expuestas de Galp.

Con el fin de determinar si la propuesta era correcta se llevó a cabo la reacción de sialilación utilizando los hexaGalp **43ol** y **43Bn** sintetizados por Mendoza (Mendoza, Tesis 2009) como sustratos aceptores, 3'SL como donador de ácido siálico y la TcTS recombinante. Se hicieron varias incubaciones de prueba utilizando diferentes relaciones de 3'SL: hexasacárido y en ambos casos se observó que si la relación era 1:1 (mM), en 15 minutos de reacción solo se obtenía un producto monosialilado (tr **S43ol**: 10,10 minutos y tr **S43Bn**: 10,11 minutos). Decidimos probar a distintos tiempos (30, 45, 60, 90 y 120 minutos) y el resultado fue el mismo. Luego se utilizó una relación 1: 0,5 (3'SL: hexasacárido) (mM) para ver si utilizando un exceso de sustrato donador se podía observar la presencia de producto disialilado. Se monitoreó a los 15 minutos de reacción y se observó, para el caso de **43 Bn**, la aparición de un producto mayoritario con tiempo de retención igual al observado anteriormente (10,11 minutos) junto con dos compuestos minoritarios a tr: 10,58 minutos, que por la similitud de los tiempos de retención consideramos que se trataba del otro compuesto monosialilado, y otro a tr: 20,05 minutos, que debido a su mayor tiempo de retención consideramos que se trataba del producto disialilado. También se observó la correspondiente disminución del pico de 3'SL (tr: 12,58 minutos) y el aumento en el pico de la lactosa (tr: 3 min). El sustrato aceptor presenta tr: 3,5 minutos (**Figuras 2-8 a - b**).



Esquema 2-6

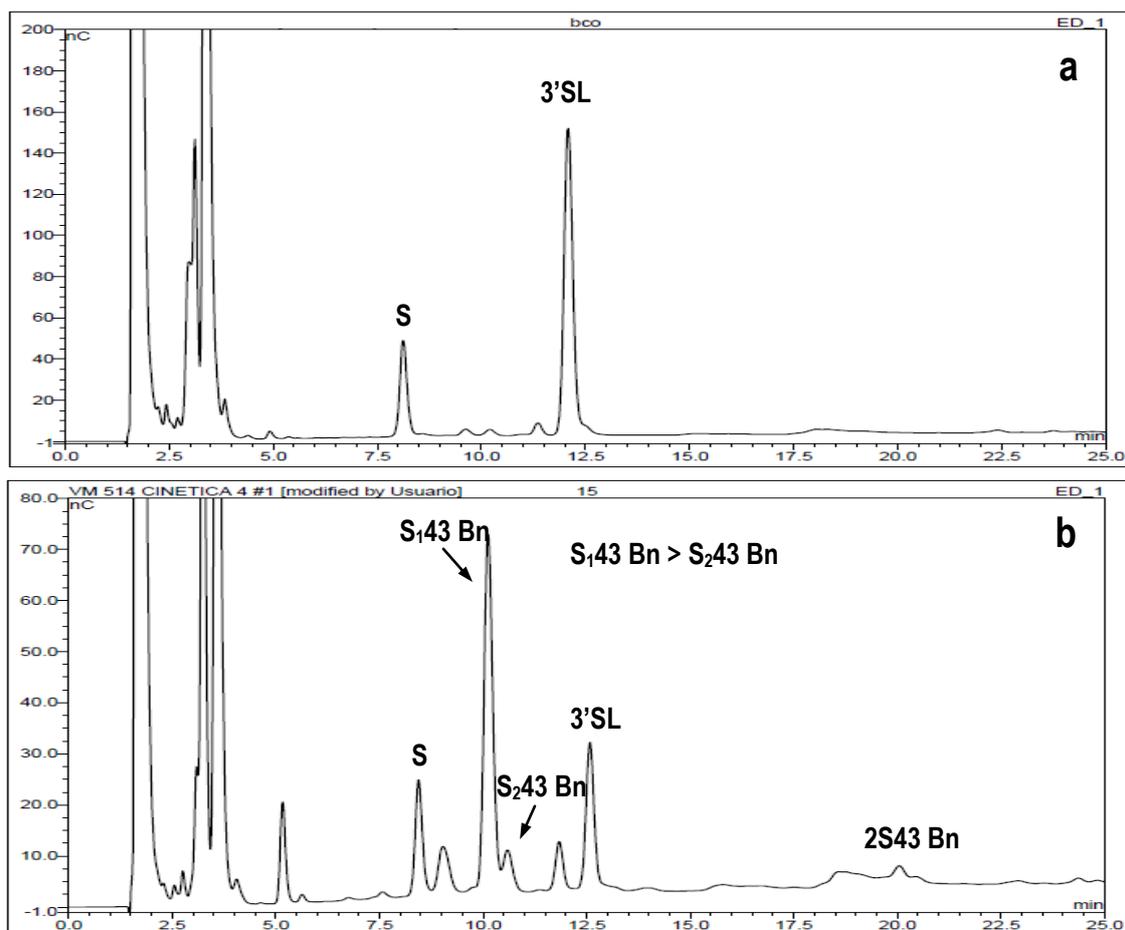
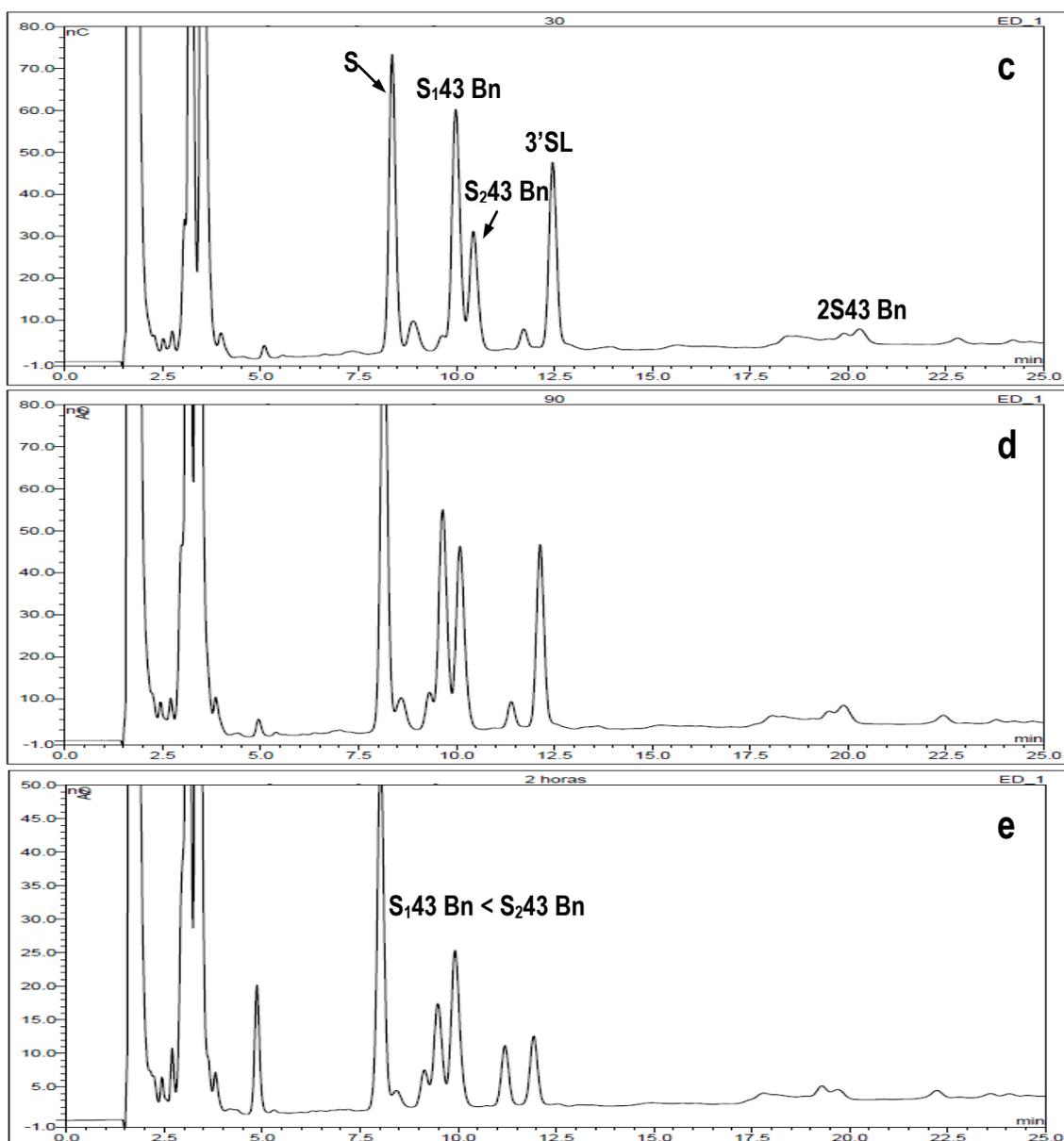


Figura 2-8 HPAEC-PAD de la reacción de sialilación de **43Bn**: **a.** blanco de reactivos a t: 0. **b.** t: 15 minutos de reacción con TcTS. Relación 3'SL: 43 Bn 1: 0,5 (mM). Condiciones de elución 4.

También probamos a distintos tiempos con incubaciones independientes para ver si la proporción de los mismos variaba con el tiempo de reacción (**Figura 2-8 c-e**). Como podemos observar a los 30 minutos de incubación, la proporción del **S₁hexaGalp S₁43Bn** disminuye a medida que el **S₂hexaGalp S₂43Bn** aumenta, mientras que al mismo tiempo disminuye el pico de 3'SL y aumenta el ácido siálico libre (**S**). Se observa que este comportamiento continúa por 90 minutos (**Figura 2-8 d**) y luego de 2 horas de reacción se invierte la relación **S₁43Bn:S₂43Bn** al mismo tiempo que disminuye considerablemente la proporción de 3'SL y no aumenta el compuesto disialilado. La proporción de ácido siálico es aún mayor (**Figura 2-8 e**).



Continuación Figura 2-8 HPAEC-PAD de la reacción de sialilación de **43Bn**: **c.** t: 30 minutos de reacción. **d.** t: 90 minutos de reacción. **e.** t: 2 horas de reacción. Condiciones de elución 4.

También puede observarse que la proporción de los compuestos que impurifican la 3'SL (tr: 5,0 y 11,2 minutos), al no ser sustratos de la TcTS, aumentan con el tiempo, con respecto de la 3'SL.

Para el caso del hexasacárido **43ol** se observó un patrón de sialilación similar. Luego de 15 minutos de reacción se observó la presencia de un producto monosialilado con el mismo tiempo de retención del **S43ol** (tr: 10,10 minutos) obtenido para la incubación con relación 1:1 a 15 minutos de reacción. También se observaron dos compuesto minoritarios a tr: 10,57 minutos y otro a tr: 18,93 minutos que, al igual que para el caso del **43Bn**, por la similitud de los tiempos de retención consideramos que se trataba del otro compuesto monosialilado, y el producto disialilado el de mayor tiempo de retención. (**Figura 2-9 a - b**)

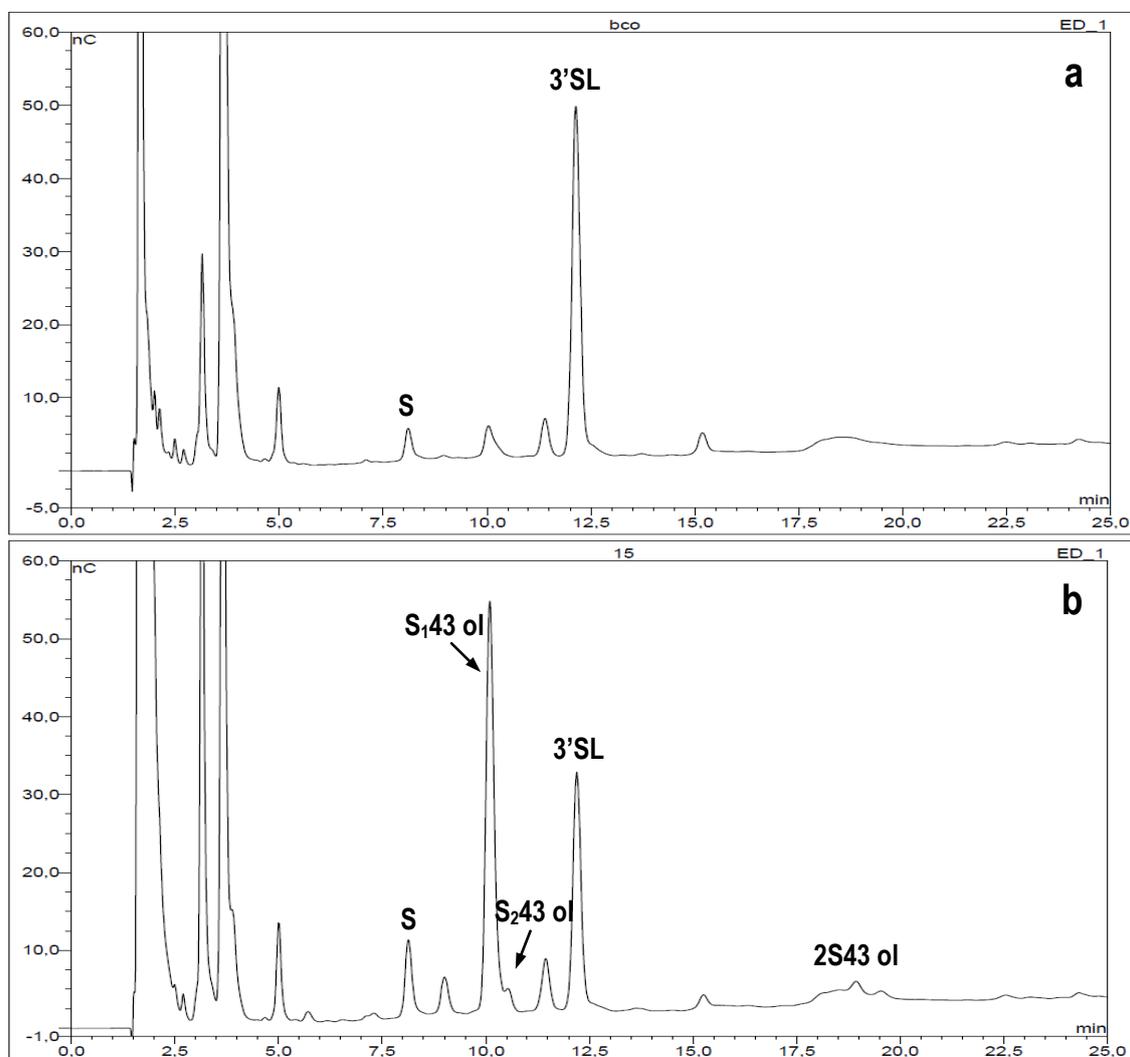
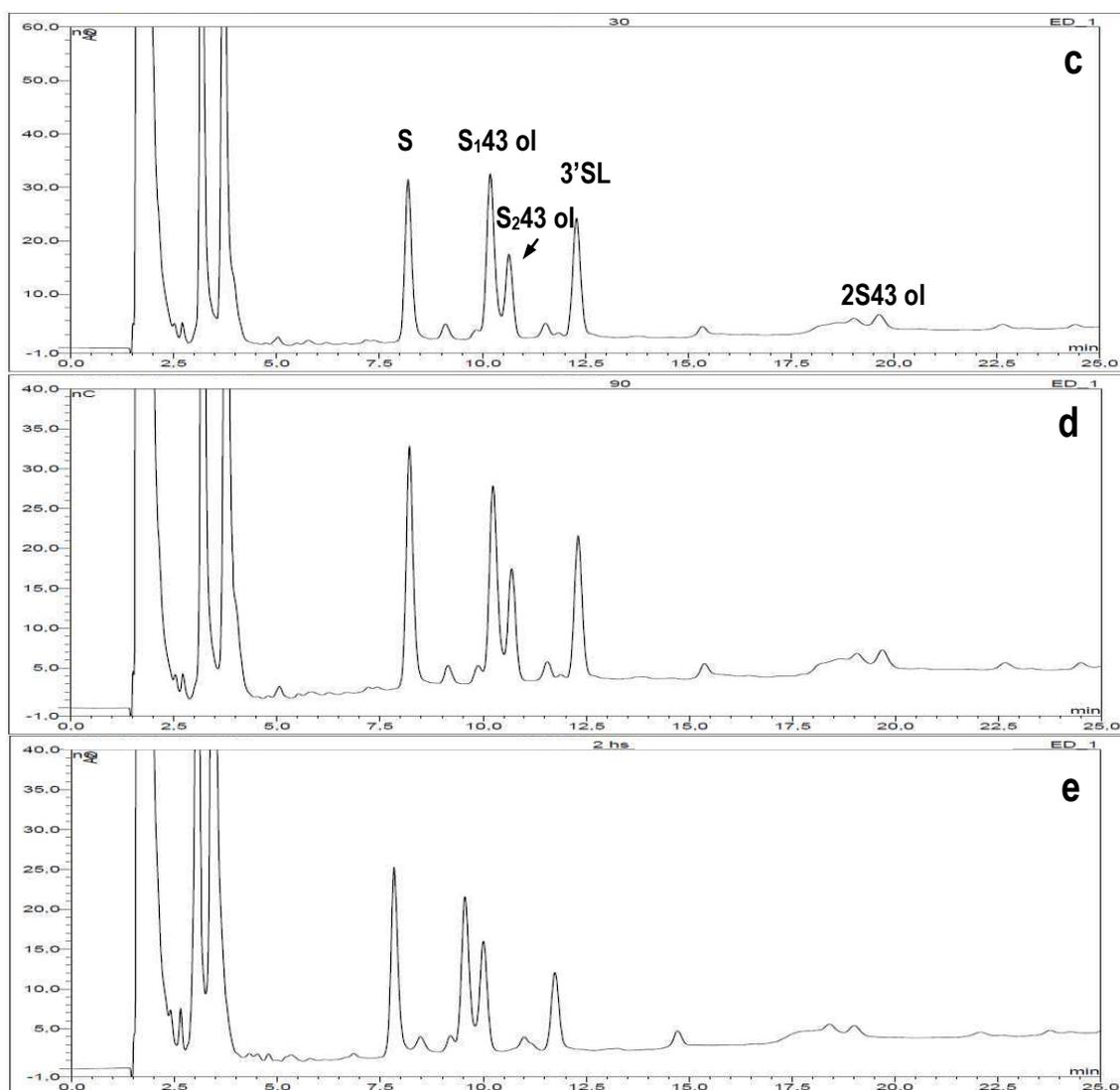


Figura 2-9 HPAEC-PAD de la reacción de sialilación de **43ol**: **a.** blanco de reactivos a t: 0. **b:** t: 15 minutos de reacción con TcTS. Condiciones de elución 4.

También probamos a distintos tiempos con incubaciones independientes para ver si la proporción de los mismos variaba con el tiempo de reacción (**Figura 2-9 c a Figura 2-9 e**). Al igual que para el caso de **43Bn**, a los 30 minutos de incubación, la proporción del **S₁hexaGalp S₁43ol** disminuyó a medida que el **S₂hexaGalp S₂43ol** aumenta, mientras que al mismo tiempo disminuye el pico de 3'SL y aumenta el ácido siálico libre (**S**). Este comportamiento se observó luego de 2 horas de reacción y contrariamente a lo observado para **43Bn**, la relación entre los monosialilados siempre se mantuvo **S₁43ol > S₂43ol**. Se observa que con el tiempo disminuye considerablemente la proporción de 3'SL y no aumenta el compuesto disialilado. La proporción de ácido siálico también es mayor con el tiempo aunque en menor grado que para el caso del **43Bn** (**Figura 2-9 c-e**).



Continuación Figura 2-9 HPAEC de la reacción de sialilación de **43ol**: **c.** t: 30 minutos de reacción. **d.** t: 90 minutos de reacción. **e.** t: 2 horas de reacción. Condiciones de elución 4.

Este comportamiento, para ambos hexasacáridos, nos demuestra que uno de los compuestos monosialilados se obtiene primero (el de menor tiempo de retención). Aparentemente la síntesis e hidrólisis del producto disialilado se mantiene en un equilibrio dinámico por lo que no varía la proporción en función del tiempo. Si bien los valores de K_m para las unidades componentes son del mismo valor, no podemos inferir cual Galp se sialilaría primero debido a que el comportamiento de los trisacáridos que lo constituyen pueden no reflejar el comportamiento que tendrían cuando estos se encuentran unidos. También se puede observar que el **S₁43ol** se hidroliza a menor velocidad que el **S₁43Bn**, probablemente el hecho de tener el extremo reductor de cadena abierta le confiere mayor estabilidad. Esto mismo explicaría la menor proporción del ácido siálico libre encontrado para el **43ol** respecto a **43 Bn** en la reacción de trans-sialidación.

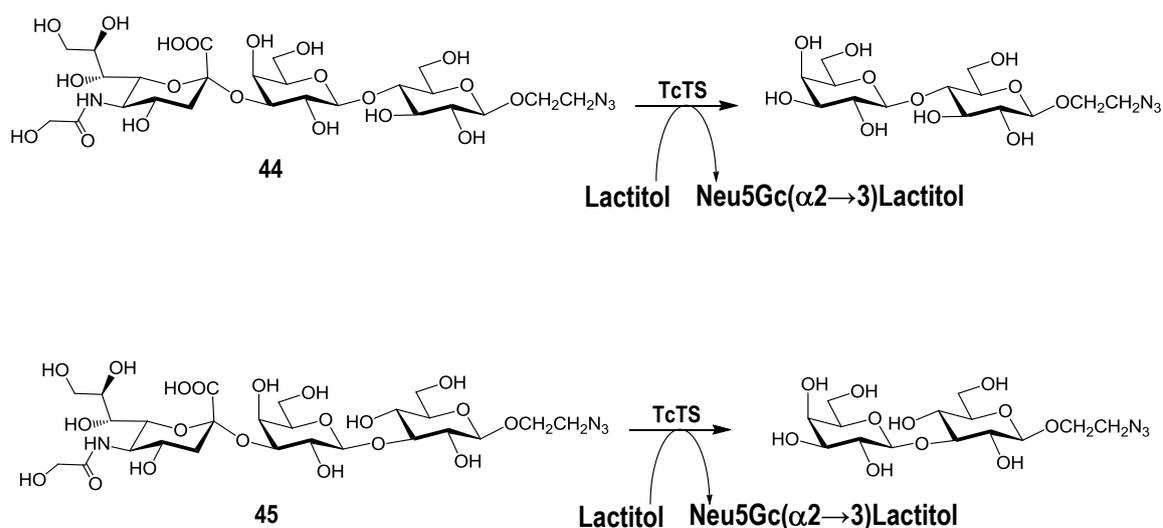
Estudio de la transferencia de N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) desde oligosacáridos hacia sustratos aceptores, mediada por TcTS.

En 1983 se describió por primera vez la presencia de los ácidos *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) en la superficie de *T. cruzi*, y se encontró que estos ácidos siálicos no eran sintetizados por el parásito (Schauer *et al.*, 1983; Pereira, 1983). Los autores sugirieron que la relación Neu5Ac/Neu5Gc obtenida en diferentes cepas reflejaba la composición del medio de cultivo. También se demostró que la forma tripomastigote obtenida del torrente sanguíneo de ratas contenían principalmente Neu5Gc, y se sugirió que la trans-sialidasa era la responsable de esta incorporación (Previato *et al.*, 1990). Se encontró en suero de ratón que un 98 % del total de ácido siálico correspondía al ácido *N*-glicolilneuramínico (Hara *et al.*, 1989). Sin embargo, hasta el momento solo se había probado que el Neu5Gc unido a oligosacáridos actuaba como donador en la reacción de trans-sialidasa de *Trypanosoma congolense*. En ese caso se utilizó el sobrenadante del medio de cultivo de células procíclicas como fuente de la enzima, con un sustrato marcado como aceptor (Engstler *et al.*, 1995).

En esta tesis mostramos por primera vez la habilidad de la enzima recombinante TcTS para transferir Neu5Gc desde un trisacárido Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Galp (β 1 \rightarrow R) hacia buenos sustratos aceptores tales como *N*-acetilactosamina (LNAc), lactosa (L) o lactitol (Lol).

Los dos oligosacáridos **44** y **45** fueron proporcionados por Ola Blixt y James Paulson (USA) a través del “Consortium for functional Glycomics”.

Se estudió la transferencia hacia una unidad terminal β -D-Galp usando Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Gal(β 1 \rightarrow 4)-Glc β -OCH₂CH₂N₃ (**44**) y Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Galp(β 1 \rightarrow 3)-GlcNAc β O-CH₂CH₂N₃ (**45**) como sustratos donores. La reacción se ejemplifica en el **Esquema 2-7**.



Esquema 2-7

El análisis fue realizado usando HPAEC-PAD, condición de elución 4 (**Figura 2-10**). Los tiempos de retención de ambos compuestos donores resultaron similares (tr **44**: 18,0 min. y tr **45**: 19,7 min.) bien separados del sustrato aceptor y su producto sialilado en cada caso. Como se esperaba, la presencia de un OH adicional, en el sustituyente del ácido siálico, incrementa el tiempo de retención del derivado *N*-glicolilado de aquel que contiene el grupo *N*-acetilo. Por ejemplo, el Neu5GcLactitol (tr: 22,6 min.) eluye más de tres veces más tarde que el Neu5AcLactitol (tr: 6,1 min.). Para los tres sustratos aceptores, la transferencia desde el trisacárido **44** (50-60%) resultó más eficiente que la realizada desde el trisacárido **45** (20-30%) (**Figura 2-10**). No se detectó Neu5Gc libre, que eluye a los 26 minutos, lo cual indicó que la TcTS no presentaba actividad hidrolasa.

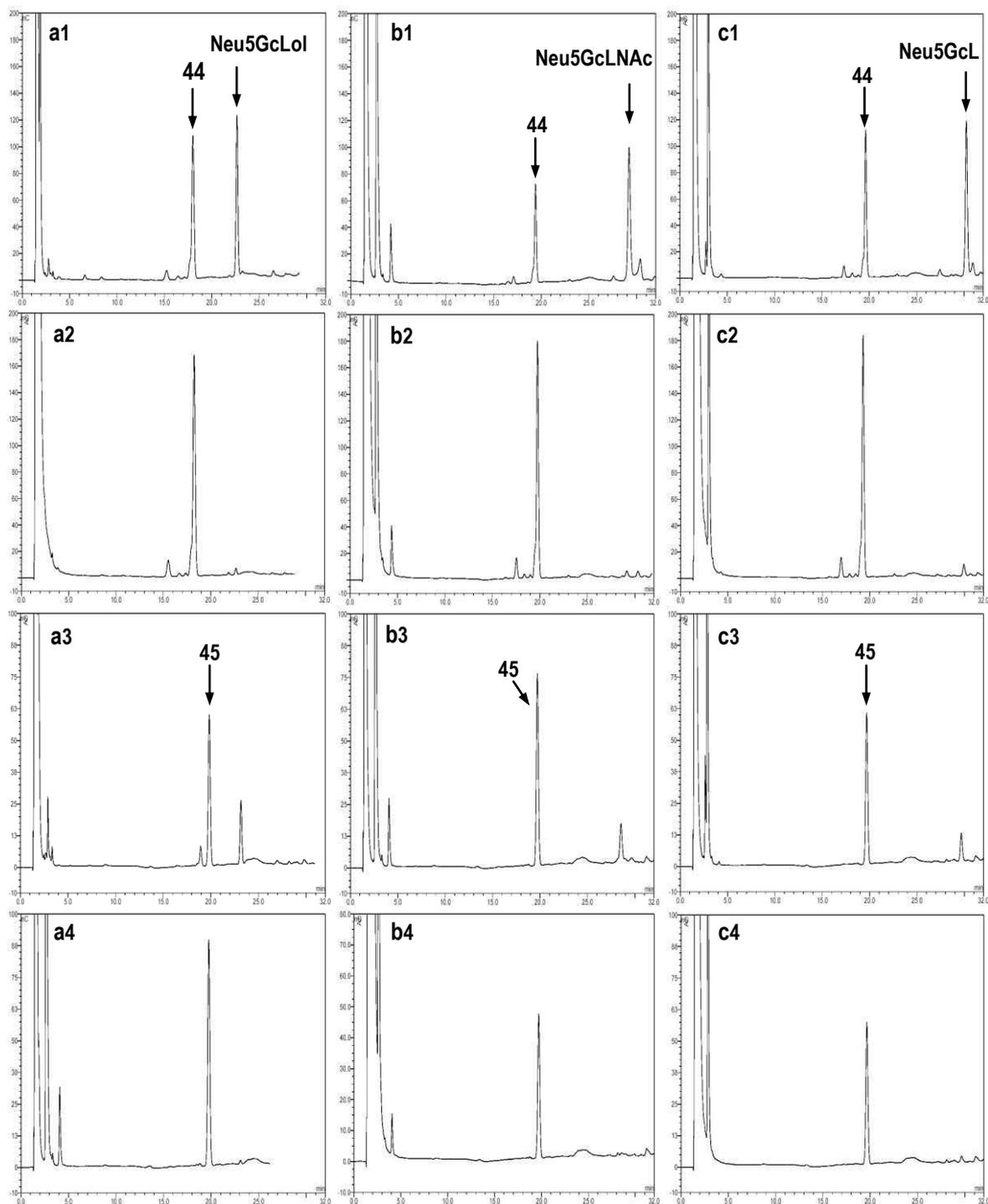


Figura 2-10 Análisis de la transferencia de Neu5Gc desde **44** y **45** hacia sustratos aceptores por TcTS. **a(1-4)**, sustrato aceptor: Lactitol; **b(1-4)**, sustrato aceptor: *N*-acetilglucosamina; **c(1-4)**, sustrato aceptor: Lactosa. **a1-c1**: **44** fue incubado con el sustrato aceptor y TcTS por 15 minutos a 25°C, y las reacciones se analizaron por HPAEC-PAD, condición de elución 4. **a2-c2** igual a la anterior pero preincubando la TcTS con anticuerpos neutralizantes. **a3-c3**, **45** se incubó en idénticas condiciones que el donador **44**. **a4-c4**, **45** y TcTS preincubada con anticuerpos neutralizantes.

En un estudio comparativo usando Neu5Ac($\alpha 2 \rightarrow 3$) unido a distintos β -D-galactopiranosil oligosacáridos se había demostrado que aquellos azúcares en los cuales la unidad Galp está unida ($\beta 1 \rightarrow 4$) a GlcNAc resultaron mejores donores de Neu5Ac que aquellos en los cuales la Galp está unida ($\beta 1 \rightarrow 3$) (Vandekerckhove, F. *et al.*, 1992). Estos resultados son similares a los obtenidos para los oligosacáridos conteniendo Neu5Gc. Es de señalar que en el estudio cristalográfico (Buchiazzo *et al.*, 2002) se había determinado que el OH-3 de la glucosa en la lactosa participa con una unión puente de hidrógeno en la estabilidad de la TcTS. En el compuesto **45** al estar dicho oxhidrilo glicosilado no puede participar en la afinidad sustrato-enzima. Por otro lado, la hidroxilación del grupo *N*-acilo del ácido siálico ofrece la posibilidad de una interacción adicional con algún aminoácido convenientemente localizado en TcTS dando como resultado una mayor afinidad hacia la enzima. de los compuestos conteniendo Neu5Gc en comparación con los que contienen Neu5Ac.

Para cuantificar la afinidad del ácido *N*-glicolilneuramínico hacia la enzima se calcularon valores de K_m para **44**, **45** y 3'SL utilizando lactitol como sustrato aceptor, bajo las mismas condiciones de reacción. Se determinó que en las condiciones utilizadas los Neu5Gc-disacáridos eran mejores sustratos que la 3'SL (**Tabla 2-3**).

Tabla 2-3 Valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para los compuestos **44**, **45** y 3'SL usando lactitol como sustrato aceptor en la reacción de TcTS.

Compuesto	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (pmol/ng.min)
44	0,84	0,48
45	1,53	0,33
3'SL	3,21	1,70

Se había determinado que la neutralización de la actividad de TcTS debido a la acción de anticuerpos (mNtAb) reduce el contenido de ácido siálico en plaquetas (Tribulatti *et al.*, 2005) y previene el daño del sistema inmune incluso en modelos extremadamente virulentos (Risso *et al.*, 2007). Cuando agregamos este anticuerpo a las incubaciones que contenían Neu5Gc($\alpha 2 \rightarrow 3$)-Gal β (1 \rightarrow R) y TcTS recombinante, previo al agregado de lactosa, lactitol o *N*-acetillactosamina como aceptores, observamos que la transferencia resultó casi completamente inhibida (**Figuras 2-10 a2-c2, a4-c4**). Estos resultados confirmaron que para la transferencia de Neu5Gc es utilizado el mismo sitio activo que el de Neu5Ac.

Estudio de la transferencia competitiva de Neu5Gc respecto de Neu5Ac mediada por TcTS.

Se estudió la competencia de la transferencia de Neu5Gc respecto de la de Neu5Ac para los oligosacáridos **44** y **45** incubando con 3'SL, TcTS y *N*-acetillactosamina como aceptor, en concentración 1mM de cada sustrato (**Figura 2-11**).

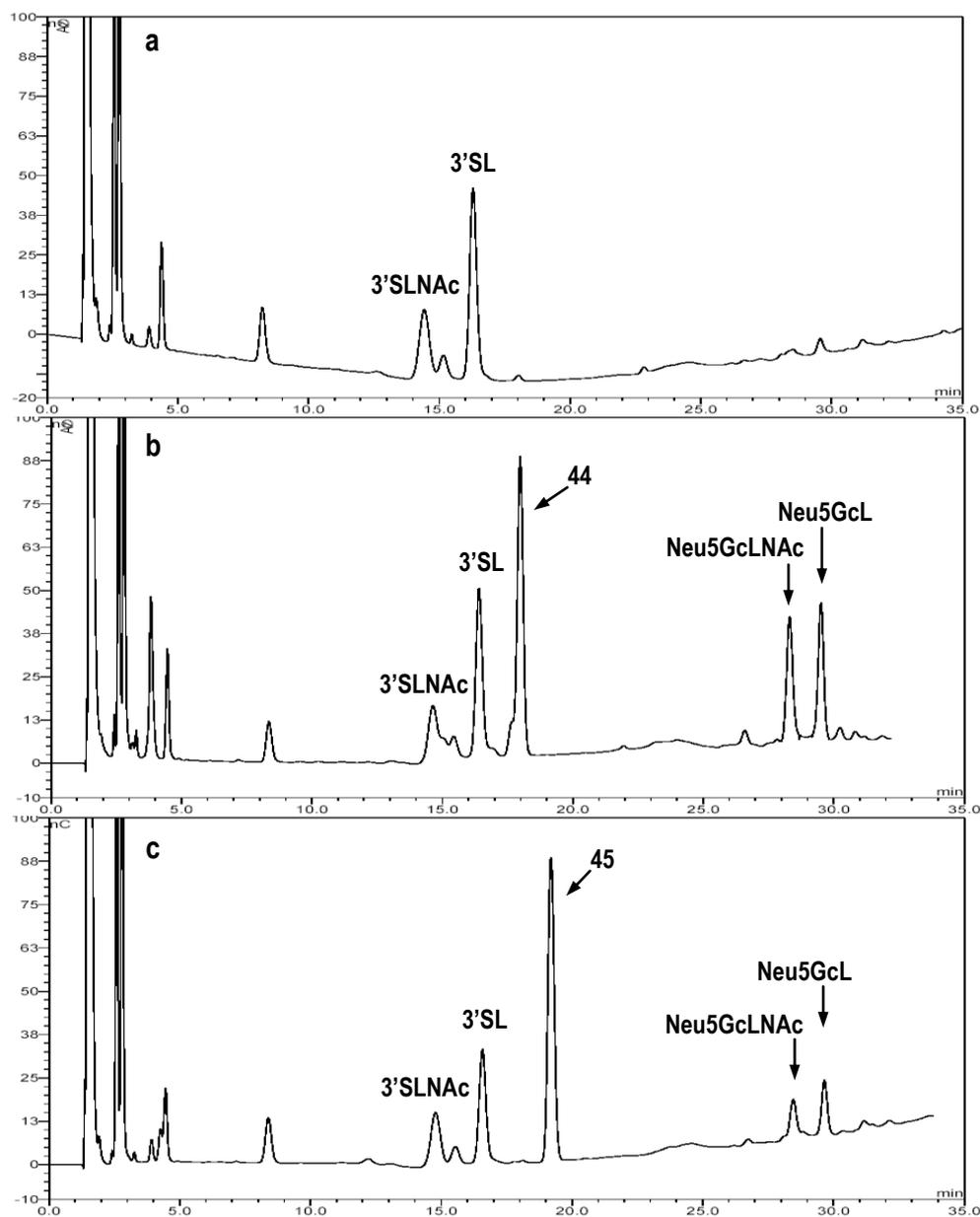


Figura 2-11 Transferencia competitiva entre Neu5Ac y Neu5Gc por TcTS. La 3'SL fue incubada con *N*-acetillactosamina como sustrato aceptor, TcTS (a), en presencia de **44** (b) y en presencia de **45** (c). Luego se analizaron por HPAEC-PAD, condición de elución 4.

El pico con tr: 8,40 minutos corresponde al Neu5Ac libre presente en la muestra de 3'SL y no interfiere con el experimento. Se pudo observar que la transferencia de Neu5Ac desde 3'SL hacia *N*-acetilactosamina en ausencia de **44** o **45** (**a**), resultó mayor que cuando **44** (**Figura 2-11 b**) o **45** (**Figura 2-11 c**) estaban presentes. Se observó también en el caso del donador **44** (**Figura 2-11 b**) que la formación de Neu5GcLNAc era mayor que la de 3'SLNAc (Neu5AcLNAc). Además, la lactosa obtenida como producto de la transferencia de Neu5Ac resultó rápidamente utilizada por TcTS como sustrato aceptor para formar Neu5GcLactosa (**Figura 2-11 b - c**). Para confirmar su identidad se co-cromatografió con Neu5GcLactosa obtenida del calostro bovino.

Discusión.

Los oligosacáridos O-glicosídicos presentes en las mucinas de *T.cruzi* pueden ser modificados con *Galf* (Preato *et al.*, 1994; Acosta-Serrano *et al.*, 1995; Agrellos *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004). Esta modificación fue encontrada solo en cepas pertenecientes a DTU I menos infectivo. Debido a que la trans-sialidasa fue relacionada con la infección, resultaba importante estudiar qué efecto tiene la presencia o ausencia de *Galf* en la reacción de la trans-sialidasa. Aunque se había demostrado anteriormente que los oligosacáridos alditoles obtenidos de las mucinas eran aceptores de ácido siálico, no se habían descrito hasta el momento datos cuantitativos. Los resultados expuestos en este capítulo mostraron que la introducción de una *Galf* externa al pasar de Galp(β 1 \rightarrow 6)-GlcNAcol (**36ol**) a Galp(β 1 \rightarrow 6)[Galf(β 1 \rightarrow 4)]-GlcNAcol (**38ol**) no afectó la sialilación de la unidad aceptor Galp, así como tampoco la presencia de una *Galf* interna en Galp(β 1 \rightarrow 2)-Galp(β 1 \rightarrow 4)-GlcNAcol (**37ol**). Como consecuencia de esto podemos decir que la disminución en la virulencia de las cepas pertenecientes al Linaje I no es causada por interferencia de la sialilación por la presencia de *Galf*. Probablemente, la antigenicidad de los glicoconjugados conteniendo *Galf* coopere con el sistema inmunológico del hospedero en la inactivación del parásito (De Arruda *et al.*, 1989). Por otra parte, en este capítulo se muestran por primera vez los tiempos de elución respecto a la 3'sialilactosa de los oligosacáridos sialilados de las mucinas. Para ello se utilizaron dos condiciones diferentes para el análisis por HPAEC-PAD (**Tabla 2-1**). También se obtuvieron los tiempos de retención de los alditoles neutros químicamente sintetizados previamente obtenidos por eliminación reductiva de las mucinas. Este método es ventajoso debido

a su sensibilidad para la caracterización de los oligosacáridos de las mucinas y por lo tanto para determinar el origen de la cepa infectante.

Los alditos analizados en este capítulo mostraron valores de IC_{50} del orden del encontrado para el lactitol. Podríamos concluir que derivados de estos oligoalditos podrían funcionar como inhibidores de la reacción de TcTS.

La reacción de trans-sialilación de **42Bn** a escala preparativa y análisis del producto aislado permitió determinar el sitio de sialilación y concluir que se incorporaba una única molécula de ácido siálico en la unidad terminal Galp(β 1 \rightarrow 3), menos impedida estéricamente y más expuesta.

El análisis cinético de la sialilación del hexaGalp **43Bn** y **43ol** permitió determinar que de acuerdo a la condiciones y al tiempo de reacción se podía obtener uno o dos compuestos monosialilados y un disialilado, producto de la sialilación en dos Galp expuestas.

En el análisis desarrollado para la transferencia de Neu5Gc mediada por TcTS, se demostró por primera vez que la enzima recombinante transfiere Neu5Gc desde oligosacáridos sintéticos que contienen esta unidad hacia *N*-acetilactosamina, unidad común en glicoconjugados. Esta enzima sería la responsable de la presencia de ácido *N*-glicolilneuramínico en la superficie de *T. cruzi* (Schauer *et al.*, 1983; Pereira, 1983). La enzima podría usarse con fines preparativos para obtener glicoconjugados con Neu5Gc, para estudios biológicos.

El cálculo de los parámetros cinéticos determino que los disacáridos conteniendo Neu5Gc eran mejores sustratos que la 3'SL. Esto también se comprobó cuando se realizó la reacción de transferencia competitiva. Por otra parte, los ensayos de transferencia realizados preincubando la enzima con anticuerpos neutralizantes permitió determinar que para la transferencia de Neu5Gc es utilizado el mismo sitio activo que el de Neu5Ac.

El Neu5Gc se encuentra frecuentemente en el reino animal pero no en los tejidos de humanos normales, porque la actividad de la CMP-Neu5Ac hidroxilasa se perdió en la evolución al humano (Varki, 2009). Sin embargo, el hombre puede incorporar Neu5Gc de la dieta principalmente de carnes rojas (vaca, cerdo, cordero y de la leche bovina) a sus glicoproteínas (Tangvoranuntakul *et al.*, 2003). Consecuentemente se encontró que la mayoría de los humanos desarrollan

anticuerpos anti-Neu5Gc que pueden contribuir a la inflamación crónica (Padler-Karavani *et al.*, 2008).

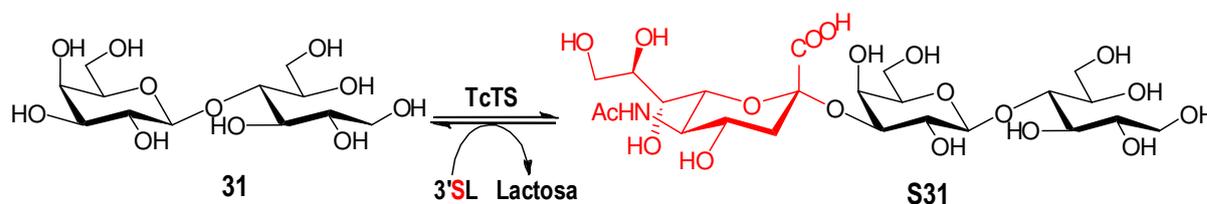
Teniendo en cuenta nuestros resultados respecto a la efectividad de la TcTS en la transferencia de Neu5Gc, sería interesante determinar si hay alguna relación entre la dieta y la sintomatología de la enfermedad de Chagas.

Capítulo 3

Síntesis y evaluación de derivados PEGilados.

Derivados de polietilenglicol (PEG) y su evaluación:

En nuestro laboratorio se había comprobado que disacáridos derivados de lactosa modificados en la glucosa pero que conservan el extremo β -galactopiranosil intacto, inhiben eficientemente la transferencia de ácido siálico hacia *N*-acetillactosamina en la reacción de TcTS. Estos inhibidores resultaron ser competitivos y todos mostraron ser sialilados cuando se los incubó con TcTS y 3'SL (**Esquema 3-1**). El lactitol (**31**) resultó ser el inhibidor más eficiente y el sialilactitol demostró ser un débil sustrato donador de ácido siálico. Más aún, el lactitol inhibió la sialilación del parásito cuando se lo incubó con TcTS y 3'SL como donador de ácido siálico (Agustí, *et al.*, 2004). Mucci *et al.*, (2002, 2006) observaron una reducción y desorganización de la corteza estructural d timo, característica de la apoptosis celular, cuando eran incubadas con 0,5 μ g de TcTS. Estas alteraciones no se observaban cuando también se agregaba lactitol. Pruebas *in vivo* mostraron que no era tóxico para los animales y que 10 mg administrados intravenosamente a ratones previamente inyectados con 200 ng de TcTS inhibían la actividad de la enzima en un 95-98 % aunque recuperaba su actividad a medida que el disacárido era eliminado de la sangre. Esta rápida pérdida del inhibidor del plasma fue solucionada usando pellets subcutáneos liberadores de lactitol los cuales, como resultado, previnieron la apoptosis inducida por TcTS de células del bazo.



Esquema 3-1. Reacción de transferencia de ácido siálico desde 3'SL hacia lactitol (**31**) cuando se lo incubó con TcTS.

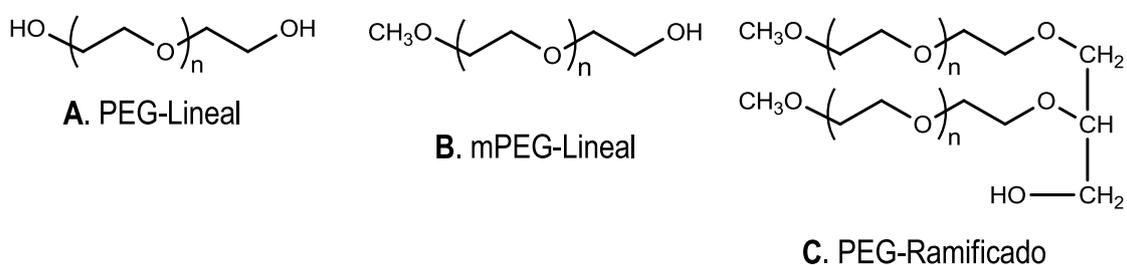
En vista de estos resultados nos propusimos obtener inhibidores derivados de la lactosa que tuvieran un mayor tiempo de permanencia en sangre sin que disminuyera su actividad inhibitoria. Para ello necesitábamos aumentar el tamaño de los inhibidores más allá de los límites de filtración renal sin modificar el extremo β -galactopiranosilo, unidad aceptora de ácido siálico en la reacción de TcTS.

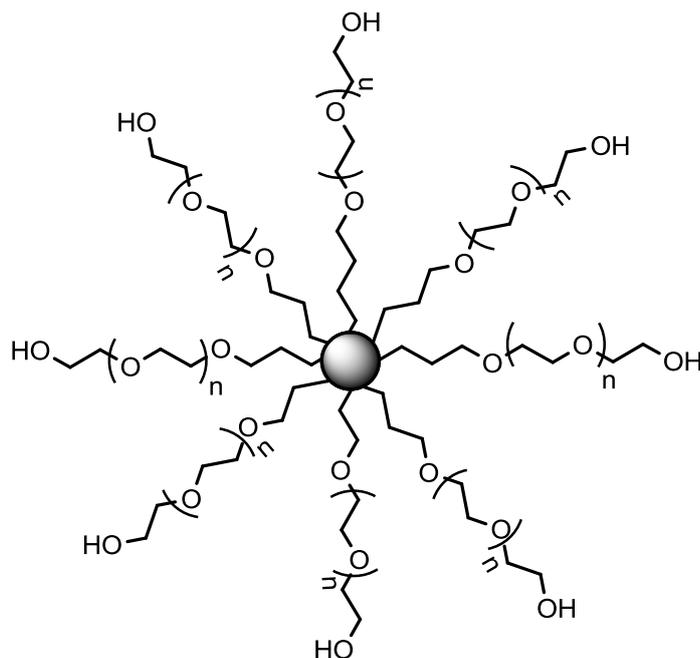
La necesidad de mantener drogas en sangre es uno de los principales desafíos en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, los cuales son obstaculizados por la

corta vida media de los compuestos suministrados. Están involucrados muchos factores en la remoción de sustancias de la circulación: las proteínas y péptidos son rápidamente eliminados por proteólisis, filtración renal y/o reacciones inmunogénicas y antigénicas, mientras que las principales causas de la breve residencia en plasma de las drogas de bajo peso molecular no proteicas son la excreción renal y las reacciones de inactivación provocadas por enzimas presentes en la sangre, particularmente por acción de esterazas (Monfardini *et al.*, 1998).

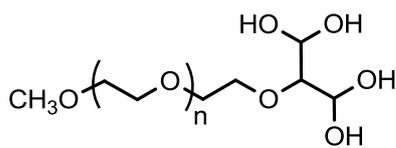
Las modificaciones de compuestos biológicamente activos con polímeros es un método ampliamente utilizado para controlar su biodisponibilidad, biodistribución y a menudo su toxicidad (Duncan *et al.*, 1984). El término PEGilación describe la modificación de moléculas biológicas por conjugación covalente con polietilenglicol (PEG), un diol polieter lineal no tóxico, no inmunogénico, no antigénico y soluble en agua y otros solventes orgánicos (Veronese *et al.*, 2008). La PEGilación modifica las propiedades físicas y químicas de la molécula conjugada tales como conformación, interacciones electrostáticas e hidrofobicidad mejorando el comportamiento farmacocinético de la droga. En términos generales mejora la solubilidad de la droga, disminuye su inmunogenicidad y también incrementa su estabilidad y permanencia en sangre permitiendo así disminuir la frecuencia de la dosis. Esto puede ser atribuido, en parte, al incremento del peso molecular más allá de los límites de filtración renal y por otra parte, a una reducción de la proteólisis del conjugado (Greenwald, 2001).

Este polímero anfifílico, generalmente inerte, consiste en unidades repetitivas de oxido de etileno, el cual puede ser ordenado en forma lineal o ramificada, dando lugar a una serie de compuestos de diferentes formas y pesos moleculares (**Figura 3-1**).

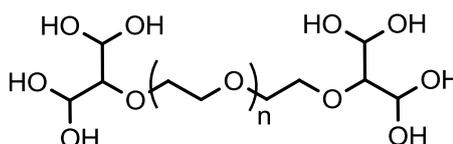




D. PEG-Multibrazos



E. PEG multifunción



F. PEG2 multifunción

Figura 3-1. Estructuras representativas de los distintos tipos de PEG utilizados para modificaciones de drogas y péptidos.

Para la PEGilación de un compuesto primeramente se debe seleccionar una química apropiada. Se deben considerar el tamaño, la simetría, y la funcionalidad del PEG de acuerdo a la aplicación deseada. La activación de la molécula de PEG para su posterior conjugación se lleva a cabo por sustitución del/los OH terminales por un grupo electrófilo que genere el tipo de unión deseado y que reaccione covalentemente con un sitio reactivo de la molécula a conjugar. Esta derivatización debe ser tal que como resultado asegure la retención de la actividad del conjugado. Algunos de los polímeros ampliamente utilizados para PEGilación de muestran en la **Figura 3-2**.

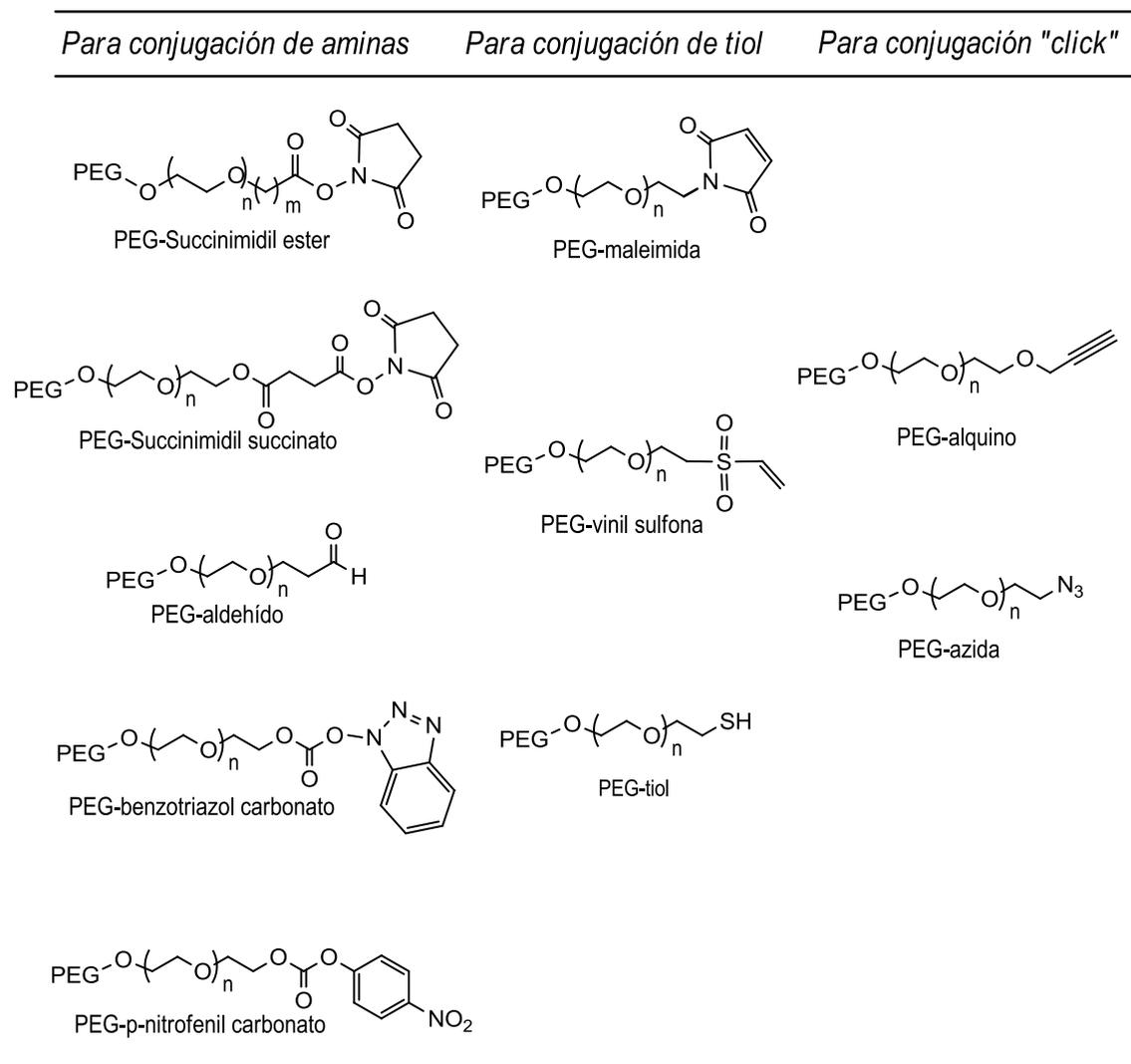


Figura 3-2 PEG activados más comunes utilizados para conjugación.

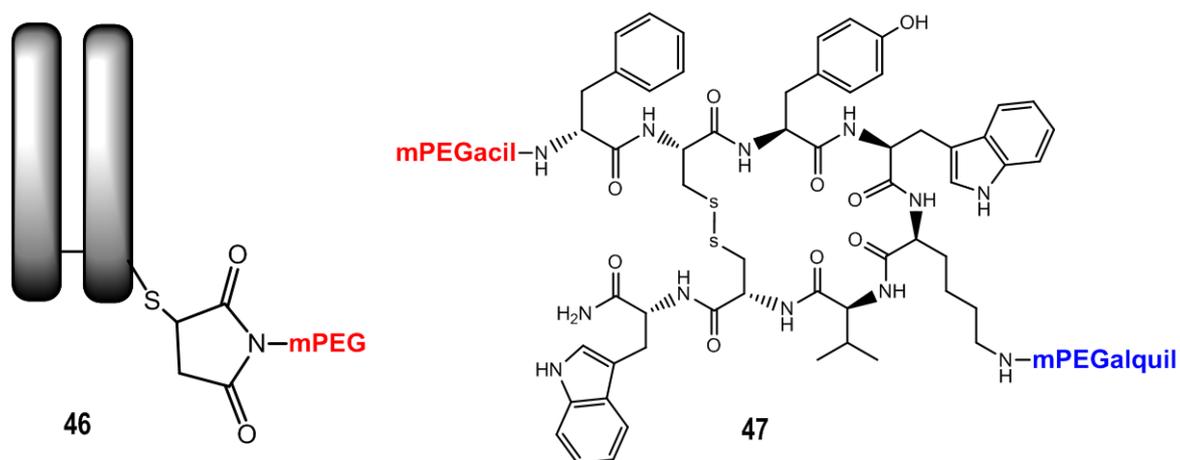
La **Tabla 3-1** lista compuestos PEGilados que actualmente se encuentran en el mercado y que son ampliamente utilizados con fines clínicos. Todos corresponden a proteínas PEGiladas con actividad biológica, excepto el Pegaptanib que es un aptámero PEGilado en el oligonucleótido 5'. Esta técnica se ha vuelto el método más utilizado para superar los límites biológicos antes mencionados y el número de productos PEGilados en el mercado se encuentra en constante crecimiento así como también los conjugados que entran en ensayos clínicos (Pasut *et al.*, 2012).

Molécula	Nombre Genérico	Nombre comercial	Tamaño PEG (kDa)	Indicación	Año de aprob. FDA	Referencia
Adenosina Deaminasa	Pegademasa bovina	Adagen® (Enzon)	5	Inmunodeficiencia combinada severa (SCID)	1990	Levi Y., <i>et al.</i> , 1988.
L-asparaginasa	Pegaspargase	Oncaspar® (Enzon)	5	Leucemia linfoblástica	1994	Graham L. M., <i>et al.</i> , 2003.
Interferon α -2b	Peginterferon α -2b	PegIntron® (Schering Plough)	12	Hepatitis C	2000	Wang Y. S., <i>et al.</i> , 2002.
Interferon α -2a	Peginterferon α -2a	Pegasys® (Genetech)	40	Hepatitis C	2001	Reddy K. R., <i>et al.</i> , 2002.
G-CSF	Pegfilgrasim	Neulasta™ (Amgen)	20	Neutropenia	2002	Kinstler O., <i>et al.</i> , 2002.
hGH	Pegvisomant	Somavert™ (Pfizer Pharmacia)	5	Acromegalias	2003	Trainer P. J., <i>et al.</i> , 2000.
Aptamero	Pegaptanib	Macugen™ (Pfizer Pharmacia)	40	Degeneración macular asociada edad	2004	Ng E. W. M., <i>et al.</i> , 2006.
Eritropoyetina	Metoxipolietilenglicol-epoetina beta	Mircera® (Roche)	40	Anemia	2007	Macdougall I.C., <i>et al.</i> , 2005.
Anti-TNF α Fab	Certolizumab pegol	Cimzia® (UCB Pharma)	40	Artritis reumatoidea y enfermedad de Crohn	2008	Sandborn W. J., <i>et al.</i> , 2007.
Uricasa	Pegloticasa	Puricase™ (Savient Pharmaceuticals)	10	Gota	2010	Sherman M.R. <i>et al.</i> , 2008.

Tabla 3-1. Drogas PEGiladas que actualmente se encuentran en el mercado.

La PEGilación se ha utilizado para prolongar la circulación in vivo de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades crónicas. La especificidad con la cual los anticuerpos pueden neutralizar citoquinas o factores de crecimiento, o bloquear interacciones de tipo receptor-ligando, los hace buenos candidatos para drogas terapéuticas (46) (**Figura 3-3**) (Chapman, 2002). Se ha descrito la alquilación o acilación selectiva de grupos amino en análogos de

Somatostatina (**47**) usando dos tipos diferentes de mPEGs lineales para el tratamiento de pacientes con adenomas secretoras de la hormona de crecimiento o para el tratamiento de los síntomas relacionados a la hipersecreción hormonal inducida por varios tumores endócrinos (Morpurgo *et al.*, 2002). También se han PEGilado drogas de bajo peso molecular como por ejemplo la Camptotesina, un potente inhibidor de topoisomerasa de tipo I y por lo tanto una droga activa contra muchos tipos de cáncer, para aumentar la biodisponibilidad y sobre todo su solubilidad. La Camptotesina PEGilada desarrollada por Enzon, Inc., consiste en una cadena PEG de 40 kDa que tiene dos moléculas de Camptotesina en sus dos extremos unidas mediante unión ester al C-20-OH de la droga (**48**) (**Figura 3-3**) (Greenwald *et al.*, 1998). Otro ejemplo de PEGilación de moléculas pequeñas para la administración controlada de drogas es la del ácido fólico y ácido tióctico. Para esto se conjugó secuencialmente un PEG homobifuncional con una unidad de ácido tióctico en un extremo y una unidad de ácido fólico en el extremo distal (**49**). El extremo ditiol es capaz de complejar partículas de oro que tengan unido, ya sea covalentemente o por adsorción, compuestos con actividad biológica y el otro extremo es reconocido por los receptores de folato presentes en las células. Los receptores de folato constituyen un blanco quimioterapéutico interesante ya que la formación de los mismos se encuentra sobreexpresada en diversos tipos de cáncer (Dixit *et al.*, 2006). Un problema común en la PEGilación de moléculas pequeñas es la disminución de la actividad biológica debido a la modificación aunque esto se ve compensado por el mayor tiempo del compuesto en plasma como producto de una mejor estabilidad y su mayor volumen hidrodinámico.



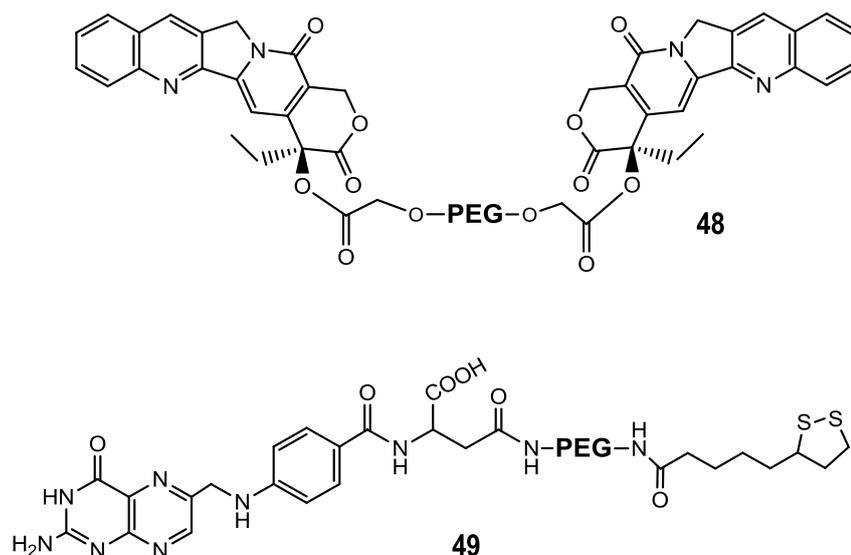


Figura 3-3. Ejemplo de drogas PEGiladas: Fragmento de anticuerpo PEGilado (**46**). Análogo de Somatostatina PEGilada (**47**). Cadena de PEG conjugada con dos unidades de Camptotesina (**48**). Cadena de PEG conjugada a ácido fólico y ácido tióctico (**49**).

La PEGilación de carbohidratos ha sido aplicada principalmente a polisacáridos o hidratos de carbono unidos a proteínas (**Figura 3-4**). Por ejemplo, la PEGilación del quitosano, polisacárido producto de la hidrólisis alcalina o enzimática de la quitina, formada por unidades D-glucosaminas unidas ($\beta 1 \rightarrow 4$) con grado de N-acetilación variable. Este polisacárido es utilizado ampliamente por la industria farmacéutica y biomédica. Su grado de solubilidad depende del grado de acetilación, la concentración iónica de la solución, el pH, el peso molecular y la distribución de los grupos acetilo. Para evitar problemas de solubilidad se lo modificó con cadenas de PEG (Casettari *et al.*, 2012). La conjugación se lleva a cabo usualmente sobre el grupo $-NH_2$ utilizando un PEG activado adecuado. En la mayoría de los casos se utiliza un monometoxiPEG para evitar entrecruzamientos entre monómeros. En otros casos se conjuga con un PEG bifuncional con el fin de colocar moléculas activas en el extremo distal de la cadena de PEG. De esta manera se evita el impedimento estérico provocado por la cadena de quitosano y asegura una mejor interacción ligando-receptor. Una α -manosa se introdujo con el propósito de que este extremo sea reconocido por receptores específicos de manosa en células del retículo endotelial y luego se introduzca por endocitosis drogas adsorbidas sobre la superficie del quitosano (**50**) (**Figura 3-4**) (Fernandez-Megia *et al.*, 2007). También se ha PEGilado un polímero de fructosa

extraído de la raíz de *Radix Ophiopogonis* con actividad antiisquémica del miocardio, con el fin de aumentar su vida media. Para la modificación se utilizó un mPEG lineal el cual se unió al OH-4 de una fructosa, previamente activada con 4-nitrofenil cloroformiato (**51**) (Lin *et al.*, 2010 y 2011).

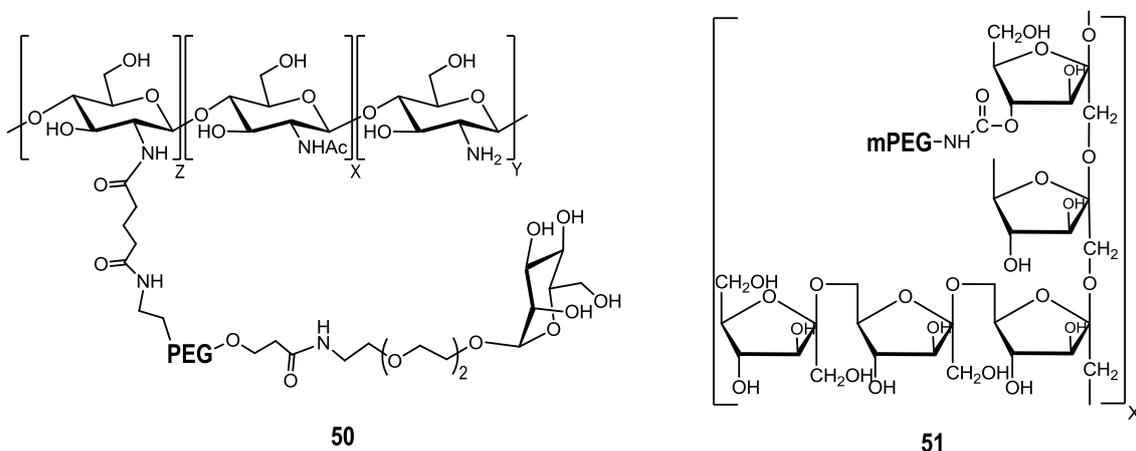


Figura 3-4. Ejemplos de PEGilación de polisacáridos: Quitosano PEGilado conteniendo una α -D manosa en su extremo distal (**50**). Fructano PEGilado en el OH-4 de una unidad de fructosa (**51**).

En los últimos años han aparecido trabajos que describen la PEGilación de monosacáridos o disacáridos (**Figura 3-5**). Como ejemplo podemos nombrar la PEGilación específica del carbohidrato de la cadena A de la Ricina. Esta es una subunidad citotóxica de la Ricina que tiene la propiedad de inhibir la síntesis de proteínas por inactivación de ribosomas y se lo utiliza con fines terapéuticos contra células tumorales. La modificación con PEG se obtuvo por oxidación con periodato del carbohidrato, seguida de formación de hidrazida con un PEG-hidrazina (**52**) (Youn *et al.*, 2005). Este método también se aplicó a otras proteínas previamente glicosiladas con oligosacáridos (Salmaso *et al.*, 2008). Recientemente, se describió la copolimerización por *trans*-esterificación enzimática de monosacáridos acetónidos que contienen dos OH primarios que reaccionan fácilmente con dos equivalentes de PEG diéster de 600 Da. De esta manera se logró una cadena de 6 o 7 unidades que posee partes hidrofóbicas e hidrófilas capaz de acomodarse en forma miscelar y que puede ser utilizada para encapsulación de drogas y liberación controlada dependiendo del pH (**53**) (Bhatia *et al.*, 2011). También se PEGilaron monosacáridos con PEG modificados en el extremo distal de la cadena con una unidad de ácido tióctico que puede complejar “quantum dots”. Estos conjugados pueden ser reconocidos por receptores

específicos de las células y pueden ser utilizados como nanosensores (54) (Kikkeri *et al.*, 2009).

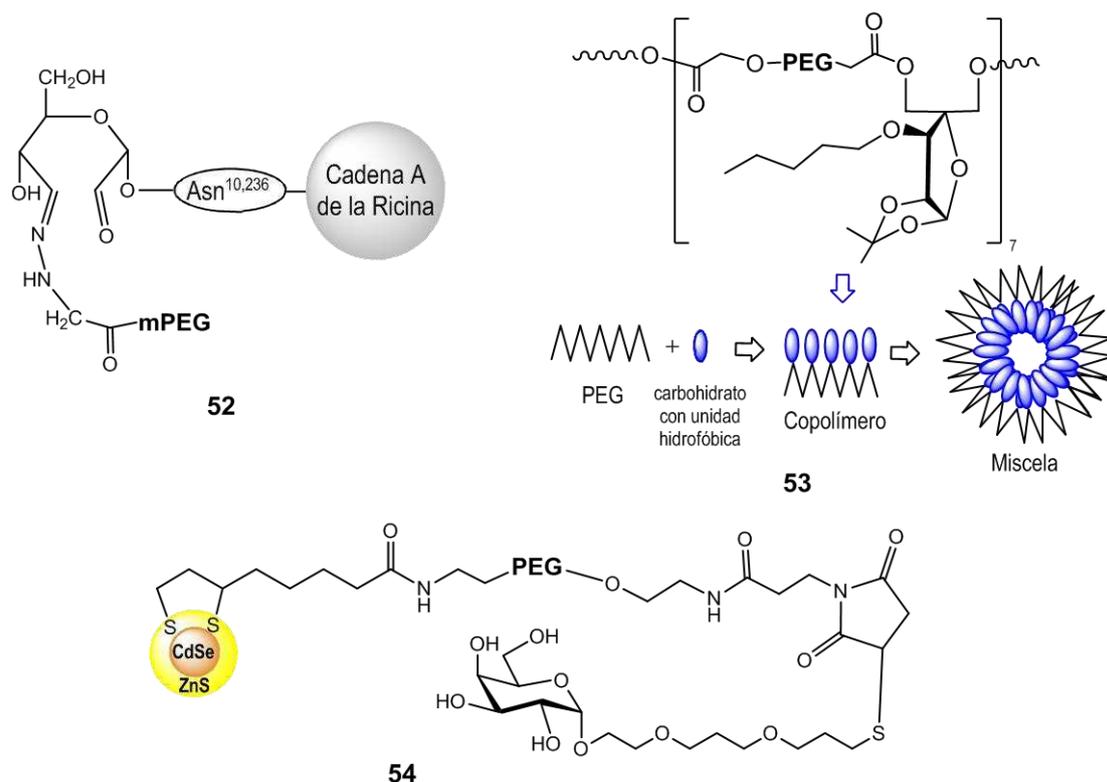


Figura 3-5 Ejemplos de PEGilación de monosacáridos modificados: PEGilación del carbohidrato en Asn¹⁰ y Asn²³⁶ de la cadena A de la Ricina (52). PEGilación de monosacáridos conteniendo una unidad hidrofóbica para la formación de micelas (53). “Quantum dots” PEGilados conteniendo un carbohidrato en el extremo distal (54).

Otro problema encontrado en la PEGilación de moléculas pequeñas es la baja capacidad de carga de moléculas activas por unidad de polímero, el cual posee uno o a lo sumo dos grupos terminales derivatizables. Para superar esta limitación se han sintetizado estructuras de tipo dendrímeras, ramificadas, multibrazos o multifunción. Estas moléculas poseen múltiples OH terminales que pueden ser funcionalizados y luego conjugados con agentes terapéuticos, ligandos específicos para la administración controlada de drogas o a cadenas PEG para aumentar la solubilidad (Figura 3-6). Como ejemplo podemos nombrar el conjugado PEG multibrazos, PEG-SN38, actualmente bajo pruebas clínicas en fase 1 (Banerjee *et al.*, 2012). PEG-SN38 se preparó funcionalizando como ácido carboxílico los 4 OH terminales de un PEG de 40 kDa con 4-brazos para luego acoplarlos a 4 equivalentes de un análogo de la Camptotesina (SN38). Este conjugado resultó ser más potente en su actividad antitumoral que el conjugado bifuncional lineal 48 debido a su mayor carga de

moléculas activas y a una mayor solubilidad (**55**) (**Figura 3-6**) (Zhao *et al.*, 2008). También se ha sintetizado, utilizando la química “click”, dendrímeros PEG conteniendo en sus extremos carbohidratos, para el estudio de procesos biológicos relacionados con interacciones receptor-carbohidrato. Para su síntesis primero se formó un dendrímero conteniendo grupos azida en sus extremos partiendo de ácido gálico y utilizando trietilenglicol como espaciador y luego estos grupos azida se acoplaron a monosacáridos o disacáridos glicosidados con un grupo alquino mediante una cicloadición catalizada por Cu(I) (**56**) (Fernandez-Megia *et al.*, 2006a y 2006b).

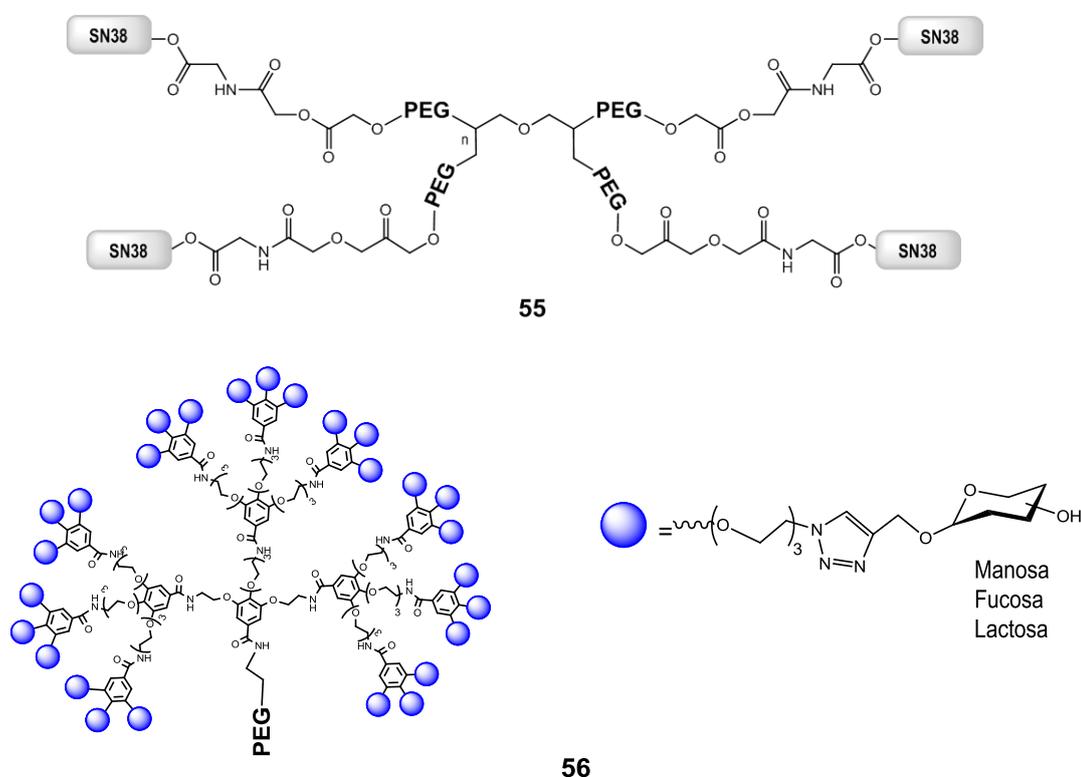
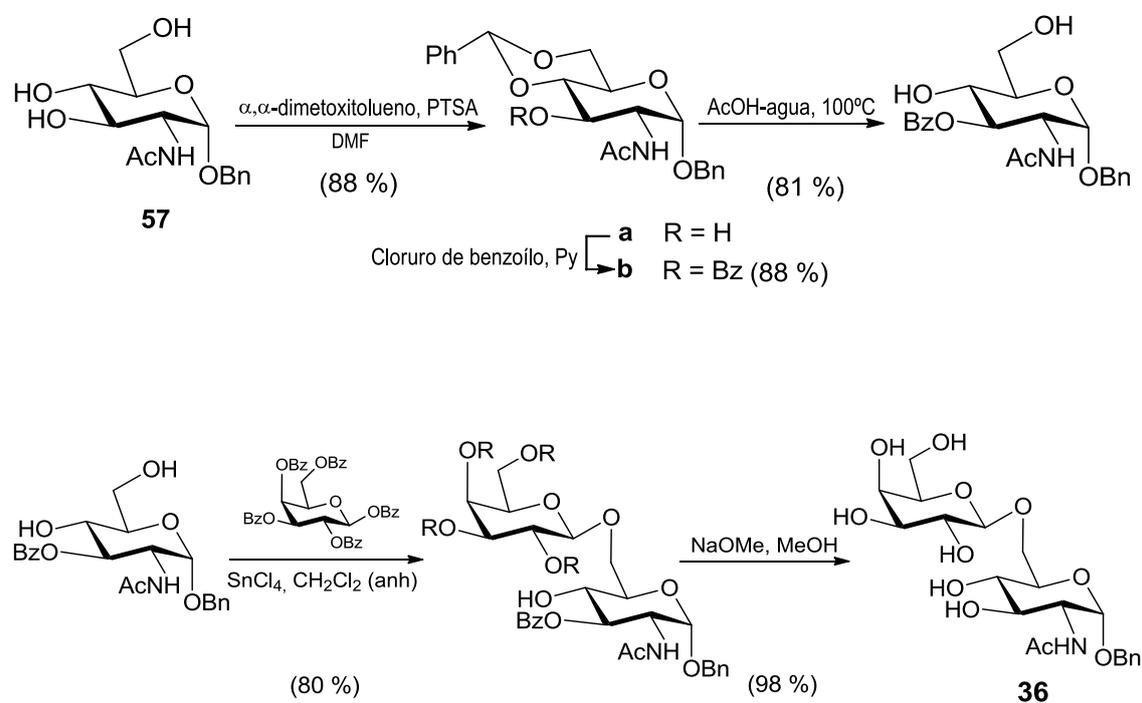


Figura 3-6. Ejemplos de conjugados multibrazos: 4-brazos-PEGSN38 (**55**) Dendrímeros PEGilados conteniendo carbohidratos en sus extremos (**56**).

Considerando la aplicación y beneficios de esta técnica decidimos aplicarla en lactosa y análogos con el objeto de incrementar su biodisponibilidad. Para ello hemos utilizado diferentes métodos de conjugación y hemos analizado el comportamiento de los conjugados como inhibidores en la reacción de TcTS. Utilizamos diferentes PEGs **lineales** de pesos moleculares menores a 5 kDa y PEGs **multibrazos** de pesos moleculares mayores a 20 kDa.

Síntesis de bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (59)

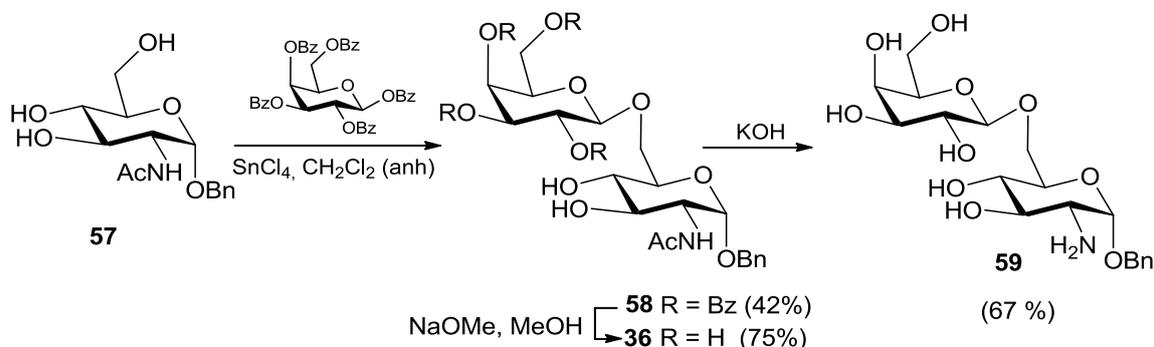
En el capítulo 2 de esta tesis habíamos mostrado que el disacárido β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucosa (**36**) así como su bencil glicósido (**36Bn**) resultaron buenos aceptores del ácido siálico en la reacción catalizada por TcTS (Agustí *et al.*, 2007). Estos también son inhibidores competitivos de la reacción de TcTS cuando se utiliza 3'SL como donador de ácido siálico y *N*-acetilactosamina como aceptor del mismo. La desacetilación del amino de **36** permitirá su posterior amidación con un derivado de PEG. El disacárido **36** había sido sintetizado a partir del bencil glicósido **57** protegiendo la posición 3 en tres pasos de reacción y luego por glicosilación selectiva del O-6 de la α -D-GlcNAc y posterior desprotección según el **Esquema 3-2** (Gallo-Rodriguez *et al.*, 1998). En esta tesis simplificamos el procedimiento consiguiendo la glicosilación selectiva del O-6 de **57** para dar **58** (**Esquema 3-3**). Aunque su rendimiento total es moderado (42 %) fue elegido por su simplicidad



Esquema 3-2

Para la obtención del bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**57**) se puso a punto el método de glicosidación que utiliza F_3B eterato como catalizador (Plimmer *et al.*, 1967), en lugar del método de Kuhn y Baer. Este último requiere el burbujeo de HCl gaseoso sobre una solución de *N*-acetilglucosamina en alcohol bencílico, calentando, para dar una solución oscura de la cual se cristaliza **57** por el agregado de éter con 42 % de rendimiento (Kuhn y Baer, 1958). En nuestro caso luego de agitar la mezcla de reacción 4h, a 80°C, una ccd mostró una mancha mayoritaria de R_f 0,66 y otra de R_f 0,60 correspondientes a los bencil glicósidos anómeros α y β respectivamente (nPrOH-EtOH-H₂O, 7:1:2). Los mismos se obtuvieron con un rendimiento total de 80 %, en relación (4:1) de acuerdo a la integración de las señales de los protones anoméricos en el espectro de RMN ¹H, los cuales se observaron como dos dobletes a δ 4,83 ppm ($J_{1,2} = 3,5$ Hz, H-1 α) y δ 4,42 ppm ($J_{1,2} = 8,5$ Hz, H-1 β). El bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido **57** se obtuvo por recrystalización fraccionada de etanol con 60 % de rendimiento.

Para la glicosidación de **57** (**Esquema 3-3**) se utilizó 1,6 equivalentes de penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa disuelta en CH₂Cl₂ anhidro bajo atmósfera de argón (Gallo-Rodríguez *et al.*, 1998) como donador, en presencia de 1,5 equivalentes de SnCl₄ como promotor de la condensación. Luego de 16 h de reacción a temperatura ambiente, una ccd mostró una mancha principal de R_f 0,69 (15 % CH₃OH en CH₂Cl₂), algo de perbenzoilgalactosa sin reaccionar y trazas de productos resultantes probablemente de la desbenzoilación parcial de la penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa. La mezcla se neutralizó con el agregado de NaHCO₃ (s.s). Por purificación a través de una columna de sílica gel se obtuvo el compuesto **58** con 42 % de rendimiento.



Esquema 3-3

El espectro de RMN ^1H de **58** (Figura 3-7) mostró entre otros, las señales de los protones anoméricos como dos dobletes que integran para 1 H a δ 4,93 ppm ($J_{1',2'}=7,8$ Hz, H-1' β) y δ 4,70 ppm ($J_{1,2}=3,5$ Hz, H-1 α), confirmando la glicosilación. Los protones del metileno del CH_2Ph se muestran como un par de dobletes a δ 4,58 ppm y δ 4,19 ppm integrando para 1 H cada uno con una constante de acoplamiento geminal $J=12$ Hz mientras que la señal correspondiente al CH_3 del acetilo se muestra como un singulete que integra para 3 H a δ 1,94 ppm.

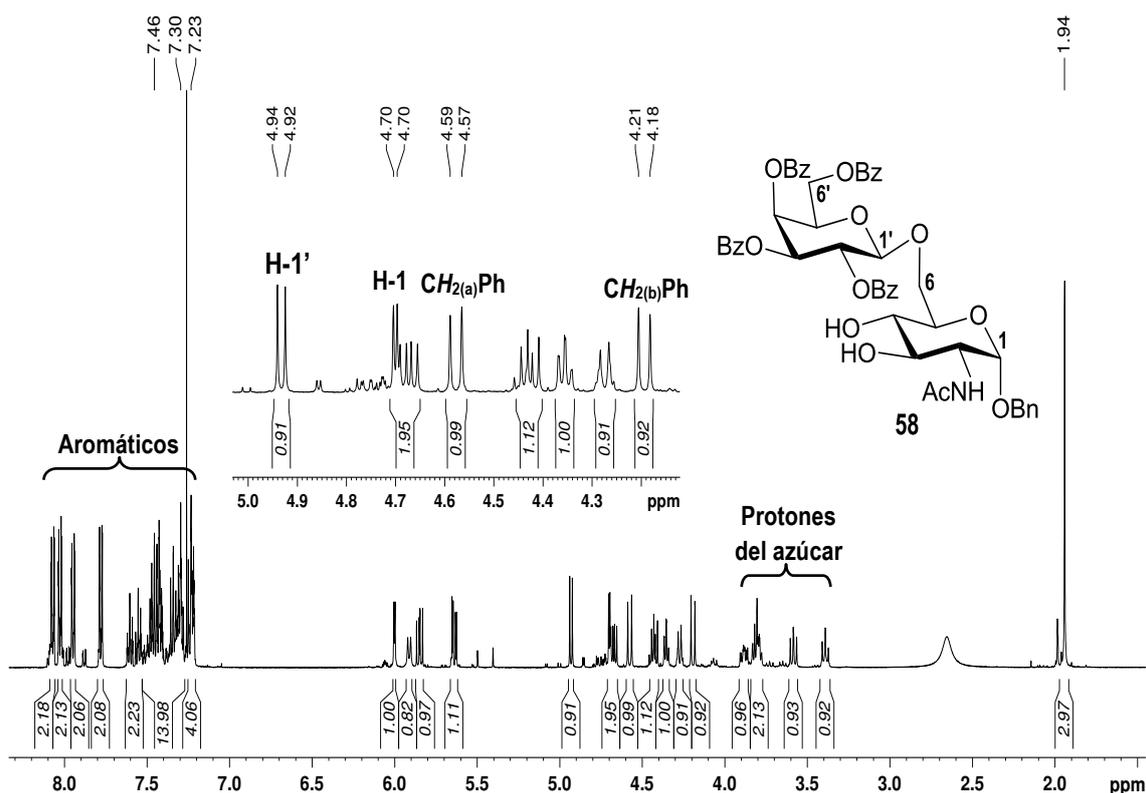


Figura 3-7 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **58**

En el espectro de RMN ^{13}C de **58** se observaron las señales de los carbonos anoméricos a δ 102,4 ppm (C-1' β) y a δ 96,2 ppm (C-1 α) mientras que el CH_3 del acetilo se muestra a δ 23,1 ppm (Figura 3-8). El análisis de espectrometría de masas ESI-TOF mostró picos de $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 890,3037, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ a 907,3300 y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a 912,2847.

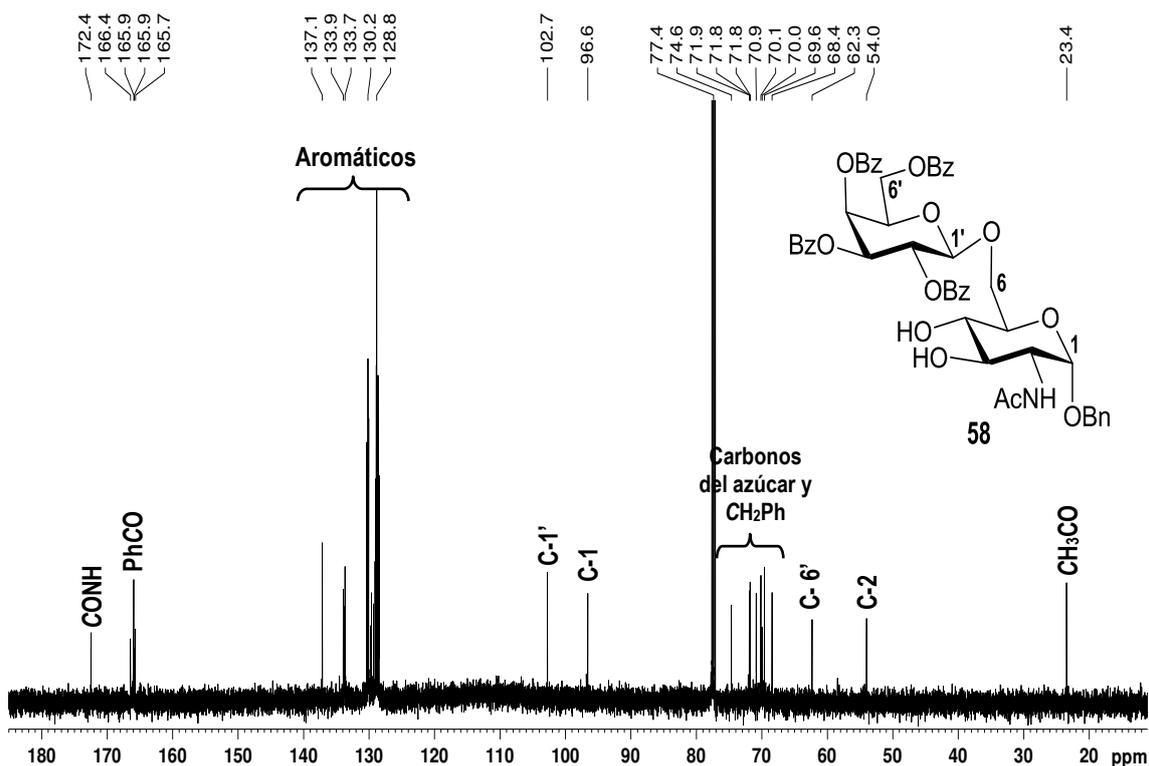


Figura 3-8 Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) de **58**

Para obtener el compuesto **59** se prefirió desacilar en dos pasos (**Esquema 3-3**) pues el compuesto **36** es cristalino y se pudo comparar con el descrito anteriormente (Gallo-Rodriguez *et al.*, 1998). Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de **36** mostraron señales idénticas a las obtenidas anteriormente. Para remover el grupo *N*-acetilo se calentó el compuesto **36** en KOH 1M a 100 °C durante 16 h. Luego de ese tiempo, una ccd mostró la hidrólisis completa revelando una única mancha con R_f 0,36 (n-PrOH-EtOH- H_2O , 7:1:2). La mezcla se purificó por pasaje por columna catiónica donde el compuesto **59** eluyó con 0,1 N HCl con 67 % de rendimiento.

En el espectro de RMN ^1H de **59** (**Figura 3-9**) se observa la señal de los protones aromáticos como un multiplete que integra para 5 H centrado a δ 7,47 ppm. Los protones anoméricos se observan como dos dobletes que integran para 1 H cada uno a δ 5,24 ppm ($J_{1,2} = 3,7$ Hz, H-1 α) y δ 4,43 ppm ($J_{1,2} = 7,9$ Hz, H-1' β). Un protón del metileno CH_2Ph se muestra como un doblete que integra para 1 H a δ 4,66 ppm mientras que el otro se suprimió junto con la señal de DHO a δ 4,79 ppm.

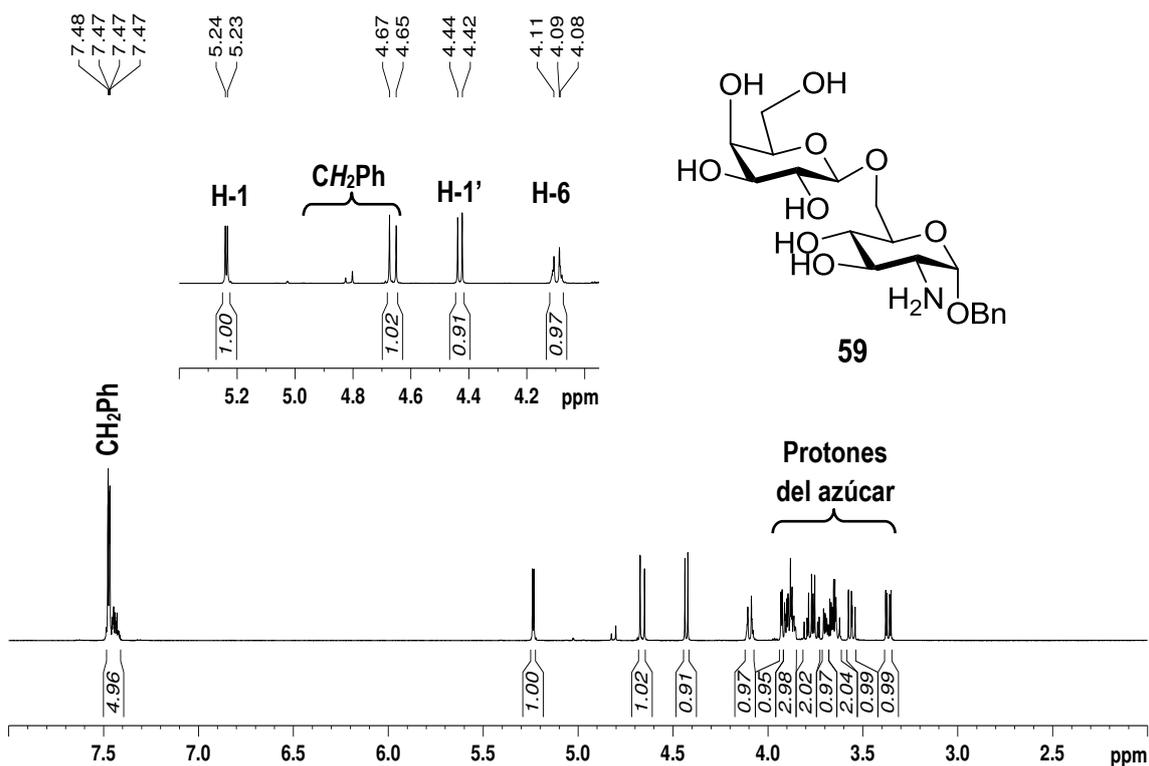


Figura 3-9. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de **59**

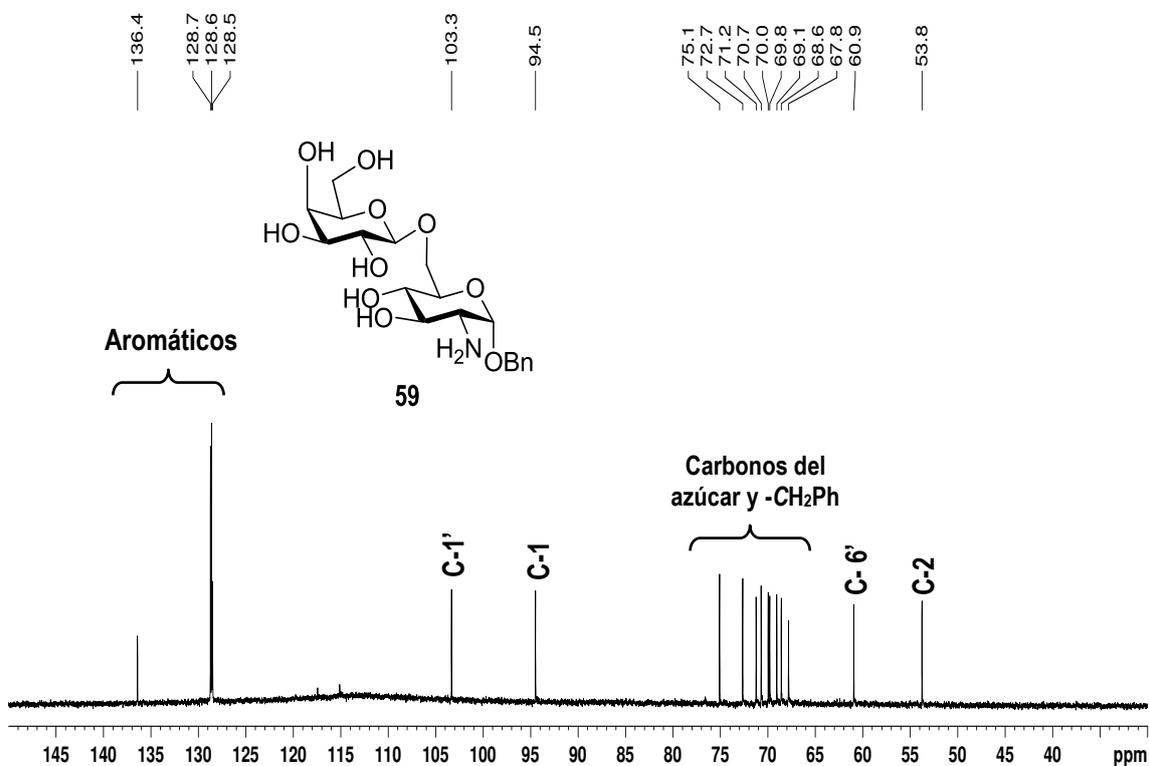


Figura 3-10. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 500 MHz) de **59**

El espectro de RMN ^{13}C de **59** (Figura 3-10) mostró, entre otras, las señales de los carbonos anoméricos a δ 103,3 ppm (C-1' β) y a δ 94,5 ppm (C-1 α) mientras que el carbono 2 que contiene el grupo amino se observó a δ 53,8 ppm. El análisis de espectrometría de masas ESI-TOF mostró picos de $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 432,1863, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a 454,1677 y otros picos que corresponden a las fragmentaciones indicadas (Figura 3-11).

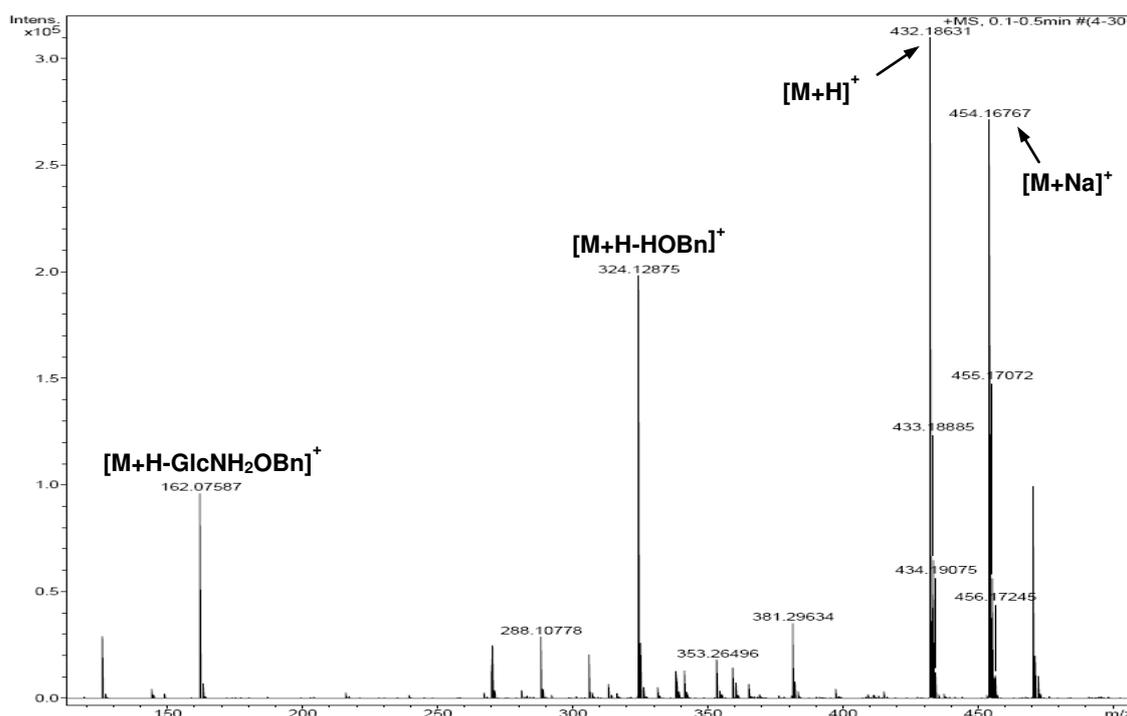


Figura 3-11. Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF de **59**

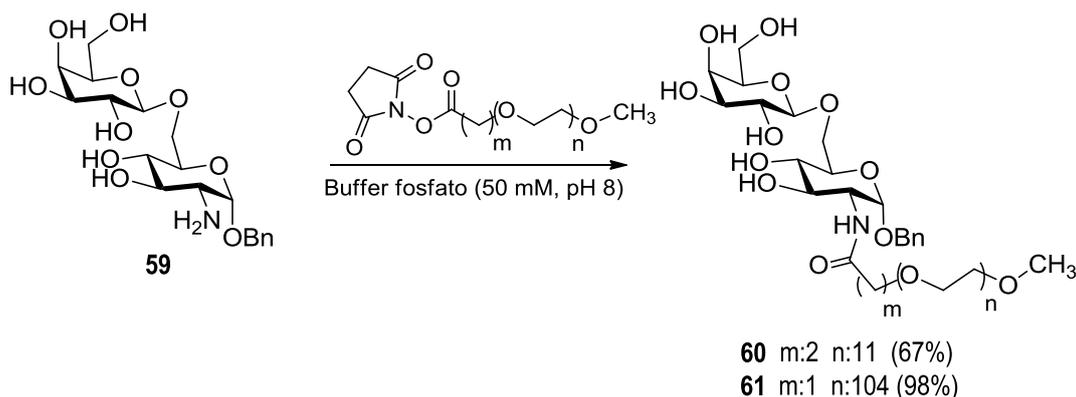
Conjugación de análogos de lactosa con PEGs lineales.

Se utilizaron tres métodos químicos diferentes para la PEGilación de disacáridos conteniendo β -D-Galp como unidad no reductora. **I.** Formación de una amida entre el grupo amino del bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**59**) y mPEGs ester activados con NHS (PEG-NHS). **II.** Formación de una amida entre el grupo carboxílico del ácido lactobiónico (**30**) con mPEGs conteniendo un grupo amino. **III.** Aminación reductiva de la lactosa con un mPEG conteniendo un grupo amino, en presencia de NaBH_3CN .

Los conjugados se caracterizaron por RMN y espectrometría de masa MALDI-TOF o ESI-TOF. Las PEGilaciones se realizaron utilizando mPEGs lineales polidispersos (excepto CH₃O-PEG₆₈₅ que era monodisperso) y se obtuvieron los valores de M_n (peso molecular numérico), M_w (peso molecular másico) y M_p (peso molecular del pico principal) por espectrometría de masas. En todos los casos el valor de IPD (índice de polidispersidad) resulto ser cercano a 1. La concordancia entre los valores experimentales y los calculados confirmaron la identidad de los conjugados.

I. PEGilación del bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido 59.

Para la conjugación por amidación del grupo 2-amino del disacárido **59** con la cadena PEG se utilizaron dos mPEGs activados como ester de N-hidroxisucinimida, uno de bajo peso molecular monodisperso el cual introduce 12 unidades de oxietilenos (CH₃O-PEG₆₈₅-NHS ester) y otro de más alto peso molecular y polidisperso (CH₃O-PEG₅₀₀₀-NHS ester) (**Esquema 3-4**). Las amidaciones se realizaron en buffer pH 8 a temperatura ambiente y se monitorearon por ccd. El disacárido de partida (**59**) tiene un R_f 0,51 (EtOH:H₂O:NH₄OH(c) 9:1:0,15) mientras que el producto **60** se muestra como una mancha oscura con un R_f 0,33 cuando fue revelado con reactivo de ácido sulfúrico. El compuesto **61**, en iguales condiciones de ccd y revelado, se observó como una mancha cercana al lugar de siembra. Los ésteres CH₃O-PEG₆₈₅-NHS y CH₃O-PEG₅₀₀₀-NHS de partida no reaccionan con este reactivo. Para la obtención del compuesto **60** se utilizó un exceso de disacárido de partida para asegurar la conjugación de todas las cadenas PEGs. Luego se purificó por cartuchos de fase reversa recuperando el disacárido **59** que eluyó con H₂O, mientras que el compuesto **60** menos polar eluyó con metanol. Para la obtención del compuesto **61** también se utilizó un exceso de disacárido para asegurar la conjugación total aunque en este caso, al tener una cadena de PEG de mucho mayor tamaño, este exceso se podía eliminar por diálisis contra agua pues se filtra fácilmente por los poros de la membrana. Por liofilización se obtuvieron los compuestos **60** y **61** como polvos blancos con un 67% y un 98% de rendimiento respectivamente.



Esquema 3-4

El espectro de RMN ^1H del compuesto **60** (Figura 3-12) mostró la PEGilación de **59** con un equivalente de mPEG, por la correlación entre las integrales de la única señal del OCH_3 terminal (d) de la cadena de polietilenglicol, la cual apareció como un singulete a δ 3,37 ppm que integra para 3 H y las señales de los dos protones anoméricos que aparecieron a δ 4,95 ppm ($J_{1,2}= 3,6$ Hz) para la α -GlcN y a δ 4,43 ppm ($J_{1,2}= 7,8$ Hz) para la β -Galp, los cuales integran para 1 H cada uno. También se pudo ver uno de los protones del CH_2Ph , sustituyente del azúcar, que se mostró a δ 4,54 ppm con una constante de acoplamiento característica de protones geminales, $J= 12$ Hz, que integra para 1 H, mientras que la señal del otro protón se suprimió junto con la señal del DHO a δ 4,79 ppm. Los protones oxietilénicos del PEG aparecieron como una señal intensa centrada a δ 3,69 ppm (b y c), la cual integró para 11 grupos de oxietilenos. El metileno unido al carbonilo de la amida (a) apareció como un doblete a campos más altos (δ 2,52 ppm, $J= 1,7$ y 6 Hz) e integró para 2 H.

El espectro de RMN ^{13}C (Figura 3-13) mostró entre otras, las señales de los carbonos anoméricos a δ 103,4 ppm (β -Galp) y δ 96,1 ppm (α -GlcN) y la señal del C-2 del grupo amino del azúcar a δ 53,6 ppm. Para el extremo del polietilenglicol la señal de OCH_3 (d) apareció a δ 58,0 ppm, el metileno unido al carbonilo del grupo amido (a) apareció a δ 35,8 ppm y los grupos oxietilenos de la cadena PEG aparecieron como un pico intenso a δ 69,6 ppm (b y c). Los otros carbonos del azúcar y el metileno del CH_2Ph se mostraron entre δ 75,1 y 61,0 ppm.

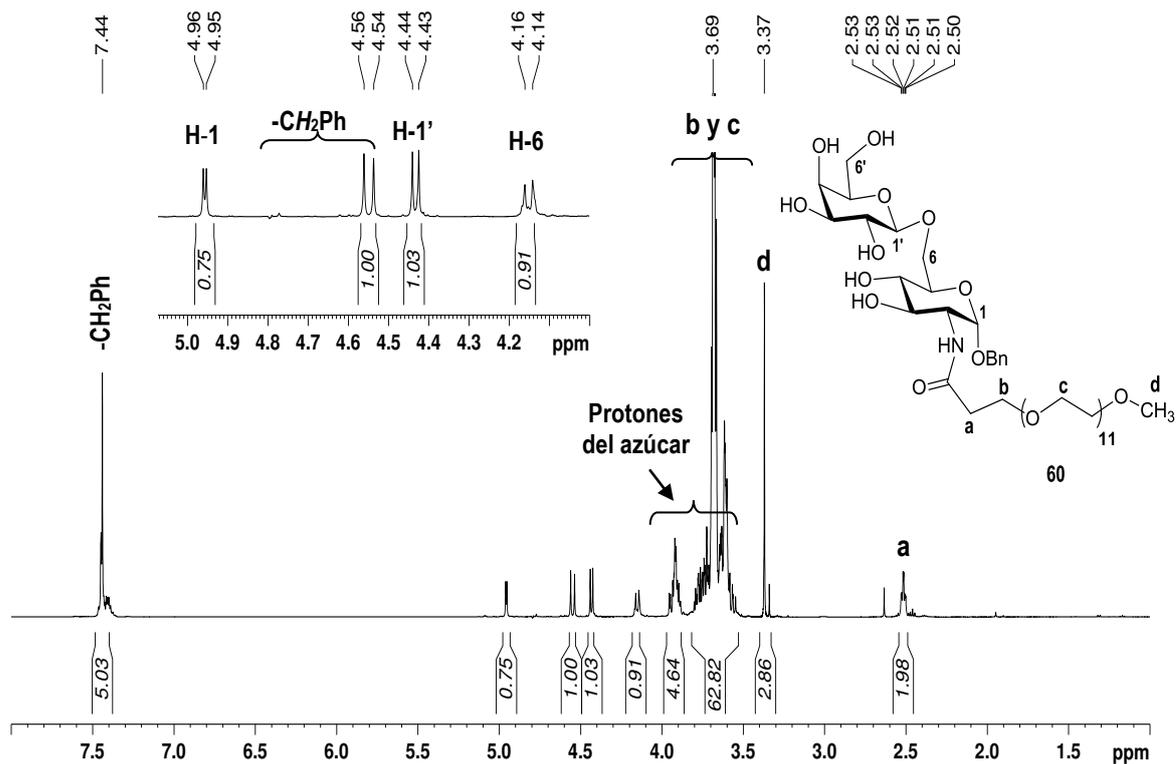


Figura 3-12. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de 60

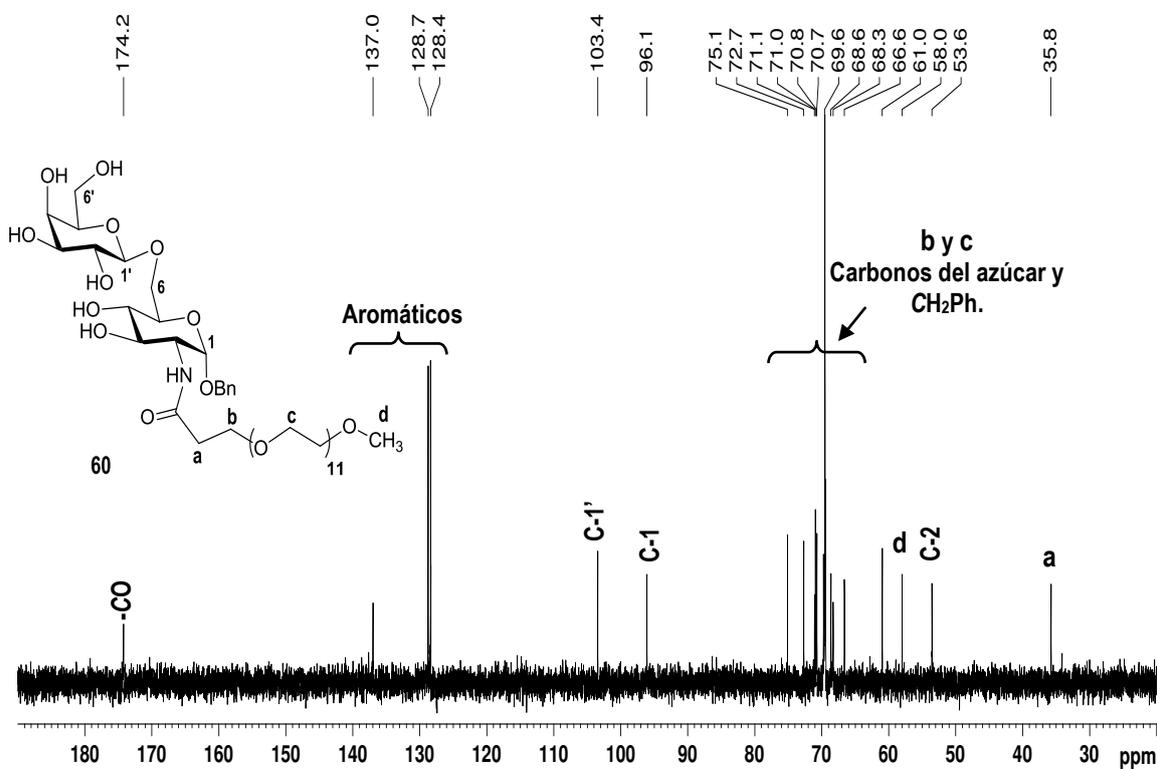


Figura 3-13. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 500 MHz) de 60

El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF mostró un pico mayoritario de $[M+Na]^+$ a 1024,49 correspondiente al conjugado **60** con 12 grupos oxietileno junto con otros picos que corresponden a los fragmentos indicados (**Figura 3-14**).

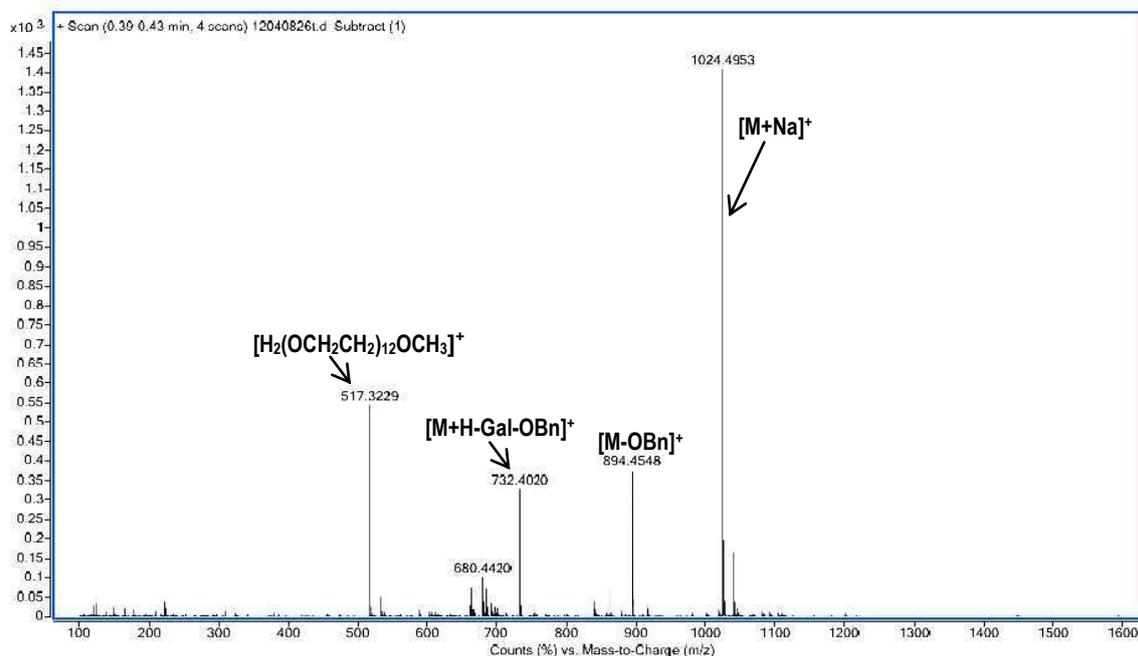


Figura 3-14. Espectro de masas de alta resolución MALDI-TOF en modo positivo de **60**.

El espectro de RMN 1H del compuesto **61** confirmó la PEGilación por el desplazamiento de señal del metileno (a) del ester $CH_3O-PEG_{5000}-NHS$ de partida (**Figura 3-15 A**) que aparece como un singulete a δ 4,20 ppm e integra para 2 H cuando no está derivatizado y se desplaza hacia campos mayores (δ 3,95 ppm) cuando se encuentra conjugado con el azúcar en una unión amida (**Figura 3-15 B**). En concordancia se puede observar la ausencia de la señal de los 4 H del NHS (s) a 2,8 ppm. Por otra lado, las señales de los dos anómeros que aparecieron a δ 4,98 ppm ($J_{1,2} = 3,7$ Hz) para la α -GlcN y a δ 4,44 ppm ($J_{1,2} = 7,8$ Hz) para la β -Galp confirmarían la conjugación con el disacárido **59**. Uno de los protones de la CH_2Ph , sustituyente del azúcar, se mostró a δ 4,57 ppm con una constante de acoplamiento geminal $J = 12$ Hz, mientras que la señal del otro protón fue suprimido junto con la señal del DHO a δ 4,79 ppm. Los protones oxietilénicos del PEG aparecieron como una señal intensa centrada a δ 3,71 ppm (b) mientras que el OCH_3 (c) terminal apareció como un singulete a δ 3,39 ppm.

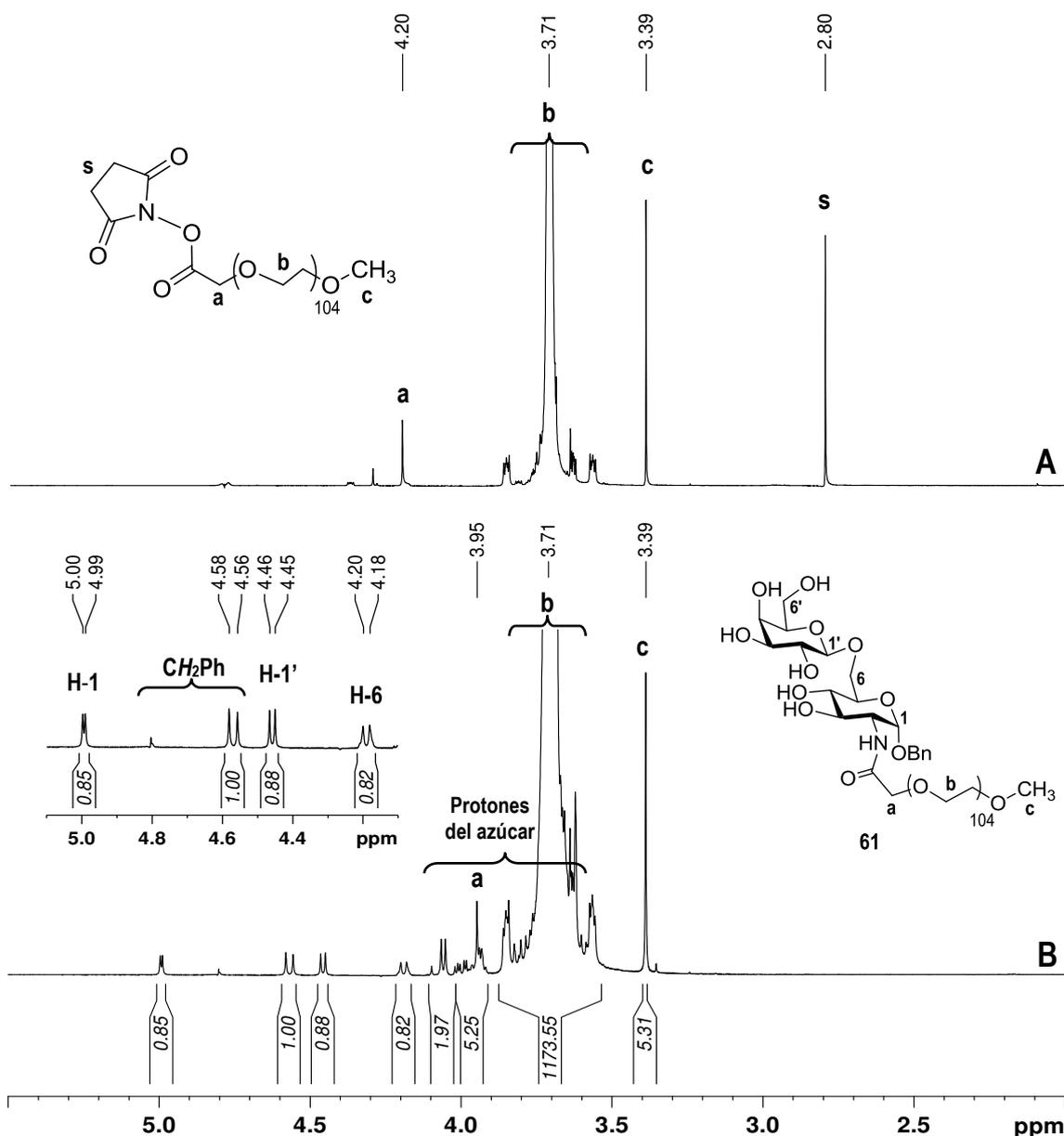


Figura 3-15. Comparación de los RMN ^1H de $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{5000}\text{-NHS}$ de partida (A) y el del compuesto **61**(B).

La integral de los protones resultó mayor de la que le correspondería de acuerdo al peso molecular observado por MALDI-TOF, lo cual podría deberse a una sobreestimación debido a las señales satelitales que dificultan la medición. Por otro lado, no podemos descartar la existencia de algunas cadenas de PEG que originalmente no contenían sitio activo derivatizable y cuyas señales (b y c) coincidirían.

El análisis de espectrometría de masas ESI-TOF reveló una serie de picos espaciados en 44 Da (OCH_2CH_2) correspondientes a los aductos de amonio. En Este caso se agregó acetato de amonio para favorecer la ionización. Se observó un pico

principal de $[M+NH_4]^+$ a 5,097 correspondiendo a un conjugado **61** con 104 grupos oxietilenos (**Figura 3-16**).

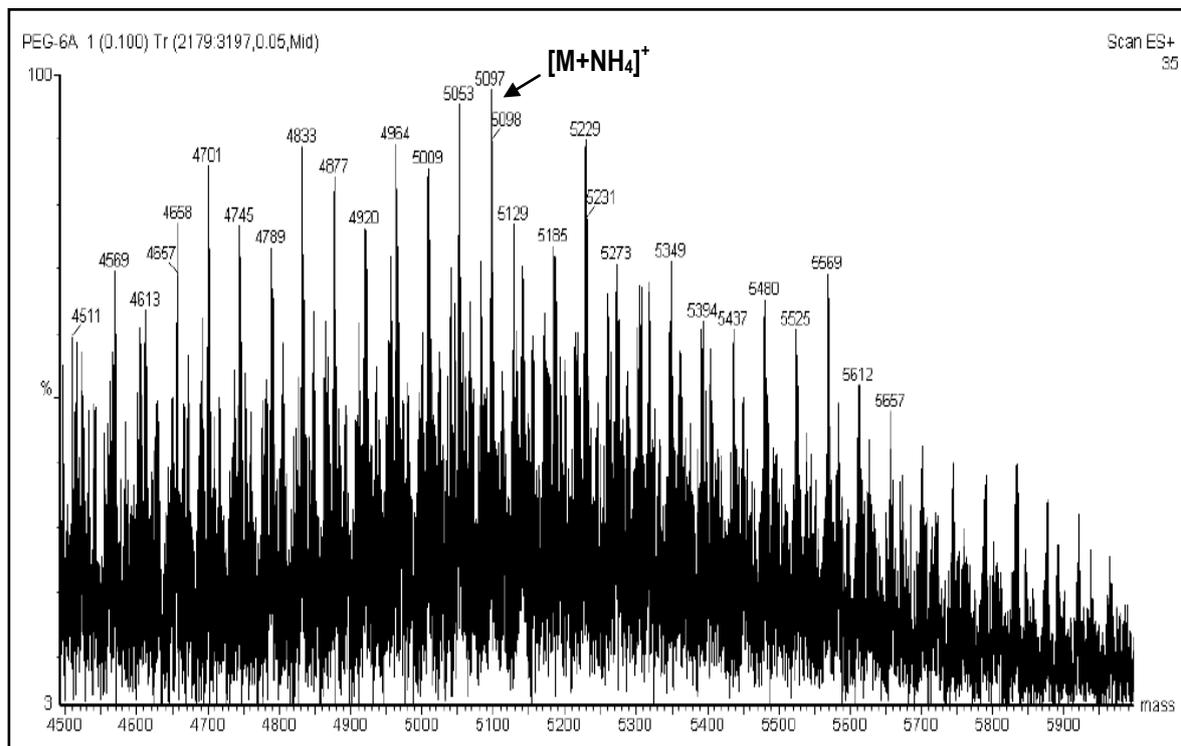
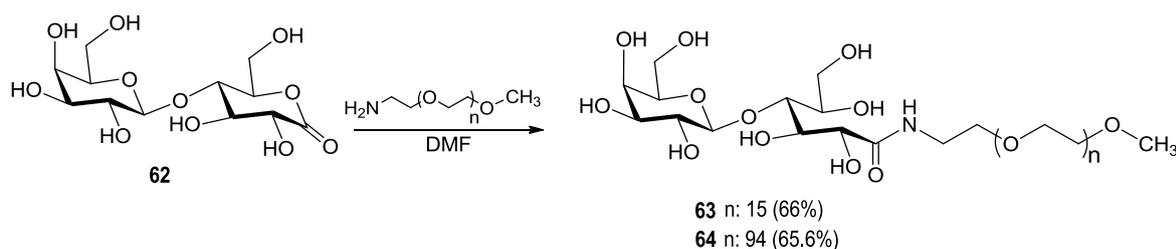


Figura 3-16. Espectro de masas de alta resolución ESI-TOF en modo positivo de **61**.

II. PEGilación de lactobiono 1,5-lactona.

Se había determinado previamente que el ácido lactobiónico (**30**) resultaba ser buen aceptor del ácido siálico e inhibidor competitivo de TcTS (Agustí *et al.*, 2004). En este trabajo se consideró la presencia del grupo carbonilo para formar una unión amida con el grupo terminal de un mPEGamino lineal (**Esquema 3-5**). Se utilizaron dos mPEG polidispersos de diferentes pesos moleculares, $CH_3O-PEG_{750}-NH_2$ y $CH_3O-PEG_{5000}-NH_2$. El ácido lactobiónico se activó como lactobiono 1,5-lactona (**62**) (Isbell *et al.*, 1963) y luego se calentó con el mPEGamino en DMF anhidra. La reacción se monitoreó por ccd. El disacárido de partida (**62**) mostró un R_f 0,60 (EtOH:H₂O:AcOH(c) 80:5:15) mientras que el producto **63** se observó como una mancha oscura con un R_f 0,35 cuando fue revelado con reactivo de ácido sulfúrico. En idénticas condiciones de ccd y revelado, el compuesto **64** se observó como una mancha oscura cercana al lugar de siembra. Ambos PEGamino de partida se detectaron con el reactivo de ninhidrina mostrando un R_f 0,36 para el $CH_3O-PEG_{750}-NH_2$ mientras que CH_3O-

PEG₅₀₀₀-NH₂ mostró una mancha violeta cercana al lugar de siembra. En el caso del conjugado de menor peso molecular se utilizó un exceso de mPEGamino pues, luego de la reacción, se pudo eliminar el excedente mediante pasaje por una columna de intercambio catiónico y luego el eluido acuoso se recromatografió por una columna cromatográfica de exclusión Sephadex G-10 para separar posibles restos de azúcar libre. Para el conjugado **64** de mayor peso molecular se utilizó un exceso de lactobionol 1,5-lactona ya que ésta podía ser totalmente removida luego de la reacción mediante diálisis contra agua. Para remover posibles restos de mPEGamino sin reaccionar la solución se pasó por resina catiónica. Por liofilización se obtuvieron los compuestos **63** y **64** como polvos blancos, ambos con un 66 % de rendimiento. El espectro de IR de ambos conjugados mostraron las señales correspondientes al grupo carbonilo de la amida a 1654 cm⁻¹ y 1672 cm⁻¹ respectivamente y se observó la desaparición del grupo carbonilo de la lactobionol 1,5-lactona **62** a 1740 cm⁻¹.



Esquema 3-5

El espectro de RMN ¹H de **63** (Figura 3-17) indicó la PEGilación con un equivalente de mPEG, mediante la correlación entre la señal del OCH₃ (d), el cual apareció como un singulete a δ 3,38 ppm que integró para 3 H y la señal del único protón anomérico de la β-Galp a δ 4,55 ppm ($J_{1,2} = 7,8$ Hz) que integró para 1 H. También se observó a δ 4,42 ppm ($J_{2,3} = 2,75$ Hz) un doblete característico del H-2 de la lactobionamida que integró para 1 H. El metileno unido directamente a la amida (a) se mostró como un multiplete que integra para 2 H centrado en δ 3,47 ppm mientras que el metileno unido a este (b) se mostró a δ 3,56 ppm integrando para 2 H. Los grupos oxietilenos de las unidades repetitivas mostraron una señal intensa centrada a δ 3,70 ppm (c) que integran para 88 H.

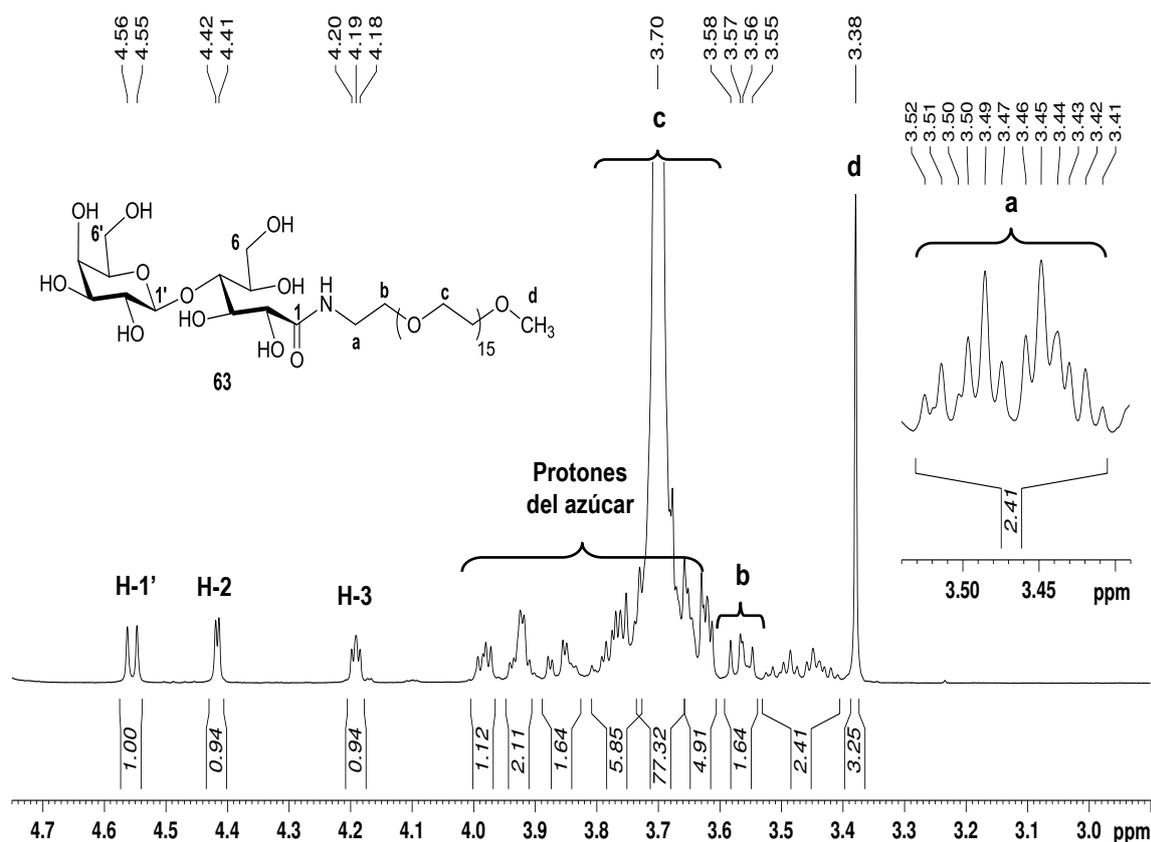


Figura 3-17. Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de **63**.

El espectro de RMN ^{13}C de **63** (Figura 3-18) mostró, entre otras, la señal correspondiente al carbonilo de una amida a δ 174,4 ppm y la señal del carbono anomérico a δ 103,5 ppm correspondiente a la β -Galp. Para el extremo mPEG la señal del OCH_3 (d) apareció a δ 58,0 ppm, el metileno junto a la amida (a) se mostró a δ 38,6 ppm y los oxietilenos de la cadena aparecieron como una señal intensa a δ 69,6 ppm (b y c).

El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 3-19) reveló una serie de picos espaciados en 44 Da (OCH_2CH_2) correspondientes a los aductos de Na^+ . Se observó un pico principal correspondiente a $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a 1098,55 correspondiendo a un conjugado con 16 grupos oxietileno.

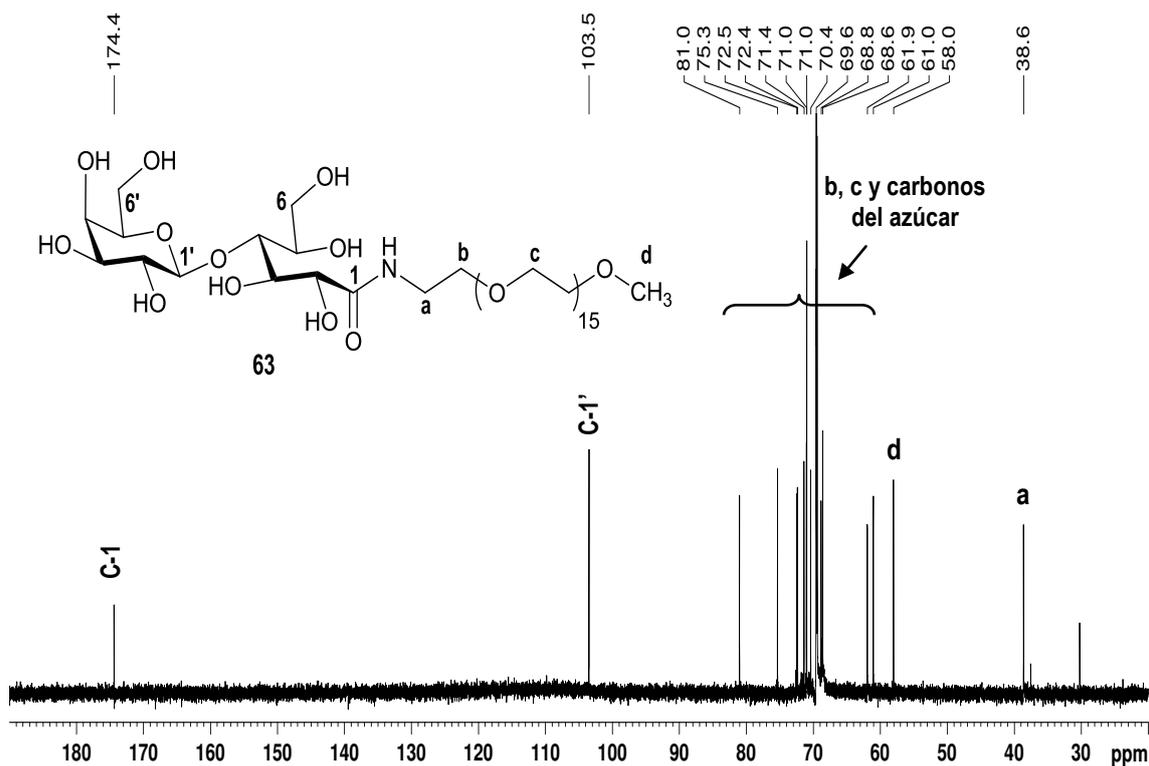


Figura 3-18. Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 500 MHz) de **63**

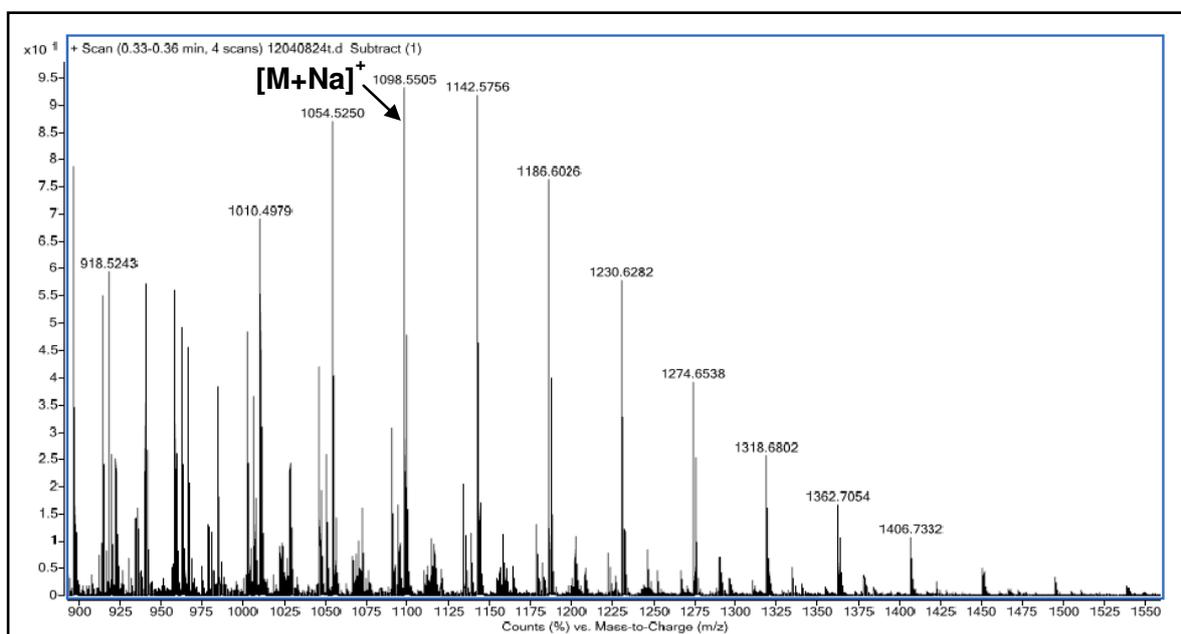


Figura 3-19. Espectro de masa de alta resolución MALDI-TOF de **63**.

El espectro de RMN ^1H del compuesto **64** confirmó la PEGilación por el desplazamiento de la señal del metileno unido a nitrógeno (a) del mPEGamino de partida que aparece como un triplete que integra para 2 H a δ 3,08 ppm cuando no

está derivatizado (**Figura 3-20 A**) y se desplaza hacia campos menores (δ 3,44 ppm) cuando se encuentra conjugado (**Figura 3-20 B**). Por otro lado, la señal del único protón anomérico de la β -Galp a 4,55 ppm ($J_{1,2}=7,8$ Hz) que integró para 1 H indicó la conjugación con la lactono 1,5-lactona. También se observó a δ 4,41 ppm ($J_{2,3}=2,75$ Hz) el doblete característico del H-2 de la lactobionamida que integró para 1 H. Los protones oxietilénicos del mPEG aparecieron como una señal intensa centrada a δ 3,7 ppm (b y c) mientras que el OCH₃ terminal (d) se mostró como un singulete a δ 3,38 ppm.

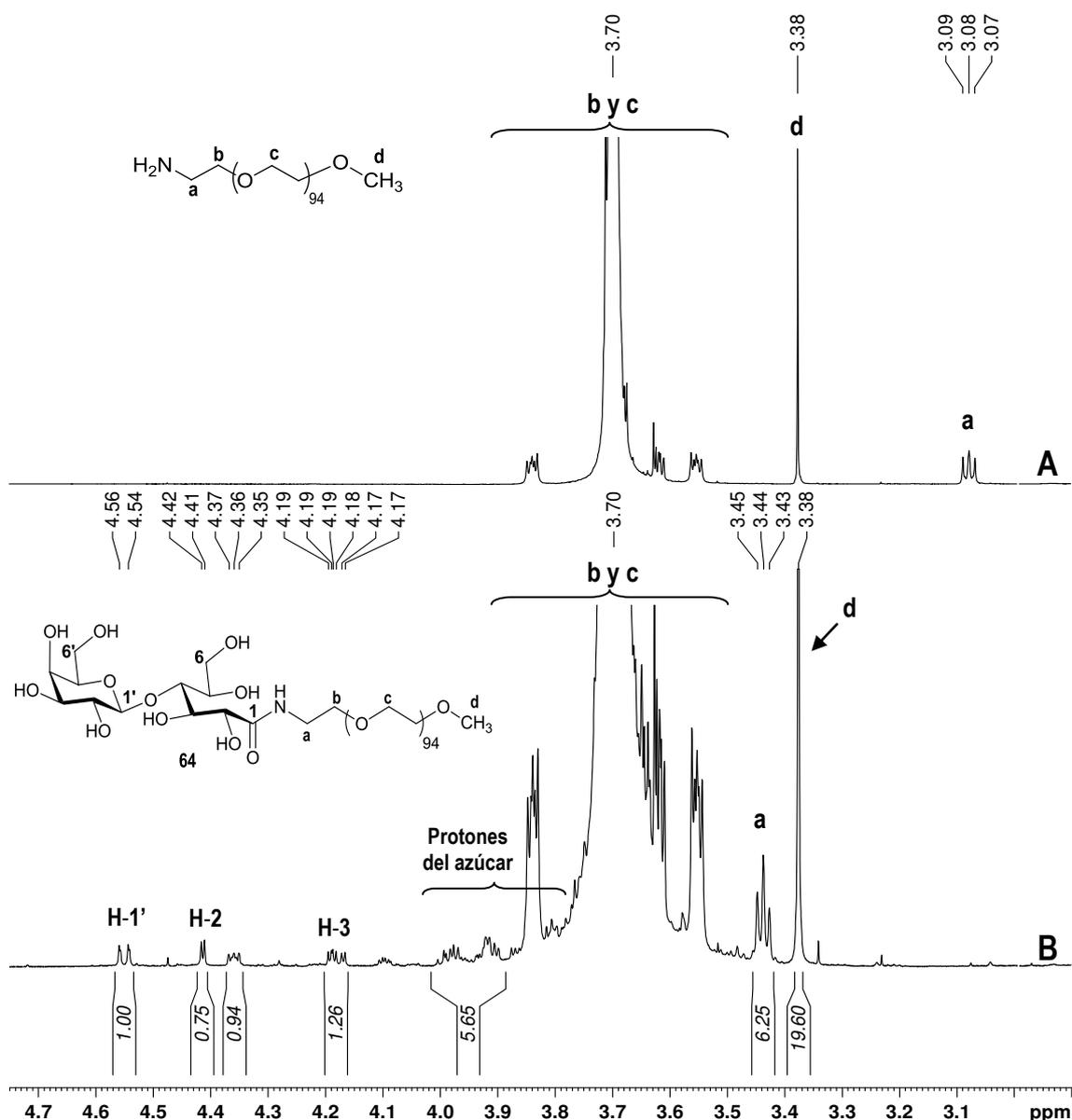


Figura 3-20. Comparación de los RMN ¹H de CH₃O-PEG₅₀₀₀-NH₂ de partida (**A**) y del compuesto **64** (**B**).

Las integrales de estos últimos resultaron ser mayores al que le correspondería de acuerdo al peso molecular observado por MALDI-TOF y esto podría deberse, al igual que para el compuesto **61**, a la existencia de cadenas de PEG que originalmente no contenían sitio activo derivatizable o a una sobreestimación de la integral debido a superposición de las señales satelitales que dificultan la medición.

El análisis de espectrometría de masas ESI-TOF (**Figura 3-21**) mostró una serie de picos espaciados en 44 Da (OCH_2CH_2) correspondientes a aductos de $[\text{NH}_4]^+$, acompañados de unos picos de menor intensidad correspondientes a aductos de $[\text{H}]^+$. Se observó un pico principal de $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ a 4569 correspondiendo a un conjugado con 95 grupos oxietilenos.

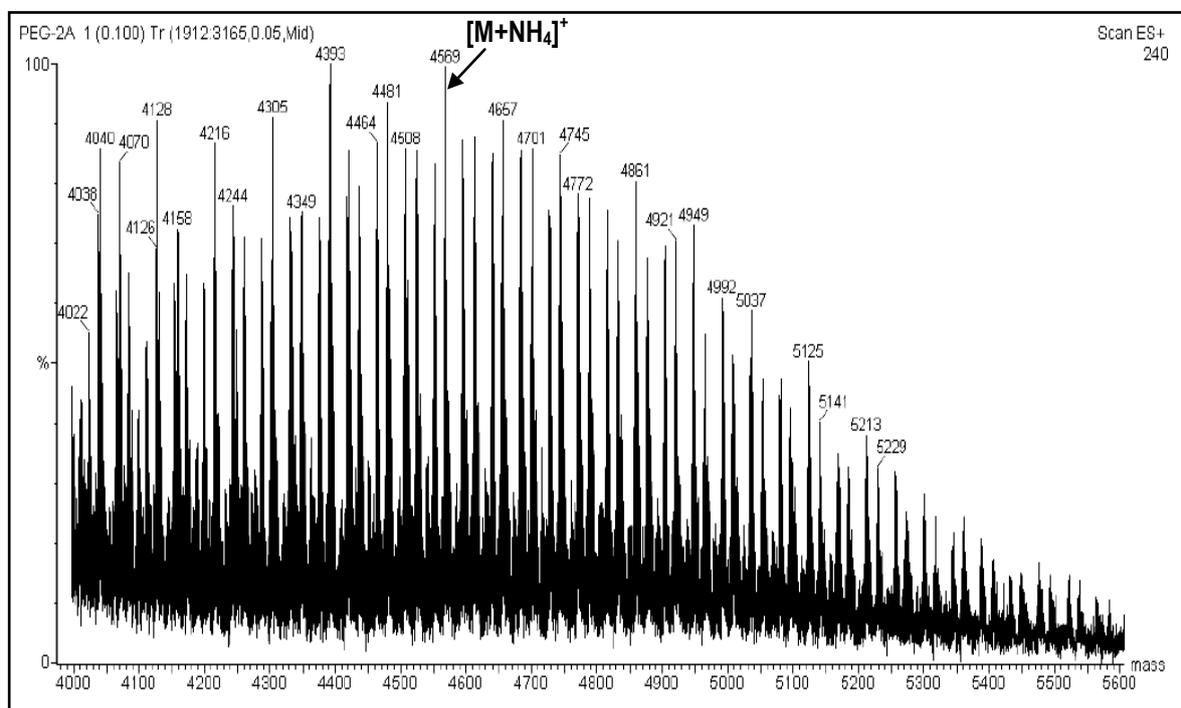
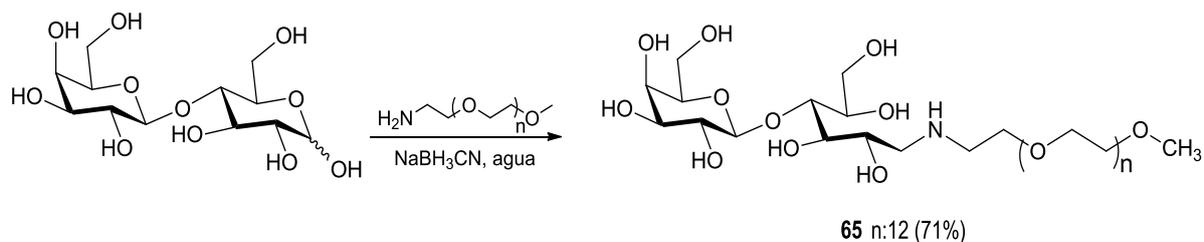


Figura 3-21. Espectro de masa de alta resolución ESI-TOF en modo positivo de **64**.

III. PEGilación de la lactosa.

Como mencionamos en la introducción de este capítulo el lactitol (**31**) resultó ser mejor aceptor de ácido siálico comparado con la lactosa y la *N*-acetilactosamina (Agustí *et al.*, 2004) sugiriendo que la estructura de cadena abierta del alditol se puede unir mejor el sitio activo de la enzima. La PEGilación de la lactosa con un PEG amino mediante aminación reductiva retiene la estructura de cadena abierta del alditol, al

mismo tiempo que provee una estructura estable de unión amino entre el disacárido y la cadena de mPEG (**Esquema 3-6**). La reacción se llevo a cabo incubando lactosa con $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{750}\text{-NH}_2$ (mPEGamino utilizado para la síntesis de amidación con lactobio1,5-nolactona) en presencia de NaBH_3CN a pH 8, condiciones bajo las cuales se produce la reducción selectiva de la imina. Se utilizó un exceso del disacárido para asegurar la conjugación de todas las cadenas de mPEGamino. La reacción fue monitoreada por ccd la cual mostró el exceso de lactosa, la aparición del compuesto **65** cuando se reveló con el reactivo de ácido sulfúrico y la desaparición del PEGamino de partida, el cual revelaba selectivamente con el reactivo de ninhidrina sobre la línea de siembra (R_f 0,8 y 0,16, EtOH:H₂O, 4:1). El ácido bórico fue eliminado por co-evaporaciones con metanol. La purificación de la mezcla de reacción se llevó a cabo mediante el pasaje de la misma por resina catiónica. El exceso de lactosa eluyó con agua mientras que el conjugado **64** eluyó con 0,5 N de HCl. Finalmente se obtuvo **65** como un sólido blanco con un 71 % de rendimiento.



Esquema 3-6

El espectro de RMN ¹H de **65** (**Figura 3-22**) indicó la PEGilación con un equivalente de mPEGamino mediante la integración de la señal del OCH₃ terminal (d), que aparece como un singulete a δ 3,39 ppm y la señal del protón anomérico a δ 4,54 ppm ($J_{1,2} = 8$ Hz) correspondiente a la β -Gal ρ el cual integra para 1 H. También se pudieron observar las señales a δ 3,23 ppm y δ 3,03 ppm de los protones de los metileno obtenidos como resultado de la reducción del carbono anomérico de la lactosa (H-1). Los oxietilenos de la cadena mPEG se mostraron como un pico intenso centrado a δ 3,72 ppm (c) mientras que los protones del metileno b se observan a δ 3,59-3,56 ppm e integran para 2 H. El metileno unido directamente al grupo nitrógeno (a) se mostró a δ 3,44-3,31 ppm superpuesto a la señal de uno de los protones del H-6 y del singulete de OCH₃.

El espectro de RMN ¹³C de **65** (**Figura 3-23**) mostró la señal del carbono anomérico a δ 102,8 ppm (β -Gal ρ) y la señal del carbono metilénico producto de la reducción (C-1) que aparece a δ 49,6 ppm. Para la cadena mPEG, la señal

correspondiente a OCH₃ (d) apareció a δ 58,1 ppm mientras que el carbono del metileno unido a nitrógeno (a) se mostró a δ 47,2 ppm. Los carbonos correspondientes a los grupos oxietileno aparecieron como un pico intenso a δ 69,6 ppm.

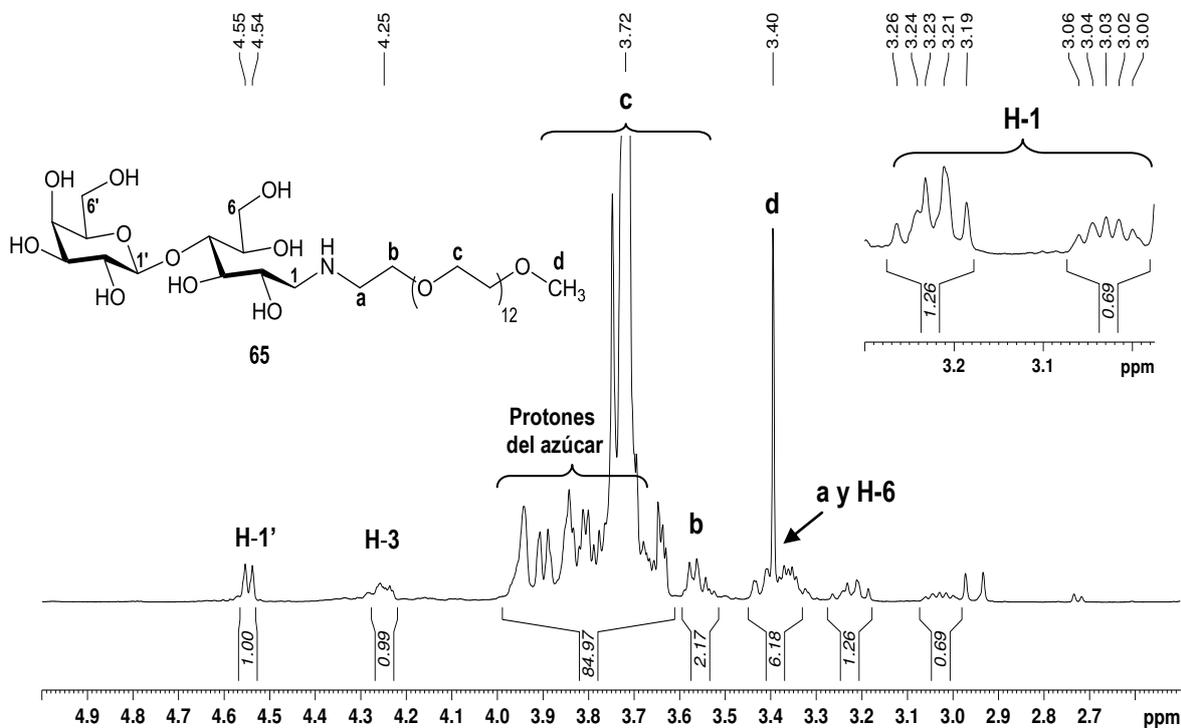


Figura 3-22 Espectro de RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) de 65.

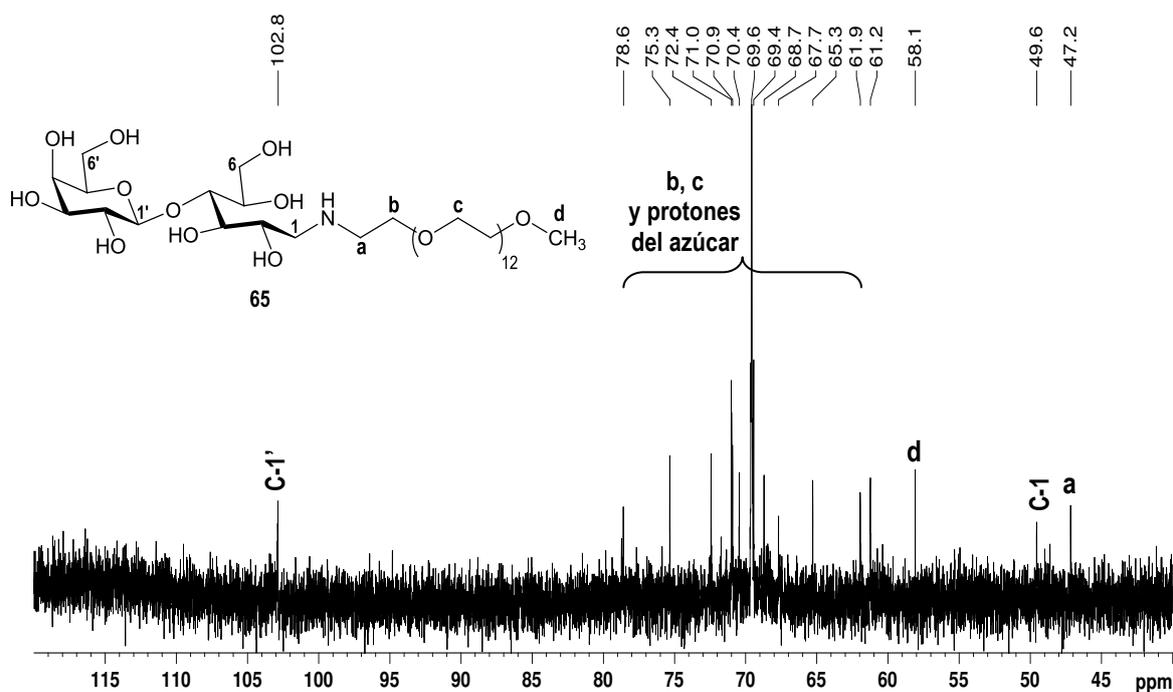


Figura 3-23 Espectro de RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz) de 65

El análisis de espectrometría de masas ESI-TOF (**Figura 3-24**) reveló una serie de picos espaciados en 44 Da (OCH_2CH_2) correspondientes a los aductos de Na^+ . Se pudo ver un pico principal de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a 952,49 que corresponde a un conjugado con 13 oxietilenos.

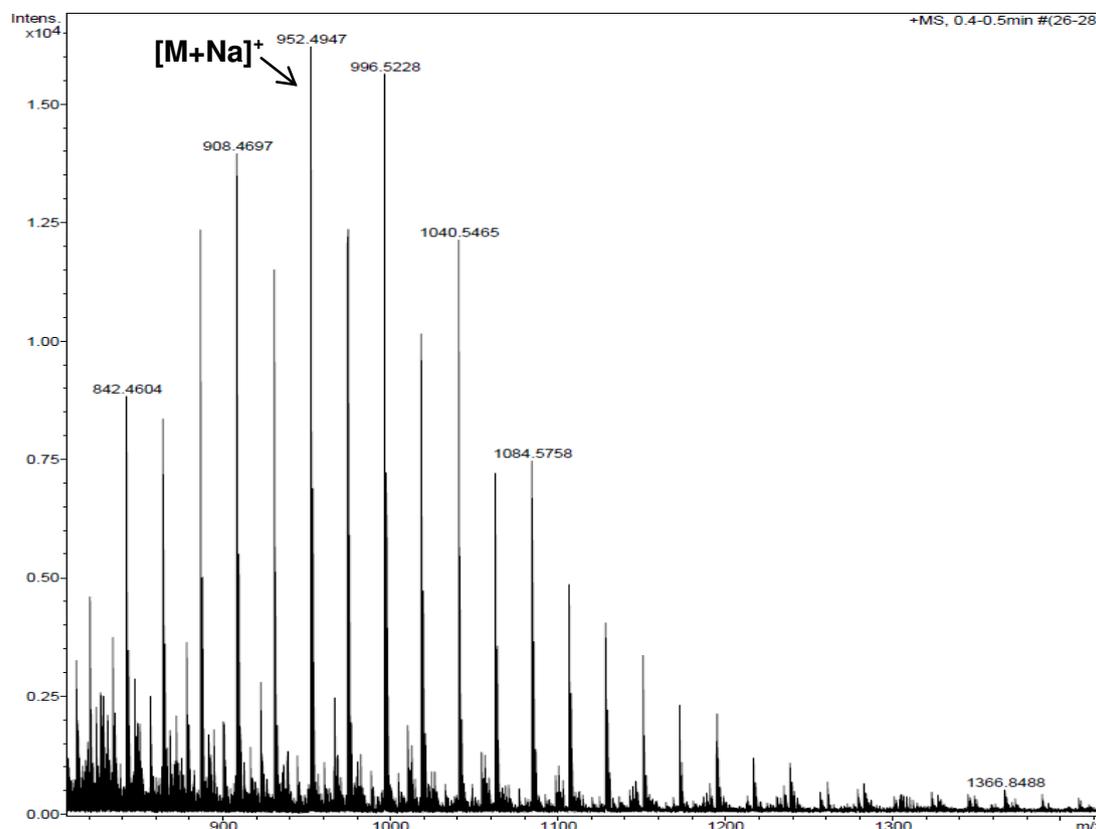


Figura 3-24. Espectro de masa de alta resolución ESI-TOF en modo positivo de 65.

Conjugación de análogos de lactosa con PEGs multibrazos.

Para la obtención de conjugados con PEGs multibrazos también utilizamos dos estrategias diferentes para la PEGilación de disacáridos conteniendo $\beta\text{-D-Galp}$ como unidad no reductora. **I.** Formación de una amida entre el grupo amino del bencil $\beta\text{-D-galactopiranosil-(1}\rightarrow\text{6)-2-amino-2-desoxi-}\alpha\text{-D-glucopiranosido}$ **59** y un SSPEG (ester succinimidilsuccinato PEG) de 8 brazos **II.** Formación de una amida entre el grupo carboxílico del ácido lactobiónico y NH_2PEGs de 8-brazos. Si bien los métodos utilizados son los mismos que para los conjugados lineales, en este caso se utilizó PEGs multibrazos constituidos por 8 cadenas lineales de polietilenglicol unidos a un “core” central de hexaglicerol y cuyos extremos libres se encuentran activados con un

grupo funcional adecuado para su posterior conjugación. De esta manera se consiguió aumentar el tamaño del conjugado manteniendo la relación en peso de sustrato inhibidor/ PEG.

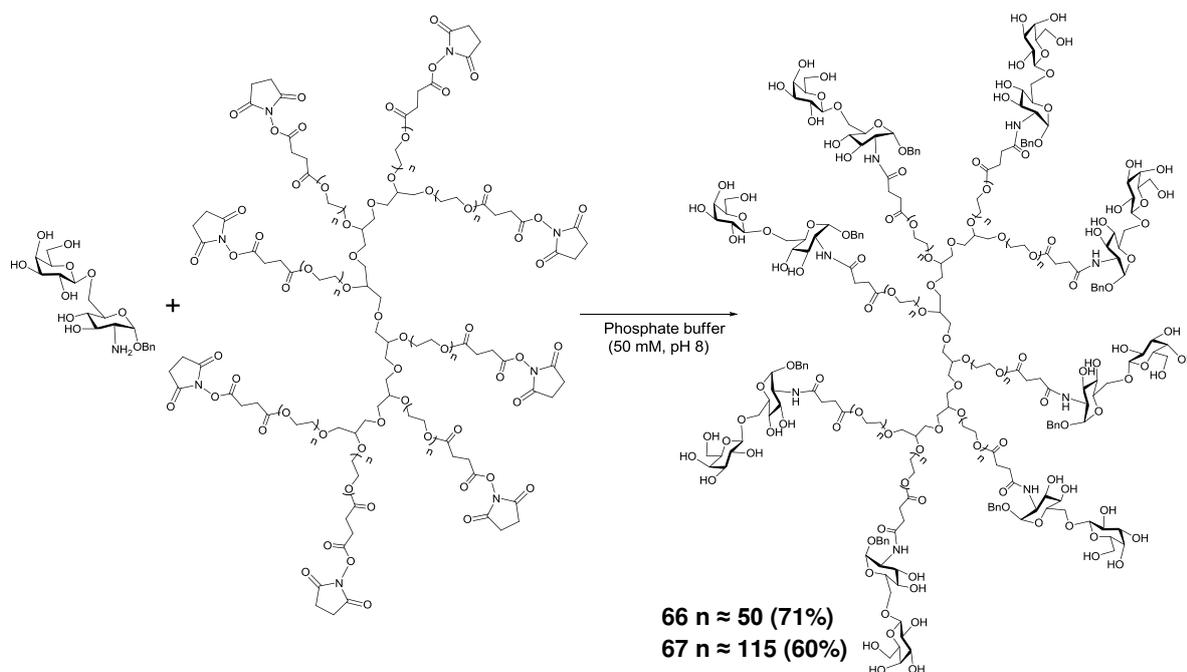
A diferencia de los conjugados lineales, estos no pudieron ser caracterizados por MALDI-TOF o por ESI por varias causas. La resolución en MALDI-TOF para compuestos mayores a 20 kDa no es suficiente como para resolver iones moleculares adyacentes con diferencia de 44 unidades de masa y como resultado solo se ve una distribución continua y ruidosa. El método no es conveniente cuando se trabaja con polímeros polidispersos de pesos moleculares altos: los iones más abundantes de menor peso molecular alcanzan el detector antes que los iones de alto peso molecular, por lo que saturan el detector, este pierde sensibilidad y como resultado, pueden no observarse los iones de mayor peso molecular (Trathnigg, 2000). Por otro lado, los espectros de ESI-TOF de polímeros de polietilenglicol resultan ser muy complejos de interpretar. Al ser polímeros polidispersos, cada oligómero presenta un peso molecular diferente y estos a su vez pueden tener múltiples estados cargados. Como resultado se obtienen señales anchas y muy ruidosas producto de la superposición de señales y de la polidispersidad del polímero.

En vista de lo explicado anteriormente los conjugados multibrazos se caracterizaron por RMN y SEC. Se obtuvieron los valores de M_n (peso molecular numérico) por ambos métodos y M_w (peso molecular másico) y M_p (peso molecular del pico principal) por SEC. En todos los casos el valor de IPD (índice de polidispersidad) resulto ser cercano a 1. La comparación entre los espectros de RMN de los PEGs de partida con sus respectivos productos de conjugación nos permitió confirmar la reacción.

1. PEGilación del bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (59).

Para esta conjugación se utilizaron PEGs multibrazos cuyos extremos libres se encuentran activados como ésteres de succinimidil *N*-hidroxisuccinimida (SS). Estos pueden ser conjugados por amidación al grupo 2-amino del disacárido **59** (**Esquema 3-7**). Se utilizaron dos PEGs activados de 8 brazos de 20 y 40 kDa (20204 y 42680 Da de acuerdo al certificado de análisis del proveedor). Las amidaciones se realizaron en buffer pH 8 a temperatura ambiente y se monitorearon por ccd detectando en ambos casos los productos obtenidos como una mancha negra cercana al lugar de siembra

cuando fue revelado con reactivo de ácido sulfúrico. Los PEG multibrazos de partida no reaccionan con este reactivo. Para ambas reacciones se utilizó un exceso del disacárido de partida (R_f 0,6, EtOH:H₂O, 4:1), para asegurar máxima sustitución, pues este puede ser removido fácilmente por diálisis. Por liofilización de la solución dializada se obtuvieron los compuestos **66** y **67** como polvos blancos con 71% y 60% de rendimiento respectivamente.



Esquema 3-7

La formación de los conjugados fue confirmada por RMN ¹H. Tres grupos de señales permitieron confirmar la conjugación de cada brazo para dar el compuesto **66**.

1. Las señales correspondientes a los protones de los metilenos del succinato (e y f) los cuales aparecen como un único multiplete centrado en δ 2,70 ppm que integra para 4 H en el PEG de partida (**Figura 3-25 A**) y cuando están conjugados se muestran como dos multipletes que integran para 2 H cada uno, centrados a δ 2,54 ppm y 2,63 ppm (**Figura 3-25 B**).
2. La desaparición de la señal a δ 2,80 ppm (s) (**Figura 3-25 A**) que integra para 4 H correspondientes al par de metilenos del extremo oxi-succinimida en el espectro de partida (**Figura 3-25 B**).
3. El desplazamiento de la señal de los protones OCOCH_2 (a) a campos más altos, la cual aparece a δ 4,27 ppm e integra para 2 H cuando esta derivatizado (**Figura 3-25 B**) y cuando se encuentra sin derivatizar se muestra a δ 4,30 ppm (**Figura 3-25 A**). Conjuntamente se puede observar la correlación entre estas señales y las de los dos protones anoméricos que

aparecieron a δ 4,94 ppm ($J_{1,2} = 3,65$ Hz, H-1) y a δ 4,45 ppm ($J_{1',2'} = 7,8$ Hz, H-1'), los cuales integran para 1 H cada uno. Uno de los protones de la CH_2Ph , sustituyente del azúcar, se mostró a δ 4,58 ppm con una constante de acoplamiento de H geminal ($J = 12$ Hz), mientras que la señal del otro protón se observa en menor proporción debido a que parte de la misma se suprimió junto con la señal del DHO a δ 4,79 ppm. Los protones oxietilénicos (b y c) aparecieron como una señal intensa centrada a δ 3,71 ppm junto con las señales del "core" de hexaglicerol (R) y algunas señales del azúcar (**Figura 3-25 B**). La estimación del número de grupos de oxietilenos y por lo tanto, del peso molecular promedio se calculó por integración de la correspondiente señal respecto de la de los protones anoméricos.

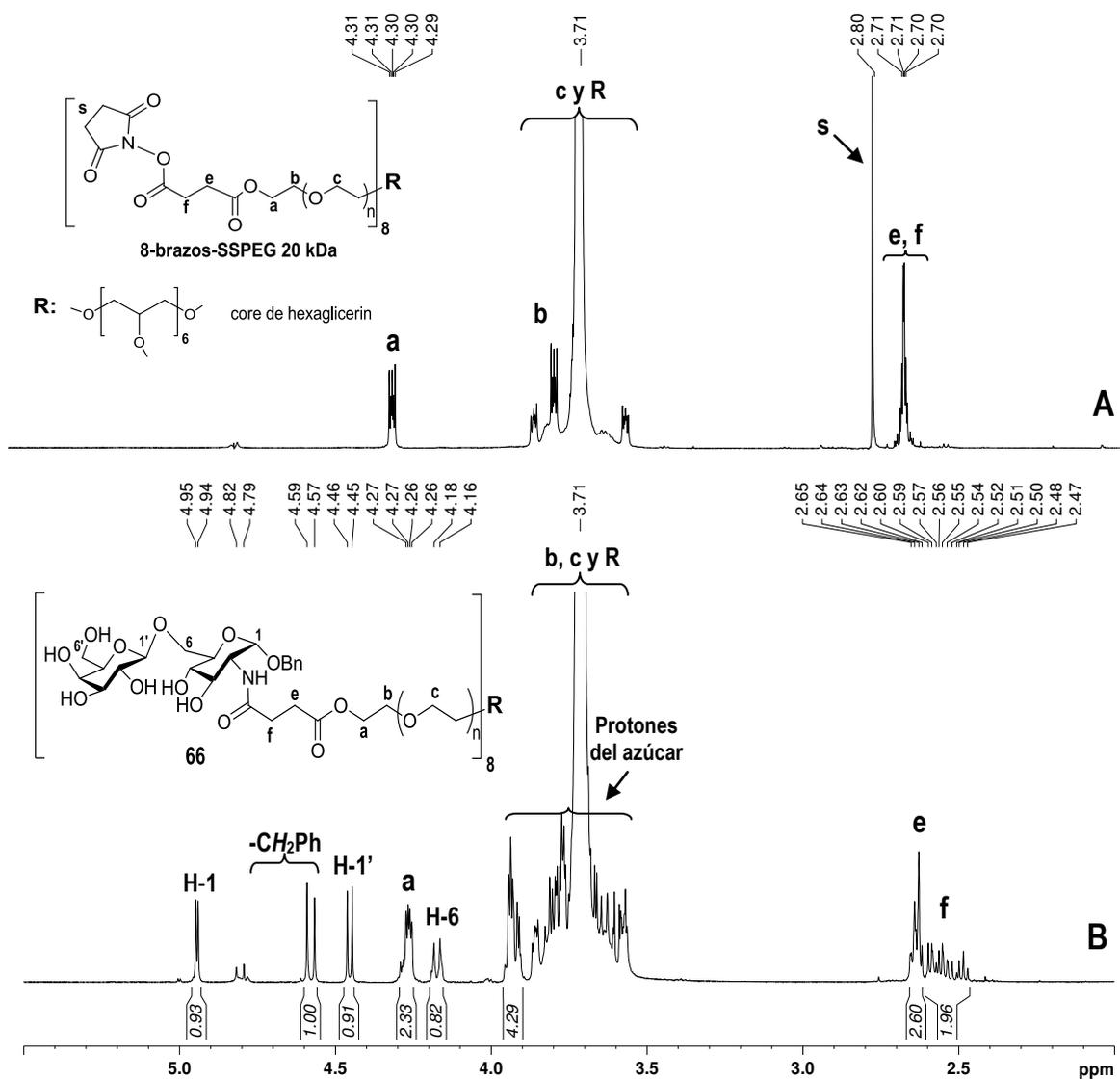


Figura 3-25. Comparación de los RMN 1H de 8-brazos-SSPEG 20kDa de partida (A) y el del conjugado 66 (B).

El espectro de RMN ^{13}C de **66** (Figura 3-26 B) mostró la desaparición de la señal de los carbonos de los metilenos de NHS (s) los cuales aparecen a δ 25,4 ppm en el material de partida (Figura 3-26 A) y la diferenciación de los carbonos del succinato (e y f) que se muestran a δ 29,3 ppm y δ 30,0 ppm respectivamente. También se pueden observar las señales de los carbonos anoméricos a δ 103,4 ppm (C-1') y δ 96,0 ppm (C-1) y la señal del C-2 del azúcar unido directamente al nitrógeno a δ 53,6 ppm. La señal del carbonilo de la amida (g) se muestra a δ 174,7 ppm superpuesta al carbonilo del ester (d) (Figura 3-26 B), mientras que en el material de partida estos aparecen a δ 175,1 ppm y δ 176,7 ppm respectivamente (Figura 3-26 A). Los grupos oxietilenos de la cadena PEG aparecieron como un pico intenso a δ 69,8 ppm junto con los carbonos de hexaglicerol (R), el CH_2Ph y otros carbonos del azúcar.

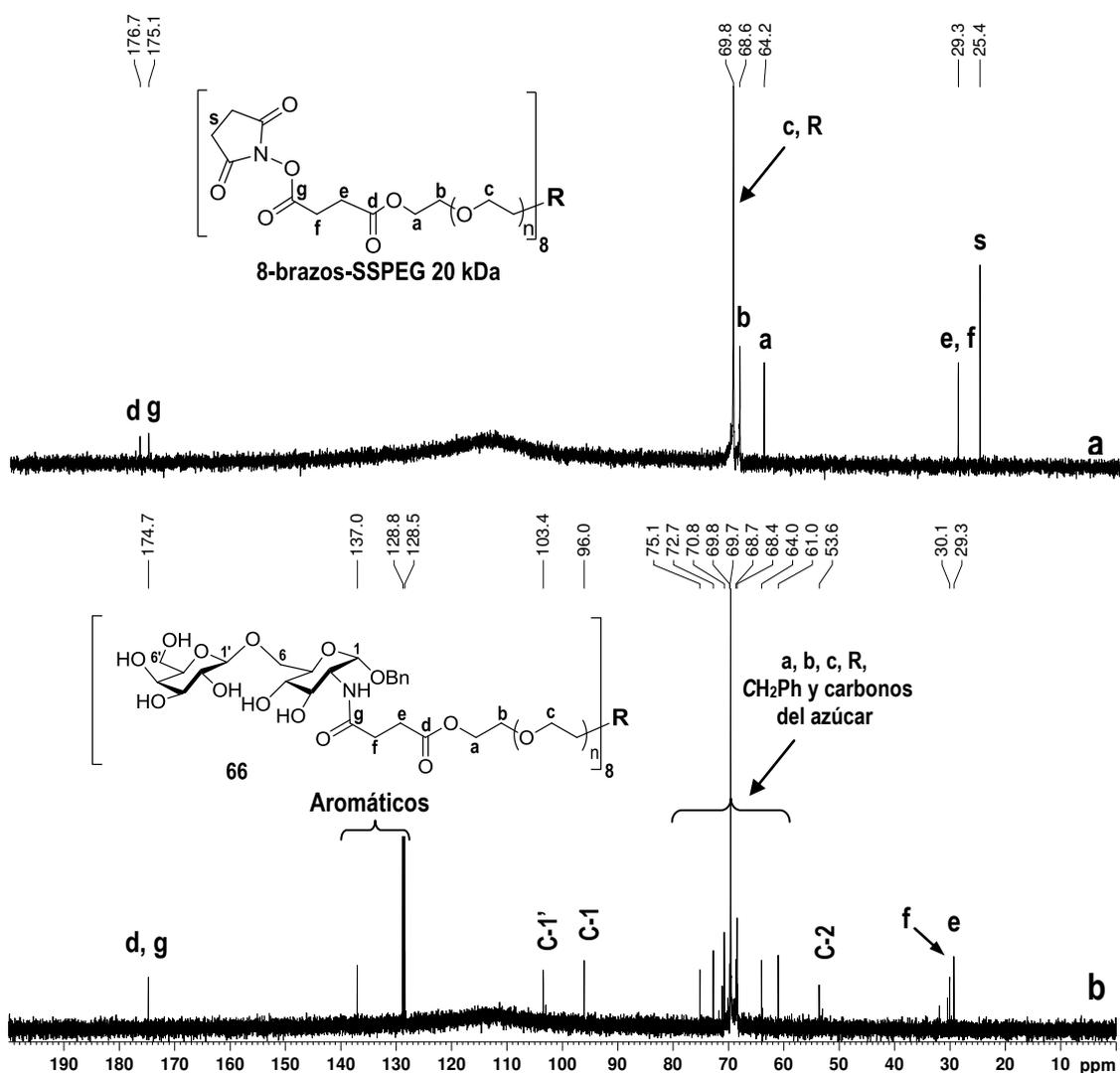


Figura 3-26. Comparación de los RMN ^{13}C de 8-brazos-SSPEG 20 kDa de partida (A) y el del conjugado **66** (B).

El espectro del compuesto **67** (Figura 3-27 B) mostró señales semejantes al espectro del compuesto **66**, diferenciándose únicamente en la integral de c y R centradas en δ 3,71 ppm y en las señales de los protones e, f y s (Figura 3-28 A) del PEG de partida que indicaría hidrólisis del grupo succinimido en el DHO, previo al análisis de RMN ^1H .

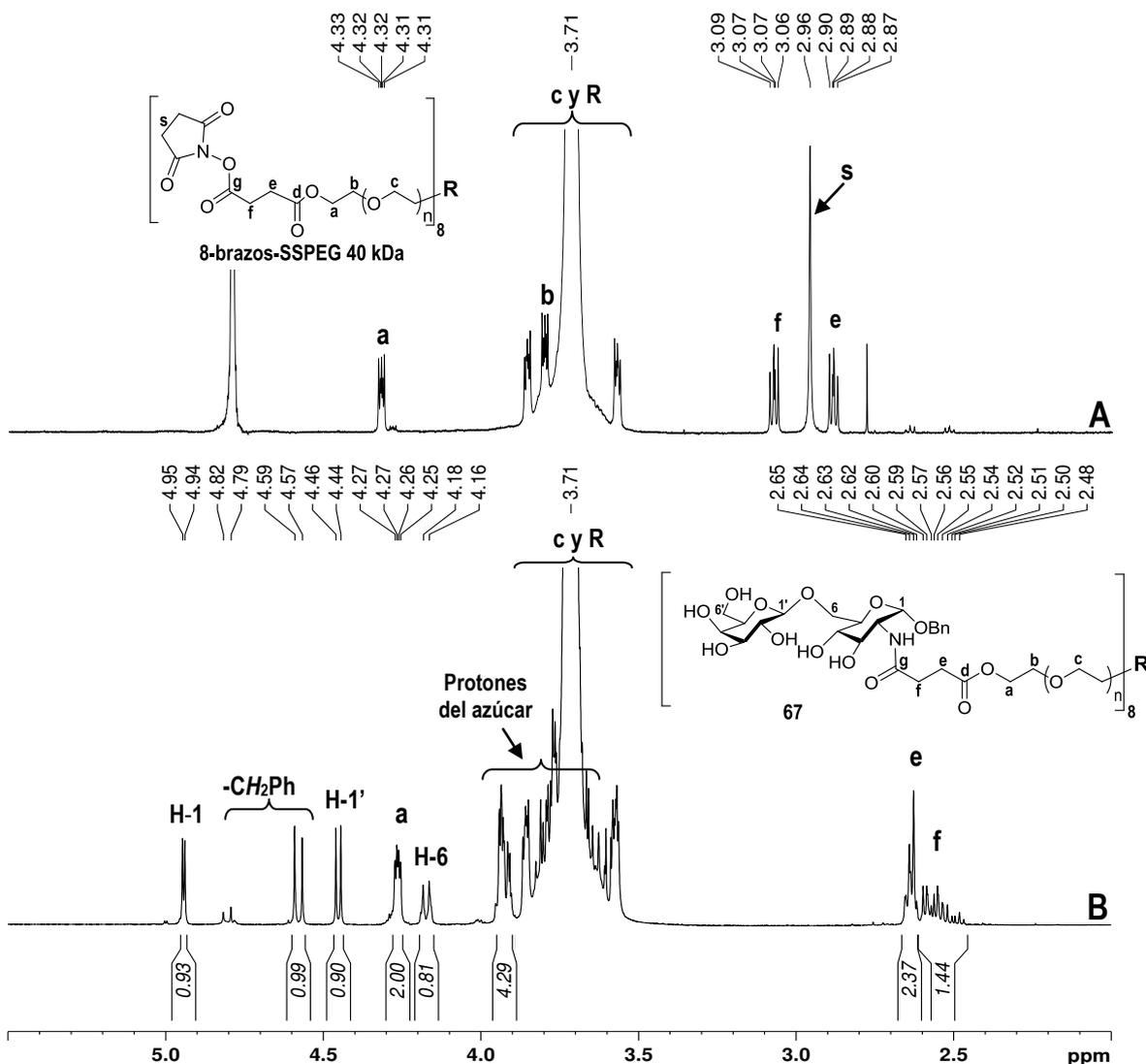
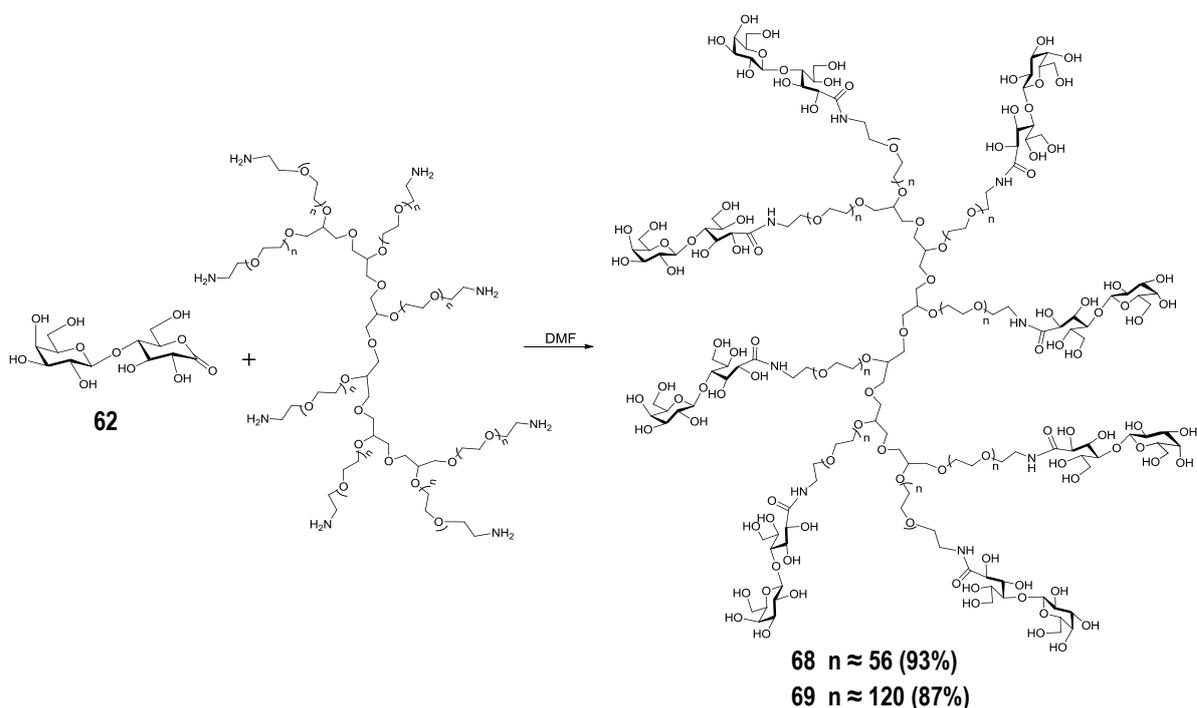


Figura 3-27 Comparación del RMN ^1H del 8-brazo-SSPEG 40kDa de partida (A) y el del conjugado **67** (B).

El análisis por SEC del compuesto **66** mostró una distribución de pesos moleculares menores a los calculados de acuerdo al certificado del proveedor para el PEG de partida (M_n 20204), calculado M_n 22732, encontrado M_p 17069 Da, M_w 19693 Da y M_n 17250 Da. Para el compuesto **67** de mayor peso molecular los pesos encontrados también resultaron ser menores a los calculados de acuerdo al certificado del proveedor (M_n 42680), calculado M_n 45208, encontrado M_p 27297 Da, M_w 30582 Da.

y M_n 27746 Da. Estas diferencias pueden deberse a que en SEC estas estructuras de tipo estrella tienden a contraerse y como resultado muestran un volumen hidrodinámico (espacio que ocupa una molécula cuando se encuentra en solución) menor al que mostraría un polímero lineal de igual tamaño. Por otro lado, los testigos utilizados para calibrar el sistema tienen una estructura química distinta (poliestirenos lineales) y esto también contribuye a la diferencia observada. Finalmente calculamos el peso molecular aproximado por RMN ^1H de acuerdo a la integral de los metilenos del polietilenglicol y estos resultaron ser de 27204 Da para **66** y 57080 Da para **67**, en este caso mayores a los calculados y esto podría deberse a que la señal de los metilenos del polietilenglicol es una suma de señales superpuestas que se observa como una señal ancha y con satélites a los costados que hace menos precisa la integración.

II. PEGilación de lactobiono 1,5 lactona.



Esquema 3-8

Para la conjugación con lactobionio 1,5-lactona se utilizó PEGs multibrazos cuyos extremos libres se encuentran funcionalizados con grupos amino. Estos pueden ser conjugados fácilmente a un ácido lactobiónico activado previamente como lactobionio 1,5-lactona (**62**). Se utilizaron dos PEGs de 8 brazos de 20 y 40 kDa (20536 y 42680 de acuerdo al certificado de análisis del proveedor). Las reacciones se llevaron a cabo a 90 °C en DMF anhidra, pH 8. Se monitorearon por ccd las cuales mostraron en ambos casos una mancha cercana al lugar de siembra cuando se reveló con reactivo de H₂SO₄. También se verificó la desaparición de los PEG amino de partida ya que los mismos revelan con el reactivo de ninhidrina. En ambas reacciones utilicé un exceso del disacárido (R_f 0,55, EtOH:H₂O:AcOH, 80:5:15) para asegurar la conjugación de cada brazo. Este exceso pudo ser eliminado por diálisis contra agua. Para la obtención de **69** se agregó el PEG en dos porciones pues se había observado que si se agregaba todo el reactivo junto el producto formaba un gel muy difícil de disolver. Por diálisis y posterior liofilización se obtuvieron los compuestos **68** y **69** como polvos blancos con un 93 % y un 87 % de rendimiento respectivamente.

La formación de los conjugados fue confirmada por RMN ¹H. El espectro del compuesto **68** (**Figura 3-28**) mostró la conjugación de cada brazo del PEG multibrazos con un equivalente de ácido lactobiónico por el desplazamiento de las señales del par de protones del metileno unido al grupo amino (a) los cuales se muestran como dos multipletes que integran para 1 H cada uno, centrados a δ 3,41 ppm y δ 3,48 ppm (**Figura 3-28 B**), mientras que en el PEG sin derivatizar se muestran como un multiplete centrado a δ 3,19 ppm (**Figura 3-28 A**). Conjuntamente se pueden ver las señales correspondientes al protón anomérico β-Galp (H-1') que se muestra como un doblete a δ 4,54 ppm ($J_{1,2}= 7,8$ Hz, H-1') que integra para 1 H y la señal del protón correspondientes a H-2 que se observa como un doblete a δ 4,40 ppm ($J_{2,3}= 2,7$ Hz) que también integra para 1 H. Los protones c, R y el resto de las señales del azúcar aparecieron como una señal intensa centrada a δ 3,68 ppm.

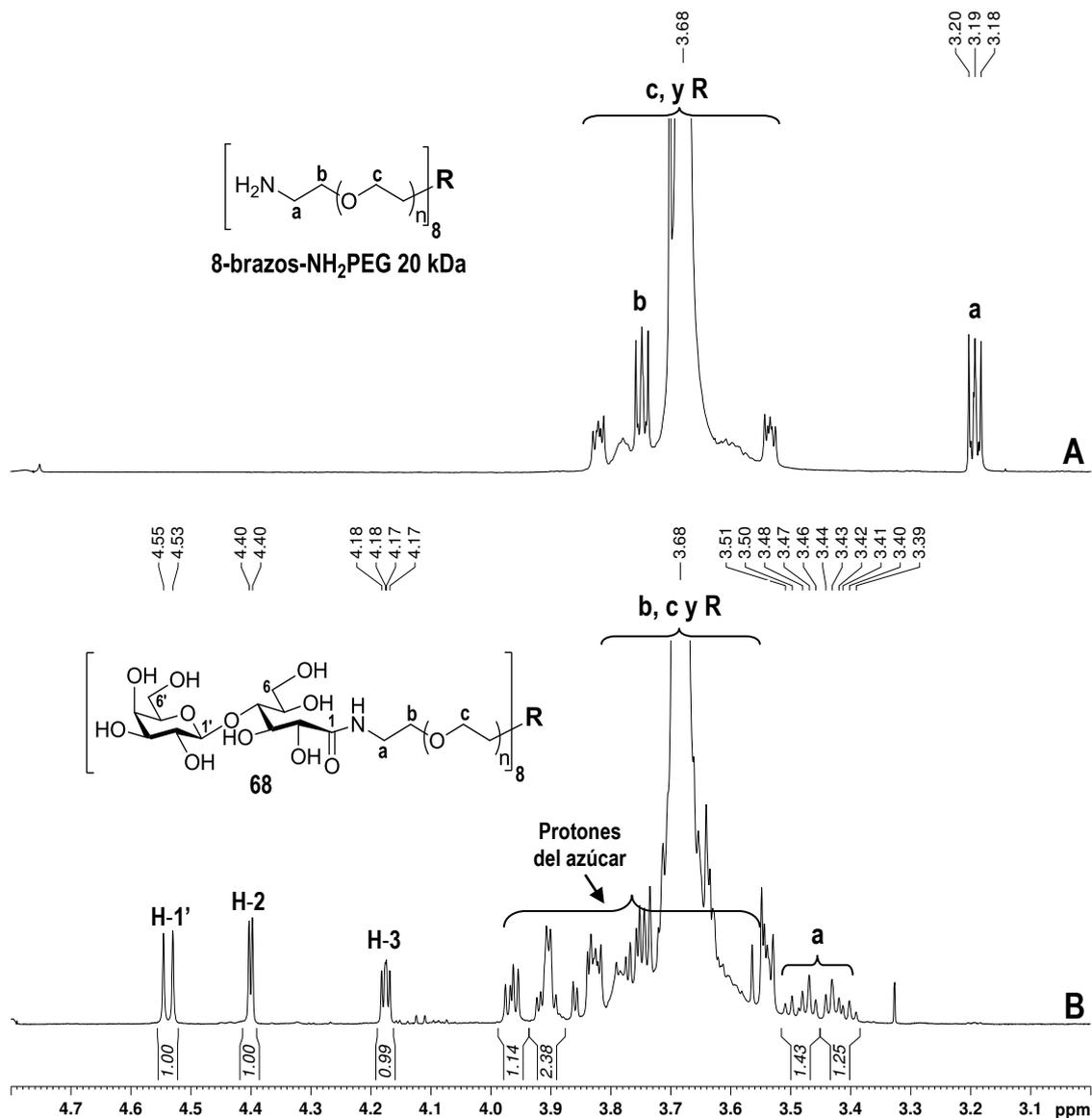


Figura 3-28. Comparación de los RMN ¹H del 8-brazos-NH₂PEG 20kDa de partida (**A**) y el del conjugado **68** (**B**).

Las principales señales que confirman la formación de **68** en el espectro de RMN ¹³C (**Figura 3-29**) son la aparición de la señal del carbonilo de la amida a δ 174,4 ppm (C-1) y la señal del carbono anomérico a δ 103,5 ppm (C-1') (**Figura 3-29 B**). Respecto a la cadena de PEG, el metileno unido directamente a la amida (a) aparece a δ 38,6 ppm, levemente desplazada del valor que mostraba en el PEG de partida (**Figura 3-29 A**). Los carbonos de los grupos oxietileno (b, c) aparecieron como un pico intenso a δ 69,6 ppm junto con los carbonos del “core” de hexaglicerín (R) y otros carbonos del azúcar

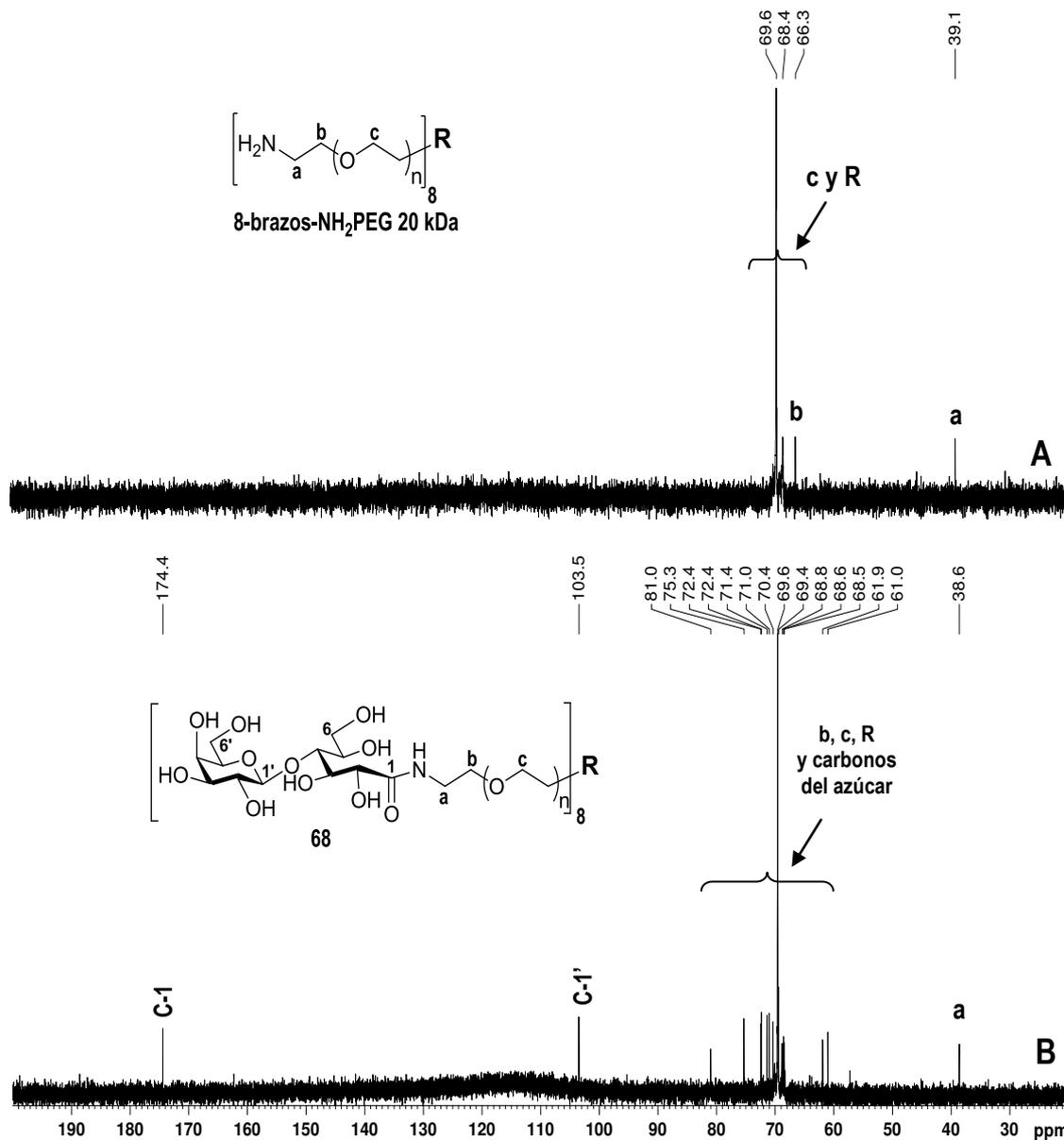


Figura 3-29. Comparación del RMN ^{13}C del 8-brazos- NH_2PEG 20 kDa de partida (A) y del conjugado **68** (B)

El espectro de RMN ^1H del compuesto **69** (Figura 3-30) mostró señales semejantes al espectro del compuesto **68**, diferenciándose únicamente en la integral de la señal centrada en δ 3,72 ppm correspondientes a los protones c, R.

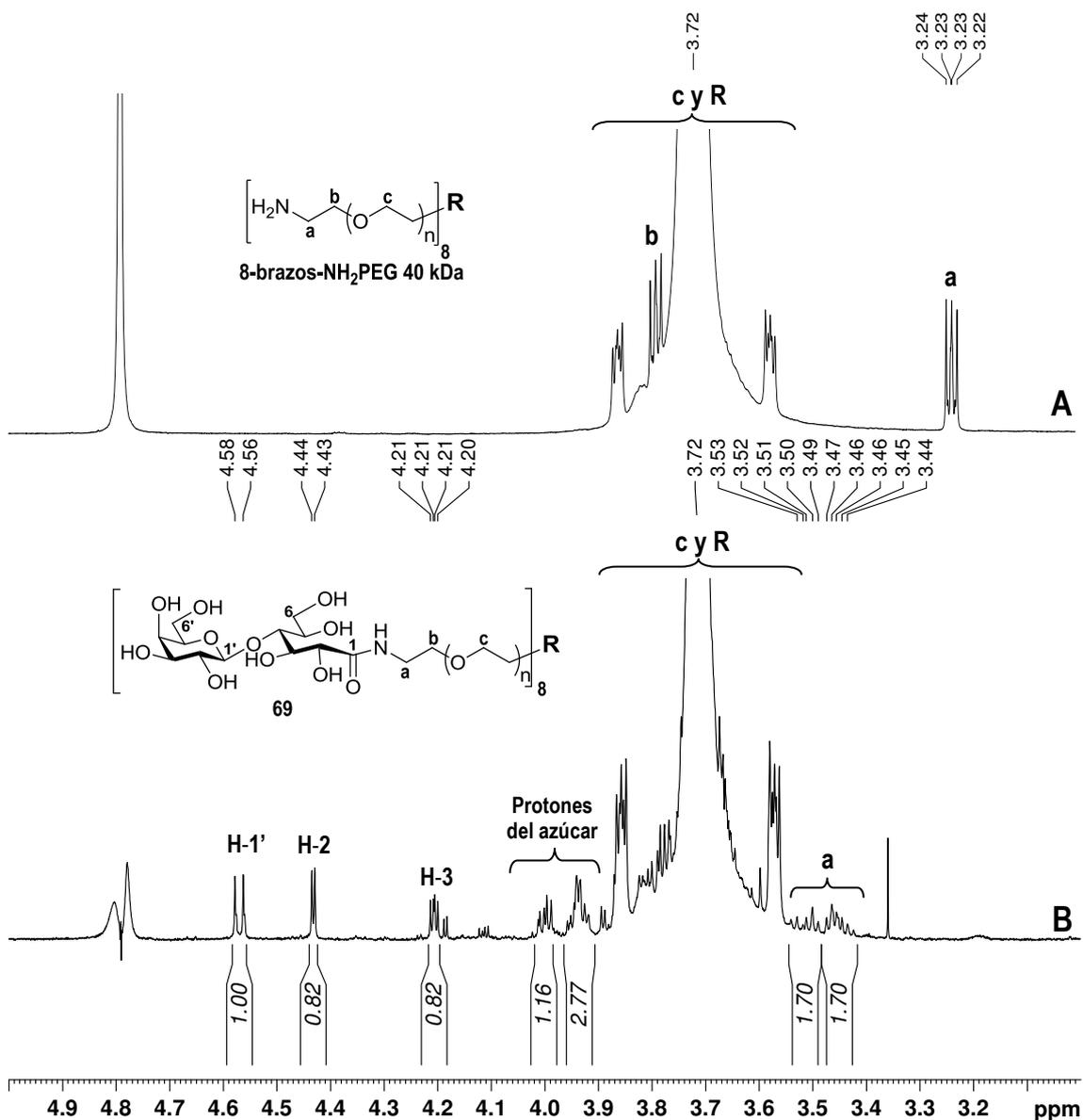


Figura 3-30 Comparación del RMN ^1H del 8-brazos- NH_2PEG 40 kDa de partida (A) y del conjugado **69** (B).

El análisis por SEC de **68** mostró, al igual que para **66** y **67**, una distribución de pesos moleculares menores a los calculados de acuerdo al certificado del proveedor (M_n 20536), calculado M_n 23256, encontrado M_p 12203 Da, M_w 12668 Da y M_n 10924 Da. Para **69** de mayor peso molecular también se encontraron valores mucho menores a los calculados de acuerdo al certificado del proveedor (M_n 42680), calculado M_n 45400, encontrado M_p 29164 Da, M_w 25483 Da y M_n 21227 Da para **69** y esto puede deberse, al igual que para los compuestos **66** y **67**, a la diferencia en el volumen hidrodinámico que presentan estos compuestos que no solo son diferentes en estructura química sino que tienen forma esférica comparada con los testigos de

poliestirenos lineales. Por último calculamos el peso molecular aproximado por RMN ^1H de acuerdo a la integral de los metilenos del PEG y estos resultaron ser de 24536 Da para **68** y 54940 Da para **69**, mayores a los esperados y esto podría deberse, al igual que para los compuestos **66** y **67**, a que la señal de los metilenos del PEG es una suma de señales superpuestas lo cual finalmente resulta en una señal ancha con señales satélites a los costados que dificultan la medición.

Inhibición de la sialilación de N-acetilactosamina por acción de los PEG-conjugados.

Para estudiar la capacidad de inhibición de la trans-sialilación, catalizada por TcTS, de los PEG conjugados se probaron diferentes concentraciones de los compuestos **59-69** en reacciones de transferencia conteniendo 1 mM de 3'SL como donador de ácido siálico, 12 μM [D-glucosa-1- ^{14}C]-lactosa como aceptor y TcTS (**Tabla 3-2**). La inhibición fue cuantificada midiendo la radioactividad retenida en una resina de intercambio aniónico luego de la incubación y comparando con la radioactividad retenida en ausencia del inhibidor. Las amidas PEGiladas **60** y **61** del disacárido **59** mostraron valores de inhibición similares al del disacárido original, incluso mejores para el de la cadena más corta. Respecto a los derivados multibrazos **66** y **67**, también derivados de **59**, se puede ver que el valor de IC_{50} es aproximadamente 8 veces menor en molaridad, pero considerando que la molécula presenta 8 moles de sustrato aceptor se podría inferir que cada brazo estaría interactuando con una unidad de enzima y que la presencia de la cadena de PEG unida a este disacárido inhibidor no alteraría la capacidad para interactuar con la misma. Contrariamente, los disacáridos de cadena abierta **63** a **65** dieron valores de IC_{50} mayores a los valores de los disacáridos de los cuales derivaron (**31** y **30**), siendo más alto para el de la PEGamina **65** mostrando que en estos casos la conjugación alteraría la capacidad de interactuar con la enzima. Sin embargo, sus análogos multibrazos **68** y **69** también presentan valores de IC_{50} más bajos que el disacárido del cual derivan (ácido lactobiónico) aunque en este caso **68** muestra un valor apenas más bajo, mientras que **69** alcanza a ser 4 veces menor.

En la mayoría de los casos (a excepción del compuesto **60**) los conjugados de cadena más larga resultaron ser mejores inhibidores que sus análogos de cadena más corta, lo cual indicaría que a mayor longitud de cadena, mayor espacio entre unidades aceptoras y por lo tanto, mejor interacción con la TcTS.

Inhibidor ^a	IC ₅₀ (mM)
Lactitol (31)	0,21
Acido Lactobiónico (30)	0,33
59	0,70
60	0,34
61	0,73
63	2,70
63	0,61
65	4,52
66	0,12*
67	0,08*
68	0,21*
69	0,09*

Tabla 3-2. Inhibición de la reacción de TcTS por análogos de lactosa y sus derivados PEGilados.

Mucci *et al.*, (Mucci *et al.*, 2006) había analizado la farmacocinética del lactitol (**31**) midiendo la capacidad inhibitoria de TcTS en muestras de sangre extraídas a distintos tiempos de ratones inyectados con 10 mg del disacárido inhibidor. Observó un 50 % de inhibición a los 160 minutos cuando el inhibidor se inyectó en forma intravenosa. Luego de 270 minutos no detectaban inhibición alguna indicando la ausencia del inhibidor pasado ese tiempo. En el presente trabajo de Tesis se repitió el ensayo inyectando 2,5 mg de lactitol (36,6 mM) ó 2,5 mg del disacárido **59** (29 mM) (ambos disueltos en 200 µl de BSA) en ratones y luego se ensayó la reacción de TcTS en muestras de sangre tomadas a distintos tiempos (0-2 h) (**Figura 3-31**). El primero mostró un 50 % de inhibición en una muestra tomada inmediatamente después de la

inyección, disminuyendo rápidamente y mostrando solo un 10 % de inhibición luego de dos horas (curva verde). En el caso del disacárido **59**, se observó un 20 % de inhibición inmediatamente luego de la inyección disminuyendo a un 6% luego de dos horas (curva púrpura). Para determinar si estos análogos de lactosa conjugados con PEG aumentan su permanencia en la sangre, los compuestos **61**, **64** y **67** se inyectaron en ratones y se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos (0-24 h). Las cantidades inyectadas fueron ajustadas de manera tal que las cantidades de inhibidor fueran similares a las previamente estudiadas (29 mM para **61**, 50 mM para **64** y 3,32 mM para **67**). Estos compuestos fueron elegidos debido al mayor tamaño de la cadena de PEG. El compuesto **69** no fue probado debido a que al disolver en BSA dió una solución demasiado viscosa como para inyectarla. Finalmente analizamos la reacción de TcTS en el plasma extraído y tomamos como 0 % de inhibición la reacción conteniendo plasma de ratón no inyectado.

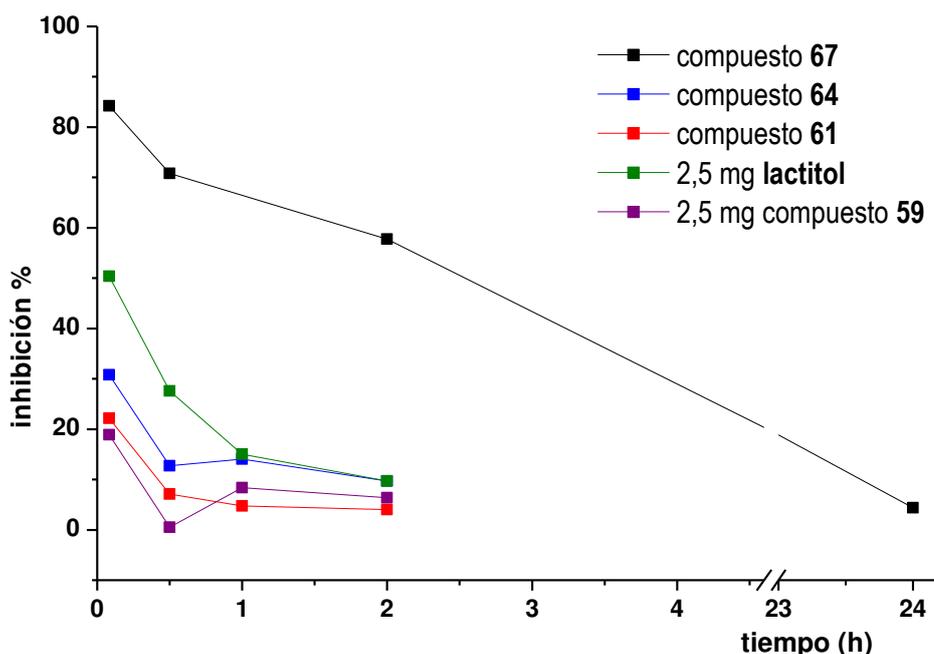


Figura 3-31 Curva de inhibición de la TcTS por el plasma obtenido de ratones inyectados con **61**, **64** y **67** en función del tiempo.

Como se puede observar, los conjugados lineales **61** (curva roja) y **64** (curva azul) muestran un comportamiento similar al de su precursor **59** (curva púrpura). Se podría inferir que estos conjugados resultaron ser rápidamente eliminados de la sangre mostrando solo un valor cercano a un 10 % a la media hora de inyección. En

cambio, para el compuesto **67** se puede observar un valor elevado de inhibición en un tiempo inmediato a la inyección y que esta disminuye lentamente con el tiempo mostrando inhibición aún luego de 24 h de ser inyectado (curva negra).

Prueba de estabilidad en sangre.

Para confirmar la presencia de estos PEG conjugados en la sangre, se analizó la presencia de los mismos por métodos colorimétricos en las mismas muestras utilizadas para medir inhibición (**Figura 3-32**). Los ensayos control se realizaron en otros ratones inyectando cantidades equivalentes del correspondiente PEG sin derivatizar. Los conjugados de PEGs lineales se cuantificaron usando un método colorimétrico basado en la partición de un cromóforo del reactivo de tiocianato de amonio que se separa del medio acuoso hacia una fase clorofórmica cuando hay PEG presente. Este método fue utilizado previamente para evaluar conjugados PEGilados de proteínas (Nag *et al.*, 1996). Para los PEGs multibrazos se empleó otro método colorimétrico basado en la formación de un complejo de yoduro de bario cuando hay PEG presente (Sims y Snape, 1980; Ramon *et. al.*, 2005). La concentración del compuesto **61** en una muestra de sangre tomada inmediatamente luego de la inyección resultó ser de 4 mg/ml y luego disminuyó en un período de 30 minutos a 1 mg/ml, valor que mantuvo durante la siguiente hora y media (curva roja). Su PEG control se comportó de manera similar (curva roja punteada). La concentración del compuesto **64** resultó un poco mayor (8,2 mg/ml), acorde a la cantidad inyectada, y también disminuyó rápidamente (1,9 mg/ml) en un período de 30 minutos, para luego mantener este valor durante la siguiente hora y media (curva azul), comportamiento similar al de su PEG control (curva azul punteada). Por otro lado se recuperó 3,5 mg del compuesto **67** en 30 μ l de orina luego de 30 minutos de la inyección disminuyendo a 1 mg en 100 μ l luego de 60 minutos. Aunque los valores totales recuperados no fueron determinados se pudo ver una rápida eliminación de la circulación a través de filtración por los riñones debido, probablemente, a que el tamaño del conjugado no fue lo suficientemente grande. El compuesto **67**, a diferencia de los PEGs lineales, mostró la presencia de 11 mg/ml en una muestra tomada inmediatamente luego de la inyección y disminuyó a la mitad en primera hora, valor que mantuvo con ligeras variaciones en las siguientes 23 horas (curva negra). El PEG control se comportó de manera similar (curva negra punteada). Se recuperaron 1,26 mg del compuesto **67** de 14 μ l de orina luego de 30 minutos de la inyección, mientras

que 1,5 mg fueron recuperados de 115 μ l luego de 24 horas. Este resultado refleja una constante, aunque lenta, eliminación del sistema por filtración por los riñones confirmando lo observado en la curva de inhibición en función del tiempo.

Si bien los compuestos finalmente resultan ser eliminados, como resultado de la conjugación con PEGs multibrazos se logró aumentar la vida media de estos análogos de lactosa en plasma. Dado que no se recuperó en orina el total del compuesto los resultados indicarían que parte de los mismos pueden localizarse en distintos tejidos y de esa forma desaparecer de la circulación.

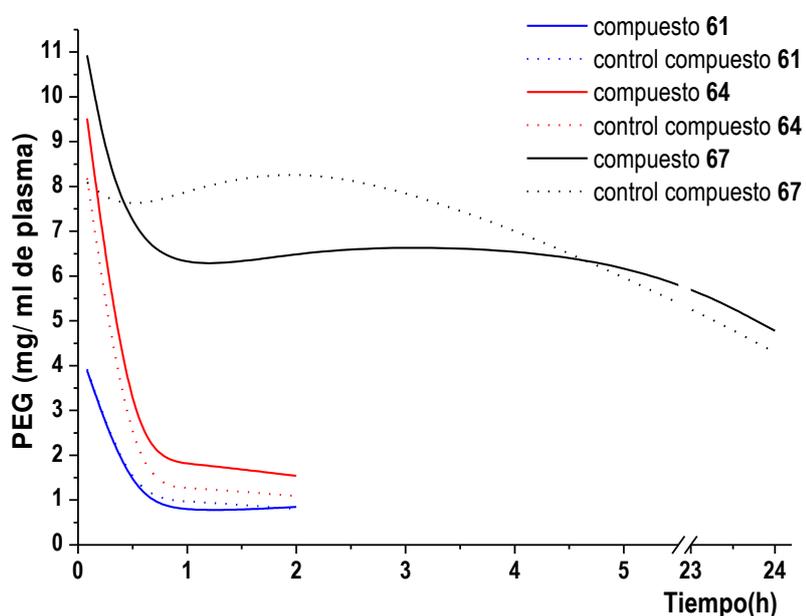


Figura 3-32. Estabilidad en sangre de los PEG conjugados 61, 64 y 67.

Conclusiones.

Las pruebas de inhibición de TcTS por los productos de PEGilación de lactosa y análogos con PEGs lineales indicaron que los conjugados del disacárido **60** y **61** mostraron valores de inhibición del orden de su disacárido precursor **59**, mientras que aquellos que tenían la cadena abierta, **63**, **64** y **65**, dieron valores de IC_{50} mayores que el disacárido precursor. Respecto a los conjugados multibrazo **66** y **67**, también derivados de **59**, se podría inferir por los valores de IC_{50} , que cada brazo estaría interactuando con una unidad de enzima y que la presencia de la cadena de PEG unida a este disacárido no alteraría la capacidad para interactuar con la misma. Para el caso de los conjugados de cadena abierta **68** y **69** también presentaron valores de IC_{50} más bajos que el disacárido del cual derivan (ácido lactobiónico, **30**) aunque en este caso **68** mostró un valor similar, mientras que **69** dio un valor 4 veces menor.

En todos los casos los conjugados de cadena más larga resultaron ser mejores inhibidores que sus análogos de cadena más corta lo cual indicaría que a mayor longitud de cadena, mayor espacio entre unidades aceptoras y por lo tanto, mejor interacción con la TcTS.

El análisis de estabilidad en sangre de estos compuestos determinó para el caso de los PEGs lineales **61** y **64**, una rápida eliminación de los conjugados probablemente por filtración por riñón debido a los pesos moleculares bajos de los polímeros utilizados para la conjugación del azúcar. En el caso del PEG multibrazo **67** se observó mejor biodisponibilidad, comprobando la presencia del conjugado en circulación hasta 24 horas después de la inyección.

Se puede concluir que la conjugación con PEGs multibrazos ha sido útil para aumentar la eficacia de los derivados de lactosa como inhibidores de TcTS. Las reacciones de conjugación son sencillas y la mayor estabilidad de estos conjugados en sangre alienta a realizar estudios de inhibición *in vivo* con pacientes Chagásicos. Futuros estudios acerca de la localización en tejidos de estos conjugados nos daría una mayor información acerca del modo de acción de estas drogas.

Capítulo 4

**Sustratos bifuncionales como
inhibidores potenciales para TcTS.**

Sustratos bifuncionales:

En base al mecanismo de acción de TcTS, los potenciales inhibidores son clasificados dependiendo del sitio activo al que estén direccionados. En los últimos años varios grupos de investigación se han abocado a la búsqueda de inhibidores de TcTS destinados principalmente al sitio de unión del ácido siálico (Neres *et al.*, 2008; Buchini *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010a). Se han probado como inhibidores de TcTS miméticos de ácido siálico y moléculas análogas al oxocarbenio, intermediario en el estado de transición (**Figura 4-1 a**), que habían resultado exitosos para la inhibición de neuraminidasas de Influenza.

El ácido 2-desoxi-2,3-didehidro-D-N-acetil-neuramínico (DANA) (**Figura 4-1 b**), un potente inhibidor de sialidasas de Influenza, resultó ser un inhibidor débil de TcTS (K_i 12,3 mM) (Paris *et al.*, 2005). Sin embargo, DANA fue el primer compuesto con el cual co-cristalizó TcTS junto con la lactosa aceptora (**Figura 1-5**) (Buschiazzo *et al.*, 2002). Por otro lado, la sialidasa de *Trypanosoma rangeli* (TrSA) con un 70% de homología con TcTS es inhibida eficientemente por DANA (K_i 1,5 μ M) (Paris *et al.*, 2005). La reacción de transferencia de ácido siálico por TcTS y la reacción de hidrólisis de TrSA comparten el mismo mecanismo, en el cual se obtiene un intermediario covalente con el sustrato sialilado (Amaya *et al.*, 2003, Watts *et al.*, 2003) (**Esquema 1-1**). Por comparación de las estructuras cristalinas de ambas enzimas co-cristalizadas con DANA se revelaron algunas diferencias estructurales en el sitio activo, las cuales pueden ser las responsables de las diferentes actividades enzimáticas. El sitio destinado al sustrato en TcTS se muestra más estrecho e hidrofóbico, y podría favorecer la reacción de trans-glicosilación debido a la exclusión del agua (Buschiazzo *et al.*, 2002).

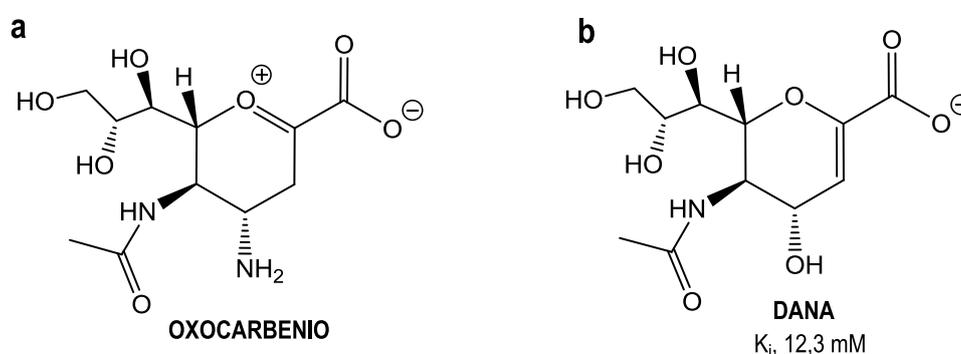


Figura 4-1. a. Estructura del oxocarbenio, intermediario en el estado de transición. b. Estructura de DANA, ligando co-cristalizado con TcTS, análogo al ácido siálico.

Se han probado otros inhibidores de neuraminidasa de Influenza, comerciales, análogos del estado de transición, como Zanamivir, Osetamivir y Panamivir y tampoco mostraron inhibir la reacción de TcTS en concentración 1-2 mM del inhibidor (Neres *et al.*, 2008) (**Figura 4-2**).

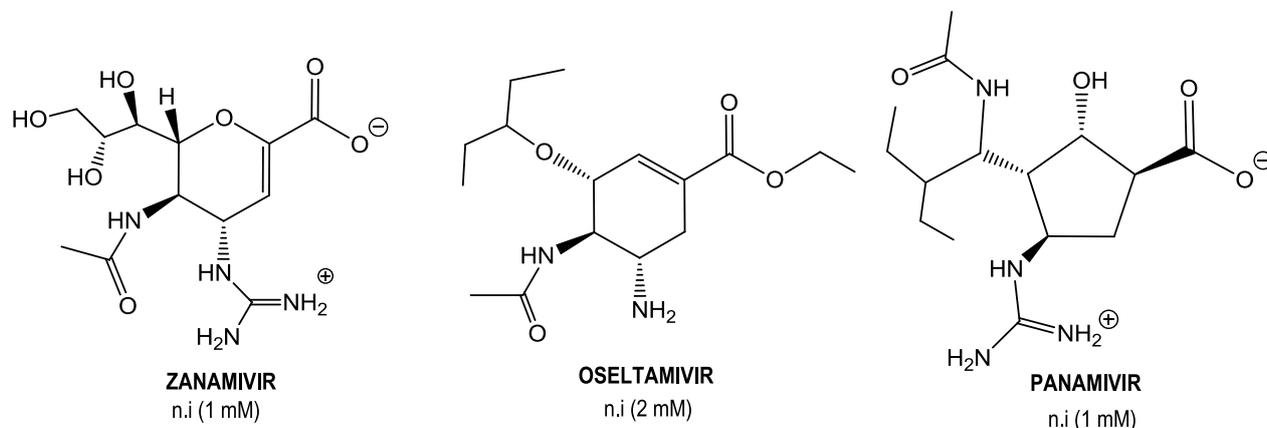


Figura 4-2 Estructuras de inhibidores de neuraminidasas virales análogos al estado de transición que se encuentran en el mercado.

Utilizando una estrategia similar, aunque no basados en azúcares, Neres *et al.*, sintetizaron inhibidores reemplazando el anillo tetrahidropirano del oxocarbenio por anillos simples como el ácido benzoico o piridina (**70-73**) (**Figura 4-3**). Si bien estas moléculas, de acuerdo a cálculos de docking, se ubicaban perfectamente en el sitio activo del ácido siálico, los valores de IC_{50} frente a TcTS resultaron en el rango 0,3-1,0 mM (Neres *et al.*, 2007).

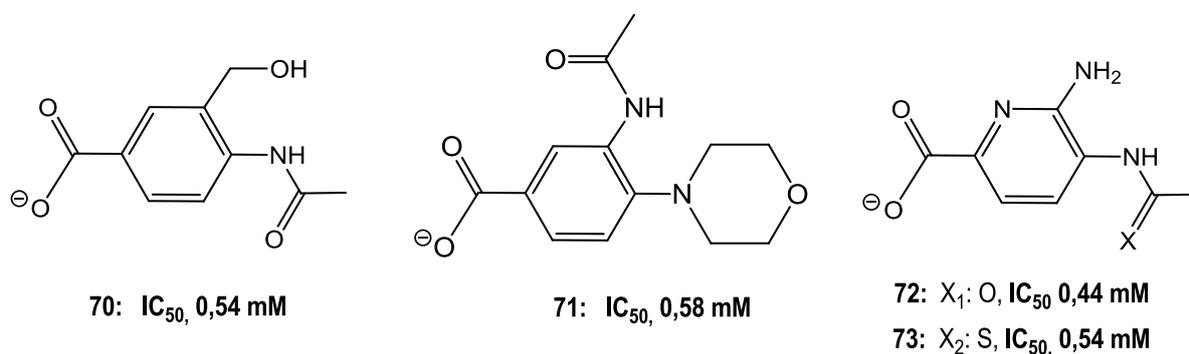


Figura 4-3 Estructuras de los inhibidores de TcTS más eficientes, derivados del ácido benzoico o piridina (**70-73**) descritos por Neres *et al.*, (2007).

Withers y colaboradores describieron algunas chalconas y quinolinonas conteniendo sulfonamidas como potenciales inhibidores de TcTS mostrando valores de K_i entre 2,0 y 0,2 μM (**74-76**) (**Figura 4-4**) (Kim *et al.*, 2009). También Arioka *et al.*, (2010) describieron una serie de flavonoides y antraquinonas seleccionadas por screening de compuestos naturales que resultaron ser buenos inhibidores de TcTS *in vitro*, con valores de IC_{50} 0,58 μM (**77-78**). Estos resultados sugirieron que la forma aniónica de estos compuestos se une al sitio activo de la enzima que normalmente es ocupada por el grupo carboxilato del ácido siálico. Si bien obtuvieron excelentes resultados estos autores no describieron estudios de toxicidad.

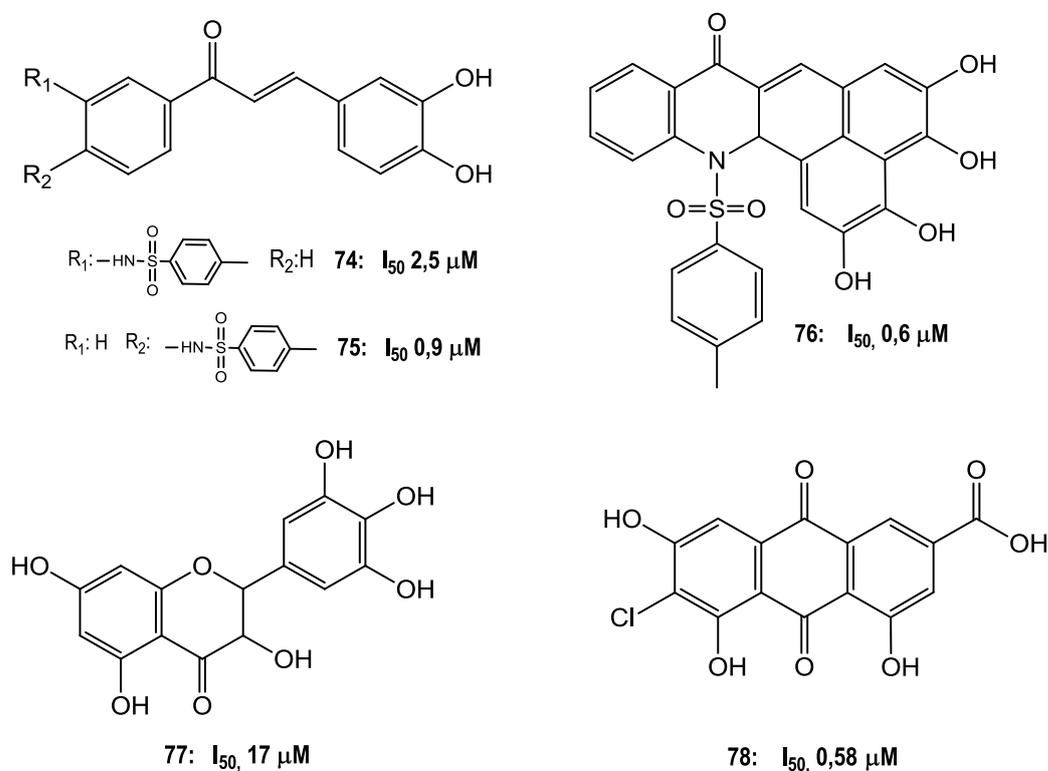


Figura 4-4. Estructura de las chalconas y quinolinonas conteniendo sulfonamidas inhibidoras de TcTS descritas por Kim *et al.* (2009) (**74-76**). Estructura de flavonoides y antraquinonas inhibidoras de TcTS descritas por Arioka *et al.* (2010) (**77-78**).

Otro inhibidor destinado al sitio del ácido siálico es el gangliósido GM_3 (**Figura 4-5**) el cual cuando la unidad de ácido siálico es modificada, en el C-4 (desoxi o metoxi) (**79,80**) o el C-8 (desoxi) (**81**), actúa como inhibidor de TcTS en el rango de concentración entre 10-100 μM (Vandekerckhove *et al.*, 1992).

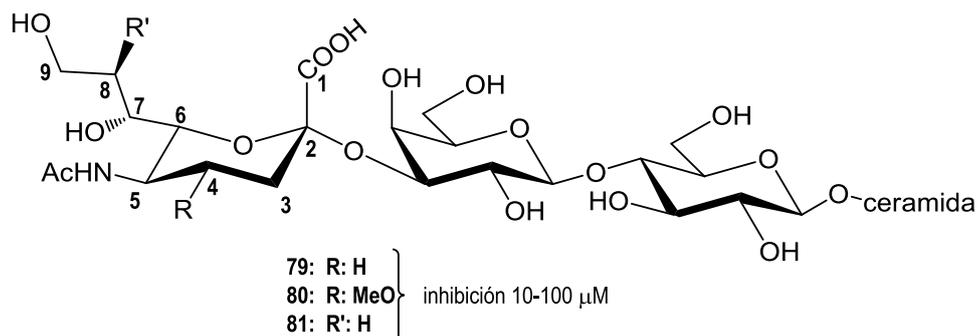
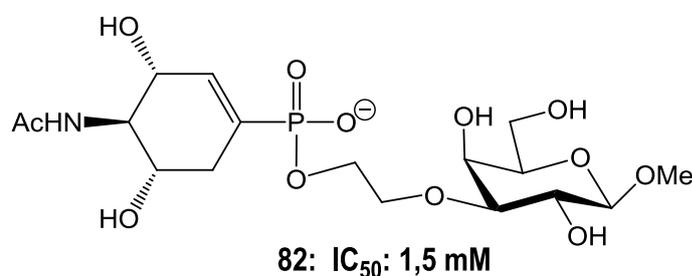


Figura 4-5 Gangliósido GM₃ modificado en C-4 (**79-80**) o C-8 (**81**) de la unidad de ácido siálico actúa como inhibidor de TcTS.

Se han descrito algunos inhibidores capaces de ocupar ambos sitios, el del ácido siálico y el de la β -galactopiranososa, de manera que la reacción de transferencia resultara inhibida o incluso bloqueada. Como primer intento podemos nombrar los ciclohexenofosfonatos, miméticos de ácido siálico, conjugados al OH 3 o 6 de una β -galactopiranososa sintetizados por Streicher y colaboradores. Estos resultaron ser inhibidores débiles de TcTS siendo el más eficiente aquel que contenía una unidad de etilenglicol como espaciador (**82**) (**Figura 4-6**) (Streicher y Busse, 2006; Busse *et al.*, 2007). Meinke *et al.*, (2011), por otro lado, sintetizaron por metátesis cruzada C-sialósidos conteniendo en el C-2 y/o en el C-9 un anillo aromático capaz de colocarse entre los residuos aromáticos Tyr119 y Trp312 del sitio aceptor (**84**, **85**). Los resultados de afinidad, determinados por SPR (surface plasmon resonance) mostraron que esta aumentaba con la presencia de solo una unidad de anillo aromático siendo el más afín aquel que contenía un residuo de fenil-propilo en su extremo anomérico (K_D 0,16 mM). Este compuesto mostró inhibir la reacción de TcTS en presencia de 1 mM del inhibidor (**Figura 4-6**).



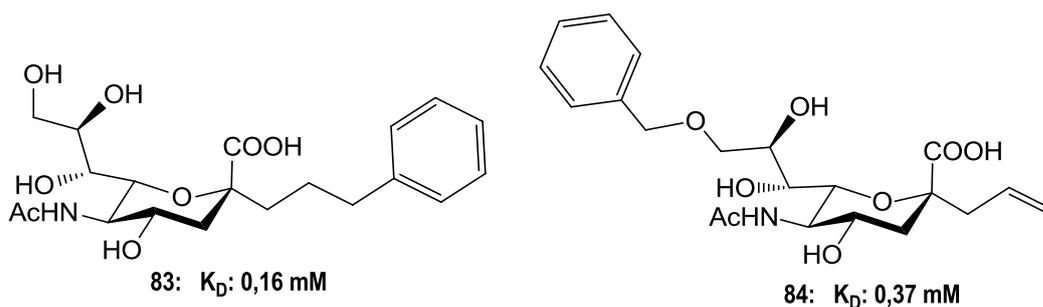


Figura 4-6 Sustratos bifuncionales inhibidores de TcTS descrito por Streicher *et al.*, (2006); Busse *et al.*, (2007) (**82**), Meinke *et al.*, (2011)(**83**, **84**)

También Carvalho *et al.*, (2010b) sintetizaron, mediante química tipo click, derivados de β -galactopiranosas sustituidos en su carbono anomérico o carbono 6, por 1,2,3-triazoles con grupos aromáticos como anilina o piridina dirigidos al sitio donador de ácido siálico. Estos compuestos resultaron ser inhibidores moderados de TcTS con valores menores a un 40 % de inhibición en presencia de 1 mM del inhibidor aunque todos mostraron ser aceptores de ácido siálico (**85**, **86**) (**Figura 4-7**). Siguiendo esta estrategia sintética Campo *et al.*, (2012), sintetizaron derivados de galacto, gluco o gulo sustituidos en su carbono anomérico, carbono 3 o 6, por un anillo 1,2,3-triazol unido a ácido siálico o simplemente a un aminoácido (treonina) (**87**, **88**). Mediante cálculos docking del sitio activo de TcTS, estimaron que estos compuestos eran capaces de formar puente de hidrógeno entre el carboxilo del ácido siálico y la tríada de arginina del sitio donador, al mismo tiempo que el anillo 1,2,3-triazol interactuaba hidrofólicamente, por interacción pi-pi, con Trp312 del sitio aceptor. Adicionalmente el compuesto que contenía la unidad β -galactopiranososa también interactuaba con Trp312 y Tyr119 del mismo sitio. Basados en estos cálculos se podía predecir que no hacía falta la unidad de ácido siálico para inhibir TcTS, sino que el simple hecho de contener un grupo carboxílico permitía la interacción con el sitio donador. Los resultados de inhibición de TcTS obtenidos para los compuestos que contenían la unidad de ácido siálico estuvieron de acuerdo con resultados calculados por docking siendo del rango de 70-90 % de inhibición cuando eran incubados con 1 mM del inhibidor, sin embargo, el compuesto que solo contenía el aminoácido no mostró valores significativos de inhibición a esa concentración de inhibidor indicando que la presencia de ácido siálico podría tener un rol relevante en la inhibición de TcTS.

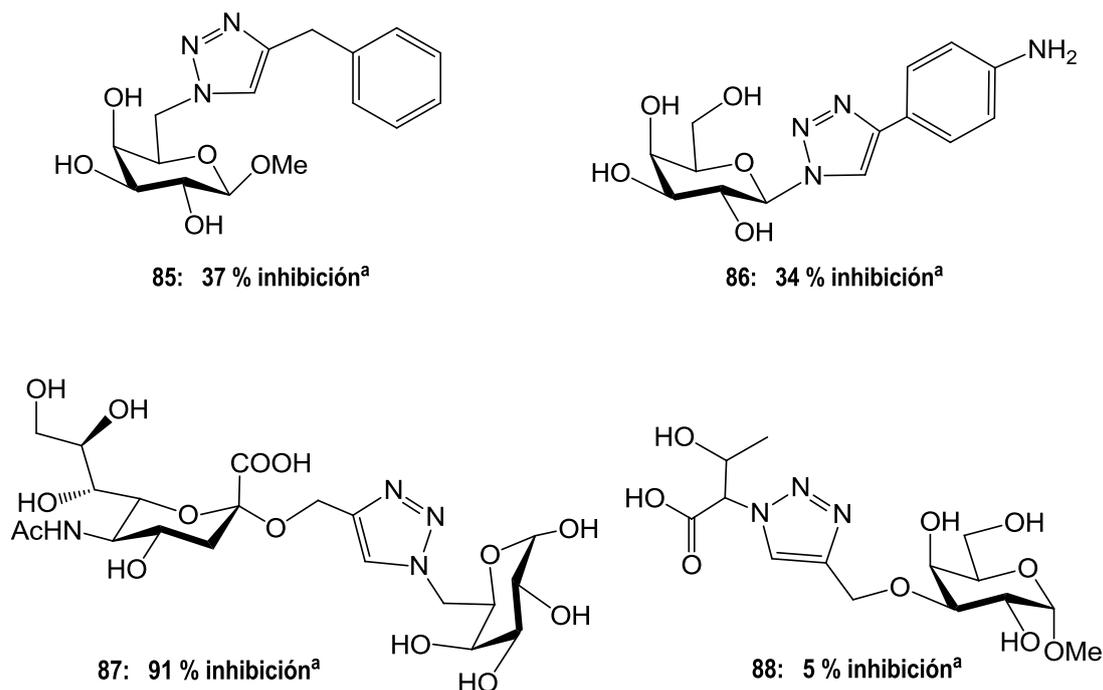


Figura 4-7 Sustratos bifuncionales inhibidores de TcTS descritos por Carvalho *et al.* (2010) (**85**, **86**). Sustratos bifuncionales inhibidores de TcTS descritos por Campo *et al.* (2012) (**87**, **88**) ^a porcentaje de inhibición observado en presencia de 1 mM de inhibidor).

En este capítulo describimos otros sustratos bifuncionales dirigidos a los sitios de unión del sustrato donador y del aceptor. Para ello unimos covalentemente sustratos que resultaron ser buenos aceptores de ácido siálico, como son la lactosa o el ácido lactobiónico, a sustratos que pueden tener afinidad por el sitio destinado al ácido siálico, como lo son los compuestos conteniendo ácidos carboxílicos y miméticos del ácido siálico.

Síntesis de los sustratos bifuncionales.

Para la conjugación de distintos disacáridos con β -D-Galp terminal, con compuestos que podrían tener afinidad por el sitio específico del ácido siálico se utilizaron tres estrategias diferentes. **I.** Aminación reductiva de la lactosa con el grupo amino del oseltamivir en presencia de NaBH_3CN . **II.** Formación de una amida entre el grupo carboxilo del ácido lactobiónico y el grupo amino del oseltamivir, del ácido aminocaproico para ser usado como espaciador o de un dipéptido.

Considerando que los sitios activos para el ácido siálico de TcTS, TrSA y neuraminidasa de Influenza son muy similares entre sí y que las interacciones enzima-DANA son semejantes (**Figura 4-8**) y (**Figura 1-5**), decidimos conjugar una unidad de oseltamivir a un disacárido aceptor de ácido siálico de manera de obtener un sustrato dirigido a ambos sitios de TcTS. Si bien se describió (Neres *et al.*, 2008) que el oseltamivir no inhibe TcTS, esperábamos que la presencia del disacárido aceptor produjera cambios conformacionales en el sitio del ácido siálico que como resultado modificaran la afinidad por este inhibidor.

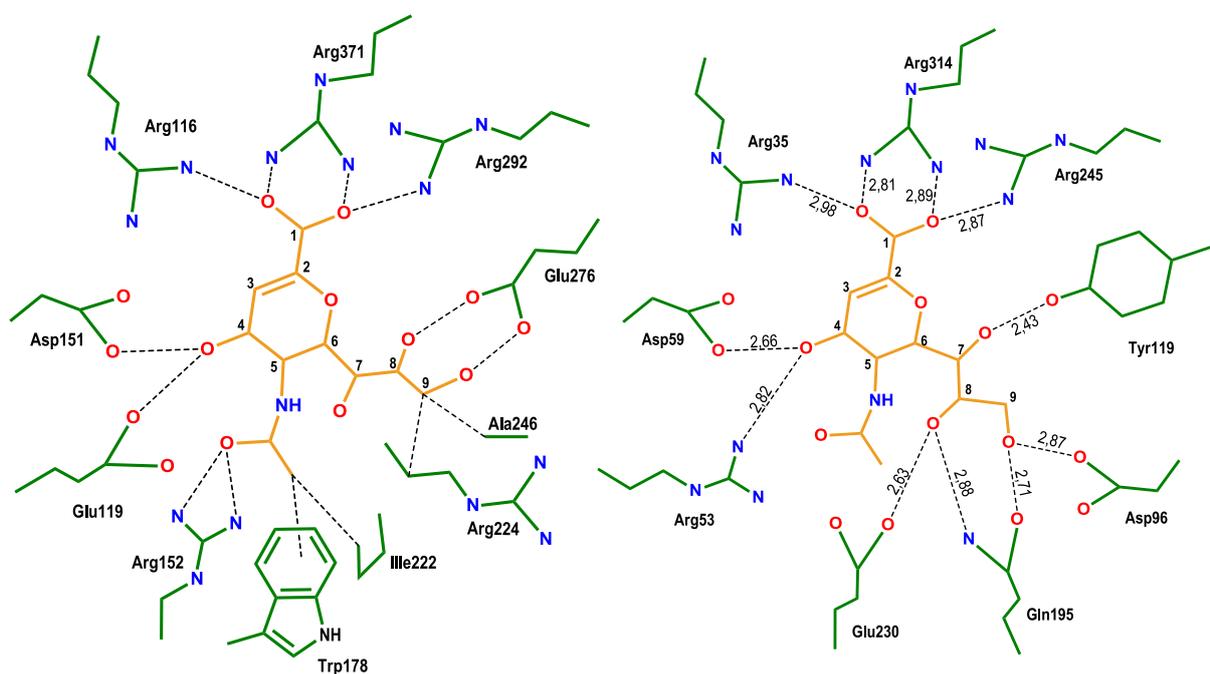


Figura 4-8 Estructura de neuraminidasa de Influenza en complejo con DANA (izquierda). Estructura de TcTS en complejo con DANA (derecha). Esquema que muestra las interacciones enzima-inhibidor.

Streicher y colaboradores ya habían sintetizado inhibidores de neuraminidasa de Influenza basados en oseltamivir sustituyendo el grupo carboxilo del oseltamivir por fosfonatos o fosfonato monoéster, conjugados al OH 3 o 6 de galactopiranosas (**89**, **90**). De este modo mantuvieron la carga negativa, sin afectar la potencia del oseltamivir como farmacóforo (Carbain *et al.*, 2009). El objetivo era obtener miméticos estables de $\alpha 2 \rightarrow 3$ o $\alpha 2 \rightarrow 6$ sialilgalactósidos, sustratos naturales de la neuraminidasa de Influenza (**Figura 4-9**). Ambos sustratos resultaron ser inhibidores de neuraminidasa del virus de Influenza A/Norway/1758/07. Estos compuestos no fueron probados como inhibidores de TcTS.

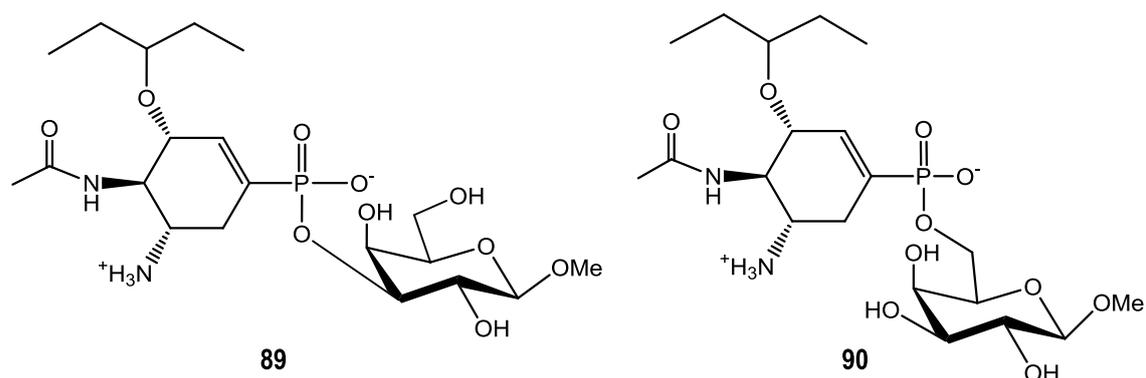
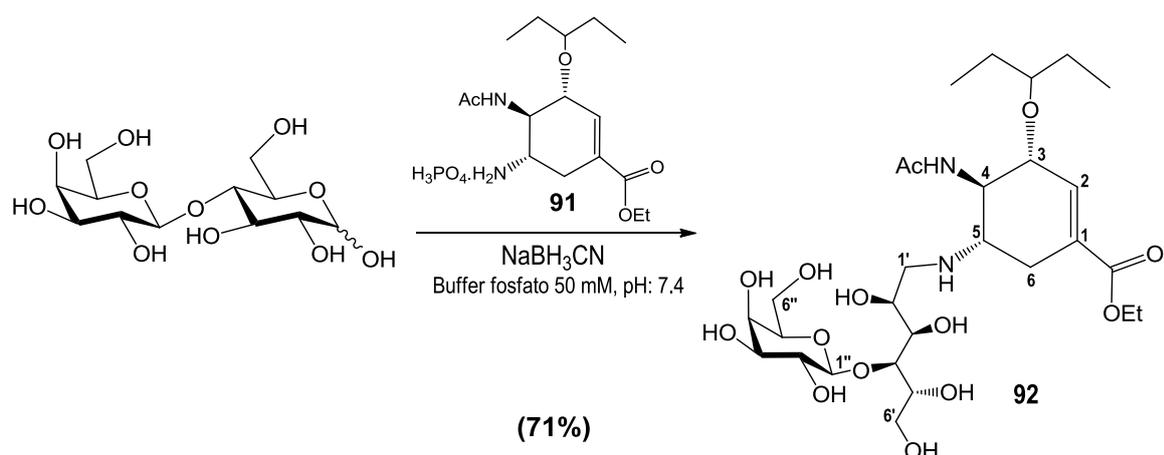


Figura 4-9 Miméticos de $\alpha 2 \rightarrow 3$ (**89**) y $\alpha 2 \rightarrow 6$ sialilgalactósidos (**90**) formado por un inhibidor de neuraminidasas de Influenza conjugado a galactosa.

Los conjugados que se describen a continuación son derivados de lactosa o de la lactobiono 1,5-lactona obtenidos por conjugación del grupo amino del C-5 de oseltamivir comercial.

Síntesis de (3R, 4R, 5S) Etil 4-acetamido-N-(1'-desoxilactitol-1'-il)-5-amino-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxilato (92).

Para la síntesis de **92** se agregaron 2 equivalentes de lactosa a una solución de 1 equivalente de fosfato de oseltamivir (**91**) disuelto en buffer fosfato y la mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente, condiciones bajo las cuales se formó la imina entre el carbonilo de la forma abierta de la lactosa y el grupo amino del oseltamivir. Pasado ese tiempo se agregaron 3 equivalentes de NaBH_3CN para reducir la imina previamente formada y dar lugar a la amina secundaria. Esta reacción fue monitoreada por ccd donde se observó la aparición de un nuevo compuesto de R_f 0,5 (EtOH:H₂O:NH₄OH(c),12:2:1) que reveló por UV y con el reactivo de ácido sulfúrico y se mostró entre la lactosa (R_f 0,2) y el oseltamivir (R_f 0,72), el cual solo se observaba mediante exposición a la luz UV. Luego de 6 horas de reacción el compuesto **92** se purificó de la mezcla por cromatografía en fase reversa RP-18 y se obtuvo como un sólido blanco (71%). (**Esquema 4-1**).



Esquema 4-1

En el espectro de RMN ^1H de **92** (Figura 4-10), la correlación entre el valor de integración para el único protón anomérico de azúcar, que se observó como un doblete a δ 4,50 ppm con una constante de acoplamiento de $J_{1'',2''} = 8$ Hz, y la señal del H-2 del anillo ciclohexeno, que se mostró como un singulete ancho a δ 6,80 ppm, demostró que la conjugación había tenido lugar. Los extremos etilo del 3-pentilo no son equivalentes entre sí por lo que los metilos se mostraron como dos tripletes a δ 0,84 ppm y δ 0,89 ppm, mientras que los respectivos protones metilénicos se observaron también a diferentes δ a campos más bajos. Los protones geminales del nuevo grupo metileno unido al amino H-1'a y H-1'b, producto de la reducción, aparecieron como dos señales, un doblete a δ 2,96 ppm con constantes de acoplamiento $J_{1'a,1'b} = 12$ Hz y $J_{1'a,2} = 2,5$ Hz y un triplete a δ 2,51 ppm con $J_{1'a,1'b}$ y $J_{1'b,2} = 11$ Hz, integrando ambos para 1 H cada uno. Como se esperaba, estos protones metilénicos aparecieron a campos más altos que el resto de los protones del azúcar

En el espectro de RMN ^{13}C de **92** (Figura 4-11), los carbonos de los metilos de la cadena 3-pentilo resuenan a δ 8,9 ppm y δ 8,7 ppm, los metilenos a δ 25,7 ppm y δ 25,3 ppm y el metino a δ 84,4 ppm. El C-1 y C-2 del ciclohexeno aparecieron a δ 129,3 ppm y δ 138,3 ppm mientras que los carbonos C-4 y C-5 unidos a nitrógeno a δ 55,0 ppm y 55,8 ppm, respectivamente. Para el azúcar, el único carbono anomérico (C-1'') resuena a δ 103,1 ppm (β -Galp) y la señal del C-1' producto de la reducción se mostró a δ 49,0 ppm. Las asignaciones se realizaron por RMN bidimensional HSQC y COSY.

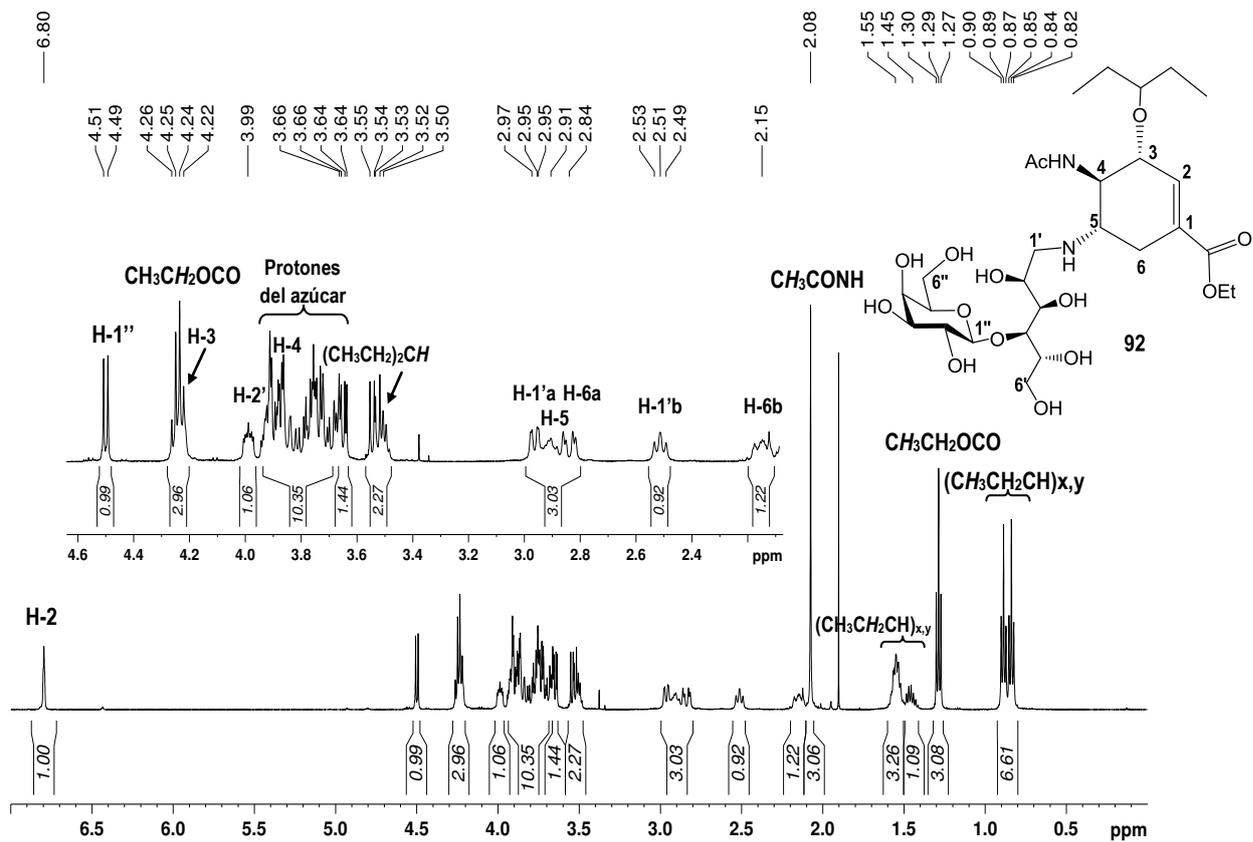


Figura 4-10 Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de 92.

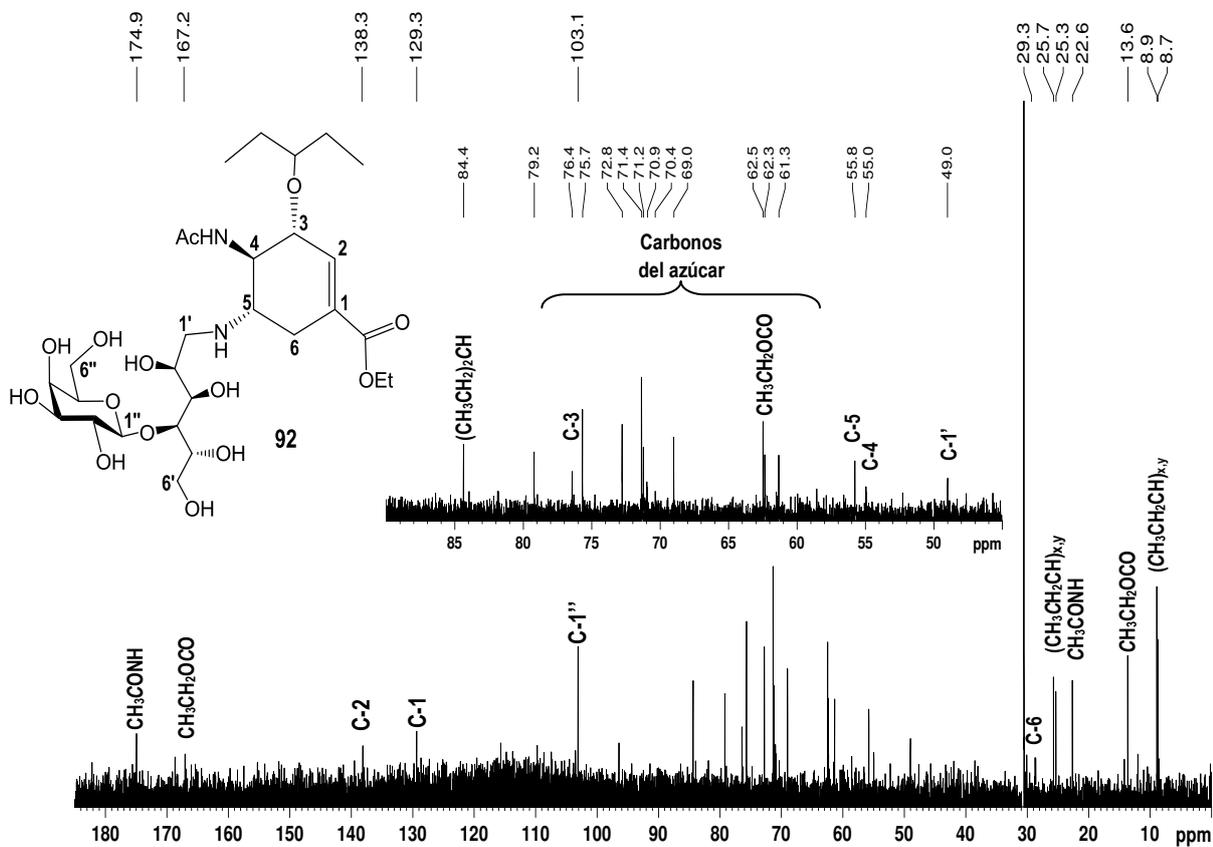
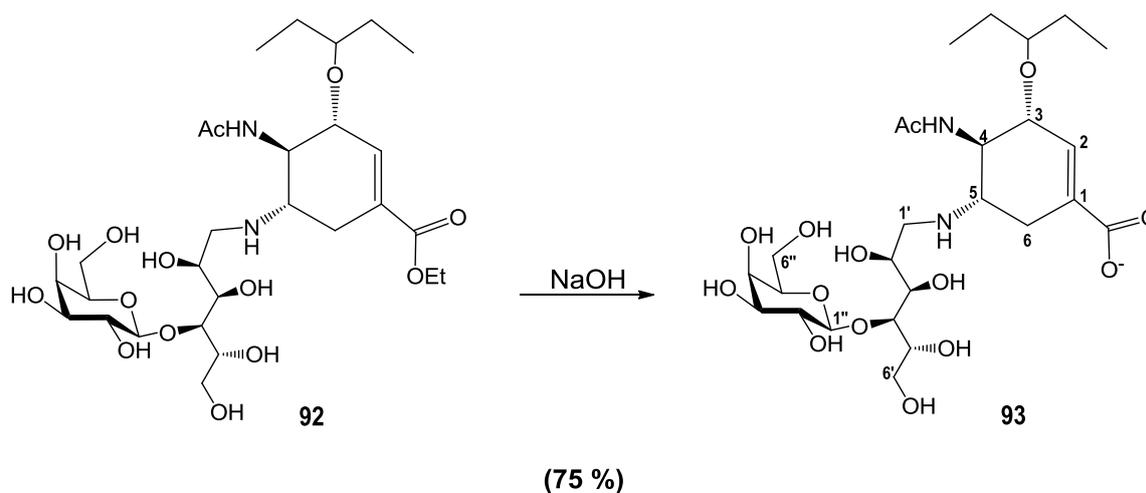


Figura 4-11 Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 500 MHz) de 92.

El análisis de espectrometría de masas ESI-TOF de **92** dió valores de $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ que confirmaron la estructura.

Síntesis de ácido (3R, 4R, 5S) 4-acetamido-N-(1'-desoxilactitol-1'-il)-5-amino-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxílico (93).

El oseltamivir es comercializado como su prodroga Tamiflu la cual, luego de la absorción, es hidrolizada enzimáticamente en el hígado por la carboxilesterasa humana 1 (HCE1) presente en el organismo al correspondiente ácido carboxílico, siendo ésta su forma activa (Shi, *et al.*, 2006). Con el objetivo de estudiar el comportamiento como inhibidor de la reacción de TcTS de la forma ácido, hidrolizamos químicamente el ester **92** para dar el carboxilato **93** el cual mostró tener menor movilidad en cdd (R_f 0,32, EtOH:H₂O:NH₄OH(c), 12:2:1) (**Esquema 4-2**). Luego de la hidrólisis con NaOH a 30 °C, la mezcla se purificó por cromatografía en resina catiónica. La estructura fue confirmada por RMN ¹H la cual mostró la desaparición de la señal del etilo del ester etílico a δ 4,24 ppm y δ 1,29 ppm (**Figura 4-2**) con el correspondiente desplazamiento hacia campos menores de la señal del H-5 y protones geminales del H-6, H-1'a y H-1'b (**Figura 4-12**). Esto también fue confirmado por RMN ¹³C (**Figura 4-13**), espectroscopía bidimensional HSQC y COSY y espectrometría de masas ESI-TOF.



Esquema 4-2

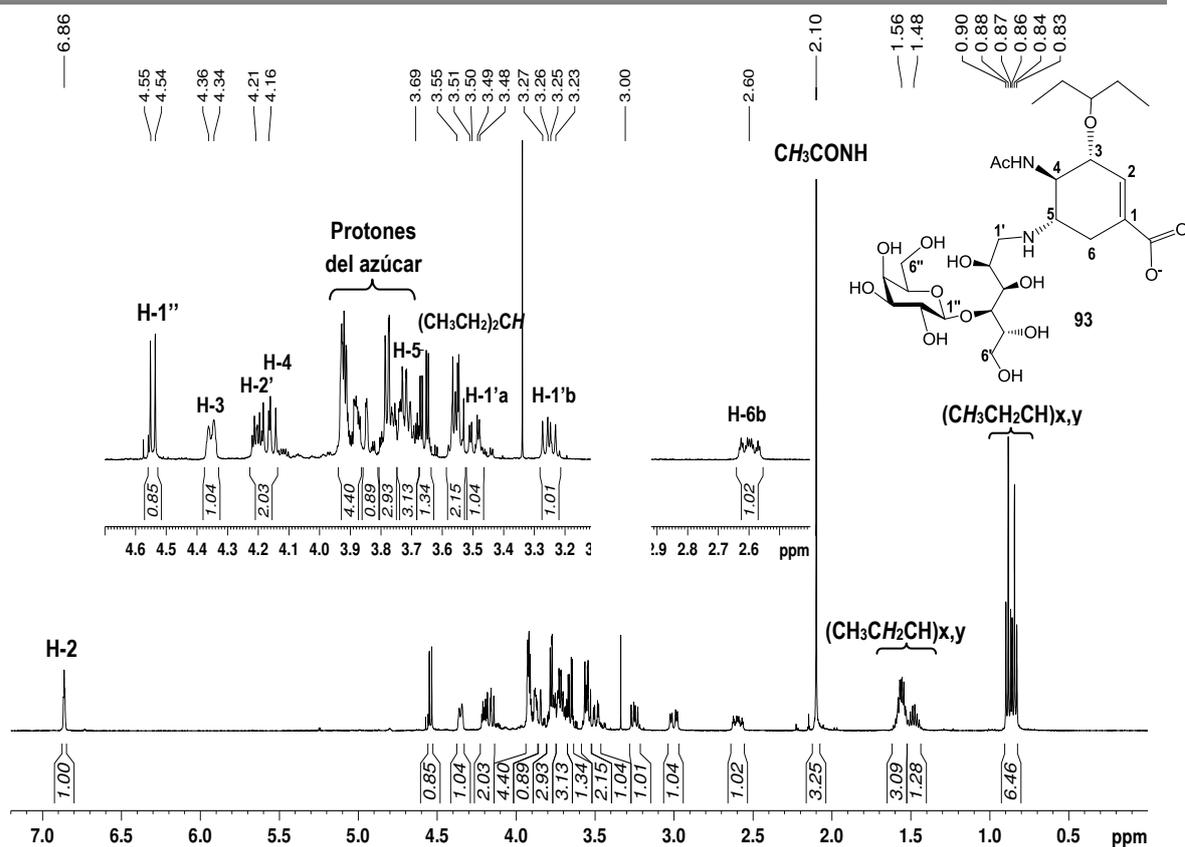


Figura 4-12 Espectro de RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) de 93.

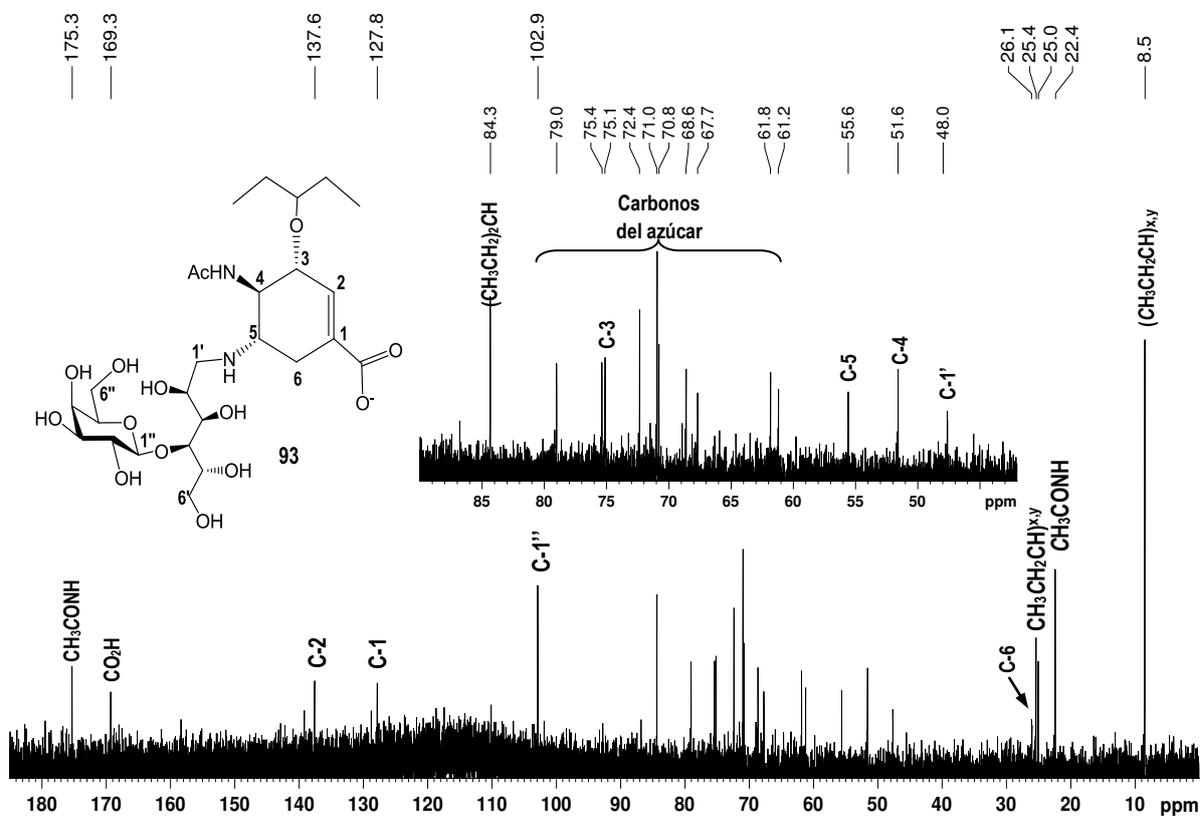
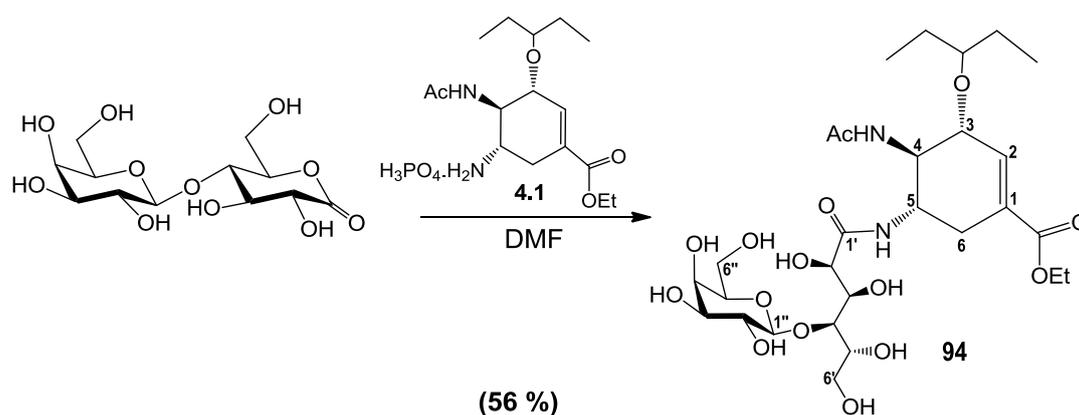


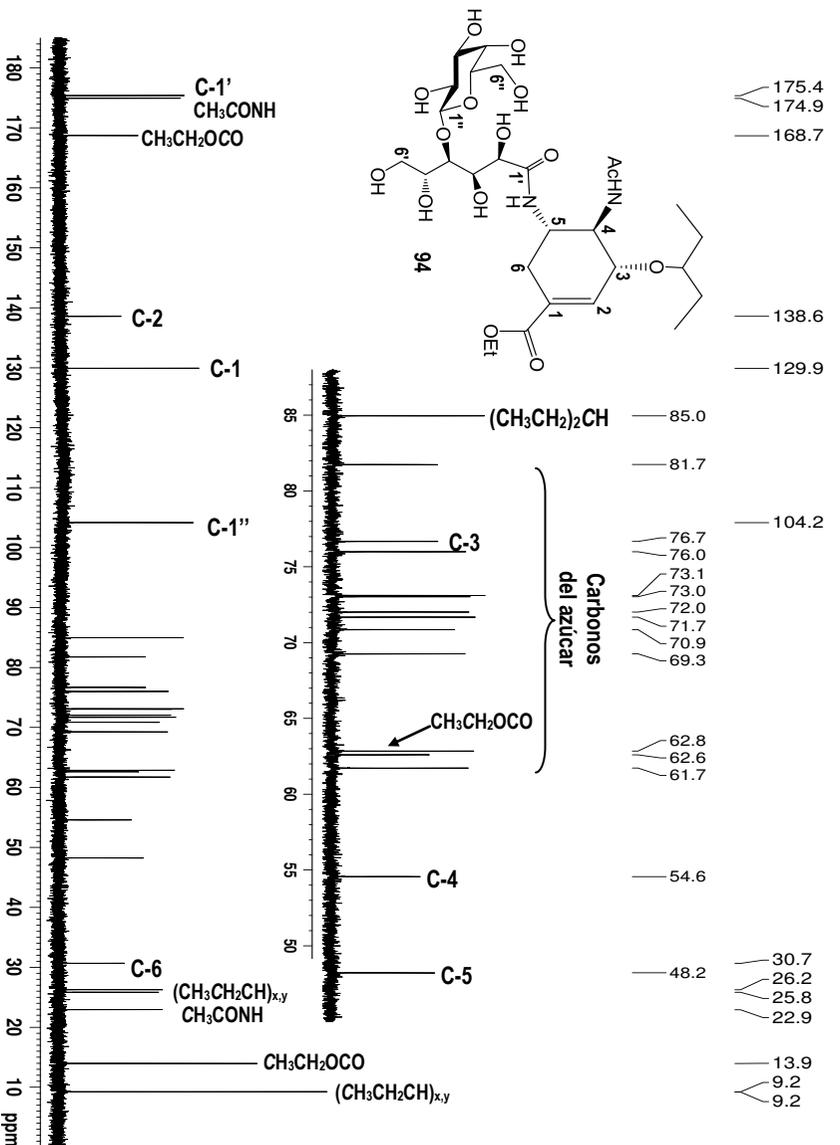
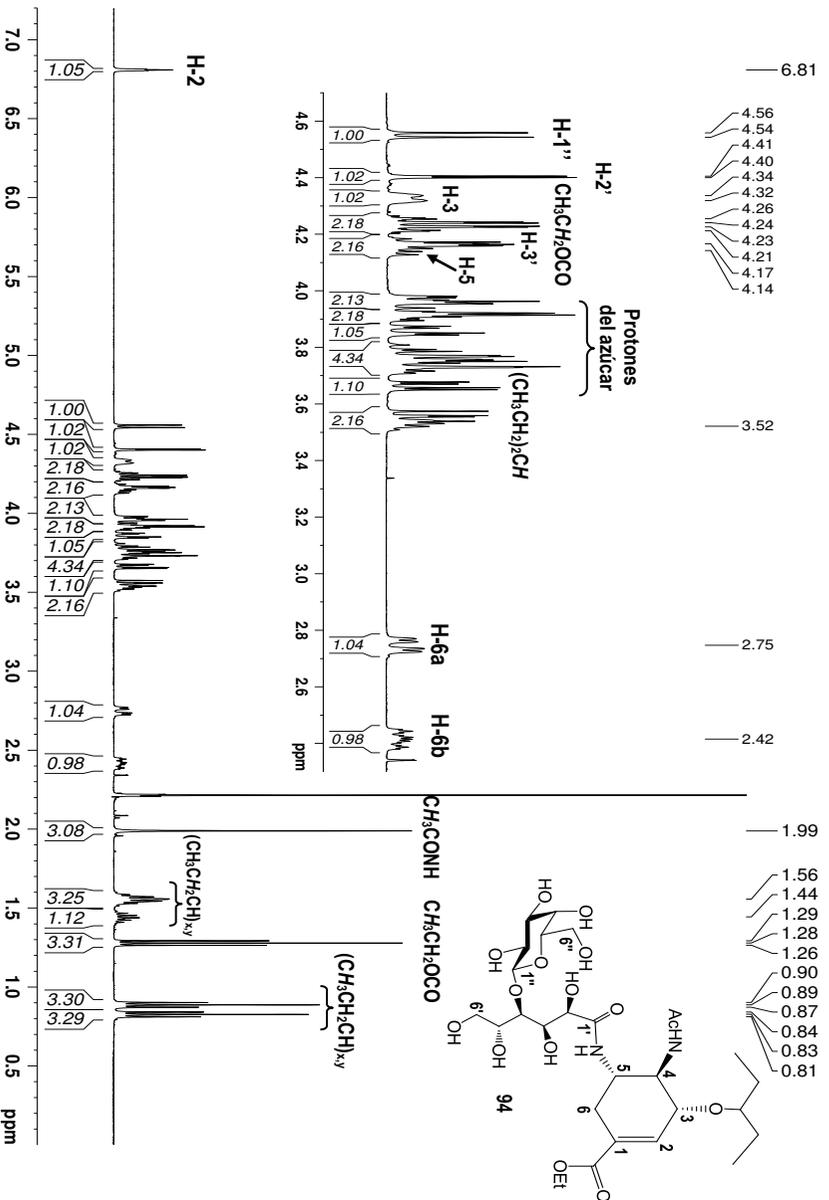
Figura 4-13 Espectro de RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz) de 93.

Síntesis de (3*R*, 4*R*, 5*S*) Etil 4-acetamido-5-lactobionamida-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxilato (94).

Para la reacción de amidación, se calentó un equivalente de fosfato de oseltamivir (**91**) en presencia de 2 equivalentes de lactobiono 1,5-lactona (**3.7**) disuelta en DMF anhidra a pH 7 (para asegurar la forma amino del oseltamivir), hasta que se observó por ccd la desaparición de la droga de partida **91**, la cual revelaba por UV (R_f 0,4, nBuOH:H₂O:AcOH, 12:5:3), y la aparición de un nuevo compuesto **94** (R_f 0,5) (**Esquema 4-3**). El producto obtenido se purificó pasando la mezcla por una columna de fase reversa RP-18. El exceso de lactobiono 1,5-lactona eluyó con agua mientras que el producto **94** eluyó con 50 % de metanol. Luego de evaporar el solvente se obtuvo un sólido con un 56 % de rendimiento.

**Esquema 4-3**

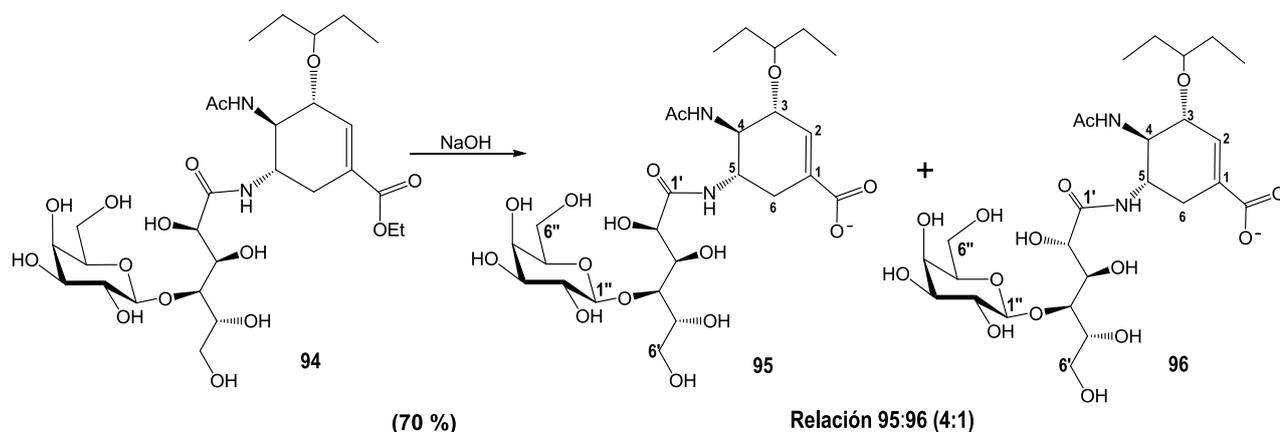
La estructura de **94** se confirmó por RMN. Nuevamente, la relación entre las integrales correspondientes al protón anomérico H-1'' a δ 4,55 ppm y la señal correspondiente al H-2 a δ 6,81 ppm, indicó que la conjugación había tenido lugar. En este caso, a diferencia de lo observado para el compuesto **92**, la señal del H-5 del ciclohexeno (carbono unido directamente al nitrógeno) apareció a campos más bajos. En el compuesto **94** este sale superpuesto al H-3' a δ 4,14 ppm, mientras que en **92** el mismo apareció a δ 2,94 ppm. También se puede observar la señal correspondiente al H-2' a δ 4,41 ppm con un $J_{2,3'} = 2,5$ Hz que integra para 1 H. Para el extremo 3-pentilo, los etilos también se muestran no equivalentes, dando señales similares a las de los compuestos **92** y **93** (**Figura 4-14**).



En el espectro de RMN ^{13}C el nuevo carbonilo resultante de la amidación (C-1') se mostró a δ 175,4 ppm. El resto de las señales resultaron similares a las del compuesto **92** excepto que en este caso el C-5 unido al nitrógeno de la amida se muestra desplazado hacia campos mayores (δ 48,2 ppm, mientras que para **92** se observaba a δ 55,8 ppm) (**Figura 4-15**). Las señales fueron confirmadas por RMN bidimensional HSQC y COSY y la estructura por espectrometría de masas ESI-TOF.

Síntesis de ácido (3R, 4R, 5S) 4-acetamido-5-lactobionamida-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxílico (95 y 96).

Para obtener la forma ácida del ester de oseltamivir procedimos a la hidrólisis alcalina utilizando el mismo protocolo que para la obtención de **93**. La reacción se monitoreó por ccd y ésta mostró la desaparición del producto de partida y la aparición de un único compuesto que reveló por UV y con el reactivo de ácido sulfúrico (R_f 0,4, nBuOH:H₂O:AcOH, 12:5:3). Se confirmó la obtención del carboxilato de la lactobionamida-oseltamivir **95** por RMN mono y bidimensional aunque también se pudo detectar otro compuesto minoritario el cual, basados en el espectro de RMN ^1H se atribuyó al epímero en C-2' (**96**) del compuesto **95**. Este se formaría por las condiciones alcalinas de la reacción debido a la presencia del grupo carbonilo de la amida en posición α al protón epimérico (**Esquema 4-4**). Los mismos no se pudieron separar y por lo tanto se caracterizó la mezcla de ambos.



Esquema 4-4

Por espectroscopia de RMN mono y bidimensional HSQC y COSY de la mezcla se confirmó la hidrólisis mostrando la desaparición de las señales del etilo del ester que se observaban a δ 4,23 ppm y δ 1,28 ppm en el RMN ^1H (Figura 4-14) y a δ 62,8 ppm y δ 13,9 ppm en RMN ^{13}C (Figura 4-15). En el espectro de RMN ^1H (Figura 4-16) el protón anomérico H-1'', el H-2' y el H-3', entre otros, aparecieron como señales dobles en una relación 4:1 correspondientes a los dos epímeros en C-2'. También se pueden observar que el H-2' y el H-3' de **95** y **96** tienen distintas constantes de acoplamiento, valores acordes con las correspondientes estructuras epiméricas. Esto también se vio reflejado en el espectro de RMN C^{13} (Figura 4-17) que mostraba las señales del C-1', C-2' y C-3', entre otras, duplicadas. El análisis de espectrometría de masa indicó solo las señales mayoritarias de $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ indicando que ambos compuestos tenían la misma masa. Por último, la presencia de **95** y **96** se confirmó por HPAEC-PAD pues los epímeros presentaron distintos tiempos de retención (Tabla 4.1).

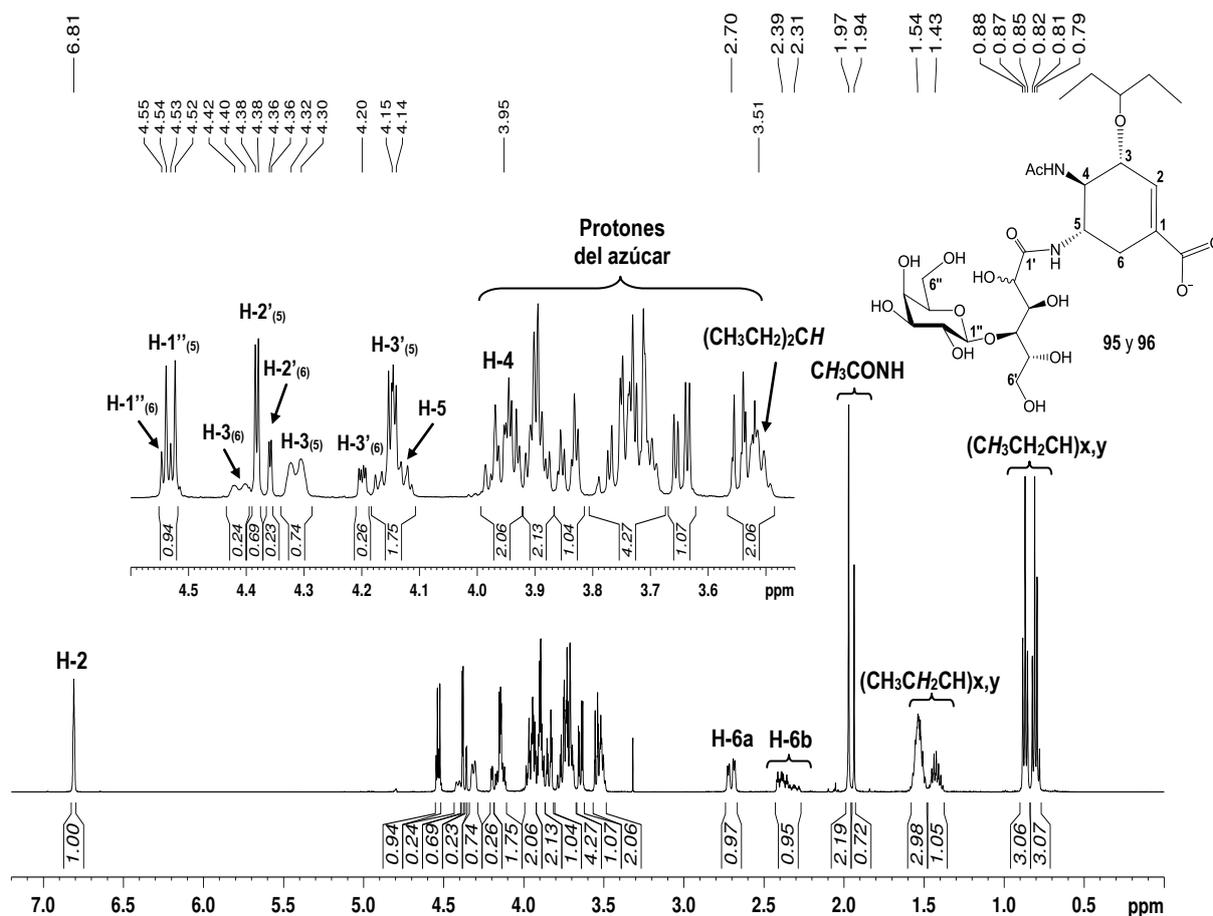


Figura 4-16 Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de **95** y **96**.

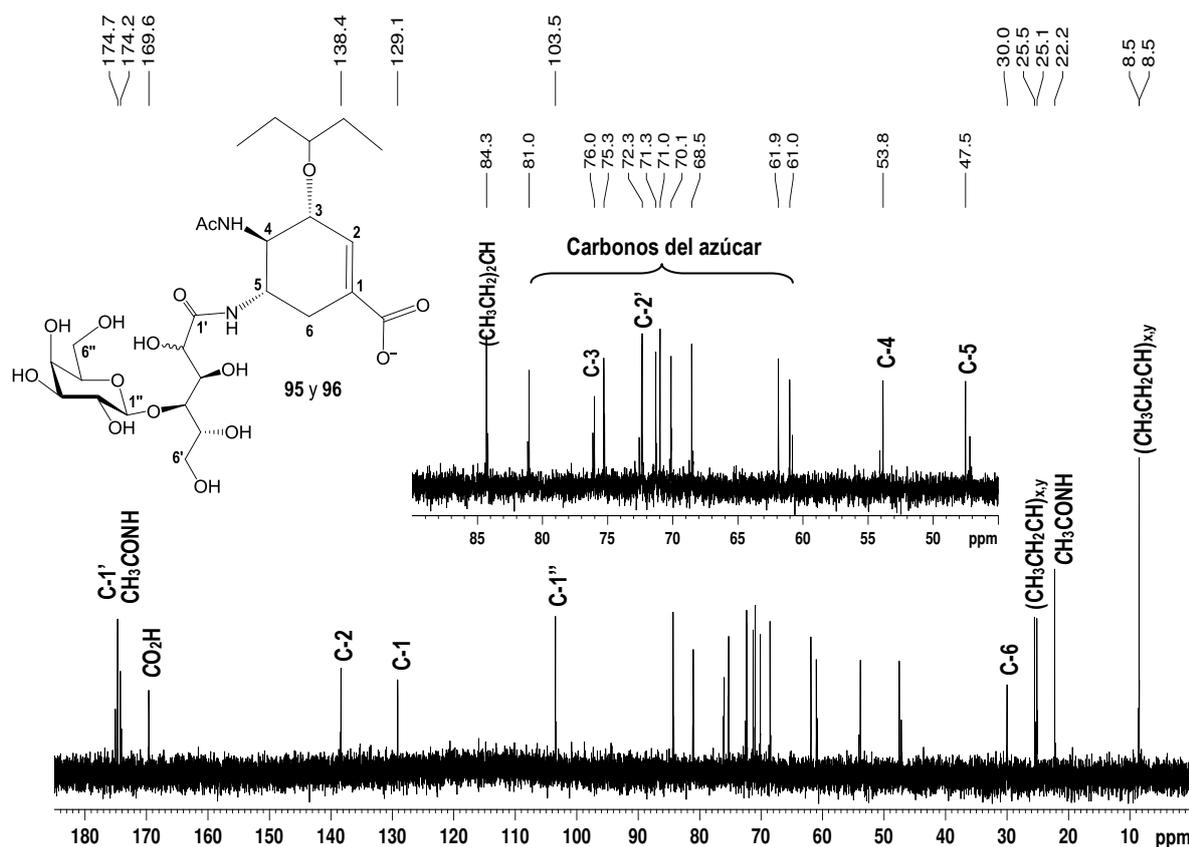
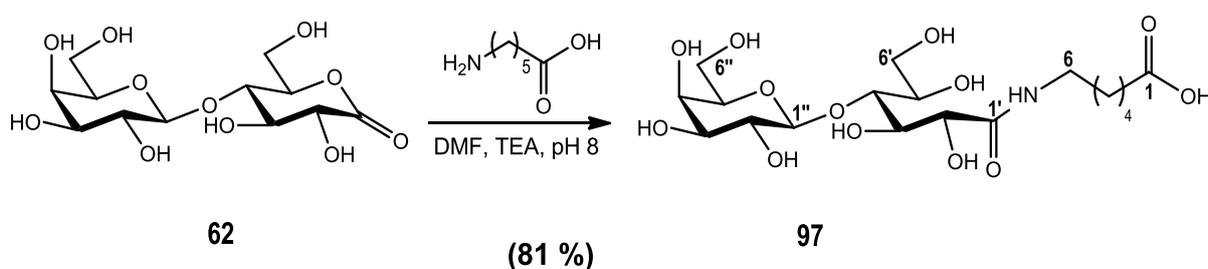


Figura 4-17 Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 500 MHz) de **95** y **96**.

Obtención del ácido ω -lactobionamidohexanoico (**97**).

Con el objetivo de obtener un sustrato bifuncional cuyos ligandos tengan mayor libertad de movimiento se interpuso una molécula espaciadora entre los dos ligandos. Para ello se utilizó un equivalente de ácido aminocaproico que presenta en un extremo un grupo ácido carboxílico para ser conjugado a la amina libre del oseltamivir y en el otro un grupo amino para conjugarse con el ácido carboxílico del ácido lactobiónico. Este espaciador presenta una cadena $(\text{CH}_2)_5$ que le brinda flexibilidad a la molécula conjugada y había sido usada anteriormente para unir dos cadenas peptídicas con quiralidad opuesta (Karle, *et al.*, 1997). Para la amidación de lactobiono 1,5-lactona con ácido aminocaproico, se disolvió un equivalente de este último en DMF anhidra a pH 8 y se calentó con 1,3 equivalentes de lactobiono 1,5-lactona (**62**) hasta que se observó la desaparición del compuesto limitante, el cual se detectaba con el reactivo de ninhidrina (R_f 0,77, $n\text{PrOH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$, 7:1:2), y la aparición del compuesto **97** el cual reveló con el reactivo de ácido sulfúrico (R_f 0,45) (**Esquema 4-5**). El producto se purificó pasándolo primeramente por una columna de intercambio catiónico para eliminar la posible presencia de ácido aminocaproico libre y posteriormente por pasaje

por columna de fase reversa RP-18, de la cual el conjugado eluyó con agua conteniendo 0,1 % de TFA, algunas fracciones más tarde que eluyera el exceso de lactobionol 1,5-lactona. Por evaporación del solvente se obtuvo la lactobionamida **97** como un sólido amorfo con 80,6 % de rendimiento. Esta molécula había sido obtenida para ser utilizada como contraión de un polinorborenno policatiónico con el propósito de obtener un latex con mayor capacidad de unir y complejar moléculas de DNA. Para su síntesis cantidades equivalentes de ácido lactobiónico, ácido aminocaproico y NaOH en metanol se calentaron a 50°C durante 24 h y luego lo purificaron en columna de sílica gel (CHCl₃:MeOH:H₂O, 5:14:1). En esta síntesis solo obtuvieron un 15 % de rendimiento y los espectros de RMN fueron parcialmente descriptos (Asgatay *et al.*, 2006).



Esquema 4-5

La estructura de **97** se confirmó por RMN (**Figura 4-18**). La relación entre las integrales correspondientes al H-1'' anomérico a δ 4,46 ppm y la señal correspondiente a los H-6 a δ 3,15 ppm, metileno adyacente al grupo amino del ácido aminocaproico, fue de 1:2, indicando que la conjugación había tenido lugar. Esta relación se observó con cada uno de los metilenos correspondientes al extremo del ácido aminocaproico a campos mayores. También se pudo distinguir el H-2' adyacente al carbonilo de la amida a δ 4,29 ppm con un $J_{2',3'} = 3$ Hz (**Figura 4-18**).

En el espectro de RMN ¹³C de **97** se observaron las dos señales correspondientes a los grupos carbonilo a δ 180,5 ppm y δ 175,3 ppm para el ácido carboxílico C-1 y la amida C-1' respectivamente. La señal del carbono anomérico C-1'' se mostró a δ 104,8 ppm. Las señales correspondientes al extremo del ácido aminocaproico, entre δ 40,3 ppm y δ 25,2 ppm, se muestran duplicadas y este efecto se puede atribuir a la libre rotación impedida debido al carácter de doble enlace

generado por resonancia del enlace simple C-N que presentan algunas amidas (Quintanilla-Licea *et al.*, 2002). Como resultado se forman dos diastereoisómeros que muestran señales distintas entre sí (**Figura 4-19**). Este efecto probablemente también se observe en el RMN ^1H aunque no se logren diferenciar unas de otras debido a la superposición de las señales. La identidad del compuesto también fue confirmado por RMN bidimensional HSQC y COSY y espectrometría de masas ESI-TOF.

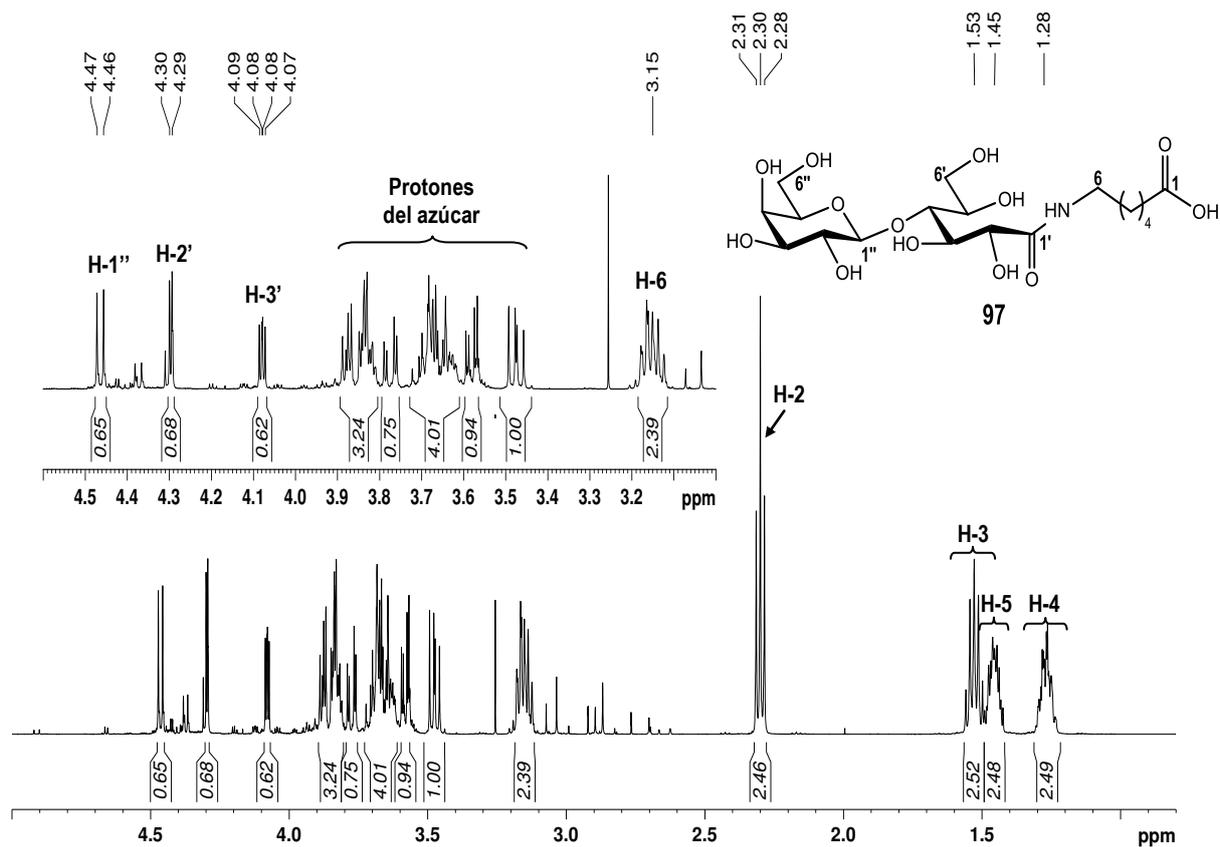


Figura 4-18 Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de 97.

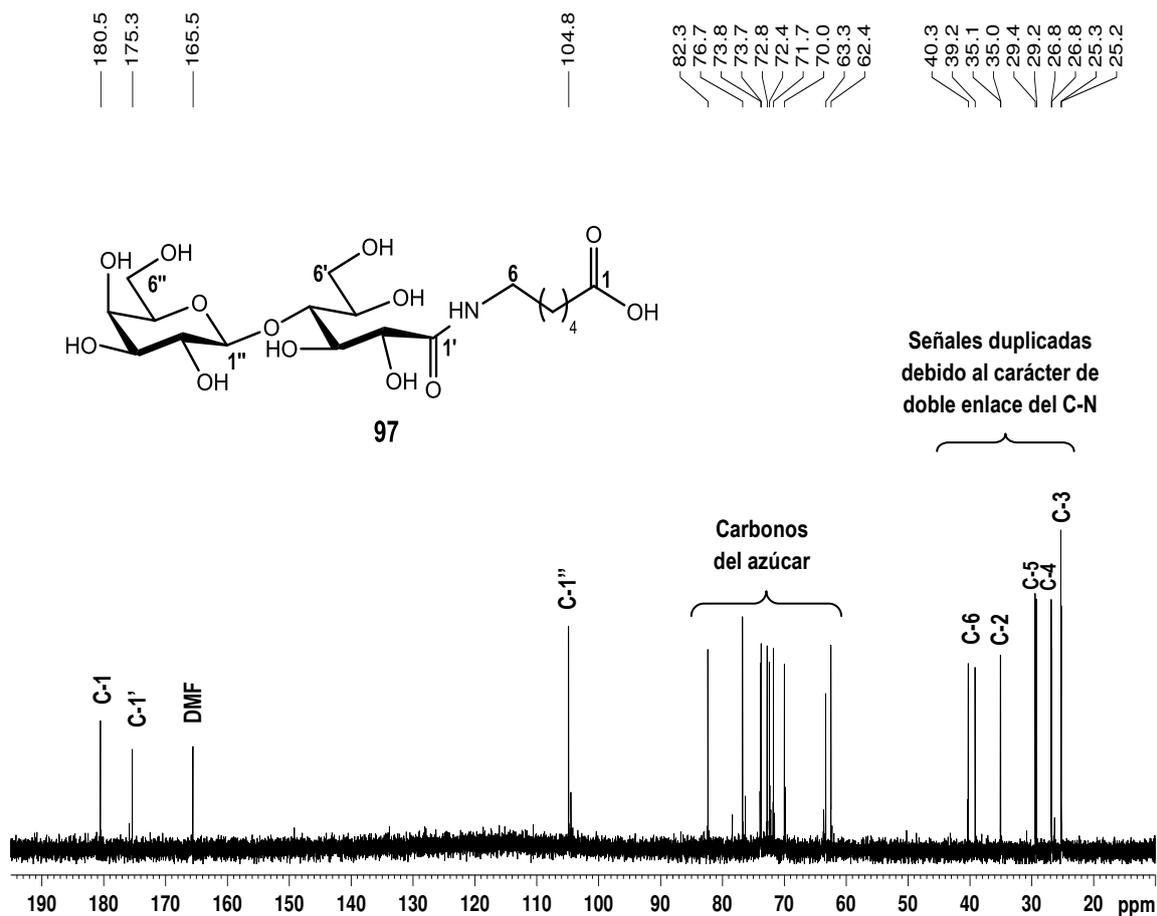
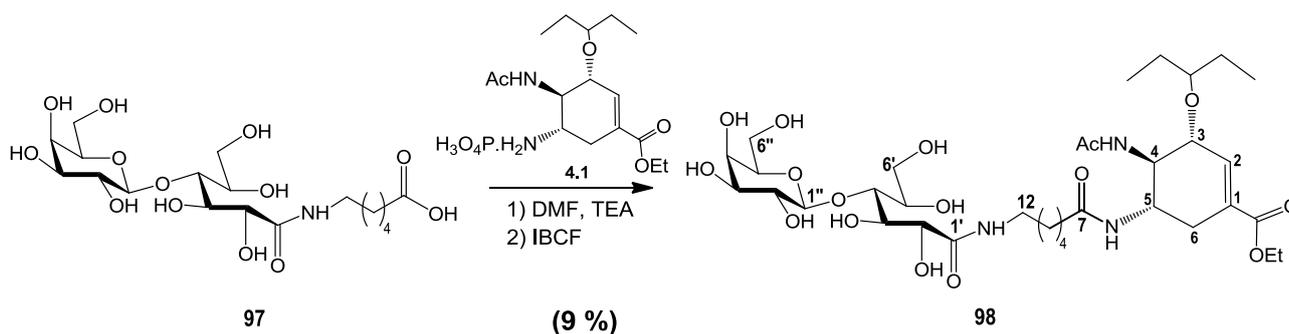


Figura 4-19 Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 500 MHz) de **97**.

Conjugación de ácido ω - lactobionamido hexanoico con oseltamivir.



Esquema 4-6

Para la amidación del compuesto **97** con oseltamivir primeramente se hizo reaccionar el ácido carboxílico terminal con 2 equivalentes de IBCF para formar el anhídrido mixto y luego, éste reaccionó con el grupo amino del oseltamivir (2,5 equivalentes) para formar la amida **98** (Esquema 4-6) que mostró un R_f 0,52

(nPrOH:EtOH:H₂O, 8:1:1). El producto se purificó pasándolo por una columna de fase reversa RP-18 (0,5 g). El producto sin reaccionar **97** eluyó con agua mientras que **98** eluyó con 50% de metanol. El oseltamivir sin reaccionar eluyó fracciones más tarde con el agregado de metanol 100 %. Luego de evaporar el solvente el compuesto **98** se obtuvo como un sólido amorfo con muy bajo rendimiento (9,3 %). Dado que el interés era obtener producto para los ensayos previos de inhibición de TcTS no se realizaron intentos de mejorar el rendimiento.

Los espectros de RMN mono y bidimensional confirmaron la estructura del compuesto **98**. En RMN ¹H (**Figura 4-20**) se pudo ver la relación entre la señal del protón anomérico a δ 4,53 ppm, la señal de los H-12 de la unidad aminocaproico a δ 3,23 ppm y la señal del H-2 del oseltamivir a δ 6,78 ppm que resultó 1:2:1 lo cual indicó que la conjugación había tenido lugar. Esto también se pudo comprobar observando el desplazamiento de la señal de los H-8 de la unidad aminocaproico (metileno adyacente al carbonilo de la amida) que en **97** se mostraban como un triplete a δ 2,30 ppm y en **98** la señal se desplazó hacia campos más altos (δ 2,21 ppm). Este aparece superpuesto a la señal del metilo de la acetona, solvente utilizado como estándar interno.

El espectro de ¹³C de **98** muestra, entre otras, las señales correspondientes a los grupos carbonilos C-7, C-1', acetamida y ester a δ 177,4 ppm, δ 174,9 ppm, δ 174,6 ppm y δ 168,7 ppm respectivamente. También se observa el desplazamiento de la señal del C-8 que en **97** aparecía a δ 35,0 ppm y en **98** se mostró a δ 36,5 ppm (**Figura 4-21**). La identidad del compuesto se confirmó por espectrometría de masas ESI-TOF.

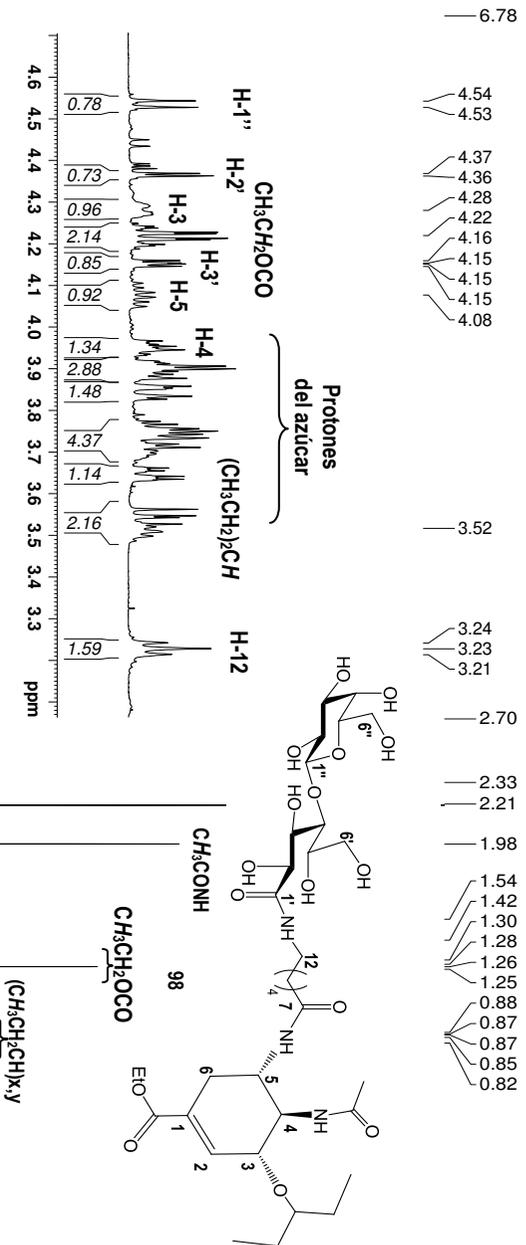


Figura 4-20 Espectro de RMN ¹H (D₂O, 500 MHz) de 98.

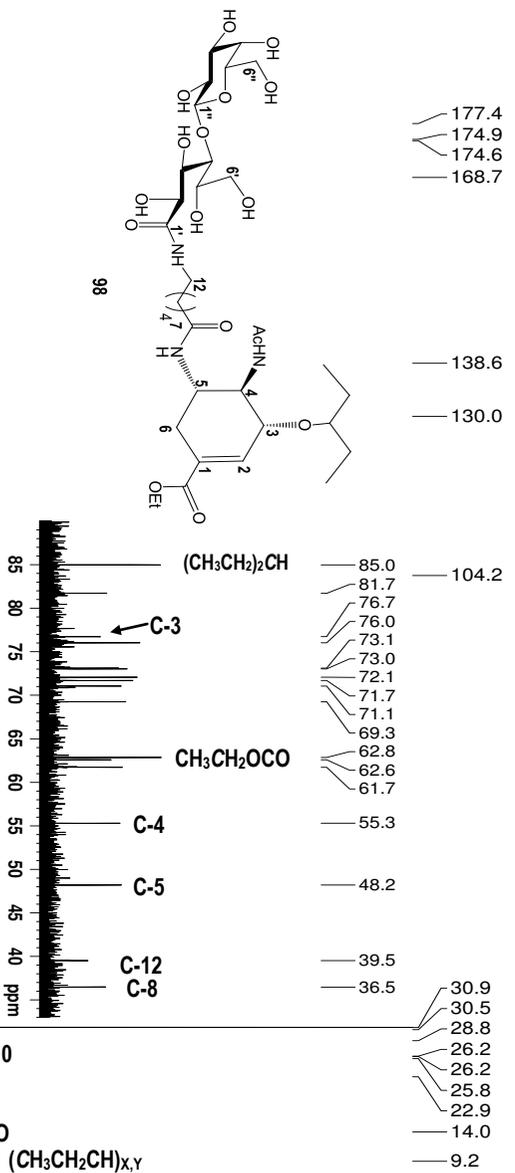
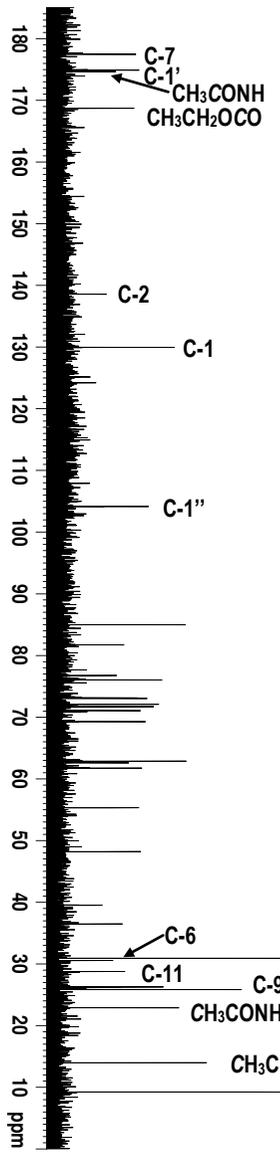
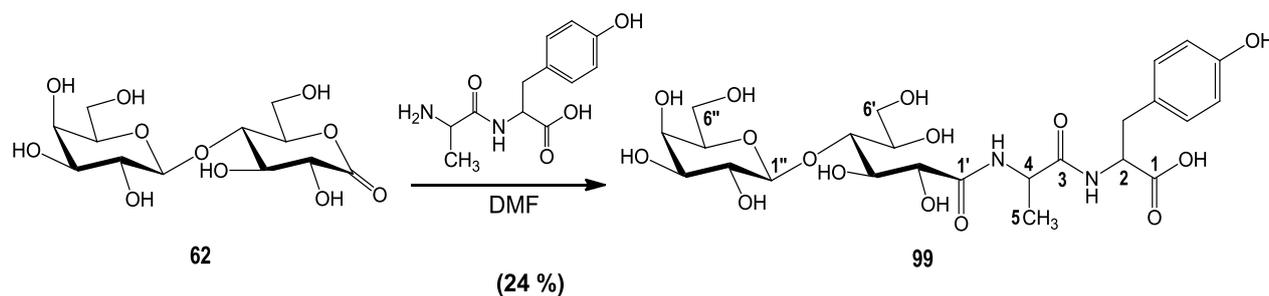


Figura 4-21 Espectro de RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz) de 98.



Conjugación de lactobiono1,5-lactona con el dipéptido AlaTyr.**Esquema 4-7**

Debido a que la Tyr342 es el aminoácido clave en la trans-glicosilación dentro del sitio de ácido siálico (**Esquema 1-1**) decidimos conjugar un dipéptido conteniendo un residuo de Tirosina a un disacárido aceptor. Este podría interferir en la formación del intermediario covalente de sialil-TcTS, etapa previa a la transferencia, mientras que la presencia del disacárido destinado al sitio aceptor podría incrementar la afinidad del sustrato por la enzima. Para la amidación con AlaTyr, un equivalente de este dipéptido disuelto en DMF anhidra se calentó en presencia de dos equivalentes de lactobiono1,5-lactona (**62**) hasta que se observó la desaparición del dipéptido, el cual se detectaba con el reactivo de ninhidrina y UV, y se mostró el nuevo compuesto **99** el cual reveló con UV y con el reactivo de ácido sulfúrico (R_f 0,42, nProp:EtOH:H₂O:NH₄OH(c), 7:1:2:200μl)(**Esquema 4-7**). En el extremo superior de la placa se observó un compuesto que revelaba por I₂ y UV, aunque no con el reactivo de ácido sulfúrico y consideramos que el dipéptido podría haberse dimerizado de manera cíclica y por lo tanto comportarse como un compuesto menos polar. Por otro lado esto también explicaría el bajo rendimiento observado (24 % de rendimiento). El producto se purificó en columna de fase reversa RP-18 donde el exceso de lactobiono1,5-lactona eluyó con agua mientras que el compuesto **99** eluyó con un 5 % de metanol.

Los espectros de RMN confirmaron la estructura del compuesto **99**. En el espectro de RMN ¹H el protón anomérico H-1'' a δ 4,55 ppm está parcialmente superpuesto a la señal del H-2, pero los protones de H-2' y H-3' muestran con las señales de los protones del metileno bencílico de la tirosina (H-6) a δ 3,14 ppm y δ 2,95 ppm, una relación 1:1:1:1 indicando que la conjugación había tenido lugar. Esto también se pudo comprobar observando el desplazamiento de la señal del H-4 que integra para 1 H y que se muestra como un doble doblete a δ 4,34 ppm con una

constante de acoplamiento de $J_{4,5} = 7,3$ Hz, desdoblada por el H-5 que se observa como un doblete a δ 1,30 ppm que integra para 3 H (**Figura 4-22**).

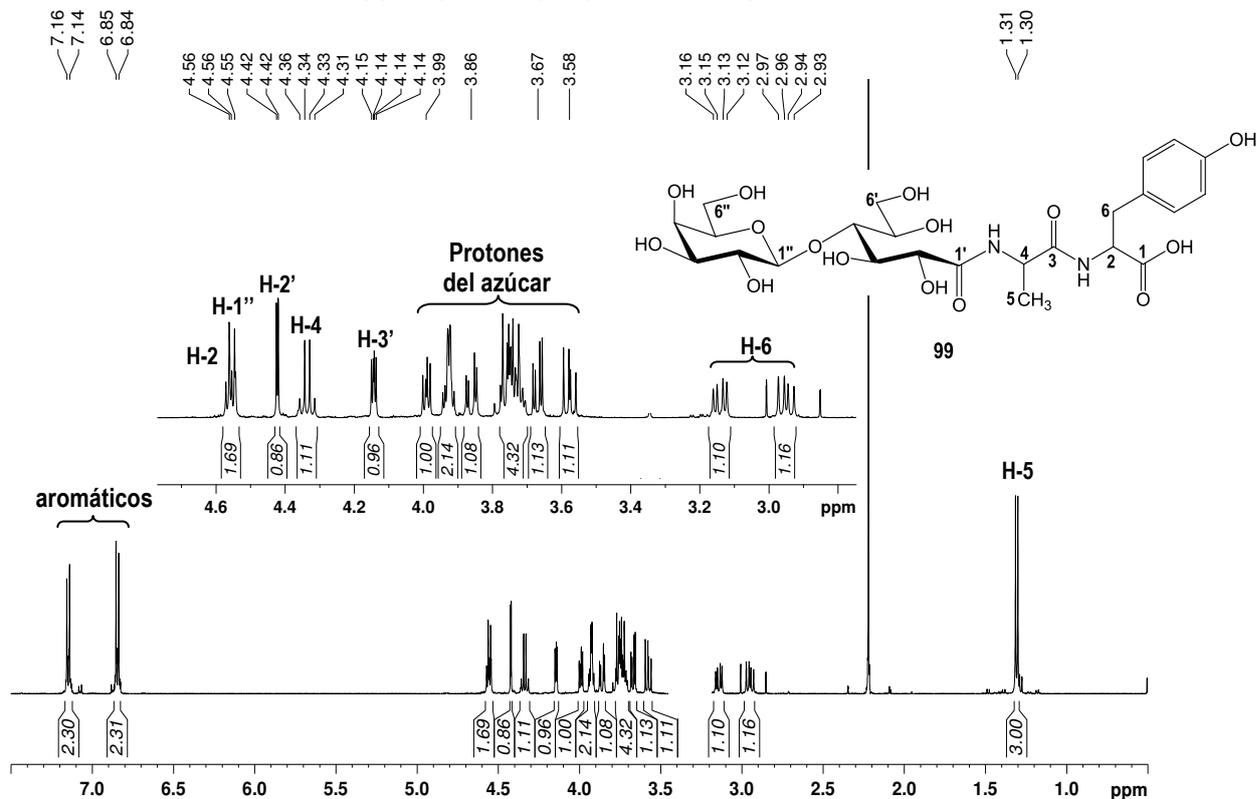


Figura 4-22 Espectro de RMN ^1H (D_2O , 500 MHz) de **99**.

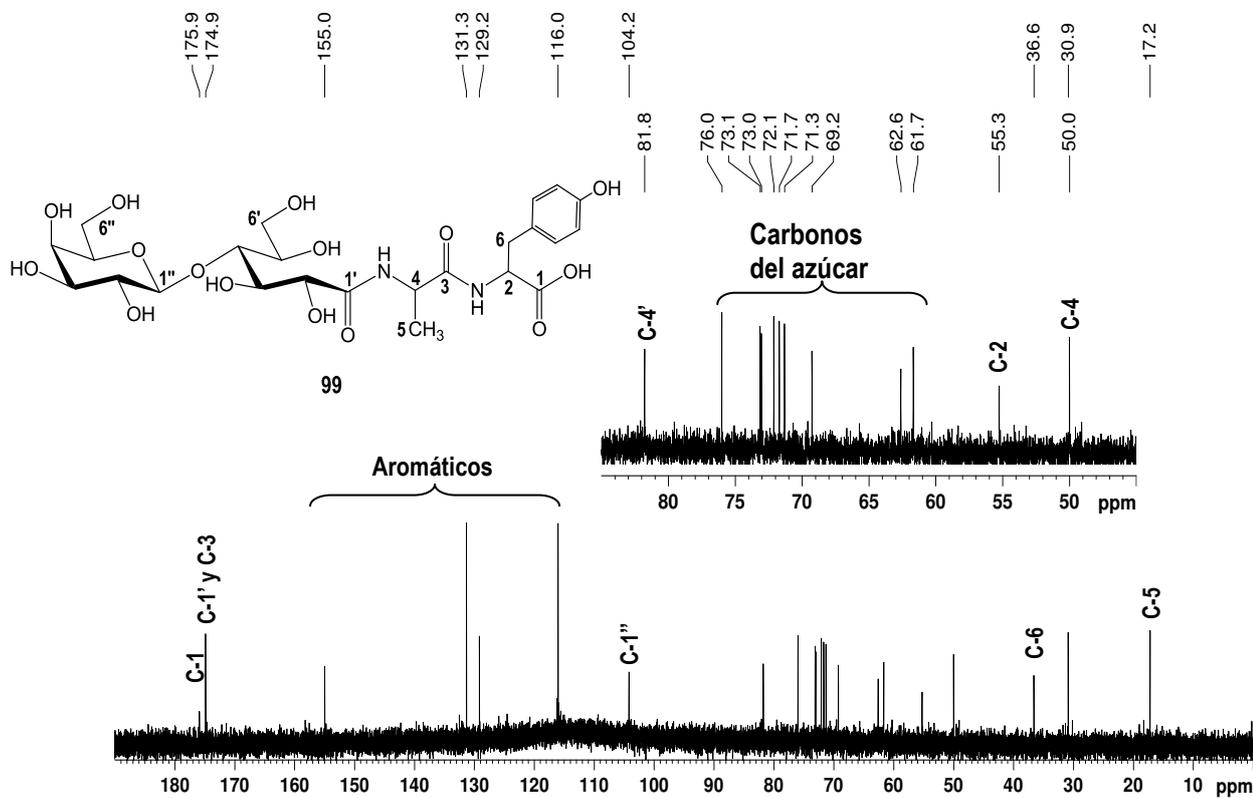


Figura 4-23 Espectro de RMN ^{13}C (D_2O , 500 MHz) de **99**.

El espectro de ^{13}C de **99** muestra, entre otras, las señales correspondientes a los grupos carbonilos C-1 a δ 175,9 ppm y C-1' y C-3 superpuestos a δ 174,9 ppm. También se observa el desplazamiento de los carbonos aromáticos (δ 155,0-116,2 ppm) y las señales del C-4 y C-5 a δ 50,0 ppm y δ 17,2 ppm respectivamente (**Figura 4-23**).

El análisis de espectrometría de masas ESI-TOF de **99** mostró picos correspondientes a los aductos de $[\text{M}+\text{H}]^+$ y $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Análisis de los sustratos bifuncionales como inhibidores de TcTS.

Los estudios del comportamiento de estos compuestos (a excepción de **97**) como sustratos e inhibidores competitivos en la reacción de TcTS fueron realizados usando 3'sialilactosa (3'SL) como donador de ácido siálico y una TcTS recombinante. Las reacciones se siguieron por HPAEC-PAD. Se observó que todos los compuestos, a excepción **99**, resultaron ser sustratos aceptores e inhibidores competitivos (**Tabla 4-1 y 4-2**). Esta diferencia podría deberse a que el OH 3 de la β -Galp en **99** estaría impedido debido a una posible interacción por puente de hidrógeno con los carbonilos de la molécula o a que la unidad aromática de la tirosina podría interactuar hidrofóbicamente con la Tyr119 y Trp312 y de esta manera colocarse entre estas dos unidades dejando la β -Galp aceptora lejos del donador sialilado o incluso fuera del sitio activo aceptor. En el caso de los conjugados con oseltamivir **95** y **96** epímeros en C-2' obtenidos en relación 4:1, ambos se sialilaron en similar proporción por lo cual las determinaciones cinéticas se realizaron usando la mezcla de ambos compuestos. Los tiempos de retención de los sustratos aceptores y sus compuestos sialilados se muestran en la **Tabla 4-1**. Los ésteres etílicos **92** y **94** no fueron incluidos en la tabla debido a que se hidrolizan en las condiciones alcalinas de corrida del HPAEC-PAD dando picos ensanchados en su base y con tiempos de retención similares a sus respectivos ácidos precursores.

Tabla 4-1. Tiempos de retención en HPAEC-PAD de los compuestos **93-99** y sus productos sialilados.

Compuesto	Condición	Tiempo de retención (min)		
		3'SL	Compuesto	Sialil-comp
93	5	16,00	10,18	25,40
Acido lactobiónico	6	11,33	9,12	25,72
95	6	12,37	17,92	35,18
96	6	12,37	15,28	33,20
98	7	20,35	15,62	24,40
99	8	11,07	9,10	-

La habilidad de los compuestos para actuar como sustratos aceptores en la reacción de TcTS es expresada por los valores de K_m los cuales son comparados con los valores de K_m del lactitol y del ácido lactobiónico (**Tabla 4-2**).

Tabla 4-2. Parámetros cinéticos para los compuestos oseltamivir y **92-99** en la reacción de TcTS.

Compuesto	K_m (mM)	IC_{50} (mM)
Lactitol (31)	0,26	0,21
Oseltamivir (91)	-	n.i. ^b
92	0,89	2,21
93	0,36	4,21
Acido Lactobiónico (30)	0,19	0,33
94	0,30	4,26
95 y 96 (4:1)	0,34	2,16
98	0,32	1,62
99	n.a ^a	n.i. ^b

^a no aceptor de ácido siálico. ^b a 2 mM de compuesto no se observó inhibición.

Todos los β -galactopiranosidos resultaron ser aceptores de ácido siálico con valores de K_m dentro del rango del lactitol excepto el compuesto **99** (explicado en párrafo anterior). También se estudió la inhibición de la sialilación de la *N*-acetilactosamina por competencia con estos compuestos. Para el caso de los conjugados con oseltamivir, los valores de IC_{50} resultaron ser de aproximadamente un orden de magnitud mayor que el que muestran los disacáridos de los cuales derivan.

Estos resultados indicaron que aunque los conjugados eran también aceptores de ácido siálico, la presencia de un ligando supuestamente dirigido al sitio donador no aumenta la afinidad del sustrato por la enzima.

Capítulo 5

Parte experimental.

Instrumental y métodos generales

Punto de fusión

Se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Cromatografía en capa delgada (ccd)

Se realizaron sobre placas de aluminio cubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) de 0,2 mm de espesor. Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso. En todos los casos, salvo indicación, el revelado se efectuó por exposición a la luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) y por inmersión en reactivo de H₂SO₄ (5% v/v en etanol con un 0,01 % de *p*-anisaldehído) y calentamiento a 150 °C. Los compuestos aminados se detectaron por inmersión en reactivo de ninhidrina (250 mg de ninhidrina en 100 ml de acetona con una gota de piridina) y calentamiento a 150 °C.

Cromatografía en columna fase normal

Se realizaron en sílica gel 60 Å, malla 200-400 (MerckTM Y AldrichTM) y los solventes de elución se indicaron en cada caso.

Cromatografía en fase reversa

Se realizaron en cartuchos de RP-18 (55 μ m, 70 Å) de 0,5 g/6 ml, 2 g/12 ml y 5 g/20 ml StrataTM (Phenomenex). Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso.

Poder rotatorio

Se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141 ó modelo 343, en celdas de 1 dm de longitud, a temperatura ambiente y empleando una lámpara de sodio ($\lambda = 589$ nm). Los solventes y concentraciones utilizadas se indicaron en cada caso.

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) se adquirieron con un espectrómetro Bruker AC-200 y AM-500 a 200 y 500 MHz respectivamente a 30 °C. Las constantes de acoplamiento aparentes (expresadas en Hz) se determinaron por medición directa de la separación de las líneas en el espectro de RMN ^1H . Los espectros de RMN ^{13}C se realizaron en equipos Bruker AC-200 y AM-500 a 50,3 MHz y 125,8 MHz, respectivamente, y se adquirieron por desacoplamiento de banda ancha. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del tetrametil silano (TMS) cuando se realizaron en CDCl_3 . Cuando los espectros se realizaron en D_2O , se utilizó la señal de agua a δ 4,79 ppm, para RMN ^1H (Gottlieb, *et al.*, 1997).

La asignación completa de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C de algunos compuestos se realizó utilizando técnicas mono y bidimensionales de experimentos de correlación heteronuclear (HSQC) y homonuclear (COSY).

Espectrometría IR

Fueron realizados en un espectrómetro Nicolet Magna 550 usando pastillas de KBr.

Espectros de Masa de Alta Resolución.

Los espectros de masa de alta resolución fueron realizados con un espectrómetro Micromass Q-TOF Ultima Tandem Quadrupole/ Time of Flight equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) o con un sistema PE BIO-Systems DE-STR-MALDI-TOF (2000) en la Universidad de California (Riverside-EEUU) ó con un BRUKER micrOTOF-Q II con fuente de ionización electrospray (ESI), UMYMFOR (CONICET-FCEN), Universidad de Buenos Aires.

Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC).

Las reacciones enzimáticas y la purificación de 3'SL de calostro bovino se monitorearon por HPAEC-PAD, utilizando un equipo DIONEX DX3000, con detector por pulso amperométrico (PAD) y electrodo de oro, empleando columnas de intercambio aniónico CarboPacPA-100 (4 x 250 mm), CarboPac PA-20 (4 x 150 mm) y CarboPac PA-10 (4 x 250 mm) equipadas con sus respectivas guardacolumnas CarboPac PA-100 (4 x 50 mm), CarboPac PA-20 (4 x 50 mm) o CarboPac PA-10 (4 x 50 mm). Las condiciones de elución se describen en cada caso.

Condiciones de elución para cromatografía de intercambio aniónico con detector por pulso amperométrico (HPAEC-PAD)

Condición 1: columna CarboPac PA-20 (3 x 150 mm), equipada con una precolumna PA-20 (3 x 30 mm), 80 mM de NaOH. Flujo: 0,4 ml/min a 25 °C.

Condición 2: columna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm), equipada con una precolumna PA-100 (4 x 50 mm), 60 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 60 minutos. Flujo: 0,9 ml/min a 25 °C.

Condición 3: columna CarboPac PA-20 (3 x 150 mm), equipada con una precolumna PA-20 (3 x 30 mm), gradiente lineal desde 20 a 200 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 30 minutos. Flujo: 0,5 ml/min a 25 °C.

Condición 4: columna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm), equipada con una precolumna PA-100 (4 x 50 mm), gradiente lineal desde 50 a 300 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 60 minutos. Flujo: 1,0 ml/min a 25 °C.

Condición 5: columna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm), equipada con una precolumna PA-100 (4 x 50 mm), gradiente lineal desde 30 a 300 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 60 minutos. Flujo: 0,9 ml/min a 25 °C

Condición 6: columna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm), equipada con una precolumna PA-100 (4 x 50 mm), gradiente lineal desde 30 a 100 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 15 minutos seguidos de otro gradiente lineal desde 100 mM a 350 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 30 minutos. Flujo: 0,9 ml/min a 25°C.

Condición 7: columna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm), equipada con una precolumna PA-100 (4 x 50 mm), gradiente lineal desde 20 mM a 100 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 30 minutos seguidos de otro gradiente lineal desde 100 mM a 400 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 30 minutos. Flujo: 0,9ml/min a 25°C.

Condición 8: columna CarboPac PA-100 (4 x 250 mm), equipada con una precolumna PA-100 (4 x 50 mm), gradiente lineal desde 30 a 350 mM de NaAcO en 100 mM de NaOH durante 60 minutos. Flujo: 0,9 ml/min a 25 °C.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Se utilizó un HPLC Waters System (bomba Waters 600 con un detector de índice de reflexión Waters 2414) utilizando una columna Styragel (HR-3, Waters) y THF como solvente, a un flujo de 1,0 ml/ min. El peso molecular numérico M_n , másico M_w y el peso molecular del pico principal M_p fueron calculados por el método de calibración universal utilizando estándares de poliestirenos.

Purificación de solventes

Diclorometano (CH_2Cl_2) y Acetonitrilo (CH_3CN) anhidro.

El solvente se secó por reflujo sobre P_2O_5 y se destiló inmediatamente antes de su uso, ó se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

Piridina anhidra (C_5H_5N)

Se reflujo sobre lentejas de NaOH y se destiló. Se conservó sobre NaOH.

Metanol anhidro (CH_3OH)

Se reflujo sobre virutas de magnesio, se destiló y se guardó sobre tamices moleculares de 4 Å, activados.

Tetrahidrofurano anhidro (THF)

Se pasó por columna de alúmina, se secó por reflujo sobre sodio-benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno hasta coloración azul. Se destiló inmediatamente antes de ser empleado.

Materiales:**Reactivos para trans-sialidaciones.**

El ácido lactobiónico, la lactosa, *N*-acetilactosamina (NAcL), el dipéptido AlaTyr y el ácido aminocaproico fueron comprados en Sigma Chemical Co. La [D- glucosa 1-¹⁴C]-lactosa fue adquirida en Amersham Biosciences.

El calostro fue gentilmente donado por Juana Inés Maggi de Donadío y Lucía Gandolfi-Donadío.

Los oligosacáridos sintéticos de las mucinas **36 y 38** fueron provistos por la Dra. Carola Gallo-Rodriguez, **37, 39-41 y 43** por la Dra. Verónica M. Mendoza y **42** fue sintetizado por el Lic. Gustavo Kashiwagi.

Los disacáridos Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Gal(β 1 \rightarrow 4)-Glc β -OCH₂CH₂N₃ (**44**) y Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Gal ρ (β 1 \rightarrow 3)-GlcNAc β O-CH₂CH₂N₃ (**45**) fueron gentilmente donados por Carbohydrate Synthesis/Protein Expression Core of The Consortium for Functional Glycomics founded by the National Institute of General Medical Sciences grant GM62116. El oseltamivir fue gentilmente donado por Laboratorio Elea SACIFyA.

La enzima TcTS recombinante (Buschiazzo, *et al.*, 1997) fue gentilmente proporcionada por el laboratorio del Dr. A. C. C. Frasch (UNSAM).

Para la reacción de trans-sialidación se utilizaron las condiciones de incubación descritas en cada caso.

Reactivos para PEGilación.

Polímeros lineales utilizados: el ester propiónico de metoxipolietilenglicol *N*-hidroxisuccinimida 685 (PM: 685,71) (CH₃O-PEG₆₈₅-NHS) fue adquirido en Pierce Biotechnology (Rockford, USA). El metoxipolietilenglicol amina 750 (PM: 750) (CH₃O-PEG₇₅₀-NH₂), el metoxipolietilenglicol amina 5000 (PM: 5000) (CH₃O-PEG₅₀₀₀-NH₂) y el ester de metoxipolietilenglicol acetil *N*-hidroxisuccinimida 5000 (PM: 5000) (CH₃O-PEG₅₀₀₀-NHS) fueron comprados en Fluka (Alemania). Polímeros multibrazos utilizados: el ester de 8-brazos de polietilenglicol succinil *N*-hidroxisuccinimida, core de hexaglicerol PM: 20204 (8-brazos-SSPEG 20 kDa), el ester de 8-brazos de

polietilenglicol succinil *N*-hidroxisuccinimida, core de hexaglicerol PM: 42680 (8-brazos-SSPEG 40 kDa), el polietilenglicol amino de 8-brazos, core de hexaglicerol PM: 20536 (8-brazos-NH₂PEG 20 kDa) y el polietilenglicol amino de 8-brazos, core de hexaglicerol PM: 42680 (8-brazos-NH₂PEG 40 kDa) fueron comprados en JenKem Technology (Beijin, China).

Obtención de 3'sialillactosa (3'SL).

La 3' sialillactosa fue obtenida del calostro bovino, mediante una modificación del método descrito (Veh, *et al.*, 1981). Se utilizó 0,5 lt de calostro bovino proveniente de animal de 2,5 años, raza Holando Argentino, segunda parición, alimentados con alfalfa.

Se centrifugó el calostro a 4 °C durante 30 minutos a 6000 rpm. Se separó el precipitado proteico del sobrenadante acuoso y se liofilizo hasta reducir su volumen a la mitad. Luego se extrajeron los lípidos por agregado de 1 lt de mezcla cloroformo: metanol (2:1). Se separaron las fases acuosa y clorofórmica. La fase acuosa se volvió a centrifugar a 4 °C a 6000 rpm durante 30 minutos. Se separaron la fase acuosa de la fase clorofórmica remanente y se concentró hasta aproximadamente 60 ml. Para precipitar la lactosa se agrego etanol hasta obtener una solución al 68 % v/v y se dejó toda la noche a 4 °C. El precipitado obtenido se filtró y el sobrenadante se concentró hasta aproximadamente 20 ml. La solución obtenida se pasó por una columna de intercambio aniónico Dowex 1X2 (forma acetato) de 50 cm de alto por 2 cm de diámetro. Los oligosacáridos neutros eluyeron con el agregado de 500 ml de agua. Luego se eluyeron los compuestos sialilados con un gradiente desde 200 a 500 mM de acetato de piridinio, pH 5. Se juntaron fracciones de 5 ml y se analizaron por HPAEC-PAD utilizando la condición de elución 4. Se juntaron las fracciones conteniendo 3'SL pura y se liofilizaron para obtener 40 mg de 3'SL como un polvo blanco.

Glicosidaciones

Las reacciones de glicosidación fueron realizadas bajo atmósfera de argón, por requerir estrictas condiciones anhidras. Los reactivos empleados en estas reacciones fueron secados en pistola secadora (alto vacío, calor, en presencia de P₂O₅ como desecante) durante varias horas. Los tamices moleculares empleados (4 Å) fueron

activados por calentamiento a 300 °C por 3 h inmediatamente antes de su uso. Todo el material de vidrio, jeringas y agujas, se secaron en estufa a 140 °C, por 3 horas.

Ensayos de cinética enzimática.

Se incubaron a 20 ° C durante 15 minutos (salvo indicación en el texto), 20 µl de una mezcla de reacción conteniendo buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7, 30 mM NaCl, 1 mM 3'sialilactosa como donador, y los sustratos con 300 ng de TcTS recombinante. Las muestras luego de la reacción se diluyeron 12 veces con agua desionizada para luego ser analizadas por HPAEC-PAD. Las condiciones de elución se indican en cada caso. Para los cálculos de K_m se usaron 6 puntos desde 0 a 1 mM de cada compuesto. Cada incubación se realizó por duplicado y se usó ácido D-galacturónico como estándar interno. El grado de sialilación se calculó por integración de la respuesta de los correspondientes compuestos sialilados. Los valores de K_m se determinaron usando el método de Lineweaver-Burk.

Inhibición de la sialilación de N-acetilactosamina

Se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos 20 µl de una mezcla conteniendo 20 mM de buffer Tris-HCl pH 7, 30 mM NaCl, 1 mM 3'sialilactosa como donador, 1 mM de N-acetilactosamina como aceptor y los sustratos en diferentes concentraciones con 300 ng de TcTS recombinante. Las muestras se diluyeron 12 veces con agua deionizada y se analizaron por HPAEC-PAD. Las condiciones de elución se indican en cada caso. Para los cálculos de IC_{50} se usaron 6 puntos desde 0 a 1 mM de cada compuesto. La inhibición se calculó por integración de la señal de 3'sialil-N-acetilactosamina respecto de la cantidad total de productos sialilados presentes con y sin la presencia de inhibidor. Los valores de IC_{50} indicaron la concentración de inhibidor necesaria para dar un 50 % de inhibición en las condiciones del ensayo.

Ensayos de cinética enzimática utilizando Neu5Gc-disacáridos como donores de ácido N-glicolilneuramínico.

Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente 20 μ l de una mezcla de reacción conteniendo buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7, 30 mM NaCl, 1 mM de Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Gal(β 1 \rightarrow 4)-Glc β -OCH₂CH₂N₃ (**44**) o Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Gal(β 1 \rightarrow 3)-GlcNAc β -OCH₂CH₂N₃ (**45**) como donador, y 1 mM de lactitol, N-acetilactosamina o lactosa como sustrato aceptor con 300 ng de TcTS recombinante. Las muestras luego se diluyeron 12 veces con agua desionizada para luego ser analizadas por HPAEC-PAD, condición de elución 4. Los cálculos de K_m se realizaron como se describió anteriormente.

Para los ensayos de inhibición de TcTS por acción de los anticuerpos neutralizantes la TcTS se incubó previamente durante 15 minutos con anticuerpos neutralizantes.

Transferencia competitiva de Neu5Gc respecto de Neu5Ac mediada por TcTS.

Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente 20 μ l de una mezcla de reacción conteniendo buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7, 30 mM NaCl, 1 mM de 3'sialilactosa, 1 mM de N-acetilactosamina y 1 mM de Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Gal(β 1 \rightarrow 4)-Glc β OCH₂CH₂N₃ (**44**) o Neu5Gc(α 2 \rightarrow 3)-Gal(β 1 \rightarrow 3)-GlcNAc β OCH₂CH₂N₃ (**45**) con 300 ng de TcTS recombinante. Las muestras luego se diluyeron 5 veces con agua desionizada para luego ser analizadas por HPAEC-PAD, condición de elución 4.

Bencil 5-N-acetil- α -neuraminil-(2 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-desoxy- α -D-galactopiranosido (42 Bn).

Se incubaron por triplicado bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopiranosido (**42Bn**; 6 mg) y 3'sialilactosa (6,5 mg) con 22 μ g de TcTS recombinante en 500 μ l de buffer Tris 200 mM pH 7,4 conteniendo NaCl 30 mM, a 25°C por 14 h. Cada reacción fue analizada por HPAEC-PAD bajo condición de elución 4. Las tres mezclas de incubación se combinaron, y se pasaron por una columna de resina de intercambio aniónico AG1X2 (forma acetato). Los compuestos neutros, bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 3)-[β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-[β -D-galactofuranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-galactofuranosil-(1 \rightarrow 4)]-2-acetamido-2-desoxy- α -D-glucopiranosido (**42Bn**) y la lactosa, eluyeron con H₂O, en la primera fracción. Los compuestos sialilados eluyeron con buffer de acetato de piridinio 200 mM, pH 5,0 y se colectaron fracciones (1,5 ml) que se analizaron por HPAEC-PAD, condición de elución 4. La 3'sialilactosa remanente se recuperó al eluir con los primeros 80 ml de buffer acetato de piridinio 200 mM y a continuación, se colectaron las fracciones que contenían al compuesto sialilado **S42Bn**, que se combinaron y se concentraron a temperatura ambiente, coevaporando con tolueno (5 x 10 ml). Se redisolvió en agua destilada y por liofilización se obtuvo 2,7 mg de **S42 Bn** como un polvo blanco.

RMN ¹H (D₂O): δ 7,54 -7,38 (m, 5H, aromáticos), 5,47 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1,2 Hz, H-1B), 5,24 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 1,5 Hz, H-1 C), 4,96 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 3,5 Hz, H-1 A), 4,80 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7,7 Hz, H-1 E), 4,74, 4,57 (2d, 2H, J = 12,0 Hz, CH₂Ph), 4,71 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 8,0 Hz, H-1 F), 4,53 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 7,7 Hz, H-1 D), 4,26-4,23 (m, 2 H, H-2 B, H-3 B), 4,20-4,19 (m, 2 H, H-6aA, H-4 D), 4,14 (dd, 1H, $J_{1,2}$ = 1,7 Hz, $J_{2,3}$ = 3,5 Hz, H-2 C), 4,12-4,09 (m, 2 H, H-3 C, H-4 B), 4,08 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 8 Hz, $J_{3,4}$ = 3,2 Hz, H-3 F), 4,04-3,56 (m, 34 H, varios), 2,76 (dd, 1H, J = 12,4 Hz, J = 4,6 Hz, H-3e Neu5Ac), 2,02 (s, 3 H, CH₃CONH Neu5Ac), 1,95 (s, 3 H, CH₃CONH), 1,81 (t, 1 H, J = 12,1 Hz, H-3a Neu5Ac).

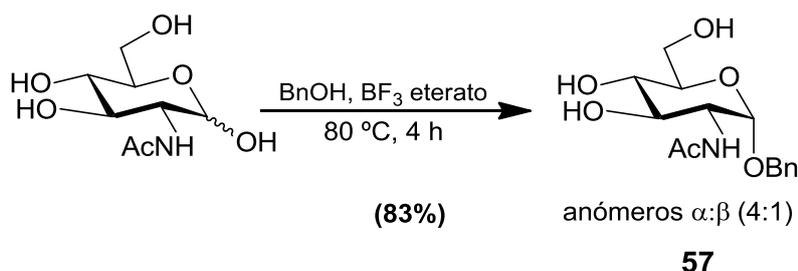
RMN ¹³C (D₂O): δ 175,7, 174,8 (CH₃CONH); 129,4 (aromáticos), 107,2 (C-1 B), 104,6 (C-1 C), 104,8 (C-1 F), 103,6 (C-1 E), 102,7 (C-1 D), 96,6 (C-1 A), 86,0 (C-2 B), 84,2 (C-4 C), 83,9 (C-3 D), 84,4 (C-4 B), 82,4 (C-2 C), 78,5 (C-4 A), 77,6 (C-3 C), 76,5

(C-3 F), 76,3, 76,2, 75,6, 75,5, 75,3, 73,7, 73,5, 72,7, 72,4, 72,3, 71,5, 71,2, 70,8 (CH₂Ph), 70,5, 70,35, 70,0, 69,7, 69,3, 69,1, 68,96, 68,7, 68,3, 63,5, 63,44, 63,41, 62,0, 61,7, 61,6, 54,4 (C-2 A), 52,4 (C-5 Neu5Ac); 40,4 (C-3 Neu5Ac), 22,8 (CH₃CONH, Neu5Ac), 22,4 (CH₃CONH).

ESI-TOF MS m/z: Calcd para [M+Na]⁺: 1435,4862, encontrado: 1435,4804.

Síntesis de bencil β-D-galactopiranosil-(1→6)-2-amino-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (59):

Bencil 2 acetamido-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (57).



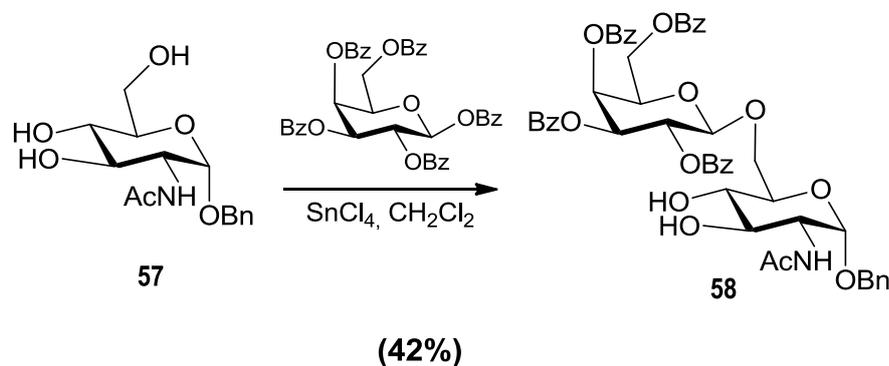
A una solución de *N*-acetil-D-glucosamina (3 g, 13,56 mmol) en alcohol bencílico (21 ml), se le agregó BF₃ eterato (320 μl, 2,7 mmol) y la mezcla se calentó con agitación a 80 °C por 4 h. Pasado ese tiempo, la ccd mostró la desaparición total del compuesto de partida. El producto resultante se precipitó mediante la adición de dietil eter (100 ml). Los bencil glicósidos fueron obtenidos con 83% de rendimiento como una mezcla de anómeros α y β (4:1)(R_f 0,66 y 0,60 respectivamente (nPrOH:EtOH:H₂O, 7:1:2).

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz): δ de la región anomérica 4,83 (d, 0,8 H, J_{1,2}=3,5 Hz, H-1α), 4,42 (d, 0,2 H, J_{1,2}= 8,5 Hz, H-1β).

RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz): δ de la región anomérica 100,7 (H-1β), 96,6 (H-1α).

El bencil 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**57**) fue obtenido por recristalización fraccionada en etanol (60%). El punto de fusión y la rotación óptica coincidieron con los valores previamente descritos (Kuhn, *et al.*, 1958).

Bencil (2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (58**).**



A una solución de 1,2,3,4,6-penta-O-benzoil- β -D-galactopiranososa (Gallo-Rodriguez *et al.*, 1998) (1,67 g, 2,36 mmol) en Cl_2CH_2 anhidro (6 ml) a 0 °C, se le agregó SnCl_4 (0,27 ml, 2,31 mmol) bajo atmósfera de argón. Luego de 15 minutos de agitación, se agregó bencil 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido **57** (0,60 g, 1,42 mmol), CH_3CN anhidro (0,6 ml) y se continuó la agitación durante 16 h a temperatura ambiente. La ccd mostró un compuesto mayoritario con R_f 0,69 (15% CH_3OH en CH_2Cl_2), algunos compuestos de menor polaridad y material de partida remanente. La mezcla se diluyó con Cl_2CH_2 (40 ml) y se volcó con agitación sobre solución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase acuosa se extrajo con Cl_2CH_2 (2 x 50 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua hasta pH 7, se secaron con MgSO_4 , se filtraron y finalmente concentraron bajo presión reducida. El producto se purificó por columna cromatográfica (sílica gel; tolueno:EtOAc 1:15) para dar el compuesto **58** (731 mg, 42,4%), p.f 118-120 °C; $[\alpha]_D^{25} +86,8^\circ$ (c1, CHCl_3).

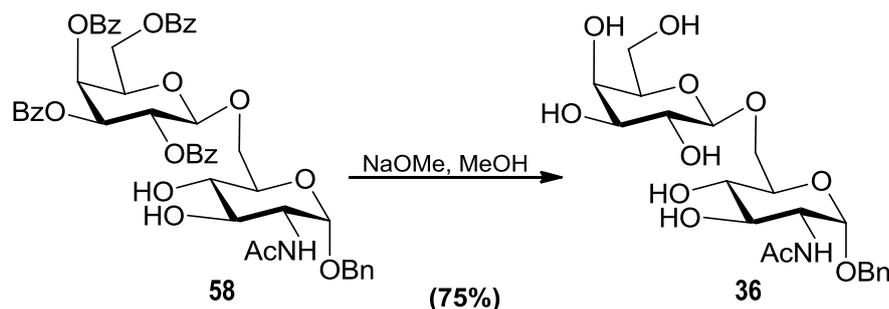
RMN ^1H (CDCl_3): δ 8,05-7,2 (m, 25 H, aromáticos), 6,0 (dd, 1H, $J_{3',4'} = 3,5$ Hz, $J_{4',5'} = 1$ Hz, H-4'), 5,91 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, NH), 5,85 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 10,5$ Hz, $J_{1',2'} = 7,8$ Hz, H-2'), 5,64 (dd, 1H, H-3'), 4,93 (d, 1H, H-1'), 4,7 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,5$ Hz, H-1), 4,67, 4,42 (2dd, 2H, $J_{6'a,6'b} = 11,5$ Hz, $J_{6'a,5'} = 6,5$ Hz, $J_{6'b,5'} = 6,5$ Hz, H-6'a, H-6'b), 4,57, 4,19

(2d, 2H, $J= 11,7$ Hz, CH_2Ph), 4.35 (ddd, 1H, H-5'), 4.27 (dd, 1H, $J_{5,6a}= 8,5$ Hz, $J_{6a,6b}= 11,5$ Hz, H-6a), 3,88 (ddd, 1H, $J_{4,5}= 9$ Hz, $J_{5,6b}= 4$ Hz, H-5), 3,83-3,77 (2dd, 2 H, H-2, H-6), 3,58 (dd, 1H, $J_{2,3}= 10,2$, $J_{3,4}= 9$ Hz, H-3), 3,39 (dd, 1H, H-4), 1,90 (s, 3H, CH_3).

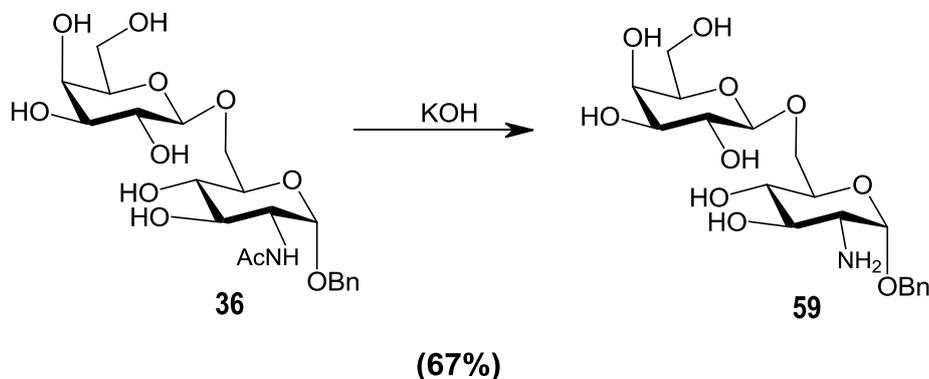
RMN ^{13}C ($CDCl_3$): δ 172,1 (CONH), 166,1-165,3 (PhCO), 136-128 (aromáticos), 102,4 (C-1'), 96,2 (C-1), 74,3 (C-3), 71,5-71,4 (C-4, C-3', C-5'), 70,5 (C-5), 69,8 (C-2'), 69,6 (C-6), 69,2 (CH_2Ph), 68,1 (C-4'), 61,9 (C-6'), 53,6 (C-2), 23,1 (CH_3CO).

Anal. Calcd. para $C_{49}H_{47}NO_{15}$: C, 66,13; H, 5,32; N, 1,57, encontrado: C, 65,74; H, 5,31; N, 1,68. ESI-TOF MS m/z : calcd. para $[M+H]^+$: 890,3018, encontrado: 890,3036. Calcd. para $[M+Na]^+$: 912,2838, encontrado: 912,2847.

Bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (36).



A una solución del compuesto **58** (731 mg, 0,82 mmol) en MeOH anhidro (10 ml) a 0 °C, se le agregó 0,5 M de NaOMe en MeOH (10 ml). Luego de agitar por 1 h a 0 °C y 2 h a temperatura ambiente, la ccd mostró un compuesto más polar que **58** (R_f 0,07, 15% CH_3OH en CH_2Cl_2). La solución se paso a través de una columna Amberlite IR 120 (plus) H^+ y se eluyó con MeOH. Se evaporó el solvente y el metil benzoato se removió por co-evaporaciones sucesivas con agua, para dar 291 mg de **36** como un sólido blanco (75 % de rendimiento). El producto recristalizado de EtOH dió p.f 234-235 °C. Las constantes físicas y los espectros fueron idénticos a los informados previamente (Gallo-Rodriguez *et al.*, 1998).

Bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (59).

El compuesto **36** (203 mg, 0,43 mmol) se disolvió en 1,2 ml de 1M KOH y se calentó a 100 °C durante 16 h. Pasado este tiempo, la ccd mostró la desaparición del compuesto de partida **36** y la aparición del compuesto **59** (R_f 0,36, n-PrOH:EtOH:H₂O, 7:1:2). La solución se pasó por una columna (1,5 cm x 6 cm) conteniendo resina Amberlite IR 120 (plus) H⁺ y se eluyó con 0,1 N de HCl para dar 110 mg de **59** (0,29 mmol, 67%). $[\alpha]_D^{+45,4^\circ}$ (c1, H₂O).

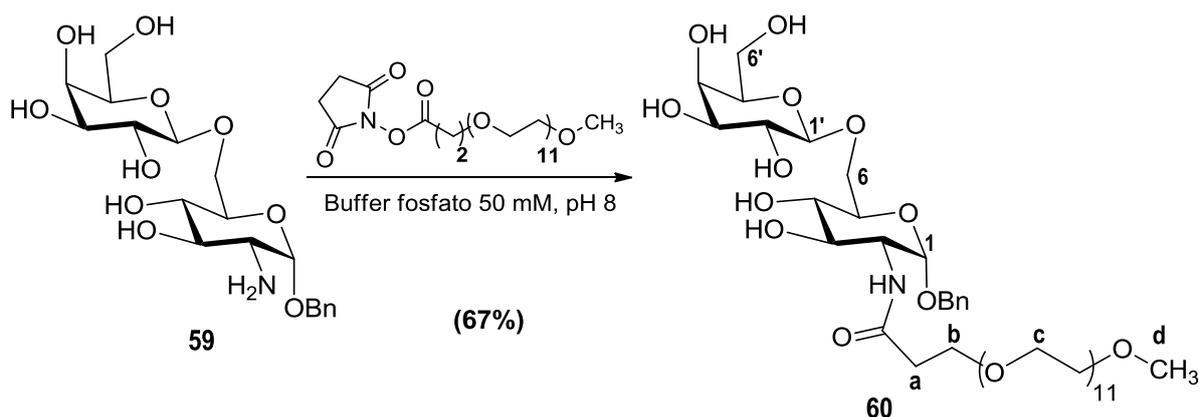
RMN ¹H (D₂O): δ 7,47 (m, 5H, aromáticos), 5,24 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 3,7 Hz, H-1), 4,81, 4,66 (2d, 2H, J =11,6 Hz, CH₂Ph), 4,43 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 7,9 Hz, H-1'), 4,10 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ =11,2 Hz, $J_{5,6a}$ = 1,7 Hz, H-6a), 3,93 (dd, 1H, $J_{4',5'}$ = 0,7 Hz, $J_{3',4'}$ =3,5 Hz, H-4'), 3,89 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 10,5 Hz, $J_{3,4}$ = 9,1 Hz, H-3), 3,89 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ = 4,3 Hz, H-6b), 3,87 (ddd, 1H, $J_{4,5}$ = 9,5 Hz, H-5), 3,79 (dd, 1H, $J_{5',6'a}$ = 7,9 Hz, $J_{6'a,6'b}$ = 11,7 Hz, H-6'a), 3,75 (dd, 1H, $J_{5',6'b}$ = 4,3 Hz, H-6'b), 3,69 (ddd, 1H, H-5'), 3,66 (dd, 1H, $J_{2',3'}$ = 10,0 Hz, H-3'), 3,64 (dd, 1H, H-4), 3,56 (dd, 1H, H-2'), 3,37 (dd, 1H, H-2).

RMN ¹³C (D₂O): δ 136,4,128,7, 128,6.128,5 (aromáticos), 103,3 (C-1'), 94,5 (C-1), 75,1 (C-5'), 72,7 (C-3'), 71,2 (C-5), 70,7 (C-2'), 70,0 (CH₂Ph), 69,8 (C-3), 69,1 (C-4), 68,6 (C-4'), 67,8 (C-6), 60,9 (C-6'), 53,8 (C-2).

ESI-TOF MS m/z: calcd para [M+H]⁺: 432,1864 encontrado: 432,1863. Calcd para [M+Na]⁺: 454, 1684 encontrado: 454,1677.

Conjugados con PEG lineales:**PEGilación del compuesto 59:**

Bencil β-D-galactopiranosil-(1→6)-2-CH₃O-PEG₆₈₅amido-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (60).



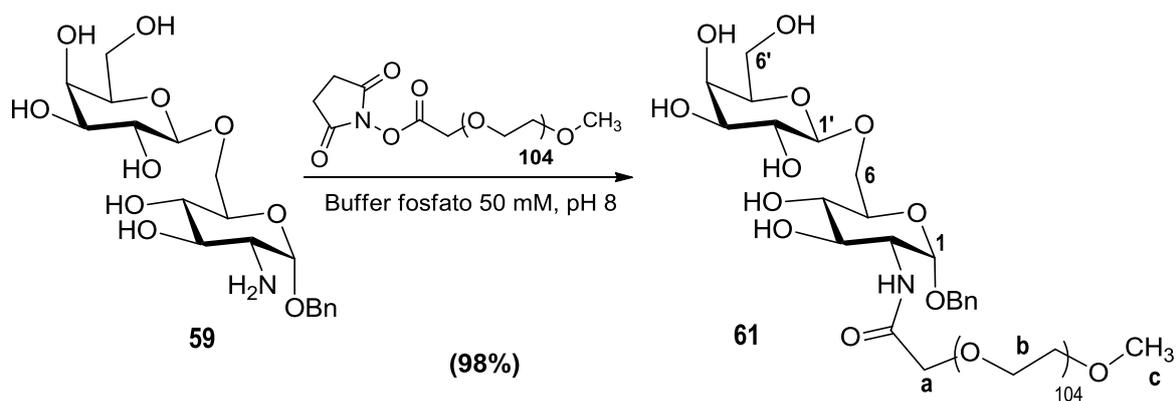
Una solución de β-D-galactopiranosil-(1→6)-2-amino-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (**59**, 38 mg, 0,09 mmol) y CH₃O-PEG₆₈₅-NHS ester (50 mg, 0,07 mmol) en 1 ml de buffer fosfato (50 mM, pH 8) se dejó a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se monitoreó por ccd y el conjugado **61** (R_f 0,33, EtOH:H₂O:NH₄OH(c), 9:1: 0,15) se detectó como una mancha negra cuando se reveló con el reactivo de ácido sulfúrico. El PEG sin derivatizar no revela con este reactivo y el exceso de **59** aparece con un R_f 0,51. El producto se purificó pasando la mezcla por una columna RP-18 (2g) y el exceso del compuesto **59** y las sales eluyeron con agua mientras que **60** eluyó con MeOH. Una vez evaporado el solvente y posterior disolución en agua y liofilización, el conjugado **60** se obtuvo como un polvo blanco (59 mg, 67%).

RMN ¹H (D₂O): δ 7,44 (m, 5 H, aromáticos), 4,95 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 3,6 Hz, H-1), 4,79 y 4,55 (d, 2H, J = 12 Hz, CH₂Ph), 4,43 (d, 1H, $J_{1',2'}$ = 7,8 Hz, H-1'), 4,15 (d, 1H, J = 9,6 Hz, H-6), 3,96-3,88 (m, 5H, protones del azúcar), 3,72-3,56 (m, 63 H, b, c y protones del azúcar), 3,37 (s, 3H, d), 2,52 (dt, 2H, J = 1,7 Hz, J = 6 Hz, a).

RMN ¹³C (D₂O): δ 174,2 (CO), 137,0, 128,7, 128,4 (aromáticos), 103,4 (C-1'), 96,1 (C-1), 75,1, 72,7, 71,1, 71,0, 70,7, 68,6, 68,3, 66,6, 61,0, (carbonos del azúcar), 70,8 y 69,6 (b y c), 58,0 (d), 53,6 (C-2), 35,8 (a).

MALDI-TOF MS m/z: calcd para $[M (12 \text{ oxietilenos}) + Na]^+$: 1024,4941; encontrado: 1024,4953.

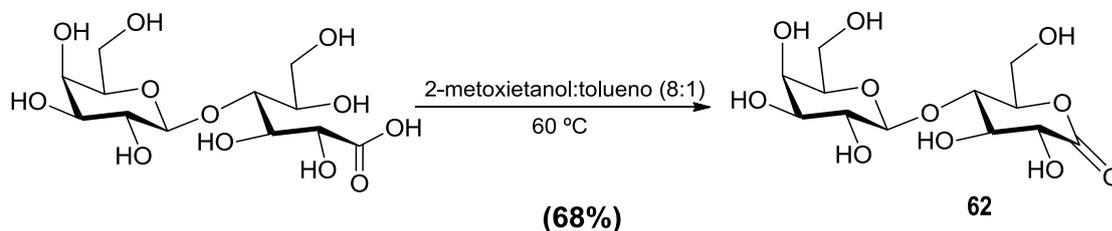
Bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-CH₃O-PEG₅₀₀₀ amido-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (61).



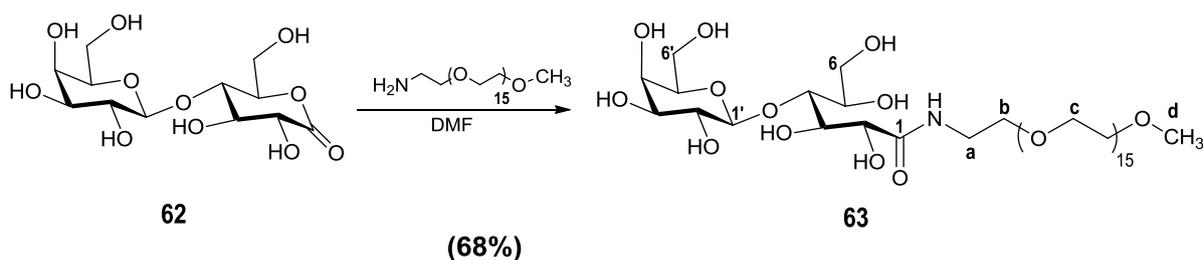
El compuesto **59** (26 mg, 0,04 mmol) se conjugó con el ester CH₃O-PEG₅₀₀₀-NHS (150 mg, 0,024 mmol) siguiendo el mismo procedimiento que para el compuesto **60**. Luego de 24 h, el análisis por ccd y posterior revelado con reactivo de ácido sulfúrico mostró un producto cercano al lugar de siembra. El PEG original no revela con este reactivo. El exceso de disacárido y las sales se removieron por diálisis contra agua (cut off 3500). La solución se seco por liofilización y el conjugado **61** (148 mg, 97%) se obtuvo como un polvo blanco.

RMN ¹H (D₂O): δ 7,44 (m, aromáticos), 4,98 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,7$ Hz, H-1), 4,79 y 4,57 (d, 2H, $J = 11,8$ Hz, CH₂Ph), 4,45 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7,8$ Hz, H-1'), 4,17 (d, 1 H, $J = 9,5$ Hz, H-6), 4,09-3,9 (m, protones del azúcar y a); 3,87-3,56 (m, b); 3,39 (s, c).

ESI-TOF MS m/z: calcd para $[M (104 \text{ oxietilenos}) + NH_4]^+$: 5099; encontrados M_n 4992,95, M_w 5007,41, M_p 5097, IPD: 0,98.

PEGilación de lactobiono-1,5-lactona:**Lactobiono-1,5-lactona (62).**

Se siguió el método descrito por Isbell, *et al.*, con algunas modificaciones (Isbell *et al.*, 1963). Se disolvió el ácido lactobiónico (2 gr, 5,59 mmol) en 12 ml de una solución de 2-metoxietanol-tolueno (8:1) y la solución resultante se concentró al vacío a 60 °C. El agregado de solvente y posterior evaporación con calentamiento se repitió 3 veces. El análisis por ccd mostró la desaparición del ácido lactobiónico, R_f 0,38, y la formación de la lactona **62** (R_f 0,78, EtOH:H₂O:HAcO, 60:25:15). El jarabe obtenido se purificó por recristalización de una mezcla de 2-metoxietanol y diisopropileter (5:1) para dar un polvo blanco (1,35 gr, 68,4%). IR (CO): 1741 cm⁻¹

Síntesis de N-(CH₃O-PEG₇₅₀)-lactobionamida (63).

La lactobionolactona **62** (100 mg, 0,29 mmol) y CH₃O-PEG₇₅₀-NH₂ (300 mg, 0,4 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (1,5 ml) bajo atmósfera de argón y la reacción se calentó a 120 °C durante 6 h. Se monitoreó por ccd, detectando la desaparición del PEGamino con el reactivo de ninhidrina y la aparición del conjugado **63** con el reactivo de ácido sulfúrico (R_f 0,35, EtOH:H₂O:HAcO, 80:5:15). El exceso de CH₃O-PEG₇₅₀-NH₂ se removió pasando la reacción por una columna de intercambio catiónico. El producto

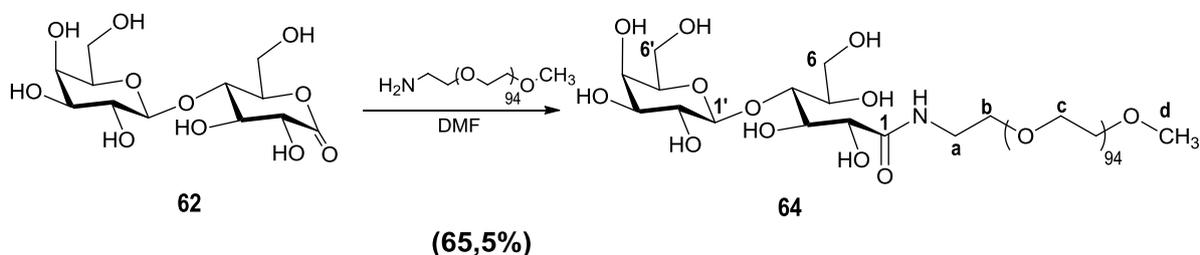
se eluyó con agua y posteriormente se purificó por cromatografía de exclusión en Sephadex G10 (1.5 cm x 7 cm) eluyendo con agua. El conjugado se recuperó de los primeros 40 ml. Luego de liofilizar, el compuesto **63** se obtuvo como un polvo blanco (209 mg, 66%). IR (C=O) 1654 cm^{-1} .

RMN ^1H (D_2O): δ 4,55 (d, 1 H, $J_{1,2}= 7,8$ Hz, H-1'), 4,42 (d, 1 H, $J_{2,3}= 2,75$ Hz, H-2), 4,19 (m, 1 H, H-3), 3,98 (dd, 1H, $J= 4,15$ Hz, $J= 6,45$ Hz, H-4), 3,95-3,74 (m, protones del azúcar), 3,73-3,6 (m, 88 H, c), 3,56 (dd, 2H, $J= 8$ Hz, $J= 9,7$ Hz, b), 3,47 (m, 2 H, a), 3,38 (s, 3H, d).

RMN ^{13}C (D_2O): δ 174,4 (C-1), 103,5 (C-1'), 81,0, 75,3, 72,5, 72,4, 71,4, 70,4, 68,8, 68,6, 61,9, 61,0 (carbonos del azúcar), 71,0, 69,6 (b y c), 58,0 (d), 38,6 (a).

MALDI-TOF MS m/z: calcd. para $[\text{M} (16 \text{ oxietilenos}) + \text{Na}]^+$: 1098,55; encontrados: M_n 1130,90, M_w 1143,0, M_p 1098,55, IPD: 1,04.

Síntesis de *N*-($\text{CH}_3\text{O-PEG}_{5000}$)-lactobionamida (**64**).



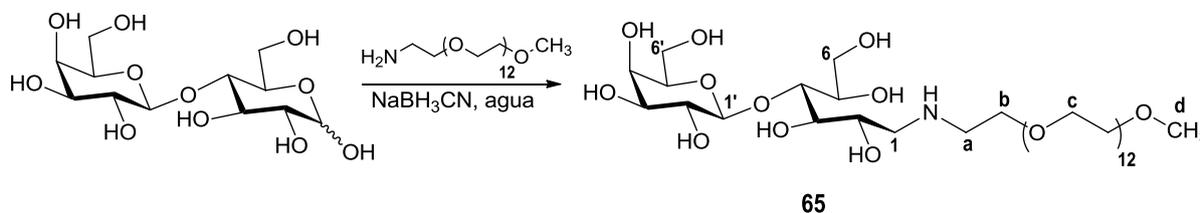
La lactobionolactona **62** (40,8 mg, 0,12 mmol) y el $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{5000}\text{-NH}_2$ (200 mg, 0,04mmol) se disolvieron en DMF anhidro (2 ml) bajo atmósfera de argón y la mezcla de reacción se calentó a 100 $^\circ\text{C}$ durante 15 h. Pasado este tiempo, el análisis por ccd y posterior revelado con el reactivo de ninhidrina mostró la desaparición del PEGamino de partida y el revelado con reactivo de ácido sulfúrico mostró la aparición de un producto en el lugar de siembra. La solución se dializó contra agua (cut-off 3500), se concentró y se pasó por resina de intercambio catiónico para remover posibles residuos de PEGamino sin derivatizar. Posterior liofilización dio como resultado el compuesto **64** como un polvo blanco (136 mg, 65,5%). IR (C=O) 1672 cm^{-1} .

RMN ^1H (D_2O): δ 4,55 (d, 1H, $J_{1',2'} = 7,8$ Hz, H-1'); 4,41 (d, 1 H, $J_{2,3} = 2,75$ Hz, H-2), 4,36 (m, 1 H, protón del azúcar), 4,19 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 4$ Hz, H-3), 4,0-3,88 (m, 6 H, protones del azúcar), 3,88-3,5 (m, b y c), 3,44 (m, a), 3,38 (s, d).

ESI-TOF MS m/z: calcd. para $[\text{M} (95 \text{ oxietilenos}) + \text{NH}_4]^+$: 4569; encontrados M_n 4586,6, M_w 4611,5, M_p 4569, IPD: 1,01.

PEGilación de la lactosa por aminación reductiva:

Síntesis del 1-amino-($\text{CH}_3\text{O-PEG}_{750}$)-lactitol (**65**).



(71%)

La lactosa (100 mg, 0,3 mmol) y $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{750}\text{-NH}_2$ (75 mg, 0,1 mmol) se disolvieron en 3 ml de agua, el pH se ajustó a 8 con 10% de ácido acético y se agregó NaBH_3CN (30 mg, 0,5 mmol). La reacción se dejó a 50°C durante 96 h y se monitoreó por ccd la cual mostró la desaparición del $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{750}\text{-NH}_2$ con el reactivo de ninhidrina mientras que el conjugado **65** se detectó con el reactivo de ácido sulfúrico (R_f 0,16, $\text{EtOH:H}_2\text{O}$, 8:2). El solvente se evaporó al vacío, el ácido bórico se removió por sucesivas co-evaporaciones con MeOH y finalmente el producto se purificó por cromatografía de intercambio catiónico. El exceso de lactosa eluyó con agua mientras que el compuesto **65** con HCl 0,5 N. Posterior liofilización dio un polvo blanco (78 mg, 71,3%).

RMN ^1H (D_2O): δ 4,54 (d, 1 H, $J_{1',2'} = 8$ Hz, H-1'), 4,25 (m, 1 H, H-4), 3,97-3,77 (m, 10 H, protones del azúcar), 3,76-3,64 (m, 60 H, c), 3,59-3,56 (dd, 2 H, b), 3,44-3,31 (m, 3 H, a y H-6), 3,40 (s, 3 H, d), 3,23 y 3,03 (m, 2 H, H-1).

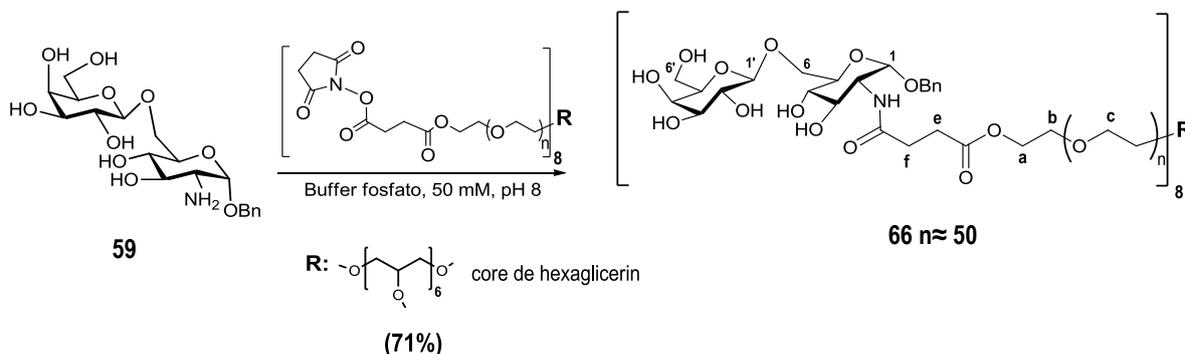
RMN ^{13}C (D_2O): δ 102,8 (C-1'), 78,6, 75,3, 72,4, 70,9, 70,4, 68,7, 67,7, 65,3, 61,9, 61,2 (carbonos del azúcar), 71,0, 69,6, 69,4 (b y c), 58,1 (d), 49,6 (C-1), 47,2 (a).

ESI-TOF MS m/z: calcd. para $[\text{M} (13 \text{ oxietilenos}) + \text{Na}]^+$: 952,49; encontrados M_n 980,46, M_w 985,91, M_p 952,49, IPD: 1,03.

Conjugación con PEG multibrazos:

Conjugación del bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (59) con 8-brazos-SSPEG 20kDa.

Obtención de 66.



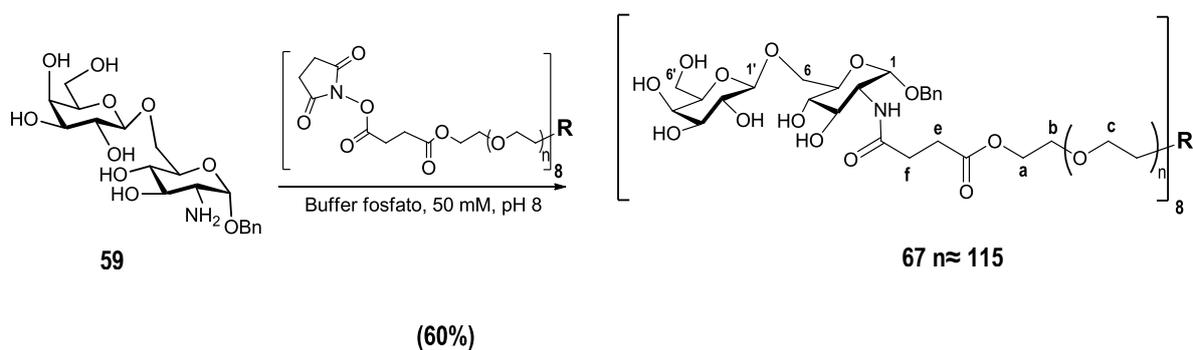
El compuesto **59** (35 mg, 0,08 mmol) se conjugó con el ester 8-brazos-SSPEG 20 kDa (100 mg, 0,005 mmol) en 1,5 ml de buffer fosfato (50 mM, pH 8) a temperatura ambiente. Luego de 24 h, el análisis por ccd mostró un producto cercano al lugar de siembra. El exceso de disacárido y las sales se removieron por diálisis contra agua (cut off 3500). La solución se seco por liofilización y el compuesto **66** (81 mg, 70,8 %) se obtuvo como un polvo blanco.

RMN ^1H (D_2O): δ 7,46 (m, 5 H, aromáticos), 4,94 (d, 1H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 4,80 y 4,58 (d, $J = 12$ Hz, CH_2Ph), 4,45 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1'), 4,27 (m, 2 H, a), 4,17 (d, 1 H, $J = 9,6$ Hz, H-6), 3,96-3,90 (m, 4 H, protones del azúcar), 3,88-3,55 (m, b, c, R y protones del azúcar), 2,63 (m, 2 H, e), 2,52 (m, 2 H, f).

RMN ^{13}C (D_2O): δ 174,72 (d), 174,71 (g), 137,0, 128,7, 128,5 (aromáticos), 103,4 (C-1'), 96,0 (C-1), 75,1, 72,7, 70,8, 69,8, 69,7, 68,7, 68,4, 64,0, 61,0 (a, b, c, R, CH_2Ph y carbonos del azúcar), 53,6 (C-2), 30,1 (f), 29,3 (e).

El peso molecular calculado de acuerdo al certificado del proveedor para el PEG de partida es: M_w 22732, encontrados por RMN ^1H M_n 27204, encontrados por SEC: M_n 17250, M_w 19693, M_p 17069, IPD: 1,14.

Conjugación del bencil β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2-amino-2-deoxi- α -D-glucopiranosido (59) con 8-brazos-SSPEG 40kDa. Obtención de 67.

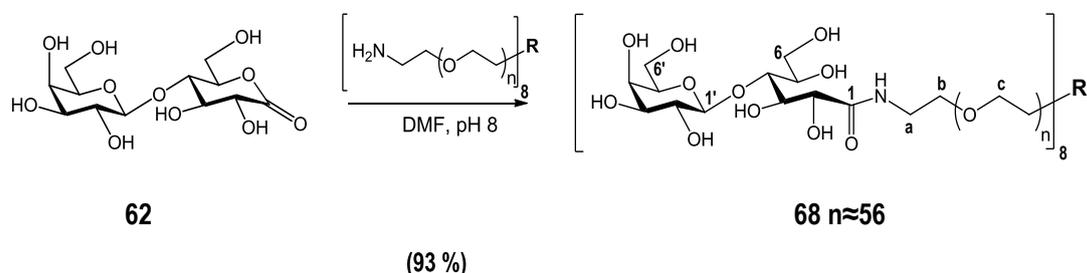


El compuesto **59** (40 mg, 0,093 mmol) se conjugó con el ester 8-brazos-SSPEG 40 kDa (200 mg, 0,0047 mmol) en 1,5 ml de buffer fosfato (50 mM, pH 8) a temperatura ambiente. Luego de 24 h, el análisis por ccd mostró un producto cercano al lugar de siembra. El exceso de disacárido y las sales se removieron por diálisis contra agua (cut off 3500). La solución se seco por liofilización y el compuesto **67** (130,5 mg, 60 %) se obtuvo como un polvo blanco.

RMN ^1H (D_2O): δ 7,46 (m, 5 H, aromáticos), 4,94 (d, 1 H, $J_{1,2} = 3,6$ Hz, H-1), 4,80 y 4,58 (d, $J = 12$ Hz, CH_2Ph), 4,45 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1'), 4,27 (m, 2 H, a), 4,17 (d, 1 H, $J = 9,5$ Hz, H-6), 3,96-3,90 (m, 4 H, protones del azúcar), 3,88-3,55 (m, b, c, R y protones del azúcar), 2,63 (m, 2 H, e), 2,55 (m, 2 H, f).

El peso molecular calculado de acuerdo al certificado del proveedor para el PEG de partida es: M_w 45208, encontrados por RMN ^1H M_n 57080, encontrados por SEC: M_n 27746, M_w 30582, M_p 27005, IPD: 1,10.

Conjugación de lactobiono 1,5-lactona (62) con 8-brazos-NH₂PEG 20kDa. Obtención de 68.



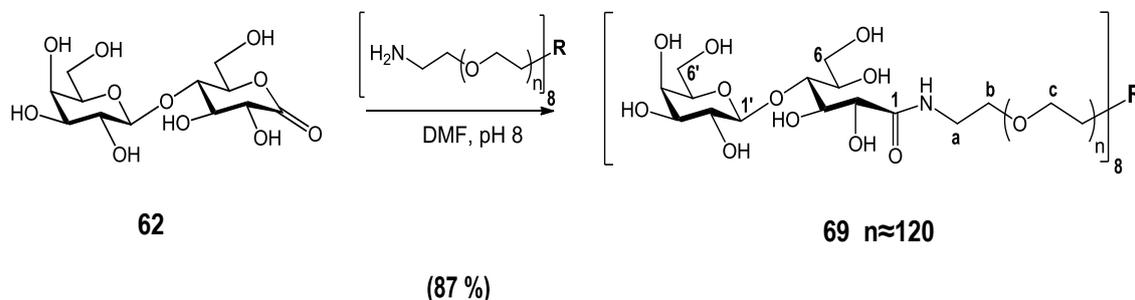
La lactobiono 1,5-lactona **62** (80 mg, 0,24 mmol) y el 8-brazos-NH₂PEG 20 kDa (100 mg, 0,0048 mmol) se disolvieron en DMF anhidra (2 ml) bajo atmósfera de argón. Se llevó a pH 8 con TEA (10 µl) y la mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 6 h. Pasado este tiempo, la ccd y posterior revelado con el reactivo de ninhidrina mostró la desaparición del PEG de partida y la aparición de un producto cercano al lugar de siembra cuando este se reveló con reactivo de ácido sulfúrico. La solución se dializó contra agua (cut-off 3500) y la posterior liofilización dio como resultado el conjugado **68** como un polvo blanco (105,7 mg, 93,3 %).

RMN ¹H (D₂O): δ 4,54 (d, 1 H, $J_{1',2'}=7,8$ Hz, H-1'), 4,40 (d, 1 H, $J_{2,3}=2,7$ Hz, H-2), 4,17 (m, 1 H, H-3), 3,96 (dd, 1 H, $J=4,0$ Hz, $J=6,5$ Hz, H-4), 3,93-3,88 (m, 1 H, protones del azúcar), 3,88-3,52 (m, b, c, R y protones del azúcar), 3,48 y 3,41 (m, 2 H, a).

RMN ¹³C (D₂O): δ 174,4 (C-1), 103,5 (C-1'), 81,0, 75,3, 72,4, 72,3, 71,4, 71,0, 70,4, 69,6, 69,4, 68,8, 68,6, 68,5, 61,9, 61,0 (carbonos del azúcar), 38,6 (a).

El peso molecular calculado de acuerdo al certificado del proveedor para el PEG de partida es: M_w 23256, encontrados por RMN ¹H M_n 24536, encontrados por SEC: M_n 10924, M_w 12668, M_p 12203, IPD: 1,16.

Conjugación de lactobiono 1,5-lactona (62**) con 8-brazos-NH₂PEG 40kDa. Obtención de **69**.**



La lactobiono 1,5-lactona **62** (80 mg, 0,24 mmol) fue disuelta en DMF anhidra (1 ml) bajo atmósfera de argón y se agregó 60 mg de 8-brazos-NH₂PEG 40kDa (60 mg, 0,0014 mmol) en dos veces con diferencia de 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 6 h. Pasado este tiempo, la ccd y posterior revelado con el reactivo de ninhidrina mostró la desaparición del PEG de partida y la aparición de un producto cercano al lugar de siembra cuando se reveló con reactivo de H₂SO₄/etanol. La solución se dializó contra agua (cut-off 3500) y la posterior liofilización dio como resultado el conjugado **69** como un polvo blanco (55,7 mg, 87,3 %).

RMN ¹H (D₂O): δ 4,57 (d, 1 H, $J_{1,2} = 7,8$ Hz, H-1'), 4,43 (d, 1 H, $J_{2,3} = 2,7$ Hz, H-2), 4,21 (m, 1 H, H-3), 4,0 (m, 1 H, H-4), 3,99-3,90 (m, 3 H, protones del azúcar), 3,90-3,55 (m, b, c, R y protones del azúcar), 3,50 y 3,46 (m, 2 H, a).

El peso molecular calculado de acuerdo al certificado del proveedor para el PEG de partida es: M_w 45400, encontrados por RMN ¹H M_n 54940, encontrados por SEC: M_n 21989, M_w 25836, M_p 29164, IPD: 1,18.

Ensayos de estabilidad de los PEG-conjugados en sangre y orina.

Se inyectaron por vía intravenosa 200 μ l de PBS estéril conteniendo 30 mg (29,5 mM) del compuesto **61**, 28 mg (29,5 mM) del ester CH₃O-PEG₅₀₀₀-NHS, 44 mg (50 mM) del compuesto **64**, 40 mg (50 mM) de CH₃O-PEG₅₀₀₀-NH₂, 30 mg (3,32 mM) del compuesto **69** ó 30 mg (3,5 mM) de 8-brazos-SSPEG 40kDa en ratones adultos (cepa C3H). Se extrajo sangre de la cola a diferentes tiempos y se analizó la presencia de

PEG libre ó conjugado en suero y en orina colectada 30 minutos luego de la inyección en el caso de los PEG lineales mientras que para los PEG multibrazos se analizaron muestras de orina a distintos tiempos.

Para analizar los PEG lineales en sangre y orina se adaptó un test colorimétrico descrito anteriormente por Nag, *et al.* (Nag *et al.*, 1996). Se agitaron vigorosamente 10 μ l de suero, 0.5 ml de CHCl_3 y 0,5 ml de reactivo de ferrotiocianato (preparado disolviendo 16,2 g cloruro férrico anhidro (FeCl_3) y 30,4 g tiocianato de amonio (NH_4SCN) en 1 L de agua) durante 30 min y luego se centrifugó a 5000 rpm durante 2 min. El $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ forma un complejo con las cadenas de PEG que absorbe a 510 nm. Se midieron las absorbancias de las fases clorofórmicas. Se utilizó el ester $\text{CH}_3\text{O-PEG}_{5000}\text{-NHS}$ para obtener la curva de calibración.

Para el caso de los PEG multibrazos en sangre y en orina se adaptó un test colorimétrico descrito por Sims, *et al.* (Sims *et al.*, 1980) y luego utilizado para análisis de interferón PEGilado (Ramon *et al.*, 2005). Se agitaron vigorosamente 2 μ l de suero, 998 μ l de agua, 0,5 ml de solución de 5 % de BaCl_2 en 1 M HCl y 0,5 ml de solución 0,1 N I_2/IK durante 15 min. El BaI forma un complejo con las cadenas de polietilenglicol que absorbe a 535 nm. La absorbancia fue determinada utilizando un espectrofotómetro Jenway 6505 UV/Vis. Se utilizó el ester 8-brazos-SSPEG 40kDa en 2 μ l de suero normal de ratón para obtener la curva de calibración.

Estudios de actividad para TcTS in vitro.

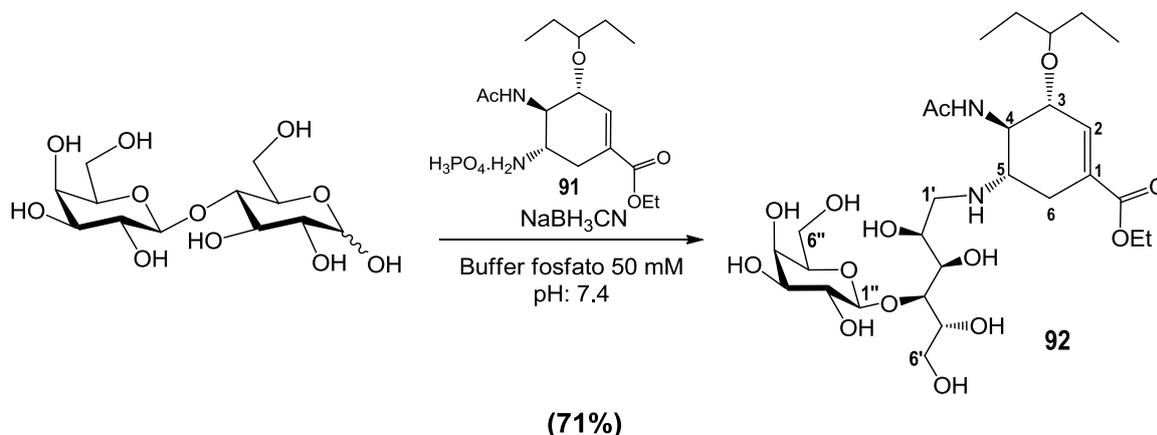
La actividad de la TcTS se midió analizando la transferencia de ácido siálico desde 1 mM of 3'-sialillactosa hacia 12 μ M [D-glucosa-1- ^{14}C] lactosa (55 mCi/mmol) por 0,5 ng de enzima TcTS purificada en 30 μ l de 20 mM Hepes-Na (pH 7,5), 0,2% BSA, 30 mM NaCl en presencia de concentraciones crecientes (0,2 a 2,0 mM) de los disacáridos **59**, ácido lactobiónico (**30**), lactitol (**31**) o los derivados PEGilados lineales. Se preincubaron durante 20 minutos con la enzima a temperatura ambiente antes del agregado de 1 mM de 3'-sialillactose y [D-glucosa-1- ^{14}C] lactosa. Para el caso de los PEG multibrazos, al presentar 8 unidades que pueden actuar como sustrato inhibidor las concentraciones fueron ajustadas (0,01 a 1,5 mM). Luego de 60 min a temperatura ambiente, se cortó la reacción diluyéndola con 1 ml de agua. Se agregó QAE-Sephadex (Amersham Pharmacia Biotech) y la resina se lavó dos veces con agua. Los compuestos cargados negativamente se eluyeron con 800 μ l de 1 M NaCl y se

cuantificaron en un contador de centelleo líquido WinSpectral 1414. La enzima se diluyó en buffer antes de su uso cuando fue necesario (0,5 ng de TcTS611/2 dió 4000 cpm por hora de compuesto sialilado). También se determinó la inhibición de TcTS por los PEGconjugados presentes en plasma preincubando 10 μ l del suero de ratones antes del agregado de la mezcla de reacción estandar.

Los resultados son expresados en porcentajes de inhibición de la actividad de TcTS. Se consideró como 0 % de inhibición (100% de actividad enzimática) la radioactividad medida cuando no se agregó inhibidor.

Síntesis de sustratos bifuncionales:

Síntesis de (3*R*, 4*R*, 5*S*) Etil 4-acetamido-*N*-(1'-desoxilactitol-1'-il)-5-amino-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxilato (**92**).



Se disolvieron la lactosa (170 mg, 0,5 mmol) y el fosfato de oseltamivir (**91**, 100 mg, 0,25 mmol) en 3 ml de buffer fosfato (50 mM, pH 7,4). Luego de una hora de agitación a temperatura ambiente, se agregó NaBH₃CN (50 mg, 0,8 mmol) y se dejó reaccionar a 80 ° C durante 6 h. La ccd (EtOH:H₂O:NH₄OH(c), 12:2:1) mostró la aparición de un compuesto (*R_f* 0,5) entre la lactosa (*R_f* 0,2) y el oseltamivir (*R_f* 0,72). Este último se detectó con luz UV mientras que el conjugado pudo ser detectado con luz UV y con el reactivo de ácido sulfúrico. Se evaporó la mezcla de reacción al vacío, el ácido bórico se removió por sucesivas coevaporaciones con metanol y el producto

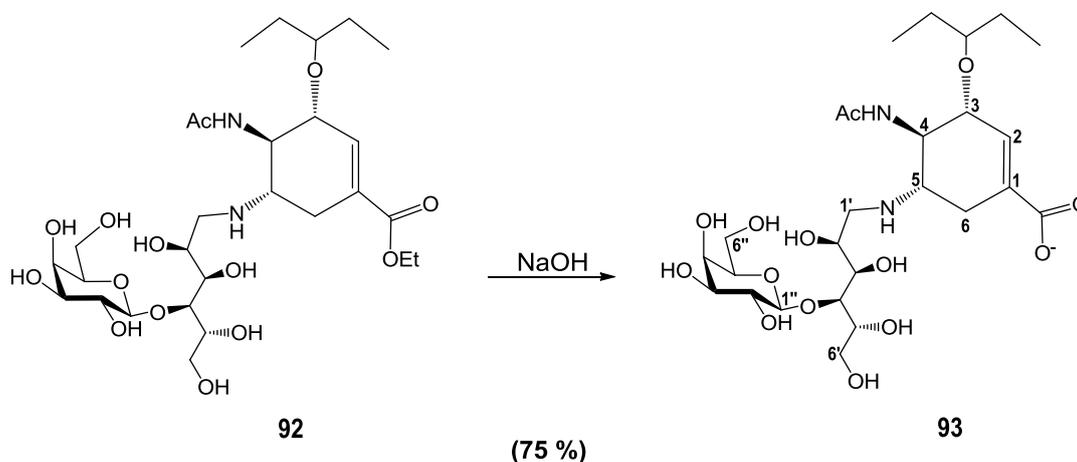
se purificó pasándolo por una columna de fase reversa RP-18 (5 g). El exceso de lactosa eluyó con agua y luego se pasó un gradiente de metanol 10 % a 60 %. El producto **92** eluyó con un 50 % de metanol y por evaporación del solvente se obtuvo un sólido blanco (116 mg, 72%). $[\alpha]_D -23$ (c 0,6, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) δ 6,80 (br s, 1H, H-2), 4,50 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 8$ Hz, H-1''), 4,24 (m, 3H, H-3 y CH₃CH₂OCO), 3,99 (m, 1H, H-2'), 3,96-3,67 (m, 10H, protones del azúcar y H-4), 3,65 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 10$ Hz, $J_{3'',4''} = 3,5$ Hz, H-3''), 3,54 (dd, 1H, $J = 10$ Hz, $J = 8$ Hz, H-2''), 3,53-3,48 (m, 1H, ((CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 2,96 (dd, 1H, $J_{1'a,1'b} = 12$ Hz, $J_{1'a,2'} = 2,5$ Hz, H-1'a), 2,91 (m, 1H, H-5), 2,84 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5$ Hz, $J_{6a,6b} = 17$ Hz, H-6a), 2,51 (dd, 1H, $J = 12$ Hz, $J_{1'b,2'} = 11$ Hz, H-1'b), 2,15 (m, 1H, H-6b), 2,08 (s, 3H, CH₃CONH), 1,55 (m, 3H, CH_{2x} y un CH_{2y} del 3-pentilo), 1,45 (m, 1H, CH_{2y} del 3-pentilo), 1,29 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH₃CH₂OCO), 0,89 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3x} del 3-pentilo), 0,84 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3y} del 3-pentilo).

RMN ¹³C (D₂O) δ 174,9 (CH₃CONH), 167,2 (CH₃CH₂OCO), 138,3 (C-2), 129,3 (C-1), 103,1 (C-1''), 84,4 ((CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 79,2 (C-4'), 76,4 (C-3), 75,7 (C-5''), 72,8 (C-3''), 71,4 (C-2''), 71,2 (C-3'), 70,9 (C-2'), 70,4 y 69,0 (C-5' y C-4''), 62,5 (CH₃CH₂OCO), 62,3 y 61,3 (C-6' y C-6''), 55,8 (C-5), 55,0 (C-4), 49,0 (C-1'), 29,3 (C-6), 25,7 (CH_{2x} del 3-pentilo), 25,3 (CH_{2y} del 3-pentilo), 22,6 (CH₃CONH), 13,6 (CH₃CH₂OCO), 8,9 (CH_{3x} del 3-pentilo), 8,7 (CH_{3y} del 3-pentilo).

ESI-TOF MS m/z: calcd para [M+H]⁺: 639,3340, encontrado: 639,3350. Calcd para [M+Na]⁺: 661,3160, encontrado: 661,3170.

Ácido (3R, 4R, 5S) 4-acetamido-N-(1'-desoxilactitol-1'-il)-5-amino-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxílico (93).



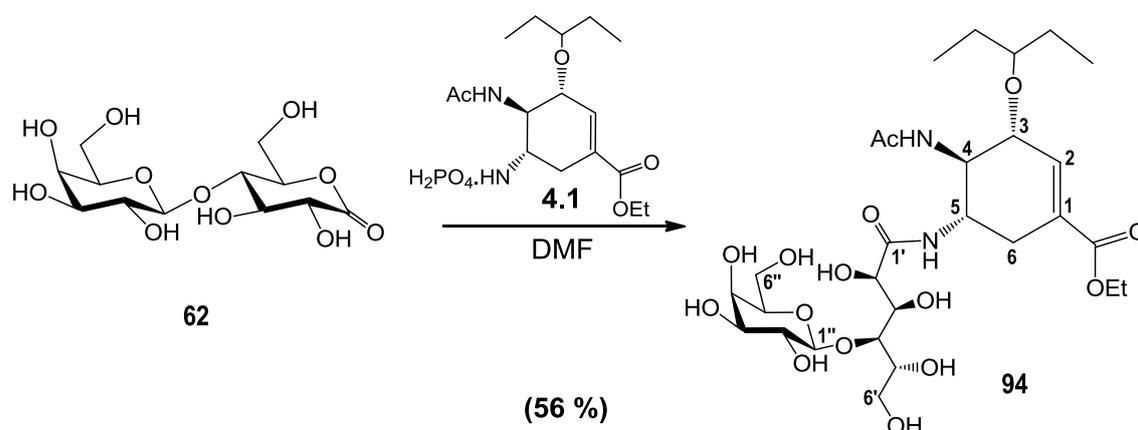
Se disolvió el compuesto **92** (28 mg) en 1M NaOH (1 ml) y se agitó durante 1 h a 30 °C. La reacción se monitoreó por ccd la cual mostro la hidrólisis completa del compuesto **92** para dar el ácido carboxílico **93** (R_f 0,32, EtOH:H₂O:NH₄OH(c), 12:2:1). El producto se purificó por resina catiónica AG 50W-X12 (Bio-Rad). Luego de lavar con agua, el compuesto eluyó con 0,1 M HCl. Por liofilización de las correspondientes fracciones se obtuvo 20 mg del compuesto **93** como un sólido blanco amorfo (75%). $[\alpha]_D -20$ (c 0,6, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) δ 6,86 (br s, 1H, H-2), 4,54 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 8$ Hz, H-1''), 4,35 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9$ Hz, $J_{3,2} < 1$, H-3), 4,21 (m, 1H, H-2'), 4,16 (dd, 1H, $J = 9$ Hz, $J_{4,5} = 12$ Hz, H-4), 3,95-3,68 (m, 10H, protones del azúcar y H-5), 3,66 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 10$ Hz, $J_{3'',4''} = 3,5$ Hz, H-3''), 3,55 (dd, 1H, $J = 8$ Hz, $J = 10$ Hz, H-2''), 3,55 (m, 1H, (CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 3,49 (dd, 1H, $J_{1'a,1'b} = 13$ Hz, $J_{1'a,2'} = 3,5$ Hz, H-1'a), 3,25 (dd, 1H, $J = 13$ Hz, $J_{1'b,2'} = 8,5$ Hz, H-1'b), 3,0 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5,5$ Hz, $J_{6a,6b} = 17$ Hz, H-6a), 2,6 (m, 1H, H-6b), 2,1 (s, 3H, CH₃CONH), 1,56 (m, 3H, CH_{2x} y un CH_{2y} del 3-pentilo), 1,48 (m, 1H, (CH_{2y} del 3-pentilo), 0,88 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3x} del 3-pentilo), 0,84 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3y} del 3-pentilo).

RMN ¹³C (D₂O) δ 175,3 (CH₃CONH), 169,3 (CO₂H), 137,6 (C-2), 127,8 (C-1), 102,9 (C-1''), 84,3 ((CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 79,0 (C-4'), 75,4 (C-5''), 75,1 (C-3), 72,4 (C-3''), 71,0 (C-2''), 70,8 (C-3'), 71,0 y 68,6 (C-4'' y C-5'), 67,7 (C-2'), 61,8 y 61,2 (C-6' y C-6''), 55,6 (C-5), 51,6 (C-4), 48,0 (C-1'), 26,1 (C-6), 25,4 (CH_{2x} del 3-pentilo), 25,0 (CH_{2y} del 3-pentilo), 22,4 (CH₃CONH), 8,5 (CH_{3x} y CH_{3y} del 3-pentilo).

ESI-TOF MS m/z: calcd para [M+H]⁺: 611,3027, encontrado: 611,3029. Calcd para [M+Na]⁺: 633,2847, encontrado: 633,2836.

Síntesis de (3*R*, 4*R*, 5*S*) Etil-4-acetamido-5-lactobionamido-3-(pentan-3-iloxi)-ciclohex-1-enocarboxilato (94).



La lactobiono 1,5-lactona se preparó a partir del ácido lactobiónico como se describió anteriormente (Isbell *et al.*, 1963). Se disolvieron la lactobiono 1,5-lactona (200 mg, 0,59 mmol) y el fosfato de oseltamivir (123 mg, 0,3 mmol) en DMF anhidra (1,5 ml) bajo atmósfera de argón y se agregó piridina hasta alcanzar un pH de 7. La mezcla se calentó a 120 °C y la reacción se monitoreo por ccd (nBuOH:H₂O:AcOH, 12:5:3). Luego de 6 h no se detectó la presencia de oseltamivir por UV (R_f 0,7) y el compuesto **94** se detectó además con el reactivo de ácido sulfúrico (R_f 0,5). Luego de evaporación del solvente el producto se purificó por cromatografía en fase reversa RP-18 (2 g). El exceso de lactobiono 1,5-lactona se eluyó con agua mientras que el compuesto **94** eluyó con 50 % metanol. Luego de la evaporación del solvente se obtuvo el compuesto **94** como un sólido blanco (110 mg, 56%). $[\alpha]_D$ -35 (c1, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) δ 6,81 (br s, 1H, H-2), 4,55 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7,5$ Hz, H-1''), 4,41 (d, 1H, $J_{2',3'} = 2,5$ Hz, H-2'), 4,33 (dd, 1H, $J_{3,4} = 9$ Hz, $J_{3,2} < 1$, H-3), 4,23 (dc, 2H, $J = 7$ Hz, 1,6 Hz, CH₃CH₂OCO), 4,17 (dd, 1H, $J = 2,5$ Hz, $J_{3',4'} = 4$ Hz, H-3'), 4,14 (m, 1H, H-5), 3,99-3,89 (m, 4H, H-4, H-4', H-4'' y H-5'), 3,86 (dd, 1H, $J_{5',6'a} = 3,5$ Hz, $J_{6'a,6'b} = 12$ Hz, H-6'a), 3,81-3,7 (m, 4H, H-6''a, H-6''b, H-5'' y H-6'b), 3,66 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 10$ Hz, $J_{3'',4''} = 3,5$ Hz, H-3''), 3,55 (dd, 1H, $J = 7,5$ Hz, 10 Hz, H-2''), 3,52 (m, 1H, (CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 2,75 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5,5$ Hz, $J_{6a,6b} = 17$ Hz, H-6a), 2,42 (m, 1H, H-6b), 1,99 (s, 3H, CH₃CONH), 1,56 (m, 3H, CH_{2x} y un CH_{2y} del 3-pentilo), 1,44 (m, 1H, CH_{2y} del 3-pentilo), 1,28 (t, 3H, $J = 7$ Hz, CH₃CH₂OCO), 0,89 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3x} del 3-pentilo), 0,83 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3y} del 3-pentilo).

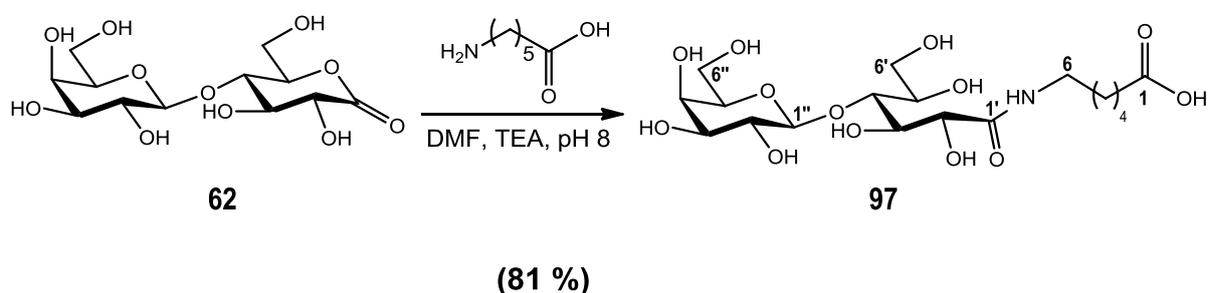
RMN ¹³C (D₂O) δ 175,4 (C-1'), 174,9 (CH₃CONH), 168,7 (CH₃CH₂OCO), 138,6 (C-2), 129,9 (C-1), 104,2 (C-1''), 85,0 ((CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 81,7 (C-4'), 76,7 (C-

Hz, H-2''), 3,51 (m, 1H, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{CH}$ del 3-pentilo), 2,70 (dd, 1H, $J_{5,6a} = 5,5$ Hz, $J_{6a,6b} = 17,5$ Hz, H-6a), 2,39 (m, 0,8H, H-6b para **95**), 2,31 (m, 0,2H, H-6b para **96**), 1,97 (s, 2,2H, CH_3CONH para **95**), 1,94 (s, 0,8H, CH_3CONH para **96**), 1,58-1,48 (m, 3H, CH_{2x} y un CH_{2y} del 3-pentilo), 1,43 (m, 1H, CH_{2y} del 3-pentilo), 0,87 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3x} del 3-pentilo), 0,81 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3y} del 3-pentilo).

RMN ^{13}C (D_2O) para el compuesto **95**, δ 174,7 (C-1'), 174,2 (CH_3CONH), 169,6 (CO_2H), 138,4 (C-2), 129,1 (C-1), 103,5 (C-1''), 84,3 ($(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{CH}$ del 3-pentilo), 81,0 (C-4'), 76,0 (C-3), 75,3 (C-5''), 72,3 (C-3'', C-2'), 71,0 (C-2''), 70,1 (C-3'), 71,3 (C-4''), 68,5 (C-5'), 61,9 y 61,0 (C-6' y C-6''), 53,8 (C-4), 47,5 (C-5), 30,0 (C-6), 25,5 (CH_{2x} del 3-pentilo), 25,1 (CH_{2y} del 3-pentilo), 22,2 (CH_3CONH), 8,5 (CH_{3x} y CH_{3y} del 3-pentilo).

ESI-TOF MS m/z: calcd para $[\text{M}+\text{H}]^+$: 625,2820, encontrado: 625,2839. Calcd para $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 647,2639, encontrado: 647,2676.

Síntesis del ácido ω -lactobionamidohexanoico (**97**).



A una solución de 100 mg (0,88 mmol) de ácido aminocaproico en 1,5 ml de DMF anhidro se agregó 40 μl TEA seguido de 403,5 mg (1,17 mmol) de lactobiono 1,5-lactona previamente secada en pistola, agitando durante 12 h a 90°C . Por ccd se observó la desaparición del ácido aminocaproico, el cual se detectaba con el reactivo de ninhidrina, indicando la finalización de la reacción. El producto se observó con el reactivo de H_2SO_4 (R_f 0,45, nPrOH:EtOH: H_2O , 7:1:2). Se evaporó la DMF a presión reducida, se disolvió en agua y se pasó por columna catiónica Amberlite IR-120 plus. El compuesto eluyó con agua mientras que posibles restos de ácido aminocaproico quedaron retenidos en la columna. El eluido se concentró y se paso por columna de fase reversa RP-18 (2 g) utilizando H_2O conteniendo 0,1% de TFA como fase móvil. El ácido lactobiónico eluyó entre las fracciones 10-20 mientras que el compuesto **97**

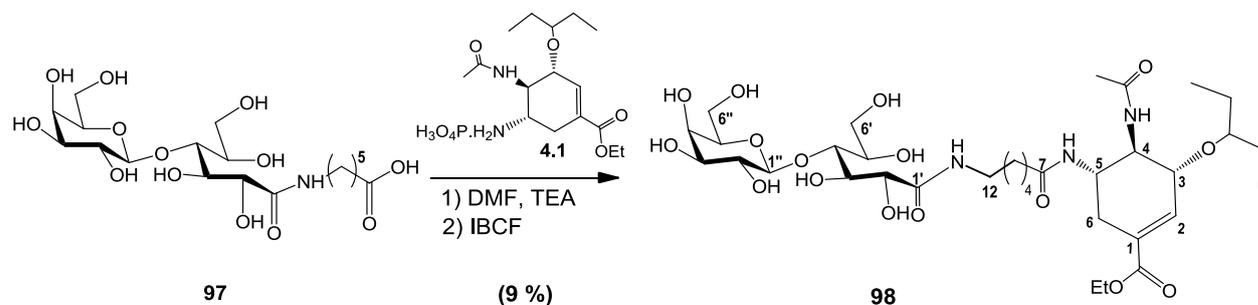
eluyó luego de la fracción 40. Se combinaron las fracciones y se llevó a seco dando 334,5 mg de un sólido blanco amorfo (80,6 % de rendimiento). $[\alpha]_D^{+25}$ (c 1, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) δ 4,46 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7,8$ Hz, H-1''), 4,29 (d, 1H, $J_{2',3'} = 3$ Hz, H-2'), 4,08 (dd, 1H, $J = 3$ Hz, $J_{3',4'} = 4$ Hz, H-3'), 3,88 (dd, 1H, $J = 4$ Hz, $J_{4',5'} = 6,6$ Hz, H-4'), 3,85-3,80 (m, 2H, H-5' y H-4''), 3,77 (dd, 1H, $J_{5'',6''a} = 3,3$ Hz, $J_{6''a,6''b} = 12$ Hz, H-6''a), 3,73-3,61 (m, 4H, H-6'a, H-6'b, H-5'' y H-6''b), 3,58 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 10$ Hz, $J_{3'',4''} = 3,4$ Hz, H-3''), 3,47 (dd, 1H, $J = 7,8$ Hz, $J = 10$ Hz, H-2''), 3,15 (m, 2 H, H-6), 2,30 (t, 2H, $J_{2,3} = 7,4$ Hz, H-2), 1,53 (ddd, 2H, H-3), 1,45 (m, 2H, H-5), 1,28 (m, 2H, H-4).

RMN ¹³C (D₂O) δ 180,5 (C-1), 175,3 (C-1'), 104,8 (C-1''), 82,3 (C-4'), 76,7 (C-5''), 73,8 (C-3''), 73,7 (C-2'), 72,8 (C-4''), 72,4 (C-2''), 71,7 (C-3'), 70,0 (C-5'), 63,3 (C-6''), 62,4 (C-6'), 40,3 y 39,2 (C-6), 35,1 y 35,0 (C-2), 29,4 y 29,2 (C-5), 26,8 (C-4), 25,3 y 25,2 (C-3).

ESI-TOF MS m/z: calcd para [M+H]⁺: 472,2030, encontrado: 472,2013, calcd para [M+Na]⁺: 494,1850, encontrado: 494,1841.

Conjugación del ácido ω -lactobionamidohexanoico con oseltamivir.



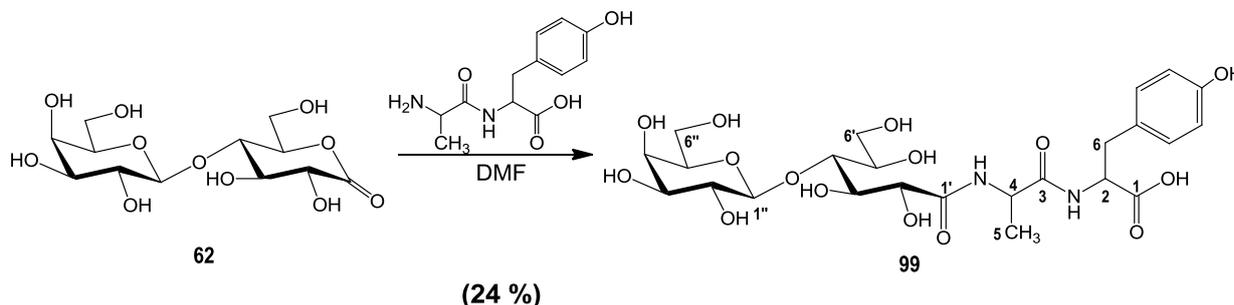
A una solución de 100 mg (0,21 mmol) del compuesto **97** en 0,5 ml de DMF anhidro, se agregó 15 μ l de TEA agitando durante 30 minutos. Luego se agregó 52 μ l (0,4 mmol) de IBCF, continuando la agitación por 3 horas. Las sales precipitadas de NH₄Cl se filtraron y el sobrenadante se agregó sobre una solución de 205 mg (0,5 mmol) de oseltamivir disuelto en 0,8 ml de DMF y 20 μ l de TEA. Se agitó durante 12 h a temperatura ambiente monitoreando la reacción por ccd la cual mostró la aparición del compuesto **98** (R_f 0,52, nPrOH:EtOH:H₂O, 8:1:1) además de los compuestos de partida. Se evaporó la DMF y se paso por columna de fase reversa RP-18 (0,5 g). El

compuesto **97** sin reaccionar eluyó con 30 ml de agua mientras que el producto de reacción **98** eluyó con 50 % MeOH. El exceso de oseltamivir se recuperó con 100 % de MeOH. Se combinaron las fracciones y se llevó a seco rindiendo 15 mg de un sólido blanco (9,3 %). $[\alpha]_D -23.8$ (c 0,7, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) δ 6,78 (bs, 1H, H-2), 4,53 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 7,8$ Hz, H-1''), 4,36 (d, 1H, $J_{2',3'} = 3$ Hz, H-2'), 4,28 (m, 1H, H-3), 4,22 (dc, 2H, $J = 7,2$ Hz, $J = 1,8$ Hz, CH₃CH₂OCO), 4,15 (dd, 1H, $J = 3,0$ Hz, $J_{3',4'} = 4$ Hz, H-3'), 4,08 (ddd, 1H, $J_{4,5} = 11$ Hz, $J_{5,6a} = 11$ Hz, $J_{5,6b} = 5,6$ Hz, H-5), 3,96 (dd, 1H, $J = 4$ Hz, $J_{4',5'} = 6,5$ Hz, H-4'), 3,92-3,88 (m, 3H, H-4'', H-5' y H-4), 3,84 (dd, 1H, $J_{5'',6''a} = 3,3$ Hz, $J_{6''a,6''b} = 12$ Hz, H-6''a), 3,79-3,67 (m, 4H, H-6'a, H-6'b, H-5'' y H-6''b), 3,65 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 10$ Hz, $J_{3'',4''} = 3,4$ Hz, H-3''), 3,54 (dd, 1H, $J = 7,8$ Hz, $J = 10$ Hz, H-2''), 3,52 (m, 1H, (CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 3,23 (t, 2 H, $J_{11,12} = 7$ Hz, H-12), 2,70 (dd, 1H, $J = 11$ Hz, $J_{6a,6b} = 16,8$ Hz, H-6a), 2,33 (m, 1H, $J = 5,6$ Hz, $J = 16,8$ Hz, H-6b), 2,21 (m, 2H, H-8), 1,98 (s, 3H, CH₃CONH), 1,62-1,49 (m, 7H, H-9, H-11, CH_{2x} y un CH_{2y} del 3-pentilo), 1,48-1,36 (m, 1H, CH_{2y} del 3-pentilo), 1,35-1,26 (m, 1H, H-10), 1,26 (t, 3H, CH₃CH₂OCO), 0,87 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3x} del 3-pentilo), 0,82 (t, 3H, $J = 7,5$ Hz, CH_{3y} del 3-pentilo).

RMN ¹³C (D₂O) δ 177,4 (C-7), 174,9 (C-1'), 174,6 (CH₃CONH), 168,7 (CH₃CH₂OCO), 138,6 (C-2), 130,0 (C-1), 104,2 (C-1''), 85,0 ((CH₃CH₂)₂CH del 3-pentilo), 81,7 (C-4'), 76,7 (C-3), 76,0 (C-5''), 73,1 (C-3''), 73,0 (C-2'), 72,1 (C-4''), 71,7 (C-2''), 71,1 (C-3'), 69,3 (C-5'), 62,8 (CH₃CH₂OCO), 62,6 (C-6''), 61,7 (C-6'), 55,3 (C-4), 48,2 (C-5), 39,5 (C-12), 36,5 (C-8), 30,5 (C-6), 28,8 (C-11), 26,2 (C-9 y C-10), 25,8 (CH_{2x} y CH_{2y} del 3-pentilo), 22,9 (CH₃CONH), 14,0 (CH₃CH₂OCO), 9,2 (CH_{3x} y CH_{3y} del 3-pentilo).

ESI-TOF MS m/z: calcd para [M+H]⁺: 766,3974, encontrado: 766,3955, calcd para [M+Na]⁺: 788,3793, encontrado: 788,3769.

Síntesis de N-lactobionilalaniltirosina (99).

Se disolvieron la lactobiono 1,5-lactona (215 mg, 0,63 mmol) y el dipéptido AlaTyr (80 mg, 0,32 mmol) en dimetilformamida anhidra (1,5 ml) bajo atmósfera de argón. La mezcla se calentó a 100 °C y la reacción se monitoreo por ccd (nProp:EtOH:H₂O:NH₄OH(c), 7:1:2:200μl). Luego de 3 h no se detectó la presencia de AlaTyr libre la cual revelaba con reactivo de ninhidrina y UV y se observó el compuesto **99** el cual reveló con UV y con el reactivo de ácido sulfúrico (R_f 0,42). Se evaporó la DMF y se purificó por cromatografía en fase reversa RP-18 (0,5 g). La lactobionolactona en exceso eluyó con 15 ml de agua, el compuesto **99** eluyó con 5% MeOH y el dipéptido sin reaccionar se recuperó por el agregado de 20 % MeOH. Se juntaron fracciones y se evaporó el solvente obteniendo un sólido blanco (43 mg, 24 %). $[\alpha]_D^{25} +21,8$ (c 0,7, H₂O).

RMN ¹H (D₂O) δ 7,15 y 6,85 (d, 4H, aromáticos), 4,56 (m, 1H, H-2), 4,55 (d, 1H, $J_{1'',2''}= 7,7$ Hz, H-1''), 4,42 (d, 1H, $J_{2',3'}= 2,6$ Hz, H-2'), 4,34 (ddd, 1H, $J_{4,5}= 7,3$ Hz, H-4), 4,14 (dd, 1H, $J= 2,6$ Hz, $J_{3',4'}= 4,2$ Hz, H-3'), 3,99 (dd, 1H, $J= 4,2$ Hz, $J_{4',5'}= 6,4$ Hz, H-4'), 3,95-3,90 (m, 2H, H-4'' y H-5'), 3,86 (dd, 1H, $J_{5'',6''a}= 3,3$ Hz, $J_{6''a,6''b}= 12$ Hz, H-6''a), 3,79-3,70 (m, 4H, H-5'', H-6'a, H-6'b y H-6''b), 3,67 (dd, 1H, $J_{2'',3''}= 10$ Hz, $J_{3'',4''}= 3,4$ Hz, H-3''), 3,58 (dd, 1H, $J= 7,7$ Hz, $J= 10$ Hz, H-2''), 3,14 (dd, 1H, $J_{2,6a}= 5,6$ Hz, $J_{6a,6b}= 14$ Hz, H-6a), 2,95 (dd, 1H, $J_{2,6b}= 8,6$ Hz, H-6b), 1,30 (d, 3H, $J_{4,5}= 7,3$ Hz, H-5).

RMN ¹³C (D₂O) δ 175,9 (C-1), 174,9 (C-1', C-3), 155,0, 131,3, 129,2, 116,0 (aromáticos), 104,2 (C-1''), 81,8 (C-4'), 76,0 (C-5''), 73,1 (C-3''), 73,0 (C-2'), 72,1 (C-4''), 71,7 (C-2''), 71,3 (C-3'), 69,2 (C-5'), 62,6 (C-6''), 61,7 (C-6'), 55,3 (C-2), 50,0 (C-4), 36,6 (C-6), 17,2 (C-5).

ESI-TOF MS m/z: calcd para $[M+H]^+$: 593,2194, encontrado: 593,2187, calcd para $[M+Na]^+$: 615,2013, encontrado: 615,2007.

Resumen

Trypanosoma cruzi es el parásito protozoario agente etiológico de la enfermedad de Chagas, que afecta a millones de personas en el mundo, siendo la vinchuca (*Triatoma infestans*) el principal insecto vector de su transmisión en nuestro país. El parásito se caracteriza por utilizar un huésped vertebrado y otro invertebrado para completar su ciclo de vida, sufriendo transformaciones morfológicas y bioquímicas durante los diferentes estadios.

Estudios biológicos, genéticos, bioquímicos e inmunológicos realizados sobre cepas de diferentes orígenes, permitieron su clasificación filogenética en dos Linajes principales, I y II, que luego se reclasificaron en 6 unidades discretas de tipificación (DTU I-VI). Las cepas pertenecientes al grupo I son menos infectivas y comprenden las cepas con ciclo de vida salvaje, y las cepas pertenecientes al grupo II, más infectivas, están asociadas al ciclo doméstico y por lo tanto a la enfermedad de Chagas.

Las glicoproteínas tipo mucina están ancladas a la superficie de *T. cruzi* por medio de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y sus cadenas O-glicosídicas se encuentran unidas a residuos de Ser ó Thr de la proteína a través de α -N-acetilglucosamina (α -GlcNAc), en lugar de α -N-acetilgalactosamina (α -GalNAc), como ocurre en mucinas de vertebrados. La función de estas proteínas consiste en la adhesión y protección de la superficie celular del parásito. Asimismo, son aceptores de ácido siálico en la reacción catalizada por la enzima trans-sialidasa (TcTS), también localizada en la superficie del parásito, que es decisiva para la infección. La reacción es específica y se transfiere un ácido siálico unido α -(2-3) a un β -galactopiranosido para formar la misma unión con el aceptor.

La estructura de la porción glicosídica de las mucinas de *T. cruzi* depende en gran medida de la cepa y del estadio en el que se encuentra el parásito. Se sabe que las cadenas O-glicosídicas de mucinas de las cepas G, Dm28C y Colombiana incluídas en DTU I contienen el "core" β -D-Galf(1→4)-GlcNAc que puede estar sustituido con una o varias unidades de Galf y/o Galp, mientras que las estructuras halladas en las cepas más infectivas, Y y CL que presentan el "core" β -D-Galp(1→4)-GlcNAc, se encuentran sustituidas solo por Galp. La cepa Tulahuen ahora reclasificada como DTU VI híbrida, expresa mucinas con oligosacáridos derivados de ambos "cores". La presencia de Galf, que no es biosintetizada por mamíferos, sugiere una posible relación entre las estructuras de los glicanos y los diferentes grados de infectividad de las cepas.

Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis consistió en analizar la cinética enzimática para la trans-sialilación de los oligosacáridos de mucinas pertenecientes al grupo I, previamente sintetizados en el laboratorio y determinar si existía una relación entre la infectividad, relacionada con la TcTS y la presencia o ausencia de *Galf*.

Primeramente se realizó un análisis por HPAEC-PAD de los oligosacáridos alditoles. Este método permite distinguir los oligosacáridos con *Galf* pues tienen un tiempo de retención considerablemente mayor que los análogos con *Galp*. Como los oligosacáridos de las mucinas se obtienen como alditoles mediante una reacción de β -eliminación reductiva, el perfil obtenido en un análisis por HPAEC-PAD permitiría determinar el origen, selvático o doméstico, de la cepa de *T. cruzi*, por la presencia o ausencia de *Galf*. Para la obtención de los parámetros cinéticos se realizaron incubaciones usando los oligosacáridos sintéticos, sus alditoles y los bencil glicósidos como sustratos aceptores, 3'SL como donador de ácido siálico y la enzima recombinante TcTS. Las reacciones enzimáticas se analizaron midiendo por HPAEC-PAD la cantidad de producto sialilado y se determinaron los K_m gráficamente por el método de Lineweaver-Burk. Todos los compuestos resultaron buenos aceptores de ácido siálico, o sea que la galactofuranosa no afectaría la sialilación de las unidades de *Galp* presentes en los mismos oligosacáridos. Como resultado de estos análisis se pudo determinar que la disminución en la virulencia de las cepas pertenecientes al grupo I no es causada por interferencia de la sialilación por la presencia de la *Galf*. Se llevó a cabo la sialilación preparativa del hexasacárido β -D-*Galp*-(1 \rightarrow 2)-[[β -D-*Galp*-(1 \rightarrow 3)]- β -D-*Galp*-(1 \rightarrow 6)]-[[β -D-*Galf*-(1 \rightarrow 2)]- β -D-*Galf*-(1 \rightarrow 4)]- α -D-GlcNAc-OBn (**42 Bn**) utilizando la enzima recombinante y 3'SL como donador. El aislamiento del producto sialilado permitió determinar por espectros RMN mono y bidimensionales que el ácido siálico se incorpora selectivamente a la *Galp* terminal unida (β 1 \rightarrow 3) menos impedida estéricamente y más expuesta.

El análisis cinético de los hexasacáridos **43 Bn** y **43 ol** con 3 *Galp* terminales permitió determinar que de acuerdo a las condiciones y al tiempo de reacción se podía obtener uno o dos compuestos monosialilados y uno minoritario disialilado, producto de la sialilación en las dos *Galp* más expuestas.

Se estudió también la capacidad de los oligosacáridos y sus derivados de comportarse como inhibidores competitivos de la transferencia de siálico desde 3'SL a *N*-acetilactosamina. Los alditoles analizados en este capítulo mostraron valores de IC_{50} del orden del lactitol, siendo el mejor el del **42 Bn**.

En el análisis desarrollado para la transferencia de Neu5Gc mediada por TcTS, se demostró por primera vez que la enzima recombinante transfiere Neu5Gc desde oligosacáridos sintéticos que contienen esta unidad a lactosa, lactitol y *N*-acetilactosamina, unidad común en glicoconjugados. Esta enzima sería la responsable de la presencia de ácido *N*-glicolilneuramínico en la superficie de *T. cruzi*. La TcTS podría usarse con fines preparativos para obtener glicoconjugados con Neu5Gc, para estudios biológicos. El cálculo de los parámetros cinéticos determinó que el disacárido conteniendo Neu5Gc($\alpha 2 \rightarrow 3$)-Galp($\beta 1 \rightarrow 4$)-Glc-R era mejor sustrato donador que la 3'SL. Esto también se comprobó cuando se realizó la reacción de transferencia competitiva. Por otra parte, los ensayos de transferencia realizados pre-incubando la enzima con anticuerpos neutralizantes permitieron determinar que el Neu5Gc ocuparía el mismo sitio activo que el Neu5Ac en la enzima.

Otro objetivo consistió en la síntesis y evaluación de inhibidores de TcTS. Previamente en el laboratorio se había determinado que la lactosa y análogos inhiben la transferencia de ácido siálico hacia *N*-acetilactosamina en la reacción de TcTS. El mejor de ellos resultó el lactitol (**31**) y fue utilizado por el grupo de Campetella (UNSAM) para demostrar que la inhibición de TcTS en la sangre del ratón infectado previene la apoptosis celular. Debido a la rápida eliminación del lactitol de la circulación sanguínea estos autores debieron recurrir a pastillas que lo liberaban lentamente. En vista de estos resultados planeamos obtener inhibidores derivados de la lactosa que tuvieran un mayor tiempo de permanencia en sangre sin que se disminuyera su actividad inhibitoria. Para ello necesitábamos aumentar el tamaño de los inhibidores más allá de los límites de filtración renal sin modificar el extremo β -galactopiranosilo, unidad aceptora de ácido siálico en la reacción de TcTS. Las modificaciones de compuestos biológicamente activos con polímeros es un método ampliamente utilizado para controlar su biodisponibilidad, biodistribución y a menudo su toxicidad. El término PEGilación describe la modificación de moléculas biológicas por conjugación covalente con polietilenglicol. Esta modificación mejora la solubilidad de la droga, disminuye su inmunogenicidad y también incrementa su estabilidad y permanencia en sangre permitiendo así disminuir la frecuencia de la dosis, aunque hay pocos ejemplos de PEGilación de carbohidratos. Considerando la aplicación y beneficios de esta técnica decidimos aplicarla a lactosa y análogos con el objeto de incrementar su biodisponibilidad. Para ello, hemos utilizado diferentes métodos de conjugación, caracterizado los productos por RMN y espectrometría de masas, analizado el comportamiento de los conjugados como inhibidores en la reacción de

TcTS y por último determinamos la estabilidad de los conjugados en sangre. Para la síntesis utilizamos diferentes PEGs **lineales** de pesos moleculares menores a 5 kDa y PEGs **multibrazos** de pesos moleculares mayores a 20 kDa. Para estudiar la capacidad de inhibición de los PEG conjugados en la reacción de TcTS se probaron diferentes concentraciones de los compuestos en reacciones de transferencia conteniendo 3'SL como donador, [D-glucosa-1-¹⁴C]-lactosa como aceptor y TcTS recombinante. La inhibición fue cuantificada midiendo la radioactividad retenida en una resina de intercambio aniónico luego de la incubación y comparando con la radioactividad retenida en ausencia del inhibidor. Los resultados indicaron, para el caso de los conjugados de lactosa y análogos con los PEGs lineales, que si bien la presencia de la cadena unida al disacárido no altera la habilidad del sustrato para funcionar como aceptor de ácido siálico, la permanencia en sangre de los conjugados no aumentaba significativamente. En el análisis de estabilidad en sangre del conjugado con PEG multibrazos se observó una mayor permanencia, comprobando la presencia del mismo hasta 24 horas después de la inyección. El valor de IC₅₀ para derivados del disacárido **59**, es aproximadamente 8 veces menor en molaridad que el de su respectivo precursor. Si consideramos que la molécula presenta 8 unidades de sustrato aceptor se podría inferir que cada brazo estaría interactuando con una unidad de enzima y que la presencia de la cadena de PEG unida a este disacárido inhibidor no alteraría la capacidad para interactuar con la misma. Los PEGs multibrazos conjugados con disacáridos de cadena abierta también presentaron valores de IC₅₀ más bajos que el del disacárido del cual derivan (ácido lactobiónico, **30**). En la mayoría de los casos los conjugados de cadena más larga resultaron ser mejores inhibidores que sus análogos de cadena más corta lo cual indicaría que a mayor longitud de brazo, mayor espacio entre unidades aceptoras y por lo tanto, mejor interacción con la TcTS.

Se puede concluir que la conjugación con PEGs multibrazos ha sido una herramienta útil para aumentar la eficiencia de los derivados de lactosa como inhibidores de TcTS. Las reacciones son sencillas y la alta estabilidad de estos conjugados en sangre alienta a realizar estudios de inhibición *in vivo* con pacientes infectados con Chagas. Futuros estudios acerca de la localización en tejidos de estos conjugados nos daría idea del modo de acción de estas drogas.

Otro enfoque de este trabajo de Tesis consistió en la síntesis y evaluación de sustratos bifuncionales dirigidos a los sitios de unión del sustrato donador y del aceptor. Estudios realizados con TcTS cristalizada con diferentes ligandos mostraron dos

(sub)sitios catalíticos relacionadas a sus sitios activos: un sitio donador específico para el ácido siálico y otro para la β -galactopiranososa aceptora. En base al mecanismo de acción de TcTS, los potenciales inhibidores son clasificados dependiendo del sitio activo al que estén direccionados. Para nuestro objetivo unimos covalentemente sustratos que resultaron ser buenos aceptores de ácido siálico, como la lactosa o el ácido lactobiónico (**30**), a sustratos que pueden tener afinidad por el sitio destinado al ácido siálico, como lo son los compuestos conteniendo ácidos carboxílicos o miméticos del ácido siálico. Para la síntesis se utilizaron estrategias diferentes y los productos se caracterizaron por espectrometría de masas y RMN mono y bidimensional. El análisis de estos compuestos como sustratos e inhibidores competitivos en la reacción de TcTS fueron realizados usando 3'sialilactosa (3'SL) como donador de ácido siálico y una TcTS recombinante. Las reacciones se siguieron por HPAEC-PAD. También se analizó la capacidad de cada uno para actuar de inhibidor competitivo de la reacción cuando se incubaba 3'SL como donador, *N*-acetilactosamina como aceptor y TcTS. Todos los β -galactopiranosidos resultaron ser aceptores de ácido siálico con valores de K_m dentro del rango del lactitol excepto el compuesto **99** que no mostró ser ni aceptor, ni inhibidor de la reacción. Para el caso de los conjugados con oseltamivir, los valores de IC_{50} resultaron ser de aproximadamente un orden de magnitud mayor que el que muestran los disacáridos de los cuales derivan. Estos resultados indicaron que aunque los conjugados eran también aceptores de ácido siálico, la presencia de estos ligandos supuestamente dirigidos al sitio donador no aumentaba la afinidad del sustrato por la enzima.

En conclusión en este trabajo se presentó:

- Los parámetros cinéticos de la reacción de trans-sialilación para los oligosacáridos sintéticos de mucinas de *Trypanosoma cruzi* con la enzima TcTS recombinante.
- La preparación del producto de sialilación del hexasacárido HexaGalp **42 Bn** por la enzima TcTS recombinante y la determinación del sitio de sialilación por estudios de RMN.
- La cinética de reacción del hexasacárido HexaGalp **43 Bn y 43 ol** por la enzima TcTS recombinante.

- La demostración de la transferencia de ácido *N*-glicolilneuramínico mediada por TcTS, desde oligosacáridos sintéticos que contienen esta unidad hacia *N*-acetilactosamina, unidad común en glicoconjugados
- La síntesis, caracterización y pruebas de inhibición de derivados PEGilados lineales y polivalentes con mayor estabilidad en sangre, basados en disacáridos aceptores de ácido siálico, análogos de lactosa.
- La síntesis, caracterización y pruebas de inhibición de inhibidores dirigidos a ambos sitios catalíticos, basados en disacáridos aceptores y sustratos que pueden tener afinidad por el sitio destinado al ácido siálico, como lo son los compuestos conteniendo ácidos carboxílicos o miméticos del ácido siálico.

Este trabajo dio lugar a las siguientes publicaciones:

1. Comparative rates of sialylation by recombinant *trans*-sialidase and inhibitor properties of synthetic oligosaccharides from *Trypanosoma cruzi* mucins-containing galactofuranose and galactopyranose.
Rosalía Agusti[†], M. Eugenia Giorgi[†], Verónica M. Mendoza, Carola Gallo-Rodriguez, Rosa M. de Lederkremer. [†] Ambos autores contribuyeron de igual forma en este trabajo.
Bioorganic & Medicinal Chemistry **2007**, *15*, 2611-2616.
2. The *Trans*-sialidase from *Trypanosoma cruzi* efficiently transfers α -(2→3) linked *N*-glycolylneuraminic acid to terminal β -D-galactosyl units.
Rosalía Agusti, M. Eugenia Giorgi, Rosa M. de Lederkremer.
Carbohydrate Research **2007**, *342*, 2465-2469.
3. Synthesis of PEGylated lactose analogs for inhibition studies on *T. cruzi* *trans*-sialidase.
M. Eugenia Giorgi, Laura Ratier, Rosalía Agusti, Alberto C. C. Frasch, Rosa M. de Lederkremer.
Glycoconjugate Journal **2010**, *27*, 549-559.

4. Synthesis of oseltamivir conjugates with lactose analogs for inhibition studies on *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase.
M. Eugenia Giorgi, Damian Piuselli, Rosalía Agusti, and Rosa M. de Lederkremer
Arkivok **2011**, *22*, 260-271. (Part (vii): Regional Issue 'Organic Chemistry in Argentina).

5. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite.
M. Eugenia Giorgi, Rosa M. de Lederkremer.
Carbohydrate Research **2011**, *346*, 1389-1393.

6. Improved bioavailability of inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: PEGylation of lactose analogs with multiarm polyethyleneglycol.
M. Eugenia Giorgi, Laura Ratier, Rosalia Agusti, Alberto C. C. Frasch, Rosa M. de Lederkremer.
Glycobiology **2012**, *10*, 1363-1373.

Bibliografía

- Acosta-Serrano, A.; Schenkman, S.; Yoshida, N.; Mehlert, A.; Richardson, J.; Ferguson, M. A. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 27244-27253.
- Acosta-Serrano, A.; Almeida, I. C.; Freitas-Junior, L. H.; Yoshida, N.; Schenkman, S. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *114*, 143-150.
- Affranchino, J. L.; Ibanez, C. F.; Luquetti, A. O.; Rassi, A.; Reyes, M. B.; Macina, R. A.; Aslund, L.; Pettersson, U.; Frasch, A. C. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *34*, 221-228.
- Agrellos, O. A.; Jones, C.; Todeschini, A. R.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato, L. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *126*, 93-96.
- Agusti, R.; Couto, A. S.; Campetella, O. E.; Frasch, A. C. C.; de Lederkremer, R. M. *Glycobiology* **1997**, *7*, 731-735.
- Agusti, R.; Couto, A. S.; Campetella, O.; Frasch, A. C.; de Lederkremer, R. M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1998**, *97*, 123-131.
- Agusti, R.; Paris, G.; Ratier, L.; Frasch, A. C.; de Lederkremer, R. M. *Glycobiology* **2004**, *14*, 659-670.
- Agusti, R.; Mendoza, V. M.; Gallo-Rodriguez, C.; de Lederkremer, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 541-551.
- Agusti, R.; Giorgi, M. E.; Mendoza, V. M.; Gallo-Rodriguez, C.; de Lederkremer, R. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2611-2616.
- Ajisaka, K.; Fujimoto, H.; Isomura, M. *Carbohydr. Res.* **1994**, *259*, 103-115.
- Almeida, I. C.; Ferguson, M. A.; Schenkman, S.; Travassos, L. R. *Biochem. J.* **1994**, *304*, 793-802.
- Alves, M. J.; Colli, W. *FEBS Lett.* **1975**, *52*, 188-190.
- Alves, M. J.; Colli, W. *Sub-Cell. Biochem.* **2008**, *47*, 58-69.
- Amaya, M. F.; Buschiazzi, A.; Nguyen, T.; Alzari, P. M. *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 773-784.
- Amaya, M. F.; Watts, A. G.; Damager, I.; Wehenkel, A.; Nguyen, T.; Buschiazzi, A.; Paris, G.; Frasch, A. C.; Withers, S. G.; Alzari, P. M. *Structure* **2004**, *12*, 775-784.
- Amino, R.; Serrano, A. A.; Morita, O. M.; Pereira-Chioccola, V. L.; Schenkman, S. *Glycobiology* **1995**, *5*, 625-631.
- Anonymous. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1999**, *94*, 2, 429-432.

- Arioka, S.; Sakagami, M.; Uematsu, R.; Yamaguchi, H.; Togame, H.; Takemoto, H.; Hinou, H.; Nishimura, S. I. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, (4), 1633-1640.
- Asgatay, S.; Bololoi, C.; Franceschi-Messant, S.; Vicendo, P.; Perez, E.; Rico-Lattes, I. *Colloid Polym. Sci.* **2006**, 284, (6), 668-676.
- Bakker, H.; Kleczka, B.; Gerardy-Schahn, R.; Routier, F. H. *Biol. Chem.* **2005**, 386, 657-661.
- Banerjee, S. S.; Aher, N.; Patil, R.; Khandare, J. *Drug Deliv.* **2012**, 2012, 17 pag.
- Beverley, S. M.; Owens, K. L.; Showalter, M.; Griffith, C. L.; Doering, T. L.; Jones, V. C.; McNeil, M. R. *Eukaryot. Cell* **2005**, 4, 1147-1154.
- Bhatia, S.; Mohr, A.; Mathur, D.; Parmar, V. S.; Haag, R.; Prasad, A. K. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3487-3498.
- Brener, Z. *Annu. Rev. Microbiol.* **1973**, 27, 347-382.
- Buchini, S.; Buschiazzo, A.; Withers, S. G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 2700-2703.
- Buscaglia, C. A.; Campo, V. A.; Frasch, A. C.; Di Noia, J. M. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 229-236.
- Buschiazzo, A.; Campetella, O.; Frasch, A. C. *Glycobiology* **1997**, 7, 1167-1173.
- Buschiazzo, A.; Amaya, M. F.; Cremona, M. L.; Frasch, A. C.; Alzari, P. M. *Mol. Cell* **2002**, 10, 757-768.
- Busse, H.; Hakoda, M.; Stanley, M.; Streicher, H. *J. Carbohydr. Chem* **2007**, 26, 159-194.
- Campo, V. A.; Buscaglia, C. A.; Di Noia, J. M.; Frasch, A. C. *Microbes Infec.* **2006**, 8, 401-409.
- Campo, V. L.; Sesti-Costa, R.; Carneiro, Z. A.; Silva, J. S.; Schenkman, S.; Carvalho, I. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, (1), 145-156.
- Carbain, B.; Collins, P. J.; Callum, L.; Martin, S. R.; Hay, A. J.; McCauley, J.; Streicher, H. *ChemMedChem* **2009**, 4, (3), 335-337.
- Carvalho, I.; Andrade, P.; Campo, V. L.; Guedes, P. M. M.; Sesti-Costa, R.; Silva, J. S.; Schenkman, S.; Dedola, S.; Hill, L.; Rejzek, M.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2010a**, 18, (7), 2412-2427.

- Carvalho, S. T.; Sola-Penna, M.; Oliveira, I. A.; Pita, S.; Gonçalves, A. S.; Neves, B. C.; Sousa, F. R.; Freire-de-Lima, L.; Kurogochi, M.; Hinou, H.; Nishimura, S.-I.; Mendonça-Previato, L.; Previato, J. O.; Todeschini, A. R. *Glycobiology* **2010b**, *20*, (8), 1034-1045.
- Casettari, L.; Vllasaliu, D.; Castagnino, E.; Stolnik, S.; Howdle, S.; Illum, L. *Progr. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 659-685.
- Chapman, A. P. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2002**, *54*, 531-545.
- Cazzulo, J. J.; Frasch, A. C. *FASEB J.* **1992**, *6*, 3259-3264.
- Chaves, L. B.; Briones, M. R. S.; Schenkman, S. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *61*, 97-106.
- Cheng, J.; Yu, H.; Lau, K.; Huang, S.; Chokhawala, H. A.; Li, Y.; Tiwari, V. K.; Chen, X. *Glycobiology* **2008**, *18*, 686-697.
- Cheng, J.; Huang, S.; Yu, H.; Li, Y.; Lau, K.; Chen, X. *Glycobiology* **2010**, *20*, 260-268.
- Chuenkova, M.; Pereira, M. E. *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 1693-1703.
- Clayton, J. *Nature* **2010**, *465*, S4-5.
- Corfield, T. *Glycobiology* **1992**, *2*, 509-521.
- Coura, J. R.; Vinas, P. A. *Nature* **2010**, *465*, S6-7.
- Couto, A. S.; Goncalves, M. F.; Colli, W.; de Lederkremer, R. M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1990**, *39*, 101-107.
- Cremona, M. L.; Campetella, O.; Sanchez, D. O.; Frasch, A. C. *Glycobiology* **1999**, *9*, 581-587.
- Damager, I.; Buchini, S.; Amaya, M. F.; Buschiazzi, A.; Alzari, P.; Frasch, A. C.; Watts, A.; Ithurs, S. G. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3507-3512.
- de Arruda, M. V.; Colli, W.; Zingales, B. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *182*, 413-421.
- de Lederkremer, R. M.; Agusti, R. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2009**, *62*, 311-366.
- Díaz-Urrutia, C. A.; Olea-Azar, C. A.; Zapata, G. A.; Lapier, M.; Mura, F.; Aguilera-Venegas, B.; Arán, V. J.; López-Muñoz, R. A.; Maya, J. D. *Spectrochim. Acta A* **2012**, *95*, 670-678.
- Dixit, V.; Van den Bossche, J.; Sherman, D. M.; Thompson, D. H.; Andres, R. P. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 603-609.

Duncan, R.; Kopeček, J. In *Advances in Polymer Science: Soluble synthetic polymers as potential drug carriers*, Springer, Berlin, **1984**, *57*, pp 51-101.

El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A. N.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G.; Westenberger, S. J.; Caler, E.; Cerqueira, G. C.; Branche, C.; Haas, B.; Anupama, A.; Arner, E.; Aslund, L.; Attipoe, P.; Bontempi, E.; Bringaud, F.; Burton, P.; Cadag, E.; Campbell, D. A.; Carrington, M.; Crabtree, J.; Darban, H.; da Silveira, J. F.; de Jong, P.; Edwards, K.; Englund, P. T.; Fazelina, G.; Feldblyum, T.; Ferella, M.; Frasch, A. C.; Gull, K.; Horn, D.; Hou, L.; Huang, Y.; Kindlund, E.; Klingbeil, M.; Kluge, S.; Koo, H.; Lacerda, D.; Levin, M. J.; Lorenzi, H.; Louie, T.; Machado, C. R.; McCulloch, R.; McKenna, A.; Mizuno, Y.; Mottram, J. C.; Nelson, S.; Ochaya, S.; Osoegawa, K.; Pai, G.; Parsons, M.; Pentony, M.; Pettersson, U.; Pop, M.; Ramirez, J. L.; Rinta, J.; Robertson, L.; Salzberg, S. L.; Sanchez, D. O.; Seyler, A.; Sharma, R.; Shetty, J.; Simpson, A. J.; Sisk, E.; Tammi, M. T.; Tarleton, R.; Teixeira, S.; Van Aken, S.; Vogt, C.; Ward, P. N.; Wickstead, B.; Wortman, J.; White, O.; Fraser, C. M.; Stuart, K. D.; Andersson, B. *Science* **2005**, *309*, 409-415.

Engstler, M.; Schauer, R.; Brun, R. *Acta Trop.* **1995**, *59*, 117-29.

Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Riguera, R. *Biomacromolecules* **2006a**, *7*, 3104-3111.

Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Rodríguez-Meizoso, I.; Riguera, R. *Macromolecules* **2006b**, *39*, 2113-2120.

Fernandez-Megia, E.; Novoa-Carballal, R.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 833-842.

Ferrero-García, M. A.; Trombetta, S. E.; Sánchez, D. O.; Reglero, A.; Frasch, A. C. C.; Parodi, A. J. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 765-771.

Frasch, A. C. *Parasitol. Today* **2000**, *16*, 282-286.

Gallo-Rodriguez, C.; Varela, O.; Lederkremer, R. M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1886-1889.

Gallo-Rodriguez, C.; Varela, O.; de Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **1998**, *305*, 163-170.

Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.

Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Conover, C. D.; Lee, C.; Choe, Y. H.; Gilbert, C.; Martinez, A.; Xia, J.; Wu, D.; Hsue, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 551-562.

- Greenwald, R. B. *J. Control. Release* **2001**, *74*, 159-171.
- Hara, S.; Yamaguchi, M.; Takemori, Y.; Furuhata, K.; Ogura, H.; Nakamura, M. *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 162-166.
- Harrison, J. A.; Kartha, K. P.; Turnbull, W. B.; Scheuerl, S. L.; Naismith, J. H.; Schenkman, S.; Field, R. A. *Bioorga. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 141-144.
- Isbell, H. S.; Frush, H. L. In *Meth. Carbohydr. Chem: Lactonization of aldonic acids*. Academic Press Inc.: N. Y., **1963**, Vol. 2, pp 16-18.
- Jones, C.; Todeschini, A. R.; Agrellos, O. A.; Previato, J. O.; Mendonca-Previato, L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11889-11897.
- Kamerling, J. P.; Gerwig, G. J. In *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology*. Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, **2007**, 1-68.
- Karle, I. L.; Banerjee, A.; Balaram, P. *Fold. Des.* **1997**, *2*, (4), 203-210.
- Kashiwagi, G. A.; Mendoza, V. M.; de Lederkremer, R. M.; Gallo-Rodriguez, C. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6322-6332.
- Katzin, A. M.; Colli, W. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Biomembranes* **1983**, *727*, 403-411.
- Kikkeri, R.; Lepenies, B.; Adibekian, A.; Laurino, P.; Seeberger, P. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2110-2112.
- Kim, J. H.; Ryu, H. W.; Shim, J. H.; Park, K. H.; Withers, S. G. *ChemBioChem* **2009**, *10*, (15), 2475-2479.
- Kim, S.; Oh, D.-B.; Kang, H.; Kwon, O. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 1-15.
- Kröger, L.; Scudlo, A.; Thiem, J. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1217-1227.
- Kuhn, R.; Baer, H. H.; Seeliger, A. *Liebigs Ann. Chem.* **1958**, *611*, 236-241.
- Lin, X.; Wang, S.; Jiang, Y.; Wang, Z.-J.; Sun, G.-I.; Xu, D.-S.; Feng, Y.; Shen, L. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *76*, 230-237.
- Lin, X.; Wang, Z. J.; Huang, F.; Liang, S.; Shen, L.; Feng, Y.; Ruan, K. F. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 2865-2872.
- Lee, K. B.; Lee, Y. C. *Anal. Biochem.* **1994**, *216*, 358-364.
- MacRae, J. I.; Obado, S. O.; Turnock, D. C.; Roper, J. R.; Kierans, M.; Kelly, J. M.; Ferguson, M. A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *147*, 126-136.

- Maru, I., Ohta, Y., Okamoto, K., Suzuki, S., Takehi, K. & Tsukada, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 1557-1561.
- Maya, J. D.; Cassels, B. K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J.; Faúndez, M.; Galanti, N.; Ferreira, A.; Morello, A. *Comp. Biochem. Physiol. A.* **2007**, *146*, 601-620.
- Meinke, S.; Schroven, A.; Thiem, J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, (12), 4487-4497.
- Mendoza, V. M.; Agusti, R.; Gallo-Rodriguez, C.; de Lederkremer, R. M. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1488-1497.
- Mendoza, V. M. *Tesis* **2009**.
- Miyagi, T. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2010**, *22*, 162-172.
- Moncayo, A. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98*, 577-591.
- Monfardini, C.; Veronese, F. M. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 418-450.
- Monti, E.; Bonten, E.; D'Azzo, A.; Bresciani, R.; Venerando, B.; Borsani, G.; Schauer, R.; Tettamanti, G. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *64*, 403-479.
- Morpurgo, M.; Monfardini, C.; Hofland, L. J.; Sergi, M.; Orsolini, P.; Dumont, J. M.; Veronese, F. M. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1238-1243.
- Mucci, J.; Hidalgo, A.; Mocetti, E.; Argibay, P. F.; Leguizamón, M. S.; Campetella, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3896-3901.
- Mucci, J.; Risso, M. G.; Leguizamón, M. S.; Frasch, A. C. C.; Campetella, O. *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 1086-1095.
- Nag, A.; Mitra, G.; Ghosh, P. C. *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 224-231.
- Neres, J.; Bonnet, P.; Edwards, P. N.; Kotian, P. L.; Buschiazzi, A.; Alzari, P. M.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, (5), 2106-2119.
- Neres, J.; Bryce, R. A.; Douglas, K. T. *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, (3-4), 110-117.
- Neubacher, B.; Schmidt, D.; Ziegelmuller, P.; Thiem, J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1551-1556.
- Neubacher, B.; Scheid, S.; Kelm, S.; Frasch, A. C.; Meyer, B.; Thiem, J. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 896-899.
- Nikonova, E. Y.; Tertov, V. V.; Sato, C.; Kitajima, K.; Bovin, N. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5161-5164.

- Nishimura, S.; Lee, K. B.; Matsuoka, K.; Lee, Y. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *199*, 249-254.
- Padler-Karavani, V.; Yu, H.; Cao, H.; Chokhawala, H.; Karp, F.; Varki, N.; Chen, X.; Varki, A. *Glycobiology* **2008**, *18*, 818-830.
- Paris, G.; Ratier, L.; Amaya, M. F.; Nguyen, T.; Alzari, P. M.; Frasch, A. C. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, (4), 923-934.
- Parodi A. J.; Pollevick G. D.; Mautner M.; Buschiazzi A.; Sanchez D. O.; Frasch A. C. *EMBO J.* **1992**, *11*, 1705-1710.
- Pasut, G.; Veronese, F. M. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 461-472.
- Pereira, M. *Science* **1983**, *219*, 1444-1446.
- Pereira-Chioccola, V. L.; Acosta-Serrano, A.; Correia de Almeida, I.; Ferguson, M. A.; Souto-Padron, T.; Rodrigues, M. M.; Travassos, L. R.; Schenkman, S. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1299-1307.
- Plimmer, J. R.; Pravdić, N.; Fletcher, H. G. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 1982-1984.
- Pollevick, G. D.; Affranchino, J.; Frasch, A. C. C.; Sánchez, D. O. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1991**, *47*, 247-250.
- Pollevick, G. D.; Di Noia, J. M.; Salto, M. L.; Lima, C.; Leguizamon, M. S.; de Lederkremer, R. M.; Frasch, A. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27671-27680.
- Previato, J. O.; Andrade, A. B.; Vermelho, A.; Firmino, J. C.; Mendonça-Previato, L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1990**, *85*, 38-39.
- Previato, J. O.; Jones, C.; Goncalves, L. P.; Wait, R.; Travassos, L. R.; Mendonca-Previato, L. *Biochem. J.* **1994**, *301*, 151-159.
- Previato, J. O.; Jones, C.; Xavier, M. T.; Wait, R.; Travassos, L. R.; Parodi, A. J.; Mendonca-Previato, L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7241-7250.
- Previato, J. O.; Sola-Penna, M.; Agrellos, O. A.; Jones, C.; Oeltmann, T.; Travassos, L. R.; Mendonca-Previato, L. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14982-14988.
- Previato, J. O.; Wait, R.; Jones, C.; DosReis, G. A.; Todeschini, A. R.; Heise, N.; Previato, L. M. *Adv. Parasitol.* **2004**, *56*, 1-41.
- Probert, M. A.; Milton, M. J.; Harris, R.; Schenkman, S.; Brown, J. M.; Homans, S. W.; Field, R. A. *Tetrahedron lett.* **1997**, *38*, 5861-5864.

- Quintanilla-Licea, R.; Colunga-Valladares, J. F.; Caballero-Quintero, A.; Rodríguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R.; Gómez-Flores, R.; Waksman, N. *Molecules* **2002**, *7*, 662-673.
- Ramon, J.; Saez, V.; Baez, R.; Aldana, R.; Hardy, E. *Pharmaceut. Res.* **2005**, *22*, 1374-1386.
- Reyes, M. B.; Lorca, M.; Munoz, P.; Frasch, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2846-2850.
- Ribeirao, M.; Pereira-Chioccola, V. L.; Eichinger, D.; Rodrigues, M. M.; Schenkman, S. *Glycobiology* **1997**, *7*, 1237-1246.
- Risso, M. G.; Pitcovsky, T. A.; Caccuri, R. L.; Campetella, O.; Leguizamon, M. S. *Parasitology* **2007**, *134*, 503-510.
- Roper, J. R.; Ferguson, M. A. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *132*, 47-53.
- Salmaso, S.; Semenzato, A.; Bersani, S.; Mastrotto, F.; Scomparin, A.; Caliceti, P. *Eur. Polym. J.* **2008**, *44*, 1378-1389.
- Salto, M. L.; Gallo-Rodriguez, C.; Lima, C.; de Lederkremer, R. M. *Anal. Biochem.* **2000**, *279*, 79-84.
- Schauer, R. In *Cell biology monographs, Vol. 10: Sialic acids: Chemistry, metabolism, and function*, Springer, Wien, **1982**, pp 195-261.
- Schauer, R.; Reuter, G.; Mühlpfordt, H.; Andrade, A. F.; Pereira, M. E. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **1983**, *364*, 1053-1057.
- Schauer, R.; Kamerling, J. P. In *New Comprehensive Biochemistry, Vol. 29b: Glycoproteins II*, Elsevier, Amsterdam, **1997**, pp 243-402.
- Schenkman, S.; Jiang, M. S.; Hart, G. W.; Nussenzweig, V. *Cell* **1991**, *65*, 1117-1125.
- Schenkman, S.; Ferguson, M. A. J.; Heise, N.; Cardoso de Almeida, M. L.; Mortara, R. A.; Yoshida, N. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1993**, *59*, 293-303.
- Schenkman, S.; Eichinger, D.; Pereira, M. E.; Nussenzweig, V. *Annual Rev. Microbiol.* **1994**, *48*, 499-523.
- Schmidt, D.; Sauerbrei, B.; Thiem, J. *J. Org. Chem.* **2000a**, *65*, 8518-8526.
- Schmidt, D.; Thiem, J. *Chem. Commun.* **2000b**, 1919-1920.
- Schrader, S.; Schauer, R. In *Glycobiology Protocols, Vol. 347: Nonradioactive Trans-Sialidase Screening Assay*, Humana, Totowa, **2006**, pp 93-107.

- Schroven, A.; Meinke, S.; Ziegelmueller, P.; Thiem, J. *Chemistry* **2007**, *13*, 9012-9021.
- Scudder, P.; Doom, J. P.; Chuenkova, M.; Manger, I. D.; Pereira, M. E. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9886-9891.
- Shi, D.; Yang, J.; Yang, D.; LeCluyse, E. L.; Black, C.; You, L.; Akhlaghi, F.; Yan, B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 1477-1484.
- Sims, G. E.; Snape, T. J. *Anal. Biochem.* **1980**, *107*, 60-63.
- Singh, S.; Scigelova, M.; Hallberg, M. L.; Howarth, O. W.; Schenkman, S.; Crout, D. H. *G. Chem. Commun.* **2000**, 1013-1014.
- Streicher, H.; Busse, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, (4), 1047-1057.
- Takahashi, N.; Lee, K. B.; Nakagawa, H.; Tsukamoto, Y.; Kawamura, Y.; Li, Y. T.; Lee, Y. C. *Anal. Biochem.* **1995**, *230*, 333-342.
- Tangvoranuntakul, P.; Gagneux, P.; Diaz, S.; Bardor, M.; Varki, N.; Varki, A.; Muchmore, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12045-12050.
- Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P. H.; de Souza, W. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1749.
- Tertov, V. V.; Kaplun, V. V.; Sobenin, I. A.; Boytsova, E. Y.; Bovin, N. V.; Orekhov, A. N. *Atherosclerosis* **2001**, *159*, 103-115.
- Tetaud, E.; Barrett, M. P.; Bringaud, F.; Baltz, T. *Biochem. J.* **1997**, *325*, 569-580.
- Thiem, J.; Sauerbrei, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *103*, 1521-1523.
- Todeschini, A. R.; da Silveira, E. X.; Jones, C.; Wait, R.; Previato, J. O.; Mendonca-Previato, L. *Glycobiology* **2001**, *11*, 47-55.
- Todeschini, A. R.; de Almeida, E. G.; Agrellos, O. A.; Jones, C.; Previato, J. O.; Mendonca-Previato, L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 270-274.
- Tomlinson, S.; Raper, J. *Parasitol. Today* **1998**, *14*, 354-359.
- Tonelli, R. R.; Giordano, R. J.; Barbu, E. M.; Torrecilhas, A. C.; Kobayashi, G. S.; Langley, R. R.; Arap, W.; Pasqualini, R.; Colli, W.; Alves, M. J. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e864.
- Trathnigg, B., In *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Size Exclusion Chromatography of Polymers*. Meyers, R. A., Ed. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, **2000**; pp 8008-8034.

- Tangvoranuntakul, P.; Gagneux, P.; Diaz, S.; Bardor, M.; Varki, N.; Varki, A.; Muchmore, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12045-12050.
- Tribulatti, M. V.; Mucci, J.; Van Rooijen, N.; Leguizamon, M. S.; Campetella, O. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 201-207
- Urbina, J. A.; Docampo, R. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 495-501.
- Vandekerckhove, F.; Schenkman, S.; Carvalho, L. P.; Tomlinson, S.; Kiso, M.; Yoshida, M.; Hasegawa, A.; Nussenzweig, V. *Glycobiology* **1992**, *2*, 541-548.
- Varki, A. *Glycoconjugate J.* **2009**, *26*, 231-245.
- Veh, R. W.; Michalski, J. C.; Corfield, A. P.; Sander-Wewer, M.; Gies, D.; Schauer, R. *J. Chromatogr.* **1981**, *212*, 313-322.
- Veronese, F. M.; Mero, A. *BioDrugs* **2008**, *22*, 315-329.
- Vetere, A.; Paoletti, S. *FEBS lett.* **1996**, *399*, 203-206.
- Vetere, A.; Miletich, M.; Bosco, M.; Paoletti, S. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 942-949.
- Vimr, E. R.; Kalivoda, K. A.; Deszo, E. L.; Steenbergen, S. M. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2004**, *68*, 132-153.
- Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Alvarez, M. G.; Petti, M.; Bertocchi, G.; Armenti, A. *Exp. Rev. Anti Infect. Ther.* **2009**, *7*, 157-163.
- Watts, A. G.; Damager, I.; Amaya, M. L.; Buschiazzi, A.; Alzari, P.; Frasch, A. C.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7532-7533.
- Watts, A. G.; Oppezzo, P.; Withers, S. G.; Alzari, P. M.; Buschiazzi, A. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 4149-4155.
- Youn, Y. S.; Na, D. H.; Yoo, S. D.; Song, S.-C.; Lee, K. C. *Int. J. Biochem. Cell* **2005**, *37*, 1525-1533.
- Yu, H.; Chokhawala, H.; Karpel, R.; Yu, H.; Wu, B.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Jia, Q.; Chen, X. *J. of Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17618-17619.
- Zhao, H.; Rubio, B.; Sapra, P.; Wu, D.; Reddy, P.; Sai, P.; Martinez, A.; Gao, Y.; Lozanguiez, Y.; Longley, C.; Greenberger, L. M.; Horak, I. D. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 849-859.
- Zingales, B.; Martin, N. F.; de Lederkremer, R. M.; Colli, W. *FEBS lett.* **1982**, *142*, 238-242.

Zingales, B.; Carniol, C.; de Lederkremer, R. M.; Colli, W. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1987**, *26*, 135-144.

Zingales, B.; Andrade, S. G.; Briones, M. R.; Campbell, D. A.; Chiari, E.; Fernandes, O.; Guhl, F.; Lages-Silva, E.; Macedo, A. M.; Machado, C. R.; Miles, M. A.; Romanha, A. J.; Sturm, N. R.; Tibayrenc, M.; Schijman, A. G. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 1051-1054.

