



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월16일

(11) 등록번호 10-1483829

(24) 등록일자 2015년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/32 (2006.01) *C07H 19/213* (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01) *C07H 21/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7005354(분할)

(22) 출원일자(국제) 2006년07월28일

심사청구일자 2012년02월28일

(85) 번역문제출일자 2012년02월28일

(65) 공개번호 10-2012-0044372

(43) 공개일자 2012년05월07일

(62) 원출원 특허 10-2011-7002057

원출원일자(국제) 2006년07월28일

심사청구일자 2011년04월25일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/007493

(87) 국제공개번호 WO 2007/012494

국제공개일자 2007년02월01일

(30) 우선권주장

10 2005 035 461.0 2005년07월28일 독일(DE)

(56) 선행기술조사문헌

Biochemistry, Vol.27, No.1, pp.183-193(1988)

전체 청구항 수 : 총 17 항

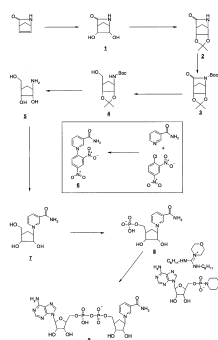
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **안정한 NAD/NADH 유도체**

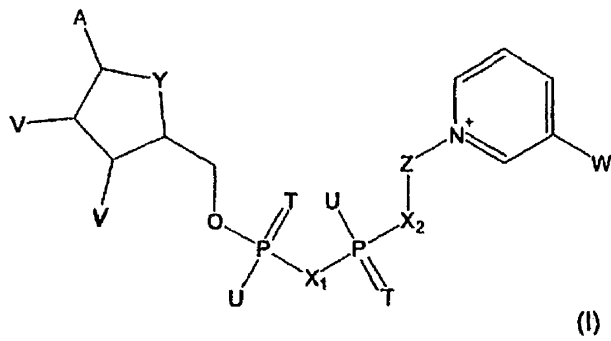
(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 (I)의 안정한 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (NAD/NADH) 유도체 및 니코틴아 (뒷면에 계속)

대표도



마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 포스페이트 (NADP/NADPH) 유도체, 상기 유도체의 효소 복합체, 및 생화학적 검출법 및 시약 키트에 있어서의 이들의 용도에 관한 것이다.



(72) 발명자

호른 카리나

독일 68647 비블리스 프랑켄슈트라쎄 5

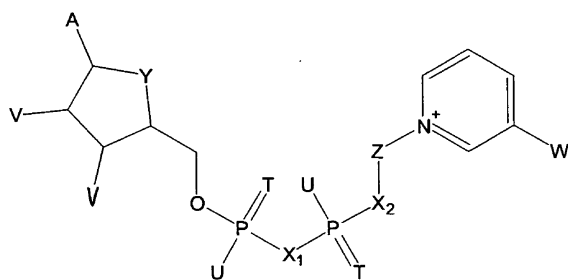
가에슬러-디트체 클라우디아

독일 69198 슈리스하임 비스마르크슈트라쎄 81

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 공효소 의존성 효소 또는 그러한 효소에 관한 기질, 및 (ii) 공효소로서의 하기 화학식 (I')의 화합물, 그의 염 또는 그의 환원형을 포함하는 분석물 측정용 시험 소자로서, 상기 시험 소자가 건조 시험의 형태이고, 상기 건조 시험은 시약이 담체에 적용되는 것인 시험 소자 :



(I')

[식에서,

A = 아데닌 또는 그의 유사물이고,

T = 각 경우에 있어, 독립적으로 O, S를 의미하고,

U = 각 경우에 있어 독립적으로 OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- 를 의미하고,

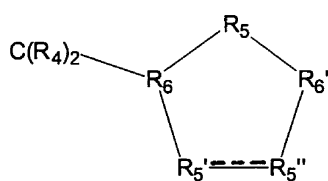
V = 각 경우에 있어 독립적으로 OH 또는 포스페이트기를 의미하고,

W = R이 각 경우에 있어 독립적으로 H 또는 $\text{C}_1\text{-C}_2$ -알킬을 의미하는 COOR , CON(R)_2 , COR , CSN(R)_2 이고,

X_1 , X_2 = 각 경우에 있어 독립적으로 O, CH_2 , CHCH_3 , $\text{C(CH}_3)_2$, NH, NCH_3 를 의미하고,

Y = NH, S, O, CH_2 이고,

Z = 하기 화학식 (II)의 포화 또는 불포화 탄소환형 또는 헤테로환형 5 원 고리를 의미함:



(II)

{식에서, R_5' 와 R_5'' 사이에는 단일 또는 이중 결합이 존재할 수 있고,

R_4 = 각 경우에 있어 독립적으로 H, F, Cl, CH_3 을 의미하고,

$\text{R}_5 = \text{CR}_4$ 이고,

R_5' 와 R_5'' 사이에 단일 결합이 존재하는 경우에는,

$\text{R}_5' = \text{O}$, S, NH, $\text{NC}_1\text{-C}_2$ -알킬, CR_4 , CHOH , CHOCH_3 이며,

$R5'' = CR4_2, CHOH, CHOCH_3$ 이고,

$R5'$ 와 $R5''$ 사이에 이중 결합이 존재하는 경우에는, $R5' = R5'' = CR4$ 이고,

$R6, R6' =$ 각 경우에 있어 독립적으로 CH, CCH_3 를 의미함},

단, Z 및 피리딘 잔기는 글리코사이드 결합에 의해 연결되지 않음].

청구항 2

제 1 항에 있어서, 포도당 탈수소효소 및 공효소로서의 화학식 (I')에 따른 화합물 또는 그의 염을 포함하는 포도당 측정용 시험 소자.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 하기와 같은 시험 소자:

$W = CONH_2$ 또는 $COCH_3$ 임.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 시약이 흡수성 물질, 팽창성 물질 또는 두 물질 모두에 고정된 형태인, 시험 스트립 형태인 시험 소자.

청구항 7

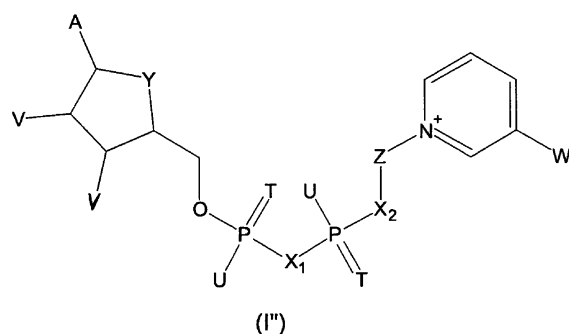
제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효소가 포도당 탈수소효소 (E.C.1.1.1.47), 락테이트 탈수소효소 (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), 말레이트 탈수소효소 (E.C.1.1.1.37), 글리세롤 탈수소효소 (E.C.1.1.1.6), 알코올 탈수소효소 (E.C.1.1.1.1), 알파-하이드록시부티레이트 탈수소효소, 소르비톨 탈수소효소, 또는 아미노산 탈수소효소로부터 선택되는 탈수소효소를 특징으로 하는 시험 소자.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 효소가 포도당 탈수소효소를 특징으로 하는 포도당 검출용 시험 소자.

청구항 9

하기 화학식 (I'')의 화합물, 그의 염 또는 그의 환원형:



[식에서,

A = 아데닌 또는 그의 유사물이고,

T = 각 경우에 있어 독립적으로 O, S를 의미하고,

U = 각 경우에 있어 독립적으로 OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- 를 의미하고,

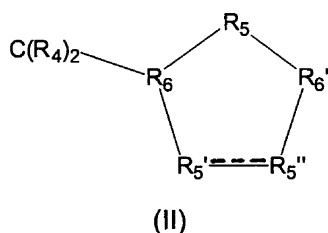
V = 각 경우에 있어 독립적으로 OH 또는 포스페이트기를 의미하고,

W = R이 각 경우에 있어 독립적으로 H 또는 $\text{C}_1\text{-C}_2$ -알킬을 의미하는 COOR, $\text{CON}(\text{R})_2$, COR, $\text{CSN}(\text{R})_2$ 이고,

X_1 , X_2 = 각 경우에 있어 독립적으로 O 또는 NH를 의미하고,

Y = NH, S, O, CH_2 이고,

Z = 하기 화학식 (II)의 포화 또는 불포화 탄소환형 또는 헤테로환형 5 원 고리를 의미함:



{식에서, $\text{R5}'$ 와 $\text{R5}''$ 사이에는 단일 또는 이중 결합이 존재할 수 있고,

R4 = 각 경우에 있어 독립적으로 H, F, Cl, CH_3 을 의미하고,

R5 = CR_4 이고,

$\text{R5}'$ 와 $\text{R5}''$ 사이에 단일 결합이 존재하는 경우에는,

$\text{R5}'$ = O, S, NH, $\text{NC}_1\text{-C}_2$ -알킬, CR_4 , CHOH, CHOCH_3 이며,

$\text{R5}''$ = CR_4 , CHOH, CHOCH_3 이고,

$\text{R5}'$ 와 $\text{R5}''$ 사이에 이중 결합이 존재하는 경우에는, $\text{R5}' = \text{R5}'' = \text{CR}_4$ 이고,

R6 , $\text{R6}'$ = 각 경우에 있어 독립적으로 CH, CCH_3 를 의미하고,

단, $\text{R5} = \text{CH}_2$, T = O, U = 각 경우에 있어 OH, V = OH, W = CONH_2 , X_1 , X_2 = O, 및 Y = O인 경우에는, $\text{R5}'$ 및 $\text{R5}''$ 가 동시에 CHOH는 아님}].

청구항 10

제 9 항에 따른 화합물이 공효소 의존성 효소와 공유 또는 비공유 결합되어 이루어지는 효소-공효소 복합체.

청구항 11

제 9 항에 따른 화합물 또는 제 10 항에 따른 복합체를, 효소 반응에 의해 시료 중 분석물을 검출하기 위하여 사용하는 방법.

청구항 12

제 9 항에 따른 화합물, 공효소 의존성 효소 및 반응 완충용액; 또는 제 10 항에 따른 효소-공효소 복합체 및 반응 완충 용액을 함유하는 시약 키트.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 시험 소자를, 포도당, 젖산, 말산, 글리세롤, 알코올, 콜레스테롤, 트라이글리세라이드, 아스코르브산, 시스테인, 글루타티온, 펩타이드, 요소, 암모늄, 살리실레이트, 피루베이트, 5'-뉴클레오타이드아제, 크레아틴 키나아제 (CK), 락테이트탈수소효소 (LDH) 및 이산화탄소로부터 선택되는 분석물을 측

정하기 위해 사용하는 방법.

청구항 14

하기 단계들을 포함하는 분석물 검출법:

- (a) 공효소를 포함하는, 제 1 항 또는 제 2 항에 따른 시험 소자와 시료를 접촉시키는 단계, 및
- (b) 분석물을 검출하는 단계.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 분석물이 광도 측정 또는 형광 측정에 의해 검출됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 시료가 체액, 폐수 또는 식품인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 12 항에 따른 시약 키트를, 포도당, 젖산, 말산, 글리세롤, 알코올, 콜레스테롤, 트라이글리세라이드, 아스코르브산, 시스테인, 글루타티온, 펩타이드, 요소, 암모늄, 살리실레이트, 피루베이트, 5'-뉴클레오타이다아제, 크레아틴 키나아제 (CK), 락테이트탈수소효소 (LDH) 및 이산화탄소로부터 선택되는 분석물을 측정하기 위해 사용하는 방법.

청구항 18

하기 단계들을 포함하는 분석물 검출법:

- (a) 공효소를 포함하는, 제 12 항에 따른 시약 키트와 시료를 접촉시키는 단계, 및
- (b) 분석물을 검출하는 단계.

청구항 19

제 7 항에 있어서, 상기 아미노산 탈수소효소가 L-아미노산 탈수소화효소 (E.C.1.4.1.5) 임을 특징으로 하는 시험 소자.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (NAD/NADH) 및 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 포스페이트 (NADP/NADPH) 유도체, 이러한 유도체의 효소 복합체 및 생화학적 검출법 및 시약 키트에 있어서의 이들의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

생화학적 분석용 측정 시스템은 임상적으로 관련 있는 분석법들의 중요한 요소이다. 이는 주로 효소의 보조 하에 직접 또는 간접적으로 측정되는 분석물, 예컨대 대사산물 또는 기질의 측정에 관련된다. 분석물은 효소-공효소 복합체의 보조 하에 전환된 다음 정량된다. 이 공정에서, 측정 대상 분석물은 적절한 효소 및 공효소와 접촉하게 되며, 이때 효소는 통상 촉매량으로 사용된다. 공효소는 효소 반응에 의해 변화, 예컨대 산화 또는 환원된다. 이러한 공정은 직접적으로 또는 매개 물질에 의해, 전기 화학적으로 또는 광도 측정 방식으로 검출될 수 있다. 칼리브레이션은 측정값과 측정 대상 분석물의 농도 사이의 직접적인 상관 관계를 제공한다.

[0003]

공효소는 효소에 공유 또는 비공유 결합된 유기 분자로서, 분석물의 전환에 의해 변화한다. 공효소의 주요 예는 각각 NADH 및 NADPH가 환원되어 형성되는 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 (NAD) 및 니코틴아마이드 아데닌 다이뉴클레오타이드 포스페이트 (NADP)이다.

[0004]

선행 기술에 의해 공지되어 있는 측정 시스템들은 한정된 보관 수명, 및 그러한 보관 수명을 달성하기 위한 특

정의 환경 요건, 예컨대 냉각 또는 건조 보관을 특징으로 한다. 따라서 일정한 사용 형태에 있어, 예컨대 포도당 자가 모니터링과 같이 최종 사용자 스스로에 의해 시험이 수행되는 경우, 부정확하고, 부주의하고, 불완전한 보관에 의해 잘못된 결과가 야기될 수 있다. 특히 주된 포장을 과도한 기간 동안 개봉해 둬으로써 건조제가 고갈되면, 일부 시스템에 있어 소비자는 거의 인지할 수 없는 측정 오류가 야기될 수 있다.

[0005] 생화학적 측정 시스템의 안정성을 증강시키기 위해 사용될 수 있는 공지의 측정 방법은 안정한 효소, 예컨대 호열성 유기체 유래의 효소를 사용하는 것이다. 화학적 개질화, 예컨대 교차 결합 또는 돌연변이 유발에 의해 효소를 안정시키는 것도 또한 가능하다. 아울러, 트레할로스, 폴리비닐피롤리돈 및 혈청 알부민과 같은 효소 안정제가 또한 첨가될 수 있거나, 또는 효소가 예컨대 광중합에 의해 중합체 네트워크에 혼입될 수 있다.

[0006] 또한, 안정한 매개 물질을 사용함으로써 생화학적 측정 시스템의 보관 수명을 개선하는 것이 시도된 바 있다. 그리하여 가능한 한 최저 산화 환원 전위를 가지는 매개 물질을 사용함으로써 시험의 특이성이 증가하고 반응 도중의 간섭들이 제거된다. 그러나 효소/공효소 복합체의 산화 환원 전위는 보다 낮은 산화 환원 전위 한계값을 구성한다. 그 한계값 미만으로 떨어지면, 그 매개 물질을 이용한 반응은 느려지거나 심지어 중단되기도 한다.

[0007] 다르게는, 예컨대 공효소 NADH와 같은 공효소가 직접 검출되는, 매개 물질 없는 생화학적 측정 시스템을 사용하는 것도 또한 가능하다. 그러나 그러한 측정 시스템의 단점은 NAD 및 NADP와 같은 공효소가 불안정하다는 것이다.

[0008] NAD 및 NADP는 염기 불안정 분자로서, 그 분해 경로는 문헌에 기재되어 있다 (N.J. Oppenheimer in The Pyridine Nucleotide Coenzymes Academic Press, New York, London 1982, J. Everese, B. Anderson, K. You, Editors, chapter 3, pages 56-65). 본질적으로 ADP-리보오스는 리보오스와 피리딘 단위체 사이의 글리코실 결합의 절단에 의한 NAD 또는 NADP의 분해 시에 형성된다. 그러나 환원형인 NADH 및 NADPH는 산 불안정하며, 이의 공지의 분해 경로는 예컨대 에피머화이다. 두 경우에 있어, NAD/NADP 및 NADH/NADPH의 불안정성은 리보오스와 피리딘 단위체 사이의 글리코실 결합의 불안정성으로 인한 것이다. 그러나 수용액 중에서도 같이 과격하지 않는 조건 하에서도, 공효소 NAD 및 NADP는 주위 습도에 의해 스스로 가수분해되고 만다. 이러한 불안정성은 분석물 측정 시에 오류를 야기할 수 있다.

[0009] 예컨대 [B.M. Anderson in the Pyridine Nucleotide Coenzymes, Academic Press New York, London 1982, J. Everese, B. Anderson, K. You, Editors, Chapter 4]에 다수의 NAD/NADP 유도체가 기재되어 있다. 그러나 이러한 유도체들은 대부분 효소에 의해 잘 수용되지 않는다. 그리하여 이전에 진단 시험에 사용되었던 유도체로는 1956 년에 처음 기재되었던 3-아세틸피리딘 아데닌 다이뉴클레오타이드 (아세틸 NAD)가 유일하다 (N.O. Kaplan, J. Biol. Chem. (1956) 221, 823). 이 공효소도 또한 효소에 의해 잘 수용되지 않으며, 산화 환원 전위에서 변화를 나타낸다.

[0010] 개질된 피리딘기를 가지는 다른 NAD 유도체들을 사용하는 것이 WO 01/94370 에 기재되어 있다. 그러나 니코틴아마이드기의 개질화는 통상 촉매 반응에 직접적인 영향을 끼친다. 대부분의 경우에 있어, 이러한 영향은 부정적이다.

[0011] 또 다른 안정화 개념은, 리보오스 단위체를 개질시켜 글리코실 결합의 안정성에 영향을 미치는 것이었다. 이 공정은 니코틴아마이드기의 촉매 반응에 직접적으로 간섭하지 않는다. 그러나 효소가 리보오스 단위체에 특이적으로 강하게 결합하면 곧바로 간접적인 영향이 있을 수도 있다. 이와 관련하여서는, Kaufmann 등이 WO 98/33936 및 US 5,801,006 및/또는 WO 01/49247 에서 다수의 티오리보오스-NAD 유도체를 개시한 바 있다. 그러나 니코틴아마이드 리보오스 단위체의 개질화와 효소 반응 중의 유도체의 활성 간의 상관 관계에 대해서는 이전에 기술된 적이 없었다.

[0012] 글리코실 결합을 가지지 않는 유도체인 카바NAD는 1988 년에 최초로 기재되었다 (J.T. Slama, Biochemistry 1989, 27, 183 및 Biochemistry 1989, 28, 7866). 이 유도체에서 리보오스는 카바사이클릭 당 단위체로 치환된다. 카바NAD 는 탈수소효소에 관한 기질로서 기재되었으나, 그 활성은 임상적인 생화학적 검출법에 있어서 아직 입증되지 않았다.

[0013] 이후 [G.M. Blackburn, Chem. Comm., 1996, 2765]에 의해 천연 피로포스페이트 대신 메틸렌 비스포스포네이트 연쇄를 가지는 카바NAD를 합성하기 위한 유사한 접근법이 기재되었다. 메틸렌 비스포스포네이트는 포스파타아제에 대하여 보다 높은 안정성을 나타내며 ADP 리보오실 사이클라아제에 관한 저해제로 사용되었다. 그 목적이 가수분해에 대한 저항성을 증가시키기 위한 것은 아니었다 (J.T. Slama, G.M. Blackburn).

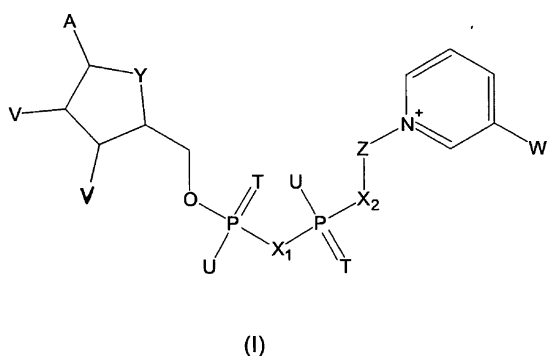
발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서 본 발명의 목적은, 특히 NAD/NADP의 가수분해에 대한 감응성을 배제하는 동시에 효소 반응에 있어 공효소로서의 활성을 띠는 포도당을 측정하기 위한 안정한 생분석 측정 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적은 (i) 공효소 의존성 효소 또는 그러한 효소에 관한 기질, 및 (ii) 공효소로서의 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염 또는 임의로는 그의 환원형을 포함하는 분석물을 측정하기 위한 시험 소자에 의해 달성된다:



[0016] [식에서,

[0017] A = 아데닌 또는 그의 유사물이고,

[0018] T = 각 경우에 있어 독립적으로 O, S를 의미하고,

[0019] U = 각 경우에 있어 독립적으로 OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- 를 의미하고,

[0020] V = 각 경우에 있어 독립적으로 OH 또는 포스페이트기를 의미하고,

[0021] W = R이 각 경우에 있어 독립적으로 H 또는 $\text{C}_1\text{-C}_2$ -알킬을 의미하는 COOR, $\text{CON}(\text{R})_2$, COR, $\text{CSN}(\text{R})_2$ 이고,

[0022] X_1 , X_2 = 각 경우에 있어 독립적으로 O, CH_2 , CHCH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, NH, NCH_3 를 의미하고,

[0023] Y = NH, S, O, CH_2 를 의미하고,

[0024] Z = O, S 및 N으로부터 선택되는 헤테로원자 및 임의로 1 개 이상의 치환기를 함유하며 5 개의 C 원자를 가지는 고리기, 및 CR_4 가 고리기 및 X_2 에 결합된 잔기 CR_4 (이때, R_4 = 각 경우에 있어 독립적으로 H, F, Cl, CH_3 를 의미함)를 포함하는 잔기이고,

[0025] 단, Z 및 피리딘 잔기는 글리코사이드 결합에 의해 연결되지 않음].

[0026] 바람직한 구현예에서, W = CONH_2 또는 COCH_3 이다.

[0027] Z에 대한 바람직한 치환기는 OH, F, Cl, 및 임의로 불소화 또는 염소화 또는/및 OH-치환된 $\text{C}_1\text{-C}_2$ 알킬, O- $\text{C}_1\text{-C}_2$ -알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0028] 바람직한 구현예에서, 제 1 잔기 V는 OH이고 제 2 잔기 V는 포스페이트기이다. 임의로는, 상기 OH기 및 상기 포스페이트기는 그들이 결합된 탄소 원자와 함께 고리를 형성할 수 있다.

[0029] 바람직한 구현예에서, 시험 소자는 포도당 탈수소효소 및 상기된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 염을 포함하는 포도당을 측정하기 위해 제공된다.

[0030] 놀랍게도, 본 발명에 따른 화합물은 가수분해에 관하여 안정하며 효소성 검출법에 있어 양호한 기질임에 따라

[0031]

생화학적 진단에 사용될 수 있다. 이러한 연구 결과는 기 공지된 대부분의 NAD/NADP 유도체에 관한 것과는 상반되는데, 이 유도체들은 효소성 검출법에 있어 통상 단지 매우 단기간 동안에만 안정하기 때문이다.

발명의 효과

본 발명에 따른 화합물이 선행 기술에 비하여 유리한 점은 하기와 같다:

- 높은 안정성,

- 높은 효소 활성,

- 간편하고 경제적인 합성,

- 기 공지된 모든 생화학적 검출법에 사용될 수 있음.

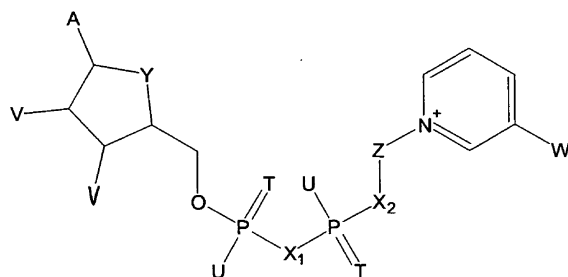
기 공지된 생화학적 검출법들의 단점들은, 예컨대 효소를 중합체 네트워크에 도입함에 따라 본 발명을 바람직하게는 안정화 제형물과 조합 사용하여 안정한 NAD/NADP 유도체를 제공함으로써 대부분 제거될 수 있다. 아울러, 안정화 첨가제를 사용하는 것이 필수적인 것은 아니다. 이는, 수반되는 반응성 물질의 수가 적을수록 분석물 측정을 위한 안정한 제형물을 수득할 가능성이 증가함에 따라, 특히 유리한 것이다.

본 발명은 시험 소자에 있어 공효소로 사용되는, 적절한 효소 활성을 가지는 다수의 안정한 NAD/NADP 유도체를 포함하는 시험 소자를 제공한다.

안정한 NAD/NADP 유도체는 일반적으로 공지되어 있는 합성 공정으로 제조될 수 있다. 이에 있어서, 고리형 아미노 알코올의 아미노기는 Zincke 화학 작용에 의해 피리디늄 유도체로 전환된다. 이어서 1 차 OH기가 인산화되고 활성화된 AMP 유도체와 커플링되어 NAD 유도체를 형성한다. 다르게는, 또한 1 차 OH기가 우선 인산화된 다음 아미노기가 Zincke 반응에 의해 피리딘으로 전환될 수도 있다.

또 다른 합성 경로는 1 차 알코올을 활성화하여 토실레이트 또는 요오드화물을 형성한 다음 ADP를 알킬화하는 것이다.

본 발명에 따른 시험 소자의 바람직한 구현에는 예컨대 하기 화학식 (I')의 화합물을 포함한다:



(I')

[식에서,

A = 아데닌 또는 그의 유사물이고,

T = 각 경우에 있어 독립적으로 O, S를 의미하고,

U = 각 경우에 있어 독립적으로 OH, SH, BH_3^- , $BCNH_2^-$ 를 의미하고,

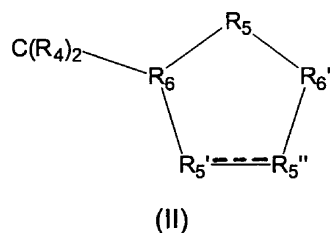
V = 각 경우에 있어 독립적으로 OH 또는 포스페이트기를 의미하고,

W = R이 각 경우에 있어 독립적으로 H 또는 C_1-C_2 -알킬을 의미하는 COOR, $CON(R)_2$, COR, $CSN(R)_2$ 이고,

X_1 , X_2 = 각 경우에 있어 독립적으로 O, CH_2 , $CHCH_3$, $C(CH_3)_2$, NH, NCH_3 를 의미하고,

Y = NH, S, O, CH_2 이고,

[0051] Z = 포화 또는 불포화된 탄소환형 또는 헤테로환형 5 원 고리, 특히 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염 또는 임의로는 그의 환원형임:



[0052]

[0053] {식에서, R5'와 R5'' 사이에는 단일 또는 이중 결합이 존재할 수 있고,

[0054] R4 = 각 경우에 있어 독립적으로 H, F, Cl, CH₃를 의미하고,

[0055] R5 = CR₄이고,

[0056] R5'와 R5'' 사이에 단일 결합이 존재하는 경우에는,

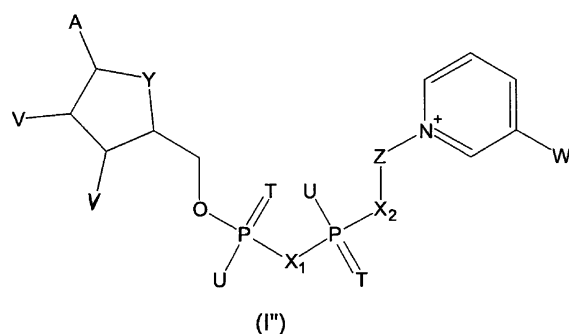
[0057] R5' = O, S, NH, NC₁-C₂-알킬, CR₄, CHOH, CHOCH₃이며,

[0058] R5'' = CR₄, CHOH, CHOCH₃이고,

[0059] R5'와 R5'' 사이에 이중 결합이 존재하는 경우에는, R5' = R5'' = CR₄이고,

[0060] R6, R6' = 각 경우에 있어 독립적으로 CH, CCH₃를 의미함}].

[0061] 하기 화학식 (I'')의 화합물은 본 발명의 또 다른 과제이다:



[0062]

[0063] [식에서,

[0064] A = 아데닌 또는 그의 유사물이고,

[0065] T = 각 경우에 있어 독립적으로 O, S를 의미하고,

[0066] U = 각 경우에 있어 독립적으로 OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻를 의미하고,

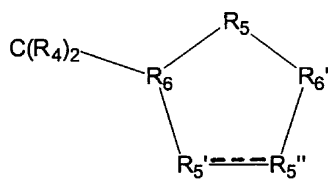
[0067] V = 각 경우에 있어 독립적으로 OH 또는 포스페이트기를 의미하고,

[0068] W = R이 각 경우에 있어 독립적으로 H 또는 C₁-C₂-알킬을 의미하는 COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂이고,

[0069] X₁, X₂ = 각 경우에 있어 독립적으로 O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃를 의미하고,

[0070] Y = NH, S, O, CH₂이고,

[0071] Z = 포화 또는 불포화된 탄소환형 또는 헤테로환형 5 원 고리, 특히 하기 화학식 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 염 또는 임의로는 그의 환원형임:



(II)

{식에서, R5'와 R5" 사이에는 단일 또는 이중 결합이 존재할 수 있고,

R4 = 각 경우에 있어 독립적으로 H, F, Cl, CH₃을 의미하고,

R5= CR₄₂이고,

R5'와 R5" 사이에 단일 결합이 존재하는 경우에는,

R5' = O, S, NH, NC₁-C₂-알킬, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃이며,

R5" = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃이고,

R5'와 R5" 사이에 이중 결합이 존재하는 경우에는, R5' = R5" = CR₄이고,

R6, R6' = 각 경우에 있어 독립적으로 CH, CCH₃를 의미하고,

단, R5 = CH₂, T = O, U = 각 경우에 있어 OH, V = OH, W = CONH₂, X = O, 및 Y = O인 경우에는, R5' 및 R5"가 동시에 CHOH는 아님}],

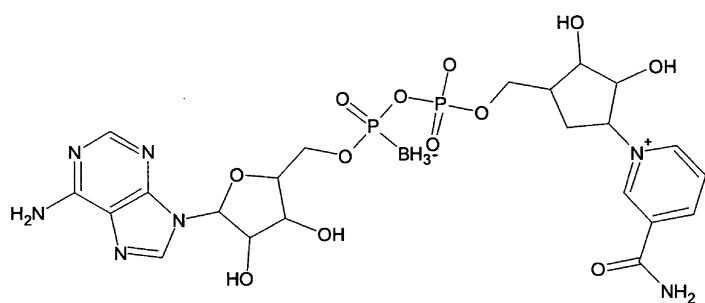
바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 화합물은 C₈-치환 및 N₆-치환된 아데닌과 같은 아데닌 유사물, 7-데아자와 같은 데아자 이형체, 8-아자와 같은 아자 이형체 또는 7-데아자 또는 8-아자와 같은 조합물, 또는 7-데아자 이형체가 7 위치에서 할로젠, C₁-C₆-알킬, C₁-C₆-알케닐 또는 C₁-C₆-알킬로 치환될 수 있는 포르마이신과 같은 탄소환형 유사물을 함유한다.

또 다른 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 리보오스 대신, 예컨대 2-메톡시데옥시리보오스, 2'-플루오로데옥시리보오스, 핵시톨, 알트리톨을 함유하는 아데노신 유사물, 또는 2 환형, LNA 및 3 환형 당과 같은 다환형 유사물을 함유한다.

특히 (다이)포스페이트 산소는 또한, 예컨대 O⁻가 S⁻ 및/또는 BH₃⁻로, O가 NH, NCH₃ 및/또는 CH₂로, 및 =O가 =S로 등전자적으로 치환될 수 있다.

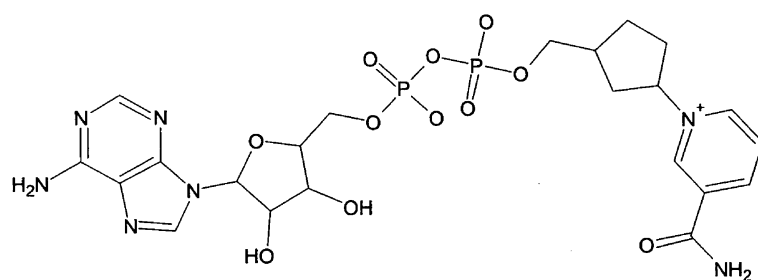
바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 화합물의 하나 이상의 잔기 U는 OH와 상이하며, 특히 바람직하게는 하나 이상의 잔기 U = BH₃⁻이다.

특히 바람직한 구현예는 하기와 같은 유도체인 보라노 카바NAD, c-펜틸 NAD, 피롤릴 NAD, 퓨라닐 NAD, 카바NAD 사이클로포스페이트, 카바NADP, 피롤리디닐 NAD와 더불어, 이들을 함유하는 시험 소자이다:



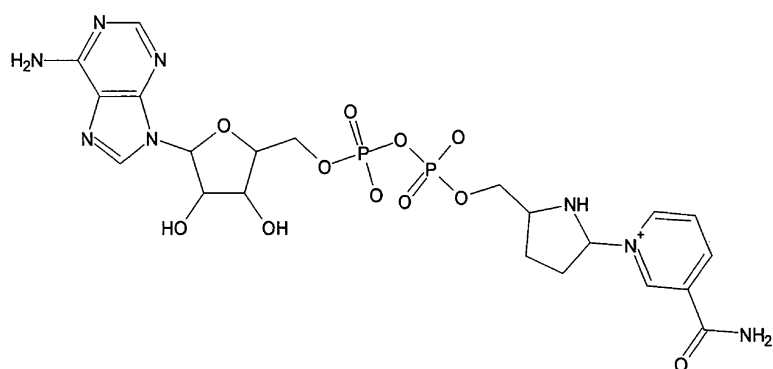
보라노 카바 NAD

[0087]



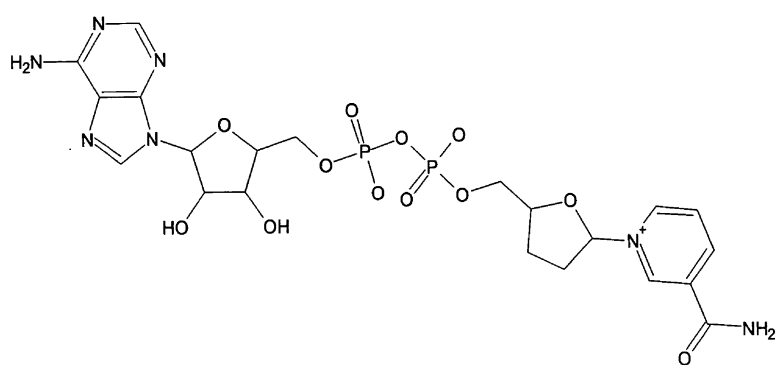
사이클로펜틸 NAD

[0088]



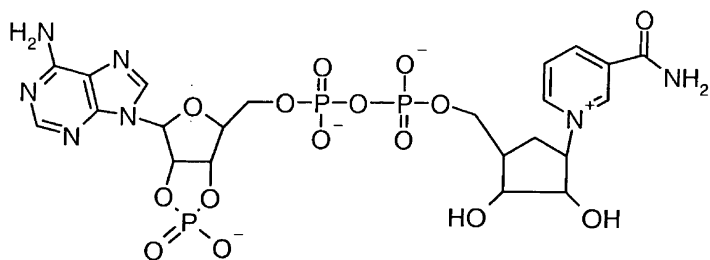
피롤릴 NAD

[0089]



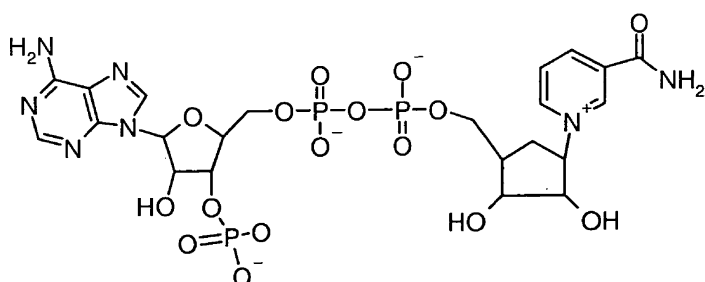
퓨라닐 NAD

[0090]



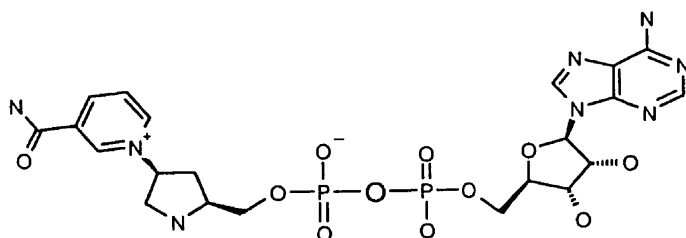
카바 NAD 사이클로포스페이트

[0091]



카바 NADP

[0092]



피롤리딘 NAD

[0093]

[0094]

분석물의 생화학적 검출, 예컨대 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변과 같은 체액, 또는 폐수 또는 식품의 시료에 관한 매개변수는 진단에 있어 중요 사항이다. 이러한 시험에 있어서 측정 대상 분석물은 적절한 효소 및 공효소와 접촉하게 된다.

[0095]

그리하여, 본 발명의 또 다른 과제는 본 발명에 따른 화합물이 적절한 효소와 조합하여 이루어지는 효소-공효소 복합체이다.

[0096]

산화 환원 반응에 의해 검출될 수 있는 임의의 생물학적 또는 화학적 물질은 분석물, 예컨대 공효소 의존성 효소의 기질인 물질 또는 공효소 의존성 효소 그 자체로서 측정될 수 있다. 분석물의 바람직한 예는 포도당, 젖산, 말산, 글리세롤, 알코올, 콜레스테롤, 트라이글리세라이드, 아스코르브산, 시스테인, 글루타티온, 펩타이드, 요소, 암모늄, 살리실레이트, 피루베이트, 5'-뉴클레오타이드아제, 크레아틴 키나아제 (CK), 락테이트 탈수

소효소 (LDH), 이산화탄소 등이다.

- [0097] 효소 기질의 검출에 있어서, 시험 소자는 바람직하게는 공효소에 더하여, 기질을 검출하는 데 적합한 효소를 함유한다. 적절한 효소는, 예컨대 포도당 탈수소효소 (E.C.1.1.1.47), 락테이트 탈수소효소 (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), 말레이트 탈수소효소 (E.C.1.1.1.37), 글리세롤 탈수소효소 (E.C.1.1.1.6), 알코올 탈수소효소 (E.C.1.1.1.1), 알파-하이드록시부티레이트 탈수소효소, 소르비톨 탈수소효소 또는 아미노산 탈수소효소, 예컨대 L-아미노산 탈수소효소 (E.C.1.4.1.5)로부터 선택되는 탈수소효소이다. 추가의 적절한 효소는 포도당 산화 효소 (E.C.1.1.3.4) 또는 콜레스테롤 산화 효소 (E.C.1.1.3.6)와 같은 산화 효소, 또는 아스파테이트 또는 알라닌 아미노트랜스퍼라아제, 5'-뉴클레오타이다아제 또는 크레아틴 키나아제와 같은 아미노트랜스퍼라아제이다.
- [0098] 효소의 검출에 있어서, 시험 소자는 바람직하게는 공효소에 더하여, 효소 검출에 적합한 효소 기질을 함유한다.
- [0099] 본 발명의 또 다른 과제는 효소 반응에 의해 시료 중의 분석물을 검출하기 위한, 본 발명에 따른 화합물 또는 본 발명에 따른 효소-공효소 복합체의 용도이다. 이와 관련하여, 포도당 탈수소효소 (GlucDH)의 보조 하에 포도당을 검출하는 것이 특히 바람직하다.
- [0100] 분석물과의 반응 (분석물이 효소 기질인 경우) 또는 분석물 촉매화 반응 (분석물이 효소인 경우)에 의한 공효소, 즉 본 발명에 따른 화합물의 변화는 대체로 임의의 원하는 방식으로 검출될 수 있다. 근본적으로, 선행 기술에 의해 공지되어 있는 모든 효소 반응 검출법이 사용될 수 있다. 그러나 공효소의 변화는 바람직하게는 광학적 방법에 의해 검출된다. 광학적 검출법에는, 예컨대 흡수, 형광, 원편광 이색성 (CD), 광학적 회전 분산 (ORD), 굴절률 등의 측정이 포함된다. 공효소의 변화는 특히 바람직하게는 형광 측정에 의해 검출된다. 형광 측정은 민감도가 높아 소형화된 시스템 중의 낮은 분석물 농도까지도 검출할 수 있다.
- [0101] 액체 시험은 시약이 예컨대 수성 또는 비수성 액체 중 용액 또는 현탁액 형태로 존재하는, 또는 분말 또는 또는 동결건조물로서 존재하는 분석물을 검출하는 데 사용될 수 있다. 그러나 건조 시험을 사용하는 것도 또한 가능하며, 이러한 경우 시약은 담체, 시험 스트립에 적용된다. 상기 담체는, 예컨대 검사 대상인 시료 액체에 의해 적셔진 흡수성 또는/및 팽창성 물질을 포함하는 시험 스트립일 수 있다.
- [0102] 그러나 효소-공효소 복합체가 혼입된 겔 매트릭스가 또한 검출 시약으로 사용될 수 있다 (DE 102 21845 A1 참조).
- [0103] 이러한 경우, 효소는 본 발명에 따른 화합물과 함께 매트릭스로 중합될 수 있거나, 또는 중합 이후 매트릭스가 효소의 존재 하에 공효소 용액과 접촉하여 상응하는 효소-공효소 복합체가 형성될 수 있다.
- [0104] 본 발명의 또 다른 과제는 시약 키트 및 분석물 검출을 위한 이의 용도에 관한 것이다. 시약 키트는 본 발명에 따른 화합물, 적절한 효소 및 적절한 반응 완충용액을 함유할 수 있다. 적절한 효소들은 이미 기재된 바 있다. 본 발명에 따른 시약 키트는 다양한 방식으로 사용될 수 있으며, 포도당, 젖산, 말산, 글리세롤, 알코올, 콜레스테롤, 트라이글리세라이드, 아스코르브산, 시스테인, 글루타티온, 펩타이드, 요소, 암모늄, 살리실레이트, 피루베이트, 5'-뉴클레오타이다아제, CK, LDH 및 이산화탄소 등과 같은 분석물을 측정하는 데 사용될 수 있다. 혈액 중 포도당을 검출하기 위해서는 본 발명에 따른 화합물 및 포도당 탈수소효소 (E.C.1.1.1.47)를 함유하는 시약 키트가 바람직하다.
- [0105] 본 발명에 따른 시약 키트는 건조 또는 액체 시험에 있어 분석물을 검출하는 데 사용될 수 있다.
- [0106] 본 발명의 또 다른 과제는 분석물의 형광 측정 또는 광도 측정 검출을 위한 시험 스트립에 관한 것이다. 이와 같은 시험 스트립은 흡수성 또는/및 팽창성 물질 상에 고정된 공효소 및 적절한 효소 또는 효소 기질로서 상기된 바와 같은 화합물을 함유한다. 적절한 물질은, 예컨대 셀룰로오스, 플라스틱 등으로부터 선택될 수 있다.
- [0107] 본 발명의 또 다른 과제는 하기의 단계들을 포함하는 분석물 검출법을 포함한다:
- [0108] (a) 공효소를 포함하는 본 발명에 따른 시험 소자 또는 시약 키트와 시료를 접촉시키는 단계, 및
- [0109] (b) 예컨대 공효소의 변화에 기초하여, 분석물을 검출하는 단계.
- [0110] 본 발명의 또 다른 이점은 공효소의 형광 발광이 장파장 이동을 나타내어 시험 소자의 다른 물질 또는/및 시료의 형광 발광에 대한 낮은 간섭이 존재한다는 것이다.

[0111] 제시되어 있는 본 발명의 과제에 관한 모든 바람직한 구현예는 또한 본 발명의 다른 과제들, 예컨대 본 발명에 따른 화합물의 바람직한 구현예들에도 적용되는 것이다.

[0112] 본 발명은 이하의 도면 및 실시예에 의해 보다 상세히 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0113] 도 1

카바NAD (cNAD)의 합성 공정에 관한 도식.

도 2

8 °C 및 37 °C에서 NAD에 스트레스를 가한 결과에 관한 그래프.

도 3

8 °C 및 37 °C에서 카바NAD에 스트레스를 가한 결과에 관한 그래프.

도 4

ADP를 알킬화하여 보라노 NAD를 합성하는 공정 (이때, $Y = BH_3$ 인 경우, ADP의 베타 포스페이트만이 알킬화되었음)에 관한 도식

도 5

피롤리딘 NAD (pNAD)의 합성 공정에 관한 도식. 각 반응 단계의 화합물 개수 및 수율은 구조식 아래 기재되어 있음.

도 6

NAD 및 pNAD의 흡수 스펙트럼.

도 7

NADH 및/또는 pNADH의 흡수 스펙트럼.

도 8

GlucDH 복합체로서의 NADH 및 pNADH의 형광 스펙트럼 (발광 스펙트럼).

도 9

GlucDH 복합체로서의 NADH 및 pNADH의 형광 스펙트럼 (여기 스펙트럼).

도 10

NAD 및 pNAD의 안정성 비교.

도 11

NAD 및 cNAD의 흡수 스펙트럼.

도 12 및 도 13

NADH 및/또는 cNADH의 흡수 스펙트럼.

도 14

GlucDH 복합체로서의 NADH 및 cNADH의 형광 스펙트럼.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 안정한 NAD/NADH 유도체의 실험적 제조

[0115] 안정한 NAD/NADH 유도체의 제조는 예로서 카바NAD (화합물 9, 도 1) 및 피롤리딘 NAD (화합물 18, 도 5)에 기초하여 제시되어 있다. 적절한 합성 공정을 사용하여 추가의 유도체를 제조할 수도 있다. 개시 시약으로

사용한 상응하는 아미노 알코올은 하기 문헌들에 공지되어 있다:

[0116] 2-아미노-1,4-안하이드로-2,3-다이데옥시-L-트레오-펜티톨: [Huryn, Donna M.; Sluboski, Barbara C.; Tam, Steve Y.; Todaro, Louis J.; Weigele, Manfred Tetrahedron Letters (1989), 30(46), 6259-62].

[0117] 3-아미노-(1R,3S)-사이클로펜탄메탄올: [Beres, J.; Sagi, G.; Tomoskozi, I.; Gruber, L.; Gulacsi, E.; Otvos, L.; Tetrahedron Letters (1988), 29(22), 2681-4].

[0118] A) 카바NAD의 제조

[0119] I. 1R-(-)-엑소-시스-5,6-다이하이드록시-2-아자바이사이클로[2.2.1]헵탄-3-온 (1)

[0120] 1R-(-)-2-아자바이사이클로[2.2.1]헵탄-5-엔-3-온 16.4 g (147 mmol)의 아세톤 400 ml 중 용액을 1 L 둥근 바닥 플라스크 중의 N-메틸-모르폴린-N-옥사이드 22.5 g (167 mmol)의 탈이온수 80 ml 중 용액에 첨가하였다. 빙냉 중에 tert-부탄올 중 2.5 % 사산화오습 용액 15 ml (1.2 mmol)를 15 분 이내에 첨가하였다. 이어서 그 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다.

[0121] 회전식 증발기에서 증류에 의해 용매를 제거하였다. 이를 100 ml로 교반한 다음, 회전식 증발기에서 다시 증류 제거하였다. 이어서, 탈이온수 600 ml에 용해한 후 활성 탄소 35 g을 첨가하였다. 그 혼합물을 1 시간 동안 격렬하게 교반한 다음, Seitz K 250 침층 여과기로 여과하였다. 회전식 증발기에서 증류에 의해 여과액으로부터 물을 제거하였다. 생성물을 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0122] TLC (Merck 실리카겔 60 F-254): 에틸 아세테이트/메탄올/빙초산 7:2:1, R_f 0.75 (개시 물질), 0.53 (1). TDM으로 착색/염소 챔버 내에서 전개.

[0123] TDM 시약: 용액 1: 빙초산 40 ml 및 탈이온수 200 ml 중의 N,N,N',N'-테트라메틸-4,4'-다이아미노-다이페닐 메탄 10 g. 용액 2: 탈이온수 400 ml 중의 염화칼륨 20 g. 용액 3: 빙초산 10 ml에 난하이드린 0.3 g을 용해한 후 탈이온수 90 ml를 첨가함. 완성 시약: 용액 1 과 2 의 혼합 및 6 ml의 용액 3 첨가.

[0124] II. 1R-(-)-엑소-시스-5,6-다이메틸메틸렌다이옥시-2-아자바이사이클로[2.2.1]헵탄-3-온 (2)

[0125] 미정제 생성물 1 을 순수 에탄올 200 ml 중에서 1 시간 동안 환류 비등시켰다. 다이메톡시프로판 400 ml (3.26 mol) 및 피리딘 하이드로클로라이드 250 mg (2.2 mmol)를 첨가한 후, 그 혼합물을 추가로 15 분 동안 환류 비등시켰다. 포화 탄산수소나트륨 용액 10 ml를 첨가한 후, 용액을 회전식 증발기에서 진공 하에 증발 건조시켰다. 잔여물에 클로로포름 500 ml, 포화 염화나트륨 용액 150 ml 및 포화 탄산수소나트륨 용액 75 ml를 첨가하고, 분리 깔때기 내로 옮겼다. 진탕에 의해 추출한 후, 상 분리가 일어나도록 밤새 정치시켰다.

[0126] 유기상을 분리하고 수성상을 각 경우에 있어 클로로포름 200 ml을 이용하여 추가로 2 회 추출하였다. 조합된 유기상을 황산 마그네슘으로 건조시켰다. 여과에 의해 건조제를 제거한 후, 회전식 증발기에서 감압 하에 증류에 의해 용매를 제거하였다. 미정제 생성물 (24.9 g = 92 %)을 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0127] TLC (Merck 실리카겔 60 F-254): 에틸 아세테이트/메탄올/빙초산 7:2:1, R_f 0.84. TDM으로 착색/염소 챔버 내에서 전개).

[0128] III. 1R-(-)-4-N-tert-부틸옥시카보닐-엑소-시스-5,6-다이메틸메틸렌-다이옥시-2-아자바이사이클로[2.2.1]헵탄-3-온 (3)

[0129] 다이-tert-부틸 다이카보네이트 41.5 g (190 mmol) 및 4-다이메틸-아미노피리딘 0.83 g (6.8 mmol)을 아르곤 하에 24.9 g (135.7 mmol)의 미정제 생성물 2 의 순수 클로로포름 450 ml 중 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 기체 발생이 멈출 때까지 교반하면서 환류 비등시켰다. 혼합물을 40 g의 실리카겔 60 으로 충전된 컬럼을 통해 여과하고 클로로포름으로 평형시켰다. 이를 클로로포름 100 ml로 세정하였다. 회전식 증발기에서 감압 하에 증류에 의해 여과액으로부터 용매를 제거하였다. 미정제 생성물을 10 mbar 및 40 °C에서 60 분 동안 건조시켰다. 이를 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0130] TLC (Merck 실리카겔 60 F-254): 에틸 아세테이트/헥산 3:2, R_f 0.85. TDM으로 착색/염소 챔버 내에서 전개).

[0131] IV. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(N-tert-부틸옥시카보닐)아미노-2,3-다이메틸-메틸렌다이옥시-1-(하이드록시메틸)사이클로펜탄 (4)

[0132] 미정제 생성물 3 을 실온에서 교반하면서 테트라하이드로퓨란 400 ml에 용해한 다음, 탈이온수 80 ml를 첨가하였다. 4 ℃로 냉각시킨 후, 나트륨 보로하이드라이드 5.3 g을 한 번에 모두 첨가하고 밤새 교반하면서 혼합물을 서서히 실온까지 가열하였다. 에탄올 100 ml를 첨가하고, 실온에서 6 시간 동안 교반하였다. 회전식 증발기에서 감압 하에 증류에 의해 용매를 제거하였다. 포화 염화나트륨 용액 300 ml 및 에틸 아세테이트 650 ml를 첨가하고, 이를 분리 깔때기로 옮겼다. 유기상을 분리하고 수성상을 에틸 아세테이트 350 ml로 다시 세정하였다. 조합된 유기상을 황산 마그네슘으로 건조시켰다. 여과에 의해 건조제를 제거한 후, 회전식 증발기에서 감압 하에 증류에 의해 용매를 제거하였다. 미정제 생성물 (42.2 g)을 컬럼 크로마토그래피 및 실리카겔 60 (컬럼 h = 93 cm, d = 10 cm, 용리액: THF/헥산 1:3, 이어서 THF/헥산 2:3, 유속 3 l/h)에 의해 정제하였다. 분획 40 ml를 수합하였다. 그 분획을 TLC (Merck 실리카겔 60 F-254: 에틸 아세테이트/헥산 3:2, R_f 0.45, TDM으로 착색/염소 챔버 내에서 전개)에 의해 모니터링하였다. 회전식 증발기에서 진공 하에 증류에 의해 조합 생성물로부터 용매를 제거하였다, 수득량 24.9 g.

[0133] V. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-아미노-2,3-다이하이드록시-1-(하이드록시메틸)사이클로펜탄 (5)

[0134] 탈이온수 8 ml 및 이어서 트라이플루오로아세트산 80 ml를 11.09 g (38.6 mmol)의 4 에 첨가하였다. 이를 실온에서 6 시간 동안 격렬하게 교반하여, 투명한 담황색 용액이 형성되었다. 탈이온수 200 ml를 첨가한 후, 회전식 증발기에서 진공 하에 증발시켰다. 다시 탈이온수 200 ml를 첨가한 후, 회전식 증발기에서 진공 하에 다시 증발시켰다. 그 미정제 생성물을 초음파욕 중에 탈이온수 100 ml에 용해한 후 여과시켰다. 여과액을 Dowex 1×8 (100~200 메시, OH형) 이온 교환체 컬럼 (15×4.9 cm)에 적용하고 물로 용리시켜 300 ml의 부피 중 약 150 ml 이후에 생성물이 용리되도록 하였다 (pH 10.4). 분획을 TLC (Merck 실리카겔 60 F-254: 부탄올/빙초산/물 5:2:3, R_f 0.42, TDM으로 착색/ 염소 챔버 내에서 전개)에 의해 모니터링하였다. 회전식 증발기에서 진공 하에 증류에 의해 조합 생성물 분획으로부터 용매를 제거하여 무색 오일 5.2 g을 수득하였다.

[0135] VI. 니코틴아마이드의 Zincke 염 (6)

[0136] 다이니트로클로로벤젠 58.6 g을 질소 하에 용융한 다음, 그 용융물에 니코틴아마이드 29.32 g을 첨가하였다. 이를 110 ℃에서 2.5 시간 동안 가열하였다. 환류 냉각기를 통해 3:2 (v/v) 에탄올/물 혼합물 500 ml를 첨가한 후, 용액이 형성될 때까지 환류 비등시켰다. 실온에서 밤새 교반한 후, 50 % 에탄올/물 150 ml 및 물 100 ml를 첨가하고 분리 깔때기로 옮겨 회당 클로로포름 500 ml로 3 회 세정하였다. 실온에서 1 시간 동안 교반하여 분리한 수성상에 300 ml 및 활성 탄소 50 g을 첨가한 다음, Seitz K 700 침층 여과기로 여과시켰다. 여과액을 회전식 증발기에서 진공 하에 약 100 ml로 농축하였으며, 이때 욕 온도는 20 ℃를 초과하지 않아야 한다. 이를 물 300 ml로 희석한 후, 교반하면서 실온에서 나트륨테트라플루오로보레이트 70 g을 첨가하였다. 그 침전물을 메탄올/물로부터 재결정하였다. 결정화물을 여과에 의해 제거하고, 소량의 아세톤 및 이어서 다이에틸에터로 세정한 다음, 40 ℃에서 고도의 진공 하에 24 시간 동안 건조시켰다 (수율 21.1 g, 23 %). 분획을 TLC (Merck 실리카겔 60 F-254: 부탄올/빙초산/물 5:2:3, R_f = 0.56)에 의해 모니터링하였다.

[0137] VII. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(3-카복시아마이드피리딘-1-일)-2,3-다이하이드록시-1-(하이드록시메틸)사이클로펜탄 (6) = 카바 니코틴아마이드 모노뉴클레오사이드 = 카바 NMN

[0138] 90 분 이내에 4.5 g (31 mmol)의 사이클로펜틸아민 5 의 순수 메탄올 110 ml 중 용액을 15.3 g (40.7 mmol)의 Zincke 염 6 의 순수 메탄올 110 ml 중 용액에 적가하면서 실온에서 교반하였다. 다이이소프로필에틸아민 1 ml 를 첨가한 다음, 실온에서 2 일 동안 교반하였다. 물 500 ml를 첨가하고, 분리 깔때기로 옮긴 다음, 회당 메틸렌 클로라이드 200 ml로 2 회 세정하였다. 회전식 증발기에서 진공 하에 증류에 의해 상기 분리된 수성상으로부터 물을 제거하였다. 잔여물을 물 100 ml 내로 취하고, 다음과 같은 Sephadex C25 (Na+형) 상의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다: 컬럼 70×7.5 cm, 완충용액 A (탈이온수)에서 완충용액 B (수중 0.35 M NaCl)로의 용출, 유속 200 ml/h. 분획 15 ml를 수합하여 TLC (Merck 실리카겔 60 F-254: 부탄올/빙초산/ 물 5:2:3, R_f 0.22)에 의해 모니터링하였다.

[0139] 회전식 증발기에서 진공 중 증류에 의해 상기 조합된 생성물 분획으로부터 용매를 제거하였다. 염 함유 잔여물을 뜨거운 에탄올 500 ml와 함께 비등시켰다. 이를 열 여과시킨 후 실온에서 12 시간 동안 정치시켰다. 침전물을 여과에 의해 제거하고 회전식 증발기에서 진공 하 증류에 의해 여과액으로부터 용매를 제거하였다.

수득량 7 g.

[0140] VIII. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(3-카복스아미도피리딘-1-일)-2,3-다이하이드록시-1-포스포토일메틸)사이클로펜탄 (6) = 카바 NMN-모노포스페이트

[0141] 0 °C에서 포스포록시 클로라이드 20 ml 및 트라이메틸 포스페이트 50 ml의 혼합물을 카바NMN 7 g (27.7 mmol)의 무수 트라이메틸 포스페이트 80 ml 중 현탁액에 첨가하였다. 이를 0 °C에서 2 시간 동안, 이어서 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 빙냉시키면서 물 300 ml를 첨가한 후, 그 혼합물을 회전식 증발기에서 진공 하에 증발시켜 10 ml로 만들었다. 이를 물 100 ml 내로 취하고, 여과한 후 다음과 같은 Sephadex C25 (NEt3H+형) 상의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다: 컬럼 66×9 cm, 완충용액 A (탈이온수)에서 완충용액 B (0.60 M 암모늄 아세테이트)로의 용출, 유속 200 ml/h. 분획 15 ml를 수합하고, TLC (Merck 실리카겔 60 F-254 플레이트: 아이소부티르산/암모니아/물 66:1:33, R_f 0.25)에 의해 모니터링하였다. 회전식 증발기에서 진공 중 증류에 의해 상기 조합된 생성물 분획으로부터 용매를 제거하였다. 잔여물을 물 100 ml에 용해한 후 동결건조시켰다. 이러한 절차를 3 회 반복하였다. 수득량 4.0 g.

[0142] IX. 카바NAD (9)

[0143] 실온에서 1 시간 이내에, AMP 모르폴레이트 1.25 g (30 mmol)의 순수 DMF 40 ml 중 용액을 카바 NMN 모노포스페이트 3.31 g (10 mmol)의 순수 DMF 40 ml 중 용액 및 순수 아세트니트릴 중 3.5 % 테트라졸 78 ml (39 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 그 혼합물을 실온에서 2 일 동안 교반하였다.

[0144] 트라이아이스/아세톤 상에서 냉각시키면서 10 % KHCO_3 수용액을 사용하여 pH를 6.5 로 조정하였다. 이를 물 500 ml로 희석한 후, 회전식 증발기에서 주의 깊게 진공 중 건조 농축하였다. 잔여물을 탈이온수 150 ml에 용해한 후, 다음과 같은 Sephadex QAE 25 (NEt3H+형) 상의 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다: 컬럼 65×4.5 cm, 완충용액 A (탈이온수)에서 완충용액 B (1 M 트라이에틸암모늄 카보네이트)로의 용출, 유속 200 ml/h. 분획 15 ml를 수합하고, TLC (Merck 실리카겔 60 F-254 플레이트: 아이소부티르산/암모니아/물 66:1:33, R_f 0.47)에 의해 모니터링하였다.

[0145] 회전식 증발기에서 진공 중 증류에 의해 상기 조합된 생성물 분획으로부터 용매를 증류 제거하였다. 잔여물을 물 100 ml에 용해한 후 동결건조시켰다. 이러한 절차를 3 회 반복하였다. 수득량 1.1 g.

[0146] 카바NAD의 안정성 검사

[0147] 0.1 M 염화칼륨 완충용액 중, pH 8 에서 카바NAD 및/또는 NAD의 10 mM 용액에 스트레스를 가하였다. 0.25, 75 및 175 시간 후에 HPLC 크로마토그래피에 의해 내용물을 측정하였다.

[0148] 완충용액 A: 100 mM KHPO_4 + 10 mM 테트라부틸암모늄 수소 설페이트, pH 6.9

[0149] 완충용액 B: 완충용액 A + 아세트니트릴 1:1

[0150] 유속: 1.0 ml/분, 검출: 254 nm

[0151] RP18 컬럼: L 125, 직경 4.6 mm

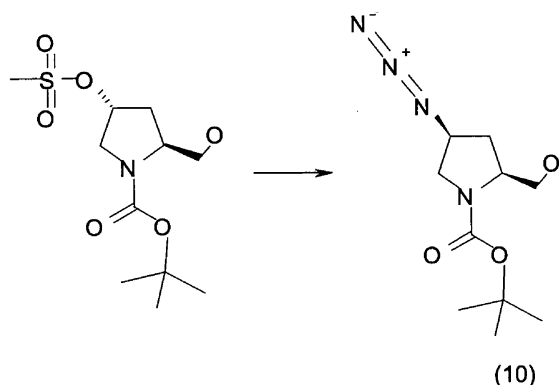
[0152] 구배: 40 분 이내에 35 % 완충용액 B로, 2 분간 유지 후, 3 분 이내에 0 % 완충용액 A로 변화.

[0153] 상기 여러 시간 동안 스트레스를 가한 후의 HPLC 백분을 범위는 도 2 및 3 에 제시되어 있다.

[0154] 분해 생성물 (니코틴아마이드, ADP-리보오스, AMP, ADP, 및 NAD에 관한 미공지 분해 생성물 및 cNAD에 관한 미공지 분해 생성물 Y1 및 Y2)의 발생은 cNAD가 NAD에 비해 매우 안정함을 나타내는 것이다.

[0155] B) 피롤리딘-NAD의 제조

[0156] I. pNAD 합성 제1단계 (화합물 10)



[0157]

[0158] 트랜스-N-t-BOC-O-메실-4-하이드록실-L-프롤리놀 (35.4 g, 120 mmol)을 DMF 500 ml에 용해한 후 물 75 ml에 용해된 나트륨 아자이드 (15.6 g, 240 mmol)를 첨가하고 5 시간 동안 70 °C로 가열하였다. 이어서 이를 실온에서 추가로 밤새 교반하고, 그 혼합물을 포화 염화나트륨 용액 1000 ml에 부은 후, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 에틸 아세테이트를 Na₂SO₄로 건조시킨 후 증발시켰다.

[0159] 잔여물 32.8 g (> 100 %)이 형성되었다 (이론값: 29 g).

[0160] TLC 및 MS 모니터링 이후 상기 미정제 생성물을 바로 추가 처리하였다. 하기와 같은 모니터링에 관하여 KG 60 F-254 플레이트 (이동 용매: 에틸 아세테이트 / 닐하이드린과 함께 분사됨) 상의 박층 크로마토그래피를 수행하였다:

[0161] 트랜스-N-t-BOC-O-메실-4-하이드록시-L-프롤리놀, R_f: 0.49

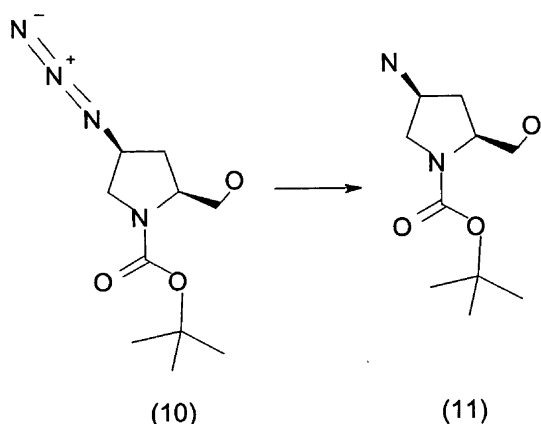
[0162] 생성물, R_f: 0.78

[0163] MS ESI ES+ 242

[0164] 생성물의 본질을 또한 NMR 분석에 의해 확인하였다.

[0165] 트랜스-N-t-BOC-O-메실-4-하이드록실-L-프롤리놀은 [Sanochemia Pharmazeutika AG, Cat. No. P-719]로부터 구입 가능하다.

[0166] II. pNAD 합성 제2단계 (화합물 11)



[0167]

[0168] 메탄올 500 ml 중에서 화합물 10 (120 mmol)을 Pd-탄소 (10 %) 2.0 g과 혼합한 후, 30 mbar에서 12 시간 동안 수소화시켰다. 상기 공정에서 반응 플라스크를 H₂로 수회 씻어내린 후, 흡입 여과에 의해 촉매를 제거하고 이를 농축하였다.

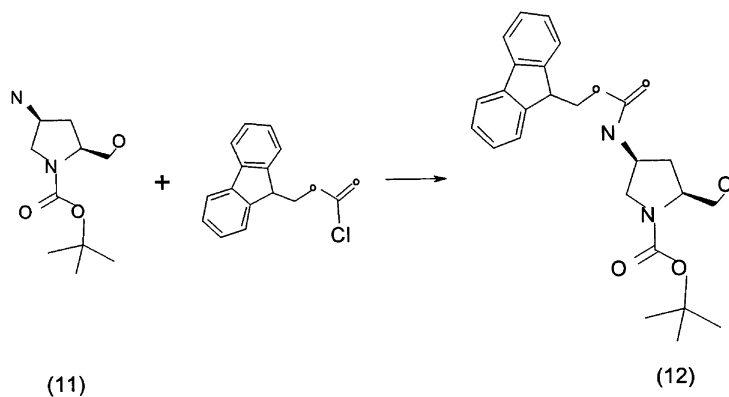
[0169] 무색 오일이 형성되었다 (이 오일은 높은 공기 민감성으로 인해 곧바로 추가 처리되어야 함).

[0170] MS ESI ES+ 217 존재

[0171] TLC (아이소헥산/에틸 아세테이트 1/1 / KG 254 F / 닐하이드린): 처음에는 생성물이 잔존함.

[0172] 생성물의 본질을 또한 NMR 분석에 의해 확인하였다.

[0173] III. pNAD 합성 제3단계 (화합물 12)



[0174]

[0175] 화합물 11 (MW: 216.28) 120 mmol을 NaHCO_3 (11.0 g, 130 mmol) 및 Fmoc 클로라이드 (33.8 g, 130 mmol)를 함유하는 다이옥산 500 ml 중에 혼합한 후, 실온에서 밤새 교반하였다. 수득된 염을 여과에 의해 제거하고, 용액을 증발시킨 후, 잔여물을 실리카겔 컬럼 (아이소헥산 및 아이소헥산/EE 8/2 - 1/1)을 통해 정제하였다. 주요 분획을 39.0 g = 74.1 % * (이론값 = 52.6 g)로 수득하였다.

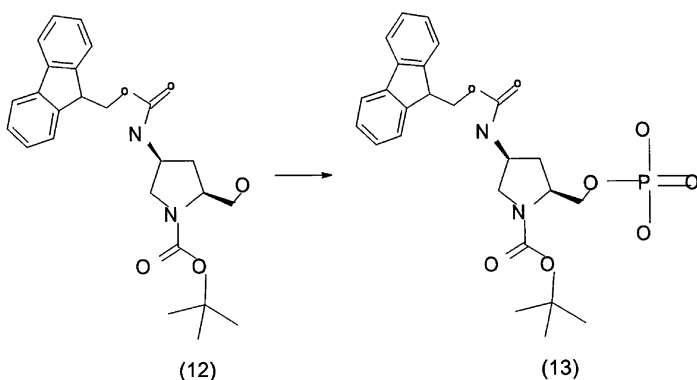
[0176] TLC (KG 60 F254 이동 용매 아이소헥산/에틸 아세테이트 2:1): R_f 0.13

[0177] MS ESI ES+ 439 / + 339

[0178] 생성물의 본질을 또한 NMR 분석에 의해 확인하였다.

[0179] * 수율은 제1단계에서 추론된 결과를 참조한 것임.

[0180] IV. pNAD 합성 제4단계 (화합물 13)



[0181]

[0182] 제3단계의 화합물 12 (7.08 g, 16.1 mmol)를 트라이메틸 포스페이트 80 ml에 용해한 다음, 빙욕 중 0 °C로 냉각시켰다. 트라이메틸 포스페이트와 혼합된 POCl_3 (트라이메틸 포스페이트 13 ml 중에 새로 용해시킨 POCl_3 13 ml)를 적하 깔때기에 첨가하여 아르곤 하에 20 분 이내에 분할 첨가하였다. 발열 반응 하에 온도가 5 °C까지 상승하였다. 이어서 피리딘 2.6 ml를 첨가하고, 이를 아르곤 하에 0 °C에서 추가로 40 분 동안 교반하였다.

[0183]

반응 용액을 냉각시킨 1 M 트라이에틸암모늄 수소 카보네이트 용액 (pH = 8) 800 ml에 주입하여 적가하였다. 첨가를 완료한 후, 이를 추가로 1 시간 동안 교반하였다. 이어서 그 약간 흐린 용액을 포화 NaCl 용액 1 L에 (빠르게) 적가하였다. 이를 추가로 밤새 교반하여 결정화를 촉진하였다. 침전물을 여과에 의해 제거하였다. Diaion 컬럼을 통해 잔여물을 탈염시켰다. 이를 위해, Diaion 500 g을 아이소프로판올/물 1/1에 첨가한 후, 밤새 팽윤되도록 하였다. Diaion을 컬럼에 충전하고 물로 행켰다. 잔여물의 슬러리를 물 100 ml, pH 3.5 (아세트산) 중에서 형성시킨 다음, 컬럼에 적용한 후 염화나트륨이 남지 않도록 물 (pH 3.5)로 행켰다. 이어서 그 물질을 25 % 아이소프로판올 (pH 3.5)을 이용한 컬럼으로부터 용출시켰다. 그 용액을 실온에서 고진공 중에 증발시켰다.

[0184]

잔여물 = 2.6 g = 31.3 %

[0185]

TLC RP8 F254 / MeOH/물 9/1

[0186]

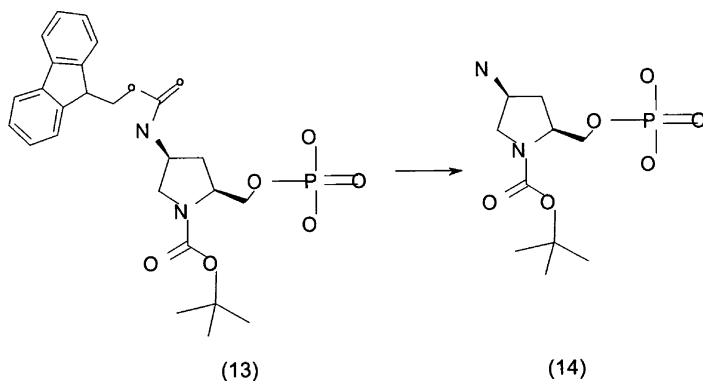
MS ESI ES- 517.13

[0187]

생성물의 본질을 또한 NMR 분석에 의해 확인하였다.

[0188]

V. pNAD 합성 제5단계 (화합물 14)



[0189]

[0190]

제4단계의 화합물 13 (4.10 g, 7.9 mmol)의 메탄올 250 ml 및 25 % 암모니아 83 ml 중 혼합물을 실온에서 밤새 교반한 후, 실온에서 진공 중 증발시켰다. 잔여물을 물 200 ml 중에 취한 후, 에틸 아세테이트 100 ml와 함께 3 회 교반하였다. 불용 성분을 여과에 의해 제거하고; 투명한 수상을 분리하여 다시 실온에서 증발시켰다.

[0191]

잔여물 = 2.56 g = 100 %

[0192]

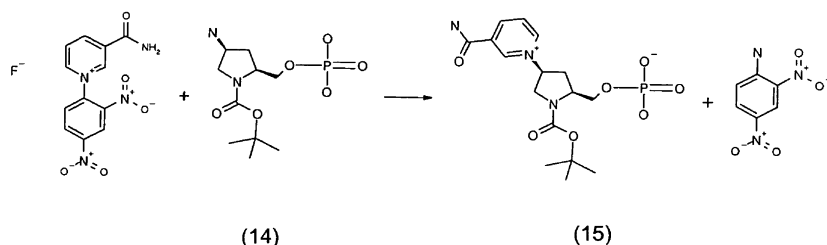
MS ESI ES- 295

[0193]

NH₃ 양이온을 제거하기 위해, 잔여물을 휘니그 염기 (Hueniig's base)에 2 회 용해하되, 각 회마다 다시 고진공 중에 증발시켰다.

[0194]

VI. pNAD 합성 제6단계 (화합물 15)



[0195]

[0196]

Zincke 염 (2.66 g, 8.99 mmol)을 메탄올 50 ml에 부분적으로 용해시킨 후, 교반하면서 메탄올 50 ml에 용해된 제5단계의 화합물 14 (2.56 g, 8.31 mmol)를 적가하였다. 그 혼합물은 적색으로 착색되며 서서히 용해되었다. 이를 실온에서 추가로 밤새 교반한 후, 침전물을 여과에 의해 제거하였다. 여과액을 진공 중 증발

시킨 후, 물 100 ml 중에 취하고 에틸 아세테이트로 3 회 추출하였다.

[0197] 에틸 아세테이트 상은 부산물인 다이니트로아닐린을 함유하였고, 수상은 생성물 및 잔여 Zincke염을 함유하였다. 수상을 실온에서 진공 중 증발시켜 수득된 잔여물에 물 10 ml를 첨가한 후, 이를 자기 교반기에서 10 분 동안 교반하고 불용 성분을 여과에 의해 제거하였다. 생성물은 용해된 채로 남아 있었다. 이 용액을 물로 행군 Diaion HP20 컬럼 (1000 ml)에 적용한 후, 물 1000 ml로 2 회 행켰다. 이어서 이를 물/5 % 아이소프로판올로 행구고 양성 분획 (TLC RP8 MeOH/W 9/1 에 의해 검출됨)을 실온에서 증발시켰다. 아이소프로판올을 이용해 잔여물을 분말화한 후, 다이에틸 에터의 보조 하에 흡입 여과시켰다.

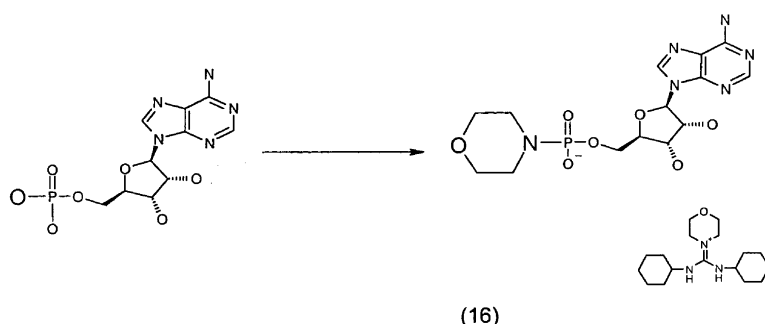
[0198] 잔여물 = 1.60 g = 47.9 %

[0199] TLC RP8 254 MeOH/W 9/1

[0200] MS ES⁻ 400.1 / ES⁺ 402.0 도 또한 이중 질량을 나타냄

[0201] 생성물의 본질을 또한 NMR 분석에 의해 확인하였다.

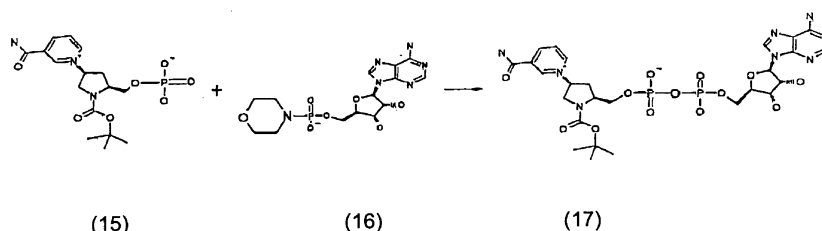
[0202] VIIa. pNAD 합성 제7a단계 (화합물 16)



[0203]

[0204] AMP산 (아데노신 모노포스페이트-유리산) (10 g, 27.5 mmol)의 메탄올 (나트륨으로 건조됨) 60 ml 및 모르폴린 (새로 증류됨) 5.3 ml (60 mmol) 중 혼합물을 교반하여 투명한 용액을 형성시켰다. 이어서 N,N'-다이사이클로헥실 카보다이이미드 (DCC) 17 g (82.5 mmol)을 첨가한 후, 수분을 차단하며 실온에서 밤새 교반하였다. 형성된 침전물 (DCH)을 흡입 여과시킨 후, 여과액을 30 °C에서 회전 증발시켰다. 이어서 이를 H₂O 150 ml/다이에틸에터 150 ml로 교반시킨 후, 다시 여과하였다. 상 분리 후, 수성상을 회당 다이에틸 에터 75 ml로 2 회 다시 추출하였다. 이어서 수성상을 실온에서 회전 증발시켰다. 잔여물을 피리딘에 추가로 2 회 용해하되, 각 회마다 다시 고진공 중에 회전 증발시켰다.

[0205] VII. pNAD 합성 제7단계 (화합물 17)



[0206]

[0207] AMP 모르폴리데이트 (제7a단계의 화합물 16) (2.53 g, 3.61 mmol), 제6단계의 화합물 15 (1.60 g, 3.98 mmol), 포르마마이드 중 0.2 M MnCl₂ 용액* (27.1 ml, 5.42 mmol) 및 무수 MgSO₄ (0.87 g, 7.95 mmol)의 혼합물을 실온에서 밤새 교반하자, 그 후 TLC (RP8 MeOH/W 9/1)에 의해 측정된 바와 같이 대량 전환되었다. 반응 혼합물을 아세토니트릴을 이용하여 침전시킨 후 흡입 여과시켰다.

[0208] 잔여물 = 5.3 g (이론 수득량 2.64 g)**

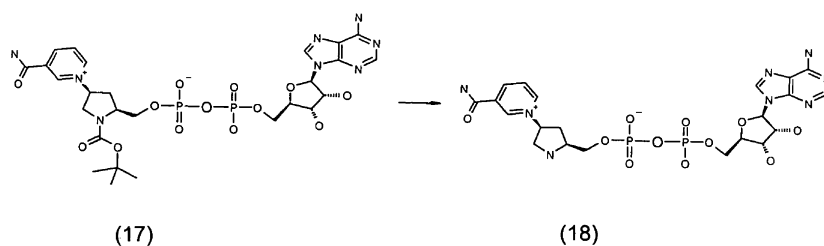
[0209] MS ESI ES- 729.3 = 생성물, ES- 415 = AMP 모르폴리테이트 양이온, ES- 400.2 / ES+ 402.1 화합물 15 (제6단계)의 잔여물

[0210] TLC RP 8 F254, R_f 0.085

[0211] * 이 용액을 제조하기 위해, 무수 $MnCl_2$ 2516 mg을 교반과 동시에 99.99 % 포름아마이드 100 ml에 용해한 후, 4A 분자체를 첨가하였음.

[0212] ** 잔여물은 미정제 생성물로서 추가 처리된 것임.

[0213] VIII. pNAD 합성 제8단계 (화합물 18, 피롤리딘-NAD)



[0214]

[0215] 트라이플루오로아세트산 (TFA) 5.0 ml를 제7단계의 화합물 17 (미정제 생성물, 약 50 % 염 함유) 500 mg에 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 교반한 다음, 증발 농축시켰다. 잔여물로서 무색 오일 500 ml이 형성되었다.

[0216] MS ESI ES- 729.24 (NH_3 첨가 필요)

[0217] 200 mg 및 300 mg의 두 부분으로 나누어 각각 하기와 같은 2 개의 분리 단계를 통해 정제하였다:

[0218] 제 1 분리 단계:

[0219] Fractogel EMD S03-s 컬럼: D (내부) = 14 mm, L (패킹) = 85 mm

[0220] I. 조건화

[0221] (유속 5 ml/분)

[0222] a) H_2O 100 ml

[0223] b) 0.25 M H_2SO_4 200 ml

[0224] c) H_2O 100 ml

[0225] d) 1 M 암모니아 용액 200 ml

[0226] e) H_2O 100 ml

[0227] II. 분리:

[0228] a) H_2O 5 ml에 용해된 물질 200 ml를 적용한다

[0229] b) $H_2O \rightarrow 0.2$ M NH_4HCO_3 용액의 구배로 용출시킨다 (이동 용매 A = H_2O 250 ml, Erlenmeyer 플라스크에 담아 자기 교반기에서 교반한 후 5 ml/분의 속도로 컬럼 상에 펌핑됨, 이동 용매 B = 0.2 M NH_4HCO_3 용액, 2.5 ml/분으로 A에 펌핑됨).

[0230] III. 분획화:

[0231] a) 각 3 ml의 분획

[0232] b) 제1 피크 = 불순물

c) 사전 용출액 약 70 ml 이후의 제2피크 = 물질

IV. 재조건화:

a) 1 M 암모늄 용액 100 ml

b) H₂O 100 ml

제 2 분리 단계:

Diaion HP20, 컬럼 D (내부) = 30 mm, L (패킹) 130 mm, H₂O 100 ml, 및 H₂O 100 ml/5 % 아이소프로판올로 용출됨.

물질은 수상을 이용하여 미리 용출시켰고; 아이소프로판올 분획에는 불순물만이 존재하였다.

분석용 HPLC에 따라 이하의 3 개의 분획을 수득하였다:

F1 = 13.5 mg

F2 = 5.5 mg

F3 = 11.5 mg

총계 = 30.5 mg = 12.2 %

피롤리디닐 NAD (화합물 18)의 본질을 NMR 분석에 의해 확인하였다.

pNAD에 관한 포도당 탈수소효소 어세이

포도당 탈수소효소 (GlucDH)에 관한 보조인자 (cofactor)로서의 pNAD의 역할을 검사하기 위해, 0.1 M 트리스 / 0.2 M NaCl (pH 8.5) 완충용액 중에서 포도당DH 활성 어세이를 수행하였다. 포도당의 농도는 80 mM이었다.

0.05~0.5 mM의 pNAD 및 NAD 농도를 사용하였다. 여기에, GlucDH 10 mg/ml (pNAD) 또는 0.002 mg/ml (NAD) [각각 83 또는 0.017 μ M]를 첨가하였다. 실온에서 어세이를 수행하고, 일정한 시간 간격으로 흡수 스펙트럼을 기록함으로써 효소 반응을 모니터링하였다. 표 1에 제시된 값들은 4 분 후의 흡수 측정을 나타낸 것이다.

표 1

(p)NAD (mM)	U/ml	활성 %	사용된 [GlucDH]
0.05 NAD	539	100	0.002 mg/ml
0.4 NAD	1556	100	0.002 mg/ml
0.05 pNAD	0.00017	0.00003	10 μ l 10 mg/ml
0.4 pNAD	0.0024	0.00015	10 μ l 10 mg/ml

pNAD 및 pNADH의 흡수 스펙트럼

NAD 및 pNAD 및/또는 NADH 및 pNADH의 흡수 스펙트럼은 도 6 및 7에 제시되어 있다. NAD 및 pNAD는 260 nm에서 최대 흡수를 나타냈다. pNADH, 즉 GlucDH 활성 어세이 이후의 pNAD는 NADH에 비하여 약 10 nm만큼 최대 흡수의 적색 이동을 나타냈다 (도 7).

또한 GlucDH 복합체로서의 NADH 및 pNADH의 형광 스펙트럼은 도 8 및 9에 제시되어 있다. 각 경우에 있어 GlucDH 활성 어세이 이후에 스펙트럼을 기록하였다. 도 8은 340 및 370 nm의 여기 파장에서의 NADH/pNADH-GlucDH 복합체의 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 여기 파장 370 nm에서의 NADH 및 pNADH의 발광 스펙트럼은 유사하였다. 도 9은 발광 파장 460 nm에서의 NADH/pNADH-GlucDH 복합체에 관한 여기 스펙트럼을 나타낸 것이다. pNADH는 NADH에 비해 보다 폭넓은 여기 스펙트럼을 나타냈다. 그 스펙트럼도 또한 GlucDH 활성 어세이 이후에 기록한 것이었다.

pNAD의 안정성 조사

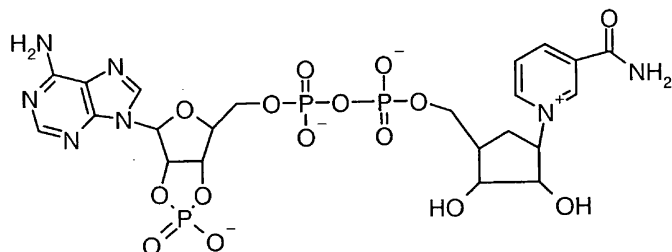
pNAD의 안정성을 NAD와 비교 검사하기 위해, 동일량의 NAD 및 pNAD를 각각 0.15 M KPO₄, 1 M NaCl 완충용액 (pH

7.0) 중에 취하고 50 °C에서 인큐베이션하였다. NAD 및/또는 pNAD의 분해를 HPLC에 의해 모니터링하였다.

도 10 는 시간 0 에서 (p)NAD 양에 대한 (p)NAD 양의 백분율 범위를 나타낸 것이다. 이 도면에 따르면 pNAD가 NAD에 비해 매우 안정한 것으로 나타났다.

[0255]

C) 카바NAD 사이클로포스페이트 (19)의 제조



[0256]

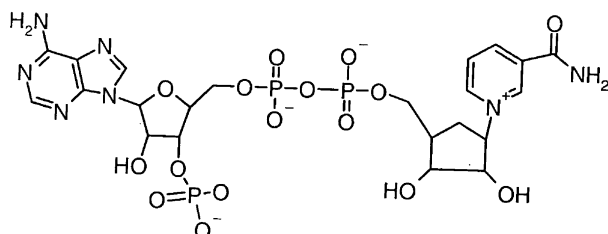
[0257]

05'-(하이드록시-모르폴리노-포르포릴)-O₂'-하이드록시-포르포릴-아데노신 79 mg (0.1 mmol), N-사이클로헥실-모르폴린-4-카보이미드산 사이클로헥실아민 염 다이하이드레이트 (피리딘을 이용한 공증발에 의해 건조됨 (Morphaat 등, J. Am. Chem. Soc. 83; 1961; 663-675)), 카바NMN 모노포스페이트 44 mg (0.105 mmol) 및 이어서 건조 황산 마그네슘 25 mg을 순수 포름아마이드 중 0.2 M 염화망간 용액 0.74 ml에 첨가하였다. 그 혼합물을 닫힌 반응 용기 내에서 아르곤 하에 3 일 동안 교반한 다음, 교반하면서 아세트니트릴 10 ml에 첨가하였다.

침전물을 여과에 의해 제거하고, 0 % B에서 100 % B로의 구배를 사용하여 60 분 동안 다음과 같은 RP 18 Hypersil ODS, 250×21.2 mm, 5 μm 컬럼 상에서의 RP 크로마토그래피에 의해 정제하였다: 용리액 A: 0.1 M 트라이에틸암모늄 아세테이트, 용리액 B: 0.1 M 트라이에틸암모늄 아세테이트 및 아세트니트릴의 1:4 혼합물, 유속: 10 ml/분. 260 nm에서의 검출에 의해 용출을 모니터링하였다. 주요 분획을 수합하고 5 회 동결건조시켜, 트라이에틸암모늄 아세테이트를 제거하였다. Dowex 50 WX2 을 이용하여 트라이에틸암모늄 염을 유리산으로, 이어서 리튬 염으로 전환시켰다. 수득량: 10 mg.

[0258]

D) 카바NADP (20)의 제조



[0259]

[0260]

37 °C에서 6 시간 이내에 4 개의 단위체 리보뉴클레아제 12 를 카바NAD 사이클로포스페이트 리튬 염 (19) 2.2 mg의 비스-트리스-프로판 완충용액 (0.02 M, pH 7.5) 1 ml 중 용액에 3 회 첨가하였다. 그 혼합물을 37 °C에서 밤새 정치시켰다. 효소를 20 분 동안 65 °C로 가열하여 변성시켰다. 여과 후, 0 % B에서 100 % B로의 구배를 사용하여 60 분 동안 다음과 같이 RP 18 Hypersil ODS, 250×21.2 mm, 5 μm 컬럼 상에서의 RP 크로마토그래피에 의해 정제를 수행하였다: 용리액 A: 0.1 M 트라이에틸암모늄 아세테이트; 용리액 B: 0.1 ml 트라이에틸암모늄 아세테이트 및 아세트니트릴의 1:4 혼합물; 유속: 10 ml/분. 260 nm에서의 검출에 의해 용출을 모니터링하였다. 주요 분획을 수합하여 5 회 동결건조시켜 트라이에틸-암모늄 아세테이트를 제거하였다.

[0261]

질량 스펙트럼 (MALDI Applied Biosystems Voyager System 6327: 계산값: 742.45, 확인값: 743.17)

[0262]

E) cNAD에 관한 포도당 탈수소효소 활성 어세이

[0263]

NAD에 대한 cNAD의 포도당 탈수소효소 활성 어세이를 pNAD에 관하여 B)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 이를 위해, 0.1 (cNAD) 및 0.002 mg/ml (NAD) [각각 0.83 및 0.017 μM]의 포도당 탈수소효소 농도를 사용하였다. 사용량 및 결과는 표 2 에 제시되어 있다.

표 2

(c)NAD (mM)	U/ml	활성 %	사용된 [GlucDH]
0.05 NAD	430	100	0.002 mg/ml
0.1 NAD	556	100	0.002 mg/ml
0.05 cNAD	2.7	0.63	0.1 mg/ml
0.1 cNAD	5.3	0.95	0.1 mg/ml

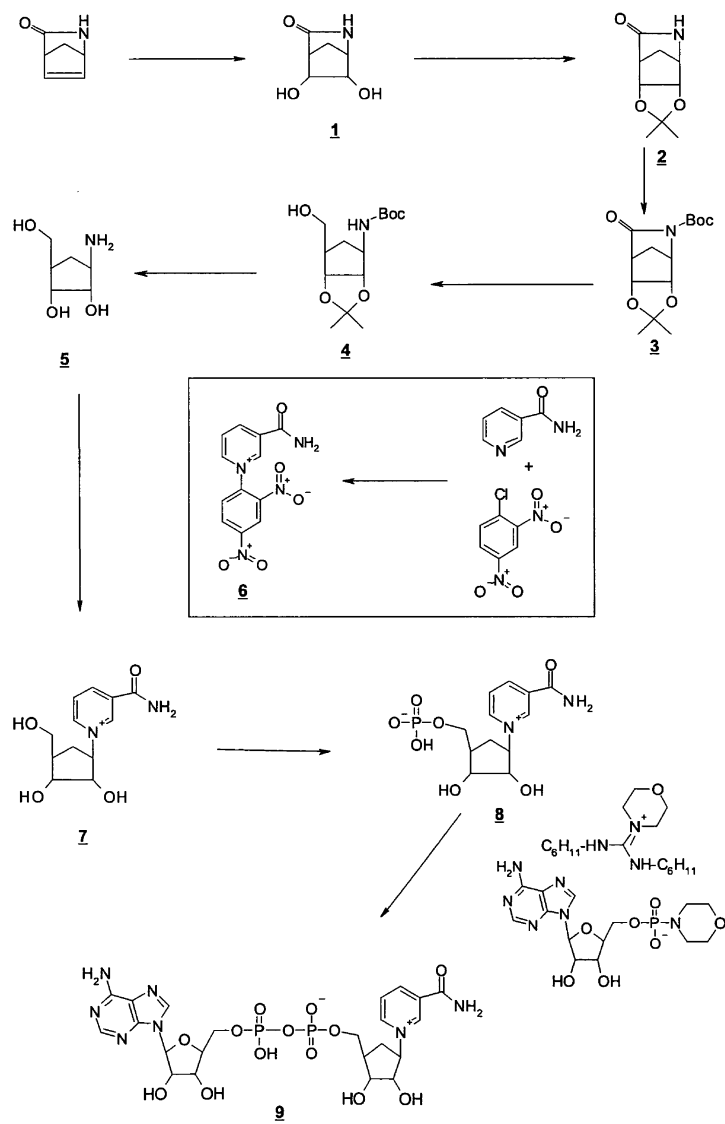
F) cNAD 및 cNADH의 흡수 스펙트럼

도 11, 12 및 13 는 NAD 및 cNAD의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다. cNAD 뿐만 아니라 NAD도 또한 260 nm에서 최대 흡수를 나타냈다. 도 12 는 NADH 및 cNADH의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것으로, 이때 그 스펙트럼은 각 경우에 있어 포도당 탈수소효소 활성 어세이 이후에 기록한 것이었다. cNADH의 최대 흡수는 20 nm의 적색 이동을 나타냈다. 또한 NADH 및 cNADH에 관한 흡수 스펙트럼은 도 13 에 제시되어 있으며, 이때 설명서에 기재된 바에 따라 관련 포도당 탈수소효소 활성 어세이에 관하여 상이한 조건을 선택하였다.

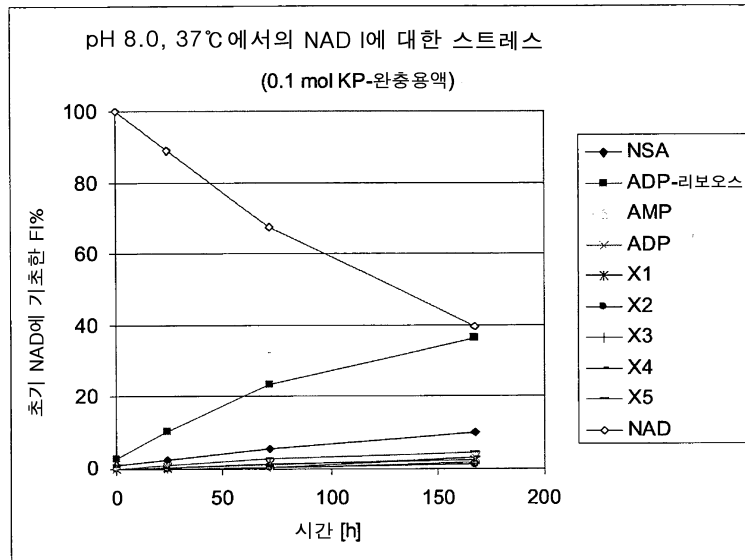
또한 도 14 은 GlucDH 복합체로서의 NADH 및 cNADH의 형광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 포도당 탈수소효소 활성 어세이 이후 여기 파장 370 nm에서 스펙트럼을 기록하였다. cNADH 뿐만 아니라 NADH도 또한 GlucDH로 처리되는 경우 형광 신호의 증가를 나타냈다.

도면

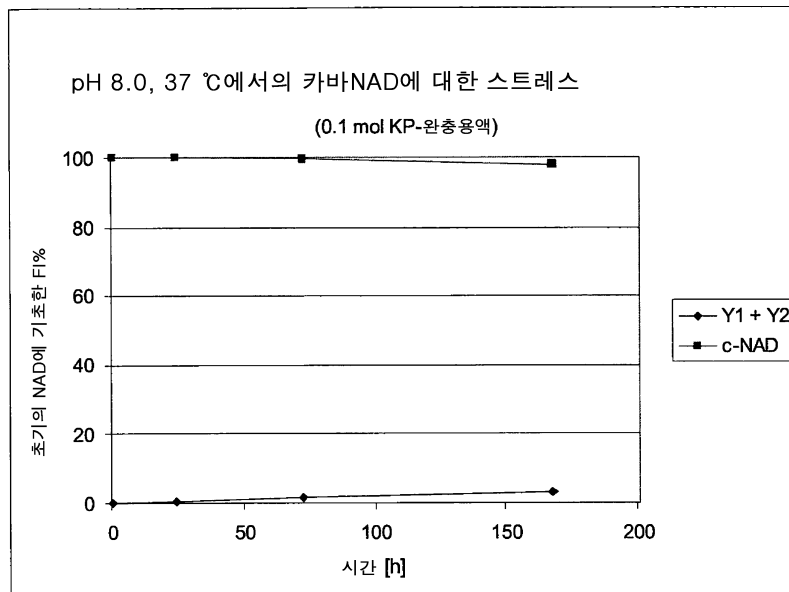
도면1



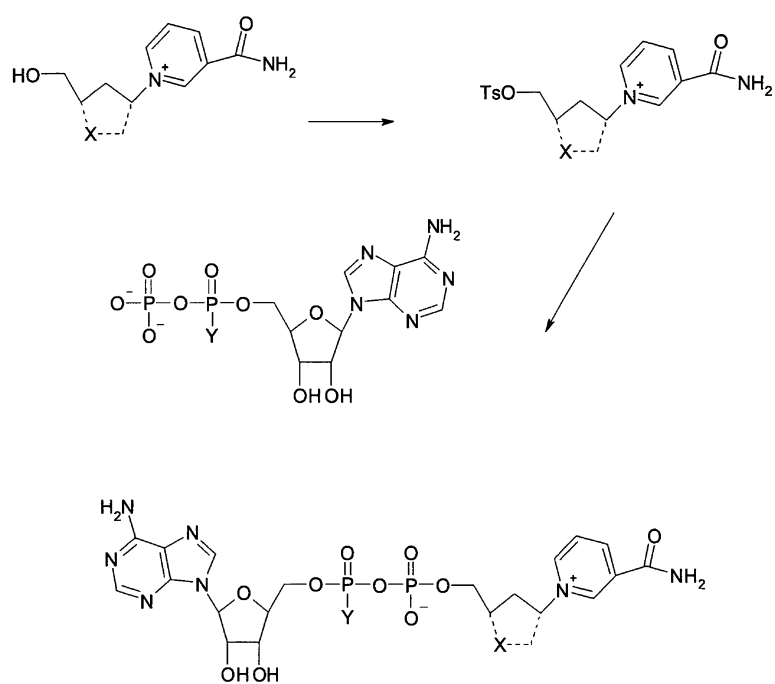
도면2



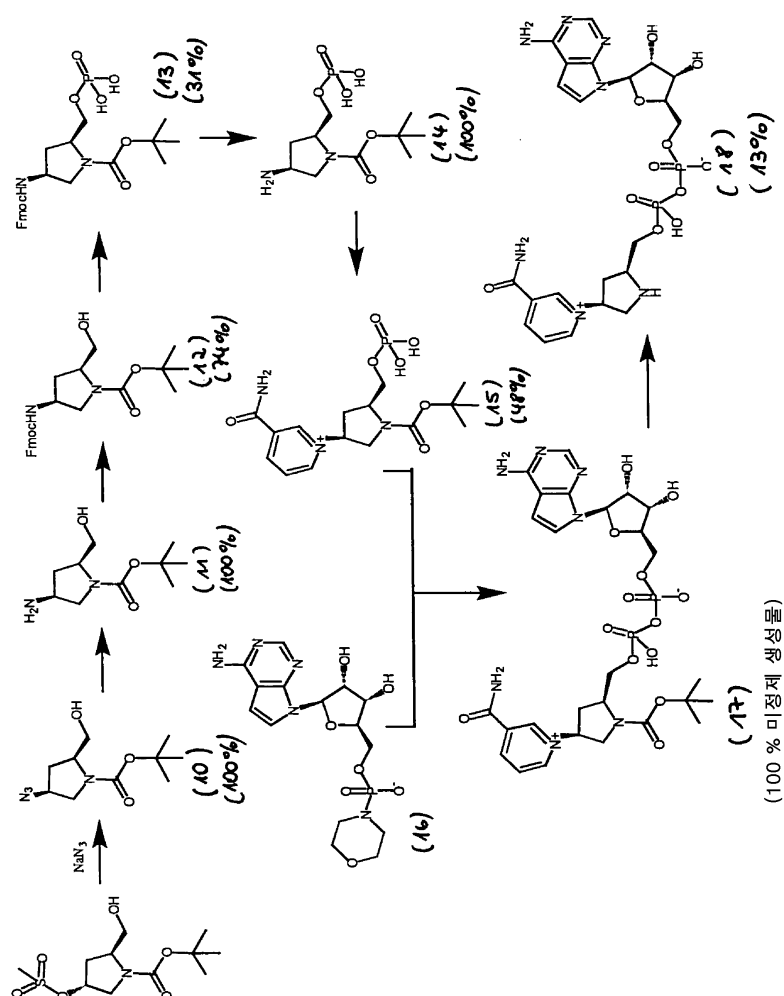
도면3



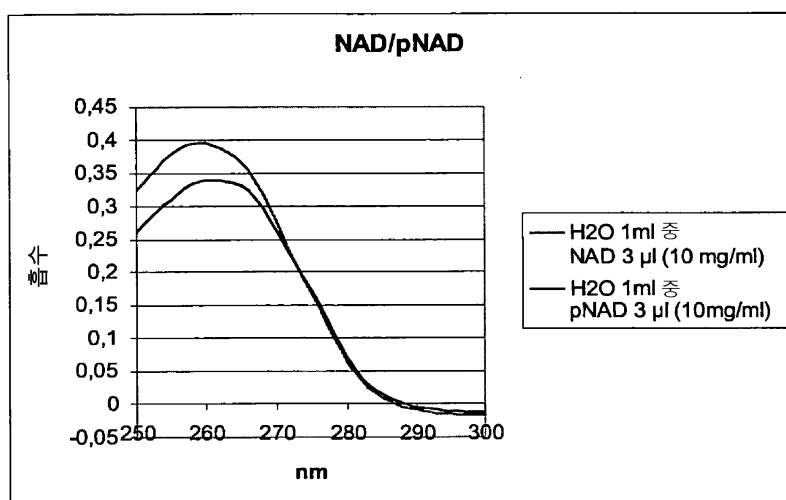
도면4



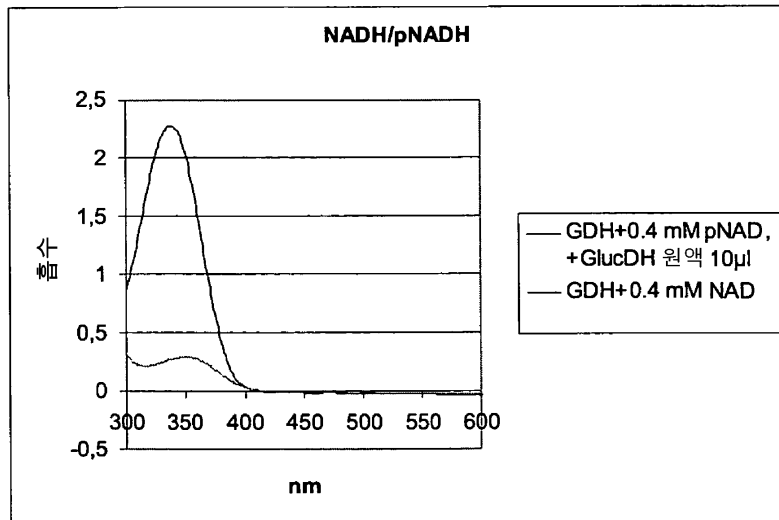
도면5



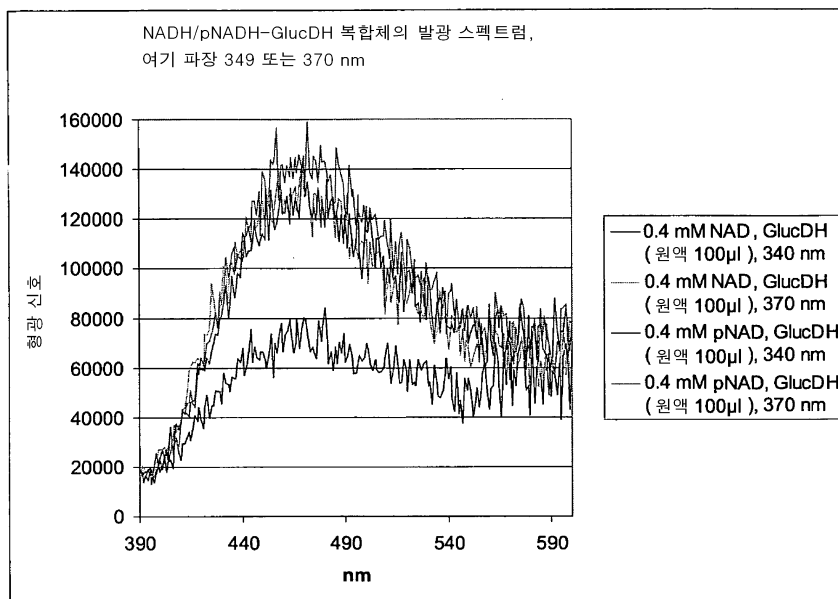
도면6



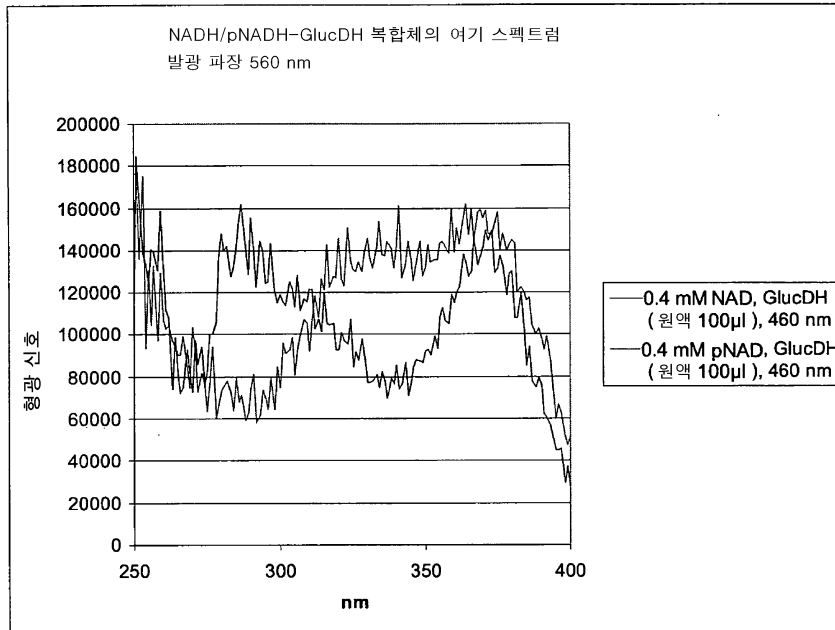
도면7



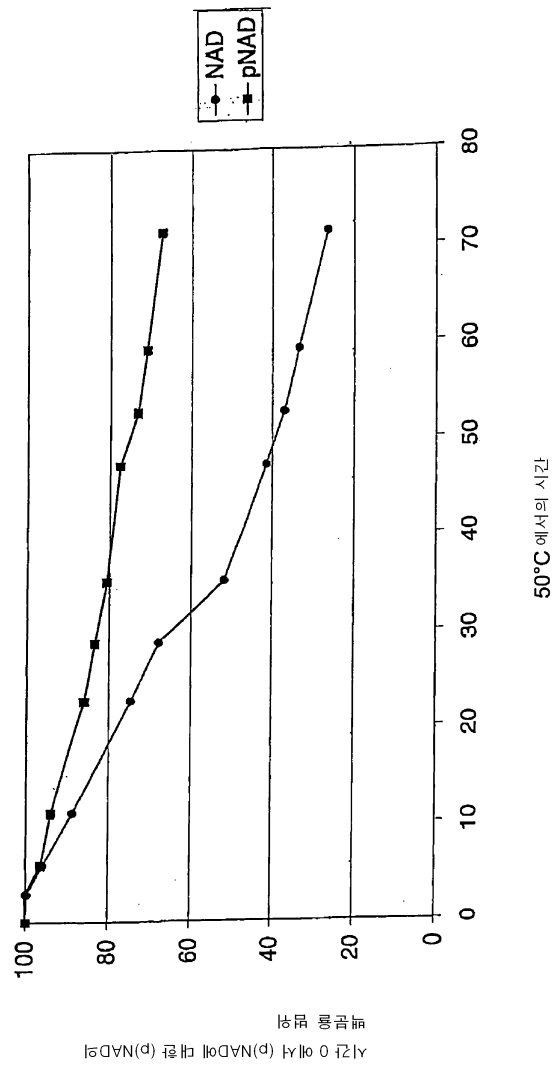
도면8



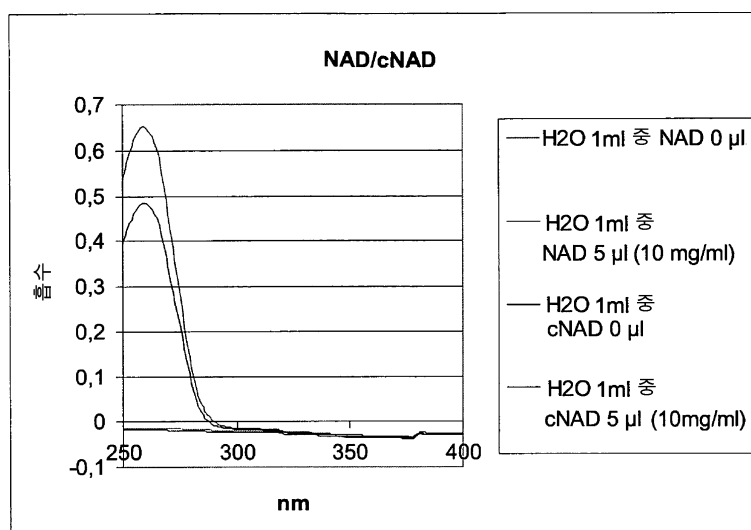
도면9



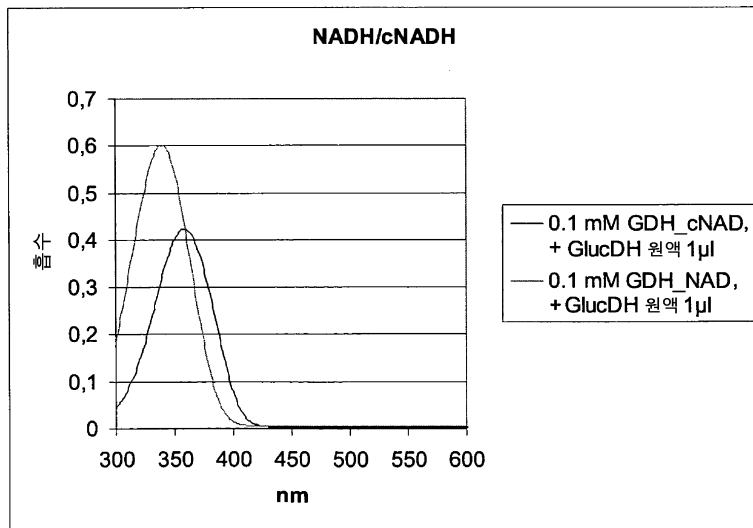
도면10



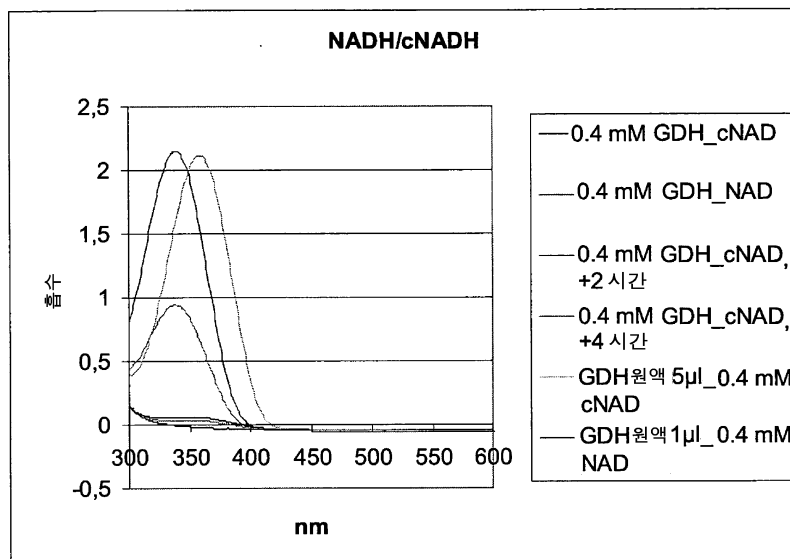
도면11



도면12



도면13



도면14

