

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037104

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.02.05

(21) Номер заявки

201890817

(22) Дата подачи заявки

2016.09.30

(51) Int. Cl. A61K 31/7028 (2006.01)

A61K 31/7032 (2006.01)

A61K 31/7052 (2006.01)

C07H 19/048 (2006.01)

(54) КРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ ФОРМЫ β-НИКОТИНАМИДА МОНОНУКЛЕОТИДА

(31) 62/236,657

(32) 2015.10.02

(33) US

(43) 2018.10.31

(86) PCT/US2016/054776

(87) WO 2017/059249 2017.04.06

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

МЕТРО ИНТЕРНЭШНЛ БАЙОТЕК,

ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:

Карр Эндрю, Фернандес Филипп

(GB), Ливингстон Дэвид Дж. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

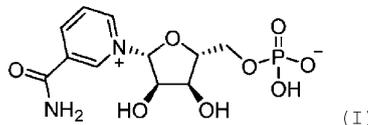
(56) Beta-Nicotinamide Mononucleotide, Item No. 16411, Cayman Chemical, Product information, <http://www.caymaneuropa.com/pdfs/16411.pdf>, 11 Mar 2014 (2014/03/11), whole document

I.A. MIKHAILOPULO ET. AL. "Synthesis of Glycosides of Nicotinamide and Nicotinamide Mononucleotide", Synthesis, Issue 05, p. 388-389, January 1981 (01-1981), DOI: 10.1055/s-1981-29462, 31 Jan 1981 (1981/01/31), p. 388 scheme compound 5d; p.389 left column last paragraph

Byrn S. et al. "Pharmaceutical solids: a strategic approach to regulatory consideration", Vol. 12, No. 7, p.945-954, ISSN:0724-8741 (1995), 01 Jan 1995 (1995/01/01), p. 945-954

Polymorphism in pharmaceutical solids", p. 7-8, p. 184-208, Marcel Dekker, first ed. ISBN:0-8247-0237-9 (1999), 01 Jan 1999 (1999/01/01), p. 7-8, p. 184-208

(57) Изобретение относится к кристаллическим формам β-никотинамида мононуклеотида, имеющим структуру формулы (I), способам их получения и их соответствующим фармацевтическим препаратам. Изобретение также относится к препаратам, подходящим длянутрицевтических, ветеринарных и сельскохозяйственных нужд



B1

037104

037104

B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По данной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки на патент США, серийный номер 62/236657, поданной 2 октября 2015 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

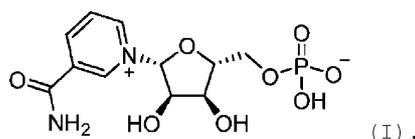
Уровень техники

β -Никотинамид мононуклеотид (NMN) недавно привлек внимание к его применению для лечения, облегчения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения и/или купирования связанных с возрастом дегенеративных изменений, таких как возрастное ожирение, возрастные повышения уровня липидов в крови, связанное с возрастом снижение чувствительности к инсулину, связанное с возрастом снижение функции памяти и возрастные изменения в функции глаз, такое как дегенерация желтого пятна.

Учитывая терапевтические преимущества, связанные с этим соединением, существует необходимость в улучшенных композициях NMN. Кроме того, существует потребность в улучшенных способах получения и разработки рецептур с β -никотинамидом мононуклеотидом.

Сущность изобретения

Один аспект изобретения относится к кристаллическому соединению, имеющему структуру формулы (I)



Другой аспект изобретения относится к способам получения кристаллических соединений формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату, пригодному для использования пациентом человеком, содержащему кристаллическое соединение формулы (I) и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты могут использоваться для лечения или профилактики состояния или заболевания, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты имеют достаточно низкую пирогенную активность, чтобы быть пригодными для внутривенного применения пациентом человеком.

Подробное описание фигур

На фиг. 1 показаны порошковые рентгенограммы форм 1 и 2 β -никотинамида мононуклеотида (NMN);

на фиг. 2 - термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии формы 1;

на фиг. 3 - термограмма дифференциальной сканирующей калориметрии формы 2;

на фиг. 4 - спектры ^1H ЯМР аморфного NMN, формы 1 NMN и формы 2 NMN после высушивания в вакууме. Как показано на спектре, форма 1 является по существу безводной, а форма 2 имеет примерно 1,1-1,2 молекул ДМСО на молекулу NMN;

на фиг. 5 - сравнение порошковых рентгенограмм аморфного NMN, аморфного NMN после хранения и формы 1 NMN;

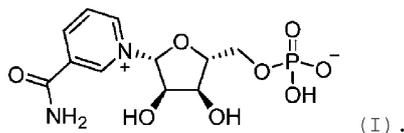
на фиг. 6 - изотерма динамической сорбции пара для аморфного NMN;

на фиг. 7 - изменение динамической сорбции пара на диаграмме массы для аморфного NMN. Когда образец аморфного NMN подвергается воздействию атмосферной влаги, образец проходит через фазы. На фиг. 7 показано изменение массы во времени. Аморфный образец гигроскопичен, пока он не расплывается и не начинает кристаллизоваться. Потеря веса менее чем за 1000 мин показывает событие кристаллизации. После кристаллизации вещество остается кристаллическим, сохраняя ту же порошковую рентгенограмму после двойного цикла, но все же демонстрирует способность обратного захвата массы (изменение до 9 мас./мас. %);

фиг. 8 представляет собой изображение, показывающее монокристаллы формы 1 NMN, наблюдаемые с помощью поляризованного микроскопа.

Подробное описание изобретения

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к кристаллическому соединению, имеющему структуру формулы (I)



В некоторых вариантах осуществления кристаллическое соединение формулы (I) не является сольватированным (например, кристаллическая решетка не содержит молекулы растворителя). В некоторых вариантах осуществления кристаллическое соединение формулы (I) является безводным или по существу безводным. В некоторых альтернативных вариантах осуществления кристаллическое соединение формулы (I) является сольватированным. В некоторых таких вариантах осуществления кристаллическое соеди-

нение формулы (I) является сольватом с диметилсульфоксидом (ДМСО).

Кристаллическое соединение, описанное в настоящем документе, может быть использовано при изготовлении лекарственного средства для лечения заболеваний или состояний, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению могут образовывать более одной кристаллической формы. В примере варианта осуществления кристаллическое соединение, имеющее структуру формулы (I), существует в виде "формы I" и "формы II", как подробно описано ниже. Эти различные формы в настоящем документе понимаются как "полиморфы".

В некоторых вариантах осуществления полиморф кристаллического соединения характеризуется порошковой рентгеновской дифракцией (XRD). θ представляет собой угол дифракции, измеренный в градусах. В некоторых вариантах осуществления дифрактометр, используемый при XRD, измеряет угол дифракции как двойной угол дифракции θ . Таким образом, в некоторых вариантах осуществления дифракционные картины, описанные в настоящем документе, относятся к интенсивности рентгеновского излучения, измеренной относительно угла 2θ .

В некоторых вариантах осуществления безводное кристаллическое соединение формулы (I) имеет значения 2θ , равные 20,03, 20,14, 21,83 и 25,73. В следующих вариантах осуществления безводное кристаллическое соединение имеет значения 2θ , равные 20,03, 20,14, 21,03, 21,83, 23,08, 23,39, 25,73 и 26,59. В еще следующих вариантах осуществления безводное кристаллическое соединение имеет значения 2θ , равные 7,70, 11,54, 12,64, 16,03, 18,99, 20,03, 20,14, 20,83, 21,03, 21,83, 23,08, 23,39, 25,48, 25,73, 26,59 и 29,78. И в еще следующих вариантах осуществления безводное кристаллическое соединение имеет значения 2θ , равные 7,70, 9,95, 11,54, 12,64, 16,03, 18,18, 18,99, 19,16, 19,44, 20,03, 20,14, 20,83, 21,03, 21,83, 22,44, 23,08, 23,39, 23,89, 24,08, 24,53, 24,68, 25,05, 25,48, 25,73, 26,08, 26,59, 27,33, 27,67, 29,78 и 29,92.

В некоторых вариантах осуществления безводное кристаллическое соединение формулы (I) имеет дифрактограмму, по существу, как показано на фиг. 1, отмеченную как форма 1.

В некоторых вариантах осуществления кристаллическое соединение формулы (I) не является сольватированным (например, кристаллическая решетка не содержит молекулы растворителя). В некоторых альтернативных вариантах осуществления кристаллическое соединение формулы (I) является сольватированным.

В некоторых вариантах осуществления кристаллический сольват с ДМСО соединения формулы (I) имеет значения 2θ , равные 8,29, 17,39, 19,54, 22,78 и 22,98. В следующих вариантах осуществления кристаллический сольват с ДМСО имеет значения 2θ , равные 8,29, 17,39, 19,54, 19,74, 20,98, 21,58, 22,03, 22,78, 22,98 и 25,53. В еще следующих вариантах осуществления кристаллический сольват с ДМСО имеет значения 2θ , равные 8,29, 16,10, 17,39, 19,24, 19,54, 19,74, 20,33, 20,78, 20,98, 21,18, 21,58, 22,03, 22,78, 22,98, 25,53, 28,48 и 29,48. В следующих вариантах осуществления кристаллический сольват с ДМСО имеет значения 2θ , равные 8,29, 13,12, 15,79, 16,10, 16,69, 17,39, 19,03, 19,24, 19,54, 19,74, 20,33, 20,78, 20,98, 21,18, 21,58, 22,03, 22,78, 22,98, 23,95, 24,14, 24,48, 24,64, 25,14, 25,53, 25,87, 26,89, 27,18, 27,67, 28,02, 28,13, 28,48, 28,98, 29,34, 29,48 и 29,92.

В некоторых вариантах осуществления кристаллический сольват с ДМСО соединения формулы (I) имеет дифрактограмму, по существу, как показано на фиг. 1, отмеченную как форма 2.

В некоторых вариантах осуществления кристаллический сольват с ДМСО соединения формулы (I) содержит примерно 1,0, примерно 1,1, или примерно 1,2 молекулы ДМСО на одну молекулу NMN.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей кристаллическое соединение формулы (I) и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция выбрана из таблеток, капсул и суспензий.

Термин "по существу чистый", как используется в настоящем документе, относится к кристаллическому полиморфу, который имеет чистоту более 90%, что означает, что он содержит менее 10% любого другого соединения, включая соответствующее аморфное соединение или альтернативный полиморф кристаллической соли. Предпочтительно, кристаллический полиморф имеет чистоту более 95% или даже чистоту более 98%.

Способы получения кристаллических форм NMN.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения кристаллического соединения, имеющего структуру формулы (I), который включает а) получение смеси соединения формулы (I) в растворителе и б) кристаллизацию соединения формулы (I) из смеси, содержащей соединение формулы (I).

В некоторых вариантах осуществления смесь, содержащая соединение формулы (I), представляет собой раствор. В некоторых вариантах осуществления смесь представляет собой взвесь или суспензию.

В некоторых вариантах осуществления кристаллическое соединение, полученное способами по изобретению, является безводным.

В некоторых вариантах осуществления кристаллическое соединение, полученное способами по изобретению, представляет собой сольват, например сольват с ДМСО.

В некоторых вариантах осуществления смесь, содержащая соединение формулы (I), представляет собой раствор, и стадия кристаллизации соединения из смеси включает доведение раствора до перенасыщения, чтобы вызвать выпадение в осадок соединения формулы (I) из раствора.

В некоторых вариантах осуществления доведение смеси, содержащей соединение формулы (I), до перенасыщения включает медленное добавление антирастворителя, такого как гептаны, гексаны, этанол или другая полярная или неполярная жидкость, смешиваемая с органическим растворителем, охлаждение раствора (с затравкой раствора или без нее), уменьшение объема раствора или какая-либо комбинация вышеуказанного. В некоторых вариантах осуществления доведение смеси, содержащей соединение формулы (I), до перенасыщения включает в себя добавление антирастворителя, охлаждение раствора до комнатной температуры или ниже, и уменьшение объема раствора, например, путем испарения растворителя из раствора. В некоторых вариантах осуществления охлаждение может быть пассивным (например, оставляя раствор стоять при температуре окружающей среды) или активным (например, охлаждение раствора на ледяной бане или в морозильной камере).

В некоторых вариантах осуществления способ получения дополнительно включает выделение кристаллов, например, путем фильтрации кристаллов, декантированием жидкости от кристаллов или любой другой подходящей способ разделения. В следующих вариантах осуществления способ получения также включает промывку кристаллов.

В следующих вариантах осуществления способ получения дополнительно включает стимулирование кристаллизации. Способ может также включать высушивание кристаллов, например, при пониженном давлении. В некоторых вариантах осуществления стимулирование осаждения или кристаллизации включает вторичное образование зародышей кристаллизации, где образование зародышей кристаллизации происходит в присутствии затравки кристаллов или взаимодействия с окружающей средой (стенки кристаллизатора, перемешивающие рабочие колеса, обработка ультразвуком и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления растворитель включает ацетонитрил, N,N-диметилацетамид (DMA), диметилформаид (DMF), диметилсульфоксид (DMSO), этанол, этилацетат, гептаны, гексаны, изопропилацетат, метанол, метилэтилкетон, N-метил-2-пирролидон (NMP), тетрагидрофуран, толуол, 2-пропанол, 1-бутанол, воду или какую-либо их комбинацию. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, например при получении формы 1, растворителем является метанол или вода. В других предпочтительных вариантах осуществления, например при получении формы 2, растворителем является диметилсульфоксид.

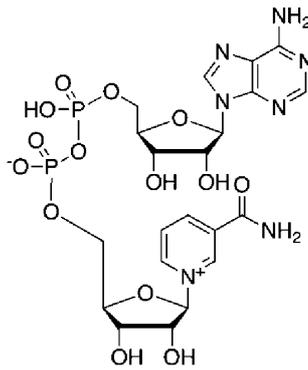
В некоторых вариантах осуществления промывание кристаллов включает промывку жидкостью, выбранной из антирастворителя, ацетонитрила, этанола, гептанов, гексанов, метанола, тетрагидрофурана, толуола, воды или их комбинации. Как используется в настоящем документе, термин "антирастворитель" означает растворитель, в котором кристаллы солей являются нерастворимыми, минимально растворимыми или частично растворимыми. На практике добавление антирастворителя к раствору, в котором растворены кристаллы солей, уменьшает растворимость кристаллов соли в растворе, тем самым стимулируя осаждение соли. В некоторых вариантах осуществления кристаллы промывают комбинацией антирастворителя и органического растворителя. В некоторых вариантах осуществления антирастворителем является вода, тогда как в других вариантах им является алкановый растворитель, такой как гексан или пентан, или ароматический углеводородный растворитель, такой как бензол, толуол или ксилол. В некоторых вариантах осуществления антирастворитель представляет собой метанол.

В некоторых вариантах осуществления промывка кристаллов включает промывку кристаллического соединения формулы (I) растворителем или смесью одного или нескольких растворителей, которые описаны выше. В некоторых вариантах осуществления растворитель или смесь растворителей перед промывкой охлаждают.

В некоторых вариантах осуществления способы получения кристаллических форм NMN используются для удаления одной или нескольких примесей из NMN. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе способы кристаллизации используются для очистки NMN, например в качестве конечной стадии очистки при получении соединения.

Применение кристаллических форм NMN.

NMN образуется из никотинамида в пути биосинтеза NAD, реакцией, катализируемой Nampt. NMN далее превращается в NAD в пути биосинтеза NAD, реакцией, которая катализируется Nmnat. "Никотинамид аденин динуклеотид" (NAD), который соответствует следующей структуре



образуется при преобразовании никотинамида в NMN, которое катализируется Nampt, и при последующем преобразовании NMN в NAD, которое катализируется Nmnat. У млекопитающих функциональный гомолог дрожжей PNC1 представляет собой NAMPT, который также катализирует первую стадию в реутилизации NAD. NAMPT катализирует образование никотинамида мононуклеотида (NMN) из NAM, который затем преобразуется в NAD с помощью NMNAT1, NMNAT2 и NMNAT3. Никотинамид рибозид, предшественник NAD, входит в реутилизационный путь после превращения в NMN с помощью ферментов никотинамид рибозид киназ (NRK).

Таким образом, на болезни, расстройства и состояния, на которые влияет увеличение уровней NAD, также влияет количество предшественника NMN, доступного для биосинтеза NAD, и, таким образом, их можно лечить путем введения соединений и композиций NMN, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления NMN работает через путь никотинамид мононуклеотид аденилаттрансферазы (Nmnat1) или другие пути биосинтеза NAD⁺, которые имеют питательную и/или терапевтическую ценность для улучшения профилей липидов в плазме, профилактики инсульта и/или продления жизни и хорошего самочувствия. Другие варианты осуществления относятся к способу профилактики или лечения заболевания или состояния, связанного с путем никотинамид мононуклеотид аденилаттрансферазы (Nmnat1) или другими путями биосинтеза NAD⁺, путем введения композиции, содержащей NMN. Заболевания или состояния, которые обычно имеют измененные уровни NAD⁺ или его предшественников, которые могут быть предотвращены или пройти лечение путем дополнения диеты или режима терапевтического лечения с помощью NMN и/или NAD⁺, включают, но не ограничиваются ими, расстройства липидного обмена (например, дислипидемия, гиперхолестеринемия или гиперлипидемия), инсульт, диабет I и II типа, сердечно-сосудистые заболевания и другие физические проблемы, связанные с ожирением.

Нейродегенеративные заболевания.

При нейродегенеративных заболеваниях и периферических невропатиях часто возникает дегенерация аксонов. Дегенерация перерезанных аксонов задерживается у мышей с медленной валлеровской дегенерацией (Wlds) с избыточной экспрессией слитого белка с синтетическим ферментом никотинамид аденидинуклеотидом (NAD⁺), никотинамид мононуклеотид аденилаттрансферазой (Nmnat1). Как Wld(s), так и Nmnat1 сами по себе являются эффективными в предотвращении дегенерации аксонов в культурах нейронов.

Снижение уровня NAD⁺ в поврежденных, больных или дегенерирующих нервных клетках и предотвращение этого снижения NAD⁺ эффективно защищает нервные клетки от гибели клеток. См. Araki & Milbrandt "Increased nuclear NAD⁺ biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration" Science. 2004 Aug. 13; 305(5686):1010-3, и Wang et al., "A local mechanism mediates NAD-dependent protection of axon degeneration" J. Cell Biol. 170 (3):349-55 (2005), полностью включенные в настоящее описание посредством ссылки. Поскольку NMN способен увеличивать внутриклеточные уровни NAD⁺, NMN может быть использован в качестве терапевтической или пищевой добавки для лечения травм, заболеваний и расстройств, влияющих на центральную нервную систему и периферическую нервную систему, включая, но этим не ограничиваясь, травму или повреждение нервных клеток, заболевания или состояния, которые вредят нейронным клеткам, и нейродегенеративные заболевания или синдромы. Корреляция усиленного синтеза NAD⁺ с положительными результатами при нервных повреждениях и заболеваниях или состояниях обсуждалась, например, Stein et al., "Expression of Nampt in Hippocampal и Cortical Excitatory Neurons Is Critical for Cognitive Function" The Journal of Neuroscience 2014 34(17):5800-5815; и Stein et al., "Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging" EMBO J. 2014 33:1321-1340.

Ниже описаны некоторые нейродегенеративные заболевания, нейродегенеративные синдромы, заболевания и состояния, которые негативно действуют на нервные клетки или иным образом вызывают повреждение нейронных клеток.

Эссенциальный тремор (ЭТ) является наиболее распространенным расстройством движения. Он представляет собой синдром, характеризующийся медленно прогрессирующим постуральным и/или ки-

нетическим тремором, обычно поражающим обе верхние конечности.

Болезнь Паркинсона (PD) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, связанное с потерей nigrostriарных дофаминергических нейронов.

Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее распространенной формой деменции. Она представляет собой прогрессирующую дегенеративную болезнь головного мозга, сильно связанную с преклонным возрастом. Со временем люди с этим заболеванием теряют способность ясно мыслить и рассуждать, судить о ситуациях, решать проблемы, концентрироваться, запоминать полезную информацию, заботиться о себе и даже говорить. Ряд нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, оказывают биологическое воздействие на мозг. Предпочтительным является, чтобы описанные в настоящем документе соединения на основе никотинамид мононуклеотида были способны проникать сквозь гематоэнцефалический барьер (BBB).

Болезнь Хантингтона (HD) представляет собой неизлечимое, аутомно-доминантное наследственное расстройство у взрослых, связанное с потерей клеток в специфическом подмножестве нейронов в базальных ганглиях и коре.

Атаксия определяется как неспособность поддерживать нормальную осанку и плавность движения. Атаксию могут сопровождать неврологические симптомы и признаки, такие как судороги и нарушения движения (например, дистония, хорей).

Кататония представляет собой состояние явной невосприимчивости к внешним стимулам у человека, который находится в состоянии бодрствования.

Эпилепсия определяется как хроническое состояние, характеризующееся спонтанными, рецидивирующими судорогами; судорога определяется как клиническое событие, связанное с переходным гиперсинхронным нейронным разрядом.

Злокачественный нейролептический синдром (NMS) относится к сочетанию гипертермии, ригидности и автономной дисрегуляции, которые могут возникать как серьезное осложнение после применения антипсихотических препаратов.

Хорей представляет собой непроизвольное аномальное движение, характеризующееся резким, быстрым, неритмичным, неповторяющимся движением конечности, часто связанным с хаотическими лицевыми гримасами. Chorea gravidarum (CG) является термином, обозначающим хорей, возникающую во время беременности.

Клинические характеристики кортико-базальной ганглиозной дегенерации (CBGD) включают прогрессирующую деменцию, паркинсонизм и апраксию конечностей. Дисфункция путей центральной или периферической нервной системы может вызывать вегетативную дисфункцию.

Дистония представляет собой синдром устойчивых мышечных сокращений, обычно вызывающий скручивание и повторяющиеся движения или ненормальные позы. Писчий спазм представляет собой вид специализированной фокальной дистонии.

Умственная отсталость (MR) представляет собой состояние, при котором интеллектуальные возможности существенно ограничены. Расстройство развития описывает состояние, которое ограничивает способность человека выполнять действия и роли, как ожидается, в определенной социальной среде. Часто MR и расстройство развития присутствуют одновременно в результате повреждения головного мозга.

Нейроанатоцитоз представляет собой прогрессирующее неврологическое заболевание, характеризующееся нарушениями движения, изменениями личности, ухудшением познавательной способности, аксональной невропатией и судорогами. В какой-то момент во время болезни у большинства пациентов имеется акантоцитоз, определяемый по мазку периферической крови.

Болезнь Пелизья-Мерцбахера (БПМ) и X-связанная спастическая параплегия типа 2 (SPG2) находятся на противоположных концах клинического спектра X-связанных заболеваний, вызванных мутациями одного и того же гена, гена протеолипидного белка 1 (PLP1), и приводят к дефектам миелинизации центральной нервной системы (ЦНС). Клинические признаки обычно включают в себя некоторую комбинацию нистагма, стридора, спастического квадрипареза, гипотонии, когнитивных нарушений, атаксии, тремора и диффузной лейкоэнцефалопатии по данным МРТ-сканирования.

Прогрессирующий супрануклеарный паралич (PSP), также известный как синдром Стиэла-Ричардсона-Ольпековского, является нейродегенеративным заболеванием, которое влияет на познавательную способность, движения глаз и осанку.

Стрионигральная дегенерация (SND) является нейродегенеративным заболеванием, которое представляет собой проявление мультисистемной атрофии (MSA). Другими проявлениями являются синдром Шей-Драгера (например, преобладает вегетативная недостаточность) и спорадическая оливопонтocerebellарная дегенерация (sOPCA, преобладает мозжечок).

Ишемический инсульт происходит из-за потери кровоснабжения в части мозга, инициируя ишемический каскад. Мозговая ткань перестает функционировать, если ее лишают кислорода более чем на 60-90 с, и через несколько часов будет страдать от необратимой травмы, которая может привести к гибели ткани, т.е. к инфаркту. Атеросклероз может нарушить кровоснабжение, сужая просвет кровеносных сосудов, приводя к уменьшению кровотока, вызывая образование сгустков крови в сосуде или высвобождая потоки маленьких эмбол, образующихся при распаде атеросклеротических бляшек. Эмболический

инфаркт возникает, когда эмболы образуются в других участках системы кровообращения, как правило, в сердце, как результат фибрилляции предсердий или в сонных артериях. Они отрываются, проникают в кровообращение мозга, затем осаждаются в кровеносных сосудах мозга и закупоривают их.

Состояние коллатерального кровообращения в области ткани головного мозга, пораженной ишемией, определяет диапазон тяжести. Таким образом, часть ткани может немедленно погибнуть, в то время как другие части могут быть повреждены и возможно могут выздороветь. Ишемическая область, где может восстанавливаться ткань, называется ишемической полутенью.

По мере того как кислород или глюкоза истощаются в ишемической ткани головного мозга, продукция высокоэнергетических фосфатных соединений, таких как аденинтрифосфат (АТФ), ослабевает, приводя к сбою энергетически зависимых процессов, необходимых для выживания тканевых клеток. Это приводит к ряду взаимосвязанных событий, результатом чего являются повреждение и гибель клеток. К ним относятся разрушение митохондрий, которое может привести к дальнейшему энергетическому истощению и может вызвать гибель клеток вследствие апоптоза. Другие процессы включают потерю функции мембранного ионного насоса, приводящую к дисбалансу электролитов в клетках мозга. Существует также высвобождение возбуждающих нейротрансмиттеров, которые оказывают токсическое действие в чрезмерных концентрациях.

Повреждение спинного мозга или миелопатия является нарушением спинного мозга, которое приводит к потере чувствительности и подвижности. Двумя распространенными типами травмы спинного мозга являются: травма: автомобильные аварии, падения, выстрелы, несчастные случаи на воде и т.д., и заболевания: полиомиелит, расщепление позвоночника, опухоли, атаксия Фридрейха и т.д. Важно отметить, что спинной мозг не должен быть полностью разорван для потери деятельности. Фактически, спинной мозг остается цельным в большинстве случаев повреждения спинного мозга.

Травматическое повреждение головного мозга (ТВИ), также называемое внутричерепной травмой или просто травмой головы, возникает, когда внезапная травма вызывает повреждение головного мозга. ТВИ может быть результатом закрытой травмы головы или проникающей травмы головы и является одним из двух разновидностей приобретенного повреждения головного мозга (АВИ). Другой разновидностью является нетравматическое поражение головного мозга (например, инсульт, менингит, аноксия). Части мозга, которые могут быть повреждены, включают в себя полушария головного мозга, мозжечок и ствол мозга. Симптомы ТВИ могут быть слабыми, умеренными или тяжелыми в зависимости от степени повреждения мозга. Результатом может быть что угодно: от полного выздоровления до постоянной нетрудоспособности или смерти. На мозг ребенка также может влиять кома. Поражение от ТВИ может быть очаговым, ограниченным одной областью головного мозга, или диффузным, с участием более чем одной области мозга. Диффузная травма головного мозга часто ассоциируется с сотрясением мозга (встряска головного мозга в ответ на резкое движение головы), диффузное аксональное повреждение или кома. Локализованные повреждения могут быть связаны с психофизиологическими проявлениями, гемипарезом или другими очаговыми неврологическими симптомами.

Еще одним кровоизлиянием в мозг, которое может вызвать травму, является аноксия. Аноксия является состоянием, при котором отсутствует подача кислорода в ткани органа, даже при наличии достаточного кровоснабжения ткани. Гипоксия относится к уменьшению подачи кислорода, а не к полному отсутствию кислорода, и ишемия представляет собой недостаточное кровоснабжение, как это видно в случаях отека мозга. В любом из этих случаев без достаточного поступления кислорода запускается биохимический каскад, называемый ишемическим каскадом, и клетки мозга могут погибнуть в течение нескольких минут. Этот вид поражения часто наблюдается у почти утонувших жертв, у пациентов с сердечным приступом (особенно у тех, кто перенес остановку сердца) или у людей, которые страдают значительной потерей крови от других травм, которые затем приводят к уменьшению притока крови в мозг из-за циркуляторного (гиповолемического) шока.

Регулирование концентрации глюкозы в крови.

В настоящем документе предложен способ регулирования концентрации глюкозы в крови у млекопитающего. Как используется в настоящем документе, регулирование концентрации глюкозы в крови относится к любому увеличению, уменьшению и/или поддержанию концентрации глюкозы в крови по сравнению с ранее определенным уровнем.

Млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении, может быть введен NMN. Например, млекопитающему может потребоваться увеличение концентрации глюкозы в крови. Альтернативно, млекопитающему может потребоваться снижение концентрации глюкозы в крови. Или млекопитающему может потребоваться поддержание концентрации глюкозы в крови выше, такое же или ниже определенного уровня, либо в определенном диапазоне (например, посредством серии увеличений и/или уменьшений, либо без увеличения или уменьшения). Регулирующий концентрацию глюкозы в крови NMN также может быть введен млекопитающему в качестве профилактической меры; т.е. млекопитающему необходимо лечение, чтобы предотвратить или задержать появление или возникновение медицинского состояния, такого как, например, диабет типа 1 или типа 2.

Способность регулировать концентрацию глюкозы в крови у млекопитающего в соответствии с описанными в настоящем документе способами (например, путем введения млекопитающему регули-

рующего количество глюкозы в крови соединения по настоящему изобретению может быть выгодным при лечении и/или профилактике различных осложнений, расстройств и/или заболеваний. Роль повышенных уровней NAD⁺ в метаболических заболеваниях и состояниях была описана, например, Yoshino et al., "Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes" *Cell Metab.* 2011 14:528-536; и Garten, et al., "Nampt: Linking NAD biology, metabolism, and cancer" *Trends Endocrinol Metab.* 2009 20 (3):130-138. В общем, настоящее изобретение может быть использовано для лечения различных острых, промежуточных стадий и хронических состояний, на которые прямо или косвенно может влиять системный биосинтез NAD.

Например, регулирование концентрации глюкозы в крови может быть эффективным при лечении и/или профилактике таких заболеваний, как гипогликемия, вызванная ишемией мозга, гипогликемическое поражение головного мозга, вызванное, например, врожденным гиперинсулинизмом у детей, и/или других состояний, которые серьезно уменьшают уровень глюкозы в крови. Альтернативно, регулирование концентрации глюкозы в крови может быть эффективным для противодействия эффектам инъекции чрезмерного количества инсулина или недостаточного питания или потребления витамина (например, дефицит витамина B3 (ниацин, который является производным никотиновой кислоты и никотинамида) может привести к появлению пеллагры, классического авитаминоза ниацина, характеризующейся двусторонним дерматитом, диареей и деменцией).

Кроме того, регулирование концентрации глюкозы в крови может быть эффективным при лечении и/или профилактике гипогликемии, гипергликемии, нарушенной толерантности к глюкозе, нарушенной гликемии натощак и диабету типа 1 и диабету типа 2.

Регулирование концентрации глюкозы в крови в соответствии с описанными в настоящем документе способами может также быть выгодным для противодействия действию препаратов, снижающих концентрацию глюкозы в крови, таких как ацетаминофен, алкоголь, анаболические стероиды, клофибрат, дисопирамид, гемфиброзил, ингибиторы моноаминоксидазы (MAOI), пентамидин или сульфонилмочевины (такие как глипизид, глибурид и глимепирид).

Другие состояния, имеющие убедительную связь с биосинтезом NAD, такие как деменция, также можно успешно лечить и/или они могут быть предотвращены регуляцией уровня глюкозы в крови. См., например, Guest et al., "Changes in Oxidative Damage, Inflammation and [NAD(H)] with Age in Cerebrospinal Fluid" *PLOS One.* January 2014 9(1): e85335.

Увеличение, уменьшение и/или поддержание концентрации глюкозы в крови может быть количественно оценено, например, в процентах выше, ниже или между одним или несколькими ранее определенными уровнями, или может быть количественно определено в виде конкретной концентрации глюкозы в крови или ее диапазона.

Например, концентрация глюкозы в крови может быть увеличена по меньшей мере на примерно 5% выше ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 10% выше ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 25% выше ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 50% выше ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 75% выше ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 100% выше ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 150% выше ранее определенного уровня; или по меньшей мере на примерно 200% выше ранее определенного уровня. В качестве другого примера, концентрация глюкозы в крови может быть уменьшена по меньшей мере на примерно 5% ниже ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 10% ниже ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 25% ниже ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 50% ниже ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 75% ниже ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 100% ниже ранее определенного уровня; по меньшей мере на примерно 150% ниже ранее определенного уровня; или по меньшей мере на примерно 200% ниже ранее определенного уровня. В качестве еще одного примера, концентрация глюкозы в крови может поддерживаться (например, путем увеличения и/или уменьшения или без увеличения и/или уменьшения) при концентрации, которая не выходит за рамки примерно на 50% или примерно на 50% меньше, чем ранее определенный уровень; например, не выходит за рамки примерно на 40% больше или примерно на 40% меньше; не выходит за рамки примерно на 30% больше или примерно на 30% меньше; не выходит за рамки примерно на 20% больше или примерно на 20% меньше; не выходит за рамки примерно на 10% больше или примерно на 10% меньше; или не выходит за рамки примерно на 5% больше или примерно на 5% меньше.

В качестве еще одного примера, концентрация глюкозы в крови может поддерживаться (например, путем серий увеличений и/или уменьшений или без увеличений и/или уменьшений) при концентрации, которая не выходит за рамки примерно на 50% больше или примерно на 50% меньше, чем ранее определенный уровень; например, не выходит за рамки примерно на 40% больше или примерно на 40% меньше; не выходит за рамки примерно на 30% больше или примерно на 30% меньше; не выходит за рамки примерно на 20% больше или примерно на 20% меньше; не выходит за рамки примерно на 10% больше или примерно на 10% меньше; или не выходит за рамки примерно на 5% больше или примерно на 5% меньше.

Альтернативно, концентрация глюкозы в крови может поддерживаться (например, путем серии

увеличений и/или уменьшений, или без увеличений и/или уменьшений) выше или ниже определенной концентрации глюкозы в крови или в пределах требуемого диапазона концентрации глюкозы в крови. Например, концентрация глюкозы в крови может поддерживаться в концентрации более чем примерно 60 мг/дл; более чем примерно 70 мг/дл; более чем примерно 100 мг/дл; более чем примерно 110 мг/дл; или более чем примерно 125 мг/дл. Альтернативно, концентрация глюкозы в крови может поддерживаться при концентрации менее чем примерно 200 мг/дл; менее чем примерно 175 мг/дл; менее чем примерно 150 мг/дл; менее чем примерно 125 мг/дл; менее чем примерно 110 мг/дл; или менее чем примерно 100 мг/дл. В качестве другого примера, концентрация глюкозы в крови может поддерживаться в концентрации от примерно 60 мг/дл до примерно 140 мг/дл; от примерно 90 мг/дл до примерно 130 мг/дл; от примерно 100 мг/дл до примерно 125 мг/дл; или от примерно 110 мг/дл до примерно 125 мг/дл.

Токсичность лекарственных средств.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к применению NMN для предотвращения побочных эффектов и защиты клеток от токсичности. Токсичность может представлять собой неблагоприятное воздействие излучения или внешних химических веществ на клетки организма. Примерами токсинов являются лекарства, препараты, вызывающие лекарственную зависимость, и облучение, такое как ультрафиолетовое или рентгеновское излучение. Как лучевые, так и химические токсины могут повредить биологические молекулы, такие как ДНК. Это повреждение обычно происходит путем химической реакции экзогенного агента или его метаболитов с биологическими молекулами, или косвенно, посредством стимулированной генерации активных форм кислорода (например, супероксида, пероксидов, гидроксильных радикалов). Система репарации в повреждении распознает и ремонтирует повреждение, вызванные токсинами.

Ферменты, которые используют NAD^+ , играют определенную роль в процессе восстановления ДНК. Например, синдромы репарации ДНК включают, но не ограничиваются ими, синдром Кокейна. В частности, поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP), в частности PARP-1, активируются разрывами нитей ДНК и влияют на восстановление ДНК. PARP поглощают NAD^+ в качестве донора аденозиндифосфат рибозы (ADPR) и синтезируют поли(ADP-рибозу) в белках ядра, таких как гистоны и сама PARP. Хотя действия PARP способствуют репарации ДНК, чрезмерная активация PARP может вызвать значительное истощение клеточного NAD^+ , что приводит к клеточному некрозу. Очевидная чувствительность метаболизма NAD^+ к генотоксичности привела к фармакологическим исследованиям ингибирования PARP как средства улучшения выживаемости клеток. Во многих сообщениях было показано, что ингибирование PARP увеличивает концентрацию NAD^+ в клетках, подверженных генотоксичности, что приводит к уменьшению клеточного некроза. См., например, Fang et al., Defective Mitophagy in XPA via PARP-1 Hyperactivation and NAD^+ /SIRT1 Reduction. *Cell* 2014 157:882-896. Тем не менее, клеточная смерть при токсичности все-таки происходит, по-видимому, потому что клетки способны завершить апоптотические пути, которые активируются генотоксичностью. Таким образом, значительная гибель клеток по-прежнему является следствием повреждения ДНК/макромолекулы, даже при ингибировании PARP. Это приводит к тому, что улучшение метаболизма NAD^+ при генотоксичности может быть частично эффективно для улучшения выживаемости клеток, но другие белки, которые модулируют апоптотическую чувствительность, такие как сиртуины, также могут играть важную роль в реакции клеток на генотоксины.

Физиологические и биохимические механизмы, которые определяют влияние химической и радиационной токсичности в тканях, являются сложными, и данные свидетельствуют о том, что метаболизм NAD^+ является важным аспектом путей ответа на клеточный стресс. Например, было показано, что активация метаболизма NAD^+ посредством сверхэкспрессии мононуклеотида никотинамида/никотиновой кислоты (NMNAT) защищает от аксональной дегенерации нейронов, и недавно было показано, что фармакологически используемый никотинамид обеспечивает защиту нейронов в модели алкогольного синдрома плода и ишемии плода. Такие защитные эффекты могут быть связаны с активированным биосинтезом NAD^+ , что увеличивает доступный пул NAD^+ , подвергающийся истощению в процессе генотоксического стресса. Это истощение NAD^+ опосредуется ферментами PARP, которые активируются повреждением ДНК и могут истощить клеточный NAD^+ , что приводит к некротической смерти. Другим механизмом повышенной защиты клеток, который может действовать совместно с активированным биосинтезом NAD^+ , является активация транскрипционных программ защиты клеток, регулируемых ферментами сиртуина.

Старение/стресс.

В некоторых вариантах осуществления изобретения относится к способу, продлевающему продолжительность жизни клетки, расширению пролиферативной способности клетки, замедлению старения клетки, повышению выживаемости клетки, задержке клеточного старения в клетке, подражанию эффектам ограничения калорийности, увеличивая сопротивление клетки стрессу или предотвращая апоптоз клетки, путем контактирования клетки с NMN и/или NAD^+ . Недавние исследования продемонстрировали роль NAD^+ в процессе старения и в связанных с возрастом заболеваниях и состояниях. См., например, Imai et al., "NAD⁺ and sirtuins in aging and disease" *Trends in Cell Biol.* 2014 24 (8): 464-471; и Gomes et al., "Declining NAD^+ Induces a Pseudohypoxic State Disrupting Nuclear-Mitochondrial Communication during Aging" *Cell* 2013 155:1624-1638.

Способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для увеличения времени, в течение которого клетки, в частности первичные клетки (например, клетки, полученные из организма, например, человека), могут сохраняться живыми в культуре клеток *ex vivo*. Эмбриональные стволовые (ES) клетки и плюрипотентные клетки и клетки, дифференцированные из них, также могут быть обработаны соединением на основе никотинамида мононуклеотида или производным, чтобы поддерживать клетки или их потомство в культуре в течение более длительных периодов времени. Такие клетки также могут быть использованы для трансплантации субъекту, например, после модификации *ex vivo*.

В некоторых вариантах осуществления клетки, которые предназначены для хранения в течение длительного периода времени, можно обрабатывать NMN и/или NAD^+ . Клетки могут находиться в суспензии (например, клетки крови, сыворотка, биологическая среда для роста и т.д.) или в тканях или органах субъекта. Например, кровь, собранная у индивидуума для целей переливания крови, может быть обработана NMN и/или NAD^+ для сохранения клеток крови в течение более длительных периодов времени. Кроме того, кровь, которая будет использоваться в судебных целях, также может быть сохранена с использованием NMN и/или NAD^+ . Другие клетки, которые можно обработать для продления срока их жизни или защиты от апоптоза, включают фидерные клетки, например, клетки от млекопитающих, включая человека, (такие как мясо) или растительные клетки (например, овощи).

NMN и/или NAD^+ могут также применяться в процессе фаз развития и роста млекопитающих, растений, насекомых или микроорганизмов, например для изменения, замедления или ускорения процесса развития и/или роста.

В некоторых вариантах осуществления NMN и/или NAD^+ могут использоваться для обработки клеток, пригодных для трансплантации или клеточной терапии, включая, например, трансплантаты солидной ткани, транспланты органов, суспензии клеток, стволовые клетки, клетки костного мозга и т.д. Клетки или ткань могут быть ауто трансплантатом, алло трансплантатом, синграфтом или ксенотрансплантатом. Клетки или ткань могут быть обработаны NMN и/или NAD^+ перед введением/имплантацией, одновременно с введением/имплантацией и/или после введения/имплантации субъекту. Клетки или ткань могут быть обработаны перед удалением клеток у индивидуума донора, *ex vivo* после удаления клеток или ткани у индивидуума донора или после имплантации реципиенту. Например, индивидуум донор или реципиент могут быть системно обработаны NMN и/или NAD^+ или могут иметь подмножество клеток/ткани, обработанных локально NMN и/или NAD^+ . В некоторых вариантах осуществления клетки или ткани (или индивидуумы доноры/реципиенты) дополнительно могут быть обработаны другим терапевтическим агентом, который может быть использован для продления выживаемости трансплантата, таким как, например, иммунодепрессант, цитокин, ангиогенный фактор и т.д.

В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть обработаны количеством NMN, которое увеличивает уровень NAD^+ *in vivo*, например, для увеличения их продолжительности жизни или предотвращения апоптоза. Например, кожа может быть защищена от старения (например, появляющиеся морщины, потеря эластичности и т.д.) путем обработки кожи или эпителиальных клеток количеством NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ . В иллюстративных вариантах осуществления кожа контактирует с фармацевтической или косметической композицией, содержащей количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ . Примеры кожных заболеваний или состояний кожи, которые можно лечить в соответствии с описанными в настоящем документе способами, включают нарушения или заболевания, связанные с воспалением или вызванные им, солнечным поражением или естественным старением. Например, композиции находят применение в профилактике или лечении контактного дерматита (включая контактный дерматит с раздражением и аллергический контактный дерматит), атопический дерматит (также известный как аллергическая экзема), актинический кератоз, расстройства кератинизации (в том числе экзема), заболевания буллезного эпидермоза (в том числе пемфигус), эксфолиативный дерматит, себорейный дерматит, эритемы (включая множественную эритему и узловатую эритему), поражение, вызванное солнцем или другими источниками света, дискоидную красную волчанку, дерматомиозит, псориаз, рак кожи и последствия естественного старения. В других вариантах осуществления количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , может быть использовано для лечения ран и/или ожогов для способствования заживлению, включая, например, ожоги первой, второй или третьей степени и/или термические, химические или электрические ожоги. Композиции могут вводиться местно, в кожу или ткань слизистой оболочки в виде мази, лосьона, крема, микроэмульсии, геля, раствора или тому подобного, как дополнительно описано в настоящем документе, в контексте режима дозирования, эффективного для достижения желаемого результата.

Местные композиции, содержащие количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , также могут быть использованы в качестве профилактических, например химиопреventивных композиций. При использовании в химиопреventивном методе чувствительную кожу обрабатывают перед любым видимым состоянием у конкретного индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , может быть использовано для лечения или предотвращения заболевания или состояния, вызванного или усугубляемого клеточным старением у субъекта; методы снижения скорости старения субъекта, например, после начала старения; способы продления срока жизни субъекта; способы лечения

или профилактики заболевания или состояния, связанные с продолжительностью жизни; способы лечения или профилактики заболевания или состояния, связанные с пролиферативной способностью клеток; и методы лечения или предотвращения заболевания или состояния, вызванного повреждением или гибелью клеток. В некоторых вариантах осуществления способ не действует путем уменьшения скорости возникновения заболеваний, которые сокращают продолжительность жизни субъекта. В некоторых вариантах способ не действует путем уменьшения летальности, вызванной болезнью, такой как рак.

В некоторых вариантах количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , может вводиться субъекту, чтобы в целом увеличить продолжительность жизни его клеток и защитить его клетки от стресса и/или от апоптоза. Лечение субъекта с помощью NMN может быть аналогичным тому, как если бы подвергать субъекту гормезису, т.е. мягкому стрессу, который полезен для организмов и может увеличить продолжительность их жизни.

Количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , также может вводиться субъектам для лечения заболеваний, например хронических заболеваний, связанных с гибелью клеток, для защиты клеток от гибели клеток. Примерами болезней являются такие, которые связаны с гибелью нервных клеток, дисфункцией нейронов или гибелью или дисфункцией мышечной клеток, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз и мышечная дистрофия; СПИД; фульминантный гепатит; заболевания, связанные с дегенерацией головного мозга, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, пигментная дистрофия сетчатки и дегенерация мозжечка; миелодисплазия, такая как апластическая анемия; ишемические заболевания, такие как инфаркт миокарда и инсульт; заболевания печени, такие как алкогольный гепатит, гепатит В и гепатит С; заболевания суставов, такие как остеоартрит; атеросклероз; алопеция; повреждение кожи вследствие УФ-излучения; плоский лишай; атрофия кожи; катаракта; и отторжение трансплантата. Смерть клеток также может быть вызвана хирургическим вмешательством, лекарственной терапией, химическим воздействием или радиационным воздействием.

Количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , также может вводиться субъекту, страдающему острым заболеванием, например повреждением органа или ткани, например, субъекту, страдающему от инсульта или инфаркта миокарда, или субъекту, страдающему от травмы спинного мозга. Количество NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , также может быть использовано для восстановления печени алкоголика.

Сердечно-сосудистое заболевание.

В некоторых вариантах осуществления изобретения относится к способам лечения и/или профилактики сердечно-сосудистых заболеваний путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, количества NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ . Эффективность NAD^+ при лечении сердечно-сосудистых заболеваний описана в нескольких исследованиях, таких как Borradaile et al., "NAD⁺, Sirtuins, and Cardiovascular Disease" *Current Pharmaceutical Design* 2016 15 (1): 110-117.

Сердечно-сосудистые заболевания, которые можно лечить или предотвращать с помощью количества NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , включают кардиомиопатию или миокардит; такую как идиопатическая кардиомиопатия, метаболическая кардиомиопатия, алкогольная кардиомиопатия, кардиомиопатия, индуцированная лекарственными средствами, ишемическая кардиомиопатия и гипертоническая кардиомиопатия. Также могут поддаваться лечению или предотвращению с использованием соединений и способов, описанных в настоящем документе, атероматозные расстройства основных кровеносных сосудов (макрососудистые заболевания), таких как аорта, коронарные артерии, сонные артерии, мозжечковые артерии, почечные артерии, подвздошные артерии, бедренные артерии и подколенные артерии. Другие сосудистые заболевания, которые можно лечить или предотвращать, включают такие, которые связаны с агрегацией тромбоцитов, артериолами сетчатки, клубочковыми артериолами, сосудами нервной системы, сердечными артериолами, и связанные с ними капиллярные слои глаза, почки, сердца и центральной и периферической нервной системы.

Еще другие расстройства, которые могут быть подвергнуты лечению количеством NMN, которое увеличивает уровень внутриклеточного NAD^+ , включают рестеноз, например, после коронарного вмешательства и расстройства, связанные с аномальным уровнем холестерина высокой плотности и низкой плотности. Другим заболеванием, для лечения которого может быть эффективным использование NAD^+ , является безалкогольный стеатогепатит (NASH), который представляет собой жировое заболевание печени.

Циркадные ритмы.

Циркадные часы кодируются циклом обратной связи транскрипции, которая синхронизирует поведение и метаболизм с циклом свет-темнота. Неожиданно было обнаружено, что как фермент, ограничивающий скорость в биосинтезе NAD^+ млекопитающих, никотинамид фосфорибозилтрансферазы (NAMPT), так и уровни NAD^+ проявляют циркадные колебания, которые регулируются центральным часовым механизмом у мышей. Ингибирование NAMPT способствует осцилляции часового гена Per2 путем освобождения CLOCK:BMAL1 от подавления SIRT1. В свою очередь, циркадный фактор транскрипции CLOCK связывается с Nampt и активирует его, тем самым завершая цикл обратной связи с использованием NAMPT/ NAD^+ и SIRT1/CLOCK:BMAL1. См., например, Ramsey et al., "Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD^+ biosynthesis" *Science* 2009 324:651-654.

Таким образом, периодическая вариация в NAMPT-опосредованном биосинтезе NAD⁺ предполагает, что он влияет на физиологические циклы и, возможно, на цикл сон-бодрствование и питание-голодание. Не ограничиваясь одной теорией, полагают, что NAD⁺ является важнейшим "метаболическим осциллятором" для ритмической регуляции реакции на экологические сигналы посредством контроля активности SIRT1. Соединения, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для воздействия на циркадный контур обратной связи через NAMPT-опосредованный биосинтез NAD⁺ и/или путь, лежащий в основе временной связи метаболических, физиологических и циркадных циклов у млекопитающих.

Признание регулирующего пути, включающего NAMPT/NAD⁺-SIRT1/CLOCK:BMAL1 имеет широкие последствия для понимания того, как физиологические и поведенческие циклы координируются с экологическим циклом свет-темнота. Например, во время сна, когда животные обычно находятся в состоянии покоя и голодания, уровни NAMPT неуклонно возрастают, достигая максимума в начале периода бодрствования и совпадают с кормлением. В результате увеличения NAMPT, NAD⁺ повышается для стимулирования SIRT1, который организует соответствующий метаболический ответ в печени с переключением с катаболических на анаболические пути.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам регулирования основного часового механизма (иногда также называемого циркадными часами) млекопитающего, что влияет на поведение, деятельность и/или биологические функции, которые происходят или находятся под воздействием суточного или циркадного цикла и которые регулируются, по крайней мере частично, циркадными часами. Как правило, способы включают введение терапевтического или профилактического количества регулирующего циркадные часы соединения пациенту или млекопитающему, нуждающемуся в регуляции циркадных часов.

Способы лечения, описанные в настоящем документе, в основном направлены на способы регулирования циркадных часов, тем самым регулируя или влияя на биологические функции, которые регулируются (иногда также называемыми влияющими, связанными или опосредованными) деятельностью циркадных часов. Как правило, эти биологические функции показывают характер активности и неактивности, который обычно повторяется примерно каждые 24 ч, колеблющийся между "активными" и "неактивными" состояниями в течение 24-часового периода.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам регулирования активности циркадных часов путем введения нуждающемуся в этом млекопитающему соединения, регулирующего циркадные часы. Как правило, регулирование активности циркадных часов является результатом регулирования CLOCK:BMAL1, которое достигается в соответствии с настоящими методами путем регулирования активности SIRT1. Активность SIRT1 обычно регулируется в соответствии с настоящими способами путем введения регулирующего циркадные часы соединения, и в некоторых вариантах осуществления путем введения количества NMN, которое влияет на путь NAD⁺. Таким образом, регулирование циркадных часов позволяет регулировать деятельность, опосредованную циркадными часами.

В соответствии с настоящим изобретением активность циркадных часов может быть увеличена, уменьшена или сохранена путем введения регулирующего циркадные часы соединения. Соответственно, биологические функции (иногда также называемые биологическими активностями), которые регулируются активностью циркадных часов, также могут быть увеличены, уменьшены или сохранены. Кроме того, эти биологические функции также могут быть сдвинуты во времени; т.е. активность, которая обычно проявляется в течение определенного периода, такая как, например, в дневные часы или в световой день (иногда также называемое световым циклом) или ночью или в ночное время (иногда также называемое темным циклом) могут быть смещены так, что активность проявляется в темном или световом цикле соответственно.

Любая из множества биологических функций, которые обычно подвержены действию циркадных часов, может регулироваться способами по настоящему изобретению. Таким образом, настоящие способы могут быть использованы для лечения расстройств или болезненных состояний, которые являются результатом, например, нерегулярной, неадекватной или патологической функции циркадных часов. Аналогичным образом, настоящие способы могут быть использованы для лечения расстройств или симптомов, вызванных экзогенными факторами, которые влияют на надлежащую функцию или активность циркадных часов или требуют "сброса" часов. Например, введение регулирующего циркадные часы соединения пациенту, испытывающему метаболическое расстройство, относится к терапевтическому эффекту не только по увеличению уровня сывороточного NMN или NAD у пациента, но также в том, что улучшение наблюдается у пациента по отношению к другим нарушениям, которые сопровождают метаболическое расстройство, такое как уменьшение или увеличение веса. В некоторых схемах лечения регулирующее циркадные часы соединение по изобретению может быть введено пациенту с риском развития расстройства, описанного в настоящем документе, или пациенту с сообщением об одном или нескольких физиологических симптомах такого расстройства, даже несмотря на то, что диагноз метаболическое расстройство, возможно, не был поставлен.

Примеры расстройств, болезненных состояний или симптоматики, которые можно лечить согласно способам по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются ими, перемещение в или через

один или несколько часовых поясов, изменение рабочих смен, ночную смену или изменение физического статуса млекопитающего, вызванное, например, беременностью или применением каких-либо лекарственных средств. Соответственно, способы по настоящему изобретению могут использоваться для лечения или профилактики расстройств, симптомов расстройств или симптомов, вызванных экзогенными факторами. Такие расстройства и симптомы могут включать, например, нарушения обмена веществ, такие как неправильное циклирование или сроки кормления и голодания, гипергликемия, гипогликемия или диабет; нарушения сна, такие как бессонница, синдром поздней фазы сна, синдром фазы с задержкой сна, непоследовательные циклы сна/бодрствования или нарколепсия или улучшение бодрствования у людей, страдающих от чрезмерной сонливости; и симптомы, вызванные экзогенными факторами, такими как перемещение в или через один или несколько часовых поясов (синдром смены часовых поясов), переход на или из летнего времени, изменение рабочих смен или ночная смена, беременность или лекарственные средства, принимаемые ввиду несвязанных заболеваний или расстройств.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения речь идет о способе регулирования биологической функции у млекопитающего, где на функцию влияют циркадные часы. Способ включает введение млекопитающему терапевтического или профилактического (иногда также называемого регулирующим циркадные часы) количества регулирующего циркадные часы соединения. Биологическая функция может быть, например, какой-либо из описанных в настоящем документе биологических функций. В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ лечения метаболического расстройства у млекопитающего, и он включает введение млекопитающему терапевтического или профилактического количества регулирующего циркадные часы соединения. В других вариантах осуществления изобретения включает способ лечения расстройства у млекопитающего, опосредованного функцией циркадных часов, и он включает введение терапевтического или профилактического количества регулирующего циркадные часы соединения млекопитающему. Согласно любому из этих вариантов осуществления регулирующим циркадные часы соединением может быть, например, никотинамид, никотинамид мононуклеотид (NMN), никотинамид адениндинуклеотид (НАД); их соли и пролекарства; никотинамид фосфорибозилтрансфераза (NAMPT); и их комбинации, как описано более подробно ниже. В других вариантах осуществления регулирующим циркадные часы соединением может быть антагонист любых перечисленных выше соединений, тем самым достигая эффекта, противоположного эффекту никотинамида, никотинамида мононуклеотида (NMN), никотинамида адениндинуклеотида (НАД); их солей и пролекарств; никотинамида фосфорибозилтрансферазы (NAMPT); и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение касается способа регулирования метаболической активности млекопитающего, включающего введение млекопитающему терапевтического количества регулирующего циркадные часы соединения. В некоторых вариантах осуществления метаболическая активность млекопитающего повышается. В других вариантах осуществления метаболическая активность снижается. В еще других вариантах осуществления метаболическая активность млекопитающего поддерживается на желаемом уровне, тем самым предотвращая флуктуации активности/неактивности. В других вариантах осуществления метаболическая активность возникает в световом цикле (в отличие от его обычного проявления в темном цикле). В других вариантах осуществления метаболическая активность возникает в темном цикле (в отличие от ее обычного проявления в световом цикле). В некоторых вариантах осуществления регулирующее циркадные часы соединение вводят млекопитающему с целью увеличения анаболической активности печени (например, повышают активность метаболических путей печени или сдвигают или переключают активность печени с катаболизма на анаболизм). В других вариантах осуществления регулирующее циркадные часы соединение вводится млекопитающему с целью увеличения катаболической активности печени (например, снижение активности метаболического процесса).

Митохондриальные болезни и метаболические эффекты.

Помимо регулирующих циркадные ритмы и защищающих нервные клетки от гибели клеток, в митохондриях находятся сиртуины, такие как SIRT3, SIRT4 и SIRT5. SIRT3 экспрессируется на высоких уровнях в метаболически активной ткани. Модуляция SIRT3 имеет множество физиологических применений для мышечных клеток, включая имитацию калорийного ограничения или физических упражнений, увеличение биогенеза или метаболизма митохондрий, повышение чувствительности клеток к глюкозе, увеличение окисления жирных кислот и уменьшение количества активных форм кислорода. Кроме того, в настоящем документе показано, что SIRT3 участвует в стимуляции клеточной выживаемости при генотоксическом стрессе. Таким образом, модуляция уровней SIRT3 также имеет применение для опосредования выживаемости клеток.

Увеличение уровня белка или активности SIRT3 в мышечной клетке может имитировать эффект ограничения калорий или физических упражнений. В некоторых вариантах осуществления изобретения относится к способам увеличения биогенеза или метаболизма митохондрий или повышения активности/выносливости митохондрий в мышечной клетке путем контактирования мышечной клетки с агентом IS, который увеличивает уровень белка или активности SIRT3 в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения относится к способам повышения чувствительности мышечной клетки к поглощению глюкозы путем контактирования мышечной клетки с агентом, который увеличивает уровень белка

или активности SIRT3 в клетке. Другие варианты осуществления относятся к способам усиления окисления жирных кислот в мышечной клетке путем контактирования мышечной клетки с агентом, который увеличивает уровень белка или активности SIRT3 в клетке. Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к способам уменьшения активных форм кислорода (ROS) в мышечной клетке путем контактирования мышечной клетки с агентом, который увеличивает уровень белка или активности SIRT3 в клетке.

Увеличение уровней SIRT3 является эффективным при многих заболеваниях и расстройствах, зависящих от метаболизма в митохондриях. Увеличение SIRT3 может быть эффективным для субъектов, нуждающихся в метаболической активации одной или нескольких своих мышц, например, гладких мышц или сердечных мышц или их мышечных клеток. Субъект может быть субъектом, имеющим кахексию или мышечное истощение.

Увеличение SIRT3 также может быть использовано для увеличения или поддержания температуры тела, например, у гипотермических субъектов. Альтернативно, ингибирование SIRT3 может быть использовано для снижения температуры тела, например, у пациентов с лихорадкой или гипертермией.

Обычно активация SIRT3 может быть использована для стимуляции метаболизма любого типа мышц, например мышц кишечника или пищеварительной системы или мочевого тракта, и, таким образом, может использоваться для регулирования моторики кишечника, например запора и недержания.

Другие варианты осуществления, при которых было бы эффективным увеличить SIRT3, включают в себя восстановление мышц, например, после операции или несчастного случая, увеличение мышечной массы; и повышение спортивных результатов.

Таким образом, изобретение относится к способам, при которых положительные эффекты производятся путем контактирования одной или более мышечных клеток с количеством NMN, которое увеличивает уровень белка или активности SIRT3 в клетке. Эти способы эффективно облегчают, увеличивают или стимулируют одно или более из следующего: имитируют эффект ограничения калорий или упражнений в мышечной клетке, усиливают биогенез или метаболизм митохондрий, увеличивают активность митохондрий и/или выносливость в мышечной клетке, повышают чувствительность мышечной клетки к поглощению глюкозы, усиливают окисление жирных кислот в мышечной клетке, уменьшают активные формы кислорода (ROS) в мышечной клетке, увеличивают экспрессию PGC-1 α и/или *ucp3* и/или GLUT4 в мышечной клетке и активируют протеинкиназу, активированную AMP, (AMPK) в мышечной клетке.

В соответствии с изобретением контактированию могут быть подвергнуты различные типы мышечных клеток. В некоторых вариантах осуществления мышечная клетка представляет собой клетку скелетных мышц. В некоторых вариантах мышечная клетка представляет собой клетку медленно сокращающейся мышцы, такую как клетка камбаловидной мышцы. Способы по изобретению включают в некоторых вариантах осуществления введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, количества NMN, которое увеличивает уровень белка или активности SIRT3 в клетках субъекта.

Клетка, которая подвергается контактированию, или субъект, который проходит лечение по вышеупомянутым способам, предпочтительно представляет собой клетку, для которой необходимо увеличение уровня белка или активности SIRT3. В некоторых вариантах осуществления клеткой является большая клетка субъекта.

Также предложены способы регулирования метаболизма скелетных мышц или гомеостаза энергии скелетных мышц у субъекта. В таких способах агент, который модулирует уровень белка или активности SIRT3 у субъекта, т.е. модуляторы SIRT3, описанные в настоящем документе, вводят нуждающемуся в этом субъекту.

Также представлены способы увеличения уровня белка SIRT3 в мышечной клетке или в мышцах субъекта. Такие способы включают воздействие на клетки или субъекта калорийного ограничения или голодания или введение субъекту, нуждающемуся в этом, количества NMN, которое увеличивает уровень белка или активности SIRT3 в мышечной клетке. Болезни, расстройства и состояния, при которых такие способы могут быть использованы, включают митохондриальные заболевания, нарушения обмена веществ, неврологические расстройства, мышечные расстройства, сердечно-сосудистые заболевания, избыточный вес или ожирение. Конкретные метаболические нарушения, заболевания или состояния включают резистентность к инсулину, диабет, связанные с диабетом состояния или расстройства или метаболический синдром. Другие метаболические нарушения известны специалисту в данной области.

Митохондриальные заболевания, которые можно лечить, включают болезни, которые проявляют множество симптомов, вызванных дисфункцией митохондрий в клетках. Митохондриальные заболевания могут быть классифицированы различными способами с помощью биохимических аномалий, клинических симптомов или типов нарушений ДНК. Широко известными являются виды, называемые KSS (хроническая прогрессирующая внешняя офтальмоплегия), MERRF (миоклонус-эпилепсия с разорванными красными мышечными волокнами, синдром Фукухары), MELAS, болезнь Лебера, энцефалопатия Ли и болезнь Пирсона. Среди них MELAS представляет собой вид, в основном показывающий инсульт-подобные эпизоды, занимающие 30% или более от всех, и считается наиболее частым видом митохондриальной болезни.

В некоторых вариантах осуществления NMN может быть использован при лечении заболеваний

или расстройств, связанных с дефектами восстановления ДНК или дисфункцией митохондрий (например, в результате дерегуляции митохондриального гомеостаза). В некоторых вариантах осуществления "митохондриальная дисфункция" или "дерегуляция митохондриального гомеостаза" означает, что один или более митохондриальных компонентов (например, компонент ЕТС) истощаются, например, путем уменьшения экспрессии гена митохондриального гена или митохондриальной ДНК, что приводит к нарушенной функции митохондрий (например, отсутствие или уменьшение окислительного фосфорилирования (OXPHOS)). Примеры заболеваний, связанных с репарацией ДНК, включают синдром Кокейна и TTD.

Болезни и расстройства сетчатки.

Гибель фоторецепторных нейрональных клеток и зрение могут быть восстановлены введением NMN. В некоторых вариантах осуществления опосредованный никотиномид фосфорибозил трансферазой (NAMPT) биосинтез NAD может сыграть важную роль в выживаемости палочковых и/или колбочковых PR нейронов. В некоторых вариантах осуществления снижение уровней NAD может вызвать нарушение функции митохондрий в PR нейронах, изменение метаболизма цикла TCA и может привести к гибели клеток и слепоте.

Удаление NAMPT может привести к гибели фоторецептора, потере нормальной структуры и функции сетчатки и потере зрения. В некоторых случаях повреждение фоторецепторных нейронов и их функция могут быть реверсированы при добавлении NMN, продукта ферментативной реакции NAMPT. В настоящем документе описаны способы введения NMN для восстановления уровней NAD в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления добавление NMN может быть эффективным терапевтическим вмешательством при многих дегенеративных заболеваниях сетчатки.

В настоящем документе предложены способы лечения, профилактики и снижения риска заболеваний, связанных с дисфункцией фоторецепторов, включая, без ограничения, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), унаследованные и приобретенные заболевания сетчатки, такие как, без ограничения, пигментная дистрофия сетчатки (RP), палочковая и колбочковая дистрофия, а также врожденный амароз Лебера (LCA), путем введения субъекту NMN. В некоторых вариантах осуществления введение NMN может быть эффективным вмешательством для профилактики и/или лечения орфанных дегенеративных заболеваний сетчатки, включая, но этим не ограничиваясь, палочковую дистрофию, колбочковую дистрофию, пигментную дистрофию сетчатки, другие наследственные дегенерации сетчатки, врожденный амароз Лебера (LCA) и приобретенные дегенерации сетчатки, такие как, но этим не ограничиваясь, возрастная дегенерация желтого пятна, дегенерация фоторецепторов после отслоения сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления эти способы могут включать введение субъекту фармацевтически эффективного количества никотинамида мононуклеотида (NMN). В некоторых вариантах осуществления фармацевтически эффективное количество никотинамида мононуклеотида (NMN) может быть количеством, эффективным для увеличения уровней NAD в сетчатке.

В настоящем документе описаны способы лечения дегенерации желтого пятна у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают обработку aberrантных уровней NAD в сетчатке у субъекта, включая aberrантно низкие уровни NAD в сетчатке. Эти способы включают введение NMN субъекту. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение дегенерации сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение повреждения фоторецептора у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение дегенерации фоторецепторов у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение дегенерации сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение aberrантной структуры сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают увеличение уровней NAD в сетчатке у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение риска развития дегенерации желтого пятна у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение риска развития aberrантных уровней NAD в сетчатке у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение риска развития дегенерации сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение риска развития дегенерации желтого пятна у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение риска развития потери зрения, связанной с дегенерацией сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы включают снижение риска развития дегенерации сетчатки у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение заболевания сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки, которое можно лечить с помощью введения NMN, может представлять собой пигментную дистрофию сетчатки (RP), врожденный амароз Лебера (LCA), палочковую дистрофию, колбочковую дистрофию, палочко-колбочковую дистрофию, колбочко-палочковую дистрофию, возрастную дегенерацию желтого пятна, дегенерацию фоторецепторов после отслоения сетчатки или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления кристаллические формы β -никотинамида мононуклеотида (NMN) (и составы, полученные с использованием таких кристаллических форм) могут быть использова-

ны для лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсии возрастного ожирения у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или изменения возрастных изменений уровня липидов в крови у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсии возрастной потери чувствительности к инсулину у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к методам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсии возрастного нарушения функции памяти у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсии возрастных изменений функции глаз у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсии возрастной потери чувствительности к инсулину у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсирования сухого глаза. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсии возрастных изменений функции глаз у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения, улучшения, смягчения, замедления, остановки, предотвращения или реверсии бесплодия.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения связанных с возрастом дефектов в функциях нейронных стволовых/предшественников клеток (NSPC) у субъекта путем введения кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам снижения возрастной популяции NSPC у субъекта путем введения кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам поддержания по меньшей мере одного NSPC у субъекта посредством введения кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам усиления биосинтеза NAD у субъекта путем введения кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам стимуляции пролиферации NSPC у субъекта, в котором способы включают введение кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы, субъекту. Способы по каждому из этих вариантов осуществления могут включать, состоять по существу или состоять из введения терапевтически эффективного количества кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам увеличения уровня плотности кости у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения аберрантно низких уровней плотности кости у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения связанного с возрастом снижения плотности кости у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения остеопороза у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к методам предотвращения снижения возрастной плотности костной ткани у субъекта. Способы по каждому из этих вариантов осуществления могут включать, состоять по существу или состоять из введения терапевтически эффективного количества кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам профилактики, способам снижения риска и способам лечения различных заболеваний, связанных с дисфункцией фоторецепторов, включая, помимо прочего, возрастную дегенерацию макулы (AMD), унаследованные и приобретенные заболевания сетчатки, такие как, без ограничения, пигментная дистрофия сетчатки (RP), палочковая и колбочковая дистрофия, а также врожденный амавроз Лебера (LCA) при введении NMN. В различных вариантах осуществления введение кристаллической формы NMN или препарата, полученного с использованием такой кристаллической формы, может быть эффективным вмешательством для профилактики и/или лечения орфальных дегенеративных заболеваний сетчатки, включая, но не ограничиваясь ими, палочковую дистрофию, колбочковую дистрофию, пигментную дистрофию сетчатки, другие наследственные дегенерации сетчатки, врожденный амавроз Лебера (LCA) и приобретенные дегенерации сетчатки, такие как, но этим не ограничиваясь, возрастная дегенерация желтого пятна, дегенерация фоторецепторов после отслоения сетчатки. В различных вариантах осуществления кристаллическую форму NMN или препарат, полученный с использованием такой кристаллической формы, можно вводить любым способом введения, известным специалистам в данной области, таким как, без ограничения, пероральный, парентеральный, внутриглазной, внутрибрюшинный, внутривенный или внутримышечный путь. В различных вариантах осуществления NMN можно вводить вместе с или без эксципиента.

В некоторых вариантах осуществления NMN лечит возрастное заболевание. В некоторых вариантах осуществления связанными с возрастом заболеваниями являются болезнь Альцгеймера, боковой амио-

трофический склероз, артрит, атеросклероз, кахексия, злокачественное новообразование, гипертрофия сердца, сердечная недостаточность, сердечная гипертрофия, сердечно-сосудистые заболевания, катаракта, колит, хроническая обструктивная болезнь легких, деменция, сахарный диабет, слабость, сердечные заболевания, стеатоз печени, высокий уровень холестерина в крови, высокое кровяное давление, болезнь Хантингтона, гипергликемия, гипертония, бесплодие, воспалительное заболевание кишечника, расстройство инсулинорезистентности, летаргия, метаболический синдром, мышечная дистрофия, рассеянный склероз, невропатия, нефропатия, ожирение, остеопороз, болезнь Паркинсона, псориаз, саркопения, нарушения сна, сепсис и/или инсульт. В некоторых вариантах осуществления митохондриальная болезнь представляет собой митохондриальную миопатию, сахарный диабет и глухоту (DAD), наследственную оптическую нейропатию Лебера (LHON), синдром Ли, нейропатию, атаксию, пигментную дистрофию сетчатки и петоз (NARP), миоклонус-эпилепсию с разорванными красными мышечными волокнами (MERRF), мускулонейрогенную гастроинтестинальную энцефалопатию (MNGIE), митохондриальную миопатию, энцефаломиопатию, лактоацидоз, инсульт-подобный симптом (MELAS), синдром Кернса-Сайре (KSS), хроническую прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию (CPEO) и/или истощение мтДНК.

Примеры заболеваний, расстройств или состояний, связанных с дисфункцией митохондрий, включают, но не ограничиваются ими, старение, связанные со старением заболевания, митохондриальные заболевания (например, болезнь Альпера, синдром Барта, дефекты β -окисления, дефицит карнитин-ацилкарнитина, дефицит карнитина, синдромы дефицита креатина, синдромы дефицита кофермента Q10, дефицит комплекса I, дефицит комплекса II, дефицит комплекса III, дефицит комплекса IV/дефицит COX, дефицит комплекса V, синдром хронической прогрессирующей внешней офтальмоплегии, дефицит CPT I, дефицит CPT II, синдром Кернса-Сейра, лактоацидоз, дефицит ацил-КоА дегидрогеназы жирных кислот с длинной цепью, синдром Ли, болезнь Люффа, глутаровую ацидурию II типа, митохондриальную цитопатию, истощение митохондриальной ДНК, митохондриальную энцефалопатию, митохондриальную миопатию и синдром Пирсона), метаболические заболевания и расстройства (например, дефицит аминокислот), заболевания, вызванные митохондриальным и энергетическим дефицитом (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона), деменцию, липодистрофию, стеатоз печени, гепатит, цирроз, почечную недостаточность, преэклампсию, мужское бесплодие, ожирение, диабет (например, диабет типа I), мышечные расстройства и мышечные истощения.

В некоторых вариантах осуществления NMN может быть использован для повышения жизнеспособности клеток (в различных образцах), ремоделирования сосудов, заживления ран и исцеления вообще (например, лечение ран, вызванных порезами, царапинами, хирургическими операциями, телесными повреждениями, травмами, ожогами, ссадинами, солнечными ожогами и т.д.). В некоторых вариантах осуществления способы и композиции могут быть использованы для продвижения гомеостаза железа и/или эритропоэза. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, предлагаемые в настоящем документе, могут быть использованы для содействия успешной трансплантации органов и тканей или для способствования восстановлению после трансплантации органов и тканей. В некоторых вариантах осуществления предлагаемые способы и композиции могут быть использованы для сохранения клеток и органов. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции, предложенные в настоящем документе, имеют косметические применения, например для лечения состояний, связанных с дисфункцией митохондрий, которые относятся к коже или волосистой части головы/волосам, таким как старение кожи (например, потеря объема и эластичности, обесцвечивание, печеночные пятна (лентиго сенсисис)), морщины, облысение и потеря пигментации волос. В некоторых вариантах осуществления агенты или композиции, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для продуктов или способов, относящихся к косметике, энергетическим напиткам и/или животным и растительным отраслям (например, домашний скот, домашние животные и сельскохозяйственные продукты).

Субъекты, которых можно лечить, как описано в настоящем документе, включают эукариоты, такие как млекопитающие, например люди, овцы, быки, лошади, свиньи, псовые, кошачьи, приматы, не относящиеся к человеку, мыши и крысы. Клетки, которые можно лечить, включают эукариотические клетки, например от субъекта, описанного выше, или растительные клетки, дрожжевые клетки и прокариотические клетки, например, бактериальные клетки. Например, NMN можно вводить сельскохозяйственным животным для улучшения их способности выдерживать условия ведения сельского хозяйства более длительное время.

Соединение также может быть использовано для увеличения продолжительности жизни, устойчивости к стрессу и устойчивости к апоптозу у растений. В некоторых вариантах осуществления NMN применяется на растениях, например на периодической основе, или на грибах. В других вариантах осуществления растения являются генетически модифицированными для продуцирования NMN. В других вариантах осуществления растения и фрукты обрабатывают NMN перед сбором и доставкой для повышения устойчивости к повреждениям во время транспортировки. Семена растений также могут быть подвергнуты контактированию с NMN, например, для их защиты.

Соединение также может быть использовано для увеличения продолжительности жизни, устойчивости к стрессу и устойчивости к апоптозу у растений. В некоторых вариантах осуществления NMN мо-

жет применяться на полезных насекомых, например, пчелах и других насекомых, которые участвуют в опылении растений. В предпочтительных вариантах осуществления NMN могут применяться на пчелах, участвующих в производстве меда. Как правило, описанные в настоящем документе способы, могут быть применены к любому организму, например эукариоту, который может иметь коммерческое значение. Например, они могут применяться к рыбам (аквакультура), креветкам, свиньям и птицам (например, цыпляткам и курица).

Другие виды использования NMN включают благоприятную модуляцию микробиома или служат в виде витамина B3. В качестве предшественника NAD NMN может также служить в анализах заболеваний и состояний, зависящих от биосинтеза NAD, таких как использование в качестве стандарта.

В данном контексте терапевтический агент, который "предупреждает" расстройство или патологическое состояние, относится к соединению, которое в статистической выборке приводит к снижению возникновения расстройства или патологического состояния в получающем лечение образце относительно не получающего лечение контрольного образца, или задерживает возникновение, или снижает тяжесть одного или более симптомов расстройства или патологического состояния относительно не получающего лечение контрольного образца. Таким образом, профилактика рака включает в себя, например, уменьшение количества обнаруживаемых раковых опухолей в группе пациентов, получающих профилактическое лечение по сравнению с не получающей лечение контрольной группой, и/или замедление появления обнаруживаемых раковых опухолей у получающей лечение группы по сравнению с не получающей лечение контрольной группой, например статистически и/или клинически значимое количество. Профилактика инфекции включает, например, уменьшение числа диагнозов инфекции у получающей лечение группы по сравнению с не получающей лечение контрольной группой и/или задержку появления симптомов инфекции у получающей лечение группы по сравнению с не получающей лечение контрольной группой. Предотвращение боли включает, например, уменьшение величины или, альтернативно, задержек, ощущений боли, испытываемых субъектами у получающей лечение группы по сравнению с не получающей лечение контрольной группой.

Термин "лечение" включает профилактическое и/или терапевтическое лечение. Термин "профилактическое или терапевтическое" лечение признан в данной области и включает введение хозяину одной или нескольких рассматриваемых композиций. При введении до клинического проявления нежелательного состояния (например, заболевания или иного нежелательного состояния животного-хозяина) лечение является профилактическим (т.е. защищает хозяина от развития нежелательного состояния), а при введении после проявления нежелательного состояния лечение является терапевтическим (т.е. предназначено для уменьшения, облегчения или стабилизации существующего нежелательного состояния или его побочных эффектов).

Фармацевтические композиции.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим кристаллическое соединение формулы (I) и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, а также к препаратам, полученным с использованием такого кристаллического соединения и одного или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты могут использоваться для лечения или предотвращения состояния или заболевания, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты имеют достаточно низкую пирогенную активность для того, чтобы быть пригодными для внутривенного применения у человека. Изобретение также относится к препаратам, подходящим для нутрицевтических, ветеринарных и сельскохозяйственных нужд.

Примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов представлены в настоящем документе и включают, например, связующие вещества, разрыхляющие агенты, смазывающие вещества, корригенты, солюбилизующие агенты, суспендирующие вещества, эмульгаторы, агенты для покрытия, циклодекстрины и/или буферы. Хотя дозы будут меняться в зависимости от симптомов, возраста и массы тела пациента, природы и тяжести расстройства, которое подлежит лечению или профилактике, способа введения и формы лекарственного средства, обычно для взрослого пациента человека рекомендуется суточная доза соединения от 0,01 до 3000 мг, которую можно вводить за один прием или за несколько приемов. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя с целью получения разовой лекарственной формы, обычно будет представлять собой такое количество соединения, которое обеспечивает терапевтический эффект.

Точное время введения и/или количество композиции, которая даст наиболее эффективные результаты с точки зрения эффективности лечения у данного пациента, будет зависеть от активности, фармакокинетики и биодоступности конкретного соединения, физиологического состояния пациента (включая возраст, пол, тип заболевания и стадию, общее физическое состояние, отзывчивость к данной дозировке и тип лекарственного средства), способа введения и т.д. Однако приведенные выше руководящие принципы могут быть использованы в качестве основы для тонкой настройки лечения, например определения оптимального времени и/или количества введения, что потребует не более чем рутинного эксперимента, состоящего в контроле за субъектом и корректировке дозировки и/или времени.

В некоторых вариантах осуществления индивидуумом, которому вводится композиция, является

млекопитающее, такое как человек, или млекопитающее, не являющееся человеком. При введении животному, такому как человек, композицию или соединение предпочтительно вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, соединение по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области и включают, например, водные растворы, такие как вода или физиологически забуференный солевой раствор, или другие растворители, или такие транспортные средства, как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло или инъеклируемые органические сложные эфиры. В предпочтительном варианте осуществления, когда такие фармацевтические композиции предназначены для введения человеку, в частности, для инвазивных путей введения (т.е. путей, таких как инъекция или имплантация, которые обходят транспорт или диффузию через эпителиальный барьер), водный раствор является непирогенным или по существу непирогенным. Эксципиенты могут быть выбраны, например, для осуществления замедленного высвобождения агента или избирательного нацеливания на одну или несколько клеток, тканей или органов. Фармацевтическая композиция может быть в виде дозированной формы, такой как таблетка, капсула (включая вскрываемую капсулу и желатиновую капсулу), гранула, лиофилизат для приготовления раствора, порошок, раствор, сироп, суппозиторий, инъекцию или тому подобное. Композиция может также присутствовать в трансдермальной системе доставки, например, на кожу. Композиция может также присутствовать в растворе, подходящем для местного введения, таком как глазные капли для введения через офтальмологическую слизистую оболочку.

Фармацевтически приемлемый носитель может содержать физиологически приемлемые агенты, которые действуют, например, для стабилизации, увеличения растворимости или для увеличения поглощения соединения, такого как соединение по изобретению. Такие физиологически приемлемые агенты включают, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы или эксципиенты. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, включая физиологически приемлемый агент, зависит, например, от способа введения композиции. Препарат или фармацевтическая композиция может представлять собой систему лекарственной доставки с самопроизвольным образованием эмульсии или систему лекарственной доставки с самопроизвольным образованием микроэмульсии. Фармацевтическая композиция (препарат) также может быть липосомой или другой полимерной матрицей, которая может включать, например, соединение по изобретению. Липосомы, например, которые включают фосфолипиды или другие липиды, являются нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просты в приготовлении и введении.

Выражение "фармацевтически приемлемый" в данном контексте используют для обозначения тех соединений, веществ, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерно с разумным соотношением пользы/риска.

Используемая в настоящем документе фраза "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такие как жидкое или твердое вещество-наполнитель, разбавитель, эксципиент, растворитель или инкапсулирующий материал. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и безвредности для пациента. Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают:

- (1) сахар, такой как лактоза, глюкоза и сахароза;
- (2) крахмал, такой как кукурузный крахмал и картофельный крахмал;
- (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы;
- (4) порошок трагаканта;
- (5) солод;
- (6) желатин;
- (7) тальк;
- (8) эксципиенты, такие как масло какао и суппозиторные воски;
- (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло;
- (10) гликоли, такие как пропиленгликоль;
- (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль;
- (12) эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат;
- (13) агар;
- (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия;
- (15) альгиновую кислоту;
- (16) апирогенную воду;
- (17) изотонический раствор натрия хлорида;
- (18) раствор Рингера;

- (19) этиловый спирт;
- (20) фосфатные буферные растворы; и
- (21) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических препаратах.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются непиrogenными, т.е. не вызывают заметного повышения температуры при введении пациенту.

Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к относительно нетоксичным солям соединения неорганических и органических кислот. Эти соли могут быть получены *in situ* во время конечного выделения и очистки соединений или путем отдельного взаимодействия очищенного соединения в его форме свободного основания с подходящей органической или неорганической кислотой и выделением образованной таким образом соли. Характерные соли включают гидробромидные, гидрохлоридные, сульфатные, бисульфатные, фосфатные, нитратные, ацетатные, валератные, олеатные, пальмитатные, стеаратные, лауратные, бензоатные, лактатные, фосфатные, тозилатные, цитратные, малеатные, фумаратные, сукцинатные, тартратные, нафтиллатные, мезилатные, глюкогептонатные, лактобионатные, лаурилсульфонатные соли и соли аминокислот и т.п. Получение кристаллических солей подробно описано в примерах далее (см., например, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

В других случаях соединения, которые могут быть использованы в способах по настоящему изобретению, могут содержать одну или несколько кислотных функциональных групп и, таким образом, способны образовывать фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемыми основаниями. Термин "фармацевтически приемлемые соли" в этих случаях относится к солям присоединения относительно нетоксичных неорганических и органических оснований. Эти соли также могут быть получены *in situ* во время конечного выделения и очистки соединения или путем отдельного взаимодействия очищенного соединения в его свободной кислотной форме с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла, с аммиаком или с фармацевтически приемлемым органическим первичным, вторичным или третичным амином. Характерные соли щелочных или щелочно-земельных металлов включают соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и т.п. Характерные органические амины, пригодные для образования основно-аддитивных солей, включают этиламин, диэтиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин и т.п. (см., например, Berge et al., выше).

Фармацевтическая композиция (препарат) может вводиться субъекту любым из ряда путей введения, включая, например, перорально (например, жидкие лекарственные формы для перорального введения в виде водных или неводных растворов или суспензий, таблетки, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык); путем абсорбции через слизистую оболочку полости рта (например, сублингвально); анально, ректально или вагинально (например, в виде пессария, крема или пены); парентерально (включая внутримышечно, внутривенно, подкожно или интратекально, например стерильный раствор или суспензия); интраназально; внутрибрюшинно; подкожно; трансдермально (например, в виде пластыря, наносимого на кожу); и местно (например, в виде крема, мази или аэрозоля, наносимых на кожу, или в виде глазных капель). Соединение также может быть в составе препарата для ингаляции. В некоторых вариантах осуществления соединение может быть просто растворено или суспендировано в стерильной воде. Подробная информация о соответствующих путях введения и композициях, подходящих для них, может быть найдена, например, в патентах США № 6110973, 5763493, 5731000, 5541231, 5427798, 5358970 и 4172896, а также в патентах, цитируемых в них.

Композиции могут быть удобно представлены в стандартной дозированной форме и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом носителя для получения разовой лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от хозяина, проходящего лечение, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя с целью получения разовой лекарственной формы, обычно будет представлять собой такое количество соединения, которое обеспечивает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество будет варьироваться от примерно 1 до примерно 99% активного ингредиента, предпочтительно от примерно 5% до примерно 70%, наиболее предпочтительно от примерно 10% до примерно 30%.

Способы получения этих составов или композиций включают стадию объединения активного соединения, такого как соединение по изобретению, с носителем и, необязательно, одним или более вспомогательными ингредиентами. Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения соединения по настоящему изобретению с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми веществами носителя или ими обоими, а затем, при необходимости, формованием продукта.

Препараты по изобретению, подходящие для перорального введения, могут быть в виде капсул (в том числе вскрываемых капсул и желатиновых капсул), облаток, пилюль, таблеток, лепешек (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской камеди или трагаканта), лиофилизованного порошка, порошков, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертного основания, такого как желатин и глицерин, сахароза и ара-

вийская камедь), и/или в виде полосканий для полости рта и тому подобное, любое из которых содержит заданное количество соединения по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента. Композиции или соединения также могут быть введены в виде боллуса, электуария или пасты.

При получении твердых лекарственных форм для перорального введения капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и тому подобное), активный ингредиент смешивают с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или любым из следующих: (1) наполнители или сухие разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхляющие агенты, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или маниоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедлители растворения, такие как парафин; (6) ускорители поглощения, такие как соединения четвертичного аммония; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбенты, такие как каолиновая и бентонитовая глина; (9) смазывающие вещества, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; (10) комплексообразователи, такие как модифицированные и немодифицированные циклодекстрины; и (11) красители. В случае капсул (в том числе вскрываемых капсул и желатиновых капсул), таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также содержать буферные агенты. Кроме того, твердые композиции подобного типа могут применяться в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с применением таких эксципиентов как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярных полиэтиленгликолей и тому подобное.

Таблетка может быть изготовлена путем прессования или формования, необязательно с одним или более вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены с использованием связующего (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя (например, натрия крахмалгликолята или сшитой натрий карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки могут быть изготовлены путем формования в подходящей машине смеси порошкообразного соединения, смоченного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые лекарственные формы фармацевтических композиций, такие как драже, капсулы (в том числе вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), пилюли и гранулы, могут быть дополнительно помечены риской или изготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечные покрытия и другие покрытия, хорошо известные в фармацевтической области. Кроме того, они могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента с применением, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в варьирующихся пропорциях, чтобы обеспечить желательный профиль высвобождения, других полимерных матриц, липосом, микросфер и/или наночастиц. Они могут быть стерилизованы путем, например, фильтрации через удерживающий бактерии фильтр, или путем введения стерилизующих агентов в виде стерильных твердых веществ, которые могут быть растворены в стерильной воде или какой-либо другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед использованием. Такие композиции дополнительно могут, необязательно, содержать замутнители и могут представлять собой композиции, которые высвобождают активный(е) ингредиент(ы) только или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, в замедленной форме. Примерами имплантируемых композиций, которые могут быть использованы, являются полимерные вещества и воски. Кроме того, активный ингредиент может находиться в микроинкапсулированной форме, если это уместно, с одним или более вышеописанными эксципиентами.

Жидкие лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают фармацевтически приемлемые эмульсии, лиофилизаты для приготовления раствора, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активному ингредиенту жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в данной области техники, например, такие как вода или другие растворители, циклодекстрины и их производные, солубилизирующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбитана, а также их смеси.

Помимо инертных разбавителей, композиции по настоящему изобретению могут также включать адьюванты, такие как увлажняющие агенты, смазывающие вещества, эмульгирующие и суспендирующие агенты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, или подслащивающие, придающие вкус, окрашивающие, ароматизирующие, консервирующие или антиоксидантные агенты.

Суспензии, помимо активных соединений, могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, эфиры полиоксиэтиленсорбитана и сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метгидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант и их смеси.

Препараты фармацевтических композиций для ректального, вагинального или уретрального введе-

ния могут быть представлены в виде суппозитория, который может быть изготовлен путем смешивания одного или нескольких активных соединений с одним или несколькими подходящими нераздражающими эксципиентами или носителями, включающими, например, масло какао, полиэтиленгликоль, суппозиторный воск или салицилат, и который является твердым веществом при комнатной температуре, но жидким при температуре тела и, следовательно, расплавится в прямой кишке или влагалищной полости и высвободит активное соединение.

Препараты фармацевтических композиций для введения в рот могут быть представлены в виде полоскания для полоскания рта, орального спрея или оральной мази.

Альтернативно или дополнительно композиции могут быть приготовлены для доставки через катетер, стент, проволоку или другое внутрисосудистое устройство. Доставка через такие устройства может быть особенно эффективна для доставки в мочевой пузырь, уретру, мочеточник, прямую кишку или кишечник.

Препараты, пригодные для вагинального введения, включают также pessaries, тампоны, кремы, гели, пасты, пенки или препараты в форме спрея, содержащие такие носители, которые известны из уровня техники как подходящие.

Дозированные формы для местного или трансдермального введения включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингалятор. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать в дополнение к активному соединению эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевые кислоты, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи могут содержать в дополнение к активному соединению эксципиенты, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси этих веществ. Спреи могут дополнительно содержать обычные пропелленты, такие как хлорфторуглеродороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Соединения, описанные в настоящем документе, могут альтернативно вводиться с помощью аэрозоля. Это достигается путем приготовления водного аэрозоля, липосомального препарата или твердых частиц, содержащих композицию. Можно применять неводную суспензию (например, фторуглеродный пропеллент). Ультразвуковые небулайзеры предпочтительны, поскольку они минимизируют воздействие агента на сдвиг, что может привести к разрушению соединения.

Обычно водный аэрозоль получают путем приготовления водного раствора или суспензии агента вместе с обычными фармацевтически приемлемыми носителями и стабилизаторами. Носители и стабилизаторы варьируются в зависимости от требований конкретной композиции, но обычно включают неионные поверхностно-активные вещества (твинны, плуроники, сорбитановые эфиры, лецитин, кремофору), фармацевтически приемлемые соразворители, такие как полиэтиленгликоль, безвредные белки, такие как сывороточный альбумин, олеиновая кислота, аминокислоты, такие как глицин, буферы, соли, сахара или сахарные спирты. Аэрозоли обычно получают из изотонических растворов.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, обеспечивающее контролируемую доставку соединения по настоящему изобретению в организм. Такие лекарственные формы могут быть получены путем растворения или диспергирования активного соединения в соответствующей среде. Усилители абсорбции также могут использоваться для увеличения проникновения соединений через кожу. Скоростью такого проникновения можно управлять с помощью контролирующей скорость мембраны или диспергируя соединение в полимерной матрице или геле.

Офтальмологические составы, глазные мази, порошки, растворы и тому подобное также рассматриваются как входящие в объем настоящего изобретения. Примеры офтальмологических составов описаны в публикациях US 2005/0080056, 2005/0059744, 2005/0031697 и 2005/004074 и патенте США № 6583124, содержание которых включено в настоящий документ путем ссылки. При желании жидкие офтальмологические составы могут обладать свойствами, аналогичными свойствам слезных жидкостей, водянистой влаги глаза или стекловидного тела, или совместимы с такими жидкостями. Предпочтительным способом введения является местное введение (например, местное введение, такое как глазные капли или введение через имплантат).

Как используется в настоящем документе, фразы "парентеральное введение" и "вводимые парентерально" означают способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно путем инъекций, и включают, без ограничения, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интраклеточные, внутрикапсулярные, внутриорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, внутриспинальные и внутрисуставные инъекцию и инфузию. Фармацевтическая композиция, подходящая для парентерального введения, включает одно или более активных соединений в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые могут

быть восстановлены в стерильные инъекционные растворы или дисперсии непосредственно перед использованием, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостаты, растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной с кровью предполагаемого реципиента или суспендирующих или загущающих агентов.

Выражения "системное введение", "вводимый системно", "периферическое введение" и "вводимый периферически", как используется в данном описании, обозначают введение лиганда, лекарственного средства или другого материала способом, за исключением непосредственного введения в центральную нервную систему, таким образом, что они поступают в организм пациента и, следовательно, подвергаются метаболизму и другим подобным процессам, например, подкожное введение.

Примерами подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по изобретению, являются вода, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, применением материалов покрытия, таких как лецитин, поддержанием необходимого размера частиц в случае дисперсий и применением поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть обеспечено введением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и тому подобное. Также может быть желательным введение в композиции агентов для поддержания изотоничности, таких как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута введением агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как алюминия моностеарат и желатин.

В некоторых случаях, чтобы продлить действие лекарственного средства, желательно замедлить абсорбцию лекарственного средства при подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть достигнуто за счет использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала с низкой растворимостью в воде. Скорость поглощения препарата затем зависит от его скорости растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. Альтернативно, замедление абсорбции парентерально вводимой лекарственной формы осуществляется путем растворения или суспендирования лекарственного средства в масляном транспортном средстве.

Формы для инъекционных депо изготавливают путем формирования микрокапсулированных матриц рассматриваемых соединений в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, а также природы конкретного применяемого полимера, можно управлять скоростью высвобождения лекарственного средства. Примеры других биodeградируемых полимеров включают поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды). Кроме того, препараты для инъекционных депо получают, включая лекарственное средство в липосомы, микроэмульсии или наноземульсии, которые совместимы с тканью организма.

Препараты агентов могут быть введены перорально, парентерально, местно или ректально. Конечно, их применяют в формах, подходящих для каждого из способов введения. Например, они вводятся в виде таблеток или капсул, путем инъекций, ингаляции, лосьона для глаз, мази, суппозитория, инфузии; местно лосьоном или мазью; и ректально суппозиториями. Предпочтительным является пероральное введение.

Для использования в способах по настоящему изобретению активные соединения могут быть предоставлены сами по себе или в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, от 0,1 до 99,5% (более предпочтительно, от 0,5 до 90%) активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Способы введения могут также обеспечиваться перезаряжаемыми или биоразлагаемыми устройствами. В последние годы разработаны и протестированы различные полимерные устройства с медленным высвобождением *in vivo* для контролируемой доставки лекарств, включая белковые биофармацевтические препараты. Множество биосовместимых полимеров (включая гидрогели), включая как биodeградируемые, так и нерастворимые полимеры, могут быть использованы для формирования имплантата для длительного высвобождения соединения в конкретном мишеневом участке.

Эти соединения могут быть введены людям и другим животным для лечения любым подходящим способом введения, в том числе перорально, назально, например с помощью распыления, ректально, интравагинально, парентерально, внутримышечно и местно, в виде порошков, мазей или капель, включая буккально и сублингвально.

Независимо от выбранного способа введения соединения, которые могут быть использованы в подходящей гидратированной форме и/или фармацевтические композиции по настоящему изобретению, формуют в фармацевтически приемлемые лекарственные формы обычными способами, известными специалистам в данной области.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях, предложенных в данном описании, можно варьировать для получения количества активного ингредиента, которое

будет эффективным с точки зрения достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсического воздействия на пациента.

Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного соединения или комбинации соединений, или сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выделения конкретного(ых) соединения(ий), продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или веществ, используемых в сочетании с конкретным(ми) соединением(ями), возрастом, полом, весом, состоянием, общим здоровьем и предшествующей медицинской историей пациента, проходящего лечение, и подобных факторов, хорошо известных в медицине. Как правило, композиции по настоящему изобретению могут быть представлены в водном растворе, содержащем примерно 0,1-30 мас./об.% соединения, описанного в настоящем документе, помимо других веществ, для парентерального введения. Типичные диапазоны доз варьируются приблизительно от 0,01 до примерно 50 мг/кг массы тела в день, даваемые в виде 1 разовой дозы или 2-4 отдельных доз. Каждая раздельная доза содержит одно и то же или различные соединения по изобретению.

Врач или ветеринар, являющийся обычным специалистом в данной области, может легко определить и назначить терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с дозы фармацевтической композиции или соединения на уровнях ниже, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" соединения по отношению к рассматриваемому способу лечения относится к количеству соединения (соединений) в препарате, которое при введении в виде части желаемого режима дозирования (для млекопитающего, предпочтительно человека) облегчает симптом, улучшает состояние или замедляет возникновение заболеваний в соответствии с клинически приемлемыми стандартами для расстройства или состояния, подлежащего лечению, или косметической целью, например, при разумном соотношении выгоды/риска, применимом к любому медицинскому лечению. Обычно понятно, что эффективное количество соединений будет варьироваться в зависимости от веса, пола, возраста и истории болезни субъекта. Другие факторы, которые влияют на эффективное количество, могут включать в себя, но не ограничиваются ими, тяжесть состояния пациента, расстройство, подвергаемое лечению, стабильность соединения, при желании, другой тип терапевтического агента, вводимого с соединением по изобретению. Большую общую дозу можно доставлять несколькими приемами агента. Способы определения эффективности и дозировки известны специалистам в данной области (Isselbacher et al. (1996) *Harrison's Principles of Internal Medicine* 13 ed., 1814-1882, включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Обычно подходящей суточной дозой активного соединения, используемого в композициях и способах по изобретению, будет такое количество соединений, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно зависит от факторов, описанных выше.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более поддоз, вводимых отдельно через соответствующие интервалы в течение дня, необязательно, в единичных дозированных формах. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения активное соединение можно вводить два или три раза в день. В предпочтительных вариантах осуществления активное соединение будет вводиться один раз в день.

Пациентом, получающим такое лечение, является любое животное, нуждающееся в помощи, включая приматов, в частности людей, и других млекопитающих, таких как лошади, крупный рогатый скот, свиньи и овцы; и домашняя птица и домашние животные в целом.

В некоторых вариантах осуществления соединения по изобретению могут использоваться отдельно или вводиться совместно с другим видом терапевтического агента. Как используется в настоящем документе, термин "совместное введение" относится к любой форме введения двух или более различных терапевтических соединений, так что второе соединение вводится, тогда как ранее введенное терапевтическое соединение все еще эффективно в организме (например, оба соединения одновременно эффективны у пациента, что может включать синергические эффекты двух соединений). Например, различные терапевтические соединения могут вводиться либо в том же препарате, либо в отдельном препарате, как одновременно, так и последовательно. В некоторых вариантах осуществления различные терапевтические соединения можно вводить с интервалом в 1, 12, 24, 36, 48, 72 ч или недели друг от друга. Таким образом, индивидуум, получающий такое лечение, может воспользоваться комбинированным эффектом различных терапевтических соединений.

Данное изобретение включает применение фармацевтически приемлемых солей соединений по изобретению в композициях и способах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления предполагаемые соли по изобретению включают, но не ограничиваются ими, алкильные, диалкильные, триалкильные или тетраалкиламмониевые соли. В некоторых вариантах осуществления предполагаемые соли по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, соли L-аргинаина, бенетамина, бензатина, бетаина, гидроксида кальция, холина, динола, диэтаноламина, диэтиламина, 2-(диэтиламино)этанол, этаноламина, этилендиамина, N-метилглюкамина, гидрабамина, 1H-имидазола, лития, L-лизина, магния, 4-(2-гидроксиэтил)морфолина, пиперазина, калия, 1-(2-гидроксиэтил)пирроли-

дина, натрия, триэтаноламина, трометамина и цинка. В некоторых вариантах осуществления предполагаемые соли по изобретению включают, но не ограничиваются ими, соли Na, Ca, K, Mg, Zn или других металлов.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот могут также существовать в виде различных сольватов, таких как с водой, метанолом, этанолом, диметилформамидом, диметилсульфоксидом и тому подобное. Также может быть получена смесь таких сольватов. Источником такого сольвата может быть растворитель кристаллизации, соответствующий растворителю при получении или кристаллизации, или побочный по отношению к такому растворителю. В некоторых вариантах осуществления сольват описанного соединения может быть сольватом с диметилсульфоксидом.

Кроме того, в композициях могут присутствовать увлажняющие агенты, эмульгаторы и смазывающие агенты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, разделительные агенты, покрытия, подсластители, вкусовые добавки и ароматизаторы, консерванты и антиоксиданты.

Примерами фармацевтически приемлемых антиоксидантов являются: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, мета-бисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, α -токоферол и тому подобное; и (3) хелатные агенты для металлов, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбитол, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

Изобретение, таким образом, в основном описано, оно будет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые включены просто для целей иллюстрации некоторых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

Примеры

Аналитические методы для примеров 1-5.

Рентгеновская порошковая дифрактометрия.

Рентгеновские порошковые дифрактограммы получали на дифрактометре Bruker D8 с использованием излучения Cu K α (40 кВ, 40 мА), θ -2 θ гониометр, расходимость V4 и приемные щели, монохроматор Ge и детектор Lynxeye. Прибор проверяется производительностью с использованием сертифицированного стандарта Corundum (NIST 1976). Программное обеспечение, используемое для сбора данных, было Diffrac Plus XRD Commander v2.6.1, и данные были проанализированы и представлены с использованием Diffrac Plus EVA v15.0.0.0.

Образцы исследовали в условиях окружающей среды в виде плоских пластинчатых образцов, используя порошок в том виде, как получен. Образец осторожно упаковывали в полость, разрезанную на полированную кремниевую пластину с нулевым фоном (510). В процессе анализа образец поворачивался в своей плоскости.

Подробности сбора данных:

угловой диапазон: от 2 до 42°2 θ ;

размер шага: 0,05°2 θ ;

время собирания: 0,5 с/шаг.

ВЭЖХ.

Анализ чистоты осуществляли на системе серии Agilent HP1100, оборудованной детектором диодной матрицы, и с использованием программного обеспечения ChemStation vB.04.03 с использованием метода, подробно описанного ниже в табл. 1.

Таблица 1. Параметры ВЭЖХ

Параметр	Значение	
Тип способа	Реверсированная фаза с градиентным элжированием	
Подготовка образца	1 мг/мл в водном 20 мМ ацетате аммония, pH 5,0	
Колонка	Waters Atlantis C18, 100Å, 3 мкм	
Температура колонки	25°C	
Объем инъекции:	5 мкл	
Длина волны детектора, пропускная способность	254 нм, 4 нм	
Скорость потока	1,0 мл/мин.	
Подвижная фаза А	20 мМ водный ацетат аммония, pH 5,0	
Подвижная фаза В	метанол	
Градиентный график	Время (мин.)	% подвижной фазы А
	0	100
	5	5
	8	5
	8,1	100
	16,1	100

Поляризованная световая микроскопия (PLM).

Образцы изучали на поляризованном световом микроскопе Leica LM/DM с цифровой видеокамерой для захвата изображения. Небольшое количество каждого образца помещали на стеклянную пластинку, 15 установленную в иммерсионном масле и покрытую стеклом скольжения, причем отдельные частицы были как можно более разделены. Образец рассматривался с соответствующим увеличением и частично поляризованным светом, соединенным с X ложно-цветным фильтром.

Пример 1. Синтез формы 1 путем кристаллизации из метанола.

В стеклянный сосуд отвешивали аморфный никотинамид мононуклеотид (565 мг) и добавляли метанол (10,0 мл). Полученную взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч и затем добавляли дополнительную порцию MeOH (10,0 мл). Имеющееся твердое вещество белого цвета выделяли путем фильтрования и затем сушили в вакууме при комнатной температуре в течение приблизительно 16 ч с получением кристаллического формы 1 β -никотинамида мононуклеотида, как показано порошковым рентгеноструктурным анализом (459 мг, выход 81%).

Пример 2. Синтез формы 1 путем кристаллизации из воды.

В стеклянный сосуд отвешивали аморфный β -никотинамид мононуклеотид (605 мг) и добавляли деионизированную воду (600 мкл). После кратковременного встряхивания образовывался прозрачный раствор. Часть этого раствора (приблизительно 200 мкл) распределяли в отдельный сосуд и охлаждали до 5°C в течение приблизительно 16 ч. Выделенное белое твердое вещество выделяли фильтрованием и, как показал порошковый рентгеноструктурный анализ, оно представляло собой кристаллический форму 1 β -никотинамида мононуклеотида (выход не определялся).

Пример 3. Синтез формы 1 путем диффузии паров для SCXRD.

В стеклянный сосуд отвешивали аморфный β -никотинамид мононуклеотид (605 мг) и добавляли деионизированную воду (600 мкл). После кратковременного встряхивания образовывался прозрачный раствор. Часть этого раствора (100 мкл) распределяли в отдельный сосуд, который помещали в больший сосуд, содержащий метанол (500 мкл), так что пары могли свободно диффундировать между обоими сосудами. Больший сосуд герметизировали и выдерживали при комнатной температуре в течение приблизительно 16 ч, после чего образовывалось белое твердое вещество. Отбирали образец этого твердого вещества, и с помощью SCXRD было показано, что это кристаллическая форма 1 β -никотинамида мононуклеотида.

Пример 4. Синтез формы 2.

В стеклянный сосуд отвешивали аморфный β -никотинамид мононуклеотид (568 мг) и добавляли ДМСО (10,0 мл). Полученную взвесь перемешивали при комнатной температуре в течение приблизительно 20 ч. Имеющееся твердое вещество белого цвета затем выделяли путем фильтрования, промывали ацетоном (3×1 мл) и сушили в вакууме при комнатной температуре в течение приблизительно 16 ч с получением кристаллического формы 2 β -никотинамида мононуклеотида (501 мг, выход 72%*).

*на основании предположения, что вещество представляет собой моносолеват с ДМСО.

Пример 5. Исследование трехмесячной стабильности и форсированной деградации аморфного и кристаллического NMN.

Образцы аморфного NMN и NMN кристаллической формы 1 хранили в виде твердых веществ при 25°C/0% относительной влажности (RH) и 40°C/75% RH в течение трех месяцев. Образцы были подготовлены в двух экземплярах со смещением в 2 недели. Каждый репликат хранился в разном контейнере.

Реплика 1 помещали в открытый сосуд для ВЭЖХ, который помещали в герметичный сцинтилляционный флакон, содержащий насыщенный раствор соответствующей неорганической соли (табл. 2). Эти образцы анализировали с помощью ВЭЖХ, ¹H ЯМР, XRPD и поляризованной световой микроскопии (PLM) во временных точках 4, 8 и 12 недель.

Реплика 2 хранился в герметичной коробке с реципиентом, содержащим насыщенный раствор соответствующей неорганической соли (табл. 2). Эти образцы анализировали с помощью ВЭЖХ во временных точках 2, 6, 10 и 12 недель. Образцы при 25°C/0% относительной влажности хранились в герметичной коробке, содержащей осушитель (P₂O₅).

Таблица 2

Условия	Неорганическая соль/ Агент адсорбции
25°C/0% RH	P ₂ O ₅
25°C/60% RH	NH ₄ NO ₃
25°C/97% RH	K ₂ SO ₄
40°C/75% RH	NaCl

Аморфное вещество оставалось без изменений с точки зрения формы твердого вещества и морфологии частиц после хранения в течение 12 недель при 25°C, 0% относительной влажности. Снижение чистоты наблюдалось с 98,2% (время 0) до 95,5% (время 12 недель). Основное возрастающее загрязнение, наблюдаемое с помощью ВЭЖХ, элюировали при RRT 1,73 и оно соответствовало никотинамиду (2,8% во временной точке 12 недель) (см. табл. 3 и 4).

Таблица 3. Профили чистоты по ВЭЖХ аморфного NMN и кристаллической формы 1 NMN при t=0

J07086 (аморфный)		RME-1304-063-01 (кристаллический)	
RRT	% площади	RRT	% площади
0,70	0,47	0,69	0,15
0,76	0,10	0,75	0,09
1,00	98,56	1,00	99,52
-	-	1,31	0,06
-	-	1,46	0,01
-	-	1,48	0,03
-	-	1,53	0,01
1,76	0,87	1,74	0,12

Аморфный материал кристаллизуется при хранении при менее 25% или большей относительной влажности, давая форму 1 с игольчатой морфологией. Было показано, что химическая чистота уменьшается при хранении во всех испытанных условиях, особенно при 40°C/75% RH. Основное наблюдаемое возрастающее загрязнение также представляло собой никотинамид (RRT=1,73). Чистота вещества после 12 недель при 40°C/75% относительной влажности определялась как 67,5% (реплика 2), а содержание никотинамида составляло 20,6%.

Кристаллическая форма 1 оставалась без изменений с точки зрения твердого вещества и морфологии частиц при всех условиях испытаний. Вещество оставалось химически чистым (~99,3%) после 4 недель хранения при всех условиях испытаний. Небольшое падение чистоты наблюдалось за пределами этой временной точки. Хранение при 25°C/0% RH оказалось наиболее благоприятным условием для стабильности образца, так как анализ через 12 недель показал, что образец имел чистоту 98,9% и содержание никотинамида 0,38%. Наибольшее изменение чистоты наблюдалось у образцов, хранящихся при высокой температуре (40°C) или высокой влажности (75% RH, 97% RH). Чистота снижалась с 99,5 до 95,8% после 12 недель при 25°C/97% RH и до 90,7% после 12 недель при 40°C/75% RH. Наиболее распространенным загрязнением во всех условиях являлся никотинамид (RRT=1,73 мин). Это загрязнение увеличилось с 0,12% (время 0) до 3,46% после 12 недель как при 40°C/75% RH, так и при 25°C/97% RH.

Результаты ВЭЖХ были совместимы между репликатами, однако более быстрое разложение наблюдалось у репликата 1. Возможное влияние мог бы оказывать меньший размер контейнеров, что потребовало бы меньше времени для уравнивания соответствующих условий хранения. В табл. 4-7 приведены результаты, полученные для репликатов 1 и 2.

Таблица 4. Исследование стабильности и форсированной деградации:
результаты для аморфного вещества репликата 1

ID образца	Условия	Временная точка	Данные наблюдений	XRPD	Чистота (%)	Известная примесь* (%)	PLM
J07087_25_0_4w	25°C, 0% RH	4 недели	твердое вещество белого цвета	Без изменений	96,9	1,81	Без изменений
J07087_25_0_8w		8 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	95,8	2,44	Без изменений
J07087_25_0_12w		12 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	95,0	2,81	Без изменений
J07087_25_60_4w	25°C, 60% RH	4 недели	твердое вещество коричневого цвета	Форма 1	96,9	2,13	игольчаты е частицы до ~75- 100 мкм
J07087_25_60_8w		8 недель	твердое вещество коричневого цвета, плотно упакованное	Форма 1	95,2	3,46	-
J07087_25_60_12w		12 недель	твердое вещество коричневого цвета, плотно упакованное	Форма 1	95,7	3,46	игольчаты е частицы до ~75- 100 мкм
J07087_25_97_4w	25°C, 97% RH	4 недели	твердое вещество белого цвета, очень влажное	Форма 1	97,1	2,44	игольчаты е частицы до ~75- 100 мкм
J07087_25_97_8w		8 недель	частично перешедший в жидкое состояние. жидкость желтого цвета	н.д.	-	-	-
J07087_25_97_12w		12 недель	перешедший в жидкое состояние. жидкость желтого цвета	н.д.	-	-	-
J07087_40_75_4w	40°C, 75% RH	4 недели	плотно упакованное твердо е вещество коричневого цвета	Форма 1	91,3	6,70	игольчаты е частицы до ~75- 100 мкм
J07087_40_75_8w		8 недель	плотно упакованное твердо е вещество коричневого цвета	Форма 1	76,9	14,23	-
J07087_40_75_12w		12 недель	твердое вещество, очень влажное черного цвета §	Форма 1	-	-	-

*никотинамид (RRT=1,73 мин).

§ Анализ ВЭЖХ не проводился, так как вес не мог быть стабилизирован для подготовки образца.
Спектры ¹H ЯМР согласуются со структурой вещества всех образцов.

Таблица 5. Исследование стабильности и форсированной деградации:
результаты для кристаллического вещества репликации 1

ID образца	Условия	Временная точка	Данные наблюдений	XRPD	Чистота (%)	Известная примесь* (%)	PLM
RME-1304-63-01_25_0_4w	25°C, 0% RH	4 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	99,4	0,25	игольчатые частицы до ~75 мкм
RME-1304-63-01_25_0_8w		8 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	99,2	0,33	игольчатые частицы до ~75 мкм
RME-1304-63-01_25_0_12w		12 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	98,9	0,38	игольчатые частицы до ~75 мкм
RME-1304-63-01_25_60_4w	25°C, 60% RH	4 недель	светло-коричневого цвета	Без изменений	99,3	0,34	игольчатые частицы до ~75 мкм
RME-1304-63-01_25_60_8w	60% RH	8 недель	светло-коричневого цвета твердое вещество, рыхлые частицы	Без изменений	98,9	0,63	игольчатые частицы до ~75 мкм
RME-1304-63-01_25_60_12w		12 недель	светло-коричневого цвета твердое вещество, рыхлые частицы	Без изменений	98,2	0,98	игольчатые частицы до ~75 мкм
RME-1304-63-01_25_97_4w		25°C, 97% RH	4 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	99,3	0,49
RME-1304-63-01_25_97_8w	25°C, 97% RH	8 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	98,3	1,38	игольчатые частицы до 75-100 мкм
RME-1304-63-01_25_97_12w		12 недель	твердое вещество белого цвета, влажное	Без изменений	95,8 [§]	3,46	игольчатые частицы <75 мкм
RME-1304-63-01_25_75_4w		40°C, 75% RH	4 недель	твердое вещество белого цвета	Без изменений	99,2	0,46
RME-1304-63-01_25_75_8w	40°C, 75% RH	8 недель	твердое вещество белого цвета с пятнами оранжевого цвета	Без изменений	97,7	1,38	игольчатые частицы до ~75 мкм
RME-1304-63-01_25_75_12w		12 недель	твердое вещество коричневого цвета, очень влажное	Без изменений	90,7	3,46	игольчатые частицы <75 мкм

*никотинамид (RRT=1,73 мин).

[§]Вес не может быть стабилизирован. Было принято приблизительное значение.

Спектры ¹H ЯМР согласуются со структурой вещества всех образцов.

Таблица 6. Результаты исследования форсированной деградации для аморфного вещества репликата 2

ID образца	Условия	Временная точка	Данные наблюдений	Чистота (%)	Известная примесь* (%)
J07087_25_60_2w	25°C, 60% RH	2 недели	твердое вещество светло-желтого цвета, очень плотно упакованное	97,4	2,14
J07087_25_60_6w		6 недель	светло-коричневое, плотно упакованное	97,4	2,06
J07087_25_60_10w		10 недель	светло-коричневое, плотно упакованное	96,0	2,92
J07087_R2_25_60_12w		12 недель	светло-коричневое, плотно упакованное	96,2	2,32
J07087_25_97_2w	25°C, 97% RH	2 недели	плотно упакованноетвердое вещество белого цвета	97,8	1,79
J07087_25_97_6w		6 недель	твердое вещество белого цвета, очень влажное	96,5	3,01
J07087_25_97_10w		10 недель	твердое вещество белого цвета, очень влажное	94,9	4,39
J07087_25_97_12w		12 недель	твердое вещество белого цвета, очень влажное	91,5	7,02
J07087_40_75_2w	40°C, 75% RH	2 недели	плотно упакованноетвердое вещество коричневого цвета	94,6	4,61
J07087_40_75_6w		6 недель	твердое вещество темно-коричневого цвета	88,0	8,22
J07087_40_75_10w		10 недель	твердое вещество черного цвета	75,9	16,18
J07087_R2_40_75_12w		12 недель	твердое вещество черного цвета, очень влажное	67,5 [§]	20,60

*никотинамид (RRT=1,73 мин).

[§]Вес не может быть стабилизирован. Было принято приблизительное значение.

Таблица 7. Результаты исследования форсированной деградации для аморфного вещества репликата 2

ID образца	Условия	Временная точка	Данные наблюдений	Чистота (%)	Известная примесь* (%)
RME-1304-63-01- _25_60_2w	25°C,	2 недели	твердое вещество белого	99,6	0,19

	60% RH		цвета		
_25_60_6w		6 недель	плотно упакованно твердое вещество светло- коричневого цвета	99,5	0,21
_25_60_10w		10 недель	плотно упакованно твердое вещество светло- коричневого цвета	99,1	0,35
R2_25_60_12w		12 недель	плотно упакованно твердое вещество светло- коричневого цвета	98,8	0,23
_25_97_2w	25°C, 97% RH	2 недели	твердое вещество белого цвета	99,5	0,22
_25_97_6w		6 недель	твердое вещество белого цвета, очень влажное	99,4	0,38
_25_97_10w		10 недель	твердое вещество белого цвета, влажное	98,6	0,77
R2_25_97_12w		12 недель	твердое вещество белого цвета, влажное	98,4	0,55
_40_75_2w	40°C, 75% RH	2 недели	твердое вещество белого цвета	99,5	0,22
_40_75_6w		6 недель	твердое вещество белого цвета с пятнами оранжевого цвета	99,4	0,27
_40_75_10w		10 недель	рыхлые частицы светло- коричневого цвета	98,8	0,49
R2_40_75_12w		12 недель	рыхлые частицы светло- коричневого цвета	97,4	0,77

*никотинамид (RRT=1,73 мин.

Включение посредством ссылки.

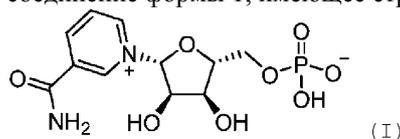
Все публикации и патенты, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и специально включены посредством ссылки. В случае противоречий следует руководствоваться настоящей заявкой, включая все приведенные в ней определения.

Эквиваленты.

Несмотря на то что описаны конкретные варианты осуществления объекта изобретения, вышеприведенное описание является иллюстративным, но не ограничивающим. Многие варианты изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники при рассмотрении настоящего описания и представленной ниже формулы изобретения. Полный объем изобретения следует определять со ссылкой на формулу изобретения, а также полный объем эквивалентов, и на настоящее описание вместе с такими вариантами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Безводное кристаллическое соединение формы 1, имеющее структуру формулы (I)



где соединение характеризуется дифрактограммой, содержащей значения 2θ 20,03, 20,14, 21,83 и 25,73.

2. Кристаллическое соединение по п.1, где дифрактограмма содержит значения 2θ 20,03, 20,14, 21,03, 21,83, 23,08, 23,39, 25,73 и 26,59.

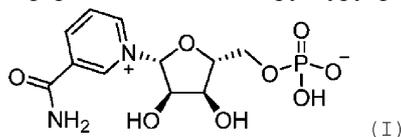
3. Кристаллическое соединение по п.2, где дифрактограмма содержит значения 2θ 7,70, 11,54, 12,64, 16,03, 18,99, 20,03, 20,14, 20,83, 21,03, 21,83, 23,08, 23,39, 25,48, 25,73, 26,59 и 29,78.

4. Кристаллическое соединение по п.3, где дифрактограмма содержит значения 2θ 7,70, 9,95, 11,54,

12,64, 16,03, 18,18, 18,99, 19,16, 19,44, 20,03, 20,14, 20,83, 21,03, 21,83, 22,44, 23,08, 23,39, 23,89, 24,08, 24,53, 24,68, 25,05, 25,48, 25,73, 26,08, 26,59, 27,33, 27,67, 29,78 и 29,92.

5. Кристаллическое соединение по п.4, имеющее дифрактограмму, по существу, как показано на фиг. 1, отмеченное как форма 1.

6. Кристаллическое соединение формы 2, имеющее структуру формулы (I)



где соединение представляет собой сольват с диметилсульфоксидом и характеризуется дифрактограммой, содержащей значения 2θ 8,29, 17,39, 19,54, 22,78 и 22,98.

7. Кристаллическое соединение по п.6, где дифрактограмма содержит значения 2θ 8,29, 17,39, 19,54, 19,74, 20,98, 21,58, 22,03, 22,78, 22,98 и 25,53.

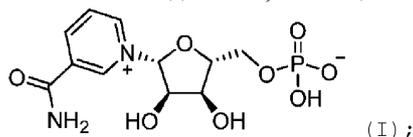
8. Кристаллическое соединение по п.7, где дифрактограмма содержит значения 2θ 8,29, 16,10, 17,39, 19,24, 19,54, 19,74, 20,33, 20,78, 20,98, 21,18, 21,58, 22,03, 22,78, 22,98, 25,53, 28,48 и 29,48.

9. Кристаллическое соединение по п.8, где дифрактограмма содержит значения 2θ 8,29, 13,12, 15,79, 16,10, 16,69, 17,39, 19,03, 19,24, 19,54, 19,74, 20,33, 20,78, 20,98, 21,18, 21,58, 22,03, 22,78, 22,98, 23,95, 24,14, 24,48, 24,64, 25,14, 25,53, 25,87, 26,89, 27,18, 27,67, 28,02, 28,13, 28,48, 28,98, 29,34, 29,48 и 29,92.

10. Кристаллическое соединение по п.9, имеющее дифрактограмму, по существу, такую, как показано на фиг. 1, отмеченное как форма 2.

11. Фармацевтическая композиция для увеличения уровня внутриклеточного NAD^+ , содержащая кристаллическое соединение по любому из пп.1-10 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.

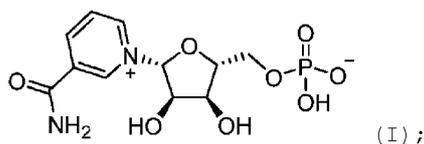
12. Способ получения кристаллического соединения, имеющего структуру формулы (I) по п.1



включающий:

- a) предоставление смеси соединения формулы (I) в растворителе;
- b) получение взвеси из смеси; и
- c) кристаллизацию соединения формулы (I) из взвеси, содержащей соединение формулы (I), где кристаллическое соединение является безводным.

13. Способ получения кристаллического соединения, имеющего структуру формулы (I) по п.6



включающий:

- a) предоставление смеси соединения формулы (I) в растворителе;
- b) получение взвеси из смеси; и
- c) кристаллизацию соединения формулы (I) из взвеси, содержащей соединение формулы (I), где кристаллическое соединение представляет собой сольват.

14. Способ по п.13, где сольват представляет собой сольват с диметилсульфоксидом.

15. Способ по п.12 или 13, где растворителем является метанол или вода.

16. Способ по п.14, где растворителем является диметилсульфоксид.

17. Способ по любому из пп.12-16, где смесь, содержащая соединение формулы (I), представляет собой раствор, и стадия кристаллизации соединения формулы (I) из смеси включает доведение раствора до перенасыщения, чтобы вызвать выпадение в осадок соединения формулы (I) из раствора.

18. Способ по п.17, где стадия доведения раствора до перенасыщения включает медленное добавление антирастворителя, охлаждение раствора, уменьшение объема раствора или какую-либо их комбинацию.

19. Способ по п.17, где стадия доведения раствора до перенасыщения включает охлаждение раствора до комнатной температуры или ниже.

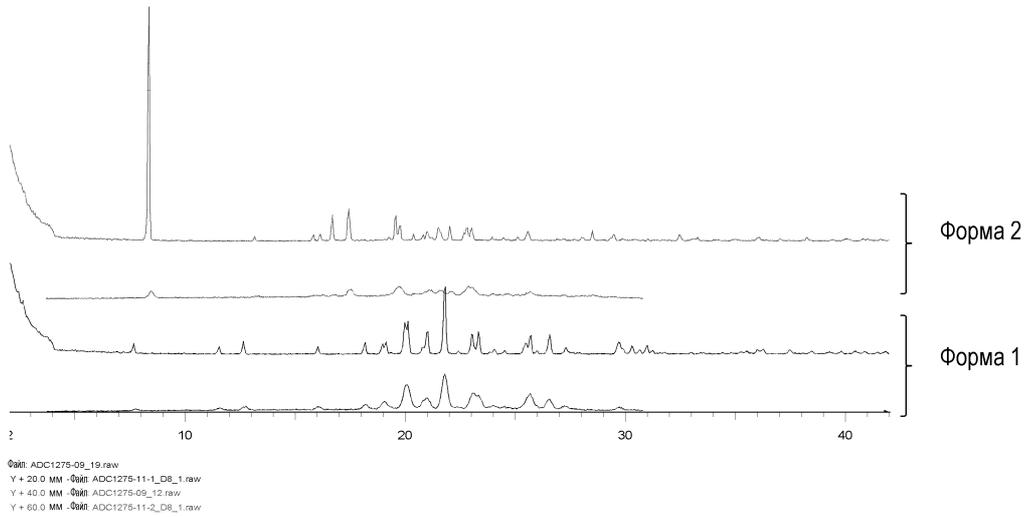
20. Способ по любому из пп.12-19, дополнительно включающий выделение кристаллического соединения.

21. Способ по п.20, где выделение кристаллического соединения включает фильтрацию кристаллизованного соединения из смеси.

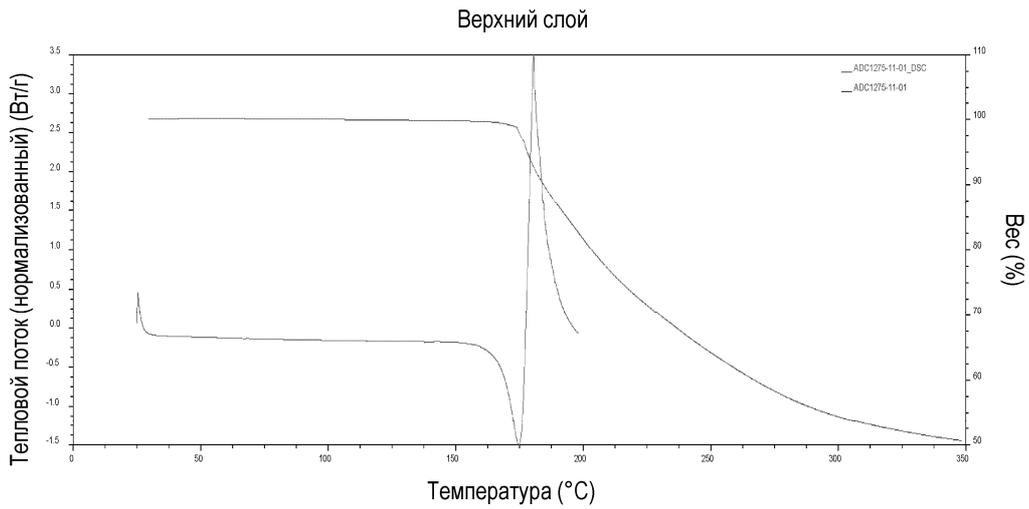
22. Способ по п.20 или 21, дополнительно включающий высушивание кристаллического соедине-

ния при пониженном давлении.

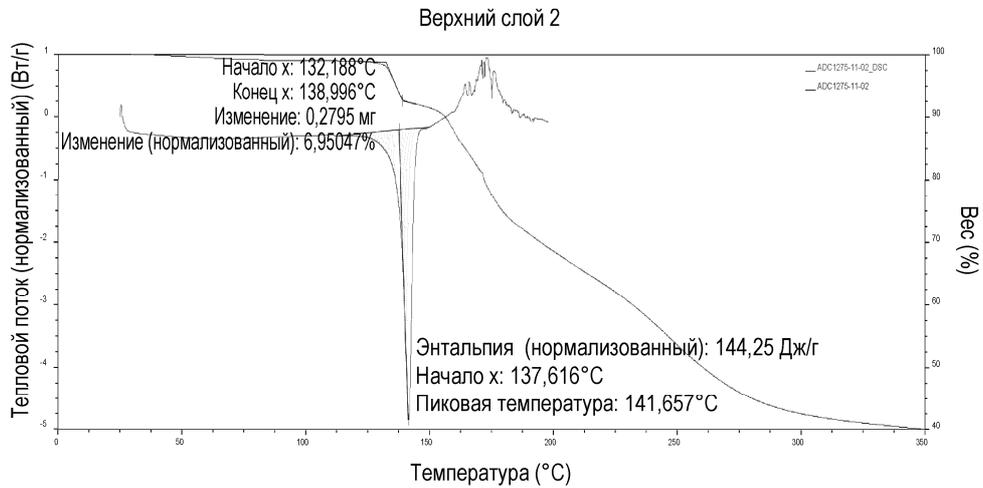
23. Способ по любому из пп.12-22, где кристаллическое соединение представляет собой кристаллическое соединение по любому из пп.1-10.



Фиг. 1

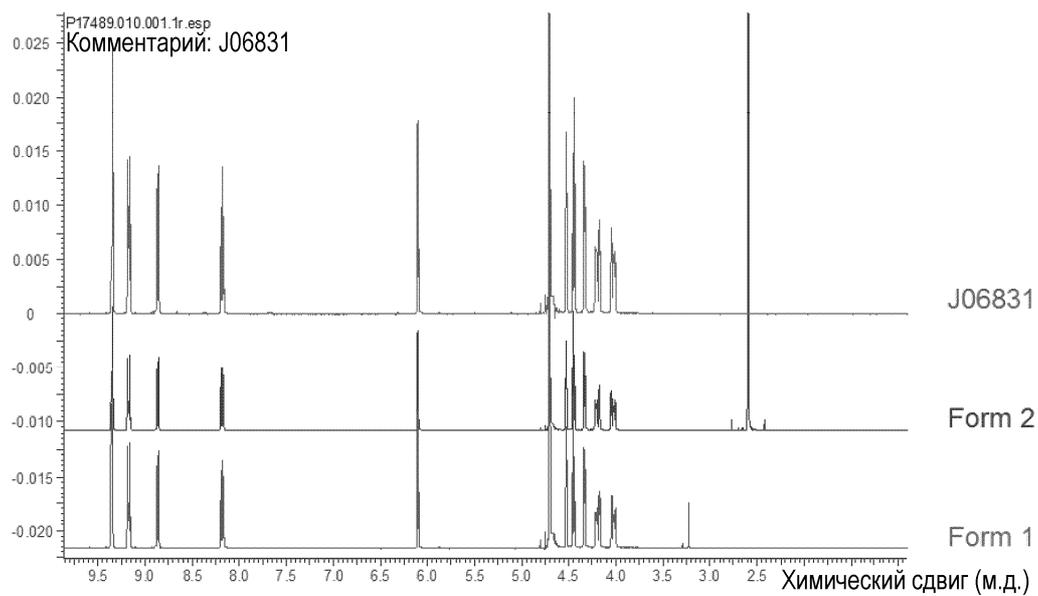


Фиг. 2

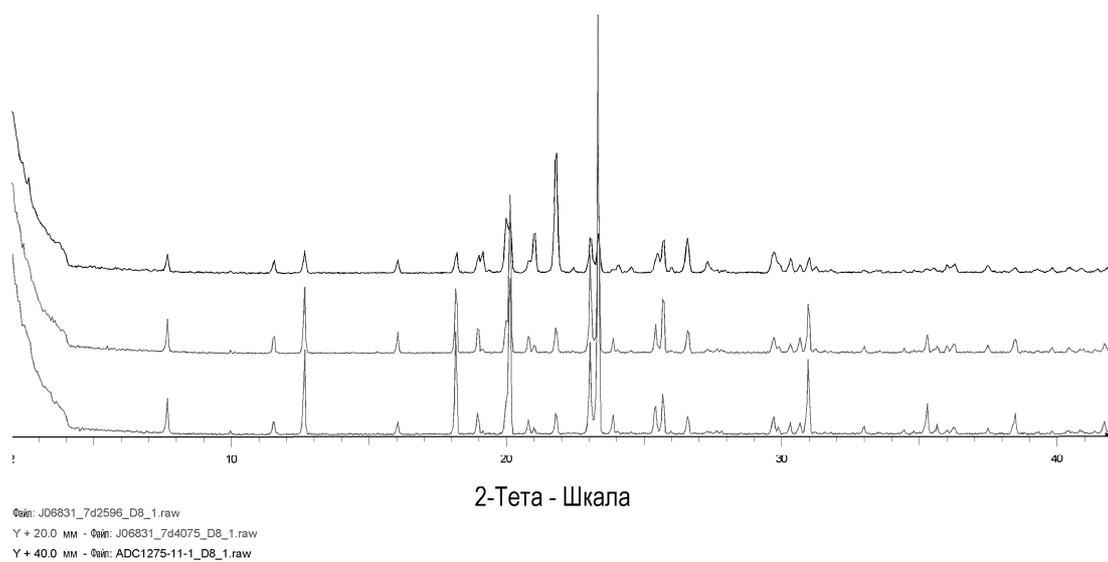


Фиг. 3

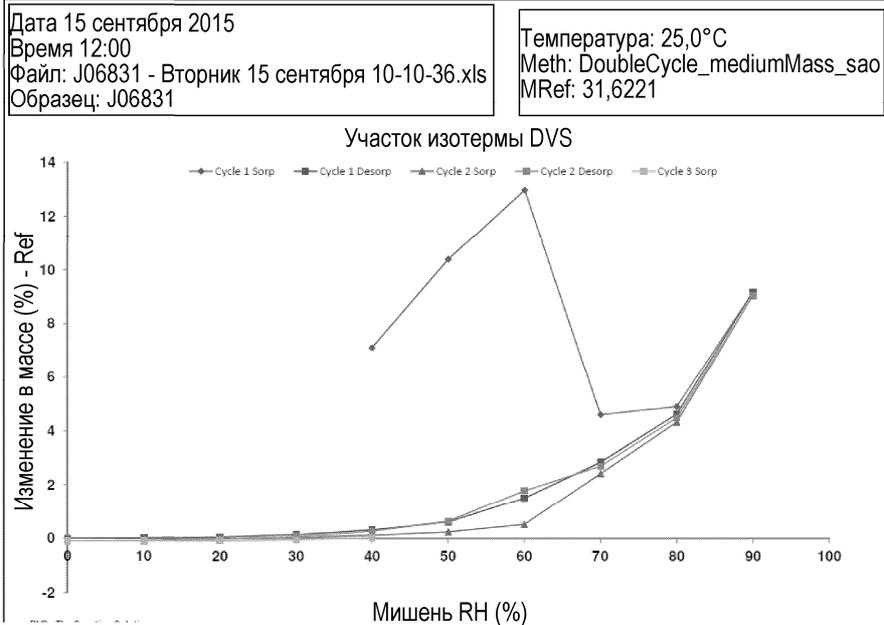
037104



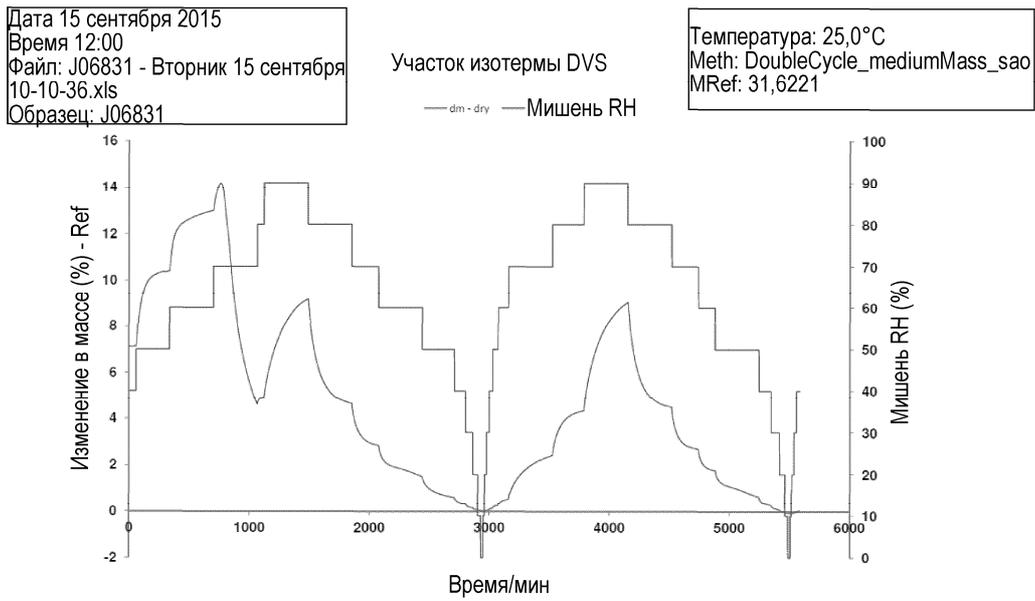
Фиг. 4



Фиг. 5

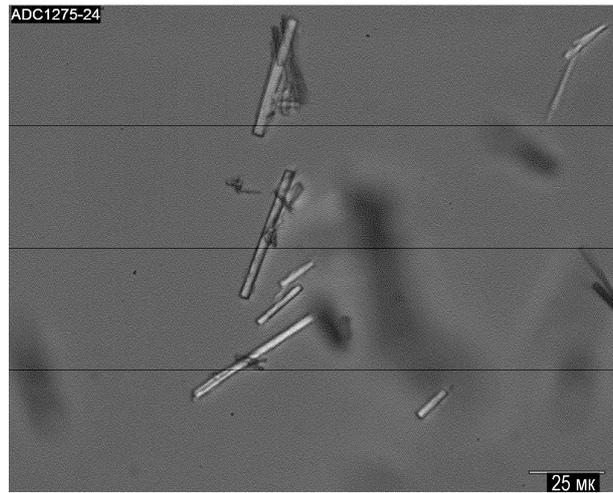


Фиг. 6



Фиг. 7

037104



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Мальный Черкасский пер., 2
