

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902111773A1

Publication Date

20140618

Applicant

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA

Title

PROCEDIMENTO PER SINTETIZZARE DERIVATI DELLA CREATINA

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"Procedimento per sintetizzare derivati della creatina"

Di: Università degli Studi di Genova, nazionalità italiana, via Balbi 5, 16125, Genova (Italia).

Inventori designati: MILLO, Enrico; BALESTRINO, Maurizio; DAMONTE, Gianluca; GARBATI, Patrizia; ANDRIANO, Enrico; SALIS, Annalisa.

Depositata il: 18 Dicembre 2012

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un procedimento per la sintesi di derivati della creatina.

I livelli intracellulari di ATP sono mantenuti costanti attraverso la fosforilazione reversibile della creatina a fosfocreatina, effettuata dall'enzima creatina chinasi. La fosfocreatina è infatti in grado di donare un gruppo fosfato all'ADP, ripristinando i livelli di ATP. La creatina svolge quindi un ruolo centrale nel metabolismo energetico delle cellule. La sua azione è di grande importanza in tutti i tipi cellulari, principalmente nel tessuto muscolare e nel cervello.

Come è ben noto, la creatina trasferisce un gruppo fosfato all'ATP mediante l'enzima creatina

chinasi, secondo la seguente reazione:



Cr = Creatina

PCr = Fosfocreatina

ATP = Adenosina-Tri-Fosfato

ADP = Adenosina-Di- Fosfato

La creatina è sintetizzata nei reni, nel fegato, nel pancreas e nel cervello, oppure è ottenuta da fonti alimentari quali carne e pesce freschi. Essa viene trasportata attraverso il sangue ed entra nelle cellule dei tessuti, soprattutto quelle caratterizzate da un elevato fabbisogno energetico, quali appunto le cellule muscolari e del cervello, utilizzando il proprio trasportatore specifico (CrT). Lo stesso trasportatore è necessario affinché la creatina attraversi la barriera ematoencefalica.

Le sindromi da deficienza di creatina rappresentano un gruppo di patologie causate da mutazioni dei geni per la arginina glicina amidinotransferasi (AGAT, EC 2.1.4.1) e per la guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT, EC 2.1.1.2), due enzimi necessari per la sintesi della creatina, nonché del gene SLC6A8 che codifica per il trasportatore specifico della creatina.

I pazienti affetti da queste sindromi presentano gravi sintomi neurologici nella prima infanzia, che tipicamente includono ritardo mentale e crisi epilettiche di gravità variabile, ma spesso vi sono altri sintomi quali il ritardo nell'acquisizione del linguaggio, disordini del movimento, disordini comportamentali, ivi inclusi l'autismo, l'iperattività, e l'autolesionismo.

Il deficit del trasportatore della creatina è attualmente una malattia incurabile ed una possibile soluzione potrebbe essere rappresentata dalla somministrazione di creatina in una forma in grado di attraversare le membrane biologiche senza l'ausilio del trasportatore specifico della creatina, che in questi pazienti non è presente. Peraltro, anche per le altre patologie caratterizzate da carenza di creatina - che, oltre alle summenzionate sindromi da deficienza di AGAT e di GAMT, annoverano altresì l'ictus ischemico - la somministrazione di creatina sarebbe di grande beneficio.

Tuttavia, la creatina è una molecola polare, che non è facilmente in grado di attraversare le membrane biologiche. Per superare questo inconveniente è quindi necessario disporre di derivati della creatina che ne aumentino il carattere lipo-

filo e la rendano quindi adatta ad attraversare le membrane biologiche, preferibilmente senza l'ausilio del suo trasportatore specifico. Una strategia alternativa consiste nel legarla ad altre molecole che possano svolgere la funzione di carrier e quindi veicolarla attraverso le membrane biologiche mediante altri trasportatori.

Tuttavia, un problema tecnico legato alla sintesi di derivati della creatina è rappresentato dal fatto che essa è poco reattiva con altre molecole, a causa della sua bassa solubilità in acqua e in solventi organici.

Nella domanda di brevetto statunitense US 2009/0297685 è descritto un procedimento per la sintesi di immuno-zuccheri legati a creatina che in un primo passaggio prevede la sintesi di creatina protetta con tert-butossicarbonile (d'ora in avanti indicata come "(Boc)₂-creatina") sui due atomi di azoto del gruppo guanidinico: tale forma è infatti più stabile e reattiva rispetto alla creatina non protetta. La (Boc)₂-creatina presenta inoltre il vantaggio di avere il gruppo carbossilico non protetto e quindi libero di reagire con altre molecole a formare il derivato desiderato. Nei derivati di creatina idonei al trattamento di sindromi da defi-

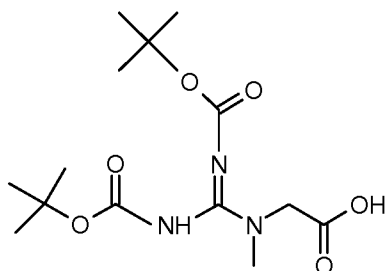
cienza di creatina è infatti necessario che il legame con la molecola di interesse sia un legame covalente che non coinvolga il gruppo guanidinico della creatina, che deve essere lasciato libero di interagire con l'enzima creatina chinasi.

Secondo gli insegnamenti di US 2009/0297685, la (Boc)₂-creatina viene sintetizzata in fase acquosa facendo reagire creatina con N,N-bis(tert-butossicarbonil)anidride. Questo metodo presenta tuttavia lo svantaggio di fornire basse rese a causa dell'instabilità e della bassa solubilità della creatina.

Scopo della presente invenzione è quindi quello di mettere a disposizione un procedimento per la sintesi di (Boc)₂-creatina e successivamente di derivati della creatina che superi i problemi della tecnica anteriore.

Tale scopo è raggiunto tramite un procedimento per la sintesi di (Boc)₂-creatina come definito nella parte caratterizzante della rivendicazione 1.

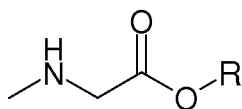
La (Boc)₂-creatina sintetizzata con il procedimento dell'invenzione ha la formula di struttura illustrata qui di seguito come formula (III):



FORMULA (III)

Il primo passaggio del procedimento dell'invenzione prevede l'impiego come precursore di un estere di sarcosina di formula (I), che viene convertito in estere di (Boc)₂-creatina di formula (II) secondo una procedura semplice. L'estere di formula (II) è infatti ottenuto mediante l'impiego di un agente guanilante protetto con t-Boc su entrambi gli atomi di azoto, che ne permette la sintesi diretta.

L'estere di sarcosina di formula (I) utilizzato come precursore nel primo passaggio del procedimento dell'invenzione ha la formula di struttura illustrata qui di seguito:



FORMULA (I)

in cui R è un gruppo alchilico o arilico, lineare o ramificato, saturo o insaturo avente da 1 a 8 atomi di carbonio. In una forma di attuazione preferita,

R è un gruppo alchilico lineare avente da 1 a 8 atomi di carbonio; ancora più preferibilmente, R è etile e la formula (I) rappresenta quindi l'etil estere di sarcosina.

Nel passaggio successivo del procedimento, l'estere di (Boc)₂-creatina di formula (II) viene sottoposto ad idrolisi basica a formare la (Boc)₂-creatina di formula (III).

Il procedimento dell'invenzione consente vantaggiosamente di ottenere alte rese e un'ottima purezza del prodotto finale (Boc)₂-creatina. In una forma di attuazione preferita, come agente guanilante viene utilizzata la 1,3-bis(tert-butossicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (CAS 107819-90-9) oppure il N,N-bis(tert-butossicarbonil)1-guanil pirazolo (CAS 152120-54-2). Le rese ottenute con questi due agenti guanilanti sono sostanzialmente analoghe.

In un secondo aspetto dell'invenzione, la (Boc)₂-creatina di formula (III) ottenuta mediante il procedimento sopra descritto viene successivamente impiegata per sintetizzare un derivato di creatina, mediante coniugazione secondo metodologie convenzionali con una molecola comprendente un gruppo funzionale atto a reagire con il gruppo car-

bossilico libero della (Boc)₂-creatina di formula (III), ottenendo in tal modo un derivato di (Boc)₂-creatina.

Esempi non limitativi di molecole comprendenti un gruppo funzionale atto a reagire con il gruppo carbossilico libero della (Boc)₂-creatina di formula (III) sono aminoacidi e loro esteri, ammine, alcoli, tioli, lipidi, vitamine e carboidrati.

Infine, se lo si desidera, i due gruppi t-Boc possono essere facilmente rimossi dal derivato di (Boc)₂-creatina mediante trattamento in ambiente acido.

L'utilizzo di t-Boc come gruppo protettore del gruppo guanidinico risulta particolarmente vantaggioso per la sintesi di derivati di creatina. I presenti inventori hanno infatti provato ad utilizzare altri gruppi protettori descritti in letteratura, hanno sperimentato diverse metodiche per proteggere il gruppo guanidinico, quali inserimento del gruppo p-toluensolfonile, inserimento di gruppo tritile (trifenilmetile) ed inserimento del gruppo Pbf (2,2,4,6,7-Pentametildiidrobenzofurano-5- solfonile, senza tuttavia ottenere risultati soddisfacenti, in quanto i tentativi hanno portato alla degradazione del prodotto e/o a rese troppo basse.

Gli esempi che seguono sono forniti a scopo meramente illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita nelle annesse rivendicazioni.

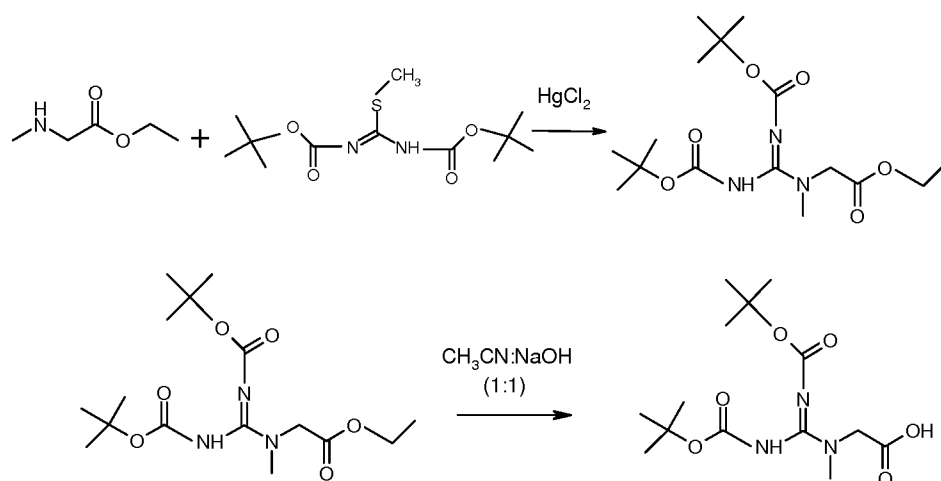
Esempio 1: sintesi di (Boc)₂-creatina

Metodo A impiegando 1,3-bis(tert-butossicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea quale agente guanilante (Schema di reazione 1)

Ad una soluzione di sarcosina etil estere (1,2 equivalenti), 1,3-bis(tert-butossicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea (1 equivalente) e trietilammina (3 equivalenti), in N,N dimetilformammide anidra, vengono aggiunti 1,1 equivalenti di HgCl₂. La sospensione è tenuta in agitazione a temperatura ambiente fino a compimento della reazione controllata mediante cromatografia su strato sottile (TLC, "Thin Layer Chromatography"). Indicativamente, a seconda dei quantitativi impiegati, i tempi di reazione vanno dalle 18 alle 24 ore. Al termine la miscela di reazione è ripresa in etere con la formazione di un abbondante precipitato bianco. Tale precipitato è filtrato mediante vuoto. La soluzione eterea ottenuta viene lavata 2 volte con acqua deionizzata e successivamente altre 2 volte con una soluzione di NaCl (0,1M). La fase eterea viene eva-

porata a minimo volume e successivamente liofilizzata. Al prodotto così ottenuto, posto in agitazione, viene aggiunta una soluzione di acetonitrile e NaOH 1N in rapporto 1:1 allo scopo di idrolizzare il gruppo etile. Anche questa reazione è controllata mediante TLC. A reazione avvenuta il pH della soluzione è portato a 6 usando HCl 1N. Il composto viene quindi centrifugato per allontanare l'eventuale precipitato. Il sopranante viene liofilizzato ricavando una polvere bianca. La struttura della molecola è stata verificata mediante analisi in spettrometria di massa confermando il peso molecolare atteso.

Schema di reazione 1:



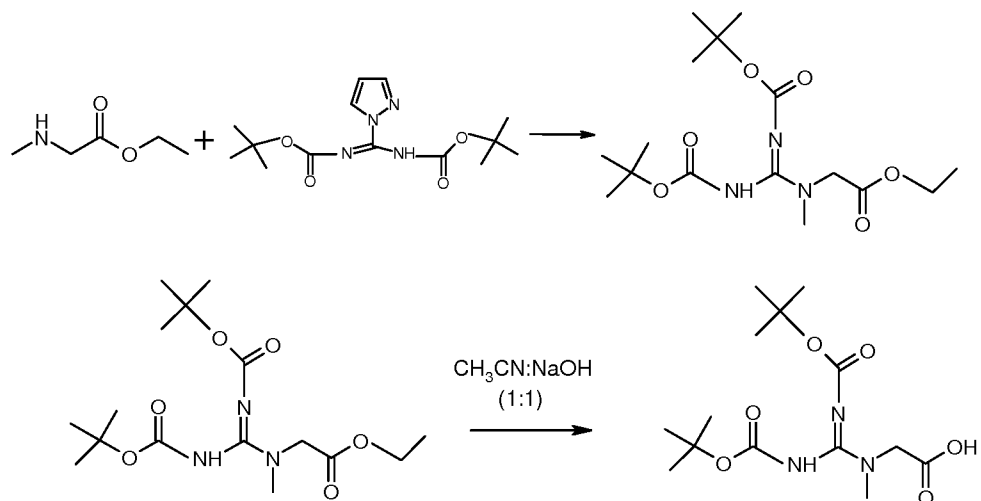
Esempio 2: sintesi di (Boc)₂-creatina

Metodo B impiegando *N,N*-bis(*tert*-butossicarbonil)1-

guanil pirazolo quale agente guanilante (Schema di reazione 2)

Una soluzione di sarcosina etil estere (1,2 equivalenti), N,N-bis(tert-butossicarbonil)1-guanil pirazolo (1 equivalente) e trietilammina (3 equivalenti), in N,N dimetilformammide anidra, viene tenuta in agitazione a temperatura ambiente fino a compimento della reazione. La reazione viene controllata mediante TLC. Indicativamente, a seconda dei quantitativi impiegati, i tempi di reazione vanno dalle 18 alle 24 ore. Al termine la mistura di reazione è ripresa in etere e lavata 2 volte con un'equivalente quantità di acqua deionizzata. La fase eterea viene evaporata a minimo volume e successivamente liofilizzata. Al prodotto così ottenuto, posto in agitazione, viene aggiunta una soluzione di acetonitrile e NaOH 1N in rapporto 1:1 allo scopo di idrolizzare il gruppo etile. A reazione avvenuta il pH della soluzione è portato a 6 usando HCl 1N. Il composto viene quindi centrifugato per allontanare l'eventuale precipitato. Il soprannatante viene liofilizzato ricavando una polvere bianca. La struttura della molecola è stata verificata mediante analisi in spettrometria di massa confermando il peso molecolare atteso.

Schema di reazione 2:



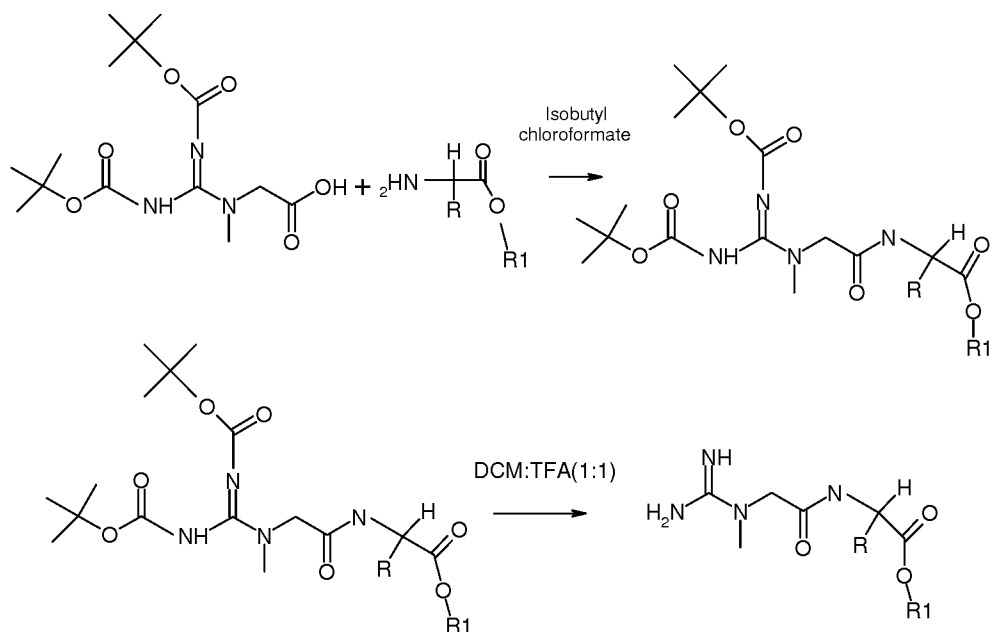
Esempio 3: sintesi di (Boc)₂-creatina legata ad un amminoacido esterificato.

Un equivalente di (Boc)₂-creatina è solubilizzato in N,N dimetilformammide anidra. A tale soluzione, posta alla temperatura di 0°C e sotto agitazione, è aggiunto 1 equivalente di isobutilclorofornato ed 1 equivalente di N-metilmorfolina. Dopo 10 minuti la reazione è posta a temperatura ambiente e protetta dalla luce. A tale soluzione si aggiunge l'amminoacido esterificato precedentemente preparato mettendo in agitazione l'estere dell'amminoacido presente sotto forma di cloridrato (1,5 equivalenti) con trietilammia (3 equivalenti) in N,N dimetilformammide anidra per 30 minuti. Quindi la miscela ottenuta è centrifugata ed il so-

pranatanate aggiunto alla miscela contenente (Boc)₂-creatina attivata. Il composto è tenuto in agitazione a temperatura ambiente dalle 24 alle 48 ore, a seconda dell'amminoacido, controllando mediante TLC l'evolversi della reazione. A reazione avvenuta la miscela di sintesi viene centrifugata ed il sopranatante ottenuto liofilizzato. Tale prodotto viene ripreso con etere o acetato di etile, a seconda della polarità dell'amminoacido impiegato, e lavato con acqua deionizzata. La fase organica è quindi evaporata a minimo volume. Il derivato della creatina così ottenuto è purificato mediante HPLC (*"High Performance Liquid Chromatography"*) a fase inversa. Al prodotto finale, posto alla temperatura di 0°C, viene aggiunta una soluzione di diclorometano ed acido trifluoroacetico in rapporto 1:1 (Schema di reazione 3). Al termine della reazione, monitorata mediante TLC, il composto viene fatto gocciolare in etere freddo ottenendo un precipitato bianco. Il precipitato è separato mediante centrifugazione ed essiccato a polvere mediante liofilizzazione.

La struttura dei derivati realizzati è stata confermata mediante analisi in spettrometria di massa confermando il peso molecolare atteso.

Schema di reazione 3:



Esempio 4: sintesi di ammidi di creatina

Un equivalente di (Boc)₂-creatina è solubilizzato in N,N dimetilformammide anidra. A tale soluzione, posta alla temperatura di 0°C, è aggiunto 1 equivalente di isobutilcloroformiato ed 1 equivalente di N-metilmorfolina. Dopo 10 minuti la reazione è messa a temperatura ambiente protetta dalla luce. A tale soluzione vengono aggiunti 1,5 equivalenti di ammina. La miscela è tenuta in agitazione a temperatura ambiente dalle 24 alle 48 ore, a seconda dell'ammina impiegata, controllando la reazione mediante TLC. A reazione avvenuta la sospensione viene centrifugata ed il sopranatante liofi-

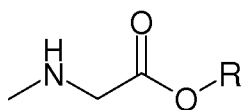
lizzato. Quindi il composto liofilizzato viene ripreso con etere e lavato con acqua deionizzata. La fase organica è quindi evaporata a minimo volume ed infine liofilizzato. Il prodotto così ottenuto è purificato mediante HPLC a fase inversa. Al prodotto finale, posto alla temperatura di 0°C, viene aggiunta una soluzione di diclorometano ed acido trifluoroacetico in rapporto 1:1 (Schema di reazione 3). Al termine della reazione, monitorata mediante TLC, il prodotto ottenuto viene fatto gocciolare in etere freddo ottenendo un precipitato. Il precipitato è separato mediante centrifugazione ed essiccato a polvere mediante liofilizzazione.

Con questa metodica sono stati realizzati i seguenti derivati: creatina-piperidina, creatina-paratoluidina, creatina-morfolina, creatina-dietilammina. La struttura dei derivati realizzati è stata confermata mediante analisi in spettrometria di massa confermando il peso molecolare atteso. Naturalmente, la stessa procedura può essere applicata per la sintesi di qualsiasi derivato di creatina ottenibile per reazione con una molecola avente almeno un gruppo amminico.

RIVENDICAZIONI

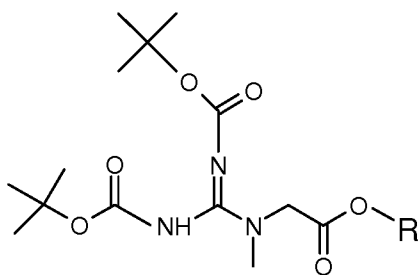
1. Procedimento per la sintesi di (Boc)₂-creatina di formula (III), caratterizzato dal fatto di comprendere i passaggi di:

(i) far reagire un estere di sarcosina di formula (I)



FORMULA (I)

in cui R è un gruppo alchilico o arilico, lineare o ramificato, saturo o insaturo avente da 1 a 8 atomi di carbonio con un agente guanilante comprendente due atomi di azoto ciascuno protetto con un gruppo tert-butossicarbonile (t-Boc), per formare un estere di (Boc)₂-creatina di formula (II)

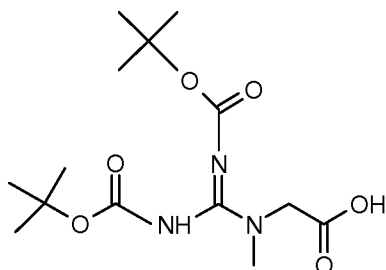


FORMULA (II)

in cui R è un gruppo alchilico o arilico, lineare o ramificato, saturo o insaturo avente da 1 a 8 atomi di carbonio;

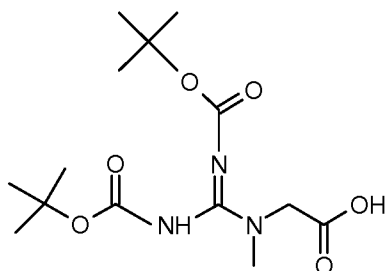
(ii) sottoporre l'estere di (Boc)₂-creatina di formula (II) a idrolisi basica, per formare (Boc)₂-

creatina di formula (III)



FORMULA (III)

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui R è un gruppo alchilico lineare.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui R è un gruppo alchilico lineare saturo.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui R è etile.
5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, in cui l'agente guanilante è 1,3-bis(tert-butossicarbonil)-2-metil-2-tiopseudourea o N,N-bis(tert-butossicarbonil)1-guanil pirazolo.
6. Procedimento per la sintesi di un derivato della creatina, caratterizzato dal fatto che comprende sintetizzare (Boc)₂-creatina di formula (III)



FORMULA (III)

con il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, e coniugare la (Boc)₂-creatina di formula (III) con una molecola comprendente un gruppo funzionale atto a reagire con il gruppo carbossilico libero della (Boc)₂-creatina di formula (III), ottenendo un tal modo un derivato di (Boc)₂-creatina.

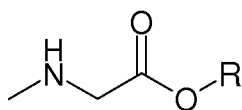
7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui la molecola comprendente un gruppo funzionale atto a reagire con il gruppo carbossilico libero della (Boc)₂-creatina di formula (III) è scelta dal gruppo che consiste di aminoacidi e loro esteri, ammine, alcoli, tioli, lipidi, vitamine e carboidrati.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 5 o 6, comprendente l'ulteriore passaggio di rimuovere i gruppi tert-butossicarbonile dal derivato di (Boc)₂-creatina mediante trattamento in ambiente acido.

CLAIMS

1. A method of synthesizing (Boc)₂-creatine of formula (III), characterized in that it comprises the steps of:

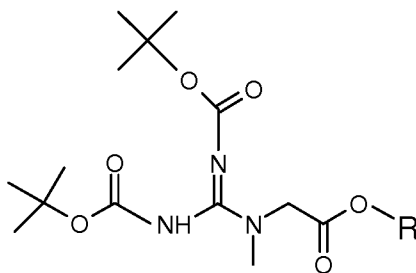
(i) reacting a sarcosine ester of formula (I)



FORMULA (I)

wherein R is a linear or branched, saturated or unsaturated alkyl or aryl group having 1 to 8 carbon atoms,

with a guanylyating agent comprising two nitrogen atoms each protected with a tert-butoxycarbonyl group (t-Boc), to form a (Boc)₂-creatine ester of formula (II)

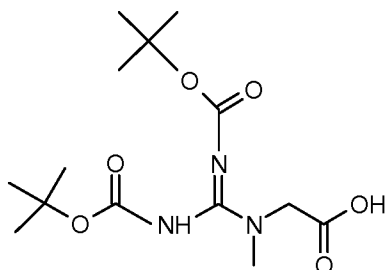


FORMULA (II)

wherein R is a linear or branched, saturated or unsaturated alkyl or aryl group having 1 to 8 carbon atoms;

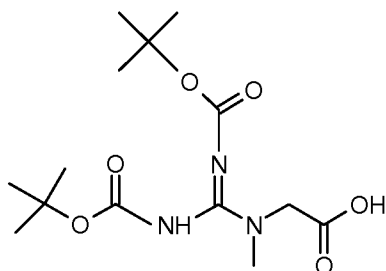
(ii) subjecting the (Boc)₂-creatine ester of formu-

1a (II) to basic hydrolysis, to form (Boc)₂-
creatine of formula (III)



FORMULA (III)

2. The method according to claim 1, wherein R is a linear alkyl group.
3. The method according to claim 2, wherein R is a linear saturated alkyl group.
4. The method according to claim 3, wherein R is ethyl.
5. The method according to any of claims 1 to 4, wherein the guanylation is 1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea or N,N'-Di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamidine.
6. A method of synthesizing a creatine derivative, characterized in that it comprises synthesizing (Boc)₂-creatine of formula (III)



FORMULA (III)

by the method according any of claims 1 to 5, and conjugating the (Boc)₂-creatine of formula (III) with a molecule comprising a functional group capable of reacting with the free carboxyl group of (Boc)₂-creatine of formula (III), thereby obtaining a derivative of (Boc)₂-creatine.

7. The method according to claim 6, wherein the molecule comprising a functional group capable of reacting with the free carboxyl group of (Boc)₂-creatine of formula (III) is selected from the group consisting of amino acids and esters thereof, amines, alcohols, thiols, lipids, vitamins and carbohydrates.

8. The method according to claims 6 or 7, comprising the further step of removing the tert-butoxycarbonyl groups from the (Boc)₂-creatine derivative by treatment in an acidic medium.