

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037841**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.05.26**

**(21)** Номер заявки  
**201991993**

**(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 В КАЧЕСТВЕ НООТРОПНОГО АГЕНТА**

---

**(43)** 2020.01.31

**(62)** 201700089; 2017.01.20

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

**(72)** Изобретатель:  
**Духовлинов Илья Владимирович (RU)**

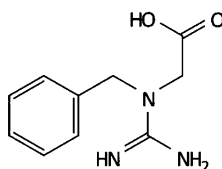
**(74)** Представитель:  
**Федорова Е.А. (RU)**

**(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 А

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 в качестве ноотропного агента производного креатина - фенилкреатина, имеющего структурную формулу



**B1**

**037841**

**037841**

**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.

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 глицинаминотрансфераза, ограничивающий скорость синтеза креатина, снижает её до 75% (McMorriss 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.

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).

Известно, что дыхание митохондрий усиливается в скелетных мышцах при концентрации креатина 20 мМ. То же самое происходит и в клетках гиппокампа. Это способствует эндогенным кластерам PSD-95 и впоследствии синаптическому нейрогенезу, что считается вторичным по отношению к содействию функции митохондрий. Митохондриальная функция как таковая, по-видимому, способствует росту и пролиферации нейронов, а креатин, по крайней мере, *in vitro*, играет в этом немаловажную роль.

Так, креатин, креатинфосфат и циклокреатин (US 6706764, 2004) показаны для лечения заболеваний нервной системы. Например, травмы головного мозга, как правило, вызывают дальнейшее повреждение клеток, что является вторичным по отношению к истощению АТФ, и креатин, по-видимому, сохраняет проницаемость митохондриальных мембран в ответ на повреждение головного мозга, что, как полагают, связано с его способностью сохранять АТФ. У крыс и мышей, получавших инъекции креатина (3 г/кг) на срок до пяти дней перед черепно-мозговой травмой, с помощью добавок удалось уменьшить тяжесть черепно-мозговой травмы на 3-36% (зависит от времени применения; прием в течение пяти дней связан с более высокой эффективностью, чем прием в течение одного или трех дней), а диетическое потребление 1% креатина в течение четырех недель в два раза уменьшило последующие травмы. Ежедневное потреб-

ление креатина у крыс, по-видимому, способно вдвое уменьшить последствия травмы головного мозга. У детей и взрослых с черепно-мозговой травмой (ЧМТ), через шесть месяцев приема креатина в количестве 400 мг/кг массы тела значительно уменьшается частота головных болей (от 93,8 до 11,1%), усталость (от 82,4 до 11,1%), и головокружение (от 88,9 до 43,8%) по сравнению с неслепым контролем. Предварительные данные свидетельствуют о том, что головные боли и головокружение, связанные с черепно-мозговой травмой, могут быть ослаблены с помощью перорального приема добавок креатина (Sullivan P.G., et al. *Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury*. *Ann Neurol*. 2000).

Существует мнение, что эндогенный креатин играет важную роль в ряде когнитивных функций, в том числе обучении, памяти, внимании, речи и языке и, возможно, эмоциях (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).

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 расстройств 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 креатин моногидрата в растворе простых углеводов увеличивает биодоступность этой добавки для мышц. Еще один прием, который усиливает действие креатин моногидрата - 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 матрице, 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% по весу 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 инсулинорезистентность и диабет (Hjelmsæth, Jørgen, 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, гидротатрат,  $\alpha$ -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  $\beta$ -аланинатная соль креатина (the creatine  $\beta$ -alaninate salt) (WO 2011/019348 A1). Также показано, что быстрее поглощается телом стабильный водный раствор сульфатной соли ки-

слоты креатина с буферным агентом и pH7,5, применяемый перорально (WO 1999/043312 A1).

Известно, что моногидрат, либо пируват, либо аскорбаты креатина, либо  $\alpha$ -кетоглутараты креатина легко абсорбируются и используются для лечения предменструального синдрома у женщин (US 6503951 B2). Сухой  $\alpha$ -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  $\alpha$ -липоевой кислоты (Effect of  $\alpha$ -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 A 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  $\text{CH}_2$ -связки, фенольная группа соединена с гетероциклом, один из заместителей кольца -  $\text{CH}_2\text{L}$ , 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 аминокгруппу, 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.

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

В дополнение технический результат от использования изобретения заключается в усилении эф-

фекта креатина даже при низких дозировках предложенной молекулы, что выражается, в том числе, в усиленной регенерации нервной ткани и нормализации кровоснабжения головного мозга.

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

Автором настоящего изобретения также выявлено, что данное соединение обладает дополнительными свойствами, по отношению к известным для креатина.

Ноотропы - средства, оказывающие специфическое позитивное влияние на высшие интегративные функции мозга. Они улучшают умственную деятельность, стимулируют познавательные функции, обучение и память, повышают устойчивость мозга к различным повреждающим факторам, в том числе к экстремальным нагрузкам и гипоксии. Кроме этого, ноотропы обладают способностью снижать неврологический дефицит и улучшать кортикосубкортикальные связи. Для обозначения веществ этой группы существует ряд синонимов: нейродинамические, нейрорегуляторные, нейроанаболические или зутотрофические средства, нейрометаболические церебропротекторы, нейрометаболические стимуляторы. Эти термины отражают общее свойство препаратов - способность стимулировать обменные процессы в нервной ткани, особенно при различных нарушениях (аноксии, ишемии, интоксикациях, травме и т.д.), возвращая их к нормальному уровню ([http://www.rlsnet.ru/fg\\_index\\_id\\_46.htm](http://www.rlsnet.ru/fg_index_id_46.htm)).

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

Технический результат также выражается в увеличении безопасности и эффективности профилактики и терапии состояний и заболеваний, корректируемых в той или иной степени ноотропными агентами, за счет реализации безопасного для организма механизма и использования молекулы предложенной структуры соответственно.

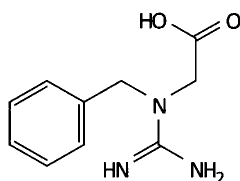
Таким образом, не является известным применение креатина и фенола, а также молекул на их основе для получения вышеуказанных технических результатов.

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

Креатин синтезируется организмом самостоятельно из 3-х 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 H. 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

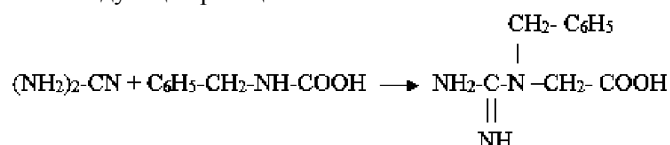
Предложен фенилкреатин (N-бензил-N-карбамимидоилглицин,  $\text{NH}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{-N}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{-CH}_2\text{-COOH}$  ( $\text{C}_{10}\text{-H}_{13}\text{-N}_3\text{-O}_2$ )) следующего строения:



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 нормальном 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 ноотропного агента.

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

### 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 цианамид и 0,2 мл дистиллированной воды. Затем добавляли каплю раствора аммиака в каталитических количествах. Смесь быстро перемешивали переворачиванием, а затем добавляли смесь цианамид 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 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 термостатирования. К отобранной пробе прибавляли 20 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и выдерживали 15 мин при температуре -24°C, центрифугировали при 6000 g в течении 5 мин для осаждения белков плазмы, отбирали супернатант и проводили его анализ.

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

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 XRbridge Peptide ВЕН С18 ("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 (см. таблицу).

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 ноотропного действия фенилкреатина.

Опыты проводили на крысах-самцах Wistar, рожденных в сентябре 2014 г. (опыты проводились в ноябре 2016 г.). Животных содержали в стандартных пластмассовых клетках при температуре воздуха 21-23°C. Они получали сбалансированный гранулированный корм и питьевую воду без ограничений. Работа выполнялась с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным.

Крыс разделили на 2 группы. Крысы первой опытной группы получали 10 мг фенилкреатина на одно животное ежедневно в течении месяца с питьевой водой. Крысы второй опытной группы получали воду. В качестве контроля в эксперименте использовались крысы, рожденные в мае 2016 г. (третья группа, молодые крысы).

В эксперименте использовали челночный лабиринт для оценки нервно-психических процессов, прежде всего когнитивных (Навакатилян М.А., Платонов Л.Л., 1988). В конце лабиринта находилось пищевое подкрепление (кусочек сыра массой 200 мг).

Время проведения эксперимента по нахождению выхода из лабиринта - 5 мин. Во время эксперимента регистрировалось время прохождения лабиринта, количество крыс, достигающих конца лабиринта, количество вертикальных стоек.

Если рассматривать возрастную динамику по показателям локомоторной и когнитивной активности, она уменьшается с возрастом в 5 раз (с 3-месячного по 24-месячный возраст) (Анисимов В.Н., 2001).

Результаты.

Группа 1 (старые крысы 25 мес. плюс фенилкреатин).

Число стоек в минуту -  $1,2 \pm 0,44$ .

Количество крыс, достигающих конца лабиринта за 5 мин - 50%.

Время прохождения лабиринта -  $2 \pm 0,22$  мин.

Группа 2 (старые крысы 25 мес.).

Число стоек в минуту -  $2 \pm 0,56$ .

Количество крыс, достигающих конца лабиринта за 5 мин - 10%.

Время прохождения лабиринта -  $5 \pm 0,42$  мин.

Группа 3 (молодые крысы 6 мес.).

Число стоек в минуту -  $0,3 \pm 0,21$ .

Количество крыс, достигающих конца лабиринта за 5 мин - 70%.

Время прохождения лабиринта -  $1 \pm 0,12$  мин.

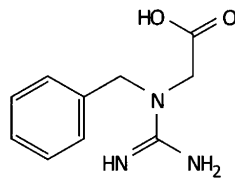
Полученные результаты подтверждают возможность использования фенилкреатина по изобретению в качестве ноотропного средства.

В ином исследовании вводили мышам (18-22 г) в течение 20 дней фенилкреатин в количестве 50 мг на 1 кг веса, либо 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 мышам в желудок ежедневно утром, натощак. Также в одном из исследований использовались дозировки 10 мг фенилкреатина на животное и 300 мг креатина на животное, животное - мышшь. Введение осуществлялось ежедневно на протяжении 25 дней. Также в одном из исследований использовалась дозировка 20 мг на одно животное, животное - крыса. Также в одном из исследований для человека использовалась дозировка 2 мг на 1 кг в день, в течение 14 дней.

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Применение фенилкреатина формулы



в качестве ноотропного агента.

