

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.07.28	(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG 124 GRENZACHERSTRASSE 4070 BASLE CH
(30) Prioridade(s): 2005.07.28 DE 102005035461	(72) Inventor(es): JOACHIM HOENES DE DIETER HEINDL DE CARINA HORN DE CLAUDIA GAESSLER-DIETSCH DE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.04.09	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2014.03.05 062/2014	

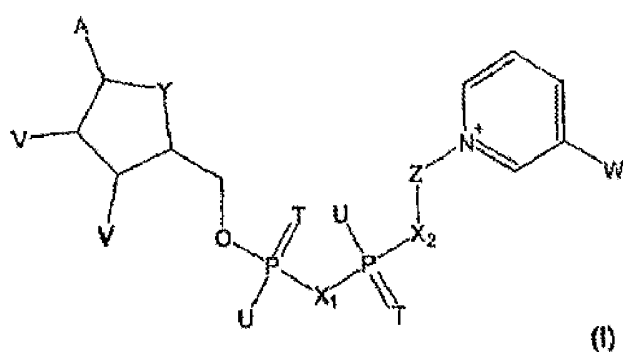
(54) Epígrafe: **DERIVADOS NAD/NADH ESTÁVEIS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A DERIVADOS DE NICOTINAMIDA-ADENINA-DINUCLEÓTIDO (NAD/NADH) OU DE NICOTINAMIDA-ADENINA-FOSFATO DE DINUCLEÓTIDO (NADP/NADPH) ESTÁVEIS E DE FÓRMULA (I), COMPLEXOS ENZIMÁTICOS DESTES DERIVADOS E A SUA UTILIZAÇÃO NO MÉTODO DE DETECÇÃO BIOQUÍMICO BEM COMO AO RESPECTIVO CONJUNTO DE REAGENTES.

RESUMO**"Derivados NAD/NADH estáveis"**

A presente invenção refere-se a derivados de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD/NADH) ou de nicotinamida-adenina-fosfato de dinucleótido (NADP/NADPH) estáveis e de fórmula (I), complexos enzimáticos destes derivados e a sua utilização no método de detecção bioquímico bem como ao respectivo conjunto de reagentes.



DESCRIÇÃO

"Derivados NAD/NADH estáveis"

A invenção refere-se a derivados de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD/NADH) ou nicotinamida-adenina-fosfato de dinucleótido (NADP/ NADPH) estável, complexos enzimáticos destes derivados e a sua utilização no método de detecção bioquímico bem como ao respectivo conjunto de reagentes.

Sistemas de medição para análise bioquímica são componentes importantes de métodos analíticos clinicamente relevantes. Incluem-se aqui em primeiro plano, a medição de analitos, por exemplo, metabolitos (ou metabólitos) ou substratos, os quais são determinados directa ou indirectamente utilizando uma enzima. O analito, neste caso, é convertido com a ajuda de um complexo enzima-coenzima, e depois quantificado. Nesta avaliação, o analito a ser determinado é colocado em contacto com uma enzima e uma coenzima adequados, sendo que a enzima é normalmente usada em quantidades catalíticas. A co-enzima é alterada pela reacção enzimática, por exemplo, oxidado ou reduzido. Este processo pode ser submetido a detecção electroquímica ou fotométrica, de forma directa ou através de um mediador. A calibração oferece uma relação directa entre o valor medido e a concentração do analito a ser determinado.

Coenzimas são moléculas orgânicas covalentemente ou não covalentemente ligados a uma enzima e podem vir a ser alteradas por meio da conversão do analito a analisar. Exemplos proeminentes de coenzimas são a nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) ou nicotinamida-adenina-fosfato de dinucleótido (NADP), os quais por meio de redução dão origem aos NADH ou NADPH.

Com base no estado actual da técnica, os sistemas de medição conhecidos são caracterizados por um período de validade limitado, bem como por requisitos de condições de medição especiais, tais como o arrefecimento ou armazenagem a seco, para se permitir obter essa validade. Em certas formas de concretização, por exemplo, com os testes que são

realizados a si mesmos pelo próprio usuário final, como quando se efectua a auto-monitorização de glicemia, podem por vezes ocorrer erros devido ao uso incorrecto e sem que de tal se aperceba devido a deficiente armazenamento dos meios de teste. Em particular, por exemplo o esgotamento do efeito de agentes dessecantes devido a prolongada abertura do acondicionamento primário pode provocar erros nas medições que são difíceis de verificar, em alguns dos sistemas pelo consumidor.

Uma medida conhecida, que é usada para aumentar a estabilidade dos sistemas de medição bioquímicos, é a utilização de enzimas estáveis, tais como por exemplo a utilização de enzimas a partir de organismos termofílicos. Também é possível, por modificação química de enzimas, tais como por exemplo por ligação cruzada ou por mutagénese proceder à sua estabilização. Além disso podem vir a ser adicionados estabilizadores enzimáticos, tais como por exemplo a trealose, polivinilpirrolidona e albumina do soro, ou podem também as enzimas virem a ser incluídas, por exemplo, por foto-polimerização em redes poliméricas.

Outras tentativas foram feitas, para melhorar a durabilidade de validade dos sistemas de medição bioquímicos, utilizando mediadores estáveis. Assim sendo, usando mediadores com potenciais redox reduzidos, dentro do possível, conseguem-se aumentar a especificidade dos testes, e eliminar as interferências e distúrbios durante a reacção. No entanto, um limite inferior para o potencial redox de mediadores é dado pelos potenciais redox dos complexos enzima/coenzima. Se estes forem ultrapassados a reacção com os mediadores torna-se mais lenta ou é mesmo impedida.

Alternativamente, os sistemas de medição bioquímicos podem também ser utilizados sem mediadores, em que por exemplo, a detecção directa de coenzimas, tais como da coenzima NADH pode ocorrer. Uma desvantagem de tais sistemas de medição, no entanto, decorre do facto de coenzimas, como NAD e NADP serem instáveis.

As NAD e NADP são moléculas de base instáveis, cujos processos de degradação são descritos na literatura (N.J.

Oppenheimer em "The Pyridine Nucleotide Coenzymes" Academic Press New York, London 1982, Hrsg. J. Everese, B. Anderson, K. You, *Kapitel 3*, pp. 56-65). Essencialmente a ADP-ribose é formada durante a degradação de NAD ou NADP, na qual são quebradas as ligações glicosilo entre a ribose e a porção de piridina. As formas reduzidas NADH e NADPH são por outro lado, ácidos instáveis, por exemplo a epimerização é um processo de degradação bem conhecido. Em ambos os casos, a instabilidade de NAD/NADP e NADH/NADPH é baseado na instabilidade da ligação glicosilo entre a ribose e a piridina. Mas também sob condições não muito drásticas, como por exemplo em soluções aquosas, pode ocorrer a hidrólise de coenzimas NAD e NADP, apenas e tão simplesmente por meio da humidade ambiente. Essa instabilidade pode conduzir a imprecisões na medição de analitos.

Uma lista de derivados de NAD/NADP vem descrito, por exemplo em B.M. Anderson em "The Pyridine Nucleotide Coenzymes", Academic Press New York, London 1982, Hrsg. J. Everese, B. Anderson, K. You, capítulo 4. A maioria destes derivados não são no entanto bem aceites por parte das enzimas. O único derivado por conseguinte, a ter sido utilizado até agora para testes de diagnóstico, é o 3-acetil-piridina-adenina-dinucleótido (acetil NAD), que foi descrito pela primeira vez em 1956 (N.O. Kaplan, *J. Biol. Chem.* (1956), 221, 823). Também esta coenzima apresenta um baixo nível de aceitação de enzimas e uma alteração no potencial redox.

Em WO 01/94370 é descrito ainda o uso de outros derivados NAD com um grupo piridina modificado. As modificações do grupo nicotinamida apresentam no entanto e de forma geral, um efeito directo sobre a reacção catalítica. Na maioria dos casos, este efeito é negativo.

Num outro conceito de estabilização, a unidade de ribose é modificada para afectar assim, a estabilidade da ligação glicosilo. Esta abordagem não interfere directamente com a reacção catalítica do grupo nicotinamida. No entanto, pode ser uma influência indirecta, uma vez que a enzima apresenta uma ligação forte e específica para com a unidade de ribose. Kaufmann *et al.* divulga a este respeito em WO 98/33936 e US

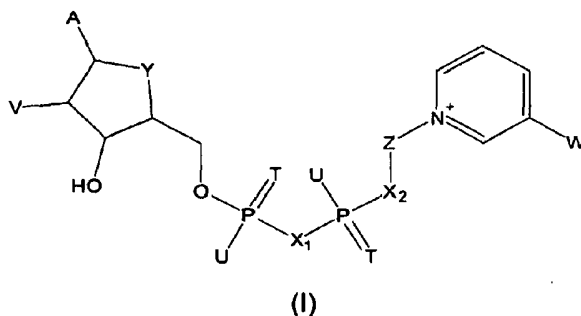
5,801,006 ou WO 01/49247 um número de derivados tioribose-NAD. Não foi no entanto até agora demonstrado existir uma correlação entre a alteração da unidade de ribose-nicotinamida e a actividade dos derivados de reacções enzimáticas.

O carbaNAD, um derivado sem ligação glicosilo, foi descrito pela primeira vez em 1988 (J.T. Slama, *Biochemistry* 1989, 27, 183 e *Biochemistry* 1989, 28, 7688). A ribose é aqui substituída por uma unidade de açúcar carbacíclico. Embora o carbaNAD tenha sido descrito como um substrato para desidrogenase, a sua actividade não foi até agora demonstrada em clinica, em métodos de detecção bioquímica.

Uma abordagem semelhante foi descrita mais tarde por G.M. Blackburn, *Chem. Comm.*, 1996, 2765, para produzir carbaNAD com um composto bifosfonato de metileno em vez do pirofosfato natural. O bifosfonato de metileno apresenta maior estabilidade em relação a fosfatases e foi utilizada como um inibidor da ADP-ribosil-ciclase. Um aumento da estabilidade em relação à hidrólise não era o objectivo (J.T. Slama, G.M. Blackburn).

O objectivo subjacente da presente invenção é, portanto fornecer sistemas de medição bioanalíticas estáveis, em particular para a determinação de glucose, que procurem evitar a maior sensibilidade em relação à hidrólise do NAD/NADP e ao mesmo tempo que sejam activos como co-enzimas em reacções enzimáticas.

Este objectivo é assim atingido através de um elemento de teste para a determinação da glucose, que compreende (i) uma glucose desidrogenase (EC 1.1.1.47) e (ii) como uma coenzima, um composto com a seguinte fórmula geral (I):



com

A= adenina ou um seu análogo,

T= em cada caso e de forma independente O, S,

U= em cada caso e de forma independente OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- ,

V= em cada caso, e de forma independente, OH ou um grupo fosfato, em que no caso em que um radical V se trate de um grupo OH e um segundo radical V seja um grupo fosfato, o grupo OH e o grupo fosfato possam formar um ciclo com os átomos de carbono aos quais eles estejam ligados,

W= COOR , CON(R)_2 , COR , CSN(R)_2 , onde R represente em cada caso e de forma independente H ou alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_2$,

X1,X2= em cada caso e de forma independente O, CH_2 , CHCH_3 , $\text{C(CH}_3)_2$, NH, NCH_3 ,

Y= NH, S, O, CH_2 ,

Z= um radical compreendendo um grupo cíclico com cinco átomos de carbono, contendo opcionalmente um heteroátomo seleccionado a partir de O, S e N bem como opcionalmente um ou mais substituintes e um radical CR_4 , onde CR_4 é ligado ao grupo cíclico e a X2, com

R4 = em cada caso e de forma independente, H, F, Cl, CH_3 ,

com a condição de que Z e o radical piridina não estejam acoplados por uma ligação glicosídica, ou um sal ou se for o caso uma forma reduzida do mesmo.

Numa forma de concretização preferida, W representa CONH_2 ou COCH_3 .

Os substituintes preferidos de Z são seleccionados a partir do grupo constituído de OH, F, Cl e alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_2$, opcionalmente substituído com grupos fluorados ou clorados e/ou grupos OH, O-alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_2$.

Numa forma de concretização preferida, um primeiro radical V representa OH e um segundo radical V representa um grupo fosfato.

Surpreendentemente, os compostos no âmbito da presente invenção são estáveis à hidrólise e são bons substratos em

métodos de detecção enzimática e podem ser utilizados para o diagnóstico bioquímico. Esta descoberta está em contraste com a maior parte dos derivados de NAD/NADP anteriormente conhecidos, uma vez que estes derivados no método de detecção enzimática e de forma geral apresentam uma estabilidade muito reduzida.

As vantagens dos compostos no âmbito da presente invenção em relação aos usados pelo estado actual da técnica, são:

- Elevada estabilidade,
- Elevada actividade enzimática,
- Síntese simples e económica,
- Utilização em todos os métodos de detecção bioquímica conhecidos até há data.

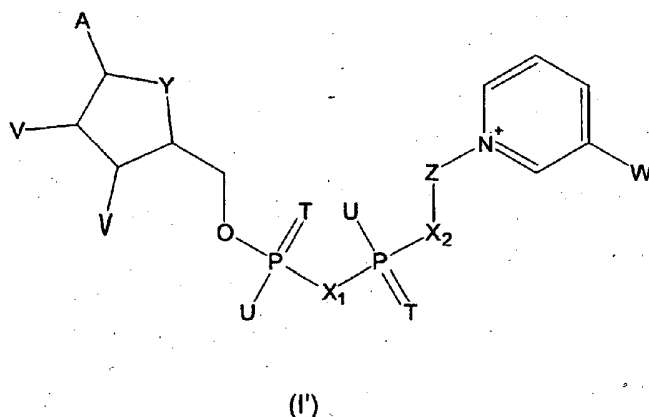
Devido à utilização de derivados estáveis NAD/NADP no âmbito da presente invenção, de preferência em combinação com uma formulação de estabilização, tais como por exemplo pela inclusão de enzimas na matriz polimérica, as desvantagens dos métodos de detecção bioquímicas conhecidas podem ser em grande parte evitadas. Além disso, não é necessário o uso de aditivos estabilizantes. E isto é em particular vantajoso, pois quanto menor for o número de substâncias reactivas que participem no processo, maior é a possibilidade de obter uma formulação estável para a determinação do analito.

Com a presente invenção, pretende-se disponibilizar os elementos de teste, compreendendo uma série de derivados de NAD/NADP estáveis, que têm uma actividade enzimática suficiente para o uso como uma coenzima no elemento de teste está disponível.

Os derivados NAD/NADP estáveis podem ser preparados por meio de métodos de síntese em geral bem conhecidos. Para este fim, o grupo amino de um amino álcool cíclico é convertido por meio de reacção de Zincke num derivado de piridina. O grupo OH primário é então fosforilado e por fim acoplado ao derivado NAD com um derivado de AMP activado. Alternativamente pode ainda o grupo OH primário ser em primeiro lugar fosforilado e em seguida, o grupo amino ser convertido em piridina através de uma reacção de Zincke.

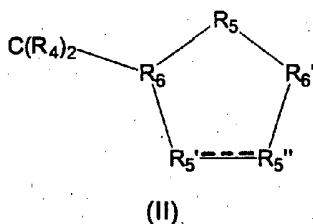
Uma outra via de síntese é a activação do álcool primário em tosilato ou iodeto e a subsequente alquilação de ADP.

Formas de concretização preferidas dos elementos de teste no âmbito da presente invenção incluem, por exemplo os compostos que têm a seguinte fórmula geral (I') :



com

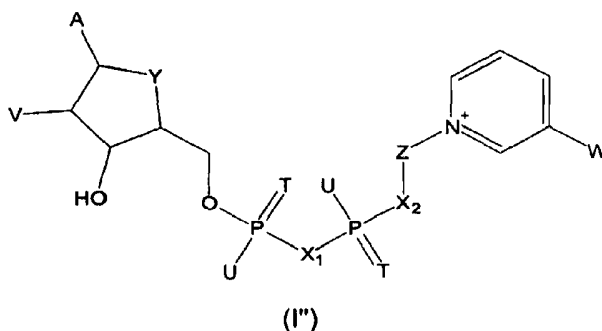
- A= adenina ou um seu análogo,
 T= em cada caso e de forma independente O, S,
 U= em cada caso e de forma independente OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- ,
 V= em cada caso, e de forma independente, OH ou um grupo fosfato,
 W= COOR , CON(R)_2 , COR , CSN(R)_2 , onde R represente em cada caso e de forma independente H ou alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_2$,
 X_1, X_2 = em cada caso e de forma independente O, CH_2 , CHCH_3 , $\text{C(CH}_3)_2$, NH, NCH_3 ,
 Y= NH, S, O, CH_2 ,
 Z= um anel carbocíclico saturado ou insaturado ou anel heterocíclico de cinco membros, em particular um composto de fórmula geral (II)



onde entre R_5' e R_5'' pode estar presente uma ligação simples ou dupla,

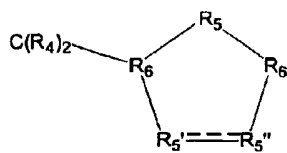
$R_4 =$ em cada caso e de forma independente, H, F, Cl, CH_3 ,
 $R_5 =$ CR_{42} ,
 se entre R_5' e R_5'' está presente uma ligação simples,
 $R_5' =$ O, S, NH, N-alquilo- $C-C_2$, CR_{42} , CHOH, $CHOCH_3$,
 $R_5'' =$ CR_{42} , CHOH, $CHOCH_3$,
 se entre R_5' e R_5'' está presente uma ligação dupla, então
 $R_5' = R_5'' = CR_4$,
 $R_6, R_6' =$ em cada caso e de forma independente, CH, CCH ,
 ou um sal ou, se apropriado, uma forma reduzida do mesmo.

Um outro ulterior objecto da presente invenção é o de obter compostos que têm a seguinte fórmula geral (I''):



com

$A =$ adenina ou um seu análogo,
 $T =$ em cada caso e de forma independente O, S,
 $U =$ em cada caso e de forma independente OH, SH, BH_3^- , $BCNH_2^-$,
 $V =$ em cada caso, e de forma independente, OH ou um grupo fosfato, em que no caso em que um radical V se trate de um grupo OH e um segundo radical V seja um grupo fosfato, o grupo OH e o grupo fosfato possam formar um ciclo com os átomos de carbono aos quais eles estejam ligados,
 $W =$ $COOR$, $CON(R)_2$, COR , $CSN(R)_2$, onde R represente em cada caso e de forma independente H ou alquilo- C_1-C_2 ,
 $X_1, X_2 =$ em cada caso e de forma independente O ou NH,
 $Y =$ NH, S, O, CH_2 ,
 $Z =$ um anel carbocíclico saturado ou insaturado ou anel heterocíclico de cinco membros, em particular um composto de fórmula geral (II)



(II)

onde entre R5' e R5'' pode estar presente uma ligação simples ou dupla,

R4= em cada caso e de forma independente, H, F, Cl, CH₃,

R5= CR₄₂,

se entre R5' e R5'' está presente uma ligação simples,

R5' = O, S, NH, N-alkilo-C-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

R5''= CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

se entre R5' e R5'' está presente uma ligação dupla, então

R5' = R5'' = CR₄,

R6, R6' = em cada caso e de forma independente CH, CCH₃,

com a condição de que quando sejam R5 = CH₂, T = O, U = em cada caso OH, V = OH, A = CONH₂, X = O e Y = O, então R5' e R5'' não sejam simultaneamente CHOH,

ou um sal ou, se apropriado, uma forma reduzida do mesmo.

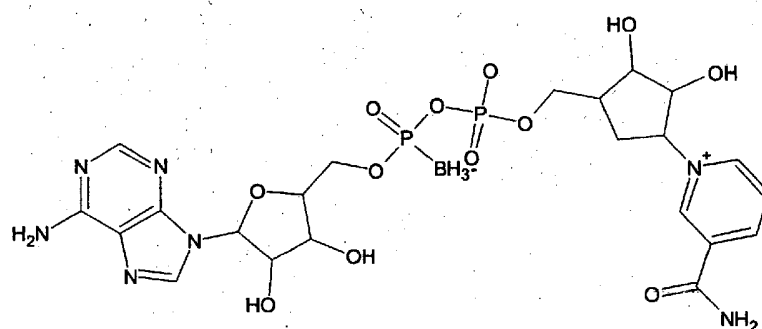
Numa forma de concretização preferida, os compostos análogos de adenina, de acordo com a presente invenção, contêm, como por exemplo adenina substituída em C₈ e adenina substituída em N₆, variantes deaza, tais como 7-deaza, variantes aza, como o 8-aza, ou combinações tais como 7-deaza ou 8-aza, ou carbocíclico análogos, tal como a formicina, em que as variantes 7-deaza possam vir a sofrer na posição 7 a substituição com halogénio, alcinilo-, alcenilo- ou alkilo-C₁-C₆.

Numa outra forma de concretização preferida, os compostos contêm análogos de adenosina, os quais em vez de ribose, podem por exemplo conter 2-metoxi-desoxirribose, 2'-fluoro-desoxirribose, hexitol, altritol ou compostos policíclicos análogos, tais como açúcares biciclo, açúcares LNA, açúcares triciclo.

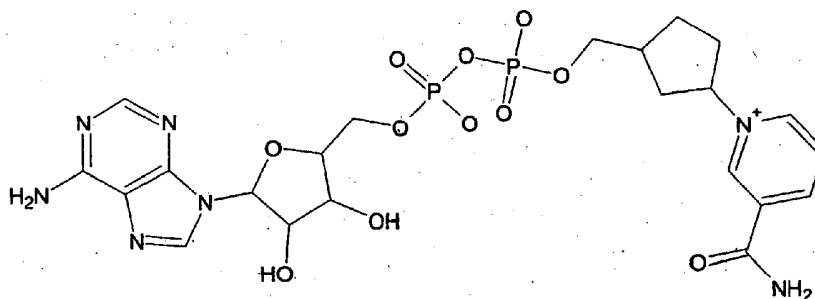
Em particular pode também o (di-)-fosfato de oxigénio, ser substituído isotronicamente, como por exemplo O por S ou BH₃⁻, O por NH, NCH₃ ou CH₂ e =O por =S.

Numa forma de concretização preferida, pelo menos um radical de U do composto no âmbito da presente invenção é diferente de OH e mais preferencialmente pelo menos um radical $U = BH_3^-$.

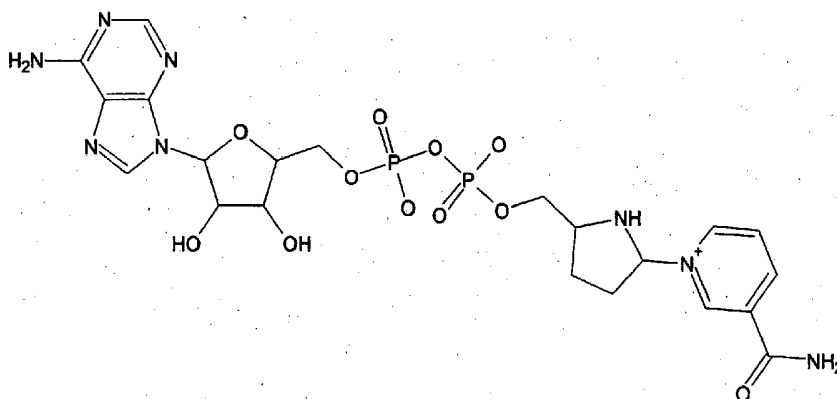
Formas de concretização particularmente preferidas são os derivados Borano carba-NAD, c-pentilo-NAD, pirrolilo-NAD, furanilo-NAD, ciclofosfato de carba-NAD, carba-NADP, pirrolidinilo-NAD, bem como elementos de teste, compreendendo os mesmos:



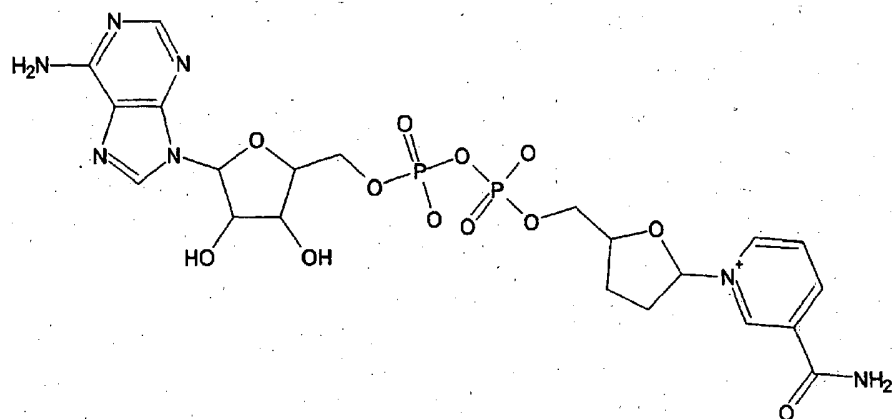
Borano carba NAD



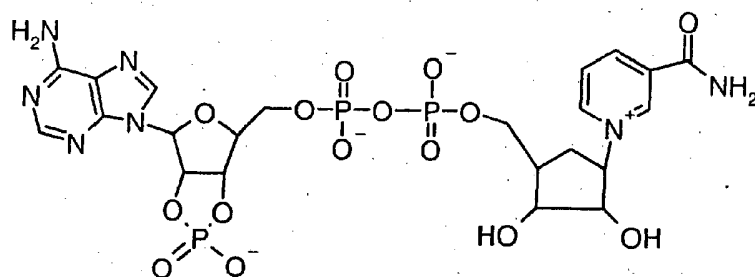
Ciclopentil NAD



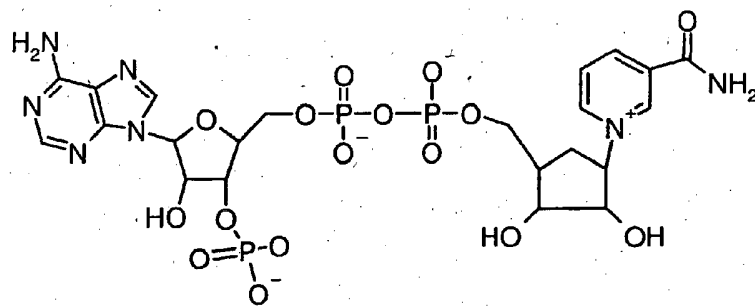
Pirrolil NAD



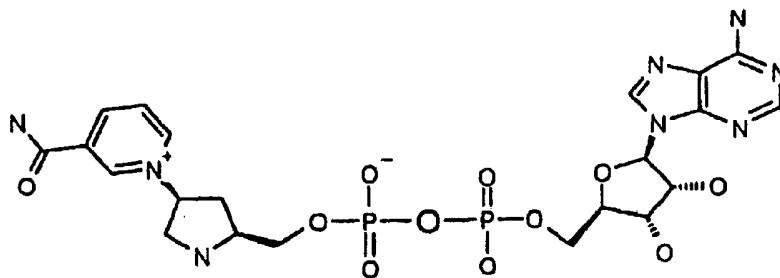
Furanil NAD



Ciclofosfato de carba NAD



carba NADP



Pirrolidinil NAD

A evidência bioquímica de analitos, tais como parâmetros em fluidos corporais, tais como sangue, soro, plasma ou urina, ou amostras de águas residuais ou de alimentos desempenham um papel importante no diagnóstico. Aqui, o analito a ser determinado é colocado em contacto com uma enzima e uma coenzima adequadas.

Um outro objecto da presente invenção é, por conseguinte, um complexo enzima-coenzima consistindo de um composto no âmbito da presente invenção em combinação com uma enzima adequada.

Como analitos podem ser determinadas quaisquer substâncias químicas ou biológicas, que possam ser detectados através de uma reacção redox, por exemplo, as substâncias onde elas são substratos de uma enzima dependente de um coenzima, ou elas mesmo sendo uma enzima dependente de coenzima. Exemplos preferidos de analitos são a glicose, o ácido láctico, o ácido málico, o glicerol, o álcool, o colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutathione, péptidos, ureia, amónia, salicilato, piruvato, 5' -nucleotidase, a creatina-quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), dióxido de carbono, etc.

As enzimas adequadas são, por exemplo, desidrogenases seleccionadas a partir da desidrogenase da glucose (E.C.1.1.1.47), da desidrogenase de lactato (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), da desidrogenase de malato (E.C.1.1.1.37), da desidrogenase de glicerol (E.C.1.1.1.6), da desidrogenase de álcool (E.C.1.1.1.1), da desidrogenase de alfa-hidroxiacetato, desidrogenase de sorbitol, ou desidrogenase de aminoácidos, como por exemplo, desidrogenase de L-aminoácido (E.C.1.4.1.5). Outras enzimas adequadas são as oxidases como a oxidase de glucose (E.C.1.1.3.4) ou oxidase de colesterol (E.C.1.1.3.6) e transaminases como por exemplo aminotransferase de aspartato ou alanina, 5' -nucleotidase ou creatina-quinase.

Um outro objecto da presente invenção é a utilização de um composto no âmbito da presente invenção ou de um complexo de enzima-coenzima no âmbito da presente invenção para a detecção de um analito numa amostra por meio de uma reacção

enzimática. Particularmente preferida neste caso é a detecção de glucose utilizando desidrogenase de glucose (GlucDH).

A alteração da coenzima, isto é, do composto no âmbito da presente invenção por meio de reacção com o analito (se o analito se trata de um substrato de enzima) ou por meio de uma reacção catalisada por analito (se o analito for neste caso um enzima) pode, em princípio, ser detectada por qualquer dos meios e processos existentes. Nestes casos, em princípio, todos os métodos conhecidos ao estado actual da técnica, podem ser usados na detecção de reacções enzimáticas. De preferência, no entanto, pode-se proceder à detecção da alteração da coenzima por métodos ópticos. Métodos de detecção ópticos incluem, por exemplo, medição da absorção, fluorescência, dicroísmo circular (CD), dispersão rotativo óptica (ORD), refractometria, etc. De forma ainda preferencial, a alteração da coenzima pode ser detectada por meio de medição da fluorescência. A medição da fluorescência é muito sensível e permite mesmo a detecção de pequenas concentrações de analitos em sistemas miniaturizados.

Para a detecção de um analito pode ser utilizado um líquido de teste, onde o reagente por exemplo é usado na forma de uma solução ou de uma suspensão num líquido aquoso ou não aquoso, ou na forma de um pó ou em forma liofilizado. Pode no entanto ser também usado um ensaio a seco, no qual o reagente é aplicado sobre um meio de transporte, num teste a executar sobre suporte. O meio de suporte pode ser por exemplo, uma tira de teste que compreende um material absorvente e/ou dilatável que se encontre humedecido pela amostra de líquido de ensaio em prova.

O reagente de detecção a ser utilizado, pode ser também uma matriz de gel com um complexo enzima-coenzima incorporado (ver DE 102 218 45 A1).

A enzima pode, quer em conjunto com o composto no âmbito da invenção a ser incorporado por polimerização na matriz são, ou a matriz, após a polimerização na presença do enzima, pode ser posta em contacto com uma solução do coenzima, resultando assim na formação do complexo enzima-coenzima correspondente.

Um outro objecto da presente invenção compreende a constituição de um kit ou conjunto de reagentes e o uso dos mesmos para a detecção de analitos. O kit de reagentes, pode conter um composto no âmbito da presente invenção, uma enzima adequada, bem como uma solução tampão adequada para a reacção. As enzimas adequadas ao uso neste caso foram já apresentadas. O kit de reagentes no âmbito da presente invenção é versátil ao uso nas mais variadas formas e pode ser utilizado para a determinação de analitos, tais como por exemplo glucose, ácido láctico, ácido málico, glicerol, álcool, colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutathione, péptidos, ureia, salicilato de amónio, piruvato, 5' -nucleotidase, CK, LDH, dióxido de carbono, etc. De preferência, um kit de reagentes, que contenha um composto no âmbito da presente da invenção e glicose desidrogenase (E.C.1.1.1.47), para a detecção de glicose no sangue.

O kit de reagentes de acordo com a presente invenção pode ser usado para a detecção de uma substância a analisar seja num teste em estado seco ou em condições de estado líquido.

A presente comunicação e patente descreve ainda e abre a possibilidade de uso de tiras de teste para a detecção fotométrica ou fluorométrica de uma substância a analisar. Essa tira de teste compreende um composto tal como indicado acima como coenzima e uma enzima adequada ou um substrato de enzima imobilizada sobre um material absorvente e/ou passível de dilatação. Os materiais adequados a esta aplicação podem ser seleccionados, por exemplo, a partir de celulose, plástico, etc.

Um outro objecto da presente invenção compreende um método para detectar um analito, que compreenda os seguintes passos:

- (a) Colocar em contacto uma amostra com um dispositivo de ensaio ou kit de reagentes de acordo com a presente invenção, que compreenda uma co-enzima, e
- (b) Detecção da substância a analisar, por exemplo com base na alteração da coenzima.

Uma outra vantagem da invenção consiste no facto de a emissão de fluorescência das coenzimas, mostrar um deslocamento batocrómico de forma a existir uma ligeira interferência com a emissão de fluorescência de outros materiais dos elementos de teste e/ou da amostra.

Todas as formas de concretização preferidas apresentadas de um objecto da presente invenção devem aplicar-se ainda a outros objectos da invenção, tal como por exemplo, as concretizações preferidas dos compostos no âmbito da presente invenção.

A presente invenção é ainda ilustrada de forma mais detalhada com as seguintes figuras e exemplos.

Figuras

Figura 1

Representação do processo de síntese de carbaNAD (cNAD).

Figura 2

Apresentação dos resultados de carga de NAD a 8°C e a 37°C.

Figura 3

Apresentação dos resultados de carga de carbaNAD a 8°C e 37°C.

Figura 4

Representação do processo de síntese de Borano NAD por alquilação de ADP, com $Y=BH_3$, apenas por alquilação em beta-fosfato do ADP.

Figura 5

Representação do processo de síntese de pirrolidinil-NAD (pNAD). Além das fórmulas estruturais são dados números dos compostos e os rendimentos dos respectivos passos de reacção.

Figura 6A/6B

Espectros de absorção de NAD e pNAD (Figura 6A) e NADH ou pNADH (Figura 6B).

Figura 7

Espectros de fluorescência de NADH e pNADH como complexo GlucDH (espectros de emissão).

Figura 8

Espectros de fluorescência de NADH e pNADH como complexo GlucDH (espectros de excitação).

Figura 9

Comparação de estabilidades de NAD e pNAD.

Figura 10A/10B/10C

Os espectros de absorção de NAD e cNAD (Figura 10A) ou NADH e cNADH (Figs. 10B e 10C).

Figura 11

Espectros de fluorescência de NADH e cNADH como complexos GlucDH.

ExemplosProdução experimental de derivados estáveis de NAD/NADH

A preparação de derivados de NAD/NADH estáveis é apresentado de forma exemplificada na produção de carbaNAD (composto 9, Figura 1) e pirrolidina-NAD (composto 18, Figura 5). Outros derivados podem ser preparados com os métodos de síntese respectivos adequados. Os correspondentes aminoálcoois como reagentes de partida são conhecidos da literatura de especialidade:

2-amino-1,4-anidro-2,3-didesoxi-L-treo-pentitol: Huryn, Donna M.; Sluboski, Barbara C.; Tam, Steve Y.; Todaro, Louis J.; Weigle, Manfred. *Tetrahedron Letters* (1989), 30(46), 6259-62.

3-amino-, (1R,3S)-ciclopentanometanol, Beres, J.; Sagi, G.; Tomoskozi, I.; Gruber, L.; Gulacsi, E.; Otvos, L.: *Tetrahedron Letters* (1988), 29(22), 2681-4

A) Preparação de carbaNAD

I. 1R-(-)-exo-cis-5,6-di-hidroxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona (1)

Em um balão de fundo redondo de 1 L, a uma solução de 22,5 g (167 mmol) de N-metilmorfolina-N-óxido em 80 ml de água desionizada é adicionada uma solução de 16,4 g (147 mmol) de 1R-(-)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona em 400 ml de acetona. Com arrefecimento usando gelo, é adicionado entretanto uma solução 2,5% de tetróxido de ósmio em terc-butanol, 15 ml (1,2 mmol) no espaço de tempo de 15 minutos. A mistura é por fim deixada com agitação à temperatura ambiente durante a noite.

Os solventes são separados por destilação num evaporador rotativo. Procede-se então à agitação com 100 ml, e de novo à destilação num evaporador rotativo. Por fim dissolve-se em 600 ml de água desionizada e é misturado com 35 g de carvão activado. A mistura é agitada vigorosamente durante 1h e em seguida filtrada por meio de um filtro de profundidade Seitz K 250. A partir do filtrado, a água é removida por destilação em evaporador rotativo. O produto final é usado sem purificação adicional.

TLC - cromatografia camada fina (sílica gel Merck 60 F-254): acetato de etilo/metanol/ácido acético glacial 7:2:1 R_f 0,75 (material de partida), 0,53 (1). Coloração com TDM/desenvolvimento em câmara de cloro.

*Reagente TDM: Solução 1: 10 g de N,N,N',N'-tetrametil-4,4' -diaminodifenilmetano, em 40 ml de ácido acético glacial e 200 ml de água desionizada. Solução 2: 20 g de cloreto de potássio em 400 ml de água desionizada. Solução 3: dissolver 0,3 g de ninidrina em 10 ml de ácido acético glacial e adicionar 90 ml de água desionizada. Reagente final: mistura da solução 1 com 2 e adição de 6 ml da solução 3.

II. 1R-(-)-exo-cis-5,6-dimetilmetilenodioxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona (2)

O produto em bruto 1 é aquecido ao ponto de ebulição sob refluxo, durante 1 hora em 200 ml de etanol absoluto. Depois

da adição de 400 ml (3,26 mol) de dimetoxipropano e 250 mg (2,2 mmol) de cloridrato de piridina, a mistura é aquecida durante mais 15 minutos sob refluxo ao ponto de ebulição. Após a adição de 10 ml de solução de bicarbonato de sódio saturada, a solução é concentrada num evaporador rotativo sob vácuo até à completa secagem. O resíduo é então tratado com 500 ml de clorofórmio, 150 ml de solução salina saturada e 75 ml de solução saturada de bicarbonato de sódio e vertida para um funil de separação. Após a extracção é deixada em repouso durante a noite, para permitir a ocorrência da separação de fases.

A fase orgânica é separada e a fase aquosa extraída duas vezes com 200 ml de clorofórmio. As fases orgânicas combinadas são secas sobre sulfato de magnésio. Após filtrar o produto desidratado, o solvente é removido por destilação sob pressão reduzida num evaporador rotativo. O produto em bruto (24,9 g = 92%) é utilizado sem purificação adicional.

TLC (sílica gel Merck 60 F-254): acetato de etilo/metanol/ácido acético glacial 7:2:1 R_f 0,84. A coloração com TDM/desenvolvimento em câmara de cloro.

III. 1R-(-)-4-N-terc-butiloxicarbonil-exo-cis-5,6-dimetil-metilenodioxo-2-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona (3)

A uma solução de 24,9 g (135,7 mmol) de produto em bruto 2 em 450 ml de clorofórmio absoluto é adicionado, sob atmosfera de árgon 41,5 g (190 mmol) de dicarbonato de di-terc-butilo e 0,83 g (6,8 mmol) de 4-dimetilaminopiridina. A mistura é aquecida em agitação, sob refluxo ao ponto de ebulição até à cessação do desenvolvimento de gás. A mistura é passada então através de uma coluna cheia com 40 g de gel de sílica 60, equilibrada com clorofórmio e filtrada. É lavada então com 100 ml de clorofórmio. A partir do filtrado, o solvente é removido por destilação sob pressão reduzida num evaporador rotativo. O produto em bruto é seco durante 60 minutos a 10 mbar e 40°C. É utilizado então sem purificação adicional.

TLC (sílica gel Merck 60 F-254): acetato de etilo/hexano 3:2, R_f =0,85. A coloração é feita com TDM/desenvolvimento em câmara de cloro.

IV. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(N-*terc*-butiloxicarbonil)amino-2,3-dimetilmetilenodioxi-1-(hidroximetil)ciclopentano (4)

À temperatura ambiente, o produto em bruto 3 é dissolvido com agitação em 400 ml de tetra-hidrofurano e 80 ml de água desionizada. Após arrefecimento a 4°C, e adição a 5,3 g de boro-hidreto de sódio e agitação durante a noite, procede-se então ao aquecimento da mistura de forma lenta até atingir a temperatura ambiente. Adicionam-se então 100 ml de etanol e agita-se à temperatura ambiente durante 6 h. Os solventes são removidos por destilação sob pressão reduzida num evaporador rotativo. São adicionados depois 300 ml de solução de cloreto de sódio saturada e 650 ml de acetato de etilo, e vertidos para uma ampola de decantação. A fase orgânica é assim separada e a fase aquosa é lavada mais uma vez com 350 ml de acetato de etilo. As fases orgânicas combinadas são então secas sobre sulfato de magnésio. Após filtrar-se o produto desidratado, o solvente removido é destilado sob pressão reduzida num evaporador rotativo. O produto em bruto (42,2 g) é purificado por cromatografia em coluna e gel de sílica 60 (coluna h=93 cm, d=10 cm) eluente THF/hexano 1:3, em seguida, THF/hexano 2:3) com fluxo de 3 l/h. São recolhidos fracções de 40 ml. As fracções são então controladas por meio de TLC: (Merck sílica gel 60 F-254: acetato de etilo/hexano 3:2, $R_f=0,45$. Coloração TDM/desenvolvimento em câmara de cloro. A partir das fracções de produto combinadas, o solvente removido é destilado em evaporador rotativo, sob vácuo, rendimento: 24,9 g.

V. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-amino-2,3-di-hidroxi-1-(hidroximetil)-ciclopentano (5)

A 11,09 g (38,6 mmol) de produto em bruto 4 são adicionados 8 ml de água desionizada e em seguida 80 ml de ácido trifluoroacético. A mistura é agitada vigorosamente durante 6h à temperatura ambiente, formando então uma solução amarelo claro, transparente. Adicionam-se 200 ml de água desionizada e procede-se a evaporação sob vácuo num evaporador rotativo. Juntam-se outros 200 ml de água desionizada e evapora-se novamente sob vácuo num evaporador rotativo. O produto em bruto é então dissolvido em 100 ml de água desionizada num banho de ultra-sons e filtrada. O

filtrado é tratado por meio de uma coluna de permuta iónica Dowex 1X8 (100-200 malhas, forma OH) (15×4,9 cm) e eluído com água, na qual o produto em bruto após aproximadamente 150 ml é eluído num volume de 300 ml (pH 10,4). As fracções são controladas com TLC (Merck sílica gel 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/água 5:2:3, $R_f=0,42$, coloração TDM/desenvolvimento em câmara de cloro. Das fracções combinadas contendo o produto, o solvente é removido por destilação em vácuo em um evaporador rotativo, para produzir 5,2 g de um óleo incolor.

VI. Sal Zincke de nicotinamida (6)

Sob atmosfera de azoto, 58,6 g dinitroclorobenzeno é fundido e em seguida, é adicionado à massa fundida 29,32 g de nicotinamida. Aquece-se tudo durante 2,5 h a 110°C. Por meio de um condensador de refluxo são adicionados 500 ml de uma mistura 3:2 (v/v) de etanol/água e procede-se a aquecimento ao ponto de ebulição sob refluxo até que uma solução seja formada. Após agitação durante a noite à temperatura ambiente, e a adição de 150 ml de 50% etanol/água e 100 ml de água, faz-se a transferência para uma ampola de decantação e lava-se por três vezes com 500 ml de clorofórmio. A fase aquosa separada é misturada com 300 ml e 50 g de carvão activado, agitada durante 1 h à temperatura ambiente e em seguida filtrada através de um filtro de profundidade Seitz K 700. O filtrado é concentrado num evaporador rotativo, sob vácuo para cerca de 100 ml, sendo que a temperatura do banho não deve subir acima de 20°C durante esse processo. Dilui-se então no final com 300 ml de água e com agitação à temperatura ambiente, é adicionado 70 g de tetrafluoroborato de sódio. O precipitado é recristalizado a partir de metanol/água. O produto cristalizado é filtrado com um pouco de acetona e em seguida lavado com éter dietílico e seco durante 24 horas, sob vácuo intenso a 40°C. Rendimento: 21,1 g, 23%. As fracções são controladas com TLC: controlados (Merck sílica gel 60 F-254 de butanol/ácido acético glacial/água 5:2:3, $R_f=0,56$).

VII. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(3-carboxamidopiridin-1-il)-2,3-dihidroxi-1-(hidroximetil)-ciclopentano (6) = carba mononucleósido de nicotinamida = carbaNMN

Com agitação, à temperatura ambiente a uma solução de 4,5 g (31 mmol) de ciclopentilamina 5 em 110 ml de metanol abs. é adicionada gota a gota num espaço de tempo de 90 minutos, uma solução de 15,3 g (40,7 mmol) do sal de Zincke 6 em 110 ml de metanol abs. É então adicionado 1 ml de diisopropiletilamina e depois deixado com agitação durante dois dias à temperatura ambiente. São depois adicionados 500 ml de água, e é tudo transferido para uma ampola de decantação, sendo lavada por duas vezes com 200 ml de cloreto de metileno. A partir da fase aquosa separada, a água é removida por destilação num evaporador rotativo, sob vácuo. O resíduo é recolhido em 100 ml de água e purificado por cromatografia em coluna Sephadex C25 (forma Na⁺): coluna 70×7,5 centímetros de eluição a partir de solução tampão A (água desionizada) para a solução tampão B) 0,35M de NaCl em água com fluxo de 200 ml/h. São recolhidas fracções de 15 ml e monitorizada por TLC (sílica gel Merck 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/água 5:2:3, R_f 0,22).

O solvente é removido por destilação em evaporador rotativo sob vácuo a partir das fracções do produto combinadas. O resíduo contendo sal é adicionado a 500 ml de etanol quente e fervido. Procede-se a filtração a quente e deixa-se repousar durante 12 h à temperatura ambiente. O precipitado é então separado por filtração e o solvente assim separado é destilado sob vácuo num evaporador rotativo. Rendimento: 7 g.

VIII. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(3-carboxamidopiridin-1-il)-2,3-dihidroxi-1-fosfatoílmethyl)ciclopentano (6) = monofosfato de carba-NMN

A uma suspensão de 7 g (27,7 mmol) de carba NMN em 80 ml de éster trimetílico de ácido fosfórico seco, é adicionado a 0°C uma mistura de 20 ml de oxicloreto de fósforo e 50 ml de éster trimetílico do ácido fosfórico. Procede-se em seguida a agitação durante 2 horas a 0°C e depois outras 2 h à temperatura ambiente. Sob arrefecimento a gelo, são adicionados 300 ml de água e a mistura é então concentrada num evaporador rotativo, sob vácuo até 10 ml. É recolhida em 100 ml de água, filtrada e purificada por meio de cromatografia de coluna sobre Sephadex C25 (forma NEt₃H⁺):

coluna 66×9cm eluição de solução tampão A (água desionizada) em solução tampão B) 0,60M de acetato de amónio, fluxo de 200 ml/h. São recolhidas fracções de 15 ml e monitorizada por TLC (sílica gel Merck 60 placas F-254: ácido isobutírico/amoníaco/água 66:1:33, R_f 0,25). O solvente removido das fracções combinadas contendo o produto é então destilado em evaporador rotativo, sob vácuo. O resíduo é depois dissolvido em 100 ml de água e liofilizado. Este procedimento é repetido três vezes. Rendimento: 4,0 g.

IX. carbaNAD (9)

À temperatura ambiente e no espaço de tempo de 1 h, uma solução de 1,25 g (30 mmol) de AMP morfolidato em 40 ml de DMF absoluto, é adicionada gota a gota a uma mistura de uma solução de 3,31 g (10 mmol) monofosfato de carbaNMN em 40 ml de DMF absoluto e 78 ml (39 mmol) 3,5% tetrazole em acetonitrilo absoluto. A mistura é agitada durante 2 dias à temperatura ambiente.

Sob arrefecimento com gelo seco/acetona é adicionada uma solução aquosa de KHCO_3 a 10% a fim de ajustar o valor de pH para 6,5. Procede-se a diluição com 500 ml de água e depois cuidadosamente à concentração sob vácuo num evaporador rotativo até à secagem. O resíduo é depois dissolvido em 150 ml de água desionizada e purificado por cromatografia em coluna Sephadex QAE 25 (forma NEt_3H^+): Coluna: 65×4,5 cm. A eluição a partir de solução tampão A (água desionizada) para a solução tampão B 1M de carbonato de trietilamónio, fluxo de 200 ml/h: fracções de 15 ml são recolhidas e monitorizadas por TLC (gel de sílica Merck 60 placas F-254: ácido isobutírico/amoníaco/água 66:1:33, R_f 0,47).

O solvente removido a partir das fracções do produto combinadas é destilado num evaporador rotativo, sob vácuo. O resíduo é depois dissolvido em 100 ml de água e liofilizado. Este procedimento é repetido três vezes. Rendimento: 1,1 g

Estudo de estabilidade de carbaNAD

Uma solução de 10 mM de carbaNAD ou NAD é carregada e exposta com uma solução tampão de fosfato de potássio 0,1M

até pH 8. O teor é determinado após 0,25, 75 e 175 horas, por meio de cromatografia HPLC.

Solução tampão A: 100 mM KHPO_4 + 10 mM Bissulfato de tetrabutilamônio, pH 6,9

Solução tampão B: solução tampão A + acetonitrilo 1:1

Fluxo de 1,0 ml/min Detecção 254 nm

RP18 coluna L 125 de diâmetro 4,6 milímetros

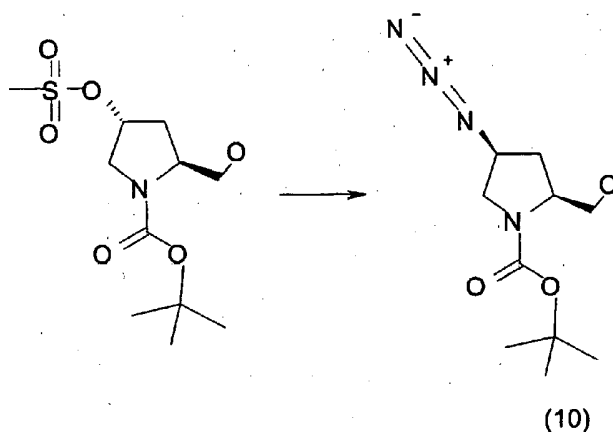
Gradiente: reter solução tampão B, 40 min a 35%, durante 2 minutos em seguida, dentro de 3 min levar a solução tampão A a 0%.

Nas Figuras 2 e 3 são apresentadas as percentagens de área de HPLC, após carga/exposição, em diferentes momentos.

Com base na ocorrência de produtos de decomposição (nicotinamida, ADP-ribose, AMP, ADP, e os produtos de decomposição desconhecidos para NAD, bem como os produtos de decomposição desconhecidos Y1 e Y2 para cNAD) demonstra-se que cNAD é muito estável quando comparado com NAD.

B) Preparação de pirrolidinil-NAD

I. Síntese pNAD, 1º Passo (Composto 10)



O trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-prolinol (35,4 g, 120 mmol) é inicialmente dissolvido em 500 ml de DMF, é então adicionada azida de sódio (15,6 g, 240 mmol) dissolvida em 75 ml de água e procede-se a aquecimento a 70°C durante 5 h. A mistura é então agitada durante a noite a temperatura ambiente, e depois vertida sobre em 1000 ml de solução salina

saturada, procedendo-se então à extracção com acetato de etilo. O acetato de etilo é depois seco com Na_2SO_4 e em seguida evaporado.

São obtidas 32,8 g (> 100%) de resíduo (valor teórico: 29 g).

O produto em bruto é processado e directamente monitorizado por TLC e MS. A fim de se proceder a controlo a cromatografia em camada fina é realizada em uma placa KG 60 F254: (eluente: acetato de etilo/pulverizado com ninidrina): trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-prolinol RF. 0,49

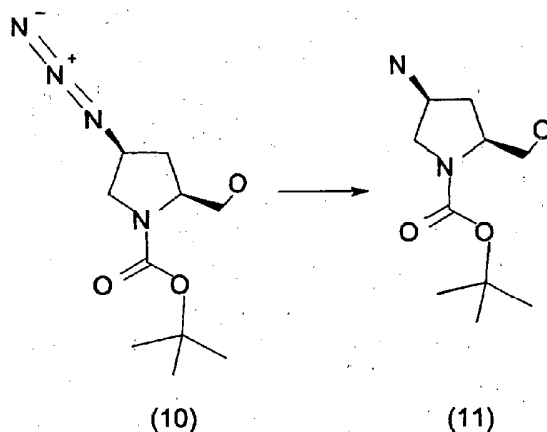
Produto RF. 0,78

MS ESI ES+ 242

A identidade do produto é ainda confirmada por análise de RMN.

* trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-prolinol está disponível comercialmente a partir de Sanochemia, Pharmazeutika AG, Kat.-Nr. P -719.

II. Síntese pNAD, 2º Passo (Composto 11)



O composto 10 (120 mmol) em 500 ml de metanol é misturado com 2,0 g de carvão de Pd (10%) e a mistura hydrogenada a 30 mbar durante 12 h. O balão onde se processa a reacção é então purgado e lavado diversas vezes com H_2 , o catalisador é filtrado com aspiração em vácuo e evaporado.

Resulta um óleo incolor (deve ser ainda processado imediatamente, devido à elevada sensibilidade com o ar).

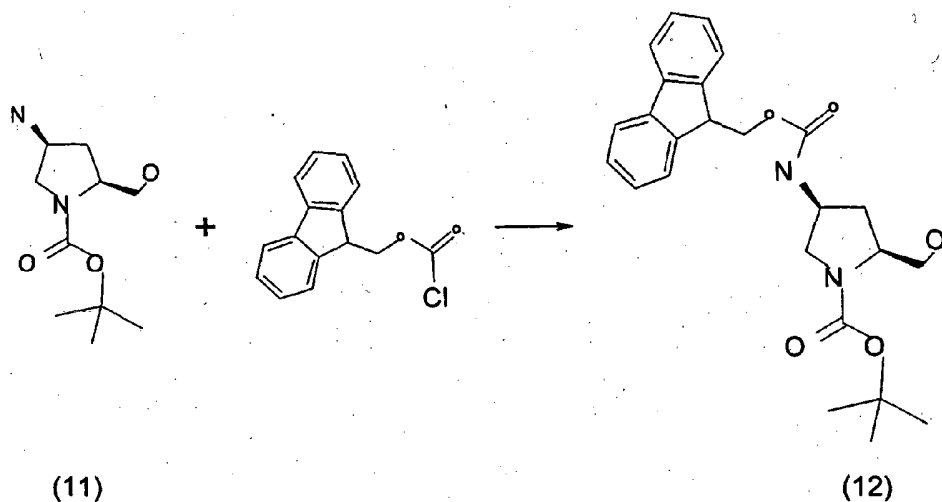
MS ESI ES+ 217 disponível

TLC (iso-hexano/acetato de etilo 1/1 / KG 254 F/ ninidrina):

O produto permanece no início

A identidade do produto foi ainda confirmada por análise de RMN.

III. Síntese pNAD, 3º Passo (Composto 12)



120 mmol do composto 11 (PM: 216,28) são dissolvidos em 500 ml de dioxano com NaHCO_3 (11,0 g, 130 mmol) e cloreto de Fmoc (33,8 g, 130 mmol), deixando-se a mistura sob agitação durante a noite à temperatura ambiente. Os sais resultantes são removidos por filtração, a solução é evaporada e o resíduo purificado numa coluna de gel de sílica (iso-hexano e iso-hexano/EE 8/2 - 1/1).

A fracção principal origina 39,0 g = 74,1% *(valor teórico = 52,6 g).

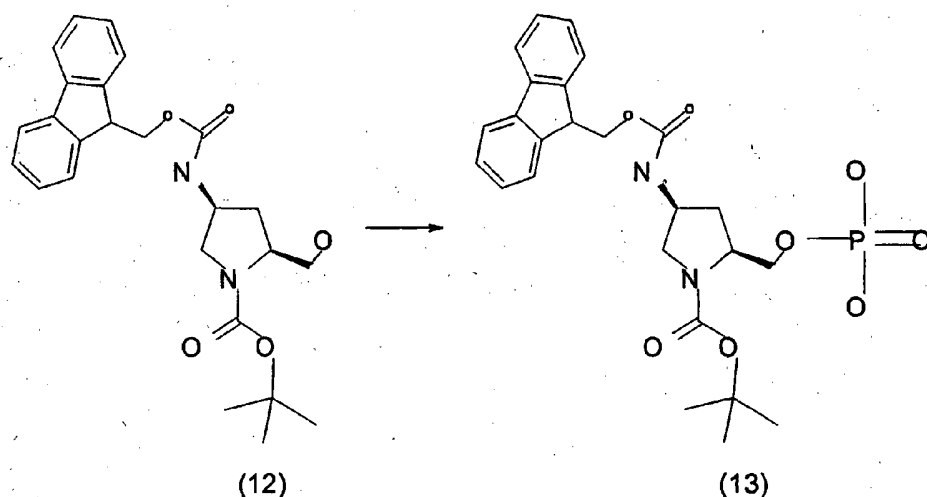
TLC (KG 60 F254 eluente iso-hexano/ acetato de etilo 2:1): RF 0,13

MS ESI ES + 439/ + 339

A identidade do produto é ainda confirmada por análise de RMN.

* Rendimento baseia-se no material de partida do 1º passo

IV. Síntese pNAD, 4º Passo (Composto 13)



O composto 12, obtido a partir do 3º Passo (7,08 g, 16,1 mmol) é dissolvido em 80 ml de fosfato de trimetilo e em seguida tudo é arrefecido num banho de gelo a 0°C. Mistura-se POCl₃ com fosfato de trimetilo (13 ml de POCl₃ obtido em destilação recente, em 13 ml de fosfato de trimetilo), sendo este depois passado através de um funil de adição por gotejamento e adicionado em pequenas porções à mistura sob atmosfera de árgon, durante 20 minutos. A temperatura aumenta então devido à reacção exotérmica que se produz, até 5°C. Subsequentemente são adicionadas 2,6 ml de piridina e tudo é agitado durante 40 min a 0°C sob atmosfera de árgon.

A solução reaccional é adicionada cuidadosamente gota a gota em 800 ml de solução 1 M de bicarbonato de trietilamónio (pH = 8) arrefecida a baixa temperatura com gelo. Após a adição ser completada, a agitação continua ainda durante 1 h. A solução ligeiramente turva é então adicionada gota a gota a 1 L de uma solução saturada de NaCl (de forma rápida). Para se obter uma melhor cristalização procede-se a agitação durante a noite. O precipitado obtido é então separado por meio de filtração. O resíduo é depois dessalinizado numa coluna Diaion. Para este fim, 500 g de Diaion são colocados em isopropanol/água 1/1, deixando-se dilatar durante a noite. Com o Diaion preenche-se então a coluna e lava-se com água. O resíduo é então mantido em suspensão/pasta em 100 ml de água, pH 3,5 (ácido acético), em seguida é aplicado a uma coluna e lavado com água (pH 3,5) pelo tempo necessário até ficar isento de sal. Em seguida, a substância a partir da coluna é eluída com 25% de isopropanol (pH 3,5). A solução é então

processada por evaporação à temperatura ambiente e em condições de vácuo elevado.

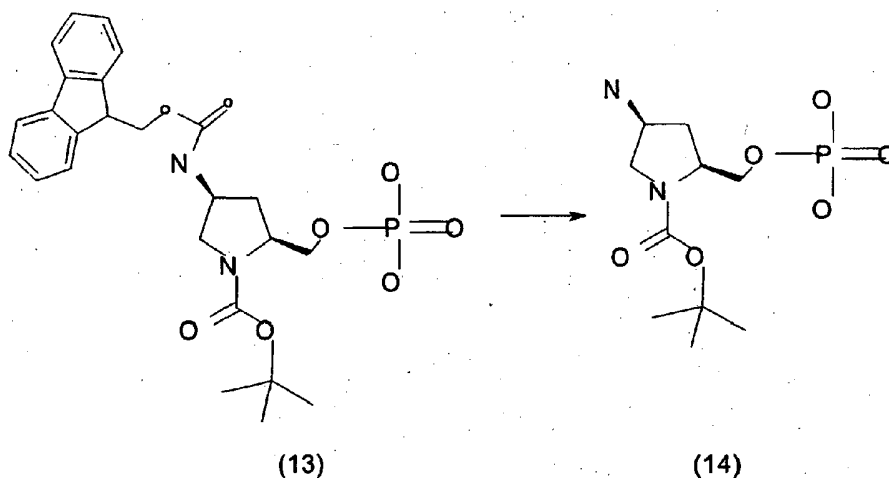
Resíduo = 2,6 g = 31,3 %

TLC RP8 F254/ MeOH/água 9/1

MS ESI ES - 517,13

A identidade do produto é confirmada por análise de RMN.

V. Síntese pNAD, 5º Passo (Composto 14)



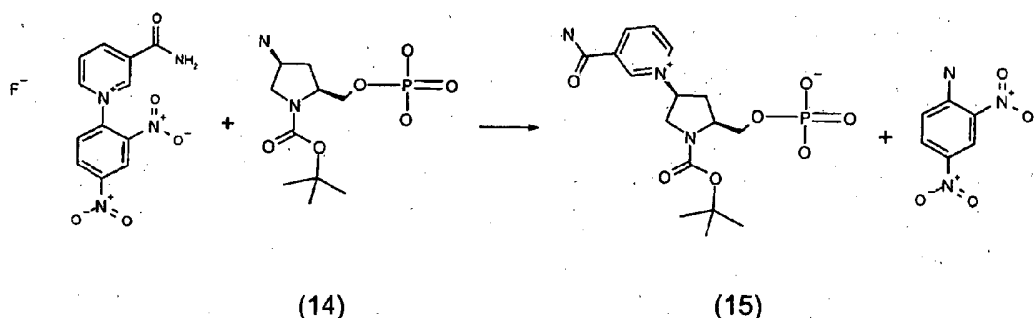
Uma mistura do composto 13 obtida a partir do 4º Passo (4,10 g, 7,9 mmol) em 250 ml de metanol e 83 ml de 25% de amoníaco coloca-se em agitação durante a noite à temperatura ambiente e levada à evaporação à temperatura ambiente em condições de vácuo. O resíduo é recolhido em 200 ml de água e agitado com 3×100 ml de acetato de etilo. Partes insolúveis são filtradas, a fase clara aquosa é separada e evaporada de novo à temperatura ambiente.

Resíduo = 2,56 g = 100%

MS ESI ES - 295

Para retirar os catiões NH_3 , o resíduo é dissolvido em 2×base de Hünig (N,N-diisopropiletilamina) e em cada caso, novamente processado por evaporação em condições de vácuo elevado.

VI. Síntese pNAD, 6º Passo (Composto 15)



Sal de Zincke (2,66 g, 8,99 mmol) é dissolvido em 50 ml de metanol e colocado sob agitação ao qual é adicionado então gota a gota a solução do composto 14 obtido a partir do 5º Passo (2,56 g, 8,31 mmol) dissolvida em 50 ml de metanol. A mistura passa a uma coloração avermelhada e de forma gradual entra em solução. A mistura é assim deixada em agitação durante a noite à temperatura ambiente e o precipitado formado é separado por filtração. O filtrado é então evaporado sob vácuo, recolhido em 100 ml de água e extraído com acetato de etilo por três vezes.

A fase de acetato de etilo contém o subproduto de dinitroanilina, a fase aquosa contém o produto e sal Zincke residual. A fase aquosa é evaporada no vácuo à temperatura ambiente e o resíduo resultante com 10 ml de água adicionada é sujeito por 10 minutos a uma agitação com agitador magnético sendo os componentes insolúveis removidos por filtração. O produto permanece então dissolvido. Esta solução é então adicionada a uma coluna Diaion HP20 lavada com água (1000 ml) e lavado com água por 2×1000 ml. Em seguida, lava-se com água/isopropanol a 5% e frações positivas (detectadas por TLC RP8 MeOH/ W 9/1) são sujeitas a evaporação à temperatura ambiente. O resíduo é então triturado com isopropanol e filtrado por sucção, em condições de vácuo, com o auxílio de éter etílico.

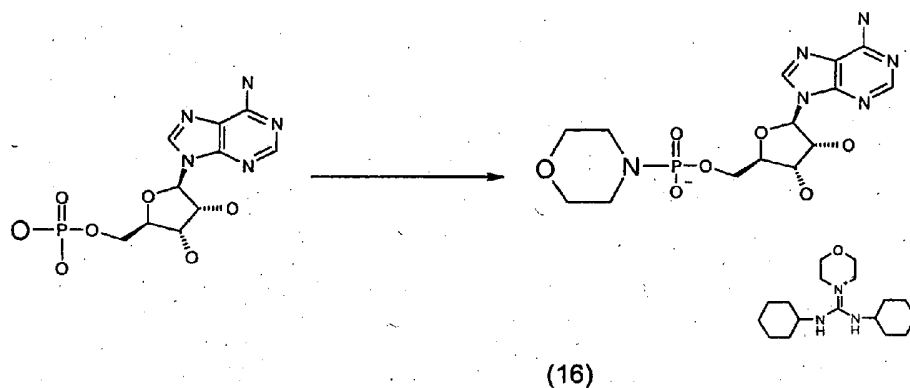
Resíduo = 1,60 g = 47,9 %

TLC RP8 254 MeOH/W 9/1

MS ES - 400,1 / ES + 402,0 - apresenta também massa dupla

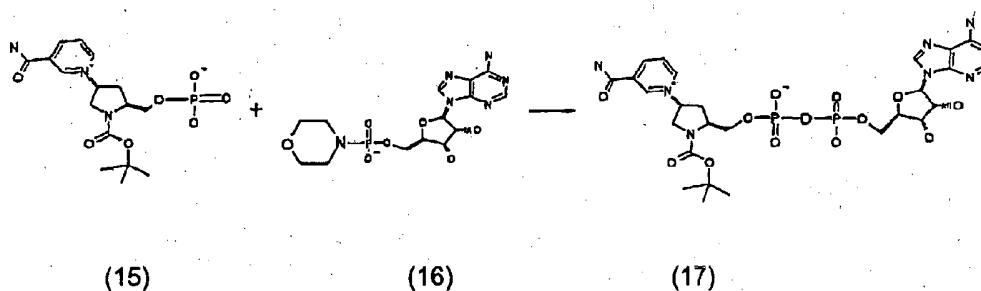
A identidade do produto é confirmada por análise de RMN.

VIIa. Síntese pNAD, 7a° Passo (Composto 16)



Uma mistura de ácido AMP (ácido livre monofosfato de adenosina) (10 g, 27,5 mmol) em 60 ml de metanol (seco sobre sódio) e 5,3 ml (60 mmol) de morfolina (recentemente destilado) é agitada até que uma solução límpida seja formada. Em seguida adiciona-se 17 g (82,5 mmol) de N,N'-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) e agita-se durante a noite à temperatura ambiente em condições de exclusão de humidade. O precipitado resultante (DCH) é removido por filtração em condições de vácuo e o filtrado é concentrado por evaporação rotativa a 30°C. Em seguida, é colocado sob agitação com 150 ml H₂O/150 ml de éter dietílico e de novo filtrado. Após a separação das fases, a fase aquosa é ainda extraída por duas vezes com 75 ml de éter dietílico. A fase aquosa é então concentrada por evaporação rotativa à temperatura ambiente. O resíduo é então dissolvido por duas vezes em piridina e em cada uma delas de novo concentrado por evaporação rotativa sob condições de forte vácuo.

VII. Síntese pNAD 7° Passo (Composto 17)



Uma mistura de morfolidato de AMP (composto 16 obtido a partir do 7º Passo) (2,53 g, 3,61 mmol), composto 15 obtido a partir do 6º Passo (1,60 g, 3,98 mmol), solução de MnCl_2 em formamida 0,2 M* (27,1 ml, 5,42 mmol) e MgSO_4 anidro (0,87 g, 7,95 mmol) é agitada durante a noite à temperatura ambiente e após esse tempo, determinado por meio de TLC (RP8 MeOH/W 9/1), como se verifica em grande medida a conversão. A mistura reaccional é então precipitada com acetonitrilo e filtrada em condições de vácuo.

Resíduo = 5,3 g (teoricamente 2,64g)**

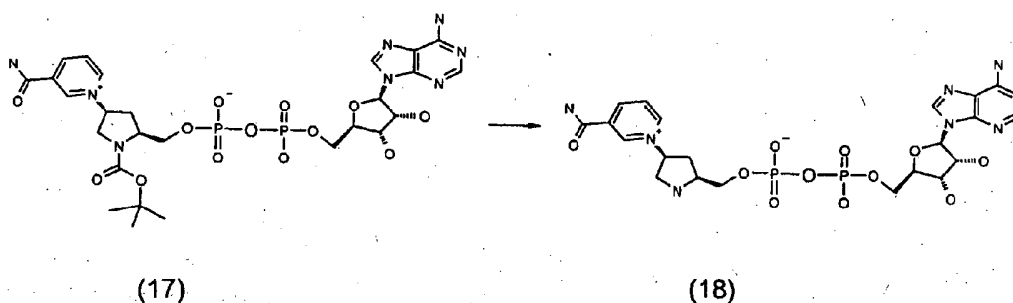
MS, ESI ES - 729,3 = Produto, ES -415 = catião morfolidato de AMP, ES -400,2/ ES +402,1 resíduos de composto de 15 (6º Passo)

TLC RP 8 F254 RF 0,085

* Para preparar esta solução 2516 mg de MnCl_2 anidro é dissolvida com agitação em 100 ml de formamida 99,99% e em seguida colocado em peneiros moleculares de 4A.

** O resíduo é ulteriormente processado como um produto em bruto.

VIII. Síntese pNAD 8º Passo (Composto 18, pirrolidinilo NAD)



500 mg do composto 17 obtido a partir do 7º Passo (produto em bruto, contendo cerca de 50% de sal) com 5,0 ml de ácido trifluoroacético (TFA) são colocados sob agitação à temperatura ambiente durante 1 h e por fim concentrados por evaporação. Como resíduo obtém-se cerca de 500 mg de um óleo incolor.

MS ESI ES - 729,24 (necessária adição de NH_3)

A purificação é levada a cabo em duas porções de 200 mg e 300 mg, em cada um dos casos, com duas etapas de separação:

1º Etapa de separação:

Fractogel EMD SO3-s coluna: D(interno) = 14 mm L
(empacotamento) = 85 milímetros

I. Condicionamento

- (fluxo de 5 ml/ min)
- a) 100 ml de H₂O
 - b) 200 ml de 0,25M de H₂SO₄
 - c) 100 ml de H₂O
 - d) 200 ml de solução 1M de amoníaco
 - e) 100 ml de H₂O

II. Separação

- a) 200 mg de substância dissolvidos em 5 ml de H₂O
- b) eluída com gradiente de H₂O solução 0,2M de NH₄HCO₃.
(Eluente A = 250 ml de H₂O em um balão de Erlenmeyer e agitada com um agitador magnético e bombeado para a coluna com 5 ml/ min
Eluente B = solução 0,2 M NH₄HCO₃
Bombeado para A com 2,5 ml/ min.)

III. Fraccionamento:

- a) Fracções de 3 ml cada
- b) 1. Pico relativo a impurezas
- c) 2. Pico após fluxo de cerca de 70 ml de substância

IV. Recondicionamento:

- a) 100 ml de solução 1 M de amoníaco.
- b) 100 ml de H₂O.

2º Etapa de separação:

Diaion HP20, Coluna D(interno) = 30 mm L (empacotamento) 130 milímetros

Eluída com 100 ml de H₂O e 100 ml de H₂O/5% de isopropanol
Substância vem já com a fase aquosa, na parte relativa ao isopropanol unicamente ainda impurezas.

De acordo com análise HPLC as três fracções obtidas apresentam:

F1 = 13,5 mg

F2 = 5,5 mg

F3 = 11,5 mg

Total = 30,5 mg = 12,2%

A identidade de pirrolidinilo de NAD (Composto 18) é confirmada por estudos de RMN.

Ensaio de glucose desidrogenase para pNAD

A fim de investigar o papel do pNAD como um co-factor para a glucose desidrogenase (GlucDH), é levado a cabo um ensaio de actividade GlucoseDH em solução tampão Tris 0,1M/NaCl 0,2 M (pH 8,5). A concentração de glucose é de 80 mM. São usadas concentrações de pNAD ou de NAD de 0,05-0,5 mM. São usados aqui 10 (pNAD) ou 0,002 mg/ml (NAD) [83 ou 0,017 μ m] GlucDH. O ensaio é conduzido à temperatura ambiente, no qual a reacção enzimática é monitorizada em intervalos de tempo regulares por meio dos espectros de absorção registados. Os valores indicados na Tabela 1 referem-se a uma medição de absorção, após 4 minutos.

Tabela 1

(p)NAD (mM)	U/ml	% Actividade	[GlucDH] usado
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

Espectros de absorção da pNAD e pNADH

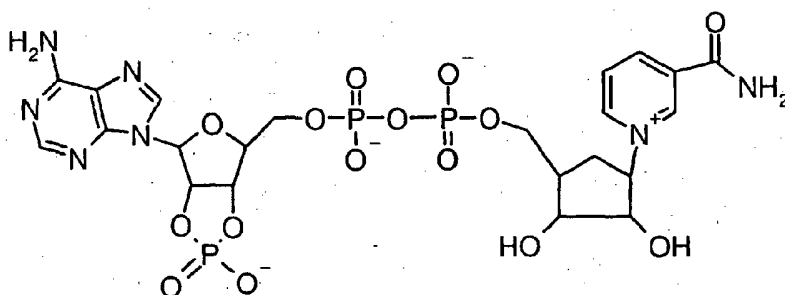
Os espectros de absorção de NAD e pNAD ou NADH e pNADH são apresentados nas Figuras 6A e 6B. NAD e pNAD apresentam um valor máximo de absorção a 260 nm. O pNADH, ou seja pNAD após ensaio de actividade com GlucDH, mostra quando comparado com NADH um desvio para o vermelho do valor de máximo de absorção de aproximadamente 10 nm (Figura 6B).

Nas figuras 7 e 8 são apresentados os espectros de fluorescência de NADH e pNADH como complexo GlucDH. Os espectros são feitos, cada um deles depois de ensaios de actividade com GlucDH. A Figura 7 mostra os espectros de emissão de NADH/complexos de pNADH-GlucDH com comprimentos de onda de excitação de 340 ou 370 nm. Os espectros de emissão de NADH e pNADH a comprimentos de onda de excitação de 370 nm são semelhantes. A Figura 8 mostra um espectro de excitação para um NADH/complexo pNADH-Gluc-DH a um comprimento de onda de emissão de 460 nm. O pNADH mostra um espectro de excitação mais amplo do espectro do NADH. Novamente, os espectros são feitos após ensaios de actividade com GlucDH.

Estudos de estabilidade de pNAD

Para se investigar a estabilidade do pNAD em comparação com NAD, são colocadas as mesmas quantidades de NAD e pNAD, em cada caso com 0,15 M de KPO_4 em soluções tampão de NaCl 1M (pH 7,0) e incubadas a 50°C. A degradação do NAD ou pNAD é monitorada por HPLC. A Figura 9 mostra os níveis de área percentual do (p)NAD em comparação com os níveis de (p)NAD relativos ao tempo zero. A figura mostra que a pNAD é muito mais estável que a NAD.

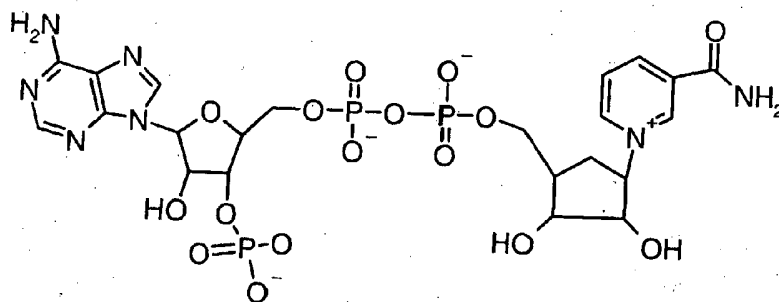
C) Preparação de ciclofosfato de carbaNAD (19)



A 0,74 ml de uma solução de 0,2M de cloreto de manganês em formamida absoluta, são adicionados 79 mg (0,1 mmol) 05' -(hidroxi-morfolino-fosforil)-02' ,03' -hidroxi-fosforil-adenosina, di-hidrato de sal de ciclohexilamina de ácido N-ciclo-hexil-morfolina-4-carbonimídico (seco por co-evaporação com piridina (Morphant *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*; 83; 1961; 663-675), 44 mg (0,105 mmol) de monofosfato de carba-NMN e por fim 25 mg de sulfato de magnésio seco. A

mistura é agitada durante 3 dias num vaso reaccional selado sob atmosfera de árgon e em seguida com agitação recebe 10 ml de acetonitrilo. O precipitado é removido por filtração, purificado por cromatografia-RP em uma coluna RP 18 Hypersil ODS 250×21,2 milímetros, 5 µm durante 60 minutos com um gradiente de 0% de B a 100% de B. Eluente A: 0,1M de acetato de trietilamónio. Eluente B: mistura 1:4 de 0,1M de acetato de trietilamónio e acetonitrilo; Caudal de fluxo: 10 ml/ min. A eluição é monitorizada por detecção a 260 nm. A fracção principal é recolhido e liofilizada por 5 vezes a fim de remover o acetato de trietilamónio. O sal de trietilamónio é então por meio de Dowex 50 WX2 convertido no ácido livre e em seguida no sal de lítio. Rendimento: 10 mg .

D) Preparação de carbaNADP (20)



A uma solução de 2,2 mg de sal de lítio de ciclofosfato de carbaNAD (19) em 1 ml de solução tampão de bis-Tris propano (0,02M, pH 7,5) é adicionada durante 6 horas por três vezes quatro unidades de ribonuclease T2 a 37°C. A mistura é mantida durante a noite a 37°C. A enzima é desnaturada por aquecimento a 65°C durante 20 min. Após filtração é conduzida uma purificação através de cromatografia RP com uma coluna RP 18 Hypersil ODS 250×21.2 mm, 5 µm usando um gradiente de 0% de B a 100% de B ao longo de 60 min: Eluente A: 0,1M de acetato de trietilamónio, Eluente B: mistura 1:4 de acetato de trietilamónio 0,1M e acetonitrilo; caudal de fluxo: 10 ml/ min. A eluição é monitorizada por meio de detecção a 260 nm. A fracção principal é recolhida e liofilizado por 5 vezes a fim de remover o acetato de trietilamónio.

Espectro de massa (MALDI Applied Biosystems Voyager System 6327: calculado 742,45, encontrado: 743,17)

E) Ensaio da actividade da glucose desidrogenase para cNAD

Tal como descrito para pNAD em B), é realizado um ensaio de actividade da glucose desidrogenase para cNAD em comparação com NAD. Para tal são usados concentrações de glucose desidrogenase de 0,1 (cNAD) ou 0,002 mg/ml (NAD), [0,83 ou 0,017 μ m]. As quantidades utilizadas e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2

(c)NAD (mM)	U/ml	% Actividade	[GlucDH] usado
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) Espectros de absorção de cNAD e cNADH

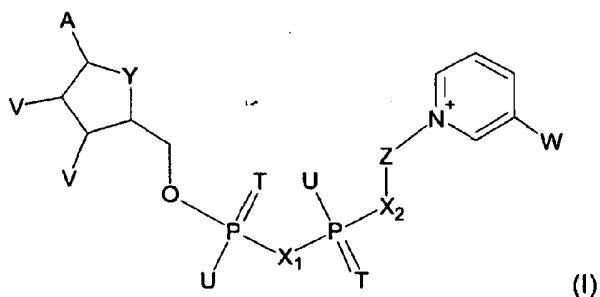
Nas Figuras 10A, 10B e 10C apresentam-se espectros de absorção de NAD e cNAD. Em ambos os casos, seja com NAD que com cNAD apresenta-se um ponto de máximo de absorção a 260 nm. A figura 10B mostra o espectro de absorção de NADH e cNADH, onde em cada um dos casos os espectros são feitos depois de ensaio de actividade com glucose desidrogenase. O valor do máximo de absorção de cNADH mostra um desvio para o vermelho de 20 nm. Outros ultteriores espectros de absorção de NADH e cNADH são apresentados na Figura 10C, onde como indicado na legenda, foram escolhidas diferentes condições associadas aos ensaios de actividade de glucose desidrogenase.

A Figura 11 mostra também um espectro de fluorescência de NADH e cNADH como complexo GlucDH. Os espectros foram realizados de acordo com os ensaios de actividade de glucose de desidrogenase a um comprimento de onda de excitação de 370 nm. Ambos NADH e cNADH mostram quando tratados com GlucDH um aumento no sinal de fluorescência.

Lisboa, 2014-03-21

REIVINDICAÇÕES

1. Elemento de teste para a determinação de glucose compreendendo: (i) uma glucose desidrogenase (E.C. 1.1.1.47) e (ii) como coenzima, um composto com a seguinte fórmula geral (I):



com

A= adenina ou um seu análogo,

T= em cada caso e de forma independente O, S,

U= em cada caso e de forma independente OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- ,

V= em cada caso, e de forma independente, OH ou um grupo fosfato, em que no caso em que um radical V seja um grupo OH e um segundo radical V seja um grupo fosfato, o grupo OH e o grupo fosfato possam formar um ciclo com os átomos de carbono aos quais eles estejam ligados,

W= COOR , $\text{CON}(\text{R})_2$, COR , $\text{CSN}(\text{R})_2$, onde R representa em cada caso e de forma independente H ou alquilo- $\text{C}_1\text{-C}_2$,

X_1, X_2 = em cada caso e de forma independente O, CH_2 , CHCH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, NH, NCH_3 ,

Y= NH, S, O, CH_2 ,

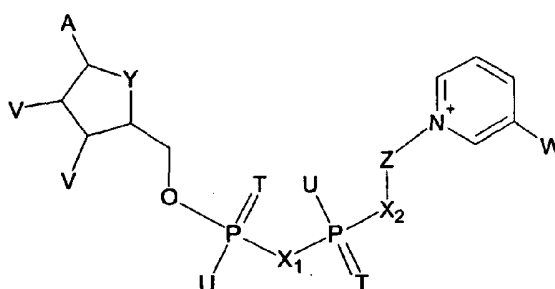
Z= um radical compreendendo um grupo cíclico com cinco átomos de carbono, contendo opcionalmente um heteroátomo seleccionado a partir de O, S e N, bem como opcionalmente um ou mais substituintes e um radical CR_4 , onde CR_4 é ligado ao grupo cíclico e a X_2 , com R_4 = em cada caso e de forma independente, H, F, Cl, CH_3 ,

com a condição de que Z e o radical piridina não estejam acoplados por uma ligação glicosídica,

ou um sal ou se for o caso uma forma reduzida do mesmo.

2. Elemento de teste de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os substituintes de Z serem seleccionados a partir do Grupo F, Cl e alquilo-C₁-C₂, opcionalmente fluorado ou clorado e/ou OH substituído, O-alquilo-C₁-C₂.

3. Elemento de teste de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que compreende como co-enzima um composto com a seguinte fórmula geral (I') :



(I')

com

A= adenina ou um seu análogo,

T= em cada caso e de forma independente O, S,

U= em cada caso e de forma independente OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,

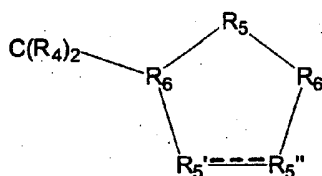
V= em cada caso, e de forma independente, OH ou um grupo fosfato,

W= COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂, onde R representa em cada caso e de forma independente H ou alquilo-C₁-C₂,

X₁, X₂= em cada caso e de forma independente O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,

Y= NH, S, O, CH₂,

Z= um anel carbocíclico saturado ou insaturado ou anel heterocíclico de cinco membros, com a fórmula geral (II)



(II)

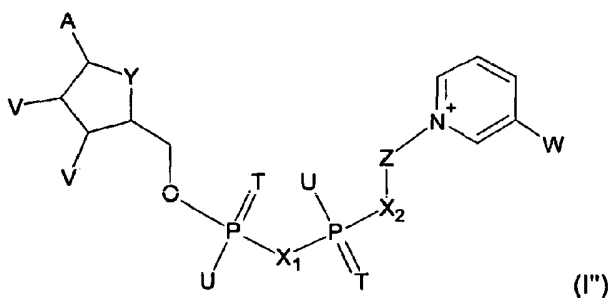
onde entre R5' e R5'' pode estar presente uma ligação simples ou dupla, com

$R_4 =$ em cada caso e de forma independente, H, F, Cl, CH_3 ,
 $R_5 =$ $CR_{4,2}$,
 se entre R_5' e R_5'' está presente uma ligação simples,
 $R_5' =$ O, S, NH, $NC-C_2$ -alquilo, $CR_{4,2}$, CHOH, $CHOCH_3$,
 $R_5'' =$ $CR_{4,2}$, CHOH, $CHOCH_3$,
 se entre R_5' e R_5'' está presente uma ligação dupla, então
 $R_5' = R_5'' = CR_4$,
 $R_6, R_6' =$ em cada caso e de forma independente, CH, CCH_5 ,
 ou um sal ou, se apropriado, uma forma reduzida do mesmo.

4. Elemento de teste de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 com $W = CONH_2$ ou $COCH_3$.

5. Elemento de teste de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, sob a forma de uma tira de teste.

6. Composto de fórmula geral (I''):



com

$A =$ adenina ou um seu análogo,

$T =$ em cada caso e de forma independente O, S,

$U =$ em cada caso e de forma independente OH, SH, BH_3^- , $BCNH_2^-$,

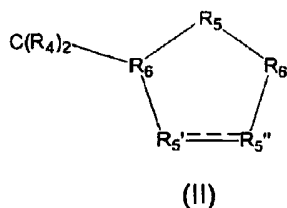
$V =$ em cada caso, e de forma independente, OH ou um grupo fosfato, em que no caso em que um radical V seja um grupo OH e um segundo radical seja um grupo fosfato, o grupo OH e o grupo fosfato possam formar um ciclo com os átomos de carbono aos quais eles estejam ligados,

$W =$ $COOR$, $CON(R)_2$, COR , $CSN(R)_2$, onde R represente em cada caso e de forma independente H ou alquilo- C_1-C_2 ,

$X_1, X_2 =$ em cada caso e de forma independente O ou NH,

$Y =$ NH, S, O, CH_2 ,

Z= um anel carbocíclico saturado ou insaturado ou anel heterocíclico de cinco membros, de fórmula geral (II)



onde entre R5' e R5'' pode estar presente uma ligação simples ou dupla,

R4= em cada caso e de forma independente, H, F, Cl, CH₃,

R5= CR₄₂,

se entre R5' e R5'' está presente uma ligação simples,

R5' = O, S, NH, N-alkilo-C-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

R5''= CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

se entre R5' e R5'' está presente uma ligação dupla, então

R5' =R5''=CR₄,

R6,R6' = em cada caso e de forma independente CH, CCH₃,

com a condição de que quando sejam R5=CH₂, T=O, U= em cada caso OH, V=OH, W=CONH₂, X₁,X₂=O e Y=O, então R5' e R5'' não sejam simultaneamente CHOH,

ou um sal ou, se apropriado, uma forma reduzida do mesmo.

7. Composto de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de pelo menos um radical U ser diferente de OH.

8. Composto de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo facto de pelo menos um radical U ser BH₃⁻.

9. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, com W = CONH₂ ou COCH₃.

10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, em que um radical V é um grupo OH e o segundo radical V é um grupo fosfato.

11. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, em que R5' = CR₄ ou CHOH.

12. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, onde $R5' = 0$.

13. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, em que $R5' = NH$ ou N-alquilo- $C-C_2$.

14. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, que é carbaNADP ou um sal ou uma forma reduzida do mesmo.

15. Complexo enzima-coenzima que consiste em um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 14, em combinação com uma enzima adequada.

16. Complexo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de a enzima se tratar de uma desidrogenase, seleccionado a partir de uma desidrogenase de glucose (E.C.1.1.1.47), desidrogenase de lactato (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), desidrogenase de malato (E.C.1.1.1.37), desidrogenase de glicerol (E.C.1.1.1.6), desidrogenase de álcool (E.C.1.1.1.1), desidrogenase de alfa-hidroxibutirato, desidrogenase de sorbitol, ou desidrogenase de aminoácido seleccionado a partir de desidrogenase de L-aminoácido (E.C.1.4.1.5).

17. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 14 ou de um complexo de acordo com a reivindicação 15 ou 16 para a detecção de um analito numa amostra por meio de uma reacção enzimática.

18. Conjunto ou kit de reagentes, que compreende um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 14, e, opcionalmente, uma enzima adequada ou com um complexo enzima-coenzima de acordo com a reivindicação 15 ou 16, bem como uma solução tampão adequada.

19. Reagente de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de a enzima ser uma desidrogenase seleccionada a partir de uma desidrogenase de glucose (E.C.1.1.1.47), desidrogenase de lactato (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), desidrogenase de malato (E.C.1.1.1.37), desidrogenase de glicerol (E.C.1.1.1.6), desidrogenase de

álcool (E.C.1.1.1.1), desidrogenase de alfa-hidroxibutirato, desidrogenase de sorbitol, ou desidrogenase de aminoácido, seleccionado a partir da desidrogenase de L-aminoácido (E.C.1.4.1.5).

20. Utilização do elemento de teste de acordo com uma das reivindicações 1 a 5 ou do kit de reagentes de acordo com as reivindicações 18 ou 19 para a determinação de analitos seleccionados a partir de glucose, ácido láctico, ácido málico, glicerol, álcool, colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutathione, péptidos, ureia, amónia, salicilato, piruvato, 5' -nucleotidase, creatina-quinase (CK), desidrogenase de lactato (LDH) e de dióxido de carbono.

21. Método para a detecção de um analito, que compreende as fases de:

(a) colocar em contacto uma amostra com um elemento de teste de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, ou com um conjunto de reagentes de acordo com as reivindicações 18 ou 19, compreendendo uma co-enzima, e

(b) detectar o analito.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo facto de o analito ser detectado fotometricamente ou fluorometricamente.

Lisboa, 2014-03-21

Figura 1

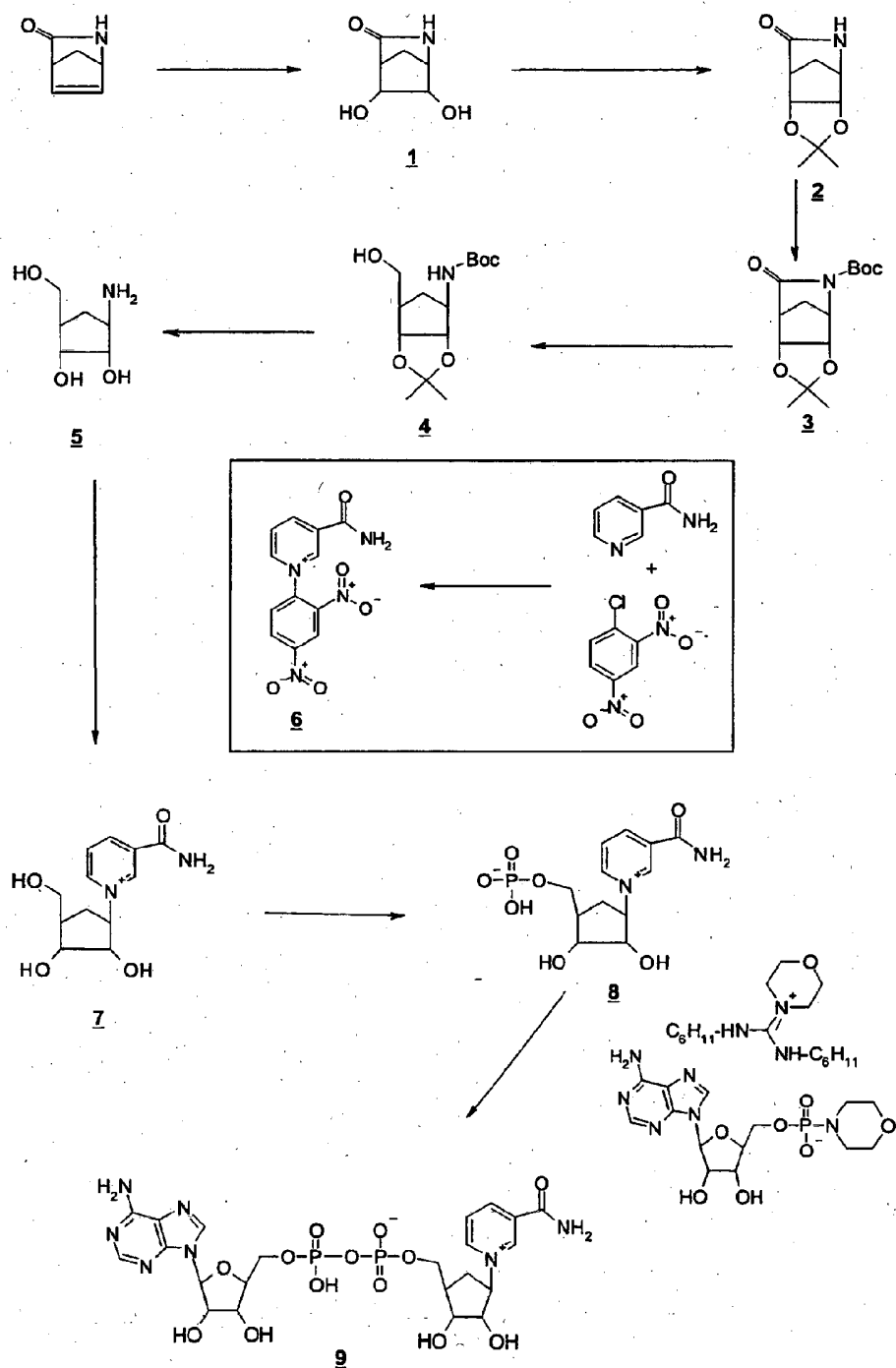


Figura 3

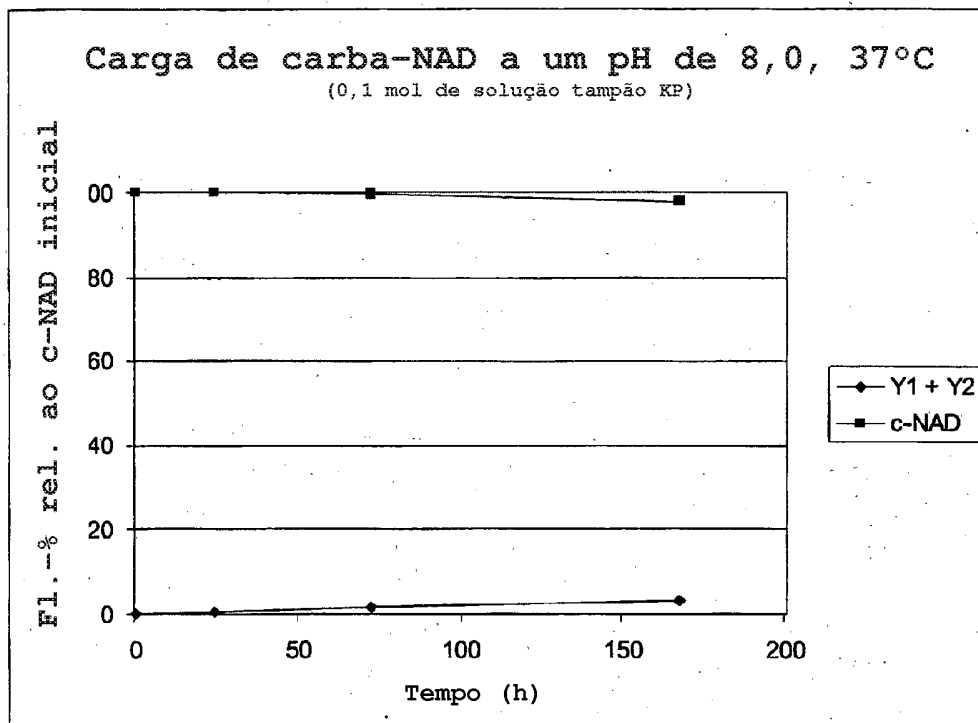


Figura 4

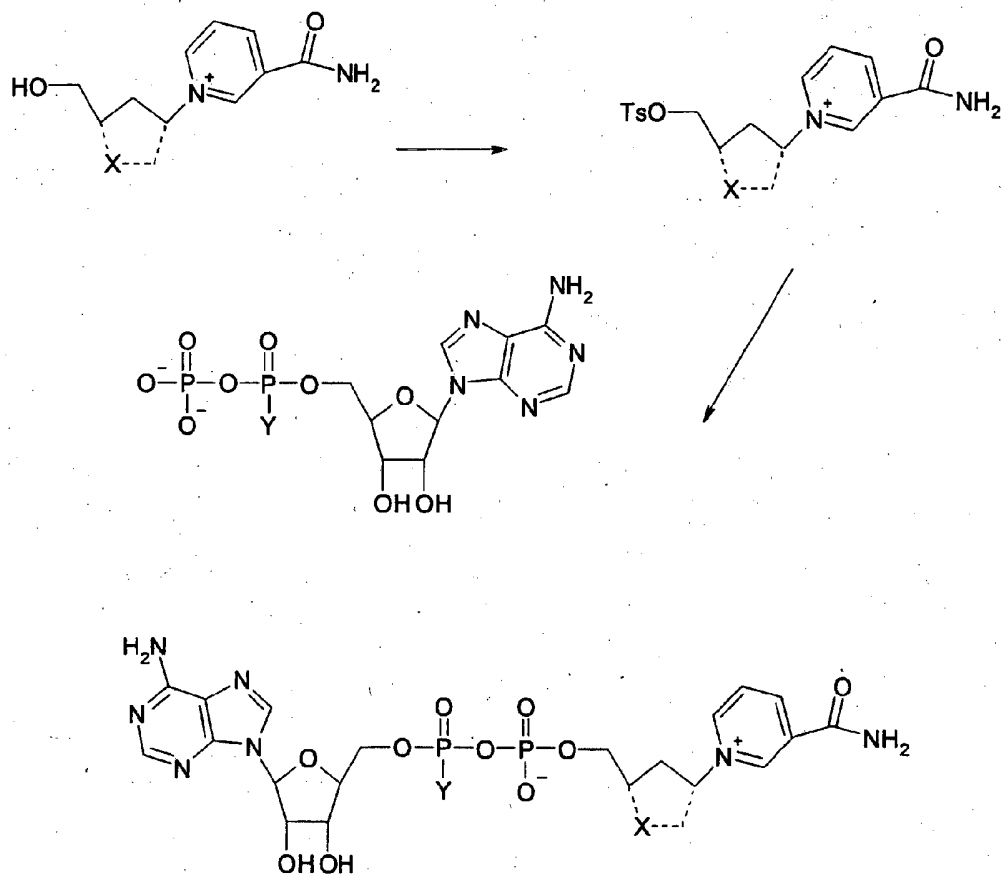


Figura 5

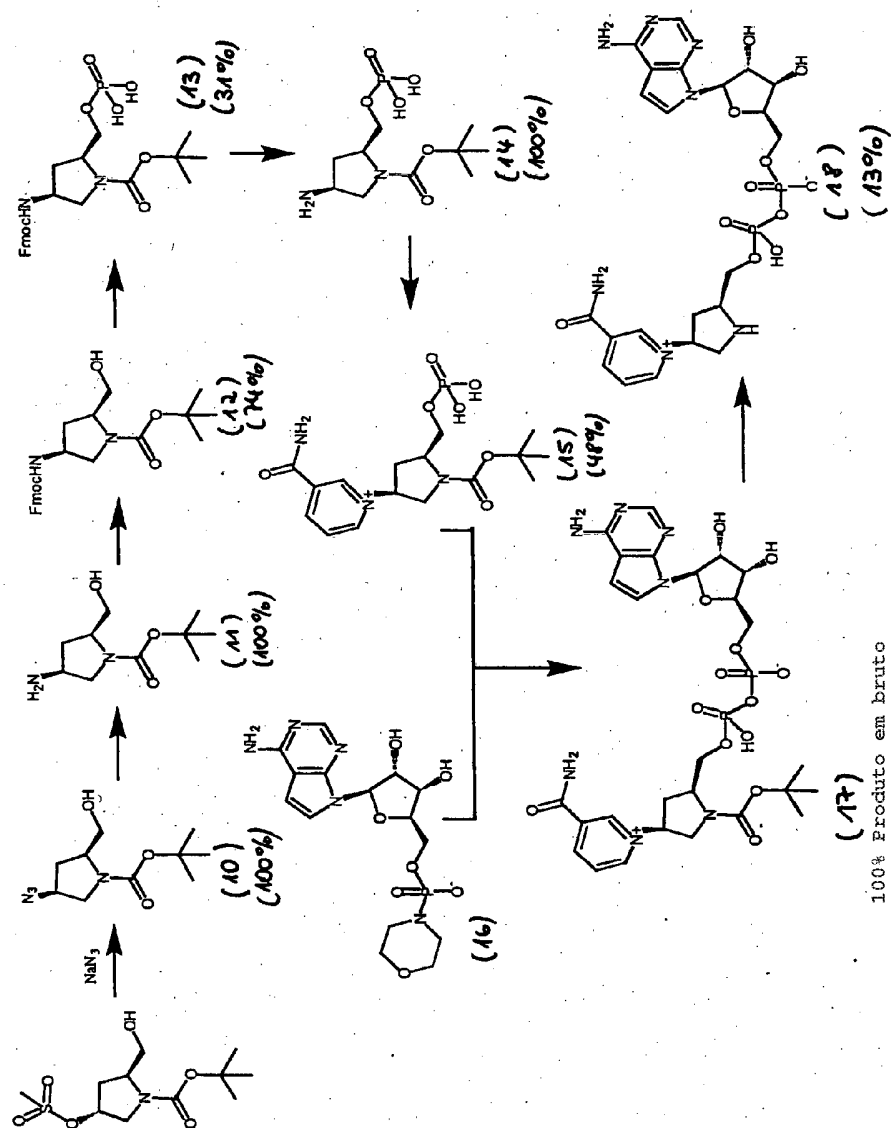


Figura 6A

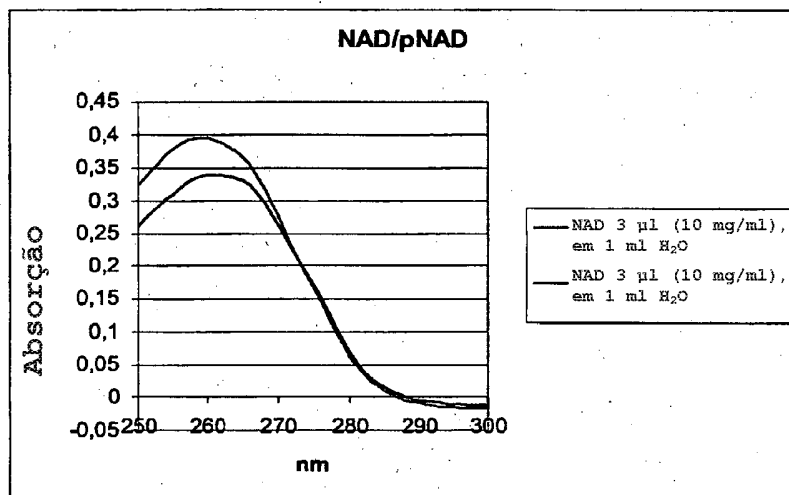


Figura 6B

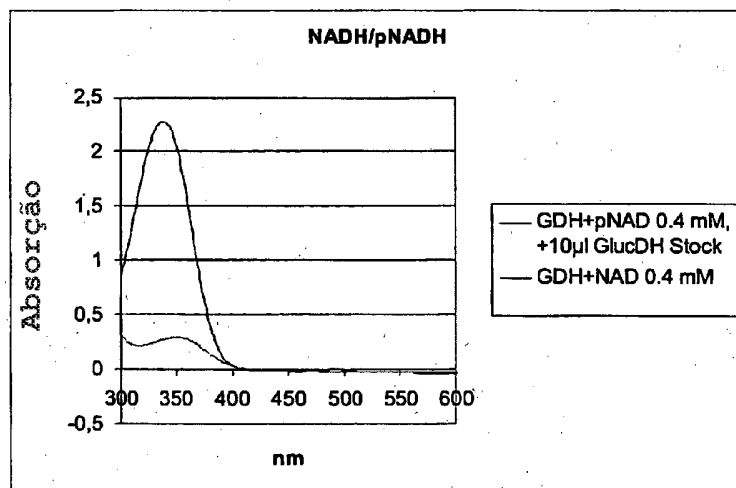


Figura 7

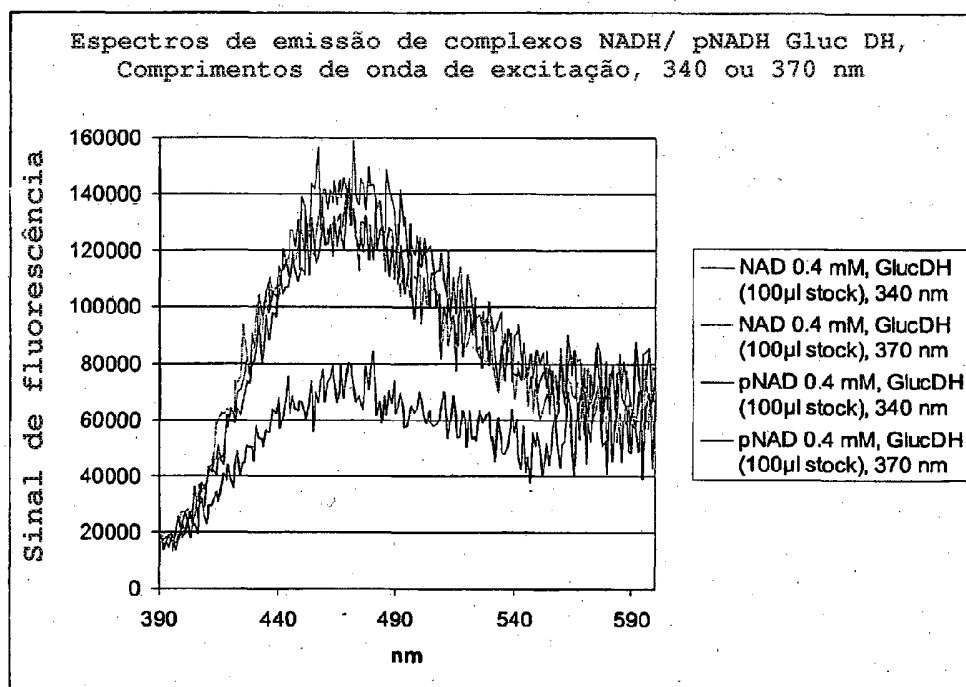


Figura 8

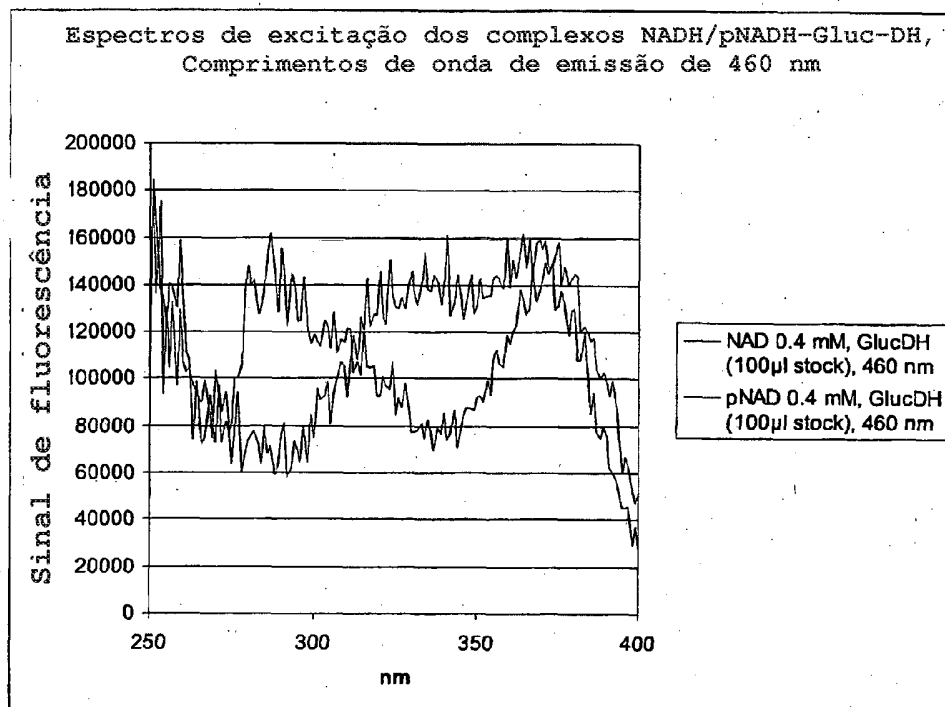
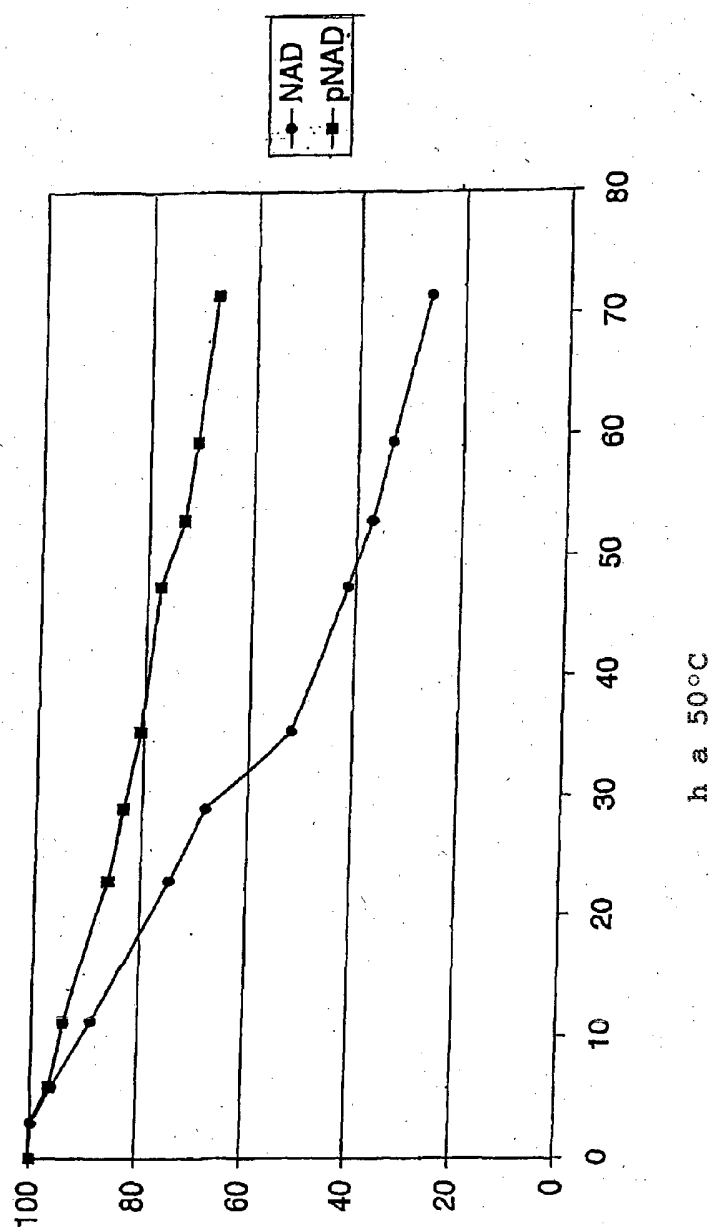


Figura 9



Percentual (p) de NAD em comparação
com (p) NAD ao tempo inicial

Figura 10A

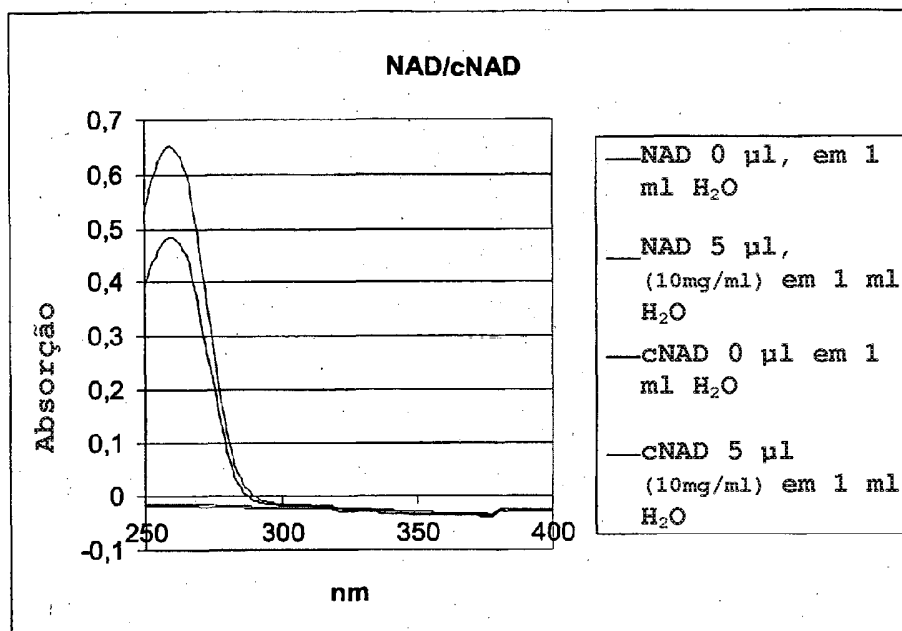


Figura 10B

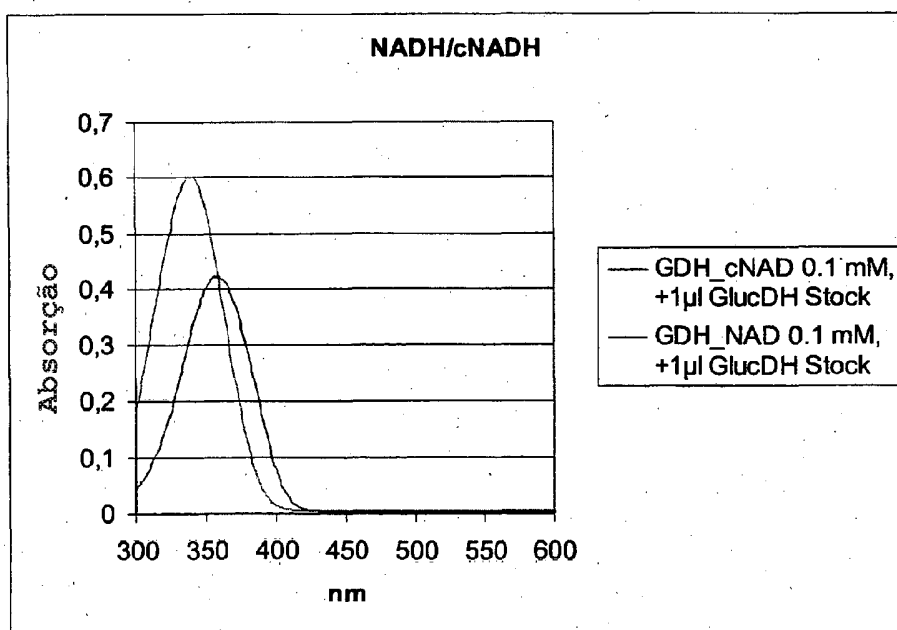


Figura 10C

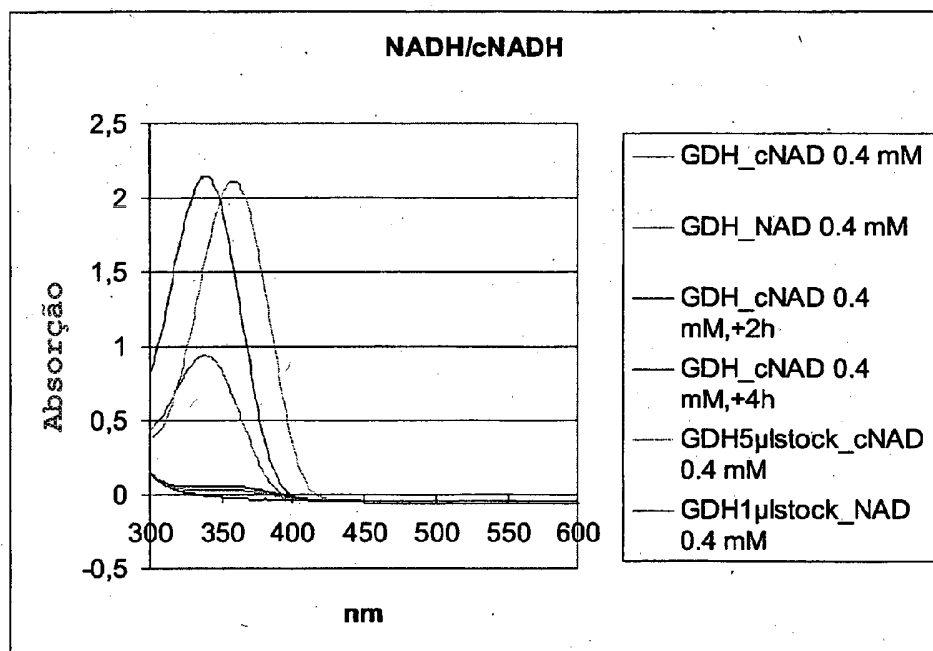


Figura 11

