

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 266**

51 Int. Cl.:

C07H 19/207 (2006.01)

C07H 23/00 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 19/213 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2006 E 06776486 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1907408**

54 Título: **Derivados estables de NAD/NADH**

30 Prioridad:

28.07.2005 DE 102005035461

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.05.2014

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**HOENES, JOACHIM;
HEINDL, DIETER;
HORN, CARINA y
GAESSLER-DIETSCHKE, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 461 266 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados estables de NAD/NADH

5 La presente invención se refiere a derivados estables del nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD/NADH) o del nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (NADP/NADPH), a complejos enzimáticos de estos derivados y a su uso en métodos de detección bioquímicos y en kits de reactivos.

10 Los sistemas bioquímicos de medición son componentes importantes de métodos analíticos clínicamente relevantes. En primer plano figura la medición de analitos, p.ej. de metabolitos o sustratos, los cuales se determinan directa o indirectamente con la ayuda de un enzima. En este caso los analitos se hacen reaccionar con un complejo enzima-coenzima y a continuación se cuantifican. Para ello, el analito determinado se pone en contacto con un enzima y un coenzima adecuados, empleando en la mayoría de los casos cantidades catalíticas del enzima. Como resultado de la reacción enzimática el coenzima se modifica, p.ej. se oxida o se reduce. Este proceso se puede registrar mediante
15 métodos electroquímicos o fotométricos, bien directamente o a través de un mediador. Mediante una calibración se obtiene una relación directa entre el valor medido y la concentración del analito buscado.

20 Los coenzimas son moléculas orgánicas unidas a un enzima por enlace covalente o no covalente que se modifican por la reacción del analito. Son ejemplos importantes de coenzimas el nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD) y el nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (NADP), de los cuales se forma por reducción NADH y NADPH.

25 Los sistemas de medición conocidos del estado técnico se caracterizan por un tiempo de estabilidad limitado y por especiales requerimientos ambientales, como refrigeración o almacenamiento en lugar seco, para conseguir esta estabilidad. Por tanto en determinadas formas de aplicación, p.ej. en pruebas realizadas por el usuario final, tales como el autocontrol de glucosa en sangre, pueden aparecer resultados erróneos debido a un mal almacenamiento inadvertido. En particular el agotamiento de los desecantes por una apertura demasiado prolongada de los envases primarios puede dar lugar a mediciones erróneas, que en algunos sistemas apenas son reconocibles por el usuario.

30 Una medida conocida que se aplica para aumentar la estabilidad de los sistemas bioquímicos de medición es el uso de enzimas más estables, p.ej. de enzimas procedentes de organismos termófilos. También cabe la posibilidad de estabilizar los enzimas por modificación química, p.ej. mediante reticulación o mutagénesis. Asimismo se pueden añadir estabilizantes de enzimas como p.ej. trehalosa, polivinilpirrolidona y albúmina sérica o incluir los enzimas en matrices poliméricas, p.ej. por fotopolimerización.

35 Además se intenta mejorar la estabilidad de los sistemas bioquímicos de medición utilizando mediadores estables. Así, el uso de mediadores con el menor potencial redox posible aumenta la especificidad de los ensayos y elimina interferencias durante la reacción. Los potenciales redox de los complejos enzima/coenzima constituyen un límite inferior para el potencial redox de los mediadores. Por debajo de dichos potenciales la reacción con los mediadores se frena o incluso se inhibe.

40 Como alternativa también se pueden emplear sistemas bioquímicos de medición sin mediadores, con los cuales se detectan directamente los coenzimas, p.ej. el coenzima NADH. Sin embargo estos sistemas de medición tienen el inconveniente de que los coenzimas como NAD y NADP son inestables.

45 El NAD y el NADP son moléculas sensibles a los álcalis, cuyas vías de degradación están descritas en la literatura (N.J. Oppenheimer in The Pyridine Nucleotide Coenzymes Academic Press New York, London 1982, editado por J. Everese, B. Anderson, K. You, capítulo 3, páginas 56-65). Al descomponerse el NAD y el NADP se forma sobre todo ADP-ribosa por disociación de los enlaces de glicosilo entre la ribosa y la unidad de piridina. En cambio las formas reducidas NADH y NADPH son sensibles a los ácidos: p.ej. la epimerización es una vía de degradación conocida. En
50 ambos casos la inestabilidad de NAD/NADP y NADH/NADPH es debida a la labilidad del enlace glicosilo entre la ribosa y la unidad de piridina. No obstante, en condiciones menos drásticas, como p.ej. en solución acuosa, también tiene lugar la hidrólisis de los coenzimas NAD y NADP solo por efecto de la humedad ambiental. Esta inestabilidad puede producir inexactitudes en la medición de analitos.

55 En B.M. Anderson, Pyridine Nucleotide Coenzymes, Academic Press, Nueva York, Londres 1982, editado por J. Everese, B. Anderson, K. You, capítulo 4, p.ej., se describe una serie de derivados de NAD/NADP. Sin embargo la mayoría de estos derivados no son bien admitidos por los enzimas. El único derivado que ha sido utilizado hasta la fecha para ensayos diagnósticos es el 3-acetilpiridina-adenina-dinucleótido (acetil-NAD), descrito por primera vez en 1956 (N.O. Kaplan, J. Biol. Chem. (1956), 221, 823). Este coenzima también muestra una baja aceptación por los
60 enzimas y varía el potencial redox.

En la patente WO 01/94370 se describe el uso de otros derivados de NAD con un grupo piridino modificado. Sin embargo las modificaciones del grupo nicotinamida tienen en general una influencia directa en la reacción catalítica, que en la mayoría de los casos es negativa.

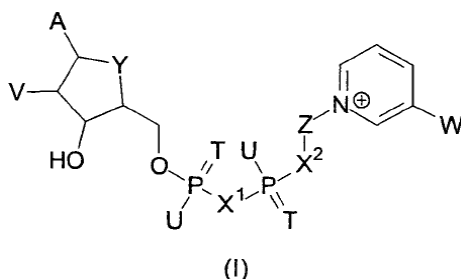
Seguendo otro concepto de estabilización se modificó la unidad de ribosa para controlar la estabilidad del enlace glicosilo. Este procedimiento no interfiere directamente en la reacción catalítica del grupo nicotinamido, pero puede haber una influencia indirecta en cuanto el enzima presente una unión fuerte y específica a la unidad de ribosa. A este respecto Kaufmann y otros revelan en las patentes WO 98/33936 y US 5,801,006 o WO 01/49247 una serie de derivados de tiorribosa-NAD. Sin embargo hasta ahora no se ha demostrado ninguna relación entre la modificación de la unidad de nicotinamida-ribosa y la actividad de los derivados en las reacciones enzimáticas.

El CarbaNAD, un derivado sin enlace glicosilo, se describió por primera vez en 1988 (J.T. Slama, Biochemistry 1989, 27, 183 y Biochemistry 1989, 28, 7688). Aquí la ribosa se sustituye por una unidad de azúcar carbocíclico. Aunque el CarbaNAD fue descrito como sustrato para deshidrogenasas, su actividad en procedimientos clínicos de detección bioquímica no ha sido comprobada hasta la fecha.

Con posterioridad G.M. Blackburn, Chem. Comm., 1996, 2765 describió una formulación análoga para preparar carbaNAD con un enlace de metilénbisdifosfonato en lugar del pirofosfato natural. El metilénbisdifosfonato muestra mayor estabilidad frente a las fosfatasas y se usó como inhibidor de ADP-ribosilclasa. El objetivo no era aumentar la estabilidad a la hidrólisis (J.T. Slama, G.M. Blackburn).

Por tanto la presente invención tiene por objeto proporcionar sistemas estables de medición bioanalítica, sobre todo para la determinación de glucosa, que eviten la sensibilidad a la hidrólisis de NAD/NADP y al mismo tiempo actúen como coenzimas en las reacciones enzimáticas.

Este objetivo se resuelve mediante un elemento de ensayo para la determinación de glucosa, que comprende (i) una glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) y (ii) como coenzima un compuesto de la siguiente fórmula general (I):



en el cual

A = adenina o un análogo de ella,

T = O, S respectivamente independientes,

U = OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻ respectivamente independientes,

V = OH respectivamente independiente o un grupo fosfato, de modo que en caso de que un radical V sea un grupo OH y el segundo radical V un grupo fosfato, el grupo OH y el grupo fosfato pueden formar un anillo con los átomos de carbono a los que están unidos;

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂, donde R = H o alquilo C₁-C₂ respectivamente independientes,

X₁, X₂ = O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃ respectivamente independientes,

Y = NH, S, O, CH₂,

Z = un radical, incluyendo un grupo cíclico de 5 átomos de C que puede llevar un heteroátomo escogido entre O, S y N, así como uno o más sustituyentes, y un radical CR₄ unido al grupo cíclico y a X₂, donde

R₄ = H, F, Cl, CH₃ respectivamente independientes,

con la condición de que Z y el radical piridino no estén unidos por un enlace glicosídico, o una sal o, dado el caso, una forma reducida del mismo.

En una forma de ejecución preferida W = CONH₂ o COCH₃.

Los sustituyentes preferidos de Z se eligen del grupo formado por OH, F, Cl, así como alquilo C₁-C₂, el cual puede estar fluorado o clorado o/y sustituido con OH, O-alquilo C₁-C₂.

En una forma de ejecución preferida un primer radical V es OH y un segundo radical V es un grupo fosfato.

Sorprendentemente los compuestos de la presente invención son estables a la hidrólisis, constituyen un buen sustrato en las reacciones de detección enzimáticas y se pueden emplear para el diagnóstico bioquímico. Esta característica es contraria a la mayoría de derivados de NAD/NADP conocidos hasta la fecha, ya que éstos tienen generalmente una estabilidad muy corta en los procesos de detección enzimática.

En comparación con el estado técnico los compuestos de la presente invención tienen las ventajas siguientes:

– gran estabilidad,

- gran actividad enzimática,
- síntesis sencilla y económica,
- posibilidad de utilización en todos procesos de detección bioquímicos conocidos hasta ahora.

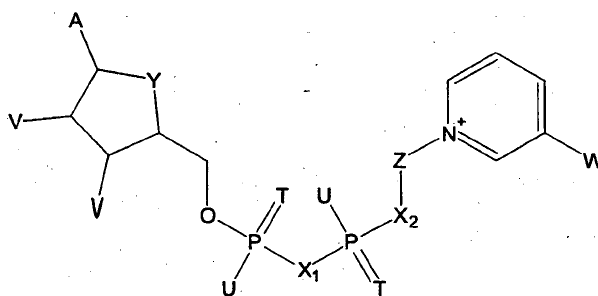
5 El aporte de derivados de NAD/NADP estables con la presente invención, preferiblemente en combinación con una receta estabilizadora – como p.ej. la inclusión de enzimas en la matriz polimérica, permite evitar en gran medida las desventajas de los métodos de detección bioquímicos conocidos hasta ahora. Además no debe agregarse ningún aditivo estabilizante, lo cual es especialmente ventajoso porque cuanto menor es el número de sustancias que intervienen en la reacción, mayor es la posibilidad de conseguir una receta estable para la determinación del analito.

10 Con la presente invención se ofrecen elementos de ensayo que incluyen una serie de derivados de NAD/NADP estables y con suficiente actividad enzimática para ser empleados como coenzima en el elemento de ensayo.

15 En general los derivados estables de NAD/NADP se pueden utilizar en procesos de síntesis conocidos. Para ello, partiendo de un aminoalcohol cíclico, el grupo amino se convierte en el derivado de piridinio mediante la reacción de Zincke. A continuación el grupo OH primario se fosforila y se acopla con un derivado activado de AMP para dar el derivado de NAD. Como alternativa se puede fosforilar primero el grupo OH primario y luego transformar el grupo amino en una piridina mediante la reacción de Zincke.

20 Otra vía de síntesis es la activación del alcohol primario a tosilato o yoduro, seguida de alquilación de ADP.

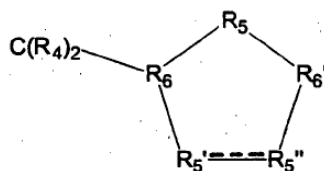
Las formas de ejecución preferidas del elemento de ensayo de la presente invención comprenden p.ej. compuestos de la siguiente fórmula general (I'):



(I')

con

- 30 A = adenina o un análogo de ella,
 T = O, S respectivamente independientes,
 U = OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- respectivamente independientes,
 V = OH o un grupo fosfato respectivamente independientes,
 W = COOR , CON(R)_2 , COR , CSN(R)_2 , donde R = H o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$ respectivamente independientes,
 X1, X2 = O, CH_2 , CHCH_3 , $\text{C(CH}_3)_2$, NH, NCH_3 respectivamente independientes,
 Y = NH, S, O, CH_2 ,
 35 Z = un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, saturado o insaturado, especialmente un compuesto de la fórmula general (II)

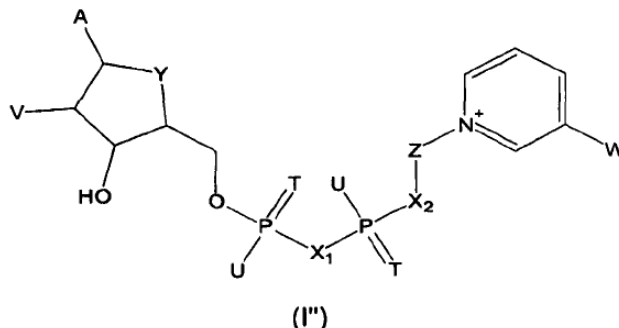


(II)

- 40 donde entre R5' y R5'' puede haber un enlace sencillo o doble,
 R4 = H, F, Cl, CH_3 respectivamente independientes,
 R5 = CR_4 , cuando hay un enlace sencillo entre R5' y R5'' ,
 R5' = O, S, NH, N-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$, CR_4 , CHOH , CHOCH_3 ,
 R5'' = CR_4 , CHOH , CHOCH_3 , cuando entre R5' y R5'' hay un enlace doble R5' = R5'' = CR_4 ,

R6, R6' = CH, CCH₃ respectivamente independientes,
o una sal o, dado el caso, una forma reducida del mismo.

Otro objeto de la presente invención son los compuestos de la siguiente fórmula general (I''):



con

A = adenina o un análogo de ella,

T = O, S respectivamente independientes,

U = OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻ respectivamente independientes,

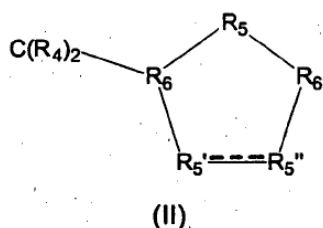
V = OH respectivamente independiente o un grupo fosfato, de modo que en caso de que un radical V sea un grupo OH y el segundo radical V un grupo fostato, el grupo OH y el grupo fostato pueden formar un anillo con los átomos de carbono a los que están unidos;

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂, donde R = H o alquilo C₁-C₂ respectivamente independientes,

X1, X2 = O o NH respectivamente independientes,

Y = NH, S, O, CH₂,

Z = un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, saturado o insaturado, en concreto compuestos de la fórmula general (II)



donde entre R5' y R5'' puede haber un enlace sencillo o doble,

R4 = H, F, Cl, CH₃ respectivamente independientes,

R5 = CR₄₂, cuando hay un enlace sencillo entre R5' y R5'',

R5' = O, S, NH, N-alquilo C₁-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

R5'' = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃, cuando entre R5' y R5'' hay un enlace doble R5' = R5'' = CR₄,

R6, R6' = CH, CCH₃ respectivamente independientes,

con la condición de que cuando R5 = CH₂, T = O, U = OH respectivamente, V = OH, W = CONH₂, X = O e Y = O, entonces R5' y R5'' no sean simultáneamente CHOH, o una sal o, dado el caso, una forma reducida del mismo.

En una forma de ejecución preferida los compuestos de la presente invención llevan análogos de adenina como p.ej. adenina sustituida en C₈ y N₆, variantes deaza como 7-deaza, azavariantes como 8-aza o bien combinaciones como 7-deaza u 8-aza o análogos carbocíclicos como formicina, donde las variantes 7-deaza pueden estar sustituidas en la posición 7 con halógeno o con alquino-, alqueno- o alquilo-C₁₋₆.

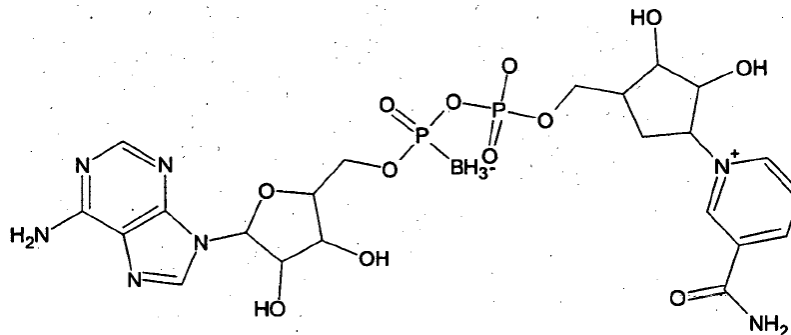
En otra forma de ejecución preferida los compuestos llevan análogos de adenosina que en lugar de ribosa contienen p.ej. 2-metoxidesoxirribosa, 2'-fluorodesoxirribosa, hexitol, altritol o análogos policíclicos como azúcares bicíclicos, azúcares de LNA y azúcares tricíclicos.

En particular los oxígenos de los (di)fosfatos también pueden estar sustituidos isotrópicamente, p.ej. O⁻ por S⁻ o BH₃⁻, O por NH, NCH₃ o CH₂ y =O por =S.

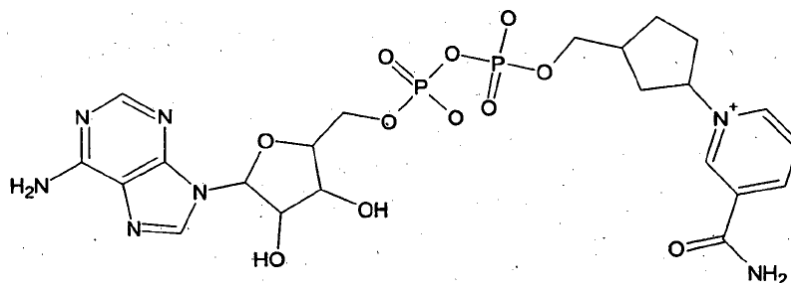
En una forma de ejecución preferida al menos un radical U del compuesto de la presente invención es distinto de OH y con especial preferencia al menos un radical U = BH₃⁻.

Son formas de ejecución especialmente preferidas los derivados borano-carba-NAD, c-pentil-NAD, pirrolil-NAD, furanil-NAD, carba-NAD-ciclofosfato, carba-NADP, pirrolidinil-NAD, así como los elementos de ensayo que llevan estos derivados:

5

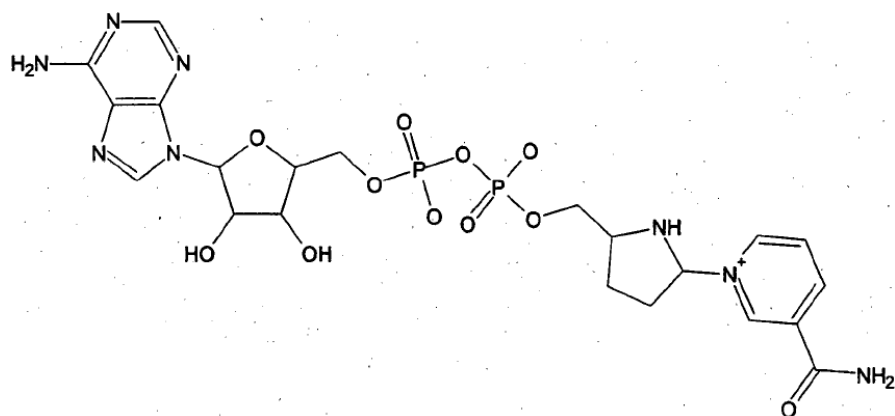


Borano-carba-NAD



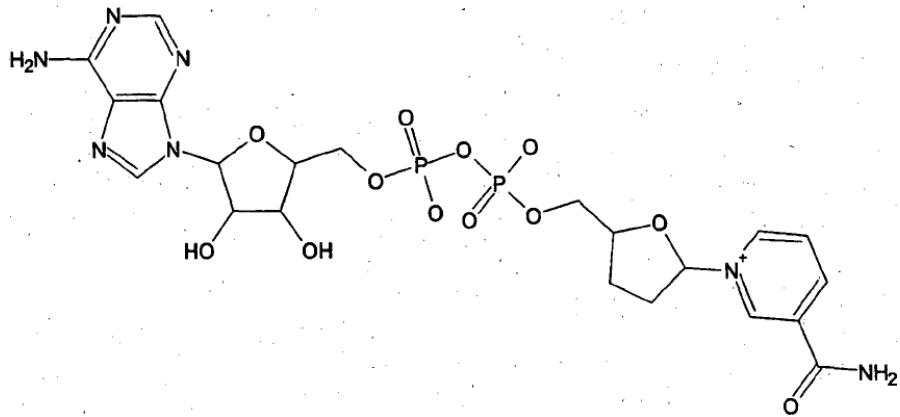
10

Ciclopentil-NAD

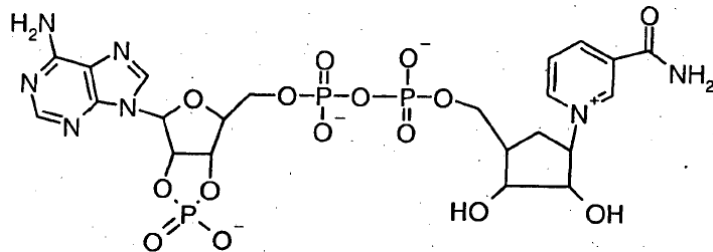


15

Pirrolil-NAD

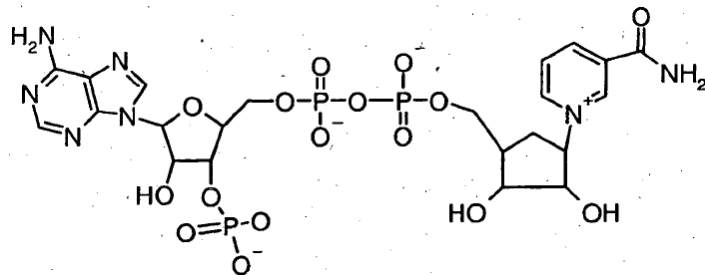


Furanil-NAD



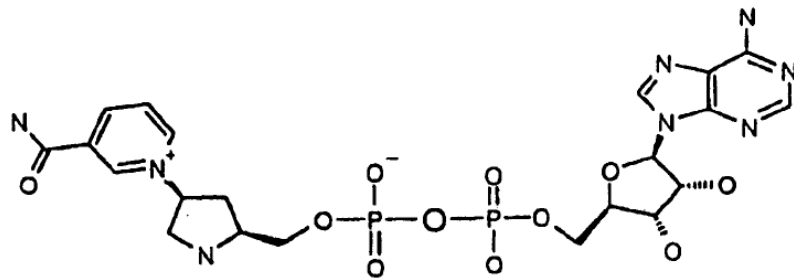
5

Carba-NAD-ciclofosfato



10

Carba-NADP



15

Pirrolidinil-NAD

La detección bioquímica de analitos, por ejemplo de parámetros en líquidos corporales como sangre, suero, plasma u orina, o en muestras de aguas residuales o de alimentos, tiene mucha importancia diagnóstica. Para ello el analito buscado se pone en contacto con un enzima y un coenzima adecuados.

20

Por tanto otro objeto de la presente invención es un complejo enzima-coenzima formado por un compuesto de la presente invención en combinación con un enzima adecuado.

25

Como analito se puede determinar cualquier sustancia biológica o química detectable mediante una reacción redox, p.ej. substratos de un enzima dependiente de un coenzima o incluso enzimas dependientes de un coenzima. Como

ejemplos preferidos de analitos cabe mencionar glucosa, ácido láctico, ácido málico, glicerina, alcohol, colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutatión, péptidos, urea, amonio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidasa, creatina-cinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH), dióxido de carbono, etc.

5 Son enzimas apropiados p.ej. las deshidrogenasas seleccionadas entre glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47), lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27; 1.1.1.28), malato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), glicerina-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), alfa-hidroxiacetato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa o aminoácido--deshidrogenasa, p.ej. L-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.1.5). Otros enzimas adecuados son las oxidasas, por ejemplo la glucosa-oxidasa (E.C.1.1.3.4) o la colesterol-oxidasa (E.C.1.1.3.6) o las aminotransferasas, como p.ej. aspartato o alanina-aminotransferasa, 5'-nucleotidasa o creatina-cinasa.

Otro objeto de la presente invención es el uso de un compuesto de la presente invención o de un complejo enzima-coenzima de la presente invención para detectar un analito en una muestra mediante una reacción enzimática. En este caso se prefiere especialmente la detección de glucosa con la ayuda de glucosa-deshidrogenasa (GlucDH).

15 La modificación del coenzima, es decir del compuesto de la presente invención, por reacción con el analito (cuando el analito es un sustrato enzimático) o por una reacción catalizada por el analito (cuando el analito es un enzima) se puede detectar en principio de cualquier modo. Para ello pueden usarse en principio todos los métodos de detección de reacciones enzimáticas conocidos del estado técnico. No obstante, la modificación del coenzima se detecta preferentemente por método ópticos. Los métodos ópticos de detección incluyen por ejemplo las mediciones de absorción, fluorescencia, dicroísmo circular (CD), dispersión óptica rotatoria (ORD), refractometría, etc. Se prefiere especialmente detectar la modificación del coenzima midiendo la fluorescencia. La medición de la fluorescencia es muy sensible y permite detectar incluso pequeñas concentraciones del analito en sistemas miniaturizados.

25 Para detectar un analito se puede usar un ensayo de líquido, p.ej. con el reactivo en forma de solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso o en forma de polvo o producto liofilizado. También se puede usar un ensayo en seco, con el reactivo incorporado sobre un soporte de un elemento de ensayo. El soporte puede ser por ejemplo una tira de ensayo provista de un material absorbente y/o hinchable que es humectado por la muestra líquida analizada.

30 Como reactivo detector también se puede usar una matriz de gel con un complejo enzima-coenzima incluido en ella (véase patente DE 102 218 45 A1).

En este caso el enzima se puede integrar en la matriz por polimerización junto con el compuesto de la presente invención o bien, después de la polimerización, la matriz se puede poner en contacto con una solución del coenzima en presencia del enzima, a fin de que se forme el correspondiente complejo enzima-coenzima.

35 Otro objeto de la presente invención consiste en un kit de reactivos y su empleo para detectar analitos. El kit de reactivos puede contener un compuesto de la presente invención, un enzima adecuado y un tampón de reacción apropiado. El kit de reactivos de la presente invención tiene múltiples aplicaciones y se puede usar para detectar analitos como p.ej. glucosa, ácido láctico, ácido málico, glicerina, alcohol, colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutatión, péptidos, urea, amonio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidasa, CK, LDH, dióxido de carbono, etc. Se prefiere un kit de reactivos que contiene un compuesto según la presente invención y glucosa-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.47) para la detección de glucosa en sangre.

45 El kit de reactivos de la presente invención se puede utilizar para detectar un analito en un ensayo por vía seca o húmeda.

Esta solicitud de patente revela asimismo una tira de ensayo para la detección fluorométrica o fotométrica de un analito. Dicha tira de ensayo contiene un compuesto en calidad de coenzima, tal como se ha indicado anteriormente, y un enzima o sustrato enzimático adecuado, inmovilizado sobre un material absorbente y/o hinchable. Entre los materiales adecuados pueden escogerse p.ej. los de celulosas, plásticos, etc.

Otro objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para detectar un analito, que comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto una muestra con el elemento de ensayo o el kit de reactivos de la presente invención que lleva un coenzima y
- (b) detectar el analito, p.ej. mediante la variación del coenzima.

60 Otra ventaja de la presente invención es que la fluorescencia emitida por los coenzimas presenta un desplazamiento batocrómico y por tanto hay poca interferencia con la emisión de fluorescencia de otros materiales del elemento de ensayo o/y de la muestra.

Todas las formas de ejecución preferidas descritas de un objeto de la presente invención deben ser válidas para los demás objetos de la presente invención, como p.ej. las formas de ejecución preferidas de los compuestos según la presente invención.

La presente invención se explica más detalladamente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1

Descripción del proceso de síntesis de carbaNAD (cNAD).

Figura 2

Representación de los resultados de la carga de NAD a pH 8,0 y 37°C.

Figura 3

Representación de los resultados de la carga de carbaNAD a pH 8,0 y 37°C.

Figura 4

Descripción del proceso de síntesis de borano-NAD por alquilación de ADP, con $Y = BH_3$ solo alquilación en el beta-fosfato del ADP.

Figura 5

Descripción del proceso de síntesis de pirrolidinil-NAD (pNAD). Junto a las fórmulas estructurales se indican los números de los compuestos y los rendimientos de cada etapa de reacción.

Figura 6A/6B

Espectros de absorción de NAD y pNAD (figura 6A) y de NADH y pNADH (figura 6B).

Figura 7

Espectros de fluorescencia de NADH y pNADH como complejo GlucDH (espectros de emisión).

Figura 8

Espectros de fluorescencia de NADH y pNADH como complejo GlucDH (espectros de excitación).

Figura 9

Estabilidad comparada de NAD y pNAD.

Figura 10A/10B/10C

Espectros de absorción de NAD y cNAD (figura 10A) y de NADH y cNADH (figuras 10B y 10C).

Figura 11

Espectros de fluorescencia de NADH y cNADH como complejo GlucDH.

Ejemplos

Preparación experimental de derivados estables de NAD/NADH

Como ejemplos de preparación de derivados estables de NAD/NADH se describe la obtención de carbaNAD (compuesto 9, figura 1) y de pirrolidin-NAD (compuesto 18, figura 5). Se pueden preparar otros derivados con los procesos de síntesis correspondientes. Los respectivos aminoalcoholes como reactivos de partida son conocidos de la literatura:

2-Amino-1,4-anhidro-2,3-didesoxi-L-treo-pentitol: Hury, 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) Preparación de carbaNAD

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

En un matraz redondo de 1 l se añade una solución de 16,4 g (147 mmoles) de 1R-(-)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona en 400 ml de acetona a una solución de 22,5 g (167 mmoles) de N-metilmorfolin-N-óxido en 80 ml de agua desionizada. Enfriando con hielo se agregan durante 15 minutos 15 ml (1,2 mmoles) de una solución de tetraóxido de osmio al 2,5% en *tert*-butanol. A continuación la mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche.

Los disolventes se separan por destilación en un rotavapor. Se agita con 100 ml y se destila nuevamente en el rotavapor. A continuación se disuelve en 600 ml de agua desionizada y se mezcla con 35 g de carbón activo. La

mezcla se agita fuertemente durante 1 h y luego se filtra a través de un filtro de profundidad Seitz K 250. El agua del filtrado se separa por destilación en el rotavapor. El producto se usa sin posterior purificación.

CCF (gel de sílice Merck 60 F-254): acetato de etilo/metanol/ácido acético glacial 7:2:1 R_f 0,75 (material de partida), 0,53 (1). Tinción con TDM/revelado en cámara de cloro.

* Reactivo TDM: solución 1: 10 g de N,N,N',N'-tetrametil-4,4'-diaminodifenilmetano en 40 ml de ácido acético glacial y 200 ml de agua desionizada. Solución 2: 20 g de cloruro potásico en 40 ml de agua desionizada. Solución 3: 0,3 g de ninhidrina en 10 ml de ácido acético glacial y adición de 90 ml de agua desionizada. Reactivo terminado: mezcla de las soluciones 1 y 2 y adición de 6 ml de la solución 3.

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

El producto crudo 1, en 200 ml de alcohol absoluto, se calienta durante 1 h a reflujo hasta ebullición. Después de añadir 400 ml (3,26 moles) de dimetoxipropano y 250 mg de (2,2 mmoles) de hidrocloreto de piridina la mezcla se calienta durante 15 más a reflujo hasta ebullición. Tras añadir 10 ml de disolución saturada de bicarbonato sódico la solución se concentra a vacío en el rotavapor hasta sequedad. El residuo se mezcla con 500 ml de cloroformo, 150 ml de disolución saturada de cloruro sódico y 75 ml de disolución saturada de bicarbonato sódico y se transfiere a un embudo de decantación. Después de agitar se deja en reposo por la noche para que se separen las fases.

Se separa la fase orgánica y la fase acuosa se extrae dos veces respectivamente con 200 ml de cloroformo. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato magnésico. Después de separar el secante por filtración se separa el disolvente por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto crudo (24,9 g = 92%) se usa sin posterior purificación.

CCF (gel de sílice Merck 60 F-254): acetato de etilo/metanol/ácido acético glacial 7:2:1 R_f 0,84. Tinción con TDM/revelado en cámara de cloro.

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

A una solución de 24,9 g (135,7 mmoles) del producto crudo 2 en 450 ml de cloroformo absoluto se le añaden en atmósfera de argón 41,5 g (190 mmoles) de di-terc-butildicarbonato y 0,83 g (6,8 mmoles) de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla se calienta y se mantiene hirviendo a reflujo hasta que cesa el desprendimiento de gas. La mezcla se filtra a través de una columna rellena con 40 g de gel de sílice 60 y equilibrada con cloroformo. Se lava con 100 ml de cloroformo. El disolvente se elimina del filtrado por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto crudo se seca durante 60 minutos a 10 mbar y 40°C. Se usa sin posterior purificación.

CCF (gel de sílice Merck 60 F-254): acetato de etilo/hexano 3:2 R_f 0,85. Tinción con TDM/revelado en cámara de cloro.

IV. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(N-terc-butiloxycarbonil)amino-2,3-dimetilmetilendioxi-1-(hidroximetil)ciclopentano (4)

El producto crudo 3 se disuelve agitándolo a temperatura ambiente en 400 ml de tetrahidrofurano y luego se añaden 80 ml de agua desionizada. Después de enfriar 4°C se agregan de golpe 5,3 g de borohidruro sódico y se agita por la noche, dejando que la mezcla llegue lentamente hasta la temperatura ambiente. Se añaden 100 ml de etanol y se agita 6 h a temperatura ambiente. El disolvente se elimina por destilación a presión reducida en el rotavapor. Se agregan 300 ml de disolución saturada de cloruro sódico y 650 ml de acetato de etilo y se transfiere a un embudo de decantación. Se separa la fase orgánica y la fase acuosa se lava con 350 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato magnésico. Después de separar el secante por filtración se separa el disolvente por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto crudo (42,2 g) se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (columna h = 93 cm, d = 10 cm). Eluyente TF/hexano 1:3 y después TF/hexano 2:3, caudal 3 l/h. Se recogen 40 ml de fracciones. Las fracciones se controlan por CCF (gel de sílice Merck 60 F-254): acetato de etilo/hexano 3:2 R_f = 0,45. Tinción con TDM/ revelado en cámara de cloro. El disolvente de las fracciones recogidas del producto se elimina por destilación a vacío en el rotavapor. Rendimiento 24,9 g.

V. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-Amino-2,3-dihidroxi-1-(hidroximetil)ciclopentano (5)

Se añaden 8 ml de agua desionizada y luego 80 ml de ácido trifluoroacético a 11,09 g (38,6 mmoles) del producto 4. Se agita fuertemente durante 6 h a temperatura ambiente y se forma una solución transparente débilmente amarilla. Se agregan 200 ml de agua desionizada y se evapora a vacío en el rotavapor. Se añaden otra vez 200 ml de agua desionizada y se evapora nuevamente a vacío en el rotavapor. El producto crudo se disuelve en 100 ml de agua desionizada en un baño de ultrasonidos y se filtra. El filtrado se introduce en una columna de intercambio iónico (15 x 4,9 cm) con resina Dowex 1X8 (100-200 mallas, forma OH) y se eluye con agua, recogiendo el producto en un volumen de 300 ml (pH 10,4) tras la elución de unos 150 ml. Las fracciones se controlan por CCF (gel de sílice Merck 60 F-254): butanol/ácido acético glacial/agua 5:2:3 R_f = 0,42, tinción con TDM/ revelado en cámara de cloro).

El disolvente de las fracciones del producto reunidas se elimina por destilación a vacío en el rotavapor. Rendimiento 5,2 g de un aceite incoloro.

VI. Sal de Zincke de la nicotinamida (6)

Se funden 58,6 g de dinitroclorobenceno en atmósfera de nitrógeno y luego se añaden al producto fundido 29,32 g de nicotinamida. Se calienta a 110°C durante 2,5 h. A través de un refrigerante de reflujo se agregan 500 ml de una mezcla de etanol/agua 3:2 (v/v) y se calienta a ebullición, con reflujo, hasta que se forma una solución. Después de agitar por la noche a temperatura ambiente se añaden 150 ml de etanol/agua al 50% y 100 ml de agua, se pasa a un embudo de decantación y se lava tres veces respectivamente con 500 ml de cloroformo. Se mezclan 300 ml de fase acuosa separada con 50 g de carbón activo, se agita a temperatura ambiente durante 1 h y luego se filtra a través de un filtro de profundidad Seitz K 700. El filtrado se concentra a vacío en el rotavapor hasta unos 100 ml de manera que la temperatura del baño no suba de 20°C. Se diluye con 300 ml de agua y agitando a temperatura ambiente se agregan 70 g de tetrafluoroborato sódico. El precipitado se recristaliza a partir de una mezcla de metanol/agua. El producto cristalizado se filtra con un poco de acetona, después se lava con dietiléter y se seca con vacío elevado a 40°C durante 24 h. Rendimiento 21,1 g (23%). Las fracciones se controlan por CCF (gel de sílice Merck 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/agua 5:2:3 R_f = 0,56).

VII. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(3-Carboxamidopiridin-1-il)-2,3-dihidroxi-1-(hidroximetil)ciclopentano (6) = Carbanicotinamido mononucleósido = carbaNMN

Agitando a la temperatura ambiente, a una solución de 15,3 g (40,7 mmoles) de la sal de Zincke 6 en 110 ml de metanol absoluto se le añade gota a gota, a lo largo de 90 minutos, una solución de 4,5 g (31 mmoles) de la ciclopentilamina 5 en 110 ml de metanol absoluto. Se agrega 1 ml de diisopropiltilamina y luego se agita dos días a temperatura ambiente. Se añaden 500 ml de agua, se transfiere a un embudo de decantación y se lava dos veces respectivamente con 200 ml de cloruro de metileno. El agua de la fase acuosa separada se elimina por destilación a vacío en el rotavapor. El residuo se recoge en 100 ml de agua y se purifica en una columna cromatográfica Sefadex C25 (forma Na⁺): columna de 70 x 7,5 cm; elución: de tampón A (agua desionizada) a tampón B (NaCl 0,35 M en agua), caudal 200 ml/h. Se recogen fracciones de 15 ml y se controlan por CCF (gel de sílice Merck 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/agua 5:2:3 R_f = 0,22).

El disolvente de las fracciones del producto reunidas se elimina por destilación a vacío en el rotavapor. El residuo salino se extrae con 500 ml de etanol caliente. Se filtra en caliente y se deja 12 h en reposo a temperatura ambiente. El precipitado se separa por filtración y el disolvente del filtrado se elimina por destilación a vacío en el rotavapor. Rendimiento 7 g.

VIII. (-)-(1R,2R,3S,4R)-4-(3-Carboxamidopiridin-1-il)-2,3-dihidroxi-1-fosfatoílmtil)ciclopentano (6) = carbaNMN-monofosfato

A una suspensión de 7 g (27,7 mmoles) de carbaNMN en 80 ml de fosfato de trimetilo seco se le añade a 0°C una mezcla de 20 ml de oxiclورو de fósforo y 50 ml de fosfato de trimetilo. Se agita durante 2 h a 0°C y luego durante otras 2 h a temperatura ambiente. Enfriando con hielo se agregan 300 ml de agua y la mezcla se concentra a vacío en el rotavapor hasta 10 ml. Se recoge con 100 ml de agua, se filtra y se purifica en una columna cromatográfica Sefadex C25 (forma NEt₃H⁺): columna de 66 x 9 cm; elución: de tampón A (agua desionizada) a tampón B (acetato amónico 0,60 M), caudal 200 ml/h. Se recogen fracciones de 15 ml y se controlan por CCF (placas de gel de sílice Merck 60 F-254: ácido isobutírico/amoniaco/agua 66:1:33, R_f 0,25). El disolvente de las fracciones del producto reunidas se elimina por destilación a vacío en el rotavapor. El residuo se disuelve en 100 ml de agua y se liofiliza. Este procedimiento se repite tres veces. Rendimiento 4,0 g.

IX. carbaNAD (9)

A una mezcla de una solución de 3,31 g (10 mmoles) de carbaNMN-monofosfato en 40 ml de DMF absoluta y 78 ml (39 mmoles) de tetrazol al 3,5% en acetonitrilo absoluto se le añade gota a gota a temperatura ambiente, a lo largo de 1 h, una solución de 1,25 g (30 mmoles) de AMP-morfolidato en 40 ml de DMF absoluta. La mezcla se agita 2 días a la temperatura ambiente.

Enfriando con hielo seco/acetona se ajusta el pH a 6,5 con una solución acuosa de KHCO₃ al 10%. Se diluye con 500 ml de agua y se concentra cuidadosamente a vacío en el rotavapor hasta sequedad. El residuo se disuelve en 150 ml de agua desionizada y se purifica en una columna cromatográfica Sefadex QAE 25 (forma NEt₃H⁺): columna de 65 x 4,5 cm; elución: de tampón A (agua desionizada) a tampón B (carbonato de trietilamonio 1 M), caudal 200 ml/h. Se recogen fracciones de 15 ml y se controlan mediante CCF (placas de gel de sílice Merck 60 F-254: ácido isobutírico/amoniaco/agua 66:1:33, R_f 0,47).

El disolvente de las fracciones del producto reunidas se elimina por destilación a vacío en el rotavapor. El residuo se disuelve en 100 ml de agua y se liofiliza. Este procedimiento se repite tres veces. Rendimiento 1,1 g.

Estudio de estabilidad del carbaNAD

Se carga una solución 10 mM de carbaNAD o NAD a pH 8 en tampón de fosfato potásico 0,1 M. Se determina el contenido a las 0,25, 75 y 175 h por cromatografía HPLC.

Tampón A: KHPO_4 100 mM + bisulfato de tetrabutilamonio, pH 6,9

Tampón B: tampón A + acetonitrilo 1:1

Caudal 1,0 ml/min. Detección 254 nm

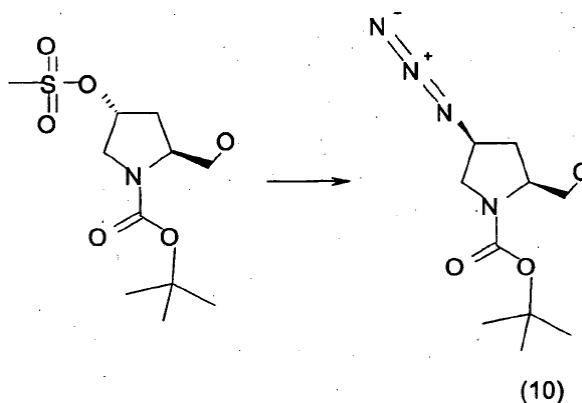
Columna RP18, L 125 diámetro 4,6 mm

Gradiente: en 40 minutos hasta 35% de tampón B, mantener 2 minutos y luego en 3 minutos hasta 0% de tampón A

En las figuras 2 y 3 se representan los porcentajes de área de HPLC tras la carga a distintos tiempos.

Viendo la formación de los productos de descomposición (nicotinamida, ADP-ribosa, AMP, ADP y los productos de descomposición desconocidos de NAD, así como los productos de descomposición desconocidos Y1 y Y2 de cNAD) se demuestra que el cNAD es muy estable en comparación con el NAD.

B) Preparación de pirrolidinil-NAD

I. Síntesis de pNAD. 1ª etapa (compuesto 10)

Se disolvió trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-prolinol (35,4 g, 120 mmoles) en 500 ml de DMF, se añadió azida sódica (15,6 g, 240 mmoles) disuelta en 75 ml de agua y se calentó 5 h a 70°C. A continuación la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, se vertió en 1000 ml de disolución saturada de cloruro sódico y se extrajo con acetato de etilo. El acetato de etilo se secó con Na_2SO_4 y luego se evaporó.

Se obtuvieron 32,8 g (> 100%) de residuo (valor teórico: 29 g).

El producto crudo se reelaboró directamente tras los controles por CCF y MS. El control por cromatografía de capa fina se realizó sobre una placa KG 60 F254 (eluyente: acetato de etilo/rociado con ninhidrina):

trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-prolinol RF 0,49

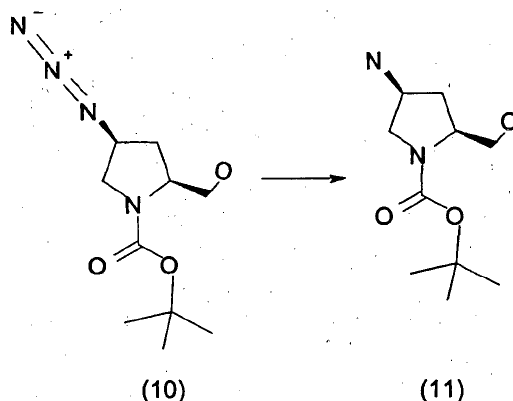
Producto RF 0,78

MS ESI ES+ 242

La identidad del producto se confirmó asimismo por análisis de RMN.

*El trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-prolinol puede adquirirse comercialmente de Sanochemia Pharmazeutika AG, con el nº de catálogo P -719.

II. Síntesis de pNAD. 2ª etapa (compuesto 11)



El compuesto 10 (120 mmoles) se mezcló en 500 ml de metanol con 2,0 g de Pd-carbón (al 10%) y se hidrogenó a 30 mbar durante 12 h. El matraz de reacción se barrió varias veces con H₂, se separó el catalizador por aspiración y se concentró el producto.

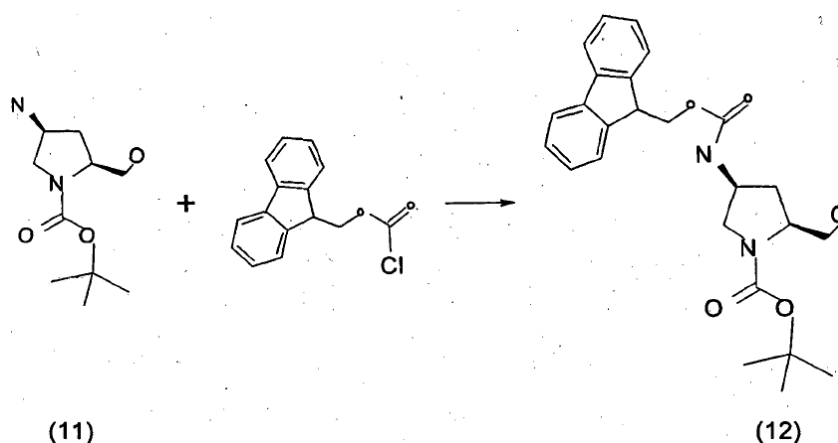
Se obtuvo un aceite incoloro (que debió reelaborarse enseguida por su elevada sensibilidad a la humedad).

MS ESI ES+217 presente

CCF (isohexano/acetato de etilo 1/1 / KG 254 F/ninhidrina): el producto queda al inicio.

La identidad del producto se confirmó asimismo por análisis de RMN.

III. Síntesis de pNAD. 3ª etapa (compuesto 12)



En 500 ml de dioxano se mezclaron 120 mmoles del compuesto 11 (PM: 216,28) con NaHCO₃ (11,0 g, 130 mmoles) y cloruro de Fmoc (33,8 g, 130 mmoles) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Las sales resultantes se separaron por filtración, la solución se concentró y el residuo se purificó a través de una columna de gel de sílice (isohexano e isohexano/EE 8/2 - 1/1).

La fracción principal dio 39,0 g = 74,1% *(valor teórico = 52,6 g).

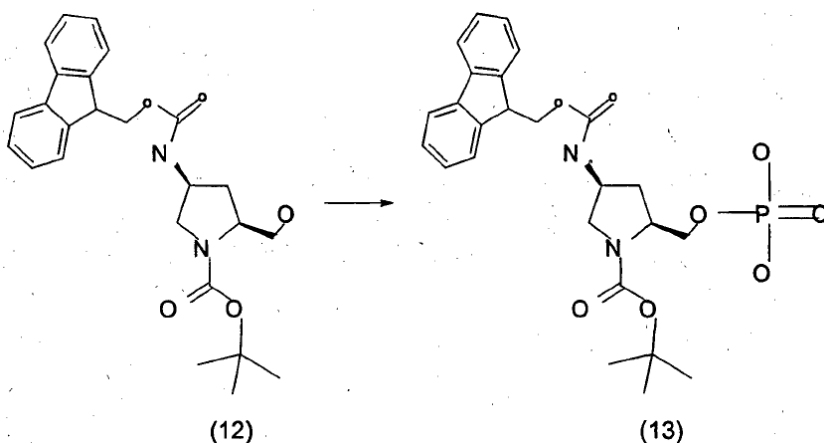
CCF (KG 60 F254, eluyente isohexano/acetato de etilo 2:1): RF 0,13

MS ESI ES + 439 / + 339

La identidad del producto se confirmó asimismo por análisis de RMN.

*El rendimiento se refiere al educto de la 1ª etapa.

IV. Síntesis de pNAD. 4ª etapa (compuesto 13)



El compuesto 12 de la etapa 3 (7,08 g, 16,1 mmoles) se disolvió en 80 ml de trimetilfosfato y a continuación se enfrió a 0°C en un baño de hielo. En un embudo de goteo se introdujo POCl₃ mezclado con trimetilfosfato (13 ml de POCl₃ recién destilado en 13 ml de trimetilfosfato) y bajo atmósfera de argón se agregó en porciones a la solución anterior durante 20 minutos. A continuación se añadieron 2,6 ml de piridina y luego se agitó durante 40 minutos a 0°C bajo atmósfera de argón.

La solución reactiva se añadió cuidadosamente gota a gota a 800 ml de una solución de bicarbonato de trietilamonio 1 M (pH = 8) enfriada con hielo. Terminada la adición se agitó una hora más. A continuación la solución ligeramente turbia se añadió gota a gota (rápidamente) a 1 l de disolución saturada de NaCl. Para mejorar la cristalización se continuó agitando durante la noche. El precipitado se separó por filtración. El residuo se desalinizó a través de una columna de intercambio iónico Diaion. Para ello se mezclaron 500 g de Diaion con isopropanol/agua 1/1 y se dejó expandir por la noche. La columna se rellenó con Diaion y se lavó con agua. El residuo se suspendió en 100 ml de agua a pH 3,5 (ácido acético) y seguidamente se introdujo en la columna, lavando con agua (pH 3,5) hasta dejarlo libre de cloruro sódico. Luego la sustancia se eluyó de la columna con isopropanol al 25% (pH 3,5). La solución se concentró a temperatura ambiente con vacío elevado.

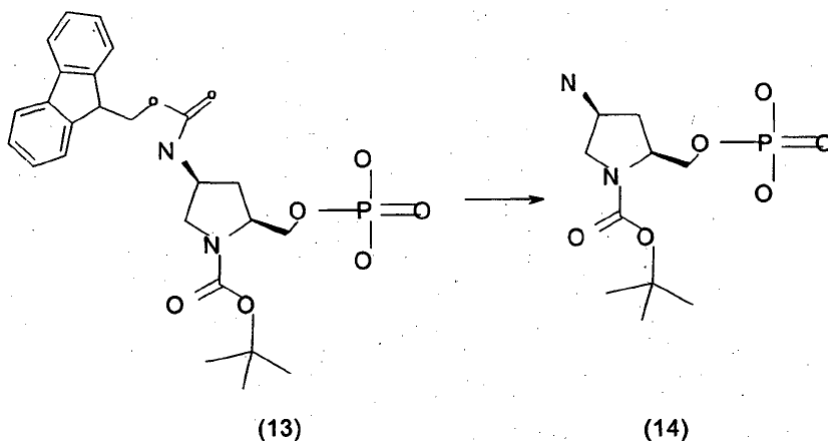
Residuo = 2,6 g = 31,3%

CCF RP8 F254 / MeOH / agua 9/1

MS ESI ES - 517,13

La identidad del producto se confirmó asimismo por análisis de RMN.

V. Síntesis de pNAD. 5ª etapa (compuesto 14)



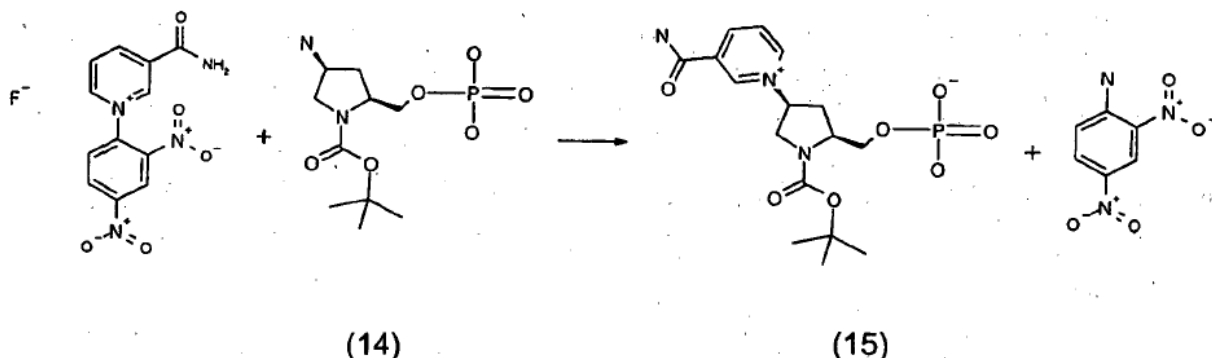
Se agitó a temperatura ambiente durante la noche una mezcla del compuesto 13 de la etapa 4 (4,10 g, 7,9 mmoles) en 250 ml de metanol y 83 ml de amoníaco al 25% y luego se concentró al vacío a temperatura ambiente. El residuo se recogió en 200 ml de agua y se agitó 3 veces con 100 ml de acetato de etilo. Las partes insolubles se separaron por filtración, la fase acuosa se decantó y nuevamente se concentró a temperatura ambiente.

Residuo = 2,56 g = 100%

MS ESI ES - 295

Para eliminar los cationes de NH₃ se disolvió el residuo 2 veces en base de Hünig y se concentró de nuevo a vacío elevado.

VI. Síntesis de pNAD. 6ª etapa (compuesto 15)



Se disolvió sal de Zinke (2,66 g, 8,99 mmoles) en 50 ml de metanol y se añadió gota a gota, agitando, el compuesto 14 de la etapa 5 (2,56 g, 8,31 mmoles) disuelto en 50 ml de metanol. La mezcla tomó color rojo y se fue disolviendo poco a poco. Se continuó agitando por la noche a temperatura ambiente y el precipitado resultante se separó por filtración. El filtrado se concentró al vacío, se recogió en 100 ml de agua y se extrajo 3 veces con acetato de etilo.

La fase de acetato de etilo contenía el producto secundario dinitroanilina, la fase acuosa contenía producto y el resto de sal de Zinke. La fase acuosa se concentró al vacío a temperatura ambiente y el residuo resultante se mezcló con 10 ml de agua, se agitó 10 minutos con un agitador magnético y las partes insolubles se separaron por filtración. El producto permaneció disuelto. Esta solución se introdujo en una columna de Diaion HP20 (1000 ml) barrida con agua y se lavó 2 veces con 1000 ml de agua. A continuación se lavó con agua/5% de isopropanol y las fracciones positivas (detectadas por CCF RP8 MeOH/agua 9/1) se concentraron a temperatura ambiente. El residuo se deslió con isopropanol y se aspiró con ayuda de dietiléter.

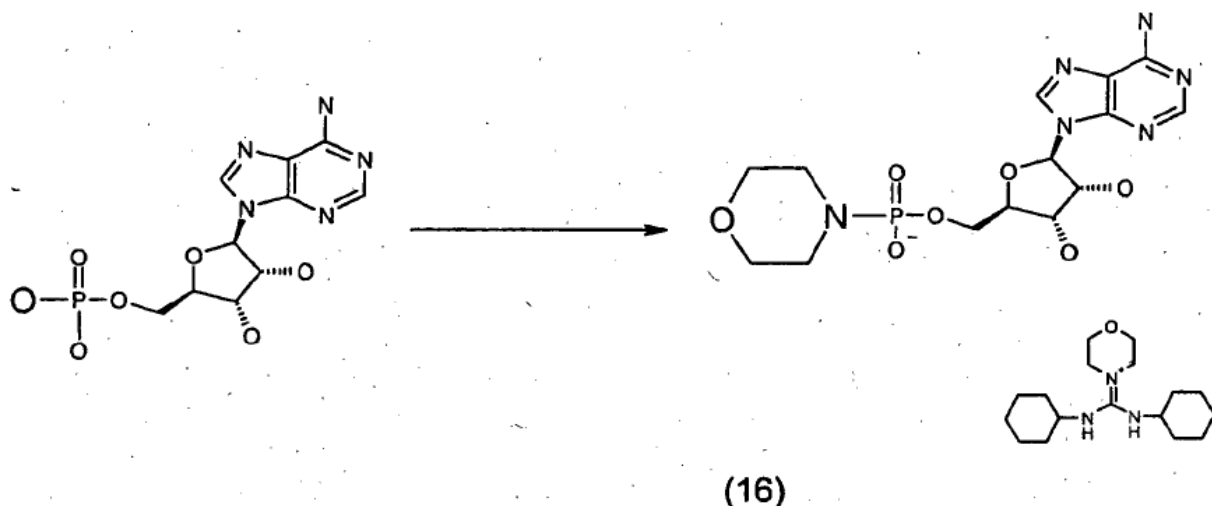
Residuo = 1,60 g = 47,9%

DC RP8 254 MeOH/agua 9/1

MS ES - 400,1 / ES + 402,0 – también presenta masa doble

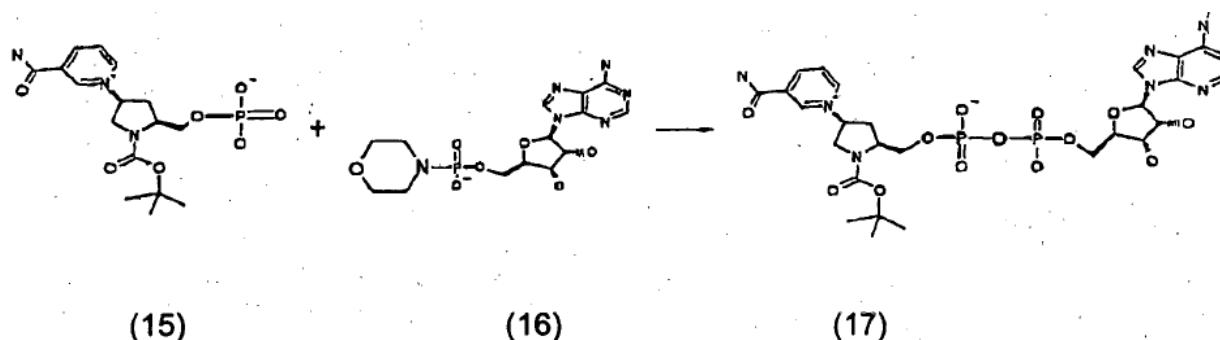
La identidad del producto se confirmó asimismo por análisis de RMN.

VIIa. Síntesis de pNAD. Etapa 7a (compuesto 16)



Una mezcla de AMP-ácido (adenosinmonofosfato-ácido libre) (10 g, 27,5 mmoles) en 60 ml de metanol (secado con sodio) y 5,3 ml (60 mmoles) de morfolina (recién destilada) se agitó hasta que se formó una solución transparente. A continuación se añadieron 17 g (82,5 mmoles) de N,N'-diciohexilcarbodiimida (DCC) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente, excluyendo la humedad. El precipitado resultante (DCH) se aspiró y el filtrado se concentró a 30°C en un rotavapor. A continuación se agitó con 150 ml de H₂O/150 ml de dietiléter y se filtró otra vez. Después de separar las fases, la fase acuosa se extrajo dos veces respectivamente con 75 ml de dietiléter. Seguidamente la fase acuosa se concentró a temperatura ambiente en el rotavapor. El residuo se disolvió dos veces en piridina y cada vez se concentró a vacío elevado en el rotavapor.

VII. Síntesis de pNAD. 7ª etapa (compuesto 17)



Se agitó durante la noche a temperatura ambiente una mezcla de AMP-morfolidato (compuesto 16 de la etapa 7a) (2,53 g, 3,61 mmoles), compuesto 15 de la etapa 6 (1,60 g, 3,98 mmoles), solución de MnCl_2 en formamida 0,2 M* (27,1 ml, 5,42 mmoles) y MgSO_4 anhidro (0,87 g, 7,95 mmoles) y transcurrido este tiempo había reaccionado en gran parte según la determinación por CCF (RP8 MeOH/agua 9/1). La mezcla reactiva se precipitó con acetonitrilo y se aspiró.

Residuo = 5,3 g (teórico 2,64 g)**

MS, ESI ES - 729,3 = producto, ES -415 = catión de AMP- morfolidato,

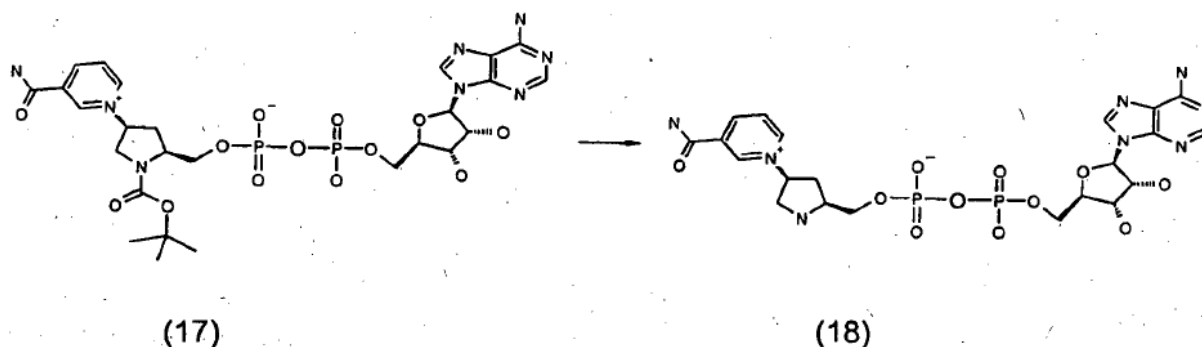
ES -400,2/ES +402,1 restos del compuesto 15 (etapa 6)

CCF RP 8 F254 RF 0,085

*Para preparar esta solución se disolvieron 2516 mg de MnCl_2 anhidro agitando en 100 ml de formamida del 99,99% y a continuación se mezcló con tamiz molecular 4A.

**El residuo se siguió procesando como producto crudo.

VII. Síntesis de pNAD. 8ª etapa (compuesto 18, pirrolidinil-NAD)



Se mezclaron 500 mg del compuesto 17 de la etapa 7 (producto crudo que contenía aproximadamente un 50% de sales) con 5,0 ml de ácido trifluoroacético (TFA), se agitó 1 h a temperatura ambiente y luego se concentró. Como residuo se obtuvieron unos 500 mg de aceite incoloro.

MS ESI ES - 729,24 (necesaria la adición de NH_3)

La purificación se llevó a cabo en 2 porciones de 200 mg y 300 mg en 2 etapas respectivas de separación:

1ª Etapa de separación:

Columna de Fractogel EMD SO3- s: D (interior) = 14 mm, L (empaquetamiento) = 85 mm

I. Acondicionamiento:

(Caudal 5 ml/min)

a) 100 ml de H_2O

b) 200 ml de H_2SO_4 0,25 M

c) 100 ml de H_2O

d) 200 ml de solución de amoníaco 1 M

e) 100 ml de H_2O

II. Separación:

a) se introducen 200 mg de sustancia disuelta en 5 ml de H_2O

b) se eluye con gradiente $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ solución de NH_4HCO_3 0,2 M (*eluyente A* = se introducen 250 ml de H_2O en un matraz Erlenmeyer, se agita con un agitador magnético y se bombea a la columna con un caudal de 5 ml/min. *eluyente B* = solución de NH_4HCO_3 0,2 M bombeada hacia con un caudal de 2,5 ml/min.)

III. Fraccionamiento:

- a) Fracciones de 3 ml respectivamente
- b) 1^{er} pico: impurezas
- c) 2^o pico: tras unos 70 ml de fracción primaria de sustancia

IV. Reacondicionamiento:

- a) 100 ml de solución de amoníaco 1 M
- b) 100 ml de H_2O

2ª Etapa de separación:

Columna Diaion HP20, D (interior) = 30 mm, L (empaquetamiento) = 130 mm, eluida con 100 ml de H_2O y 100 ml de agua/5% de isopropanol. La sustancia ya sale con la fase acuosa, en la parte de isopropanol solo hay impurezas.

Tras la HPLC analítica se obtuvieron 3 fracciones:

- F1 = 13,5 mg
- F2 = 5,5 mg
- F3 = 11,5 mg
- Total = 30,5 mg = 12,2%

La identidad del pirrolidinil-NAD (compuesto 18) se confirmó por análisis de RMN.

Ensayo de glucosa-deshidrogenasa para pNAD

Para estudiar el papel de pNAD como cofactor de la glucosa-deshidrogenasa (GlucDH) se llevó a cabo un ensayo de actividad de glucosaDH en tampón Tris 0,1 M/NaCl 0,2 M (pH 8,5). La concentración de glucosa era de 80 mM. Se emplearon concentraciones de pNAD, o como NAD, de 0,05-0,5 mM. En este caso se añadieron 10 (pNAD) o 0,002 mg/ml (NAD) [83 o 0,017 mM] de GlucDH. El ensayo se efectuó a temperatura ambiente, controlando la reacción enzimática a intervalos de tiempo regulares mediante el registro de espectros de absorción. Los valores indicados en la tabla 1 se refieren a una medición de absorción después de 4 minutos.

Tabla 1

(p)NAD (mM)	U/ml	% de actividad	[GlucDH] empleada
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 μl 10 mg/ml
0,4 pNAD	0,0024	0,00015	10 μl 10 mg/ml

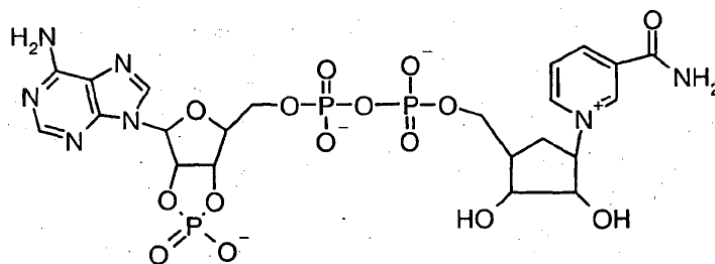
Espectros de absorción de pNAD y pNADH

En las figuras 6A y 6B se representan los espectros de absorción de NAD y pNAD y de NADH y pNADH. El NAD y el pNAD presentan un máximo de absorción a 260 nm. El pNADH, es decir el pNAD tras el ensayo de actividad de GlucDH, presenta respecto al NADH un desplazamiento del máximo de absorción hacia el rojo de aproximadamente 10 nm (figura 6B).

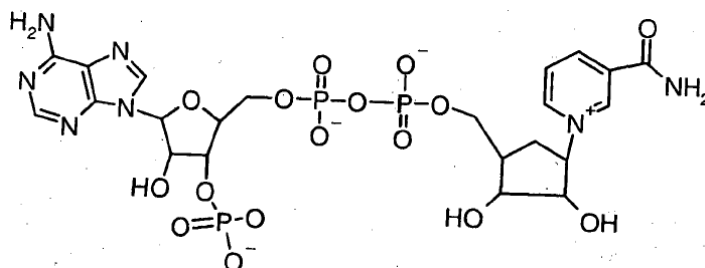
Asimismo, en las figuras 7 y 8 se representan los espectros de fluorescencia de NADH y pNADH como complejos de GlucDH. Los espectros se registraron respectivamente tras el ensayo de actividad de GlucDH. La figura 7 muestra espectros de emisión de complejos NADH/pNADH-GlucDH para longitudes de onda de excitación de 340 o 370 nm. Los espectros de emisión de NADH y pNADH para una longitud de onda de excitación de 370 nm son parecidos. La figura 8 muestra un espectro de excitación de un complejo NADH/pNADH-Gluc-DH para una longitud de onda de emisión de 460 nm. En este caso el pNADH presenta un espectro de excitación más amplio que el NADH. Los espectros se registraron nuevamente tras los ensayos de actividad de GlucDH.

Estudio de estabilidad del pNAD

A fin de examinar la estabilidad del pNAD en comparación con el NAD se prepararon respectivamente cantidades iguales de NAD y pNAD en tampón de KPO_4 0,15 M, NaCl 1 M (pH 7,0) y se incubaron a 50°C. La descomposición de NAD y pNAD se siguió por HPLC. En la figura 9 se representa el área porcentual de las cantidades de (p)NAD en comparación con las cantidades de NAD, respecto al momento inicial. La figura demuestra que el pNAD es muy estable en comparación con el NAD.

C) Preparación de carba-NAD-ciclofosfato (19)

A 0,74 ml de una solución de cloruro de manganeso 0,2 M en formamida absoluta se añadieron 79 mg (0,1 mmoles) de 5'-((hidroximorfolino-fosforil)-O2',O3'-hidroxi-fosforil-adenosina, N-ciclohexil-morfolin-4-carbonimidato de ciclohexilamina dihidrato (secada por coevaporación con piridina (Morphaat y otros, J. Am. Chem. Soc.; 83; 1961; 663-675)), 44 mg (0,105 mmoles) de carba-NMN-monofosfato y a continuación 25 mg de sulfato magnésico seco. La mezcla se agitó 3 días en un recipiente de reacción cerrado bajo atmósfera de argón y luego se introdujo agitando en 10 ml de acetonitrilo. El precipitado se separó por filtración y se purificó por cromatografía RP en una columna RP 18 Hypersil ODS, 250 x 21,2 mm, 5 µm, empleando un gradiente de 0% de B hasta 100% de B a lo largo de 60 min.: eluyente A: acetato de trietilamonio 0,1 M; eluyente B: mezcla 1:4 de acetato de trietilamonio 0,1 M y acetonitrilo; caudal: 10 ml/min. La elución se controló por detección a 260 nm. La fracción principal se recogió y se liofilizó 5 veces para eliminar el acetato de trietilamonio. La sal de trietilamonio se convirtió al ácido libre con Dowex 50 WX2 y a continuación se transformó en la sal de litio. Rendimiento: 10 mg.

D) Preparación de carbaNADP (20)

A una solución de 2,2 mg de carbaNAD-ciclofosfato de litio (19) en 1 ml de tampón bis-Tris-Propano (0,02 M, pH 7,5) se le añadieron en 6 h tres veces cuatro unidades de ribonucleasa T2 a 37°C. La mezcla se mantuvo a 37°C por la noche. El enzima se desnaturizó calentándolo a 65°C durante 20 minutos. Después de filtrar se llevó a cabo una purificación por cromatografía RP en una columna RP 18 Hypersil ODS, 250 x 21,2 mm, 5 µm, empleando un gradiente de 0% de B hasta 100% de B a lo largo de 60 min.: eluyente A: acetato de trietilamonio 0,1 M; eluyente B: mezcla 1:4 de acetato de trietilamonio 0,1 M y acetonitrilo; caudal: 10 ml/min. La elución se controló por detección a 260 nm. La fracción principal se recogió y se liofilizó 5 veces para eliminar el acetato de trietilamonio.

Espectro de masas (MALDI Applied Biosystems Voyager System 6327: calculado 742,45, hallado: 743,17).

E) Ensayo de actividad de glucosa-deshidrogenasa para cNAD

Tal como se ha descrito en B) para pNAD, se llevó a cabo un ensayo de actividad de glucosa-deshidrogenasa para cNAD en comparación con NAD. Para ello se usaron concentraciones de glucosa-deshidrogenasa de 0,1 (cNAD) o 0,002 mg/ml (NAD) [83 o 0,017 mm]. En la tabla 2 se indican las cantidades empleadas y los resultados.

Tabla 2

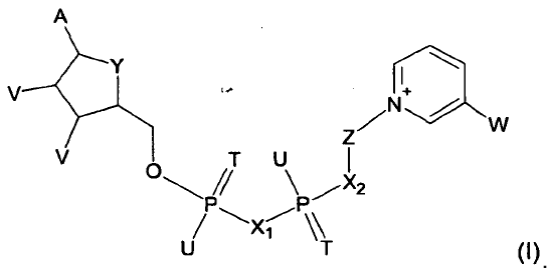
(c)NAD (mM)	U/ml	% de actividad	[GlucDH] empleada
0,05 NAD	430	100	0,002 mg/ml
0,1 NAD	556	100	0,002 mg/ml
0,05 cNAD	2,7	0,63	0,1 mg/ml
0,1 cNAD	5,3	0,95	0,1 mg/ml

F) Espectros de absorción de cNAD y cNADH

- 5 Las figuras 10A, 10B y 10C muestran los espectros de absorción de NAD y cNAD. Tanto el NAD como el cNAD presentan un máximo de absorción a 260 nm. La figura 10B muestra los espectros de absorción de NADH y cNADH, registrados respectivamente tras un ensayo de actividad de glucosa-deshidrogenasa. El máximo de absorción de cNADH presenta un desplazamiento hacia el rojo de 20 nm. En la figura 10C están representados otros espectros de absorción de NADH y cNADH, que corresponden a diferentes condiciones del respectivo ensayo de actividad de glucosa-deshidrogenasa, tal como indica la leyenda.
- 10 La figura 11 muestra además espectros de fluorescencia de NADH y cNADH como complejo GlucDH. Los espectros se registraron para una longitud de onda de excitación de 370 nm después del ensayo de actividad de glucosa-deshidrogenasa. Tanto para el NADH como para el cNADH, el tratamiento con GlucDH muestra un aumento de la señal de fluorescencia.

REIVINDICACIONES

1. Elemento de ensayo para la determinación de glucosa, que comprende (i) una glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) y (ii) como coenzima un compuesto de la siguiente fórmula general (I):



en el cual

A = adenina o un análogo de ella,

T = O, S respectivamente independientes,

U = OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻ respectivamente independientes,

V = OH respectivamente independiente o un grupo fosfato, de modo que en caso de que un radical V sea un grupo OH y el segundo radical V un grupo fosfato, el grupo OH y el grupo fosfato pueden formar un anillo con los átomos de carbono a los que están unidos;

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂, donde R = H o alquilo C₁-C₂ respectivamente independientes,

X₁, X₂ = O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃ respectivamente independientes,

Y = NH, S, O, CH₂,

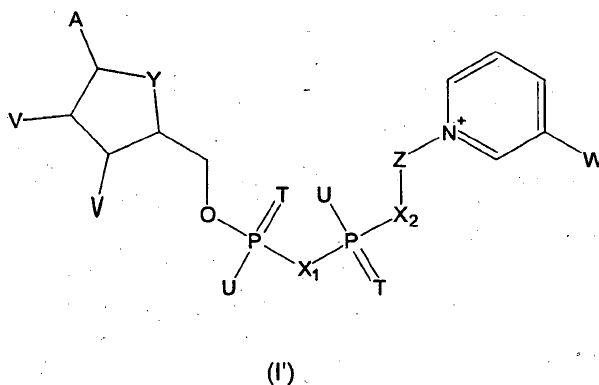
Z = un radical, incluyendo un grupo cíclico de 5 átomos de C que puede llevar un heteroátomo escogido entre O, S y N, así como uno o más sustituyentes, y un radical CR₄ unido al grupo cíclico y a X₂, donde

R₄ = H, F, Cl, CH₃ respectivamente independientes,

con la condición de que Z y el radical piridino no estén unidos por un enlace glicosídico, o una sal o, dado el caso, una forma reducida del mismo.

2. Elemento de ensayo según la reivindicación 1, caracterizado porque los sustituyentes de Z se eligen del grupo formado por F, Cl, así como alquilo C₁-C₂, que puede estar fluorado o clorado o/y sustituido con OH, O-alquilo C₁-C₂.

3. Elemento de ensayo según la reivindicación 1 o 2, que comprende como coenzima un compuesto de la siguiente fórmula general (I'):



con

A = adenina o un análogo de ella,

T = O, S respectivamente independientes,

U = OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻ respectivamente independientes,

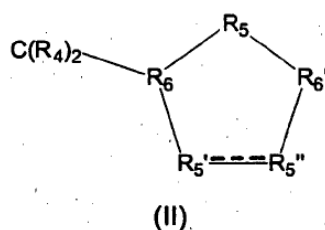
V = OH o un grupo fosfato respectivamente independientes,

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂, donde R = H o alquilo C₁-C₂ respectivamente independientes,

X₁, X₂ = O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃ respectivamente independientes,

Y = NH, S, O, CH₂,

Z = un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, saturado o insaturado, de la fórmula general (II)



donde entre R5' y R5'' puede haber un enlace sencillo o doble,

R4 = H, F, Cl, CH₃ respectivamente independientes,

5 R5 = CR₄₂, cuando hay un enlace sencillo entre R5' y R5'',

R5' = O, S, NH, N-alquilo C₁-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

R5'' = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃, cuando entre R5' y R5'' hay un enlace doble R5' = R5'' = CR₄,

R6, R6' = CH, CCH₃ respectivamente independientes,

o una sal o, dado el caso, una forma reducida del mismo.

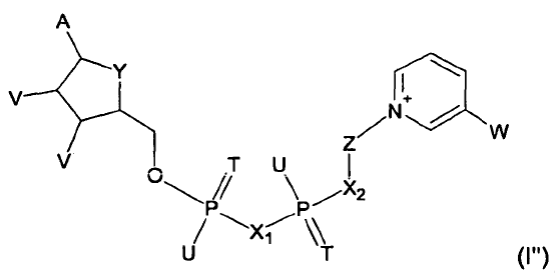
10

4. Elemento de ensayo según una de las reivindicaciones 1 a 3, donde W = CONH₂ o COCH₃.

5. Elemento de ensayo según una de las reivindicaciones 1 a 4 en forma de una tira de ensayo.

15

6. Compuesto de la fórmula general (I''):



con

20

A = adenina o un análogo de ella,

T = O, S respectivamente independientes,

U = OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻ respectivamente independientes,

V = OH respectivamente independiente o un grupo fosfato, de modo que en caso de que un radical V sea un grupo OH y el segundo radical V un grupo fosfato, el grupo OH y el grupo fosfato pueden formar un anillo con los átomos de carbono a los que están unidos;

25

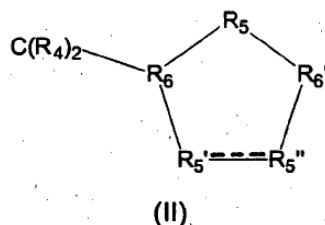
W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂, donde R = H o alquilo C₁-C₂ respectivamente independientes,

X1, X2 = O o NH respectivamente independientes,

Y = NH, S, O, CH₂,

Z = un anillo carbocíclico o heterocíclico de cinco miembros, saturado o insaturado, de la fórmula general (II)

30



donde entre R5' y R5'' puede haber un enlace sencillo o doble,

R4 = H, F, Cl, CH₃ respectivamente independientes,

35

R5 = CR₄₂, cuando hay un enlace sencillo entre R5' y R5'',

R5' = O, S, NH, N-alquilo C₁-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

R5'' = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃, cuando entre R5' y R5'' hay un enlace doble R5' = R5'' = CR₄,

R6, R6' = CH, CCH₃ respectivamente independientes,

con la condición de que cuando R5 = CH₂, T = O, U = OH respectivamente, V = OH, W = CONH₂, X₁, X₂ = O e Y = O, entonces R5' y R5'' no sean simultáneamente CHOH,

40

o una sal o, dado el caso, una forma reducida del mismo.

7. Compuesto según la reivindicación 6, caracterizado porque al menos un radical U es distinto de OH.
8. Compuesto según la reivindicación 6 o 7, caracterizado porque al menos un radical U = BH_3^- .
9. Compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 8, en que W = CONH_2 o COCH_3 .
10. Compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 9, en el cual un radical V es un grupo OH y el segundo radical V un grupo fosfato.
11. Compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 9, en el cual $\text{R5}' = \text{CR}_4_2$ o CHOH .
12. Compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 9, en el cual $\text{R5}' = \text{O}$.
13. Compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 9, en el cual $\text{R5}' = \text{NH}$ o N- alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$.
14. Compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 9, que es carbaNADP o una sal o una forma reducida del mismo.
15. Complejo enzima-coenzima formado por un compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 14 combinado con un enzima adecuado.
16. Complejo según la reivindicación 15, caracterizado porque el enzima es una deshidrogenasa escogida entre una glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47), lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27; 1.1.1.28), malato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), glicerina-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), alfa-hidroxi-butarato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa o aminoácido--deshidrogenasa, tal como L-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.1.5).
17. Uso de un compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 14 o de un complejo según la reivindicación 15 o 16 para detectar un analito en una muestra mediante una reacción enzimática.
18. Kit de reactivos que comprende un compuesto según una de las reivindicaciones 6 a 14 y dado el caso un enzima o un complejo enzima-coenzima idóneos según la reivindicación 15 o 16, así como un tampón de reacción apropiado.
19. Kit de reactivos según la reivindicación 18, caracterizado porque el enzima es una deshidrogenasa escogida entre una glucosa-deshidrogenasa (EC 1.1.1.47), lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27; 1.1.1.28), malato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.37), glicerina-deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1), alfa-hidroxi-butarato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa o aminoácido--deshidrogenasa, tal como L-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.1.5).
20. Empleo del elemento de ensayo según una de las reivindicaciones 1 a 5 o del kit de reactivos según la reivindicación 18 o 19 para determinar analitos escogidos entre glucosa, ácido láctico, ácido málico, glicerina, alcohol, colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutatión, péptidos, urea, amonio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidasa, creatina-cinasa (CK), lactato-deshidrogenasa (LDH) y dióxido de carbono.
21. Método para detectar un analito que comprende las etapas de
 - (a) poner en contacto la muestra con un elemento de ensayo según una de las reivindicaciones 1 a 5 o con un kit de reactivos según la reivindicación 18 o 19, que lleva un coenzima y
 - (b) detectar el analito.
22. Método según la reivindicación 21, caracterizado porque la detección del analito tiene lugar por fotometría o por fluorimetría.

Figura 1

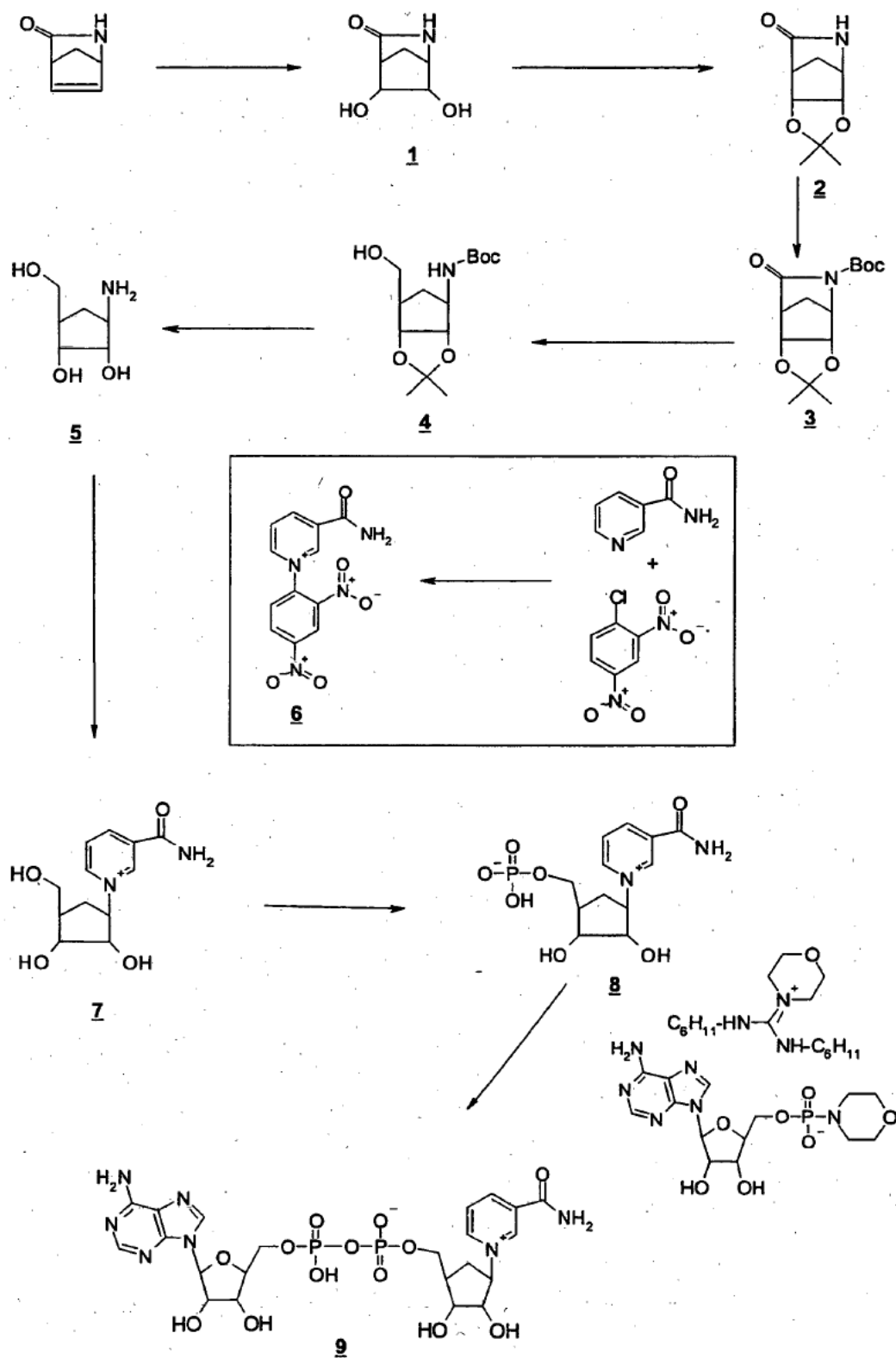


Figura 2

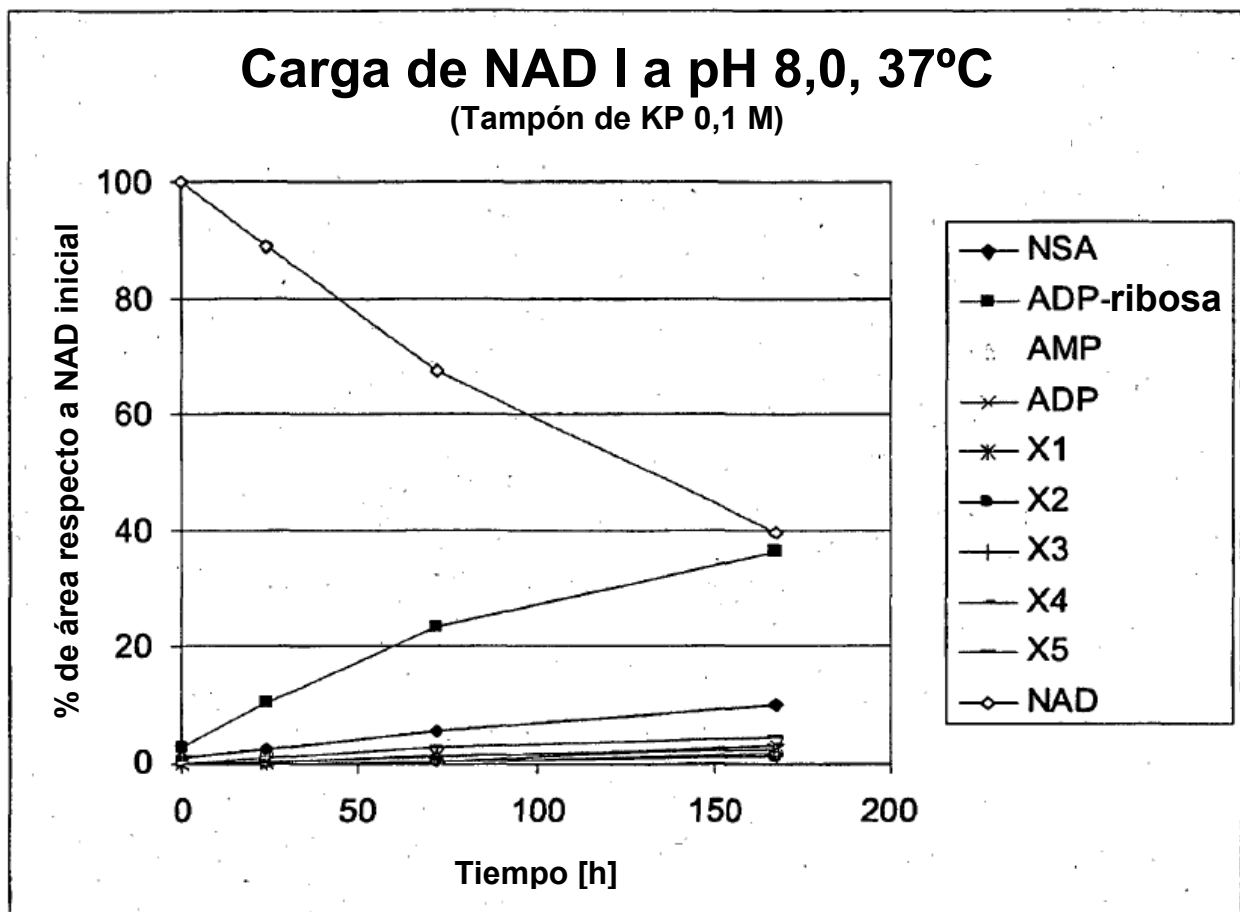


Figura 3

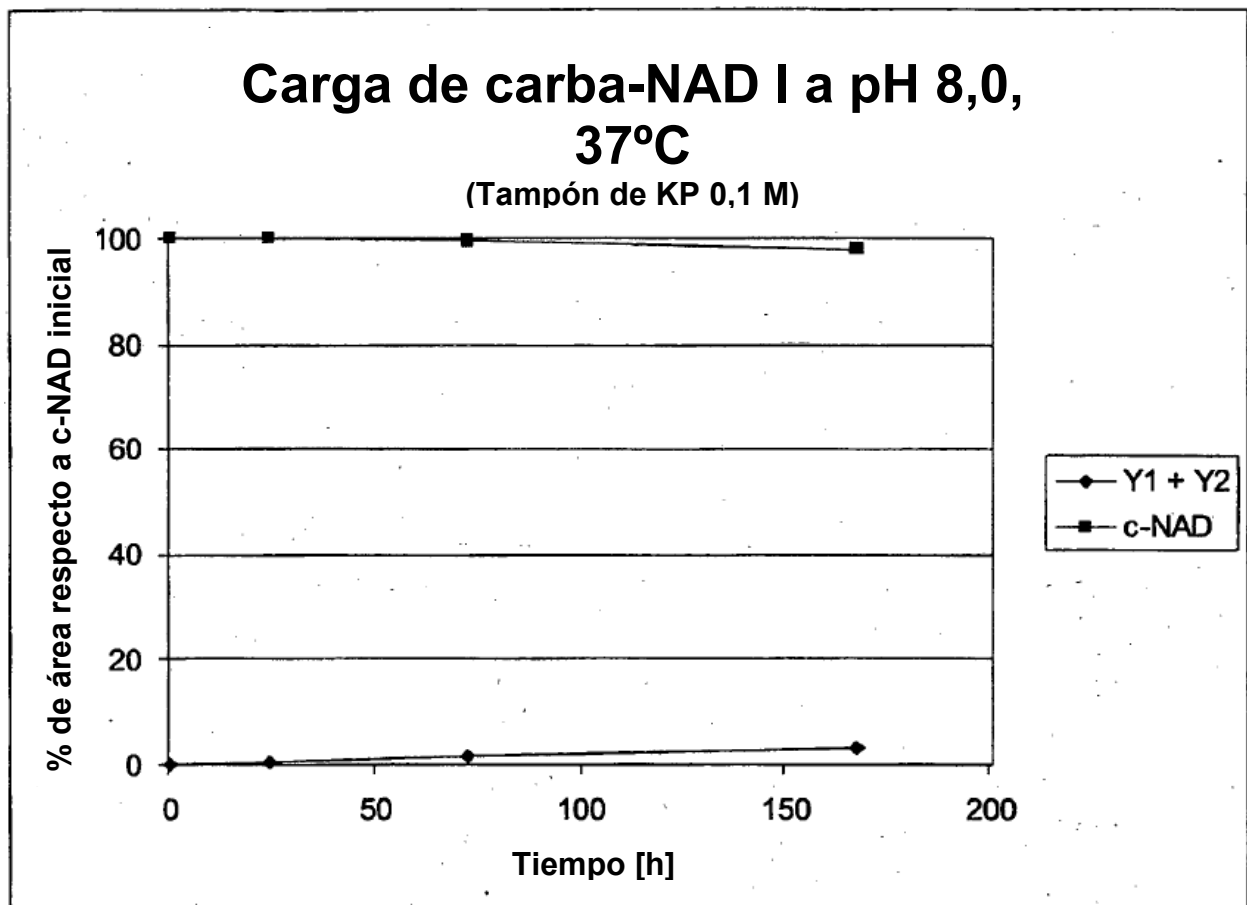


Figura 4

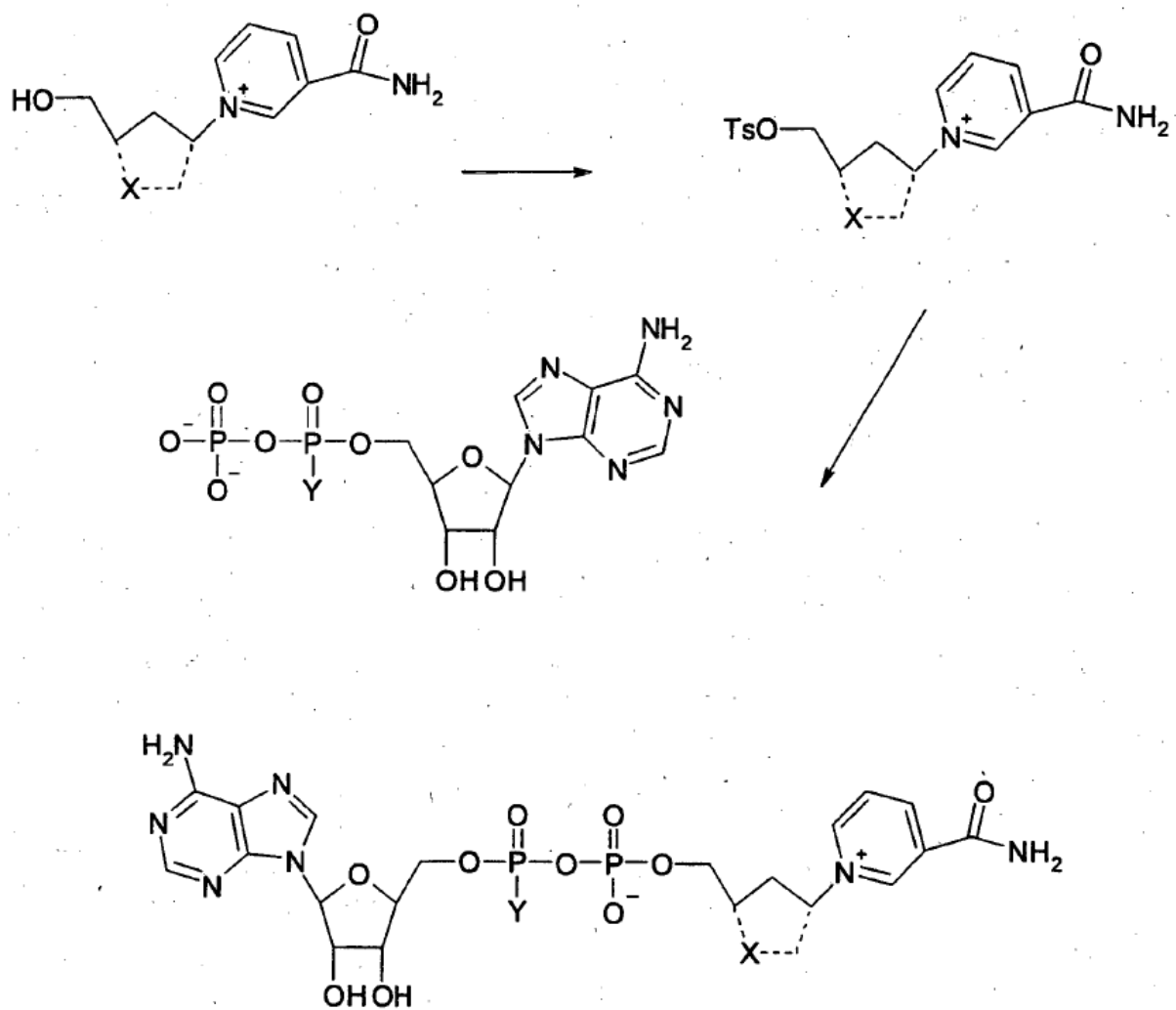


Figura 5

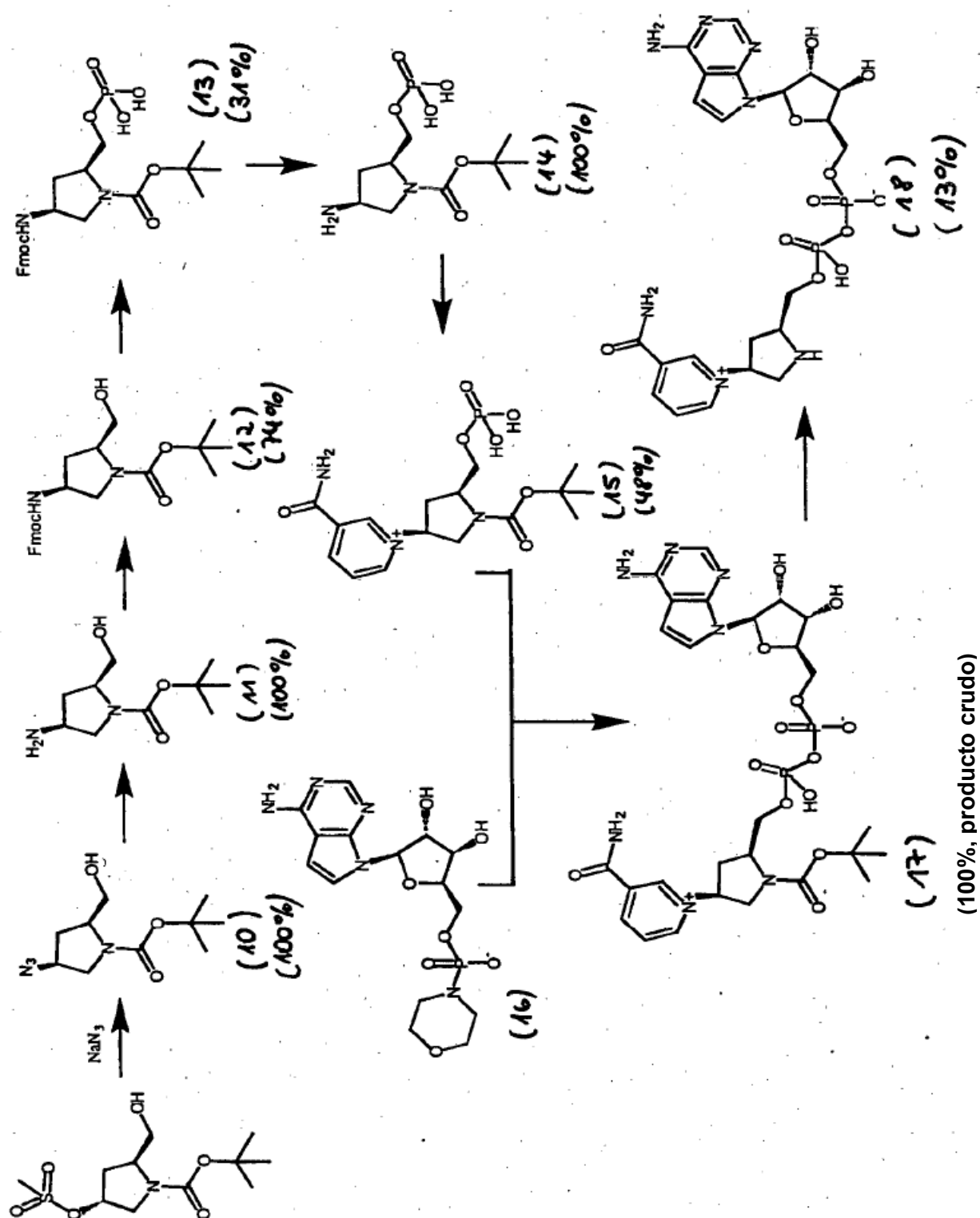


Figura 6A

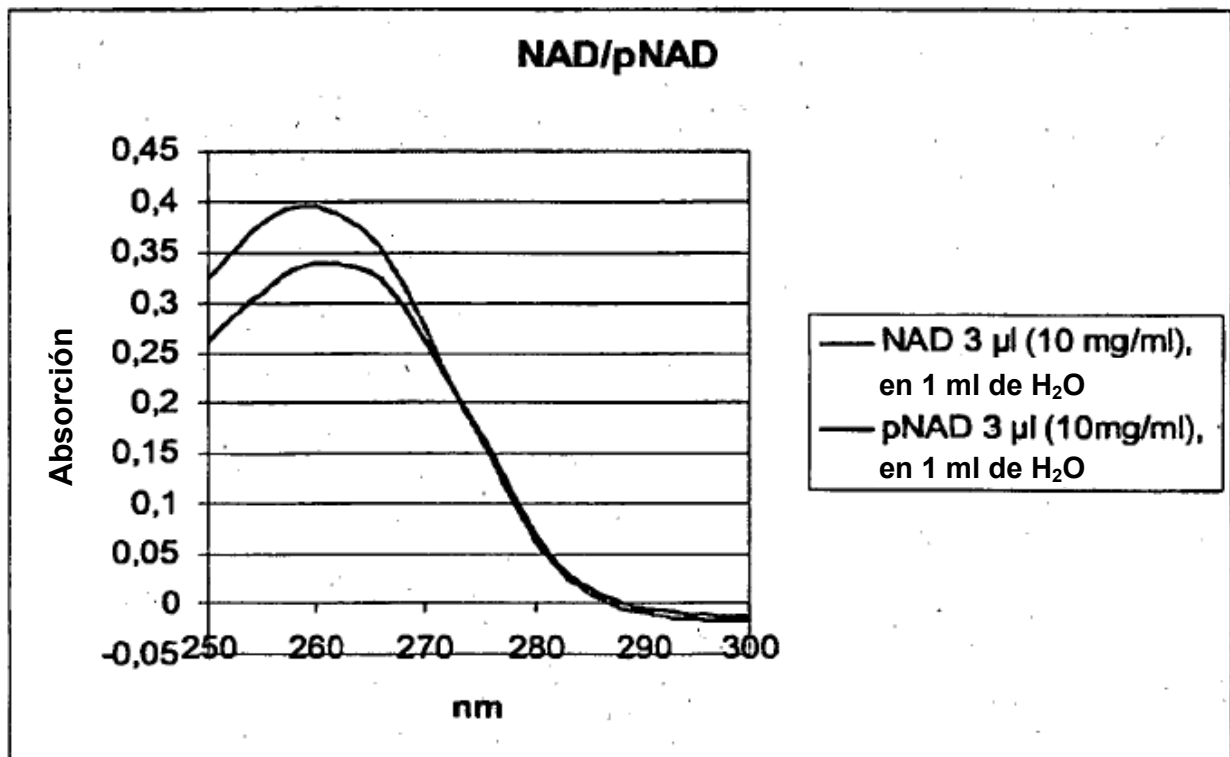


Figura 6B

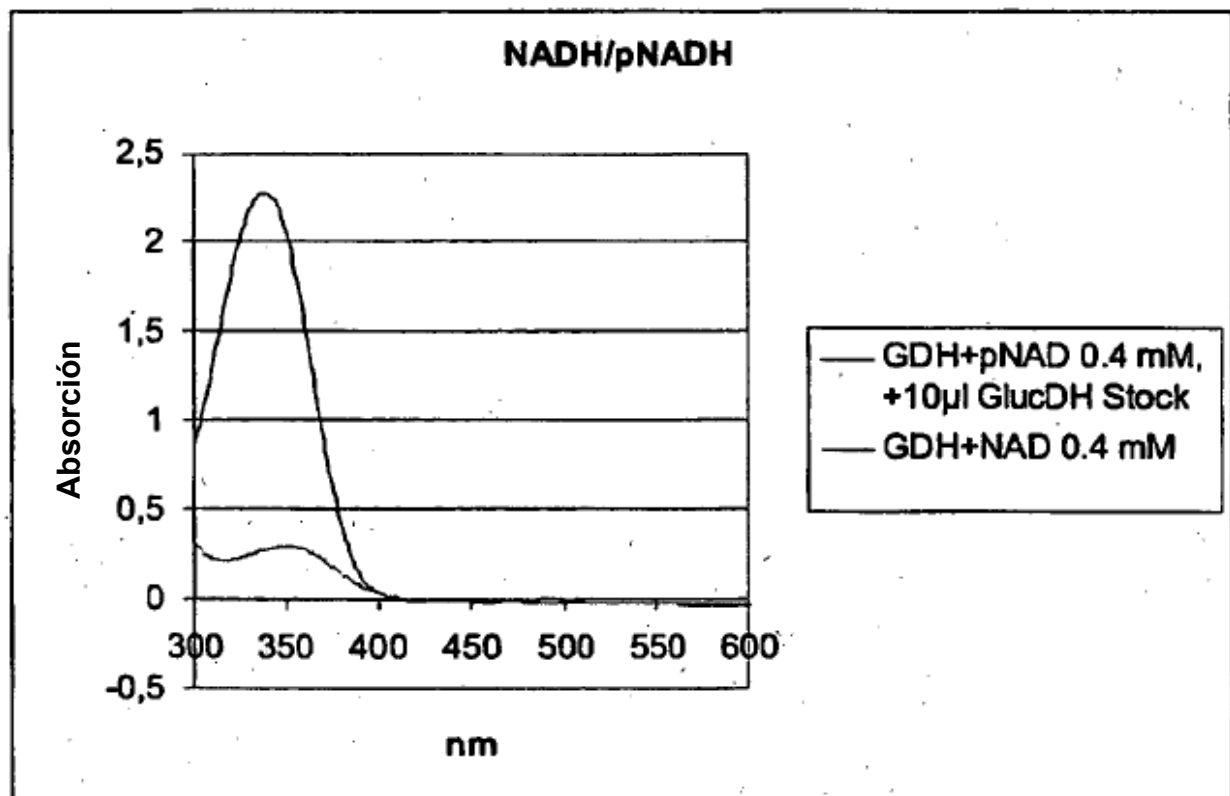


Figura 7

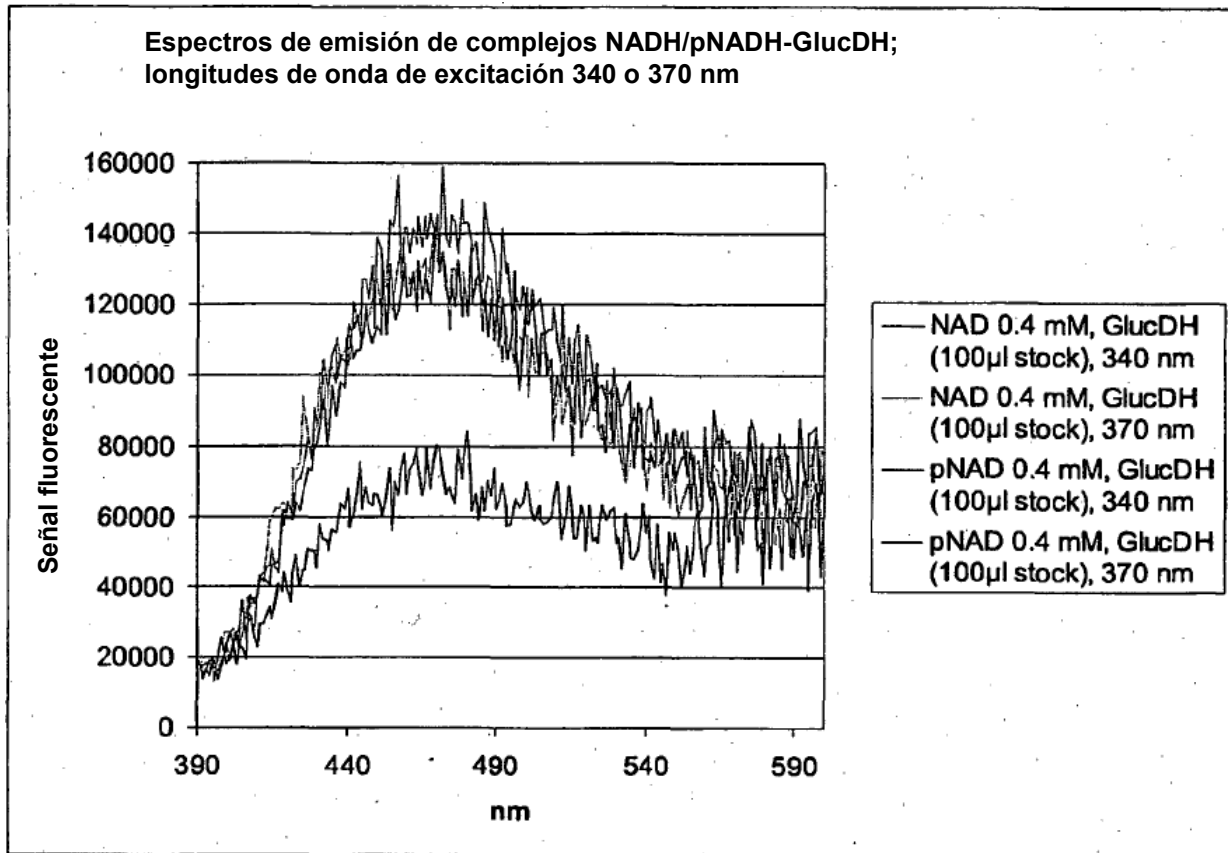


Figura 8

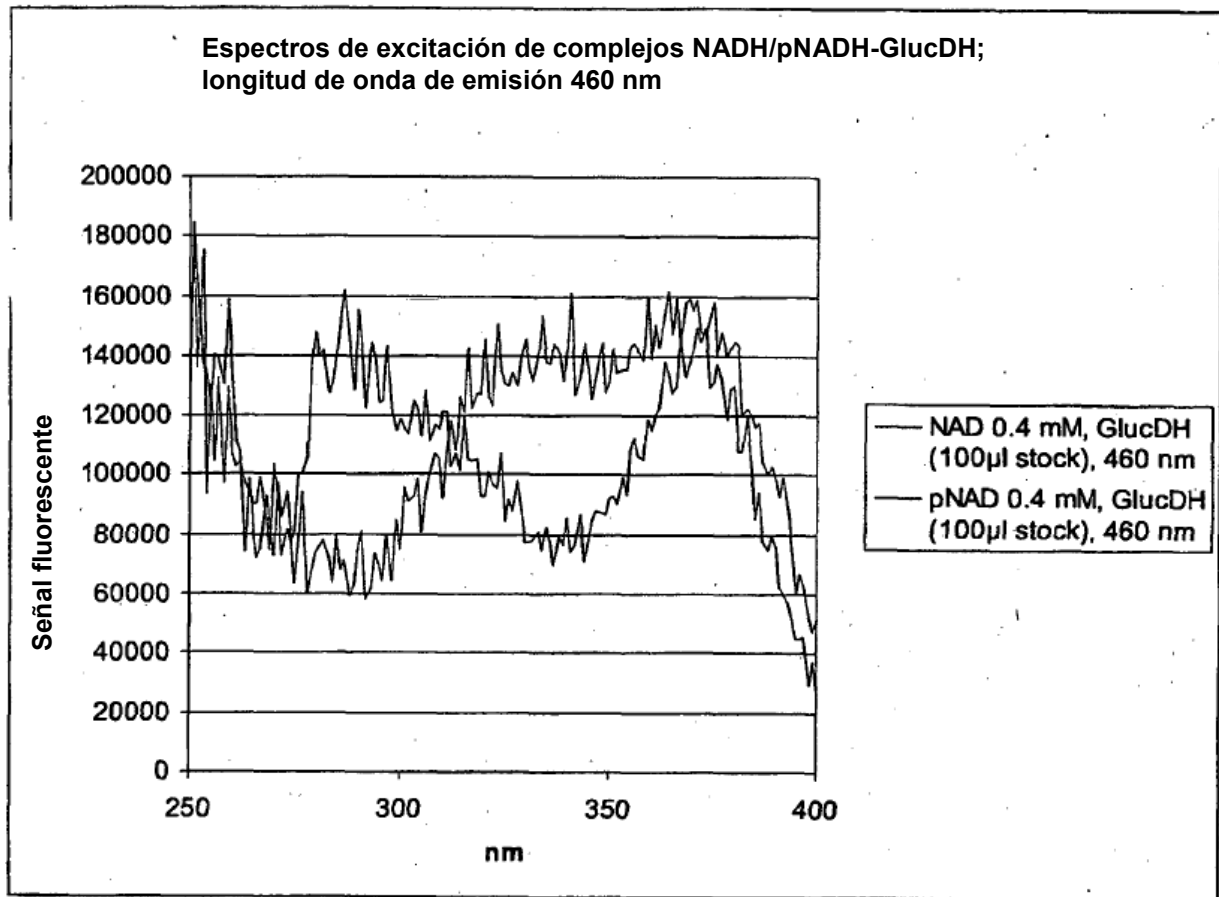
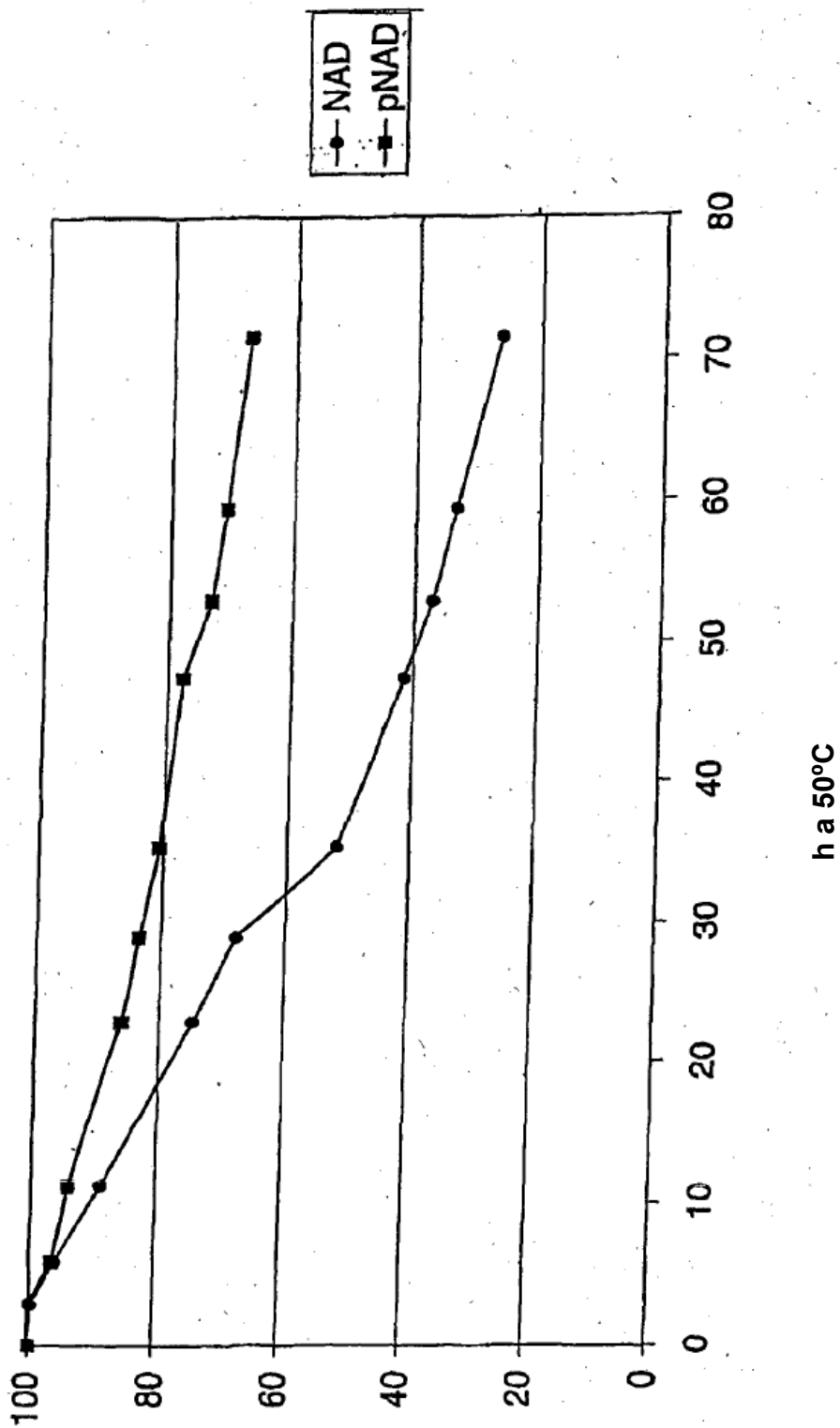


Figura 9



Porcentaje de área de (p)NAD en comparación con NAD respecto al inicio

Figura 10A

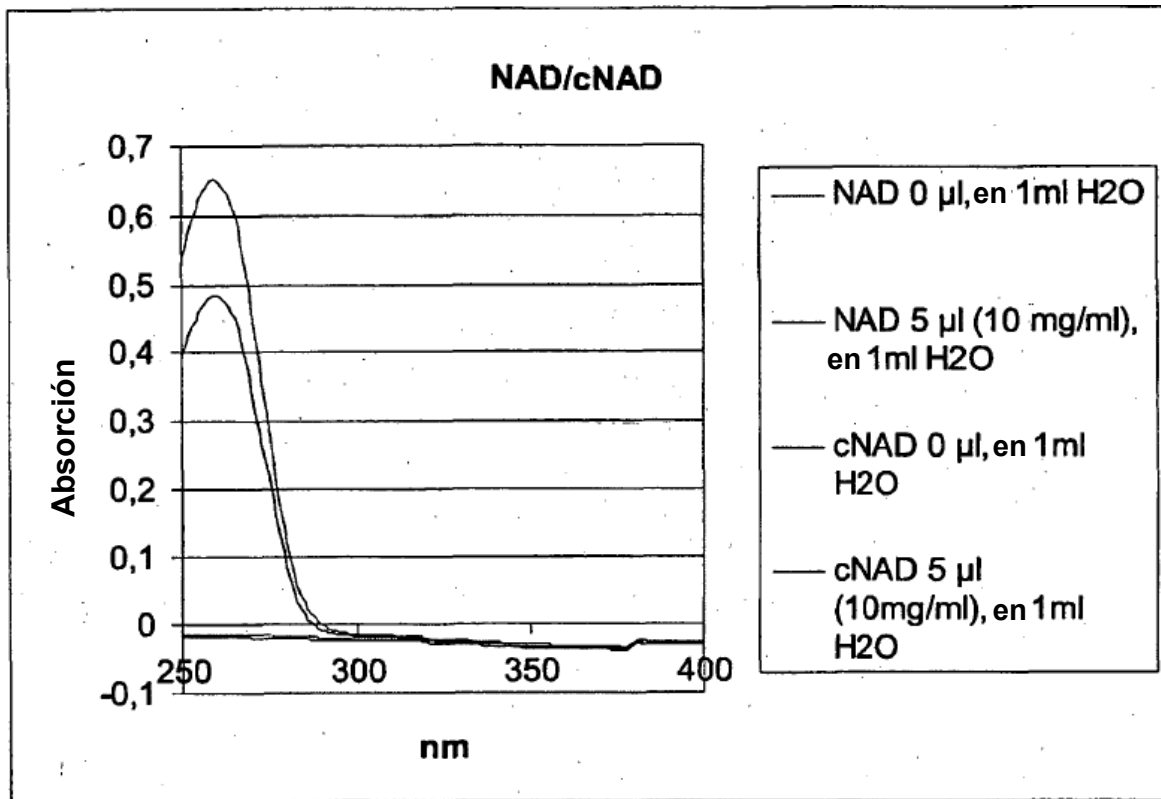


Figura 10B

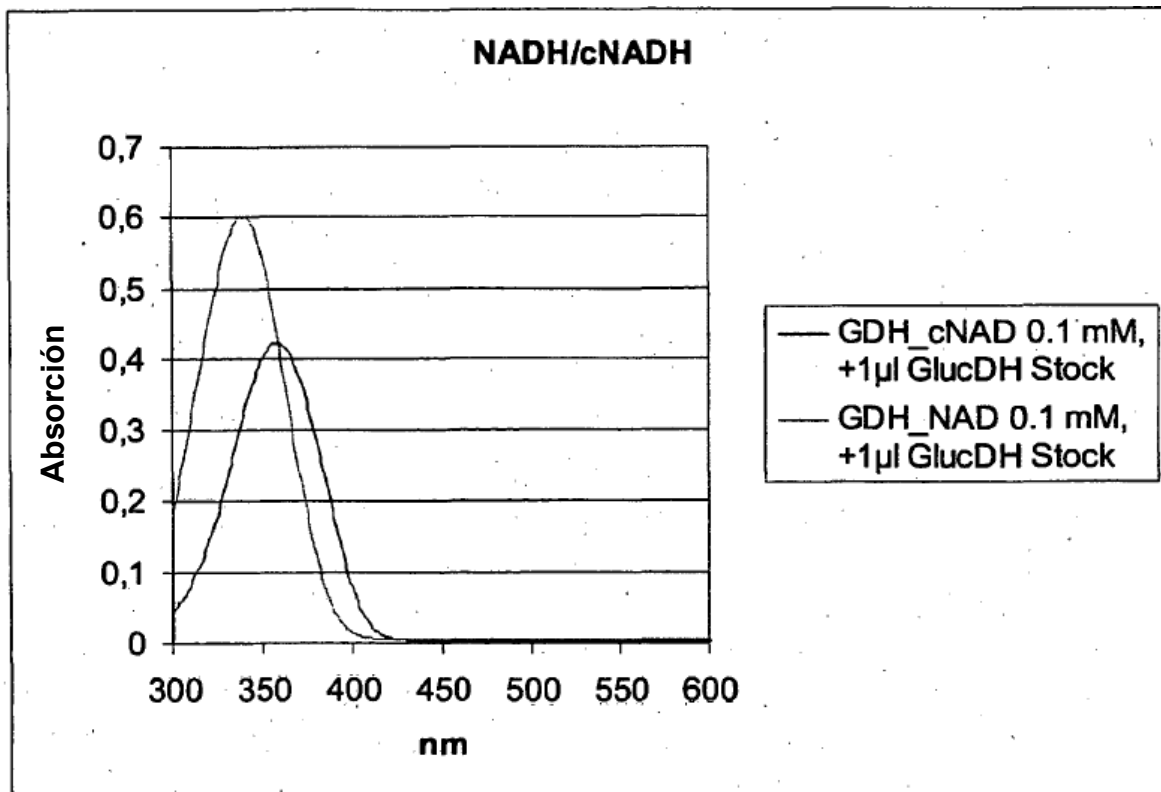


Figura 10C

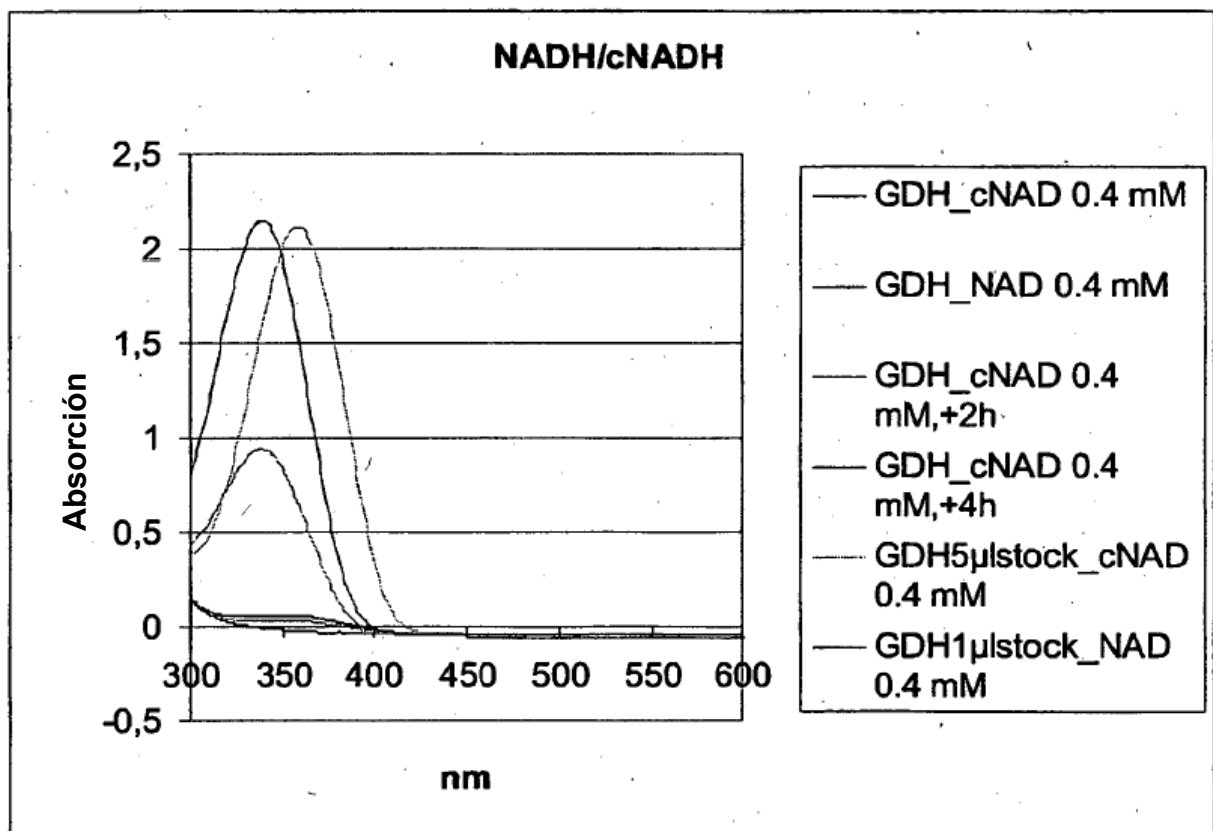


Figura 11

