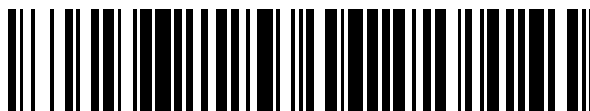


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 435**

51 Int. Cl.:

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 19/048 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2006** **E 18161394 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020** **EP 3369738**

54 Título: **Método para preparar nicotinoil ribósidos y nicotinamida beta-ribósido**

30 Prioridad:

18.11.2005 US 738081 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.12.2020

73 Titular/es:

CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.
(100.0%)
395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US

72 Inventor/es:

SAUVE, ANTHONY ANDREW y
YANG, TIANLE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 798 435 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

Método para preparar nicotinoil ribósidos y nicotinamida beta-ribósido

Campo de la invención

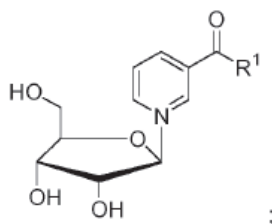
- 5 La invención se refiere a un método para preparar nicotinoil ribósidos y nicotinamida ribósidos. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas y suplementos nutricionales que contienen un nicotinoil ribósido. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a métodos de uso de nicotinoil ribósidos y derivados de nicotinamida ribósidos que promueven el aumento de los niveles intracelulares de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en células y tejidos para mejorar la supervivencia celular y tisular.

Antecedentes de la invención

- 10 La nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es una coenzima natural que funciona como un intermediario en la oxidación celular y reacciones de reducción, así como un sustrato de ADP-ribosiltransferasa. La alteración de los niveles intracelulares de NAD⁺ puede mejorar la salud de una célula, pero la introducción de compuestos que entran en las vías metabólicas de NAD⁺ también puede ser tóxica para las células. Por ejemplo, el ribósido de benzamida (BAR) es un agente antitumoral bien conocido. BR es un profármaco que puede fosforilarse a su 5'-monofosfato y luego convertirse en su metabolito activo benzamida adenina dinucleótido (BAD). Ese metabolito es un análogo activo de NAD⁺ y un inhibidor de la inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). La IMPDH está vinculada a transformaciones malignas. BAR muestra una sensibilidad selectiva frente al sistema nervioso central y a las líneas celulares leucémicas. Sin embargo, BAD también inhibe otras deshidrogenasas, tales como la malato deshidrogenasa y ácido glutámico deshidrogenasa que pueden causar efectos adversos si se usa como terapéutico.
- 15 Por lo tanto, existe la necesidad de identificar composiciones que sean capaces de mejorar la salud de las células dañadas o enfermas preferiblemente alterando los niveles intracelulares de NAD⁺ y que no tienen efectos adversos si las composiciones se administran terapéuticamente.
- 20

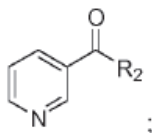
Sumario de la invención

- 25 La invención se refiere a un método para preparar nicotinoil ribósidos y nicotinamida ribósidos de acuerdo con las presentes reivindicaciones 1 a 7. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas y suplementos nutricionales que contienen un nicotinoil ribósido. En otras realizaciones, la descripción se refiere a métodos de uso de nicotinoil ribósidos y derivados de nicotinamida ribósido que promueven el aumento de los niveles intracelulares de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en células y tejidos para mejorar la supervivencia celular y tisular.
- 30 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un método para preparar un compuesto que tiene la Fórmula I:



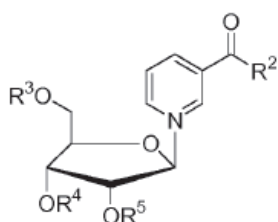
Fórmula I

en donde, R¹ es amino, que comprende: i) mezclar a) tetraacilo o acil ribofuranosa sustituida y b) un compuesto que tiene la fórmula II:



Fórmula II

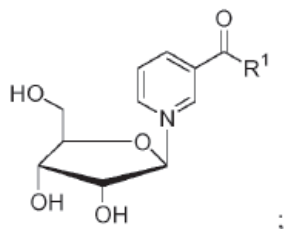
- 35 en donde, R² es alquiloxi, -OCH₂CH₂OH, ariloxi; para formar un compuesto de fórmula III:



Fórmula III

en donde, R^2 es alquiloxi, $-OCH_2CH_2OH$, ariloxi, y R^3 , R^4 y R^5 son cada uno acilo; y ii) mezclar el compuesto de fórmula III con una disolución de amoníaco para formar un compuesto de fórmula I. En realizaciones adicionales, las condiciones para preparar el compuesto I a partir del compuesto III son en un disolvente de alcohol alquílico halogenado a una temperatura inferior a la temperatura ambiente. En otras realizaciones, dicho disolvente es trifluorometanol.

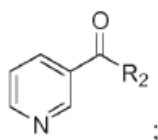
En realizaciones adicionales, la descripción se refiere a un método para preparar un compuesto que tiene la Fórmula I:



Fórmula I

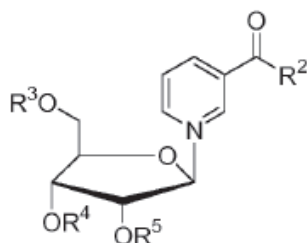
en donde, R^1 es amina, amina sustituida, alquilamina, alquilamina sustituida, dialquilamina, dialquilamina sustituida, alquiloxi o alquiloxi sustituido,

que comprende: i) mezclar a) tetraacilo o acil ribofuranosa sustituida, preferiblemente tetraacetil ribofuranosa, y b) un compuesto que tiene la fórmula II:



Fórmula II

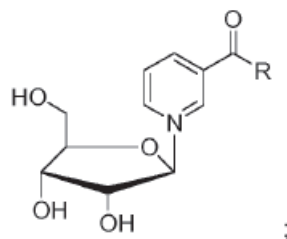
en donde, R^2 es alquiloxi, alquiloxi sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, alquiltiol, alquiltiol sustituido, ariltiol o ariltiol sustituido en condiciones tales que se forma un compuesto de fórmula III:



Fórmula III

en donde, R^2 es alquiloxi, alquiloxi sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, alquiltiol, alquiltiol sustituido, ariltiol o ariltiol sustituido, y R^3 , R^4 y R^5 son iguales o diferentes y, en cada caso independientemente, acilo o acilo sustituido; y ii) mezclar el compuesto de fórmula III con amoníaco, alquilamina de amoníaco sustituida, alquilamina sustituida, dialquilamina, dialquilamina sustituida, alcóxido o alcóxido sustituido en condiciones tales que se forme un compuesto de fórmula I.

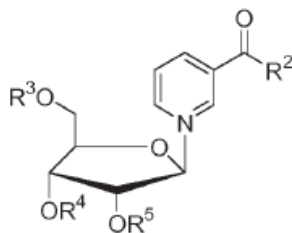
En algunas realizaciones, la invención se refiere a un método para preparar un compuesto que tiene la Fórmula I:



Fórmula I

en donde, R es NH_2 , alquilamino, alquilamino sustituido, dialquilamino, dialquilamino sustituido, alquiloxi, y alquiloxi sustituido, que comprende: i) mezclar tetra-acil ribofuranosa, preferiblemente tetraacetil ribofuranosa, y el compuesto

de éster o tioéster de alquil o aril piridin-3-carboxilato bajo condiciones tales que se forma un compuesto de fórmula II:



Fórmula II

5 en donde R² es -O-alquilo, -O-arilo, -S-alquilo o -S-arilo y, R³, R⁴ y R⁵ son iguales o diferentes y, en cada caso, independientemente acilo y iii) mezclar el compuesto de fórmula II con una alquilamina, alquilamina sustituida, dialquilamina, dialquilamina sustituida, alcóxido y alcóxido sustituido en condiciones tales que se forma un compuesto de fórmula I.

10 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a la preparación de 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de alquilo, preferiblemente 1-[3,4-diacetiloxi]-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de alquilo, que comprende mezclar una composición que consiste esencialmente en 1,2,3,5-tetra-O-acetil-beta-D-ribofuranosa, alquilpiridina-3-carboxilato y trifluorometanosulfonato de trimetilsililo en condiciones tales que se forma 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridina 3-carboxilato de alquilo.

15 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a un método para preparar 1-[3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]piridina-5-carboxamida de N-alquilo o N, N-dialquilo que comprende mezclar 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de alquilo con una amina primaria o secundaria en condiciones tales que se forma 1-[3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]piridin-5-carboxamida de N-alquilo o N,N-dialquilo.

20 En algunas realizaciones, la descripción se refiere a un método para preparar 1-[3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]piridin-5-carboxilato de O-Alquilo² que comprende mezclar 1-[3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]piridin-5-carboxilato de O-Alquilo¹ y óxido de sodio y alquilo² en condiciones tales que se forma 1-[3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]piridin-5-carboxilato de O-Alquilo².

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un esquema de métodos preferidos para preparar composiciones preferidas.

La figura 2 muestra datos sobre la mejora de la supervivencia celular cuando crecen en un medio suplementado con nicotinamida ribosida (NAR) como se proporciona en el ejemplo 7.

25 La figura 3 muestra datos sobre el aumento de los niveles intracelulares de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) cuando las células madre embrionarias se exponen a un cultivo que contiene NAR, como se proporciona en el ejemplo 6.

La figura 4 muestra datos sobre los efectos de NAR en la supervivencia celular como se proporciona en el ejemplo 8.

30 La figura 5 ilustra la preparación de N-alquil nicotinamida ribósidos.

La figura 6 ilustra reacciones controladas cinéticamente (-20°C) o termodinámicamente (4°C) de ribósidos de nicotinato de O-alquilo con alquilaminas.

35 La figura 7 muestra la ruta biosintética de NAD⁺ en mamíferos. Abreviaturas: NA, ácido nicotínico; Npt, ácido nicotínico fosforribosiltransferasa; NaMN, mononucleótido de ácido nicotínico; Nmnat, nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa; NAAD, adenina dinucleótido de ácido nicotínico; NAM, nicotinamida; NMN, mononucleótido de nicotinamida; NR, ribósido de nicotinamida; Nrk, nicotinamida ribósido quinasa; ART, ADP-ribosil transferasa; PARP, poli-ADP-polimerasas; Nampt, nicotinamida fosforribosiltransferasa, también conocido como el factor de mejora de colonias de células pre-B (PBEF).

40 La figura 8 demuestra la reducción de la toxicidad por estatinas (lovastatina) para células madre embrionarias de ratón tratadas con nicotinamida ribósido (500 µM) durante periodos de 2, 4 y 7 días. Los controles tratados con estatinas se indican con símbolos menos. Las barras representan la concentración de estatinas que conduce a una disminución del 50% en el número de células o el ensayo MTT, que mide la viabilidad celular. Las dos columnas más a la izquierda de cada día se miden por conteo de células, las dos columnas de la derecha se miden por MTT. Como se muestra, el tratamiento con NR reduce significativamente la toxicidad de las estatinas sobre la viabilidad celular como se determina por un aumento en la cantidad de estatina requerida para matar las células.

La figura 9 muestra un diagrama de barras del contenido de NAD⁺ (pmol) en células ES después de tratarse con diferentes compuestos.

La figura 10 muestra el porcentaje de muerte celular después de un tratamiento de 48 horas con lovastatina (800 nM y 5 µM). Las células ES de ratón se trataron en presencia de derivados ribosídicos de nicotinato NAR (500 µM), OENR (1 mM), TAENR (1 mM). Abreviaturas: NAR: ribósido de ácido nicotínico, OENR: O-etil nicotinamida ribósido, TAENR: tri-O-acetil O'-etil nicotinamida ribósido. Las células control no se trataron con un derivado. El porcentaje de muerte celular está determinado por el porcentaje de células viables totales en los pocillos tratados con estatinas frente a los controles no tratados (sin estatinas). El efecto de cada aditivo sobre la muerte celular se calcula de manera similar, en comparación con un control sin estatina en el que también está presente el derivado de nicotinato de ribósido. Los recuentos de células en controles no tratados (sin estatinas) para cada grupo experimental fueron similares, lo que indica una falta de toxicidad de los compuestos sobre las células.

La figura 11 muestra la estructura química de los compuestos probados en la FIG. 10.

La figura 12 ilustra datos del ensayo de proliferación celular con tratamiento DMNR (1 mM) y ANR (1 mM). DMNR: N-dimetil nicotinamida ribósido, ANR: N-alil nicotinamida ribósido.

La figura 13 muestra estructuras químicas de los compuestos probados en la FIG. 12.

La figura 14 muestra ¹H-RMN de nicotinamida ribósido

La figura 15 muestra ¹H-RMN del ribósido de nicotinato de O-etilo.

La figura 16 muestra ¹H-RMN de N-metil nicotinamida ribósido.

La figura 17 muestra ¹H-RMN de N-etil nicotinamida ribósido.

La figura 18 muestra ¹H-RMN de N-alil-nicotinamida-ribósido.

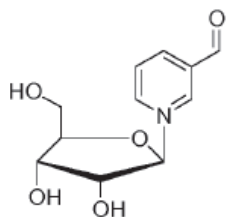
La figura 19 muestra ¹H-RMN de N-etanol nicotinamida ribósido.

La figura 20 muestra ¹H-RMN de dimetil nicotinamida ribósido.

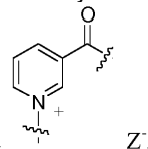
Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un método para preparar nicotinoil ribósidos y nicotinamida ribósidos de acuerdo con las presentes reivindicaciones 1 a 7. En algunas realizaciones, la descripción se refiere a composiciones farmacéuticas y suplementos nutricionales que contienen un nicotinoil ribósido. En realizaciones adicionales, la descripción se refiere a métodos de uso de nicotinoil ribósidos y derivados de nicotinamida ribósidos que promueven el aumento de los niveles intracelulares de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) en células y tejidos para mejorar la supervivencia celular y tisular.

Un compuesto de "nicotinoil ribósido" significa un compuesto sustituido o no sustituido de la siguiente fórmula:



Las "sales" de ribonucleótidos de nicotinoilo se refieren a sales que constituyen la composición que incluye



específicamente la sal de ribósido de nicotinoilo que tiene la fórmula parcial

y Z es un contraión, que incluye cloruro, bromuro, yoduro, alcóxido, toluenosulfonato, metilsulfonato, sulfonato, fosfato o carboxilato (tal como benzoato, succinato, acetato, glicolato, maleato, malato, fumarato, citrato, tartrato, ascorbato, cinamato, mandeloato y difenilacetato).

Como se usa en el presente documento, la expresión "componente nicotinoil ribósido" se refiere a la parte de una composición que contiene todas las moléculas de nicotinoil ribósido en una composición dada, que incluye todas las formas conformacionales y estereoméricas. En realizaciones preferidas, un compuesto dado (por ejemplo,

designado por una estructura) constituye un gran porcentaje (por ejemplo, en número de moléculas y/o en peso) del componente nicotinoil ribósido. Por ejemplo, una molécula de nicotinoil ribósido dada puede estar presente en una composición acuosa a un nivel en el que el 70% de todas las moléculas de nicotinoil ribósido son de ese compuesto dado, mientras que la mayoría de la composición en sí misma está compuesta de agua.

5 "Acilo" significa un grupo $-C(=O)$ alquilo o $-C(=O)$ arilo.

"Alquilo" significa un hidrocarburo alifático no cíclico o cíclico, insaturado o saturado de cadena lineal o ramificada que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, mientras que la expresión "alquilo inferior" tiene el mismo significado que alquilo, pero contiene de 1 a 6 carbonos átomos. La expresión "alquilo superior" tiene el mismo significado que alquilo pero contiene de 2 a 10 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-septilo, n-octilo, n-nonilo y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares. Los alquilos cíclicos también se denominan en este documento "homociclos" o "anillos homocíclicos". Los alquilos insaturados contienen al menos un enlace doble o triple entre átomos de carbono adyacentes (denominados "alquenilo" o "alquinilo", respectivamente). Los alquenilos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares; mientras que los alquinilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo y similares.

20 "Alquilamino" y "dialquilamino" significan uno o dos restos alquilo unidos a través de un puente de nitrógeno (es decir, -N-alquilo) tal como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino y similares.

"Alquiltiol" significa un resto alquilo unido a través de un puente de azufre (es decir, -S-alquilo).

"Alquiloxi" significa un resto alquilo unido a través de un puente de oxígeno (es decir, -O-alquilo) tal como metoxi, etoxi y similares.

25 "Alcóxido" significa un resto alquilo unido a un átomo de oxígeno cargado negativamente (es decir, $-O^-$ alquilo) tal como metóxido o etóxido.

En el contexto de cierta realización, una "amina" significa $-NH_2$ o "amoniaco" el gas NH_3 .

"Arilo" significa un resto carbocíclico aromático tal como fenilo o naftilo.

"Ariloxio" significa un resto arilo unido a través de un puente de oxígeno (es decir, -O-arilo).

30 "Arlitio" significa un resto alquilo unido a través de un puente de azufre (es decir, -S-arilo).

"Aminooxi" significa un resto amino unido a través de un puente de oxígeno (es decir, -O- NH_2).

"Hidroxilamino" significa un resto hidroxilo unido a través de un puente de amina (es decir, -NH-OH).

"O-alquiloxiamino" significa un resto alquilamino unido a través de un puente de amina (es decir, -NH-O-alquilo).

"N-alquilaminooxi" significa un resto alquilamino unido a través de un puente de oxígeno (es decir, -O-NH-alquilo).

35 "Hidrazino" significa un resto amino unido a través de un puente de nitrógeno (es decir, -NH- NH_2) dependiendo del contexto.

"Alquilhidrazino" significa un resto alquilo unido a través de un puente de hidrazina (es decir, -NH-NH-alquilo).

"Células" significa la unidad estructural de un organismo que consiste en uno o más núcleos, citoplasmas y diversos orgánulos, todos rodeados por una membrana celular semipermeable.

40 "Medios de crecimiento" son composiciones usadas para cultivar microorganismos o células en cultivo. Existen diferentes tipos de medios para cultivar diferentes tipos de células. La mayor diferencia en los medios de crecimiento se encuentra entre los utilizados para cultivar células en cultivo (el cultivo celular utiliza tipos de células específicos derivados de plantas o animales) y los utilizados para cultivar microorganismos (generalmente bacterias o levaduras). Estas diferencias surgen debido al hecho de que las células derivadas de organismos completos y cultivadas en cultivo a menudo son incapaces de crecer sin la provisión de ciertos requisitos, tales como hormonas o factores de crecimiento que generalmente ocurren in vivo. En el caso de las células animales, estos requisitos son a menudo proporcionados por la adición de suero sanguíneo al medio. Estos medios a menudo son rojos o rosados debido a la inclusión de indicadores de pH. Los medios de crecimiento para las células madre embrionarias contienen preferiblemente un medio esencial mínimo, es decir, Eagle: aminoácidos, sales (nitrato férrico nonahidrato, cloruro potásico, sulfato magnésico, cloruro sódico, dihidrogenofosfato sódico), vitaminas (ácido ascórbico, ácido fólico, nicotinamida, riboflavina, B-12) o Dulbecco: adicionalmente hierro, glucosa; aminoácidos no

esenciales, piruvato sódico, β -mercaptoetanol, L-glutamina, suero bovino fetal y factor inhibidor de la leucemia (LIF). En el caso de los microorganismos, no existen tales limitaciones, ya que a menudo son organismos de células individuales. Otra diferencia importante es que las células animales en cultivo a menudo crecen en una superficie plana a la que se unen, y el medio se proporciona en forma líquida, que cubre las células. Las bacterias tales como Escherichia coli (E. coli, el microbio más comúnmente utilizado en los laboratorios) pueden cultivarse en medios sólidos o en medios líquidos, el medio nutriente líquido se denomina comúnmente caldo nutriente. Los medios de crecimiento preferidos para los microorganismos son caldo nutriente o medio Luria-Bertani (medio L-B). Las bacterias cultivadas en cultivos líquidos a menudo forman suspensiones coloidales. Cuando el agar (una sustancia que se transforma en un gel) se agrega a un medio líquido, puede verse en placas de Petri donde se solidificará (se llaman placas de agar) y proporcionarán un medio sólido sobre el que se pueden cultivar microbios.

"Homociclo" (también denominado en este documento "anillo homocíclico") significa un anillo carbocíclico saturado o insaturado (pero no aromático) que contiene de 3 a 7 átomos de carbono, tales como ciclopropano, ciclobutano, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, ciclohexeno, y similares.

"Isómeros" significa cualquiera de dos o más sustancias que se componen de los mismos elementos en las mismas proporciones pero que difieren en la disposición tridimensional de los átomos que incluyen isómeros enantioméricos (es decir, imágenes especulares) y diastereoméricos.

"Metileno" significa $-\text{CH}_2-$.

El término "derivado", cuando se usa en relación con un compuesto químico, se refiere a una estructura similar que, tras la aplicación, por ejemplo, la administración a un sujeto, es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, la función de dicho compuesto químico que se describe que tiene. En el contexto de ciertas realizaciones, se entiende que un "derivado de nicotinamida ribósido (NAR)" no incluye el compuesto NAR.

Como se usa en este documento, las expresiones "isómero purificado" y "composición de isómero purificado" pretenden indicar una composición (por ejemplo, derivada de una mezcla racémica o sintetizada de novo) en la que un isómero se ha enriquecido (por ejemplo, isómero alfa) respecto al otro (por ejemplo, isómero beta), y más preferiblemente, en el que el otro isómero representa menos del 10% y, más preferiblemente, menos del 7% y, aún más preferiblemente, menos del 2% de la preparación.

Las composiciones purificadas de acuerdo con la invención contienen preferiblemente menos de 5% en masa/masa (m/m), ventajosamente menos de 3% m/m de impurezas. Debe entenderse que las referencias en la presente memoria a "impurezas" deben entenderse que incluyen productos de reacción no deseados que no son isómeros formados durante la síntesis y no incluyen disolventes residuales que permanecen del proceso usado en la preparación de la composición o excipientes utilizados en preparaciones farmacéuticas.

La expresión "esencialmente libre" de una molécula significa que la molécula está presente en una composición solo como una impureza inevitable.

"Sujeto" significa cualquier animal, preferiblemente un paciente humano, ganado o mascota doméstica.

La "célula madre embrionaria" (ES) se define por su origen, es decir, desde una de las etapas más tempranas del desarrollo del embrión, llamado blastocisto. Específicamente, las células madre embrionarias se derivan de la masa celular interna del blastocisto en una etapa antes de que se implante en la pared uterina. En esta etapa, el embrión preimplantatorio del ratón está formado por 150 células y consiste en una esfera compuesta por una capa externa de células (el trofotodermo), una cavidad llena de líquido (el blastocelo) y un grupo de células en el interior (la masa celular interna). Las células ES pluripotentes pueden dar lugar a tipos celulares diferenciados que se derivan de las tres capas germinales primarias del embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo).

La célula madre "adulta" es una célula indiferenciada (no especializada) que se encuentra en un tejido diferenciado (especializado); puede renovarse y especializarse para producir todos los tipos de células especializadas del tejido del que se originó. Las células madre adultas son capaces de autorrenovarse durante la vida del organismo. Se han encontrado fuentes de células madre adultas en la médula ósea, el torrente sanguíneo, la córnea y la retina del ojo, la pulpa dental del diente, el hígado, la piel, el tracto gastrointestinal y el páncreas. A diferencia de las células madre embrionarias, no hay células madre adultas identificables que sean capaces de formar todas las células del cuerpo. Sin embargo, las células madre sanguíneas (derivadas del mesodermo) pueden generar un número de células diferenciadas que incluyen tanto el músculo esquelético (también derivado del mesodermo) como las neuronas (derivadas del ectodermo).

El término "sustituido", como se usa en este documento, significa cualquiera de los grupos anteriores (es decir, alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, homociclo, heterociclo y/o heterocicloalquilo) en donde al menos un átomo de hidrógeno está reemplazado con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo ("=O"), se reemplazan dos átomos de hidrógeno. Cuando se sustituyen, uno o más de los grupos anteriores son "sustituyentes". Los sustituyentes en el contexto de esta invención incluyen halógeno, deuterio, tritio, boro, hidroxilo, oxo, ciano, nitro, amino, alquilamino, dialquilamino, alquilo, alcoxi, alquiltio, haloalquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclo y heterocicloalquilo, así como un sacárido, $-\text{NR}_a\text{R}_b$, $-\text{NR}_a\text{C}(=\text{O})\text{R}_b$, --

NR_aC(=O)NR_aNR_b, --NR_aC(=O)OR_b, --NR_aSO₂R_b, --C(=O)R_a, C(=O)OR_a, --C(=O)NR_aR_b, --OC(=O)NR_aR_b, --OR_a, --SR_a, --SOR_a, --S(=O)₂R_a, --OS(=O)₂R_a y --S(=O)₂OR_a. Además, los sustituyentes anteriores pueden estar sustituidos adicionalmente con uno o más de los sustituyentes anteriores, de modo que el sustituyente alquilo sustituido, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, heterociclo sustituido o heterocicloalquilo sustituido. R_a y R_b en este contexto pueden ser iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo, haloalquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, arilalquilo, arilalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, heterocicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido. En el contexto de ciertas realizaciones, un compuesto se puede describir como "no sustituido", lo que significa que el compuesto no contiene sustituyentes adicionales unidos al compuesto. Un compuesto no sustituido se refiere a la composición química del compuesto sin sustituyentes adicionales, por ejemplo, el compuesto no contiene grupo(s) protector(es). Por ejemplo, la prolina no sustituida es el aminoácido prolina aunque el grupo amino de prolina se puede considerar disustituido con grupos alquilo.

Ruta de nicotinamida adenina dinucleótido

El nicotinamida adenina dinucleótido (NAD o NAD⁺) es importante como coenzima para diferentes enzimas. Estudios recientes han mostrado que, cuando es el cosustrato de SIR2 (regulador de la información silenciosa 2), el NAD⁺ tiene un papel en la regulación de múltiples procesos biológicos, tales como la apoptosis regulada por p53, el almacenamiento de grasa, la resistencia al estrés y el silenciamiento génico. Sin limitar los usos potenciales de las composiciones descritas en este documento a una única teoría, existen diversas vías a través de las cuales se piensa actualmente que NAR se metaboliza. Nicotinamida ribosida (NAR) se conoce como un precursor NAD⁺ para humanos y levaduras. Es capaz de entrar en una ruta natural que conduce a la síntesis biológica de NAD⁺ bajo la acción de la enzima nicotinamida ribosida quinasa (NrK). NAR se convierte en NMN por NrK, que luego se convierte en NAD⁺ por la enzima nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa (NmnaT) (véase la figura 7). Alternativamente, la nicotinamida ribósido puede ingresar en el metabolismo de NAD por medio de otras rutas metabólicas, que incluirían la acción de enzimas que separan el resto de nicotinamida del azúcar. Tal ruta incluiría la acción de las fosforilasas que se ha demostrado que degradan el NAR en las células para formar nicotinamida y ribosa-1-fosfato. La nicotinamida es competente para ingresar en el metabolismo de NAD⁺ y se convierte en NAD⁺ por la acción de la enzima nicotinamida pirofosforribosiltransferasa.

Las sirtuinas son histonas deacetilasas de clase III (HDAC) y también son ADP-ribosil transferasas. Desacetilan residuos de lisina en una nueva reacción química que consume nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), liberando nicotinamida, O-acetil-ADPribosa (AADPR) y el sustrato desacetilado. La alteración de los niveles intracelulares de NAD⁺ puede mejorar la salud de una célula, pero la introducción de compuestos que entran en las vías metabólicas de NAD⁺ también puede ser tóxica para las células. En algunas realizaciones, la invención se refiere al uso de los compuestos descritos en este documento para manipular los niveles de NAD⁺, para modular la actividad de sirtuinas y otras ADP-ribosil transferasas, y para modular IMPHD. Estas realizaciones se usan para destruir o debilitar las defensas de células cancerosas, o para promover la supervivencia de neuronas, miocitos o células madre a través de la adición a medios de crecimiento.

El ácido nicotínico es un agente eficaz para controlar el colesterol de lipoproteínas de baja densidad, aumentar el colesterol de lipoproteínas de alta densidad y reducir los niveles de triglicéridos y lipoproteínas (a) en seres humanos. Aunque el tratamiento con ácido nicotínico afecta a todos los lípidos clave en la dirección deseable y se ha demostrado que reduce la mortalidad en las poblaciones objetivo, su uso es limitado debido a un efecto secundario del calor y el enrojecimiento denominado sonrojo. Además, la nicotinamida protege contra las lesiones por accidentes cerebrovasculares en los sistemas modelo, presumiblemente debido a múltiples mecanismos, incluido el aumento de los niveles mitocondriales de NAD⁺.

En algunas realizaciones, la descripción se refiere al uso de los compuestos descritos en este documento como agonistas y antagonistas de enzimas en la ruta de la biosíntesis del NAD⁺. En realizaciones adicionales, los derivados de NAR descritos en este documento son agonistas, es decir, estimulan actividades normalmente estimuladas por sustancias naturales, de una o más sirtuinas, preferiblemente SIRT1 en seres humanos o Sir2p en levadura. En realizaciones adicionales, los derivados NAR son antagonistas de una o más sirtuinas.

Aunque el solicitante no pretende que la descripción esté limitada por ningún mecanismo particular, se cree que es útil porque SIRT1 desacetila factores de transcripción tales como FOXOs, p53 y factor nuclear Kappa B (NFkB), que proporcionan resistencia al estrés, apoptosis y respuestas inflamatorias que mejoran la supervivencia del organismo. La sirtuina SIRT1 regula al alza las vías de protección contra el estrés mediante la desacetilación de los factores de transcripción FOXO, lo que conduce a una mayor transcripción de GADD45 (reparación del ADN) y MnSOD (desintoxicación del oxígeno reactivo). SIRT1 regula a la baja de forma concomitante la transcripción de FOXO de los factores proapoptóticos Fas y mediadores que interactúan con Bcl-2 de la muerte celular (BIM).

Por ejemplo, la red p53 en situaciones normales no activadas no es funcional, pero se activa en las células como respuesta a varias señales inhibiendo el crecimiento anormal de las células y desencadenando la muerte celular programada. SIRT1 interactúa con p53 y desacetila el dominio regulador C-terminal. Esta actividad regula a la baja los efectos de la activación transcripcional de p53 en genes diana.

Síntesis química de nicotinoil ribósidos

Debido a su importancia biológica, se han usado una serie de enfoques químicos para preparar nicotinamida ribósido (NAR). Véase Franchetti et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, 4655 - 4568 (2004) y Tanimori et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12, 1135 - 1137 (2002). Sin embargo, todavía no existe una forma sistemática de sintetizar los análogos de NAR. Una realización de la invención se refiere a un método eficaz para sintetizar estereoselectivamente β -NAR y sus diversos derivados en un recipiente con alto rendimiento. En comparación con los métodos anteriores, este método estereoselectivo es más eficiente y ofrece más posibilidades de formar varios análogos de NAD⁺ con un procedimiento similar.

La síntesis de compuestos de nicotinoil ribósido se inició con la preparación de un intermedio preferido, 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de etilo. A partir de esto, se prepararon derivados de O-alquilo de ribósido de ácido nicotínico. El reflujo del azúcar protegido, 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranosa con nicotinato de etilo (1,2 equiv.) en cloruro de metileno bajo la catálisis de TMSOTf (1 equiv) formó estereoselectivamente el isómero β a un buen rendimiento (> 90%). Una de las ventajas de este método es que no hay necesidad de pasar por la sililación de nicotinamida. Después de la evaporación del disolvente, se puede usar 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de etilo directamente para la siguiente etapa. El β -NAR y sus derivados son extremadamente solubles en agua. La extracción de acetato de etilo de la capa de agua pudo eliminar la mayoría de los productos secundarios no polares y dar el 95% de productos puros de acuerdo con la TLC. El 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de etilo también se trató con NaOCH₃/MeOH a -20°C para formar ribósido de nicotinato de O-metilo. Otros ribósidos de nicotinato de O-alquilo se prepararon de manera similar. Los ribósidos de nicotinato de O-alquilo pueden hidrolizarse con esterasa (de hígado de cerdo, Sigma) a pH = 7,0 para proporcionar ribósido de ácido nicotínico limpio. La HPLC inversa se usó para detectar y purificar los productos.

El estudio termodinámico mostró la reacción de 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de etilo y NH₃/MeOH a -20°C dio el producto 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de metilo, en lugar de β -NAR. Sin embargo, sin agotar, la reacción podría ir más allá para finalmente formar β -NAR después de que se restauró a 4°C. Esto podría ser explicado termodinámicamente. Como la amida es termodinámicamente más estable que el éster, a mayor temperatura, el β -NAR más estable sería el producto primario. Sin embargo, la reacción con NaOCH₃ a una temperatura más baja, -20°C, favorece cinéticamente la formación de ribósido de nicotinato de O-metilo.

La preparación de derivados de N-alquil β -NAR comienza a partir del ribósido de nicotinato de 2,3,5-tri-O-acetil-P-fenilo (véase la Figura 5) y un éster de fenilo activado. La incubación de cloruro nicotínico con fenol en THF durante la noche a temperatura ambiente produjo nicotinato de fenilo puro cuantitativamente, que luego se trató con 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranosa en cloruro de metileno bajo la catálisis de TMSOTf para dar 2,3,5-tri-O-acetil- β -fenil nicotinato ribósido. El ribósido 2,3,5-Tri-O-acetil- β -fenil nicotinato podría transformarse adicionalmente para preparar múltiples derivados de N-alquil NR con la adición de varias aminas primarias o secundarias. También se consideró que el éster etílico intermedio se usaba para construir los derivados de N-alquil-NAR, ya que en la bibliografía el intercambio éster-amida se ha considerado una forma versátil y simple de preparar amidas. Sin embargo, el estudio termodinámico de los inventores (ver Figura 6) mostró que la incubación del éster etílico intermedio con N-metilamina en metanol a -20°C formaba el ribósido de nicotinato de O-metilo como producto, en lugar del N-metil nicotinamida ribósido esperado. El MALDI-MS del producto mostró el peso molecular en 270, que es una masa más de la esperada 269. También se detectó el pico m/z en 138 en lugar de 137, lo que se debió a la pieza de nicotinato de metilo después de que el enlace C^{1'}-N¹ del éster metílico se rompiera. Toda la información sugiere que se produce una transesterificación en lugar de un intercambio del éster-amida. A baja temperatura, tanto la transesterificación como las reacciones de éster-amida fueron muy lentas, de modo que la selectividad de la reacción se controló cinéticamente. La transesterificación se favoreció más cinéticamente que el intercambio de éster-amida debido a la mayor concentración del disolvente, metanol. Como la amida es termodinámicamente más estable que el éster, suponemos que la selectividad de la reacción a temperatura más alta se controlaría termodinámicamente para formar el producto de amida más estable. Por lo tanto, la misma mezcla de reacción se incubó a 4°C. Sin embargo, después de una noche, el ribósido se descompuso totalmente, y se formaron N-metilamina y azúcar libre, lo que no sucedió en la preparación de β -NAR con el uso de NH₃/MeOH en absoluto. La descomposición puede deberse al hecho de que las N-alquilaminas son más básicas/neutrofílicas que el amoníaco libre, que tiende a atacar la posición C-1' del ribósido y causar la ruptura del enlace C^{1'}-N¹.

Para evitar la descomposición, se ha intentado con otro disolvente de reacción, el trifluoroetanol (TFE). El TFE tiene un pKa de 12,5, lo que lo hace más ácido en comparación con disolventes como metanol o etanol. Esta acidez del TFE disminuye la neutrofilia de las N-alquilaminas y, por lo tanto, ayuda a estabilizar el enlace C^{1'}-N¹. La reacción del éster etílico se realizó entonces en trifluoroetanol a 4°C durante días. Se descubrió que la acidez del trifluoroetanol también modera la nucleofilicidad/basicidad de la N-metilamina de modo que la reacción de intercambio éster-amida tarda semanas en completarse. El intercambio de éster-amida del éster de fenol en trifluoroetanol a 4°C podría completarse durante la noche. De manera bastante interesante, también se encontró que los grupos 2', 3' y 5'-O-acetilo en el azúcar presentan diferentes tasas de desacetilación en las mismas condiciones básicas. Después del tratamiento con N-metilamina a 4°C durante la noche, MALDI-MS ha mostrado el peso molecular del producto aislado como 311 en lugar del 269 esperado. La ¹H-NMR también estaba de acuerdo en que el grupo 5'-O-acetilo no

había sido quitado de la molécula. Este método de desprotección selectiva de hecho presenta una oportunidad conveniente para una modificación selectiva en la posición 5' de la ribosa. Después de que se añadiera 4N de NH_3/MeOH a la mezcla de reacción, la reacción se completó después de una incubación durante la noche a -20°C , y dio el producto desprotegido esperado. Todos los otros N-alquil nicotinamida ribósido también se han preparado con un procedimiento similar.

Composiciones para la administración

Las composiciones que comprenden los compuestos activos (derivados de nicotinamida ribósidos) incluyen suplementos nutricionales/dietéticos y composiciones de fármaco a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es decir, composiciones que son adecuadas para administración a un sujeto) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitaria. Dichas composiciones comprenden opcionalmente una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un agente profiláctico y/o terapéutico descrito en la presente memoria o una combinación de esos agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la descripción comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz del compuesto activo y otro agente terapéutico o profiláctico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden contener entre 0,1 - 99% del ingrediente activo.

En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enlistado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto activo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de petróleo, animales, vegetales o de origen sintético, tales como el aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, goma arábica, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar agentes auxiliares, estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes. Cuando se administran a un sujeto, los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente estériles. El agua puede ser el vehículo cuando el compuesto activo se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados también incluyen excipientes tales como almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. Las presentes composiciones, si se desea, también pueden contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, gránulos, cápsulas, cápsulas que contienen líquidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, emulsiones, aerosoles, pulverizaciones, suspensiones o cualquier otra forma adecuada para su uso. En una realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una cápsula (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.698.155).

En una realización preferida, el compuesto activo y opcionalmente otro agente terapéutico o profiláctico se formulan de acuerdo con procedimientos rutinarios como composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, el compuesto activo para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, las composiciones también pueden incluir un agente solubilizante. Las composiciones para la administración intravenosa pueden incluir opcionalmente un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando el compuesto activo se va a administrar por infusión, se puede dispensar, por ejemplo, con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando el compuesto activo se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones para la administración oral pueden estar en forma de tabletas, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, gránulos, polvos, emulsiones, cápsulas, jarabes o elixires, por ejemplo. Las composiciones administradas por vía oral pueden contener uno o más agentes opcionales, por ejemplo, agentes edulcorantes tales como fructosa, aspartamo o sacarina; agentes aromatizantes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza; agentes colorantes; y conservantes, para proporcionar una preparación farmacéuticamente aceptable. Además, cuando están en forma de tableta o píldora, las composiciones pueden recubrirse para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal, proporcionando así una acción sostenida durante un período prolongado de tiempo. Las membranas selectivamente permeables que rodean un compuesto de accionamiento osmóticamente activo también son adecuadas para una administración oral del compuesto activo. En estas plataformas posteriores, el compuesto de accionamiento absorbe fluido del entorno que rodea la cápsula, que se hincha para desplazar el agente o la composición del agente a través de una abertura. Estas plataformas de entrega pueden proporcionar un perfil de entrega de orden esencialmente cero en oposición a los perfiles enriquecidos de las formulaciones de liberación

inmediata. También se puede usar un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerol o estearato de glicerol. Las composiciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Tales vehículos son preferiblemente de calidad farmacéutica.

- 5 Además, el efecto del compuesto activo puede retrasarse o prolongarse mediante una formulación adecuada. Por ejemplo, se puede preparar un comprimido lentamente soluble del compuesto activo e incorporarlo en una tableta o cápsula. La técnica puede mejorarse fabricando gránulos de diferentes velocidades de disolución y rellenando las cápsulas con una mezcla de los gránulos. Las tabletas o cápsulas pueden recubrirse con una película que resista la disolución durante un período de tiempo predecible. Incluso las preparaciones parenterales pueden hacerse de acción prolongada, disolviendo o suspendiendo el compuesto en vehículos aceitosos o emulsionados que le permitan dispersarse solo lentamente en el suero.

Las composiciones para uso de acuerdo con la presente descripción se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables.

- 15 Por lo tanto, el compuesto y opcionalmente otro agente terapéutico o profiláctico y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables se pueden formular en composiciones farmacéuticas para su administración por inhalación o insuflación (por la boca o la nariz) o por vía oral, parenteral o mucosa (tales como la administración bucal, vaginal, rectal, sublingual). En una realización, se usa la administración parenteral local o sistémica.

- 20 Para la administración oral, las composiciones pueden tomar la forma de, por ejemplo, tabletas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Las tabletas se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, saborizantes, colorantes y edulcorantes, según corresponda.

Las preparaciones para la administración oral se pueden formular de forma adecuada para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo.

- 35 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

- 40 Para la administración por inhalación, las composiciones para uso de acuerdo con la presente descripción se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

- 45 Las composiciones se pueden formular para su administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones farmacéuticas pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

- 50 Las composiciones también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 55 Además de las formulaciones descritas previamente, las composiciones también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

En otras realizaciones de la descripción, pueden administrarse agentes de terapia de radiación tales como isótopos radiactivos por vía oral como líquidos en cápsulas o como una bebida. Los isótopos radiactivos también se pueden formular para inyección intravenosa. El oncólogo experto puede determinar la formulación y la vía de administración preferidas.

5 Las composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El paquete puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un paquete blíster. El paquete o el dispositivo dispensador pueden ir acompañados de instrucciones de administración.

10 En ciertas realizaciones preferidas, el paquete o dispensador contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen no más de la formulación de dosificación recomendada como se determina en Physician's Desk Reference (56ª edición, 2002).

15 Los métodos para administrar el compuesto activo y opcionalmente otro agente terapéutico o profiláctico incluyen, pero no se limitan a, la administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (p. ej., vías intranasal, rectal, vaginal, sublingual, bucal u oral). En una realización específica, el compuesto activo y opcionalmente otros agentes profilácticos o terapéuticos se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. El compuesto activo y opcionalmente otro agente profiláctico o terapéutico también pueden administrarse por infusión o inyección en bolo y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser local o sistémica. El compuesto activo y opcionalmente el agente profiláctico o terapéutico y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables también se pueden administrar por inhalación o insuflación (a través de la boca o la nariz). En una realización preferida, se usa la administración parenteral local o sistémica.

20 En realizaciones específicas, puede ser deseable administrar el compuesto activo localmente en el área que necesita tratamiento. Esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante una infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas elásticas o fibras. En una realización, la administración puede ser mediante inyección directa en el sitio (o sitio anterior) de un tejido de placa aterosclerótica.

25 La administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización, o mediante perfusión en un fluorocarbono o agente tensioactivo pulmonar sintético. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede formular como un supositorio con aglutinantes y vehículos tradicionales, tales como triglicéridos.

En otra realización, el compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma.

30 En aún otra realización, el compuesto activo se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba. En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos.

35 La cantidad del compuesto activo que es efectiva en el tratamiento o la prevención de afecciones cardíacas se puede determinar mediante técnicas de investigación estándar. Por ejemplo, la dosificación del compuesto activo que será efectiva en el tratamiento o la prevención de afecciones cardíacas se puede determinar administrando el compuesto activo a un animal en un modelo tal como, por ejemplo, los modelos animales conocidos por los expertos en la técnica. Además, los ensayos in vitro se pueden emplear opcionalmente para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos.

40 La selección de una dosis efectiva particular puede determinarse (por ejemplo, a través de ensayos clínicos) por un experto en la materia basándose en la consideración de varios factores que serán conocidos por los expertos en la técnica. Tales factores incluyen la enfermedad a tratar o prevenir, los síntomas implicados, la masa corporal del sujeto, el estado inmune del sujeto y otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

45 La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad del desgaste relacionado con la enfermedad, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos in vitro o animales.

50 La dosis del compuesto activo a administrar a un sujeto, tal como un ser humano, es bastante variable y puede someterse a juicio independiente. A menudo es práctico administrar la dosis diaria del compuesto activo a varias horas del día. Sin embargo, en cualquier caso dado, la cantidad del compuesto activo administrado dependerá de factores tales como la solubilidad del componente activo, la formulación utilizada, el estado del sujeto (tal como el peso) y/o la vía de administración.

55 El intervalo general de las cantidades efectivas del compuesto activo solo o en combinación con otro(s) agente(s) profiláctico(s) o terapéutico(s) es de aproximadamente 0,001 mg/día a aproximadamente 1000 mg/día, más

- preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 750 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 500 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 250 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 100 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 75 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 50 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 25 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 10 mg/día, más preferiblemente de aproximadamente 0,001 mg/día a 1 mg/día. Por supuesto, a menudo es práctico administrar la dosis diaria de compuesto en porciones, a varias horas del día. Sin embargo, en cualquier caso dado, la cantidad de compuesto administrado dependerá de factores tales como la solubilidad del componente activo, la formulación utilizada, el estado del sujeto (tal como el peso) y/o la vía de administración.
- 10 Un medicamento popular contra el cáncer es el taxol. Los intervalos de dosificación típicos de taxol incluyen menos de 10 mg a 100 mg o más. Las dosis particulares de taxol incluyen aproximadamente 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 80 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg. Por lo general, estas son dosis diarias. En general, las dosis más altas son menos preferidas debido a posibles alteraciones gástricas. Las dosis terapéuticas pueden oscilar entre 40 y 80 mg por día cuando sea tolerable por un sujeto.
- 15 La descripción proporciona cualquier método de administración de dosis más bajas de agentes conocidos (por ejemplo, taxol) de los que se pensó anteriormente que eran útiles para la prevención o el tratamiento del cáncer.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis de ribósido de nicotinato de 2',3',5'-triacetil etilo (1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de etilo)

- 20 Se añadió lentamente un equivalente de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf) en nicotinato de etilo (0,9 ml, 6,6 ml) y 1,2,3,5-tetra-O-acetil-β-D-ribofuranosa (1,4 g, 4,4 mmol) en 50 mL de cloruro de metileno anhidro a temperatura ambiente. La mezcla luego se calentó a reflujo durante 8 horas. La TLC teñida con H₂SO₄ en MeOH mostró la desaparición de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-β-D-ribofuranosa, y un producto casi puro. El producto podía usarse directamente para el siguiente paso después de que se evaporó el cloruro de metileno.

- 25 Ejemplo 2: Síntesis de β-NAR (ribósido de nicotinamida)

Se añadió 2',3',5'-triacetil etil nicotinato ribósido (180 mg, 0,44 mmol) en 4,7 ml de NH₃ 4N/MeOH en hielo. Después de mezclar bien, la reacción se almacenó a 4°C durante la noche. Después de eliminar el metanol al vacío, el residuo se disolvió en agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces para eliminar la impureza no polar. La capa de agua se concentró luego y se inyectó en HPLC inversa para la purificación (columna de Waters xTerra Prep RP18®, 2 ml/min, acetato de amonio 20 mM).

- 30 Ejemplo 3: O-alquil β-nicotinato ribósidos

Se añadió ribósido de 2',3',5'-triacetil etil nicotinato (25 mg, 0,61 μmol) en 0,9 ml de NaOMe/MeOH (255 mM) o NaOEt/EtOH (312 mM) en hielo. Después de mezclar bien, la reacción se almacenó a -20°C durante la noche. La reacción se inactivó con la adición de ácido acético a pH = 7. Después de eliminar el disolvente orgánico a vacío, el residuo se disolvió en agua y se extrajo con ciclohexano para eliminar las impurezas no polares. La capa de agua se concentró luego y se inyectó en HPLC inversa para su purificación.

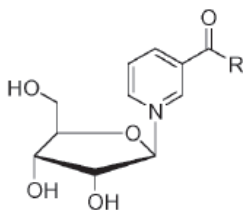


Tabla 1

Entrada (figura 1)	R	Temp.
14	-OCH ₃	-20°C
15	-OCH ₂ CH ₃	-20°C
16	-OCH ₂ CH ₂ OH	-20°C

- 40 Ejemplo de referencia 4: N-alquil β-nicotinamida ribósidos

Se añadió cloruro de nicotina (1,78 g, 10 mmol) a fenol (1,29 g, 12 mmol) en 10 ml de THF. Después se añadieron trietilamina (5 ml) y piridina (5 ml) a la mezcla, que luego se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de que el THF se evaporara, la mezcla se lavó luego con acetato de etilo en agua tres veces. La capa orgánica se purificó entonces con columna de sílice (Hexano:EtOAc = 4:1) para dar el producto puro. El ribósido se preparó de acuerdo con el procedimiento proporcionado en el Ejemplo 1. Este éster de fenol (25 mg, 0,61 μ mol) se añadió a diversas aminos (400 μ M) en 0,9 ml de trifluoroetanol. Después de mezclar bien, la reacción se almacenó a 4°C durante la noche. El día siguiente, se añadió 4N de NH_3/MeOH a la mezcla de reacción, y la reacción se almacenó a -20°C durante la noche. Después de que la reacción se inactivara con la adición de HCl para hacer que el pH fuera <7, el disolvente orgánico se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en agua y se aisló con una extracción desechable de Octadecil-C18.

Tabla 2

Entrada (Figura 1)	Intermedio	Temp. Disolvente	Producto	Rendimiento (%)
3	R' = C ₂ H ₅	MeOH 4°C	R = NH ₂	85
4	R' = C ₂ H ₅	MeOH -20°C	R = OCH ₃	85
5	R' = C ₂ H ₅	EtOH -20°C	R = OC ₂ H ₅	81
6	R' = C ₂ H ₅		R = OH	80
9	R' = C ₆ H ₅	TFE 4°C	R = NHCH ₃	80
10	R' = C ₆ H ₅	TFE 4°C	R = NHC ₂ H ₅	80
11	R' = C ₆ H ₅	TFE 4°C	R = NHCH ₂ CH = CH ₂	80
12	R' = C ₆ H ₅	TFE 4°C	R = NHC ₂ H ₄ NH ₂	55
13	R' = C ₆ H ₅	TFE 4°C	R = NH(CH ₃) ₂	52

Ejemplo de referencia 5

Síntesis de ribósido de ácido β -nicotínico (ácido 1-[3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)oxolan-2-il]piridina-5-carboxílico)

Se disolvió 1-[3,4-diacetiloxi-5-(acetiloximetil)oxolan-2-il]-piridin-3-carboxilato de metilo en tampón de fosfato (150 mM, pH = 7,0). Se añadieron 10 μ l de esterasa a la mezcla y se mezcló bien. La reacción se realizó a 25°C durante la noche. La inyección de HPLC mostró un producto puro al 98%.

Ejemplo de referencia 6. Aumento de los niveles celulares de NAD⁺ producidos con medio enriquecido con Nicotinamida Ribósido (NAR)

Se sembraron células madre embrionarias de ratón sobre matraces de cultivo celular (250 ml, 75 cm²) y se cultivaron hasta una confluencia del 50% en 48 horas después del paso. A las 48 horas se separaron 2 matraces como controles y se usaron 2 matraces para determinar el efecto de NAR sobre la biosíntesis de NAD⁺. Las células se trataron con HClO₄ 1 M y una cantidad específica de ¹⁸O-NAM (mononucleótido de nicotinamida) y ¹⁸O-NAD⁺. Las muestras se fraccionaron por HPLC y las fracciones que contenían NAM y NAD⁺ se analizaron mediante ESI-MS y MALDI-MS, respectivamente. La relación máxima (¹⁶O/¹⁸O) se usó para cuantificar cantidades de NAM y NAD⁺ en cada muestra. Se encontró que las células tratadas con NAR muestran una mayor concentración de NAD⁺ en comparación con los controles. De acuerdo con la medición de los inventores, el nivel de NAD⁺ en las células tratadas con NAR es 3886,6 pmol/mg de proteína celular y contenido de ácido nucleico, y el NAD⁺ en las células control es solo 1782,2 pmol/mg de proteína celular y contenido de ácido nucleico. La proteína celular y el contenido de ácido nucleico se midieron por separado (véase la figura 3).

Ejemplo de referencia 7. Efecto de nicotinamida ribósido (NAR) sobre la muerte celular mediada por mms

Se pasan células madre embrionarias de ratón a 7 matraces (250 ml, 75 cm²) con 20 ml de medio [Para 500 ml: la modificación de Dulbecco del medio Eagle, glutamina 2 mM, suero de bovino fetal calificado al 10% ES al 10%, penicilina/estreptomicina (5 ml 100 ×), aminoácidos no esenciales (5 ml 100 ×), piruvato sódico (5 ml 100 ×), 4 µl de beta-mercapto-etanol y concentración final del factor inhibidor de la leucemia 1000 unidades/mL], nombrado desde el no. 1 al no. 7. Después de 2 días de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se añadió NAR al matraz nº 3, 5, 7 para hacer la concentración final a 1 mM, y las células se incubaron durante otro día. Se añadió Mms (200 mM) al matraz nº 2, 3, 4, 5, 6, 7 para obtener una concentración final de 1 mM. El matraz celular n.º 1 se mantiene como control y se utiliza para el paso. Después de 3 horas de incubación, se cambió el medio reciente por el matraz nº 4, 5, 6, 7. Y la Células no. 2 y 3 son cosechadas. Después de 6 horas, se cosechó el tratamiento de mms, Célula no. 4, 5. Y las Células no. 6, 7 se cosechan a las 9 h de tratamiento de mms. Las células de cosecha (las vivas) se cuentan para determinar el porcentaje de muerte con azul de tripano (ver figura 2).

Ejemplo de referencia 8. Supervivencia celular

Las células madre embrionarias de ratón se pasan a 2 matraces (250 ml, 75 cm²) con 20 ml de medio, denominados nº. A y nº. B. Después de 2 días de incubación a 37°C con 5% de CO₂, se añadió NAR al matraz nº. A para obtener la concentración final a 1 mM, y ambas células se incubaron durante otro día. Se añadió Mms (200 mM) a ambos matraces nº. A y nº. B para obtener una concentración final de 1 mM. Después de 3 horas de incubación, cada cultivo celular (con/sin tratamiento de NR) se pasa a dos nuevos matraces con/sin 1 mM de NAR. Después de dos días de incubación, el recuento de la supervivencia del cultivo en cada uno de estos 4 nuevos matraces: medio mms/control, medio mms/NAR; medio mms + NAR/control; medio mms + NAR/NAR. Se descubrió después del tratamiento con mms que las células cultivadas se dañaban seriamente y que solo tenían una supervivencia muy baja después del paso. Sin embargo, en comparación con otros, el cultivo celular tratado con NAR proporciona los números de cultivo más altos. El recuento de células por hemocitometría se usó para determinar la supervivencia frente al número de células (véase la figura 4).

Ejemplo de referencia 9. Efectos de las estatinas sobre la viabilidad celular y la mitigación de la toxicidad por nicotinamida ribósido

Se pasan cantidades iguales de células madre embrionarias de ratón en dos placas de cultivo tisular de 6 pocillos (10 cm² cada pocillo) con 3 ml de medio [Para 500 ml: modificación de Dulbecco de medio Eagle, glutamina 2 mM, Suero Fetal Bovino ES al 10% calificado al 10%, penicilina/estreptomicina (5 ml 100 ×), aminoácidos no esenciales (5 ml 100 ×), piruvato sódico (5 ml 100 ×), 4µL de beta-mercapto-etanol y concentración final del factor inhibidor de leucemia 1000 unidades/ml], denominado desde el n.º 1 al n.º 6. Después de 2 días de incubación a 37°C con CO₂ al 5%, se añadieron diferentes concentraciones de lovastatina 0, 50, 250, 800, 2000 y 10000 nM a los pocillos 1-6 en cada placa, respectivamente. Las dos placas se denominaron NR y no NR para representar el tratamiento y la falta de tratamiento con el compuesto nicotinamida ribósido (NR). Cada pocillo en la placa NR se trató con 10 µL de NR 150 mM para hacer una concentración final de NR en cada pocillo de 500 µM. A los 2, 4 y 7 días las células se analizaron mediante recuento de células y mediante ensayo de MTT después de tratar con tripsina las células para despegarlas de las placas. A los 2 y 4 días las células se volvieron a sembrar a partir de cada pocillo individual en nuevas placas nuevas de 6 pocillos y se trataron inmediatamente con la misma concentración de NR y estatinas que las células del pocillo de origen. Las células sembradas fueron idénticas en número de las células viables en cada caso según se determinó contando las células con una dilución apropiada de las células tripsinizadas de cada pocillo.

La viabilidad celular en cada punto de tiempo se representó frente a la concentración de estatinas para determinar la IC₅₀ de la estatina en la placa con NR y sin NR donde IC₅₀ se define como la concentración de estatinas que reduce la viabilidad celular en un 50% en las condiciones experimentales. La estatina típicamente reduce la viabilidad celular en un 50% a una concentración entre 130 nM-300 nM en cada punto de tiempo para las células no tratadas con NR (Figura 8). En presencia de NR, la CI₅₀ de la estatina aumenta moderadamente a los 2 días de tratamiento y de dos a tres veces después de 4 y 7 días de tratamiento (Figura 8). Esto muestra que NR mitiga la toxicidad de estatinas de una manera significativa con NR disponible en medios celulares.

La viabilidad celular medida por recuento celular y el ensayo MTT es significativamente mayor en el grupo tratado con NR versus sin NR virtualmente en cada concentración de estatinas, lo que da como resultado una IC₅₀ mayor para las estatinas en presencia de NR (566 nM, determinada por el conteo celular; 656 nM determinado por el ensayo de MTT) frente a la ausencia de NR (248 nM, determinado por recuento de células; 216 nM determinado por el ensayo de MTT). Destacadamente, a la concentración de estatinas más alta medida, 10 µM, los porcentajes significativos de células viables permanecen en el grupo tratado con NR, medido tanto por recuento celular como por ensayo MTT, mientras que la viabilidad celular en el grupo sin NR es casi completamente inviable. El análisis de los datos utilizado fue análogo en los resultados de los días 2 y 4 que se muestran gráficamente en la FIG. 8.

Ejemplo de referencia 10. Evaluación de diferentes derivados de ribósido de nicotinato como formas biodisponibles de niacina que estimulan la síntesis de NAD⁺ en células

Se sembraron células Hela en una placa de 6 pocillos a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Los compuestos sintetizados (NAR: ribósido de ácido nicotínico, O-etil-NR: ribósido de nicotinato de etilo, Intermedio: TAENR,

ribósido de triacetil-etil-nicotinato, véase la Figura 10) se añadieron a las células separadamente después de 24 horas (no se añadió ningún compuesto para el control). Las células se incubaron entonces durante otras 24 horas antes de la cosecha. Las células se trataron con tripsina y se extrajo una alícuota para contar. Las células se sedimentaron y luego se disolvieron en 100 μ L de ácido perclórico al 7%, y se añadieron 535,5 pmol de ^{18}O -NAD⁺ (95% enriquecido isotópicamente) a cada muestra. Después de mezclar bien, las muestras se sedimentaron y luego se neutralizaron con NaOH para hacer pH = 7~8. Las muestras se centrifugaron luego durante 3 minutos y el sobrenadante (100 μ L) se inyectó en una columna C-18 (detector de red de diodos L2450 de la bomba Hitachi HPLC L2130) y se separaron para aislar el pico que contenía NAD⁺. La elución se recogió durante el pico de NAD⁺ y la solución se congeló y liofilizó. La muestra fue analizada por MALDI-MS en modo de detección de iones positivos para determinar el contenido de NAD⁺ (Tabla 3) midiendo los picos m/z = 664 (^{16}O -NAD⁺) y 666 (^{18}O -NAD⁺).

El experimento sugiere que diferentes formas de ribósidos de nicotinato están disponibles como fuentes metabolizables de niacina y que estas formas químicas de niacina de nueva composición tienen el efecto de aumentar sustancialmente las concentraciones de NAD⁺ en las células como se determina mediante un ensayo cuantitativo de MS. Los aumentos en las concentraciones de NAD⁺ dentro de las células pueden conducir a beneficios clínicos. El aumento mínimo en la concentración de NAD⁺ en las células que observamos fue de 618 pmol por millón de células (Tabla 3, y gráfico de barras Figura 9) en células no tratadas hasta 1004 pmol por millón de células en el caso del tratamiento con 500 micromolar del compuesto ribósido de nicotinato de O-etilo. Esto representa un aumento del 62% sobre el control del contenido NAD⁺. El aumento de la concentración de este compuesto a 800 micromolar condujo a un aumento en la concentración de NAD⁺ de aproximadamente tres veces (Tabla 3). De forma similar, el ribósido de ácido nicotínico y el compuesto completamente esterificado tri-acetil-etilnicotinato ribósido fue capaz de aumentar las concentraciones de NAD⁺ en las células en un 60% y tres veces respectivamente (Tabla 3). Estos datos demuestran que estos derivados son metabolizados por las células y aumentan las concentraciones de NAD⁺ en las células de manera sustantiva (60-300%). Estos compuestos aumentan el NAD⁺ intracelular.

Tabla 3: Contenido de NAD⁺ (pmol) en células ES después de tratarse con diferentes compuestos

Compuestos	664/666	^{16}O -NAD ⁺ (pmol)	^{18}O -NAD ⁺ (pmol)	Número de células (*10 ⁶)	[NAD ⁺]/10 ⁶ células (pmol)
NAR (669 μ M)	4,11	2201,2	535,5	2,04	1079
O-etil NR (500 μ M)	2,02	1084,1	535,5	1,08	1004
O-etil NR (803 μ M)	4,90	2622,7	535,5	1,17	2242
TAENR (750 μ M)	8,28	4432,2	535,5	2,16	2052
Control	2,01	1075,5	535,5	1,74	618

NAR: ribósido de ácido nicotínico, O-etil-NR: ribósido de nicotinato de etilo, TAENR, triacetil-etil-nicotinato de ribósido

Ejemplo de referencia 11. Reducción de la toxicidad de estatinas

Las células ES crecieron en cuatro placas de 6 pocillos a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Las células se trataron después con lovastatina 0, 800 ó 5000 nM (concentración final) y también se trataron con uno de NAR 500 μ M, OENR 1 mM, TAENR 1 mM o ningún compuesto. Después de 48 horas, se eliminaron los medios celulares y las células se recogieron por tripsinización. Las células se contaron por hemocitometría y usando tinción con yoduro de propidio para evaluar la viabilidad. Las células se contaron para ningún tratamiento con estatinas y con tratamiento con estatinas 800 nM y 5 μ M en cada grupo. El porcentaje de muerte celular fue determinado por las células viables en cada grupo dividido por los números de células en el grupo correspondiente no tratado con estatinas. Los recuentos de células fueron similares en los controles de cada grupo (sin estatinas) lo que indicaba una baja toxicidad de los compuestos ribosídicos de nicotinato añadidos a las células tratadas.

La figura 10 muestra datos que sugieren que la toxicidad de estatinas puede ser mitigada por compuestos ribosídicos de nicotinato. Los porcentajes de muerte celular más bajos muestran que los compuestos ribosídicos de nicotinato evitan que las células sucumban al tratamiento tóxico con estatinas. Se cree que estos compuestos pueden entrar en el metabolismo de NAD⁺ como lo demuestra el estudio de los inventores de la potencia de estas moléculas como precursores de NAD⁺ y, de ese modo, proteger a las células del estrés o la toxicidad. Por lo tanto, varios trastornos degenerativos que resultan de procesos de enfermedad pueden tratarse usando estos compuestos.

Ejemplo de referencia 12. Toxicidad de derivados de ribósido de nicotinamida seleccionados

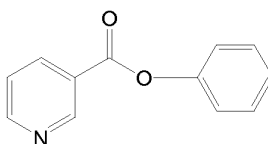
A placas de 96 pocillos, se incubaron células ES de ratón en medio de cultivo celular durante un período de 24 horas sin compuesto (control) dimetil nicotinamida ribósido (1 mM) o N-alil nicotinamida ribósido (1 mM). Después de un período de 24 horas, las células se trataron con reactivo MTT y se incubaron adicionalmente a 37 grados

centígrados durante tres horas adicionales. Después de este tiempo, los medios se eliminaron mediante pipeta y se añadió DMSO para solubilizar el colorante. El color púrpura se midió a 590 nm en un lector de placas para evaluar la viabilidad celular. Todas las muestras se corrieron por duplicado y la lectura promedio de MTT se comparó con la lectura promedio versus el control. N-alil-nicotinamida-ribósido es capaz de reducir la proliferación celular en comparación con los controles que no se tratan con el compuesto (Figura 12).

Ejemplo 13. Síntesis y caracterización química

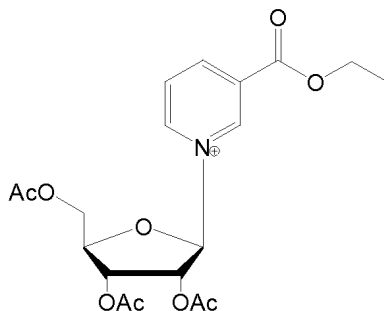
Todos los disolventes orgánicos y reactivos se compraron de Sigma-Aldrich Corporation y VWR Scientific y se usaron sin purificación adicional. El sistema HPLC consiste en un sistema Hitachi EZChrom Elite HPLC con una matriz de diodos L2450 como detector. El sistema de purificación empleó un sistema de fase móvil que implicaba 20 mM de tampón de acetato de amonio con un caudal de 2,0 ml/min y una columna Waters Delta PAK C18 (15 μ m, 300 x 7,8 mm). Los espectros de masas MALDI se obtuvieron del centro de Recursos Proteómicos de la Universidad Rockefeller con el uso del Espectrómetro de Masas DERP MALDI-TOF PerSeptive Voyager. Los espectros de HRMS se obtuvieron del Hunter College Mass Spectrometry Facility. Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN se registraron en el espectrómetro de RMN de Bruker que opera a 400 MHz (DPX Avance), respectivamente. Los desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C se expresan en ppm con respecto a los picos de disolvente de deuterio estándar.

Nicotinato de fenilo:



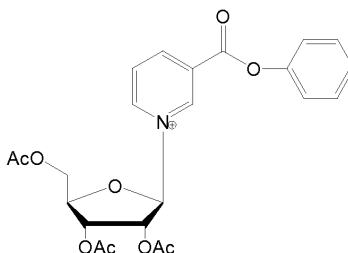
Se añadió cloruro nicotínico (1,78 g, 10 mmol) a fenol (1,29 g, 12 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano (THF). Después se añadieron trietilamina (5 ml) y piridina (5 ml) a la mezcla, que luego se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de evaporar el THF, la mezcla se lavó con acetato de etilo en agua tres veces. La capa de acetato de etilo (EtOAc) se purificó entonces con columna de sílice (Hexano:EtOAc = 4:1) para dar el producto puro. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 9,40 (s, 1 H), 8,86 (d, 1 H), 8,46 (d, 1 H), 7,45 (m, 3 H), 7,32 (d, 1 H), 7,24 (m, 2H).

2',3',5'-Triacetil etil nicotinato ribósido (2):



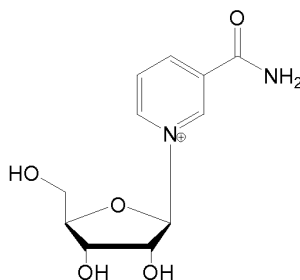
1 equiv. de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf) se añadió lentamente en nicotinato de etilo (0,9 ml, 6,6 ml) y 1,2,3,5-tetra-O-acetil- β -D-ribofuranosa (1,4 g, 4,4 mmol) en 50 ml de cloruro de metileno anhidro a temperatura ambiente. La mezcla se calentó luego a reflujo durante 8 horas. La TLC (MeOH: MeOH: TEA = 5: 0,3: 0,05) teñida con 10% de H_2SO_4 en MeOH mostró la desaparición de la ribofuranosa, y un producto casi puro. El producto 2 se usó luego directamente para la siguiente etapa después de que se evaporó el cloruro de metileno. MS: M/Z (%): 410,06 (14, $[\text{M}]^+$), 259,0 (100), 138,9 (22).

2',3',5'-Triacetil fenil nicotinato ribósido (8):



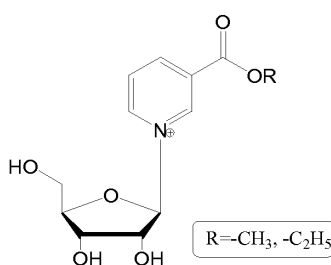
1 equiv. de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf) se añadió lentamente a fenil nicotinato (100 mg, 0,41 mmol) y 1,2,3,5-tetra-O-acetil-β-D-ribofuranosa (159 mg, 0,5 mmol) en 15 ml de cloruro de metileno anhidro a temperatura ambiente. La mezcla luego se calentó a reflujo durante 5 horas. La TLC (MeOH: MeOH: TEA = 5: 0,3: 0,05) teñida con 10% de H₂SO₄ en MeOH mostró la desaparición de 1, y un producto casi puro. El producto pudo usarse directamente para el siguiente paso después de que se evaporara el cloruro de metileno. MS: M/Z (%): 458,1 (12, [M]⁺), 139,0 (64), 200,0 (76).

β-nicotinamida ribósido (3)



El compuesto 2 (180 mg, 0,44 mmol) se añadió a 4,7 ml de 4N de NH₃/MeOH en hielo. Después de mezclar bien, la reacción se almacenó a 4°C durante la noche. Después de eliminar el metanol a vacío, el residuo se disolvió en agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces para eliminar las impurezas no polares. La capa de agua se concentró luego y se inyectó en HPLC inversa para la purificación. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 9,60 (s, 1 H), 9,31 (d, 1 H), 8,92 (d, 1 H), 8,16 (t, 1 H), 6,06 (d, 1 H), 4,31 (m, 2H), 4,19 (t, 1H), 3,90 (dd, 1H), 3,74 (dd, 1H). ¹³C RMN (300 MHz, D₂O): δ = 146,0, 143,0, 141,3, 128,7, 100,2, 88,1, 77,7, 70,2, 60,6. MS: 255 (67, [M]⁺), 133,0 (4), 123,0 (82). HRMS (ESI) m/z [M]⁺ calculado para C₁₁H₁₅N₂O₅ 255,09755, encontrado 255,09801.

O-alkil β-nicotínico ribósido (4, 5):

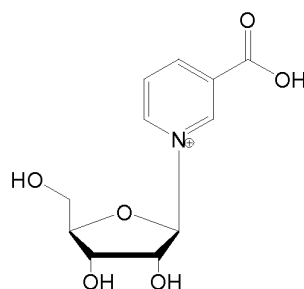


El compuesto 2 (25 mg, 0,61 μmol) se añadió a 0,9 ml de NaOMe/MeOH (255 mM, para formar 4) o NaOEt/EtOH (312 mM, para formar 5) en hielo. Después de mezclar bien, la reacción se almacenó a -20°C durante la noche. La reacción se inactivó con la adición de ácido acético a pH = 7. Después de eliminar el disolvente orgánico a vacío, el residuo se disolvió en agua y se extrajo con ciclohexano para eliminar las impurezas no polares. La capa de agua se concentró luego y se inyectó en HPLC inversa para su purificación.

O-metil β-nicotínico ribósido (4): ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ = 9,74 (s, 1 H), 9,24 (d, 1 H), 9,05 (d, 1 H), 8,23 (t, 1 H), 6,21 (d, 1H), 4,42 (m, 2H), 4,29 (t, 1H), 3,99 (m, 4H), 3,84 (dd, 1H), ¹³C RMN (300 MHz, D₂O): δ = 147,8, 144,0, 142,2, 129,0, 100,5, 87,9, 77,8, 69,9, 60,4, 54,4. MS: m/z (%): 270,1 (42, [M]⁺), 152,1 (81), 138,0 (92). HRMS (ESI) m/z [M]⁺ calculado para C₁₂H₁₆NO₆ 270,09721, encontrado 270,09737.

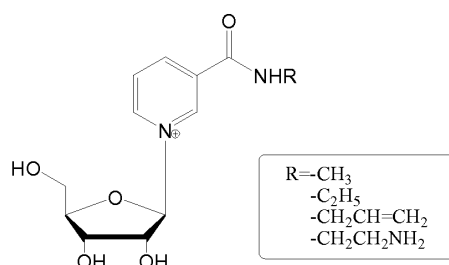
O-etil β-nicotínico ribósido (5): ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 9,86 (s, 1 H), 9,37 (d, 1 H), 9,20 (d, 1 H), 8,37 (t, 1 H), 6,35 (d, 1 H), 4,55 (m, 4 H), 4,44 (t, 1 H), 4,15 (dd, 1 H), 3,98 (dd, 1 H), 1,49 (t, 3 H). ¹³C RMN (300 MHz, D₂O): δ = 148,9, 145,0, 143,5, 129,8, 101,7, 88,8, 79,0, 70,8, 65,7, 61,4, 15,0. MS: m/z (%): 284,1 (77, [M]⁺), 256,0 (6), 212,0 (83), 133,0 (7), 124,0 (14). HRMS (ESI) m/z [M]⁺ calculado para C₁₃H₁₈NO₆ 284,11286, encontrado 284,11339.

Ribósido de ácido β-nicotínico (6)



El compuesto 5 se disolvió en tampón de fosfato (150 mM, pH = 7,0). Se añadieron 10 µl de esterasa a la mezcla y se mezcló bien. La reacción se realizó a 25°C durante la noche. La inyección de HPLC mostró que la pureza del producto está por encima del 98%. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ =; MS: m/z (%): 256,1 (3, [M]⁺), 228,0 (80), 207,1 (42), 146,1 (17), 124,0 (23).

Derivados de N-alkil β-NAR (9, 10, 11, 12, 13):



El compuesto 8 (25 mg, 0,61 µmol) se añadió a diversas amina (400 µM) en 0,9 ml de trifluoroetanol. Después de mezclar bien, la reacción se almacenó a 4°C durante la noche. El día siguiente, se añadió 4N de NH₃/MeOH a la mezcla de reacción, y la reacción se almacenó a -20°C durante la noche. Después de que la reacción se inactivara con la adición de HCl para hacer que el pH fuera <7, el disolvente orgánico se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en agua y se aisló con una columna de extracción desechable de Octadecil-C18.

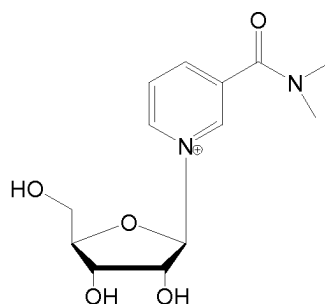
N-metil β-nicotinamida ribósido (9): ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ = 9,58 (s, 1 H), 9,28 (d, 1 H), 8,95 (d, 1 H), 8,30 (t, 1 H), 6,27 (d, 1 H), 4,75 (1 H), 4,53 (m, 1 H), 4,39 (t, 1 H), 4,08 (dd, 1 H), 3,93 (dd, 1 H), 3,00 (s, 3 H). ¹³C RMN (300 MHz, D₂O): δ = 145,3, 142,4, 140,0, 128,4, 100,0, 87,8, 77,5, 69,9, 60,2, 27,5. MS: m/z (%): 269,1 (13, [M]⁺), 248,0, 212,0, 137,0 (100). HRMS (ESI) m/z [M]⁺ calculado para C₁₂H₁₇N₂O₅ 269,11320, encontrado 269,11378.

N-etil β-nicotinamida ribósido (10): ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 9,57 (s, 1 H), 9,27 (d, 1 H), 8,95 (d, 1 H), 8,29 (t, 1 H), 6,27 (d, 1 H), 4,52 (m, 2 H), 4,38 (t, 1 H), 4,07 (dd, 1 H), 3,92 (dd, 1 H), 3,49 (q, 2 H), 1,26 (t, 3 H). ¹³C RMN (300 MHz, D₂O): δ = 145,8, 142,7, 140,3, 129,0, 100,5, 88,0, 77,8, 70,0, 60,6, 36,0, 13,4. MS: m/z (%): 283,1 (93, [M]⁺), 227 (50), 207,1 (100), 151,1 (44).

N-alil β-nicotinamida ribósido (11): ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ = 9,59 (s, 1H), 9,28 (d, 1 H), 8,98 (d, 1 H), 8,30 (t, 1 H), 6,27 (d, 1 H), 5,99 (m, 1 H), 5,27 (m, 1 H), 4,52 (m, 2 H), 4,38 (t, 1 H), 4,08 (m, 3 H), 3,92 (dd, 1 H). ¹³C RMN (300 MHz, D₂O): δ = 146,2, 143,5, 140,7, 133,7, 129,4, 117,3, 100,9, 88,4, 78,2, 70,8, 61,0, 43,5. MS: m/z (%): 295,1 (63, [M]⁺), 163,1 (98), 133,1 (5), 123,1 (88).

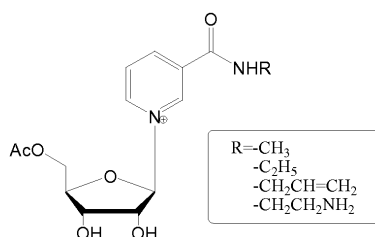
N-etanol β-nicotinamida ribósido (12): ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ = 9,55 (s, 1H), 9,24 (d, 1H), 8,93 (d, 1H), 8,24 (t, 1H), 6,22 (d, 1H), 5,99 (m, 1H), 4,48 (m, 2H), 4,33 (t, 1H), 4,02 (dd, 1H), 3,87 (dd, 1H), 3,77 (t, 2H), 3,58 (t, 2H), ¹³C RMN (300 MHz, D₂O): δ = 145,0, 142,7, 140,3, 128,2, 99,3, 88,0, 77,8, 69,6, 59,9, 48,5, 41,9. MS: m/z (%): 295,1 (63, [M]⁺), 163,1 (98), 133,1 (5), 123,1 (88).

N-dimetil β-NAR:



MS: m/z (%): 283,3 (13, [M]⁺), 151,2 (100).

Derivados de 5'-O-acetil N-alquil β-NAR (9', 10', 11', 12', 13')



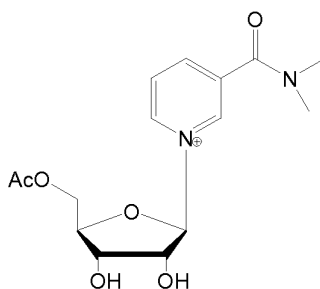
- 5 El compuesto 8 (25 mg, 0,61 μmol) se añadió a diversas amina (400 μM) en 0,9 ml de trifluoroetanol. Después de mezclar bien, la reacción se almacenó a 4°C durante la noche. Después de que la reacción se inactivara con la adición de HCl para hacer que el pH fuera <7, el disolvente orgánico se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en agua y se aisló con una columna de extracción desechable Octadecil-C18.

- 10 5'-O-acetil N-metil β-nicotínico ribósido (9'): 1H RMN (400 MHz, D₂O) δ = 9,42 (s, H₂, 1H), 9,23 (d, H₆, 1H), 8,98 (d, H₄, 1H), 8,33 (t, H₅, 1H), 6,30 (d, H_{1'}, 1H), 4,73 (t, H_{2'}, 1H), 4,55 (m, 3H), 4,40 (t, H_{3'}, 1H), 3,02 (s, 3H), 2,11 (s, 3H). MS: m/z (%): 311,1 (67, [M]⁺), 269,1 (13), 221,1 (13), 137,1 (100).

5'-O-acetil-N-etil-β-nicotínico ribósido (10'): MS: m/z (%): 325,1 (12, [M]⁺), 283,1 (7), 151,1 (77), 139,1 (22), 115,1 (68).

5'-O-acetil N-alil-β-nicotínico ribósido (11'): MS: m/z (%): 337,1 (18, [M]⁺), 163,0 (71), 138,0 (100), 124,0 (18)

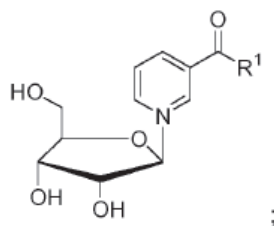
- 15 5'-O-etilendiamina N-metil-β-nicotínico ribósido (12'): MS: m/z (%): 340,2 (100, [M]⁺), 298,1 (44), 166,1 (100), 124,0 (82)



- 20 5'-O-acetil N-dimetil-β-nicotinamida ribósido (300 MHz, D₂O) δ = 9,23 (s, H₂, 1H), 9,19 (d, H₆, 1H), 8,78 (d, H₄, 1H), 8,32 (t, H₅, 1H), 6,28 (d, H_{1'}, 1H), 4,72 (m, H_{4'}, 1H), 4,55 (t, H_{2'}, 1H), 4,52 (d, H_{5'}, 2H), 4,40 (t, H_{3'}, 1H), 3,17 (s, 3H), 3,08 (s, 3H), 2,10 (s, 3H). MS: m/z (%): 325,1 (92, [M]⁺), 283,1 (2) 151,1 (100).

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar nicotinamida ribósido de Fórmula I:



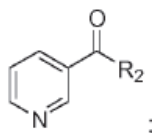
Fórmula I

5 en donde R¹ es amino, que comprende las etapas de:

(i) mezclar

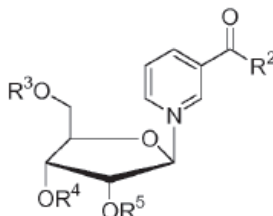
(a) tetraacilo o acil ribofuranosa sustituida y

(b) un compuesto de fórmula II:



Fórmula II

10 en donde, R² es alquiloxi, -OCH₂CH₂OH o ariloxi; para formar un compuesto de fórmula III:



Fórmula III

en donde, R² es alquiloxi, -OCH₂CH₂OH o ariloxi, y

15 R³, R⁴ y R⁵ son cada uno acilo; y

(ii) mezclar el compuesto de fórmula III con una disolución de amoníaco para formar nicotinamida ribósido.

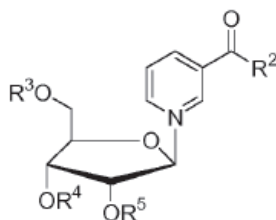
2. El método de la reivindicación 1, en el que R² es feniloxi.

3. El método de la reivindicación 2, en el que la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo.

20 4. El método de la reivindicación 2, en en el que la disolución de amoníaco en la etapa (ii) es una disolución de amoníaco en metanol.

5. Un método para preparar nicotinamida ribósido, que comprende:

(i) proporcionar un compuesto de Fórmula III:

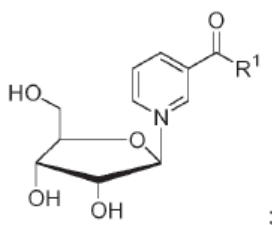


Fórmula III

en donde, R² es alquiloxi, -OCH₂CH₂OH o ariloxi, y

R³, R⁴ y R⁵ son cada uno acilo; y

- 5 (ii) mezclar el compuesto de fórmula III con una disolución de amoníaco para formar nicotinamida ribósido de fórmula I.



Fórmula I

en donde R¹ es amino.

- 10 6. El método de la reivindicación 5, en el que R² es feniloxi.
7. El método de la reivindicación 5, en el que la disolución de amoníaco de la etapa (ii) es una disolución de amoníaco en metanol.

Figura 1

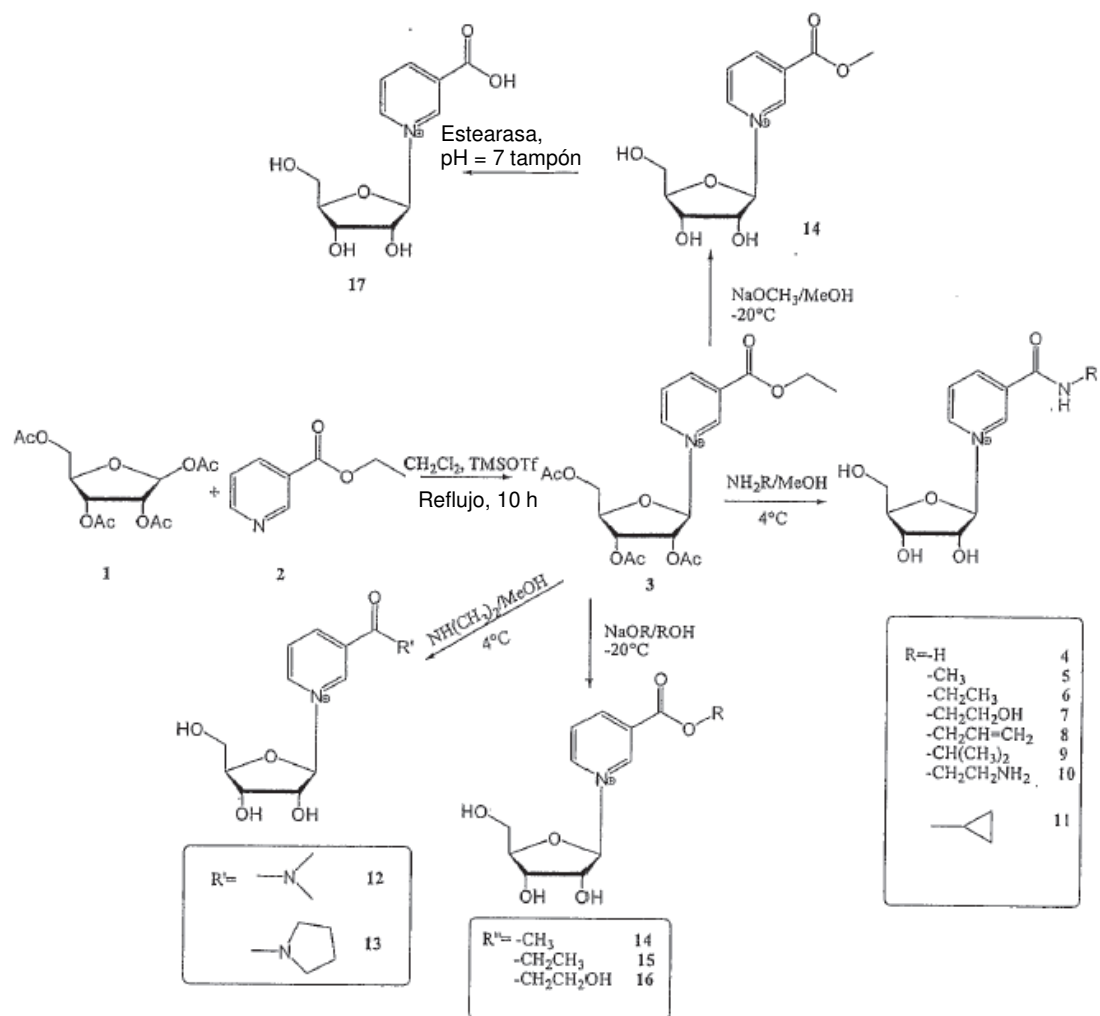


Figura 2

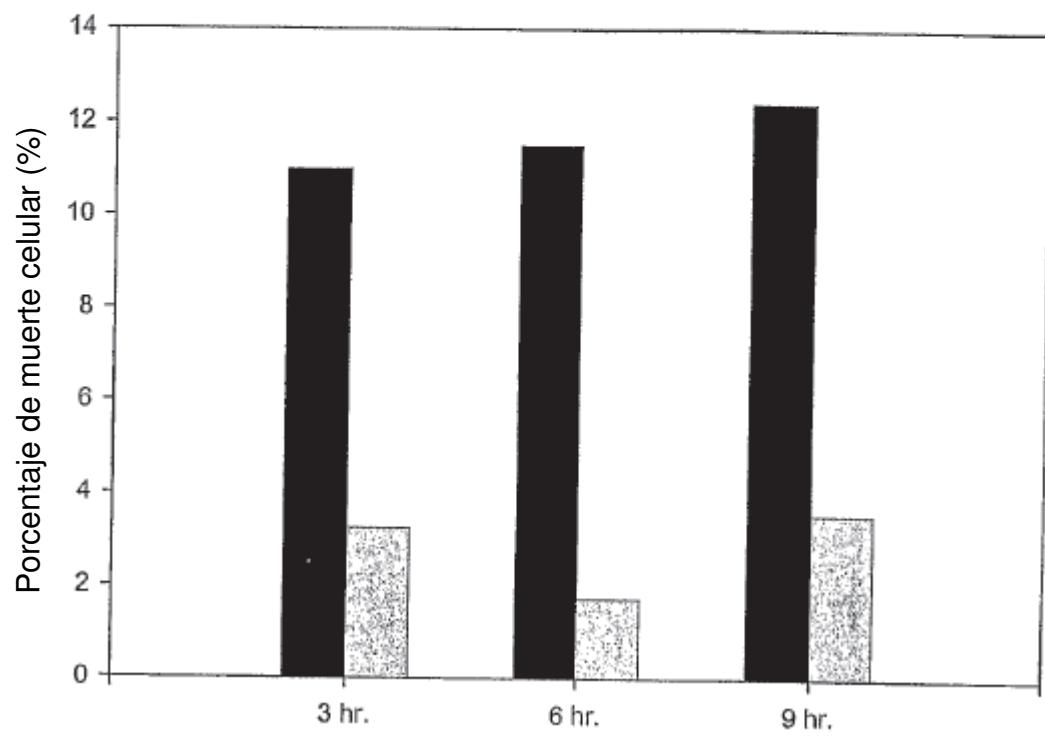


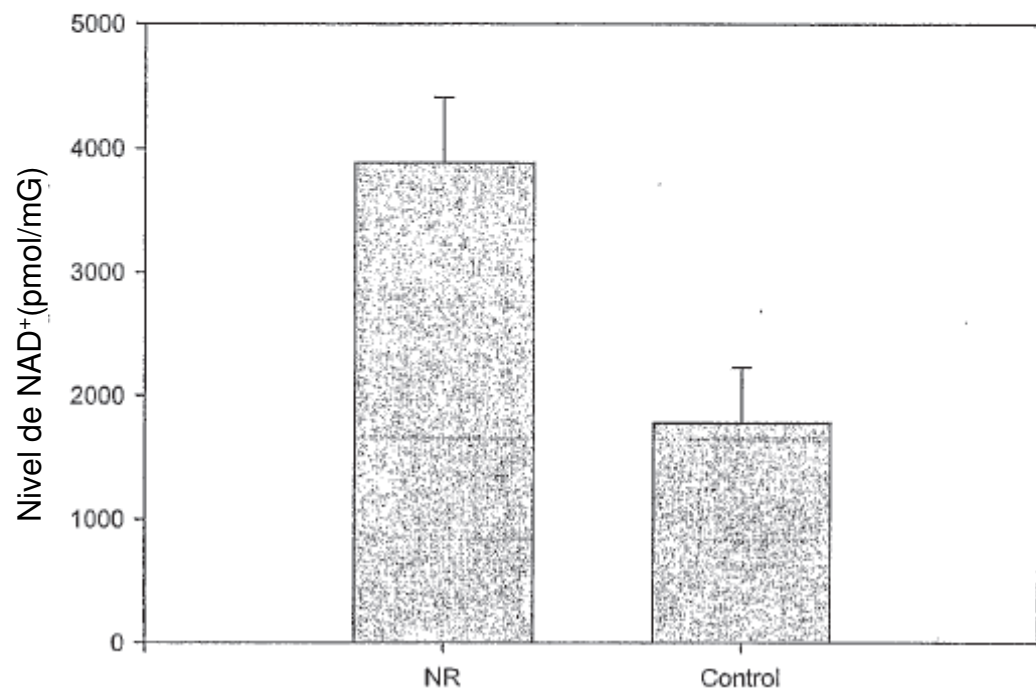
Figura 3

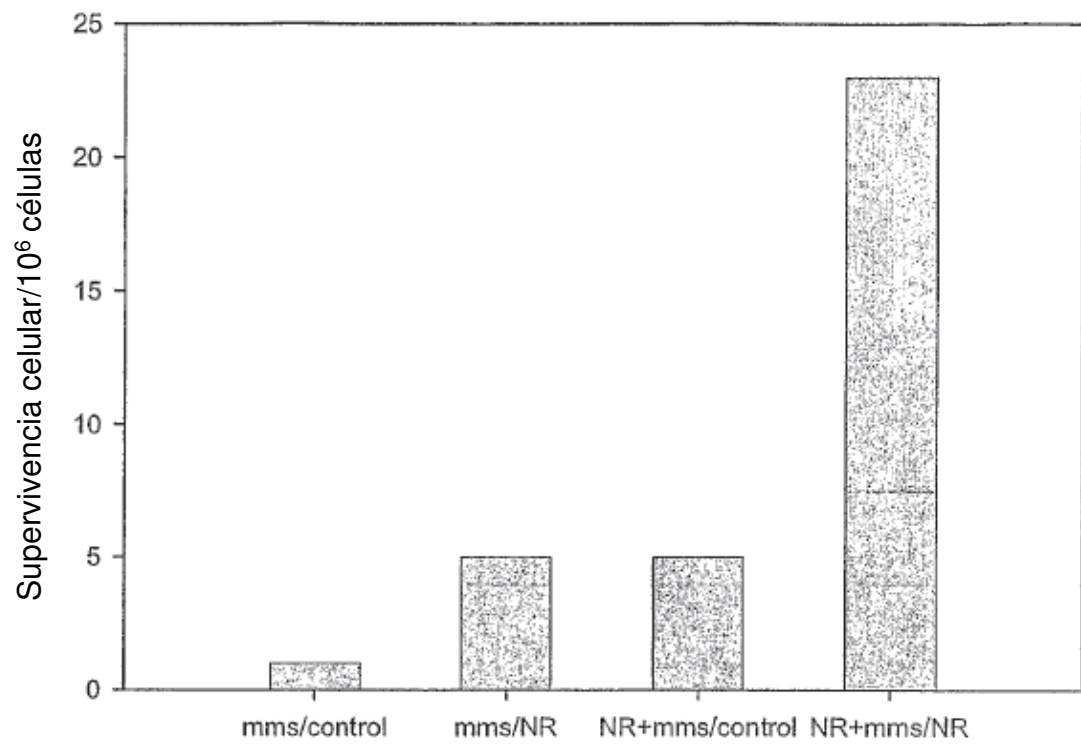
Figura 4

Figura 5

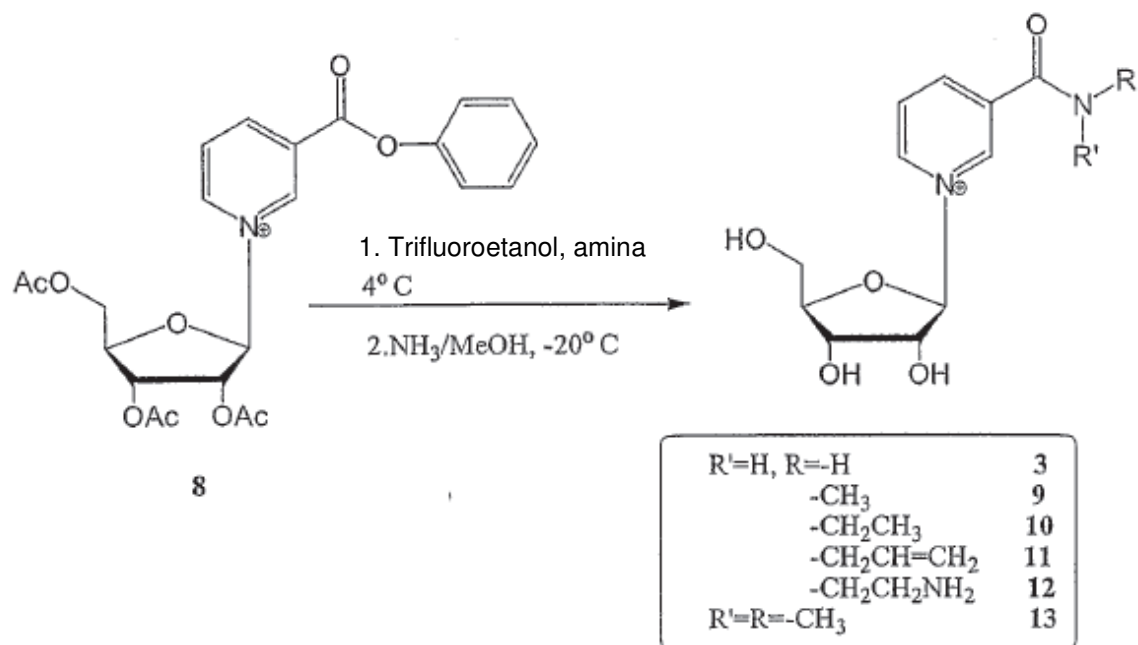
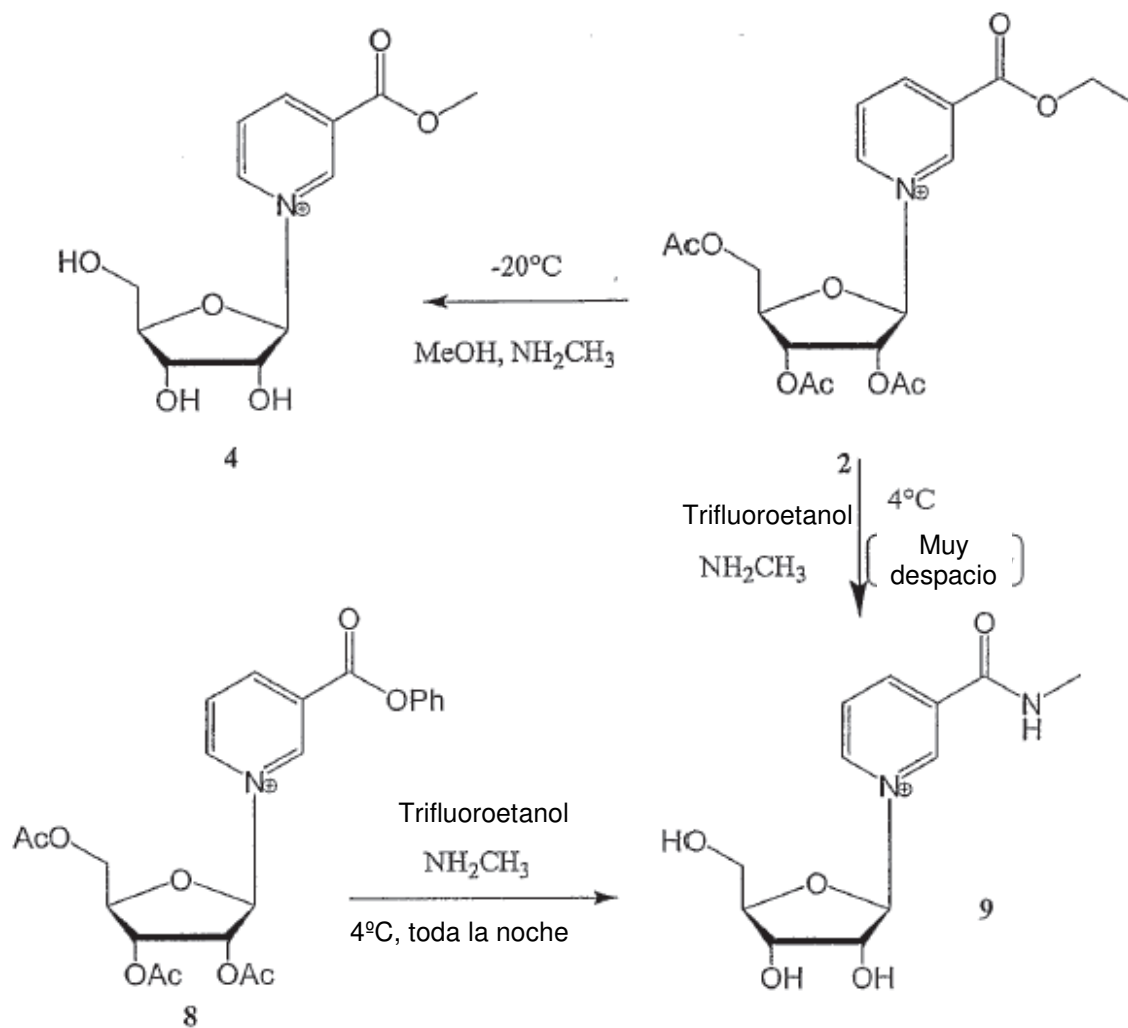


Figura 6



-20°C : reacción controlada cinéticamente
 4°C : reacción controlada termodinámicamente

Figura 7

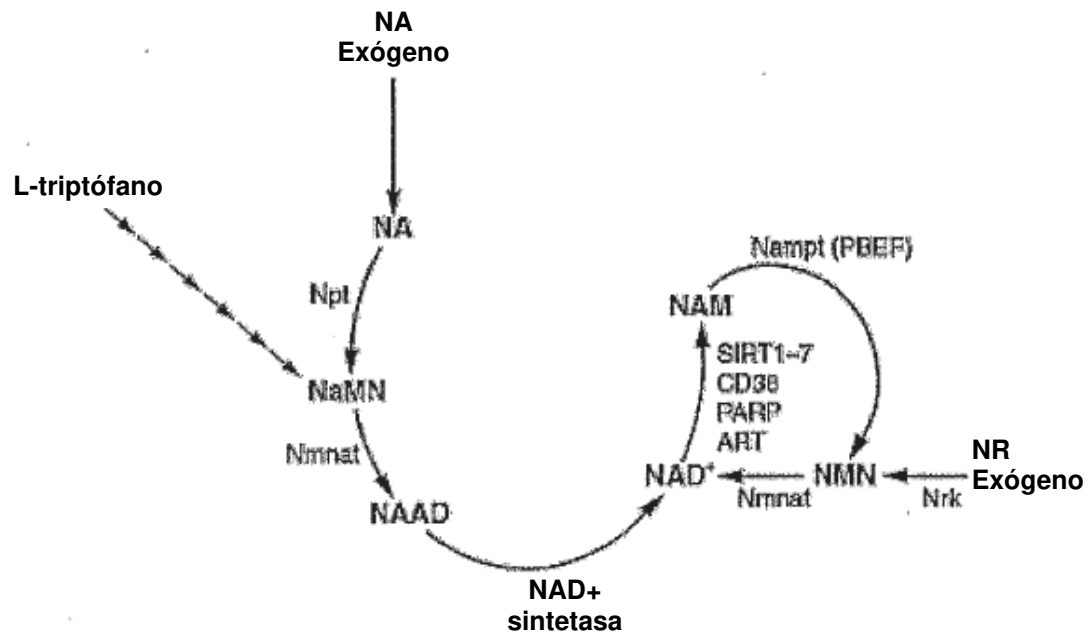


Figura 8

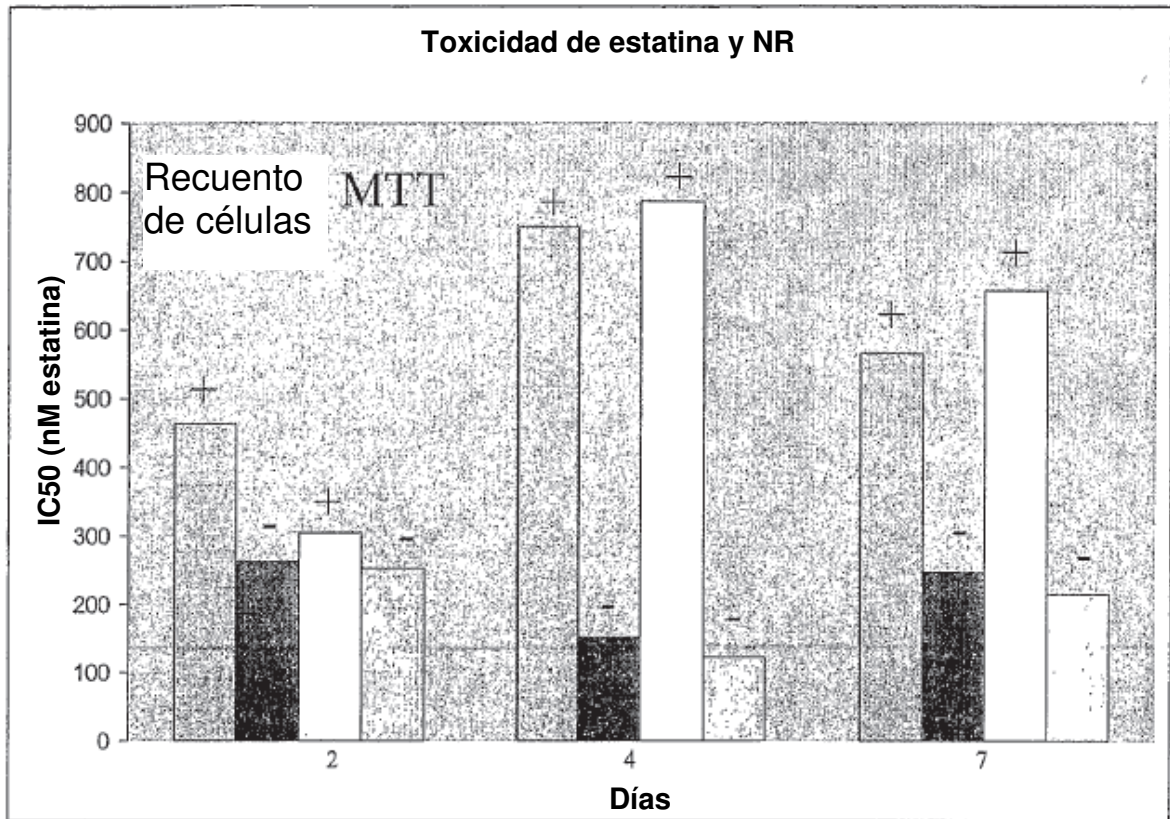


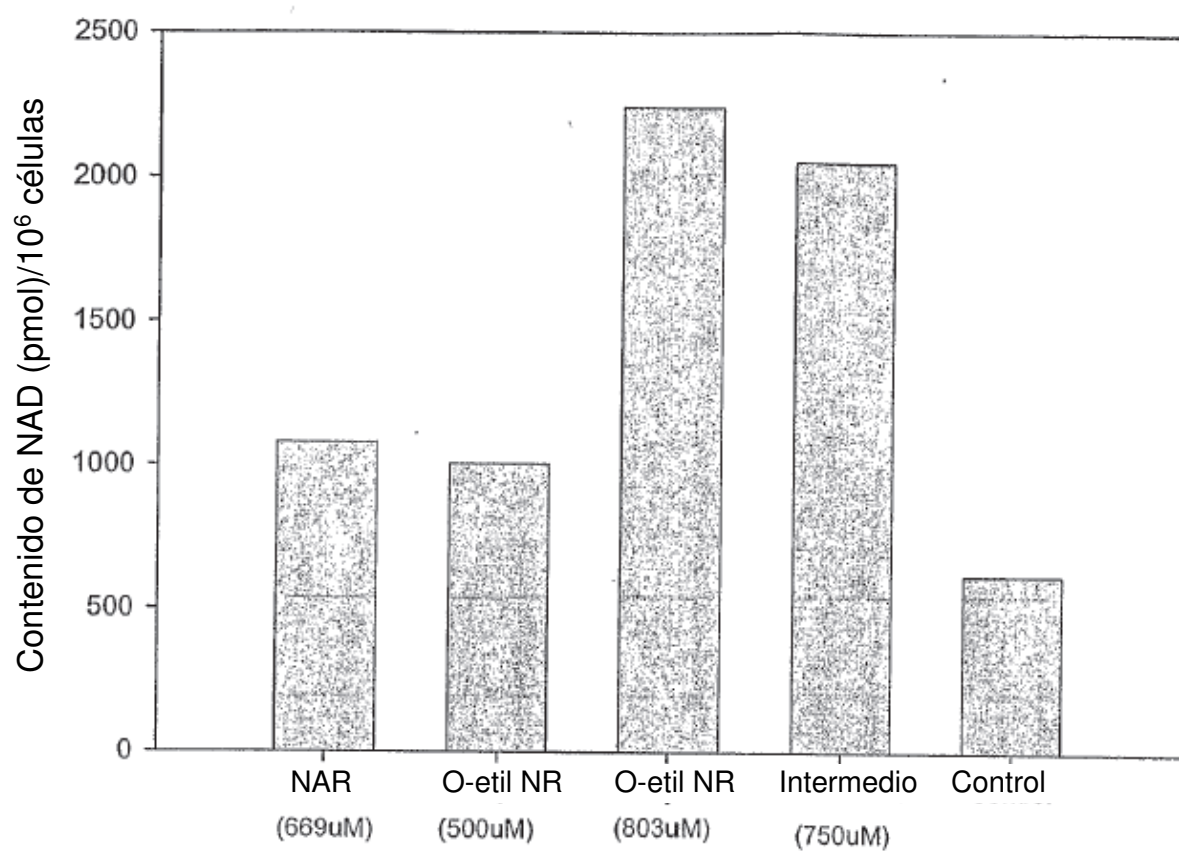
Figura 9

Figura 10

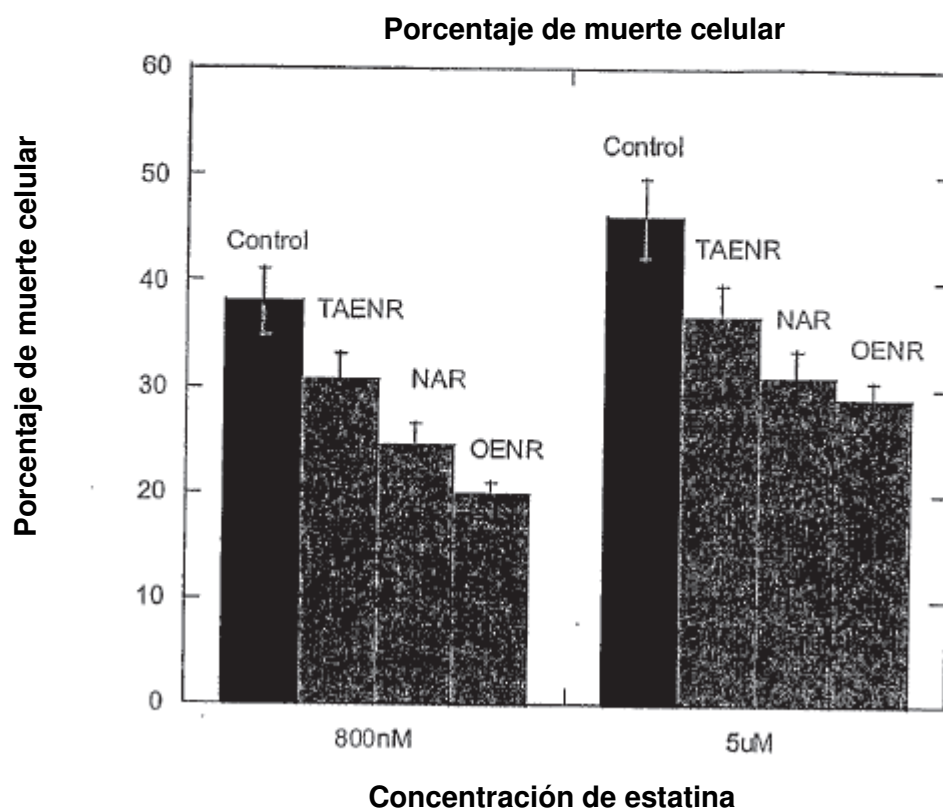


Figura 11

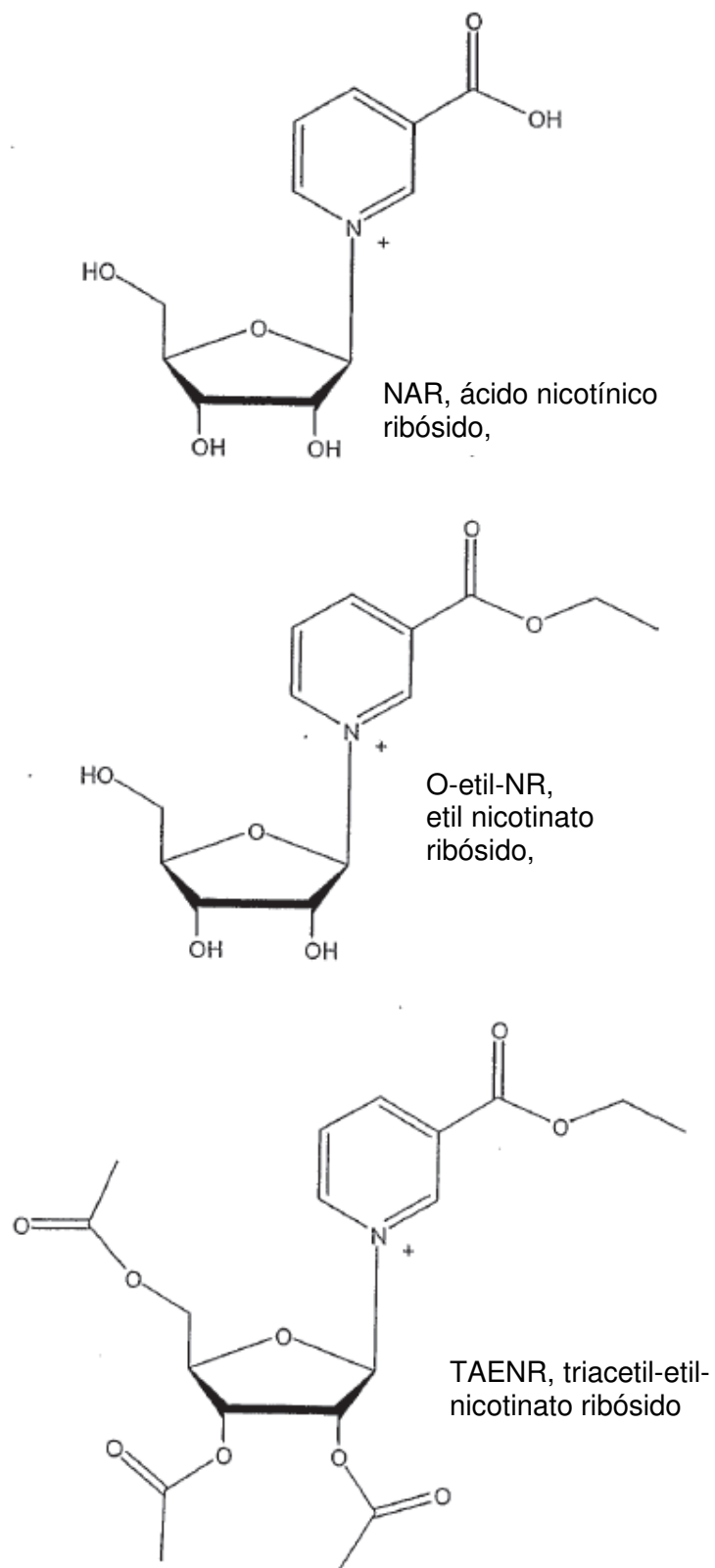


Figura 12

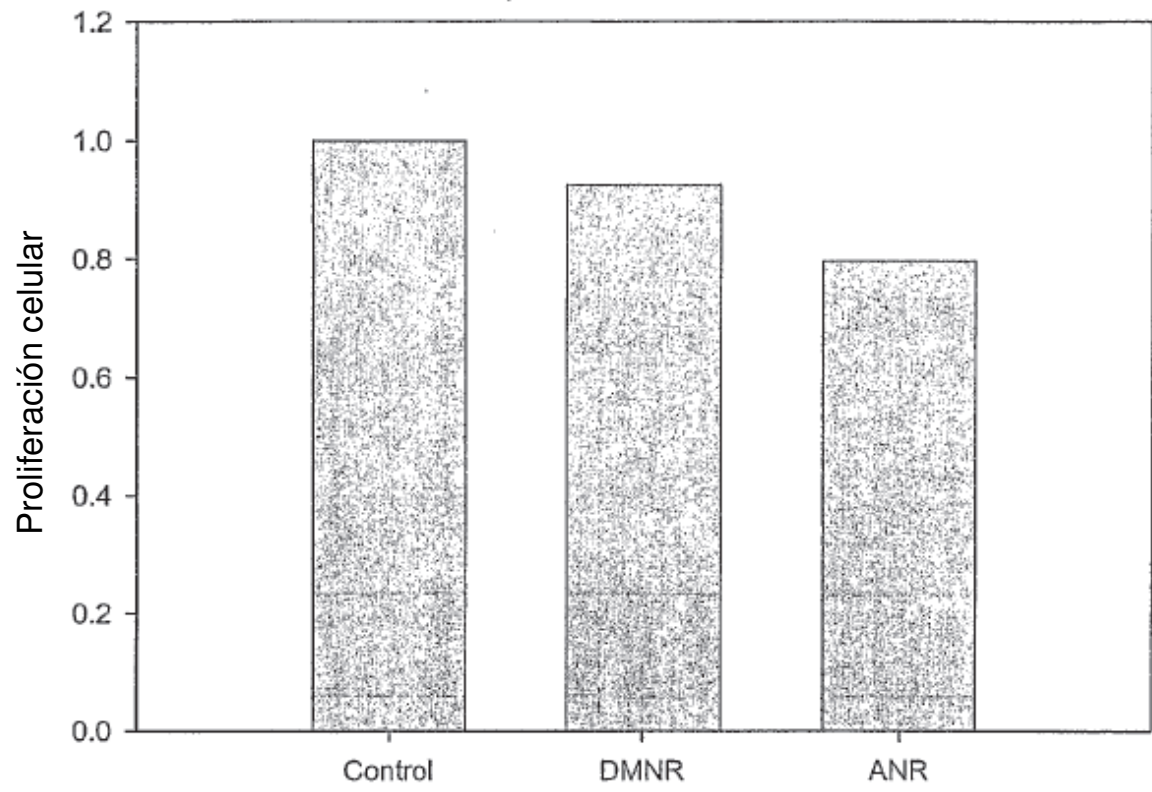
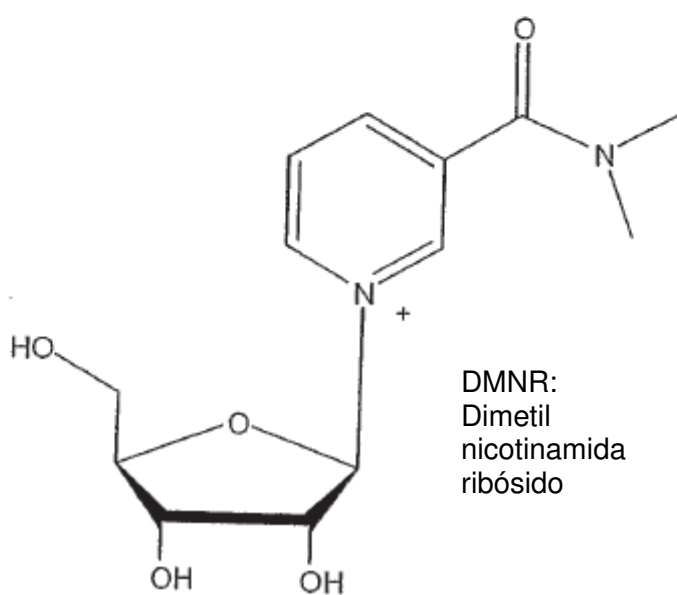
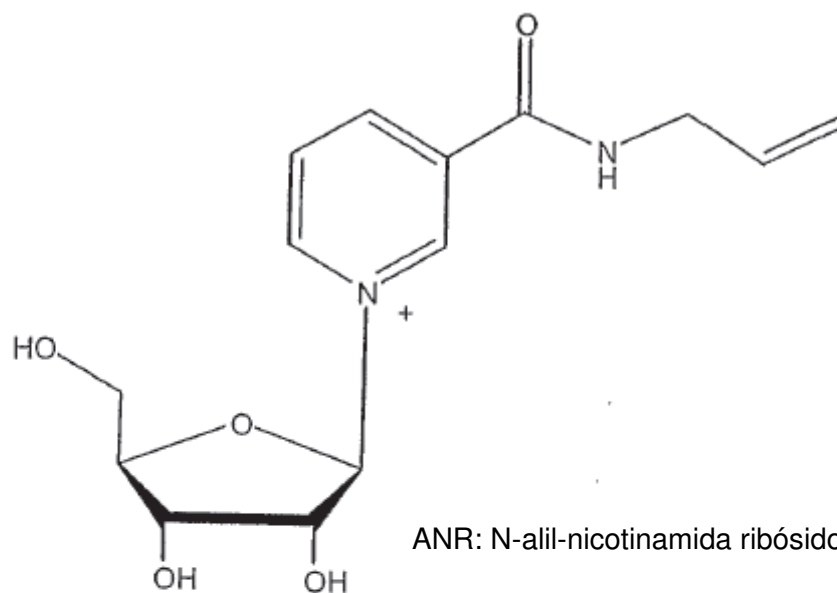


Figura 13



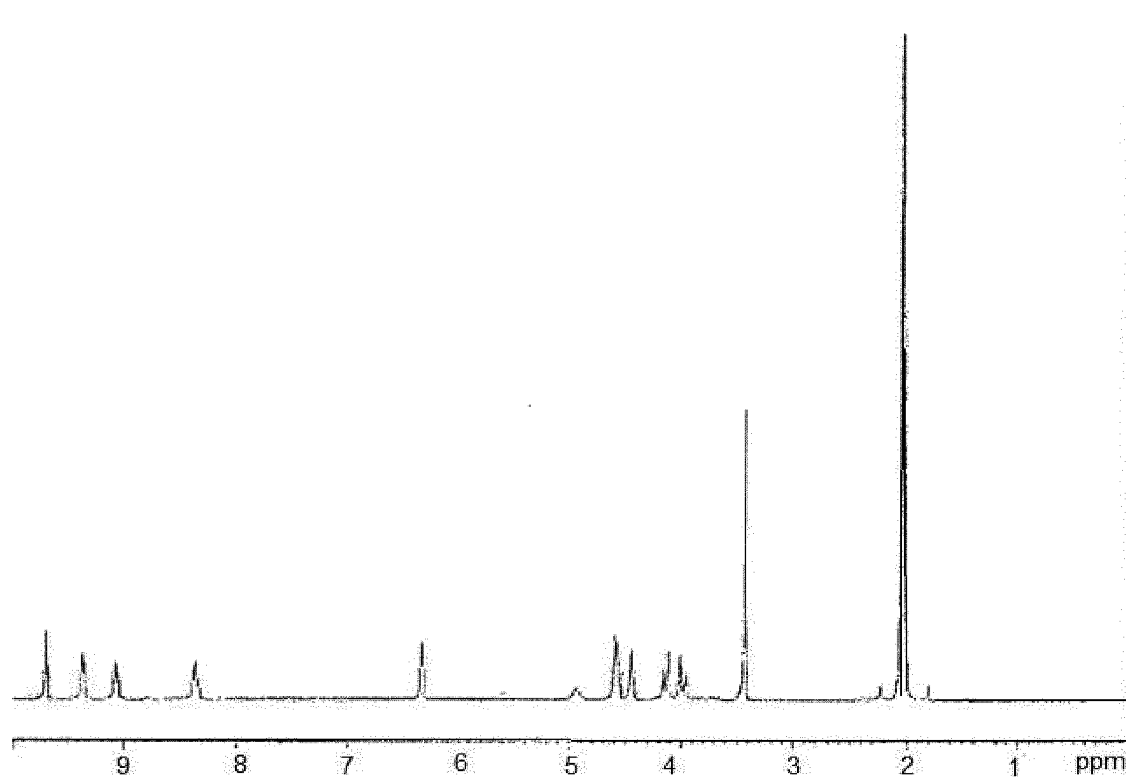


Figura 14

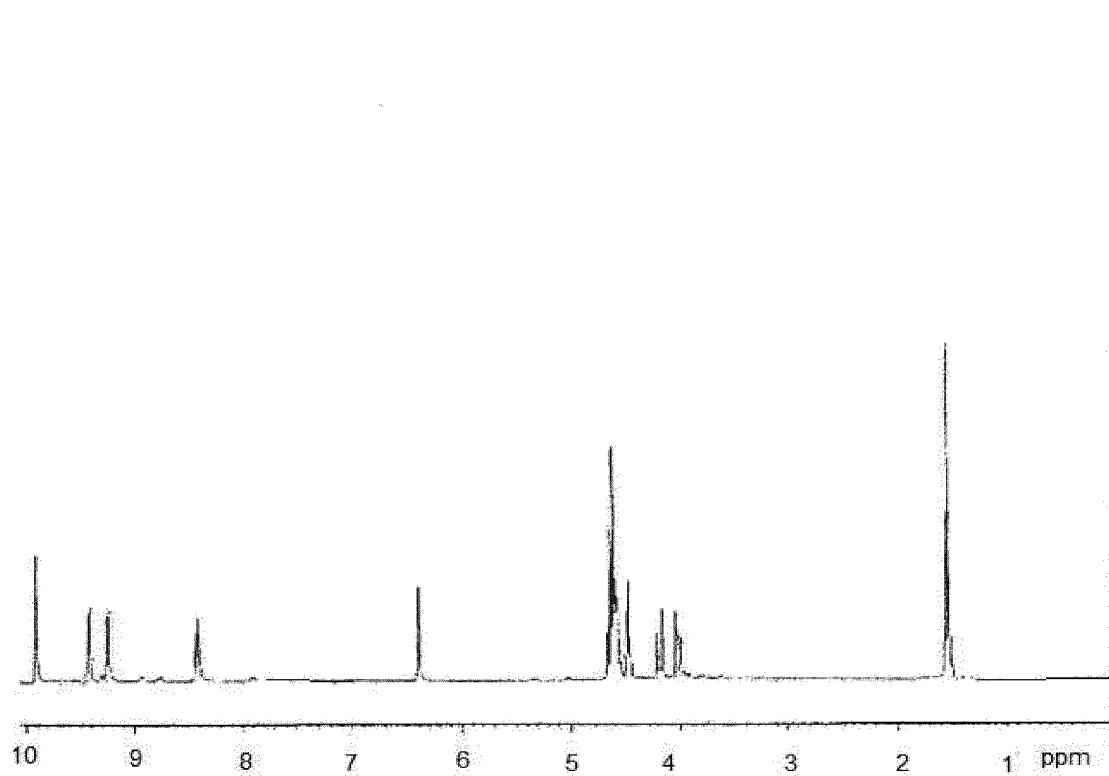


Figura 15

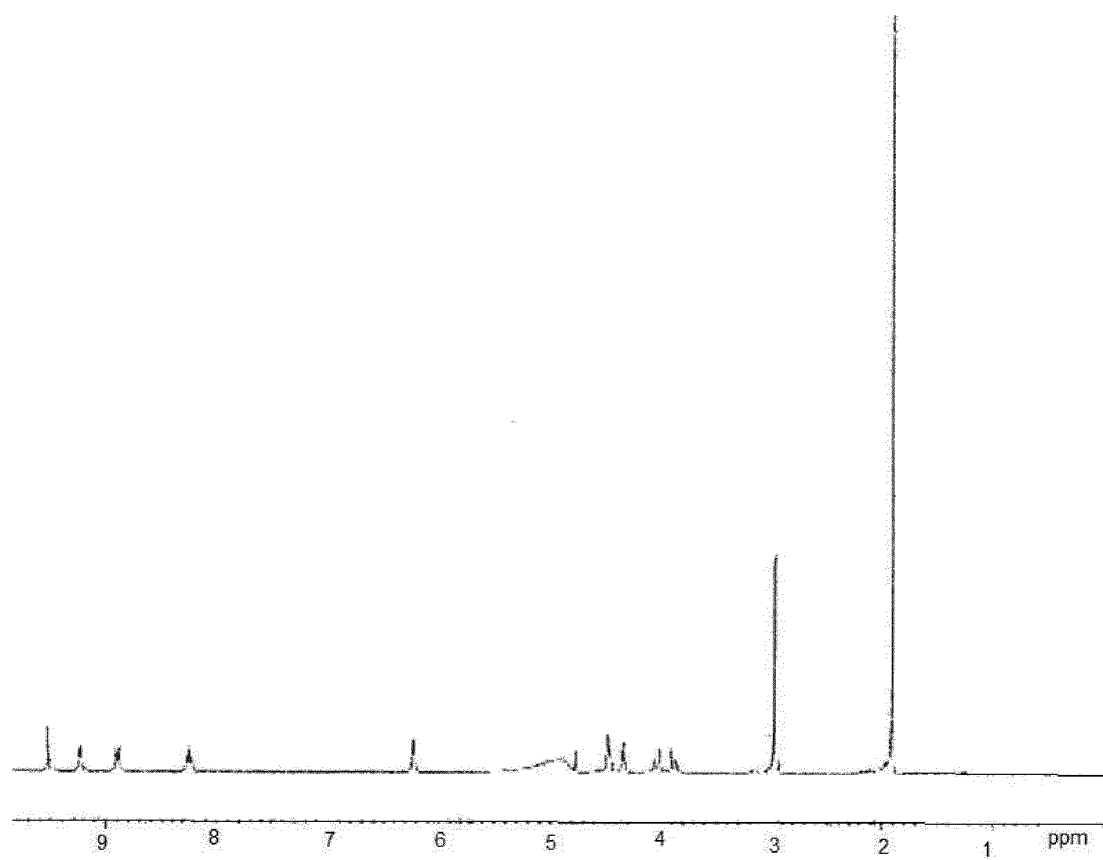


Figura 16

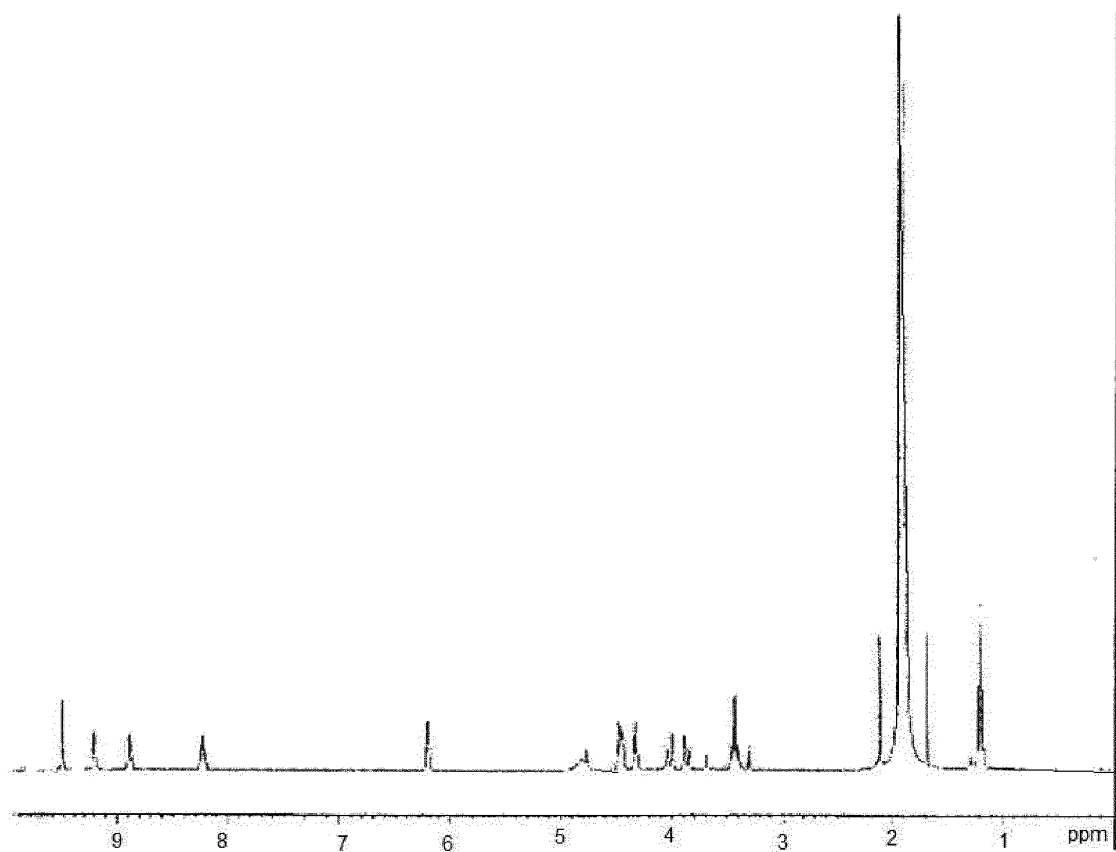


Figura 17

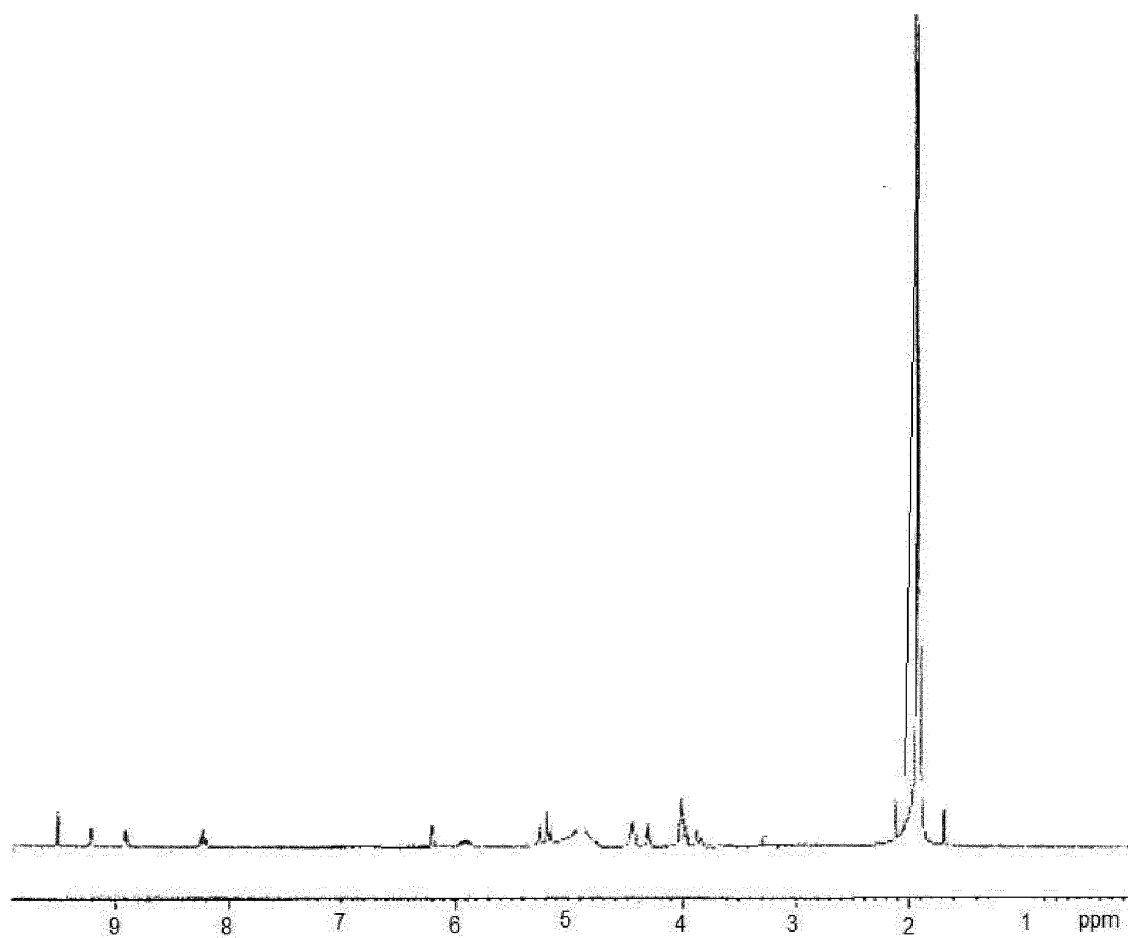


Figura 18

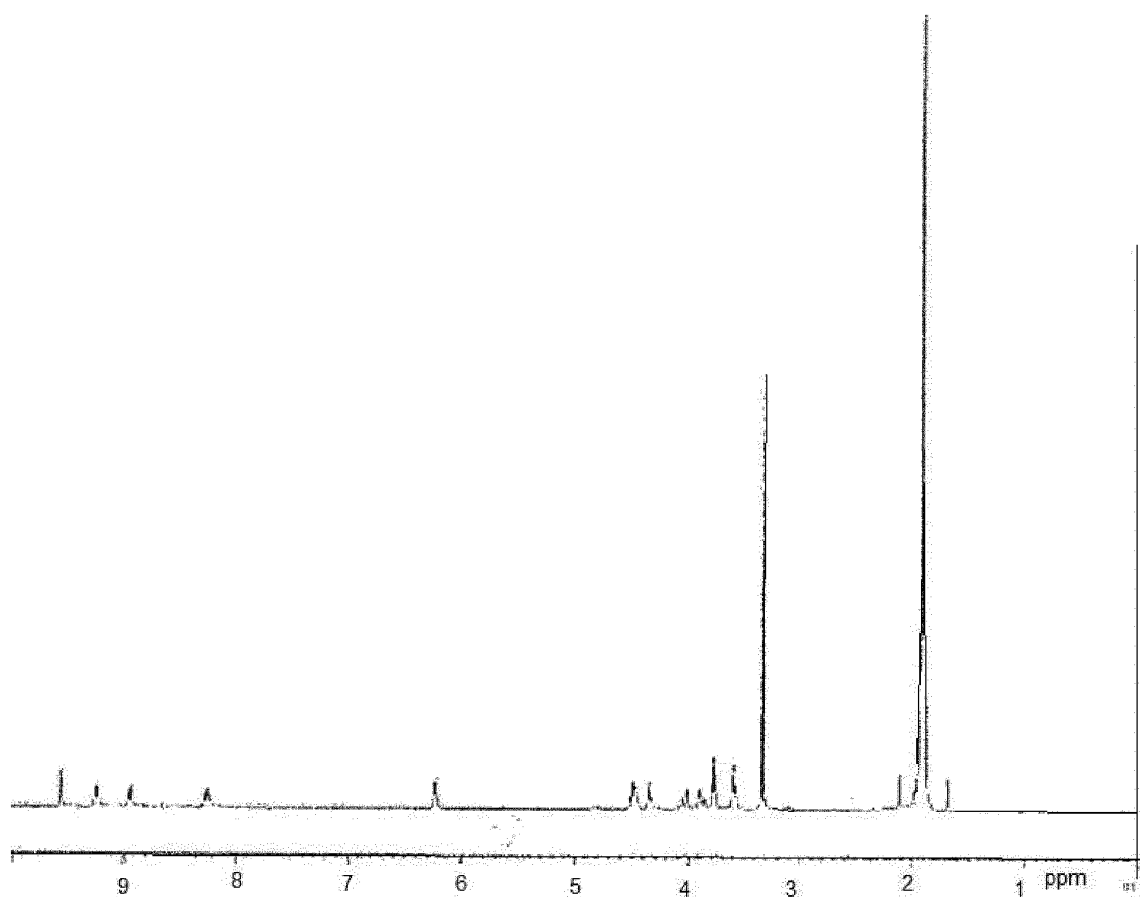


Figura 19

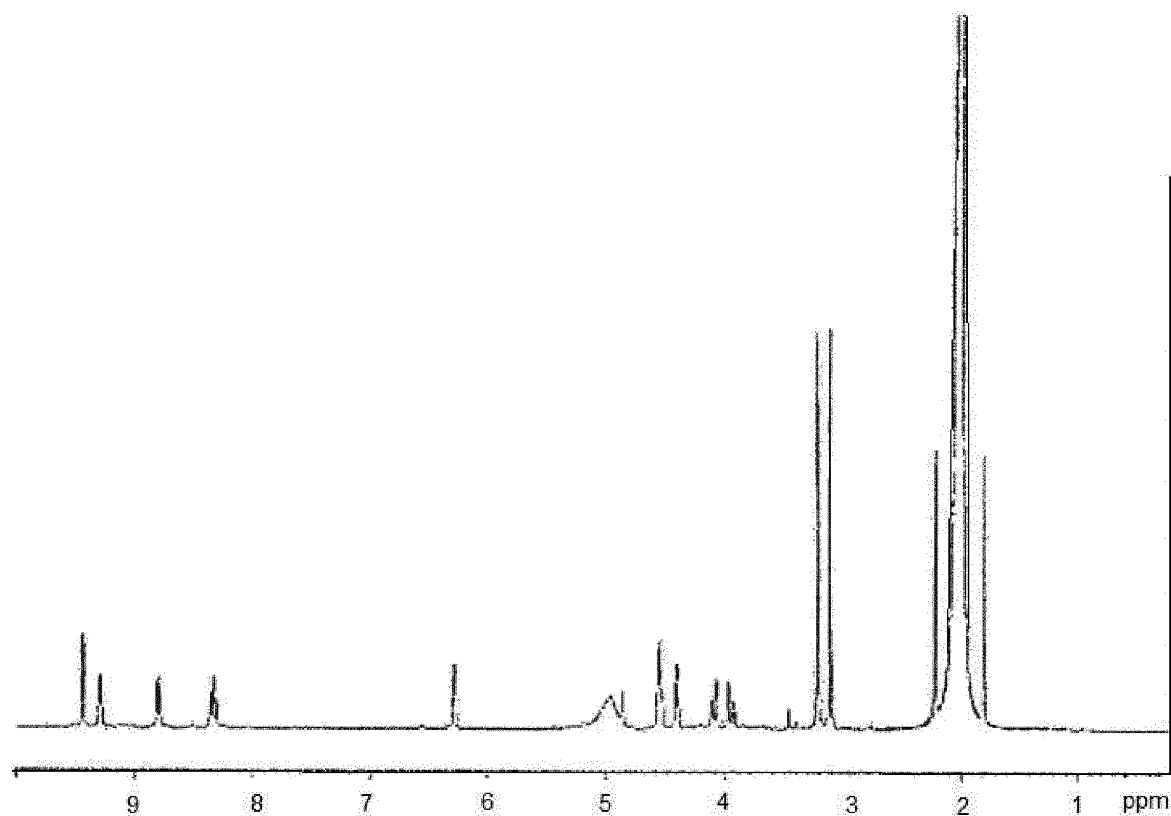


Figura 20