

REAL ACADEMIA NACIONAL
DE FARMACIA DE ESPAÑA

“REFERENCIAS-TIPO” DE ENZIMAS DE
INTERÉS FARMACÉUTICO
(NEURAMINIDASA, ACETIL-O-ESTERASA)
Y OTRAS GLICOSIDASAS

José Antonio Cabezas Fernández del Campo

e-mail: jacabezasfdc@movistar.es

M. LORA-TAMAYO

La
investigación
química
española

 Alhambra

1981

**SEGUNDA PARTE: LA INVESTIGACION QUIMICA
ESPAÑOLA EN EL SIGLO XX**

	La investigación química española en el siglo XX.	105
1	Primera época: 1903-1910	107
	Química analítica, 108. Química inorgánica, 112. Química orgánica y biológica, 114.	
2	Segunda época	118
	Química analítica, 118. Química inorgánica, 124. Química orgánica y biológica, 130. Química física, 143. Química técnica, 159.	
3	Tercera época: desde 1940	163
	Química analítica, 163. Química inorgánica, 172. Química orgánica, 184. Química física, 224. Catálisis, 248. <u>Bioquímica</u> , 255. Enzimoquímica, 268. Metalurgia, 282. Ingeniería química, 289. Química aplicada, 300.	
	Consideración final	331

Otras contribuciones

Un grupo bioquímico trabaja en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Salamanca con el profesor J. A. CABEZAS, que desempeñó antes igual cátedra en Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, después de una estancia en el laboratorio de Química biológica del profesor Courtois, de la Facultad de Farmacia de París, y en los de Química patológica del hospital Broussais con el profesor Leclerc, también en París, con alguna más breve estancia en el Departamento de Química patológica de la Universidad de Londres, a cargo del profesor N. F. MacLagan.

La actividad científica de Cabezas se ha centrado en el estudio de los ácidos siálicos y de las glucidasas. Las investigaciones sobre ácidos siálicos se han dirigido a la determinación del N-acetilneuramínico en órganos y líquidos biológicos humanos y animales y su diferenciación de aquellos entre estados normales y patológicos. El primero de sus trabajos en esta línea es de 1962 (*Clin. Chim. Acta*, 7, 406, 448, 1962) y continúa en *Biochim. Biophys. Acta*, 83, 318, 1964; *Anal. R. Acad. Farmacia*, 34, 155, 1969; describe la presencia de un ácido N,O-diacetilneuramínico en orina (*Clin. Chim. Acta*, 25, 351, 481, 1969) y en la bilis (*Carbohydrate Res.*, 24, 486, 1972). La mayoría de estos trabajos se publicaron también en la *Rev. Esp. de Fisiol.* (1965, 1968, 1969 y 1970).

En orden a las glucidasas, Cabezas ha estudiado la presencia y actividad α -D-fucosidásica, asociada a la α -D-galactosidásica en una especie botánica, y especialmente también en moluscos, iniciándola con la purificación y propiedades de una α -L-fucosidasa de la *Chamelea gallina* en 1976 (*Eur. J. Biochem.*, 66, 379, 1976) y de β -N-acetilhexosaminidasas en moluscos (Simpósio internacional, Proc. of the 5th Int. Symp., Kiel, 370, 1979).

Asimismo ha publicado sobre Bioquímica comparada en insectos (1974,1975), en células sanguíneas de animales y grupos sanguíneos (*Rev. esp. Fisiol.*, 1973, 1975, 1978) y aún se diversifica su trabajo en el estudio actualmente de membranas animales (*Int. J. Biochem.* 1977,1979).

NOTA
(Diciembre de 2024)

El Prof. J.A. Cabezas agradeció en su momento al autor del libro sobre “La investigación química española”, Prof. Lora-Tamayo, la incorporación en esta obra lo arriba transcrito, relativo a la labor de investigación bioquímica del Prof. Cabezas, aunque haya sido de forma incompleta.

Por ello, quien suscribe desea ahora ampliar esta información (aunque no de manera exhaustiva) señalando brevemente los siguientes datos de sus publicaciones sobre sus trabajos (generalmente realizados en colaboración) relativos a algunas glicosidasas que catalizan procesos de reconocido interés farmacéutico, como la neuraminidasa del virus de la gripe cuyos inhibidores son valiosos medicamentos (*oseltamivir*, *zanamivir*, etc).

.. Son publicaciones que han merecido ser seleccionadas como “referencias-tipo” por el Comité de Enzimas de la *INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY* en sus *RECOMMENDATIONS* de 1992:

--Neuraminidasa / Sialidasa, E. C. 3.2.1. 18 (referencia 691), *Biochim. Biophys. Acta* 616 (1980) 228-238.

-- β -Fucosidasa, E. C. 3.2.1.38 (referencia 4159), *Int. J. Biochem.* Vol. 14, pp. 695-698, 1982.

--La misma enzima (referencia 806), *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 75 B, pp.719-728, 1983

--B-Glucosidasa, E. C. 3. 2.1.21 (referencia 807), *Int. J. Biochem.* Vol. N° 5, pp. 469-476, 1989.

--Sialato-O-acetilesterasa, E. C. 3.1.1.53 (referencia 1518), *Biochem. J.* (1991), 273, 435-441.

Otras referencias, relativas también a glicosidasas, son algunas de las indicadas en la página anterior, así como otras no mencionadas allí. Así:

-- β -N-Acetilhexosaminidasa, E.C 3.2.52 (referencia 690), *Biochem J.* (1989) 261, 1959-1961.

--La misma enzima (referencia 698), *Biochem. J.* (1978) 175, 743-750.

-- α -L-Fucosidasa, E. C. 3.2.1.51 (referencia 4070), *Eur. J. Biochem.* 66, 379-367 (1976).

-- β -Glucuronidasa, E. C. 3. 2.1.31 (referencia 1090), *Eur. J. Biochem.* 93, 391-311 (1979).

-- β -Galactosidasa, E. C. 3. 2. 1. 23 (referencia 2939), *Int. J. Biochem.* 1977, Vol. 8, 557-564.

BBA 69147

NEURAMINIDASE FROM INFLUENZA VIRUS A (H3N2)

SPECIFICITY TOWARDS SEVERAL SUBSTRATES AND PROCEDURE OF ACTIVITY DETERMINATION

JOSE A. CABEZAS ^a, PEDRO CALVO ^a, PIERRE EID ^b, JOSEFA MARTIN ^a,
NIEVES PEREZ ^a, ANGEL REGLERO ^a and CLAUDE HANNOUN ^b

^a *Department of Biochemistry, Faculties of Biology and Pharmacy, University of Salamanca, Salamanca (Spain)* and ^b *Department of Viral Ecology, Institut Pasteur, Paris (France)*

(Received April 29th, 1980)

Key words: Neuraminidase specificity; Sialidase; NADH; N-Acetylneuraminyllactose; Methoxyphenyl-N-acetylneuraminic acid; (Influenza virus)

Summary

Neuraminidase (acylneuraminyllactosyl hydrolase, EC 3.2.1.18) from the influenza virus A/Hong Kong/68 (H3N2) was purified after treatment of the purified virus with sarcosyl (sodium laurylsarcosinate), centrifugation at $110\,000 \times g$, and chromatography on DEAE-Sephadex and Sephadex G-200. It migrated as a single component during electrophoresis on polyacrylamide gel, and its molecular weight was estimated about 270 000.

The enzyme was thermolabile, the activity being reduced to 60% in 10 min at 50°C. The purified neuraminidase had an apparent K_m value of $4.1 \cdot 10^{-3}$ M for 5-*N*-acetyl-2-*O*-(3-methoxyphenyl)- α -D-neuraminic acid and was able to release sialic acid with linkages α 2-3, α 2-6 and α 2-8 (with very different efficiency) from fetuin, gangliosides, colominic acid, and bovine and porcine submaxillary mucins.

The enzymic activity was measured by several procedures: (A) spectrophotometric determination at 340 nm of the NADH produced in the reaction catalysed by β -galactose dehydrogenase on β -galactose + NAD⁺, this β -galactose was the product released from lactose by β -galactosidase and lactose was the product of the neuraminidase activity on *N*-acetylneuraminyllactose; (B) determination of the colored quinone yielded by the liberated methoxyphenol with 4-aminoantipyrine (Santer, U.V., Yee-Foon, J. and Glick, M.C. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 523, 435–442); (C) periodate-thiobarbiturate procedures (Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1971–1975 or Aminoff, D. (1961) *Biochem. J.* 81, 384–391). Some peculiarities of these methods are discussed.

Activity of influenza C virus *O*-acetyltransferase with *O*-acetyl-containing compounds

Adolfo GARCIA-SASTRE,* Enrique VILLAR,* Jean C. MANUGUERRA,† Claude HANNOUN† and José A. CABEZAS*†

* Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Salamanca, Plaza de la

* Merced 1, 37008 Salamanca, Spain, and † Unit of Viral Ecology, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75724

* Paris, France

Influenza C virus (strain C/Johannesburg/1/66) was grown, harvested, purified and used as source for the enzyme *O*-acetyltransferase (*N*-acyl-*O*-acetylneuraminase *O*-acetylhydrolase; EC 3.1.1.53). This activity was studied and characterized with regard to some new substrates. The pH optimum of the enzyme is around 7.6, its stability at different pH values shows a result similar to that of the pH optimum, and its activity is well maintained in the pH range from 7.0 to 8.5 (all these tests were performed with 4-nitrophenyl acetate as substrate). Remarkable differences were found in the values of both K_m and V_{max} with the synthetic substrates 4-nitrophenyl acetate, 2-nitrophenyl acetate, 4-methylumbelliferyl acetate, 1-naphthyl acetate and fluorescein diacetate. The use of 4-nitrophenyl acetate, 4-methylumbelliferyl acetate or 1-naphthyl acetate as substrate seems to be convenient for routine work, but it is better to carry out the measurements in parallel with those on bovine submandibular gland mucin (the latter is a natural and commercially available substrate). It was found that 4-acetoxybenzoic acid, as well as the methyl ester of 2-acetoxybenzoic acid, but not 2-acetoxybenzoic acid itself, are cleaved by this enzyme. Triacetin, di-*O*-acetyladenosine, tri-*O*-acetyladenosine, and di-*O*-acetyl-*N*-acetyladenosine phosphate, hitherto unreported as substrates for this viral esterase, are hydrolysed at different rates by this enzyme. We conclude that the *O*-acetyltransferase from influenza C virus has a broad specificity towards both synthetic and natural non-sialic acid-containing substrates. Zn^{2+} , Mn^{2+} and Pb^{2+} (as their chloride salts), *N*-acetylneuraminic acid, 4-methylumbelliferone and 2-acetoxybenzoic acid (acetylsalicylic acid) did not act as inhibitors.
