

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 631**

51 Int. Cl.:

C12P 19/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10742423 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2459728**

54 Título: **Síntesis enzimática de carba-NAD**

30 Prioridad:

27.07.2009 EP 09166457

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

16.10.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DUEFEL, HARTMUT;
HEINDL, DIETER;
HORN, CARINA;
MEIER, THOMAS y
SCHMUCK, RAINER**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 425 631 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

Síntesis enzimática de carba-NAD

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la síntesis enzimática de los análogos estables de nicotinamida adenina dinucleótido NAD / NADH y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato NADP / NADPH, denominados "carba-NAD", es decir, análogos de NAD / NADH o NADP / NADPH, respectivamente, que comprende un azúcar carbacíclico en lugar de ribosa.

10

Antecedentes de la invención

15

Los sistemas de medición para análisis bioquímicos son componentes importantes de los métodos de análisis clínicamente relevantes. Esto se refiere principalmente a la medición de analitos, por ejemplo, metabolitos o sustratos que se determinan directa o indirectamente con la ayuda de una enzima. Con frecuencia un analito de interés se convierte con la ayuda de un complejo enzima-coenzima y posteriormente se cuantifica a través de esta reacción enzimática. En este proceso, el analito a determinar en condiciones de reacción apropiadas se pone en contacto con una enzima adecuada y una coenzima mediante las cuales se cambia la coenzima por ejemplo, oxidada o reducida por la reacción enzimática. Este proceso se puede detectar electroquímicamente o fotométricamente ya sea directamente o por medio de un mediador. Por lo general, una curva de calibración proporciona una correlación directa entre el valor medido y la concentración del analito de interés y la concentración del analito se puede determinar de este modo.

20

25

Las coenzimas son moléculas orgánicas que están covalentemente o no covalentemente unidas a una enzima y están modificadas por la conversión del analito. Ejemplos prominentes de coenzimas son la dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) de la que el NADH y el NADPH, respectivamente, se forman por reducción.

30

Como se describe en US 2008/0213809, las desventajas de los sistemas de medición convencionales, por ejemplo, un período de validez limitado, requisitos especiales para las condiciones de almacenamiento como la refrigeración o el almacenamiento liofilizado con el fin de lograr una mejor vida en estantería puede, al menos en gran medida, ser superados por los derivados estables de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD / NADH) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP / NADPH) descritos allí. Estos análogos estables de NAD (P) H son apropiados para evitar resultados erróneos causados por un almacenamiento incorrecto, desapercibido, o defectuoso que es especialmente importante, por ejemplo, en el caso de los ensayos que se llevan a cabo por los usuarios finales así como la automonitorización de glucosa.

35

40

Como se describe en US 2008/0213809 la síntesis química de carba-NAD es extremadamente difícil, requiere al menos 8 etapas de síntesis, tiene lugar un bajo rendimiento global y por lo tanto es bastante caro. La ruta química para la síntesis de carba-NAD se representa en la Figura 1. Se necesitan con urgencia rutas alternativas de síntesis.

Por lo tanto un objeto de la presente invención es proporcionar carba-NAD de una manera menos engorrosa, con altos rendimientos y a un coste atractivamente bajo.

45

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que es posible utilizar enzimas en lugar de la química convencional con el fin de proporcionar carba-NAD de una forma adecuada y coste-efectiva.

Resumen de la invención

50

La presente invención se refiere a un método para la síntesis de carba-NAD o un análogo del mismo, comprendiendo el método los pasos de a) fosforilar un 3-carbamoyl-1-(2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-piridinio-metanosulfonato o un análogo del mismo por la ayuda de una enzima NRK, b) adenilar el producto fosforilado del paso (a) con adenosina o un compuesto estructuralmente relacionado, con la ayuda de una enzima NMN-AT obteniendo de este modo carba-NAD o un análogo de la misma.

55

Descripción detallada de la invención

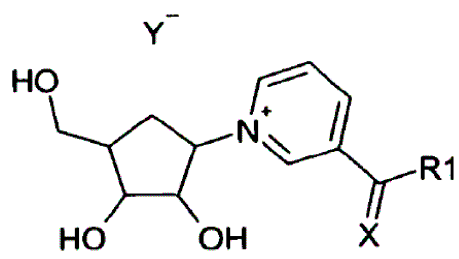
La presente invención se refiere a un método para la síntesis de carba-NAD o un análogo del mismo, comprendiendo el método los pasos de

60

a) fosforilar el compuesto de Fórmula I con la ayuda de una enzima quinasa nicotinamida ribosa (NRK),

65

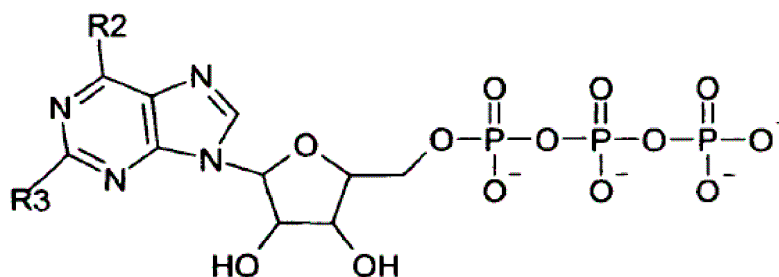
Fórmula I



5 en la que R1 es OH, NH2, O-metilo o N-dimetilo, metilo, Y-es un contraión y X es O o S,

b) adenilar el producto fosforilado del paso (a) con un compuesto de Fórmula II con la ayuda de una enzima NMN-AT.

10 Fórmula II

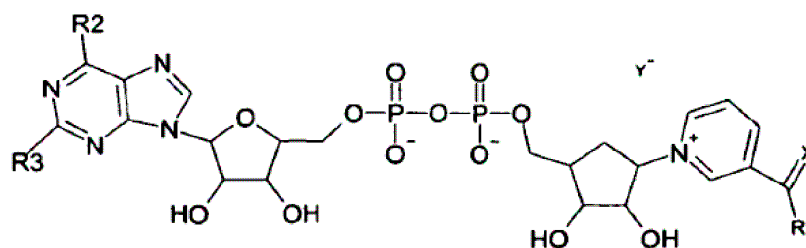


en el que R2 es NH2, OH, o NHalquilo,

15 en el que R3 es H, OH, NH2,

obteniendo de este modo carba-NAD o un análogo del mismo de fórmula III.

Fórmula III



20

en el que, R1, R2, R3, Y y X son como se han definido anteriormente.

25

El método anterior también se ilustra por el esquema de reacción mostrado en la Figura 2.

30

El término "carba-" se utiliza para indicar que en lugar de un residuo de azúcar ribosilo está presente un 2,3-dihidroxyciclopentano. En otras palabras, un carba-análogo oxidado de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), por ejemplo, es un compuesto por lo demás idéntico a (NAD⁺), excepto que un anillo de 2,3-dihidroxyciclopentano reemplaza el anillo D-ribonucleótido de la porción nicotinamida ribósido (Slama, JT y Simmons, AM, Biochemistry 27 (1988) 1831).

35

Las enzimas se conocen como catalizador altamente específico para permitir que se produzcan reacciones en condiciones más o menos fisiológicas que en su ausencia requieren condiciones severas o que incluso a veces son casi imposible de alcanzar. Con el fin de realizar este tipo de reacciones específicas y, como resultado de la evolución a través de generaciones y generaciones bajo presión selectiva, las enzimas tienden a ser muy específicas tanto con respecto a la especificidad de sustrato, así como con respecto a la reacción catalizada. Ahora se ha encontrado sorprendentemente que quinasas de nicotinamida ribosa aceptan los compuestos de piridinio de fórmula I que comprenden un anillo en lugar de un residuo ribosil como un sustrato de 2,3-dihidroxyciclopentano y son capaces de fosforilar estos compuestos.

Las quinasas nicotinamida ribosa (NRK) según la nomenclatura de las enzimas internacionales se agrupan en la clase EC 2.7.1.22 (ATP: N-ribosilnicotinamida 5'-fosfotransferasas). Una enzima escogida de la clase EC 2.7.1.22 se utiliza en un método de acuerdo con la presente invención con el fin de fosforilar un compuesto de Fórmula I. Las NRK preferidas son las que se conocen a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus Sanguinius* y *Homo sapiens*. También se prefieren las NRK utilizadas en un método de acuerdo con la presente invención son las conocidas de *Streptococcus Sanguinius* y de *Homo sapiens*. En una forma de realización preferida, la NRK1 como se conoce a partir de *Homo sapiens* se utiliza con el fin de llevar a cabo el primer paso en un método de acuerdo con la presente invención.

Como se indica en la Fórmula I no sólo carba-nicotinamida con R1 siendo NH₂, sino también otros compuestos como los análogos de carba-nicotinamida definidos y resumidos por las alternativas dadas para R1 representa un sustrato apropiado para ciertas enzimas NRK. Armado con la descripción de la presente invención, el experto en la materia no tendrá ningún problema para investigar los compuestos de Fórmula I, así como compuestos relacionados por su capacidad para ser fosforilados eficazmente por una enzima NRK. Los compuestos de piridinio tal como se definen en la Fórmula I se utilizan para la fosforilación enzimática en un método de acuerdo con la presente invención. Un análogo de nicotinamida es un compuesto tal como se define en la Fórmula I, en el que R1 no es NH₂. Preferiblemente R1 de la fórmula I se selecciona de entre el grupo que consiste en OH, NH₂ y O-metilo. En una forma de realización preferida R1 es OH y en otra realización preferida R1 es NH₂. Alquilo en R1 o R2 es preferiblemente alquilo C1 a C6 lineal o ramificado, preferiblemente alquilo lineal.

El residuo X en la fórmula I pueden ser o bien O o S. En una forma de realización preferida X en la Fórmula I es O.

El contraión Y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de metilsulfonato, Cl⁻, PF₆⁻, BF₄⁻, y ClO₄⁻. También se prefiere el contraión es BF₄⁻ o metilsulfonato.

Sorprendentemente, las adeniltransferasas de nucleótidos de nicotinamida (NMN-AT) pueden utilizar la carba-nicotinamida fosforilada obtenida como se ha descrito anteriormente como moléculasceptoras y son capaces de adenilar estos compuestos. En el segundo paso la síntesis enzimática de carba-NAD o un análogo del mismo un mononucleótido de nicotinamida adeniltransferasa se utiliza así para transferir un residuo de adenilo o un análogo del mismo a la carbo-nicotinamida fosforilada o un análogo del mismo, formando de este modo carba-NAD o un análogo del mismo.

Las adeniltransferasas de nucleótidos de nicotinamida (NMN-AT) según la nomenclatura de las enzimas internacionales se agrupan en la clase EC 2.7.7.1 (ATP: adeniltransferasas de nucleótidos de nicotinamida). Una enzima escogida de la clase EC 2.7.7.1 se utiliza en un método de acuerdo con la presente invención con el fin de adenilar un compuesto fosforilado de fórmula I con un compuesto de acuerdo con la Fórmula II. Las NMN-AT preferibles son las conocidos a partir de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Janashii Methanococcus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae* y el *Homo sapiens*. En una forma de realización preferida, la NMN-AT como se conoce en el *Homo sapiens*, por ejemplo, se utiliza expresado en *E. coli* o en *B. subtilis* con el fin de llevar a cabo la segunda reacción enzimática en un método de acuerdo con la presente invención. A pesar del hecho de que no sólo un grupo adenilo, sino también análogos de los mismos pueden utilizarse como un sustrato para NMN-AT en un método como se describe en la presente invención y por el bien de la conveniencia los términos adenilato, adenilado o adenilación se utilizan para todas estas sustancias por igual.

Sorprendentemente, también se ha observado que ambos pasos de la síntesis enzimática de carba NAD o un análogo del mismo, se puede realizar en una única mezcla de reacción. En aún una realización preferida adicional, la presente invención se refiere a un método para sintetizar enzimáticamente carba-NAD o un análogo del mismo comprendiendo el método los pasos de a) la fosforilación de un 3-carbamoil-1-(2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-piridinio-metanosulfonato o un análogo del mismo por la ayuda de una enzima NRK, b) adenilar el producto fosforilado del paso (a) con adenosina o un compuesto estructuralmente relacionado, con la ayuda de una enzima NMN-AT obteniendo de este modo carba-NAD o un análogo del mismo, en el que ambas reacciones enzimáticas se llevan a cabo en una mezcla de reacción.

Sorprendentemente, se ha encontrado que basado en el método descrito en la presente invención, el enantiómero biológicamente relevante de cNAD que se basa en el enantiómero 1R, 2S, 3R, 4R de carbamoil-1-(2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-piridinio se puede obtener en forma pura y con alto rendimiento. En una realización preferida el método descrito en la presente invención se utiliza para sintetizar cNAD que comprende el enantiómero 1R, 2S, 3R, 4R de carbamoil-1-(2,3 dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-piridinio.

Como se ha indicado en la Fórmula II no sólo adenosina-trifosfato, sino también otros compuestos estructuralmente relacionados, como los caracterizados y resumidos por las definiciones dadas para R2 y R3, respectivamente, en la Fórmula II. Los compuestos con las diversas combinaciones posibles de R2 y R3, respectivamente, en la Fórmula II representan un sustrato apropiado para ciertas enzimas NMN-AT. Armado con la descripción de la presente invención, el experto en la materia no tendrá ningún problema para investigar los compuestos de Fórmula II, así como compuestos estructuralmente relacionados por su capacidad para ser adenilados eficazmente por una enzima

NMN-AT. Un compuesto estructuralmente relacionado a la adenosina es un compuesto como se ha definido en la Fórmula II, en el que R2 no es NH2 y en el que R3 no es H, respectivamente. Preferiblemente, los compuestos de purina tal como se definen a través de los grupos indicados para R2 y R3 en la Fórmula II, respectivamente, se utilizan para adenilación enzimática de una carbanicotinamida fosforilada o un análogo de la misma.

5 En una forma de realización preferida adicional, la presente descripción se refiere al uso de un compuesto que se relaciona con un compuesto de la Fórmula II y se selecciona de entre el grupo que consiste de los trifosfatos de nebularina, formicina, aristeromicina, 7-deaza adenosina, 7 deaza -guanosina, 7 deaza-inosina, 7-deaza xantosina, 7 deaza 2,6-diamino purina, 7 deaza 8 aza-adenosina, 7 deaza 8 aza-guanosina, 7 deaza 8 aza-inosina, 7 deaza 8-aza xantosina, 7 deaza 8 aza 2,6-diamino purina, 8 aza-adenosina, 8 aza-guanosina, 8-aza inosina y 8-aza xantosina y 8 aza 2,6-diamino purina. Estos compuestos también se pueden usar para producir un dinucleótido correspondiente que comprende un análogo de carbanicotinamida en un método de acuerdo con la presente descripción.

15 Preferiblemente R2 de la Fórmula II se selecciona entre el grupo que consiste en NH2 u OH. En una realización preferida R2 es OH y aún en otra realización preferida R2 es NH2.

20 Preferentemente, R3 de Fórmula II se selecciona entre el grupo que consiste en H u OH. En una forma de realización preferida R3 es H.

En una forma de realización preferida, el método de acuerdo con la presente invención se practica con los compuestos dados en las Fórmulas I, II y III, en el que R1 es NH2, R2 es NH2, R3 es H y X es O.

25 Como es obvio para el experto en la materia, el carba-NAD o sus análogos, respectivamente, no va a funcionar exactamente de la misma manera con las diferentes enzimas que requieren NAD como co-enzima o co-factor. Sin embargo, el experto en la materia no tendrá ningún problema para elegir el análogo más apropiado de las opciones disponibles.

Descripción de las Figuras

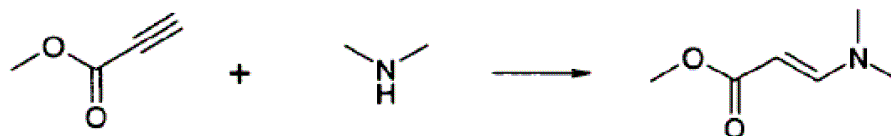
30 Figura 1. La Figura 1 ilustra en un diagrama la ruta estándar que se utiliza para sintetizar químicamente carba-NAD (cNAD). Según lo indicado por los porcentajes que se indican, el rendimiento total de acuerdo con este procedimiento es más bien bajo.

35 Figura 2. La Figura. 2 ilustra esquemáticamente los dos pasos enzimáticos utilizados en la síntesis de carba-NAD como se describe en la presente invención.

Ejemplo 1: (no según la invención)

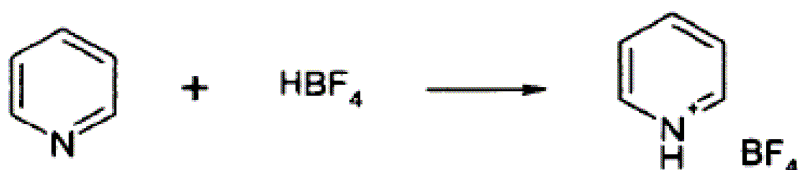
40 Síntesis de tetrafluoroborato de 5-dimetilamino-4-metoxicarbonil-penta-2,4-dieniliden-dimetil-amonio-

Ejemplo 1.1: Síntesis de metil-(2E)-3-(3-dimetilamino) prop-2-enoato



45 A una solución de metilpropiolato (68,0 ml, 0,764 mol) en 700 ml de THF seco, una solución 2 M de N, N-dimetilamina en el mismo disolvente (392 ml, 0,783 mol) se añadió en 1h a temperatura ambiente. Después de retirar el disolvente, el residuo se secó durante 1 h (37 °C, 10-20 mbar) en el evaporador resultando de un sólido de color amarillo pálido. El sólido triturado se lavó con n-hexano para proporcionar 93,0 g (94%) metil-(2E)-3-(3-dimetilamino) prop-2-enoato que fue puro de acuerdo con la TLC y 1H RMN.

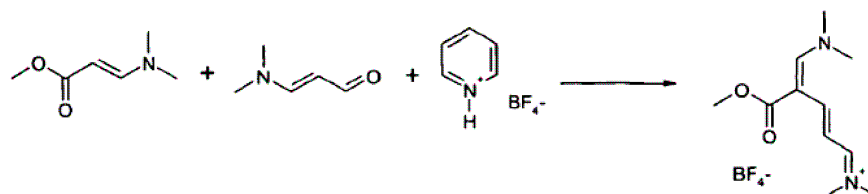
Ejemplo 1.2: Síntesis de tetrafluoroborato de piridinio



55

Se añadió [0031] ácido tetrafluorobórico (250 ml, 2,00 mol) para enfriar (0 °C) piridina (157,7 ml, 1,95 mol) durante 25 min para obtener un precipitado incoloro. Después de esto se añadió completamente el ácido, la mezcla se agitó adicionalmente durante 30 min a la misma temperatura. A continuación, la mezcla de reacción se filtró. El residuo se lavó dos veces con etanol frío y se secó 12 horas a alto vacío para producir 201,9 g (60%) en forma de cristales incoloros de tetrafluoroborato de piridinio.

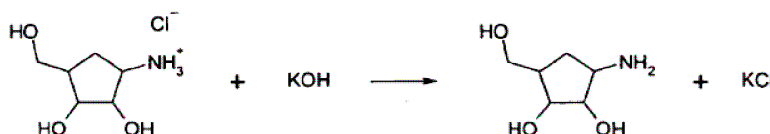
Ejemplo 1.3: Síntesis de tetrafluoroborato de 5-dimetilamino-4-metoxicarbonil-penta-2,4-dieniliden-dimetil-amonio



Se añadió tetrafluoroborato de piridinio (283,7 g, 1,70 mol) a una solución de metil-(2E)-3-(3-dimetilamino)prop-2-enoato de metilo en 442,5 ml de anhídrido acético / ácido acético (2:1). La suspensión resultante se enfrió a 0 °C y se añadió lentamente (3 h) 3-dimetilaminoacroleína (169,9 ml, 1,70 moles) con agitación vigorosa y enfriando con un baño de hielo proporcionó un precipitado de color amarillo marronoso. Después de agitar durante 2 h a temperatura ambiente se filtró la mezcla de reacción. El sólido restante se lavó con éter dietílico varias veces y se secó bajo presión reducida. La recristalización a partir de i-propanol / etanol (2:1) proporcionó 326,7 g (65%) de la sal de pentametinio como cristales de color amarillo.

Ejemplo 2:

Síntesis de 2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-1-aminociclopentano

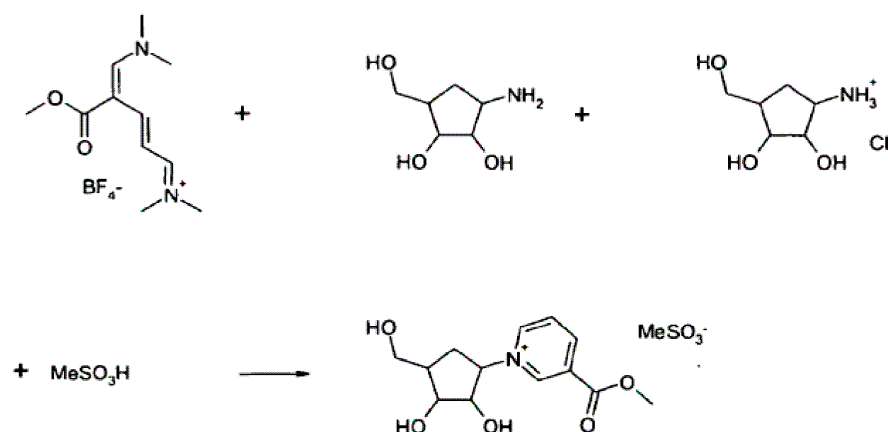


Se añadió una solución 1 M de KOH en EtOH (54,5 ml, 54,5 mmol) a una solución enfriada (0 °C) de clorhidrato (10,0 g, 54,5 mmol) disuelto en 540 ml de EtOH. Después de 15 min de agitación a temperatura ambiente, el precipitado incoloro formado se separó por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida. El aceite restante se secó en el evaporador (1 h, 40 °C) proporcionando 9,01 g (112%) de amino carbaribosa en forma de aceite de color amarillo pálido. El producto obtenido se utilizó para los siguientes pasos sin purificación adicional.

Este procedimiento se utiliza para la síntesis de (1R, 2S, 3R, 4R)-2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-1 aminociclopentano y el enantiómero del mismo.

Ejemplo 3:

Síntesis de metanosulfonato de 1-(2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-3-metoxicarbonil-piridinio



Se disolvió la sal de vinamidinio (298,1 g, 1,00 moles) en 1500 ml de DMF y se añadió el equivalente de ácido

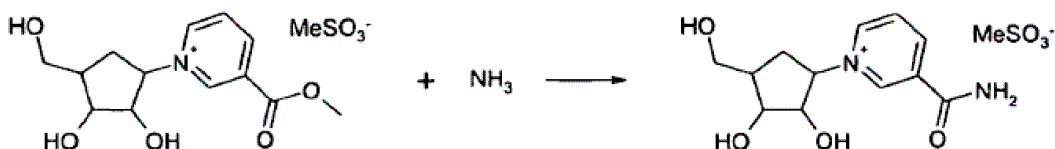
metanosulfónico (65,02 ml, 1,00 mol). Esta mezcla se dejó caer continuamente y muy lentamente (durante 5 h) a una solución en reflujo (90 °C) de 3-amino-5-hidroximetil-ciclopentano-1,2-diol (165,3 g, 0,90 moles) y 3-amino-5-hidroximetil-ciclopentano-1,2-diol (25,8 g, 0,15 mol) en 1250 ml de MeOH. Después de la adición completa de la solución de sal de vinamidinio la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y de nuevo se añadieron 0,15 equivalentes de ácido metanosulfónico. La mezcla se agitó durante 12 h a la misma temperatura. Después de eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo un aceite marrón rojizo, que se secó adicionalmente durante 3 h (45 °C, 4 mbar). Rendimiento: 693,0 g (191%, que contiene sales y una mayor cantidad de disolvente).

Este procedimiento se utiliza para la síntesis de 3-metoxicarbonil-1-((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-sal de piridinio y el enantiómero del mismo.

Ejemplo 4:

Metanosulfonato de 3-carbamoil-1-(2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-piridinio

El material bruto de metanosulfonato de 1-(2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-3-metoxicarbonil-piridinio del Ejemplo 3 se convirtió rápidamente en la amida correspondiente sin purificación adicional.



El metanosulfonato de 1-(2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-3-metoxicarbonil-piridinio crudo (118,3 g, 173,7 mmol) se disolvió en 100,0 ml de metanol. Después de la adición de amoníaco metanólico (7 M, 350,0 ml, 2,45 moles) la mezcla de reacción se agitó durante 2,5 h. Después de eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo un aceite de color rojo-marrón que se secó adicionalmente durante 3 h (40 °C, 10 mbar). Este producto bruto se pre-purificó con carbón vegetal activado y puede por ejemplo, utilizarse directamente para la síntesis química del cNAD (WO2007/012494) o en la síntesis enzimática de cNAD, como se describe más adelante.

Otros compuestos apropiados para su uso en un método de acuerdo con la presente invención, véase, por ejemplo los compuestos definidos en la Fórmula I, se pueden sintetizar de una manera análoga a los procedimientos dados en los Ejemplos 1 a 4 anteriormente en este documento.

Este procedimiento se utiliza para la síntesis de 3-carbamoil-1-((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-sal de piridinio y el enantiómero del mismo.

Ejemplo 5:

Fosforilación enzimática de varios compuestos de acuerdo con la Fórmula I con quinasa de nicotinamida ribosa



14: R = NH₂ [348.38]

12: R = OMe [363.39]

17: R = NMe₂ [376.43]

15: R = NH₂ [331.24]

16: R = OMe [346.26]

18: R = NMe₂ [359.30]

Enantiómeros puros (1R,2S,3R,4R) de 12, 14, 17 respectivamente, 100 mg/ml: 100 µl
 Tampón TRIS x HCL pH 7,5, MgCl₂ 15 mM: 960 µl
 Solución ATP 100 mM/1: 40 µl
 Fosfato de creatina: 14,5 mg
 Creatina quinasa: 0,1 mg
 Quinasa de nicotinamida ribosa, 0,7 U/ml 230 µl

(NRK1 recombinante de Homo sapiens (SwissProt ID: Q9NWW6) o NRK (nadR) de S. sanguinis (SwissProt ID: A3CQV5), expresado de forma heteróloga en E. coli).

Procedimiento de trabajo general:

5 El fosfato de creatina (14,5 mg) y la creatina quinasa (0,1 mg) se disolvieron en una mezcla de tampón TRIS (pH 7,5, MgCl₂ 15 mM, 960 µl) y ATP (100 mM / 1 en H₂O, 40 µl). A continuación, se añadió una solución del ribósido (compuesto 14 o análogo tal como se indica más arriba) (100 mg / ml en H₂O, 100 µl) seguido de ribosil quinasa (0,7 U / ml, 230 µl). La mezcla de reacción se incubó 16 horas a 37 °C. Después de un breve calentamiento hasta 80 °C, la mezcla se filtró y se analizó mediante HPLC.

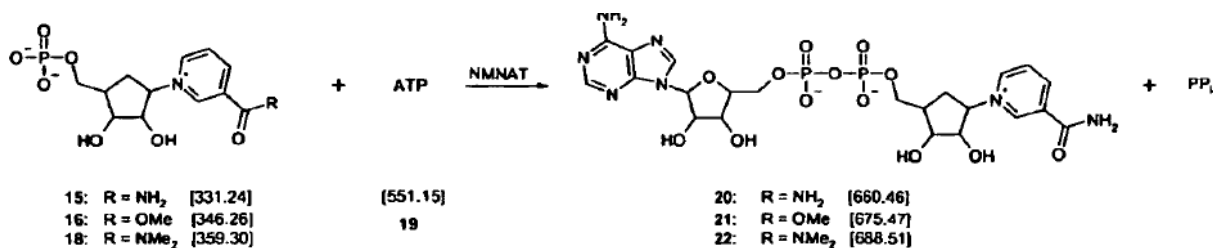
15 En los tres casos (con los compuestos 14, 12 o 17) el consumo completo del ribósido y la formación de un nuevo compuesto (el producto fosforilado correspondiente dado como compuestos 15, 16 o 18, respectivamente, anteriormente) se pudo detectar por HPLC.

Las masas correctas de los productos fosforilados deseados se encontraron mediante CL / EM: (EM: ESI: M= 330,75 (compuesto 15), 345,74 (compuesto 16), 358,79 (compuesto 18)).

20 El compuesto 15 se purificó utilizando cromatografía en una resina Dowex de intercambio de cationes y se eluyó con agua.

Ejemplo 6:

25 Conversión enzimática de carba-nicotinamida y análogos de la misma, respectivamente, con NMN-AT



De las sustancias 15, 16 y 18, respectivamente, (material crudo a partir de fosforilación enzimática del ejemplo 5) ca. 10,0 mg

Sustancia 19 (adenosintrifosfato, sal disódica) 22,6 mg

30 NMN-AT: (32 U/ml) 4,8 µl (0,153 U)

(se utiliza adenosiltransferasa mononucleótido de nicotinamida recombinante (NMN-AT) de Homo sapiens (SwissProt ID: Q9HAN9) Por otra parte, por ejemplo, NMN-AT a partir de E. coli (SwissProt ID: P0A752) o B. subtilis (ID SwissProt: P54455) expresado de forma heteróloga en E. coli)

35 Procedimiento de trabajo:

40 Se añadieron sal disódica del ATP (22,6 mg) y adenosiltransferasa mononucleótido de nicotinamida (NMN-AT, 4,8 µl, 0,153 U) a la solución filtrada obtenida de la fosforilación enzimática que contiene mononucleótido (compuesto 15 o un análogo, por ejemplo los compuestos 16 y 18). La mezcla de reacción se incubó 18 horas a 37 °C. Después de un breve calentamiento de 80 °C, la mezcla se filtró y se analizó mediante HPLC y CL / EM.

45 En los tres experimentos, el consumo completo del mononucleótido (compuestos 15, 16 o 18) y la formación de un nuevo compuesto se puede detectar por HPLC.

Se encontró la masa correcta del compuesto 20 (EM: ESI: M = 659,77).

Ejemplo 7:

50 Procedimiento para la conversión de 3-carbamoil-1-((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil) - sal de piridinio a carba-nicotinamida

55 Se disolvió 1 g (2,16 mmol) de 3-carbamoil-1-((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroximetil-ciclopentil)-piridinio, cloruro, 0,242 g (0,4 mmoles) sal disódica de ATP, 300 mg Mg C12 x 6H₂O (1,45 mmol) 16 U de ribosil quinasa, 1,45 g (4,43 mmol) creatinfosfato y 4,27 kU de creatina quinasa en 25 ml de agua estéril. La mezcla se incubó a 35 °C durante la noche. A continuación, se añadieron 2,42 g (4 mmol) de sal disódica de ATP, 440 mg MgC12 x 6H₂O (2,16 mmol) y 32 U de NMN-AT. La mezcla se incubó a 35 °C durante la noche. Después se calentó a 90 °C durante

5 min y después de enfriar se filtró. La purificación se realizó mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico como se describe en el documento WO 2007/012494.

Ejemplo 8:

5 Conversión de 3-carbamoil-1-((1R, 2S, 3R, 4R)-2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-sal de piridinio a carba-nicotinamida en presencia del enantiómero 3-carbamoil-1-((1S, 2R, 3S, 4S))-2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-sal de piridinio

10 Se disolvió 1 g (2,16 mmol) de una mezcla 1:1 que consiste en 3-carbamoil-1-((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-piridinio, cloruro y 3-carbamoil-1-((1S, 2R, 3S, 4S) -2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-piridinio; cloruro 0,242 g (0,4 mmol), sal disódica de ATP, 300 mg de Mg Cl₂ x 6H₂O (1,45 mmoles) 16 U ribosil quinasa, 1,45 g (4,43 mmoles) creatinfosfato y 4,27 kU creatin quinasa en 25 ml de agua estéril. La mezcla se
15 incubó a 35 °C durante la noche. La reacción se controló por análisis de HPLC de fase inversa (Hypersil ODS, 5 µm, 250 x 4,6 mm Thermo Scientific, Parte-Nº :30105-254630, eluyente A = 0,1 M acetato de trietilamonio pH 7,0, eluyente B = 0,2 L de 0,1 M acetato de trietilamonio. pH 7,0 + 0,8 L de acetonitrilo, gradiente 2 min 0% de B, en 23 min 100% de B, flujo: 1 ml / min, detección: UV / 260 nm) que muestra que ambos enantiómeros estaban fosforilados. El pico correspondiente a 3-carbamoil-1-((1R, 2S, 3R, 4R) -2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-piridinio, cloruro y el enantiómero (1S, 2R, 3S, 4S) en 2,96 min desaparece y aparece un nuevo pico correspondiente
20 a los productos fosforilados en 3,45 min.

A continuación se añadieron 2,42 g (4 mmol) de sal disódica de ATP, 440 mg MgCl₂ x 6H₂O (2,16 mmol) y 32 U NMN-AT. La mezcla se incubó a 35 °C durante la noche. A partir de entonces se calentó a 90 °C durante 5 min y después de enfriar se filtró. El análisis por HPLC de fase reversa muestra un pico a 7,92 min correspondiente a
25 cNAD. A los 3,45 min permanece un pico que corresponde al enantiómero fosforilado (1S, 2R, 3S, 4S). Después de la adición de fosfatasa alcalina el pico a 7,92 min no se ve influenciado mientras que el pico del enantiómero fosforilado (1S, 2R, 3S, 4S) a 3,45 min desaparece y aparece un pico a 2,96 min que corresponde a la 3-carbamoil-1-((1S, 2R, 3S, 4S)-2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-sal de piridinio. Por lo tanto cNAD (basado en el enantiómero 1R, 2S, 3R, 4R) no se ve afectado, mientras que el enantiómero restante fosforilado (1S, 2R, 3S, 4S) se defosforila mediante
30 la fosfatasa alcalina.

Como control el mismo experimento se llevó a cabo usando sólo el 3-carbamoil-1-((1S, 2R, 3S, 4S) -2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-piridinio, cloruro y controlado por HPLC. Hubo formación de un pico a los 3,45 min (corresponde al enantiómero fosforilado) después de añadir la ribosil quinasa pero no se encontró ningún pico con
35 un tiempo de retención de 7,92 min en el cromatograma de HPLC después de la adición de la NMN-AT.

Por lo tanto, se puede iniciar la síntesis de cNAD con una mezcla enantiomérica de 2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-1-aminociclopentano que consiste de los enantiómeros (1R, 2S, 3R, 4R y 1S, 2R, 3S, 4S) y obtener, mediante el método descrito en la presente invención únicamente cNAD biológicamente relevante.

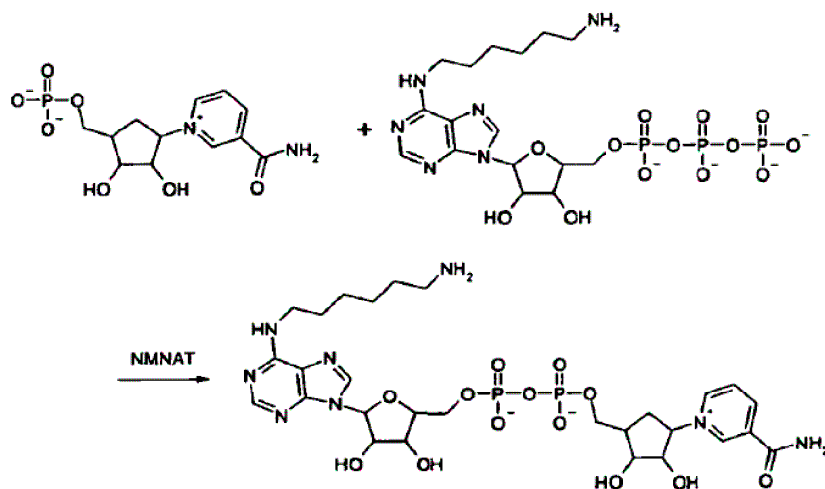
40 A continuación se añadieron 2,42 g (4 mmol) de sal disódica de ATP, 440 mg MgCl₂ x 6H₂O (2,16 mmol) y 32 U NMN-AT. La mezcla se incubó a 35 °C durante la noche. A partir de entonces se calentó a 90 °C durante 5 min y después de enfriar se filtró. El análisis por HPLC muestra un pico a 7,92 min correspondiente a cNAD. A los 3,45 min permanece un pico que corresponde al enantiómero fosforilado (1S, 2R, 3S, 4S). Después de la adición de fosfatasa
45 alcalina el pico a 7,92 min no se ve influenciado mientras que el pico del enantiómero fosforilado (1S, 2R, 3S, 4S) a 3,45 min desaparece y aparece un pico a 2,96 min que corresponde a la 3-carbamoil-1-((1S, 2R, 3S, 4S)-2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-sal de piridinio. Por lo tanto cNAD (basado en el enantiómero 1R, 2S, 3R, 4R) no se ve afectado, mientras que el enantiómero restante fosforilado (1S, 2R, 3S, 4S) se defosforila mediante la fosfatasa
50 alcalina.

Como control el mismo experimento se llevó a cabo usando sólo el 3-carbamoil-1-((1S, 2R, 3S, 4S)-2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-ciclopentil)-piridinio, cloruro y controlado por HPLC. No hubo formación de un pico a 3,45 min (corresponde al enantiómero fosforilado) después de añadir la ribosil quinasa pero no se encontró ningún pico con
55 un tiempo de retención a 7,92 min en el cromatograma de HPLC después de la adición de la NMN-AT.

Por lo tanto, se puede iniciar la síntesis de cNAD con una mezcla enantiomérica de 2,3-dihidroxi-4-hidroxiometil-1-aminociclopentano que consiste de los enantiómeros (1R, 2S, 3R, 4R y 1S, 2R, 3S, 4S) y obtener, mediante el método descrito en la presente invención, cNAD basado únicamente en el enantiómero biológicamente relevante 1R,
60 2S, 3R, 4R.

Ejemplo 9:

Conversión enzimática de mononucleótidos de carba-nicotinamida (sustancia 15) con NMN-AT y N6 hexilamino ATP



Procedimiento de trabajo general:

5 Se añadieron sal disódica de N6-hexilaminoATP Jena Bioscience (0,33 mg) y adenosiltransferasa mononucleótido de nicotinamida (NMN-AT, 4,8 ml, 0,153 U) a una solución de 1 mg de 15. La mezcla de reacción se incubó 18 horas a 37 °C. Después de un breve calentamiento de 80 °C, la mezcla se filtró y se analizó mediante HPLC CL / EM.

10 El carba-NMN (compuesto 15) se consumió por completo y un nuevo compuesto (el derivado adenosil correspondiente) se detectó mediante HPLC.

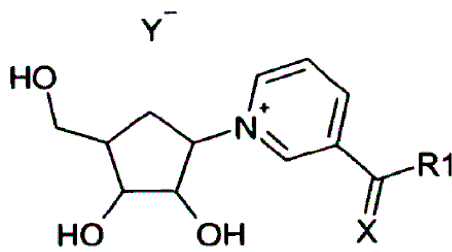
Se encontró la masa correcta (EM: ESI: M = 759,77)

REIVINDICACIONES

1. Un método para la síntesis de carba-NAD o un análogo del mismo, comprendiendo el método los pasos de

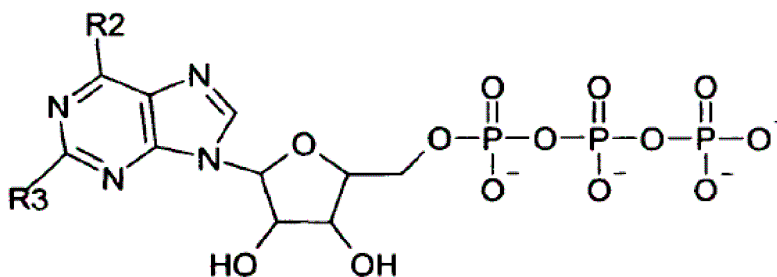
5 a) fosforilar el compuesto de Fórmula I con la ayuda de una enzima quinasa nicotinamida ribosa (NRK),

Fórmula I



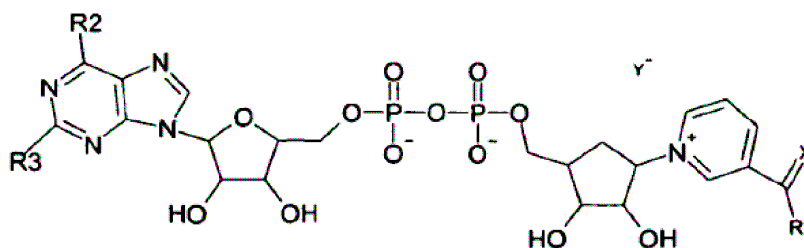
10 en la que R1 es OH, NH₂, O-metilo o N-dimetilo, metilo, Y-es un contraión y X es O o S,
 b) adenilar el producto fosforilado del paso (a) con un compuesto de Fórmula II con la ayuda de una enzima NMN-AT.

15 Fórmula II



20 en el que R2 es NH₂, OH, o NHalquilo,
 en el que R3 es H, OH, NH₂,
 obteniendo de este modo carba-NAD o un análogo del mismo de fórmula III.

25 Fórmula III



en el que, R1, R2, R3, Y y X son como se han definido anteriormente.

30 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha enzima NRK se selecciona de NRK conocidas a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus Sanguinius* y *Homo sapiens*.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho NMN-AT se selecciona del grupo que consiste en el NMN-AT conocido de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Janashii Methanococcus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en el compuesto R1 de fórmula I se selecciona del grupo que consiste en OH, NH₂ y O-metilo.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en el compuesto R2 de fórmula II es NH₂ u OH.
- 5 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto R3 de fórmula II es H o OH.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en el compuesto X de la Fórmula I es O.
- 10 8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R1 es NH₂, R2 es NH₂, R3 es H y X es O.

Fig. 1

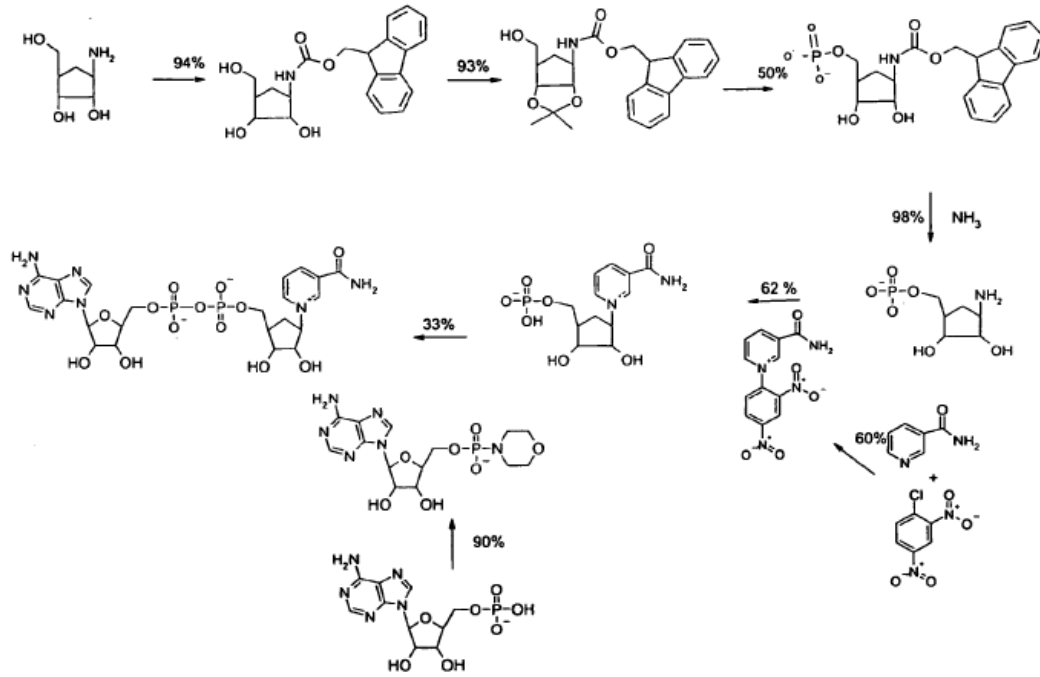


Fig. 2

