

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 001 124**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 1/06 (2006.01)

C07H 19/048 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2021** **PCT/EP2021/075245**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.03.2022** **WO22058312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2021** **E 21766096 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024** **EP 4214217**

54 Título: **Métodos para producir ribósido dihidronicotinamida a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida**

30 Prioridad:

15.09.2020 US 202063078526 P

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

04.03.2025

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (50.00%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH y
CORNELL UNIVERSITY (50.00%)

72 Inventor/es:

ZAREI, AMIN;
KHAZDOOZ, LEILA;
ENAYATINOOK, MOJTABA;
MADARSHAHIAN, SARA;
ABBASPOURRAD, ALIREZA y
UFHEIL, GERHARD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 3 001 124 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

Métodos para producir ribósido dihidronicotinamida a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida

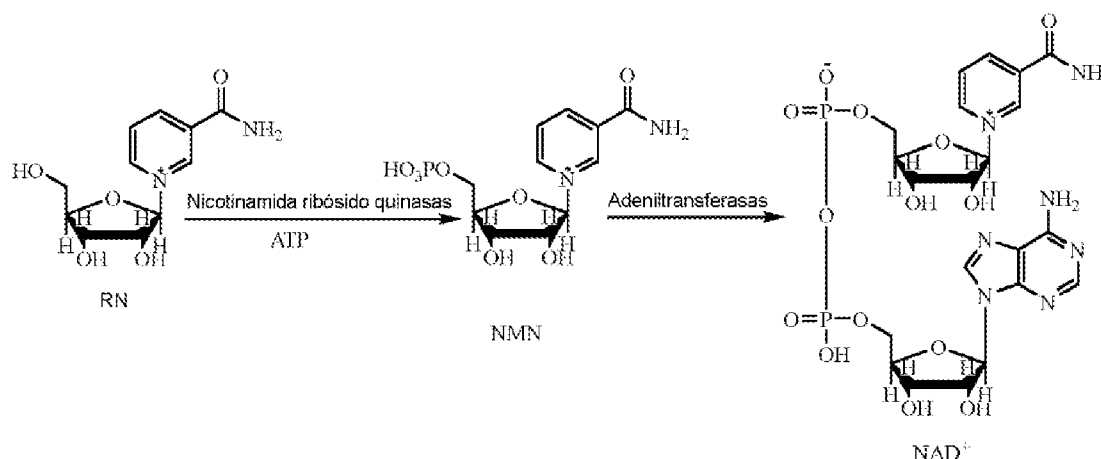
Antecedentes

La presente exposición se refiere de manera general a métodos para producir ribósido de dihidronicotinamida a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida y métodos de purificación y estabilización relacionados.

El dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+ , por sus siglas en inglés), y su forma reducida, dinucleótido de 1,4-dihidronicotinamida adenina (NADH), son moléculas clave en el metabolismo energético y la función mitocondrial mediante transferencia de electrones. Además, NAD^+ es un cofactor crucial en varias reacciones no redox, al causar que la adenosina difosfato ribosa (ADP-ribosa) catalice enzimáticamente las funciones de las dos familias esenciales de proteínas: sirtuínas (SIRT) y poli(ADP-ribosa) polimerasas (PARP, por sus siglas en inglés). Las sirtuínas poseen varias funciones clave en el mantenimiento de la homeostasis nuclear, mitocondrial, citoplasmática o metabólica. Las funciones más importantes de las PARP son la reparación del ADN y el mantenimiento de la estructura y función de la cromatina. El envejecimiento, y algunos factores disruptivos, tales como una lesión aguda o afecciones metabólicas o inflamatorias crónicas, pueden causar la caída drástica de los niveles de NAD^+ .

La caída del NAD^+ conduce a una reducción de la producción de energía y, en consecuencia, alteraciones de la función celular, la homeostasis celular y la función de las células inmunitarias. Este fenómeno se vuelve todavía más importante cuando las células resultan dañadas por factores medioambientales ordinarios, debido a que la reparación del daño requiere una gran cantidad de NAD^+ . En el caso de que la lesión sea grave, las células dañadas no dispondrán de suficiente energía almacenada para proporcionar el NAD^+ necesario para el mantenimiento de la homeostasis, por lo que el daño se volverá irreversible. El cerebro, el corazón, el hígado, los riñones y el músculo esquelético son los órganos que presenta mayor número de mitocondrias; por lo tanto, estos órganos vitales son más susceptibles a la caída del NAD^+ . Por lo tanto, se requiere un precursor de NAD^+ rico en energía para mantener las células en tejidos dañados a niveles normales de energía. El ribósido de nicotinamida (RN), el ácido nicotínico (niacina) y la nicotinamida se encuentran disponibles comercialmente; se utilizan compuestos naturales como suplementos nutricionales para incrementar las concentraciones de NAD^+ .

El RN es un precursor de NAD^+ más eficiente que la niacina y la nicotinamida debido a que es metabolizado a NAD^+ en las células de mamífero en menos etapas (Esquema 1). Algunos estudios muestran que tomar RN como un suplemento resulta eficaz para estimular el metabolismo del NAD^+ y puede reforzar el nivel de NAD^+ en un 60 por ciento.

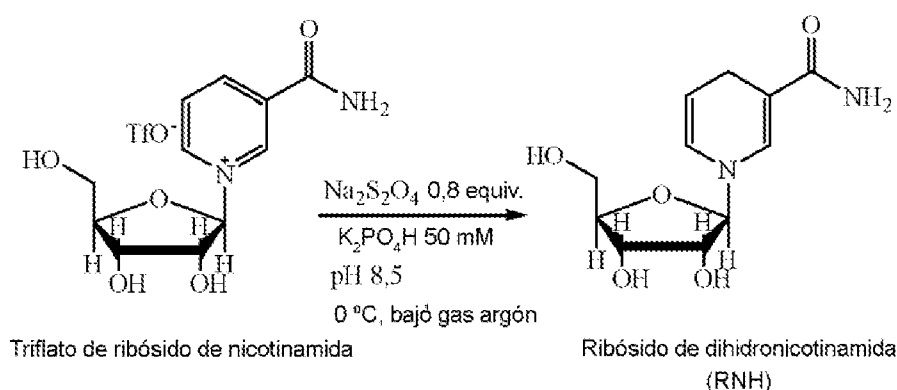


Esquema 1. Transformación de RN en NAD^+ en la célula de mamífero.

Aunque el RN puede incrementar el nivel de NAD^+ de la célula y puede mejorar la salud celular, el RN debe tomarse en grandes cantidades para resultar eficaz. Recientemente, Sauve et al. han sintetizado ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) y han demostrado que este compuesto es un fuerte potenciador de la concentración del NAD^+ en afecciones tanto in vitro como in vivo. Encontraron que, tras la administración de RNH a células de mamífero, incrementaba la concentración del NAD^+ en 2,5 a 10 veces sobre los valores de control en solo una hora. Sus hallazgos demuestran que la utilización de RNH resulta más eficaz que RN o que NMN. Además, el RNH potencia considerablemente la proporción NAD^+/NADH en las células en cultivo sin inducción de marcadores apoptóticos o incrementos sustanciales de los niveles de lactato en las células. Más recientemente, Canto et al. han encontrado que, a diferencia de la ruta de RN, RNH utiliza diferentes etapas y enzimas para sintetizar el NAD^+ . Lo anterior explica por qué el RNH resulta ser un precursor de NAD^+ más eficaz y rápido que RN en las células de mamífero. Los mismos

investigadores también han demostrado, en experimentos con ratones, que RNH está biodisponible oralmente como precursor de NAD^+ y evita la lesión renal aguda inducida por el cisplatino. Además de incrementar los niveles de NAD^+ , el RNH también puede reducir el nivel de algunas genotoxinas, tales como el peróxido de hidrógeno y el sulfonato de metilmetano. Como resultado, las células de ratón tratadas con RNH son resistentes a la muerte celular.

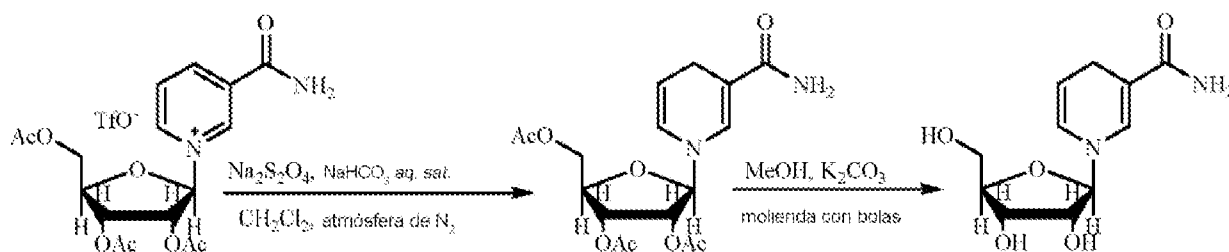
Existen muy pocos métodos para la preparación de RNH. Dicho compuesto puede prepararse a partir de mononucleótido de dihidronicotinamida (MNHN) mediante hidrólisis del éster 5'-fosfato en la presencia de fosfatasa alcalina. El método de MNHN es laborioso y no resulta eficaz respecto a los costes debido a que el MNHN como precursor debe ser hidrolizado enzimáticamente a partir de NADH. Otro método para la síntesis de RNH es la reducción del RN en la presencia de ditionita sódica ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) como agente reductor. En este método, el triflato de ribósido de nicotinamida se reduce a RNH en una solución acuosa de ditionita sódica e hidrogenofosfato potásico (Esquema 2). Debido a que la solución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ es muy inestable bajo condiciones ambientales, dicha reacción debe llevarse a cabo a baj atemperatura y bajo condiciones alcalinas y anaeróbicas. Además, el producto en bruto debe purificarse inmediatamente mediante HPLC utilizando una resina C18 debido a que el RNH es sensible tanto a la hidrólisis como a la oxidación bajo condiciones ambientales, tal como se muestra en los resultados y discusión del Ejemplo.



Esquema 2. Síntesis de RNH a partir de triflato de ribósido de nicotinamida.

Aunque dicho método resulta adecuado para sintetizar una pequeña cantidad de RNH, adolece de varias desventajas que impiden su escalado a la producción comercial de RNH. El precursor, el triflato de ribósido de nicotinamida, es muy caro, es un material muy higroscópico, y debe almacenarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bajo una atmósfera inerte. Además, dicho compuesto no es de grado alimentario debido a la presencia del anión triflato en la estructura del triflato de ribósido de nicotinamida. Por lo tanto, se requiere una purificación completa del RNH a partir del RN restante (triflato) después de la reducción.

Otro método para la síntesis del RNH es la utilización de triflato de ribósido de nicotinamida triacetilado en lugar de triflato de ribósido de nicotinamida (Esquema 3). En la primera etapa de este procedimiento indirecto, el RN triacetilado se convierte a RNH triacetilado con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. En la etapa siguiente, el RNH se forma mediante metanolisis del RNH triacetilado, bajo molienda con bolas. Este método podría resultar apropiado para la síntesis escalable de RNH debido a que proporciona un buen rendimiento. Sin embargo, la utilización de triflato de ribósido de nicotinamida triacetilado, una sustancia cara y de grado no alimentario, podría limitar este procedimiento.



Esquema 3. Síntesis indirecta de RNH a partir de triflato de ribósido de nicotinamida triacetilado

Cabe destacar que la mayor parte de los ribósidos de nicotinamida que se han utilizado para la síntesis de RNH son mezclas de dos formas anoméricas, α y β . Sin embargo, solo el anómero β del RN presenta bioactividad y propiedades medicinales. Entre los derivados de RN, solo el cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) se encuentra disponible comercialmente en forma de un suplemento dietético.

Descripción resumida

La presente exposición incluye la admisión de que la utilización de β -RNCl como un precursor para sintetizar RNH representaría un cambio radical para la comercialización del RNH, un producto deseado y valioso. En efecto, el método para producir RNH dado a conocer en la presente memoria presenta ventajosamente un rendimiento elevado a partir de un RN disponible comercialmente, o sus derivados, tales como β -RNCl.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama que muestra métodos de ejemplo para producir ribósido de dihidronicotinamida a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida, según una realización proporcionada por la presente exposición.

La FIG. 2 es un grupo de fotografías y gráficos que muestran la cromatografía de capa fina (CCF) de RNH sintetizado a pH 8,1 tras la purificación, en comparación con RN y AN (FIG. 2a) y FT-IR de RNH purificado y RN prístino (FIG. 2b), según una realización proporcionada por la presente exposición.

La FIG. 3 es un grupo de gráficos que muestra la RMN- ^1H de RNH purificada en D_2O , según una realización proporcionada por la presente exposición.

La FIG. 4 es un grupo de gráficos que muestra los espectros de RMN- ^1H del RNCl (FIG. 4a), RNH (FIG. 4b) y AN (FIG. 4c) en D_2O , según una realización proporcionada por la presente exposición.

La FIG. 5 es un grupo de fotografías y gráficos que muestran la CCF de RNH sintetizado a pH 8,5 tras la purificación, en comparación con RNCl y AN (FIG. 5a), y la RMN- ^1H de RNH sintetizado a pH 8,5 tras la purificación (FIG. 5b), según una realización proporcionada por la presente exposición.

La FIG. 6 es un grupo de gráficos que muestra los termogramas de análisis termogravimétrico (ATG) del RNH en comparación con el RNCl en el intervalo de entre 25 °C y 900 °C bajo una atmósfera de N_2 . Pérdida de peso frente a temperatura (FIG. 6a) y pérdida de peso derivado frente a la temperatura (FIG. 6b), según una realización proporcionada por la presente exposición.

La FIG. 7 es un grupo de gráficos que muestra un estudio cinético de degradación de RNH. Recuperación de RNH (%) en muestras acuosas durante los 60 días de almacenamiento en la oscuridad/luz y en aire/bajo N_2 (FIG. 7a), recuperación del RNH en soluciones acuosas que se conservan a 4 °C y a 25 °C durante 60 días de almacenamiento en aire/bajo N_2 (FIG. 7b); el efecto de los tampones de pH 5, 7 y 9 sobre la estabilidad del RNH durante 60 días de almacenamiento a 25 °C en aire y bajo N_2 (FIG. 7c); recuperación de RN y RNH (%) en muestras acuosas durante 30 días y 60 días de almacenamiento a 4 °C y a 25 °C (FIG. 7d), según una realización proporcionada por la presente exposición.

La FIG. 8 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^1H del RNH en D_2O .

La FIG. 9 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^1H del RNH en D_2O (expandido entre 5,00 y 7,20 ppm)..

La FIG. 10 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^1H del RNH en D_2O (expandido entre 4,11 y 4,95 ppm)..

La FIG. 11 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^1H del RNH en D_2O (expandido entre 3,09 y 4,03 ppm)..

La FIG. 12 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^{13}C del RNH en D_2O .

La FIG. 13 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^1H del RNH en CD_3OD .

La FIG. 14 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^1H del RNH en CD_3OD (expandido entre 4,76 y 7,22 ppm).

La FIG. 15 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^1H del RNH en CD_3OD (expandido entre 3,06 y 4,12 ppm).

La FIG. 16 es un gráfico que muestra el espectro de RMN- ^{13}C del RNH en CD_3OD .

La FIG. 17 es un gráfico que muestra la espectrometría de masas (EM) del RNH.

La FIG. 18 es un gráfico que muestra el seguimiento de reacciones seleccionadas (SRS) del RNH.

La FIG. 19 es un gráfico que muestra el espectro de UV-VIS del RNH en H_2O .

La FIG. 20 es un grupo de gráficos que muestra los cromatogramas de HPLC del RNCl purificado (FIG. 2a); detector de UV a 220 nm (FIG. 20b); detector de UV a 340 nm y (FIG. 20c) detector de fluorescencia.

La FIG. 21 es un grupo de gráficos que muestran los cromatogramas de HPLC de las soluciones acuosas de RNH almacenadas bajo condiciones diferentes durante 60 días. La FIG. 21a) a 4 °C bajo N_2 y en la oscuridad (FIG. 21b) a 4 °C bajo aire y en la oscuridad (FIG. 21c) a 25 °C bajo N_2 y en la oscuridad (FIG. 21d) a 25 °C bajo aire y en la oscuridad (FIG. 21e) a 25 °C bajo N_2 y en la luz (FIG. 21f) a 25 °C bajo aire y en la luz.

La FIG. 22 es un grupo de gráficos que muestran los cromatogramas de HPLC de las soluciones acuosas de RNH almacenadas bajo condiciones diferentes durante 60 días. La FIG. 22a) pH=7,0 a 25 °C bajo N_2 y en la oscuridad (FIG. 22b) pH=7,0 a 4 °C bajo aire y en la oscuridad (FIG. 22c) pH=9,0 a 25 °C bajo N_2 y en la oscuridad (FIG. 22d) pH=9,0 a 25 °C bajo aire y en la oscuridad.

La FIG. 23 es un grupo de gráficos que muestra representaciones cinéticas y las tasas de degradación de primer orden para algunas de las muestras de RNH. La FIG. 23a, FIG 23b) pH=7,0 a 25 °C bajo N_2 y en aire (FIG. 23c, FIG 23d) pH=9,0 a 25 °C bajo N_2 y en aire (FIG. 23e, FIG 23f) agua DI, a 25 °C bajo N_2 y aire.

Descripción detalladaDefiniciones

A continuación en la presente memoria se proporcionan algunas definiciones. Sin embargo, las definiciones pueden encontrarse en la sección "Realizaciones" que figura a continuación, y el encabezado anterior "Definiciones" no significa que tales exposiciones en la sección de "Realizaciones" no sean definiciones.

5 Todos los porcentajes expresados en la presente memoria son en peso del peso total de la composición, a menos que se exprese lo contrario. Tal como se utiliza en la presente memoria, se entiende por "aproximadamente" y "sustancialmente" los números en un intervalo de números, por ejemplo, el intervalo de entre -10 % y +10 % del número referenciado, preferentemente de entre -5 % y +5 % del número referenciado, más preferentemente de entre -1 % y +1 % del número referenciado, preferentemente de entre -0,1 % y +0,1 % del número referenciado. Todos los intervalos numéricos en la presente memoria debe entenderse que incluyen todos los números enteros, ya sean enteros o sea fraccionarios, comprendidos dentro del intervalo. Además, estos límites numéricos deben interpretarse en el sentido de que apoyan una reivindicación referida a cualquier número o subconjunto de números de ese intervalo. Por ejemplo, una exposición de entre 1 y 10 debe interpretarse como compatible con un intervalo de entre 1 y 8, de entre 3 y 7, de entre 1 y 9, de entre 3,6 y 4,6, de entre 3,5 y 9,9, etc.

15 Tal como se utiliza en la presente exposición y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "un componente" o a "el componente" incluye dos o más componentes.

20 Los términos "comprende", "comprenden" y "que comprende" deben interpretarse de manera inclusiva y no excluyente. Del mismo modo, los términos "incluye", "que incluye" y "o" deben interpretarse en el sentido de que son inclusivos, a menos que esa interpretación esté claramente negada por el contexto. Sin embargo, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden carecer de cualquier elemento no dado a conocer específicamente en la presente memoria. De esta manera, una exposición de una realización utilizando la expresión "que comprende" incluye una descripción de las realizaciones "que consisten esencialmente en" y "que consisten en" los componentes identificados.

25 El término "y/o" utilizado en el contexto de "X y/o Y" debe interpretarse como "X," o "Y," o "X y Y". De manera similar, "por lo menos uno de X o Y" debe interpretarse como "X," o "Y," o "X e Y." Por ejemplo, "por lo menos una ditionita o un agente reductor funcionalmente similar" debe interpretarse como "ditionita," o "un agente reductor funcionalmente similar," o "ambos, ditionita y un agente reductor funcionalmente similar."

30 Cuando se utilizan en la presente memoria, los términos "ejemplo" y "tales como", en particular cuando siguen una lista de términos, son meramente de ejemplo e ilustrativos y no deben considerarse excluyentes o exhaustivos. Tal como se utiliza en la presente memoria, una afección "asociada con" o "vinculada con" otra afección significa que las afecciones ocurren simultáneamente, preferentemente significa que las afecciones son causadas por la misma afección subyacente, y lo más preferentemente significa que una de las afecciones identificadas es causada por la otra afección identificada.

35 La expresión "una solución básica", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una solución con un pH superior a 7,0. Por ejemplo, una solución básica podría presentar un pH comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 10,0, de entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 9,0, de entre aproximadamente 7,9 y aproximadamente 8,8, o preferentemente de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,5. En donde se hace referencia en la presente memoria al pH, los valores corresponden al pH medido a 25 °C con equipos estándares.

40 La expresión "pH neutro", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un pH de aproximadamente 7,0. En donde se hace referencia en la presente memoria al pH, los valores corresponden al pH medido a 25 °C con equipos estándares.

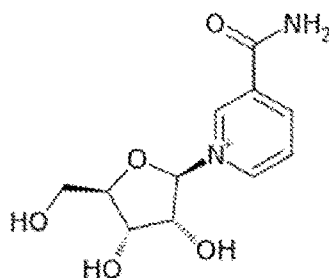
45 La expresión "temperatura ambiente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una temperatura comúnmente utilizada en física y química, es decir, una temperatura de esencialmente aproximadamente 293 °K (o aproximadamente 20 °C).

50 La expresión "condición anaeróbica", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una condición en ausencia de oxígeno libre.

55 La expresión "condición anaeróbica", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una condición en presencia de oxígeno libre.

60 El término "ditionita", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anión de $S_2O_4^{2-}$.

65 El término "ribósido de nicotinamida" o "RN", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una forma de nucleósido piridina de la vitamina B3 que funciona como un precursor del dinucleótido de nicotinamida adenina, o NAD^+ . El ribósido de nicotinamida o RN presenta una forma α o una forma β . Por ejemplo, la forma β del ribósido de nicotinamida o RN presenta una estructura química de fórmula I, tal como sigue:



Fórmula I.

La expresión "sal alcalina" o "sal básica", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sal que es el producto de la neutralización de una base fuerte y un ácido débil. Una sal de álcali o sal básica, cuando se hidroliza, puede formar una solución básica. Entre los ejemplos de sales alcalinas o sales básicas se pueden incluir carbonatos de metal, bicarbonato de metal, acetato de metal, derivados de fosfato de metal y otros.

La expresión "alto rendimiento", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un rendimiento total de una síntesis de por lo menos 40 %, por lo menos 41 %, por lo menos 42 %, por lo menos 43 %, por lo menos 44 %, por lo menos 45 %, por lo menos 46 %, por lo menos 47 %, por lo menos 48 %, por lo menos 49 %, por lo menos 50 %, por lo menos 51 %, por lo menos 52 %, por lo menos 53 %, por lo menos 54 %, por lo menos 55 %, por lo menos 56 %, por lo menos 57 %, por lo menos 58 %, por lo menos 59 %, por lo menos 60 %, por lo menos 61 %, por lo menos 62 %, por lo menos 63 %, por lo menos 64 %, por lo menos 65 %, por lo menos 66 %, por lo menos 67 %, por lo menos 68 %, por lo menos 69 %, por lo menos 70 %, por lo menos 71 %, por lo menos 72 %, por lo menos 73 %, por lo menos 74 %, por lo menos 75 %, por lo menos 76 %, por lo menos 77 %, por lo menos 78 %, por lo menos 79 %, por lo menos 80 %, por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 %. Preferentemente, un alto rendimiento de la presente exposición es por lo menos 50 %, por lo menos 51 %, por lo menos 52 %, por lo menos 53 %, por lo menos 54 %, por lo menos 55 %, por lo menos 56 %, por lo menos 57 %, por lo menos 58 %, por lo menos 59 %, por lo menos 60 %, por lo menos 61 %, por lo menos 62 %, por lo menos 63 %, por lo menos 64 %, por lo menos 65 %, por lo menos 66 %, por lo menos 67 %, por lo menos 68 %, por lo menos 69 %, por lo menos 70 %, por lo menos 71 %, por lo menos 72 %, por lo menos 73 %, por lo menos 74 %, por lo menos 75 %, por lo menos 76 %, por lo menos 77 %, por lo menos 78 %, por lo menos 79 %, por lo menos 80 %, por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 %.

La expresión "alta pureza", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una pureza de un compuesto o sustancia de por lo menos 70 %, por lo menos 71 %, por lo menos 72 %, por lo menos 73 %, por lo menos 74 %, por lo menos 75 %, por lo menos 76 %, por lo menos 77 %, por lo menos 78 %, por lo menos 79 %, por lo menos 80 %, por lo menos 81 %, por lo menos 82 %, por lo menos 83 %, por lo menos 84 %, por lo menos 85 %, por lo menos 86 %, por lo menos 87 %, por lo menos 88 %, por lo menos 89 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 %. Preferentemente, una alta pureza de la presente exposición es por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, o por lo menos 99 %.

La expresión "cantidad eficaz", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una cantidad de una sustancia capaz de incrementar (directa o indirectamente) el rendimiento del producto de reducción o incrementar la selectividad hacia ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH). Las cantidades óptimas de una determinada sustancia pueden variar según las condiciones de reacción y la identidad de otros constituyentes, aunque se pueden determinar fácilmente a la luz de las circunstancias discretas de una aplicación determinada.

El término "cromatografía", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier tipo de técnica de purificación que separa el compuesto de interés de otras moléculas en la mezcla, por ejemplo, a partir de sus diferencias de partición entre un sustrato sólido y la fase móvil, incluyendo, aunque sin limitación, solución, tampón o solvente, y permite aislar el compuesto de interés.

El término "eluyente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un solvente o una mezcla de dos o más solventes utilizados en un procedimiento de cromatografía para mover, o eluir, una o más sustancias de un material

de soporte estacionario. En una realización, un solvente polar tal como el metanol puede usarse como eluyente para eluir el RNH de la fase estacionaria durante un procedimiento cromatográfico.

El término "adsorbente" o "fase estacionaria", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un material que existe en la corriente de líquido en forma sólida en un procedimiento cromatográfico. En una realización, una mezcla de alúmina básica y sílice puede usarse como adsorbente durante un procedimiento cromatográfico.

El término "solvente", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia capaz de disolver otra sustancia (soluto).

Realizaciones

Un aspecto de la presente exposición es un método de producción de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) a partir de un compuesto químico comercialmente disponible, tal como el cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl). El cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) es el único derivado de RN comercialmente disponible (p. ej., como un suplemento dietético). Por lo tanto, el presente método representa una nueva vía para la producción y comercialización de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH).

El solicitante encontró inesperadamente que una reducción del cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) comercialmente disponible con un agente reductor, tal como una ditionita en una solución líquida puede llevar a la formación y producción eficaz de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH). Además, el Solicitante ha encontrado inesperadamente que el ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) resultante se puede aislar y purificar con un alto rendimiento mediante la utilización de cromatografía de columna.

En un aspecto, la presente exposición se refiere a un método de producción de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl).

La FIG. 1 muestra un método de ejemplo (100) para producir ribósido de 1,4-dihidronicotinamida a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida, según una realización proporcionada por la presente exposición.

Tal como se muestra en la FIG. 1, el método 100 comprende proporcionar cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) en una solución líquida (102).

El cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) está disponible comercialmente y podría adquirirse, p. ej., como Niagen™ de ChromaDex.

El cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) incluye ya sea la forma α de RNCl (α -RNCl) o la forma β de RNCl (β -RNCl). En una realización, el cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) de la presente exposición comprende β -RNCl. En una realización, el cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) de la presente exposición comprende β -RNCl.

En una realización, dado que solo el anómero β de RN representa bioactividad y propiedades medicinales, la presente exposición utiliza β -RNCl como material de partida de ejemplo para producir ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH). El presente método de producción de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) también puede aplicarse a utilizar α -RNCl como material de partida.

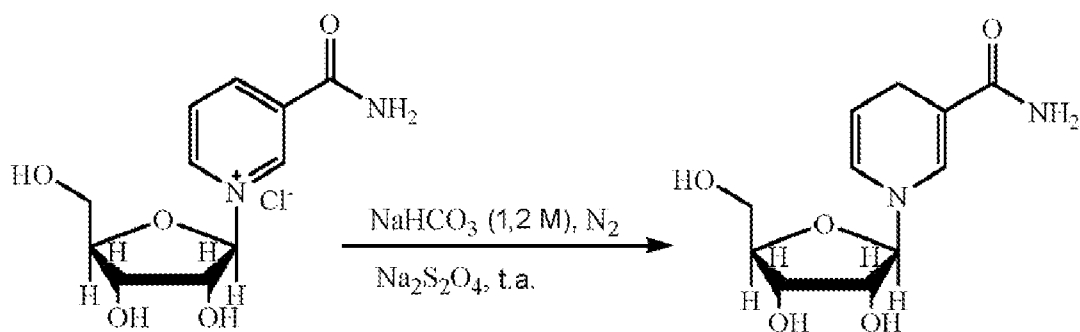
Se proporciona una cantidad químicamente eficaz de cloruro de ribósido de nicotinamida (β -RNCl) en forma de sólido (p. ej., unos polvos). En una realización, la forma sólida de cloruro de ribósido de nicotinamida (β -RNCl) puede utilizarse en una reacción en estado sólido para producir ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH). Una reacción en estado sólido de ejemplo se describe en el Ejemplo.

En otra realización, la forma sólida de cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) se disuelve en un solvente, tal como agua, para formar una solución líquida para la producción de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH).

En una realización preferida, una cantidad químicamente efectiva de cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) se disuelve primero en una solución, tal como agua para formar una solución para una producción líquida de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH).

Tal como se muestra en la FIG. 1, después de que una cantidad químicamente eficaz de cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) se proporciona en una solución líquida, el método 100 puede comprender añadir una ditionita de metal a la solución líquida bajo una primera temperatura (104). De este modo, un agente reductor, tal como una ditionita de metal puede añadirse a la solución líquida.

En una realización, el agente reductor puede comprender una ditionita de metal, tal como ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). En una realización, el único agente reductor puede ser una ditionita de metal, tal como ditionito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). El Esquema 4 muestra una reacción de reducción de ejemplo de cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) con ditionita de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) en una solución líquida.



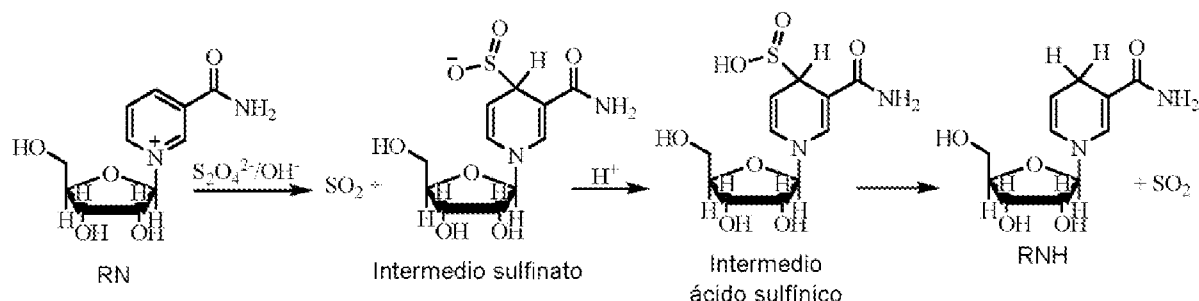
Esquema 4. Síntesis de RNH a partir de RNCl

El Esquema 5 muestra un mecanismo de reacción de la síntesis de RNH a partir de RN mediante la utilización de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ como agente reductor. Tal como se muestra en el Esquema 5, una reacción de reducción de RN mediante la utilización de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ forma inicialmente un intermediario sulfinato, que es estable bajo condiciones básicas.

Después de la protonación, el intermediario sulfinato forma su derivado ácido sulfinico. Este compuesto intermedio de ácido sulfinico es inestable bajo condiciones ambientales y se convierte en RNH mediante la salida de SO_2 .

De esta manera, el solicitante observa que una realización particularmente preferida utiliza un pH que no solo estabilizará la $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ sino que también protonará el compuesto intermedio sulfonato para producir el RNH. Además, debido a que el RNH presenta un enlace N-glucosídico en su estructura, el RNH es susceptible a la hidrólisis. En consecuencia, una realización particularmente preferida ajusta el pH y lo mantiene con precisión durante todo el curso de la reacción para que el RNH no se hidrolize.

De esta manera, los presentes métodos incluyen ajustar el pH de las soluciones relacionadas y mantenerlo con precisión dentro de un intervalo específico (p. ej., 8,0 a 8,5, preferentemente 8,1) para una producción eficaz de RNH.

Esquema 5. Mecanismo de síntesis de RNH a partir de RN mediante la utilización de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

A lo largo de la presente exposición, se utilizó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ como un agente reductor de ejemplo. También se puede usar otro agente reductor funcionalmente similar. Preferentemente, el agente reductor es $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

Una relación molar entre cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) y agente reductor tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ es preferentemente de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1:5, de entre aproximadamente 1:1.5 y aproximadamente 1:4, o de entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:3, preferentemente de entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 1:3, más preferentemente de aproximadamente 1:2,7.

Debido a que una solución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ es inestable bajo condiciones aeróbicas a pH neutro (p. ej., pH=7), preferentemente la solución líquida para la reacción de reducción de cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) mediante la utilización de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ se mantiene bajo condiciones anaeróbicas y básicas.

Por ejemplo, la solución líquida puede purgarse con un gas inerte para eliminar el oxígeno libre en la solución. Un gas inerte puede incluir nitrógeno (N_2), argón (Ar) u otros. En una realización, se utiliza ya sea nitrógeno o sea argón como el gas inerte. La solución líquida puede purgarse con un gas inerte durante toda la reacción de reducción.

En una realización, el gas inerte comprende gas de nitrógeno. En una realización, el único gas inerte es gas de nitrógeno.

En una realización, la solución líquida comprende una solución básica. En una realización, la solución líquida es una solución básica.

En una realización, la solución básica comprende bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Por ejemplo, la solución líquida puede incluir por lo menos una sal de álcali o sal básica, tal como bicarbonato de sodio (NaHCO_3), para formar una solución básica. En una realización, la única sal de álcali o sal básica es bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Sin embargo, otras sales alcalinas o sales básicas, tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio y compuestos similares, pueden utilizarse opcionalmente.

En una realización, un valor de pH de la solución líquida puede controlarse mediante la concentración de por lo menos una sal de álcali o sal básica en la solución. Por ejemplo, mediante la utilización de 1 a 1,5 M, preferentemente 1,1 a 1,4M, más preferentemente 1,2 M de NaHCO_3 , el valor de pH de la solución líquida puede controlarse en el intervalo de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,5, de entre aproximadamente 8,05 y aproximadamente 8,45, de entre aproximadamente 8,07 y aproximadamente 8,35, de entre aproximadamente 8,08 y aproximadamente 8,29, de entre aproximadamente 8,09 y aproximadamente 8,19, preferentemente de aproximadamente 8,1.

En una realización, el método 100 comprende mantener un valor de pH de la solución de NaHCO_3 entre 8,0 y 8,5. En una realización, el método 100 comprende mantener un valor de pH de la solución de NaHCO_3 entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,5. En una realización, el método 100 comprende mantener un valor de pH de la solución de NaHCO_3 de aproximadamente 8,1.

En una realización, la solución de NaHCO_3 presenta una concentración de entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 1,5 M. En una realización, la solución de NaHCO_3 presenta una concentración de aproximadamente 1,2 M.

En una realización, el agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, puede añadirse gradualmente a la solución líquida de cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) bajo una atmósfera de gas inerte a una primera temperatura. En una realización, el agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, puede predisolverse en un solvente, tal como agua y la solución del agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ puede añadirse gota a gota a la solución líquida de cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) bajo una atmósfera de gas inerte a una primera temperatura.

En una realización, la primera temperatura es una temperatura baja, tal como aproximadamente 0°C (p. ej., utilizando agua con hielo para controlar) para que la reacción de reducción pueda controlarse durante la adición del agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

Nuevamente en referencia a la FIG. 1, después de la adición del agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, el método 100 puede comprender hacer reaccionar la ditionita de metal con el cloruro de ribósido de nicotinamina (RNCl) en la solución líquida bajo una segunda temperatura para formar una mezcla, en donde una porción de la mezcla es ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) (106).

Por lo tanto, la temperatura de la solución líquida preferentemente se incrementa desde la primera temperatura hasta una segunda temperatura. Bajo la segunda temperatura, el cloruro de ribósido de nicotinamina (RNCl) en la solución líquida puede reaccionar completamente y eficazmente con el agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, para formar el ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH). En una realización, la segunda temperatura es la temperatura ambiente.

Bajo la temperatura ambiente, el agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y el cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) pueden reaccionar continua y completamente para formar una mezcla, en donde por lo menos una porción de la mezcla es el ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH).

En una realización, el progreso de la reacción de reducción entre el agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, y la cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) puede seguirse mediante la utilización de una técnica cromatográfica. Por ejemplo, tal como se muestra en la FIG. 2a, todos los compuestos de β -RNCl, RNH y nicotinamida (NA; un producto de degradación de RNH; ver el Esquema 6) eran visibles a una longitud de onda de 254 nm. Sin embargo, a una longitud de onda de 365 nm, solo RNH era visible. Al realizar un seguimiento de la intensidad y posición de los picos correspondientes al material de partida β -RNCl y el producto resultante RNH, se puede determinar el progreso de la reacción de reducción entre el agente reductor como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y el cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl).

Después de que la reacción de reducción entre el agente reductor, tal como $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, y el cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl) se complete, la mezcla resultante puede secarse para obtener un sólido de la mezcla. En una realización, la mezcla resultante puede liofilizarse para obtener un sólido amarillo de la mezcla.

En otro aspecto de la presente exposición, se da a conocer un método de purificación para obtener una alta pureza del RNH resultante. Además, el solicitante ha encontrado inesperadamente que el ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) resultante se puede aislar y purificar con un alto rendimiento mediante la utilización de cromatografía de

columna. Los ejemplos, posteriormente, proporcionan un método de purificación de ejemplo detallado mediante el uso de cromatografía de columna (p. ej., con una mezcla de alúmina básica y sílice como adsorbente).

En una realización, se puede usar un método de cromatografía para aislar el RNH resultante de la mezcla. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de columna para separar RNH de β -NRCI u otras sustancias impurezas basándose en la adsorción diferencial de compuestos al adsorbente; los compuestos se mueven a través de la columna a diferentes velocidades, permitiendo que se separen en fracciones.

En una realización, el método de cromatografía de columna utiliza un alcohol como eluyente. En una realización, el eluyente comprende metanol. En una realización, el único eluyente es metanol. Sin embargo, opcionalmente pueden utilizarse otros solventes, tal como una mezcla de metanol y etanol, como eluyente adicional o alternativamente.

En una realización, el adsorbente de la cromatografía de columna comprende por lo menos alúmina básica y sílice. En una realización, la alúmina básica y la sílice son los únicos adsorbentes de la cromatografía de columna.

La alúmina básica y la sílice pueden presentar una proporción en peso de entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 10:1, de entre aproximadamente 1:9 y aproximadamente 9:1, de entre aproximadamente 1:8 y aproximadamente 8:1, de entre aproximadamente 1:7 y aproximadamente 7:1, de entre aproximadamente 1:6 y aproximadamente 6:1, de entre aproximadamente 1:5 y aproximadamente 5:1, de entre aproximadamente 1:4 y aproximadamente 4:1, de entre aproximadamente 1:3 y aproximadamente 3:1, o de entre aproximadamente 1:2 y aproximadamente 2:1, preferentemente de aproximadamente 2:3.

En una realización, un método de purificación por cromatografía de columna puede usar alúmina básica con sílice, por ejemplo con la proporción en peso de aproximadamente 2:3, para aislar RNH con una pureza de por lo menos 70 %, por lo menos 72 %, por lo menos 75 %, por lo menos 77 %, por lo menos 80 %, por lo menos 83 %, por lo menos 85 %, por lo menos 87 %, por lo menos 90 %, por lo menos 93 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, o por lo menos 98 %, preferentemente de por lo menos 96 %.

En una realización, el método de purificación mediante cromatografía de columna utilizando alúmina básica con sílice puede eliminar por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 99 %, por lo menos 99,9 %, o por lo menos 99,999 % del RNCI no reaccionado en la mezcla. En una forma preferida de realización, el método de purificación mediante cromatografía de columna usando alúmina básica con sílice puede purificar completamente el producto RNH del RNCI no reaccionado en la mezcla.

En una realización, tal como se demuestra en los Ejemplos, los resultados del solicitante muestran que la cromatografía de columna, ya sea en sílice o en alúmina básica sola, no resultó eficaz para separar RN de RNH. Por lo tanto, una mezcla de alúmina básica y sílice puede ser el adsorbente necesario de la cromatografía de columna.

La alúmina básica, como superficie polar con muchos grupos hidroxilo, presumiblemente podría separar físicamente RN de RNH en un grado moderado (por la diferencia de sus polaridades). Además, debido a que la alúmina básica presenta cargas negativas en su superficie y el RN presenta una carga positiva, la alúmina básica podría actuar como una resina de intercambio catiónico para inmovilizar el RN en la superficie de la alúmina básica.

Uno podría creer que esta es la razón principal por la que la alúmina es una mejor fase estacionaria que el sílice para la purificación del RNH. Sin embargo, el Solicitante ha encontrado que, durante la purificación de RNH en la cromatografía de columna, la alúmina básica obstruiría la columna, resultando en una tasa de flujo muy lenta que conduciría a la degradación del RNH.

En una realización, el rendimiento total de RNH para el presente método puede ser de por lo menos 35 %, por lo menos 40 %, por lo menos 45 %, por lo menos 50 %, por lo menos 55 %, por lo menos 60 %, por lo menos 65 %, por lo menos 70 %, por lo menos 75 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, o por lo menos 90 %, preferentemente de por lo menos 55 %.

En una realización, el presente método de producción de RNH en una solución líquida produce un rendimiento significativamente mayor que el de un método en estado sólido. Por ejemplo, el presente método de producción de RNH en una solución líquida produce un rendimiento por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30 %, por lo menos 35 %, por lo menos 40 %, por lo menos 45 %, por lo menos 50 %, por lo menos 55 %, por lo menos 60 %, por lo menos 65 %, por lo menos 70 %, por lo menos 75 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 100 %, por lo menos 120 %, por lo menos 140 %, por lo menos 160 %, por lo menos 180 %, por lo menos 200 %, por lo menos 220 %, por lo menos 240 %, por lo menos 260 %, por lo menos 280 %, por lo menos 300 %, por lo menos 320 %, por lo menos 340 %, por lo menos 360 %, por lo menos 380 %, por lo menos 400 %, por lo menos 420 %, por lo menos 440 %, por lo menos 460 %, por lo menos 480 %, por lo menos 500 %, o por lo menos 600 % mayor que el de un método de estado sólido.

Los Ejemplos, posteriormente, proporcionan un método de estado sólido detallado de ejemplo para producir RNH con un rendimiento de entre aproximadamente 15 % y aproximadamente 17 %.

Tal como se muestra en los Ejemplos, los métodos de solución de ejemplo para la producción y purificación de RNH, según determinadas realizaciones de la presente exposición, muestran un rendimiento en el intervalo de entre aproximadamente 42 % y aproximadamente 55 %.

Por lo tanto, el presente método de producción de RNH en solución líquida puede producir un rendimiento por lo menos 267 % mayor que el del método de estado sólido de ejemplo.

En otro aspecto, la presente exposición se refiere a las estabilidades del RNH tal como se produce a partir de los métodos comentados en la presente memoria.

En una realización, un determinado porcentaje del RNH producido se hidrolizaría para formar 1,4-dihidronicotinamida (DHNA). Tal como se muestra en el Esquema de la FIG. 5a, es probable que la 1,4-dihidronicotinamida (DHNA) se forme mediante hidrólisis del RNH durante el transcurso de la reacción (p. ej., a pH=8,5).

Tal como se muestra en la FIG. 2, cuando el pH=8,1, solo había picos de trazas, correspondientes a AN en la RMN-¹H del RNH purificado. Lo anterior significa que solo se hidroliza una cantidad traza de RN durante el transcurso de la reacción para formar AN (ver el Esquema 6).

En una realización, puede manipularse el valor de pH de la solución líquida del método de producción de RNH para controlar la velocidad de reacción del método y la hidrólisis tanto del material de partida de RNCl como del producto, RNH.

Por ejemplo, al incrementar el pH de 8,1 a 8,5, la velocidad de reacción evidentemente disminuye y, posteriormente, hay una mayor posibilidad de reacciones secundarias, tales como la hidrólisis de tanto RN como RNH.

En una realización, puede ser preferente un valor de pH de aproximadamente 8,1 para incrementar la velocidad de reacción de la reducción, a la vez que se disminuye la posibilidad de reacciones secundarias, tales como la hidrólisis de tanto RN como RNH.

En una realización, podría ser necesario ajustar el pH de la reacción de producción de RNH para minimizar la formación de AN y DHNA, y reducir el tiempo de reacción. Por ejemplo, los valores del factor de retardo (Rf) de estos subproductos de AN y DHNA son próximos a los valores de Rf del RNH. Por lo tanto, AN y DHNA no pueden separarse del producto RNH mediante la cromatografía de columna habitual (ver la FIG. 5a). En una realización preferente, el pH de la reacción para producir RNH puede ajustarse a aproximadamente 8,1.

En una realización, el RNH es más estable térmicamente que el RNCl bajo una atmósfera de nitrógeno. Las FIG. 6a y 6b mostraron que, mientras que tanto RNH como RN muestran su mayor pérdida de peso a aproximadamente 218 °C y 910 °C, respectivamente, el RNH muestra una pérdida de peso de solo aproximadamente 50 % a esta temperatura, mientras que el RNCl muestra una pérdida de peso de aproximadamente 65 % a esta temperatura. El RNH muestra otra clara pérdida de peso con un pico en aproximadamente 800 °C que contribuye a un 30 % de la pérdida de peso.

En una realización, el RNH puede ser susceptible a la oxidación en presencia de aire y el RNH puede ser más estable bajo una atmósfera de N₂ que en presencia de aire, tal como se muestra en la FIG. 7. Además, el RNH puro (en forma de polvos) puede ser estable en un refrigerador, en un tubo sellado, durante unos meses sin degradación alguna.

En una realización, tal como se muestra en la FIG. 7c y la FIG. 22, el producto RNH puede degradarse completamente en menos de un día a pH 5, mientras que los productos de RNH preparados en el tampón de acetato amónico a pH 7 pueden mostrar una disminución lineal de la concentración de RNH de aproximadamente 70 % en el día uno hasta aproximadamente 2 % el día 30.

Además, los productos de RNH preparados en el tampón de carbonato a pH 9 pueden ser estables al aire tanto en aire (p. ej., degradación de aproximadamente 45 % medida después de 60 días) como bajo N₂ (por ejemplo, degradación de aproximadamente 42 % después de 60 días).

En una realización, el RN en una solución acuosa puede ser muy estable sin degradación detectable después de 60 días, mientras que el RNH en una solución acuosa almacenada en aire puede mostrar un 9 % y un 10 % de degradación después de 30 y 60 días, respectivamente.

En una realización, el RNH en una solución acuosa almacenada bajo una cubierta de N₂ puede ser bastante estable sin degradación detectable después de 60 días de almacenamiento.

Ejemplo

El siguiente ejemplo no limitativo presenta datos científicos que desarrollan y apoyan el concepto de métodos y procedimientos para producir ribósido de 1,4-dihidronicotinamida a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida y estudios relacionados de purificación y estabilidad.

En el presente trabajo, los presentes inventores describen un método eficiente para la síntesis y purificación de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) a partir de cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) disponible comercialmente y en presencia de ditionita sódica como agente reductor. El método es potencialmente escalable. El RNH es industrialmente relevante como el precursor sintético de NAD⁺ más eficaz.

Los presentes inventores muestran que la síntesis en fase sólida no puede utilizarse para la reducción del RNCl a RNH con alto rendimiento, mientras que la reacción de reducción en agua a temperatura ambiente bajo condiciones anaeróbicas resulta ser muy eficaz, alcanzando un rendimiento de aislamiento del 55 %. Por primera vez, mediante la utilización de la cromatografía de columna habitual, los presentes inventores pudieron purificar con alta pureza dicho biocompuesto sensible con buen rendimiento. Se realizó una serie de identificaciones y análisis, incluyendo HPLC, RMN, CL-EM, FTIR y espectroscopía de UV-Vis, en la muestra purificada, confirmando la estructura del RNH, así como su pureza, que era de 96 %. El análisis térmico de RNH mostró mayor estabilidad térmica en comparación con RNCl, con dos pérdidas de peso mayores, una a 218 °C y otra a 805 °C. Los presentes inventores también investigaron los efectos de estabilidad a largo plazo de la temperatura, pH, luz y oxígeno (tal como aire) en el RNH en soluciones acuosas. Nuestros resultados muestran que el RNH puede oxidarse en presencia de oxígeno, y que se hidroliza rápidamente bajo condiciones ácidas. También encontramos que la tasa de degradación es menor bajo una atmósfera de N₂, a temperaturas más bajas, y a pH básico.

Sección experimental

Materiales. El cloruro de RN (forma beta) fue proporcionado por ChromaDex Company. Se adquirió ditionita sódica de VWR, el bicarbonato sódico se adquirió de Aldrich, el gel de sílice (P60, 40-63 µm, 60 Å) se adquirió de SiliCycle, y la alúmina básica (50-200 µm, 60 Å, pH 8), de Acros. Metanol (al 99,9 %, certificado ACS, Fisher), acetona (al 99,8 %, certificado ACS, Fisher), hidróxido sódico (certificado ACS, Fisher Chemical), hexanos (≥98,5 %, ACS GR), acetato de etilo (EtOAc, >99,9 %, certificado ACS) y placas de CCF revestidas de gel de sílice 60 F254 con respaldo de aluminio, adquiridas de EMD Millipore (Billerica, MA, EE. UU.). El agua deuterada y el dimetilsulfóxido (DMSO-d₆, D, al 99,9 %) se adquirieron de Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

Caracterización. Se utilizó un espectrómetro NMR 500 (Bruker INOVA) para preparar los espectros de RMN de ¹H y ¹³C en agua deuterada. Los espectros de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu IRAffinity-1S, recolectando 128 barridos con una resolución de 8 cm⁻¹. Los espectros de UV-vis de las soluciones RN y RNH se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2600. Se prepararon termogramas de análisis termogravimétrico (ATG) en el intervalo de temperatura de entre 20 °C y 900 °C a una tasa de temperatura de 10 °C min⁻¹ bajo flujo de N₂, utilizando un instrumento TA Q100. Se utilizó un sistema LC Agilent 1200 dotado de bomba binaria SL y detector de matriz de diodos y un detector de índice de refracción Shodex RI-501 (canal único) para realizar las mediciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). La HPLC de fase inversa se llevó a cabo en una columna Discovery C18, 180 Å (tamaño de poro), diámetro de 5 µm, dimensiones de 250×4,6 mm. Se utilizó acetato amónico (20 mM) como la fase móvil con un caudal de 1,0 ml min⁻¹ durante 30 o 45 min a 25 °C. Todas las muestras se filtraron usando un filtro de jeringa de nailon de 13 mm con un tamaño de poro de 0,22 µm antes de la medición. Para el análisis de CL-EM, los presentes inventores utilizaron un cromatógrafo líquido (CL) (serie Agilent 1100) acoplado a un espectrómetro de masas. Se utilizó cromatografía de fase inversa con una columna LC Phenomenex Luna Omega (Phenomenex) con las siguientes especificaciones: 100×4,6 mm, 3 µm, polar C18, tamaño de poro de 100 Å con un caudal de 0,3 ml min⁻¹. Entre los eluyentes de CL se incluyen acetato amónico 20 mM (solución A) y acetonitrilo (solución B) utilizando una elución en gradiente (cambio con el tiempo de la composición de la solución A:B: 0 min: 95:5, 3 min: 95:5, 15 min: 85:15, 17 min: 90:10, y 20 min: 95:5). El espectrómetro de masas (espectrómetro de masas Finnigan LTQ) estaba dotado de una interfaz de electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés) configurada en modo de ionización de electropulverización positiva para analizar el RNH. Los parámetros optimizados fueron un flujo de gas de protección a 20 unidades arbitrarias, voltaje de pulverización establecido en 4,00 kV, temperatura del capilar a 350 °C, tensión del capilar de 41,0 V, y lente del tubo configurada a 125,0 V.

Síntesis de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida a partir de β-cloruro de ribósido de nicotinamida

Se añadieron 0,5 g de NRCl (1,72 mmoles) y 20 ml de solución de NaHCO₃ (1,2 M) a un matraz de fondo redondo con una barra de agitación magnética. Este sistema se introdujo en un baño de hielo, se purgó de oxígeno y se mantuvo bajo gas nitrógeno. Después, se añadieron gradualmente 0,80 g de ditionita sódica (4,60 mmoles) a la mezcla de reacción. Después de añadir Na₂S₂O₄, el matraz se sacó del baño de hielo y posteriormente la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante tres horas adicionales. La mezcla de reacción se liofilizó, obteniendo un sólido amarillo. Finalmente, el residuo se purificó mediante cromatografía de columna utilizando una mezcla de alúmina básica y sílice en una proporción en peso de 2:3, respectivamente, utilizando metanol como eluyente. El metanol extra se eliminó mediante un evaporador rotatorio a temperatura ambiente, obteniendo un sólido pegajoso de color amarillo pálido que después se convirtió en unos polvos amarillos (precipitado) al añadir acetato de etilo.

Finalmente, el producto aislado se lavó con n-hexano y se secó a presión reducida a temperatura ambiente, obteniendo RNH puro con un rendimiento del 55 % (0,24 g). RMN ^1H (500 MHz, D_2O), δ ppm: 7,19 (s, 1H), 6,14 (dd, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, 1H), 5,05-5,02 (m, 1H), 4,92 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 4,24 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H), 4,18-4,16 (m, 1H), 4,03-3,99 (m, 1H), 3,79 (dd, $J_1 = 12,5$ Hz, $J_2 = 3,5$ Hz, 1H), 3,73 (dd, $J_1 = 12,5$ Hz, $J_2 = 5,0$ Hz, 1H), 3,11 (s, 2H) (FIG. 8 a 11). RMN ^{13}C (125 MHz, D_2O), δ ppm: 173,03, 137,92, 125,32, 105,30, 101,05, 95,01, 83,62, 71,06, 70,24, 61,64, 22,09 (FIG. 12). Además, los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C de RNH purificado en visuales de CD_3OD están en la sección de información de apoyo (FIG. 13 a 16), en donde EM: observado $m/z=257,18$ ($M+1$). calc. para $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5$ ($M+1$): 257,11 (FIG. 17 y 18). UV (λ_{max} en H_2O): 338 nm (FIG. 19).

Síntesis en estado sólido de RNH a partir de RNCl

En la primera etapa, para disminuir la hidrólisis de RNH durante el transcurso de la reacción, se configuró la reacción de reducción en un medio sin solventes. Los presentes inventores utilizaron SiO_2 como soporte sólido para incrementar la superficie en la que ocurría la reacción. En este procedimiento, se introdujeron SiO_2 (0,25 g), RNCl (0,1 g, 0,34 mmol), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,2 g, 1,15 mmol) y NaHCO_3 (0,25 g) en un mortero y se molieron durante 5 minutos, obteniendo unos polvos homogéneos. A continuación, se añadió 1 ml de agua DI gota a gota a la mezcla de reacción y la reacción se molió durante 10 minutos a temperatura ambiente (Tabla 1, entrada 1). Cabe mencionar que sin usar el soporte sólido, la mezcla de reacción se volvió pegajosa y difícil de moler. Después de moler, los productos fueron extraídos con MeOH y se realizó un seguimiento del progreso de la reacción mediante CCF (cromatografía en capa fina). Los resultados mostraron una cantidad traza de RNH como el único producto que no resultó posible aislar y purificar para su posterior identificación. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que, en ausencia de suficiente agua, el compuesto intermedio sulfinico no puede protonarse para producir el compuesto intermedio ácido sulfinico y a continuación RNH como producto (Esquema 5). Para someter a ensayo dicha hipótesis, se repitió este procedimiento con una etapa final alternativa. Al final, se transfirió la mezcla de reacción a un matraz de fondo redondo con una barra agitadora magnética, se añadieron 8 ml de solución de NaHCO_3 (1 M), y se dejó que transcurriera la reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se liofilizó la mezcla de reacción y el residuo se purificó mediante cromatografía de columna en una mezcla de alúmina básica y sílice, utilizando metanol como eluyente. Se obtuvo el RNH aislado con un rendimiento de 15 % (Tabla 1, entrada 3). Al cambiar el soporte sólido (Al_2O_3 en lugar de SiO_2), no se observó una mejora notable del rendimiento del producto (Tabla 1, entradas 2 y 4).

La capacidad de trabajar bajo condiciones ambientales es una ventaja de este procedimiento, aunque el bajo rendimiento del producto es una grave desventaja. Por lo tanto, con el fin de encontrar un medio para producir un alto rendimiento, los presentes inventores decidieron realizar un seguimiento de la reacción en solución acuosa bajo condiciones anaeróbicas (Tabla 1, entradas 5 a 9).

Tabla 1. Síntesis de RNH a partir de RNCl bajo diferentes condiciones.

Entrada	Condiciones de reacción	Base	Soporte sólido	RNCl: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (mol:mol)	Tiempo	Rendimiento (%) ^e
1	Sin solvente ^a	NaHCO_3 (0,25 g)	SiO_2 (0,25 g)	1:3,4	15 min	0
2	Sin solvente ^a	NaHCO_3 (0,25 g)	Al_2O_3 (0,25 g)	1:3,4	15 min	0
3	Sin solvente/Solución ^b	NaHCO_3 (0,25 g)	SiO_2 (0,25 g)	1:3,4	15+30 min	15
4	Sin solvente/Solución ^b	NaHCO_3 (0,25 g)	Al_2O_3 (0,25 g)	1:3,4	15+30 min	17
5	Solución ^c	NaHCO_3 (1,2 M)	-	1:2,0	3 h	42
6	Solución ^c	NaHCO_3 (1,2 M)	-	1:2,5	3 h	50
7	Solución ^c	NaHCO_3 (1,2 M)	-	1:2,7	3 h	55
8	Solución ^c	NaHCO_3 (1,2 M)	-	1:3,0	3 h	54
9	Solución ^d	NaHCO_3 (1,2 M) y Na_2CO_3 (0,2 g)	-	1:2,7	15 h	51 ^f

^a RNCl (0,1 g), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,2 g), base y soporte sólido se introdujeron en un mortero y se molieron.

^b RNCl (0,1 g), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,2 g), base y soporte sólido se introdujeron en un mortero y se molieron durante 15 min; a continuación, toda la mezcla de reacción se añadió a 8 ml de solución de NaHCO_3 (1 M) y se sometió a agitación durante 30 min.

^c La reacción de RNCl (0,5 g) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,8 g) se llevó a cabo en 20 ml de solución de NaHCO_3 (1,2 M) bajo atmósfera de N_2 a pH 8,1.

^d La reacción de RNCl (0,5 g) y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0,8 g) se llevó a cabo en una solución de 20 ml de NaHCO_3 (1,2 M) y 0,2 g de Na_2CO_3 bajo atmósfera de N_2 a pH 8,5.

^e Los rendimientos se refieren a los productos puros aislados.

^f El producto contiene un 12 % de impureza de dihidronicotinamida según la RMN ^1H .

Resultados y comentario

En el presente estudio, presentamos un procedimiento directo para la síntesis escalable de RNH mediante la utilización de β -RNCl disponible comercialmente. La reacción se llevó a cabo en una solución acuosa de NaHCO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ bajo una atmósfera de nitrógeno (Esquema 4). Los presentes inventores han desarrollado un método rápido de cromatografía de columna para la purificación del RNH a partir de la mezcla de reacción que resulta en un 96 % de pureza. Dado que una de las principales aplicaciones de RNH es en bebidas suplementarias, también se investigó el efecto de la temperatura, luz, pH y oxígeno en la estabilidad del RNH en soluciones acuosas y se compararon estos resultados con la estabilidad del RN bajo condiciones similares

Uno de los parámetros más significativos, y que afecta directamente a la reacción de síntesis de RNH y al producto RNH, es el pH. Es importante el ajuste y mantenimiento de un pH constante durante el curso de la reacción. Este problema puede entenderse mejor revisando el mecanismo de la reacción (Esquema 5). Una solución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ es inestable bajo condiciones aeróbicas a $\text{pH}=7$. Por lo tanto, esta reacción debe llevarse a cabo bajo condiciones anaeróbicas y alcalinas. Inicialmente, la reacción entre RN y $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ lleva a la formación de un intermedio sulfinato, que es estable bajo condiciones básicas. Al protonar este compuesto, se forma su derivado del ácido sulfinico. Este compuesto intermedio de ácido sulfinico es inestable bajo condiciones ambientales y se convierte en RNH mediante producción de SO_2 . Por lo tanto, es importante encontrar y establecer un pH que no solo estabilice $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, sino que también protone el intermedio sulfonato para producir RNH. Además, debido a que el RNH presenta un enlace N-glucosídico en su estructura, es susceptible a la hidrólisis. En consecuencia, resulta necesario ajustar el pH y mantenerlo con precisión durante todo el transcurso de la reacción para que el RNH no se hidrolice.

El pH mínimo para estabilizar la solución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, sin disminuir su actividad como agente reductor, es de entre 8,0 y 8,5. Inicialmente, se configuró la reacción a pH 8,1 mediante la utilización de una solución de NaHCO_3 (1,2 M). A continuación, se disolvió RNCl en dicha solución y se añadió $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ gradualmente a la mezcla de reacción, bajo una atmósfera de nitrógeno a 0°C . Al añadir $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a la solución, y durante toda su oxidación, se redujo el pH. Sin embargo, la solución de bicarbonato sódica a una concentración de 1,2 M resultó suficiente para mantener el pH constante durante el transcurso de la reacción. Después de añadir $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se liofilizó la mezcla, obteniendo un sólido amarillo. Finalmente, se purificó el residuo mediante cromatografía de columna corta con una mezcla de alúmina básica y sílice (metanol como eluyente), obteniendo el producto puro RNH con un rendimiento de 55 % (Tabla 1, entrada 7). La proporción molar optimizada de RNCl a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ era de entre 1 y 2,7 y un aumento de la cantidad de ditionita sódica no mejoró el rendimiento del producto (Tabla 1, entrada 8). Después de la purificación del producto en bruto, se llevó a cabo una cromatografía de capa fina (CCF) con el RNH purificado utilizando metanol como solvente y se comparó con el RNCl puro y la nicotinamida (NA) (FIG. 1a). Todos los compuestos eran activos a una longitud de onda de 254 nm. Sin embargo, al cambiar la longitud de onda a 365 nm, se encontró que solo RNH emitía fluorescencia. Se ha informado de que RNH es fuertemente fluorescente a aproximadamente 340 nm. Debido a que los valores de R_f de RNH y AN eran casi iguales, la propiedad fluorescente del RNH ayudó a identificar la posición exacta de este compuesto durante la CCF. Tal como se muestra en la FIG. 1a, la RNH purificada muestra alta pureza en la placa de CCF.

El espectro de FT-IR del RNH sintetizado y purificado se estudió y comparó con el espectro del RNCl original (FIG. 2b). En el espectro de FT-IR del RNH, la existencia de un pico específico en 1643 cm^{-1} puede atribuirse a la vibración de estiramiento de la banda $\text{C}=\text{C}$, y confirma la reducción del anillo de piridinio del NR. Dos picos en 3340 y 3209 cm^{-1} se refieren a bandas de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo NH_2 en la estructura del RNH, lo que implica que el grupo amida permanece intacto durante el transcurso de la reacción. Un pico agudo en 1685 cm^{-1} indica la banda de estiramiento $\text{C}=\text{O}$ del grupo amida. Dos picos en 2920 y 2840 cm^{-1} confirman la vibración de estiramiento de $\text{C}-\text{H}$ alifático tanto en la ribosa como en los anillos de dihidronicotinamida de la estructura del RNH. La presencia de grupos hidroxilo en la estructura del RNH se confirma con un pico ancho que aparece en el intervalo de entre 3500 y 3000 cm^{-1} .

Para asegurar adicionalmente el éxito de la síntesis de RNH y su pureza, también se registraron los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C del RNH purificado en agua deuterada. La existencia de once protones que no son intercambiables con D_2O confirma completamente la estructura del RNH sintetizado (FIG. 3). El desplazamiento químico de cada protón y las constantes de acoplamiento correspondientes están de acuerdo con las previamente informadas en la literatura científica. La RMN- ^{13}C y más detalles se proporcionan en la FIG. 12.

Para estudiar la eficiencia de la columna utilizada para la purificación del RNH, se comparó la RMN- ^1H del RNH purificado con la RMN- ^1H de los RNCl y AN puros (FIG. 4). La principal impureza en la mezcla de reacción era RN no reaccionado y, después de la purificación, no se observó ningún pico específico de RN en el espectro de RMN- ^1H del RNH purificado. Mediante la comparación del espectro de RNH con el espectro de AN, se encontró que solo había picos de trazas, lo que indica la presencia de AN en el RMN- ^1H del RNH purificado. Lo anterior significa que solo se hidroliza una cantidad traza del RN durante el transcurso de la reacción para formar AN. También se utilizó cromatografía de HPLC de fase inversa para confirmar adicionalmente la pureza de la muestra de RNH (FIG. 20). Los hallazgos de la HPLC coincidieron con los datos de RMN- ^1H y mostraron que tanto la pureza del RNH era de 96 % como que la impureza de AN era de 4 %. Curiosamente, no se detectó RN mediante la HPLC, aunque el RN estaba presente en la RMN- ^1H . Lo anterior significa que la cromatografía de columna sobre una mezcla de alúmina básica y sílice es muy eficiente y capaz de purificar completamente el producto RNH respecto del RNCl restante.

A continuación, se intentó purificar el RNH en bruto, utilizando cromatografía de columna en sílice y usando metanol como el eluyente. Los resultados mostraron que la cromatografía de columna en sílice no resultó eficaz para separar el RN del RNH. La alúmina básica, como una superficie polar con muchos grupos hidroxilos, puede, en un grado moderado, separar físicamente el RN del RNH (por diferencia de sus polaridades). Además, debido a que la alúmina básica presenta cargas negativas en su superficie y el RN presenta una carga positiva, puede actuar como una resina de intercambio catiónico para inmovilizar el RN en su superficie. Los presentes inventores creen que esta es la razón principal por la que la alúmina es una mejor fase estacionaria que la sílice para la purificación del RNH. Sin embargo, se encontró que, durante la purificación del RNH en la cromatografía de columna, la alúmina básica obstruía la columna y resultaba en un caudal muy bajo que conducía a la degradación del RNH. Se tomaron medidas para resolver fácilmente este problema, mediante la mezcla de alúmina básica con sílice en una proporción de peso de 2:3, respectivamente. De esta manera se pudo purificar por primera vez cuantitativamente el RNH en modo preparativo (sin usar HPLC), utilizando un método habitual de cromatografía de columna sobre una mezcla de alúmina básica y sílice, utilizando metanol como eluyente.

A continuación, se configuró la reacción de reducción de RNCl a pH 8,5 mediante la utilización de una solución de NaHCO_3 y Na_2CO_3 (Tabla 1, entrada 9). Se disolvió el RNCl en dicha solución, después se añadió gradualmente $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a la mezcla de reacción bajo una atmósfera de nitrógeno a 0 °C. Tras completar la reacción (seguida mediante CCF), se liofilizó la mezcla, obteniendo un sólido amarillo. Finalmente, el residuo se purificó mediante cromatografía de columna corta sobre alúmina básica utilizando metanol como eluyente. A modo de prueba cualitativa, se llevó a cabo una CCF de dicho RNH purificado y se comparó el RN y AN utilizando metanol como solvente (FIG. 5a). Los resultados mostraron que el RNH obtenido no era puro después de la cromatografía de columna. En este punto, se observó que la nueva impureza estaba situada solo ligeramente sobre el RNH en la CCF. Dicha observación ayudó a explicar por qué este contaminante no puede separarse del RNH mediante la cromatografía de columna habitual. Curiosamente, la propiedad de fluorescencia de esta nueva impureza es similar a la del RNH, causando que ambos emitan fluorescencia a 365 nm en la CCF. Al estudiar la literatura, se encontró que probablemente era 1,4-dihidronicotinamida (DHNA) formada por hidrólisis del RNH durante el transcurso de la reacción.

Para obtener pruebas adicionales, se llevó a cabo una RMN- ^1H de dicha muestra en D_2O (FIG. 5b). Los resultados obtenidos indicaron que no había RNCl residual en esta muestra. Sin embargo, la presencia de cuatro picos de baja intensidad entre 7,5 y 9 ppm confirmó la existencia de una cantidad traza de AN en el RNH purificado. Tal como se muestra en la FIG. 5b, cuatro picos principales en 7,19, 6,14, 5,03 y 3,11 ppm confirman fuertemente un anillo de 1,4-dihidronicotinamida en la estructura del RNH. En el lado derecho de cada uno de los picos principales, hay un pico de menor intensidad y una forma similar al pico principal correspondiente. Los desplazamientos químicos de estos picos son 7,12, 6,05 y 4,98 ppm, respectivamente. La integral de cada pico es de aproximadamente 0,12 y la integral de cada pico principal es de 0,89.

Estos resultados muestran que aproximadamente el 12 % del DHNA se encuentra presente en el RNH purificado. En otras palabras, lo anterior significa que al incrementar el pH, disminuye la velocidad de reacción y el RNH se hidroliza bajo las condiciones de reacción en un plazo de 15 horas. Resulta evidente que al hidrolizar el RNH, se forman simultáneamente D-ribosa y DHNA. Tal como se muestra en la FIG. 5b, los picos de impureza correspondientes a 5,19 y 5,10 ppm se atribuyen a los protones anoméricos α y β de la D-ribosa, respectivamente. Los otros picos de impurezas de la ribosa aparecen entre 3,65 y 4,65 ppm.

Al incrementar el pH de 8,1 a 8,5, la velocidad de la reacción evidentemente disminuye y, en consecuencia, hay una mayor posibilidad de reacciones secundarias, tales como la hidrólisis tanto de RN como de RNH.

Estas observaciones están de acuerdo con el mecanismo de reacción de la reducción de RN a RNH, tal como se observa en el Esquema 5. En este mecanismo, la reacción involucra un intermedio sulfínico que es estable bajo condiciones alcalinas y, en consecuencia, no se protona fácilmente para producir el RNH. En el procedimiento de síntesis del RNH, se forman aniones tiosulfato y bisulfito como productos de la hidrólisis y oxidación de la ditionita. Dichos aniones, de alta nucleofilicidad, pueden atacar el carbono 1' en la estructura del RNH y sustituir en lugar de DHNA. Lo anterior incrementaría indirectamente la velocidad de hidrólisis del RNH. Al incrementar el pH, la posibilidad de hidrólisis de RNH disminuye, mientras que simultáneamente la presencia de algunos aniones, que actúan como nucleófilos, puede incrementar la hidrólisis del RNH. La hidrólisis del RNH por estos aniones es más grave e incrementa el tiempo de reacción de la síntesis de RNH. Por lo tanto, como el parámetro más importante, debe ajustarse el pH de la reacción a fin de minimizar la formación de AN y DHNA, reduciendo el tiempo de reacción. Este es un factor muy significativo debido a los valores de R_f de dichos subproductos son cercanos a los valores de R_f del RNH; por lo tanto, no pueden separarse del producto RNH mediante la cromatografía de columna habitual (FIG. 4a). En el presente trabajo, los presentes inventores encontraron que el pH optimizado para la síntesis de RNH a partir de RN era 8,1; a este pH (8,1), no se observó ninguna cantidad de DHNA y la cantidad de AN era despreciable.

La estabilidad térmica es muy importante para los fármacos y suplementos con potencial de uso en alimentos, debido a las elevadas temperaturas que con frecuencia se requieren para el procesamiento industrial. Con el fin de estudiar la estabilidad térmica del RNH, se llevó a cabo un ATG del RNH puro entre 25 °C y 900 °C, y se compararon los resultados con los del RNCl puro. La FIG. 6 muestra los termogramas TGA en el intervalo de 25 °C a 900 °C para

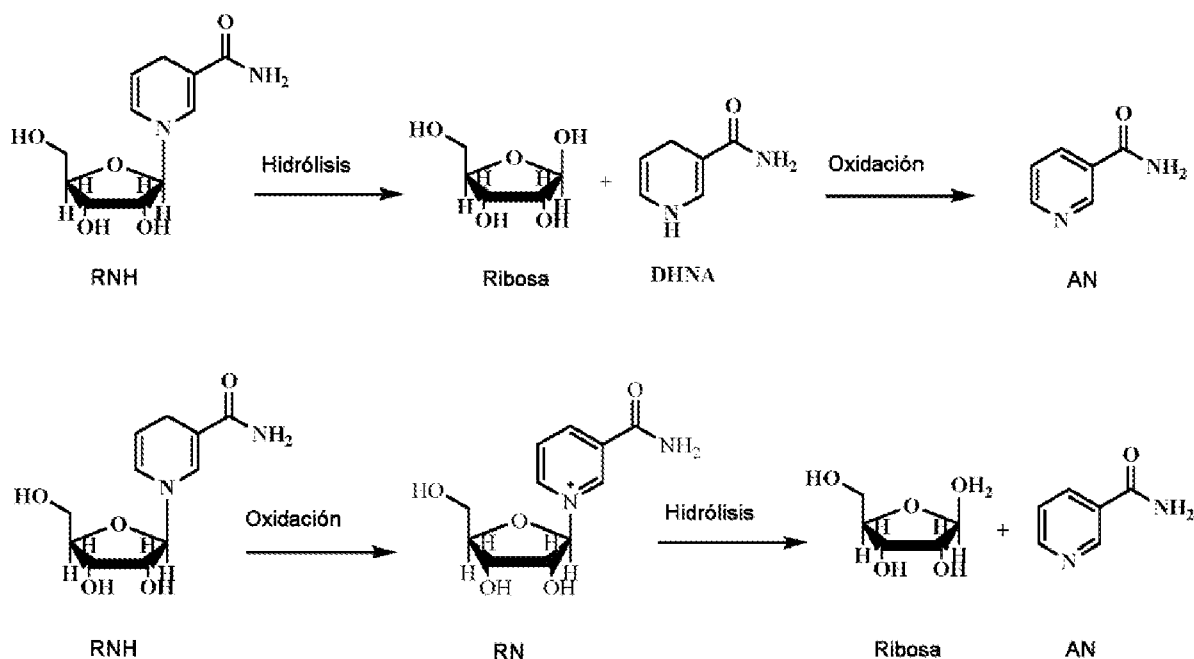
RNH y RNCl. Tal como puede observarse en las FIG. 6a y 6b, el RNH es claramente más estable térmicamente que el RNCl. Mientras que tanto el RNH como el RN muestran una mayor pérdida de peso a aproximadamente 218 °C y 910 °C, respectivamente, el RNH muestra una pérdida de peso de solo aproximadamente 50 % a esta temperatura, mientras que el RNCl muestra una pérdida de peso de aproximadamente 65 % a esta temperatura. El RNH muestra otra pérdida de peso distintiva, con un pico en aproximadamente 800 °C, que contribuye a un 30 % de pérdida de peso. Estos resultados confirman que el RNH es más estable térmicamente que el RNCl bajo una atmósfera de nitrógeno. Podría deberse a la presencia de iones cloruro en la estructura del RNCl, que pueden salir en forma de HCl cuando se incrementa la temperatura.

Estudio de estabilidad de las soluciones acuosas de RNH y RN

Se preparó una solución madre de RNH recién sintetizado y purificado (10.000 ppm) en agua DI desoxigenada. Esta solución madre se utilizó para la preparación de soluciones de RNH de 1000 ppm para mediciones de estabilidad. Se investigaron los efectos de la luz, pH (tampón), temperatura y oxígeno (en forma de aire) durante un período de almacenamiento de 60 días. La concentración restante de RNH se midió utilizando HPLC. Este procedimiento también se utilizó para una medición de la estabilidad del RN y los resultados se compararon con los de las muestras de RNH bajo las mismas condiciones.

Estudio de la estabilidad del RNH bajo diferentes condiciones

El RNH es una molécula inestable y sensible debido a su enlace N-glucosídico y puede sufrir degradación, hidrólisis y oxidación durante la exposición a altas temperaturas, nucleófilos y oxígeno. Algunos de los principales productos de estas reacciones de degradación para RNH se muestran en el Esquema 6. El estudio de la degradación del RNH bajo diferentes variables condicionales es importante para desarrollar nuevos suplementos o potenciales productos de bebidas. En la presente invención se estudió el efecto de la luz, la temperatura, el oxígeno y el pH sobre la tasa de degradación del RNH recién sintetizado y purificado en una solución acuosa durante un período de 60 días.



Esquema 6. Productos de degeneración del RNH, incluyendo hidrólisis y oxidación

Efecto del oxígeno y la luz

La sensibilidad oxidativa del RNH, como un derivado de la dihidronicotinamida, es bien conocida. Como la forma reducida del RN, el RNH presenta un alto potencial de oxidación. Con el fin de estudiar el efecto del aire, así como de la luz ambiental, sobre la estabilidad del RNH en una solución acuosa, se prepararon soluciones de RNH recién purificado (mediante cromatografía de columna) en agua DI al aire y bajo una capa de N₂, así como en la oscuridad y con luz ambiental. Se realizó un seguimiento de la concentración del RNH durante el transcurso de 60 días mediante HPLC. La FIG. 7a muestra la recuperación de RNH (%) durante los 60 días de almacenamiento según los resultados de HPLC tanto para muestras en la oscuridad/luz como en aire/bajo N₂.

A partir del resultado mostrado en FIG. 7a, resulta evidente que, mientras que el efecto de la luz es insignificante sobre la estabilidad del RNH en comparación con las muestras que se han mantenido en oscuridad, el oxígeno (en forma de

aire) presenta un efecto drástico sobre la estabilidad del RNH. Las muestras que se han conservado a 25 °C en agua DI en la oscuridad mostraban una degradación más rápida, alcanzando el 50 % en 60 días bajo aire. Por el contrario, se observó una degradación de aproximadamente 27 % para la muestra bajo las mismas condiciones que se había conservado bajo una capa de N₂. Estos hallazgos muestran que el RNH es susceptible a la oxidación en presencia de aire.

Efecto de la temperatura

La temperatura puede presentar un efecto profundo sobre la estabilidad de las moléculas con un enlace N-glucosídico. La degradación de la molécula de RN depende de la temperatura, siguiendo una cinética de orden uno. Ello es probable debido a la susceptibilidad de la disociación del enlace N-glucosídico, ya que la nicotinamida (NA) es un buen grupo saliente. Sin embargo, el grupo saliente para el RNH es la dihidronicotinamida (DHNA) y el RNH no es iónico (el nitrógeno en el anillo no posee una carga positiva). Por lo tanto, se podría prever que el RNH fuese más estable que la molécula de RN en términos de disociación espontánea del enlace N-glucosídico debido a la temperatura. Sin embargo, la degradación oxidativa del RNH también desempeña un papel importante en su estabilidad, tal como se ha mostrado en la sección anterior.

Se estudió la estabilidad del RNH a dos temperaturas diferentes tanto en aire como bajo una atmósfera de N₂. La FIG. 7b muestra los resultados de la recuperación del RNH en soluciones acuosas conservadas a 4 °C y 25 °C durante 60 días de almacenamiento. La FIG. 21 muestra los cromatogramas de HPLC correspondientes de algunas de las muestras tras 60 días de almacenamiento. Estos resultados confirman la degradación más rápida del RNH a 25 °C que a 4 °C, y también muestran el efecto acelerado del aire sobre la degradación oxidativa del RNH a 25 °C. Las muestras conservadas a 4 °C bajo una capa de N₂ no mostraban ninguna degradación detectable después de 60 días de almacenamiento, mientras que las muestras conservadas a 4 °C en aire mostraban una degradación de aproximadamente 10 % tras 60 días. Para las muestras a 25 °C, la degradación era de aproximadamente 27 % bajo una atmósfera de N₂ y de aproximadamente 50 % en aire tras 60 días de almacenamiento. El RNH puro (en forma de polvos) era estable en el refrigerador, en un tubo sellado, durante unos cuantos meses sin ninguna degradación.

Efecto del pH (tampón)

La degradación disociativa de la molécula de RN es independiente del pH. La molécula de RNH mostró una estabilidad relativamente buena en un medio básico (como también se destaca en los resultados y comentario) y una rápida degradación bajo condiciones ácidas durante un periodo de seguimiento de 10 h. Los presentes inventores investigaron el efecto del pH 5, 7 y 9, utilizando tampón de citrato, tampón de acetato amónico y tampón de carbonato, respectivamente, sobre la estabilidad del RNH en soluciones acuosas conservadas a 25 °C tanto al aire como bajo N₂, así como en oscuridad, durante un periodo de 60 días. 7c y FIG. 22). Los resultados de los presentes inventores en la FIG. 7c confirman la completa degradación del RNH en menos de un día a pH 5, mientras que las muestras preparadas en el tampón de acetato amónico a pH 7 mostraron una disminución lineal de la concentración de RNH de aproximadamente 70 % en el primer día a aproximadamente 2 % el día 30. Sin embargo, las muestras preparadas en el tampón de carbonato a pH 9 mostraron una estabilidad aceptable tanto en aire (aproximadamente 45 % de degradación medida después de 60 días) como bajo N₂ (aproximadamente 42 % de degradación medida después de 60 días), lo que concuerda con los datos a corto plazo obtenidos por otros estudios.

A partir de la comparación de la FIG. 7c (25 °C, pH 7, aire y N₂) con la FIG. 7b (25 °C, agua DI), resulta evidente que la rápida degradación del RNH a pH 7 se debe a la sal de acetato amónico utilizada para preparar el tampón. La presencia de algunos aniones, tales como cloruro y acetato, acelera la oxidación de RNH a RN debido a que la presencia de un anión como contraión del RN resulta necesaria en este proceso de oxidación. Además, el ion acetato puede actuar como nucleófilo y acelerar la hidrólisis del RNH. Al consumir el anión acetato, la proporción de amonio a acetato aumenta y, mediante la hidrólisis de esta cantidad adicional de amonio, la solución gradualmente se vuelve ácida y se incrementa la velocidad de hidrólisis del RNH. Por lo tanto, se puede afirmar que hay un efecto sinérgico en la degradación del RNH bajo condiciones de pH 7,0 al utilizar un tampón producido con acetato amónico.

Los gráficos de cinética de la velocidad de degradación del RNH se basan en los datos de HPLC recopilados durante los 60 días de almacenamiento para muestras con velocidad de degradación bastante rápidas. La FIG. 23 muestra las gráficas de cinética y las velocidades de degradación de orden uno para muestras de RNH almacenadas a pH 7,0, a 25 °C, bajo N₂ y bajo aire (FIG. 23a y 23b), muestras almacenadas a pH 9,0, a 25 °C, bajo N₂ y bajo aire (FIG. 23c y 23d), y para muestras de RNH que se han conservado en agua DI, a 25 °C, bajo N₂ y bajo aire (FIG. 23e y 23f). La velocidad de degradación para las muestras que se han conservado a 25 °C en agua DI bajo aire es de $1,27 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, lo que corresponde a una vida media de 63 días. En comparación, para las muestras de RNH que se han mantenido a 25 °C en agua DI bajo N₂ la tasa de degradación es de $5,9 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, lo que corresponde a una vida media de 136 días (FIG. 23).

Comparación de la estabilidad de RNH vs. RN en solución acuosa

El RNH es la forma reducida de RN y presenta una actividad biológica mucho mayor. Sin embargo, es esencial comparar la estabilidad de RN con la del RNH. Si el RNH no es tan estable como el RN, este último resultaría útil para

más aplicaciones. En la presente invención se comparó la estabilidad de ambos, RN y RNH, en soluciones acuosas. Dado que la estabilidad de RN en soluciones acuosas es independiente del pH, se estudió la estabilidad del RN y el RNH en agua DI a 4 °C y a 25 °C durante un período de 60 días. La Figura 6d compara los resultados de este estudio durante 30 y 60 días.

Resulta evidente a partir de los resultados de la FIG. 7d que, a 4 °C, el RN en una solución acuosa es muy estable, sin degradación detectable tras 60 días. Sin embargo, el RNH en solución acuosa almacenada al aire muestra una degradación de 9 % y 10 % tras 30 y 60 días, respectivamente, mientras que el RNH en una solución acuosa almacenada bajo una capa de N₂ es bastante estable, sin degradación detectable tras 60 días de almacenamiento. Por otro lado, la solución de RN que se ha conservado a 25 °C (que representa la temperatura ambiente) muestra una degradación de 48 % y 68 % tras 30 y 60 días de almacenamiento, mientras que esta degradación era de 36 % y 50 % para soluciones de RNH que se habían conservado al aire tras 30 y 60 días y de 13 % y 27 % para soluciones de RNH que se habían conservado bajo N₂ tras 30 y 60 días, respectivamente. Lo anterior muestra claramente que la degradación térmica es más intensa para RN que para RNH en soluciones acuosas, y que el almacenamiento del RNH alejado del aire mejora su estabilidad.

Conclusiones

Se ha desarrollado un procedimiento conveniente, eficiente y escalable para la síntesis y purificación del RNH a partir de RNCl disponible comercialmente. En el método actual, se utiliza ditionita sódica como agente reductor bajo diferentes condiciones. Si bien la síntesis aeróbica en fase sólida no puede proporcionar rendimientos elevados, la síntesis anaeróbica en una solución de bicarbonato sódico (1,2 M), a pH=8,1, alcanza un rendimiento de aproximadamente 55 % tras 3 horas de tiempo de reacción. Por primera vez, se llevó a cabo el procedimiento de purificación utilizando una cromatografía de columna corta habitual con alúmina básica. Se encontró que el efecto del pH de la reacción era muy crítico y se optimizó a 8,1. El mantenimiento de este pH es esencial durante toda la reacción. Los presentes inventores mostraron que un aumento del pH de 8,1 a 8,5 condujo a un incremento del tiempo de reacción y a algunas reacciones secundarias significativas, incluyendo la hidrólisis del RNH a ribosa y dihidronicotinamida. La RMN, FTIR, CL-EM, UV-vis y HPLC confirmaron la estructura, así como la alta pureza del RNH sintetizado mediante este método. Con el fin de investigar el efecto de la temperatura, pH, luz y oxígeno (aire) sobre la degradación del RNH en soluciones acuosas, se llevó a cabo un estudio de estabilidad a largo plazo. Los resultados mostraron que el RNH se oxida en presencia de oxígeno y se hidroliza rápidamente bajo condiciones ácidas. La velocidad de degradación fue menor bajo una atmósfera de N₂, a temperaturas más bajas y bajo pH básico.

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH), que comprende:
 5 proporcionar cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) en una solución líquida, añadir una ditionita de metal a la solución líquida bajo una primera temperatura, y hacer reaccionar la ditionina de metal con el cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) en la solución líquida bajo una segunda temperatura para formar una mezcla, en donde por lo menos una parte de la mezcla comprende el ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH).
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el cloruro de ribósido de nicotinamida (RNCl) comprende cloruro de ribósido de β -nicotinamida (β -RNCl).
3. Método según la reivindicación 1, en el que la solución líquida es una solución básica.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, en el que la solución básica comprende NaHCO_3 .
5. Método según la reivindicación 4, que comprende mantener un valor del pH de la solución básica entre 8,0 y 8,5.
- 20 6. Método según la reivindicación 5, en el que la solución básica presenta una concentración de NaHCO_3 entre 1,0 M y 1,5 M.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la solución básica presenta una concentración de NaHCO_3 de aproximadamente 1,2 M.
- 25 8. Método según la reivindicación 1, en el que la ditionita de metal comprende ditionita sódica.
9. Método según la reivindicación 1, en el que la primera temperatura es aproximadamente 0 °C.
- 30 10. Método según la reivindicación 1, en el que la segunda temperatura es la temperatura ambiente.
11. Método según la reivindicación 1, que comprende purgar de oxígeno la solución líquida y mantener la solución líquida bajo un gas inerte.
- 35 12. Método según la reivindicación 11, en el que el gas inerte comprende gas nitrógeno.
13. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende, además, liofilizar la mezcla para obtener unos polvos sólidos amarillos.
- 40 14. Método según la reivindicación 13, en el que el método comprende, además, purificar los polvos amarillos sólidos mediante cromatografía de columna utilizando una mezcla de alúmina básica y sílice.
15. Método según la reivindicación 14, en el que la alúmina básica y la sílice se encuentran en una proporción en peso de aproximadamente 2:3.
- 45 16. Método según la reivindicación 15, en el que el ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) presenta una pureza de por lo menos 90 %.
17. Método según la reivindicación 16, en el que la pureza del ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) es de por lo menos 93 %.
- 50 18. Método según la reivindicación 17, en el que la pureza del ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) es de por lo menos 95 %.
19. Método según la reivindicación 18, en el que la pureza del ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) es de por lo menos 96 %.
- 55 20. Método según la reivindicación 1, en el que el rendimiento del ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) es de por lo menos 40 %.
- 60 21. Método según la reivindicación 20, en el que el rendimiento del ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) es de por lo menos 45 %.
22. Método según la reivindicación 21, en el que el rendimiento del ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) es de por lo menos 50 %.
- 65

23. Método según la reivindicación 22, en el que el rendimiento del ribósido de 1,4-dihidronicotinamida (RNH) es de por lo menos 55 %.

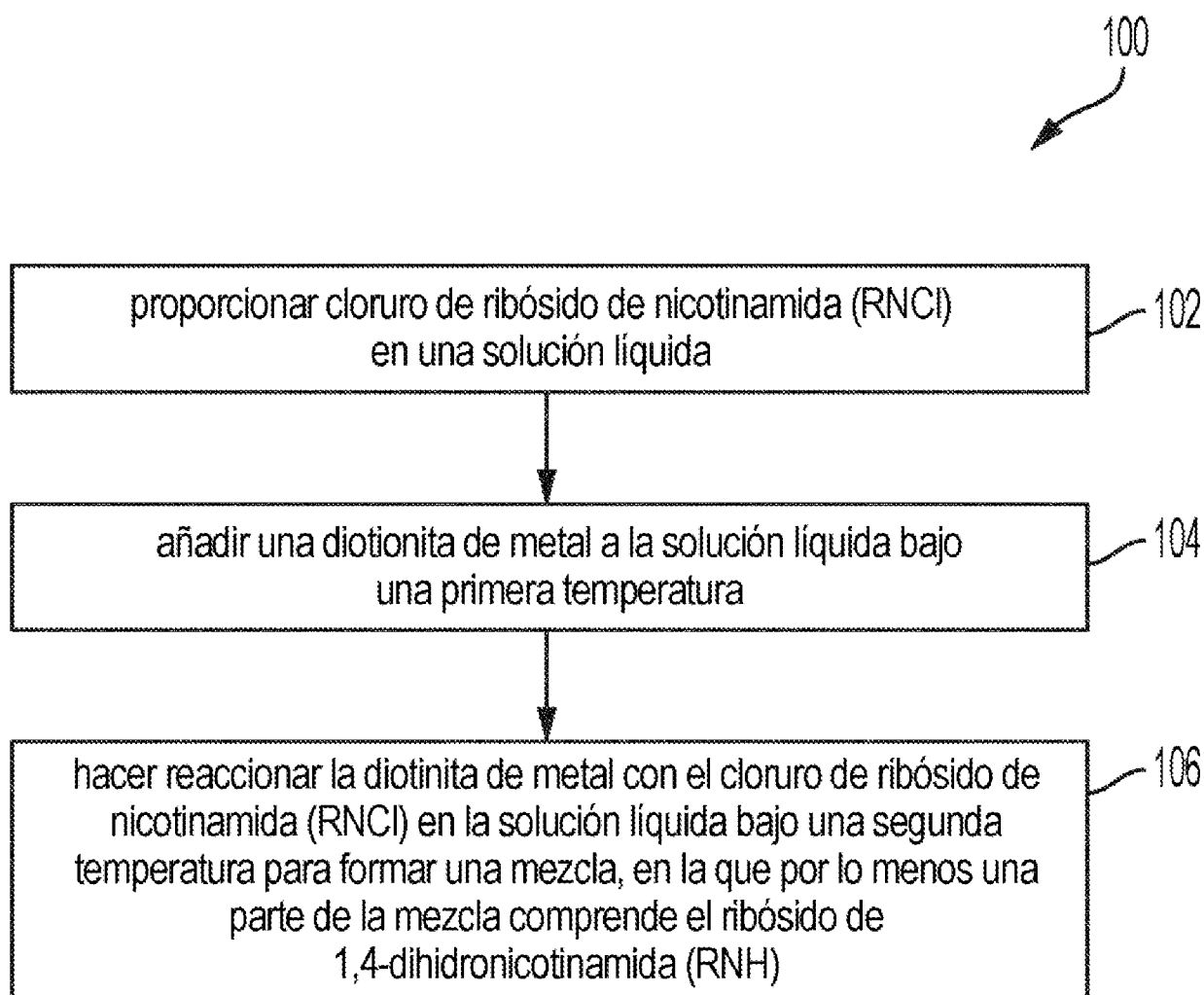


FIG. 1

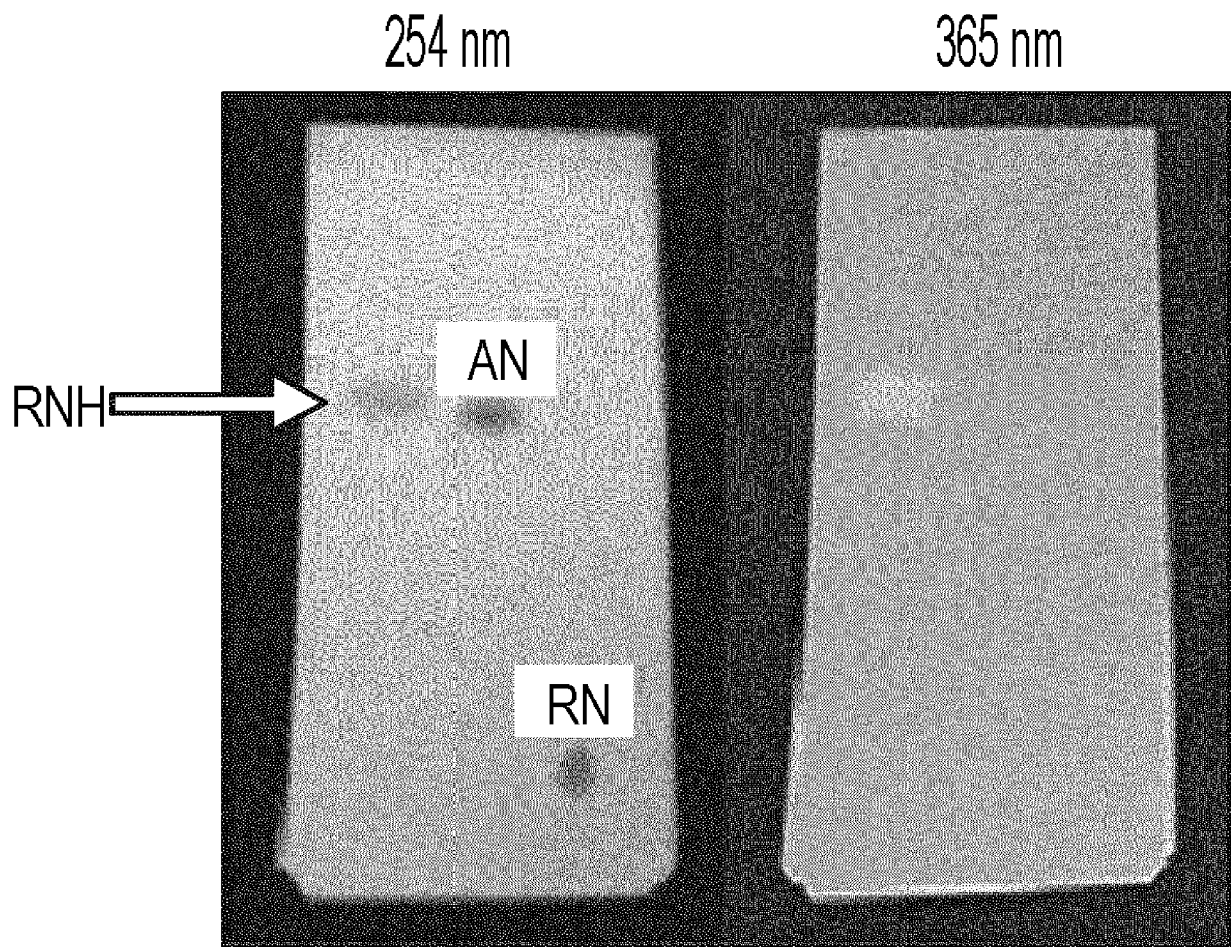


FIG. 2A

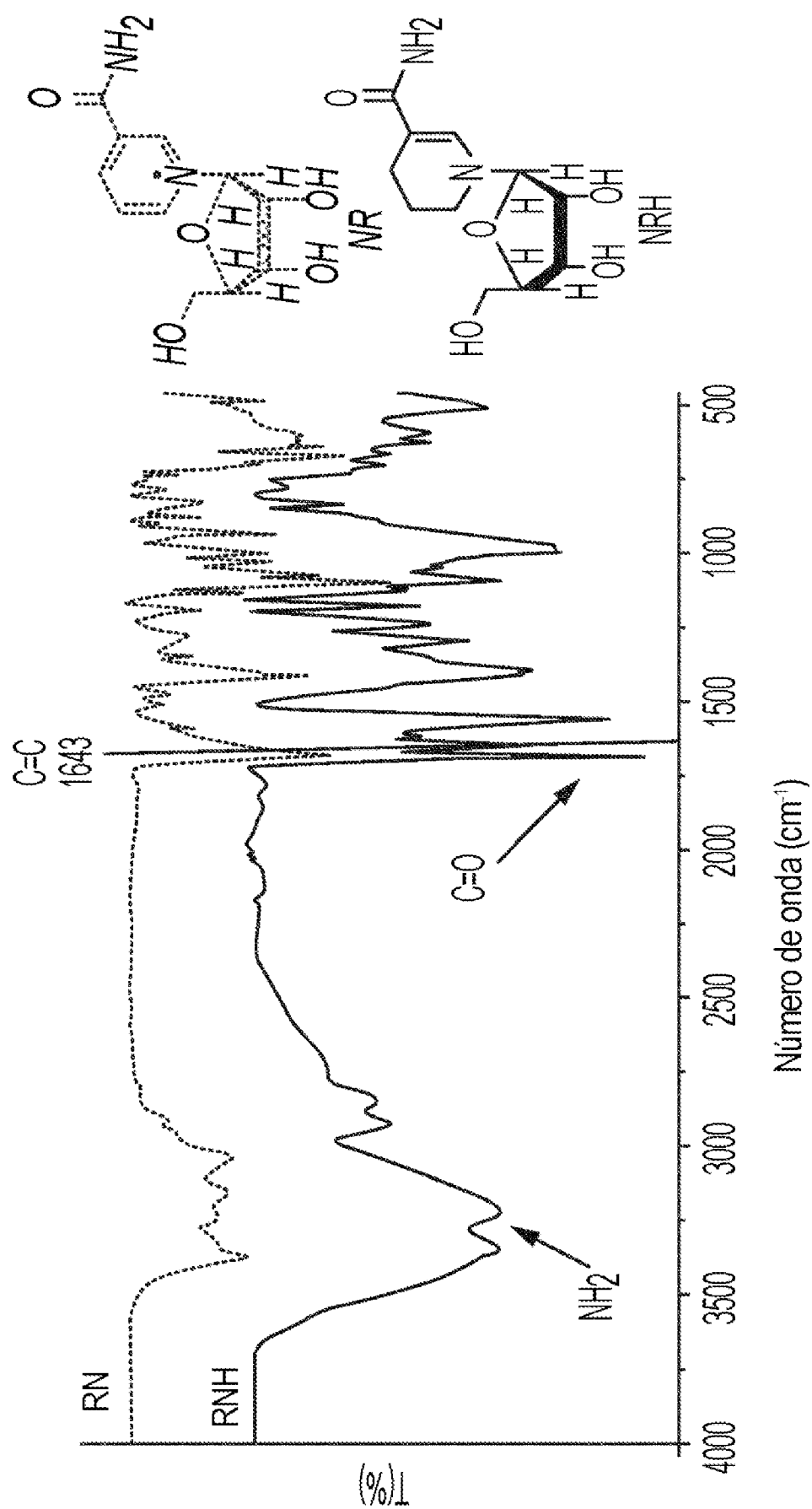


FIG. 2B

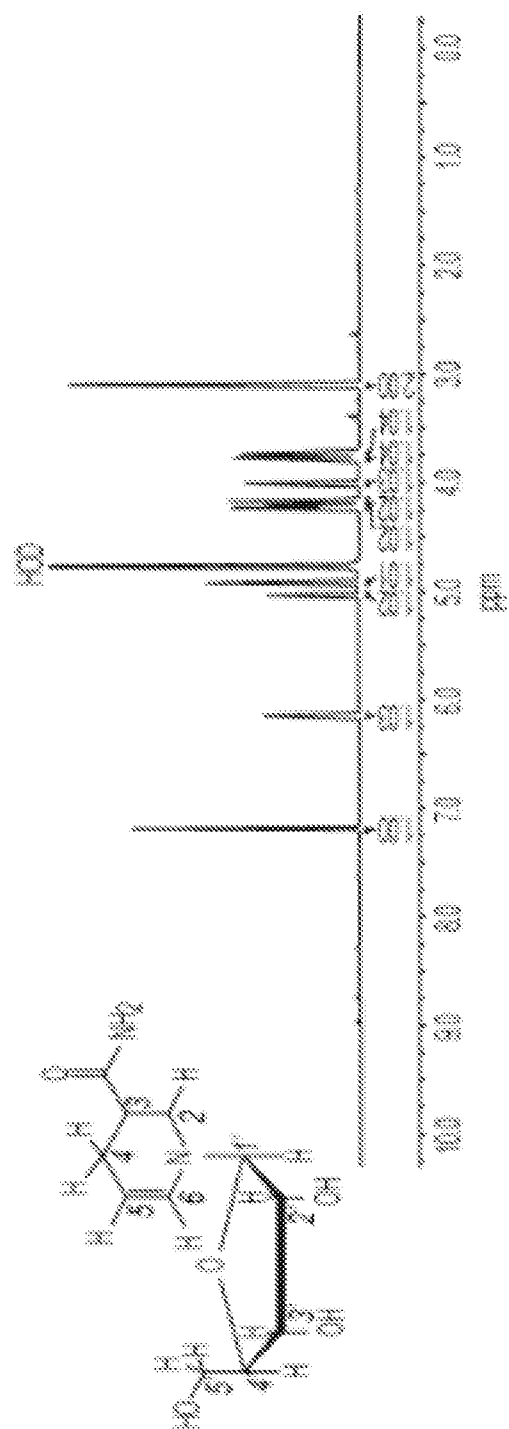


FIG. 3

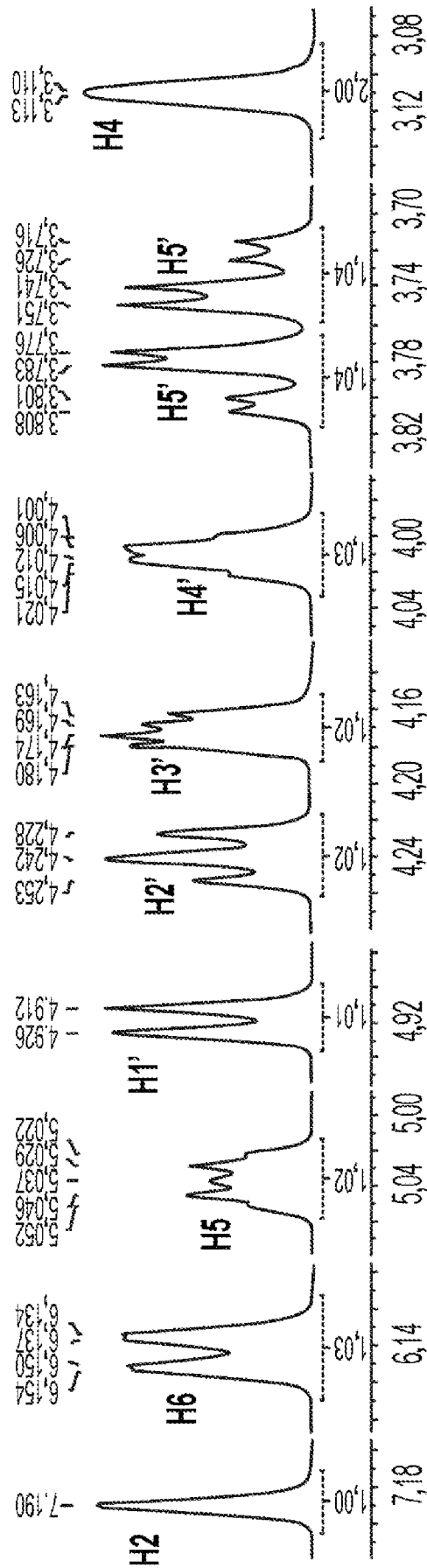
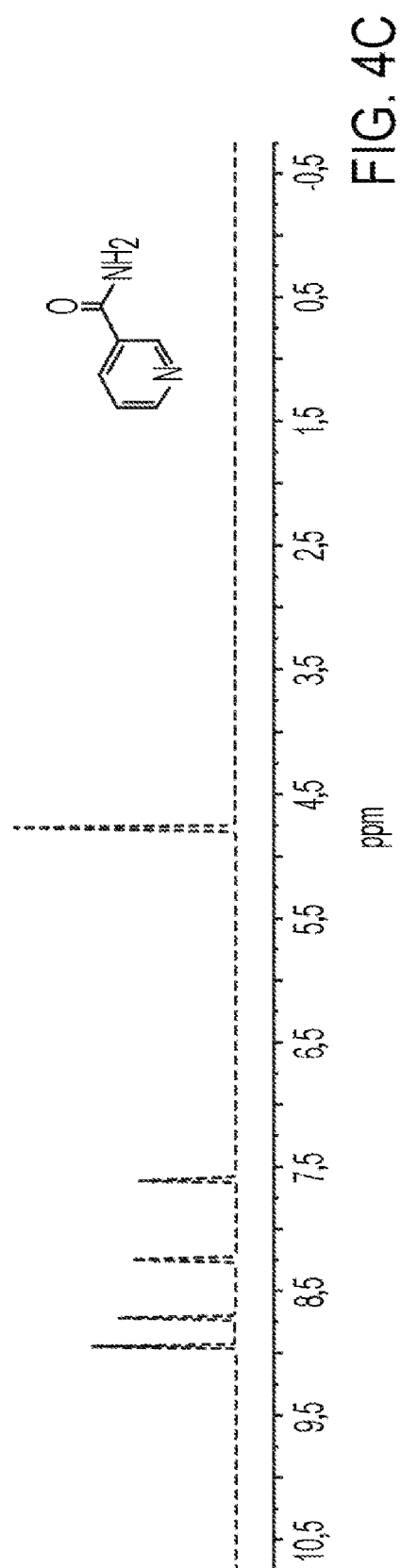
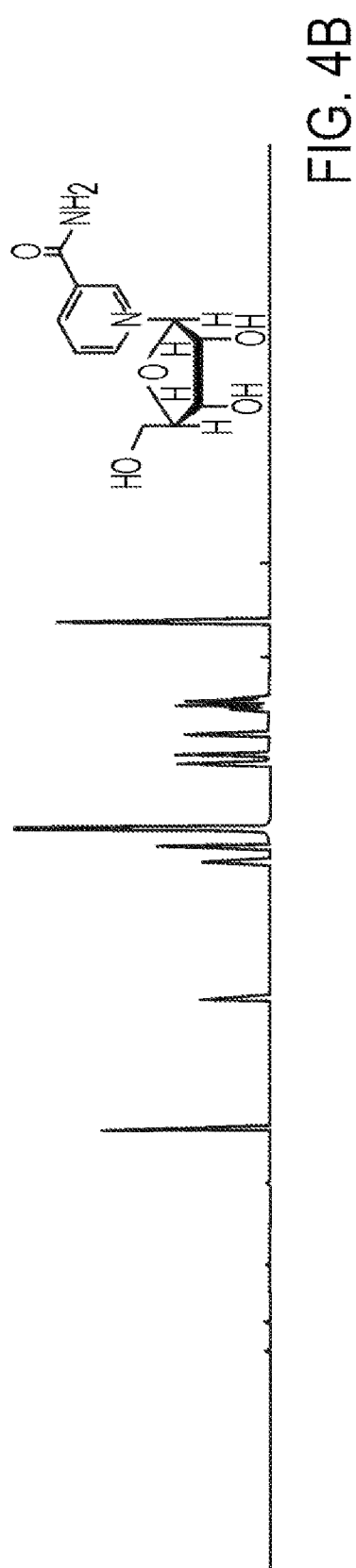
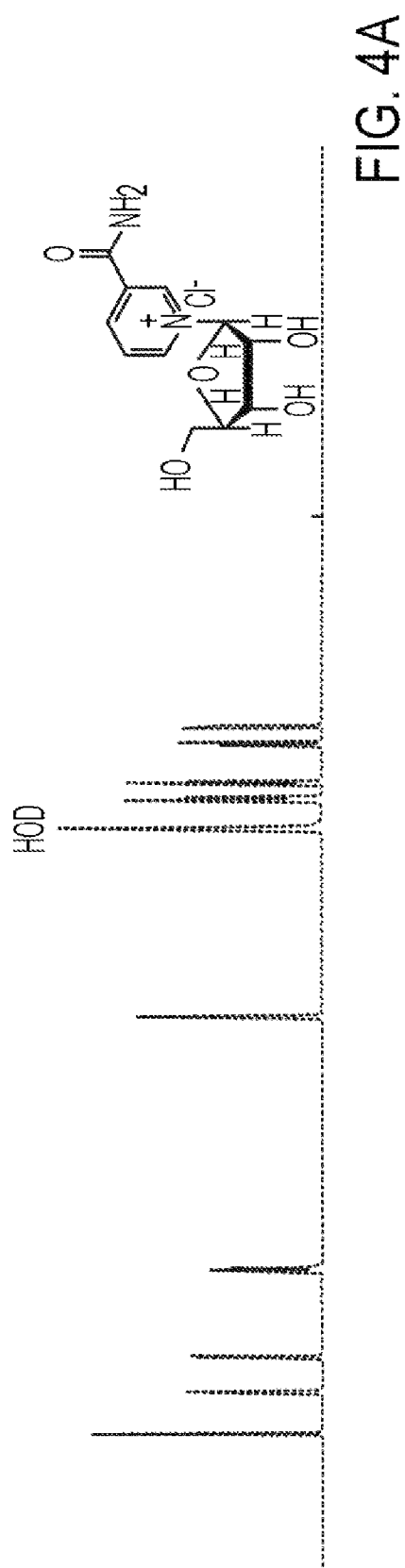


FIG. 3 (CONTINUACIÓN)



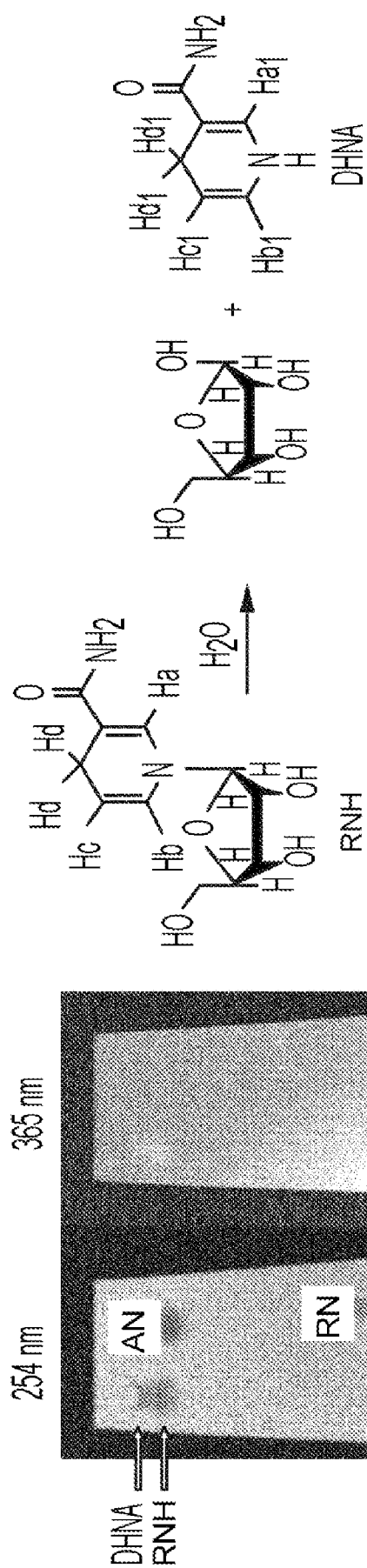


FIG. 5A

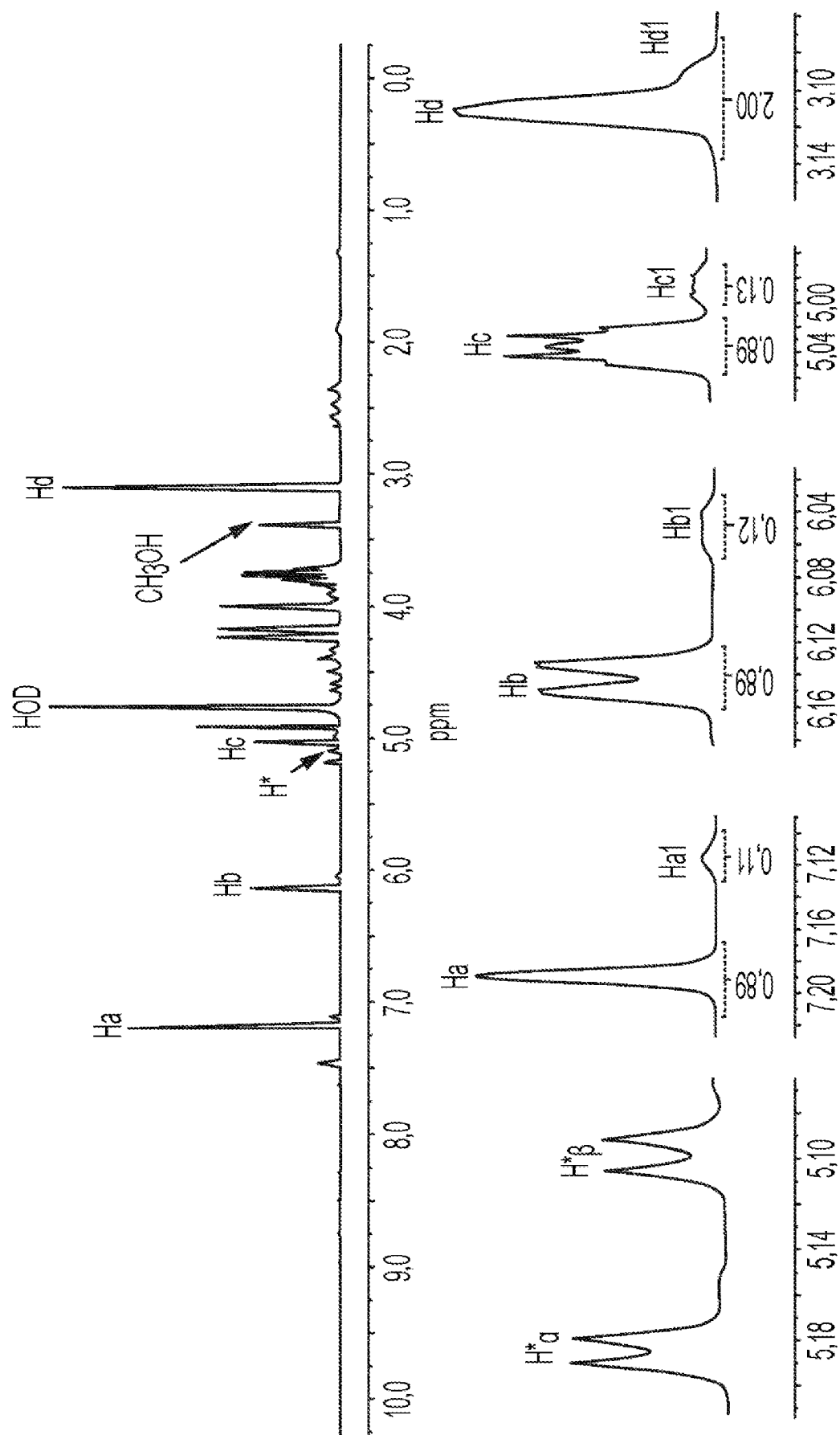


FIG. 5B

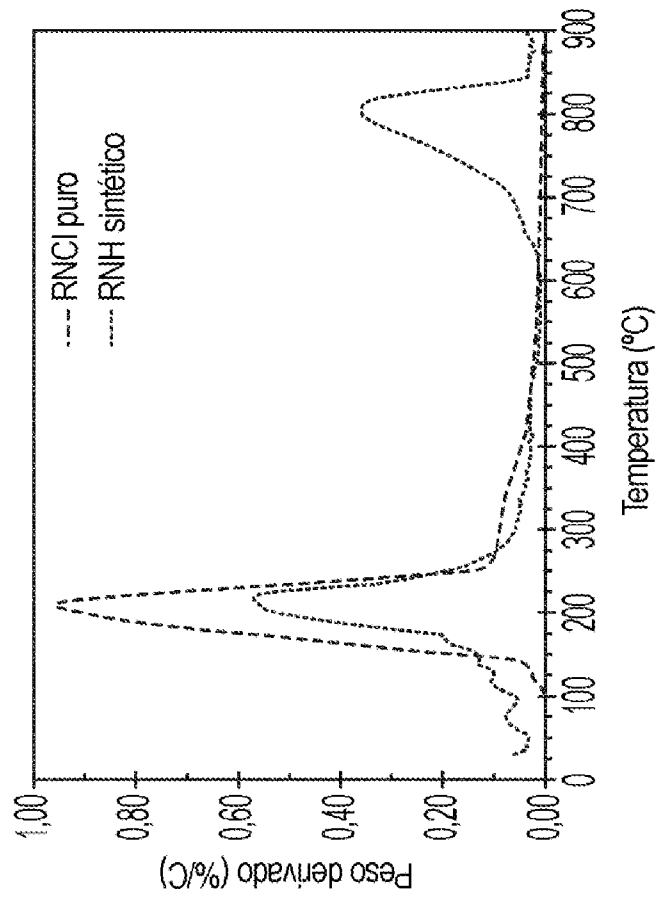


FIG. 6A

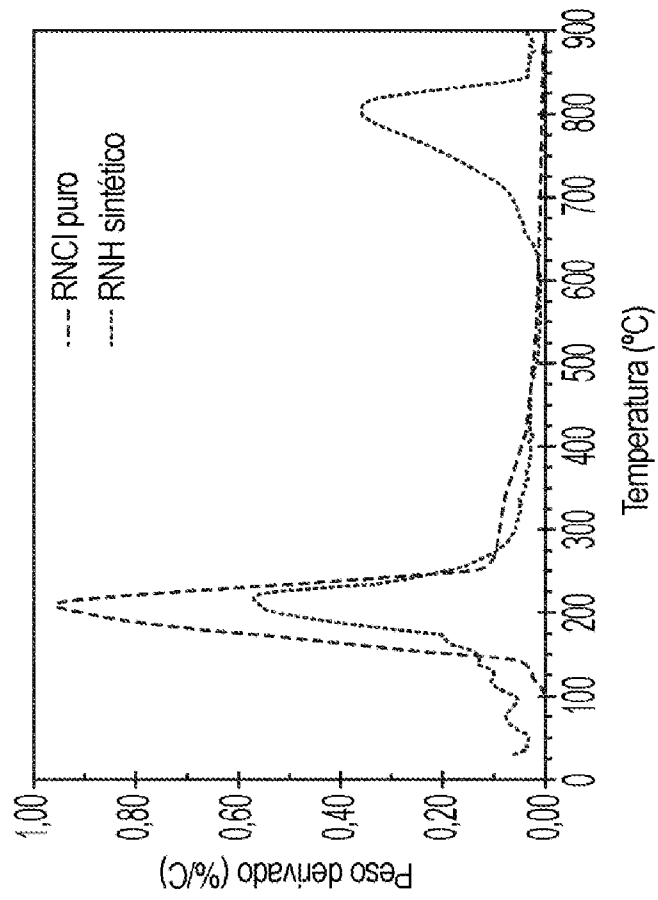


FIG. 6B

Muestras de RNH (1000 ppm) durante 60 días de almacenamiento a 25 °C, agua DI
Efecto de la luz bajo dos atmósferas diferentes

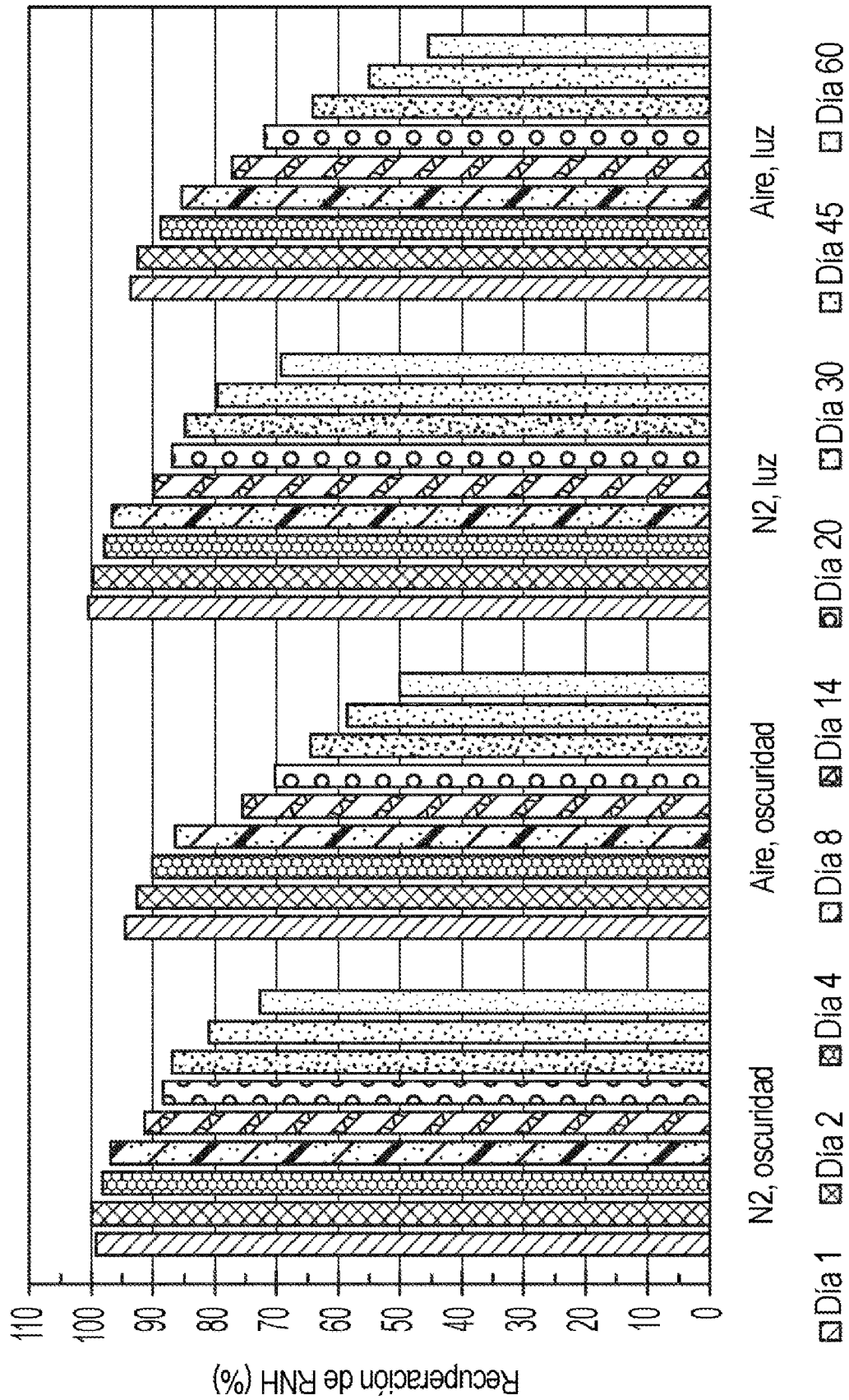


FIG. 7A

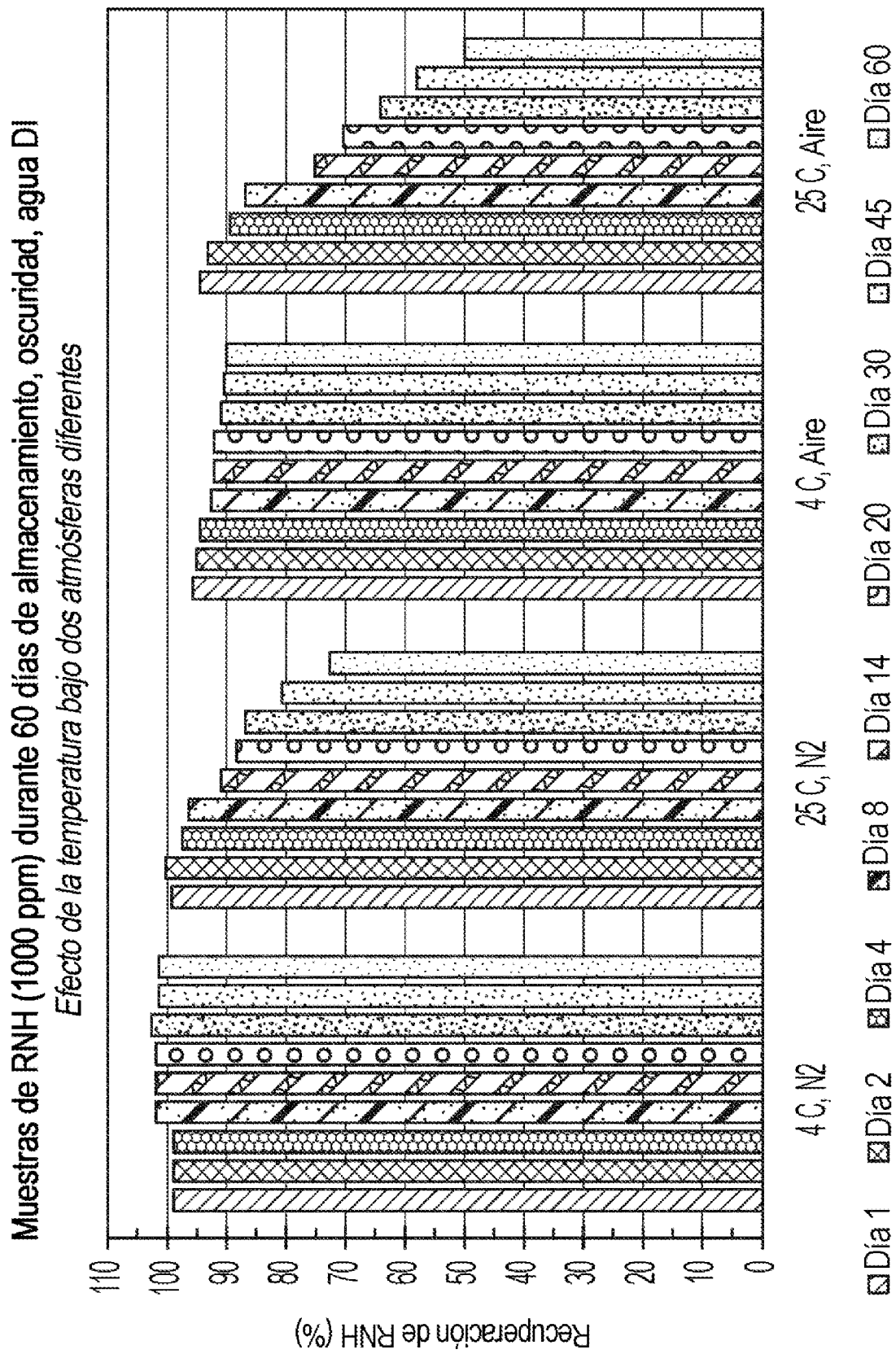


FIG. 7B

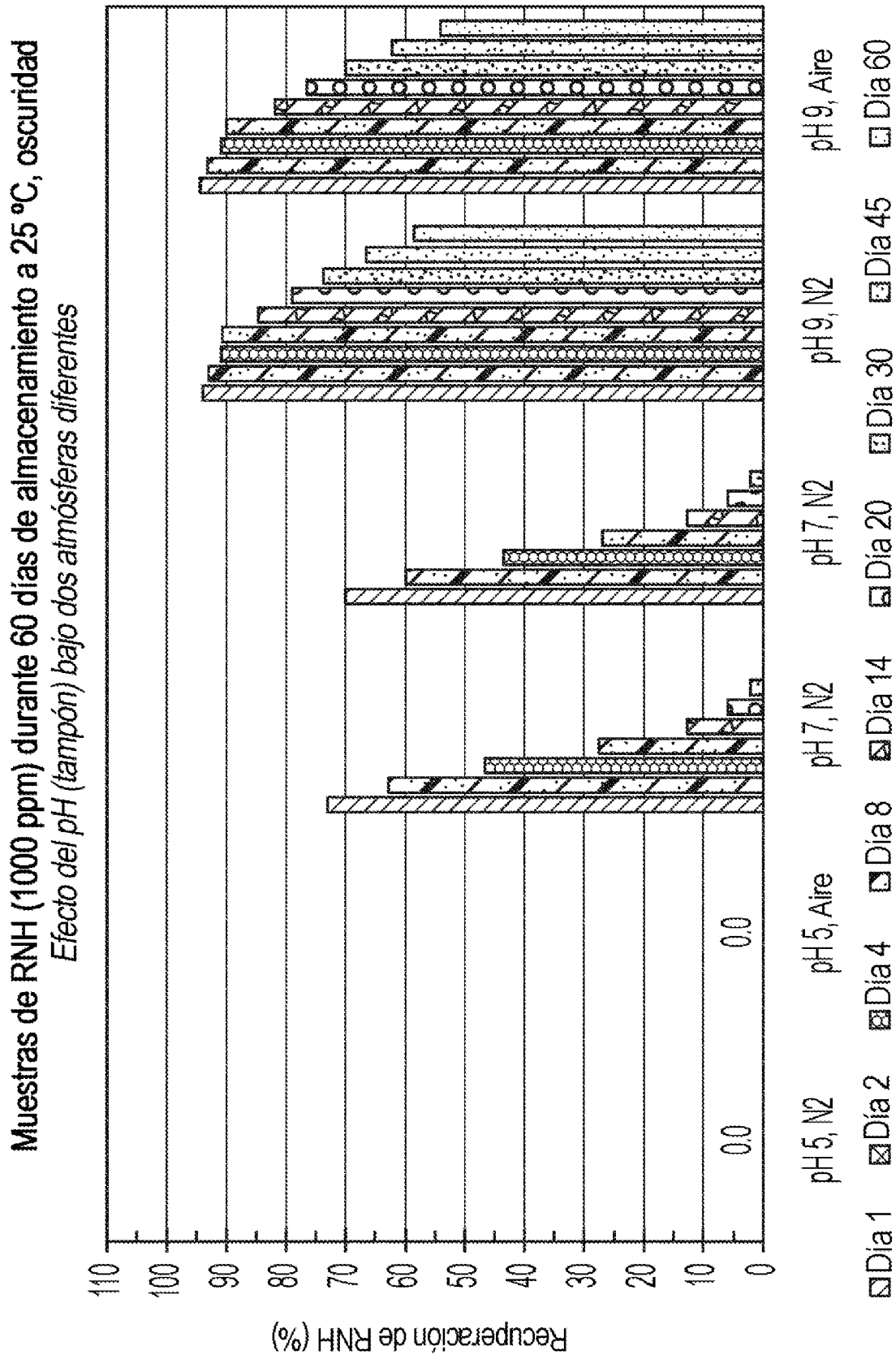


FIG. 7C

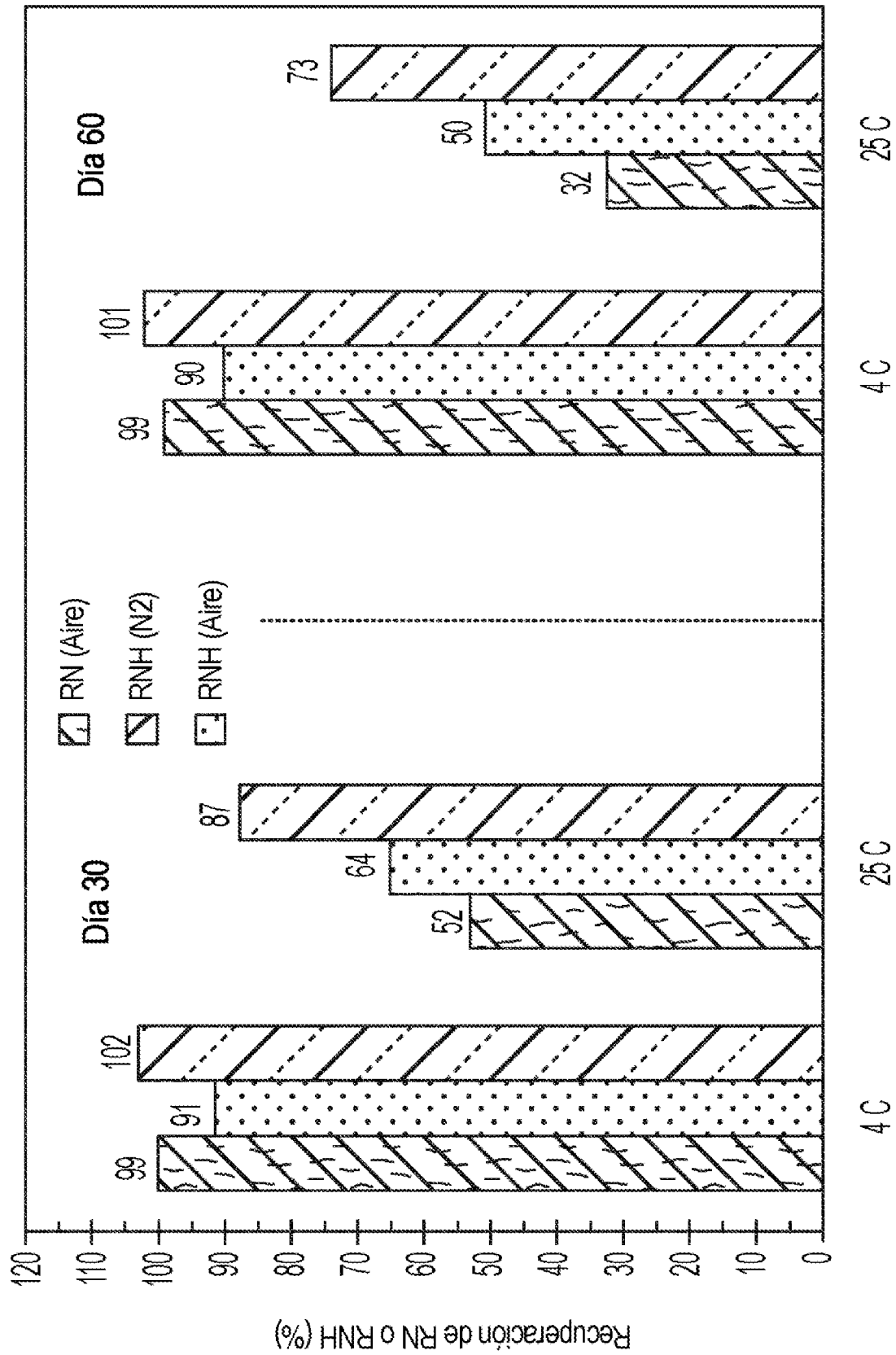


FIG. 7D

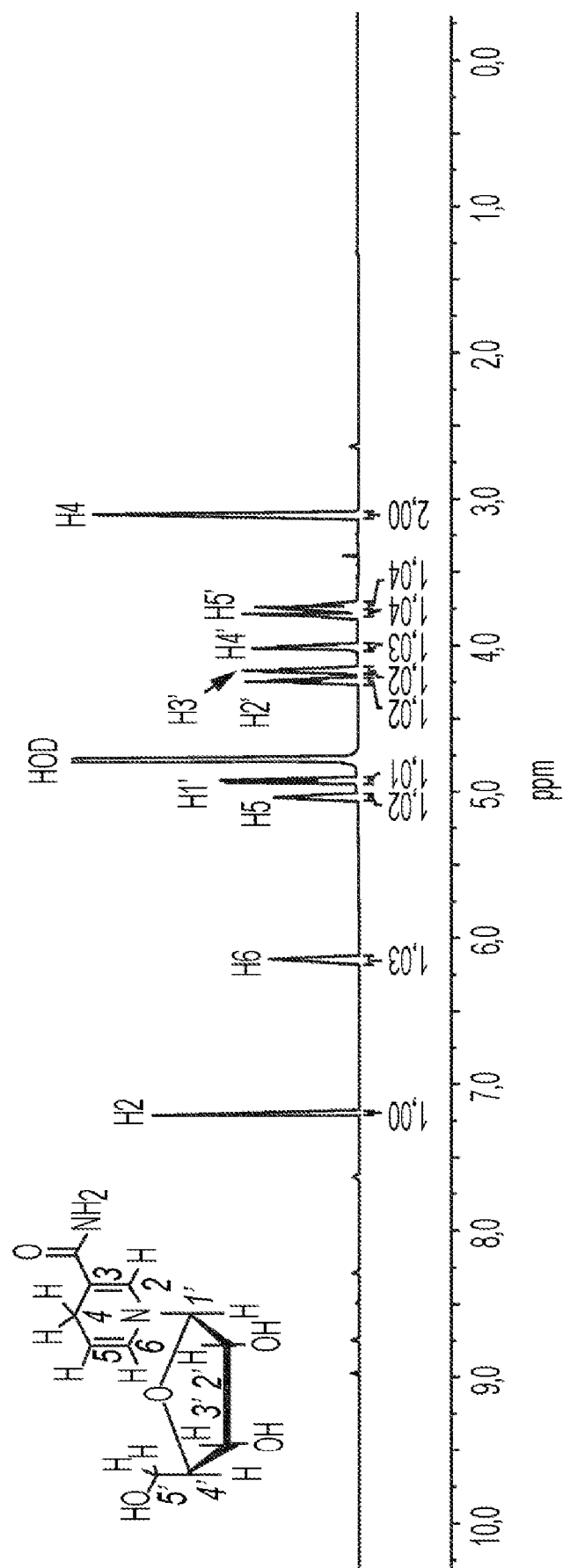


FIG. 8

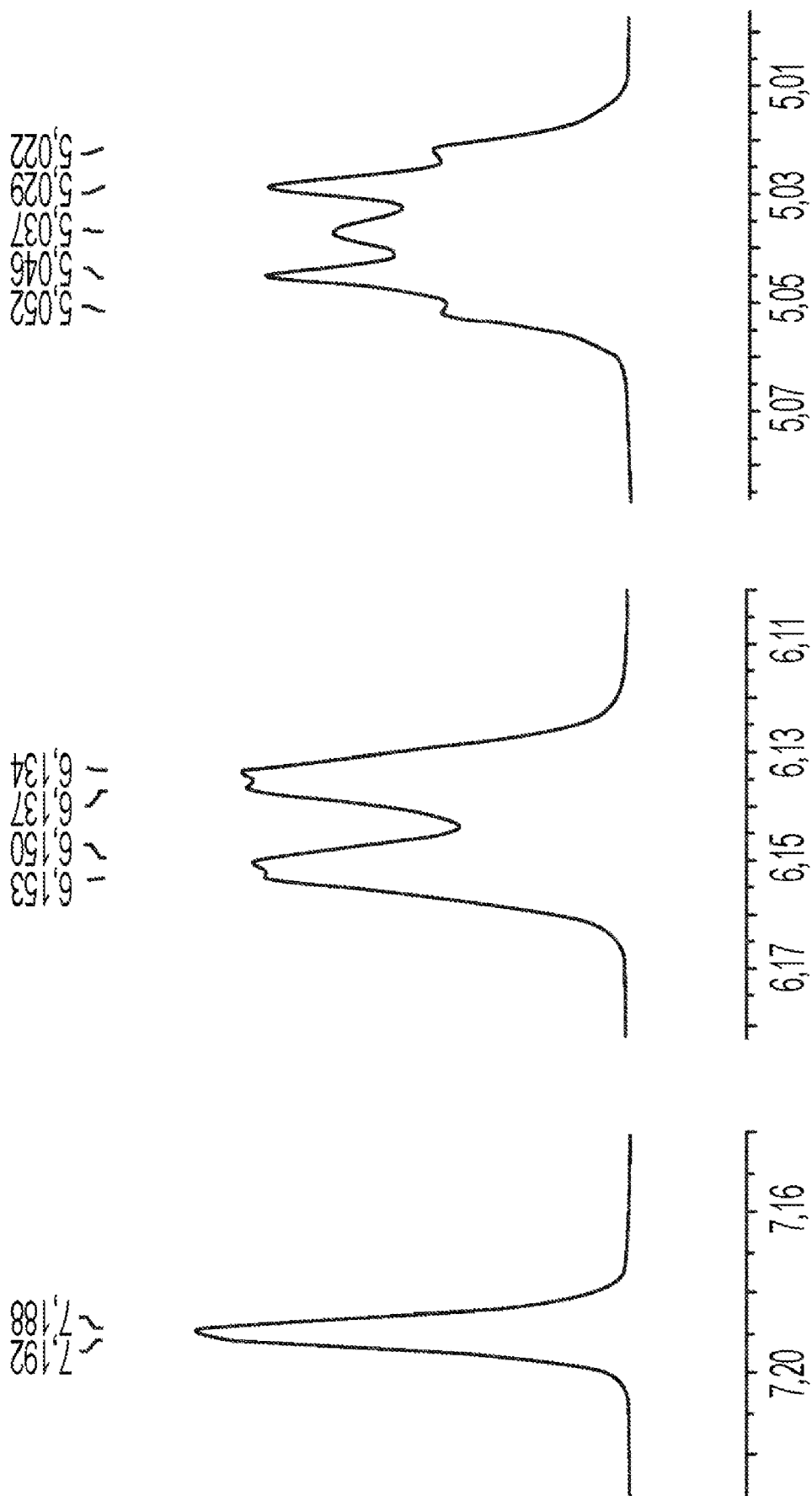


FIG. 9

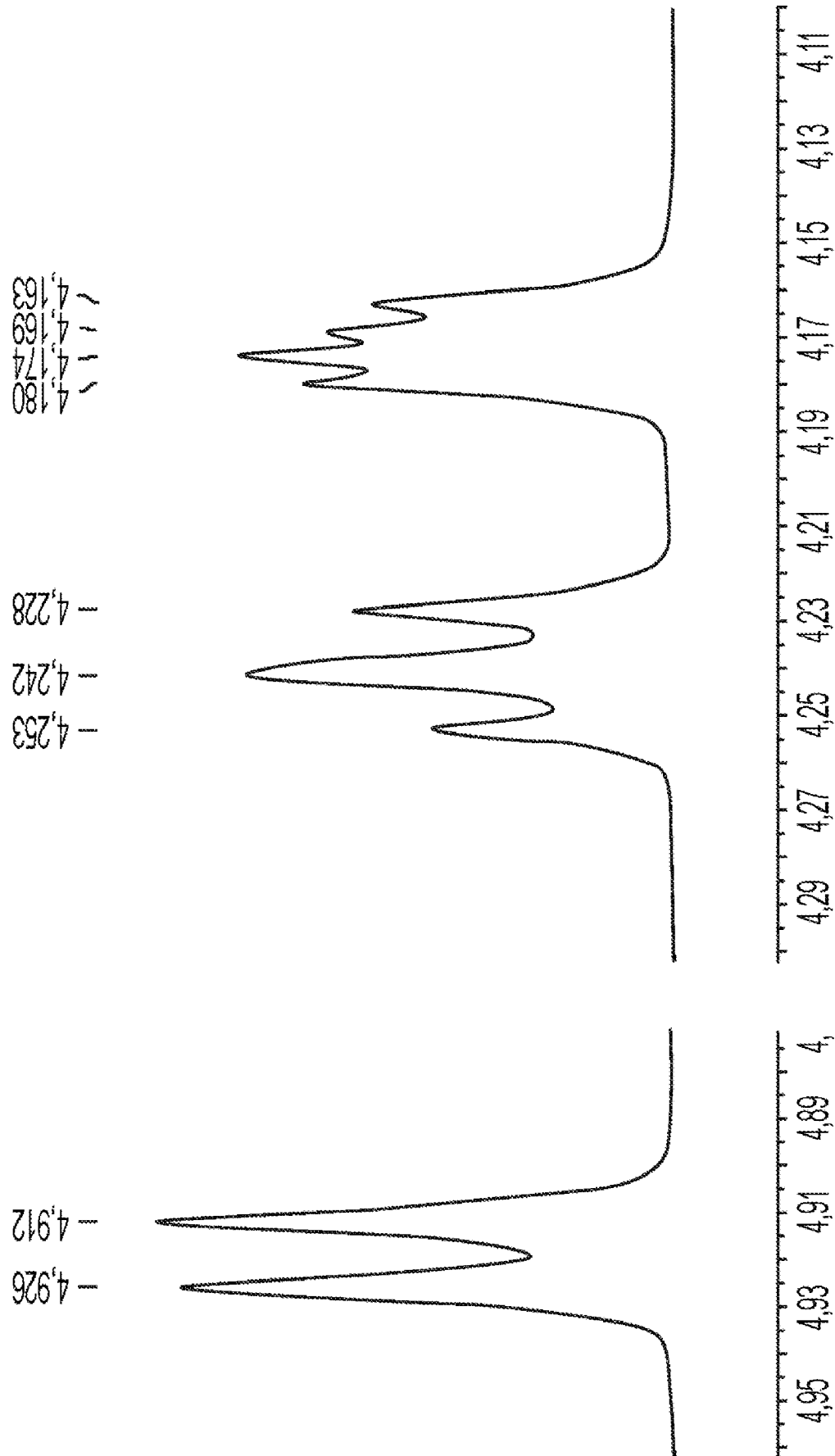


FIG. 10

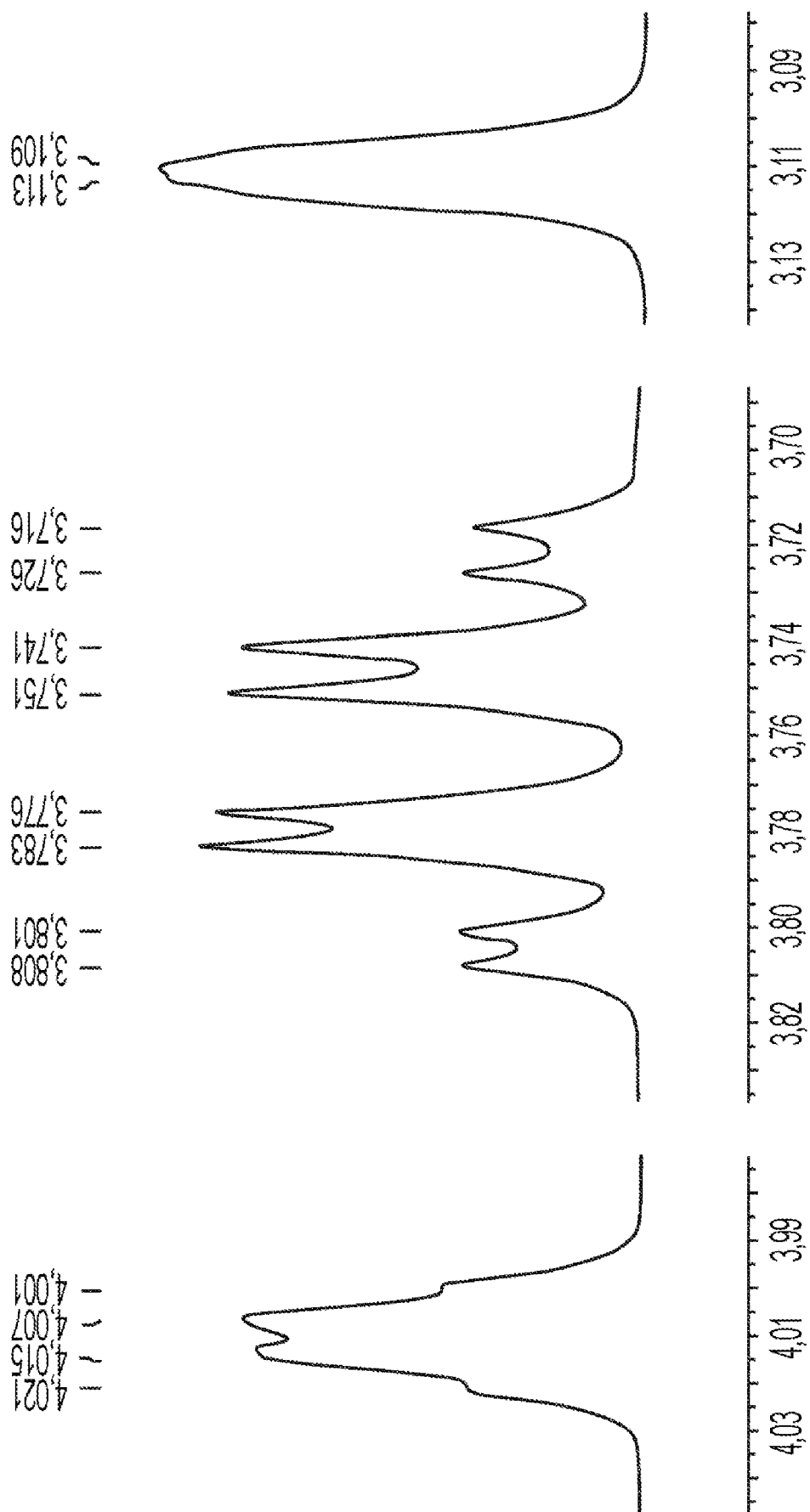


FIG. 11

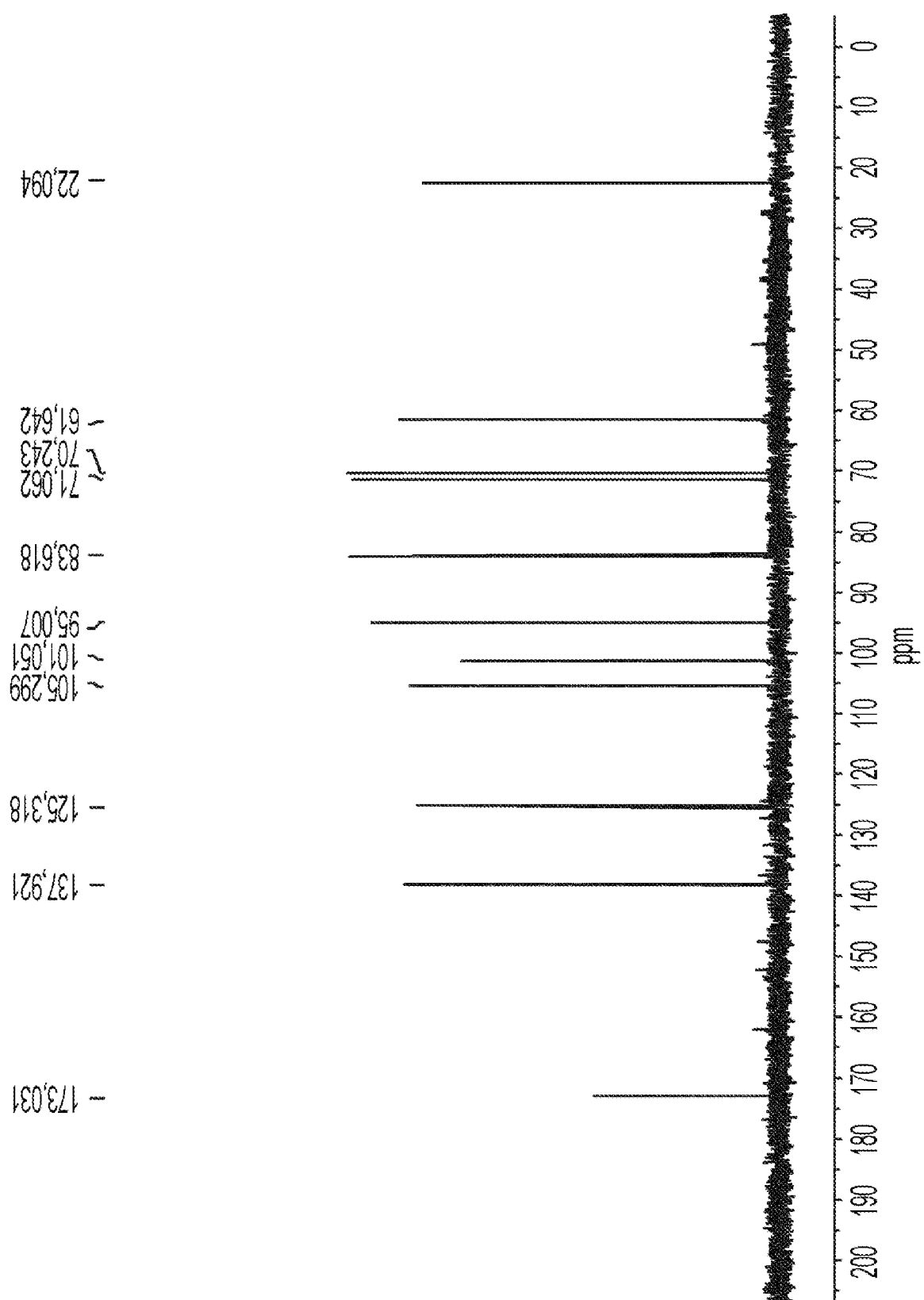


FIG. 12

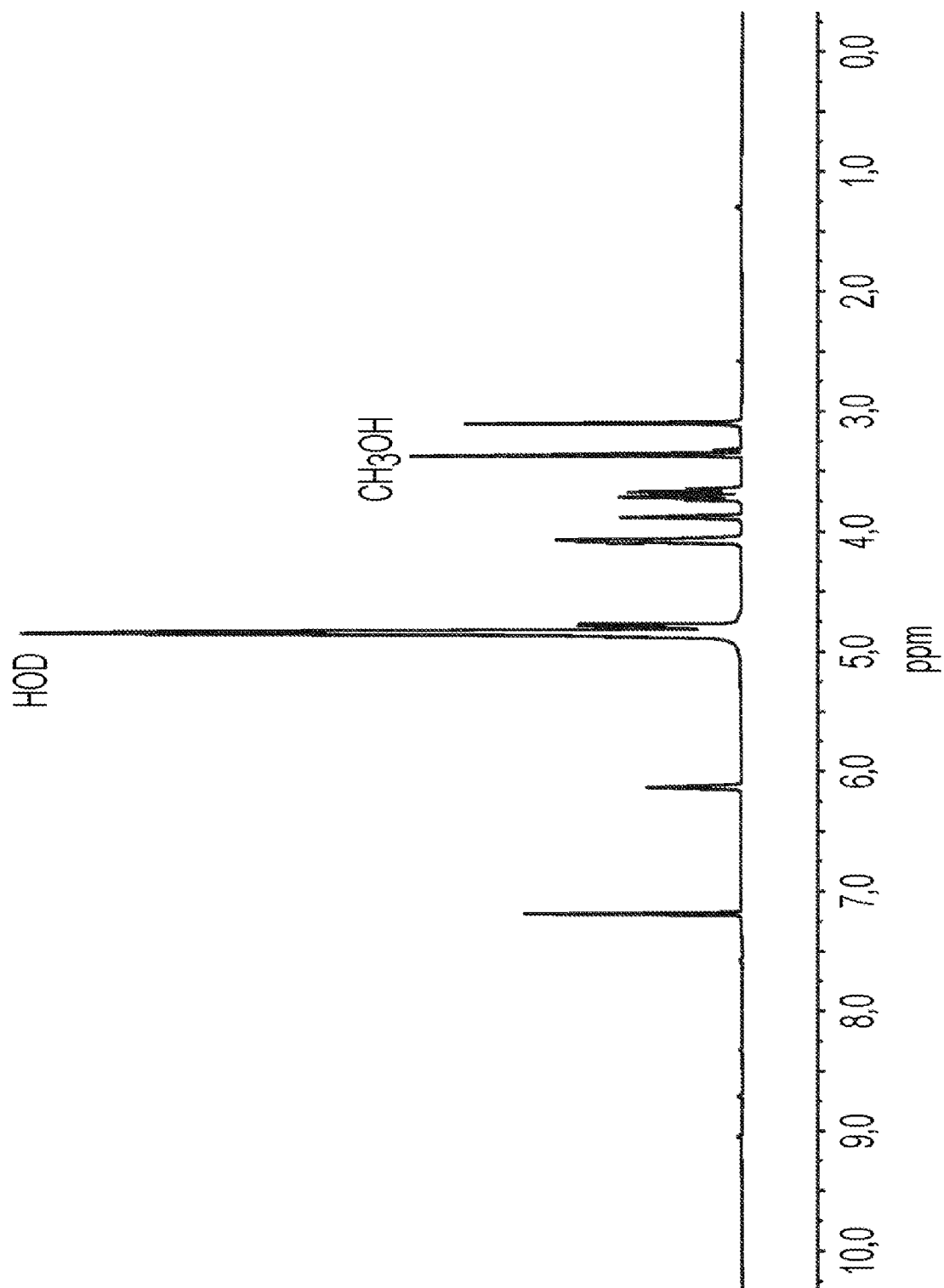


FIG. 13

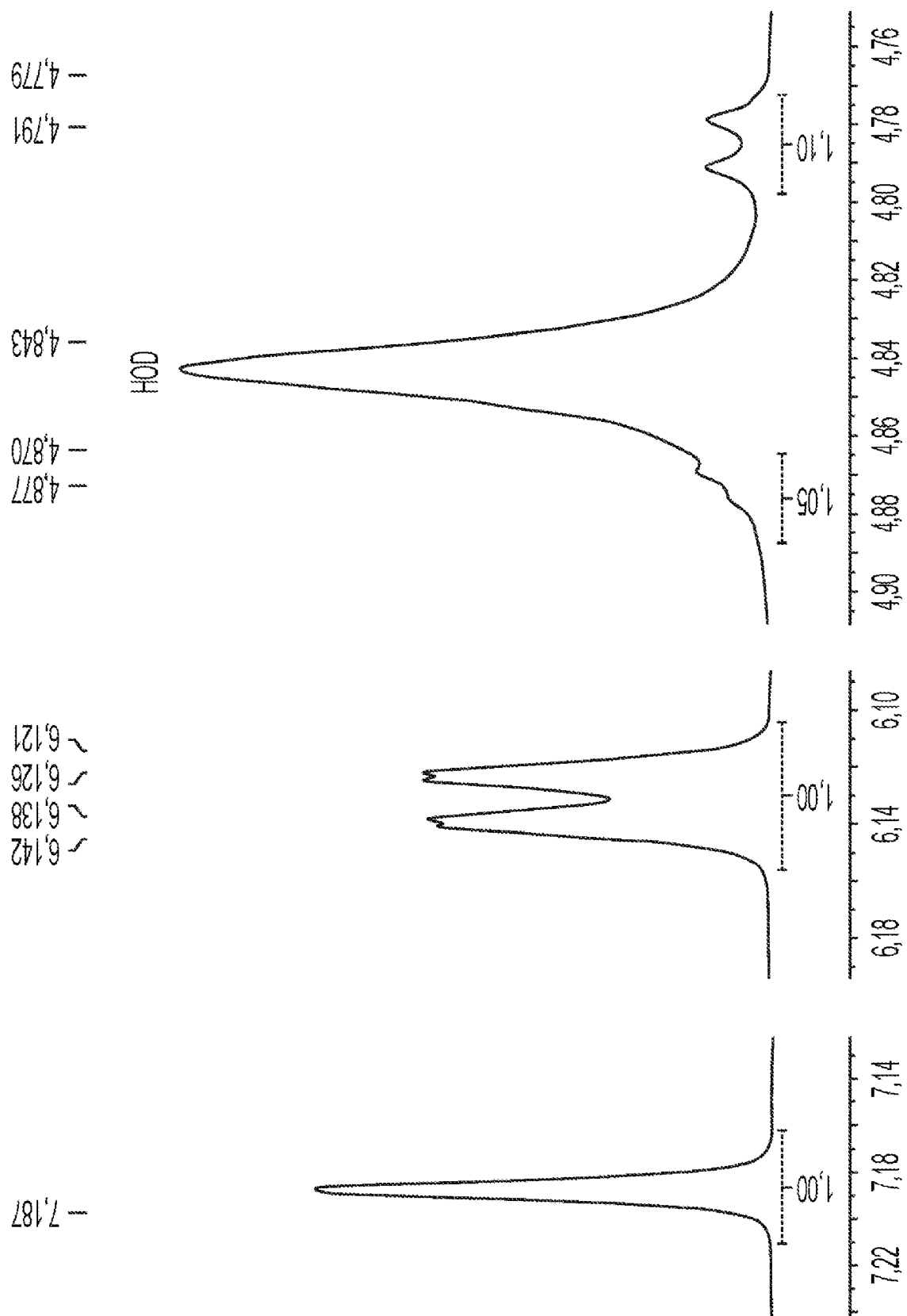


FIG. 14

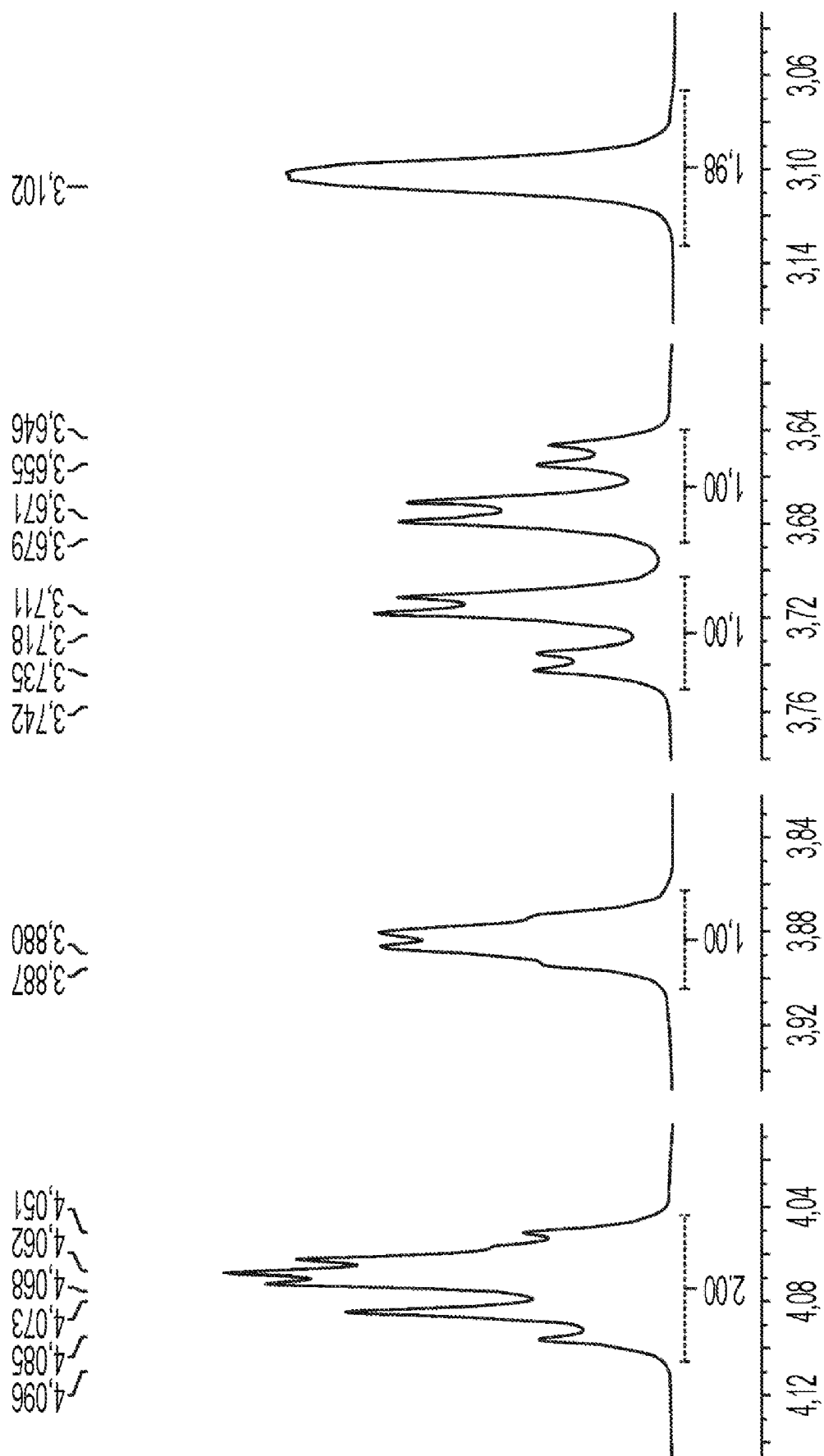
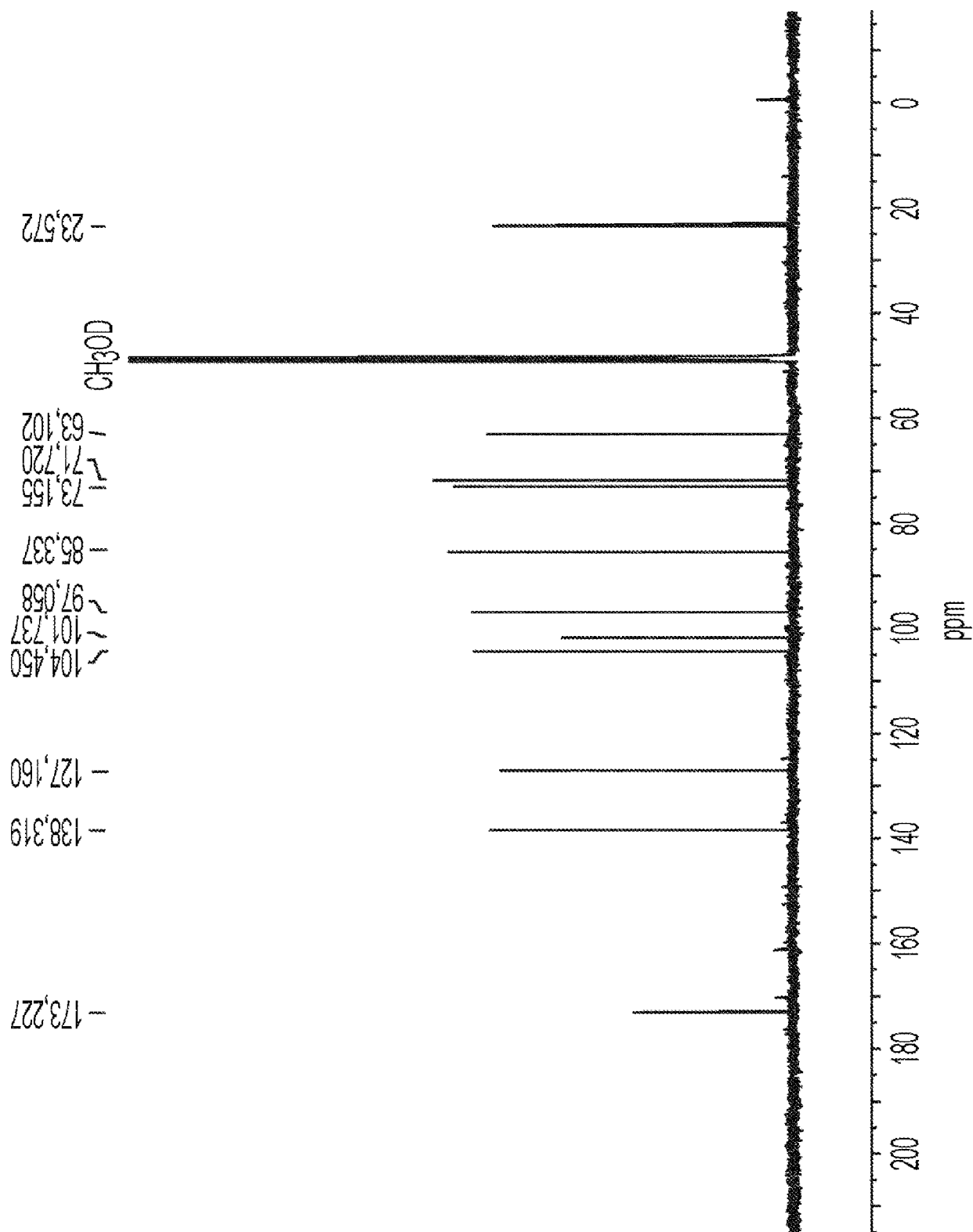


FIG. 15



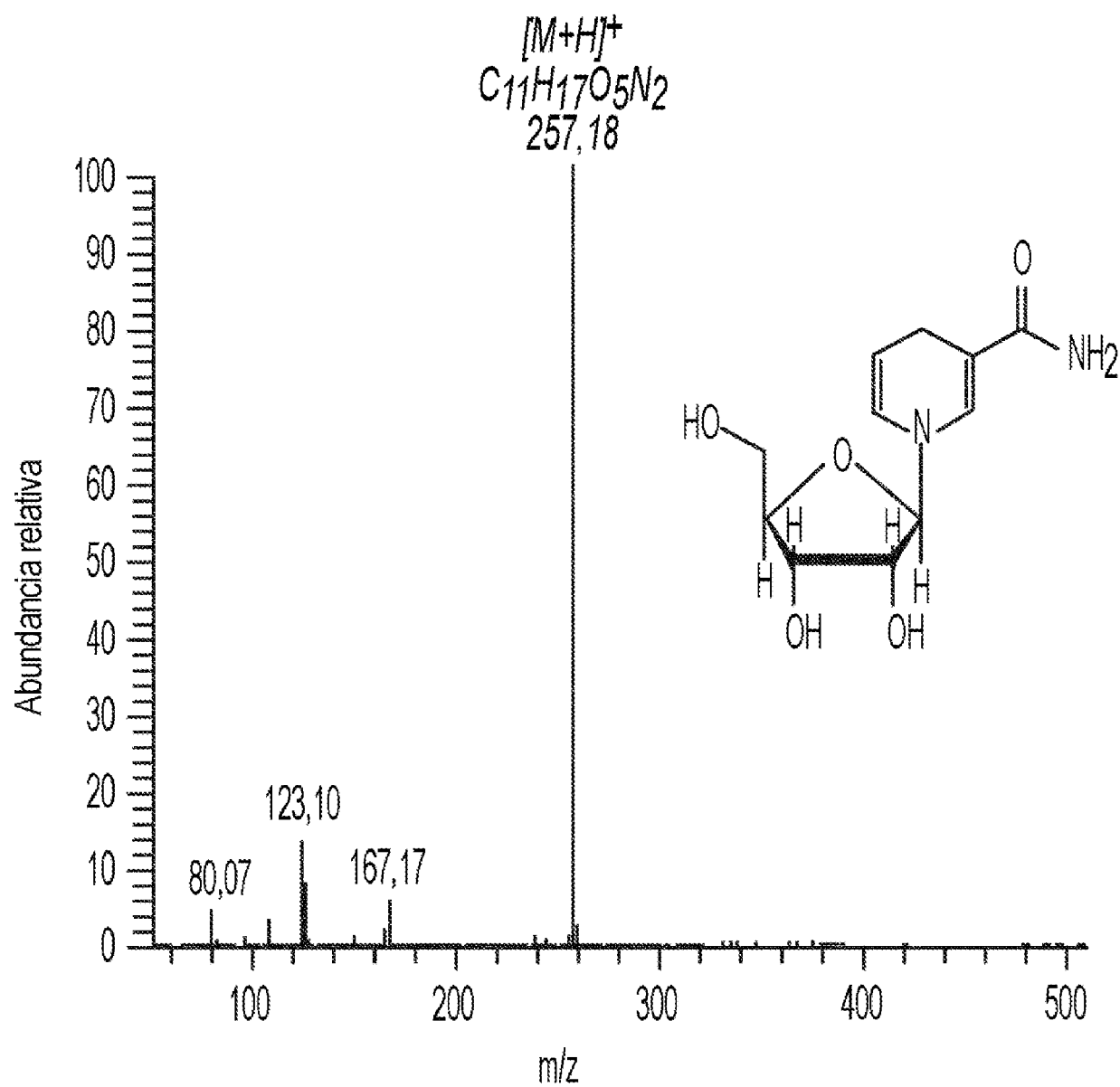


FIG. 17

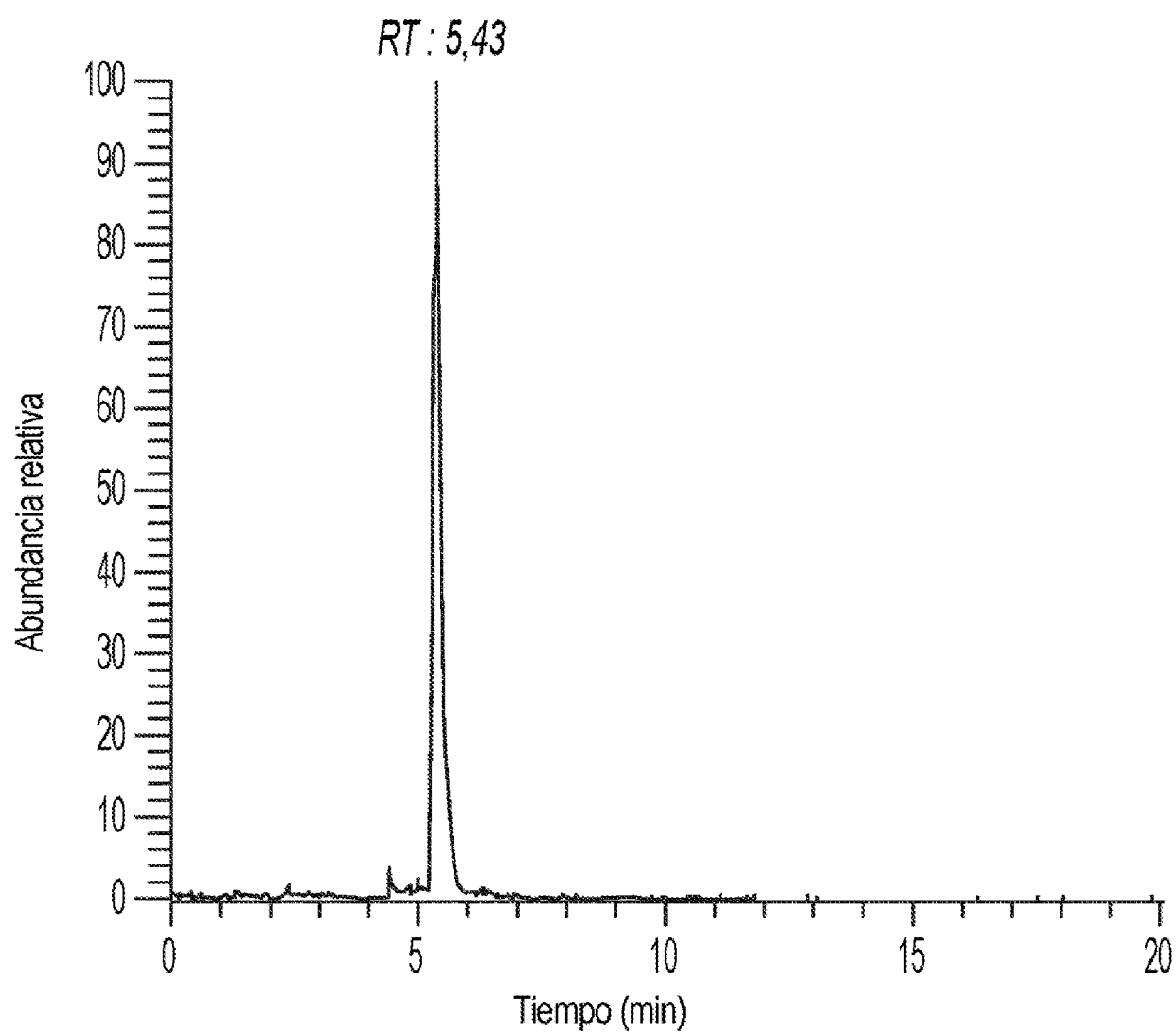


FIG. 18

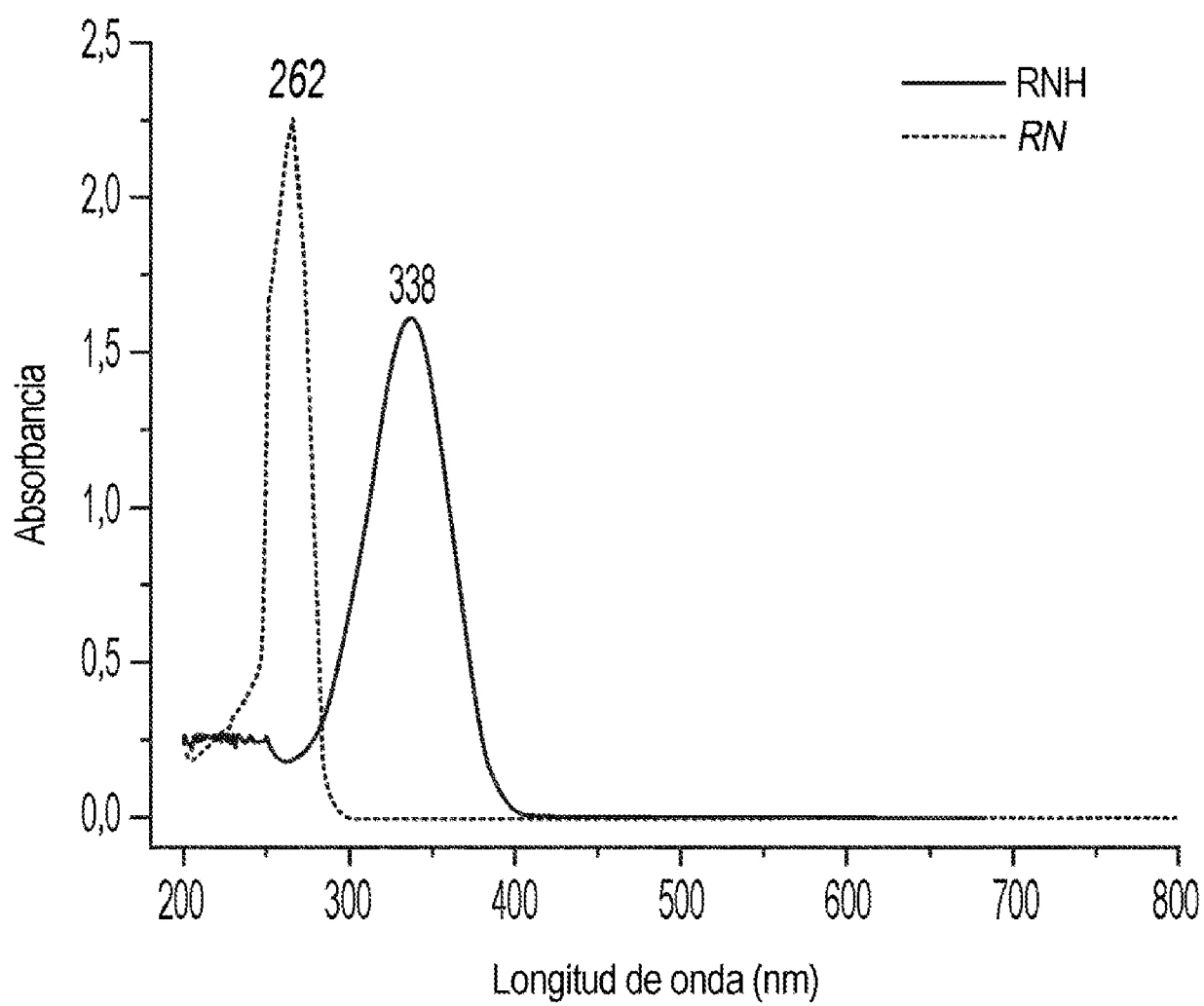


FIG. 19

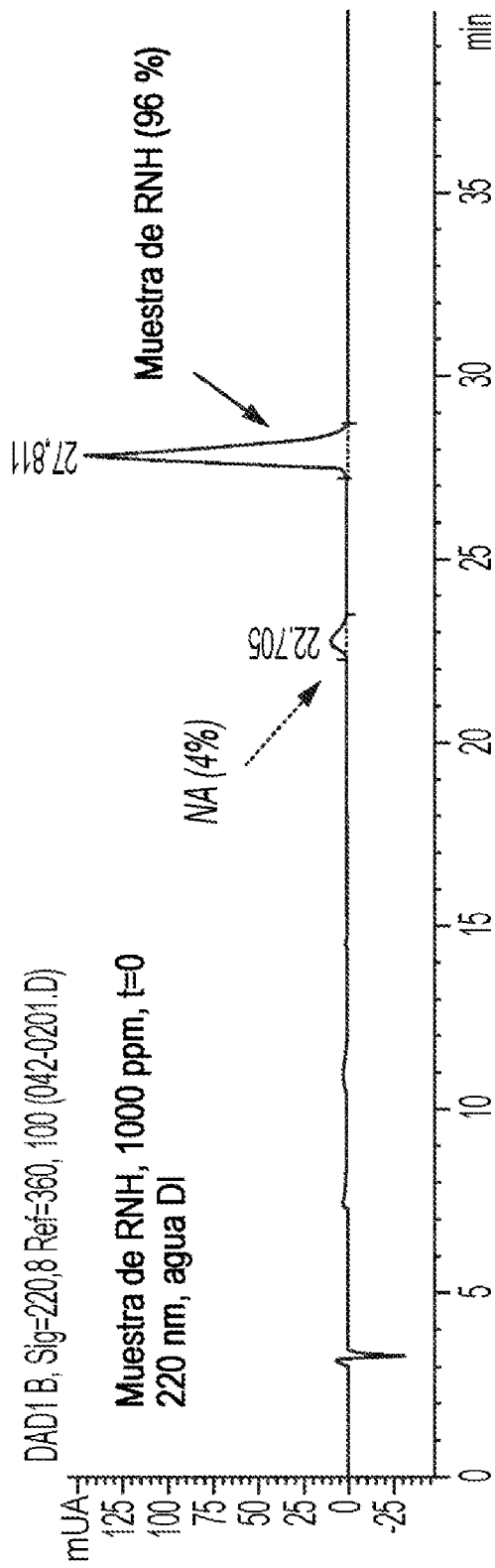


FIG. 20A

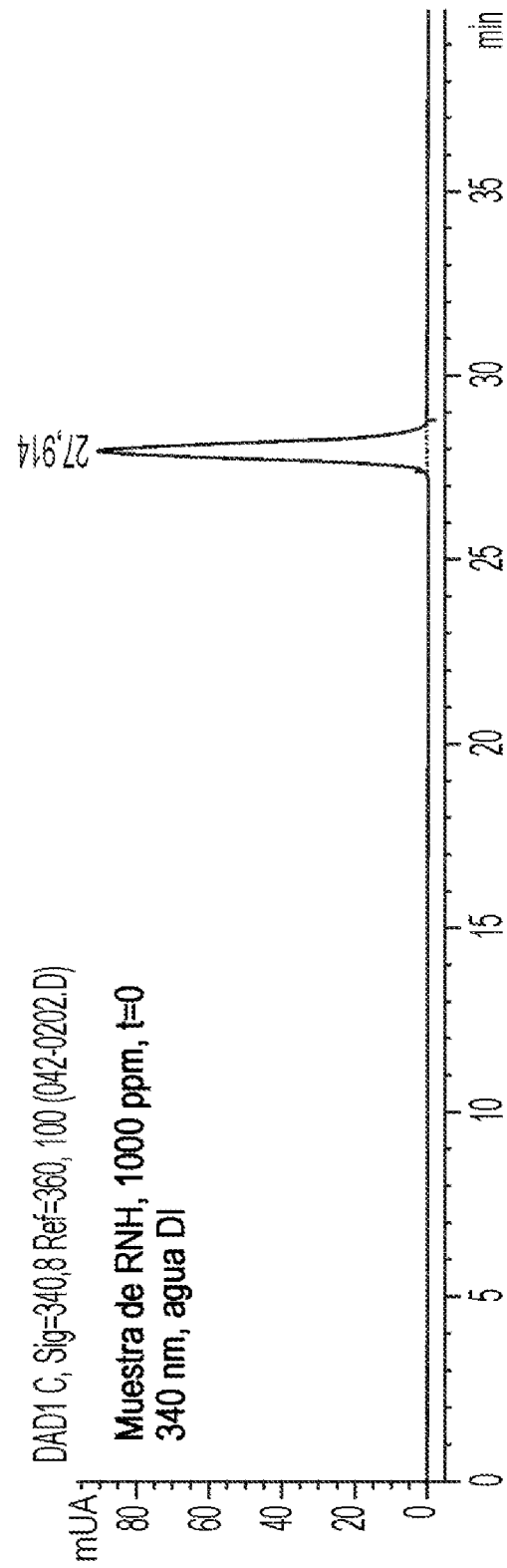


FIG. 20B

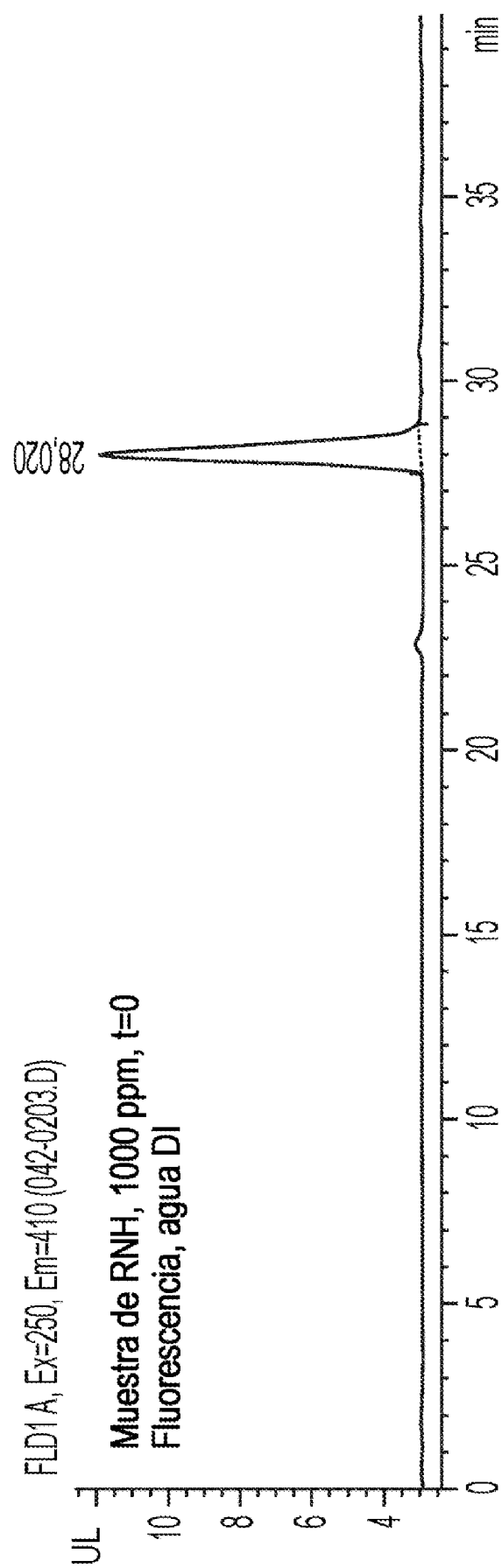


FIG. 20C

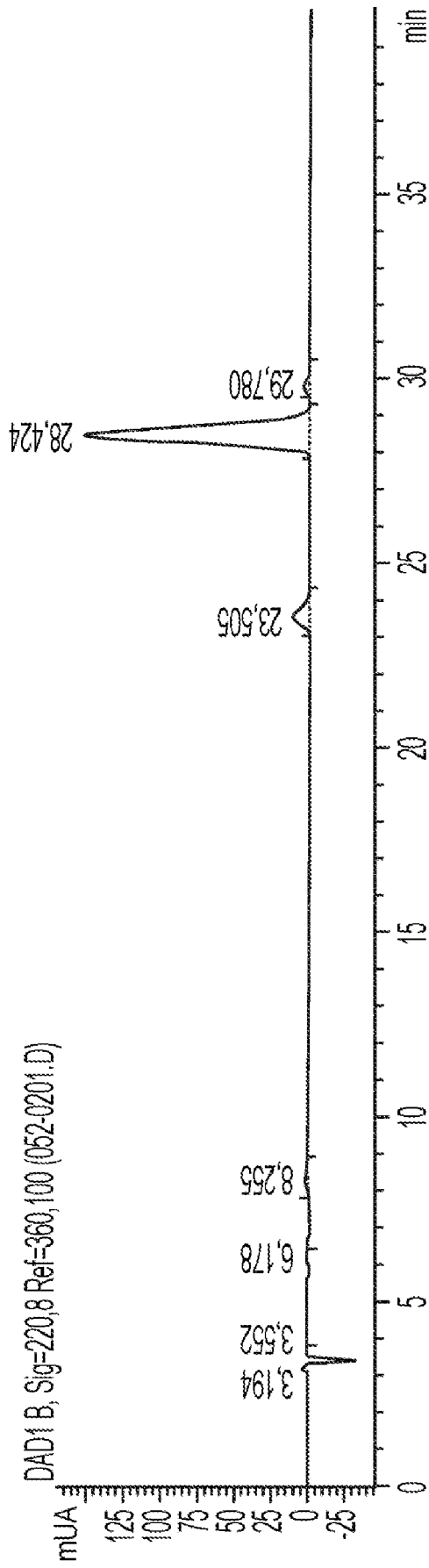


FIG. 21A

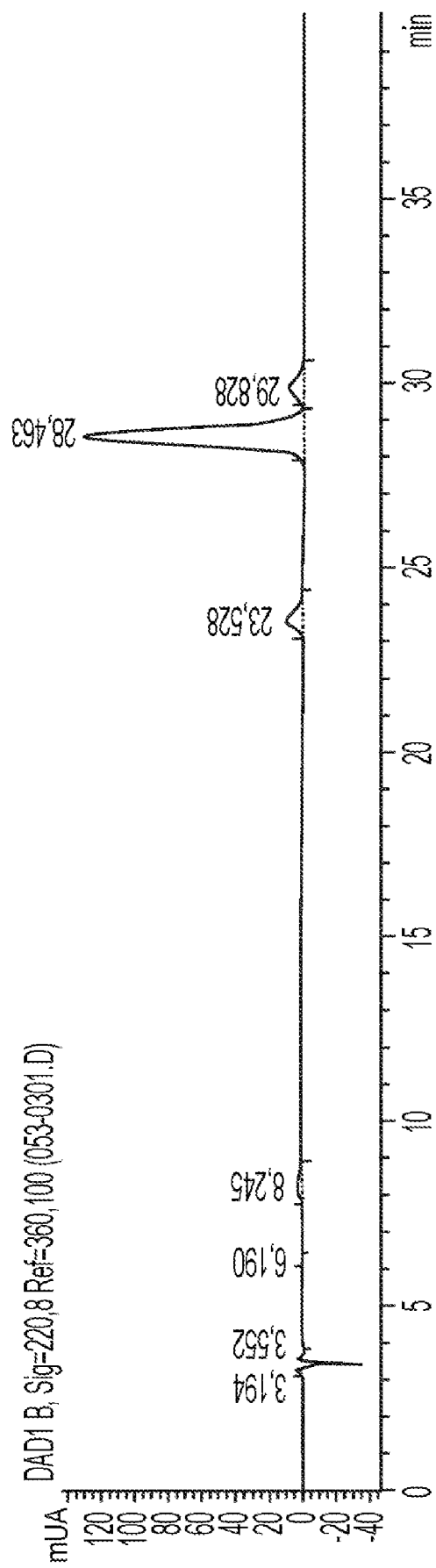


FIG. 21B

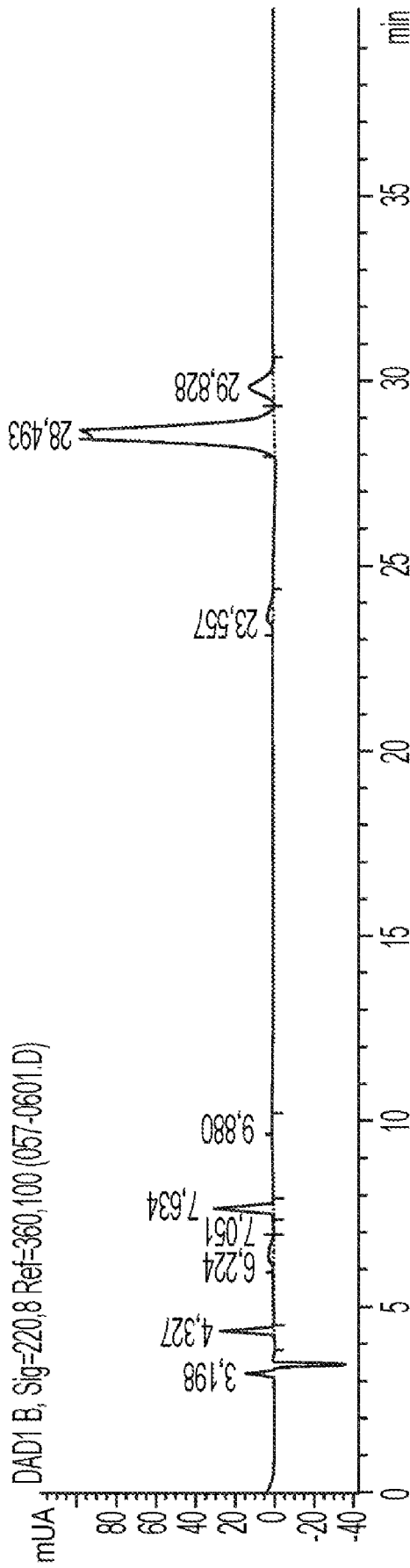


FIG. 21C

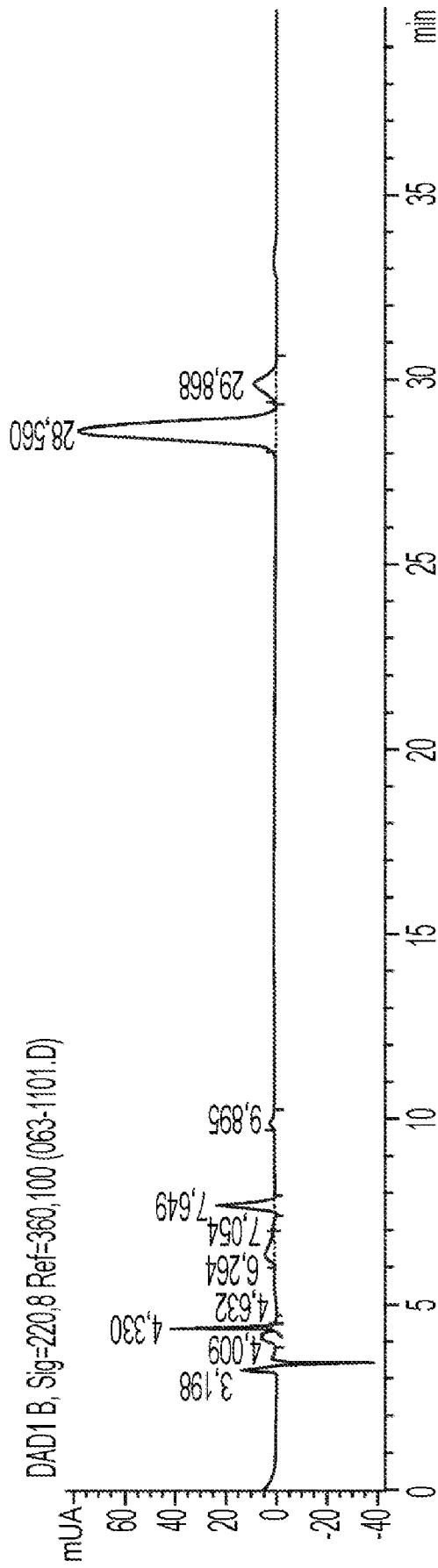


FIG. 21D

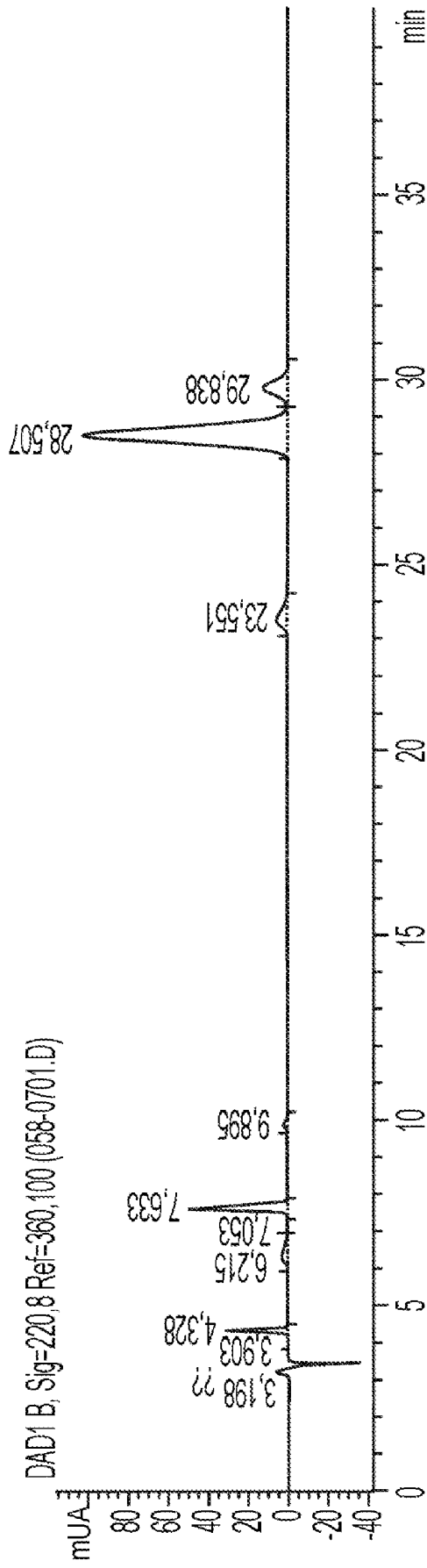


FIG. 21E

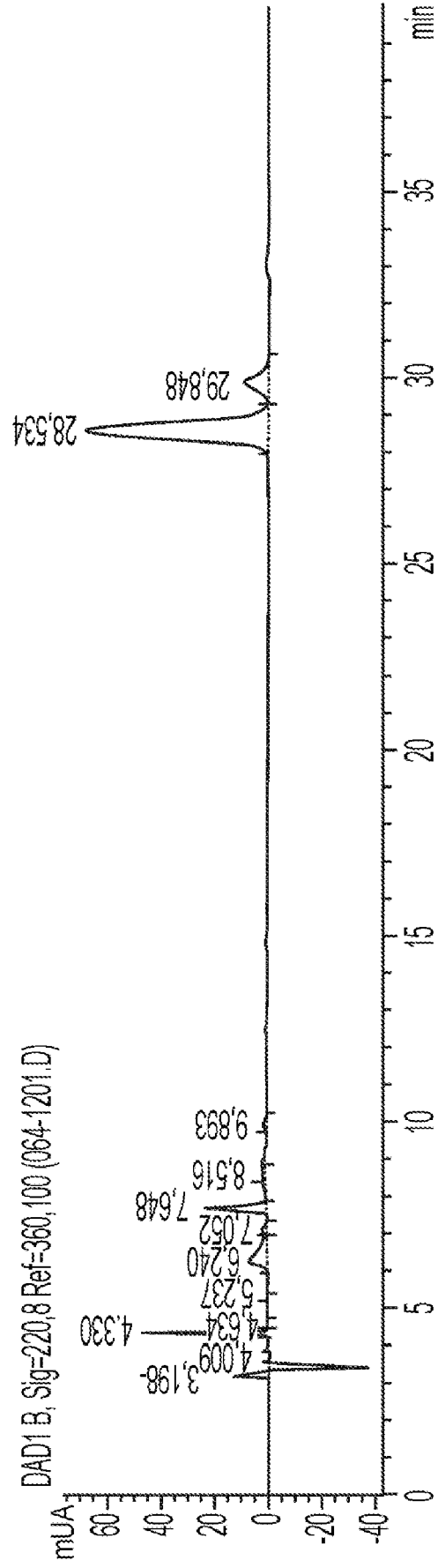


FIG. 21F

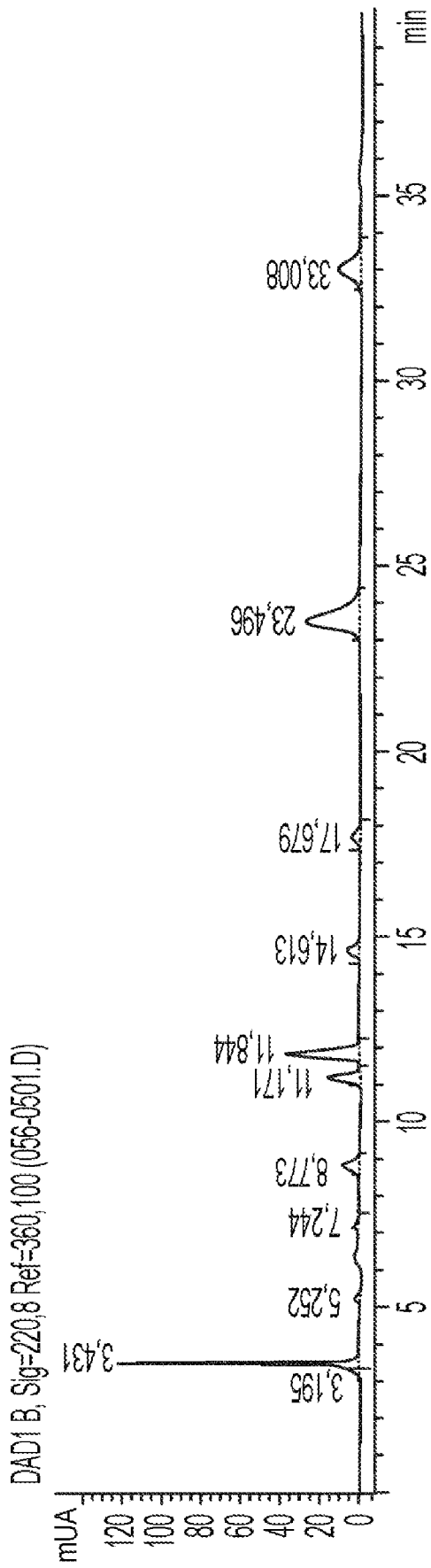


FIG. 22A

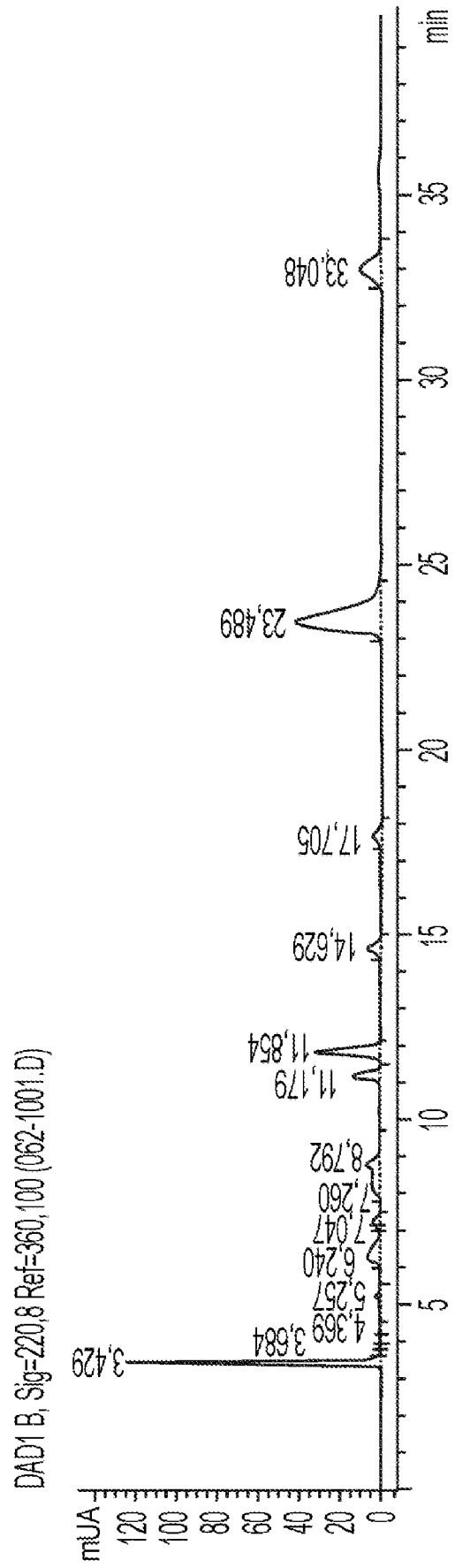


FIG. 22B

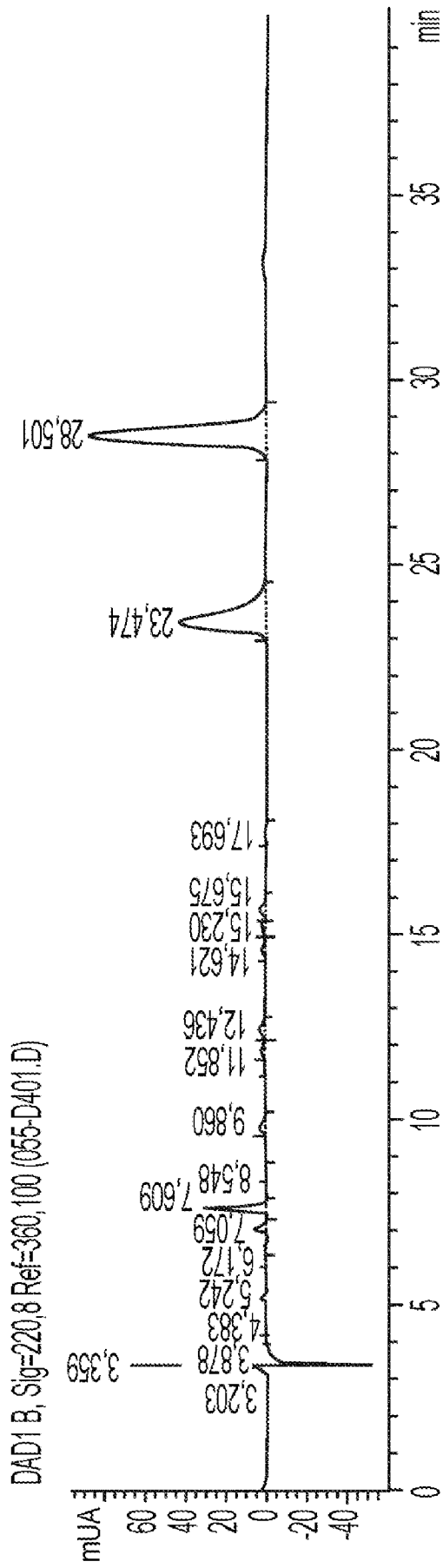


FIG. 22C

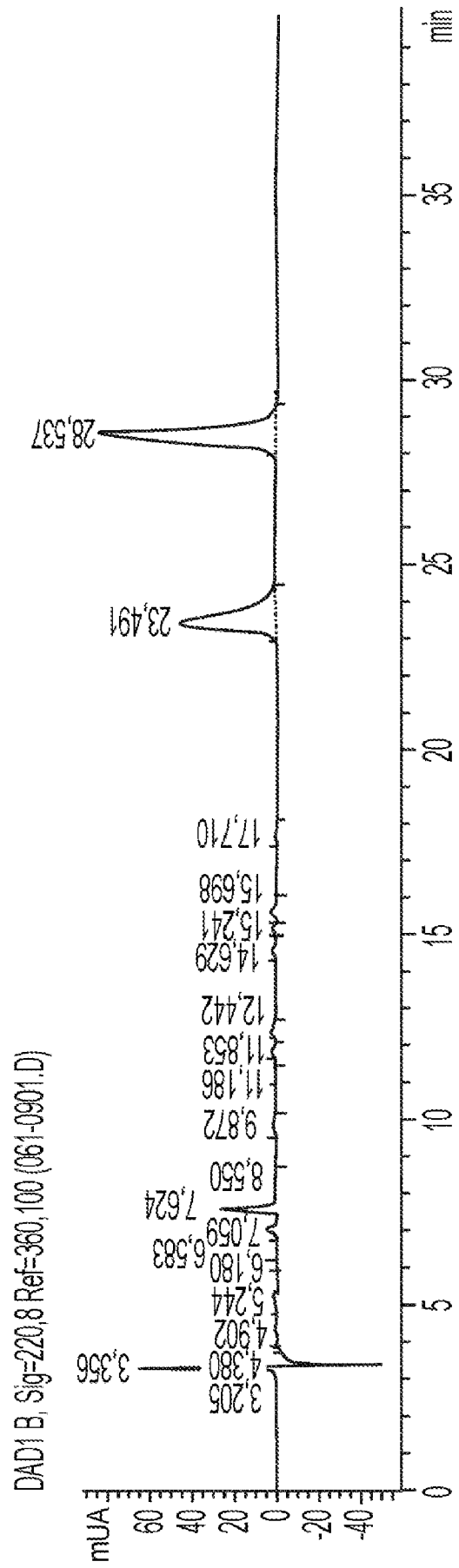


FIG. 22D

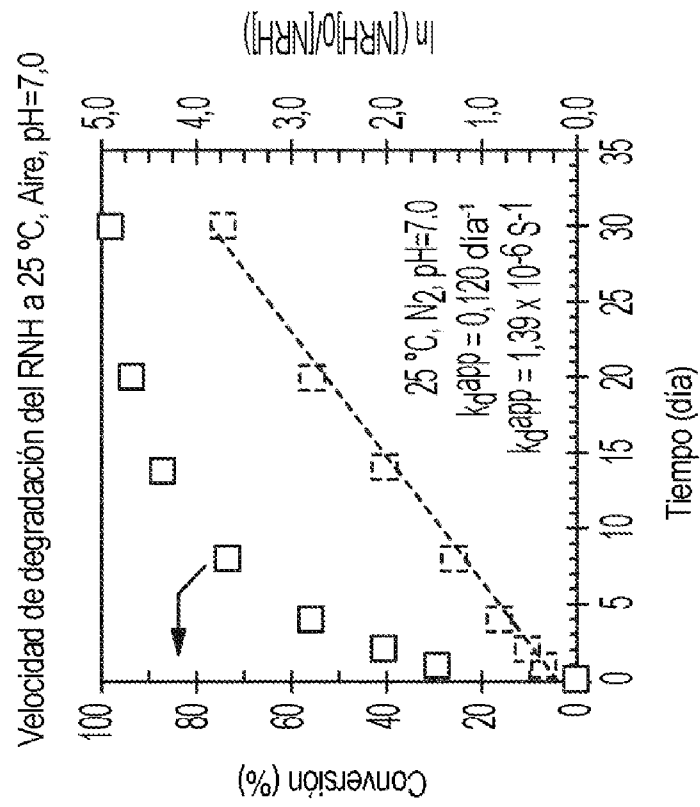


FIG. 23B

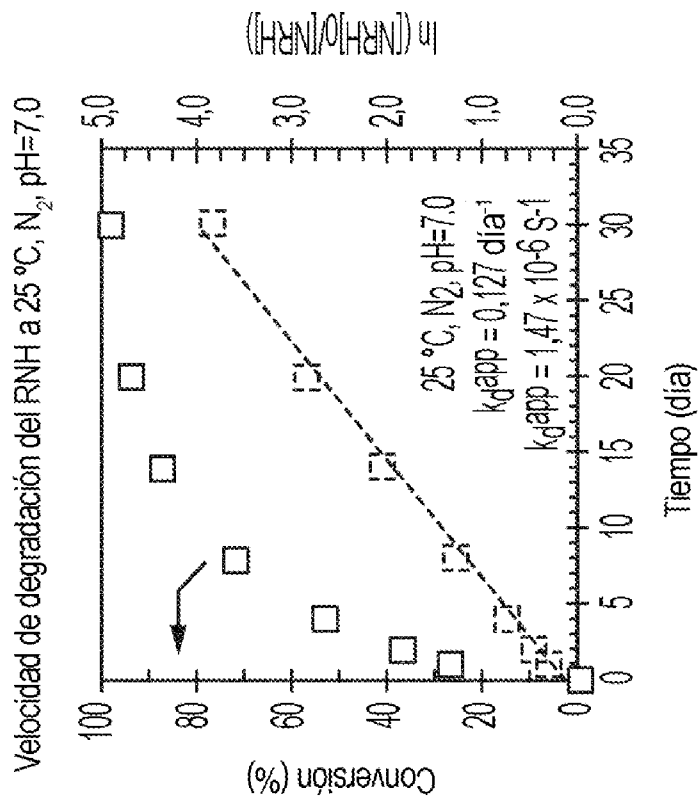


FIG. 23A

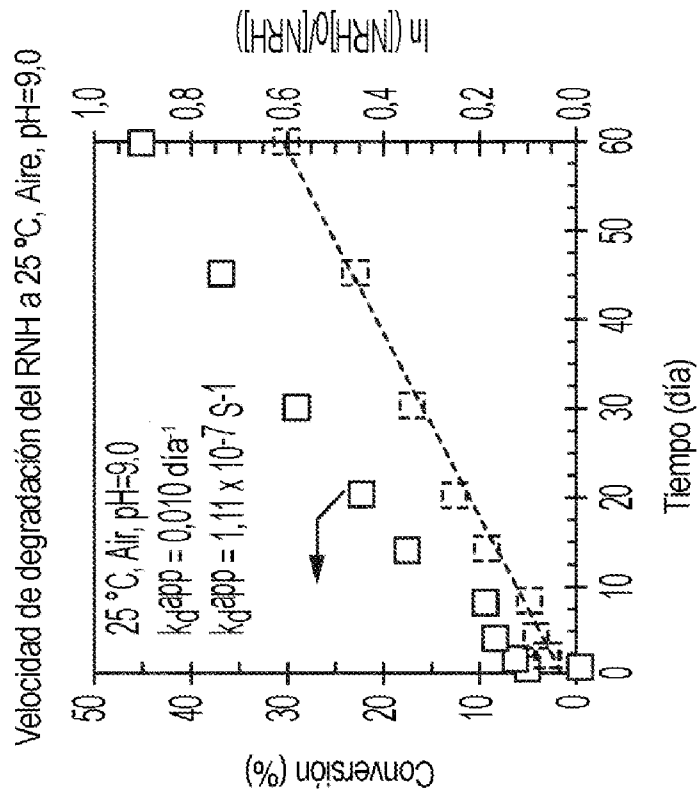


FIG. 23D

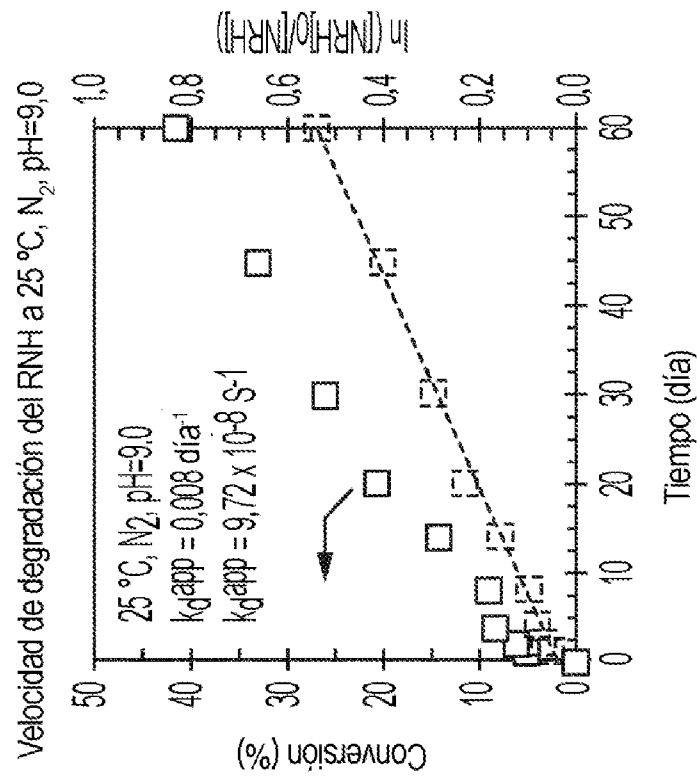


FIG. 23C

