

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033913**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.09

(21) Номер заявки
201700089

(22) Дата подачи заявки
2017.01.20

(51) Int. Cl. **C07C 279/14** (2006.01)
C07C 277/08 (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФЕНИЛКРЕАТИНА

(43) 2018.07.31

(96) 2017000003 (RU) 2017.01.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЛЕКСЕЕВ АЛЕКСЕЙ
ВИКТОРОВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:
Духовлинов Илья Владимирович (RU)

(74) Представитель:
Федорова Е.А. (RU)

(56) ROWLEY Gerald L. et al. On the Specificity of Creatine Kinase. New Glycocyamines and Glycocyamine Analogs Related to Creatine. Journal of the American Chemical Society, 1971, 93(21), pp. 5542-5551, реферат, с. 5546, табл. II, соединение N-амидино-N-бензилглицин, с. 5548, кол. 1, строки 20-28, с. 5550, кол. 2, метод A
DIETRICH Robert F. et al. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Creatine, Creatinine and some of their Analogs. Organic magnetic resonance, Vol. 13, No. 2, 1980, pp. 79-88, реферат, с. 81, табл. 1, соединение 12, с. 86, кол. 2, соединение N-амидино-N-бензилглицин (12)

(57) Изобретение относится к области фармацевтической химии. В частности, изобретение относится к применению производного креатина - фенилкреатина для увеличения не менее одного показателя, выбранного из активности, выносливости, работоспособности, производительности, мускульной силы. Предлагается использовать фенилкреатин для ускорения восстановления после тренировок, а также для увеличения мышечной массы. Указанные выше эффекты наблюдаются как при присутствии, так и отсутствии сна.

B1

033913

033913

B1

Изобретение относится к области фармацевтической химии, а именно к применению биологически активных веществ. В частности, изобретение относится к производному креатина - веществу общей формулы $\text{NH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{-N}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ($\text{C}_{10}\text{-H}_{13}\text{-N}_3\text{-O}_2$), N-бензил-N-карбамимидоилглицину (далее фенилкреатин).

Креатин или 2-(метилгуанидино)этановая кислота - это азотсодержащая карбоновая кислота, которая присутствует в различных тканях млекопитающих, а именно в печени, почках, мышечной ткани, ткани головного мозга, крови и даже обнаруживается в фоторецепторных клетках сетчатки, сперматозоидах и сенсорных волосковых клетках внутреннего уха (Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U., The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine, *Amino Acids*. 2011 May;40(5):1271-96. doi: 10.1007/s00726-011-0877-3).

Приблизительно 95% общего пула креатина запасается в тканях скелетной мускулатуры. В момент, когда потребность в энергии возрастает, в митохондриях креатин обратимо реагирует с аденозинтрифосфатом (АТФ) с образованием АДФ и креатинфосфата с помощью фермента креатинкиназы. Креатинфосфат представляет собой резерв макроэргического фосфата. Однако в отличие от АТФ, гидролизуемой по пирофосфатной связи O-P, креатинфосфат гидролизуется по фосфамидной связи N-P, что обуславливает значительно больший энергетический эффект реакции. Таким образом, эта реакция помогает поддерживать постоянный пул АТФ в момент его интенсивного потребления. Другие способы, такие как гликолиз и окислительное фосфорилирование, также пополняют запасы АТФ, но значительно медленнее (Shulman, Rothman, *Metabolism By In Vivo NMR*, Wiley 2005). В скелетных мышцах концентрация креатинфосфата может достигать 20-35 мМ или более.

Таким образом, креатин обладает способностью увеличивать мышечные запасы креатинфосфата, потенциально увеличивая способность мышц к ресинтезированию АТФ из АДФ для восполнения энергии, что в свою очередь способствует улучшению работоспособности мышц и увеличению мышечной массы (WO 2010074591 A1). Соответственно, известные эффекты креатина - увеличение объема и силы мышц, а также скорости их сокращения. Увеличение объема мышц частично осуществляется за счет того, что большее количество воды привлекается в мышечную ткань, поскольку в ней запасается большее количество креатина, а моногидрат креатина связывается с водой.

Сердце экспрессирует фермент креатинкиназу в большей степени, чем любая другая ткань в организме млекопитающих, и это способствует увеличению эффективности митохондриальной активности: повышение цитоплазматических концентраций фосфокреатина (не столько самого креатина) связано с повышением эффективности окислительных процессов в митохондриях, вероятно, из-за передачи высокоэнергетических фосфатных групп. Фосфокреатин, как известно, является основным источником энергии для сердечной ткани наряду с жирными кислотами, которые являются доминирующими при периодах нормоксии (нормальное содержание O_2), а фосфокреатин становится все более важным в периоды гипоксического стресса. Вся система креатинкиназы играет важную роль в восстановлении сердца при ишемическом/гипоксическом стрессе, так как блокирование деятельности креатинкиназы ухудшает восстановление, а гиперэкспрессия креатинкиназы способствует ему. После ишемии повышение активности транспортера креатина (без обязательного влияния на креатинкиназу) для большего притока креатина связано с улучшением постишемической сократимости примерно на 30% (Lygate C.A., et al. Moderate elevation of intracellular creatine by targeting the creatine transporter protects mice from acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. (2012)). Повышение активности системы креатинкиназы, так же как и приток креатина в клетку, рассматриваются как преимущество после сердечной травмы (WO EP 97/06225, 1999).

Пероральное введение креатина увеличивает содержание креатина в организме. Обширные исследования показали, что прием креатина в количестве от 5 до 20 г в день эффективно улучшает работоспособность и выносливость мышц, увеличивая максимальную производственную силу мышц у мужчин и женщин, особенно при использовании в качестве дополнения к диете спортсменов (WO 94/02127, 1994). Креатин поддерживает резервную активность мышц, снижая уровень метаболической кислоты, которая может привести к усталости мышц и прекращению их работы.

Прием креатина снижает необходимость выработки его в организме. После приема креатинмоногидрата ("загрузочная" фаза и 19 недель приема) количество предшественников креатина снижается до 50% (привыкание) или до 30% (прием), что подразумевает снижение уровня эндогенного синтеза креатина. Это происходит благодаря свойствам креатина и подавлению L-аргинина: фермент глицинамидинотрансфераза, ограничивающий скорость синтеза креатина, снижает её до 75% (McMorris T., et al. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn*. 2007). Это подавление может быть полезным для здоровья за счёт освобождения организма от данной функции. Уменьшается и ожидаемое увеличение гомоцистеина после интенсивных физических нагрузок, и это одна из причин, почему креатин считается кардиозащитной добавкой в процессе выполнения тяжелых упражнений.

Также креатин рекомендуется в качестве пищевой добавки для пожилых людей и вегетарианцев в связи с тем, что у таких людей наблюдается явное снижение содержания креатина в мышцах (WO 97/45026), т.е. для компенсации при естественных потерях.

Предметом двух недавних исследований было выяснение роли, которую креатин играет в восста-

новление мышц после тренировок. В одном из этих экспериментов 14 нетренированных субъектов были случайным образом поделены на две группы. В течение пяти дней до тренировки с отягощениями и 14 дней после нее первая группа принимала креатин с углеводами, в то время как вторая - только углеводы. Они выполняли жимы одной ногой, экстензии ног и сгибания одной ноги в четырех сетах из десяти повторений, причем упражнения были только эксцентрическими (опускание веса), со 120%-ным весом от максимума в концентрических (подъеме веса) движениях. Эксцентрические сокращения вызывают повреждение большего количества мышечных волокон и более сильную болезненность, чем концентрические. Для оценки мышечных повреждений ученые отслеживали высвобождение двух мышечных энзимов.

Участники эксперимента, принимавшие креатин в сочетании с углеводами, достигли гораздо лучших результатов по сравнению с теми, кто принимал одни лишь углеводы. А если конкретнее, то в "креатиновой группе" изометрическая сила мышц оказалась большей на 21%, а изокинетическая на 10%.

Несмотря на то, что в данном эксперименте не изучался точный механизм благотворного воздействия креатина, авторы этого исследования полагают, что пищевая добавка увеличивает буферизацию кальция в мышцах, что, в свою очередь, понижает внутриклеточный кальций и способствует сдерживанию мышечной деградациии. Креатин также ускоряет синтез белка в мышцах и способствует усиленному размножению стволовых клеток, а это ведет к образованию новых мышечных волокон. Все это вместе взятое улучшает восстановительные процессы после тренировки (J. Int Soc Sports Nutr. 6:13. 2009, J. Sports Sci Med. 8:89-96, 2009).

Недавние исследования показывают, что креатин способствует синтезу белка путем стимуляции в мышцах инсулиноподобного фактора роста 1.

Креатин используют при терапии гипергликемии и сахарном диабете (US 6193973, 2001). У здоровых мужчин, ведущих сидячий образ жизни, которые использовали загрузочный протокол креатина с последующим 11-недельным периодом поддержания, ответ глюкозы в тесте толерантности к глюкозе снижается на 11-22% (в течение 4-12 недель, вне зависимости от времени), который не был связан с изменениями уровня инсулина или чувствительностью (Rooney K.B., et al. Creatine supplementation affects glucose homeostasis but not insulin secretion in humans. Ann Nutr Metab. 2003).

Однако применение креатина и креатинфосфата снижается за счет уменьшения растворимости и нестабильности в водных средах при физиологических значениях pH (RU 2295261, 2007). Так же известно, что креатин плохо абсорбируется из желудочно-кишечного тракта, поэтому зачастую перорально креатин применяют в высоких дозах, от порядка 5 г на 80 кг веса. Это приводит, в первую очередь, к увеличению стоимости курса приема препарата, а также известно, что высокие дозы креатина могут оказывать негативное влияние в виде увеличения веса, желудочно-кишечных расстройств, ингибирования синтеза эндогенного креатина, дисфункции почек или обезвоживания, в меньшей степени расстройства настроения и тревоги (Allen P.J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? Neurosci Biobehav Rev. 2012 May; 36(5):1442-62. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.03.005).

Известно несколько способов увеличения биодоступности креатина.

Прием креатинмоногидрата в растворе простых углеводов увеличивает биодоступность этой добавки для мышц. Еще один прием, который усиливает действие креатинмоногидрата - это его комбинирование с веществами, которые стимулируют выделение гормона поджелудочной железы инсулина. В ряде исследований было показано, что при повышении уровня инсулина в крови значительно увеличивается накопление креатина в мышцах. Большинство транспортных систем креатина работает при стимуляции производства организмом инсулина простым углеводом типа декстрозы. Для этого запивать препарат советуют не водой, а натуральным соком, в особенности виноградным, который богат углеводами.

Так, для увеличения доступности креатина для мышц при пероральном применении (всасываемость через желудок) известно использование микронизированного креатина с сахаром, механизм - через инсулин (WO 2001/070238 A1), либо с простым углеводом, например мальтодекстрином или декстрозой, механизм - также через инсулин (<http://www.purenutrition.com.au/creatine-explained/>), либо креатина с декстрозой, 18 г (<http://www.livestrong.com/article/465112-how-much-dextrose-do-you-mix-with-creatine-for-bodybuilding/>). Известно эффективное увеличение силы и изменение состава тела у мужчин при использовании креатина совместно с глюкозой, а также пажитником (900 мг) при использовании 3,5 г креатина (<http://www.predatornutrition.com/articlesdetail?cid=fenugreek-improves-creatine-absorption-more-than-carbohydrates>). Известен также способ доставки креатина, при котором данная молекула вводится в матрицу, содержащей один или более сахарных сиропов; один или более модифицированных крахмалов; гидроколлоидный компонент, содержащий желатин или сочетание желатина и геллана; растворитель, содержащий глицерин, низшие производные алкильных эфиров глицерола, пропиленгликоля, полиалкиленгликоля с короткой цепью, или их комбинации; один или более источников моно- или двухвалентных катионов и один или несколько источников воды, в средстве доставки содержание влаги - от около 10 до около 30 вес.% и активность воды менее чем около 0,7 (US 2004/0013732 A1).

Несмотря на то, что креатин в некоторых количествах используют для нормализации уровня сахара в крови, такой дополнительный прием "быстрых" углеводов вызывает с течением времени инсулиноре-

зистентность и диабет (Hjelmsaeth, Joran, et al. "Low serum creatinine is associated with type 2 diabetes in morbidly obese women and men: a cross-sectional study." *BMC endocrine disorders* 10.1 (2010): 1).

В настоящее время креатин является основным представителем группы эргогенных компонентов спортивного питания и выпускается в различных химических формах (моногидрат, гидротартрат, α -кетоглутарат, три- и дикриатина малат, цитрат, этиловый эфир креатина и др). Существует большое количество производных креатина, таких как, например, пируватов креатина (US 6166249; RU 2114823), производных креатина и малоновой, малеиновой, фумаровой, оротовой кислот и таурина (CN 10/249338; US 6861554; US 6166249; CA 10/740263), эфиров креатина, для увеличения доступности креатина для мышц при пероральном применении (всасываемость через желудок) (AU 2001/290939 B2), таких как этиловый и бензиловый (WO 02/22135), магниевая соль креатинфосфата (CN 1709896) и другие.

Для улучшения всасываемости и доступности для тканей известно использование соли креатина (US 7479560 B2). В сравнении с моногидратом креатина имеет повышенную растворимость в органических растворителях и водных растворах, по сравнению с креатином, а также повышенную всасываемость и биодоступность для тканей β -аланинатная соль креатина (the creatine β -alaninate salt) (WO 2011/019348 A1). Также показано, что быстрее поглощается телом стабильный водный раствор сульфатной соли кислоты креатина с буферным агентом и pH 7,5, применяемый перорально (WO 1999/043312 A1).

Известно, что моногидрат, либо пируват, либо аскорбаты креатина, либо α -кетоглутараты креатина легко абсорбируются и используются для лечения предменструального синдрома у женщин (US 6503951 B2). Сухой α -кетоглутарат креатина, молярное соотношение 1:2, используют и для увеличения сроков хранения при комнатной температуре до года (US 20130184487).

Относительная биодоступность гидрохлорида креатина около 50% выше, чем моногидрата креатина (US 8354450 B2).

Недостатком указанных соединений является недостаточная стабильность в организме и низкая биозквивалентность.

Показано, что повышенную всасываемость и биодоступность для тканей по сравнению с креатином имеет и бикарбонат креатина (US 8466198 B2). Использование креатина совместно с бикарбонатом натрия позволяет усилить интервальное плавание, однако только в начале, и есть риски для здоровья из-за повышенного захвата натрия (<http://kendevo.com/tag/creatine-absorption/>).

Показано, что всасываемость креатина увеличивается и с использованием α -липоевой кислоты (Effect of α -Lipoic Acid Combined With Creatine Monohydrate on Human Skeletal Muscle Creatine and Phosphagen Concentration. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2003, 13, 294-302), либо пропиленгликоля, всасываемость - через кишечник (US 5773473 A).

Использование одной безопасной молекулы, имеющей активность креатина, при этом обладающей большей биодоступностью и активностью, чем креатин, и высокой стабильностью, является более предпочтительным.

Данная задача решена нетривиально использованием молекулы фенилкреатина (N-бензил-N-карбамимидоилглицин).

Известны следующие аналоги данной молекулы.

Известно совместное применение креатина и в качестве защиты против UVA и/или UVB лучей эфиров фенола для профилактики и лечения морщин в составе средства, наносимого на кожу наружно (AU 783758 B2), против старения (WO 2006/065920 A1). Известно совместное применение креатина и в качестве защиты против солнца оксибензена (Oxybenzene) для лечения повреждений кожи, такая композиция наносится на кожу (WO 2008/073332 A2, US 2009098221 A1).

Известно использование наружно композиции, содержащей масло и в качестве антиоксидантов креатина и полифенола (US 2014/0315995 A1).

Известно использование креатина в качестве улучшающей сладкий вкус добавки органической кислоты совместно с фенолом в качестве антиоксиданта, в композиции также содержатся ребаудиозид А и эритрит (RU 2588540 C2), либо иные вещества (RU 2472528 C2).

Известно использование в композиции с иными компонентами креатина в качестве агента клеточного транспорта энергии - вещества аэробного энергетического метаболизма клетки, совместно с фенолом в качестве антибактериального и противогрибкового агента (RU 2288706 C2), креатина для регуляции pH, совместно с фенолом в качестве антисептического, противомикробного или антибактериального агента, композиция для отбеливания зубов (RU 2505282 C2).

Известно соединение, в котором креатин связан с лигандом, при этом лигандом может быть фенилаланин или фенилсерин, однако место такого соединения не указано (US 2011/0008306 A1). Известны пролекарства креатина, т.е. соединения, распадающиеся при попадании в организм, где заместителем может быть фенил, однако в документе описаны соединения именно иной структуры, чем креатин, и местоположение фенольной группы не аналогично предложенному автором настоящего изобретения (WO 2016/106284 A2).

Известно соединение на основе креатина, по NH группе которого добавлен дополнительный компонент, соединение с фенольной группой осуществляется без промежуточной CH_2 -связки, фенольная

группа соединена с гетероциклом, один из заместителей кольца - CH_2L , где L - дополнительный компонент (WO 2009/002913 A1).

Известно соединение, похожее на фенилкреатин, однако карбоксильная группа заменена на иную (US 09127233 B2). Такое строение обеспечивает иной функционал.

Также известен фенилкреатин, в котором связь креатина с фенольной группой осуществляется через аминогруппу, что также обуславливает иной функционал (WO 2015/120299 A1).

Однако прототипом фенилкреатина считаем молекулу креатина, поскольку производные креатина, в том числе описанные выше, имеют несколько иной функционал, обусловленный структурой, как и композиции, содержащие креатин и фенол.

Технический результат от использования изобретения заключается в значительном уменьшении дозы применяемого вещества и частоты его применения для достижения требуемого эффекта: 125 мг фенилкреатина на 80 кг веса по сравнению с 5 г креатина и других форм креатина на 80 кг веса для получения желаемых результатов, связанных с увеличением мышечной массы, повышением мускульной силы, повышением производительности (возможность выполнить больше подходов/повторений), приростом веса.

Технический результат от использования изобретения заключается в ускоренном восстановлении после тренировок при значительном уменьшении дозы применяемого вещества - вместо 72 ч происходит за 24 ч.

Технический результат от использования изобретения заключается в увеличении длительности эффекта применяемого вещества - он сохраняется в течении 48 ч в случае предложенного фенилкреатина в отличие от креатина, который эффективен лишь в течение 16 ч.

Технический результат от использования изобретения заключается в сохранении эффектов при отсутствии сна.

В дополнение технический результат от использования изобретения заключается в усилении эффекта креатина даже при низких дозировках предложенной молекулы.

Технический результат также выражается в расширении спектра производных креатина, что позволит при невозможности использования аналогов достичь требуемого результата.

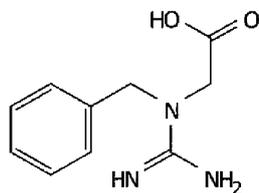
Таким образом, не является известным применение креатина и фенола, а также молекул на их основе для получения вышеуказанных технических результатов.

Все указанные выше технические результаты достигаются за счет использования предложенной молекулы фенилкреатина.

Креатин синтезируется организмом самостоятельно из 3 аминокислот: глицина, аргинина и метионина. У людей ферменты, вовлеченные в синтез креатина, локализуются в печени, поджелудочной железе и почках. Нейроны также обладают способностью синтезировать креатин. Связь двух аминокислот образует гуадиноцетат, а после метилирования этой молекулы образуется креатин. Два фермента принимают участие в этом процессе, один из них - формируемый орнитин, а второй - используемый S-аденилметион (донор метила) (Braissant O., Henry N. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: A review. J. Inherit Metab Dis., 2008) Креатин может быть произведен в любом из этих органов и затем транспортируется через кровь и поглощается тканями, требующими высоких энергозатрат, такими как мозг и скелетные мышцы, посредством активной транспортной системы.

Сущность изобретения

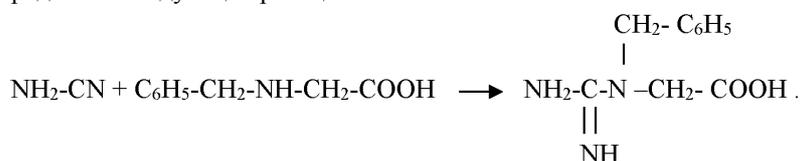
Предложен фенилкреатин (N-бензил-N-карбамимидоилглицин, $\text{NH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{-N}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ($\text{C}_{10}\text{-H}_{13}\text{-N}_3\text{-O}_2$)) следующего строения:



Брутто-формула $\text{C}_{10}\text{-H}_{13}\text{-N}_3\text{-O}_2$; $M=207,299$.

Вещество представляет собой рассыпчатый белый порошок.

Фенилкреатин синтезируется несложным химическим превращением из цианамиды и N-бензилглицина посредством следующей реакции:



Реакция протекает при диапазоне температур от комнатной до $+65^\circ\text{C}$ в течение 24-96 ч при нор-

мальном атмосферном давлении и нормальной влажности воздуха. Самый большой выход наблюдали при проведении реакции при комнатной температуре в течение 96 ч.

Предложенную молекулу предлагается использовать в качестве функционального аналога креатина.

Проведены лабораторные исследования, отражающие конкретные примеры реализации указанного изобретения. Полученные результаты лабораторных исследований проиллюстрированы чертежом и примерами 1-3.

На чертеже представлены графики динамики продолжительности бега мышей до полного утомления в опыте, описанном в примере 3.

Пример 1. Получение фенилкреатина.

N-бензилглицин массой 429 мг и 0,5 мл дистиллированной воды смешивали в круглодонной колбе объемом 10 мл. Затем к смеси добавляли 152 мг NaCl. Далее при помощи магнитной мешалки смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. В небольшой стакан добавляли 206 мг цианамиды и 0,2 мл дистиллированной воды. Затем добавляли каплю раствора аммиака в каталитических количествах. Смесь быстро перемешивали переворачиванием, а затем добавляли смесь цианамиды к раствору N-бензилглицина. Получившуюся смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. После 96 ч инкубации при комнатной температуре и нормальном атмосферном давлении продукт, а именно фенилкреатин, N-бензил-N-карбамимидоилглицин, выпал в осадок. Кристаллы перемещали в чистую емкость объемом 10 мл.

Очистку пробы проводили рекристаллизацией с использованием 1-2 мл кипящей дистиллированной воды. Затем раствор охлаждали до тех пор, пока его температура не достигла комнатной. Далее раствор охлаждали на ледяной бане в течение 5 мин и высушивали в вакууме.

Продукт получали и при инкубации при более высоких температурах, вплоть до 65°C, он кристаллизовывался по прошествии от 24 ч до недели. Если фенилкреатин оставался в растворе, раствор фильтровали до тех пор, пока не обнаруживались сухие кристаллы вещества, использовали вакуумную фильтрацию. Выход фенилкреатина в конечном итоге составлял 65-80%. Масс-спектр, найдено: m/z: 207,2. Вычислено: M = 209.

Пример 2. Исследование стабильности фенилкреатина по сравнению с креатином в водном растворе и в крови.

Исследование стабильности фенилкреатина и креатина в водном растворе и в крови человека осуществляли следующим образом.

Для приготовления растворов исследуемых веществ на аналитических весах брали точную навеску фенилкреатина и креатина. К ним добавляли расчетное количество бидистиллированной воды для получения концентрации 1 мг/мл. Часть раствора разбавляли в 10 раз и сразу проводили анализ образца. Далее этот раствор выдерживали при комнатной температуре и через 3 ч повторяли анализ.

Далее по методике, описанной в статье Dunnett, Harris & Orme (1991) Reverse phase ion-pairing high performance liquid chromatography of phosphocreatine, creatine and creatinine in equine muscle. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 51, 137-141, стр. 139, аликвота (с), удаляли креатинин, креатин и креатинфосфат из образцов, используемых для получения сыворотки крови для смешивания, для получения более точных результатов.

К 200 мкл раствора в воде исходного вещества с концентрацией 2-3 мг/мл добавляли 1 мл воды или подготовленной согласно методике, приведенной выше, сыворотки крови, встряхивали и сразу же отбирали пробу объемом 200 мкл и проводили анализ начальной концентрации. Далее раствор помещали в вибротермостат при температуре 37°C и из него отбирали аликвоту 200 мкл через 0,5, 1 и 3 ч термостабилизации. К отобранной пробе прибавляли 20 мкл 10 % раствора трихлоруксусной кислоты и выдерживали 15 мин при температуре -24°C, центрифугировали при 6000 g в течение 5 мин для осаждения белков плазмы, отбирали супернатант и проводили его анализ.

Изучение стабильности фенилкреатина по сравнению с креатином в водном растворе и в крови проводилось методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1220 Infinity LC System (CH2A).

Буфер А - 30% ацетонитрил с 0,1%TFA.

Буфер В - 70% ацетонитрил с 0,1%TFA.

Температура 50°C, детекция 220 нм.

Поток 1,5 мл/мин.

Колонка XRbridgePeptide ВЕН C18 ("Waters") 5 мкм 300 Å 150×4,6 мм.

Использовали следующий градиент:

Время, мин.	0	20	21
%А	100	0	100
%В	0	100	0

Для оценки стабильности анализируемых веществ сравнивали площади пиков соединений в начале эксперимента и через выбранные промежутки времени (табл. 1).

Таблица 1

Стабильность фенилкреатина в сравнении со стабильностью креатина в сыворотке крови

Вещество	Стабильность в сыворотке крови			
	0ч	0,5ч	1ч	3ч
Фенилкреатин	100%	100%	99%	96%
Креатин	100%	98%	67%	52%

Как следует из приведенных данных, фенилкреатин имеет высокую стабильность в крови, и концентрация в течение 3 ч оставалась практически неизменной, в то время как концентрация креатина в крови человека снижалась до 52%.

Пример 3. Оценка функционального состояния мышечной ткани в тесте на тредбане при приеме креатина и фенилкреатина.

Для того чтобы выяснить, является ли фенилкреатин функциональным аналогом креатина, а также насколько его действие соотносится по силе с таковым креатина, была проведена оценка функционального состояния мышечной ткани, а именно измерена масса тела, оценена активность и выносливость в тесте на белых беспородных мышцах - самцах массой 18-22 г.

Было отобраны 2 опытные группы мышечной ткани и одна контрольная (по 10 мышечных тканей в каждой группе). Первоначально животные были одинаковой массы. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (EST № 123), г. Страсбург, 18.03.1986 г. М., 1990, 12 с.). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Умерщвление животных осуществляли декапитацией в соответствии с "Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных", утвержденными приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.1984 (Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабахян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных//Качественная клиническая практика. 2002. № 1, с. 58-61).

В течение 20 дней животные получали водный раствор креатина в дозировке 0,3 мг на 1 г веса. Дозировка выбрана согласно данным о том, что ежедневное употребление креатина в количестве 20 г для взрослых мужчин средней массы 75 кг в течение шести дней приводит к увеличению концентрации мышечного креатина (Daniel Santarsieri TLS. Antidepressant efficacy and side-effect burden: a quick guide for clinicians. *Drugs in Context*. 2015; 4:1-12). При введении препарат растворяли в 0,3 мл воды и через зонд вводили мышцам в желудок ежедневно утром, натощак. Животным контрольной группы вводили аналогичный объем воды. Фенилкреатин вводили также в течение 20 дней в количестве 50 мг на 1 кг веса.

Взвешивание животных проводили на 1, 5, 10, 15 и 20 дни исследования, натощак, непосредственно перед введением креатина, фенилкреатина или дистиллированной воды в контроле.

Выносливость мышечной ткани при физических нагрузках оценивали по стандартной методике (Эмирова Л.Р. Потенцирование цитаминами действия лекарственных веществ, повышающих выносливость спортсменов: дис. канд. мед. наук: 14.00.25. М., 2004, 125 с.) по тесту продолжительности бега в тредбане. Животные каждой группы подвергались ежедневным тренировочным нагрузкам в режиме высокой мощности нагрузки, которая моделировалась бегом на тредбане со скоростью 29-31 м/мин. Продолжительность ежедневных тренировок мышечной ткани составляла 5 мин. Выносливость мышечной ткани тестировали на 1, 5, 10, 15, 20 и 25 дни тренировки на фоне введения препаратов (или дистиллированной воды в контроле). Тестирование выносливости проводилось в тех же условиях, что и тренировка. Выносливость тестировалась через 1 ч после введения препарата (Петренко Е.Р. Сравнительное фармакологическое изучение адаптивных свойств препаратов женьшеня: дис. канд. биол. наук: 14.00.25. СПб., 1998, 126 с.) до полного утомления, критерием которого было отсутствие реакции мышечной ткани на раздражение лапок и хвоста электрическим током (Стратиев Е.Н. Влияние фенилэтилзамещенных производных 3-оксипридина на физическую работоспособность мышечной ткани в условиях гипобарической гипоксии: дис. канд. мед. наук. Брянск, 1996. ДСП, 201 с.). Продолжительность бега регистрировали в секундах. Исследование проводилось в состоянии покоя, через час после введения креатина или фенилкреатина и сразу после окончания бега в тредбане.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica для всех групп данных с использованием критерия Стьюдента.

Получили следующие результаты по влиянию приема креатина и фенилкреатина на массу тела мышечной ткани.

Масса тела у животных контрольной (изначально 19±2 г) и экспериментальных групп, принимавших креатин (изначально 18±2 г) и фенилкреатин (изначально 18,6±2 г), изменялась незначительно. Наблюдалась тенденция к увеличению массы в экспериментальных группах, прирост массы составил 9% для группы животных, получавших креатин, и 15,4% для группы животных, получавших фенилкреатин.

Увеличение массы тела мышей в контрольной группе составило 6,4%, данные являются достоверными при 95% уровне значимости.

Получили следующие результаты по влиянию приема креатина и фенилкреатина на выносливость мышей. Использовались дозировки 10 мг фенилкреатина на животное и 300 мг креатина на животное.

За весь период исследования продолжительность бега до полного утомления достоверно выросла на 15-й день исследования в 2,8 раз для животных из экспериментальной группы, получавшей креатин, и в 6,4 раза для группы, получавшей фенилкреатин, тогда как у животных контрольной группы выносливость увеличилась в 1,1 раз, на 20-й день исследования в 4,5 раз для животных из экспериментальной группы, получавшей креатин, и в 6,9 раз для группы, получавшей фенилкреатин, тогда как у животных контрольной группы выносливость увеличилась в 1,4 раз, на 25-й день исследования в 5,6 раз для животных из экспериментальной группы, получавшей креатин, и в 6,7 раз для группы, получавшей фенилкреатин, тогда как у животных контрольной группы выносливость увеличилась в 1,7 раз (табл. 2, чертеж).

Таблица 2

Продолжительность бега мышей (n=15) при введении креатина и фенилкреатина (M±m)

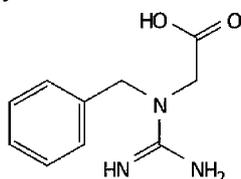
Группы	1д	5д	10д	15д	20д	25д
Контроль, с	556,71±21,74	599,80±43,00	669,00±52,91	648,60±46,52	789,50±56,40	934,6±76,3
Группа, принимавшая креатин, с	626,00±32,25	772,60±33,07	775,80±37,01	1811,30±85,82	2794,70±103,22	3697,5±1373
Группа, принимавшая фенилкреатин, с	588,23±25	747,23±17,06	1874,12±14,43	3756,77±97,02	4076,45±276,57	3981,4±202,8
P, группы креатин и фенилкреатин	P> 0,05	P≤ 0,05	P> 0,05	P≤0,05	P≤0,05	P≤0,05

В результате курсового приема как креатина, так и фенилкреатина в течение 20 дней отмечается значительное повышение уровня выносливости, начиная с 15 дня приема для креатина и с 10 дня приема для фенилкреатина, и нарастает до его завершения. Максимальный эффект от приема фенилкреатина наступает уже к 15 дню, т.е. он возрастает 2 раза быстрее, чем в опытной группе, получавшей креатин. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что прием креатина способствует повышению выносливости и работоспособности организма. Прием фенилкреатина еще более усиливает этот эффект, а также способствует выводу организма на пик физических возможностей при подготовке к физической нагрузке. Данный эффект фенилкреатина сохранился и при отсутствии сна.

Также следует отметить, что при всех проведенных исследованиях отрицательные эффекты фенилкреатина по изобретению не были обнаружены, что говорит о его безопасности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фенилкреатина формулы



для увеличения не менее одного показателя, выбранного из активности, выносливости, работоспособности, производительности, мускульной силы.

2. Применение по п.1 для ускорения восстановления после тренировок.

3. Применение по п.1 для увеличения мышечной массы.

4. Применение по любому из пп.1-3 при присутствии или отсутствии сна.

