



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0614217-6 A2



(22) Data de Depósito: 28/07/2006
(43) Data da Publicação: 22/03/2011
(RPI 2098)

(51) Int.CI.:

C07H 19/207
C07H 23/00
C07H 21/02
C07H 19/213
C07H 21/00
C12Q 1/32

(54) Título: DERIVADOS DE NADH/NAD ESTÁVEIS

(30) Prioridade Unionista: 28/07/2005 DE 10 2005 035 461.0

(73) Titular(es): F. Hoffmann-La Roche AG

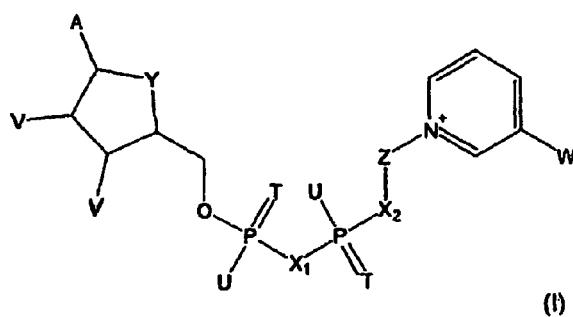
(72) Inventor(es): Carina Horn, Claudia Gaessler-Dietsche, Dieter Heindl, Joachim Hoenes

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006007493 de 28/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/012494de 01/02/2007

(57) Resumo: DERIVADOS DE NADH/NAD ESTÁVEIS. A presente invenção refere-se a derivados de dinucleotídeo de adenina de nicotinamida (NAD/NADH) e fosfato de dinucleotídeo de adenina de nicotinamida (NADP/NADPH) da fórmula (1), complexos de enzima desses derivados e a seu uso em métodos de detecção bioquímica e a kit de reagentes.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**DERIVADOS
DE NADH/NAD ESTÁVEIS**".

Descrição

A presente invenção refere-se a dinucleotídeo de adenina de 5 nicotinamida estável (NAD/NADH) e derivados de fosfato de dinucleotídeo de adenina de nicotinamida (NADP/NADPH), complexos de enzima desses derivados e a seu uso em métodos de detecção bioquímica e a kits de reagente.

Sistemas de medição analíticos bioquímicos são componentes 10 importantes de métodos analíticos clinicamente relevantes. Isto principalmente refere-se à medição de analitos, por exemplo, metabólitos ou substratos que são determinados diretamente ou indiretamente com o auxílio de uma enzima. Os analitos são convertidos com o auxílio de um complexo de enzima-coenzima e subsequentemente são quantificados. Nesse processo 15 o analito a ser determinado é posto em contato com uma enzima e uma coenzima adequadas onde a enzima é usualmente usada em quantidade catalíticas. A coenzima é mudada, por exemplo, oxidada ou reduzida pela reação enzimática. Este processo pode ser detectado eletroquimicamente ou fotometricamente ou diretamente ou por meio de um mediador. Uma calibração 20 provê uma correlação direta entre o valor medido e a concentração do analito a ser determinada.

Coenzimas são moléculas orgânicas que estão covalentemente ou não covalentemente ligadas a uma enzima e são mudadas pela conversão do analito. Exemplos proeminentes de coenzimas são dinucleotídeo de 25 adenina de nicotinamida (NAD) e fosfato de dinucleotídeo de adenina de nicotinamida (NADP) a partir dos quais NADH e NADPH são formados por redução respectivamente.

Sistemas de medição conhecidos da técnica anterior são caracterizados por uma vida de prateleira limitada e por exigências especiais para 30 o ambiente tal como resfriamento ou armazenagem por via seca a fim de alcançar esta vida de armazenagem. Portanto, resultados errôneos causados por armazenagem incorreta, despercebida, imperfeita pode, portanto,

ocorrer para certas formas de aplicação, por exemplo, no caso de testes que são realizados pelos próprios usuários finais tal como automonitoração de glicose. Em particular a remoção de dissecantes devido à remoção da embalagem primária por períodos excessivos pode resultar em erros de medição

5. que em alguns sistemas podem ser dificilmente reconhecidos pelo consumidor.

Uma medida conhecida que pode ser usada para aumentar a estabilidade de sistemas de medição bioquímica é o uso de enzimas estáveis, por exemplo, o uso de enzimas oriundas de organismos termofílicos. É 10 também possível estabilizar enzimas pela modificação química, por exemplo, reticulação ou por mutagênese. Além do mais, estabilizadores de enzima tais como trealose, polivinilpirrolidona e albumina do soro podem também ser adicionados ou as enzimas podem ser encerradas em redes de polímero, por exemplo, fotopolimerização.

15. Também foi tentado aperfeiçoar a vida de armazenagem de sistemas de medição bioquímica por uso de mediadores estáveis. Assim a especificidade de testes é aumentada e interferências durante a reação são eliminadas por uso de mediadores tendo o mais baixo potencial redox possível. No entanto, os potenciais redox dos complexos de enzima/coenzima 20 constituem um limite inferior para o potencial redox. Se cair-se abaixo deste limite, esta reação com os mediadores é diminuída ou ainda evitada.

- Alternativamente é também possível usar sistemas de medição bioquímica sem mediadores em que, por exemplo, coenzimas tal como a coenzima NADH são diretamente detectadas. No entanto, uma desvantagem 25 de tais sistemas de medição é que as coenzimas tais como NAD e NADP são instáveis.

NAD e NADP são moléculas de base instáveis cujas trajetórias de degradação são descritas na literatura (N. J. Oppenheimer in The Pyridine Nucleotide Coenzymes Academic Press, New York, London 1982, J. Evereze, B. Anderson, K. You, Editores, capítulo 3, pp. 56-65). Essencialmente ADP-ribose é formado durante a degradação de NAD ou NADP por clivagem das ligações de glicosila entre a ribose e a unidade de piridina. As formas

reduzidas de NADH e NADPH são, no entanto, ácido instável: por exemplo, epimerização é uma trajetória de degradação conhecida. Em ambos os casos a instabilidade de NAD/NADP e NADH/NADPH é devido à instabilidade da ligação de glicosila entre a ribose e a unidade de piridina. Mas mesmo sob condições que não são drásticas tal como solução aquosa, as coenzimas NAD e NADP já são hidrolisadas unicamente pela umidade ambiente. A instabilidade pode resultar em imprecisões quando da medição de analitos.

Numerosos derivados de NAD/NADP são descritos, por exemplo, em B.M. Anderson in the Piridina Nucleotide Coenzymes, Academic Press New York, London 1982, J. Everese, B. Anderson, K. Vou, Editors, Capítulo 4. No entanto, a maioria desses derivados não são bem-aceitos por enzima. O único derivado que, portanto, foi anteriormente usado para teste de diagnóstico é dinucleotídeo de adenina de 3-acetilpiridina (acetil NAD) que foi primeiramente descrito em 1956 (N.O. Kaplan, J. Biol. Chem. (1956) 221, 823). Esta coenzima também não é bem aceita por enzimas e exibe uma mudança no potencial de redox.

O uso de outros derivados de NAD com um grupo de piridina modificada é descrito na WO 01/94370. No entanto, modificações do grupo nicotinamida usualmente têm efeito na reação catalítica. Na maioria dos casos este efeito é negativo.

Em um outro conceito de estabilização a unidade de ribose foi modificada a fim de influenciar a estabilidade da ligação de glicosila. Esse processo não diretamente interfere com a reação catalítica do grupo nicotinamida. No entanto, pode haver um efeito indireto assim que a enzima se liga fortemente e especialmente à unidade de ribose. Nesta ligação Kauffmann e outros descrevem numerosos derivados de tioribose-NAD na WO 98/33936 e a patente U.S. nº 5.801.006 e/ou WO 01/49247. No entanto, uma correlação entre a modificação da unidade de ribose de nicotinamida e a atividade dos derivados em reações enzimáticas foi anteriormente demonstrada.

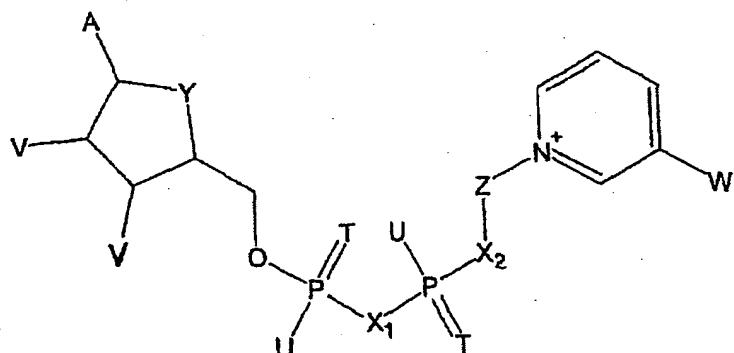
CarbaNAD, um derivado sem uma ligação de glicosila foi descrito pela primeira vez em 1988 (J.T. Slama, Biochemistry 1989, 27, 183 and

Biochemistry 1989, 28, 7866). Neste derivado a ribose está substituída por uma unidade de açúcar carboxílica. Embora carbaNAD fosse descrito como um substrato para desidrogenases, sua atividade já foi provada em métodos de detecção bioquímica.

5 Uma abordagem similar foi descrita mais tarde por G.M. Blackburn, Chem. Comm., 1996, 2765 a fim de sintetizar carbaNAD com uma ligação de bisfosfonato de metileno ao invés do pirofosfato natural. O bisfosfonato de metileno mostra estabilidade mais alta em relação a fosfatases e foi usado como um inibidor para ciclase de ribosila de ADP. O objetivo não
10 era para torná-lo mais resistente a hidrólise (J.T. Slama, G.M. Blackburn).

Portanto, o objetivo da presente invenção é prover sistemas de medição bioanalíticos estáveis especialmente para a determinação de glicose que evitam a sensibilidade a hidrólise de NAD/NADP e ao mesmo tempo são ativos como coenzimas em reações de enzima.

15 Este objetivo é alcançado por um elemento de teste para a determinação de um analito compreendendo (i) uma enzima dependente de coenzima ou um substrato para tal enzima e (ii) um composto da seguinte fórmula geral (I) como a coenzima:



(I)

em que

20 A = adenina ou um análogo da mesma,

T = em cada caso independentemente significa O, S,

U = em cada caso independentemente significa OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,

V = em cada caso independentemente significa OH ou um grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ em que R em cada caso independentemente significa H ou C₁₋₂ alquila,

X₁, X₂ = em cada caso independentemente significam O, CH₂, CHCH₃,

5 C(CH₃)₂, NH, NCH₃,

Y = NH, S, O, CH₂,

Z = um resíduo compreendendo um grupo cíclico com 5 átomos de carbono que opcionalmente contém um heteroátomo selecionado de O, S e N e opcionalmente um ou mais substituintes, e um resíduo CR₄₂ em que CR₄₂ está

10 ligado ao grupo cíclico e a X₂

onde R₄ = em cada caso independentemente significa H, F, Cl, CH₃,

com a condição de que Z e o resíduo de piridínio não estejam ligados por uma ligação glicosídica, ou um sal ou opcionalmente uma forma reduzida dos mesmos.

15 Em uma concretização preferida W = CONH₂ ou COCH₃.

Substituintes preferidos em Z são selecionados do grupo que consiste em OH, F, Cl e C_{1-C₂} alquila que estão opcionalmente fluorados ou clorados e/ou OH-substituídos, O-C_{1-C₂} alquila.

20 Em uma concretização preferida um primeiro resíduo V é OH e um segundo resíduo V é um grupo fosfato. Opcionalmente aquele do grupo OH e aquele grupo fosfato podem formar um anel juntamente com os átomos de carbono aos quais eles estão ligados.

25 Em uma concretização preferida um elemento de teste é provido para determinar glicose que comprehende uma desidrogenase glicose e um composto da fórmula geral (I) como mencionado acima ou um seu sal.

Surpreendentemente os compostos de acordo com a invenção são estáveis em relação a hidrólise e são bons substratos em métodos de detecção enzimática e podem ser usados para diagnósticos bioquímicos. Esta constatação está em contraste com aquele da maioria dos derivados de 30 NAD/NADP anteriormente conhecidos uma vez que esses derivados são usualmente estáveis por apenas períodos muito curtos em métodos de detecção enzimática.

As vantagem dos compostos de acordo com a invenção comparadas com a técnica anterior são:

- alta estabilidade,
 - alta atividade enzimática,
- 5 - síntese simple e econômica,
- eles podem ser usados em todos os métodos de detecção bioquímicos anteriormente conhecidos.

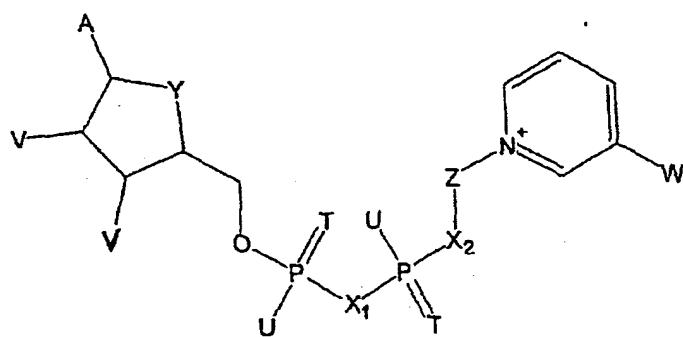
As desvantagens dos métodos de detecção bioquímica anteriormente conhecidos podem ser largamente evitados pela provisão de derivados de NAD/NADP estáveis usando-se a presente invenção de preferência em combinação com uma formulação de estabilização tal como, por exemplo, por encerramento de enzimas em redes de polímero. Além do mais, não é necessário usar aditivos de estabilização. Isto é particularmente vantajoso uma vez que quanto mais baixo o número de substâncias reativas envolvidas, maior é a chance de se obter uma formulação estável para a determinação de analito.

A presente invenção provê elementos de teste compreendendo numerosos derivados de NAD/NADP estáveis que têm uma atividade enzimática adequada para o uso como uma coenzima no elemento de teste.

Derivados de NAD/NADP estáveis podem ser produzidos em processos de síntese em geral conhecidos. Para esse o grupo amino de um amino álcool cíclico é convertido em um derivado de piridínio por química de Zincke. O grupo OH primário é subseqüentemente fosforilado e é acoplado a um derivado de AMP para formar um derivado de NAD. Alternativamente o grupo OH primário pode também ser primeiramente fosforilado e então o grupo amino pode ser convertido em uma piridina por meio da reação de Zincke.

Uma outra rota sintética é ativar o álcool primário para formar um tosilato ou iodeto e subseqüentemente ADP de alquilato.

Concretizações preferidas do elemento de teste de acordo com a invenção compreendem, por exemplo, compostos tendo a seguinte fórmula geral (I'):



(I')

em que

A = adenina ou um análogo da mesma,

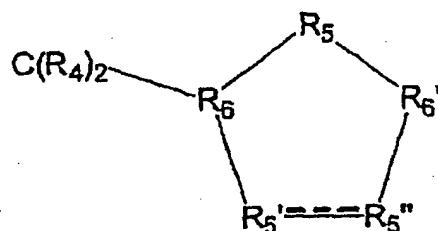
T = em cada caso independentemente significa O, S,

U = em cada caso independentemente significa OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,

5 V = em cada caso independentemente significa OH ou um grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ em que R em cada caso independentemente significa H ou C₁-C₂ alquila,X₁, X₂ = em cada caso independentemente significam O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,10 Y = NH, S, O, CH₂,

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



(II)

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

R4 = em cada caso independentemente significa H, F, Cl, CH₃,15 R5 = CR₄₂,

se uma ligação simples estiver presente entre R5' e R5'', então

R5' = O, S, NH, NC₁-C₂ alquila, CR₄₂, CHO_H, CHOCH₃,

R5" = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

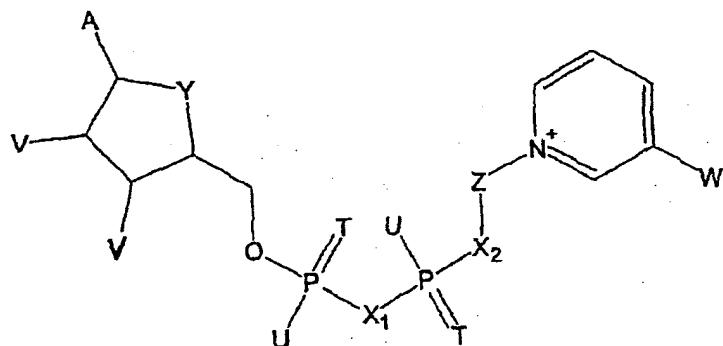
se uma ligação dupla estiver presente entre R5' e R5", então

R5' = R5" = CR₄,

R6, R6' = em cada caso independentemente significam CH, CCH₃ ou um sal

5 ou opcionalmente uma forma reduzida dos mesmos.

Compostos da seguinte fórmula geral (I") são um outro objetivo da invenção:



(I")

em que

A = adenina ou um análogo da mesma,

10 T = em cada caso independentemente significa O, S,

U = em cada caso independentemente significa OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,

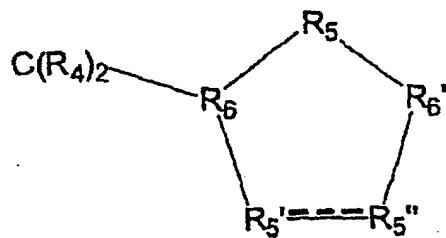
V = em cada caso independentemente significa OH ou um grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ em que R em cada caso independentemente significa H ou C₁-C₂ alquila,

15 X₁, X₂ = em cada caso independentemente significam O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,

Y = NH, S, O, CH₂,

Z = um anel de 5 membros saturado ou insaturado carbocíclico ou heterocíclico, em particular compostos da fórmula geral (II)



(II)

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

R4 = em cada caso independentemente significa H, F, Cl, CH₃,

R5 = CR₄₂,

se uma ligação simples estiver presente entre R5' e R5'', então

5 R5' = O, S, NH, NC₁-C₂ alquila, CR₄₂, CHO_H, CHOCH₃,

R5'' = CR₄₂, CHO_H, CHOCH₃,

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

R5' = R5'' = CR₄,

R6, R6' = em cada caso independentemente significam CH, CCH₃

10 com a condição de que se R5 = CH₂, T = O, U = em cada caso significa OH, V = OH, W = CONH₂, X = O e Y = O então R5' e R5'' não são simultaneamente CHO_H, ou um sal ou opcionalmente uma forma reduzida dos mesmos.

Em uma concretização preferida os compostos de acordo com a
15 invenção contêm análogos de adenina tal como adenina C8-substituída e N6-substituída, variantes de desaza tais como 7-desaza, variantes de aza tais como 8-aza ou combinações tais como 7-desaza ou 8-aza ou análogos carbocíclicos tal como formicina onde as variantes de 7-desaza podem estar substituídas na posição 7 com halogênio, C₁-C₆ alquinila, C₁-C₆ alquenila ou
20 C₁-C₆ alquila.

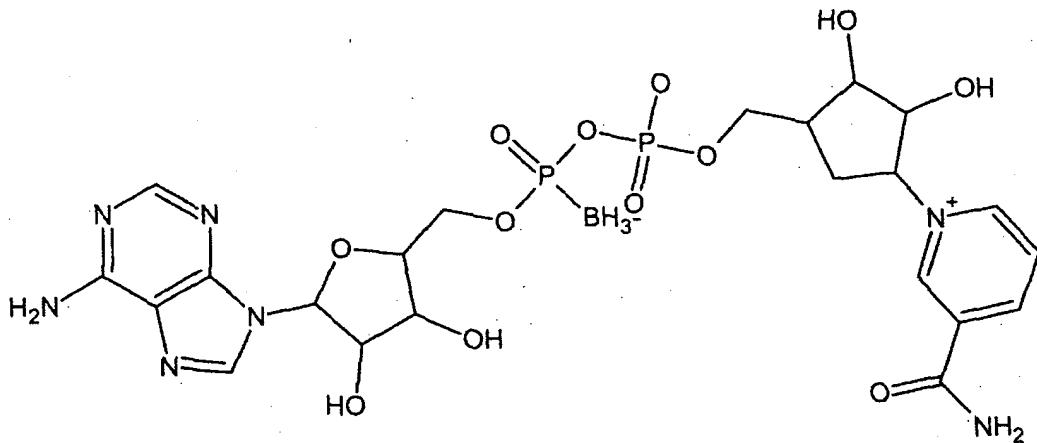
Em uma outra concretização preferida os compostos contêm análogos de adenosina que contêm, por exemplo, 2-metoxidesoxirribose, 2'-fluorodesoxirribose, hexitol, altritol ou análogos policíclicos tais como açúcares tricíclicos, LNA e bicíclicos, ao invés de ribose.

25 Em particular oxigênios de (di)fosfato podem também estar isoeleticamente substituídos tais como, por exemplo, O- por S- e/ou por BH₃, O

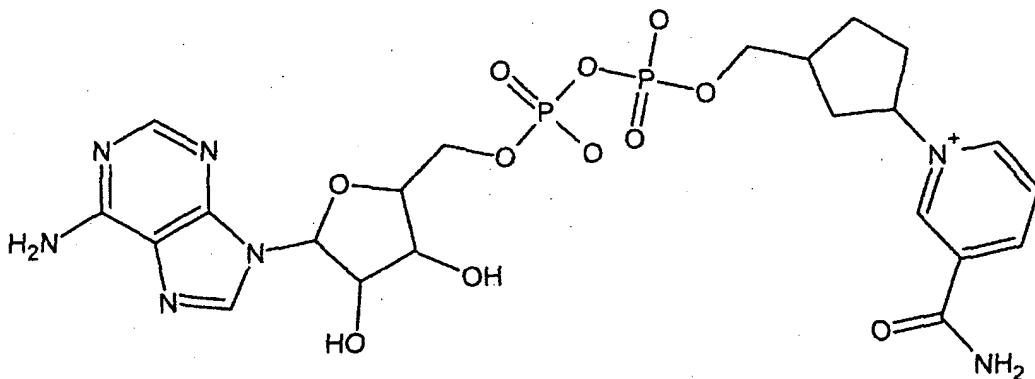
por NH, NCH₃ e/ou por CH₂ e =O por =S.

Em uma concretização preferida pelo menos um resíduo U do composto de acordo com a invenção é diferente de OH e particularmente de preferência pelo menos um resíduo U = BH₃.

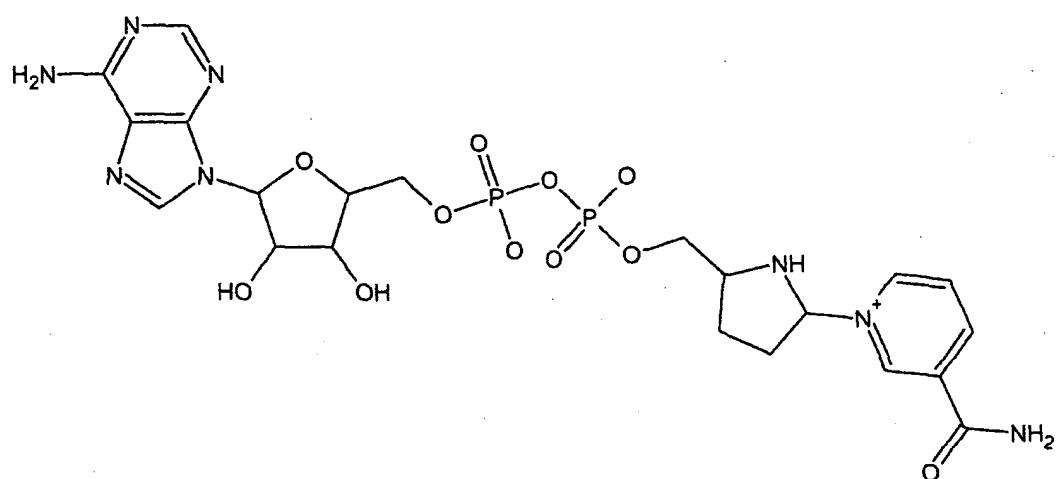
- 5 Concretizações especialmente preferidas são os derivados boro- no carbaNAD, c-pentil NAD, pirrolil NAD, furanil NAD, carbaNADciclofosfato, carbaNADP, pirrolildinil NAD bem como elementos de teste que os contêm:



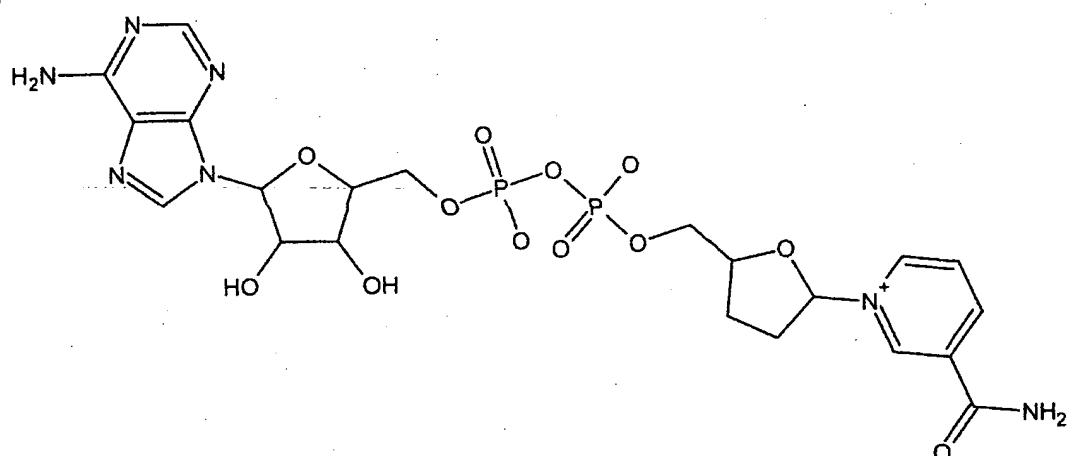
borano carbaNAD



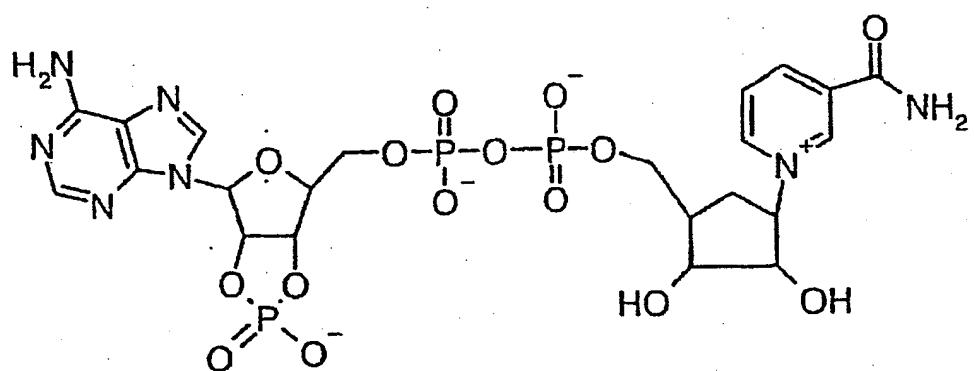
ciclopentil NAD



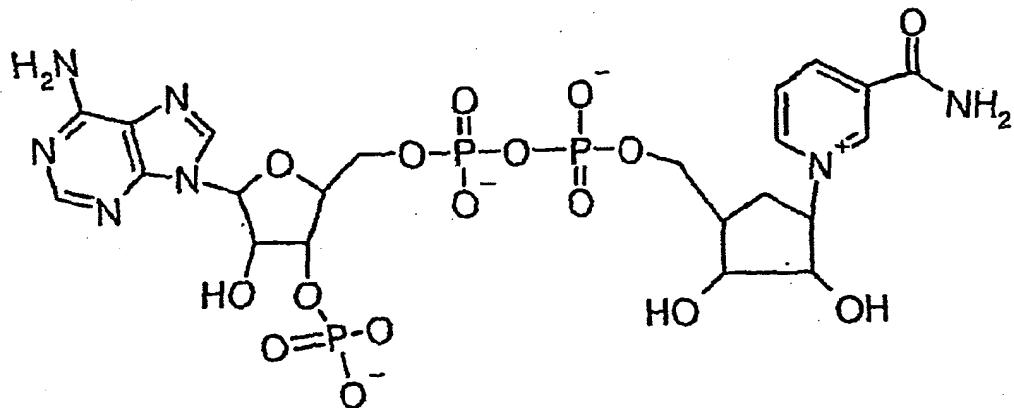
pirrolil NAD



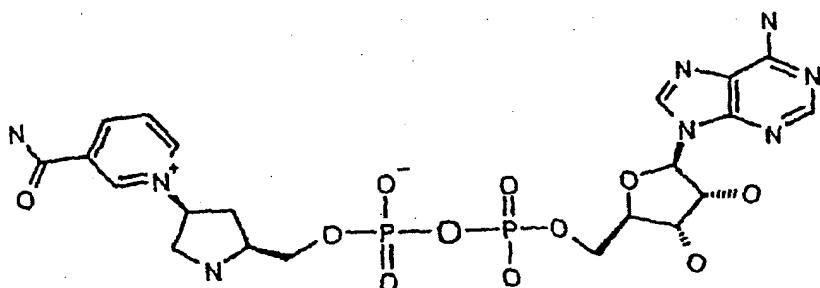
furanil NAD



carbaNAD ciclofosfato



carbaNADP



pirrolidinil NAD

Detecções bioquímicas de analitos, por exemplo, parâmetros em fluidos de corpo tal como sangue, soro, plasma ou urina ou em amostras de água servida ou alimentos são de principal importância em diagnósticos. Nesses testes o analito a ser determinado é posto em contato com uma enzima ou uma coenzima adequada.

Portanto, um outro objetivo da presente invenção é um complexo de enzima-coenzima que consiste em um composto de acordo com a invenção em combinação com uma enzima adequada.

Quaisquer substâncias biológicas ou químicas que podem ser detectadas por uma reação de redox podem ser determinadas como analitos, por exemplo, substâncias que são substratos de uma enzima dependente de coenzima ou as próprias enzimas dependente de coenzima. Exemplos preferidos de analitos são glicose, ácido láctico, ácido málico, glicerol, álcool, colesterol, triglycerídeos, ácido ascórbico, cisteína, glutationa, peptídeos, ureia, amônio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidase, cinase de creatina (CK),

lactato desidrogenase (LDH), dióxido de carbono etc.

- Para a detecção de substratos de enzima o elemento de teste de preferência contém uma enzima que é adequada para a detecção do substrato, além da coenzima. Enzimas adequadas são, por exemplo, desidrogenase selecionada de glicose desidrogenase (E.C.1.1.1.47), lactato desidrogenase (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato desidrogenase (E.C.1.1.1.37), glicerol desidrogenase (E.C.1.1.1.6), álcool desidrogenase (E.C.1.1.1.1), alfa-hidroxibutirato desidrogenase, sorbitol desidrogenase ou aminoácido desidrogenase, por exemplo, L-aminoácido desidrogenase (E.C.1.4.1.5). Outras enzimas adequadas são oxidases tal como glicose oxidase (E.C.1.1.3.4) ou colesterol oxidase (E.C.1.1.3.6) ou aminotransferases tal como aspartato ou alanina aminotransferase, 5'-nucleotidase ou cinase de creatina.

- Para a detecção de enzimas o elemento de teste de preferência contém um substrato de enzima adequado para a detecção da enzima, além da coenzima.

- Um outro objetivo da presente invenção é o uso de um composto de acordo com a invenção ou de um complexo de enzima-coenzima de acordo com a invenção para detectar um analito em uma amostra por uma reação enzimática. Nesta ligação a detecção de glicose com o auxílio de glicose desidrogenase (GlucDH) é particularmente preferida.

- A mudança na coenzima, isto é, no composto de acordo com a invenção por reação com o analito (se o analito for um substrato de enzima) ou por uma reação catalisada por analito (se o analito for uma enzima) pode em princípio ser detectada de qualquer modo desejado. Basicamente todos os métodos para a detecção das reações enzimáticas que são conhecidos da técnica anterior podem ser usados. No entanto, a mudança na coenzima é de preferência detectada por método óticos. Métodos de detecção ótica, por exemplo, incluem a medição de absorção, fluorescência, dicroismo circular (CD), dispersão rotativa ótica (ODR), refractometria etc. A mudança na coenzima é particularmente de preferência detectada por medição da fluorescência. Medições de fluorescência é altamente sensível e permite a detec-

ção mesmo de baixas concentrações do analito em sistemas miniaturizados.

Um teste líquido pode ser usado para detectar um analito em que o reagente está, por exemplo, presente na forma de uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não aquoso ou está presente como um pó ou liofilizado. É, no entanto, também possível usar um teste seco, caso esse em que o reagente é aplicado a um veículo, uma tira de teste. O veículo pode, por exemplo, ser uma tira de teste compreendendo um material absorvente e/ou inchável que é umidecido pelo líquido da amostra a ser examinado.

Uma matriz de gel em que um complexo de enzima-coenzima é incorporado pode, no entanto, também ser usado como um reagente de detecção (conforme DE 102 218 45 A1).

Neste caso a enzima pode ou ser polimerizada na matriz juntamente com o composto de acordo com a invenção ou, depois da polimerização, a matriz pode ser contatada com uma solução da coenzima na presença da enzima para formar o complexo de enzima-coenzima correspondente.

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a um kit de reagente e a seu uso para detectar analitos. O kit de reagente pode conter um composto de acordo com a invenção, uma enzima adequada e um pão de reação adequado. Enzimas adequadas já foram descritas. O kit de reagente de acordo com a invenção pode ser usado em uma ampla variedade de meios e pode ser usado para determinar analitos tais como glicose, ácido láctico, ácido málico, glicerol, álcool, colesterol, triglicerídeos, ácido ascórbico, cisteína, glutationa, peptídeos, uréia, amônio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidase, CK, LDH e dióxido de carbono etc. Um kit de reagente é preferido que contém um composto de acordo com a invenção e glicose desidrogenase (E.C.1.1.47) para detectar glicose no sangue.

O kit de reagente de acordo com a invenção pode ser usado para detectar um analito em um teste seco ou líquido.

Um outro objetivo da presente invenção refere-se a uma tira de teste para a detecção fotométrica ou fluorométrica de um analito. Tal tira de teste contém um composto como afirmado acima como uma coenzima e

uma enzima adequada ou um substrato de enzima immobilizado sobre um material absorvente e/ou inchável. Materiais adequados podem, por exemplo, ser selecionados de celulose, plásticos etc.

- Um outro objetivo da presente invenção compreende um método para a detecção de um analito compreendendo as etapas:
- 5 (a) contato de uma amostra com um elemento de teste ou kit de reagente de acordo com a invenção compreendendo uma coenzima e
 - (b) detecção do analito, por exemplo, com base na mudança na coenzima.

Uma outra vantagem da invenção é que a emissão de fluorescência das coenzimas exibe um deslocamento batocrômico e, portanto, há baixa interferência com a emissão de fluorescência de outros materiais do elemento de teste e/ou da amostra.

Todas as concretizações preferidas de um objetivo da presente invenção que são mostradas também destinam-se a aplicar a outros objetivos da invenção tais como, por exemplo, concretizações preferidas dos compostos de acordo com a invenção.

A invenção deve ser elucidada em mais detalhes pelas seguintes figuras e exemplos.

Figuras

- 20 Figura 1
Diagrama do processo para a sintetização de carbaNAD (cNAD).
- Figura 2
Gráfico dos resultados de esforço de NAD a 8°C e 37°C.
- Figura 3
Gráfico dos resultados de esforço de carbaNAD a 8°C e 37°C.
- 25 Figura 4
Diagrama do processo para a sintetização de borano NAD por alquilação de ADP, no caso em que de Y = BH₃, apenas o beta fosfato de ADP foi alquilado.
- 30 Figura 5
Diagrama do processo para a sintetização de pirrolidinil NAD (pNAD). Números de composto e rendimentos das etapas de reação respec-

tivas são a seguir afirmados para as fórmulas estruturais.

Figura 6A/6B

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

5 Figura 7

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

Figura 8

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

Figura 9

Comparação da estabilidade de NAD e pNAD.

Figura 10A /10B/10C

Espectros de absorção de NAD e cNAD (figura 10A) e de NADH e/ou cNADH (figuras 10B e 10C).

Figura 11

Espectros de fluorescência de NADH e cNADH como um complexo de GlucDH.

Exemplos

20 Preparação experimental de derivados de NAD/NADH estáveis
A preparação de derivados de NAD/NADH estáveis é mostrada na base de carbaNAD (composto 9, figura 1) e pirrolidina NAD (composto 18, figura 5) como os exemplos. Derivados adicionais podem ser preparados usando-se processos de síntese apropriados. Os amino álcoois correspondentes usados como reagentes de partida são conhecidos na literatura:

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

30 3-amino-,(1R,3S)-ciclopantanometanol, Beres, J.; Sagi, G.; Tomoskozi, I.; Gruber, L.; Gulacsi, E.; atvos, L.; Tetrahedron Letters (1988), 29(22), 2681-4.

A) Preparação de carbaNAD

I. 1 R-(-)-exo-cis-5,6-didiidróxi-2-azabiciclo[2.2.1]heptan-3-oná (1)

Uma solução de 16,4 g (147 mmols) de 1R-(-)-2-azabiciclo[2.2.1]hept-5-en-3-oná em 400 ml de acetona é adicionada a uma solução de 22,5 g (167 mmols) de N-metil-morfolina-N-óxido em 80 ml de água desionizada em um
 5 frasco de fundo redondo de 1 L. 15 ml de (1,2 mmols) de uma solução de 2,5% de tetraóxido de ósmio em terc-butanol são adicionados no período de 15 min enquanto se resfriando no gelo. A mistura subseqüentemente agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente.

O solvente é removido por destilação em um evaporador rotativo.
 10 É agitado com 100 ml e novamente é separado por destilação em um evaporador rotativo. Posteriormente, é dissolvido em 600 ml de água desionizada e 35 g de carvão ativado são adicionados. A mistura é agitada vigorosamente por 1 h e então é filtrada sobre um filtro de leito profundo Seitz K 250. Água é removida do filtrado por destilação em um evaporador rotativo.
 15 O produto é usado sem outra purificação.

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

* Reagente de TDM: Solução 1: 10 g de N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diamino-difenil metano 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: Dissolve 0,3 g de ninidrina em 10 ml de ácido acético glacial e adicionam 90 ml de água desionizada.

Reagente acabado: Uma mistura de solução 1 e 2 e adição de 6
 25 ml de solução 3.

II 1 R-(-)-exo-cis-5,6-dimetilmetenodióxi-2-azabiciclo[2.2.1] heptan-3-oná (2)

O produto bruto 1 é fervido sob refluxo por 1 h em 200 ml de etanol absoluto. Depois da adição 400 ml de (3,26 moles) dimetoxipropano e
 30 250 mg (2,2 mmols) de cloridrato de piridina, a mistura é fervida sob refluxo por uns outros 15 min. Depois da adição de 10 ml de solução de carbonato de hidrogênio de sódio saturada, a solução é evaporada até a secura sob

um vácuo em um evaporador rotativo. 500 ml de Clorofórmio, 150 ml de solução de cloreto de sódio saturada e 75 ml de solução de carbonato de hidrogênio de sódio saturada são adicionados ao resíduo e é transferido para dentro de um funil de separação. Depois da extração por agitação é permitido que se repouse de um dia para o outro durante o qual fase de separação ocorre.

A fase orgânica é separada e a fase aquosa é extraída por uma outras duas vezes com 200 ml de clorofórmio em cada caso. As fases orgânicas combinadas são secas sobre sulfato de magnésio. Depois da remoção do dissecante por filtração, o solvente é removido por destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotativo. O produto bruto (24,9 g = 92%) é usado sem outra purificação.

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

III. 1 R-(*-*)-4-N-terç-butiloxicarbonil-exo-cis-5,6-dimetilmetileno-dióxi-2-2-azobiciclo[2.2.1]heptan-3-ona (3)

41,5 g (190 mmols) de dicarbonato de di-terc-butila e 0,83 g (6,8 mmols) de 4-dimiel-aminopiridina são adicionados sob argônio a uma solução de 24,9 g (135,7 mmols) de produto bruto 2 em 450 ml de clorofórmio absoluto. A mistura é fervida sob refluxo enquanto se agitando até que a produção de gás cessasse. A mistura é filtrada sobre uma coluna que é enchida com 40 g de sílica-gel 60 e é equilibrada com clorofórmio. É lavada com 100 ml de clorofórmio. O solvente é removido do filtrado por destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotativo. O produto bruto é seco por 60 min a 1 kpa (10 mbar) e 40°C. É usado sem outra purificação.

TLC (Merck sílica-gel 60 F-254): acetato de etila/hexano 3:2 R_f 0,85. Manchamento com TDM/desenvolvimento em uma câmara de cloro).

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

O produto bruto 3 é dissolvido à temperatura ambiente em 400 ml de tetraidrofurano enquanto se agitando e 80 ml de água desionizada são

adicionados. Depois do resfriamento para 4°C. 5,3 g de boroidreto de sódio são adicionados uma vez e são agitados de um dia para o outro durante o qual a mistura é deixada lentamente se aquecer até à temperatura ambiente. 100 ml de etanol são adicionados e são agitados por 6 h à temperatura ambiente. Os solventes são removidos por destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotativo. 300 ml de solução de cloreto de sódio saturada e 650 ml de acetato de etila são adicionados e são transferidos para um funil de separação. A fase orgânica é separada e a fase aquosa é novamente lavada com 350 ml de acetato de etila. As fases orgânicas combinadas são secas sobre sulfato de magnésio. Depois da remoção do dissecante por filtração, o solvente é removido por destilação sob pressão reduzida em um evaporador rotativo. O produto bruto (42,2 g) é purificado por meio de cromatografia de coluna e sílica-gel 60 (coluna h = 93 cm, d = 10 cm) eluente THF/hexano 1:3, então THF/hexano 2:3), taxa de fluxo 3 l/h. 40 ml de frações são coletados. As frações são monitoradas por TLC (Merck sílica-gel 60 F-254: acetato de etila/hexano 3:2 R_f 0,45. Manchamento com TDM/desenvolvimento em uma câmara de cloro). O solvente é removido a partir das frações de produtos combinadas por destilação em um vácuo em um evaporador rotativo, rendimento: 24,9 g.

20 V. (-)-(1 R,2R,3S,4R)-4-amino-2,3-diidróxi-1-(hidroximetil) ciclopentano (5) 8 ml de Água desionizada e então 80 ml de ácido trifluoroacético são adicionados a 11,09 (38,6 mmols) 4. São agitados vigorosamente por 6 h à temperatura ambiente durante a qual uma solução amarela pálida clara forma. 200 ml de água desionizada são adicionados e são evaporados sob 25 um vácuo em um evaporador rotativo. 200 ml de água desionizada são novamente adicionados e são novamente evaporados sob um vácuo em um evaporador rotativo. O produto bruto é dissolvido em 100 ml de água desionizada em um banho ultrassônico e é filtrado. O filtrado é aplicado a uma coluna de troca de íons Dowex 1X8 malha 100-200, forma de OH) (15 x 4,9 cm) e é eluído com água durante o qual o produto elui depois de cerca de 150 ml em um volume de 300 ml de (pH 10,4). As frações são monitoradas 30 por TLC (Merck sílica-gel 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/água 5:2:3

R_f 0,42, manchamento com TDM/desenvolvimento em uma câmara de cloro). O solvente é removido a partir das frações de produto combinadas por destilação em um vácuo em um evaporador rotativo,
rendimento: 5,2 g de óleo incolor.

5 VI. Sal de Zincke da nicotinamida (6)

58,6 g de Dinitroclorobenzeno são fundidos sob nitrogênio e então 29,32 g de nicotinamida são adicionados à massa fundida. É aquecida por 2,5 h a 110°C. 500 ml de uma mistura de 3:2 (v/v) etanol/água são adicionados através de um resfriador de fluxo e são fervidos sob refluxo até que 10 a solução seja formada. Depois da agitação de um dia para o outro à temperatura ambiente, 150 ml de 50% de etanol/água e 100 ml de água são adicionados, são transferidos para um funil de separação e são lavados três vezes com 500 ml de clorofórmio cada vez. 300 ml e 50 g de carvão ativo são adicionados à fase aquosa separada que é separada por 1 h à temperatura 15 ambiente e então é filtrada sobre um filtro de leito profundo Seitz K 700. O filtrado é concentrado em um vácuo a cerca de 100 ml de em um evaporador rotativo durante o qual a temperatura de banho não deve exceder a 20°C. Ele é diluído com 300 ml de água e 70 g de tetrafluoroborato de sódio é adicionado à temperatura ambiente enquanto se agitando. O precipitado é 20 recristalizado a partir de metanol/água. O cristalizado é removido por filtração, é lavado com uma quantidade pequena de acetona e então com éter de dietila e é seco por 24 h em um alto vácuo a 40°C (rendimento 21,1 g 23%). As frações são monitoradas por TLC (Merck sílica-gel 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/água 5:2:3 R_f = 0,56).

25 VII. (-)-(1 R,2R,3S,4R)-4-(3-carboxamidopiridin-1-il)-2,3-diidróxi-1- (hidroximetil)ciclopentano (6) = carba nicotinamida mononucleosídeo = carbaNMN

Uma solução de 4,5 g (31 mmols) de ciclopentilamina 5 em 110 ml de metanol absoluto é adicionada gota a gota no período de 90 minutos a 30 uma solução de 15,3 g (40,1 mmols) do sal 6 Zincke em 110 ml de metanol absoluto enquanto se agitando à temperatura ambiente. 1 ml de diisopropiletilamina é adicionado e é então agitado por dois dias à temperatura ambien-

te. 500 ml de água são adicionados, são transferidos para dentro de um funil de separação e são lavados duas vezes com 200 ml de cloreto de metileno cada vez. A água é removida a partir da fase aquosa separada por destilação sob um vácuo em um evaporador rotativo. O resíduo é colocado em 100

5 ml de água e é purificado por cromatografia de coluna em Sephadex C25 (forma de Na⁺): coluna 70 x 7,5 cm eluição de tampão A (água desionizada) a tampão B NaCl a 0,35 M em água, taxa de fluxo 200 ml/h. 15 ml de frações são coletados e são monitorados por TLC (Merck sílica-gel 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/água 5:2:3 R_f 0,22).

10 O solvente é removido a partir das frações de produtos combinadas por destilação em um vácuo em um evaporador rotativo. O resíduo contendo sal é fervido com 500 ml de etanol quente. É filtrado quente e é deixado repousar por 12 h à temperatura ambiente. O precipitado é removido por filtração e o solvente é removido a partir do filtrado por destilação sob um
15 vácuo em um evaporador rotativo. Rendimento 7 g.

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

Uma mistura de 20 ml de cloreto de fosforóxi e 50 ml de fosfato de trimetila é adicionada a 0°C a uma suspensão de 7 g (27,7 mmols) carbaNMN em 80 ml de fosfato de trimetila anidra. É agitada por 2 h a 0°C e então por 2 h à temperatura ambiente. 300 ml de água são adicionados enquanto se resfriando no gelo e a mistura é evaporada para dar 10 ml de sob um vácuo em um evaporador rotativo. É colocada em 100 ml de água, é filtrada e é purificada por meio de cromatografia de coluna em Sephadex C25 (forma de NEt₃H⁺): coluna 66 x 9 cm, eluição de tampão A (água desionizada) a tampão B) acetato de amônio a 0,60 M, taxa de fluxo 200 ml/h. 15 ml de frações são coletados e são monitorados por TLC

(Merck placas de sílica-gel 60 F-254: ácido isobutírico/amônia/água 66:1:33, R_f 0,25). O solvente é removido a partir das frações de produtos combinadas por destilação em um vácuo em um evaporador rotativo. O resíduo é dissolvido em 100 ml de água e é liofilizado. Este procedimento é repetido três vezes. Rendimento 4,0 g.

IX. carbaNAD (9) .

Uma solução de 1,25 g (30 mmols) de morfolidato de AMP em 40 ml de DMF absoluto é adicionada gota a gota no período de 1 h à temperatura ambiente a uma mistura de uma solução de 3,31 g (10 mmols) de carbaNMN monofosfato em 40 ml de DMF absoluto e 78 ml de (39 mmols) tetratrazol a 3,5% em acetonitrila absoluta. A mistura é agitada por 2 dias à temperatura ambiente.

O pH é ajustado para 6,5 usando-se uma solução aquosa de KHCO_3 a 10% enquanto resfriando sobre gelo seco/acetona. É diluída com 10 500 ml de água e cuidadosamente é concentrada até a secura em um vácuo em um evaporador rotativo. O resíduo é dissolvido em 150 ml de água desionizada e é purificado por cromatografia de coluna

em Sephadex QAE 25 (forma de NEt_3H^+): coluna 65 x 4,5 cm, eluição de tampão A (água desionizada) a tampão B) carbonato de trimetilamônio a 1 M, taxa de fluxo 200 ml/h: 15 ml de frações são coletados e são monitorados por TLC (Merck placas de sílica-gel 60

F-254: ácido isobutírico/amônia/água 66:1:33, R_f 0,47).

O solvente é removido por destilação a partir das frações de produtos combinadas por destilação em um vácuo em um evaporador rotativo. 20 O resíduo é dissolvido em 100 ml de água e é liofilizado. Este procedimento é repetido três vezes. Rendimento 1,1 g.

Exame da estabilidade de carbaNAD

Uma solução a 10 mM de carbNAD e/ou NAD é acetuada a pH 8 em tampão de fosfato de potássio a 0,1 M. O teor é determinado por meio de 25 cromatografia de HPLC depois de 0,25, 75 e 175 h.

Tampão A: KHPO_4 a 100 mM + sulfato de hidrogênio de tetrabutilamônio a 10 mM,

pH 6,9

tampão B: tampão A + acetonitrila 1:1

30 taxa de fluxo 1,0 ml/min detecção: 254 nm

coluna de RP18 L 125 diâmetro 4,6 mm

gradiante: em 40 min a 35% de tampão B, manter por 2 min e então mudar

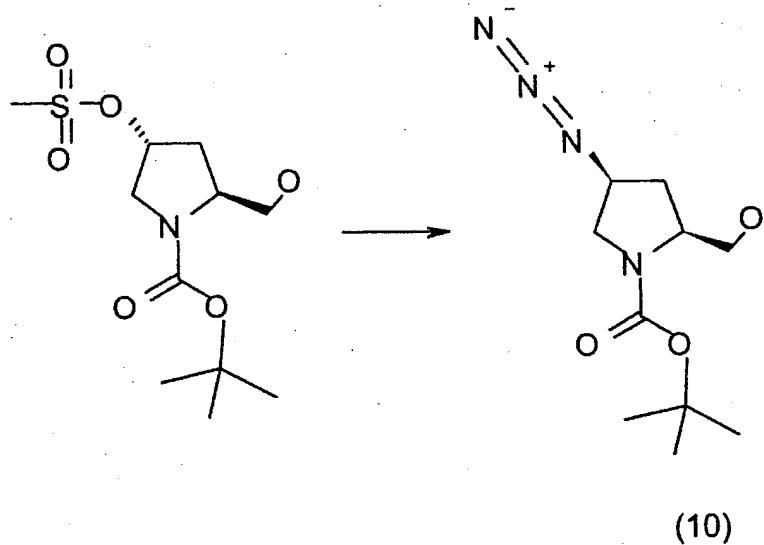
em 0% de tampão A no período de 3 min.

As percentagem de área de HPLC depois do esforço pelos vários tempos são mostrados nas figuras 2 e 3.

A ocorrência de produtos de composição (nicotinamida, ADP-ribose, AMP, ADP e os produtos de decomposição desconhecidos para NAD e os produtos de decomposição desconhecidos Y1 e Y2 para cNAD) mostram que cNAD é muito estável comparada com NAD.

8) Preparação de pirrolidinil-NAD

I. Síntese de primeiro estágio de pNAD (composto 10)



Trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxil-L-prolinol (35,4 g, 120 mmols) foi dissolvido em 500 ml de DMF e azida de sódio (15,6 g, 240 mmols) é dissolvida em 75 ml de água foi adicionada e foi aquecida por 5 h a 70°C. Foi subseqüentemente agitada ulteriormente de um dia para o outro à temperatura ambiente, a mistura foi despejada para dentro de 1000 ml de solução de cloreto de sódio saturada e foi extraída com acetato de etila. O acetato de etila foi seco com Na₂SO₄ e subseqüentemente foi evaporado.

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

O produto bruto foi diretamente processado ulteriormente depois de monitoração de MS e TLC. Uma cromatografia de camada fina em uma placa KG 60 F-254 (solvente móvel: acetato de etila/borrifada com ninidrina) foi realizada para a monitoração:

trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidróxi-L-prolinol R_f: 0,49

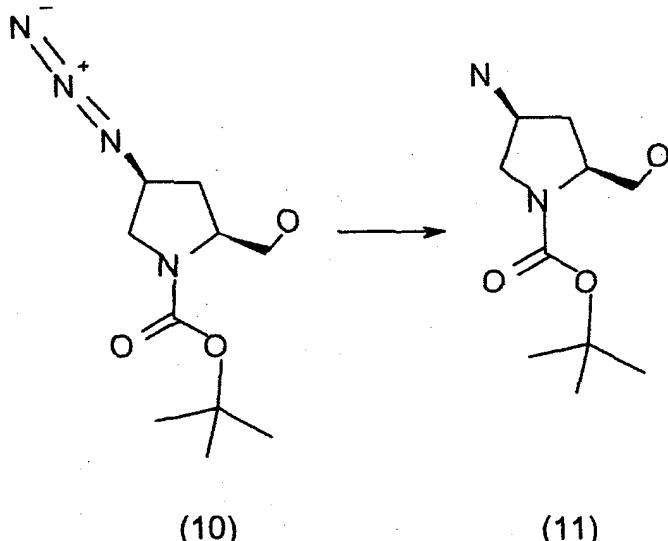
R_f de produto: 0,78

MS ESI ES+ 242

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

- *trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxil-L-prolinol está comercialmente disponível da Sanochemia Pharmazeutika AG, Cato No. P-719.

II. Síntese de segundo estágio de pNAD (composto 11)



Composto 10 (120 mmols) foi misturado em 500 ml de metanol com 2,0 g de Pd-carbono (10%) e é hidrogenado por 12 h a 3 kpa (30 mbar). Nesse processo o frasco de reação foi lavado várias vezes com H₂, o catalisador foi removido por filtração por succção e ele foi concentrado.

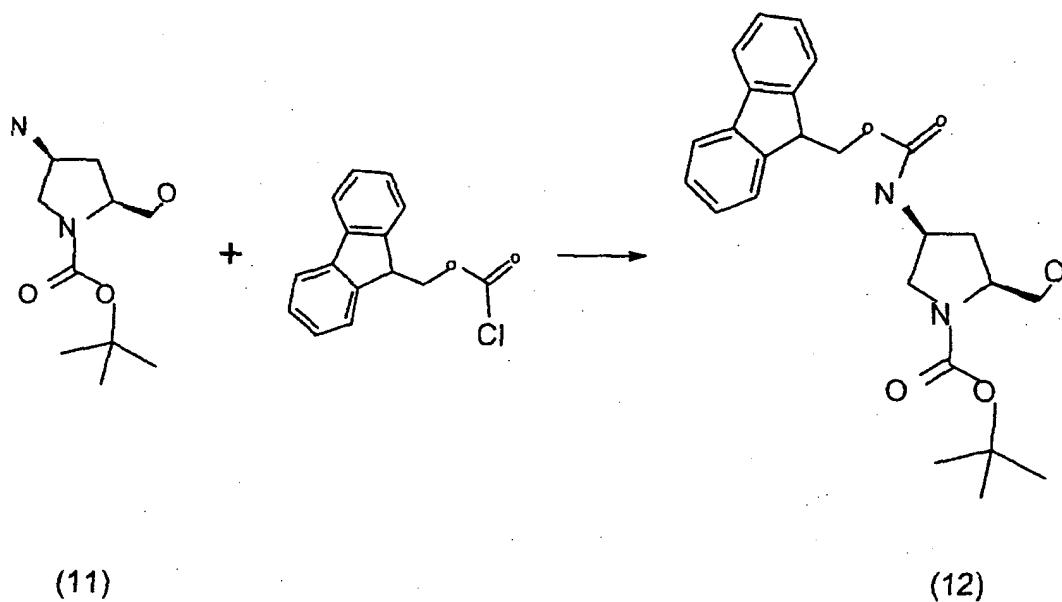
Um óleo incolor foi formado (o óleo seria imediatamente processado ulteriormente devido a sua alta sensibilidade a ar).

MS ESI ES+ 217 presente

- 15 TLC (isoexano/acetato de etila 1/1/KG 254 F/ninidrina): produto permanece no início.

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

III. Síntese de terceiro estágio de pNAD (composto 12)

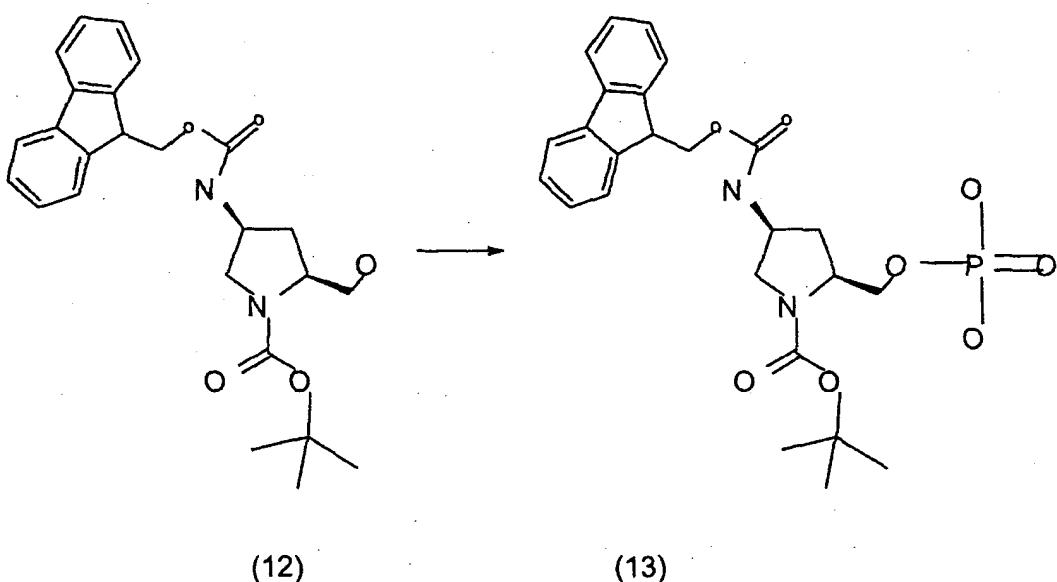


120 mmols do composto 11 (PM: 216,28) foram misturados em 500 ml de dioxano contendo NaHCO₃ (11,0 g, 130 mmol) e cloreto de Fmoc (33,8 g, 130 mmols) e foram agitados de um dia para o outro à temperatura ambiente. Os sais resultantes foram removidos por filtração, a solução foi evapora-
 5 da e o resíduo foi purificado sobre uma coluna de sílica-gel (isoexano e isoe-
 xano/EE 8/2 - 1/1). A fração principal forneceu 39,0 g = 74,1% * (valor teóri-
 co = 52,6 g). TLC (KG 60 F254 solvente móvel isoexano/acetato de etila
 2:1): R_f 0,13 MS ESI ES+ 439/+ 339

A identidade do produto foi também confirmada por análise de
 10 RMN.

* Rendimento refere-se a o extrato do primeiro estágio.

IV. Síntese de quarto estágio de pNAD (composto 13)



Composto 12 oriundo do estágio 3 (7,08 g, 16,1 mmols) foi dissolvido em 80 ml de fosfato de trimetila e subsequentemente foi resfriado para 0°C em um banho com gelo. POCl_3 misturado com fosfato de trimetila (13 ml de POCl_3 frescamente destilado em 13 ml de fosfato de trimetila) foi adicionado a um funil de gotejamento e foi adicionado em porções no período 20 min sob argônio. A temperatura aumentou em uma reação exotérmica para até 5°C. Subseqüentemente 2,6 ml de piridina foram adicionados e foram agitados por uns outros 40 min a 0°C e sob argônio.

A solução de reação foi cuidadosamente adicionada gota a gota a 800 ml de solução de carbonato de hidrogênio de tretilamônio a 1 M resfriada com gelo (pH = 8). Depois que a adição foi completada, ela foi agitada por mais 1 h. A solução levemente turva foi subsequentemente adicionada (rapidamente) gota a gota a solução de NaCl saturada a 1 l. Foi agitada ulteriormente de um dia para o outro para aperfeiçoar a cristalização. O precipitado foi removido por filtração. O resíduo foi dessalinizado sobre uma coluna de Diaion. Para esta finalidade 500 g de Diaion foram adicionados a isopropanol/água 1/1 e foram deixados se inchar de um dia para o outro. Diaion foi introduzido na coluna e foi exaguado com água. Uma pasta do resíduo foi formado em 100 ml de água pH 3,5 (ácido acético) que foi subsequentemente aplicada a uma coluna e foi enxaguada com água (pH 3,5) até que ela esteja livre de cloreto de sódio. A substância foi então eluída a partir da co-

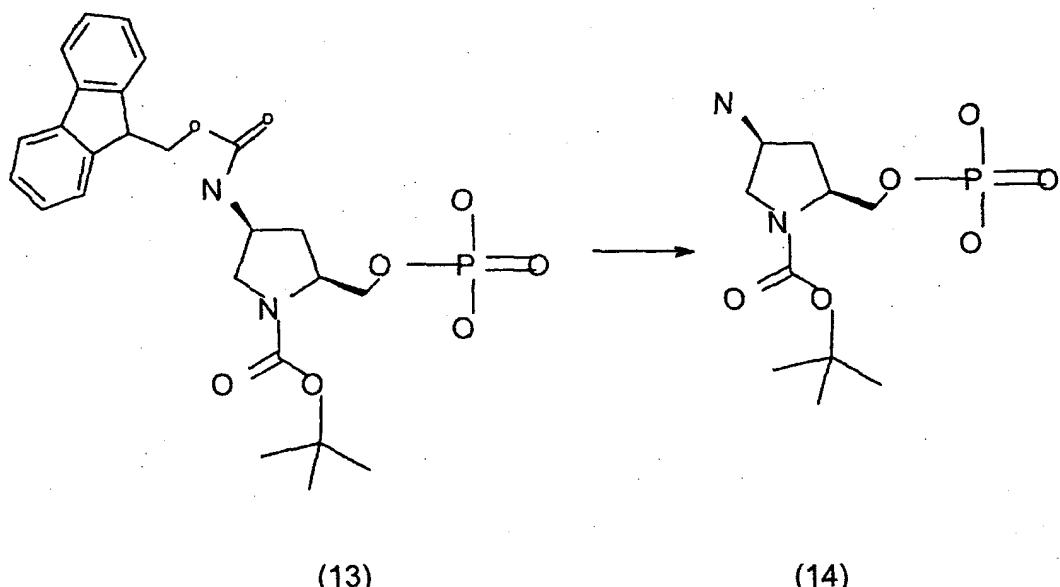
luna com 25% de isopropanol (pH 3,5). A solução foi evaporada em um alto vácuo à temperatura ambiente.

Resíduo = 2,6 g = 31,3%

TLC RP8 F254/MeOH/água 9/1 MS ESI ES-517,13

- 5 A identidade do produto foi também confirmada por análise de
RMN.

V. Síntese de quinto estágio de pNAD (composto 14)



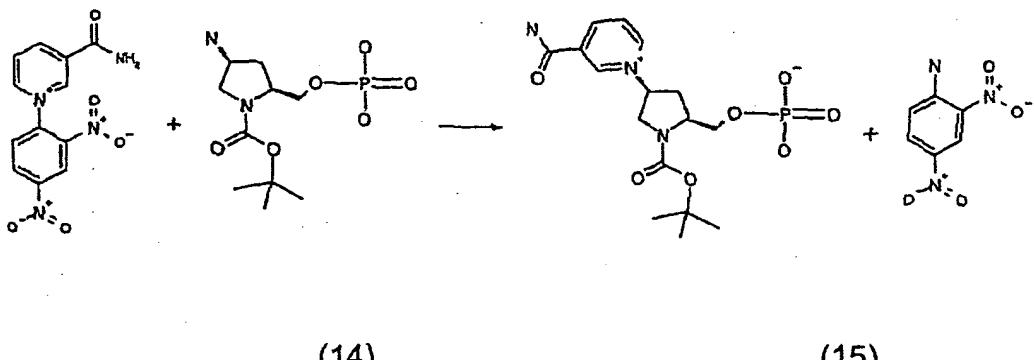
Uma mistura de composto 13 oriundo do estágio 4 (4,10 g, 7,9 mmols) em 250 ml de metanol e 83 ml de 25% de amônia foi agitada de um dia para o outro à temperatura ambiente e foi evaporada em um vácuo à temperatura ambiente. O resíduo foi colocado em 200 ml de água e foi agitado três vezes com 100 ml de acetato de etila. Componentes insolúveis foram removidos por filtração; a fase aquosa clara foi separada e novamente foi evaporada à temperatura ambiente.

15 Resíduo = 2,56 q = 100%

MS ESI ES - 295

A fim de remover os cátions de NH_3 , o resíduo foi dissolvido 2 x em base de Hünig's e novamente foi evaporado cada vez em um alto vácuo.

VI. Síntese de sexto estágio de pNAD (composto 15)



O sal de Zincke (2,66 g, 8,99 mmols) foi apresentado parcialmente dissolvido em 50 ml de metanol e composto 14 oriundo do estágio 5 (2,56 g, 8,31 mmols) foi dissolvido em 50 ml de metanol foi adicionado gota a gota enquanto se agitando. A mistura colorida de vermelho e lentamente dissolvida. Foi agitada ulteriormente de um dia para o outro à temperatura ambiente

e o precipitado foi removido por filtração. O filtrado foi evaporado em um vácuo, foi colocado em 100 ml de água e foi extraído três vezes com acetato de etila.

10 A fase de acetato de etila contém o subproduto dinitroanilina, a fase aquosa
contém o produto e o sal de Zincke restante. A fase aquosa foi evaporada
em um vácuo à temperatura ambiente e 10 ml de água foram adicionados ao
resíduo que foi obtido, que foi agitada por 10 min em um agitador magnético
e componentes insolúveis foram removidos por filtração. O produto permaneceu dissolvido. Esta solução foi aplicada a uma coluna Diaion HP20 (1000
ml) que tinha sido enxaguada com água e foi enxaguada duas vezes com
1000 ml de água. Subseqüentemente foi enxaguada com água/5% de isopropanol e frações positivas (detectadas por TLC RP8 MeOH/W 9/1) foram
evaporadas à temperatura ambiente. O resíduo foi triturado com isopropanol
e filtrada por succão com o auxílio de éter de dietila.

$$\text{Resíduo} = 1,60 \text{ g} = 47,9\%$$

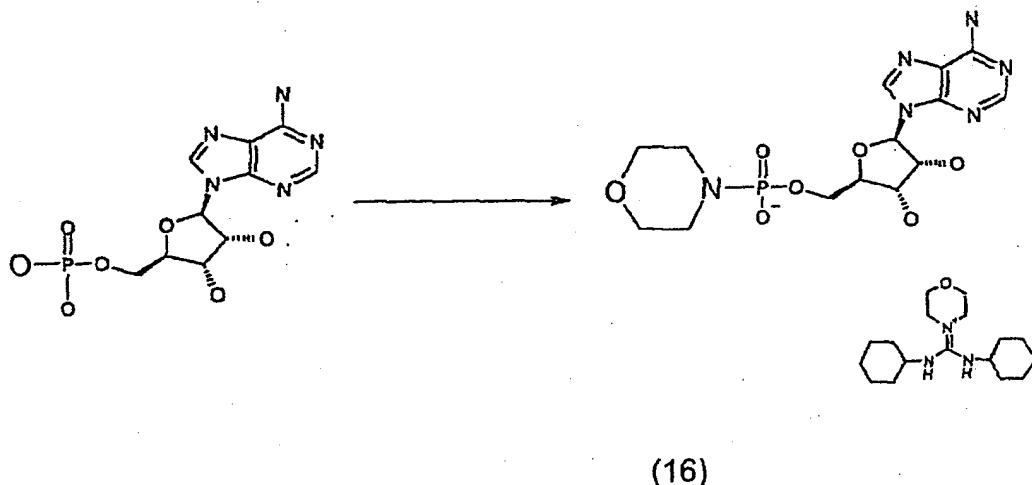
TLC RP8 254 MeOH/W 9/1

MS ES - 400,1/ES + 402,0 também exibe a massa dupla.

A identidade do produto foi também confirmada por análise de

25 RMN.

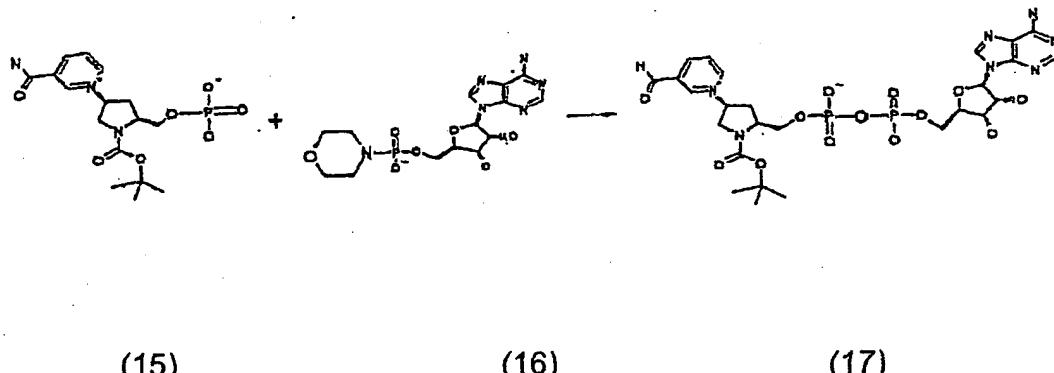
VIIa. Síntese de estágio 7a de pNAD (composto 16)



Uma mistura de ácido AMP (ácido livre de adenosina monofosfato) (10 g, 27,5 mmols) em 60 ml de metanol (seca com sódio) e 5,3 ml de (60 mmols) de morfolina (frescamente destilada) foi agitada até que uma solução
5 clara fosse formada.

Subseqüentemente 17 g (82,5 mmols) de N,N'-dicioexil carbodiimida (DCC) foram adicionados e foram agitados de um dia para o outro à temperatura ambiente enquanto se excluindo umidade. O precipitado (DCH) que foi formado foi filtrado por succção e o filtrado foi evaporado rotativo a
10 30°C. Subseqüentemente foi agitado com 150 ml de H₂O/150 ml de éter de dietila e novamente foi filtrado. Depois da separação de fases foi novamente extraída duas vezes com 75 ml de éter de dietila cada vez. A fase aquosa foi subseqüentemente evaporada rotativa à temperatura ambiente. O resíduo foi dissolvido umas outras duas vezes em piridina e cada vez novamente foi
15 evaporado roativo em um alto vácuo.

VII. Síntese de sétimo estágio de pNAD (composto 17)



Uma mistura de morfolidato de AMP (composto 16 oriundo do estágio 7a) (2,53 g, 3,61 mmols), composto 15 oriundo do estágio 6 (1,60 g, 3,98 mmols), solução de MnCl₂ em formamida a 0,2 M* (27,1 ml, 5,42 mmols) e MgSO₄ anidro (0,87 g, 7,95 mmols) foram agitados de um dia para o outro à temperatura ambiente e depois desse tempo foram largamente convertidos como determinado por TLC (RP8 MeOH/W 9/1). A mistura de reação foi precipitada com acetonitrila e foi filtrada por succão.

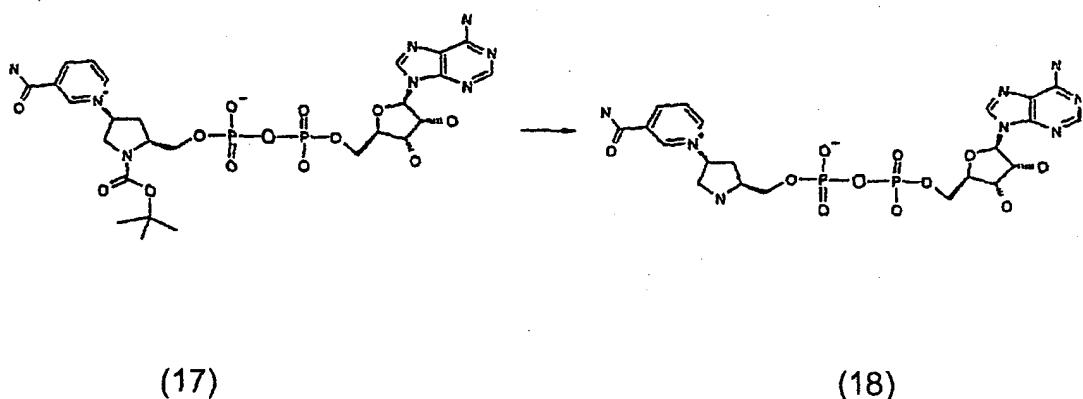
Resíduo = 5,3 g (rendimento teórico 2,64 g)**

MS ESI ES - 729,3 = produto, ES - 415 = cátion de morfolidato de AMP, ES - 400,2/ ES + 402,1 resíduos do composto 15 (estágio 6) TLC RP 8 F254 R_f 0.085

* A fim de preparar esta solução de 2516 mg de MnCl₂ anidro foi dissolvida em 100 ml de 99,99% de formamida enquanto se agitando e subsequente-mente uma peneira molecular 4A foi adicionada.

15 ** O resíduo foi ulteriormente processado como um produto bruto.

VIII. Síntese de oitavo estágio de pNAD (composto 18, pirrolidinil-NAD)



5,0 ml de ácido trifluoroacético (TFA) foram adicionados a 500 mg de composto 17 do estágio 7 (produto bruto, contém cerca de 50% de sais) e foram agitados por 1 h à temperatura ambiente e subsequentemente foram concentrados por evaporação. 500 ml de óleo incolor foram formados como o resíduo

MS ESI ES-729,24 (adição de NH₃ necessário)

2 Porções de 200 mg e 300 mg foram cada uma purificadas em 2 etapas de separação:

Primeira etapa de separação:

10 coluna de Fractogel EMD SO₃-s: D (interno) = 14 mm L (embalagem) = 85 mm

I. Condicionamento

(taxa de fluxo 5 ml/min) a) 100 ml de H₂O
b) 200 ml de 0,25 M H₂SO₄

15 c) 100 ml de H₂O

d) 200 ml de solução de amônica a 1 M
e) 100 ml de H₂O

II. Separação: a) aplicar 200 ml de substância dissolvida em 5 ml de H₂O

20 b) eluir com a gradiente de H₂O -> solução de NH₄HCO₃ a 0,2 M. (solvente móvel A = 250 ml de H₂O apresentado em um frasco Erlenmeyer e agitado em um agitador magnético, bombeado sobre a coluna a uma taxa de ml/min solvente móvel B = solução de NH₄HCO₃ a 0,2 M bombeado a 2,5 ml/min para A).

25 III. Fracionação:

a) frações de cada um de 3 ml
b) impurezas de primeiro pico de primeiro
c) segundo pico depois de cerca de 70 ml de eluato preliminar = substância

IV. Recondicionamento:

30 a) 100 ml de solução de amônia a 1 M
b) 100 ml de H₂O

Segunda etapa de separação:

Diaion HP20, coluna D (interna) = 30 mm L (embalagem) 130 mm eluída com 100 ml de H₂O e 100 ml de H₂O/5% de isopropanol.

A substância já elui com a fase aquosa; apenas impurezas estão presentes na fração de isopropanol.

5 3 Frações foram obtidas de acordo com HPLC analítico:

F1 = 13,5 mg

F2 = 5,5 mg

F3 = 11,5 mg

Total = 30,5 mg = 12,2 %

10 A identidade do pirrolidinil NAD (composto 18) foi confirmada por análises de RMN.

Ensaio de desidrogenase de glicose para pNAD

A fim de examinar a regra de pNAD como um cofator para desidrogenase de glicose (GlucDH), um ensaio de atividade de glicoseDH em 15 Tris a 0,1 M/NaCl a 0,2 M (pH 8,5) tampão foi realizado. A concentração de glicose era de 80 mM. Concentrações de pNAD e NAD a 0,05-0,5 mM foram usadas. A isso, 10 mg/ml (pNAD) ou 0,002 mg/ml (NAD) [83 ou 0,017 µM respectivamente] GlucDH foi adicionado. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente e a reação enzimática foi monitorada por registro de espectros 20 de absorção a intervalos de tempo regular. Os valores mostrados na tabela 1 referem-se a uma medição de absorção depois de 4 min.

Tabela 1

(p) NAD (mm)	U/ml	% de atividade	[GlucDH] usada
0,05 NAD	539	100	0,02 mg/ml
0,4 NAD	1556	100	0,002 mg/ml
0,05 pNAD	0,00017	0,00003	10 µl 10 mg/ml
0,4 pNAD	0,0024	0,00015	10 µl 10 mg/ml

Espectros de absorção de pNAD e pNADH

25 Espectros de absorção de NAD e pNAD e/ou NADH e pNADH são mostrados nas figuras 6A e 6B. NAD e pNAD exibem uma máxima absorção a 260 nm. pNADH, isto é, pNAD depois do ensaio de atividade de

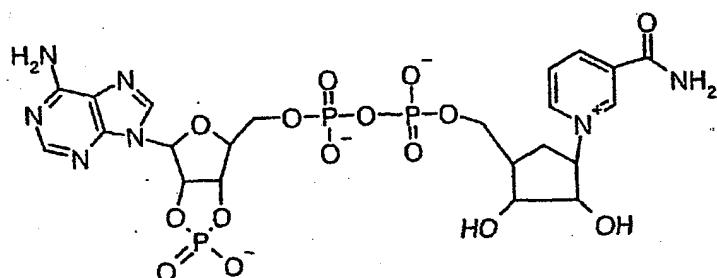
GlucDH exibe um deslocamento vermelho da absorção máxima por cerca de 10 nm (figura 6B) em comparação com NADH.

Espectros de fluorescência de NADH e pNADH como complexos de GlucDH são adicionalmente mostrados nas figuras 7 e 8. Os espectros 5 foram em cada caso registrados depois do ensaio de atividade de GlucDH. Figura 7 mostra espectros de emissão de complexos de NADH/pNADH-GlucDH a comprimentos de onda de excitação de 340 e 370 nm. Os espectros de emissão de NADH e pNADH a comprimento de onda de excitação de 10 370 nm são similares. Figura 8 mostra um espectro de excitação para um complexo de NADH/pNADH-GlucDH a um comprimento de onda de emissão de 460 nm. pNADH exibe um espectro de excitação mais amplo do que NADH. Os espectros foram também registrados depois do ensaio de atividade de GlucDH.

Investigação da estabilidade de pNAD.

15 A fim de examinar a estabilidade de pNAD em comparação com NAD, as mesmas quantidades de NAD e pNAD foram cada uma colocadas em KPO₄ a 0,15 M, tampão de NaCl a 1 M (pH 7,0) e foram incubadas a 50°C. A decomposição de NAD e/ou pNAD foram monitoradas por HPLC. Figura 9 mostra a percentagem de áreas das quantidades de (p)NAD em 20 comparação com as quantidades de (p)NAD na hora zero. A figura mostra que pNAD é muito estável em comparação com NAD.

C) Preparação de carbaNAD ciclofosfato (19)

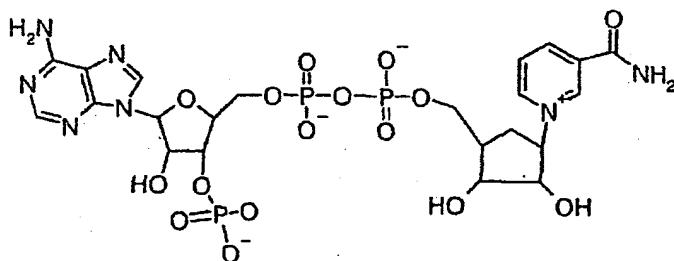


79 mg (0,1 mmol) de O5'-(hidróxi-morfolino-fosforil)-O2',O3'-hidróxi-fosforil-adenosina, diidrato de cicloexilamina de ácido N-cicloexil-morfolina-4-25 carbonimídico (secos por coevaporação com piridina (Morhat e outros, J. Am. Chem. Soc. 83; 1961; 663-675), 44 mg (0,105 mmol) carbaNMN mono-fosfato e subseqüentemente 25 mg sulfato de magnésio seco foram adicionados.

nados a 0,74 ml de uma solução de cloreto de manganês a 0,2 em formamida absoluta. A mistura foi agitada sob argônio por três dias em um recipiente de reação encerrado e subseqüentemente foi adicionada a 10 ml de acetonitrila enquanto se agitando.

O precipitado foi removido por filtração, foi purificado por cromatografia de RP em um RP 18 Hypersil ODS, 250 x 21,2 mM, coluna de 5 μ M usando-se um gradiente de 0% de B a 100% de B por 60 min: Eluente A: trietilacetato de amônio a 0,1 M, eluente B: mistura de 1:4 de 0,1 M de trietilacetato de amônio e acetonitrila, taxa de fluxo: 10 ml/min. A eluição foi monitorada por detecção a 260 nm. A fração principal foi coletada e foi liofilizada 5 vezes a fim de remover o trietilacetato de amônio. O sal de trietilamônio foi convertido no ácido livre com Dowex 50 WX2 e subseqüentemente no sal de lítio Rendimento: 10 mg.

D) Preparação de carbaNADP (20)



Três vezes quatro unidades de ribonuclease T2 foram adicionadas no período de 6 h a 37°C a uma solução de 2,2 mg de sal de lítio de carbaNAD ciclofosfato (19) em 1 ml de tampão de Bis-tris-propano (0,02 M, pH 7,5). A mistura foi mantida de um dia para o outro a 37°C. A enzima foi desnaturada por aquecimento para 65°C por 20 min. Depois da filtração uma purificação foi realizada por cromatografia de RP em um RP 18 Hypersil ODS, 250 x 21,2 mm, coluna de 5 μ M usando-se um gradiente de 0% de B a 100 % de B por 60 min. Eluente A: trietilacetato de amônio a 0,1 M; eluente B: 1:4 mistura de 0,1 ml de trietilacetato de amônio e acetonitrila; taxa de fluxo: 10 ml/min. A eluição foi monitorada por detecção a 260 nm. A fração principal foi coletada e foi liofilizada 5 vezes a fim de remover o acetato de trietilamônio.

6327: calculado 742,45, encontrado: 743,17).

E) Desidrogenase de ensaio de atividade de glicose para cNAD

A desidrogenase de ensaio de atividade de glicose para cNAD em comparação com NAD foi realizada como descrita sob B) para pNAD.

- 5 Para essa finalidade concentrações de desidrogenase de glicose de 0,1 (cNAD) e 0,002 mg/ml (NAD) [0,83 e 0,017 μ M respectivamente] foram usadas. As quantidades usadas e os resultados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2

(p) NAD (mm)	U/ml	% de atividade	[GlucDH] usada
0,05 NAD	430	100	0,002 mg/ml
0,1 NAD	556	100	0,002 mg/ml
0,05 pNAD	2,7	0,63	0,1 mg/ml
0,4 cNAD	5,3	0,95	0,1 mg/ml

10 F) Espectros de absorção de cNAD e cNADH

Figuras 10A, 10B e 10C mostram espectros de absorção de NAD e cNAD. NAD bem como cNAD têm uma absorção máxima a 260 nm.

Figura 10B mostra espectros de absorção de NADH e cNADH onde os es-

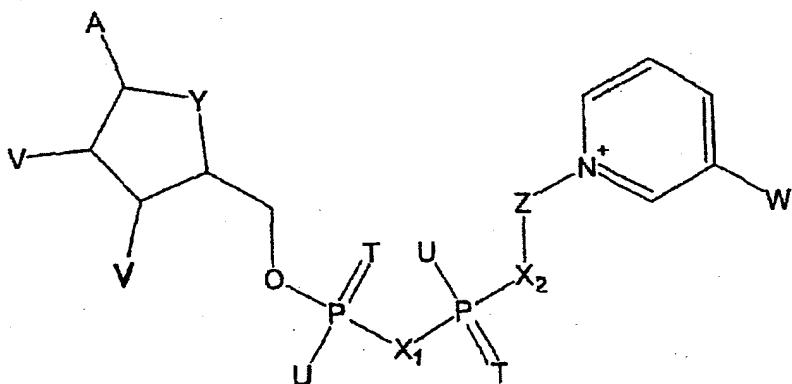
pectros foram em cada caso registrados depois de um ensaio de atividade

- 15 de desidrogenase de glicose. A absorção máxima de cNADH exibe um des-
locamento vermelho de 20 nm. Outros espectros de absorção para NADH e
cNADH são mostrados na figura 10C em que condições diferentes para os
ensaio de atividade desidrogenase de glicose associado foram selecionados
como afirmado nas legendas.

- 20 Figura 11 adicionalmente mostra espectros de fluorescência de
NADH e cNADH como complexos de GlucDH. Os espectros foram regis-
trados a um comprimento de onda de excitação de 370 nm depois de um de
ensaio de atividade de desidrogenase de glicose. NADH bem como cNADH
exibe um aumento de sinal de fluorescência quando tratado com GlucDH.

REIVINDICAÇÕES

1. Elemento de teste para a determinação de um analito compreendendo (i) uma enzima dependente de coenzima ou um substrato para tal enzima e (ii) um composto da seguinte fórmula geral (I) como a coenzima:



(I)

5 em que

A = adenina ou um análogo da mesma,

T = em cada caso independentemente significa O, S,

U = em cada caso independentemente significa OH, SH, BH₃, BCNH₂,

V = em cada caso independentemente significa OH ou um grupo fosfato.

10 W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ em que R em cada caso independentemente significa H ou C₁-C₂ alquila,

X₁, X₂ = em cada caso independentemente significam O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,

Y = NH, S, O, CH₂,

15 Z = um resíduo compreendendo um grupo cíclico com 5 átomos de carbono que opcionalmente contém um heteroátomo selecionado de O, S e N e opcionalmente um ou mais substituintes, e

um resíduo CR₄₂ em que CR₄₂ está ligado ao grupo cíclico e a X₂

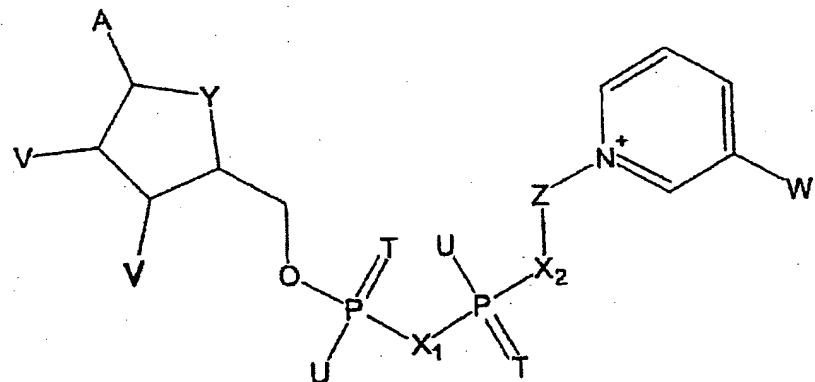
onde R₄ = em cada caso independentemente significa H, F, Cl, CH₃,

20 com a condição de que Z e o resíduo de piridina não estejam ligados por uma ligação glicosídica, ou um sal ou opcionalmente uma forma reduzida dos mesmos.

2. Elemento de teste de acordo com a reivindicação 1, para a determinação de glicose compreendendo desidrogenase de glicose e um composto de acordo com a fórmula geral (I) ou um sal como uma coenzima.

5 3. Elemento de teste de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que os substituintes no Z são selecionados do grupo que compreende F, Cl e C₁-C₂ alquila que está opcionalmente fluorada ou clorada ou/e OH-substituída, O-C₁-C₂ alquila.

10 4. Elemento de teste de acordo com uma das reivindicações de 1 a 3, compreendendo um composto da seguinte fórmula (I') como a coenzima:



(I')

em que

A = adenina ou um análogo da mesma,

T = em cada caso independentemente significa O, S,

U = em cada caso independentemente significa OH, SH, BH₃, BCNH₂, V =

15 em cada caso independentemente significa OH ou um grupo fosfato,

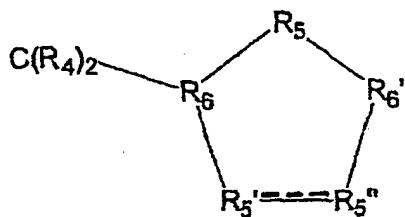
W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ em que R em cada caso independentemente significa H or C₁-C₂ alquila,

X₁, X₂ = em cada caso independentemente significam O, CH₂, CHCH₃,

C(CH₃)₂, NH, NCH₃,

20 Y = NH, S, O, CH₂,

Z = um anel de cinco membros carbocílico ou heterocíclico saturado ou insaturado, em particular um composto da fórmula geral (II)



em que uma ligação simples ou dupla pode estar presente entre R_5' e R_5''

R_4 = em cada caso independentemente significa H, F, Cl, CH_3 , $\text{R}_5 = \text{CR}_4_2$, se uma ligação simples estiver presente entre R_5' e R_5'' , então $\text{R}_5' = \text{O}, \text{S}, \text{NH}, \text{NC}_1\text{-C}_2$ alquila, $\text{CR}_4_2, \text{CHOH}, \text{CHOCH}_3$,

- 5 $\text{R}_5'' = \text{CR}_4_2, \text{CHOH}, \text{CHOCH}_3$, se uma ligação dupla estiver presente entre R_5' e R_5'' , então $\text{R}_5' = \text{R}_5'' = \text{CR}_4$, $\text{R}_6, \text{R}_6' =$ em cada caso independentemente significam CH, CCH_3 ou um sal ou opcionalmente uma forma reduzida dos mesmos.

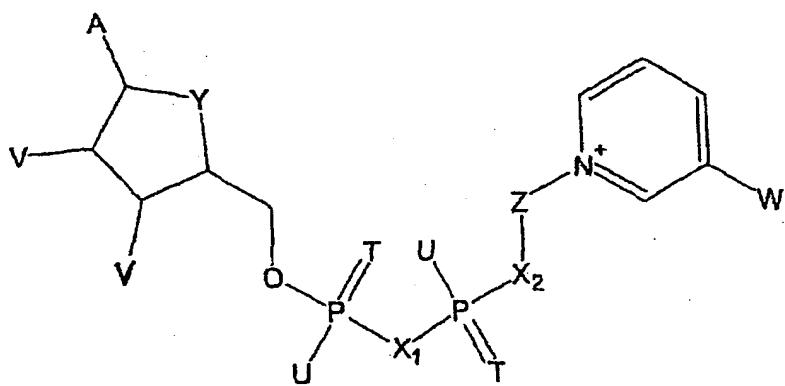
5. Elemento de teste de acordo com uma das reivindicações de
10 1 a 4, em que $\text{W} = \text{CONH}_2$ ou COCH_3 .

6. Elemento de teste de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, na forma de uma tira de teste.

7. Elemento de teste de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma desidrogenase selecionada de desidrogenase de glicose (E.C.1.1.1.47), lactato desidrogenase (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato desidrogenase (E.C.1.1.1.37), glicerol desidrogenase (E.C.1.1.1.6), álcool desidrogenase (E.C.1.1.1.1), alfa-hidroxibutirato desidrogenase, sorbitol desidrogenase ou aminoácido desidrogenase tal como L-aminoácido desidrogenase (E.C.1.4.1.5).

- 20 8. Elemento de teste de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, para detectar glicose, caracterizado pelo fato de que a enzima é desidrogenase de glicose.

9. Composto da fórmula geral (I"):



(I'')

em que

A = adenina ou um análogo da mesma,

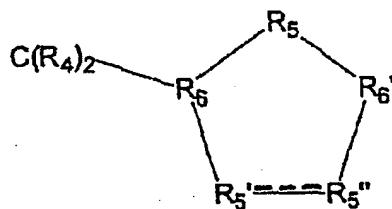
T = em cada caso independentemente significa O, S,

U = em cada caso independentemente significa OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,

5 V = em cada caso independentemente significa OH ou um grupo fosfato,

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ em que R em cada caso independentemente significa H or C₁-C₂-alquila,X₁, X₂ = em cada caso independentemente significam O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,10 Y = NH, S, O, CH₂,

Z = um anel de cinco membros carbocílico ou heterocíclico saturado ou insaturado, em particular compostos da fórmula geral (II)



(II)

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

R4 = em cada caso independentemente significa H, F, Cl, CH₃,15 R5 = CR4₂,

se uma ligação simples estiver presente entre R5' e R5'', então

R5' = O, S, NH, NC₁-C₂-alquila, CR4₂, CHO, CHOCH₃,

R5" = CR₄₂, CHO_H, CHOCH₃,

se uma ligação dupla estiver presente entre R5' e R5", então R5' = R5" = CR₄

R6, R6' = em cada caso independentemente significam CH, CCH₃

5 com a condição de que se R5 = CH₂, T = O, U = em cada caso OH, V = OH, W = CONH₂, X = O e Y = O, então R5' e R5" não sejam simultaneamente CHO_H, ou um sal ou opcionalmente uma forma reduzida dos mesmos.

10. Composto de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que pelo menos um resíduo U é diferente de OH.

11. Composto de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que pelo menos um resíduo U = BH₃⁻.

12. Composto de acordo com uma das reivindicações de 9 a 11, em que W = CONH₂ ou COCH₃.

13. Composto de acordo com uma das reivindicações de 9 a 12, 15 que é borano NAD, borano NADP ou um sal ou uma forma reduzida dos mesmos.

14. Composto de acordo com uma das reivindicações de 9 a 12, que é c-pentil NAD, c-pentil NADP ou um sal ou uma forma reduzida dos mesmos.

20 15. Composto de acordo com uma das reivindicações de 9 a 12, que é pirrolil NAD, pirrolil NADP ou um sal ou uma forma reduzida dos mesmos.

25 16. Composto de acordo com uma das reivindicações de 9 a 12, que é furanil NAD, furanil NADP ou um sal ou uma forma reduzida dos mesmos.

17. Composto de acordo com uma das reivindicações de 9 a 12, que é pirrolidinil NAD, pirrolidinil NADP ou um sal ou uma forma reduzida dos mesmos.

30 18. Composto de acordo com uma das reivindicações de 9 a 12, que é carbaNAD ciclofosfato, carbaNADP ou um sal ou uma forma reduzida dos mesmos.

19. Complexo de enzima-coenzima constituída de um composto

como definido em uma das reivindicações 9 a 16, em combinação com uma enzima adequada.

20. Complexo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a enzima é uma desidrogenase selecionada de desidrogenase de glicose (E.C.1.1.1.47), lactato desidrogenase (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato desidrogenase (E.C.1.1.1.37), glicerol desidrogenase (E.C.1.1.1.6), álcool desidrogenase (E.C.1.1.1.1), alfa-hidroxibutirato desidrogenase, sorbitol desidrogenase ou aminoácido desidrogenase selecionada de L-aminoácido desidrogenase (E.C.1.4.1.5).

10 21. Uso de um composto como definido em uma das reivindicações de 9 a 18 ou de um complexo de acordo com a reivindicação 19 ou 20, para detectar um analito em uma amostra por uma reação enzimática.

15 22. Kit de reagente contendo um composto como definido em uma das reivindicações 9 a 18, e opcionalmente uma enzima adequada ou um complexo de enzima-coenzima como definido na reivindicação 19 ou 20, bem como um tampão de reação adequado.

20 23. Kit de reagente de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a enzima é um desidrogenase selecionada de desidrogenase de glicose (E.C.1.1.1.47), lactato desidrogenase (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato desidrogenase (E.C.1.1.1.37), glicerol desidrogenase (E.C.1.1.1.6), álcool desidrogenase (E.C.1.1.1.1), alfa-hidroxibutirato desidrogenase, sorbitol desidrogenase ou aminoácido desidrogenase selecionada de L-aminoácido desidrogenase (E.C.1.4.1.5).

25 24. Uso de um elemento de teste como definido em uma das reivindicações de 1 a 8, ou do kit de reagente como definido na reivindicação 22 ou 23, para determinar analitos selecionados de glicose, ácido láctico, ácido málico, glicerol, álcool, colesterol, triglycerídeos, ácido ascórbico, cisteína, glutationa, peptídeos, uréia, amônio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidase, cinase de creatina (CK), lactato desidrogenase (LDH) e dióxido de carbono.

30 25. Método para a detecção de um analito compreendendo as etapas:

(a) contato de uma amostra com um elemento de teste como de-

finido em uma das reivindicações 1 a 8, ou um kit de reagente como definido na reivindicação 22 ou 23, compreendendo uma coenzima e (b) detecção do analito.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo
5 fato de que
o analito é detectado fotometricamente ou fluorometricamente.

Fig. 1

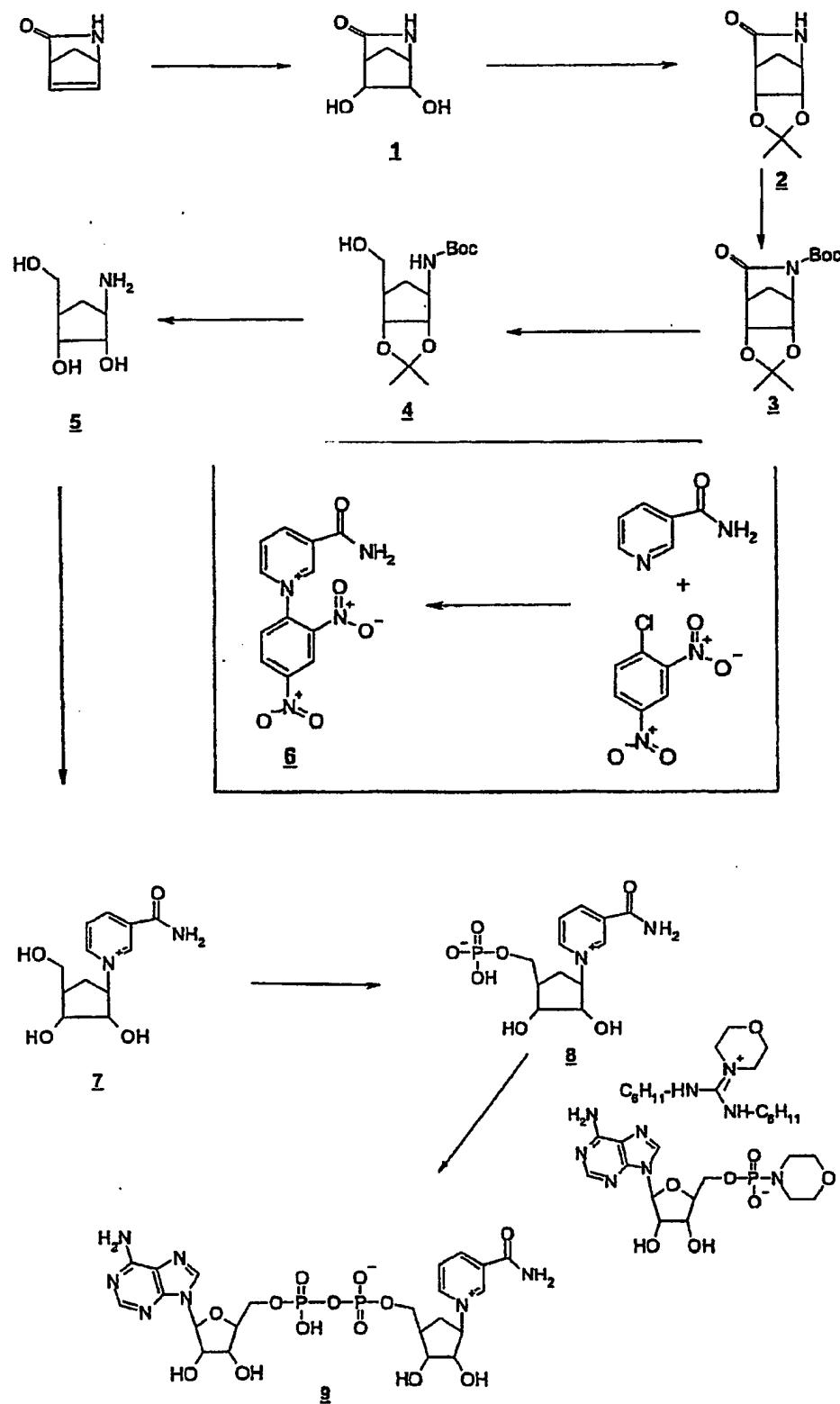


Fig. 2

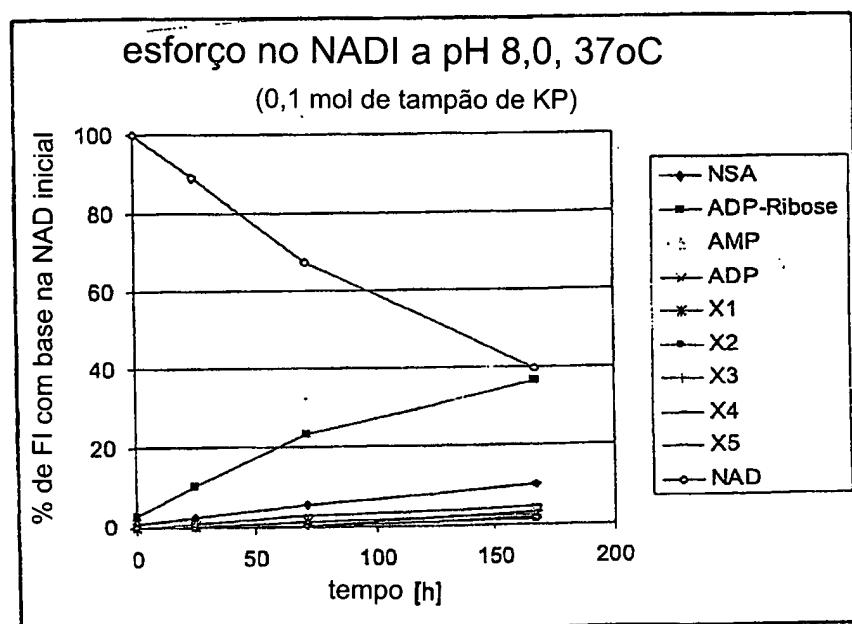


Fig. 3

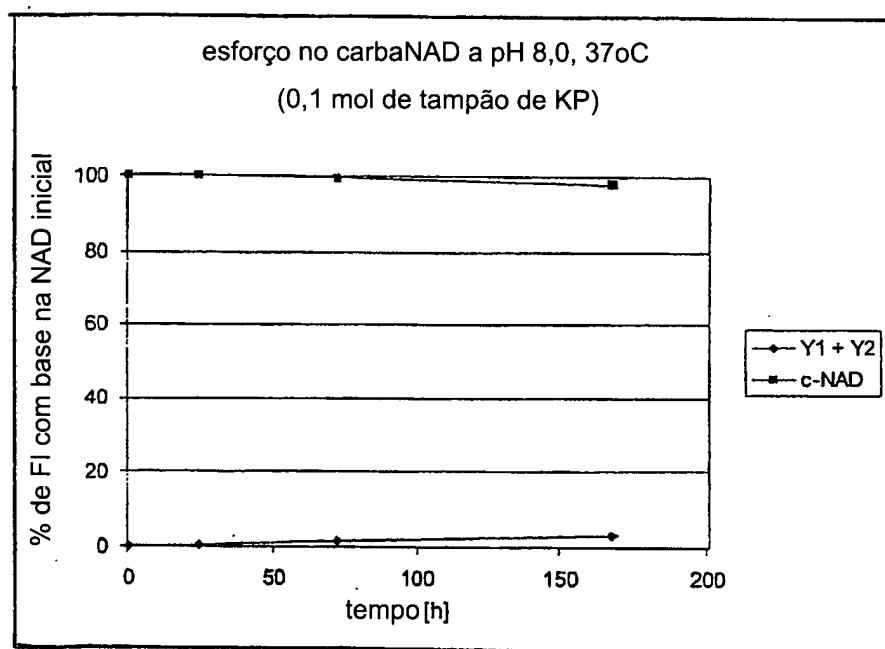


Fig. 4

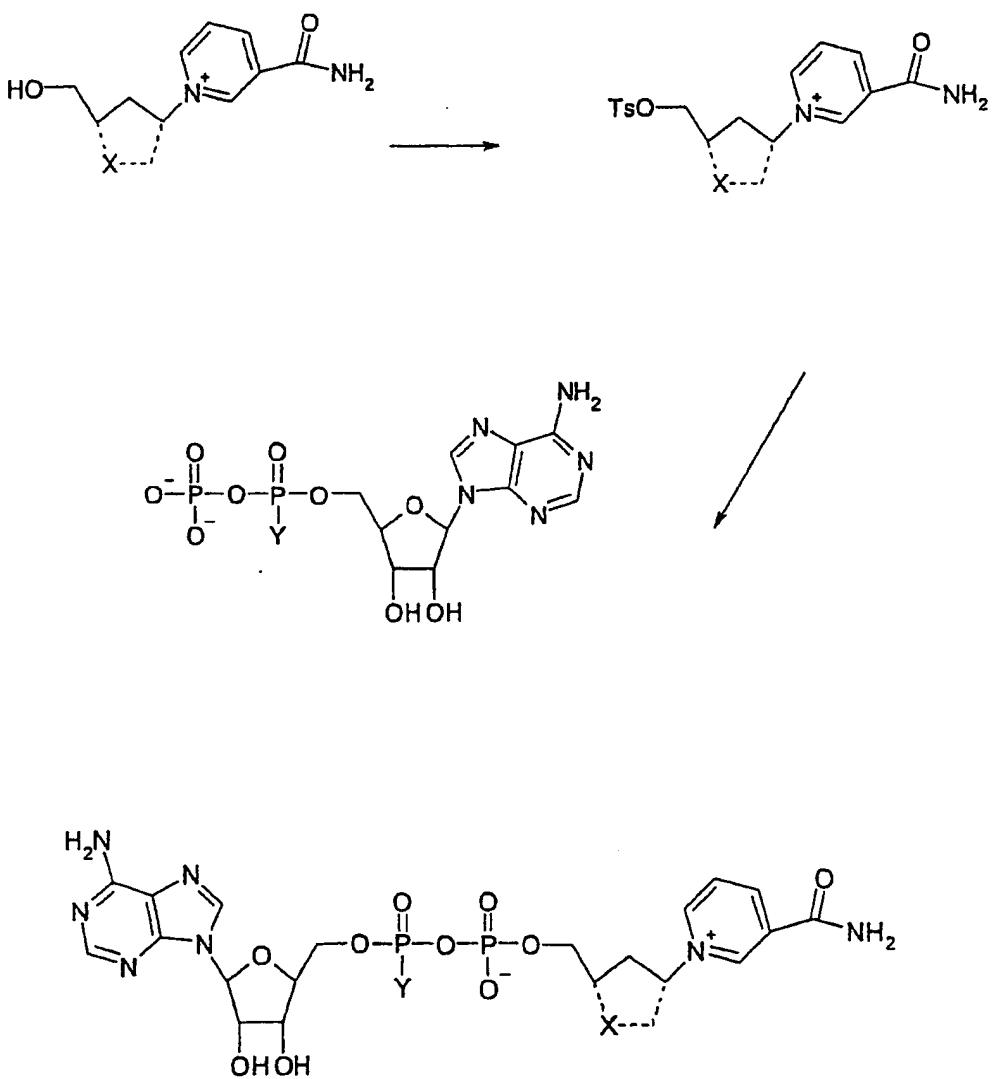


Fig. 5

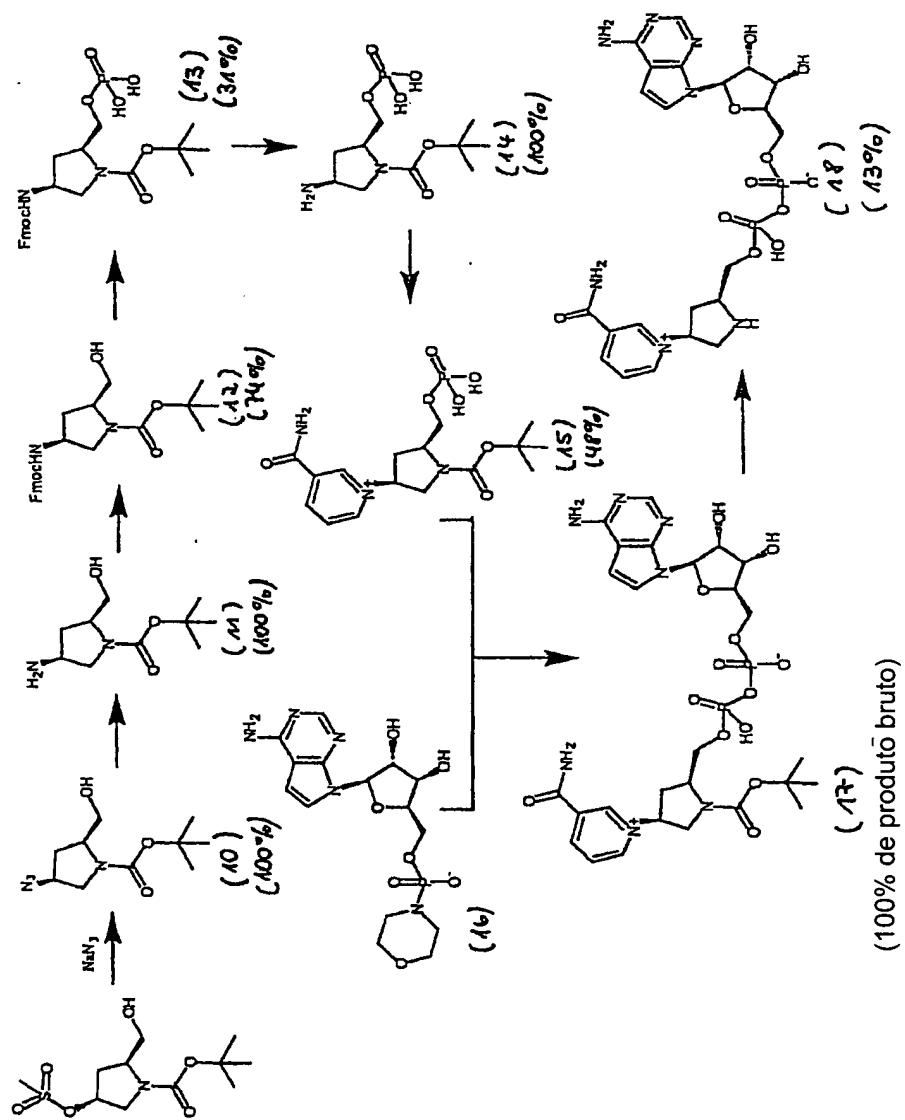


Fig. 6A

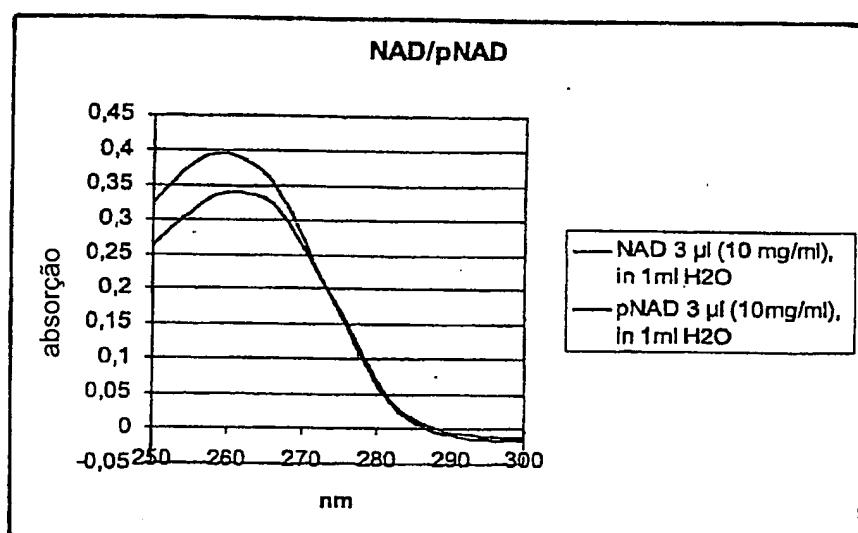
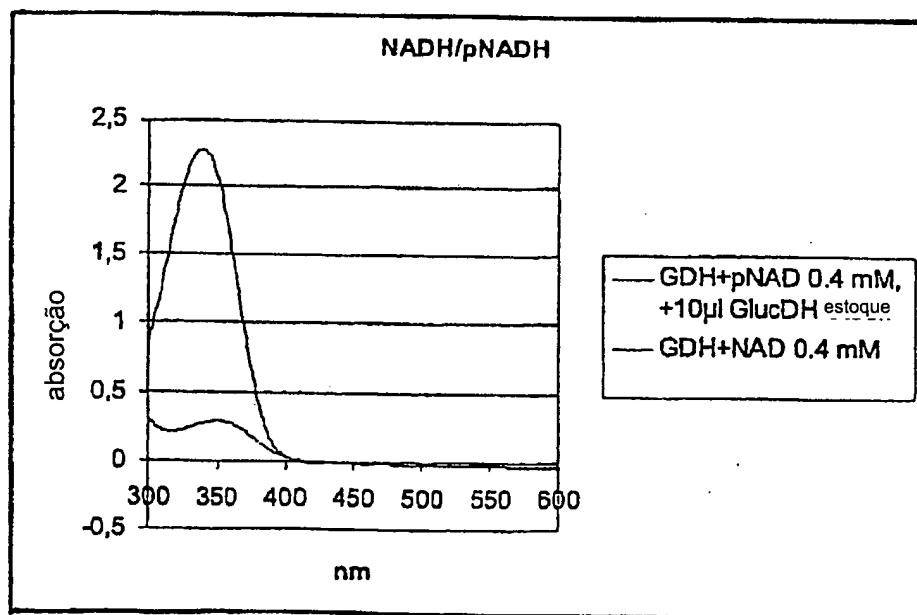


Fig. 6B



?

Fig. 7

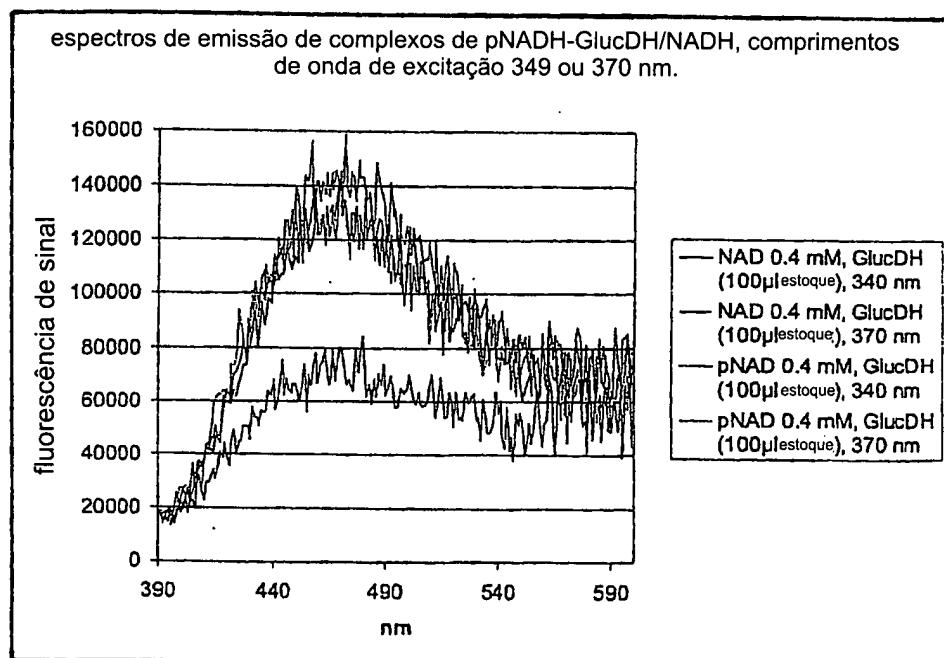


Fig. 8

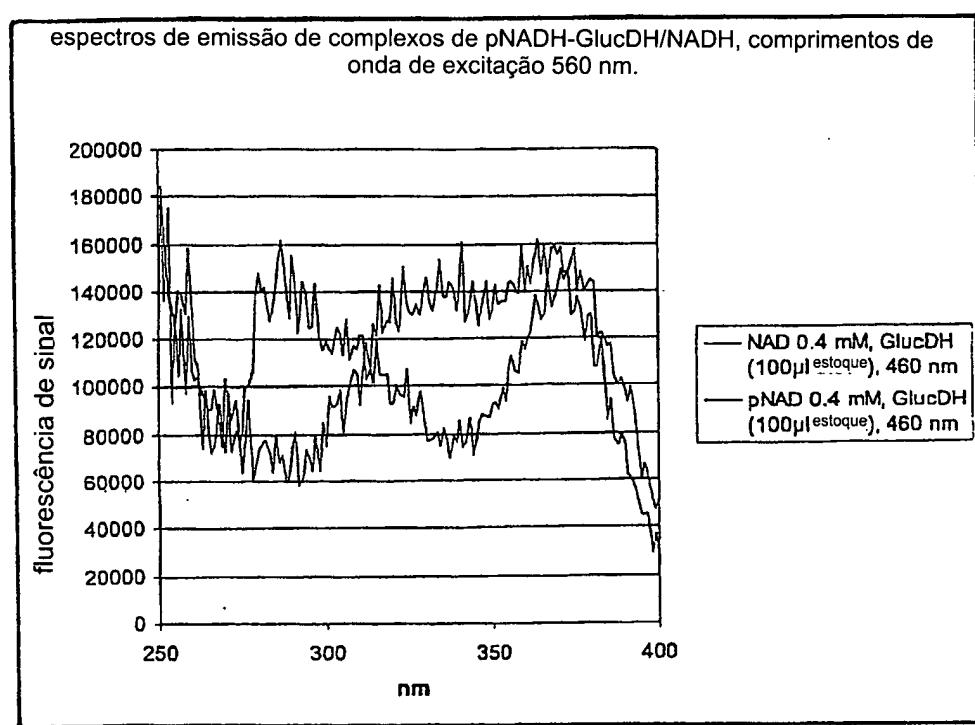
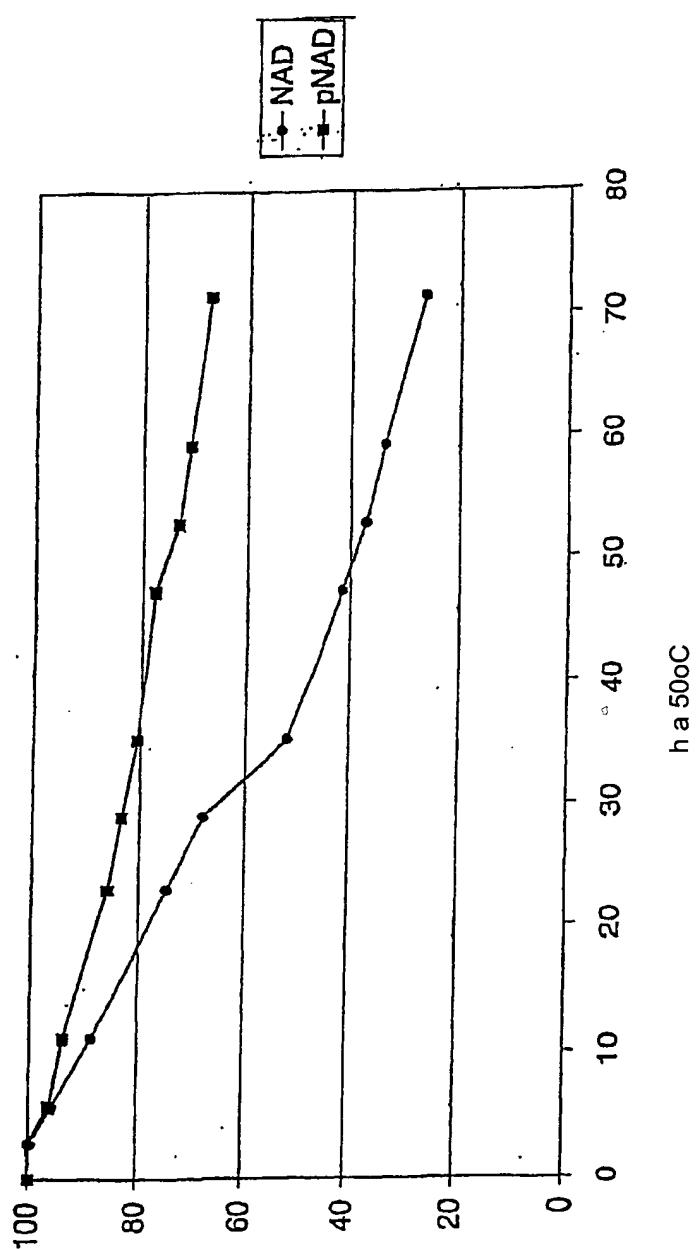


Fig. 9



percentagem de área de (p) NAD comparada com (p (NAD) na hora zero

Fig. 10A

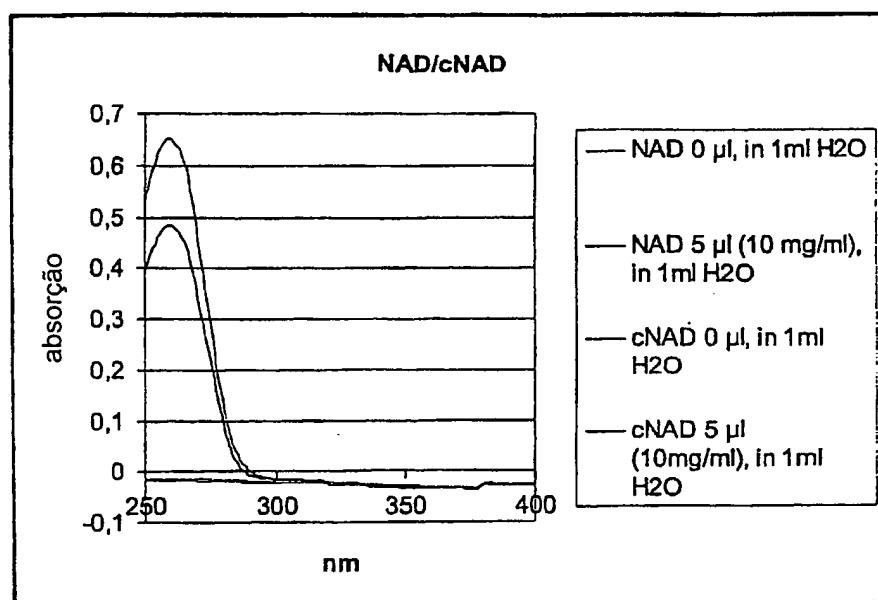


Fig. 10B

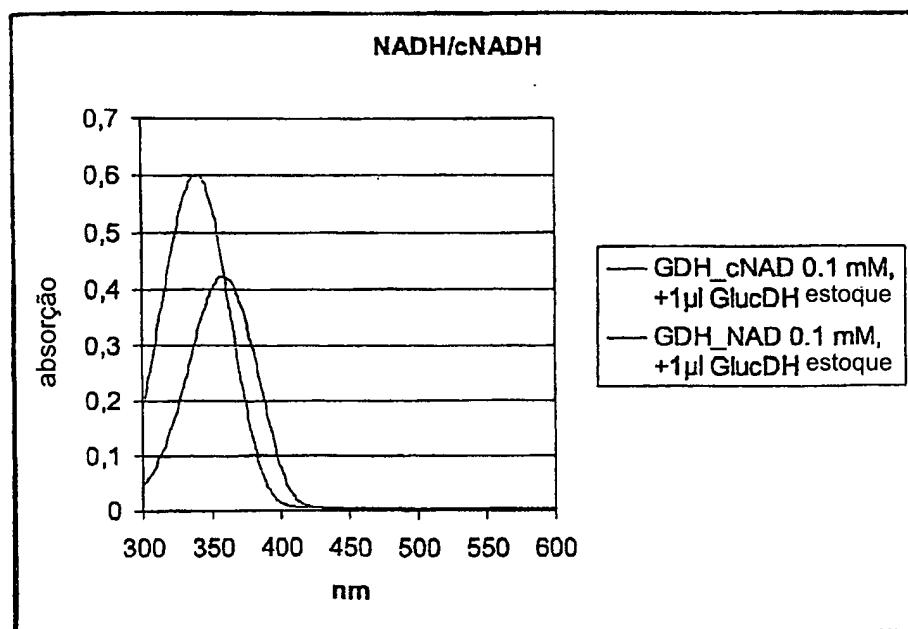


Fig. 10C

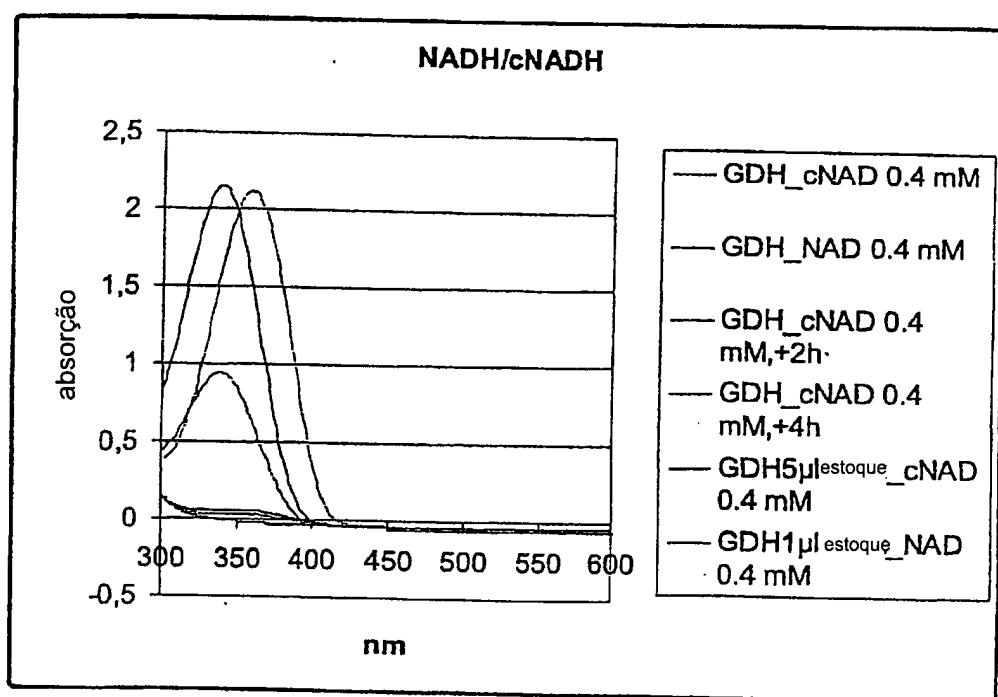
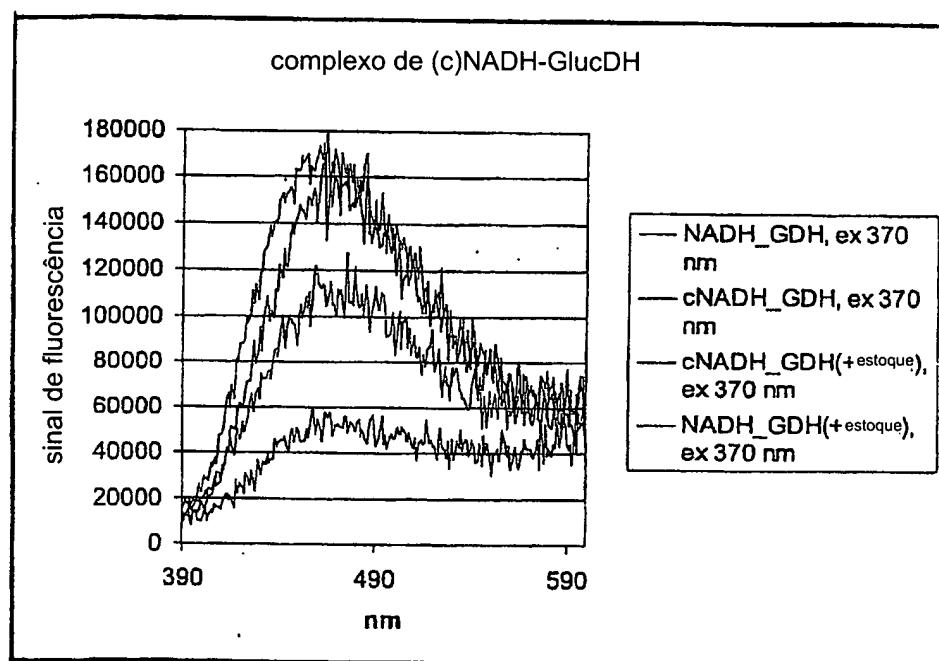
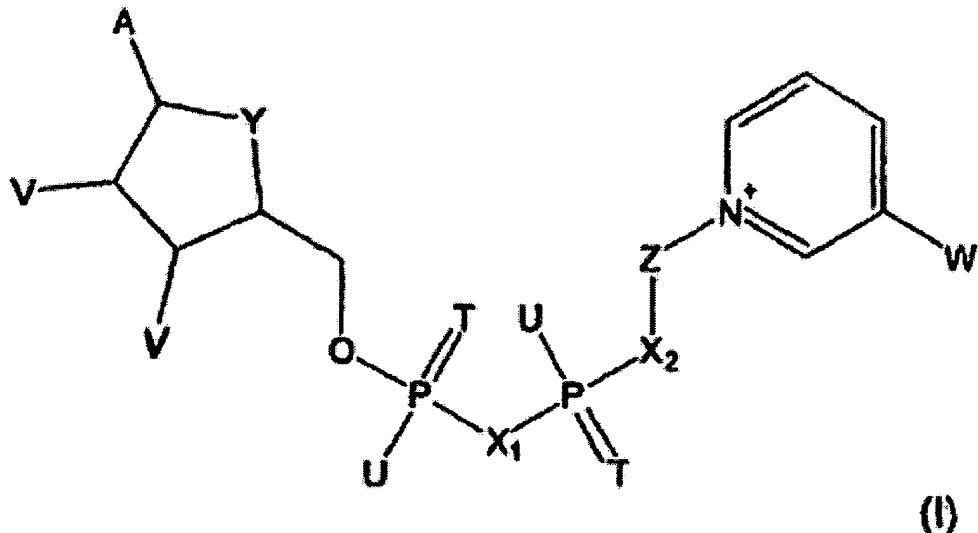


Fig.11





P10614217-6

PJ0614217 6

RESUMO

Patente de Invenção: "**DERIVADOS DE NADH/NAD ESTÁVEIS**".

A presente invenção refere-se a derivados de dinucleotídeo de adenina de nicotinamida (NAD/NADH) e fosfato de dinucleotídeo de adenina de nicotinamida (NADP/NADPH) da fórmula (I), complexos de enzima desses derivados e a seu uso em métodos de detecção bioquímica e a kit de reagentes.