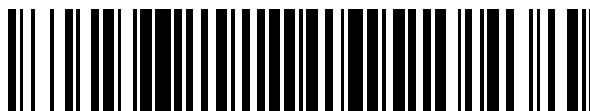


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 150**

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 11167471 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2014 EP 2364988**

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:

04.04.2014

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 2 453 150 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 invención se refiere a elementos de ensayo que comprenden derivados estables de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD/NADH) o de fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP/NADPH) y a su uso en procedimientos bioquímicos de detección.
- 10 Los sistemas de medición para la analítica bioquímica son constituyentes importantes de procedimientos de análisis clínicamente relevantes. En este sentido tiene prioridad la medición de analitos, por ejemplo metabolitos o sustratos, que se determinan directa o indirectamente con ayuda de una enzima. Los analitos se hacen reaccionar a este respecto con ayuda de un complejo de enzima-coenzima y, a continuación, se cuantifican. A este respecto, el analito que va a determinarse se pone en contacto con una enzima y una coenzima adecuadas, utilizándose la enzima, en la mayoría de los casos, en cantidades catalíticas. La coenzima se cambia mediante la reacción enzimática, por
- 15 ejemplo se oxida o se reduce. Este proceso puede detectarse de manera electroquímica o fotométrica directamente o a través de un mediador. Una calibración proporciona una relación directa del valor de medición con la concentración del analito que va a determinarse.
- 20 Las coenzimas son moléculas orgánicas que están unidas de manera covalente o no covalente a una enzima y que cambian mediante la reacción del analito. Son ejemplos destacados de coenzimas dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP), a partir de los cuales, mediante reducción, se genera NADH o NADPH.
- 25 Los sistemas de medición conocidos por el estado de la técnica se caracterizan por una durabilidad de tiempo limitado así como por requisitos especiales en cuanto al entorno, tales como refrigeración o almacenamiento en seco, para conseguir esta durabilidad. En determinadas formas de aplicación, por ejemplo en ensayos que se llevan a cabo por el propio consumidor final, tal como, por ejemplo, en la automonitorización de la glucemia, pueden aparecer, por tanto, resultados erróneos debido a un almacenamiento erróneo inadvertido y equivocado. Especialmente el agotamiento de desecantes debido a un tiempo de apertura demasiado largo de los envases
- 30 primarios puede llevar a mediciones erróneas que, en algunos sistemas, el consumidor apenas puede reconocer.
- Una medida conocida que se utiliza para aumentar la estabilidad de sistemas de medición bioquímicos es el uso de enzimas estables, por ejemplo el uso de enzimas de organismos termófilos. Existe además la posibilidad de estabilizar enzimas mediante modificación química, por ejemplo reticulación, o mediante mutagénesis. Además
- 35 pueden añadirse también estabilizantes de enzima, tales como, por ejemplo, trehalosa, polivinilpirrolidona y albúmina sérica, o las enzimas pueden incluirse, por ejemplo, mediante fotopolimerización en redes poliméricas.
- Además se intenta mejorar la durabilidad de sistemas de medición bioquímicos mediante el uso de mediadores estables. De este modo, mediante el uso de mediadores con un potencial redox lo más bajo posible, se aumenta la
- 40 especificidad de los ensayos y se eliminan perturbaciones durante la reacción. Un límite inferior para el potencial redox de mediadores lo forman, sin embargo, los potenciales redox de los complejos enzima/coenzima. Si se cae por debajo de los mismos, la reacción con los mediadores se ralentiza o incluso se impide.
- 45 Como alternativa pueden usarse también sistemas de medición bioquímicos sin mediadores, en los que, por ejemplo, se realiza una detección directa de coenzimas, por ejemplo de la coenzima NADH. Sin embargo, una desventaja de tales sistemas de medición consiste en que las coenzimas, tales como NAD y NADP, son inestables.
- El NAD y NADP son moléculas lábiles frente a bases, cuyas rutas de degradación están descritas en la bibliografía (N. J. Oppenheimer en *The Piridine Nucleotide Coenzymes* Academic Press Nueva York, Londres 1982, ed. J. Everese, B. Anderson, K. You, capítulo 3, páginas 56-65). En esencial, durante la degradación de NAD o NADP se genera ADP-ribosa al escindirse los enlaces glucosídicos entre la ribosa y la unidad de piridina. Las formas
- 50 reducidas NADH y NADPH son, por el contrario, lábiles frente a ácidos: por ejemplo, la epimerización es una ruta de degradación conocida. En ambos casos, la inestabilidad de NAD/NADP y NADH/NADPH se basa en la labilidad del enlace glucosídico entre la unidad de ribosa y la de piridina: pero incluso también en condiciones no drásticas, tales como, por ejemplo, en solución acuosa, se produce la hidrólisis de las coenzimas NAD o NADP, tan solo por la
- 55 humedad ambiental. Esta inestabilidad puede llevar a imprecisiones en la medición de analitos.
- Una serie de derivados de NAD/NADP se describe, por ejemplo, en B. M. Anderson en *the Piridine Nucleotide Coenzymes*, Academic Press Nueva York, Londres 1982, ed. J. Everese, B. Anderson, K. You, capítulo 4. No obstante, la mayoría de estos derivados no son aceptados adecuadamente por las enzimas. Por lo tanto, el único derivado que se ha usado hasta el momento para ensayos de diagnóstico es el dinucleótido de 3-acetilpiridina adenina (acetil NAD), que se describió por primera vez en 1956 (N. O. Kaplan, *J. Biol. Chem.* (1956), 221, 823). También esta coenzima muestra una baja aceptación por las enzimas y una variación en el potencial redox.
- 60

En el documento WO 01/94370 se describe el uso de otros derivados de NAD con un grupo piridina modificado. Las modificaciones del grupo nicotinamida tienen, sin embargo, en general una influencia directa sobre la reacción catalítica. En la mayoría de los casos, esta influencia es negativa.

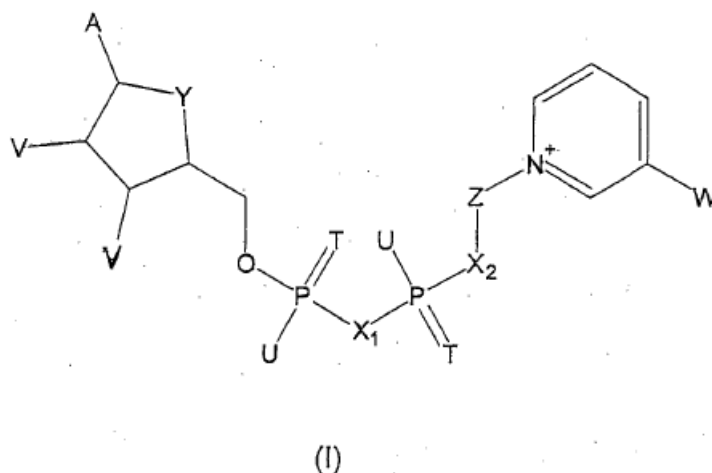
En otro concepto de estabilización se cambió la unidad de ribosa para influir de esta manera en la estabilidad del enlace glucosídico. Este modo de proceder no interfiere directamente con la reacción catalítica del grupo nicotinamida. Sin embargo, puede existir una influencia indirecta tan pronto como la enzima presente un enlace fuerte y específico a la unidad de ribosa. A este respecto, Kaufmann y col. dan a conocer en los documentos WO 98/33936 y US 5.801.006 o en el documento WO 01/49247 una serie de derivados de tiorribosa NAD. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado una relación entre la modificación de la unidad de nicotinamida-ribosa y la actividad de los derivados en reacciones enzimáticas.

CarbNAD, un derivado sin enlace glucosídico, se describió por primera vez en 1988 (J. T. Slama, Biochemistry 1989, 27, 183 y Biochemistry 1989, 28, 7688). La ribosa se sustituye aquí por una unidad de azúcar carbáclica. Si bien carbNAD se describió como sustrato para deshidrogenasas, su actividad no se ha detectado hasta el momento en procedimientos bioquímicos de detección en la práctica clínica.

Un planteamiento similar se describió posteriormente por G. M. Blackburn, Chem. Comm., 1996, 2765, para preparar carbNAD con un compuesto de metilénbisfosfonato en lugar del pirofosfato natural. El metilénbisfosfonato muestra una estabilidad aumentada frente a fosfatasa y se ha usado como inhibidor para ADP-ribosilciclase. Un aumento de la estabilidad frente a la hidrólisis no era el objetivo (J. T. Slama, G. M. Blackburn).

Por lo tanto, la presente invención se basa en el objetivo de proporcionar sistemas de medición bioanalíticos, estables, en particular para la determinación de glucosa, que eviten la sensibilidad a la hidrólisis de NAD/NADP y que, al mismo tiempo, sean activos como coenzimas en reacciones enzimáticas.

Este objetivo se resuelve mediante un elemento de ensayo para la determinación de un analito, que comprende (i) una enzima dependiente de coenzima o un sustrato para una enzima de este tipo y (ii) como coenzima un compuesto con la siguiente fórmula general (I):



con

A = adenina o un análogo de la misma,

T = en cada caso independientemente O, S,

U = en cada caso independientemente OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,

V = en cada caso independientemente OH o un grupo fosfato, tal como se define en la reivindicación 1,

W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ con R = en cada caso independientemente H o alquilo C₁-C₂,

X₁, X₂ = en cada caso independientemente O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,

Y = NH, S, O, CH₂,

Z = un resto que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C, que contiene dado el caso un heteroátomo seleccionado de O, S y N así como dado el caso uno o varios sustituyentes, y un resto CR₄₂, estando CR₄₂ unido al grupo cíclico y a X₂, con R₄ = en cada caso independientemente H, F, Cl, CH₃,

con la condición de que Z y el resto piridina no estén enlazados a través de un enlace glucosídico, o una sal o dado el caso una forma reducida del mismo, caracterizado por que está realizado como ensayo en seco.

En una forma de realización preferida, W = CONH₂ o COCH₃.

Sustituyentes preferidos en Z están seleccionados del grupo OH, F, Cl así como alquilo C₁-C₂, dado el caso fluorado o clorado y/o sustituido con OH, O-alquilo C₁-C₂.

En una forma de realización preferida, un primer resto V es OH y un segundo resto V es un grupo fosfato. Dado el caso, el un grupo OH y el un grupo fosfato, con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden formar un ciclo.

En una forma de realización preferida se proporciona un elemento de ensayo para la determinación de glucosa, que comprende una glucosa deshidrogenasa y un compuesto de fórmula general (I), tal como se indicó anteriormente, o una sal del mismo.

Sorprendentemente, los compuestos de acuerdo con la invención son estables frente a la hidrólisis y son sustratos adecuados en procedimientos enzimáticos de detección y pueden utilizarse para el diagnóstico bioquímico. Este resultado está en contraposición al de la mayoría de los derivados de NAD/NADP conocidos hasta el momento, dado que estos derivados por norma general solo son estables brevemente en procedimientos enzimáticos de detección.

Las ventajas de los compuestos de acuerdo con la invención con respecto al estado de la técnica son:

- alta estabilidad,
- alta actividad enzimática,
- síntesis sencilla y económica,
- aplicabilidad en todos los procedimientos bioquímicos de detección conocidos hasta el momento.

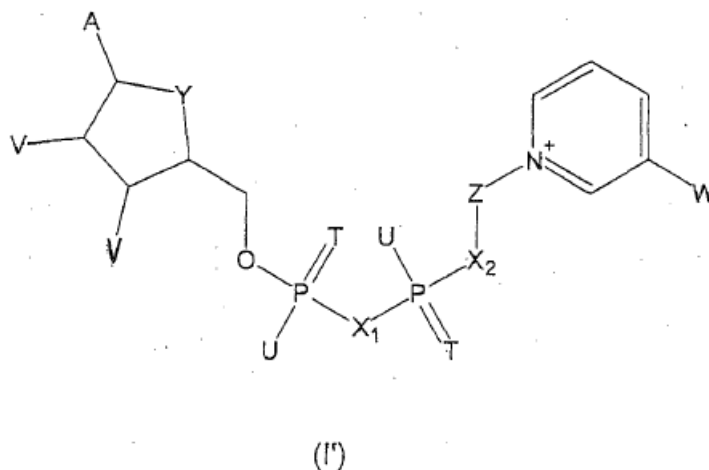
Mediante la provisión de derivados estables de NAD/NADP con la presente invención preferentemente en combinación con una formulación estabilizante, tal como, por ejemplo, mediante la inclusión de enzimas en redes poliméricas, pueden evitarse en gran medida las desventajas de los procedimientos bioquímicos de detección conocidos hasta el momento. Además no tiene que emplearse ningún aditivo estabilizante. Esto es en particular ventajoso, dado que cuanto menor sea el número de las sustancias reactivas implicadas, mayor será la probabilidad de obtener una formulación estable para la determinación de analitos.

Con la presente invención se proporcionan elementos de ensayo que comprenden una serie de derivados estables de NAD/NADP que, para el uso como coenzima en el elemento de ensayo, poseen una actividad enzimática suficiente.

Pueden producirse derivados estables de NAD/NADP en procedimientos de síntesis conocidos en general. Para ello se convierte el grupo amino de un aminoalcohol cíclico en el derivado de piridinio a través de la química de Zincke. A continuación se fosforila el grupo OH primario y se acopla con un derivado de AMP activado para dar el derivado de NAD. Como alternativa también puede fosforilarse en primer lugar el grupo OH primario y entonces convertirse el grupo amino en una piridina por medio de la reacción de Zincke.

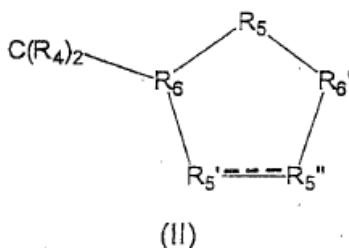
Una ruta de síntesis adicional es la activación del alcohol primario para dar tosilato o yoduro y la alquilación posterior de ADP.

Formas de realización preferidas del elemento de ensayo de acuerdo con la invención comprenden, por ejemplo, compuestos con la siguiente fórmula general (I'):



con

- A = adenina o un análogo de la misma,
T = en cada caso independientemente O, S,
U = en cada caso independientemente OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,
5 V = en cada caso independientemente OH o un grupo fosfato,
W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ con R = en cada caso independientemente H o alquilo C₁-C₂,
X₁, X₂ = en cada caso independientemente O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,
Y = NH, S, O, CH₂,
10 Z = un anillo de cinco miembros carbocíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, en particular un compuesto de fórmula general (II)



pudiendo existir entre R5' y R5'' un enlace simple o doble,

- R4 = en cada caso independientemente H, F, Cl, CH₃,
R5 = CR₄₂,

cuando entre R5' y R5'' existe un enlace simple,

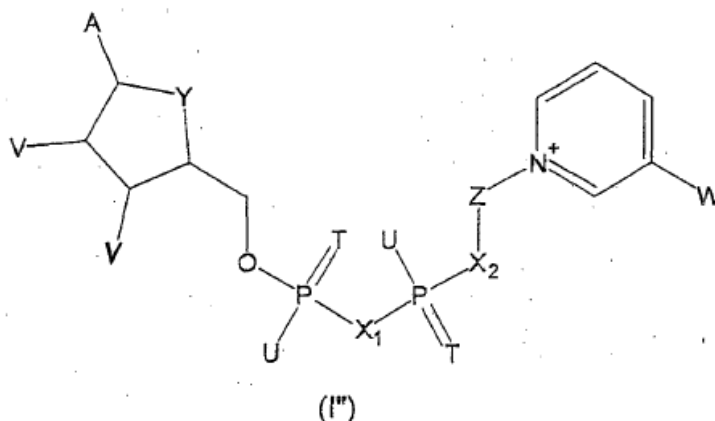
- R5' = O, S, NH, N-alquilo C₁-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,
R5'' = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,

cuando entre R5' y R5'' existe un doble enlace, R5'=R5''=CR₄,

- R6, R6' = en cada caso independientemente CH, CCH₃,

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

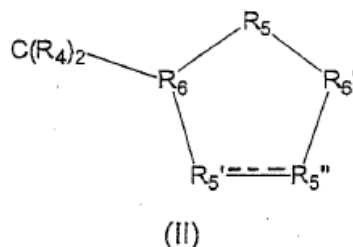
Otras formas de realización preferidas del elemento de ensayo comprenden compuestos con la siguiente fórmula general (I''):



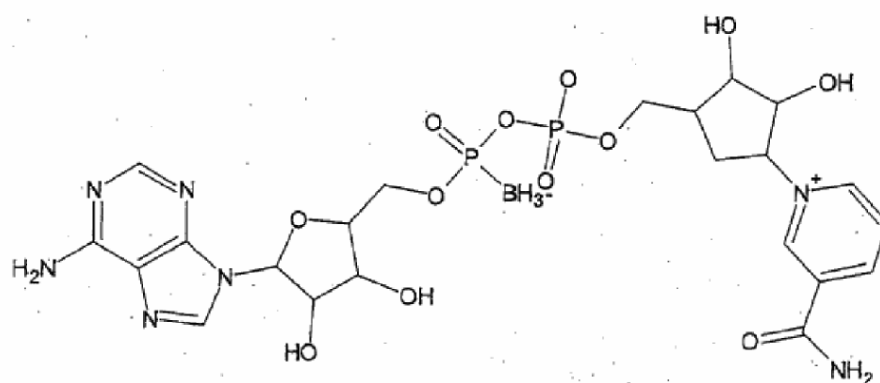
con

- A = adenina o un análogo de la misma,
T = en cada caso independientemente O, S,
U = en cada caso independientemente OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,
40 V = en cada caso independientemente OH o un grupo fosfato,
W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ con R = en cada caso independientemente H o alquilo C₁-C₂,
X₁, X₂ = en cada caso independientemente O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,

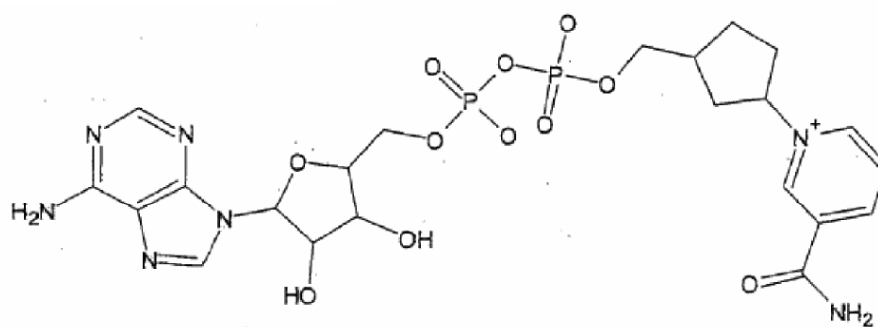
Y = NH, S, O, CH₂,
Z = un anillo de cinco miembros carbocíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, en particular compuestos de fórmula general (II)



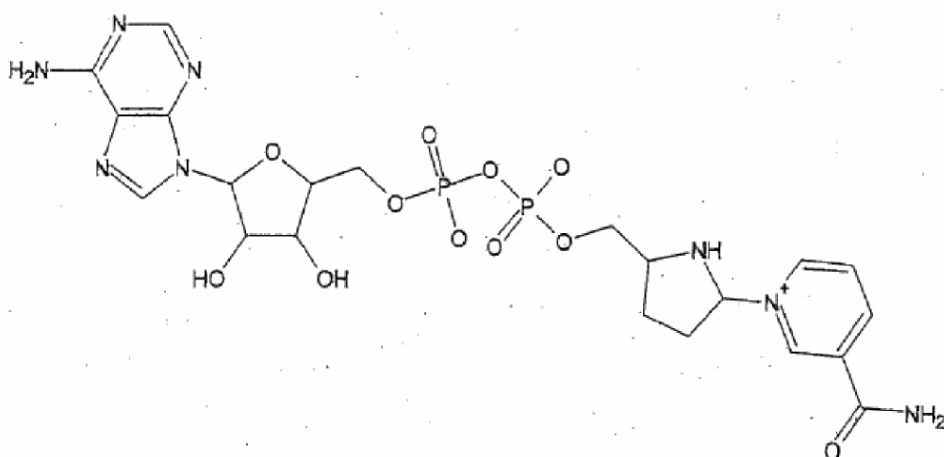
- 5 pudiendo existir entre R5' y R5'' un enlace simple o doble,
- 10 R4 = en cada caso independientemente H, F, Cl, CH₃,
R5 = CR₄₂,
- cuando entre R5' y R5'' existe un enlace simple,
- 15 R5' = O, S, NH, N-alquilo C₁-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,
R5'' = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,
- cuando entre R5' y R5'' existe un doble enlace, R5'=R5''=CR₄,
- 20 R6, R6' = en cada caso independientemente CH, CCH₃,
- con la condición de que cuando R5 = CH₂, T = O, U = en cada caso OH, V = OH, W = CONH₂, X = O e Y = O, entonces R5' y R5'' no son al mismo tiempo CHOH, o una sal o dado el caso una forma reducida del mismo.
- 25 En una forma de realización preferida, los compuestos contienen análogos de adenina, tales como, por ejemplo, adenina C₈- y N₆-sustituída, variantes desaza tales como 7-desaza, variantes aza tales como 8-aza o combinaciones tales como 7-desaza u 8-aza o análogos carbocíclicos, tales como formicina, pudiendo estar sustituidas las variantes 7-desaza en la posición 7 con halógeno, alquínilo, alquénilo o alquilo C₁-C₆.
- 30 En una forma de realización preferida adicional, los compuestos contienen análogos de adenosina que, en lugar de ribosa, contienen por ejemplo 2-metoxi-desoxirribosa, 2'-fluoro-desoxirribosa, hexitol, altritol o análogos policíclicos, tales como azúcares bicíclicos, de LNA y tricíclicos.
- 35 En particular, también los oxígenos de (di)-fosfato pueden estar sustituidos isotrópicamente, tal como, por ejemplo, O- por S⁻ o BH₃⁻, O por NH, NCH₃ o CH₂ y =O por =S.
- En una forma de realización preferida, al menos un resto U del compuesto es distinto de OH y de manera especialmente preferente es al menos un resto U = BH₃⁻.
- 40 Son formas de realización particularmente preferidas los elementos de ensayo que comprenden los derivados borano carba-NAD, c-pentil-NAD, pirrolil-NAD, furanil-NAD, carba-NAD ciclofosfato, carba-NADP, pirrolidinil-NAD



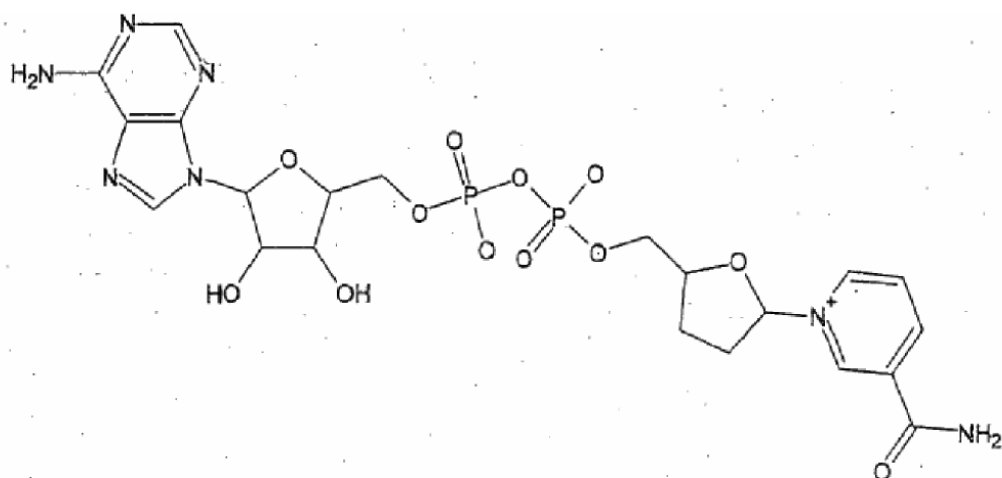
Borano carba-NAD



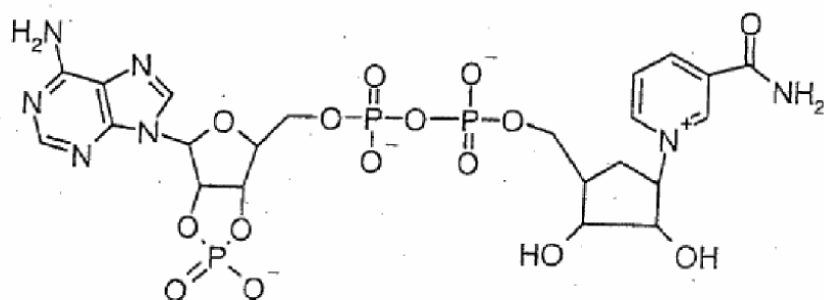
Ciclopentil NAD



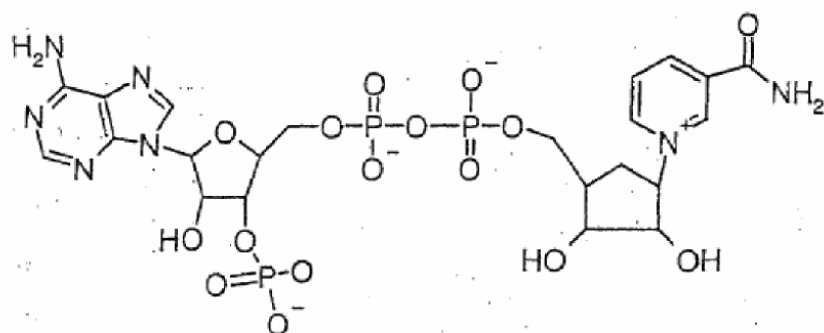
Pirrolil NAD



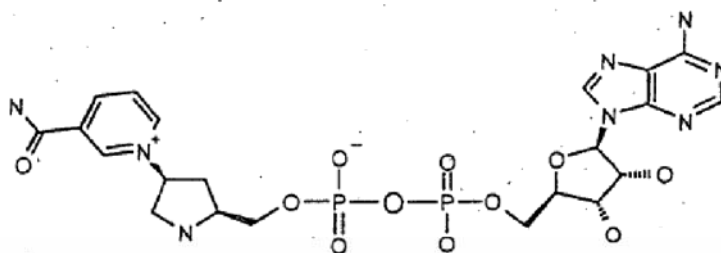
Furanil NAD



carba NADciclofosfato



carba NADP



Pirrolidinil NAD

Las detecciones bioquímicas de analitos, por ejemplo, parámetros en líquidos corporales, tales como, por ejemplo sangre, suero, plasma u orina, o en muestras de aguas residuales o alimentos, desempeñan un papel importante en el diagnóstico. A este respecto, se pone en contacto el analito que va a determinarse con una enzima adecuada y una coenzima.

Como analitos puede determinarse cualquier sustancia biológica o química que puede detectarse mediante una reacción redox, por ejemplo sustancias en cuyo caso se trata de sustratos de una enzima dependiente de coenzima o de las propias enzimas dependientes de coenzima. Son ejemplos preferidos de analitos glucosa, ácido láctico, ácido málico, glicerol, alcohol, colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutatión, péptidos, urea, amonio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidasa, creatina cinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH), dióxido de carbono, etc.

En el caso de la detección de sustratos de enzima, el elemento de ensayo contiene preferentemente, además de la coenzima, una enzima adecuada para la detección del sustrato. Son enzimas adecuadas, por ejemplo, deshidrogenasas, seleccionadas de una glucosa deshidrogenasa (E.C.1.1.1.47), lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37), glicerol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.1), alfa-hidroxiacetato deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa o aminoácido deshidrogenasa, por ejemplo L-aminoácido deshidrogenasa (E.C. 1.4.1.5). Otras enzimas adecuadas son oxidasas, tales como, por ejemplo, glucosa oxidasa (E.C.1.1.3.4) o colesterol oxidasa (E.C.1.1.3.6) o aminotransferasas, tales como, por ejemplo, aspartato o alanina aminotransferasa, 5'-nucleotidasa o creatina cinasa.

En el caso de la detección de enzimas, el elemento de ensayo contiene preferentemente, además de la coenzima, un sustrato de enzima adecuado para la detección de la enzima.

El cambio de la coenzima, es decir, del compuesto, mediante reacción con el analito (cuando el analito es un sustrato de enzima) o mediante una reacción catalizada con analito (cuando el analito es una enzima) puede detectarse, en principio, de cualquier manera. En este caso pueden utilizarse en principio todos los métodos conocidos por el estado de la técnica para la detección de reacciones enzimáticas. Sin embargo, preferentemente se detecta el cambio de la coenzima mediante métodos ópticos. Los métodos ópticos de detección comprenden, por ejemplo, la medición de absorción, fluorescencia, dicroísmo circular (CD), dispersión óptica rotatoria (ORD), refractometría, etc. De manera especialmente preferente, el cambio de la coenzima se detecta mediante medición de la fluorescencia. La medición de la fluorescencia es altamente sensible y permite la detección de concentraciones incluso reducidas del analito en sistemas miniaturizados.

Para la detección de un analito se usa un ensayo en seco, estando aplicado el reactivo sobre un soporte, una tira de ensayo. El soporte puede comprender, por ejemplo, una tira de ensayo, que comprende un material absorbente y/o hinchable, que se humedece por el líquido de muestra que va a someterse a ensayo.

No obstante, como reactivo de detección puede usarse también una matriz de gel con un complejo de enzima-coenzima incluido en la misma (véase el documento DE 102 218 45 A1).

La enzima puede o bien incluirse por polimerización en la matriz, en este caso, junto con el compuesto de acuerdo con la invención, o bien la matriz puede ponerse en contacto después de la polimerización en presencia de la enzima con una solución de la coenzima, de modo que se forma el complejo de enzima-coenzima correspondiente.

Otro objeto descrito en este caso comprende un kit de reactivos así como su uso para la detección de analitos. El kit de reactivos puede contener un compuesto de acuerdo con la invención, una enzima adecuada así como un tampón

de reacción adecuado. Ya se han descrito enzimas adecuadas. El kit de reactivos de acuerdo con la invención es de uso múltiple y puede usarse para la determinación de analitos, tales como, por ejemplo, glucosa, ácido láctico, ácido málico, glicerol, 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 de acuerdo con la invención y glucosa deshidrogenasa (E.C.1.1.1.47) para la detección de glucosa en la sangre.

El kit de reactivos puede usarse para la detección de un analito en un ensayo de líquido o en seco.

Otro objeto descrito en este caso comprende una tira de ensayo para la detección fluorométrica o fotométrica de un analito. Una tira de ensayo de este tipo contiene un compuesto, tal como se indicó anteriormente, como coenzima y una enzima adecuada o un sustrato de enzima inmovilizado sobre un material absorbente y/o hinchable. Los materiales adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, de celulosas, plásticos, etc.

Otro objeto de la presente invención comprende un procedimiento para la detección de un analito, que comprende las etapas:

- (a) poner en contacto una muestra con un elemento de ensayo de acuerdo con la invención, que comprende una coenzima y
- (b) detectar el analito, por ejemplo, por medio del cambio de la coenzima.

Otra ventaja de la invención consiste en que la emisión de fluorescencia de las coenzimas muestra un desplazamiento batocrómico, de modo que existe una pequeña interferencia con la emisión de fluorescencia de otros materiales del elemento de ensayo y/o de la muestra.

Todas las formas de realización preferidas representadas de un objeto de la presente invención han de aplicarse a los demás objetos de la invención, tales como, por ejemplo, formas de realización preferidas de los compuestos de acuerdo con la invención.

La invención se explicará en detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1
Representación del procedimiento de síntesis de carbaNAD (cNAD).

Figura 2
Representación de los resultados de la carga de NAD a 8 °C y 37 °C

Figura 3
Representación de los resultados de la carga de carbaNAD a 8 °C y 37 °C

Figura 4
Representación del procedimiento de síntesis de borano NAD mediante alquilación de ADP, con Y = BH₃ solo alquilación a beta-fosfato del ADP.

Figura 5
Representación del procedimiento de síntesis de pirrolidinil-NAD (pNAD). Además de las fórmulas estructurales se indican números de compuestos y rendimientos de las respectivas etapas de reacción.

Figura 6A/6B
Espectros de absorción de NAD y pNAD (Figura 6A) y NADH o pNADH (Figura 6B).

Figura 7:
Espectros de fluorescencia de NADH y pNADH como complejo de GlucDH (espectros de emisión)

Figura 8
Espectros de fluorescencia de NADH y pNADH como complejo de GlucDH (espectros de excitación)

Figura 9
Comparación de estabilidad de NAD y pNAD

Figura 10A/10B/10C
Espectros de absorción de NAD y cNAD (Figura 10A) o de NADH y cNADH (Figuras 10B y 10C)

Figura 11

Espectros de fluorescencia de NADH y cNADH como complejo de GlucDH

Ejemplos

Preparación experimental de derivados estables de NAD/NADH

La preparación de derivados estables de NAD/NADH se representa, a modo de ejemplo, con la preparación de carbaNAD (Compuesto 9, Figura 1) y pirrolidin-pNAD (Compuesto 18, Figura 5). Otros derivados pueden producirse con procedimientos de síntesis correspondientes. Los aminoalcoholes correspondientes como reactivos de partida se conocen por la bibliografía: 2-amino-1,4-anhidro-2,3-didesoxi-L-treo-pentitol: Huryn, Donna M.; Sluboski, Barbara C.; Tam, Steve Y.; Todaro, Louis J.; Weigle, Manfred. *Tetrahedron Letters* (1989), 30(46), 6259-62. 3-amino-, (1R,3S)-ciclopentanometanol, Beres, J.; Sagi, G.; Tomoskozi, I.; Gruber, L.; Gulacsi, E.; Otvos, L.: *Tetrahedron Letters* (1988), 29(22), 2681-4

A) Preparación de carbaNAD

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

En un matraz de fondo redondo de 1 l se añade a una solución de 22,5 g (167 mmol) de N-óxido de N-metilmorfolina en 80 ml de agua desionizada una solución de 16,4 g (147 mmol) de 1R-(-)-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-ona en 400 ml de acetona. Con enfriamiento con hielo se añaden, en el intervalo de 15 min, 15 ml (1,2 mmol) de una solución al 2,5 % de tetraóxido de osmio en *tert*-butanol. La mezcla se agita a continuación a temperatura ambiente durante una noche.

Los disolventes se separan por destilación en el rotavapor. Se agita con 100 ml y se separa por destilación de nuevo en el rotavapor. A continuación se disuelve en 600 ml de agua desionizada y se mezcla con 35 g de carbón activado. La mezcla se agita enérgicamente durante 1 h y entonces se filtra a través de un filtro de lecho profundo Seitz K 250. Del filtrado se separa por destilación el agua en el rotavapor. El producto se utiliza sin purificación adicional.

CF (gel de sílice Merck 60 F-254): éster etílico del ácido acético/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 de potasio en 400 ml de agua desionizada. Solución 3: disolver 0,3 g de ninhidrina en 10 ml de ácido acético glacial y añadir 90 ml de agua desionizada. Reactivo acabado: mezcla de solución 1 y 2 y adición de 6 ml de solución 3.

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

El producto bruto 1 se calienta hasta ebullición a reflujo durante 1 h en 200 ml de etanol absoluto. Después de la adición de 400 ml (3,26 mol) de dimetoxipropano y 250 mg (2,2 mmol) de clorhidrato de piridina se calienta hasta ebullición a reflujo la mezcla durante 15 min más. Después de la adición de 10 ml de solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio se concentra hasta sequedad la solución en el rotavapor al vacío. El residuo se mezcla con 500 ml de cloroformo, 150 ml de solución salina saturada y 75 ml de solución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y se transfiere a un embudo de decantación. Después de la extracción con agitación se deja reposar durante una noche, teniendo lugar la separación de fases.

La fase orgánica se separa y la fase acuosa se extrae dos veces más respectivamente con 200 ml de cloroformo. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio. Después de la separación por filtración del desecante, se separa por destilación el disolvente a presión reducida en el rotavapor. El producto bruto (24,9 g = 92 %) se utiliza sin purificación adicional.

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

III. 1R-(-)-4-N-*tert*-butiloxycarbonil-exo-cis-5,6-dimetilmetilen-dioxi-2-azabicyclo[2.2.1]heptan-3-ona (3)

A una solución de 24,9 g (135,7 mmol) de producto bruto 2 en 450 ml de cloroformo absoluto se añaden en atmósfera de argón 41,5 g (190 mmol) de dicarbonato de di-*tert*-butilo y 0,83 g (6,8 mmol) de 4-dimetilaminopiridina. La mezcla se calienta hasta ebullición a reflujo con agitación hasta que cesa el desprendimiento de gas. La mezcla se filtra a través de una columna, que está cargada con 40 g de gel de sílice 60 y equilibrada con cloroformo. Se lava con 100 ml de cloroformo. A partir del filtrado se separa por destilación el disolvente a presión reducida en el rotavapor. El producto bruto se seca durante 60 min a 1,00 MPa (10 mbar) y 40 °C. Se utiliza sin purificación adicional.

CF (gel de sílice Merck 60 F-254): éster etílico del ácido acético/hexano 3:2 $R_f = 0,85$. Tinción con TDM/revelado en cámara de cloro).

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

A temperatura ambiente se disuelve el producto bruto 3 con agitación en 400 ml de tetrahidrofurano y se añaden 80 ml de agua desionizada. Después de enfriar hasta 4 °C se añaden, de una vez, 5,3 g de borohidruro de sodio y se agita durante una noche, pudiendo calentarse la mezcla lentamente hasta temperatura ambiente. Se añaden 100 ml de etanol y se agita durante 6 h a temperatura ambiente. Los disolventes se separan por destilación a presión reducida en el rotavapor. Se añaden 300 ml de solución salina saturada y 650 ml de éster acético y se transfieren a un embudo de decantación. La fase orgánica se separa y la fase acuosa se lava de nuevo con 350 ml de éster acético. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato de magnesio. Después de la separación por filtración del desecante se separa por destilación el disolvente a presión reducida en el rotavapor. El producto bruto (42,2 g) se purifica por medio de cromatografía en columna y gel de sílice 60 (columna, h = 93 cm, d = 10 cm) eluyente THF/hexano 1:3, entonces THF/hexano 2:3) caudal 3 l/h. Se recogen fracciones de 40 ml. Las fracciones se controlan con CF (gel de sílice Merck 60 F-254: éster etílico del ácido acético/hexano 3:2, $R_f = 0,45$. Tinción con TDM/revelado en cámara de cloro). De las fracciones de producto combinadas se separa por destilación el disolvente en el rotavapor al vacío, rendimiento: 24,9 g.

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

A 11,09 (38,6 mmol) 4 se añaden 8 ml de agua desionizada y entonces 80 ml de ácido trifluoroacético. Se agita intensamente durante 6 h a temperatura ambiente, formándose una solución clara, de color ligeramente amarillo. Se agregan 200 ml de agua desionizada y se evaporan el vacío en el rotavapor. Se agregan de nuevo 200 ml de agua desionizada y se evapora otra vez al vacío en el rotavapor. El producto bruto se disuelve en 100 ml de agua desionizada en el baño de ultrasonidos y se filtra. El filtrado se aplica a una columna de intercambio iónico Dowex 1X8 (100-200 de malla, forma OH) (15 x 4,9 cm) y se eluye con agua, eluyéndose el producto tras aproximadamente 150 ml en un volumen de 300 ml (pH 10,4). Las fracciones se controlan con CF (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). De las fracciones de producto combinadas se separa por destilación el disolvente en el rotavapor al vacío, rendimiento: 5,2 g de aceite incoloro.

VI. Sal de Zincke de la nicotinamida (6)

En atmósfera de nitrógeno se funden 58,6 g de dinitroclorobenceno y entonces se añaden a la masa fundida 29,32 g de nicotinamida. Se calienta durante 2,5 h a 110 °C. Mediante un condensador de reflujo se añaden 500 ml de una mezcla de etanol/agua 3:2 (v/v) y se calienta hasta ebullición a reflujo hasta que se genera una solución. Después de agitar durante una noche a temperatura ambiente se añaden 150 ml de etanol al 50 %/agua y 100 ml de agua, se transfiere a un embudo de decantación y se lava tres veces respectivamente con 500 ml de cloroformo. La fase acuosa separada se mezcla con 300 ml y 50 g de carbón activado, se agita durante 1 h a temperatura ambiente y entonces se filtra a través de un filtro de lecho profundo Seitz K 700. El filtrado se concentra en el rotavapor al vacío hasta aproximadamente 100 ml, no debiendo aumentar la temperatura del baño por encima de 20 °C. Se diluye con 300 ml de agua y se añaden con agitación a temperatura ambiente 70 g de tetrafluoroborato de sodio. El precipitado se recristaliza en metanol/agua. El cristalizado se separa por filtración con un poco de acetona y entonces se lava con éter de dietilo y se seca al alto vacío a 40 °C durante 24 h, rendimiento 21,1 g (23 %). Las fracciones se controlan con CF (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) = carba-nicotinamidamono-nucleósido = carbaNMN

Con agitación a temperatura ambiente se añade gota a gota una solución de 4,5 g (31 mol) de ciclopentilamina 5 en 110 ml de metanol absoluto en el intervalo de 90 min a una solución de 15,3 g (40,7 mmol) de la sal de Zincke 6 en 110 ml de metanol absoluto. Se añade 1 ml de diisopropiletilamina y entonces se agita durante dos días a temperatura ambiente. Se añaden 500 ml de agua, se transfieren a un embudo de decantación y se lava dos veces respectivamente con 200 ml de cloruro de metileno. A partir de la fase acuosa separada se separa por destilación el agua en el rotavapor al vacío. El residuo se recoge en 100 ml de agua y se purifica por medio de cromatografía en columna Sephadex C25 (forma Na⁺): columna 70 x 7,5 cm, elución de tampón A (agua desionizada) en tampón B) NaCl 0,35 M en agua, caudal 200 ml/h. Se recogen fracciones de 15 ml y se controlan con CF (gel de sílice Merck 60 F-254: butanol/ácido acético glacial/agua 5:2:3 $R_f = 0,22$).

De las fracciones de producto combinadas se separa por destilación el disolvente en el rotavapor al vacío. El residuo que contiene sal se extrae por ebullición con 500 ml de etanol caliente. Se filtra en caliente y se deja reposar durante 12 h a temperatura ambiente. El precipitado se separa por filtración y del filtrado se separa por destilación el disolvente al vacío en el rotavapor. Rendimiento 7 g.

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

A una suspensión de 7 g (27,7 mmol) de carba NMN en 80 ml de éster trimetílico del ácido fosfórico anhidro se añade a 0 °C una mezcla de 20 ml de oxiclورو de fósforo y 50 ml de éster trimetílico del ácido fosfórico. Se agita durante 2 h a 0 °C y entonces durante 2 h a temperatura ambiente. Con enfriamiento con hielo se añaden 300 ml de agua y la mezcla se concentra en el rotavapor al vacío hasta 10 ml. Se recoge en 100 ml de agua, se filtra y se purifica por medio de cromatografía en columna en Sephadex C25 (forma NET3H^+): columna 66 x 9 cm, elución de tampón A (agua desionizada) en tampón B) 0,60 M de acetato de amonio, caudal 200 ml/h. Se recogen fracciones de 15 ml y se controlan con CF (placas de gel de sílice Merck 60 F-254: ácido isobutírico/amoniaco/agua 66:1:33, R_f 0,25). De las fracciones de producto combinadas se separa por destilación el disolvente en el rotavapor al vacío. 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 temperatura ambiente se añade gota a gota en el intervalo de 1 h una solución de 1,25 g (30 mmol) de AMP morfolidato en 40 ml de DMF absoluta a una mezcla de una solución de 3,31 g (10 mmol) de carbaNMN-monofosfato en 40 ml de DMF absoluta y 78 ml (39 mmol) de tetrazol al 3,5 % en acetonitrilo absoluto. La mezcla se agita durante 2 días a temperatura ambiente.

Con enfriamiento con hielo seco/acetona se ajusta el pH a 6,5 con una solución acuosa de KHCO_3 al 10 %. Se diluye con 500 ml de agua y se concentra al vacío en el rotavapor con cuidado hasta sequedad. El residuo se disuelve en 150 ml de agua desionizada y se purifica por medio de cromatografía en columna en Sephadex QAE 25 (forma NET3H^+): columna 65 x 4,5 cm. Elución de tampón A (agua desionizada) en tampón B) carbonato de trietilamonio 1 M, caudal 200 ml/h: Se recogen fracciones de 15 ml y se controlan con CF (placas de gel de sílice Merck 60 F-254: ácido isobutírico/amoniaco/agua 66:1:33, R_f 0,47).

De las fracciones de producto combinadas se separa por destilación el disolvente en el rotavapor al vacío El residuo se disuelve en 100 ml de agua y se liofiliza. Este procedimiento se repite tres veces. Rendimiento: 1,1 g.

Examen de estabilidad de carbaNAD

Una solución 10 mM de carbaNAD o NAD se carga a pH 8 en tampón fosfato de potasio 0,1 M. El contenido se determina después de 0,25, 75 y 175 h por medio de cromatografía HPLC.

Tampón A: KHPO_4 100 mM + hidrogenosulfato de tetrabutilamonio 10 mM, pH 6,9

Tampón B: tampón A + acetonitrilo 1:1

Caudal 1,0 ml/min detección: 254 nm

RP18 columna L 125 diámetro 4,6 mm

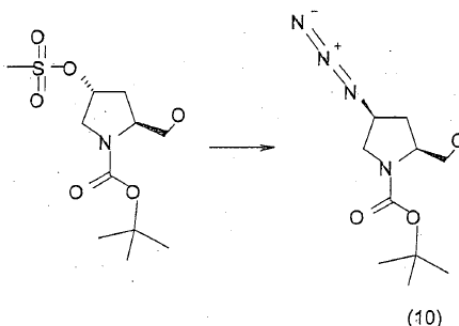
Gradiente: en 40 min mantener en el 35 % de tampón B, durante 2 min entonces en el intervalo de 3 min en el 0 % de tampón A

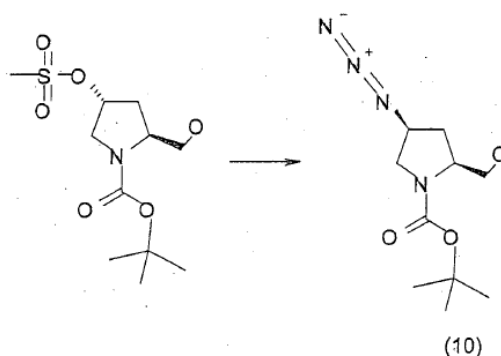
En las figuras 2 y 3 se representan los porcentajes de superficie de HPLC después de la carga en distintos momentos.

Mediante la aparición de productos de degradación (amida de ácido nicotínico, ADP-ribosa, AMP, ADP y los productos de degradación desconocidos para NAD así como los productos de degradación desconocidos Y1 e Y2 para cNAD) se muestra que cNAD es muy estable en comparación con NAD.

B) Preparación de pirrolidinil-NAD

I. Síntesis de pNAD, Paso 1 (Compuesto 10)





Se dispuso trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-profinol (35,4 g, 120 mmol) disuelto en 500 ml de DMF, se añadió azida de sodio (15,6 g, 240 mmol) disuelta en 75 ml de agua y se calentó durante 5 h a 70 °C. A continuación se agitó posteriormente durante una noche a temperatura ambiente, se vertió la mezcla en 1000 ml de solución salina saturada y se extrajo con éster acético. El éster acético se secó con Na₂SO₄ y a continuación se concentró por evaporación.

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

El producto bruto se continuó procesando directamente después de control de CF y EM. Para el control se realizó la cromatografía en capa fina sobre una placa KG 60 F254 (eluyente: éster acético/rociado con ninhidrina):

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

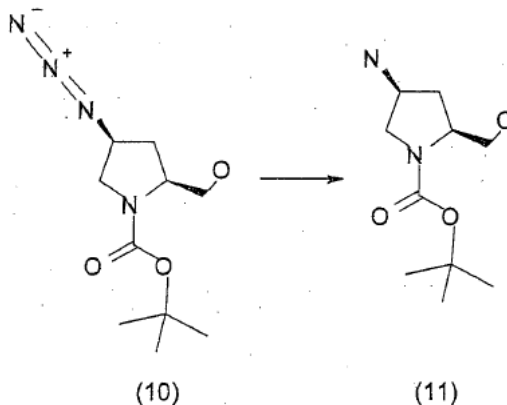
RF del producto 0,78

EM IEN EN+ 242

La identidad del producto se confirmó además mediante examen de RMN.

*trans-N-t-BOC-O-mesil-4-hidroxi-L-prolinol está disponible en el mercado en Sanochemia Pharmazeutika AG, N° de cat. P -719

II. Síntesis de pNAD, Paso 2 (Compuesto 11)



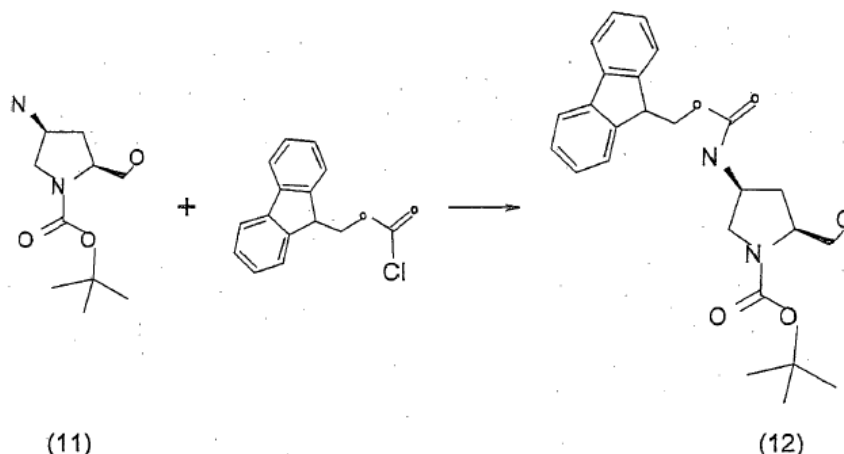
El compuesto 10 (120 mmol) se mezcló en 500 ml de metanol con 2,0 g de Pd-carbón (al 10 %) y se hidrogenó durante 12 h a 3 MPa (30 mbar). A este respecto se enjuagó el matraz de reacción varias veces con H₂, se aspiró el catalizador y se concentró por evaporación.

Se obtuvo un aceite incoloro (debido a la elevada sensibilidad al aire, debería continuar procesándose de inmediato).

EM IEN EN+217 presente

CF (isohexano/éster acético 1/1 / KG 254 F/ninhidrina): el producto permanece al inicio. La identidad del producto se confirmó además mediante examen de RMN.

III. Síntesis de pNAD, Paso 3 (Compuesto 12)



120 mmol del compuesto 11 (PM: 216,28) se mezclaron en 500 ml de dioxano con NaHCO_3 (11,0 g, 130 mmol) y cloruro de Fmoc (33,8 g, 130 mmol) y se agitaron durante una noche a temperatura ambiente. Las sales resultantes a este respecto se separaron por filtración, se concentró por evaporación la solución 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).

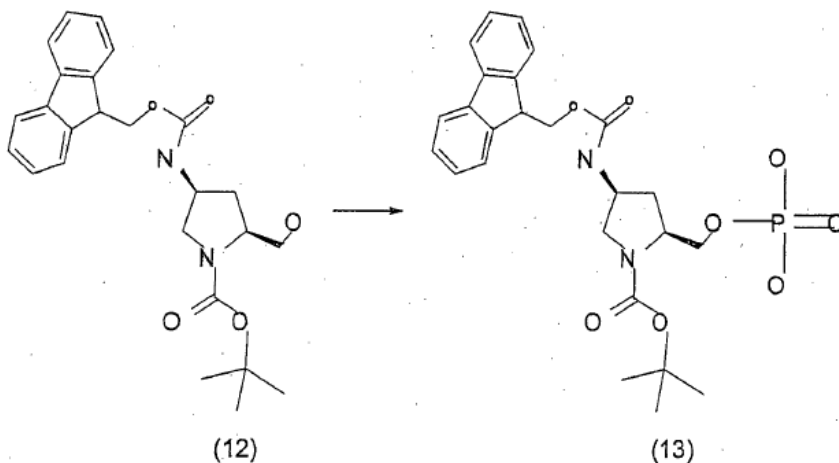
CF (KG 60 F254 eluyente isohexano/éster acético 2:1): RF 0,13

EM IEN EN + 439 / + 339

La identidad del producto se confirmó además mediante examen de RMN.

*Rendimiento se refiere al producto de partida del paso 1

IV. Síntesis de pNAD, Paso 4 (Compuesto 13)



El compuesto 12 del paso 3 (7,08 g, 16,1 mmol) se disolvió en 80 ml de fosfato de trimetilo y a continuación se enfrió en el baño de hielo hasta 0 °C. POCl_3 mezclado con fosfato de trimetilo (13 ml de POCl_3 recién destilado en 13 ml de fosfato de trimetilo) se puso en un embudo de goteo y se añadió en atmósfera de argón en el intervalo de 20 min por porciones. La temperatura aumentó en una reacción exotérmica hasta 5 °C. A continuación se añadieron 2,6 ml de piridina y se agitó posteriormente durante 40 min a 0 °C y en atmósfera de argón.

La solución de reacción se añadió gota a gota con cuidado a 800 ml de solución enfriada con hielo de hidrogenocarbonato de trietilamonio 1 M (pH = 8). Después de la adición completa se agitó todavía durante 1 h más. La solución ligeramente turbia se añadió gota a gota a continuación sobre 1 l de solución saturada de NaCl (rápidamente). Para una mejor cristalización se agitó posteriormente durante una noche. El precipitado se separó por filtración. El residuo se desaló a través de una columna de Diaion. Para ello se añadieron 500 g de Diaion en isopropanol/agua 1/1 y se dejó hinchar durante una noche. Se cargó Diaion en la columna y se enjuagó con agua. El residuo se suspendió en 100 ml de agua pH 3,5 (ácido acético), a continuación se aplicó a una columna y se enjuagó con agua (pH 3,5) hasta que estuviera libre de cloruro de sodio. Entonces se eluyó la sustancia a partir de la

columna con isopropanol al 25 % (pH 3,5). La solución se concentró por evaporación al alto vacío a temperatura ambiente.

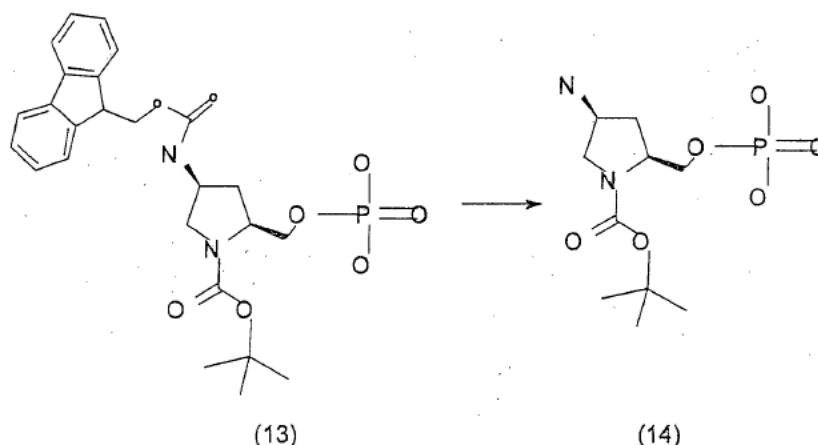
Residuo = 2,6 g = 31,3 %

CF RP8 F254 / MeOH / agua 9/1

EM IEN EN - 517,13

La identidad del producto se confirmó además mediante examen de RMN.

V. Síntesis de pNAD, Paso 5 (Compuesto 14)



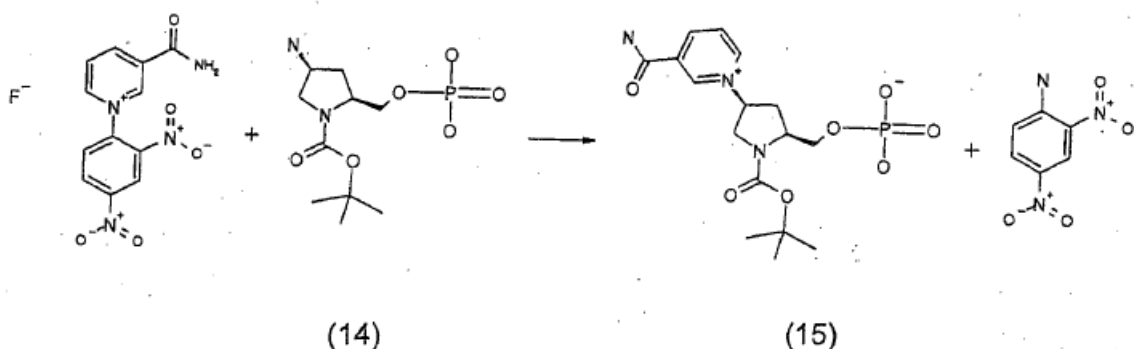
Una mezcla del compuesto 13 del paso 4 (4,10 g, 7,9 mmol) en 250 ml de metanol y 83 ml de amoníaco al 25 % se agitó durante una noche a temperatura ambiente y se concentró por evaporación a temperatura ambiente al vacío. El residuo se recogió en 200 ml de agua y se agitó 3 x con 100 ml de éster acético. Las partes insolubles se separaron por filtración, la fase acuosa clara se separó y se concentró de nuevo por evaporación a temperatura ambiente.

Residuo = 2,56 g = 100 %

EM IEN EN - 295

Para eliminar los cationes NH_3 se disolvió el residuo 2 x en base de Hünig y se concentró por evaporación al alto vacío en cada caso de nuevo

VI. Síntesis de pNAD, Paso 6 (Compuesto 15)



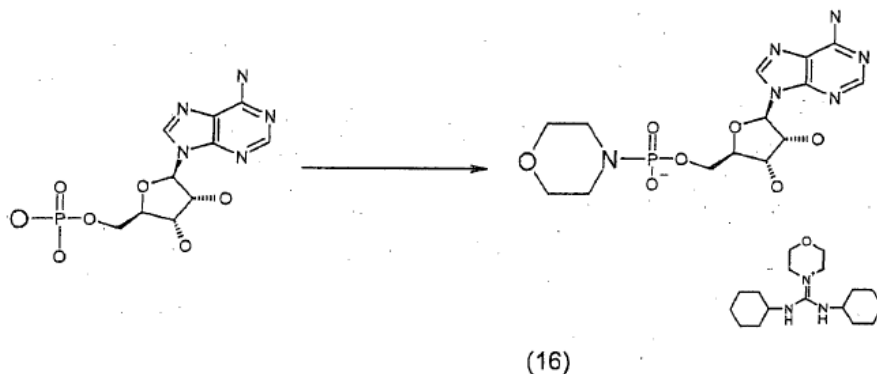
Se dispuso previamente sal de Zinke (2,66 g, 8,99 mmol) disuelta en 50 ml de metanol y se añadió gota a gota con agitación el compuesto 14 del paso 5 (2,56 g, 8,31 mmol) disuelto en 50 ml de metanol. La mezcla tomó color rojo y pasó a solución poco a poco. Se agitó posteriormente durante una noche a temperatura ambiente y se separó por filtración el precipitado formado. El filtrado se concentró por evaporación al vacío, se recogió en 100 ml de agua y se extrajo con éster acético 3 x.

La fase de éster acético contenía el producto secundario dinitroanilina, la fase acuosa contenía producto y sal de Zinke restante. La fase acuosa se concentró por evaporación al vacío a temperatura ambiente y el residuo obtenido se mezcló con 10 ml de agua, se agitó durante 10 min en un agitador magnético y se separaron por filtración las partes insolubles. El producto permaneció disuelto. Esta solución se puso en una columna Diaion HP20 enjuagada

con agua (1000 ml) y se enjuagó 2 x con 1000 ml de agua. A continuación se enjuagó con agua/isopropanol al 5 % y se concentraron por evaporación las fracciones positivas (detectadas con CF RP8 MeOH/W 9/1) a temperatura ambiente. El residuo se trituró con isopropanol y se aspiró con ayuda de éter de dietilo.

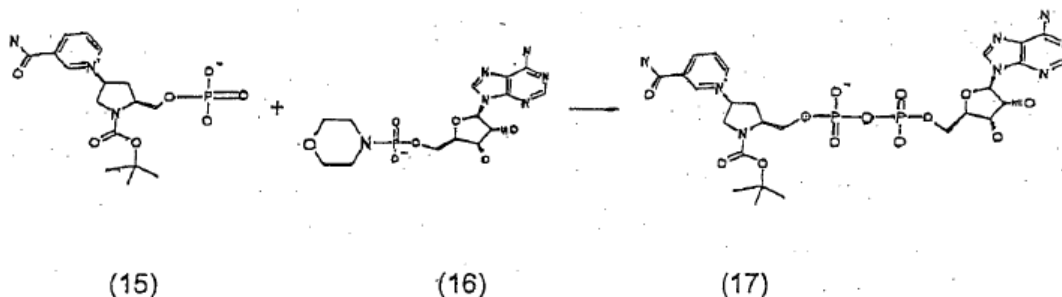
- 5 Residuo = 1,60 g = 47,9 %
 CF RP8 254 MeOH/W 9/1
 EM EN - 400,1 / EN + 402,0 - muestra también masa doble
 La identidad del producto se confirmó además mediante examen de RMN.

10 VIIa. Síntesis de pNAD, Paso 7a (Compuesto 16)



- 15 Una mezcla de AMP-ácido (adenosina monofosfato-ácido libre) (10 g, 27,5 mmol) en 60 ml de metanol (secado con sodio) y 5,3 ml (60 mmol) de morfolina (recién destilada) se agitó hasta que se formó una solución clara. A continuación se añadieron 17 g (82,5 mmol) de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y se agitó durante una noche a temperatura ambiente con eliminación de la humedad. El precipitado formado (DCH) se aspiró y el filtrado se concentró en el rotavapor a 30 °C. A continuación se agitó con 150 ml de H₂O/150 ml de éter de dietilo y de nuevo se filtró. Después de la separación de fases se extrajo la fase acuosa dos veces más respectivamente con 75 ml de éter de dietilo. La fase acuosa se concentró en el rotavapor a continuación a temperatura ambiente. El residuo se disolvió dos veces más en piridina y se trató en el rotavapor en cada caso de nuevo al alto vacío.
- 20

VII. Síntesis de pNAD, Paso 7 (Compuesto 17)



- 25 Una mezcla de AMP-morfolidato (compuesto 16 del paso 7a) (2,53 g, 3,61 mmol), compuesto 15 del paso 6 (1,60 g, 3,98 mmol), solución de MnCl₂ en formamida 0,2 M* (27,1 ml, 5,42 mmol) y MgSO₄ anhidro (0,87 g, 7,95 mmol) se agitó durante una noche a temperatura ambiente y después de ese tiempo había reaccionado en gran parte, tal como se determina por CF (RP8 MeOH/W 9/1). La mezcla de reacción se precipitó con acetonitrilo y se aspiró.
- 30

Residuo = 5,3 g (teórico 2,64 g)**

EM, IEN EN - 729,3 = producto, EN -415 = catión de AMP-morfolidato, EN

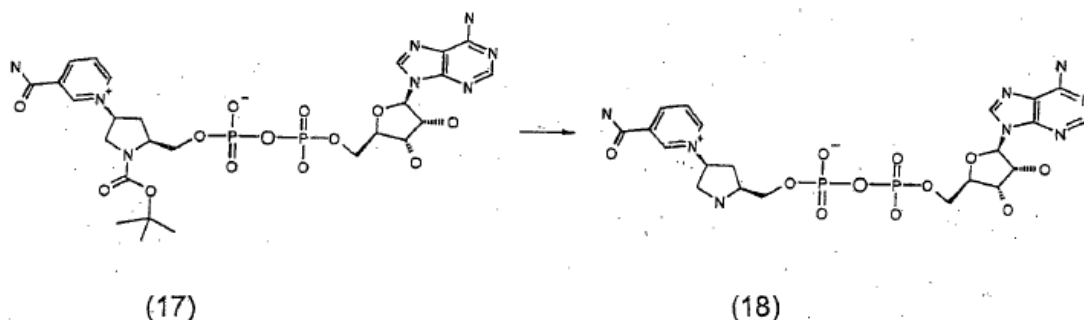
-400,2/EN +402,1 restos de compuesto 15 (paso 6)

- 35 CF RP 8 F254 RF 0,085

*Para la preparación de esta solución se disolvieron 2516 mg de MnCl₂ anhidro con agitación en 100 ml de formamida al 99,99 % y a continuación se mezcló con tamiz molecular 4A.

- 40 **El residuo se continuó procesando como producto bruto.

VIII. Síntesis de pNAD, Paso 8 (Compuesto 18, pirrolidinil-NAD)



500 mg de compuesto 17 del paso 7 (producto bruto, contiene aproximadamente un 50 % de sales) se mezclaron con 5,0 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente y a continuación se concentró por evaporación. Como residuo resultaron aproximadamente 500 mg de aceite incoloro.
EM IEN EN - 729,24 (adición de NH_3 necesaria)

La purificación tuvo lugar en 2 porciones de 200 mg y 300 mg en cada caso en 2 etapas de separación:

1ª Etapa de separación:

Columna Fraktogel EMD SO3- s: D (interno) = 14 mm L (relleno) = 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) añadir 200 mg de sustancia disueltos en 5 ml de H_2O
- b) eluido con gradiente de $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ solución 0,2 M de NH_4HCO_3 (Eluyente A = 250 ml de H_2O dispuestos en matraz Erlenmeyer y agitados en agitador magnético, bombeados con 5 ml/min en columna, Eluyente B = solución 0,2 M de NH_4HCO_3 , bombeada con 2,5 ml/min a A.)

III. Fraccionamiento:

- a) fracciones en cada caso de 3 ml
- b) 1^{er} pico impurezas
- c) 2^o pico después de aproximadamente 70 ml de fase de cabeza de sustancia

IV. Reacondicionamiento:

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

2ª Etapa de separación:

Columna Diaion HP20, D (interno) = 30 mm L (relleno) 130 mm
eluida con 100 ml de H_2O y 100 ml de H_2O /isopropanol al 5 %

La sustancia viene ya con la fase acuosa, en la parte de isopropanol queda solo impureza.

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 de pirrolidinil-NAD (compuesto 18) se confirmó mediante exámenes de RMN.

Ensayo de glucosa deshidrogenasa para pNAD

Para examinar el papel de pNAD como cofactor para glucosa deshidrogenasa (GlucDH) se realizó un ensayo de actividad de glucosaDH en tampón Tris 0,1 M/NaCl 0,2 M (pH 8,5). La concentración de glucosa ascendía a 80 mM. Se utilizaron concentraciones de pNAD o como NAD de 0,05-0,5 mM. Para ello se añadieron 10 (pNAD) o 0,002 mg/ml (NAD), [83 o 0,017 μ M] de GlucDH. El ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente, siguiéndose la reacción enzimática mediante registro de espectros de absorción a intervalos temporales regulares. Los valores

indicados en la tabla 1 se refieren a una medición de la absorción después de 4 min.

Tabla 1

(p)NAD (mM)	U/ml	% de actividad	[GlucDH] usada
0,05 NAD	539	100	0,002 mg/ml
0,4 NAD	1556	100	0,002 mg/ml
0,05 pNAD	0,00017	0,00003	10 μ l 10 mg/ml
0,4 pNAD	0,0024	0,00015	10 μ l 10 mg/ml

Espectros de absorción de pNAD y pNADH

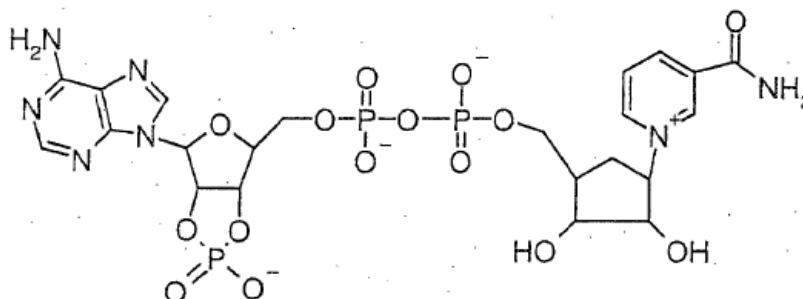
Se muestran espectros de absorción de NAD y pNAD o NADH y pNADH en las figuras 6A y 6B. NAD y pNAD muestran un máximo de absorción a 260 nm. pNADH, es decir pNAD tras ensayo de actividad de GlucDH, muestra, en comparación con NADH, un desplazamiento hacia el rojo del máximo de absorción de aproximadamente 10 nm (figura 6B).

En las figuras 7 y 8 se muestran asimismo espectros de fluorescencia de NADH y pNADH como complejo de GlucDH. Los espectros se registraron en cada caso tras el ensayo de actividad de GlucDH. La figura 7 muestra espectros de emisión de complejos NADH/pNADH-GlucDH a longitudes de onda de excitación de 340 o 370 nm. Los espectros de emisión de NADH y pNADH a longitudes de onda de excitación de 370 nm son similares. La figura 8 muestra un espectro de excitación para un complejo de NADH/pNADH-Gluc-DH a una longitud de onda de emisión de 460 nm. pNADH muestra, a este respecto, un espectro de excitación más ancho que NADH. Los espectros se registraron, a su vez, tras ensayos de actividad de GlucDH.

Examen de estabilidad de pNAD

Para examinar la estabilidad de pNAD en comparación con NAD se recogieron cantidades iguales de NAD y pNAD en cada caso en KPO_4 0,15 M, tampón NaCl 1 M (pH 7,0) y se incubaron a 50 °C. La descomposición de NAD o pNAD se siguió por HPLC. La figura 9 muestra el porcentaje de zona de superficie de las cantidades de (p)NAD en comparación con las cantidades de (p)NAD en tiempo cero. La figura muestra que pNAD es muy estable en comparación con NAD.

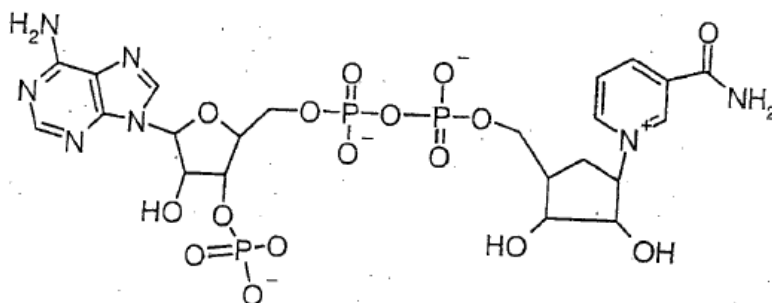
C) Preparación de carbaNADciclofosfato (19)



A 0,74 ml de una solución de cloruro de manganeso 0,2 en formamida absoluta se añadieron 79 mg (0,1 mmol) de O5'-(hidroximorfolino-fosforil)-O2',O3'-hidroxi-fosforil-adenosina, sal de ciclohexilamina del ácido N-ciclohexil-morfolin-4-carbonimídico dihidrato (secada mediante coevaporación con piridina (Morphaat y col. J. Am. Chem. Soc.; 83; 1961; 663-675), 44 mg (0,105 mmol) de carba-NMNmonofosfato y a continuación se añaden 25 mg de sulfato de magnesio seco. La mezcla se agitó durante 3 días en un recipiente de reacción cerrado en atmósfera de argón y a continuación se añadió con agitación a 10 ml de acetonitrilo. El precipitado se retiró mediante filtración, se purificó mediante cromatografía RP en una columna RP 18 Hypersil ODS, 250 x 21,2 mM, 5 μ m con el uso de un gradiente del 0 % de B al 100 % de B durante 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 supervisó mediante detección a 260 nm. La fracción principal se recogió y se liofilizó 5x, para retirar el acetato de trietilamonio. La sal de trietilamonio se convirtió con Dowex 50 WX2 en el ácido libre y a continuación en la sal de litio. Rendimiento: 10 mg.

5 D) Preparación de carbaNADP (20)



10 A una solución de 2,2 mg de carbaNADciclofosfato, sal de litio (19) en 1 ml de tampón bis-Tris-propano (0,02 M, pH 7,5) se añadieron en el intervalo de 6 h tres veces cuatro unidades de ribonucleasa T2 a 37 °C. La mezcla se mantuvo durante una noche a 37 °C. La enzima se desnaturalizó mediante calentamiento a 65 °C durante 20 min. Después de la filtración se llevó a cabo una purificación mediante cromatografía RP en una columna RP 18 Hypersil ODS, 250 x 21,2 mm, 5 µm con el uso de un gradiente del 0 % de B al 100 % de B durante 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 supervisó mediante la detección a 260 nm. La fracción principal se recogió y se liofilizó 5x para retirar el acetato de trietilamonio.

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

20 E) Ensayo de actividad de glucosa deshidrogenasa para cNAD

Tal como se describe en B) para pNAD, se llevó a cabo un ensayo de actividad de glucosa deshidrogenasa para cNAD en comparación con NAD. Para ello se utilizaron concentraciones de glucosa deshidrogenasa de 0,1 (cNAD) o 0,002 mg/ml (NAD), [0,83 o 0,017 µM]. Las cantidades utilizadas y los resultados se muestran en la tabla 2.

25

Tabla 2

(c)NAD (mM)	U/ml	% de actividad	[GlucDH] usada
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

30 Las figuras 10A, 10B o 10C muestran espectros de absorción de NAD y cNAD. Tanto NAD como cNAD presentan un máximo de absorción a 260 nm. La figura 10B muestra espectros de absorción de NADH y cNADH, registrándose los espectros en cada caso tras un ensayo de actividad de glucosa deshidrogenasa. El máximo de absorción de cNADH muestra un desplazamiento hacia el rojo de 20 nm. Otros espectros de absorción para NADH y cNADH se muestran en la figura 10C, en los que, tal como se indica en la leyenda, se seleccionaron diferentes condiciones para los correspondientes ensayos de actividad de glucosa deshidrogenasa.

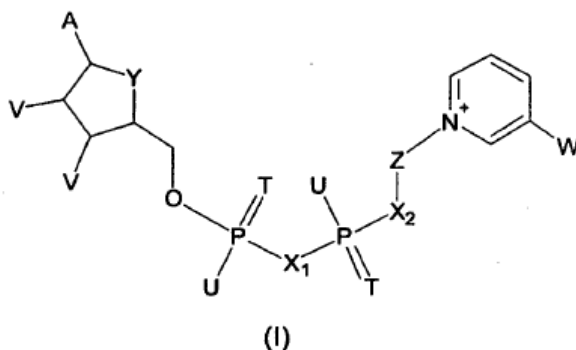
35

La figura 11 muestra asimismo espectros de fluorescencia de NADH y cNADH como complejo de GlucDH. Los espectros se registraron a una longitud de onda de excitación de 370 nm tras ensayo de actividad de glucosa deshidrogenasa. Tanto NADH como cNADH muestran, en el caso de un tratamiento con GlucDH, un aumento de la señal de fluorescencia.

40

REIVINDICACIONES

1. Elemento de ensayo para la determinación de un analito, que comprende (i) una enzima dependiente de coenzima o un sustrato para una enzima de este tipo y (ii) como coenzima un compuesto con la siguiente fórmula general (I):



con

A = adenina o un análogo de la misma,

T = en cada caso independientemente O, S,

U = en cada caso independientemente OH, SH, BH_3^- , BCNH_2^- ,

V = en cada caso independientemente OH o un grupo fosfato, donde, en el caso de que un resto V sea un grupo OH y el segundo resto V sea un grupo fosfato, el grupo OH y el grupo fosfato, con los átomos de carbono a los que están unidos, pueden formar un ciclo,

W = COOR , $\text{CON}(\text{R})_2$, COR , $\text{CSN}(\text{R})_2$ con R = en cada caso independientemente H o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$,

X_1 , X_2 = en cada caso independientemente O, CH_2 , CHCH_3 , $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, NH, NCH_3 ,

Y = NH, S, O, CH_2 ,

Z = un resto que comprende un grupo cíclico con 5 átomos de C, que contiene dado el caso un heteroátomo seleccionado de O, S y N así como dado el caso uno o varios sustituyentes y

un resto CR_4 , estando CR_4 unido al grupo cíclico y a X_2 , con

R_4 = en cada caso independientemente H, F, Cl, CH_3 ,

con la condición de que Z y el resto piridina no estén enlazados a través de un enlace glucosídico,

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

caracterizado por que

está configurado como ensayo en seco.

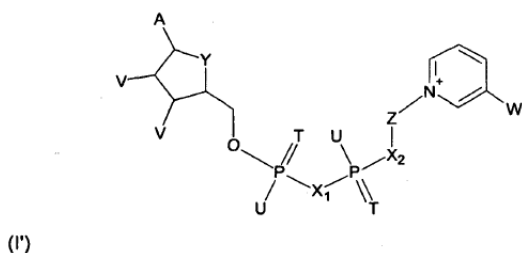
2. Elemento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 para la determinación de glucosa, que comprende una glucosa deshidrogenasa y, como coenzima, un compuesto de acuerdo con la fórmula general (I) o una sal del mismo.

3. Elemento de ensayo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2,

caracterizado por que

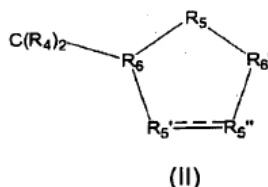
los sustituyentes en Z están seleccionados del grupo F, Cl así como alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$, dado el caso fluorado o clorado y/o sustituido con OH, O-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_2$.

4. Elemento de ensayo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende como coenzima un compuesto con la siguiente fórmula general (I'):



con

A = adenina o un análogo de la misma,
 T = en cada caso independientemente O, S,
 U = en cada caso independientemente OH, SH, BH₃⁻, BCNH₂⁻,
 V = en cada caso independientemente OH o un grupo fosfato,
 W = COOR, CON(R)₂, COR, CSN(R)₂ con R = en cada caso independientemente H o alquilo C₁-C₂,
 X₁, X₂ = en cada caso independientemente O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, NCH₃,
 Y = NH, S, O, CH₂,
 Z = un anillo de cinco miembros carbocíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, de fórmula general (II)



pudiendo existir entre R5' y R5'' un enlace simple o doble, con
 R4 = en cada caso independientemente H, F, Cl, CH₃,
 R5 = CR₄₂,
 cuando entre R5' y R5'' existe un enlace simple,
 R5' = O, S, NH, N-alquilo C₁-C₂, CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,
 R5'' = CR₄₂, CHOH, CHOCH₃,
 cuando entre R5' y R5'' existe un doble enlace,
 R5'=R5''= CR₄,
 R6, R6' = en cada caso independientemente CH, CCH₃,

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

5. Elemento de ensayo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 con
 W = CONH₂ o COCH₃.

6. Elemento de ensayo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5 en forma de una tira de ensayo.

7. Elemento de ensayo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6,
 caracterizado por que
 la enzima es una deshidrogenasa, seleccionada de una glucosa deshidrogenasa (E.C.1.1.1.47), lactato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28), malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37), glicerol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.6), alcohol deshidrogenasa (E.C.1.1.1.1), alfa-hidroxibutirato deshidrogenasa, sorbitol deshidrogenasa o aminoácido deshidrogenasa, tal como, por ejemplo, L-aminoácido deshidrogenasa (E.C.1.4.1.5).

8. Elemento de ensayo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7 para la detección de glucosa,
 caracterizado por que
 la enzima es glucosa deshidrogenasa.

9. Uso del elemento de ensayo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para la determinación de analitos seleccionados de glucosa, ácido láctico, ácido málico, glicerol, alcohol, colesterol, triglicéridos, ácido ascórbico, cisteína, glutatión, péptidos, urea, amonio, salicilato, piruvato, 5'-nucleotidasa, creatina cinasa (CK), lactato deshidrogenasa (LDH) y dióxido de carbono.

10. Procedimiento para la detección de un analito, que comprende las etapas

- (a) poner en contacto una muestra con un elemento de ensayo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una coenzima y
- (b) detectar el analito.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10,
 caracterizado por que
 la detección del analito se realiza mediante fotometría o fluorometría.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11,
 caracterizado por que
 la muestra es un líquido corporal, aguas residuales o un alimento.

Figura 1

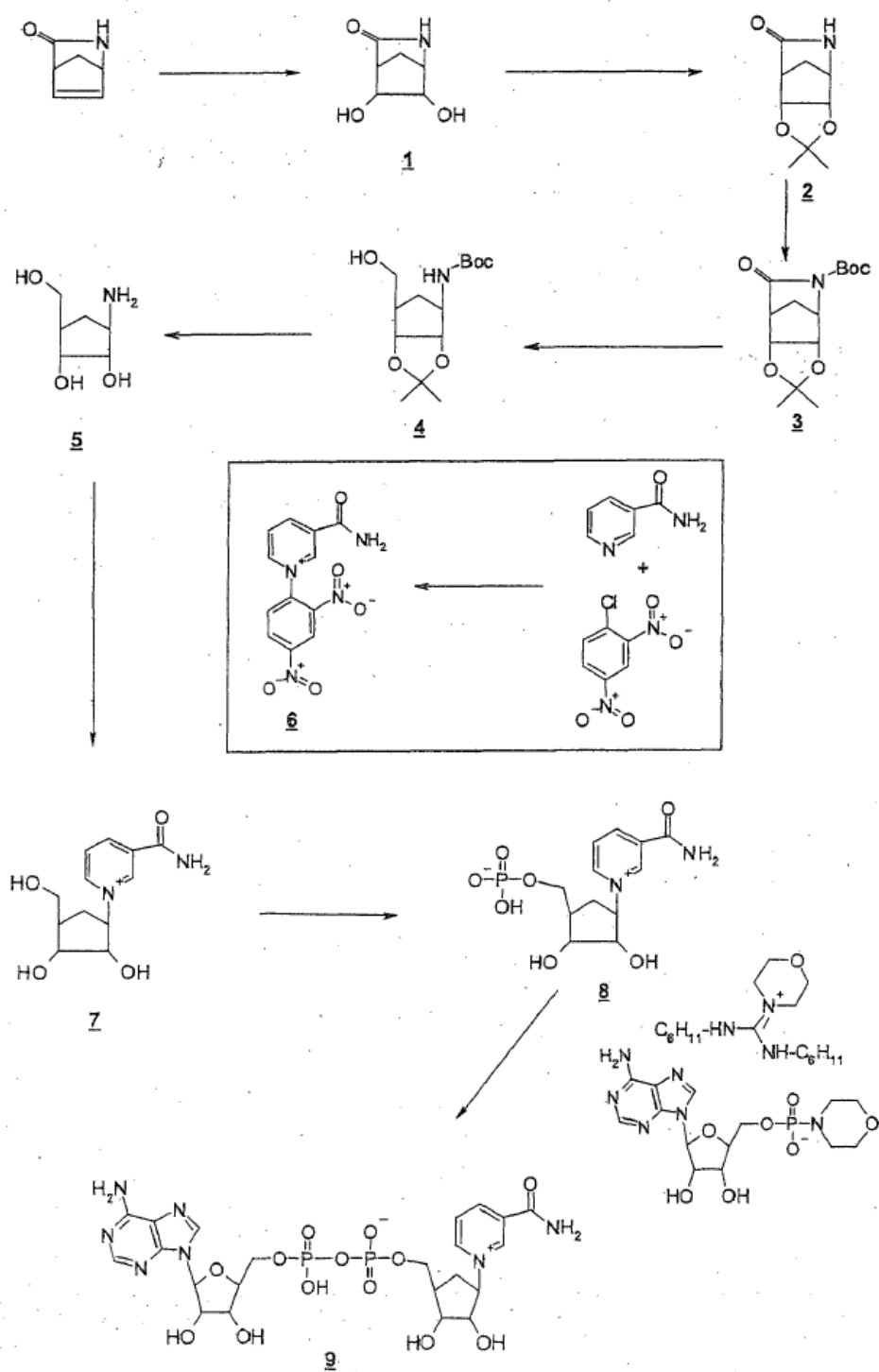


Figura 2

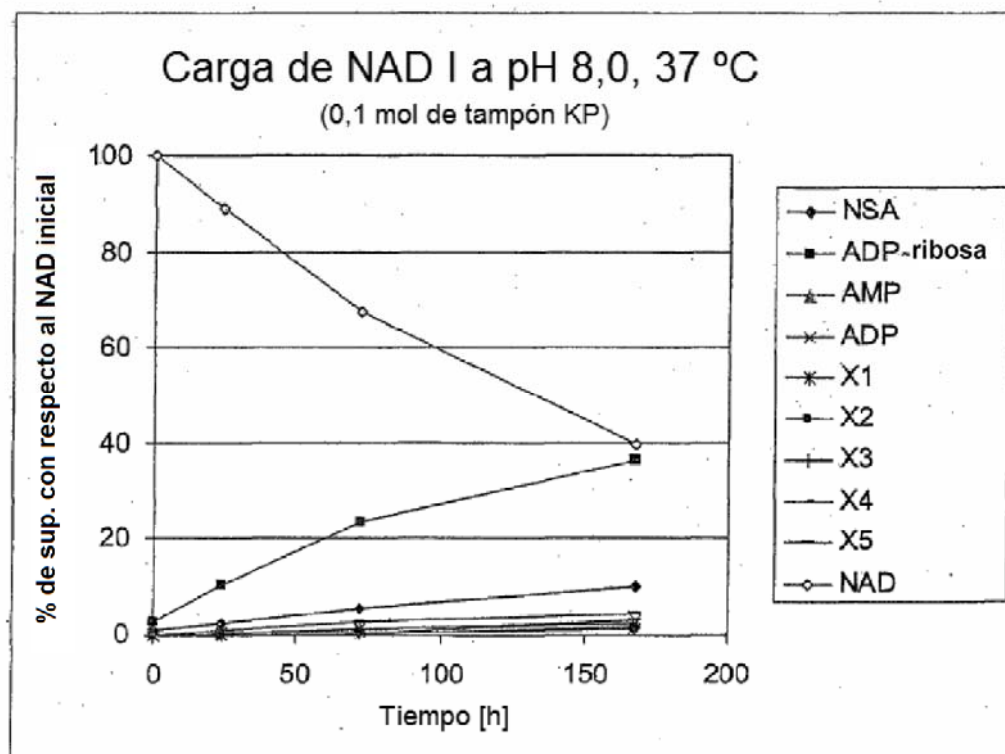


Figura 3

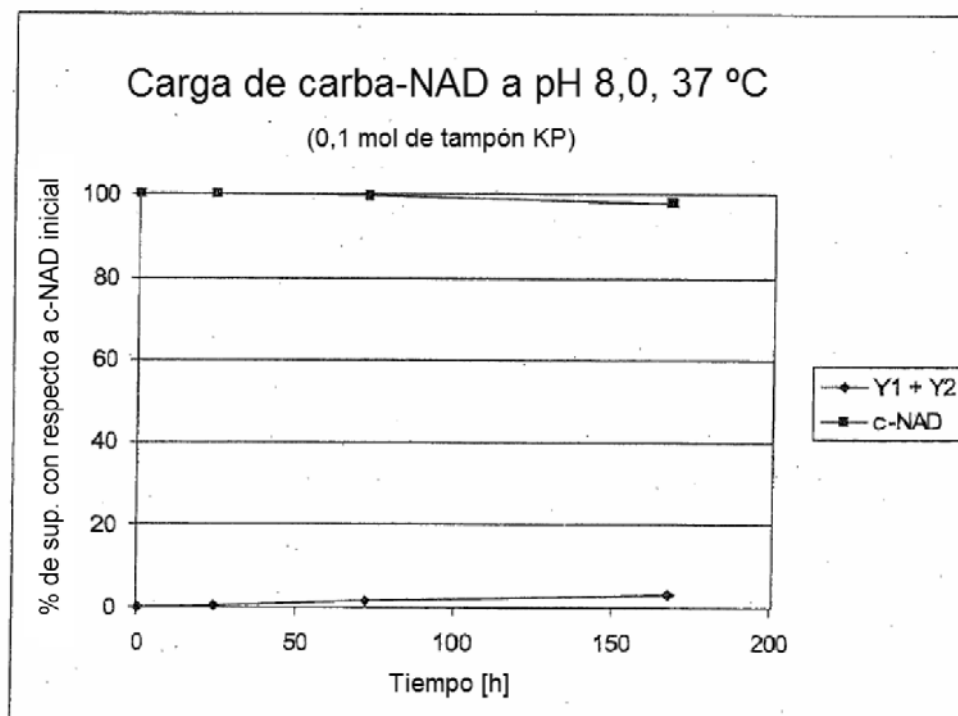


Figura 4

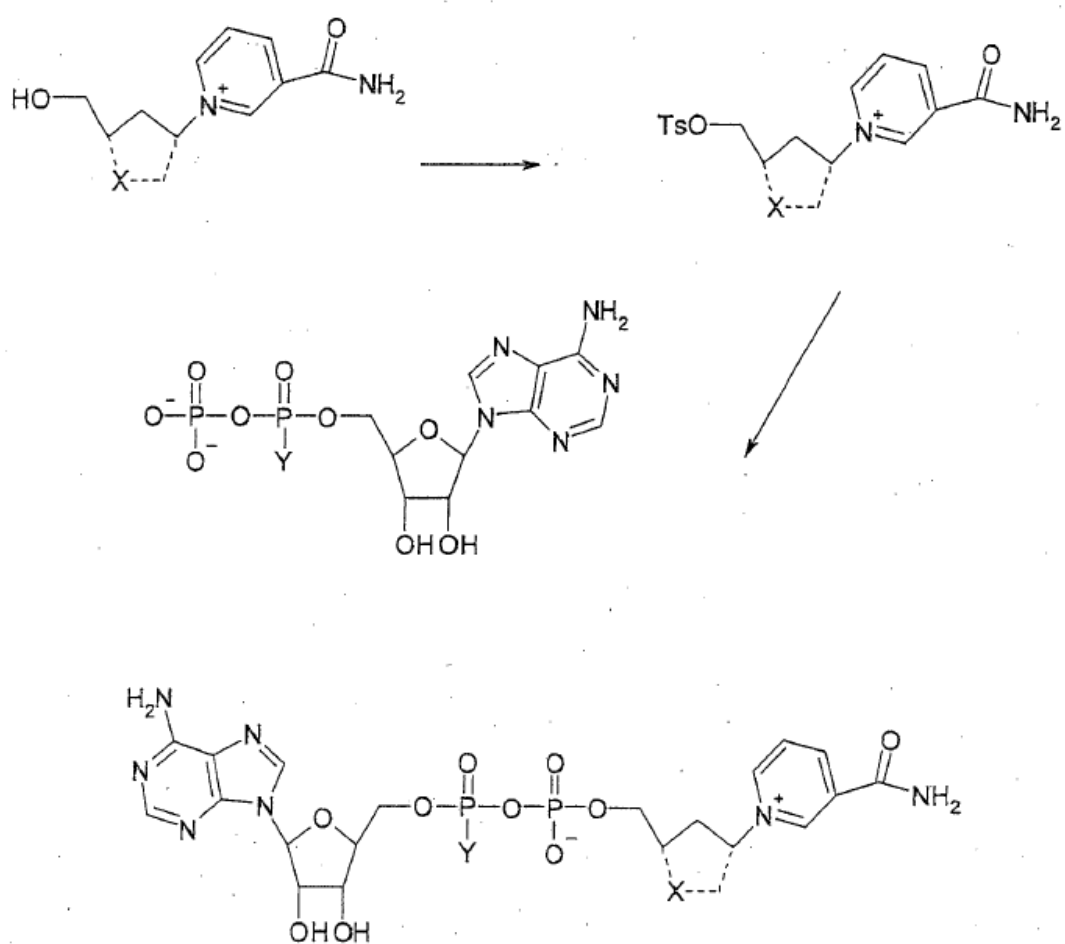


Figura 5

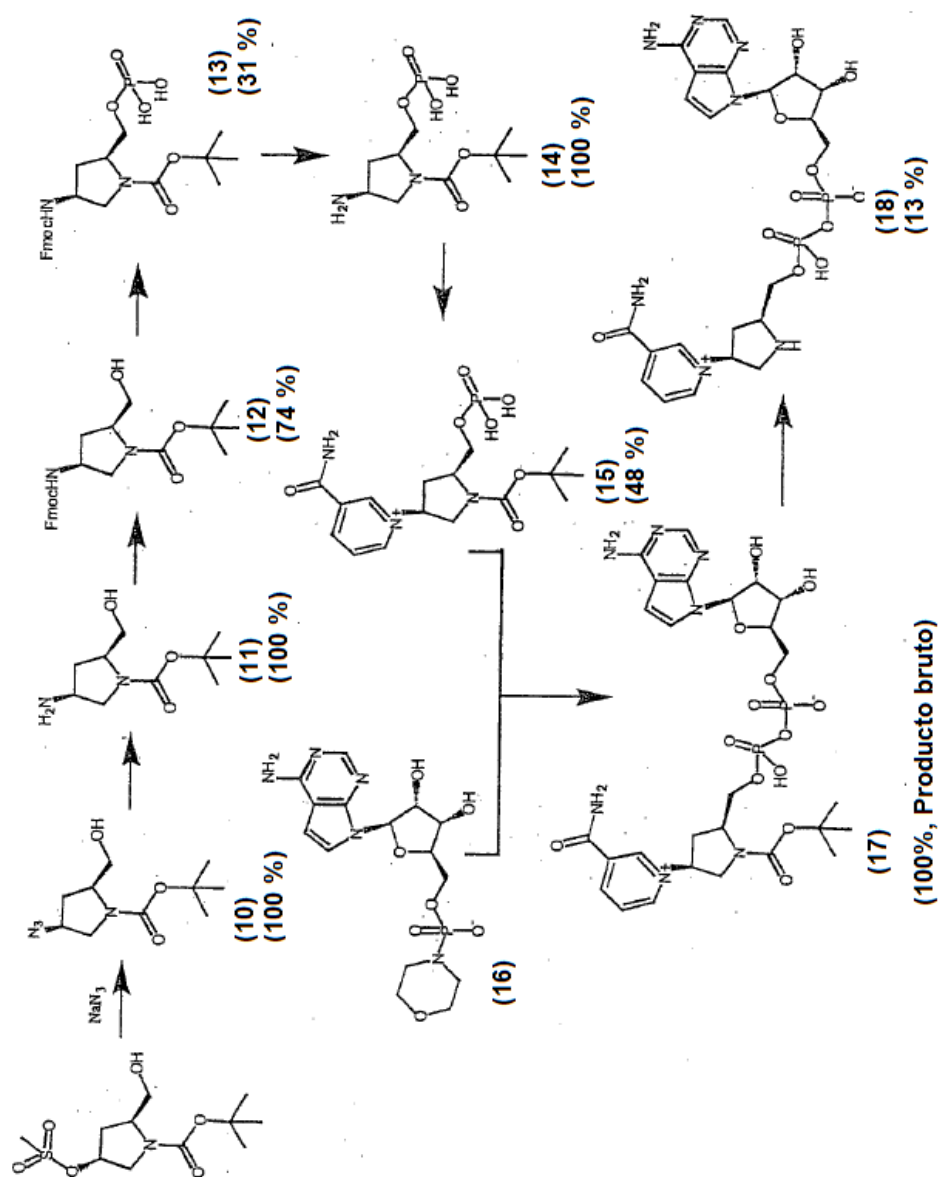


Figura 6A

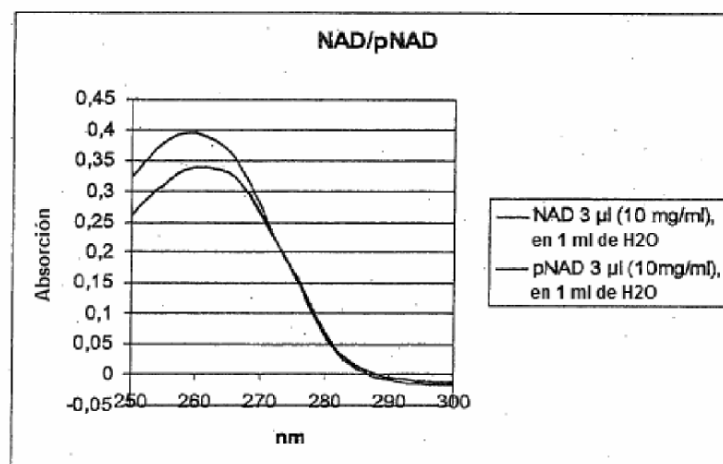


Figura 6B

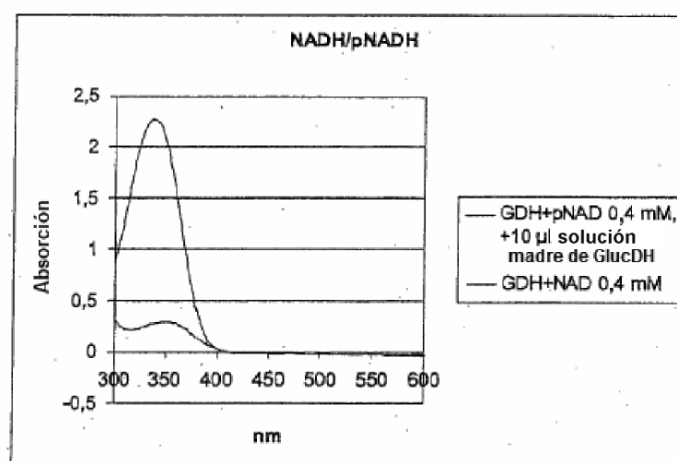


Figura 7

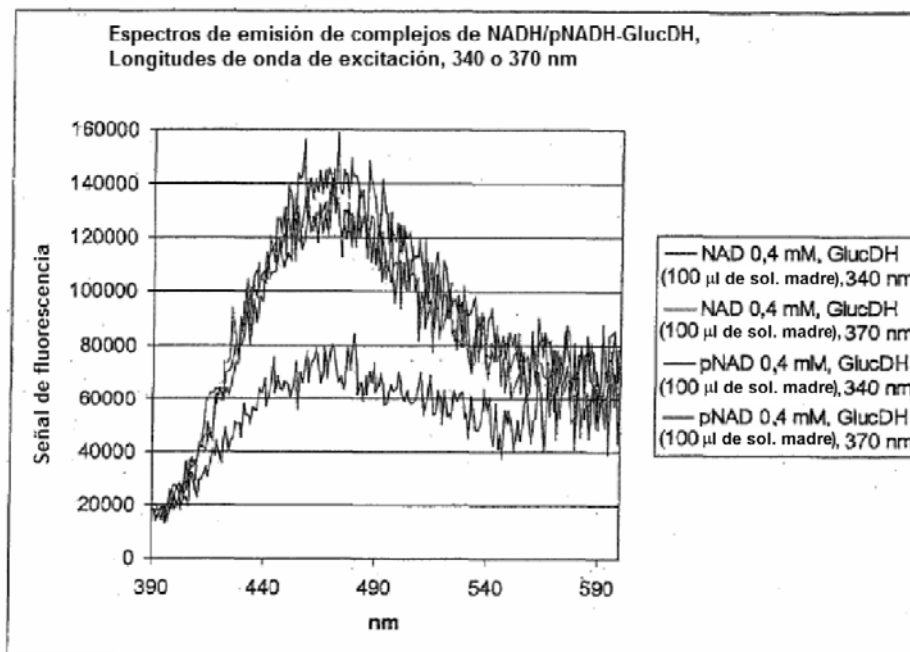


Figura 8

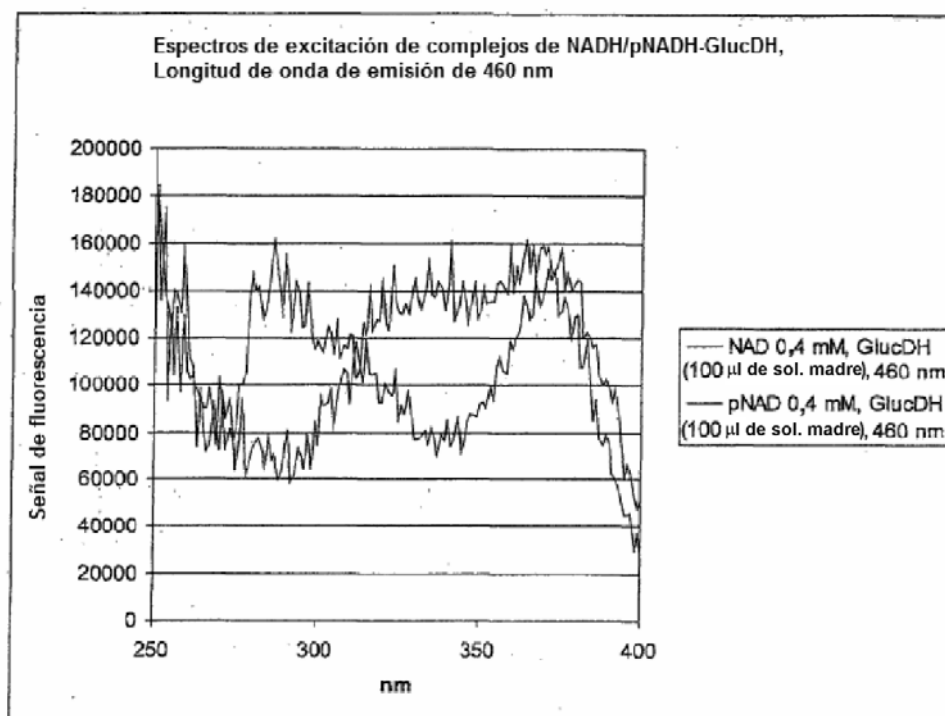


Figura 9

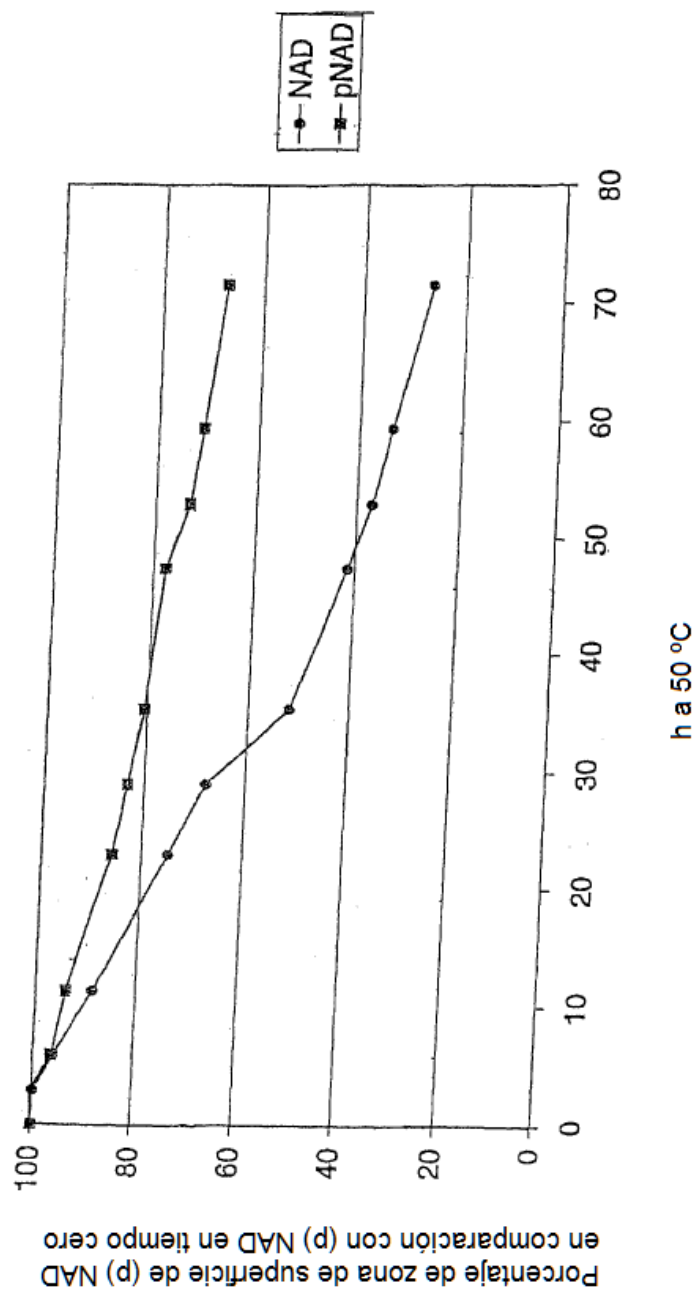


Figura 10A

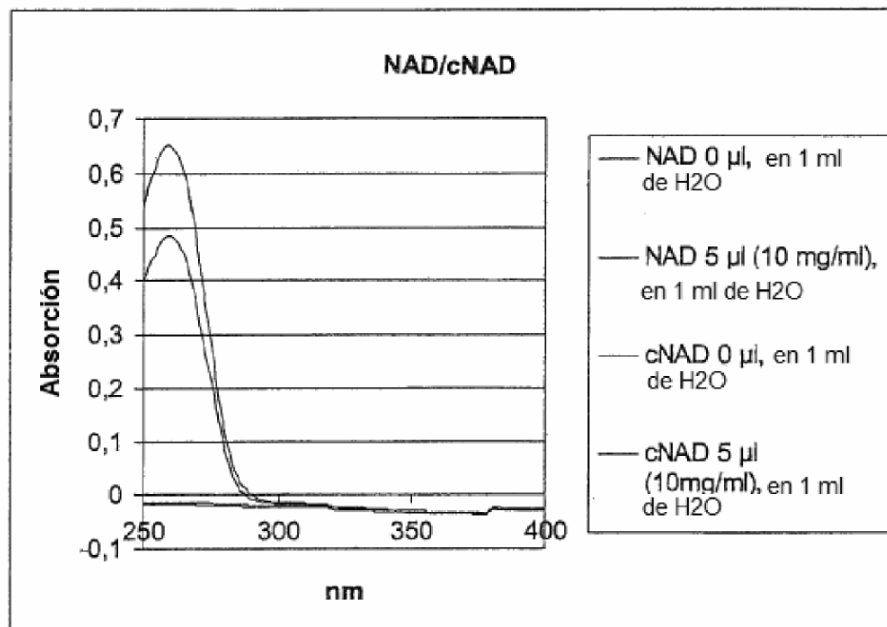


Figura 10B

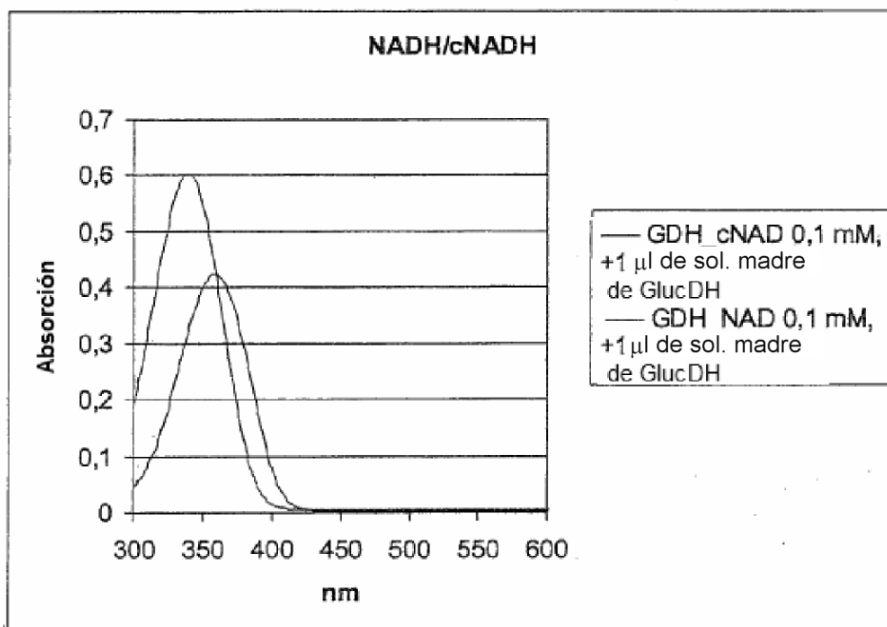


Figura 10C

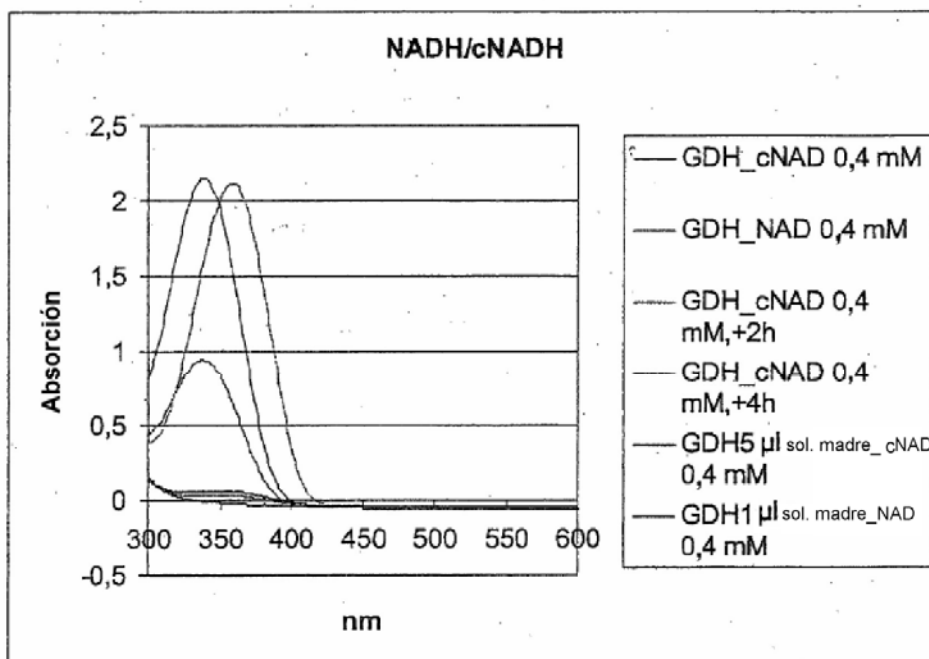


Figura 11

