



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

⑳ Numer zgłoszenia: 306282

⑤① IntCl⁶
C07F 9/06

㉑ Data zgłoszenia: 13.12.1994

⑤④

Pochodne fosfokreatyny

GZYTELIA
OGÓLNA

④③

Zgłoszenie ogłoszono:
24.06.1996 BUP 13/96

④⑤

O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2000 WUP 05/00

⑦③

Uprawniony z patentu:
Politechnika Śląska, Gliwice, PL
Śląska Akademia Medyczna, Katowice, PL

⑦②

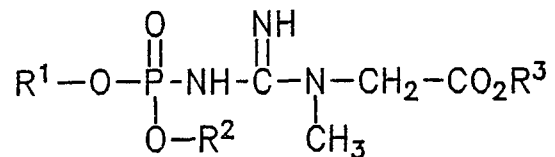
Twórcy wynalazku:
Witold Tuganowski, Katowice, PL
Wojciech Zieliński, Gliwice, PL

⑦④

Pełnomocnik:
Ziółkowska Urszula, Politechnika Śląska

⑦⑦

1. Pochodne fosfokreatyny określone wzorem 1, gdzie R¹ oznacza grupę benzylową, R² oznacza wodór lub grupę benzylową, R³ oznacza wodór lub grupę alkilową, korzystnie etylową występujące w postaci soli metali.



Wzór 1

Pochodne fosfokreatyny

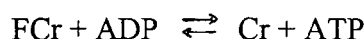
Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne fosfokreatyny określone wzorem 1, gdzie R^1 oznacza grupę benzyłową, R^2 oznacza wodór lub grupę benzyłową, R^3 oznacza wodór lub grupę alkilową, korzystnie etylową występujące w postaci soli metali.
2. Pochodne fosfokreatyny według zastrz. 1 w postaci soli monosodowej lub disodowej.
3. Pochodne fosfokreatyny według zastrz. 1 lub 2 występujące w postaci soli wewnętrznej określonej wzorem 2.

* * *

Przedmiotem wynalazku są pochodne fosfokreatyny podstawione grupami alkilowymi i benzyłowymi w grupie fosforanowej i karboksylowej występujące w postaci soli metali.

Fosfokreatyna (FCr, wzór 1, $R^1=R^2=R^3=H$) jest jednym z kilku wewnątrzkomórkowych wysokoenergetycznych środków obiegowych. Odgrywa ona szczególną rolę w energetyce tkanek mięśniowych i nerwowych. Fosfokreatyna może przenosić grupę fosforanową na adenozyndifosforan (ADP), tworząc adenozynotrójfosforan (ATP), związek spełniający główną rolę w transporcie i wymianie energii



Może być realizowana również reakcja odwrotna. Reakcje te w organizmie katalizowane są przez enzym kreatynokinazę. Równowaga ustala się w zależności od różnicy potencjałów grup fosforanowych. W środowisku obojętnym w obecności jonów magnezowych potencjał przenoszenia grup fosforanowych w fosfokreatynie jest wyższy od potencjału ADP, dlatego też równowaga tej reakcji przesunięta jest znacznie w prawo, natomiast w środowisku zasadowym, z uwagi na zmianę wartości potencjałów - w lewo. Ponieważ nie jest znana inna metaboliczna droga tworzenia i rozkładu fosfokreatyny, związek ten jest dobrze dostosowany do spełniania roli magazynowania grup fosforanowych, tym bardziej, że jego zawartość w komórkach mięśniowych i nerwowych jest kilkakrotnie większa niż ATP.

W normalnych warunkach pracy organizmu tworzenie ATP z ADP następuje w wyniku utlenienia cząsteczek pokarmu. Fosfokreatyna jest w tym przypadku substancją buforową, która magazynuje energię w przypadku nadmiernej jej produkcji i oddaje energię w wyniku przekazywania grupy fosforanowej na ADP w przypadku jej dużego zużycia. Obecność w fosfokreatynie wysokoenergetycznego wiązania stwarza możliwość wykorzystania tego związku jako dostarczyciela energii w warunkach niedoboru tlenu (np. zawał serca, zator mózgu). Jednakże z uwagi na silne hydrofilowe własności fosfokreatyny nie jest ona przenikalna przez błonę komórkową i nie ma w związku z tym możliwości wprowadzenia jej do komórki z zewnątrz.

Istotą wynalazku jest zsyntezowanie takich pochodnych fosfokreatyny, które wykazując zdolność przenikania przez błonę komórkową zachowują możliwość przekazywania grup fosforanowych na ADP. Pochodne fosfokreatyny o wzorze 1 według wynalazku nie były dotąd opisane, stanowią więc grupę związków nowych. Nieoczekiwanie związki te, w zależności od rodzaju podstawników R^1 , R^2 i R^3 wywierają bądź znacznie silniejszy efekt przekazywania energii od fosfokreatyny manifestujący się większą amplitudą skurczów preparatów mięśniowych, bądź też wykazują silne działanie inhibujące ten efekt.

W pochodnych fosfokreatyny według wynalazku o wzorze 1 R^1 oznacza grupę benzyłową, R^2 oznacza wodór lub grupę benzyłową, a R^3 oznacza wodór lub grupę alkilową.

Korzystną grupę pochodnych fosfokreatyny stanowi związek 1, gdzie grupa alkilowa jest grupą etylową.

Związki o wzorze 1 mogą występować w postaci soli, korzystnie soli monosodowych lub dwusodowych. Otrzymywanie pochodnych fosfokreatyny w postaci soli pozwala po rozpuszczeniu w wodzie na uzyskanie roztworów o odczynie obojętnym lub zasadowym, co zapewnia im wystarczającą trwałość.

Związki o wzorze 1 zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

| | Nazwa związku | R ¹ | R ² | R ³ | t.t. °C |
|---|--|--|--|-------------------------------|---------|
| a | O-benzylfosfokreatyna (sól monosodowa) | C ₆ H ₅ -CH ₂ | Na | H | 39 ÷ 40 |
| b | O-benzylfosfokreatyna (sól dwusodowa) | C ₆ H ₅ -CH ₂ | Na | Na | 123 |
| c | O,O-dibenzylfosfokreatyna (sól sodowa) | C ₆ H ₅ -CH ₂ | C ₆ H ₅ -CH ₂ | Na | olej |
| d | Ester etylowy O-benzylfosfokreatyny (sól monosodowa) | C ₆ H ₅ -CH ₂ | Na | C ₂ H ₅ | 45 |

Jak się okazało, związki a ÷ c, mogące tworzyć wewnętrzne sole określone wzorem 2, powodują znaczny wzrost amplitudy skurczów preparatów mięśniowych w stosunku do kontroli oraz wzrost ilości ATP w komórkach. Związek d, który nie może tworzyć soli wewnętrznej i występuje tylko w postaci określonej wzorem 1, wykazuje silny efekt inhibujący, zmniejszając w komórkach ilość ATP, fosfokreatyny, obniżając aktywność kreatynokinazy oraz zmniejsza częstotliwość i amplitudę skurczów.

Sposób wytwarzania nowych związków o wzorze 1 polega na tym, że związek 3 będący pochodną fosfocyjanamidu, w którym R¹ i R² mają znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1, poddaje się reakcji ze związkiem 4, będącym pochodną sarkozyny, w którym R³ ma znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1. Reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku polarnym, korzystnie roztworze etanolowo-wodnym, w temperaturze 20 ÷ 80°C, korzystnie 50°C, przez 2 ÷ 20 dni, korzystnie 7 dni. Szczegóły wytwarzania produktów pośrednich o wzorze 3 można zaczerpnąć z metod podanych w publikacji Chem. Ber., 95, 1670 (1962).

W innym wariantcie sposobu według wynalazku związku o wzorze 1 można otrzymać na drodze fosforylacji związkiem 5, gdzie R¹ i R² mają znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1, pochodnej kreatyny o wzorze 6, gdzie R³ ma znaczenie podane przy omawianiu wzoru 1, według ogólnie znanych metod.

Podane niżej przykłady szczegółowo podają sposób wytwarzania niektórych nowych związków o wzorze 1 i ich działanie biologiczne.

Przykład 1

Synteza soli monosodowej O-benzylfosfokreatyny (1a)

W kolbie o pojemności 100 cm³ umieszczono 2.22 g (0.08 m) soli monosodowej O-benzylfosfocyjanamidu i 1.00 g (0.012 m) sarkozyny, 54 cm³ etanolu i 20 cm³ wody destylowanej. Kolbę ogrzewano w termostatowej łaźni o temperaturze 50°C przez 7 dni. Kła-

rowny roztwór odparowano na wyparce próżniowej. Pozostały gęsty jasnożółty olej zadano 10 cm³ bezwodnego acetonu. Wypadający osad nadmiaru sarkozyny odsączono, przesącz rozpuszczono w 30 cm³ metanolu, zadano 10 cm³ bezwodnego eteru, odsączono pozostałą ilość sarkozyny. Rozpuszczalniki odparowano otrzymując chromatograficznie czysty produkt o t.t. 39 ÷ 40°C z wydajnością 59 %.

Przykład 2

Synteza soli monosodowej estru etylowego O-benzylofosfokreatyny (1d)

1.3 g (0.05 m) soli disodowej O-benzylofosfocyanamidu i 1.15 g (0.0075 m) chlorowodoru estru etylowego sarkozyny rozpuszczono w mieszaninie 35 cm³ etanolu i 15 cm³ wody destylowanej. Roztwór ogrzewano w temperaturze 50°C przez 7 dni. Rozpuszczalniki oddzielono na próżniowej wyparce rotacyjnej. Mieszaninę oleju i białego osadu zadano 20 cm³ bezwodnego acetonu, odsączono osad stanowiący chlorek sodu i nadmiar chlorowodoru estru etylowego sarkozyny. Z przesącza oddzielono aceton, otrzymując chromatograficznie czysty produkt o t.t. 45°C z wydajnością 63 %.

Przykład 3

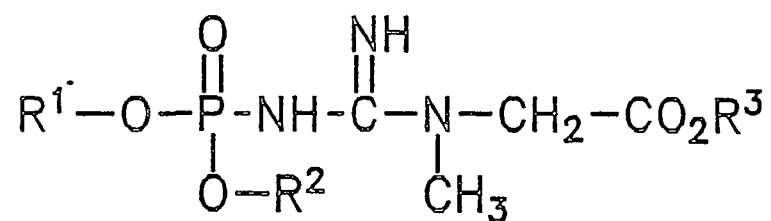
Działanie soli monosodowej O-benzylofosfokreatyny na mięśnie serca królika

Świeżo spreparowane mięśnie serca królika obmywano natlenowanym roztworem Tyroda mierząc znanymi metodami zawartość ATP w mięśni, wielkość potencjału i amplitudy skurczu mięśnia jako dane kontrolne. Całkowite niedotlenienie mięśnia uzyskano przemycając go roztworem Tyroda nasyconym mieszaniną azotu i dwutlenku węgla (95 : 5), co powodowało zanik skurczów i obniżenie potencjału. Przemycie następnie roztworem Tyroda zawierającym 5 mmoli/l soli monosodowej O-benzylokreatyny spowodowało przyrost ATP w stosunku do kontroli o ponad 60 %, niewielki wzrost potencjału i prawie sześciokrotny wzrost amplitudy skurczu mięśnia.

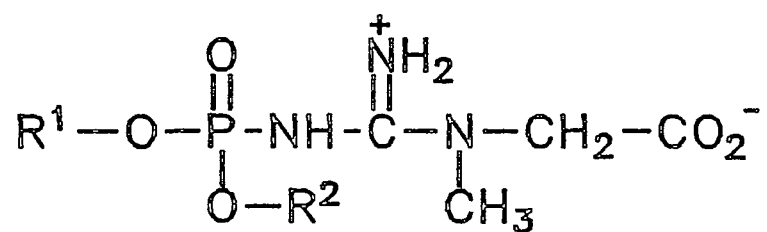
Przykład 4

Działanie soli monosodowej estru etylowego O-benzylofosfokreatyny

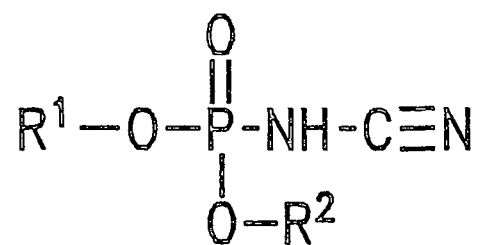
Przeprowadzając doświadczenie analogicznie jak w przykładzie 3, po przemyciu roztworem Tyroda zawierającym sól monosodową estru etylowego O-benzylofosfokreatyny, przy stężeniu 2.5 mmoli/l stwierdzono około czterokrotny spadek zawartości ATP, około trzykrotny spadek zawartości fosfokreatyny oraz około trzykrotny spadek aktywności kreatynokinazy, przy stężeniu 0.5 mmoli/l stwierdzono pięciokrotny spadek częstotliwości skurczów, przy stężeniu 0.1 mmoli/l stwierdzono dwukrotny spadek częstotliwości skurczów, około trzykrotne zmniejszenie amplitudy skurczu i obniżenie potencjału.



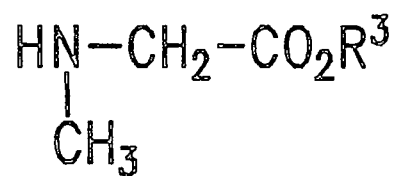
Wzór 1



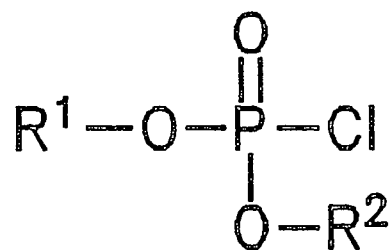
Wzór 2



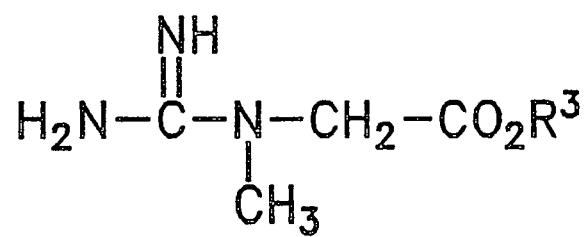
Wzór 3



Wzór 4



Wzór 5



Wzór 6