



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA**

**DOTTORATO IN MEDICINA SPERIMENTALE**

**CURRICULUM BIOCHIMICA (XXX CICLO)**

**SETTORE DISCIPLINARE BIO 10**

**Sintesi e Caratterizzazione di nuovi derivati della creatina per la terapia del Deficit del trasportatore SLC6A8 e nuova procedura sintetica per l'ottenimento della fosfocreatina**

Candidata: Maria Arkel

Tutor: Prof. Gianluca Damonte

Anno accademico 2016-2017

# INDICE GENERALE

## Indice delle figure

## Abbreviazioni

Abstract in italiano.....	1
Parole chiave.....	2
Abstract in inglese.....	3
Keywords.....	3
<b>CAPITOLO 1 : INTRODUZIONE GENERALE.....</b>	<b>4</b>
<b>PARTE 1: LA CREATINA E LE CONDIZIONI PATOLOGICHE IN CUI E'IMPLICATA .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 LA CREATINA .....</b>	<b>4</b>
biosintesi della creatina epatica.....	5
trasportatore della creatina.....	6
escrezione della creatina.....	8
biosintesi della creatina nel SNC .....	9
funzione della creatina nel metabolismo energetico cellulare .....	11
effetti fisiologici della creatina .....	13
effetto antiossidante della creatina .....	13
effetto antiapoptotico della creatina .....	13
effetti della creatina a livello cerebrale.....	15
effetto della creatina a livello muscolare .....	15
Effetto neuroprotettivo dall'anossia.....	15
Altri effetti fisiologici della creatina.....	16
<b>1.2 COINVOLGIMENTO DELLA CREATINA IN CONDIZIONI PATOLOGICHE .....</b>	<b>16</b>
patologie del SNC .....	16
patologie psichiatriche.....	16
patologie neurodegenerative .....	17
ictus ischemico.....	21
le sindromi da deficit cerebrale di creatina.....	22
deficit di AGAT .....	23
deficit di GAMT.....	23
deficit del trasportatore SLC6A8.....	23
diagnosi delle CCDS .....	24
effetti collaterali nella somministrazione di creatina .....	26
<b>PARTE 2: PROBLEMI DELLA SOMMINISTRAZIONE DELLA Cr E STRATEGIE</b>	
<b>TERAPEUTICHE SVILUPPATE.....</b>	<b>26</b>
1.3 ATTRAVERSAMENTO DEI FARMACI DELLE BARRIERE CELLULARI.....	26

membrane cellulari .....	27
la barriera ematoencefalica .....	28
approcci per migliorare l'attraversamento dei farmaci della BEE .....	30
strategie per superare l'ostacolo della BEE .....	30
strategie che sfruttano le caratteristiche della BEE .....	31
<b>1.4 STRATEGIE TERAPEUTICHE SVILUPPATE PER RISOVERE I PROBLEMI DI DEFICIT DI Cr CEREBRALE .....</b>	<b>31</b>
trattamento con creatina monoidrato .....	31
amminoacidi precursori .....	32
derivati della creatina.....	32
complessi creatina-Mg.....	32
derivati esterei della creatina .....	32
derivati amminoacidici della creatina .....	33
ciclocreatina .....	34
altri derivati della creatina .....	34
<b>PARTE 3: IMPIEGO TERAPEUTICO DELLA FOSFOCREATINA E SUA PRODUZIONE.....</b>	<b>35</b>
<b>1.5 FOSFOCREATINA COME FARMACO .....</b>	<b>35</b>
effetti della fosfocreatina a livello cardiaco .....	35
effetti della fosfocreatina a livello del muscolo scheletrico .....	36
metodi sintetici utilizzati nella produzione della fosfocreatina.....	36
<b>CAPITOLO 2 : OBIETTIVI .....</b>	<b>38</b>
<b>Parte 1: derivati della creatina .....</b>	<b>38</b>
<b>Parte 2: fosfocreatina .....</b>	<b>39</b>
<b>CAPITOLO 3: PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>40</b>
<b>Parte 1: derivati della creatina .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 SINTESI ORGANICA E CARATTERIZZAZIONE DI DERIVATI DELLA CREATINA .....</b>	<b>40</b>
caratteristiche chimiche della creatina .....	40
sintesi della (Boc) <sub>2</sub> creatina .....	41
sintesi e caratterizzazione di derivati glucidici ottenuti a partire dalla (Boc) <sub>2</sub> creatina.....	42
sintesi e caratterizzazione della diacetilcreatina etilestere e terbutilestere.....	43
derivati dall'acido guanidinoacetico .....	43
sintesi e caratterizzazione dei derivati dell'acido guanidinoacetico .....	44
<b>3.2 STUDIO DEGLI EFFETTI NEUROBIOLOGICI DI DERIVATI DELLA CREATINA.....</b>	<b>44</b>
stabilità .....	44
modello sperimentale .....	45
valutazione dell'effetto neuroprotettivo tramite esperimenti di elettrofisiologia .....	45
effetti biochimici :determinazione del contenuto di creatina e fosfocreatina nel tessuto .....	47
<b>Parte 2: nuova procedura sintetica per la fosfocreatina.....</b>	<b>48</b>

<b>3.3 SINTESI ORGANICA E CARATTERIZZAZIONE DELLA FOSFOCREATINA</b> .....	<b>48</b>
<b>CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI</b> .....	<b>50</b>
<i>Parte 1: derivati della creatina</i> .....	<b>50</b>
<b>4.1 MATERIALI IMPIEGATI</b> .....	<b>50</b>
<b>4.2 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA PER ANALISI E PURIFICAZIONE</b> .....	<b>50</b>
HPLC analitico.....	50
HPLC preparativo.....	50
spettrometria di massa.....	51
HPLC-MS.....	51
TLC.....	51
NMR.....	51
<b>4.3 METODI DI SINTESI</b> .....	<b>52</b>
sintesi chimica della (Boc) <sub>2</sub> creatina.....	52
sintesi chimica dei derivati glucidici della creatina ottenuti dalla (Boc) <sub>2</sub> creatina.....	53
sintesi chimica del derivato creatina-glucosio.....	53
sintesi chimica del derivato creatina-glucosammina.....	54
sintesi chimica dei derivati della diacetilcreatina.....	56
sintesi chimica della diacetilcreatina etilestere.....	56
sintesi chimica della diacetilcreatina terbutilestere.....	57
sintesi dei derivati dell'acido guanidinoacetico.....	58
sintesi chimica del guanidinoacetato etilestere.....	58
sintesi chimica del guanidinoacetato benzilestere.....	59
sintesi chimica del diacetilguanidinoacetato metilestere.....	59
sintesi chimica del diacetilguanidinoacetato etilestere.....	60
<b>4.4 METODI DEI TEST BIOLOGICI</b> .....	<b>61</b>
valutazione della stabilità.....	61
preparazione delle fettine di ippocampo.....	62
inattivazione del trasportatore della creatina nelle fettine di ippocampo.....	62
preparazione dei campioni ed analisi HPLC per gli esperimenti di biochimica.....	63
metodi elettrofisiologici.....	64
effetto del GPA sulla vitalità delle fettine.....	65
effetto della DAC e del DiacetilGAAetilestere sulla vitalità delle fettine.....	65
effetto della DAC sulla vitalità delle fettine in condizioni di blocco del CrT.....	65
esperimenti con anossia.....	66
<i>Parte 2: fosfocreatina</i> .....	<b>66</b>
<b>4.5 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLA FOSFOCREATINA</b> .....	<b>66</b>
<b>CAPITOLO 5: RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>70</b>
<i>Parte1: derivati della creatina</i> .....	<b>70</b>

<b>5.1 (BOC)<sup>2</sup>-CREATINA E SUA STABILITA'</b> .....	<b>70</b>
derivati glucidici della creatina ottenuti dalla (Boc) <sup>2</sup> creatina .....	72
sintesi del derivato creatina-glucosio .....	73
sintesi del derivato creatina-glucosammina .....	75
<b>5.2 SINTESI DEI DERIVATI DELLA DIACETILCREATINA</b> .....	<b>76</b>
sintesi della diacetilcreatina etilestere.....	77
sintesi della diacetilcreatina terbutilestere.....	79
<b>5.3 SINTESI DEI DERIVATI DEL GUANIDINOACETATO</b> .....	<b>80</b>
sintesi dei derivati esterei del guanidinoacetato.....	80
sintesi del guanidinoacetato etilestere .....	80
sintesi del guanidinoacetato benzilestere .....	81
sintesi dei derivati del diacetilguanidinoacetato .....	81
sintesi del diacetilguanidinoacetato metilestere .....	82
sintesi del diacetilguanidinoacetato etilestere .....	83
<b>5.4 STABILITA' DEI COMPOSTI DAC, DIACETILCREATINA TERBUTILESTERE E DIACETILGAA ETILESTERE</b> .....	<b>85</b>
stabilità della diacetilcreatina etilestere.....	85
stabilità della diacetilcreatina terbutilestere.....	86
stabilità del guanidinoacetato etilestere .....	87
<b>5.5 RISPOSTA ELETTROFISIOLOGICA DELLA DAC E DEL DIACETILGAA ETILESTERE</b> <b>87</b>	
effetti della DAC e del diacetilGAA etilestere sulla vitalità delle fettine.....	87
effetto del blocco del trasportatore sulla vitalità delle fettine .....	89
effetto della DAC sulla vitalità delle fettine in condizioni di blocco del trasportatore .....	90
esperimenti in condizioni di anossia .....	92
<b>5.6 EFFETTI BIOCHIMICI DELLA DAC SULLA CONCENTRAZIONE DI CR E PCR</b> .....	<b>93</b>
<b>Parte 2: fosfocreatina</b> .....	<b>96</b>
<b>5.7 sintesi della fosfocreatina</b> .....	<b>96</b>
<b>CAPITOLO 6: CONCLUSIONI</b> .....	<b>102</b>
<b>Parte 1: derivati della creatina</b> .....	<b>102</b>
<b>Parte 2: sintesi della fosfocreatina</b> .....	<b>104</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>105</b>
<b>ABSTRACT E PUBBLICAZIONI</b> .....	<b>121</b>

## INDICE DELLE FIGURE

Figura 1: struttura chimica della creatina.....	4
Figura 2: biosintesi endogena della creatina .....	5
Figura 3: passaggio della creatina tramite SLC6A8.....	6
Figura 4: struttura del trasportatore SLC6A8.....	7
Figura 5: struttura chimica dell'acido 3-guanidinopropionico .....	7
Figura 6: struttura chimica della creatinina.....	8
Figura 7: formula di Cockcroft-Gault della clearance di creatinina.....	8
Figura 8: conversione non enzimatica di creatina e fosfocreatina in creatinina .....	9
Figura 9: processi biosintetici della creatina al livello del SNC .....	10
Figura 10: struttura cristallografica dell'isoenzima CK-BB in presenza di creatina e ADP.....	11
Figura 11: reazione catalizzata dall'enzima creatina chinasi .....	11
Figura 12: ruolo di "shuttle" del sistema creatina /fosfocreatina.....	12
Figura 13: metabolismo anaerobico lattacido del sistema Cr/PCr .....	13
Figura 14a: la CK è uno dei fattori protettivi dall'apoptosi a livello mitocondriale .....	14
Figura 14b: ruolo antiossidante della Cr a livello mitocondriale .....	14
Figura 15: ruolo della Cr nella AD a livello mitocondriale.....	18
Figura 16: ruolo della Cr nella PD a livello mitocondriale.....	19
Figura 17: ruolo della Cr nella SLA a livello mitocondriale.....	20
Figura 18: ruolo della Cr nella HD a livello mitocondriale .....	21
Figura 19: analisi di risonanza magnetica a protoni di paziente affetto da deficit di SLC6A8.....	25
Figura 20: meccanismi d'azione degli attivanti dei gruppi carbossilici.....	42
Figura 21: posizionamento degli elettrodi sulla fettina di ippocampo .....	46
Figura 22: forma d'onda registrata con la disposizione degli elettrodi descritta nel testo.....	47
Figura 23: reazione di Aherton-Todd.....	49
Figura 24: sintesi della (Boc) <sub>2</sub> -creatina.....	70
Figura 25: HPLC analitico della (Boc) <sub>2</sub> -creatina .....	71
Figura 26: spettri di massa della (Boc) <sub>2</sub> -creatina .....	71
Figura 27: sintesi del derivato creatina-glucosio.....	73
Figura 28: HPLC analitico del derivato (Boc) <sub>2</sub> -creatina-glucosio .....	73
Figura 29: spettro di massa della miscela con DCM:TFA del derivato (Boc) <sub>2</sub> -creatina-glucosio ....	74
Figura 30: spettro di massa della molecola creatina-glucosio .....	74
Figura 31: sintesi del derivato creatina-glucosammina.....	75
Figura 32: HPLC analitico del derivato (Boc) <sub>2</sub> -creatina-glucosammina.....	75
Figura 33: spettro di massa della molecola creatina-glucosammina.....	76
Figura 34: acetilazione della S-metilisotiourea .....	76
Figura 35: HPLC analitico della N,N-diacetil-S-metilthiourea.....	77

Figura 36: spettro di massa della N,N-diacetil-S-metilourea .....	77
Figura 37: sintesi del derivato diacetilcreatina etilestere.....	77
Figura 38: HPLC analitico del derivato diacetilcreatina etilestere .....	78
Figura 39: spettro di massa del derivato diacetilcreatina etilestere.....	78
Figura 40: sintesi del derivato diacetilcreatina terbutilestere .....	79
Figura 41: HPLC analitico del derivato diacetilcreatina terbutilestere .....	79
Figura 42: spettro di massa del derivato diacetilcreatina terbutilestere.....	79
Figura 43: sintesi del derivato guanidinoacetato etilestere .....	80
Figura 44: spettro di massa del derivato guanidinoacetato etilestere .....	80
Figura 45: sintesi del derivato guanidinoacetato benzilestere .....	81
Figura 46: spettro di massa del derivato guanidinoacetato benzilestere.....	81
Figura 47: sintesi del derivato diacetilguanidinoacetato metilestere .....	82
Figura 48: HPLC analitico del derivato diacetilguanidinoacetato metilestere .....	82
Figura 49: spettro di massa del derivato diacetilguanidinoacetato metilestere .....	83
Figura 50: sintesi del derivato diacetilguanidinoacetato etilestere .....	83
Figura 51: HPLC analitico del derivato diacetilguanidinoacetato etilestere.....	83
Figura 52: spettro di massa del derivato diacetilguanidinoacetato etilestere .....	84
Figura 53: degradazione della DAC in soluzione acquosa .....	85
Figura 54: degradazione della diacetilcreatina terbutilestere in soluzione acquosa.....	86
Figura 55: degradazione del diacetilguanidinoacetato etilestere in soluzione acquosa .....	87
Figura 56: effetti delle diverse concentrazioni di DAC sull'ampiezza del PS.....	88
Figura 57: effetti del diacetilGAAetilestere sulla vitalità delle fettine .....	88
Figura 58: effetto del GPA sulla vitalità delle fettine .....	89
Figura 59: effetto dose-dipendente del GPA sulla vitalità delle fettine .....	89
Figura 60: effetto dell'incubazione a breve termine di GPA sulle fettine .....	90
Figura 61: ampiezza del PS dopo somministrazione di GPA 1mM e DAC 2µM.....	90
Figura 62: effetto della DAC in condizioni di blocco del trasportatore sulla vitalità delle fettine.....	91
Figura 63: tempo di cessazione del PS durante anossia.....	92
Figura 64: effetto dell'incubazione in medium privo di Cl <sup>-</sup> sull'uptake di Cr .....	93
Figura 65: aumento del contenuto di Cr tissutale dopo trattamento con DAC 2µM.....	94
Figura 66: aumento di Cr dopo trattamento con DAC 2µM con trasportatore bloccato .....	94
Figura 67: concentrazione di PCr dopo trattamento con DAC 2µM con trasportatore bloccato .....	95
Figura 68: sintesi della t-Boc-metilisotiourea .....	96
Figura 69: HPLC analitico della t-Boc-metilisotiourea.....	96
Figura 70: spettro di massa della t-Boc-metilisotiourea .....	96
Figura 71: fosforilazione della t-Boc-metilisotiourea .....	97
Figura 72: HPLC analitico del tert-butil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbammato .....	97

Figura 73: spettro di massa del tert-butil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbammato .....	97
Figura 74: coniugazione con la sarcosina etilestere o terbutilestere .....	98
Figura 75: HPLC analitico del tert-butil-2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato .....	98
Figura 76: HPLC analitico dell'etil-2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato .....	99
Figura 77: spettro di massa dell'etil-2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato .....	99
Figura 78: rimozione dei gruppi protettori dell'etil-2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato .....	100
Figura 79: spettro di massa della fosfocreatina etilestere .....	100
Figura 80: idrolisi della fosfocreatina etilestere .....	100
Figura 81: spettro di massa della fosfocreatina .....	101

## ABBREVIAZIONI

ACSF = Artificial Cerebrospinal Fluid (liquido cerebrospinale artificiale)

AD = Malattia di Alzheimer

ANT = adenine nucleotide traslocator

AGAT = Arginino-glicina amidinotransferasi

BEE = Barriera ematoencefalica

CCDS= Sindromi da deficit cerebrale di creatine

CGE = Creatina-glicina etil estere

CK = Enzima creatina chinasi

CK-BB = Creatina chinasi isoenzima cerebrale

CK-MB = Creatina chinasi isoenzima cardiaco

CK-MM = Creatina chinasi isoenzima muscolare

CNE = Creatina etilammina

Cr= Creatina

Crn= Creatinina

CrT= Cfr SLC6A8

DA= Depolarizzazione Anossica

DAC= Diacetilcreatina Etilestere

DCM = Diclorometano

DMF = Dimetilformammide

ESI-MS = Spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray

ESI-MS<sup>2</sup> = Spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray tandem

GAMT = Guanidino-acetato-metiltransferasi

GLUT = Trasportatore del glucosio

GPA = Acido guanidinopropionico

HD= Corea di Hungtinton

HPLC = Cromatografia liquida ad alte prestazioni

HPLC-MS = Cromatografia liquida ad alte prestazioni-spettrometria di massa

MPTP= 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina

mtPTP = mitochondrial permeability transition pore

mRNA = Acido ribonucleico messaggero

mtCK= creatina chinasi mitocondriale

NMR = Risonanza Magnetica Nucleare

PCr = Fosfocreatina

PD= Malattia di Parkinson

PS = Population Spike

PV= Presynaptic Volley

RP-HPLC = Cromatografia liquida ad alte prestazioni a fase inversa

rtPA = Attivatore tissutale del plasminogeno

SLA = Sclerosi laterale amiotrofica

SLC2A1 = Solute carrier family 2, member 1

SLC6A8 = Trasportatore della creatina

SNC = Sistema nervoso centrale

SOD= Superossido Dismutasi

TBAHS = Tetrabutylammonio idrogeno solfato

t-Boc = Tert-butossicarbonile

TFA = Acido trifluoroacetico

TLC = Thin-layer chromatography (Cromatografia su strato sottile)

T<sub>R</sub> = Tempo di ritenzione



## **Abstract (Italiano)**

### **Parte 1**

Il Deficit del trasportatore della creatina è una rara malattia genetica dovuta al malfunzionamento della proteina denominata SLC6A8 e deputata al trasporto della creatina attraverso le barriere biologiche. Il mancato funzionamento del trasportatore della creatina comporta l'assenza di creatina a livello cerebrale con la conseguenza di gravissimi danni neurologici. La creatina infatti è una molecola polare che attraversa le barriere biologiche solo per mezzo del suo trasportatore. Ad oggi non esiste nessuna terapia per tale patologia. Una possibilità terapeutica potrebbe essere rappresentata da profarmaci della creatina in grado di attraversare le membrane cellulari e la barriera ematoencefalica (BEE) in modo indipendente dal trasportatore della creatina stessa. Questo potrebbe ripristinare il contenuto di creatina all'interno delle cellule nervose. Per raggiungere tale scopo, in questo progetto di tesi, si sono messe a punto due diverse strategie di sviluppo di derivati della creatina:

1. modificare la struttura della creatina in modo tale da ottenere una molecola maggiormente lipofila che possa attraversare le membrane biologiche per diffusione passiva.
2. realizzare derivati ottenuti dalla coniugazione della creatina con molecole che possano utilizzare un trasportatore diverso dall'SLC6A8.

I derivati sintetizzati secondo tali strategie sono stati ottenuti in buona resa e caratterizzati mediante HPLC e spettrometria di massa; alcuni di loro sono stati anche valutati dal punto di vista della stabilità in mezzo fisiologico e degli effetti neurobiologici.

### **Parte 2**

La fosfocreatina esogena viene prodotta con il nome di "Neoton" dalla casa farmaceutica Alfa Wasserman S.p.A. (Italia), e fa parte del gruppo di farmaci metabolici utilizzati nella protezione del miocardio in aggiunta alle soluzioni cardioplegiche. La fosfocreatina infatti esercita un duplice effetto che la rende un potenziale agente terapeutico cardioprotettivo: l'attività di conservazione dell'energia miocardica mediante il ripristino delle riserve di ATP e l'azione protettiva verso le membrane biologiche. Quasi tutti i metodi pubblicati finora per la sintesi della fosfocreatina portano nella maggior parte dei casi ad una molecola ottenuta in bassa resa e dopo molteplici step di purificazione. La bassa resa è dovuta ad una scarsa reattività dell'agente guanilante utilizzato, soprattutto quando esso è costituito da un derivato della cianoammide. Parte del lavoro svolto ha riguardato la messa a punto di una metodica alternativa ai metodi convenzionali che ha permesso di ottenere la fosfocreatina in buona resa e purezza.

**Parole chiave** : barriere biologiche; deficit del trasportatore della creatina; profarmaci della creatina; derivati lipofili della creatina; sintesi di coniugati della creatina; trasportatore alternativo; sintesi della fosfocreatina esogena; nuovi metodi di sintesi

## **Abstract (English)**

### ***Part 1***

Creatine transporter deficiency is a rare hereditary disease due to the loss of function of the SLC6A8 (creatine transporter). Creatine is a polar molecule, able to cross the biological barriers exclusively using its own transporter and therefore this disease causes the lack of cerebral creatine and leads to dramatic neurological symptoms. To date there is no therapy available for this disorder. A therapeutic strategy could be represented by creatine prodrugs able to cross the cellular membranes and the blood brain barrier (BBB) in an independent way from using the creatine transporter and releasing creatine once inside the cells to exert its biological activities. Two different strategies have been developed to synthesized creatine derivatives:

1. The modification of the creatine molecular skeleton in order to obtain more lipophilic prodrugs that could cross the BBB and the biological membranes by passive diffusion.
2. The conjugation of creatine with a molecule able to exploit a different transporter than SLC6A8, i.e. the glucose transporters, creating a chimeric molecule able to use an alternative way

The synthesized derivatives have been obtained in high yield and purity and characterized by means of HPLC and mass spectrometry. Some of them have been evaluated for their stability in physiological conditions and neurobiological effects.

### ***Part 2***

The exogenous phosphocreatine is currently marketed as "Neoton" by Alfa Wasserman Industry S.p.A. (Italy) and is part of the therapy in the myocardial protection in addition to the cardioplegic solutions. Phosphocreatine exerts a twofold effect as a cardioprotective agent: the regeneration of the ATP reserves and the protective effects of the biological membranes. Most of the methods published so far to synthesize phosphocreatine lead to a low-yielded molecule and involve several purification steps. Low yield is due to the poor reactivity of the guanilating agent used, especially when it is a cyanamide derivative. Part of this job was to develop an alternative method to conventional methods ,that allowed to obtain phosphocreatine with good yeld and purity.

### **Keywords:**

biological barriers; creatine transporter deficiency; creatine lipophilic prodrugs; synthesis of creatine conjugates; alternative transporter; synthesis of exogenous phosphocreatine; new synthetic methods

## CAPITOLO 1 : INTRODUZIONE GENERALE

### PARTE 1: LA CREATINA E LE CONDIZIONI PATOLOGICHE IN CUI è IMPLICATA

#### 1.1 LA CREATINA

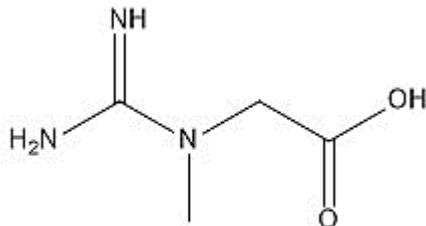
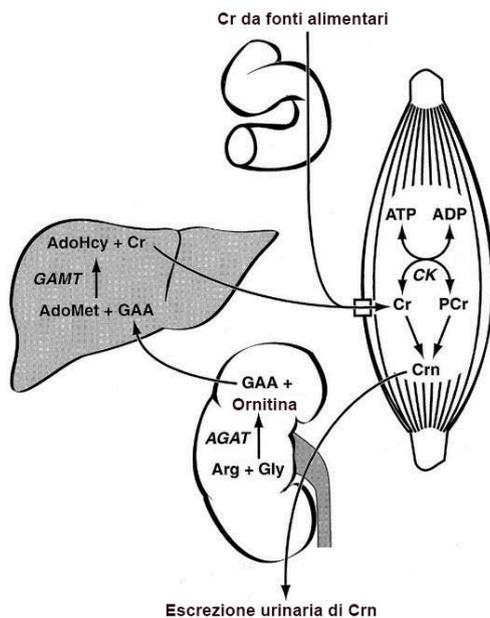


fig.1 Struttura chimica della creatina

La creatina (Cr) o acido metil-guanidino-acetico, (fig.1), è un derivato amminico la cui scoperta come costituente della carne si deve al chimico francese Michel Eugène Chevreul nel 1832 ed il cui nome deriva dalla parola greca κρέας (krèas, carne). Ne fu in seguito accertata la presenza nel muscolo scheletrico dal chimico tedesco Justus von Liebig nel 1847 che ipotizzò per primo un ruolo della creatina nella fisiologia muscolare dei mammiferi, osservando che nella muscolatura di volpi selvatiche la quantità di creatina era quantitativamente superiore a quella contenuta nella muscolatura di volpi in cattività. Dopo numerosi anni di studi e ricerche <sup>1,2</sup> alla creatina è stata attribuita una notevole importanza nel metabolismo energetico cellulare, fino ad essere utilizzata commercialmente come integratori per gli sportivi. Il fabbisogno giornaliero di creatina per l'essere umano è di circa 2 grammi <sup>3</sup>; la metà di esso proviene dall'alimentazione (solo da prodotti di origine animale: carne, pesce, latticini) e la sua biodisponibilità dipende dall'assorbimento intestinale che è stato stimato essere di circa l'80% della creatina ingerita <sup>4</sup>. L'altra metà è fornita da una sintesi endogena <sup>4</sup>, che si svolge in due tappe enzimatiche e coinvolge tre amminoacidi: glicina, arginina e metionina.

## ***biosintesi della creatina epatica***

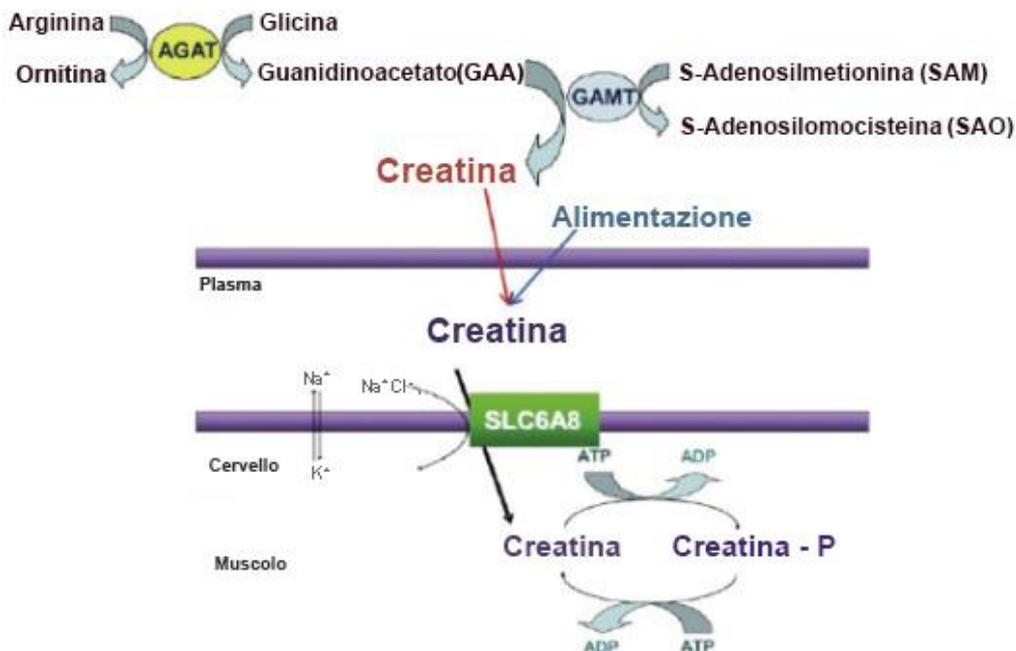


**fig.2 : la creatina nell'organismo proviene in parte dalla biosintesi endogena (che avviene in due tappe) ed in parte dall'alimentazione**

Schematicamente la biosintesi della creatina endogena (fig.2) può essere così descritta: una prima tappa, a livello renale, catalizzata dall'enzima L-arginina amidinotransferasi (AGAT, EC 2.1.4.1), che consiste nel trasferimento di un gruppo guanidinico dall'arginina alla glicina con formazione di ornitina ed acido guanidinoacetico (GAA). Si ha poi una seconda tappa, a livello epatico, catalizzata dall'enzima guanidinoacetato metiltransferasi (GAMT), che consiste nella metilazione del GAA da parte del donatore di metili S-GAMT adenosil-L-metionina, che si converte in S-adenosil-omocisteina<sup>5</sup>. La biosintesi della creatina gioca un ruolo importante nel metabolismo amminoacidico: circa la metà dei gruppi metilici della S-adenosil-metionina dell'organismo vengono consumati durante questo processo<sup>6</sup>; la glicina è incorporata interamente a formare la struttura del GAA; l'arginina invece è convertita in ornitina che entra a far parte del ciclo dell'urea. Per quanto riguarda i processi regolatori, l'enzima AGAT viene attivato dalla presenza di arginina mentre viene inibito con un meccanismo a feedback negativo dall'ornitina, dal GAA e dalla creatina stessa<sup>3,5,7</sup>; questi meccanismi di regolazione rendono questa prima tappa enzimatica la tappa limitante della biosintesi della creatina. Non è stato invece rilevato alcun effetto regolatorio della glicina sull'AGAT<sup>8</sup>. L'enzima GAMT invece non è soggetto ad alcun meccanismo di regolazione da parte dei prodotti di reazione mentre è attivato dalla presenza di GAA<sup>9</sup>. Gli enzimi AGAT e GAMT si ritrovano anche in diverse

percentuali a livello di altri organi dove non avviene la sintesi della creatina ( pancreas, polmoni) ,ma il loro ruolo in tali siti non è ancora stato chiarito <sup>7</sup>.

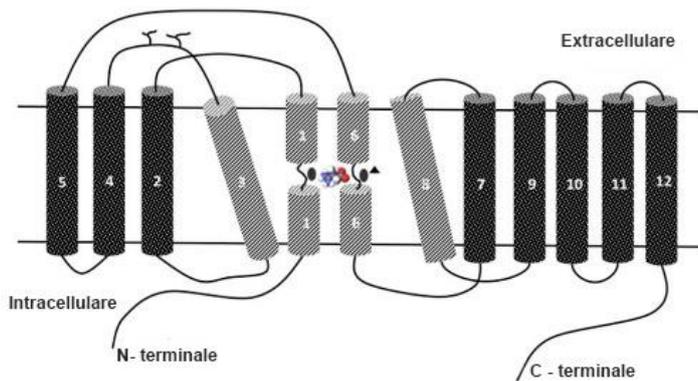
### **trasportatore della creatina**



**fig.3 il passaggio della creatina dal sangue attraverso le membrane plasmatiche degli organi bersaglio avviene per trasporto attivo mediante il trasportatore specifico SLC6A8.**

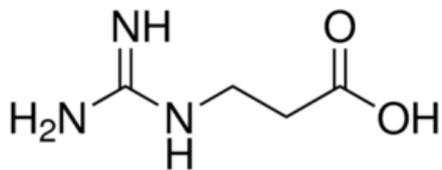
La creatina sintetizzata nel fegato entra nel circolo sanguigno e viene captata a livello degli organi bersaglio; il muscolo scheletrico ne assorbe circa il 95% <sup>9</sup> ed il restante 5% è ripartito tra cervello, fegato, reni, testicoli, retina e placenta <sup>3,9,10</sup>. Data la sua natura estremamente polare, il suo uptake da parte degli organi bersaglio non può avvenire per diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica <sup>11</sup>, ma per trasporto attivo tramite il trasportatore specifico della creatina SLC6A8 <sup>3</sup> (fig.3) (anche detto CrT, CrT1, CT1, CrTr). Esso fa parte della superfamiglia dei trasportatori di soluti 6 (SLC6) sodio e cloro dipendenti, cui appartengono anche le proteine di trasporto transmembrana di alcuni neurotrasmettitori ed aminoacidi. Il trasporto della creatina avviene contro gradiente di concentrazione di circa 100:1 ed il co-transporto di 2 ioni Na<sup>+</sup> e uno ione Cl<sup>-</sup> è associato all'attività della pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi <sup>12,13</sup>. L'espressione di SLC6A8 è ubiquitaria ma maggiormente presente a livello degli organi richiedenti un elevato fabbisogno energetico (cervello, muscolo scheletrico) o con funzione di assorbimento (rene ed intestino). Il gene del trasportatore è localizzato sul

cromosoma X alla posizione Xq28, consiste in 13 esoni e presenta una lunghezza di 8,4 kb <sup>14-16</sup> (GenBank accession number: Z66539) <sup>15</sup>. La proteina codificata ha un peso molecolare stimato di 70 Kda ed è costituita da 635 amminoacidi. La sua struttura è costituita da 12 domini transmembrana separati da loop di dimensioni variabili e con le estremità ammino e carbossi terminali rivolte verso il citosol <sup>3</sup> (fig.4).



**fig.4 struttura del trasportatore SLC6A8**

Sono state rilevate tre varianti del prodotto genico, di cui due mitocondriali (Mi-CrT) <sup>17</sup> ed una citosolica (PM-CrT) <sup>18</sup>. Il trasportatore è inibito in modo competitivo dall'acido 3-guanidinopropionico (GPA) <sup>19</sup> (fig.5).



**Fig.5 struttura chimica dell'acido 3-guanidinopropionico**

## escrezione della creatina

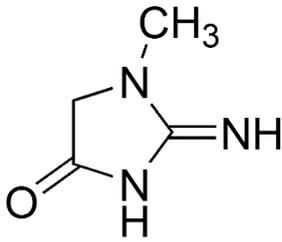


Fig.6 struttura chimica della creatinina

Il metabolita di degradazione della creatina è un derivato ciclico, la creatinina (fig.6), che viene escreta con le urine ed il suo tasso di eliminazione è un parametro utilizzato per valutare la capacità di filtrazione dei glomeruli renali attraverso la formula di Cockcroft e Gault che calcola la clearance renale (fig.7)

### Valutazione della Clearance della Creatinina

Equazione di Cockcroft-Gault per il calcolo della Clearance della creatinina

$$\text{Donne: CrCl} = \frac{0,85 (140 - \text{età}) \times \text{peso}}{\text{creatinina sierica} \times 72}$$

$$\text{Uomini: CrCl} = \frac{(140 - \text{età}) \times \text{peso}}{\text{creatinina sierica} \times 72}$$

fig.7 formula di Cockcroft-Gault della clearance di creatinina

La creatina e la fosfocreatina tendono a trasformarsi in creatinina mediante un processo non enzimatico, spontaneo ed irreversibile *in vivo* (fig.8). Al contrario, *in vitro* la reazione è modulata da pH e temperatura. La riserva di creatina in un individuo medio adulto di 70 kg si rinnova con un tasso di 2g/die<sup>20</sup>, che corrispondono in percentuale all'1.7% del totale di creatina presente nell'organismo (120 grammi)<sup>3</sup>: 2 grammi al giorno infatti di creatina nuova sono forniti all'organismo (1 grammo dalla biosintesi endogena e 1 grammo dall'alimentazione) e altrettanti 2 grammi al giorno di creatina sono convertiti in creatinina ed escreti con le urine<sup>9</sup>. La produzione di creatinina aumenta sia con l'aumento della massa muscolare sia con l'avanzare dell'età ed è minore nelle donne rispetto agli uomini<sup>7</sup>.

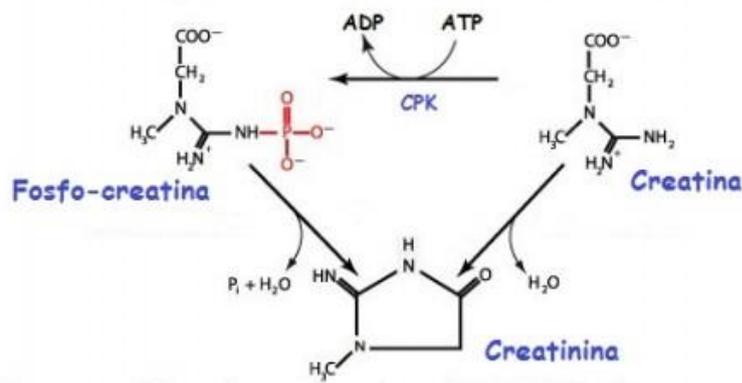
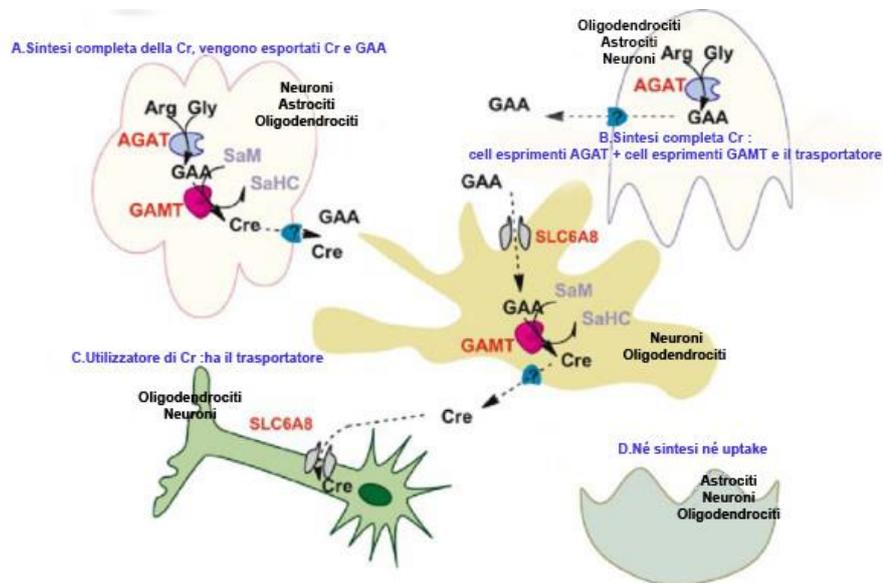


fig.8 conversione non enzimatica di creatina e fosfocreatina in creatinina

### ***biosintesi della creatina nel Sistema Nervoso Centrale***

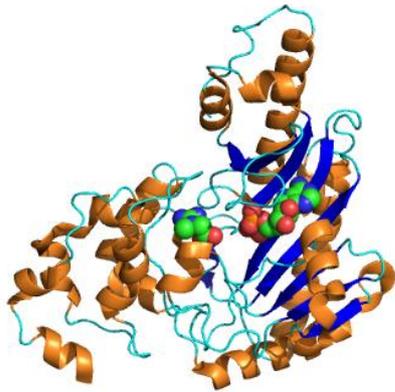
Benchè l'uptake di creatina periferica da parte del SNC sia fondamentale, sono state trovate evidenze dell'esistenza della biosintesi di creatina a livello cerebrale <sup>21</sup>. Diversi studi su cellule nervose di ratto (neuroni, cellule gliali e cellule endoteliali) hanno infatti dimostrato la presenza degli enzimi biosintetici a livello del SNC in percentuali diverse a seconda del tipo di cellula <sup>22</sup>. Tramite studi di ibridazione *in situ* è stata studiata infatti la distribuzione delle cellule esprimenti le tre diverse proteine e ne è risultato che AGAT e GAMT erano espressi sia sui neuroni che sulla glia, mentre l'SLC6A8 era espresso in neuroni e oligodendrociti <sup>22</sup>. Inoltre l'SLC6A8 è assente sugli astrociti, ma presente sulle cellule endoteliali della BEE, facendo ipotizzare che il passaggio della creatina periferica verso il SNC avvenisse attraverso la zona dei capillari libera dai pedicelli astrocitari. Gli astrociti, esprimendo sia GAMT sia AGAT, sono in grado di internalizzare gli amminoacidi precursori della biosintesi della creatina (tramite i trasportatori degli amminoacidi) e fornire creatina sia a se stessi sia alle altre cellule nervose <sup>22,23</sup>. Questo dato è stato anche confermato dalle elevate concentrazioni di fosfocreatina e creatina chinasi presenti a livello delle cellule gliali. Le cellule esprimenti AGAT e GAMT e che quindi sono in grado di realizzare autonomamente la sintesi della creatina sono solo il 12%, tra cui quelle che esprimono anche l'SLC6A8 sono solo il 4,1%. Del rimanente 88% , il 15% esprime solo AGAT mentre il 13.5 % esprime solo GAMT e solo il 32.7% delle cellule esprime il trasportatore della creatina SLC6A8. Infatti la maggior parte delle cellule è coinvolta in un complesso traffico di metaboliti tra le zone di sintesi e di consumo della creatina <sup>22,24</sup> (fig.9). In particolare, le cellule che esprimono solo AGAT sono in grado di sintetizzare GAA, che viene poi internalizzato ,probabilmente mediante SLC6A8,dalle cellule esprimenti GAMT <sup>25,26</sup> .Il ruolo del trasportatore SLC6A8 a livello del SNC è quindi fondamentale per mantenere i processi di regolazione della sintesi della creatina e ciò è confermato dall'assenza di creatina intracerebrale nei pazienti affetti da deficit di SLC6A8 <sup>27</sup>. A livello del SNC la biosintesi non è inibita da meccanismi a

feedback negativo da parte dei prodotti di reazione, in quanto le funzioni cerebrali sono strettamente dipendenti dal metabolismo energetico della creatina <sup>28</sup>.



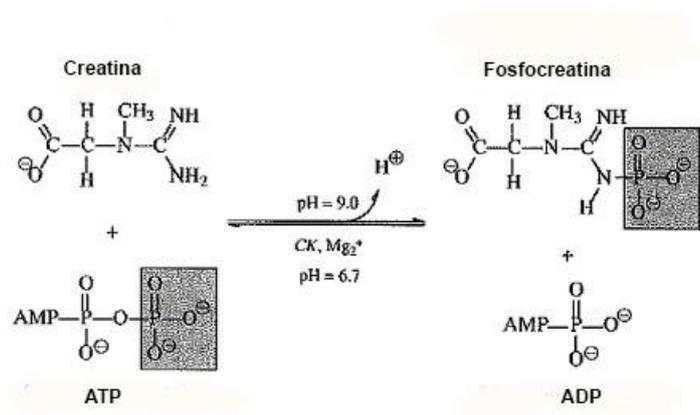
**fig.9 i processi biosintetici della creatina a livello del SNC** : il 12% solamente delle cellule nervose sono in grado di effettuare la sintesi completa della creatina (A). Il 15% delle cellule sono in grado di effettuare la prima tappa della biosintesi e quindi sintetizzare GAA (B), che viene captato tramite SLC6A8 dalle cellule esprimenti GAMT. Un altro 14% delle cellule esprime soltanto SLC6A8 (C) ed il 31% delle cellule non esprime nessuna delle tre proteine (D).

**funzione della creatina nel metabolismo energetico cellulare**



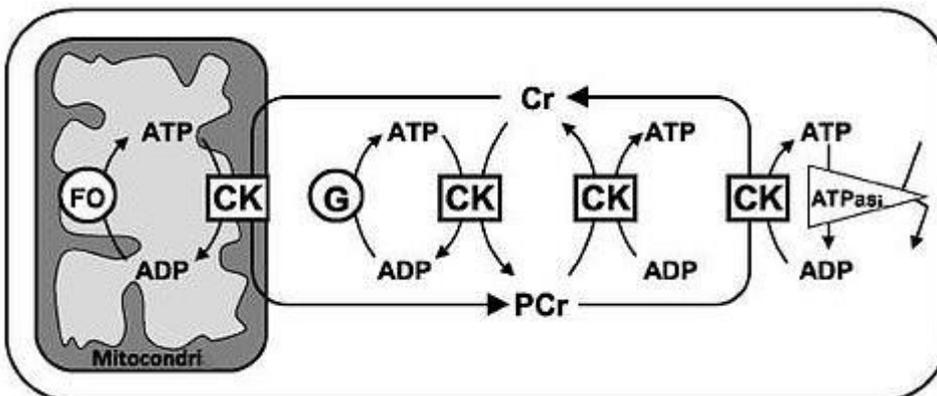
**Fig.10** Struttura cristallografica dell'isoenzima CK-BB in presenza di creatina e ADP

La creatina è fosforilata mediante una reazione reversibile catalizzata dall'enzima creatina chinasi (CK)(E. C. 2.7.3.2)(fig.10) <sup>29,30</sup>, presente in tessuti diversi a seconda dell'isoforma considerata. L'enzima infatti è presente in tre isoforme citosoliche (CK-MM isoenzima muscolare; CK-BB isoenzima cerebrale; CK-MB isoenzima miocardico) e due mitocondriali (sMtCK sarcomerica e la uMtCK ubiquitaria), localizzate nello spazio intermembrana <sup>31,32</sup>. La CK non ha la stessa funzionalità in tutti i tessuti; presenta infatti maggiore attività nei tessuti con elevata richiesta energetica (muscolare, cardiaco, cerebrale), mentre è assente nei tessuti con elevato metabolismo ossidativo (epatociti) <sup>33</sup>. Dal momento che quella catalizzata dalla CK è una reazione di equilibrio (fig.11), quando la concentrazione di Cr nella cellula è presente a livelli fisiologici o elevati la CK trasforma creatina in fosfocreatina (PCr) e ATP in ADP secondo lo schema:  $Cr+ATP +Mg^{2+} \rightarrow PCr+ADP +Mg^{2+}$ ; quando invece si ha necessità di produrre ATP (per elevati consumi energetici o in condizioni patologiche) la reazione si sposterà in senso opposto comportando la defosforilazione della PCr secondo la reazione :  $PCr+ADP+ +Mg^{2+} \rightarrow Cr+ATP +Mg^{2+}$ . <sup>3,7,20,21,34</sup>



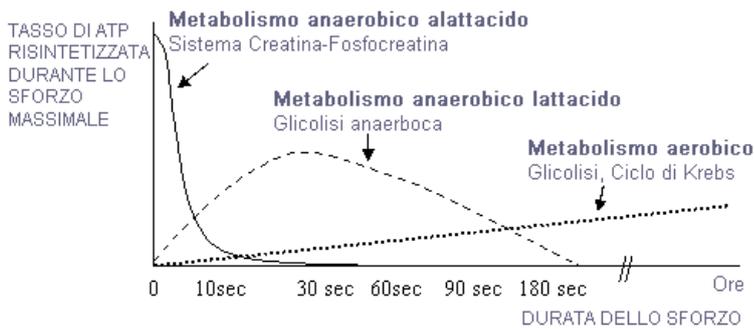
**Fig.11** la reazione catalizzata dall'enzima creatina chinasi (CK).

La fosfocreatina svolge un ruolo di trasporto dei gruppi fosfato ad alta energia dal mitocondrio al citosol, secondo il concetto di “shuttle di energia cellulare”<sup>35</sup> (fig.12). L’ATP prodotto dai mitocondri mediante la fosforilazione ossidativa ed il ciclo di Krebs rappresenta la forma di energia utilizzabile dalla cellula per le sue funzioni ed è in grado di diffondere dal mitocondrio al citosol o di essere sintetizzato dove è richiesta energia<sup>36,37</sup>. Tuttavia, data la minore dimensione e la quantità inferiore di cariche negative che caratterizzano la fosfocreatina e la creatina rispetto all’ATP e all’ADP, il sistema creatina/fosfocreatina si è rivelato il maggior trasportatore di fosfati ad alta energia all’interno della cellula, permettendo anche un maggior accumulo di questi nucleotidi, come dimostrano le loro maggiori concentrazioni nel muscolo scheletrico (fosfocreatina: 27 mM; creatina: 13 mM; ATP: 8 mM; ADP: 20μM)<sup>38,39</sup>.



**Fig.12 ruolo di “shuttle” del sistema Cr/PCr.** L’ATP prodotto nel mitocondrio cede il suo fosfato alla creatina che è convertita in fosfocreatina. La fosfocreatina migra nel citosol a livello dei siti dove c’è elevata richiesta energetica e a questo punto cede il fosfato all’ADP che si converte in ATP, che può essere utilizzato.

A livello mitocondriale, perciò, la reazione va in direzione della produzione di ADP e fosfocreatina, la quale migra nei siti citosolici che richiedono ATP (quali le ATPasi) mentre a livello citosolico la reazione va in senso opposto per ottenere creatina e ATP. Grazie a questo sistema viene mantenuto l’equilibrio del rapporto ATP/ADP cellulare, vengono ripartite nello spazio cellulare la creatina e la fosfocreatina, si evita l’accumulo di ADP (che inattiverebbe le ATPasi), si mantengono adeguati livelli di fosfato inorganico necessari per la glicolisi e la glicogenolisi<sup>40,41</sup>. Un altro ruolo svolto dal sistema Cr/PCr è quello di agire, in condizioni di particolare richiesta energetica della cellula, da tampone di ATP in modo tale da ritardarne la deplezione<sup>42</sup>. Infatti nel caso di sforzi muscolari brevi ed intensi o di condizioni patologiche quali ischemia o ipossia, la fosfocreatina cede il suo gruppo fosfato all’ADP, rigenerando velocemente l’ATP e mantenendone costanti i livelli, in un meccanismo a breve latenza (4-5 secondi) e ridotta capacità. Tale meccanismo è definito anaerobico alattacido, in quanto non necessita della presenza di ossigeno e non porta alla formazione di acido lattico<sup>3,43</sup> (fig.13).



**Fig.13 il metabolismo anaerobico alattacido del sistema Cr/PCr con funzione di tampone di ATP**

### ***Effetti fisiologici della creatina***

La creatina, oltre ad essere implicata nel metabolismo energetico cellulare, esercita delle funzioni fisiologiche a livello di numerosi organi. Possiede infatti proprietà antiossidanti, antiapoptotiche, protettrici a livello cardiovascolare; inoltre aumenta le performance cerebrali, regola i processi di memorizzazione e di neuromodulazione oltre ad esercitare una attività neuroprotettiva.

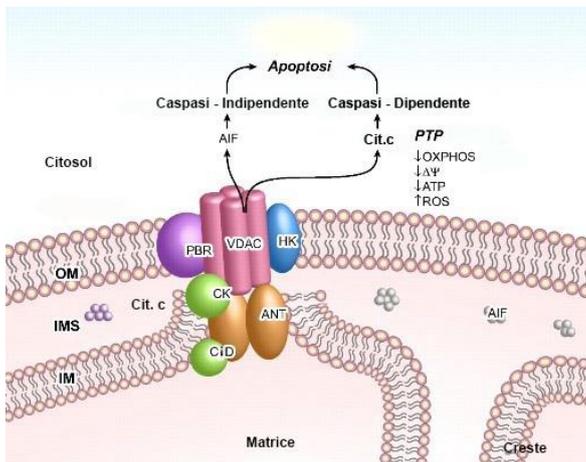
### Effetto antiossidante della creatina

L'effetto antiossidante della creatina è stato indagato in diversi studi sia *in vitro* che *in vivo*. In particolare essa ha mostrato una buona capacità di neutralizzare gli anioni superossido ( $O_2^-$ ) e perossinitrito ( $OONO^-$ )<sup>44</sup>. Il ruolo antiossidante della creatina è stato confermato dal fatto che i livelli di glutathione ed altri enzimi antiossidanti non risultano mutati<sup>45</sup>. Anche la mutagenesi mitocondriale su colture cellulari di mammifero viene inibita da una somministrazione di creatina, che quindi esercita un effetto protettivo sul DNA mitocondriale dopo una induzione da stress ossidativo<sup>46</sup>. La creatina esercita infatti un ruolo di ripristino dell'attività del complesso II della catena respiratoria oltre a diminuire la perossidazione lipidica e la carbonilazione delle proteine, entrambi segnali di stress ossidativo<sup>47,48,49</sup>. In studi condotti su animali giovani ed adulti è stato dimostrato come la creatina determini una maggiore attività anticonvulsivante su quelli più giovani<sup>48</sup>. Infine in uno studio condotto su pazienti in età infantile e adolescenziale è stato verificato come l'assunzione di creatina prima di una lesione cerebrale portasse beneficio ai sintomi stessi<sup>50</sup>.

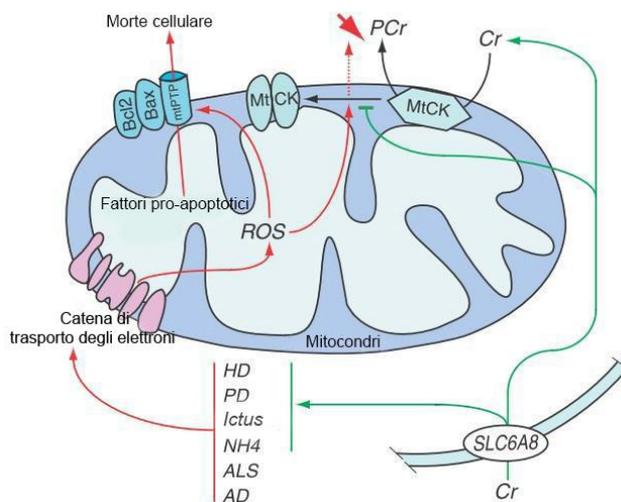
### Effetto antiapoptotico della creatina

I mitocondri sono correlati a fenomeni apoptotici della cellula mediante il fenomeno della mtPTP (mitochondrial permeability transition pore). La mtCK in condizioni normali si presenta in forma ottomera<sup>51</sup>, la quale previene la permeabilità dei mitocondri perchè favorisce la coniugazione delle porine con la proteina ANT (adenine nucleotide traslocator) (fig.14a). Invece durante condizioni di

stress ossidativo le specie reattive dell'ossigeno favoriscono la conversione della mtCK nella sua forma dimerica, evento che favorisce l'apertura dei pori mitocondriali con conseguente fuoriuscita delle proteine pro-apoptotiche<sup>20,52</sup>. La creatina legandosi alla mtCK previene la sua conversione alla forma dimerica, esercitando quindi un effetto antiapoptotico ed antiossidante, inibendo quindi gli effetti tossici delle specie reattive dell'ossigeno sui mitocondri<sup>53</sup>. (fig.14b)



**Fig.14a** la CK è uno dei fattori protettivi dall'apoptosi a livello mitocondriale. Essa infatti in condizioni normali coniuga le porine con la ANT.



**Fig.14b** ruolo antiossidante della creatina a livello mitocondriale : le specie reattive dell'ossigeno (ROS) liberate nel mitocondrio favoriscono la conversione dalla forma ottomera della mtCK nella forma dimerica, permettendo l'apertura dei pori di transizione mitocondriali mtPTP e la liberazione dei fattori inducenti la morte cellulare. Al contrario, la creatina, che entra nella cellula tramite il trasportatore specifico (SLC6A8) inibisce tale conversione. Esercita quindi una attività antiossidante. Estratto da Bèard et al.<sup>24</sup>

### Effetti della creatina a livello cerebrale

A livello del SNC viene consumato circa il 20% di tutte le riserve energetiche dell'organismo, da qui si deduce il ruolo fondamentale della creatina in tale tessuto. La creatina partecipa allo sviluppo e alla maturazione del SNC, favorendo la sinaptogenesi, processo che continua anche dopo la nascita<sup>54</sup>; mantiene i potenziali di membrana neuronali, l'omeostasi del calcio intracellulare e la neurotrasmissione. La creatina è inoltre in grado di agire come neuromodulatore nella trasmissione GABAergica fungendo da agonista parziale o antagonista dei recettori post-sinaptici in base alla sua concentrazione. Agisce essa stessa come neurotrasmettitore rilasciato con meccanismo esocitotico calcio-dipendente<sup>55</sup> e la presenza dei trasportatori SLC6A8 a livello dei sinaptosomi di ratto ne confermano il meccanismo di re-uptake<sup>56,57</sup>. Il supplemento di creatina orale si è dimostrato efficace nel ridurre la fatica mentale e nell'aumentare la memoria a breve termine e la neuroplasticità, per cui la creatina sembra essere un buon potenziatore cerebrale<sup>58,59</sup>.

### Effetto della creatina a livello muscolare

La creatina viene utilizzata per le sue proprietà ergogeniche in integratori destinati all'ambito sportivo<sup>60</sup>. In letteratura sono illustrati due tipi di schemi di assunzione di creatina. Il primo consiste in un forte dosaggio di creatina per un breve periodo (0.3g/kg/die per circa 5 giorni)<sup>2</sup>; il secondo consiste in un minor dosaggio per un periodo più lungo (0.03g/kg/die per un periodo di 4-6 settimane)<sup>61</sup>. Il primo protocollo aumenta gli effetti ergogenici e la resistenza fisica in sforzi di breve durata (meno di 30 secondi)<sup>62</sup>. L'introduzione di creatina aumenta la sua quantità totale di circa il 30% e questo aumento è superiore nei soggetti più giovani rispetto a quelli più anziani<sup>7</sup>. Il potere ergogenico della creatina si spiega con un meccanismo di aumento dei livelli di fosfocreatina, glicogeno e fattori di crescita<sup>63</sup>. Gli effetti ergogenici della creatina possono essere sfruttati nel trattamento di patologie muscolari quali la distrofia muscolare, l'atrofia girata<sup>64</sup> o le miopatie. L'integrazione di creatina ha mostrato dei benefici in sperimentazioni cliniche di malattie di origine muscolare quali la distrofia muscolare di Duchenne, dove sono state rilevate un aumento della forza contrattile e una maggiore resistenza agli sforzi muscolari<sup>7</sup>.

### Effetto neuroprotettivo dall'anossia

In condizioni di anossia si ha una diminuzione della produzione di ATP neuronale. Trattamenti pre-anossia *in vitro* con creatina provocano un aumento intracellulare di creatina stessa con diminuzione della morte neuronale e protezione della neurotrasmissione<sup>65</sup>. Nei modelli *in vivo* di ratto sono stati descritti effetti neuroprotettivi di pre-trattamenti con creatina, con diminuzione dei fenomeni apoptotici per inibizione della caspasi 3 e dell'espressione delle acquaporine 4 (AQP4)<sup>66</sup>.

### Altri effetti fisiologici della creatina

La creatina ha anche effetti sul controllo della glicemia: essa è in grado di aumentare la traslocazione del trasportatore del glucosio, migliorando la sensibilità all'insulina in soggetti affetti da diabete di tipo 2 insulino-resistenti <sup>67,68</sup>. Esercita inoltre un ruolo di inibizione a feedback negativo sull'S-adenil omocisteina, che è un precursore dell'omocisteina. In tal modo riduce i livelli di omocisteina, amminoacido aterogenico, diminuendo il rischio di patologie cardiovascolari <sup>69,70</sup>. L'incubazione di cellule endoteliali con creatina mostra effetti antinfiammatori riscontrabili con una diminuzione della permeabilità vascolare indotta da serotonina ed una diminuzione dell'espressione di proteine pro-infiammatorie quali ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule) e E-selectina <sup>71</sup>.

## **1.2 COINVOLGIMENTO DELLA CREATINA IN CONDIZIONI PATOLOGICHE**

### ***Patologie del SNC***

La Cr ha mostrato *in vitro* su colture primarie di cellule di ippocampo di ratto un effetto neuroprotettivo contro l'eccitotossicità indotta sia dal glutammato sia dai depositi di  $\beta$ -amiloide <sup>72,73</sup>; *in vivo* un supplemento di Cr si è mostrato efficace nei ratti nel ridurre le lesioni indotte dall'eccitotossicità NMDA-mediata <sup>73</sup>. La Cr agisce infatti da neuromodulatrice nella trasmissione mediata dai recettori NMDA ed inoltre inibisce l'attivazione degli effetti apoptotici a livello mitocondriale, impedendo l'apertura dei pori che favoriscono l'aumento della permeabilità mitocondriale <sup>74</sup>. Tutte queste evidenze fanno presupporre un ruolo importante della Cr in tutte quelle patologie psichiatriche e neurodegenerative in cui vi sia l'implicazione di eccitotossicità o di riserve energetiche cerebrali limitate. Dati ottenuti da studi di spettroscopia NMR hanno inoltre rilevato un aumento delle riserve energetiche cerebrali di Cr e PCr a seguito di trattamento con creatina <sup>75</sup> evidenziando un potenziale ruolo terapeutico in situazioni patologiche che implicino un depauperamento delle riserve energetiche cerebrali, come l'ischemia, l'anossia e le lesioni cerebrali traumatiche. L'impiego della creatina in patologie che riguardano il SNC incontra l'ostacolo del basso assorbimento a livello cerebrale dovuto alla presenza della BEE, nonostante la presenza del trasportatore SLC6A8 <sup>76</sup>; il suo utilizzo a livello clinico e terapeutico è stato quindi sempre effettuato a dosi elevate (25 mM) <sup>43,77,78</sup>.

### Patologie psichiatriche

In alcune patologie psichiatriche quali i disturbi affettivi dell'umore (depressione maggiore e disturbo bipolare), la schizofrenia ed i disturbi d'ansia (disturbo d'ansia generalizzato e disturbo da attacchi di panico) sono state riscontrate alterazioni del metabolismo della creatina, che portavano nella maggior parte dei casi ad una diminuzione delle concentrazioni di Cr e PCr cerebrali <sup>79-82</sup>. Nonostante la carenza di dati che possano illustrare di preciso il ruolo della Cr nelle patologie psichiatriche, sono state formulate due diverse teorie che ne ipotizzano il meccanismo d'azione:

a) la prima correla la malattia psichiatrica a disfunzioni mitocondriali che rendono inutilizzabile il processo energetico di rigenerazione dell'ATP tramite il sistema Cr/PCr. La cellula quindi può soltanto utilizzare come sua fonte energetica il catabolismo del glucosio, processo però più lento e meno efficiente rispetto alla defosforilazione della PCr, con conseguente alterazione dell'umore e della funzione cognitiva <sup>75</sup>.

b) La seconda ipotesi riguarda l'instaurarsi di una situazione ipermetabolica <sup>83,84</sup> causata dallo stress psicologico, in cui si ha un rilascio incontrollato di neurotrasmettitori eccitatori quali glutammato e glutamina, che porta ad un consumo eccessivo della riserva energetica di Cr cerebrale. Si ha quindi una diminuzione dei livelli di Cr e PCr e una conseguente maggiore sensibilità dei neuroni agli effetti eccitotossici e apoptotici; infine viene alterato il funzionamento neuronale <sup>85</sup>. La Cr infatti esercita un effetto neuroprotettivo contro stress ossidativo ed apoptosi, (§ pg 13) favorendo la sopravvivenza neuronale; il suo effetto neuromodulatore aumenta la neuroplasticità (§ pg 15), che entra in gioco nella terapia di questi disturbi.

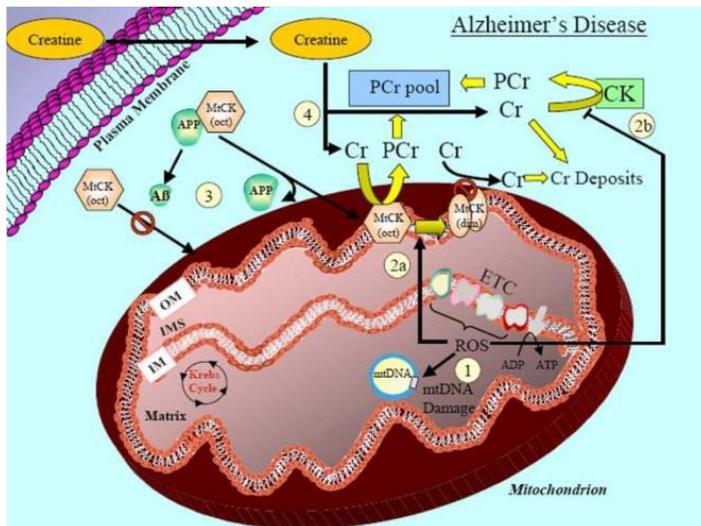
Studi NMR sui metaboliti della Cr in pazienti psichiatrici <sup>86-88</sup> hanno rilevato una estrema variabilità dei livelli di Cr in base all'età dei pazienti (con l'età la concentrazione di Cr intracerebrale aumenta) e alla zona cerebrale interessata, pertanto per la quantificazione dei metaboliti vengono presi in considerazione non solo i valori assoluti dei metaboliti stessi ma anche i loro valori in rapporto alla Cr <sup>89</sup>.

I farmaci antidepressivi ed antipsicotici inoltre alterano il trasporto della Cr ed il funzionamento della CK, fenomeno che varia in base a posologia, stadio della patologia e schema terapeutico <sup>75</sup>. La Cr quindi potrebbe essere presa in considerazione per il suo elevato potenziale terapeutico come adiuvante o alternativa nel trattamento o prevenzione delle malattie psichiatriche.

### Patologie neurodegenerative

La funzionalità del sistema Cr/PCr è alterata in alcune patologie neurodegenerative, come dimostrato da studi sia *in vitro* che *in vivo*, rilevando quindi l'importanza delle funzioni antiossidante e neuroprotettiva della Cr, che in tali situazioni sono ridotti o addirittura assenti.<sup>90</sup> Per quanto riguarda il morbo di Alzheimer (AD), si ha una concatenazione di eventi a livello mitocondriale che comincia da alterazioni a livello del ciclo di Krebs e della catena respiratoria <sup>91</sup> con conseguente stress ossidativo che porta all'inibizione della mtCK, che quindi viene convertita nella forma dimerica pro-apoptotica interrompendo la sua attività di conversione della Cr in PCr. Parallelamente si ha un mancato raggiungimento del mitocondrio da parte della mtCK, poiché la proteina che normalmente agisce come suo chaperon, la APP (proteina precursore dell'amiloide), in questa patologia è disfunzionale (fig.15). Diminuendo i livelli di mtCK cellulari, la Cr si accumula sotto forma di depositi intracellulari <sup>92,93</sup>, portando ad ipotizzare che quindi un supplemento di Cr in tale patologia sia inutile se non dannoso. L'accumulo di Cr tuttavia sembra variare in differenti zone cerebrali: in modelli animali di AD è stato infatti rilevato un aumento del segnale di Cr nella corteccia ma non

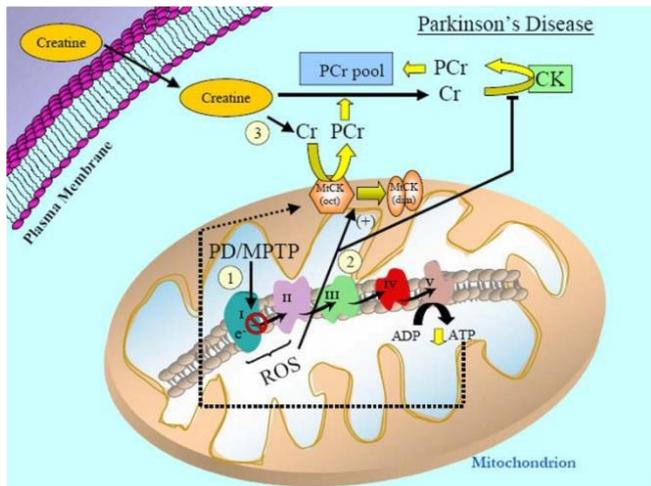
nell'ippocampo <sup>87</sup>. Nei modelli *in vitro*, invece, si rilevano benefici seguenti all'utilizzo di Cr <sup>72</sup>; la Cr infatti potrebbe avere un effetto di inibizione diretta sulla produzione delle specie radicaliche dell'ossigeno, limitando quindi lo stress ossidativo e i danni a carico del DNA mitocondriale. La creatina esogena, quindi, ripristinerebbe il contenuto intracellulare di Cr contribuendo a limitare l'evoluzione della patologia <sup>94</sup>.



**Fig.15 ruolo della creatina nella AD a livello mitocondriale** : la liberazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) a livello del mitocondrio porta all'inattivazione della mtCK (2a) e ad una diminuzione dell'attività della CK citosolica (2b) che conduce ad una diminuzione di PCr e ad un accumulo di Cr. Nello stesso tempo il taglio della APP nel peptide Aβ impedisce la translocazione della mtCK verso il mitocondrio (3) limitando la produzione di PCr mitocondriale. La supplementazione in creatina (4) permette di ripristinare il contenuto intracellulare di creatina. Estratto da Adihetty et al. <sup>94</sup>

Nel morbo di Parkinson (PD), la Cr è in grado di limitare la tossicità indotta dall'MPTP nei modelli animali di PD <sup>95</sup>, limitando la perdita dei neuroni dopaminergici della substantia nigra e quindi la deplezione di dopamina. L'MPTP agisce a livello mitocondriale inibendo in modo selettivo il complesso I della catena di trasporto degli elettroni <sup>91</sup> e di conseguenza producendo ROS che inattivano la mtCK e la convertono nella forma dimerica (fig.16). La Cr agisce ,come nel caso del morbo di Alzheimer, inibendo la produzione delle specie radicaliche dell'ossigeno, impedendo la conversione della mtCK nella forma dimerica ,impedendo la disattivazione dell'enzima e ripristinando il contenuto cellulare di Cr <sup>94</sup>.

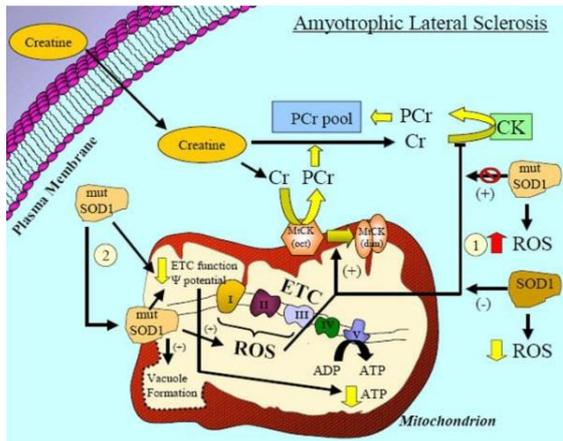
La Cr ha dimostrato ,in un test clinico di fase 2, una regressione della patologia del 50% ad un anno dall'inizio del trattamento <sup>96,97</sup>. La Cr è attualmente in fase di sperimentazione clinica per i casi di PD precoce e precocemente diagnosticato <sup>90</sup>.



**Fig.16 : ruolo della creatina nella PD a livello mitocondriale**

L'inibizione del complesso I della catena respiratoria mitocondriale aumenta la produzione di ROS che inattivano la mtCK per dimerizzazione e diminuiscono la quantità di ATP che è necessaria per permettere la produzione di PCr. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) inibiscono ugualmente l'attività della CK. La supplementazione di creatina permette di ripristinare il contenuto intracellulare in creatina. Estratto da Adhihetty et al. <sup>94</sup>

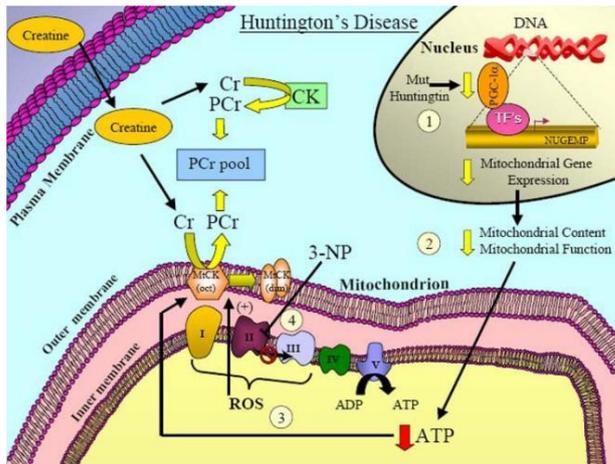
Nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA) la mutazione genetica a carico della superossido dismutasi (SOD) produce una metallo-proteinasi mutata che non è più in grado di esercitare una attività antiossidante. Le conseguenze sono un aumento delle specie radicaliche dell'ossigeno ma anche una diminuzione dell'attività dei complessi della catena di trasporto, che portano a modificazioni morfologiche dei mitocondri e a una successiva inattivazione della mtCK (fig. 17). Nei modelli animali di SLA l'utilizzo di creatina ha mostrato una attività neuroprotettiva verso i motoneuroni, limitandone la mortalità <sup>98</sup>. Studi NMR hanno messo in luce che il supplemento di Cr a 15gr/die nella SLA porta non solo ad un aumento del segnale di Cr ma anche ad una diminuzione del glutammato e della glutamina <sup>99</sup>. La Cr permetterebbe infatti la ricaptazione del glutammato dallo spazio sinaptico, fornendo l'energia necessaria per questo processo; questo porterebbe ad una diminuzione dei livelli di amminoacidi eccitatori nella sinapsi, limitando la depolarizzazione post-sinaptica, l'entrata del sodio e ripristinando l'omeostasi del calcio, così da limitare gli effetti eccitotossici.



**Figura 17 : ruolo della creatina nella SLA a livello mitocondriale**

La mutazione del gene che codifica per la SOD1 porta ad una diminuita attività antiossidante con conseguente aumento delle specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) (1 e 2). Questi inoltre inattivano la mtCK tramite la conversione nella sua forma dimerica ed inibiscono la CK citosolica portando ad una diminuzione della produzione di PCr. La supplementazione di creatina permette il ripristino del contenuto intracellulare di creatina. Estratto da Adihetty et al. <sup>94</sup>

Nella malattia detta Corea di Huntington (HD), per la quale la Cr è attualmente in fase di sperimentazione clinica <sup>90</sup>, la proteina mutata huntingtina implicata in diverse funzioni mitocondriali e non (trasporto intracellulare, trasduzione del segnale) <sup>100</sup>, genera disfunzioni che portano a morte neuronale a livello dello striato. L'huntingtina mutata diminuisce infatti l'espressione del co-fattore PGC-1 $\alpha$  che diminuisce l'espressione a livello genico delle proteine mitocondriali; si ha quindi una diminuzione delle funzioni mitocondriali ed un aumento delle specie radicaliche dell'ossigeno, con diminuita produzione di ATP <sup>94</sup> (fig.18). I difetti enzimatici a livello del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa appaiono contemporaneamente nel SNC e in periferia <sup>91</sup> e nel muscolo di avrà quindi una minore concentrazione di PCr. I modelli animali di HD rappresentati dai topi transgenici N-171-82Q e R6/2 trattati con creatina mostrano un prolungamento della sopravvivenza, una diminuzione dell'atrofia cerebrale nei neuroni dello striato ed una diminuzione degli aggregati di huntingtina <sup>101,102</sup>. Anche uno studio clinico ha dato risultati promettenti con la supplementazione di Cr, mostrando una diminuzione del danno ossidativo del DNA mitocondriale, misurato tramite il suo marker 8-idrossi-2-deossiguanidina sierica <sup>103</sup>.



**Fig.18 ruolo della creatina nella HD a livello mitocondriale** La huntingtina mutata diminuisce la quantità di cofattore PGC-1 $\alpha$ , che regola l'espressione dei geni che codificano per le proteine mitocondriali. Questo porta ad una diminuzione della sintesi di ATP e inibisce la CK. Nello stesso tempo la liberazione di specie radicaliche dell'ossigeno inattivano la mtCK per dimerizzazione portando quindi a una minor produzione di PCr. La supplementazione di creatina permette di ripristinare il contenuto intracellulare di creatina. Estratto da Adihetty et al. <sup>94</sup>

### Ictus cerebrale ischemico

L'ictus cerebrale ischemico consiste nella conseguenza della mancata irrorazione di una zona cerebrale dovuta ad occlusione di un'arteria da parte di un aterotrombo o di un embolo (gassoso, lipidico o costituito da un coagulo di sangue). Tale occlusione conduce alla formazione di una zona ischemica (core) che non riceve più né sangue né ossigeno e pertanto va incontro a morte neuronale in pochi minuti, ed una zona periferica al core (penombra), dove i neuroni hanno ancora disponibilità di ossigeno e sangue per qualche ora. Una volta giunta la morte neuronale, le funzioni che sono sotto il controllo di tali neuroni perdono la loro attività. La linea di demarcazione tra le due zone non è ben definita perché l'arteria occlusa può creare anastomosi con le arterie periferiche per supplire alla mancata irrorazione di quelle zone. Durante situazioni di ischemia i neuroni in assenza di glucosio ed ossigeno perdono la capacità di sintetizzare ATP, che va incontro ad esaurimento delle scorte in breve tempo dall'inizio dell'ischemia <sup>104</sup>. La diminuzione repentina della concentrazione di ATP si va a riflettere in particolare sul funzionamento della pompa Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> ATPasi, che di norma consuma circa l'80% dell'ATP cerebrale <sup>105</sup>. Il blocco della pompa determina un influsso di ioni Na<sup>+</sup> verso l'ambiente intracellulare, sovvertendo i gradienti ionici <sup>36</sup> e diminuendo il potenziale di membrana (che passa da 8 mV a 15 mV o oltre), determinando il fenomeno chiamato "depolarizzazione anossica" (DA) <sup>106</sup>. Questo evento elettrofisiologico di depolarizzazione dei neuroni porta ad un cambiamento delle concentrazioni ioniche intra ed extracellulari (tra cui un aumento del Ca<sup>+</sup> intracellulare), ad un aumento del rilascio di glutammato con successiva eccitotossicità ed a uno spostamento di pH da 7,4 a 6,75 (acidosi). Gli effetti della depolarizzazione

anossica sono reversibili con la riossigenazione, ma l'entità del danno dipende dalla durata dell'evento; ne consegue quindi l'importanza di ripristinare il flusso sanguigno nel minor tempo possibile. Attualmente la terapia utilizzata per l'ictus ischemico consiste in misure mediche generali e in un ripristino dell'arteria occlusa <sup>107</sup>, mentre l'unico farmaco approvato per la terapia dell'ictus negli USA ed in Europa è l'rtPA (attivatore tissutale del plasminogeno ricombinante, Actilyse, Boeringer Ingelheim), con effetto trombolitico, il quale però va utilizzato dopo tre ore dall'insorgenza dei sintomi a causa del suo potenziale emorragico. Non esiste ad oggi alcuna terapia in grado di proteggere specificatamente il tessuto nervoso dagli effetti dell'ischemia. Il sistema Cr/PCr, durante l'evento ischemico, è in grado di produrre ATP anche in assenza di ossigeno e con grande rapidità <sup>3,108</sup>. La concentrazione cerebrale di PCr può essere incrementata pretrattando il tessuto con Cr <sup>43,77</sup>, come dimostrato da studi *in vitro* in cui fettine di ippocampo di topo incubate con concentrazioni elevate di Cr (25 mM) hanno mostrato un incremento del loro contenuto in PCr e Cr (da 40 µmol/g a 150 µmol/g) e con lo stesso trattamento la trasmissione sinaptica si era mantenuta dopo 10 minuti di privazione di ossigeno <sup>77</sup>. Questa neuroprotezione era dovuta al fatto che l'utilizzo di Cr aveva rallentato il depauperamento delle scorte di ATP iniziale: nelle fettine incubate con Cr, infatti, era stata conservata una certa quantità di ATP, mentre nelle fettine di controllo essa era diminuita più velocemente arrivando a 3,6 µmol/g. *In vivo* la somministrazione di Cr direttamente nel ventricolo cerebrale (quindi garantendone l'arrivo ad alte dosi e in modo rapido), riduce il danno neuronale in ratti soggetti ad ischemia cerebrale, anche se somministrata successivamente all'evento ischemico <sup>109</sup>. La modificazione della Cr in modo da renderla più lipofila ne mantiene gli effetti benefici neuroprotettivi <sup>110,111</sup> e potrebbe quindi essere un modo per rendere più rapido ed efficiente il suo accesso al SNC e per proteggere il tessuto neuronale dagli eventi ischemici.

### ***Le sindromi da deficit cerebrale di creatina***

Le sindromi da deficit cerebrale di creatina (CCDS) <sup>112-114</sup> sono un gruppo di tre patologie ereditarie riguardanti sintesi e trasporto della Cr, che portano come conseguenza a una diminuita o assente concentrazione di Cr e PCr a livello cerebrale <sup>115</sup>. La sintomatologia non è specifica di tali patologie e ed è costituita da disturbi neuronali che compaiono già dalla prima infanzia e che possono essere variamente associati tra di loro, tra cui ritardo mentale, iperattività, autolesionismo, disturbi extrapiramidali del movimento, disturbi del linguaggio, autismo ed epilessia <sup>112,116,117</sup>. Due di queste patologie riguardano difetti enzimatici, il deficit di AGAT <sup>118</sup> e il deficit di GAMT <sup>119</sup>, che alterano rispettivamente la prima e la seconda tappa della biosintesi della Cr e sono trattabili con trattamenti continui di Cr <sup>120</sup>; la terza patologia consiste nel deficit del trasportatore SLC6A8 <sup>121,122</sup> e ad oggi è ancora una patologia incurabile, dato che la creatina non può essere assorbita vista la mancanza del trasportatore. I difetti enzimatici sono trasmessi con modalità autosomica recessiva, mentre il difetto del trasportatore con modalità X-linked. La prima di queste patologie ad essere stata descritta è il deficit di GAMT nel 1994 <sup>119</sup>, mentre le altre due sono state individuate all'inizio degli anni 2000.

Sono malattie rare: sono stati individuati 52 pazienti affetti dal deficit di GAMT, 7 pazienti con deficit di AGAT ed un centinaio affetti dal deficit di SLC6A8 <sup>112</sup>, che quindi risulta essere, tra le tre, la più frequente anche se si suppone che il numero di pazienti ad oggi segnalato sia sottostimato <sup>113</sup>.

### Deficit di AGAT

Il deficit di AGAT è una patologia dovuta ad una mutazione del gene localizzato sul cromosoma 15q15.3 che si trasmette con modalità autosomica recessiva e che porta ad un difetto enzimatico che inibisce la prima tappa della biosintesi della Cr <sup>118,123</sup>. Si è mostrata efficace nella cura di questo disturbo la somministrazione di amminoacidi precursori della Cr, che portano ad un aumento della concentrazione di Cr intracerebrale e di conseguenza ad un miglioramento dei sintomi. Anche la somministrazione di Cr monoidrato inizialmente ad alto dosaggio (400 mg/Kg/die) e poi diminuita gradualmente si è rivelata efficace nell'aumentare il contenuto di Cr cerebrale. Il trattamento pre-sintomatico in neonati si è mostrato in grado di garantire uno sviluppo cerebrale normale, impendendo quindi la comparsa dei sintomi. L'utilizzo di Cr incontra però l'ostacolo del basso assorbimento a livello del SNC nonostante la presenza del trasportatore <sup>76</sup>.

### Deficit di GAMT

Il deficit di GAMT riguarda un difetto genetico a livello del cromosoma 19p13.3 che si trasmette con modalità autosomica recessiva e che comporta una inibizione della seconda tappa della biosintesi della Cr <sup>119</sup>. Le manifestazioni fenotipiche di tale difetto riguardano soprattutto episodi epilettici e di ritardo nello sviluppo del linguaggio <sup>124-126</sup>. Si è mostrata efficace per il trattamento di questo disturbo la somministrazione di creatina monoidrato ad alte dosi (da 350 fino a 2000 mg/Kg/die), anche se persistono sintomi neurologici in quanto nei pazienti si riscontra una elevata concentrazione di GAA nei fluidi biologici. Per ovviare a questo inconveniente sono state aggiunte all'integrazione di Cr altre due strategie: la somministrazione di ornitina per inibire l'attività dell'AGAT tramite feedback negativo e l'esclusione dalla dieta di arginina (substrato dell'AGAT). Con la combinazione di queste tre strategie si può ottenere un miglioramento della sintomatologia dei pazienti, specialmente se trattati precocemente <sup>114,127</sup>.

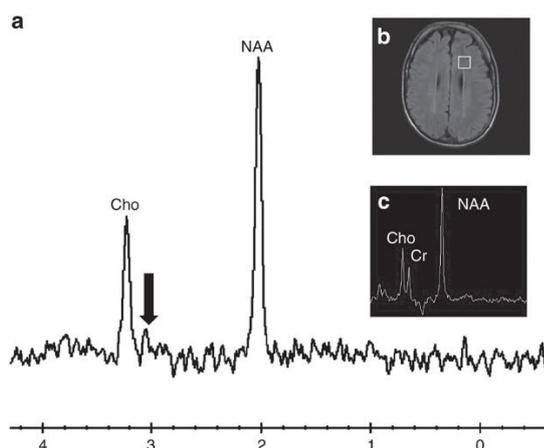
### Deficit del trasportatore SLC6A8

Il deficit del trasportatore SLC6A8 <sup>121</sup> è dovuto ad una mutazione a carico del gene che codifica per il trasportatore della Cr, situato sul cromosoma X. I maschi affetti da questa mutazione sono quindi sempre omozigoti e manifestano la malattia con sintomi neurologici con elevata gravità quali ritardo mentale e dell'acquisizione del linguaggio, deficit dell'attenzione, epilessia, microcefalia, atrofia cerebrale, mentre le femmine sono più spesso eterozigoti e possono essere portatrici sane oppure manifestare, nel 50% dei casi, gli stessi sintomi neurologici ma di gravità inferiore rispetto agli omozigoti <sup>128,129</sup>. Più frequentemente si riscontrano in tali pazienti disturbi del comportamento, dell'apprendimento o una epilessia farmaco-resistente <sup>128,129</sup>. La patologia rappresenta una delle più

comuni cause di ritardo mentale X-linked ed è la più frequente tra le tre CCDS. La mutazione porta ad una assenza o a una inattività del trasportatore SLC6A8, con la conseguenza che la Cr plasmatica non può attraversare la BEE e quindi non raggiungere il cervello <sup>128</sup>. A livello del SNC vengono inoltre impediti gli scambi di metaboliti tra i neuroni che sono in grado di sintetizzare Cr o GAA e quelli che li utilizzano <sup>56</sup>, con la conseguenza che la sintesi di Cr a livello cerebrale è compromessa depauperando le scorte di creatina. La mancanza di tali riserve energetiche a livello del SNC provoca la comparsa della sintomatologia neurologica. La concentrazione di Cr nel liquido cefalo-rachidiano risulta normale, probabilmente come conseguenza di un deficit nella ricaptazione di Cr conseguente ad un suo rilascio, mentre il muscolo scheletrico, che in alcuni pazienti risulta essere atrofico ed ipotonico, va incontro nel tempo ad un processo adattativo aumentando il suo contenuto in glicogeno. Come risposta alla carenza di Cr, infatti, il tessuto muscolare dei soggetti affetti da deficit di SLC6A8 aumenta la sua produzione di ATP tramite la glicolisi ed il metabolismo aerobico, permettendo quindi un funzionamento normale delle fibre contrattili. <sup>130</sup> Ciò non può avvenire a livello del SNC, dove una risposta adattiva richiederebbe un tempo troppo lungo per le necessità energetiche rapide ed intense del tessuto cerebrale.

### diagnosi delle CCDS

Vista la non specificità dei sintomi neurologici delle CCDS, è dapprima necessaria una diagnosi differenziale in cui si devono considerare patologie che portano a deficit secondari di Cr cerebrale quali lesioni vascolari cerebrali, disfunzioni del ciclo dell'urea <sup>131</sup> e l'atrofia girata della retina <sup>132</sup>. Si procede poi con una quantificazione di Cr e dei suoi metaboliti nel sangue e nelle urine, che permette di effettuare anche una prima distinzione tra le tre CCDS in base ai diversi valori dei markers diagnostici (creatina, creatinina e acido guanidin acetico). Tutte e tre le sindromi hanno in comune una bassa concentrazione di creatina cerebrale, ma i livelli plasmatici ed urinari dei metaboliti variano in base al tipo di patologia <sup>133,134</sup>. La creatina ed il GAA mostrano livelli plasmatici generalmente nella norma nel deficit di SLC6A8, mentre si ha una elevata concentrazione di creatina e creatinina a livello urinario, che ne determina quindi il marker diagnostico. Per quanto riguarda il deficit di AGAT, esso è caratterizzato da bassi livelli di creatina e GAA sia plasmatici sia urinari; infine il deficit di GAMT presenta una elevata concentrazione di GAA urinario mentre i valori della creatina plasmatica ed urinaria sono più bassi della norma <sup>133,134</sup>. I dosaggi biochimici dei metaboliti possono essere effettuati tramite HPLC o con spettrometria di massa su campioni di urine o sangue eparinato <sup>134,135</sup>. Per determinare invece l'assente o diminuita concentrazione di Cr cerebrale si ricorre alla risonanza magnetica cerebrale, tecnica non invasiva di neuro-imaging che permette di identificare e quantificare i metaboliti di interesse, in questo caso la creatina, in un volume definito di tessuto biologico, misurando il segnale di risonanza magnetica generato dai protoni <sup>1</sup>H in risposta a degli impulsi di radiofrequenza (fig.19).



**Fig.19** analisi di risonanza magnetica a protoni del primo paziente affetto da deficit del trasportatore della creatine.(a) MRS (spettroscopia a risonanza magnetica) della sostanza bianca: si osserva un diminuito segnale della Creatina, mentre quello di NAA (N-acetil-aspartato) e Cho (colina) risultano essere nella norma (b) MRI (imaging a risonanza magnetica) (c) MRS : segnali normali di Cr, Cho e NAA di un soggetto sano. Estratto da *Joseph F. Clark & Kim M. Cecil Pediatric Research (2015) 77, 398–405 doi:10.1038/pr.2014.203*

Nel caso del deficit di SLC6A8 è stato messo a punto un metodo diagnostico da Salomons e collaboratori nel 2001<sup>121</sup>, in cui colture di fibroblasti di pazienti affetti da SLC6A8 erano incubate per 24 h con diverse concentrazioni di creatina (100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M e 500  $\mu$ M) per valutarne l'uptake, assieme a colture di fibroblasti di controllo. Il contenuto in Cr intracellulare dei fibroblasti di controllo aumentava a tutte le concentrazioni, mentre il livello di Cr intracellulare dei fibroblasti dei pazienti aumentava soltanto alla concentrazione di 500  $\mu$ M (concentrazione fortemente al di sopra dei livelli fisiologici) e tale uptake non variava con la presenza nel mezzo di incubazione di GPA (l'inibitore del trasportatore SLC6A8). Nei fibroblasti di controllo, invece, la presenza di GPA faceva diminuire l'uptake di creatina. Il fatto che la presenza dell'inibitore non influenzasse l'assorbimento di Cr da parte dei fibroblasti dei pazienti dava la conferma che il trasportatore SLC6A8 non fosse funzionante e pertanto si poteva ipotizzare un meccanismo di diffusione passiva o di passaggio della Cr mediante altre proteine trasportatrici<sup>121</sup>. Per avere la conferma della patologia si ricorre poi all'analisi molecolare del gene che codifica per la proteina di interesse. In questo modo si può anche riconoscere l'origine della mutazione genetica (somatica o *de novo*) mediante il confronto con le sequenze genetiche dei parenti prossimi, ad esempio dei genitori. Nel caso del deficit di SLC6A8 sono state ad oggi riconosciute più di una ventina di mutazioni<sup>112,136,137</sup> considerate patologiche, ma la precisa correlazione tra ciascuna di esse e le conseguenti alterazioni nel funzionamento del trasportatore è ancora da indagare.

### ***effetti collaterali nella somministrazione di creatina***

La creatina non rientra nella regolamentazione dei farmaci in quanto è considerata un integratore alimentare nonostante il suo potenziale terapeutico e la sua azione anabolizzante. Presente sul mercato statunitense dal 1993<sup>138</sup>, in Europa è stata approvata solo nel 2004 e viene considerata un agente dopante nell'etica sportiva. Per gli atleti si raccomanda l'assunzione massima di 2-3 g/die (EFSA Journal, 2004). È stato ipotizzato un suo potenziale cancerogenico per essere la molecola precursore di ammino-imidazo-areni e di nitrosoammine, ma queste ipotesi non sono mai state appurate<sup>70</sup>. È stato riportato in letteratura qualche caso di disfunzione renale di alcuni atleti che abusavano di creatina<sup>62,139</sup> è stato infatti dimostrato che un dosaggio elevato (20g/die) porta all'escrezione urinaria di molecole citotossiche quali la metilammina e la formaldeide, associate allo sviluppo di nefropatie<sup>140</sup>. L'utilizzo di creatina è quindi attualmente considerato privo di rischio dato il gran numero di utilizzatori<sup>70</sup> e la minima percentuale riportata di effetti collaterali (diarrea, sete, senso di gonfiore allo stomaco e crampi). Negli USA circa il 40% degli atleti universitari fanno infatti uso quotidiano di creatina senza alcun controllo medico. Tuttavia gli studi tossicologici non hanno mai mostrato segno di tossicità né acuta né subacuta, pertanto un dosaggio di attacco di 20g/die seguito da una dose di mantenimento di 2-5 g/die è attualmente considerata senza rischi per la salute<sup>70</sup>.

## ***PARTE 2: PROBLEMI DELLA SOMMINISTRAZIONE DELLA CREATINA E STRATEGIE TERAPEUTICHE SVILUPPATE***

### ***1.3 ATTRAVERSAMENTO DEI FARMACI DELLE BARRIERE CELLULARI***

I farmaci somministrati nell'organismo sono soggetti a meccanismi di passaggio delle barriere cellulari, sia durante la fase di assorbimento sia nella fase di distribuzione tra i diversi compartimenti corporei di cui uno lipidico e quattro acquosi : fluidi interstiziali, plasma, fluidi intracellulari, fluidi transcellulari. Nella fase di assorbimento il farmaco, a seconda della via di somministrazione, deve attraversare una barriera cellulare per raggiungere il circolo sanguigno; nel caso di farmaci somministrati per via orale, il farmaco dovrà passare nel lume intestinale e da lì arrivare nel torrente circolatorio. In questo caso la barriera cellulare da attraversare separa il compartimento extracellulare da quello intracellulare ed è costituita da un tessuto epiteliale, formato quindi da un doppio strato di cellule, uno interno ed uno esterno. Il farmaco dovrà successivamente attraversare anche l'endotelio dei vasi sanguigni. L'endotelio vascolare ha una diversa permeabilità da tessuto a tessuto e gli spazi tra le cellule sono costituiti da una matrice proteica che filtra le molecole più grandi (80.000-100.000 Da). In alcuni organi come il SNC le cellule sono unite da giunzioni serrate e l'endotelio è rivestito dai periciti (cellule periendotheliali); in altri organi invece si ha un endotelio

fenestrato che permette il passaggio delle molecole, come a livello delle ghiandole dove gli ormoni devono facilmente entrare o uscire dal flusso sanguigno. Nella fase di distribuzione il farmaco si muove tra i vari compartimenti acquosi attraversando barriere cellulari lipidiche; tipico esempio è il passaggio dal compartimento extracellulare a quello transcellulare attraverso la barriera ematoencefalica. Il movimento dei farmaci tra i vari compartimenti acquosi durante l'assorbimento e la loro distribuzione avviene quindi mediante il passaggio attraverso membrane lipidiche (mucosa gastrointestinale, placenta, BEE ecc.) che ne determina la biodisponibilità a livello degli organi bersaglio <sup>141</sup>.

### ***membrane cellulari***

Le membrane cellulari sono costituite da un doppio strato fosfolipidico contenente diverse proteine, una piccola quantità di glucidi e molecole di colesterolo. Il passaggio delle molecole attraverso le membrane cellulari può avvenire mediante diversi meccanismi, di cui i più utilizzati dai farmaci sono principalmente due: la diffusione tramite i lipidi e il trasporto mediato da trasportatori. Le molecole apolari presentano una elevata solubilità nei lipidi, che a temperatura corporea sono allo stato liquido, e perciò diffondono liberamente attraverso le membrane cellulari. Il numero di molecole di farmaco che attraversano la membrana per unità di superficie e nell'unità di tempo è determinata dal gradiente di concentrazione del farmaco ai due lati della membrana e dal coefficiente di permeabilità  $P$  che a sua volta dipende principalmente dalla ripartizione della molecola tra la membrana e l'ambiente acquoso; si può quindi dedurre che la permeabilità della membrana verso un determinato farmaco è strettamente correlata dalla solubilità del farmaco nei lipidi della membrana stessa. La liposolubilità del farmaco è un parametro che permette in molti casi di prevedere la biodisponibilità del farmaco stesso a livello di diversi organi. Un altro fattore che influenza la permeazione delle membrane è il rapporto, nei fluidi biologici, tra la forma ionizzata e quella non ionizzata del farmaco, qualora i farmaci siano acidi o basi deboli. Tale rapporto è determinato dal pH del compartimento in cui si trova il farmaco e dalla costante di dissociazione  $pK_a$  ottenuta dall'equazione di Henderson-Hasselbach e che varia in funzione del pH. La forma ionizzata dei farmaci presenta un grado di liposolubilità estremamente basso e quindi essa non è in grado di passare la membrana cellulare per diffusione, ma solo tramite un trasportatore. La forma non ionizzata è invece, nella maggior parte dei casi molto liposolubile e diffonde agevolmente nello strato lipidico. L'influenza del pH determina anche uno spostamento dei farmaci tra i compartimenti acquosi che presentano differenza di pH e un conseguente accumulo dei farmaci acidi nei distretti cellulari a pH basico e viceversa secondo il fenomeno del cosiddetto "intrappolamento ionico". Il gradiente di concentrazione del farmaco ai due lati della membrana è anch'esso un fattore importante nella permeabilità, in quanto un suo aumento determina in modo direttamente proporzionale un aumento del passaggio del farmaco. Per quanto riguarda il trasporto dei farmaci mediante i trasportatori, molte membrane cellulari sono dotate di meccanismi di trasporto

specializzati per internalizzare o espellere molecole. Il trasportatore può essere una proteina transmembrana detta carrier, che lega il farmaco e lo porta all'interno della membrana; se il trasporto avviene secondo la direzione del gradiente elettrochimico del farmaco tra i due lati della membrana e non si ha l'utilizzo di fonti energetiche il processo è detto diffusione facilitata. Se invece il trasporto viene condotto grazie all'utilizzo di una fonte energetica quale l'idrolisi di ATP o l'accoppiamento ad un altro gradiente elettrochimico, il processo può anche avvenire contro gradiente del farmaco e prende il nome di trasporto attivo. Entrambi questi processi sono soggetti a saturazione e quindi vanno incontro ad una velocità massima di trasporto quando tutti i siti sono occupati dal farmaco.<sup>141</sup>

### ***la barriera ematoencefalica***

La barriera ematoencefalica è una complessa struttura che separa il circolo sanguigno dal SNC, con lo scopo di proteggere quest'ultimo e di regolare selettivamente il flusso di sostanze in entrata e in uscita da e verso il flusso sanguigno. Essa costituisce quindi una barriera fisica, metabolica e strutturale; la sua esistenza è stata prima indagata nel 1885 da Paul Ehrlich che aveva osservato come un colorante somministrato per via endovenosa raggiungeva tutti i tessuti ma non era in grado di penetrare nel tessuto cerebrale<sup>142</sup> ed in seguito il suo studente Goldman rilevò l'esistenza di una barriera impermeabile all'ingresso dei farmaci nel cervello. La barriera ematoencefalica è costituita da diversi tipi di cellule che formano una unità neurovascolare: cellule endoteliali cerebrali, unite tra di loro da giunzioni serrate formando un tessuto continuo; i peduncoli astrocitari che avvolgono l'endotelio; i periciti (cellule connettivali contrattili). La BEE è assente a livello degli organi circumventricolari, dove l'endotelio è fenestrato per permettere il passaggio di ormoni e neurotrasmettitori e per controllare la composizione del fluido cefalorachidiano<sup>143</sup>. La struttura dell'endotelio cerebrale mostra delle caratteristiche che lo contraddistinguono da tutti gli altri organi: la membrana basale sottostante le cellule endoteliali ed i periciti è costituita da una matrice proteica contenente collagene di tipo IV, laminine e fibronectine ed è rivestita dalle estroflessioni degli astrociti<sup>144-146</sup>. Studi in vitro hanno rilevato che la presenza dei peduncoli astrocitari è fondamentale per la formazione delle giunzioni serrate tra le cellule endoteliali, in quanto essi rilasciano fattori chimici che ne permettono la stretta adesione<sup>147</sup>. Le giunzioni serrate a livello luminale delle cellule endoteliali sono costituite da proteine (claudine, occludine) che impediscono il passaggio paracellulare delle molecole e formano una rete proteica di collegamento con il citoscheletro di actina<sup>148</sup>; le giunzioni aderenti sono invece costituite da una forte interazione tra le proteine caderine, espresse sulla superficie delle cellule, e le catenine, espresse nella matrice extracellulare; le giunzioni comunicanti regolano invece il passaggio di segnali chimici ed elettrici tra le cellule adiacenti. La BEE permette il passaggio di ossigeno, anidride carbonica ed altre piccole molecole lipofile<sup>149</sup>. Essa è in grado di regolare il passaggio dei nutrienti, dell'acqua e degli ioni. Esistono diverse vie possibili per attraversare la BEE:

- la diffusione passiva (via transcellulare) per piccole molecole lipofile
- la via paracellulare per piccole molecole idrofile
- la via endocitotica mediata da recettori o tramite riconoscimento di fosfolipidi di membrana
- trasporto mediato da carrier (glucosio).

I trasportatori sono generalmente collocati sia sul lato luminale sia sul lato basale della membrana endoteliale e possono effettuare trasporto unidirezionale o bidirezionale (influsso o efflusso) <sup>150</sup>. Le principali famiglie di trasportatori ad elevata specificità di substrato che sono numerosi a livello della BEE sono la famiglia SLC (di cui fanno parte i trasportatori del glucosio GLUT1, i trasportatori degli aminoacidi cationici CAT e i trasportatori di glicina e taurina, rispettivamente SLC6A9 e SLC6A6) e la famiglia ABC (ATP-binding cassette), che comprende proteine di efflusso quali la glicoproteina P e la MRPs (multidrug-resistance associated proteins), responsabili dell'efflusso di farmaci e quindi dello sviluppo di resistenze ai trattamenti <sup>150</sup>. Il trasportatore SLC6A8 della creatina è ritenuto essere un trasportatore di influsso localizzato all'interfaccia tra la cellula endoteliale ed il peduncolo astrocitario, ed è presente sia a livello luminale sia abluminale della cellula endoteliale ma manca sul versante esterno degli astrociti <sup>151</sup>. La BEE costituisce inoltre una barriera con delle proprie funzioni metaboliche. Le cellule endoteliali della BEE esprimono infatti tutta una serie di enzimi in grado di metabolizzare i profarmaci (un esempio è costituito dalla L-dopa che viene convertita a dopamina a livello dell'endotelio tramite l'enzima L-dopa-decarbossilasi) <sup>152</sup> ed inoltre è stata individuata una stretta correlazione metabolica tra gli astrociti (che rivestono il 99% dell'endotelio vascolare) e le cellule endoteliali <sup>153</sup>. Essi infatti sono coinvolti nell'espressione delle giunzioni serrate e nell'espressione dei trasportatori e degli enzimi grazie ai fattori astrocitari da essi rilasciati e controllano il flusso sanguigno cerebrale <sup>151</sup>; i periciti sono invece coinvolti nello sviluppo della matrice extracellulare <sup>152,154,155</sup>. Il cervello è inaccessibile alla maggior parte dei farmaci (98%) in quanto caratterizzati da solubilità lipidica insufficiente per superare la BEE <sup>156,157</sup>. I farmaci che riescono a passare la BEE per via transcellulare sono altamente lipofili. Per stabilire la possibilità che un farmaco attraversi tale membrana si fa riferimento alla "regola del cinque di Lipinski": esiste una correlazione tra la velocità con cui il farmaco attraversa la BEE ed il suo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua per valori positivi fino a cinque <sup>158</sup>. Il passaggio della BEE da parte del farmaco è anche limitato dalla sua dimensione (PM > 500 Da) <sup>150</sup>, dalla presenza di legami in grado di ruotare liberamente <sup>150</sup> e dalla capacità di formare più di sei legami Idrogeno <sup>159</sup>. La condizione ottimale per un farmaco per l'attraversamento della BEE è quella di essere tanto lipofilo da poterla attraversare in forma di profarmaco, essere poi convertito a livello della cellula endoteliale nella sua forma attiva più idrofila che ne garantirebbe alte concentrazioni a livello del SNC, senza distribuirsi a livello periferico <sup>160</sup>. La creatina è di per sé una molecola polare che quindi riesce ad attraversare la BEE solo tramite il proprio trasportatore specifico ed il suo passaggio è estremamente lento e

difficoltoso, complicato anche dal fatto che non è presente il trasportatore sul lato esterno degli astrociti. Una volta entrata nel SNC essa può passare le membrane neuronali solo nuovamente tramite il suo trasportatore <sup>76</sup>.

### ***approcci per migliorare l'attraversamento dei farmaci della BEE***

#### strategie per superare l'ostacolo della BEE

Esistono diverse modalità con cui è possibile somministrare farmaci aggirando l'ostacolo della BEE; la prima consiste nella somministrazione intracerebrale, che può essere effettuata per iniezione nel liquido cefalorachidiano (iniezione intratecale), oppure per iniezione nei ventricoli cerebrali (iniezione intraventricolare). Queste vie di somministrazione sono utilizzate per farmaci quali anestetici (lidocaina e derivati), analgesici (morfina e derivati), baclofene utilizzato nel trattamento della spasticità della sclerosi a placche, metotrexato utilizzato in chemioterapia nel caso dei linfomi <sup>161-163</sup>. Un'altra modalità è la via tramite i nervi olfattivo e trigemino che innervano la cavità nasale, che permette una comunicazione diretta con il cervello <sup>164</sup>. Tali vie di somministrazione non possono comunque essere considerate nel caso dei derivati della creatina, in quanto non è ancora nota l'entità della diffusione cerebrale a partire dal punto di iniezione. Un secondo approccio per superare l'ostacolo della BEE è rappresentato dall'apertura transitoria delle giunzioni serrate, che può essere effettuata tramite modulatori delle giunzioni serrate, apertura osmotica o l'utilizzo di tecniche di accoppiamento di ultrasuoni e microbolle. I modulatori delle giunzioni serrate sono stati individuati durante uno screening che ha permesso di identificare una serie di sostanze aventi come bersaglio i peptidi espressi dalle giunzioni serrate; i più conosciuti sono i derivati delle enterotossine dei batteri *Vibrio cholerae* e *Clostridium perfringens* che agiscono da tossine per la zonula occludens e i vasodilatatori come la bradichinina, che aumenta la concentrazione degli ioni calcio liberi nella cellula, attivando il complesso actina-miosina e distendendo le giunzioni serrate. Questi ultimi sono stati valutati in un modello di glioma di ratto dove favoriscono la penetrazione nel cervello di antitumorali. L'apertura osmotica consiste nella somministrazione intracarotidea di soluzioni iperosmotiche (mannitolo o arabinosio), che porta ad una differenza di pressione osmotica e modifica quindi il flusso di acqua a livello delle cellule. Questa procedura sembra aumentare la permeabilità degli antitumorali nel SNC <sup>165</sup>. La tecnica degli ultrasuoni accoppiata alla tecnica delle microbolle utilizza invece delle microbolle cariche di un gas pesante, l'esafluoruro di zolfo Sonovue® e ha mostrato dei risultati interessanti in termini di apertura transitoria della BEE <sup>166,167</sup>. Tuttavia l'apertura della BEE in queste condizioni non è ancora un processo perfettamente controllato e questo potrebbe comportare dei rischi nella limitazione dell'accesso di sostanze tossiche nel cervello ed inoltre è necessario controllare il tempo di permeabilità della BEE limitandolo al picco di concentrazione plasmatica del farmaco.

## strategie che sfruttano le caratteristiche della BEE

Un ulteriore approccio è rappresentato dalla possibilità di sfruttare le caratteristiche funzionali e strutturali della barriera stessa. L'inibizione delle pompe di efflusso, ad esempio, è una metodica utilizzata per aumentare la permeabilità degli antiretrovirali verso il cervello mediante l'azione di inibitori competitivi delle pompe di efflusso. Un altro approccio è quello che utilizza i CPP (Cell-penetrating peptides), un gruppo di piccoli peptidi costituiti da meno di 30 aminoacidi che legati ad altre molecole ne favoriscono la permeazione cellulare <sup>168</sup>.

Un'altra metodica sfrutta i numerosi trasportatori espressi a livello dell'endotelio della BEE, in modo tale da attuare un riconoscimento ligando-recettore, con successiva internalizzazione del complesso all'interno del lume endoteliale e quindi un rilascio per esocitosi della molecola <sup>168</sup>.

Sono stati descritti procedimenti di internalizzazione di farmaci mediante i recettori della transferrina, dell'insulina e delle lipoproteine. Nel caso del trasportatore dell'insulina, ad esempio, è stato messo a punto un metodo diagnostico per la malattia di Alzheimer che utilizza un anticorpo monoclonale che riconosce il recettore dell'insulina accoppiato ad un peptide  $\beta$ -amiloide <sup>169</sup>.

Un altro approccio utilizzato è quello dell'utilizzo delle nanoparticelle come vettori di principi attivi; esse possono attraversare la BEE tramite il processo detto EPR (enhanced permeability and retention) cioè un aumento della permeabilità vascolare in presenza di processi infiammatori o tumori <sup>170</sup>, oppure mediante il riconoscimento dell'anticorpo sulla superficie del nanovettore con il recettore e il successivo rilascio del farmaco nel lume endoteliale.

L'ultimo metodo considerato è l'aumento della lipofilia dei farmaci che devono attraversare la BEE. Tale obiettivo può essere ottenuto modificando la struttura chimica di una molecola aggiungendo, per esempio, gruppi funzionali che possano aumentarne la lipofilia e quindi il logP, per favorirne il passaggio della BEE molto più agevolmente <sup>171,172</sup>.

La diacetilmorfina, ad esempio, conosciuta anche con il nome di eroina, attraversa la BEE 25 volte più facilmente della morfina, avendo un logP di 1,12 contro quello della morfina di 0,2 <sup>173</sup>. Assieme all'aumento della lipofilia della molecola va comunque anche considerata la massa molecolare che deve essere inferiore a 500 Da per ottenere un buon risultato.

## **1.4 STRATEGIE TERAPEUTICHE SVILUPPATE PER RISOLVERE I PROBLEMI DI DEFICIT DELLA CREATINA**

### ***trattamento con creatina monoidrato***

Il trattamento con creatina monoidrato viene utilizzato con successo nei pazienti affetti da deficit enzimatici della biosintesi di creatina, mentre per il deficit del trasportatore la somministrazione di creatina monoidrato si è mostrata efficace solo nel caso in cui i pazienti fossero eterozigoti, in cui si è infatti verificato un miglioramento del linguaggio e dell'umore associati ad un aumento della creatina cerebrale e plasmatica <sup>174</sup>. Nel caso di pazienti omozigoti invece la somministrazione di

creatina della durata di diversi mesi ad alte dosi (250-750 mg/kg/die) non ha fornito alcun miglioramento dello stato clinico<sup>54,122,128,175-178</sup>. Inoltre, ripetute somministrazioni di creatina per diversi anni non hanno sortito alcun effetto positivo né a livello sintomatico né a livello di aumento di concentrazione di creatina cerebrale<sup>178</sup>. In questo caso tuttavia, sono stati evidenziati, nei bambini, effetti positivi a livello della funzione muscolare, con un aumento di peso e di altezza, mentre negli adulti un trattamento a lungo termine previene l'insorgenza delle complicazioni della malattia che sopraggiungono con l'aumento dell'età, come miopatie e disfunzioni intestinali<sup>178</sup>.

### ***amminoacidi precursori***

Gli amminoacidi precursori della biosintesi della creatina possono attraversare la BEE ed entrare a far parte della sintesi in situ a livello intracerebrale. Vengono utilizzate la L-arginina a dosi di 300-450 mg/kg/die e la L-glicina a dosi di 200 mg/kg/die. Sono stati condotti studi clinici su pazienti affetti da deficit del trasportatore che hanno dato risultati contrastanti: alcuni infatti hanno mostrato un miglioramento dei disturbi neurologici con un lieve aumento della creatina intracerebrale<sup>178-179</sup>; per altri invece non è stato rilevato alcun miglioramento dei sintomi<sup>180-181</sup>. Tale fenomeno potrebbe essere spiegato con il fatto che in assenza di trasportatore funzionante vengano meno anche gli scambi intercellulari dei precursori della creatina necessari per la sua biosintesi.

### ***derivati della creatina***

#### complessi creatina-Mg e fosfocreatina-Mg

I complessi creatina-magnesio e fosfocreatina-magnesio *in vivo* si dissociano liberando creatina e fosfocreatina ed esercitando una attività neuroprotettrice in un modello sperimentale di topo una volta somministrati per iniezione intraperitoneale<sup>182</sup>. *In vitro* portano ad un aumento della concentrazione di creatina in fettine di ippocampo di topo dopo tre ore di incubazione, anche in condizioni di inibizione del trasportatore<sup>65,110</sup>. Tutti questi effetti sono proporzionali all'aumento della concentrazione di creatina cerebrale<sup>65</sup>.

#### derivati esterei della creatina

Sono stati studiati finora due diversi esteri della creatina : l'estere etilico e l'estere benzilico. I due composti, essendo derivati più lipofili della creatina stessa, riescono a passare la BEE ed una volta all'interno delle cellule cerebrali vengono sottoposti all'azione delle esterasi liberando creatina. L'estere benzilico della creatina determina un aumento del contenuto di creatina nelle fettine di ippocampo di topo anche con un pretrattamento con acido guanidinpropionico (noto inibitore del trasportatore), tuttavia la sua emivita di circa 45 minuti alla temperatura di 37°C ne limita l'utilizzo<sup>110</sup>. L'estere etilico della creatina induce un aumento di concentrazione di creatina e fosfocreatina nelle fettine di ippocampo di topo in tre ore dall'incubazione. Tale aumento si riscontra anche in

condizioni di trasportatore bloccato <sup>183</sup>. Pur essendo in grado di attraversare le membrane cellulari dei fibroblasti di pazienti affetti dal deficit del trasportatore <sup>184</sup>, l'estere etilico della creatina è stato anche testato in studi clinici di pazienti affetti da tale deficit, ma oltre a non aver sortito alcun miglioramento a livello dei sintomi neurologici non ha determinato un aumento della concentrazione plasmatica e cerebrale di creatina <sup>183</sup>. L'assenza di effetti positivi da parte della molecola potrebbe essere dovuta ad una idrolisi seguita da ciclizzazione a creatinina che essa subisce in modo spontaneo a pH fisiologico (si sono infatti individuati nei soggetti alti livelli di creatinina plasmatica che rafforza questa ipotesi). La creatina etilestere presenta infatti una emivita estremamente bassa in mezzo fisiologico a pH 7,4 (circa 6 minuti), mentre è molto stabile a pH=1 (emivita di 570 ore) <sup>185</sup>. L'idrolisi da parte delle esterasi plasmatiche, che "in vivo" convertono rapidamente la molecola ad alcol etilico e creatina, potrebbe impedire il passaggio della BEE in assenza del trasportatore <sup>186</sup>. Tale molecola esercita una azione neuroprotettiva paragonabile a quella della creatina stessa ma non è sufficientemente lipofila da attraversare la BEE in condizioni di blocco del trasportatore; non risulterebbe quindi adatta per trattare il deficit di SLC6A8 <sup>183</sup>. E' sorta quindi la necessità di aumentare la lipofilia di tale derivato per renderlo in grado di attraversare le membrane cellulari in modo indipendente dal trasportatore della creatina e meno soggetto alla ciclizzazione a creatinina, per trovare un potenziale derivato utile nella terapia del deficit dell'SLC6A8 e di altre malattie neurologiche.

Risultati estremamente positivi si sono ottenuti invece dalla somministrazione dell'estere etilico della creatina in soggetti sani, tanto che essa è un prodotto già presente sul mercato utilizzato dagli sportivi allo scopo di aumentare il livello atletico e la forza muscolare.

Uno studio clinico su soggetti sani tra i 18 ed i 24 anni ha inoltre evidenziato che l'utilizzo con estere etilico della creatina migliora il rendimento intellettuale, la memoria, il pensiero logico, i tempi di reazione e i processi cognitivi, soprattutto quelli di maggiore complessità. Lo studio non ha evidenziato alcun effetto collaterale nei soggetti trattati <sup>187</sup>.

Sono stati anche sintetizzati esteri della creatina con catene alifatiche più lunghe, per aumentarne la lipofilia, descritti in brevetti (tra cui US2003/0212130 e US 2005/6897334) in particolare l'estere dodecilico della creatina si è rivelato un profarmaco in grado di attraversare le membrane dei fibroblasti di pazienti affetti dal deficit del trasportatore e una volta nello spazio intracellulare viene idrolizzato dalle esterasi liberando creatina (EP1235/2002).

#### derivati amminoacidici della creatina

Sono stati preparati diversi derivati amminoacidici della creatina, legati ad essa tramite un legame ammidico, in particolare con amminoacidi esterificati <sup>188</sup>. Sono stati sintetizzati e studiati *in vivo* un derivato della glicina (Cr-Gly-OEt), un derivato della fenilalanina (Cr-Phe-NH<sub>2</sub>), un derivato della tirosina (Cr-Tyr-NH<sub>2</sub>) ed un derivato del GABA (Cr-GABA-OEt) <sup>189</sup> e tutti e quattro i composti hanno dimostrato di esercitare una attività neuroprotettrice, diminuendo l'area necrotica cerebrale soggetta

ad ischemia. Sono stati anche studiati i dosaggi biochimici in fettine di ippocampo incubate con Cr-Gly-OEt e creatina etilamina, rilevando che essi conducono ad un aumento dei livelli di fosfocreatina e creatina nel tessuto cerebrale anche in condizioni di blocco del trasportatore (effettuato mediante un'incubazione in un mezzo privo di ione cloruro)<sup>190</sup>. Un altro derivato ammidico ottenuto dal legame della funzione carbossilica della creatina con un'altra molecola è quella di un coniugato costituito da creatina e da un immino-zucchero (WO 2009/143630). Altre ammidi della creatina sono state sintetizzate e descritte in brevetti pur non essendo state immesse sul mercato; tali derivati sono ottenuti dal legame del gruppo guanidinico della creatina con un acido carbossilico a lunga catena che aumenta la lipofilia della molecola madre (ad es. WO 2008/101310, US2011/0269986, WO 2009/143630).

### ciclocreatina

La ciclocreatina (acido 2-immino-1-imidazolidinoacetico) è un derivato commerciale della creatina che è stato studiato in vivo su modelli animali (di topo) di deficit del trasportatore, in cui ha mostrato, dopo un trattamento di due mesi, un aumento del segnale di fosfocreatina e ciclofosfocreatina cerebrali<sup>191</sup>. Ha mostrato anche proprietà nel migliorare i sintomi comportamentali, ottenendo risultati migliori rispetto ai soggetti trattati con creatina. Sembra essere quindi in grado di attraversare le membrane in modo indipendente dal trasportatore della creatina.

### altri derivati della creatina

Sono stati anche sintetizzati derivati della creatina che non sono stati ottenuti dal legame del gruppo carbossilico della creatina con un'altra molecola, ma tramite altri tipi di modificazioni: una strategia è stata quella di aggiungere alla creatina gruppi funzionali a livello del gruppo guanidinico e una esterificazione a livello del gruppo carbossilico della creatina (un esempio è la creatina etil estere butirril derivato) per aumentarne la stabilità e la lipofilia e quindi la capacità di passaggio delle membrane cellulari in modo indipendente dal trasportatore. Una seconda strategia è stata quella di effettuare una salificazione della creatina con molecole idrofile tramite un legame ionico (creatina-ascorbato; creatina-gluconato, creatina-glucosio) che agiscono da "carrier" per la creatina.<sup>192</sup> Queste ultime molecole sono state testate in esperimenti di elettrofisiologia, manifestando un effetto neuroprotettivo anche in condizioni di blocco del trasportatore, facendo quindi ipotizzare il loro attraversamento delle membrane mediante un trasportatore diverso dall'SLC6A8, rispettivamente il trasportatore dell'acido ascorbico ed il trasportatore degli esosi<sup>192</sup>.

### **PARTE 3: IMPIEGO TERAPEUTICO DELLA FOSFOCREATINA E SUA PRODUZIONE**

#### **1.5 FOSFOCREATINA COME FARMACO**

Le soluzioni cardioplegiche agiscono con tre diversi obiettivi di cardioprotezione: impedire l'arresto cardiaco, l'ipertermia e preservare l'energia cardiaca. Proprio per questo ultimo scopo la fosfocreatina esogena viene prodotta con il nome di "Neoton" dalla casa farmaceutica Alfa Wasserman S.p.A. (Italia), ed assieme alla corvitina (quercetina idrosolubile) e al preductal (trimetazidin), fa parte del gruppo di farmaci metabolici utilizzati nella protezione del miocardio in aggiunta alle soluzioni cardioplegiche, allo scopo di ottenere un recupero più rapido dopo interventi di cardiocirurgia. In particolare il Neoton somministrato per via parenterale previene lo sviluppo di aritmie ventricolari (soprattutto la fibrillazione ventricolare) in situazioni di ischemia acuta del miocardio <sup>193</sup>. La fosfocreatina infatti esercita un duplice effetto che la rende un potenziale agente terapeutico cardioprotettivo: l'attività di conservazione dell'energia miocardica mediante il ripristino delle riserve di ATP e l'azione protettiva verso le membrane biologiche, legandosi ad esse ed esercitando un forte effetto stabilizzante contro stress meccanici o ossidativi <sup>194</sup>.

Infatti grazie alla sua natura ionica interagisce con le teste idrofiliche dei fosfolipidi della membrana, stabilizzando quest'ultima e diminuendone la fluidità. Il cambiamento nella consistenza del doppio strato fosfolipidico gli conferisce una maggior resistenza a stress meccanici ed ossidativi, prevenendo il danno causato dall'ischemia, l'attacco dei fattori litici e la perdita di eventuale metaboliti intracellulari (enzimi e nucleotidi) <sup>194</sup>. Gli effetti della fosfocreatina sembrano essere di potenziale interesse terapeutico per altre patologie cardiovascolari, tra cui in particolare l'insufficienza cardiaca, evento multifattoriale ma con una notevole componente legata al metabolismo energetico <sup>194</sup>.

#### **effetti della fosfocreatina a livello cardiaco**

Sempre più spesso viene associata l'insufficienza cardiaca alla privazione delle risorse energetiche del miocardio <sup>195</sup> e di conseguenza ad una minore conversione dell'energia chimica in energia meccanica necessaria per la contrazione delle miofibrille. Il cuore infatti ha un fabbisogno energetico estremamente elevato, consumando circa 6 kg di ATP ogni giorno, ed il suo metabolismo si può riassumere in tre principali componenti: la captazione dei substrati energetici (glucosio ed acidi grassi), la fosforilazione ossidativa mitocondriale che produce ATP ed infine il veicolamento ed il consumo delle riserve di ATP <sup>196</sup>. Quest'ultimo processo viene effettuato dal sistema Cr-PCr, essendo la PCr il sistema di trasporto dei fosfati ad alta energia dal mitocondrio ai siti della cellula che consumano ATP <sup>33,197</sup>. La compromissione del sistema Cr-PCr (dovuta a diminuzione dell'ATP miocardico, aumento dei livelli di ADP libero, minore attività della CK, down-regulation del trasportatore della Cr) conduce ad una diminuzione dei livelli di ATP, fosfocreatina e creatina ed a un aumento dei livelli di ADP circolante, effetto che porta all'inibizione di enzimi necessari per

l'attività della contrazione delle miofibrille. L'attività della CK diminuisce e si ha una diminuzione del flusso energetico all'interno della cellula; tutto questo porta a disfunzioni nella contrazione miocardica ed in particolare ad una diminuzione dell'effetto inotropo, caratteristico dell'insufficienza cardiaca, e ad una successiva ipertrofia miocardica<sup>196</sup>. Il rapporto tra fosfocreatina e ATP è molto ridotto nei pazienti che presentano questo quadro clinico e spesso può essere un criterio diagnostico utilizzato per la prognosi di mortalità<sup>199</sup>. In particolare, uno studio effettuato su pazienti con insufficienza cardiaca cronica, alcuni dei quali sottoposti ad interventi cardiocirurgici, ha rilevato che la somministrazione endovenosa di PCr riduce i parametri predittivi di mortalità, compreso il rischio di sviluppare aritmie, mentre aumenta l'effetto inotropo favorendo il recupero delle condizioni cardiache dopo interventi chirurgici<sup>200</sup>.

### ***effetti della fosfocreatina a livello del muscolo scheletrico***

La fosfocreatina somministrata per via intramuscolare o endovenosa porta ad un miglioramento della funzionalità del muscolo scheletrico e ad una maggiore velocità di recupero dopo un esercizio fisico intenso<sup>201</sup>. I suoi effetti sulla muscolatura scheletrica sono dovuti ad entrambe le attività, quella di aumento della concentrazione di ATP e quella di stabilizzazione delle membrane cellulari muscolari, proteggendole dagli effetti di sforzi estremi. L'aumento della concentrazione di PCr a livello muscolare è inoltre in grado di incrementare la sintesi proteica a livello degli organelli intracellulari; l'inibizione della sintesi della creatina infatti porta ad una diminuzione della sintesi proteica e lipidica e a una diminuzione dello sviluppo muscolare. La PCr ha quindi anche un effetto anabolizzante<sup>201</sup>. Somministrata ad atleti a dosaggi di 2 g/die ha mostrato un aumento della performances in esercizio aerobico ed anaerobico, un aumento della massa muscolare e un effetto protettivo sul muscolo. In pazienti affetti da patologie muscolari ha anche rilevato un potenziale effetto contro l'ipotonotrofia. Anche l'introduzione di Cr per via orale ha mostrato gli stessi effetti, anche se i dosaggi per via orale sono più elevati (dai 5 ai 20 g/die) e la Cr al contrario della PCr non presenta l'effetto protettivo sulle membrane plasmatiche<sup>201</sup>.

### ***metodi sintetici utilizzati nella produzione della fosfocreatina***

La fosfocreatina attualmente viene prodotta con tre diverse metodiche: sintesi enzimatica, estrazione biologica e sintesi chimica. I metodi esclusivamente enzimatici rendono complessa la purificazione del prodotto di interesse data la presenza dell'enzima. L'estrazione biologica viene effettuata dal tessuto muscolare animale ma spesso il contenuto estratto è in quantità limitata. La principale via per l'ottenimento della molecola rimane quindi la sintesi chimica; sono stati usati metodi differenti di sintesi, che utilizzavano come molecola di partenza la creatina o i sali di creatina. Il brevetto US3632603 utilizza la reazione tra creatinina e tricloruro di fosforo e successivamente una idrolisi basica che tuttavia porta all'ottenimento di diversi sali inorganici di cui non si conosce il

processo di purificazione. Un brevetto cinese (CN 102558227A) utilizza una reazione tra creatinina e ossicloruro di fosforo e successivamente l'utilizzo di un sale di acido carbossilico che però conduce di nuovo ad una serie di sottoprodotti e ad una bassa resa. Un altro brevetto (CN 101274943A) introduce la reazione tra l'estere della creatina o un sale ammonico quaternario della creatina con il dibenzilfosfito per ottenere il sale sodico della fosfocreatina ma con basse rese. Un altro brevetto cinese (CN 103172661A) parte dalla dicloro fosfocreatina per ottenere il sale sodico della fosfocreatina ma anche questo metodo conduce a rese molto basse. Un articolo descrive invece l'ottenimento della creatinina difenilfosfato partendo da creatinina e difenilcloruro <sup>202</sup>; l'apertura dell'anello della creatinina richiede comunque alte quantità di molibdeno come catalizzatore e quindi costi elevati. Il brevetto US 3036087 descrive la reazione tra dibenzilfosfito e metilisotiurea utilizzando una cianoammide come agente guanilante. Dal cianoammide derivato si ottiene poi il derivato della creatinina da cui si ottiene la fosfocreatina in condizioni basiche. La reazione ha comunque una bassa resa e l'intermedio creatinico è impuro e richiede diversi step di purificazione. Il brevetto EP 0150883 descrive un processo partendo da una dibenzilossifosforilcianoammide che reagisce con una ammina primaria o secondaria, fornendo un derivato guanidinico. Il brevetto comunque non fa menzione della resa ottenuta.

## CAPITOLO 2 : OBIETTIVI

### PARTE 1

Il primo obiettivo della presente tesi è stato quello di risolvere il problema dello scarso assorbimento della creatina a livello della BEE e delle membrane plasmatiche in condizioni di deficit del trasportatore o in altre condizioni patologiche in cui invece il trasportatore sia presente ma in cui vi sia la necessità di un passaggio più rapido ed efficace della creatina attraverso le membrane (caso dell'ictus ischemico). La creatina infatti attraversa scarsamente le membrane anche in presenza del trasportatore <sup>76</sup>. A tal fine è quindi stata messa a punto la sintesi e la caratterizzazione di alcuni profarmaci della creatina che possano riuscire ad attraversare la BEE e le membrane biologiche in un modo indipendente dalla presenza del trasportatore SLC6A8 e che una volta nello spazio intracellulare liberino la creatina come agente terapeutico. Tali composti sono stati progettati seguendo due diverse strategie.

- 1) La prima consiste nella modificazione dello scheletro della creatina in modo tale da renderlo più lipofilo e più stabile in mezzo fisiologico.
- 2) L'altra è quella di coniugare la creatina con molecole che utilizzino trasportatori alternativi all'SLC6A8.

Il primo approccio può essere seguito mediante l'aggiunta di gruppi funzionali apolari, che possano adiuvarne il passaggio della creatina attraverso le membrane fosfolipidiche ma che anche possano essere poi facilmente rimossi da parte degli enzimi presenti nella cellula dopo l'internalizzazione del profarmaco al fine di ottenere creatina libera.

Precedentemente erano già state attuate modificazioni a livello del gruppo carbossilico della creatina. In particolare sono state realizzati due composti quali l'estere etilico e l'estere benzilico della creatina; l'estere benzilico *in vitro* ha mostrato di riuscire ad attraversare le membrane neuronali in fettine di ippocampo fornendo risultati positivi nei test biochimici aumentando in pratica la concentrazione di creatina e fosfocreatina intracellulari <sup>110</sup>. L'estere etilico invece non ha mostrato alcuna capacità di riuscire a passare le membrane plasmatiche in condizioni di trasportatore non funzionante <sup>183</sup>. Entrambi i composti, tuttavia, si sono rivelati estremamente sensibili all'idrolisi del legame estereo in fluidi biologici, ciclizzando a creatinina e limitandone quindi l'uso e l'applicazione *in vivo* <sup>110,183</sup>. È emersa quindi la necessità di modificare la molecola della creatina in altro modo; un metodo fornito dalla farmacologia risulta essere l'aggiunta di gruppi acetilici alla molecola di partenza al fine di aumentarne la lipofilia e la stabilità in mezzo fisiologico; un esempio è la diacetil-morfina, o eroina, estremamente più lipofila della morfina stessa tanto da riuscire ad attraversare molto più facilmente e velocemente la BEE <sup>173</sup>. L'aggiunta di gruppi acetilici è stata realizzata in questo caso a livello di entrambi gli azoti del gruppo guanidinico della creatina, al fine di ottenere una molecola di creatina diacetilata. Tale modificazione renderebbe anche la molecola più stabile in mezzo fisiologico, impedendole la ciclizzazione a creatinina e prolungandone l'emivita <sup>183</sup>.

Durante la sintesi di tale molecola il reagente che introduce il gruppo carbossilico del derivato è un amminoacido esterificato con gruppo etile o terbutile, pertanto i prodotti risultano essere diacetilcreatina etilestere e terbutilestere. Tale molecola quindi avrebbe la funzione di profarmaco in grado di attraversare facilmente le membrane e una volta all'interno della cellula essere, grazie all'azione di esterasi e amidasi, privato dei gruppi funzionali apolari, liberando la creatina. Il medesimo rationale è stato in seguito applicato ad una molecola precursore della creatina, l'acido guanidinoacetico, che nella biosintesi epatica della creatina risulta essere il precursore dell'ultima tappa la metilazione da parte della S-adenosil-metionina. Si è pertanto realizzata la sintesi dell'acido guanidinacetico diacetilato su entrambi gli atomi di azoto del gruppo guanidinico ed esterificato sul gruppo carbossilico. Le esterificazioni effettuate sono state di due tipi, volte ad ottenere sia l'estere metilico sia quello etilico.

L'altra strategia per ottenere derivati della creatina in grado di attraversare le membrane plasmatiche e la BEE è quella di coniugare la creatina con molecole che utilizzino trasportatori alternativi all'SLC6A8, in modo tale che essi possano fungere da carriers per condurre la creatina all'interno dello spazio intracellulare e "in loco" liberare la creatina stessa. Strategia già sfruttata per i trasportatori degli aminoacidi<sup>189,190</sup> e dell'acido ascorbico<sup>203</sup>. In particolare a livello del SNC i trasportatori del glucosio sono estremamente numerosi e ad alta efficienza<sup>204</sup>, pertanto si è pensato di utilizzare alcuni carboidrati da coniugare alla creatina in modo tale da ottenere un derivato che sfruttasse i trasportatori del glucosio per portare creatina all'interno delle cellule nervose.

Si suppone che solo i trasportatori del glucosio sodio-indipendenti siano responsabili del passaggio del glucosio e dei suoi analoghi (quali l'acido gluconico) attraverso la BEE e si ritiene che tali trasportatori non siano estremamente selettivi<sup>205</sup>. La coniugazione di creatina ad una molecola di glucosio tramite un legame estereo si è rivelata estremamente labile data la facilità con cui si idrolizza l'estere; per ovviare a tale inconveniente si è quindi deciso di costituire un derivato della creatina dotato di un legame ammidico e quindi ritenuto più stabile all'idrolisi, coniugando la creatina con una molecola di glucosamina.

## **PARTE 2**

Il secondo obiettivo di questa tesi riguarda un nuovo metodo di sintesi della fosfocreatina. Tutti i metodi pubblicati finora utilizzano come agente guanilante un composto recante un gruppo fosfato protetto da gruppi benzilici o fenilici e portano ad un prodotto ottenuto in bassa resa e con molti sottoprodotti; la bassa resa probabilmente è dovuta ad una scarsa reattività dell'agente guanilante utilizzato, quando esso è costituito da un derivato della cianoammide. Per aumentare la reattività dell'agente guanilante utilizzato, nel laboratorio in cui è stato svolto questo lavoro di tesi si è deciso di utilizzare un agente guanilante recante un gruppo protettivo ed in particolare il gruppo tert-butossi carbonilico (t-Boc) che si è rivelato essere il più appropriato oltre ad aumentare notevolmente la solubilità della molecola nei solventi organici. Come agente guanilante è stato utilizzato la S-

metilisotiourea, cui è stato aggiunto un gruppo protettore t-Boc su uno dei due atomi di azoto guanidinici; in seguito è stato fosforilato l'agente guanilante con un agente fosforilante recante due gruppi benzilici come gruppi protettori ed infine la molecola è stata coniugata con l'ammina secondaria sarcosina etilestere, per ottenere l'estere etilico della fosfocreatina. Tali metodiche sintetiche sono modificazioni mirate di metodi utilizzati già nel laboratorio in cui è stato svolto questo lavoro di tesi per sintetizzare derivati della creatina. L'idrolisi dell'estere ha permesso l'ottenimento di un prodotto in buona resa.

## **CAPITOLO 3: PARTE SPERIMENTALE**

### ***PARTE 1: DERIVATI DELLA CREATINA***

#### ***3.1 SINTESI ORGANICA E CARATTERIZZAZIONE DI DERIVATI DELLA CREATINA***

Il lavoro di sintesi e caratterizzazione di derivati della creatina si è svolto in due direzioni:

- la sintesi di derivati che potessero utilizzare il trasportatore degli esosi invece dell'SLC6A8.
- la sintesi di derivati che fossero molto più lipofili della creatina tal quale. I derivati della diacetil-creatina e del diacetil-guanidinoacetato sono stati quindi sintetizzati a tale scopo, con l'inserimento di due gruppi acetilici a livello del gruppo guanidinico e con l'esterificazione a livello del gruppo carbossilico.

Entrambi i tipi di derivati costituiscono profarmaci che consentirebbero alla creatina di attraversare più facilmente la BEE e le membrane plasmatiche sia in assenza che in presenza del suo trasportatore, e che potrebbero portare alla liberazione di creatina all'interno delle cellule in seguito all'attività di enzimi intracellulari quali esterasi ed amidasi e renderla a quel punto in grado di esercitare la propria attività biologica. Tali molecole porterebbero quindi ad un maggiore e più rapido accumulo di creatina rispetto a condizioni normali, utile in diverse patologie neurologiche.

#### ***caratteristiche chimiche della creatina***

La creatina è un amminoacido non standard che non entra a far parte della struttura delle proteine; ad un pH compreso tra 3 e 12 essa si trova principalmente in forma di zwitterione<sup>206</sup> e pertanto in tali condizioni presenta una reattività estremamente bassa, poiché bilanciando le cariche positiva e negativa presenti sui suoi due gruppi funzionali raggiunge una certa stabilità. Si formano infatti legami idrogeno tra il gruppo carbossilico e uno dei due gruppi amminici, determinando un equilibrio che rende difficile la formazione di legami con altri composti, mentre più facilmente essa può degradarsi a creatinina per disidratazione. La bassa reattività della molecola è anche dovuta alla sua quasi totale insolubilità nei solventi organici, mentre in acqua è scarsamente solubile e la sua solubilità nelle soluzioni acquose aumenta con l'aumento della temperatura e l'abbassamento del

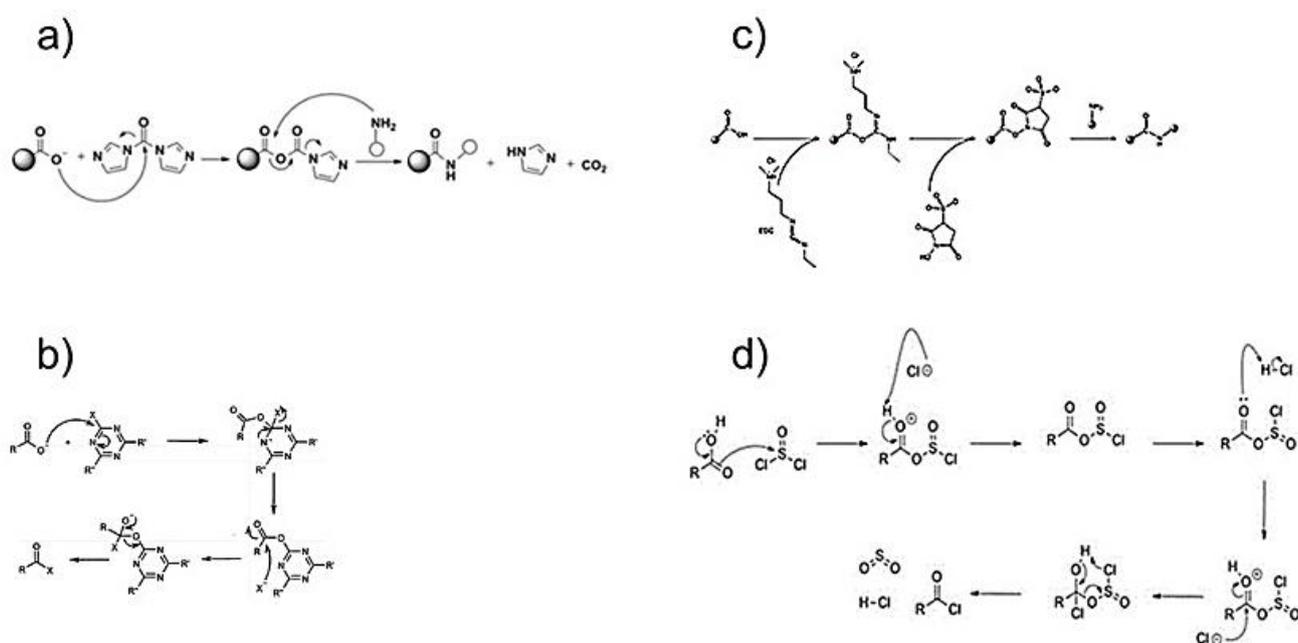
pH (che determina la protonazione del gruppo guanidinico) <sup>207</sup>. Per quanto riguarda la stabilità della creatina, essa è stabile in forma di polvere mentre in soluzione acquosa essa tende a trasformarsi in creatinina con una velocità proporzionale all'abbassamento del pH e all'aumento della temperatura <sup>208</sup>. Il pH acido infatti, favorendo la protonazione di un gruppo amminico, porta a ciclizzazione della molecola e ciò si verifica anche a livello del tratto gastrointestinale dopo ingestione della creatina monoidrato, che quindi in gran parte va incontro a degradazione. Il pH basico, al contrario, favorendo la deprotonazione del gruppo carbossilico, aumenta la stabilità della creatina in soluzione acquosa riducendone la ciclizzazione a creatinina. Gli esteri della creatina sono anch'essi poco stabili in ambiente acquoso, in quanto suscettibili di idrolisi; in particolare possono subire idrolisi a livello del tratto gastrointestinale ma sono anche soggetti all'azione delle esterasi plasmatiche <sup>209,210</sup>. Gli esteri a catena corta (catene fino a 4 atomi di carbonio) sono solubili in soluzioni acquose. Gli esteri con catene più lunghe sono solubili in alcuni solventi organici quali metanolo e cloroformio ma necessitano di pH acido. Inoltre un rischio del metanolo è quello della degradazione della molecola da transesterificazione <sup>211</sup>. Una possibile alternativa è stata proposta da Burov e collaboratori sfruttando la diretta acilazione del composto con un sale della creatina <sup>189</sup>. In tal modo la conversione della creatina in forma di sale permette la sua solubilizzazione. Infatti, l'aggiunta di un controione particolarmente lipofilo rappresenta una valida strategia per ottenere la dissoluzione della creatina, e di altri vari guanidino o amidino composti, in solventi organici.

### ***sintesi della (Boc)<sub>2</sub>-creatina***

La scarsa reattività e solubilità nei solventi organici della creatina ha reso necessario l'utilizzo di una molecola di creatina modificata per sintetizzare derivati della creatina stessa ed in particolare quelli in cui la creatina lega un'altra molecola a livello del suo gruppo carbossilico. In particolare, nel laboratorio di sintesi del Centro di Eccellenza per la Ricerca Biomedica (CEBR), si era già progettata una forma di creatina recante su entrambi gli atomi di azoto del gruppo guanidinico una protezione t-Boc, denominata appunto (Boc)<sub>2</sub>creatina, la quale è dotata di una buona reattività sul gruppo carbossilico e di una elevata solubilità nei solventi organici. Il metodo di sintesi sfrutta la reattività della sarcosina etilestere, una ammina secondaria con uno scheletro carbonioso simile alla creatina ma privo del gruppo funzionale guanidinico; la sarcosina etilestere reagisce con l'agente guanilante protetto, la N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-di(ter-butossicarbonil)-S-metilisotiourea, ottenendo il prodotto (Boc)<sub>2</sub>-creatina etilestere in alta resa e facilmente purificabile, che poi viene sottoposto ad idrolisi basica al fine di ottenere la (Boc)<sub>2</sub>-creatina come sale sodico. La resa della (Boc)<sub>2</sub>-creatina supera l'80% e la molecola si ottiene con un elevato grado di purezza. Il composto ottenuto, oltre ad essere solubile nei solventi organici risolvendo quindi gli inconvenienti di insolubilità della creatina, si è rivelata anche molto stabile e quindi utilizzabile nelle varie condizioni sperimentali.

### **sintesi e caratterizzazione di derivati glucidici ottenuti a partire dalla (Boc)<sub>2</sub>creatina**

Per ottenere i coniugati glucidici della creatina è stato necessario far avvenire la reazione tra il gruppo carbossilico della (Boc)<sub>2</sub>creatina e uno degli ossidrili del glucosio, a formare un legame estere. Tale reazione richiede però l'attivazione del gruppo carbossilico in modo tale da renderlo più elettrofilo e quindi più reattivo nella formazione dell'estere con gli ossidrili del glucosio, solo debolmente nucleofili. L'attivazione del gruppo carbossilico della (Boc)<sub>2</sub>creatina è stata tentata con diversi agenti attivanti (fig.20), tra cui cloruro di tionile, carbonildiimidazolo (CDI), 1-[di(dimetilamino)metilene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin 3-ossido esafluorofosfato (HATU) ed etil-N,N'-dimetilaminopropilcarbodiimide (EDC). Quest'ultimo si è rivelato essere il più funzionale per l'attivazione del carbossile e la successiva esterificazione.



**Fig.20 meccanismi d'azione degli attivanti dei gruppi carbossilici** a) meccanismo d'azione del carbonildiimidazolo (CDI) b) meccanismo d'azione dell'HATU c) meccanismo d'azione dell'EDC d) meccanismo d'azione dell'SOCl<sub>2</sub>

Una volta ottenuto il prodotto (Boc)<sub>2</sub>creatina-glucosio si è proceduto con la rimozione dei gruppi protettori t-Boc in ambiente acido. Si è poi ritenuto utile focalizzare l'attenzione su un derivato glucidico che fosse in grado di dare luogo ad un legame più stabile di quello estereo, in particolare il legame ammidico. Si è perciò seguita la stessa procedura utilizzando però la glucosammina al

posto del glucosio, in modo tale da ottenere la reazione tra il gruppo carbossilico della (Boc)<sub>2</sub>-creatina e il gruppo amminico della glucosamina, attivando il primo con EDC. A tal proposito si è ritenuto utile realizzare la sintesi con una molecola di glucosamina che fosse protetta sugli ossidrili da gruppi acetilici in modo tale che soltanto il gruppo amminico fosse disponibile per il legame; in questo modo si sarebbe ottenuto un profarmaco della creatina recante un gruppo funzionale amidico e quattro gruppi esterei, che potessero essere poi substrati delle esterasi ed amidasi presenti all'interno delle cellule una volta internalizzata la molecola. Si è perciò eseguita la prima sintesi con la 1,3,4,6 tetra-O-acetil-amino-2-deossi-β-D-glucopiranoside, utilizzando come attivanti l'HATU e successivamente l'EDC, ottenendo in entrambi i casi il prodotto ma in bassa resa; probabilmente questo risultato era dovuto al fatto che la molecola di glucosamina fosse molto ingombrata stericamente e fosse quindi difficile rendere il gruppo amminico esposto alla reazione con il gruppo carbossilico attivato della (Boc)<sub>2</sub>-creatina. E' stata in seguito effettuata la coniugazione di una molecola di (Boc)<sub>2</sub>-creatina con una molecola di glucosamina che non recasse protezioni né sui gruppi alcolici né sul gruppo amminico. Come per il derivato precedente è stata svolta la sintesi provando ad attivare il gruppo carbossilico della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con diversi attivanti, tra cui POCl<sub>3</sub> ed EDC; quest'ultimo ha permesso di ottenere il prodotto (Boc)<sub>2</sub>-creatina -glucosamina in alta resa. Come in precedenza, si è poi proseguito con la rimozione dei gruppi t-Boc e l'ottenimento del prodotto finale creatina-glucosamina.

### ***sintesi e caratterizzazione della diacetilcreatina etilestere e terbutilestere***

I derivati lipofili della creatina che sono stati sintetizzati e caratterizzati in questo lavoro di tesi sono profarmaci recanti due gruppi acetilici sui entrambi gli atomi di azoto guanidinici ed una esterificazione a livello del gruppo carbossilico. La sintesi di tali composti si effettua in due fasi: inizialmente si acetila l'agente guanilante S-metiltiourea tramite anidride acetica; la molecola acetilata si coniuga poi con la N-metil glicina (sarcosina) esterificata sul gruppo carbossilico con un etile o un terbutile. I prodotti si ottengono in resa elevata e con una buona stabilità nei mezzi acquosi, permettendo quindi di effettuare i test elettrofisiologici e biochimici.

### ***derivati dall'acido guanidinoacetico***

L'acido guanidinoacetico rappresenta nella biosintesi epatica il precursore non metilato della creatina, per cui può essere considerato un precursore naturale della creatina stessa. Poiché anche l'acido guanidinoacetico è soggetto al trasporto mediante SLC6A8 per entrare nelle cellule dove viene convertito a creatina, è sorta l'importanza di ottenere derivati della molecola in grado di poter attraversare le membrane delle cellule anche in modo indipendente dal trasportatore, al fine di poter essere considerati una potenziale strategia nel trattamento del deficit dell'SLC6A8 e di altre patologie neurologiche. La sua trasformazione in un derivato più lipofilo, e quindi in grado di passare la BEE

e le membrane plasmatiche anche in assenza dell'SLC6A8, potrebbe rappresentare un modo alternativo per sopperire alla carenza di creatina. Infatti una volta all'interno delle cellule potrebbe essere rilasciato come tale e convertito in creatina tramite l'S-adenosil-metionina (SAM) completando l'ultima fase della biosintesi della creatina che avviene a livello delle cellule epatiche e nervose.

### Sintesi e caratterizzazione dei derivati dell'acido guanidinoacetico

La sintesi dei derivati dell'acido guanidinoacetico segue una procedura simile a quella descritta per la diacetilcreatina etilestere, trattandosi infatti dei suoi derivati demetilati a livello del gruppo amminico secondario inserito nella catena alchilica. I derivati sintetizzati sono stati gli esteri etilico e metilico dell'acido guanidinoacetico diacetilato. La sintesi di tali derivati viene effettuata in due fasi: dapprima si effettua l'acetilazione dei due gruppi amminici dell'agente guanilante S-metilisotiourea tramite anidride acetica; in seguito si coniuga il prodotto acetilato con la glicina metilestere o etilestere, ad ottenere rispettivamente l'estere metilico o l'estere etilico del prodotto diacetilato. Su entrambi i due derivati sono stati effettuati studi di stabilità in fluidi fisiologici.

Proseguendo nella direzione di realizzare derivati dell'acido guanidinoacetico dotati di un più elevato grado di lipofilia in modo tale da attraversare più agevolmente le membrane e la BEE è stata inoltre messa a punto la sintesi dell'estere etilico e dell'estere benzilico dell'acido guanidinoacetico, ottenuti per esterificazione diretta dell'acido guanidinoacetico rispettivamente con alcol etilico e con alcol benzilico.

### **3.2 STUDIO DEGLI EFFETTI NEUROBIOLOGICI DEI DERIVATI DELLA CREATINA**

#### **stabilità**

I derivati della creatina, una volta sintetizzati, vengono valutati in base alla loro stabilità, in mezzo acquoso, criterio indispensabile per garantirne la distribuzione all'interno dei fluidi dell'organismo. I test di stabilità sono stati effettuati monitorando la concentrazione della molecola posta in acqua ed in ACSF (fluido cerebrospinale artificiale §) a temperatura ambiente a diversi intervalli di tempo mediante HPLC-MS. Sono state valutate le stabilità dei derivati creatina-glucosio, creatina-glucosammina, diacetil creatina etilestere, diacetil guanidinoacetato metilestere ed etilestere.

I derivati creatina-glucosio e creatina-glucosammina si sono rivelati estremamente instabili in mezzo acquoso a causa dell'idrolisi del legame estereo ed amidico.

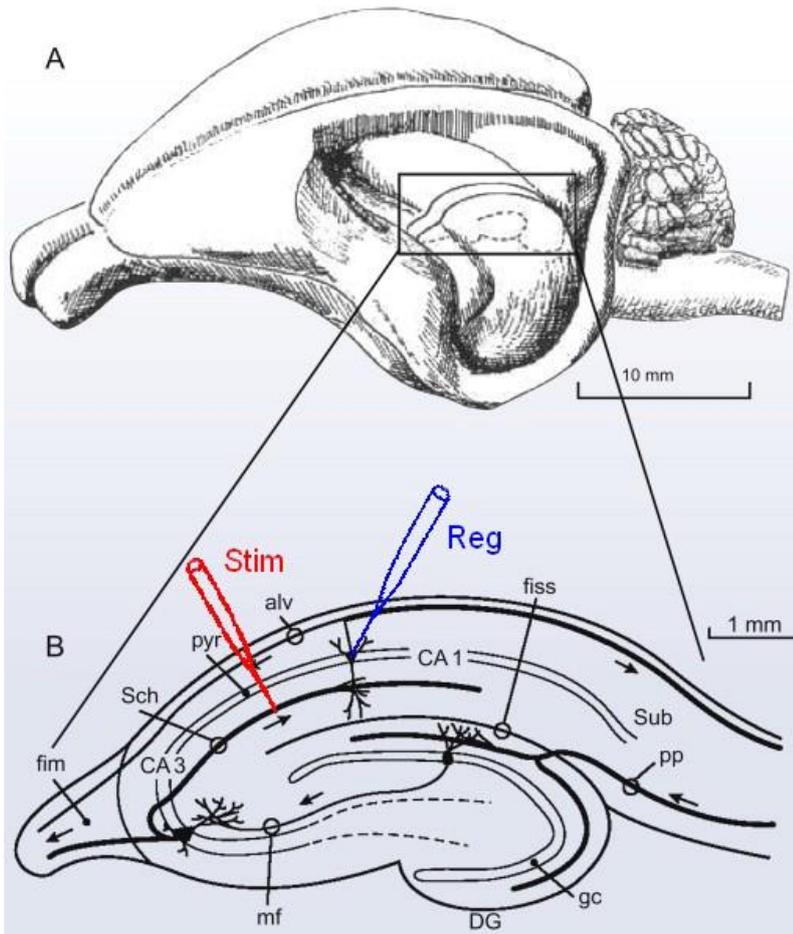
Gli altri derivati hanno mostrato invece una maggiore stabilità e quindi è stato possibile utilizzarli per esperimenti atti a valutare i loro effetti biologici.

## **modello sperimentale**

Il modello sperimentale utilizzato per gli esperimenti di biochimica e di elettrofisiologia consiste di fettine sottili di ippocampo di topo, le quali mantengono intatte le connessioni sinaptiche dell'ippocampo stesso. Le procedure di preparazione delle fettine sono descritte in letteratura <sup>183</sup>. Per la preparazione delle fettine sono richieste basse temperature e una procedura in cui viene isolato l'ippocampo ed ottenute le fettine, mediante microtomo, dello spessore di circa 400 µm per ridurre al minimo l'influenza di un'eventuale area anossica. Durante l'incubazione di tre ore delle fettine si verifica un rimodellamento delle sinapsi danneggiate tra i neuroni restanti.

## **valutazione dell'effetto neuroprotettivo tramite esperimenti di elettrofisiologia**

Gli effetti neuroprotettivi si valutano sul modello sperimentale di fettine di ippocampo incubate in mezzo ACSF in presenza della molecola in esame ed il suo relativo controllo. Le procedure utilizzate per tali esperimenti di elettrofisiologia sono descritte in letteratura <sup>77,78,212</sup>. Le fettine trattate sia con la molecola sia con il relativo controllo vengono stimulate elettricamente in modo tale da produrre un potenziale d'azione. Create le condizioni di anossia sostituendo l'ossigeno con l'azoto, si valuta il prolungamento del segnale elettrico attraverso l'attività neuroprotettrice delle molecole testate, mentre la presenza di eventuali molecole neurotossiche porta ad anticipare la scomparsa del segnale. Le fettine non trattate (controlli) contrastano l'anossia utilizzando il sistema creatina/fosfocreatina per rigenerare ATP, generando un segnale elettrico. Normalmente le fettine incubate con creatina mostrano un prolungamento del segnale elettrico dopo induzione di anossia, rivelando quindi un effetto neuroprotettivo della creatina stessa nei confronti del danno anossico. L'inibitore del trasportatore SLC6A8, ossia l'acido guanidinpropionico (GPA), in incubazione con le fettine determina invece una anticipazione della scomparsa del segnale elettrico, rivelando quindi un effetto peggiorativo del danno causato da anossia sulle fettine. Tale fenomeno viene utilizzato per simulare le condizioni di deficit di SLC6A8 e quindi verificare se la molecola testata sia effettivamente in grado o meno di attraversare le membrane biologiche. Sulle fettine si posizionano due microelettrodi di tungsteno: l'uno con funzione di stimolatore, a livello delle collaterali di Schaffer, l'altro, con funzione di registrazione, nello strato dei corpi cellulari di CA1. (fig.21)



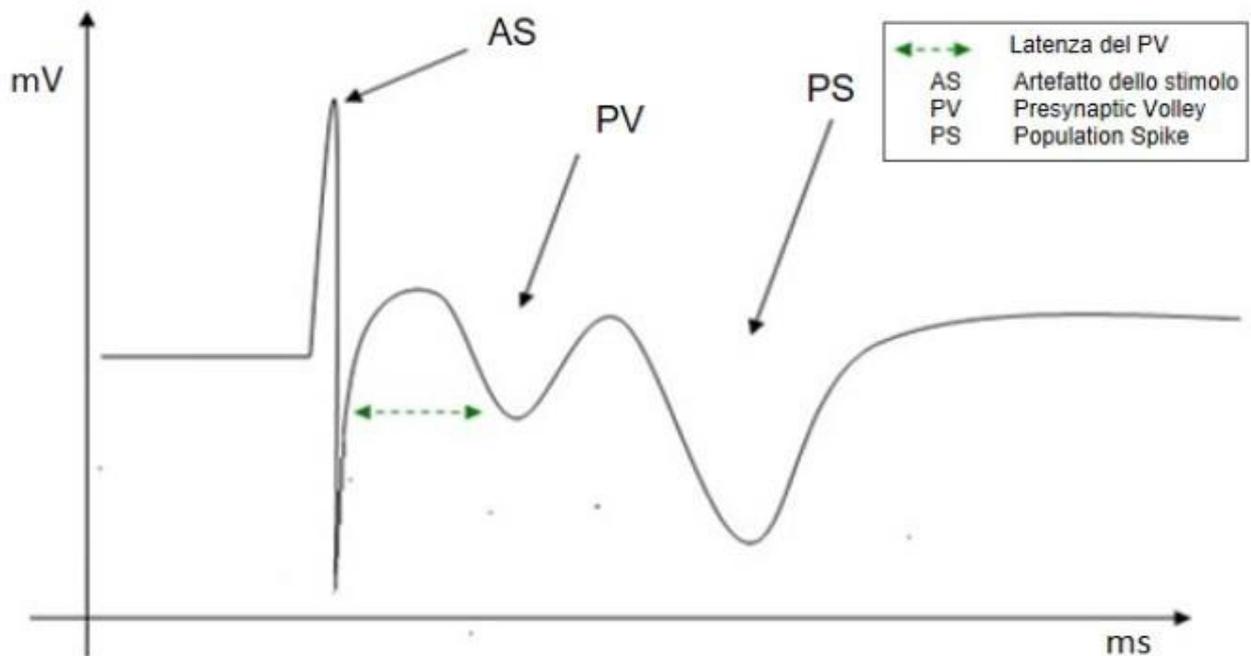
**Fig 21: rappresentazione della posizione anatomica dell'ippocampo a livello cerebrale e la sua struttura.**

**Viene inoltre illustrato il posizionamento degli elettrodi sulla fettina di ippocampo:** l'elettrodo stimolante (rosso) viene inserito fra le collaterali di Schaffer mentre il registrante (blu) sulle cellule piramidali della regione CA1. (Seguendo la direzione delle frecce: (pp) fascio perforante, (gc) cellule granulari, (DC) giro dentato, (mf) fibre muschiate, (fim) fimbria, (Sch) collaterale di Schaffer, (pyr) cellule piramidali della regione CA3, (alv) alveo, (fiss) fessura ippocampale, (Sub) subiculum).

Con questa disposizione si registra, stimolando le collaterali di Schaffer, un potenziale d'azione composto extracellulare. Esso è costituito da tre onde consecutive che rappresentano distintamente - Artefatto dello stimolo "Presynaptic Volley" (P.V.): questo segnale, rappresentato come un'onda più piccola, è visibile subito dopo l'artefatto dello stimolo e rappresenta l'eccitazione degli assoni che compongono la collaterale di Schaffer. Il termine fa riferimento alla sua natura pre-sinaptica, puramente assonale. Per poter determinare la velocità di conduzione nervosa viene utilizzata la misurazione della latenza, che rappresenta il tempo che intercorre tra l'artefatto dello stimolo e la comparsa del P.V.;

- "Population Spike" (P.S.): rappresenta il potenziale d'azione composto extracellulare. Esso indica la risposta eccitatoria dei corpi dei neuroni facenti parte dell'area CA1 che vengono eccitati tramite connessione sinaptica dagli assoni della collaterale di Schaffer. Questo segnale è temporalmente

successivo al potenziale d'azione pre-sinaptico (P.V.). Tale ritardo è da attribuire alla risposta sinaptica ("ritardo sinaptico") (fig.22).



**Figura 22:** forma d'onda registrata con la disposizione degli elettrodi descritta nel testo, indice di avvenuta trasmissione sinaptica. AS (Artefatto dello Stimolo), PV (Presynaptic Volley), PS (Population Spike).

Un prolungamento del segnale elettrico PS dopo incubazione con la molecola in esame, in condizioni di blocco del trasportatore, significa che la molecola stessa è in grado di esercitare un effetto neuroprotettivo ed è inoltre in grado di attraversare le membrane senza utilizzare il trasportatore stesso. Le fettine di ippocampo sono considerati vitali se è presente un PS dopo stimolazione delle collaterali di Schaffer. Tutti i dati ottenuti sono poi archiviati digitalmente.

### **determinazione degli effetti biochimici**

Per valutare l'azione delle varie molecole testate si è pensato di determinare il contenuto di creatina e fosfocreatina presente all'interno delle fettine di ippocampo di topo precedentemente incubate in mezzo ACSF (controllo), ACSF addizionato a creatina (come confronto) e ACSF addizionato alla molecola di cui si vuole studiare l'effetto. L'incubazione con il solo ACSF consente di stabilire il contenuto basale di creatina presente all'interno delle fettine; l'incubazione con ACSF addizionato a creatina costituisce il confronto per valutare se la molecola studiata ha una maggiore capacità di incrementare i livelli di creatina e fosfocreatina cellulari rispetto alla creatina stessa. Le condizioni di simulazione del blocco del trasportatore SLC6A8 sono state realizzate mediante l'utilizzo del mezzo di incubazione ACSF privo di Cl<sup>-</sup>, essendo tale trasportatore funzionante mediante un simporto Na<sup>+</sup>

e Cl<sup>-</sup> in rapporto 2 a 1 . Tale esperimenti sono in grado di stabilire se la molecola testata attraversa le membrane cellulari in modo indipendente o no dalla presenza del trasportatore. Le analisi sono state condotte mediante analisi HPLC calcolando l'area sottesa alla curva del contenuto di creatina e fosfocreatina prodotte nel campione.

## **PARTE 2: NUOVA PROCEDURA SINTETICA PER LA FOSFOCREATINA**

I metodi utilizzati attualmente per la sintesi della fosfocreatina impiegano come agente guanilante un composto contenente un fosfato protetto da gruppi benzilici o fenilici. Quando però l'agente guanilante è costituito da un derivato cianoammidico dotato di scarsa reattività osserva normalmente un'abbassamento della resa generale della reazione.

### **3.3 SINTESI ORGANICA E CARATTERIZZAZIONE DELLA FOSFOCREATINA**

Per superare quindi i problemi dei metodi precedentemente citati (§ pg 36) , come agente guanilante è stato utilizzato un composto protetto temporaneamente da un adatto gruppo protettore, in particolare un gruppo protettore t-Boc su uno degli atomi di azoto guanidinici, in grado di aumentarne la reattività e la solubilità nei solventi organici. Il procedimento di reazione utilizzato si articola in cinque fasi :

1. Il composto guanilante scelto, la S-metilisotiourea, viene fatto reagire con il Di-terbutildicarbonato, dalla cui reazione si ottengono due composti : la (Boc)<sub>2</sub>metilisotiourea e la Boc-metilisotiourea. I due prodotti vengono separati e il composto guanilante monoprotetto viene utilizzato per la fase di reazione successiva
2. la fosforilazione del secondo atomo di azoto guanidinico con un agente fosforilante protetto con due gruppi benzilici, il dibenzilfosfito (reazione di Aher-ton-Todd, fig.23) Tale reazione permette di ottenere un nuovo agente guanilante contenente sia il gruppo terbutossicarbonilico sia il gruppo fosfato protetto.
3. Tale composto viene coniugato con la sarcosina etilestere, ad ottenere una molecola di fosfocreatina etilestere protetta su entrambi gli atomi di azoto guanidinici.
4. Le protezioni vengono poi rimosse con idrolisi acida mediante acido trifluoroacetico a dare fosfocreatina etilestere
5. Tale estere viene poi idrolizzato a fosfocreatina utilizzando un metodo enzimatico che coinvolge una esterasi.

È stata anche realizzata la sintesi dell'estere terbutilico della fosfocreatina, utilizzando come ammina secondaria nella fase di coniugazione la sarcosina terbutilestere. Tale derivato, una volta rimossi i gruppi protettori , ha dato luogo ad una vasta serie di sottoprodotti con diversi pesi molecolari non riconducibili al prodotto desiderato. La molecola fosfocreatina è quindi stata ottenuta in buona resa soltanto mediante la formazione del derivato estere etilico e caratterizzata mediante HPLC analitico

e spettrometria di massa ESI in ogni suo passaggio di reazione. Le metodiche di sintesi che sono state tentate prima di adottare il metodo definitivo descritto sopra sono state:

-l'Inversione delle fasi di reazione 1 e 2 : la fosforilazione di uno dei due atomi di azoto guanidinici e la successiva protezione dell'altro atomo di azoto con il gruppo t- Boc

-l'utilizzo di un agente guanilante alternativo alla S-metilisotiourea, già protetto con un gruppo terbutilossicarbonilico su uno degli atomi di azoto guanidinici (N-Boc-pirazolo-carbodiimide) permettendo quindi di eliminare la prima fase della reazione, cioè la fase di reazione dell'agente guanilante con il diterbutildicarbonato.

-l'inversione delle fasi di reazione 2 e 3 (fosforilazione e coniugazione) utilizzando come agente guanilante l'N-Boc-pirazolo-carbodiimide e attuando quindi prima la coniugazione con la sarcosina etilestere e successivamente la fosforilazione dell'atomo di azoto libero.

-l'utilizzo di un agente guanilante alternativo alla S-metiltiourea (pirazolo carbodiimide) attuando prima la fosforilazione su uno dei due atomi di azoto guanidinici e successivamente la reazione con il di-terbutildicarbonato per proteggere il secondo atomo di azoto

-l'utilizzo di solventi alternativi al diclorometano (terbutanolo, diossano) nella prima fase di reazione.

Tali prove però non si sono mostrate efficaci per l'ottenimento del prodotto desiderato.

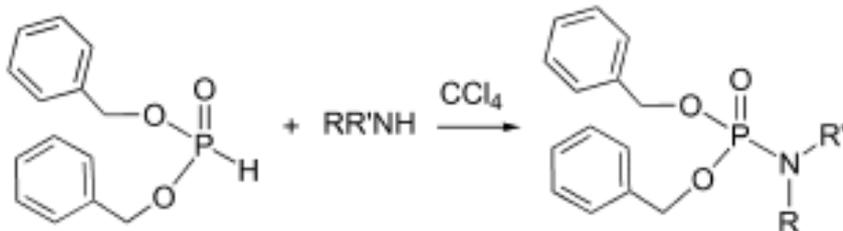


Fig.23 reazione di Aherton-Todd

## **CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI**

### ***PARTE 1: DERIVATI DELLA CREATINA***

#### ***4.1 MATERIALI IMPIEGATI***

Per le sintesi chimiche tutti i prodotti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich ed utilizzati senza ulteriore purificazione. I solventi utilizzati erano tutti HPLC grade. Per gli esperimenti di biochimica ed elettrofisiologia tutti i prodotti chimici sono stati acquistati da Sigma-Aldrich ed utilizzati senza ulteriore purificazione. Gli animali utilizzati sono stati topi maschi ICR (CD-1) di 4 settimane d'età, provenienti da allevamenti Envigo.

#### ***4.2 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA PER ANALISI E PURIFICAZIONE***

##### ***HPLC analitico***

Per monitorare l'andamento di tutte le singole fasi delle reazioni, caratterizzare i prodotti di reazione e valutarne la purezza è stato utilizzato un sistema HPLC analitico Agilent costituito da una pompa binaria ad alta pressione, iniettore manuale, comparto colonna termostato e rivelatore DAD; la colonna impiegata è stata una Phenomenex Luna C18 250 x 4.60 mm. Le lunghezze d'onda UV utilizzate sono state 254 nm e 220 nm. Le analisi sono state condotte con eluizione a gradiente con flusso a 1ml/min, con due tipi di fase mobile: solvente A costituito da acqua con l'aggiunta dello 0.1% di acido formico e solvente B costituito da acetonitrile anch'esso addizionato con 0.1% di acido formico. I singoli metodi di eluizione a gradiente variavano per ciascuna molecola sintetizzata. Ogni campione è stato disciolto in acqua deionizzata e acetonitrile 1:1 per ottenere una soluzione alla concentrazione di 0.1 mg/ml.

##### ***HPLC preparativo***

Per ottenere un livello di purezza delle molecole ottenute che fosse accettabile per i test biologici e qualora le molecole sintetizzate non potessero essere purificate mediante cristallizzazione con solventi, sono state effettuate purificazioni mediante HPLC preparativo. Il sistema utilizzato era costituito da un sistema HPLC Agilent con pompa binaria ad alta pressione, iniettore manuale, comparto colonna termostato e rivelatore DAD. La colonna utilizzata è stata una Phenomenex C18 Luna 21.2 x 250 mm. Le lunghezze d'onda impiegate sono state 254 nm e 220 nm. Le purificazioni sono state condotte con eluizione a gradiente con flusso pari a 15 ml/min, con due tipi di fase mobile: solvente A costituito da acqua con l'aggiunta dello 0.1% di acido formico e solvente B costituito da acetonitrile anch'esso addizionato con 0.1% di acido formico. I singoli metodi di eluizione a gradiente variavano per ciascuna molecola purificata. Ogni campione è stato iniettato dopo essere stato solubilizzato in una miscela di acqua deionizzata ed acetonitrile 1:1, ad ottenere una soluzione alla concentrazione di 20 mg/ml.

### ***spettrometria di massa***

Per caratterizzare le molecole sintetizzate è stato utilizzato in aggiunta all'HPLC analitico uno spettrometro di massa con sorgente electrospray e analizzatore a trappola ionica (Agilent 1100 serie LC/MSD ion trap XCT instrument della Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Gli spettri sono stati acquisiti sia in modalità Full Scan (ESI-MS) sia in tandem (ESI/MS<sup>2</sup>). Sono state effettuate analisi sia delle miscele di reazione grezze sia dei singoli picchi raccolti dal sistema HPLC analitico per visualizzare i pesi molecolari delle singole molecole e determinare le masse di eventuali sottoprodotti. Le analisi sono state effettuate in infusione diretta (DIA) a 5 µl/min utilizzando la pompa di infusione NE1000 (KF Technology, Roma, Italia). Ogni campione è stato diluito in una soluzione di acqua deionizzata : acetonitrile 50:50 contenente 0.1% di acido formico per ottenere una concentrazione finale di 0.01 mg/ml.

### ***HPLC-MS***

L'analisi per poter valutare la stabilità dei derivati di creatina compresa la (Boc)<sub>2</sub>creatina sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC Agilent 1100 accoppiato ad uno spettrometro di massa MSD Ion Trap XCT, dotato di una sorgente elettrospray (HPLC-ESI-MS ).

### ***cromatografia su strato sottile (TLC)***

La cromatografia su strato sottile (Thin-layer chromatography, TLC) è stato il metodo di analisi utilizzato per monitorare alcune reazioni chimiche durante il loro svolgimento, in particolare l'esterificazione diretta di molecole amminoacidiche quali la glicina e l'acido guanidinoacetico. La fase stazionaria utilizzata era costituita da lastre di alluminio ricoperte da un sottile strato di gel di silice. La rivelazione è stata effettuata con un reattivo cromogenico in grado di evidenziare le molecole di interesse. Come fase eluente è stata utilizzata una miscela di solventi così costituita: MeOH:CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>COOH in proporzione 8:1,75:0,25. Lavorando su molecole contenenti gruppi amminici il reattivo cromogenico usato è stata una soluzione di ninidrina ed etanolo, 0,4 g ogni 100 ml. Le macchie si coloravano diventando così visibili nel momento in cui le lastre venivano poste ad una temperatura di 100°C.

### ***NMR***

È stato utilizzato come spettrometro di risonanza magnetica nucleare (NMR) un Varian Gemini 200 MHz. Gli spettri dei protoni sono stati acquisiti a 200 MHz mentre gli spettri del carbonio sono stati acquisiti a 50 MHz, a temperatura ambiente. I chemical shifts sono riportati in δ (ppm) riferiti al TMS come standard interno. Le costanti di coupling (J) sono riportate in Hertz (Hz).

### 4.3 METODI DI SINTESI

#### **sintesi chimica della (Boc)<sub>2</sub>-creatina**

Ad una sospensione di N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-Di-(terbutossicarbonil)-S-metilisotiourea (917 mg; 0,9 equivalenti; 3,78 mmol), sarcosina etilestere (645 mg; 1,2 equivalenti; 4,2 mmol) e trietilammina (1,5 ml; 3 equivalenti; 10,5 mmol) in 4 ml di dimetilformammide anidra è stato aggiunto HgCl<sub>2</sub> (1,046 g; 1,1 equivalenti; 3,85 mmol). La sospensione è stata mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per circa 10 ore monitorando l'andamento della reazione mediante HPLC analitico. Successivamente la miscela di reazione grezza è stata trattata con dietiletere ottenendo la formazione di un precipitato bianco sottoposto a filtrazione mediante vuoto. Il filtrato è stato lavato con acqua deionizzata tre volte e successivamente con una soluzione di NaCl 0,1 M. La fase organica è stata essiccata mediante evaporatore rotante ed in seguito liofilizzata, ad ottenere il composto (Boc)<sub>2</sub>-creatina etilestere, ossia l'acido N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-Di (terbutossicarbonil)-N-metilguanidino-N-acetico etilestere. (1,1 g; 84%). ESI-MS: m/z 360 [M+H]<sup>+</sup>. Il composto è stato caratterizzato mediante spettrometro di massa e HPLC analitico (T<sub>R</sub>: 30 min) con il seguente metodo di eluizione a gradiente :

Tempo(min)	%A	%B
0.00	95.00	5.00
5.00	90.00	10.00
35.00	30.00	70.00
50.00	0.00	100.00
55.00	0.00	100.00
60.00	100.00	0.00

A tale prodotto è stata poi aggiunta una soluzione di acetonitrile ed NaOH 2 N 1:1 e la miscela di reazione è stata messa in agitazione a temperatura ambiente, monitorando l'idrolisi dell'estere etilico tramite HPLC (T<sub>R</sub> del prodotto idrolizzato: 21 min). Dopo circa 5 ore di reazione, ad idrolisi avvenuta, la miscela di reazione è stata acidificata a pH 6 mediante l'aggiunta di HCl 2 N. Il composto è stato quindi essiccato sotto vuoto e poi mediante speed vac ottenendo una polvere bianca che è stata successivamente purificata mediante HPLC preparativo applicando il seguente a gradiente:

Tempo (min)	%A	%B
0.00	80.00	20.00
5.00	80.00	20.00
35.00	50.00	50.00
45.00	0.00	100.00

La frazione raccolta è stata essiccata sotto vuoto mediante evaporatore rotante e successivamente speed vac ad ottenere una polvere biancastra di acido N<sup>1</sup>,N<sup>2</sup>-Di (terbutossicarbonil)-N-metilguanidino-N-acetico, ossia (Boc)<sub>2</sub>-creatina. È stata valutata la purezza del composto mediante HPLC e l'analisi qualitativa è stata effettuata mediante analisi ESI-MS ed ESI-MS<sup>2</sup>. (910 mg, 90%)

ESI-MS : m/z 332.00 [M + H]<sup>+</sup>; ESI-MS<sup>2</sup>: m/z (rel.int.): 275 [M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>(100); 220 [M- 2x C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>(40); 176 [M-(2x C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>) -CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>(10).

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 9.54 (s, broad 1H), 3.89 (s, 2H), 3.01 (s, 3H), 1.44 (s, 18H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 175.43, 161.53, 154.63, 151.53, 81.72, 79.66, 55.05, 38.41, 28.34

### ***sintesi chimica dei derivati glucidici della creatina ottenuti dalla (Boc)<sub>2</sub>-creatina***

Le sintesi dei derivati della creatina ottenuti dalla (Boc)<sub>2</sub>-creatina sono state tutte monitorate mediante il medesimo sistema HPLC con lo stesso metodo di eluizione a gradiente utilizzato per la sintesi della (Boc)<sub>2</sub>-creatina stessa (§ pg 52). Per i derivati che sono stati purificati mediante HPLC preparativo è stato impiegato lo stesso metodo di eluizione a gradiente utilizzato per purificare la (Boc)<sub>2</sub>-creatina stessa (§ pg 52). Le analisi tramite spettrometro di massa sono state realizzate tutte con lo stesso metodo utilizzato per la (Boc)<sub>2</sub>-creatina.

#### Sintesi del derivato creatina-glucosio

##### *sintesi del derivato creatina-glucosio mediante attivazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con CDI*

Ad una soluzione di (Boc)<sub>2</sub>-creatina (10 mg, 0,03 mmol, 1 eq) in 50 µl di THF sono stati aggiunti 4,86 mg di carbonildiimidazolo (0,03 mmol; 1 eq). Dopo la scomparsa di effervescenza la soluzione è stata messa in agitazione per un'ora a temperatura ambiente. A tale soluzione sono stati quindi aggiunti 54 mg di glucosio anidro (0,3 mmol; 10 eq). Monitorando la reazione in HPLC analitico non è stata riscontrata la formazione del prodotto (Boc)<sub>2</sub>-creatina-glucosio, mentre è stata rilevata la formazione di diversi sottoprodotti.

##### *sintesi del derivato creatina-glucosio mediante attivazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con SOCl<sub>2</sub>*

1 equivalente di (Boc)<sub>2</sub>-creatina (10 mg; 0,03 mmol) è stato disciolto in 6.56 ml di SOCl<sub>2</sub> ( 0,09 mmol; 3 eq) e messo a refluxo a 80°-90° C per 4 ore in atmosfera di azoto. Ad attivazione avvenuta è stato rimosso il cloruro di tionile mediante evaporatore rotante e speed vac. A questo punto sono stati aggiunti 10 equivalenti di glucosio anidro (54 mg; 0,3 mmol) e 1 equivalente di trietilammina (41,8 µl; 0,3 mmol) in dimetilformammide anidra. Dopo agitazione a temperatura ambiente il monitoraggio dell'andamento della reazione non ha permesso di evidenziare la formazione del prodotto mentre ha mostrato la formazione di diversi sottoprodotti.

### *sintesi del derivato creatina-glucosio mediante attivazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con EDC*

Ad una soluzione di glucosio anidro (1,08 g; 6 mmol; 10 eq) e trietilammina (83,6 µl; 0,6 mmol; 1 eq) in 1,5 ml di dimetilformammide anidra è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di (Boc)<sub>2</sub>-creatina (200 mg; 0,6 mmol; 1 eq) ed EDC (191,7 mg; 0,6 mmol; 1 eq) in 1 ml di dimetilformammide anidra. La soluzione è stata posta in agitazione a 40° per circa 24 ore. In HPLC analitico è stato osservato il picco relativo al prodotto (Boc)<sub>2</sub>-creatina-glucosio (T<sub>R</sub>: 19 minuti) mentre si assisteva alla scomparsa del picco della (Boc)<sub>2</sub>-creatina (T<sub>R</sub>: 21 minuti). Dietiletere freddo è stato poi aggiunto alla miscela per favorire la precipitazione del prodotto che è stato successivamente sottoposto a centrifugazione. Si è ottenuto un abbondante precipitato bianco che è stato lavato due volte con dietiletere freddo e poi portato a secchezza sotto flusso di azoto. (219 mg, resa 73%) ESI-MS m/z = 493 [M+H]<sup>+</sup>. Il solido bianco è stato poi trattato con una miscela di TFA:DCM 1:1 a 0°C sotto agitazione fino a completa rimozione dei gruppi protettori t-Boc; lo stacco dei gruppi protettori è stato monitorato mediante spettrometro di massa per ottenere, dopo circa 5 ore, il prodotto completamente deprotetto, creatina-glucosio. La miscela di TFA e DCM è stata diminuita di volume con evaporatore rotante liofilizzando il prodotto per ottenere una polvere bianca. (108 mg, resa 84%)

ESI-MS m/z = 293 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.71 (3H, s), 3.66-3.71 (3H, 3.67 (s), 3.69 (d, J = 8.1 Hz), 3.67 (s)), 3.80-3.89 (3H, 3.81 (s), 3.85 (dd, J = 8.1, 7.7 Hz), 3.81 (s)), 4.74 (1H, d, J = 7.7 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 169.29, 168.3, 106.08, 101.17, 79.36, 78.13, 51.90, 63.4, 36.74

### sintesi del derivato creatina-glucosamina

#### sintesi del derivato creatina-glucosamina utilizzando 1,3,4,6 tetra-O-acetil-2-amino-2-deossi-β-D-glucopiranoside cloridrato (glucosamina protetta)

##### *Attivazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con HATU*

Ad una soluzione di 1,3,4,6 tetra-O-acetil-2-amino-2-deossi-β-D-glucopiranoside cloridrato (115 mg, 0,03 mmol, 10 eq) e trietilammina (4,18 µl, 0,03 mmol, 1 eq) in 0,5 ml di dimetilformammide anidra è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di (Boc)<sub>2</sub>-creatina (10 mg; 0,03 mmol, 1 eq) ed HATU (11,4 mg; 0,03 mmol; 1 eq) in 0,5 ml di dimetilformammide anidra. La reazione è stata tenuta in agitazione a 40°C. Il monitoraggio in HPLC non ha mostrato formazione del prodotto. L'analisi mediante spettrometro di massa ha rilevato, infatti, la presenza del prodotto richiesto in bassissima resa. ESI-MS m/z = 661 [M+H]<sup>+</sup>.

#### *attivazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con EDC*

Ad una soluzione di 1,3,4,6 tetra-O-acetil-2-amino-2-deossi-β-D-glucopiranoside cloridrato (115 mg, 0,03 mmol, 10 eq) e trietilamina (4,18 μl; 0,03 mmol; 1 eq) in 0,5 ml di dimetilformammide anidra è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di (Boc)<sub>2</sub>-creatina (10 mg; 0,03 mmol; 1 eq) ed EDC (4,65 mg; 0,03 mmol; 1eq) in dimetilformammide anidra. La reazione è stata tenuta in agitazione a 40°C . il monitoraggio in HPLC non ha mostrato formazione del prodotto. Anche in questo caso, l'analisi mediante spettrometro di massa ha mostrato la presenza del prodotto richiesto in bassissima resa.ESI-MS m/z=661 [M+H]<sup>+</sup>.

#### *sintesi del derivato creatina-glucosamina utilizzando glucosamina cloridrato*

##### *attivazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con POCl<sub>3</sub>*

Ad una soluzione di (Boc)<sub>2</sub>-creatina (33 mg; 0,1 mmol; 1 eq) in piridina anidra (2 ml) e POCl<sub>3</sub> (9,32 μl; 0,1 mmol, 1 eq) a 0°C in agitazione è stata aggiunta glucosamina cloridrato (216 mg; 1 mmol; 10 eq). La miscela di reazione è stata lasciata a 0°C in agitazione e monitorata mediante HPLC analitico. Non è stato isolato il prodotto richiesto.

##### *attivazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con EDC*

Ad una soluzione di glucosamina cloridrato (258,7 mg; 1,2 mmol; 10 eq) e trietilamina (16,7 μl; 0,12 mmol; 1 eq) in 2 ml di dimetilformammide anidra è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione formata da (Boc)<sub>2</sub>-creatina (40 mg; 0,12 mmol; 1 eq) ed EDC (28,7 mg; 0,12 mmol, 1 eq) in 0,5 ml di dimetilformammide anidra. La miscela di reazione è stata posta a temperatura ambiente in agitazione e monitorata mediante HPLC analitico; dopo 6 ore si notava la comparsa del picco del prodotto (T<sub>R</sub>= 16 min). Il controllo mediante spettrometro di massa del picco raccolto ha confermato la formazione del prodotto (Boc)<sub>2</sub>-creatina-glucosamina. Al termine della reazione è stato aggiunto dietiletere freddo allo scopo di ottenere la precipitazione del prodotto. Il precipitato ottenuto, di colore rossastro, è stato quindi purificato in HPLC preparativo (T<sub>R</sub>=11 min). ESI-MS m/z= 493 [M+H]<sup>+</sup>. (28,5 mg; 49%). Il picco raccolto è stato seccato in rotavapor e successivamente evaporato fino a secchezza mediante speed vac. Il prodotto liofilizzato è stato poi sottoposto a trattamento con TFA:DCM 1:1 in agitazione a 0°C per rimuovere i gruppi protettori t-Boc. Dopo due ore di reazione il controllo mediante spettrometria di massa ha rilevato l'ottenimento del prodotto finale creatina-glucosamina. La miscela di TFA e DCM è stata rimossa mediante evaporatore rotante ed il prodotto è stato quindi precipitato in dietiletere freddo e successivamente lasciato seccare sotto N<sub>2</sub>. (9,25 mg, 54%)

ESI-MS  $m/z=293$   $[M+H]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.70 (3H, s), 3.67-3.68 (2H, 3.68 (s), 3.68 (s)), 3.79-3.80 (2H, 3.80 (s), 3.80 (s)), 3.86 (1H, dd,  $J = 8.1, 7.7$  Hz), 3.96 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 4.74 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 169.26, 168.3, 101.17, 92.46, 79.36, 74.63, 69, 49.82, 36.74

### ***derivati della diacetilcreatina***

Le sintesi chimiche della diacetilcreatina etilestere e terbutilestere sono state effettuate entrambe in due fasi: la prima fase consisteva nell'acetilazione dei due gruppi amminici dell'agente guanilante S-metilisotiourea mediante anidride acetica; nella seconda fase il composto diacetilato veniva coniugato con l'ammina secondaria esterificata sarcosina etilestere o terbutilestere. L'andamento di entrambe le fasi di reazione è stato monitorato mediante HPLC analitico utilizzando il seguente metodo di eluizione a gradiente:

Tempo (min)	%A	%B
0.00	100.00	0.00
5.00	100.00	0.00
35.00	50.00	50.00
50.00	0.00	100.00
55.00	0.00	100.00
60.00	100.00	0.00

I prodotti intermedi e le molecole finali sono state analizzate mediante spettrometro di massa ESI-MS.

### sintesi chimica della diacetilcreatina etilestere

#### 1) Acetilazione dell'S-metilisotiourea

Ad una soluzione di S-metilisotiourea (175 mg; 1,94 mmol; 1 eq) in 2.5 ml di diclorometano anidro sono stati aggiunti anidride acetica (403  $\mu\text{l}$ ; 4,27 mmol; 2,2 eq) e trietilammina (405,6  $\mu\text{l}$ ; 2,91 mmol; 1,5 eq). La miscela di reazione è stata messa in agitazione per due ore a temperatura ambiente finchè non si evidenziava un cambiamento di colore. L'andamento della reazione è stato monitorato mediante HPLC analitico ( $T_R$ : 22,5 min). La risultante miscela è stata diluita con diclorometano anidro e lavata tre volte con acqua deionizzata. Le fasi acquose sono state poi riestratte con acetato di etile e la fase organica è stata evaporata in rotavapor. Il prodotto risultante è stato poi cristallizzato in etanolo assoluto e filtrato in imbuto buckner lavando con etanolo ghiacciato. L'analisi qualitativa del prodotto risultante è stata effettuata mediante spettrometria di massa e la sua purezza è stata determinata mediante HPLC analitico. (152 mg, 45 %)

ESI-MS  $m/z = 175 [M + H]^+$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.11-2.12 (6H, 2.11 (s), 2.11 (s)), 2.67 (3H, s).

$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 168.73, 167.26, 156.42, 23.32, 22.71, 12.96

2) Coniugazione con la sarcosina etilestere:

Il prodotto della fase precedente (152 mg; 0,87 mmol; 1 eq) è stato sciolto in THF anidro e sono stati aggiunti sarcosina etilestere cloridrato (133 mg; 0,87 mmol; 1 eq), trietilammina (363,7  $\mu\text{l}$ ; 2,61 mmol; 3 eq) e  $\text{HgCl}_2$  (352 mg; 1,3 mmol; 1,5 eq). La miscela è stata tenuta in agitazione per due ore a temperatura ambiente fino a completamento della reazione monitorandola tramite HPLC analitico ( $T_R$  prodotto 17,1 min). A completamento della reazione la miscela è stata sottoposta a centrifugazione per separare il surnatante dal precipitato; quest'ultimo è stato lavato tre volte con THF anidro, centrifugando ogni volta ed alla fine tutti i surnatanti sono stati riuniti ed evaporati prima in rotavapor e, successivamente, in speed vac. La purezza del prodotto è stata controllata in HPLC e spettrometria di massa. (185 mg, 87%)

ESI-MS  $m/z = 244 [M+H]^+$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.15 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 2.11 (3H, s), 2.15 (3H, s), 2.78 (3H, s), 3.93 (2H, s), 4.14 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz).

$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 169.14, 168.4, 167.26, 153.78, 61.65, 51.90, 36.74, 23.36, 23.32, 14.13

### sintesi chimica della diacetilcreatina terbutilestere

1) Acetilazione dell'S-metilisotiourea

Ad una soluzione di S-metilisotiourea (175 mg; 1,94 mmol; 1 eq) in 2.5 ml di diclorometano anidro sono stati aggiunti anidride acetica (403  $\mu\text{l}$ ; 4,27 mmol; 2,2 eq) e trietilammina (405,6  $\mu\text{l}$ ; 2,91 mmol; 1,5 eq). La miscela di reazione è stata messa in agitazione per due ore a temperatura ambiente finchè non si osservava un cambiamento di colore. L'andamento della reazione è stato monitorato mediante HPLC analitico ( $T_R$ : 22,5 min). La risultante miscela è stata diluita con diclorometano anidro e lavata tre volte con acqua deionizzata. Le fasi acquose sono state poi riestratte con acetato di etile e la fase organica è stata evaporata in rotavapor. Il prodotto risultante è stato poi cristallizzato in etanolo assoluto e filtrato in imbuto buckner lavando con etanolo ghiacciato. L'analisi qualitativa del prodotto risultante è stata effettuata mediante spettrometria di massa e la sua purezza determinata mediante HPLC analitico. (152 mg, 45 %)

ESI-MS  $m/z = 175 [M + H]^+$

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.11-2.12 (6H, 2.11 (s), 2.11 (s)), 2.67 (3H, s).

$^{13}\text{C NMR}$  (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 168.73, 167.26, 156.42, 23.32, 22.71, 12.96

## 2) Coniugazione con la sarcosina terbutilestere:

Il prodotto della fase precedente (152 mg; 0,87 mmol; 1 eq) è stato disciolto in THF anidro, aggiungendo successivamente sarcosina terbutilestere cloridrato (157,5 mg; 0,87 mmol ;1 eq), trietilammina (363,7 µl; 2,61 mmol; 3 eq) e HgCl<sub>2</sub> (352 mg; 1,3 mmol; 1,5 eq). La miscela è stata tenuta in agitazione per due ore a temperatura ambiente fino a completamento della reazione monitorandola tramite HPLC analitico (T<sub>R</sub> prodotto 24,6 min). A completamento della reazione la miscela è stata sottoposta a centrifugazione per separare il surnatante dal precipitato, che è stato lavato poi tre volte con THF anidro, centrifugato ogni volta e alla fine tutti i surnatanti ottenuti sono stati riuniti, evaporati in rotavapor e successivamente in speed vac. La purezza del prodotto finito è stata controllata mediante HPLC e spettrometria di massa.(182 mg, 77%).

ESI-MS m/z = 272 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.38 (9H, s), 2.11 (3H, s), 2.14 (3H, s), 2.78 (3H, s), 3.93 (2H, s).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):δ (ppm) 170.57, 169.14, 167.26, 153.78, 80.39, 51.90, 36.74, 28.02, 28.02, 28.02, 23.36, 23.32

## ***derivati dell'acido guanidinoacetico***

I derivati dell'acido guanidinoacetico sintetizzati possono essere classificati in due gruppi:

- 1) esteri dell'acido guanidinoacetico : estere etilico ed estere benzilico ottenuti per esterificazione diretta dell'acido guanidinoacetico.
- 2) esteri dell'acido guanidinoacetico diacetilato: guanidinoacetato diacetilato etilestere e metilestere ottenuti con un metodo di sintesi analogo a quello utilizzato per la diacetilcreatina etilestere e terbutilestere.

### 1) sintesi chimica dell'estere etilico dell'acido guanidinoacetico

L'acido guanidinoacetico (100 mg; 0,85 mmol,1 eq) è stato risospeso in trimetilclorosilano (217 µl; 1,7 mmol; 2 eq) a cui è stato aggiunto alcol etilico (100 µl; 1,7 mmol; 2 eq). La miscela di reazione è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente monitorandone l'andamento mediante TLC ( § 4.2) Dopo circa 12 ore, a reazione avvenuta, è stato evaporato il solvente organico mediante rotavapor e il prodotto risultante è stato ulteriormente essiccato mediante speed vac ottenendo un semisolido trasparente. (98 mg, 79%)

ESI-MS m/z: 146 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.15 (3H, t, J = 7.1 Hz), 3.69 (2H, s), 4.11 (2H, q, J = 7.1 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 171.12, 157.52, 61.65, 44.08, 14.13

#### sintesi chimica dell'estere benzilico dell'acido guanidinoacetico

L'acido guanidinoacetico (100 mg; 0,85 mmol; 1 eq) è stato risospeso in trimetilclorosilano (217 µl; 1,71 mmol; 2 eq) a cui è stato aggiunto alcol benzilico (178 µl; 1,71 mmol; 2 eq). La miscela di reazione è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente monitorandone l'andamento mediante HPLC analitico (T<sub>R</sub> alcol benzilico: 16 min; T<sub>R</sub> estere benzilico dell'acido guanidinoacetico: 8 min) utilizzando il seguente metodo di eluizione a gradiente:

Tempo (min)	%A	%B
0.00	95.00	5.00
5.00	90.00	10.00
35.00	30.00	70.00
50.00	0.00	100.00
55.00	0.00	100.00
60.00	100.00	0.00

Dopo circa 24 ore la reazione la miscela ha assunto una colorazione rosata. La reazione è stata fermata e quindi è stata effettuata una estrazione con acqua ed acetato di etile. L'estratto, contenente il prodotto, è stato quindi evaporato in rotavapor e successivamente in speed vac ottenendo un solido bianco. (146 mg; 83%)

ESI-MS m/z : 208,08 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3.70 (2H, s), 7.23-7.33 (3H, 7.28 (dtd, J = 8.1, 1.3, 0.5 Hz), 7.28 (tt, J = 7.6, 1.3 Hz)), 7.47 (2H, dddd, J = 8.1, 7.6, 1.5, 0.5 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 169.29, 157.52, 150.32, 129.63, 129.63, 123.59, 121.59, 121.59, 44.08

#### 2) sintesi chimica del diacetil guanidinoacetato metilestere

Per sintetizzare tale derivato è stata effettuata una coniugazione della diacetil-S-metiltiourea sintetizzata con il metodo descritto sopra (§ pg.57) con la glicina metilestere, preparata per esterificazione diretta della glicina con alcol metilico.

### *1. esterificazione della glicina con alcol metilico*

Glicina (100 mg, 1.33 mmol, 1 eq) è stata risospesa in trimetilclorosilano (340  $\mu$ l, 3.66 mmol, 2 eq). A tale miscela è stato aggiunto alcol metilico (108  $\mu$ l, 3.66 mmol, 2 eq). La miscela di reazione è stata tenuta a temperatura ambiente in agitazione e monitorata mediante TLC con lo stesso metodo utilizzato per monitorare l'esterificazione del guanidinoacetato etilestere (§ 4.2). A compimento della reazione, dopo circa 12 h, il solvente organico incolore è stato evaporato mediante rotavapor e successivamente speed vac, ottenendo un solido biancastro. (102 mg, 85.7%)

ESI-MS m/z : 89.85 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  3.56 (2H, s), 3.69 (3H, s).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) 169.12, 52.25, 41.11

### *2. coniugazione della glicina metilestere con la diacetilmetiltiourea*

Glicina metilestere (102 mg; 1.14 mmol, 1 eq) e N,N diacetil-metilisotiourea (200 mg; 1.14 mmol, 1 eq) ottenuta con il metodo descritto sopra (§ pg 57) sono state sospese in THF anidro con HgCl<sub>2</sub> (463 mg; 1.71 mmol, 1.5 eq) e trietilammina (476  $\mu$ l; 3.42 mmol, 3 eq). La miscela di reazione è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente per circa un'ora, monitorandone l'andamento mediante HPLC analitico (Rt 18 min) utilizzando lo stesso gradiente di eluizione descritto per la diacetilcreatina etilestere. Al termine la miscela è stata centrifugata a 2497 g per 5 minuti per separare il surnatante dal precipitato, è stato lavato e centrifugato per tre volte il precipitato con THF anidro ed i surnatanti riuniti sono stati evaporati in rotavapor. Il prodotto finale è stato cristallizzato in metanolo. (156 mg, 63.6%)

ESI-MS m/z 216 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  2.15 (3H, s), 2.17 (3H, s), 3.72 (3H, s), 4.54 (2H, s).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) 171.16, 169.64, 168.8, 160.35, 52.29, 44.08,

23.35, 21.3

### sintesi chimica del diacetil guanidinoacetato etilestere

La sintesi di tale derivato è stata effettuata mediante la coniugazione della N,N-diacetil-metiltiourea preparata con il metodo descritto sopra (§ pg 57) con la glicina etilestere cloridrato disponibile commercialmente. N,N diacetil-metiltiourea (281.6 mg; 0.97 mmol, 1 eq) e glicina etilestere cloridrato

(100 mg; 0.97 mmol, 1 eq) sono state sospese in THF anidro con  $\text{HgCl}_2$  (394 mg, 1.45 mmol, 1.5 eq) e trietilammina (405.6  $\mu\text{l}$ , 2.91 mmol, 3 eq). La miscela di reazione è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente per circa un'ora, monitorandone l'andamento mediante HPLC analitico ( $R_t$  23 min) utilizzando lo stesso gradiente di eluizione descritto per la diacetilcreatina etilestere. Al termine la miscela è stata centrifugata a 2497 g per 5 minuti per separare il surnatante dal precipitato, è stato lavato e centrifugato per tre volte il precipitato con THF anidro ed i surnatanti riuniti sono stati evaporati in rotavapor. Il prodotto finale è stato cristallizzato in etanolo. (119 mg, 53.6%)

ESI-MS  $m/z$  230  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  1.15 (3H, t,  $J = 7.1$  Hz), 2.15 (3H, s), 2.17 (3H, s), 4.14 (2H, q,  $J = 7.1$  Hz), 4.54 (2H, s).

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 171.12, 169.64, 168.8, 160.35, 61.65, 44.08, 23.35, 21.3, 14.13

#### **4.4 METODI DEI TEST BIOLOGICI**

##### ***valutazione della stabilità***

La valutazione della stabilità dei composti sintetizzati è stata condotta tramite analisi HPLC di prelievi a diversi intervalli di tempo da soluzioni delle molecole opportunamente diluite. In particolare la stabilità dei coniugati glucidici creatina-glucosio e creatina-glucosamina è stata determinata mediante HPLC-MS tramite prelievi effettuati a diversi periodi, su soluzioni acquose diluite. Le concentrazioni da usare per le soluzioni oggetto dello studio sono state individuate con delle prove preliminari, in cui la molecola veniva disciolta a diverse concentrazioni (1 mM; 0,5 mM; 0,1 mM; 0,05 mM) in acqua o in ACSF ed iniettata in HPLC per verificare l'intensità del picco cromatografico. Le aliquote per valutare la stabilità della molecola diacetilcreatina etilestere sono state preparate da due soluzioni madri, una in acqua e una in ACSF (liquido cefalorachidiano artificiale), di concentrazione 20 mM, da cui si sono ottenute le soluzioni diluite di dieci volte per ottenere concentrazioni 2 mM. La soluzione madre e le soluzioni diluite sono state preparate in matracci tarati a temperatura ambiente e pH 7. Sono stati poi effettuati prelievi delle soluzioni ottenute al tempo zero e ogni 30 minuti e valutate mediante HPLC-MS. Per determinare la stabilità dei composti diacetilcreatina terbutilestere e diacetilguanidinoacetico etilestere è stata preparata una soluzione madre in ACSF 1 mM in matraccio tarato da cui si è ottenuta la soluzione 0,5 mM, di cui sono stati prelevati campioni ogni 30 minuti per essere iniettati nel sistema HPLC.

### ***preparazione delle fettine di ippocampo***

Per questo tipo di esperimenti sono stati utilizzati topi maschi albini Swiss ICR (CD-1) di 28-40 giorni di età, acquistati da Harlan Italia (San Pietro al Natisone, Udine, Italia) e mantenuti presso lo stabulario dell'Ospedale Policlinico San Martino. L'approvazione per condurre tali esperimenti è stata ottenuta dal Ministero della Salute Italiano; gli esperimenti sono stati condotti in linea con la normativa richiesta ( D.L. 27.1.1992 n. 116, in accordo con la direttiva dell'UE 89/609/CEE). L'approvazione formale per gli esperimenti descritti è stata ottenuta dal Comitato Etico dell'Ospedale Policlinico San Martino di Genova. La procedura di preparazione delle fettine in vitro è stata precedentemente descritta. Per poter isolare l'ippocampo l'animale è stato anestetizzato con etere etilico e immediatamente decapitato. È stato poi estratto l'ippocampo della porzione cerebrale sinistra e suddiviso, per mezzo di un microtomo, in fettine trasversali rispetto alla lunghezza dell'organo con uno spessore di:

- 600 µm per gli esperimenti di elettrofisiologia;
- 400 µm per gli esperimenti di biochimica

Le fettine così ottenute sono state trasferite all'interno di beaker contenenti una soluzione di ACSF ossigenata continuamente da una miscela CO<sub>2</sub> 95:5, in modo da mantenere il pH intorno a 7.35 – 7.4. I beaker durante l'ossigenazione erano posti in un bagno termostato alla temperatura di:

- 32° C per l'elettrofisiologia
- 36° C per la biochimica

L'ACSF utilizzato consisteva in una soluzione di acqua deionizzata contenente i seguenti composti a tali concentrazioni :

- Glucosio 410 mM
- MgSO<sub>4</sub> 21.2mM
- CaCl<sub>2</sub> 31.2mM
- Main Stock (soluzione formata da: NaCl 130mM, KCl 3.5mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25mM, NaHCO<sub>3</sub> 24mM)

Per gli esperimenti di biochimica è stata preparata anche una soluzione di ACSF modificata (§ pag.63)

### ***inattivazione del trasportatore della creatina nelle fettine di ippocampo***

L'inattivazione del trasportatore della creatina si può ottenere con due diverse metodiche, anche utilizzate contemporaneamente<sup>110</sup> : l'utilizzo dell'acido guanidinopropionico (GPA) 1mM o un medium di incubazione privo di ioni Cl<sup>-</sup><sup>213</sup>. Concentrazioni di GPA maggiori di 1mM non possono essere utilizzate in quanto provocano una soppressione del segnale elettrico da parte delle fettine, mentre una concentrazione pari a 1 mM riduce l'uptake e la concentrazione di creatina nelle fettine del 50%<sup>110</sup> .L'incubazione in un medium privo di ioni Cl<sup>-</sup> non può essere utilizzata negli esperimenti

di elettrofisiologia in quanto deprime la neuroeccitabilità delle fettine. Negli esperimenti di biochimica non si utilizza il GPA in quanto presenta in HPLC caratteristiche di eluizione molto simili a quelle della creatina, interferendo quindi con la determinazione della concentrazione di quest'ultima. Pertanto negli esperimenti descritti di seguito è stata utilizzata una inattivazione del CRT mediante GPA 1mM negli esperimenti di elettrofisiologia, e il medium di incubazione privo di ioni  $\text{Cl}^-$  negli esperimenti di biochimica.

### ***preparazione dei campioni biologici ed analisi HPLC per la determinazione dei contenuti di creatina e fosfocreatina (esperimenti di biochimica)***

Questi studi sono stati effettuati per determinare la capacità di innalzare i livelli di creatina e fosfocreatina intracellulare nel tessuto trattato e sono stati condotti su fettine di ippocampo isolate da topi maschi ICR (CD-1) di 4 settimane, anestetizzati con etere e decapitati. Una volta prelevato l'ippocampo di sinistra sono state eseguite delle sezioni di 400  $\mu\text{m}$  di spessore e le fettine così ottenute sono state trasferite in beaker e incubate a 36° C per 3 ore in un bagno termostato. Ogni beaker conteneva 12 fettine di dieci differenti animali .

I gruppi sperimentali utilizzati in questo studio sono stati:

- ACSF
- ACSF senza  $\text{Cl}^-$
- ACSF + Creatina (2mM)
- ACSF senza  $\text{Cl}^-$  + Creatina (2mM)
- ACSF + DAC (2  $\mu\text{M}$ )
- ACSF senza  $\text{Cl}^-$  + DAC (2 $\mu\text{M}$ )

In questo caso è stato utilizzato l'ACSF modificato ,dove i cloruri di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  e  $\text{K}^+$  sono sostituiti con gli acetati di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  e  $\text{K}^+$ . Le soluzioni sono state continuamente ossigenate con una miscela  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  95:5 in modo che il pH risultante fosse 7,35-7,4. Dopo l'incubazione le fettine sono state lavate con soluzione fisiologica, mentre per quelle incubate senza cloruro è stata utilizzata una soluzione isotonica di acetato di sodio, e poi trasferite in provette Eppendorf. Queste sono state congelate in azoto liquido e conservate a una temperatura di -80° C. Ogni campione è stato omogenizzato con una soluzione di acido perclorico 0,3 M ( $\text{HClO}_4$ ) in modo da inattivare l'attività enzimatica della CK e successivamente il pH è stato portato a 7 con potassio carbonato ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) 3M. Dopo centrifugazione è stato prelevato il soprannatante, mentre il precipitato è stato conservato per la determinazione della concentrazione proteica con tecnica Bradford. Tutte le misurazioni sono state effettuate utilizzando BSA (Bovine Serum Albumine) come standard. Il soprannatante è stato prelevato e utilizzato per l'analisi HPLC in modo da determinare i livelli di creatina e fosfocreatina. La quantificazione dei metaboliti è stata condotta secondo metodi precedentemente pubblicati, con piccole modificazioni <sup>110</sup>. Il sistema HPLC utilizzato era un Agilent 1260–Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) dotato di autocampionatore e colonna Symmetry C18, di 3,9 mm x 150 mm con

particelle di dimensioni 5 micron (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La temperatura della colonna è stata mantenuta a 30°C ed è stata utilizzata una eluizione in modalità isocratica con la seguente fase mobile a pH 6.8 (Il pH è stato mantenuto leggermente inferiore a 7 per la tendenza di creatina e fosfocreatina a ciclizzare in ambiente basico:

- Solvente A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40 mM (fosfato monoacido di sodio) + TBAHS 1mM (tetrabuttilammonio idrogeno solfato)
- Solvente B: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40 mM (fosfato biacido di sodio) + TBAHS 1mM (tetrabuttilammonio idrogeno solfato)

La velocità del flusso per l'analisi dei campioni è stata fissata a 0,8 ml/min e la lunghezza d'onda a 220 nm. Il volume di iniezione è stato fissato a 5 µl sia per gli standard che per i campioni. Le molecole degli standard sono state diluite nella fase mobile per raggiungere la concentrazione desiderata e il soprannatante dei campioni è stato diluito 1:1 nella fase mobile. I risultati ottenuti sono stati normalizzati rapportandoli con la concentrazione di proteine di ogni campione ottenuta secondo Bradford, un metodo colorimetrico che permette di stimare il contenuto di proteine. In particolare, la tecnica si basa sull'interazione non-covalente del colorante Coomassie Brilliant Blue con le proteine presenti. Il saggio viene effettuato a pH acido. Il colorante è in grado di legarsi primariamente ai residui basici ed aromatici, portando alla formazione di complessi. Questi ultimi determinano uno spostamento del massimo di assorbimento del colorante da 465 nm a 595 nm, che può essere misurato spettrofotometricamente. (*Bradford MM, 1976*).

Mediante analisi HPLC e successiva normalizzazione verso la concentrazione delle proteine sono stati quindi determinati i contenuti di creatina e fosfocreatina nei campioni incubati con i diversi media allo scopo di determinare se le molecole in esame fossero in grado di aumentare i livelli intracellulari di creatina e fosfocreatina e se tale aumento fosse o meno dipendente dall'integrità del trasportatore della creatina. Le curve di calibrazione sono state eseguite in triplicato utilizzando tre concentrazioni standard prima di eseguire le analisi sui campioni e l'accuratezza si trovava in un range compreso tra ± 13 e ± 16% con una deviazione standard in un range dell'8%.

### **metodi elettrofisiologici**

Le tecniche elettrofisiologiche <sup>212</sup> sono state utilizzate per studiare gli effetti neuroprotettivi dei derivati sintetici della creatina e sono state effettuate sulle fettine di ippocampo *in vitro*. Per realizzare questo tipo di esperimenti sono stati utilizzati come animali da esperimento topi ICR (CD-1) maschi di quattro settimane, provenienti da allevamenti Harlan. Le fettine di ippocampo sono state preparate seguendo la metodica esposta precedentemente. Dopo 3 ore di preincubazione in beaker posti in un bagnetto termostato, le fettine sono state trasferite in una camera di incubazione e registrazione elettrofisiologica (*Fine Science Tools, Vancouver, Canada*). Il tessuto è stato mantenuto a 35±1 °C, con un flusso costante (2 ml/min) di ACSF avente la stessa composizione del medium di

incubazione. I dati ottenuti sono stati archiviati digitalmente utilizzando il software Axo-Tape versione 1.1.2 (Axons Instruments, Foster City, CA, USA)

#### effetto del GPA sulla vitalità delle fettine

Si è dapprima determinato l'effetto elettrofisiologico del GPA sulle fettine a due diverse concentrazioni utilizzando i seguenti mezzi di incubazione, in cui le fettine sono state tenute per 3 ore a 36°C:

- ACSF
- ACSF+GPA (0,5 mM)
- ACSF+GPA (1 mM)

Le fettine di diversi animali sono state distribuite nei beaker di incubazione in modo che ogni beaker contenesse 12 fettine di ippocampo da dieci animali diversi per ridurre la variabilità dei campioni e venisse considerato come un soggetto sperimentale. Le fettine sono poi state trasferite nella camera di incubazione e registrazione. Due microelettrodi sono stati posizionati, l'uno con funzione di stimolazione sulle collaterali di Schaffer, l'altro con funzione di registrazione nello strato dei corpi cellulari di CA1 ed è stata misurata poi l'ampiezza del PS.

#### effetto della DAC e del DiacetilGAAetilestere sulla vitalità delle fettine

Per valutare invece gli effetti delle molecole sintetizzate sulla vitalità, le fettine sono state preincubate per 3 ore in ACSF a 36°C e poi trasferite nella camera di incubazione e registrazione, dove sono state percolate con diverse concentrazioni del composto in esame in ACSF:

- ACSF+DAC o DiacetilGaaEtilestere (1mM)
- ACSF + DAC o DiacetilGaaEtilestere (500 µM)
- ACSF + DAC o DiacetilGaaEtilestere (250 µM)
- ACSF + DAC (125 µM) o DiacetilGaaEtilestere (100 µM)
- ACSF + DAC (62.5 µM)

La stessa procedura è stata ripetuta per ciascuna delle soluzioni e i microelettrodi sono stati posizionati come descritto sopra (§ pg 46) e misurata l'ampiezza del PS.

#### effetto della DAC sulla vitalità delle fettine in condizioni di blocco del CrT

Per valutare invece se le molecole testate erano in grado di sovvertire l'effetto tossico del GPA sulla vitalità delle fettine sono stati utilizzati i seguenti medium di incubazione:

- ACSF
- ACSF + GPA 1mM
- ACSF + GPA 1mM + Creatina 2mM
- ACSF + GPA 1mM + DAC\*

\*Sono state testate diverse concentrazioni di DAC, a partire da DAC 2mM dimezzando ogni volta la dose fino ad arrivare a una concentrazione di DAC 1µM.

### esperimenti con anossia

Gli esperimenti sono stati condotti riproducendo un metodo riportato in letteratura<sup>77</sup> e precedentemente utilizzato nel laboratorio di neurofisiologia sperimentale nel corso di altri studi<sup>111,212</sup>. Il principio su cui si basa è l'osservazione di Whittingham e Lipton, che nel 1981 dimostrarono la capacità della creatina di prevenire la perdita irreversibile della trasmissione sinaptica su fettine di ippocampo di topo dopo 10 minuti di privazione di ossigeno. Questa protezione era inoltre accompagnata da una parziale conservazione di ATP nelle fettine anossiche. Il contenuto di ATP nelle fettine prima di essere sottoposte ad anossia era di 13,9  $\mu\text{mol/g}$  di proteine. In quelle sottoposte ad anossia e trattate con creatina la concentrazione di ATP risultava essere 7,9  $\mu\text{mol/g}$  di proteine, mentre nelle fettine di controllo era di 3,6  $\mu\text{mol/g}$  di proteine. La procedura di preparazione delle fettine era identica a quella precedentemente illustrata (§ pg 62). Dopo 3 ore di preincubazione in beaker posti in un bagnetto termostato, le fettine sono state trasferite in una camera di incubazione e sottoposte a registrazione elettrofisiologica. Il tessuto è stato mantenuto a  $35\pm 1^\circ\text{C}$ , con un flusso costante (2 ml/min) di ACSF avente la stessa composizione del medium di incubazione. Dopo aver posizionato gli elettrodi (stimolante e registrante) e aver verificato la presenza del PS, è stata indotta anossia sostituendo l'ossigeno nella fase gassosa della camera di incubazione con azoto ed è stata effettuata una misurazione del potenziale d'azione composto extracellulare, stimolando ogni 5 secondi. Una volta instaurata l'anossia il PS tendeva a diminuire progressivamente fino a scomparire. Si è quindi registrato quanto tempo il segnale (PS) impiega ad annullarsi dal momento di inizio dell'anossia. L'attività neuroprotettiva della creatina o di composti che hanno azione simile è rappresentata dalla sua capacità di ritardare la deplezione di ATP durante l'anossia e quindi ritardare la scomparsa del PS, che è ATP-dipendente<sup>77</sup>. I gruppi sperimentali utilizzati nell'ambito di questo studio sono stati:

- Controlli: incubazione in ACSF
- Soggetti trattati sperimentalmente: incubazione con ACSF + DAC

## **PARTE 2**

### **4.5 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DELLA FOSFOCREATINA**

Il metodo ottimale che è stato adottato per sintetizzare la fosfocreatina prevede cinque fasi, ciascuna delle quali è stata monitorata durante il suo decorrere mediante HPLC analitico; ogni intermedio di reazione è stato inoltre valutato qualitativamente mediante analisi con spettrometro di massa ESI-MS. Con l'obiettivo di ottenere due esteri della fosfocreatina, l'estere terbutilico e quello etilico, nella terza fase sono state utilizzate due diverse ammine secondarie, rispettivamente la sarcosina terbutilestere e la sarcosina etilestere. Soltanto il prodotto recante l'estere etilico ha mostrato stabilità durante la fase successiva, cioè la rimozione dei gruppi protettori, fornendo la fosfocreatina etilestere, da cui si è poi ottenuta la molecola fosfocreatina. Il metodo HPLC usato prevedeva il seguente schema di eluzione a gradiente utilizzando la seguente fase mobile:

- solvente A: H<sub>2</sub>O con aggiunta di 0,1% di acido formico
- solvente B: CH<sub>3</sub>CN con aggiunta di 0,1% di acido formico

Tempo (min)	A %	B%
0	100	0
5	95	5
35	25	75
50	0	100
55	0	100
60	100	0

#### sintesi della N-tert-butilossicarbonil-S-metilisotiourea (N-t-Boc-metilisotiourea)

Una soluzione di S-metilisotiourea sale emisolfato (500 mg; 3,59 mmol) in 2,5 ml di NaOH 1N è stata posta a 0°C in bagno di ghiaccio e ad essa sono stati aggiunti 5 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e trietilammina (250 µl; 1,79 mmol). Una soluzione di di-tert-butil-dicarbonato (783.5 mg; 3.59 mmol) in 2 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> è stata aggiunta goccia a goccia in un periodo di circa 2 ore. La miscela ottenuta è stata tenuta in agitazione per una ulteriore ora fino a completamento della reazione. Il controllo in HPLC mostra per l'N-tert-butilossi-metilisotiourea un T<sub>R</sub> di 13 min e per l'N,N-ditertbutilossi-metilisotiourea un T<sub>R</sub> di 41 min. La soluzione finale è stata diluita con 1 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e portata a pH 4 mediante l'aggiunta di HCl 1N. La fase organica è stata estratta con acqua acida e separata dalla fase acquosa. Quest'ultima è stata portata a pH 7 con l'aggiunta di NaOH 1N e riestratta con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

La risultante fase organica è stata separata, disidratata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata ed evaporata in rotavapor. Il composto ottenuto è stato trattato con dietiletere anidro ed evaporato fino all'ottenimento di un semisolido biancastro. (377 mg, 55 %)

ESI-MS m/z = 191 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 1.39 (s, 9H), 2.45 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 13.8, 27.8, 79.2, 157.3, 161.4.

#### fosforilazione dell'N-t-Boc-metilisotiourea per ottenere il tertbutil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbammato

L'N-tert-butilossicarbonil-S-metilisotiourea (240 mg; 1.26 mmol) è stata disciolta in 1,5 ml di acqua deionizzata. La soluzione è stata posta in agitazione a 0°C in bagno di ghiaccio ed è stata aggiunta una soluzione di dibenzilfosfito (223 µl, 1 mmol) in 1,5 ml di CCl<sub>4</sub>; durante i successivi 30 minuti sono stati aggiunti goccia a goccia 500 µl di NaOH 0,8 N. Al termine dell'aggiunta la soluzione è stata fatta reagire a temperatura ambiente fino a compimento della reazione, controllata in HPLC (T<sub>R</sub> prodotto: 41,2 min). La fase organica è stata quindi separata da quella acquosa, lavata con acqua deionizzata, disidratata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata ed evaporata mediante rotavapor fino ad ottenere un olio giallo chiaro. (388 mg, 69%)

ESI-MS  $m/z = 451,1 [M+H]^+$

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1.39 (s, 9H), 2.46 (s, 3H), 5.06 (s, 4H), 7.37-7.46 (m, 10H)

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ): 13.8, 27.8, 70.5, 78.2, 126.8, 127.3, 127.8, 135.9, 151.3, 160.4.

coniugazione con la sarcosina etilestere per ottenere l'etil-2-(2-(di(benzilossifosforil)-3-(tert-butossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato

Il prodotto ottenuto, il tert-butil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbammato (388 mg; 0,86 mmol) è stato posto in una soluzione di 2 ml di DMF anidra assieme a sarcosina etilestere cloridrato (131 mg; 0,86 mmol),  $\text{HgCl}_2$  (700 mg; 2,58 mmol) e trietilammina (120  $\mu\text{l}$ ; 0,86 mmol). La miscela risultante è stata tenuta in agitazione per circa 18 ore a temperatura ambiente. Dopo completamento della reazione ( $T_R$  prodotto: 37 min) è stato aggiunto dietil etere (2 ml) e si è formato un precipitato bianco che è stato rimosso per filtrazione e lavato due volte con dietiletere freddo. Il filtrato etero è stato evaporato in rotavapor fino ad ottenere un derivato oleoso (244 mg, 55%)

ESI-MS  $m/z = 520,2 [M+H]^+$

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1.28(t,3H),1.38 (s, 9H), 3.05 (s, 3H),4.06 (q,2H),4.22 (s,2H),5.06 (s,4H),7.40-7.46 (m,10H)

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):14.3,27.6,37.6,51.1,61.1,70.5,81.4,126.8,127.3,127.8,134.8,154.3, 160.4,170.2

coniugazione con la sarcosina terbutilestere per ottenere il terbutill-2-(2-(di(benzilossifosforil)-3-(tert-butossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato

Il prodotto ottenuto, il tert-butil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbammato (388 mg; 0,86 mmol) è stato posto in una soluzione di 2 ml di DMF anidra assieme a sarcosina terbutilestere cloridrato (157 mg; 0,86 mmol),  $\text{HgCl}_2$  (700 mg; 2,58 mmol) e trietilammina (120  $\mu\text{l}$ ; 0,86 mmol). La miscela risultante è stata tenuta in agitazione per circa 16 ore a temperatura ambiente. Dopo completamento della reazione monitorata mediante HPLC ( $T_R$  prodotto: 41,9 min) è stato aggiunto dietil etere (2 ml) e si è formato un precipitato bianco che è stato rimosso per filtrazione e lavato due volte con dietiletere freddo. Il filtrato etero è stato evaporato in rotavapor. (241 mg, 52%)

ESI-MS  $m/z = 534,2 [M+H]^+$

$^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ): 1.39 (s, 9H), 1.44(s, 9H), 3.01 (s, 3H), 4.12 (s, 2H), 5.06 (s, 4H), 7.40-7.46 (m, 10H)

$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ):27.6,27.8,37.6,51.3,70.5,79.2,81.4,126.8,127.3,127.8,134.9,155.3, 160.4,170.9

rimozione dei gruppi protettori ed ottenimento dell'acido ammino((2-etossi-2-ossietil)(metil)ammino)metilene fosforoammidico (estere etilico della fosfocreatina)

All'etil-2-(2-(di(benzilossifosforil)-3-(terz-butossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato (244 mg; 0,47 mmol) è stata aggiunta una miscela di 2 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e TFA 1:1 a T=0°C in bagno di ghiaccio. La soluzione è stata tenuta in agitazione a T=0°C per tre ore e successivamente a temperatura ambiente per un'ora, fino alla completa rimozione dei gruppi tert-butilossi-carbonilici e benzilici, monitorando lo svolgimento della reazione mediante HPLC-MS. Al termine la miscela è stata diluita con 2 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ed il solvente evaporato in rotavapor per rimuovere anche l'acido trifluoroacetico. Il composto è stato poi trattato con dietilere freddo (1 ml), centrifugato a 4000 g per 5 minuti ed il precipitato lavato due volte con dietilere ottenendo l'etilstere della fosfocreatina (96 mg, 86%)

ESI-MS m/z = 240,1 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 1.27(t, 3H), 3.01 (s, 3H), 3.88 (s, 2H), 4.03 (q, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.3, 37.3, 51.2, 61.1, 157.5, 170.1

idrolisi del gruppo estereo ed ottenimento dell'acido-2-(1-metil-2-fosfoguanidino)acetico (fosfocreatina)

A ciascun mg di acido ammino((2-etossi-2-ossietil)(metil)ammino)metilene fosforoammidico ottenuto dalla quarta fase, sono stati aggiunti 0,7 mg di PLE [(Porcine Liver Esterase) (EC 3.1.1.1) (130 Units/mg)] disciolti in una miscela formata da 200 µl di tampone fosfato KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M e 60 µl di MeOH a pH 8. La reazione è stata posta a temperatura ambiente per circa un'ora. Al termine della reazione la miscela è stata centrifugata ed il filtrato è stato concentrato sotto vuoto. Il prodotto è stato ricristallizzato in etanolo assoluto ed è stato ottenuto il prodotto come sale di potassio.

ESI-MS m/z = 212.1 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O) 3.01 (s, 3H), 3.89 (s, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):37.3, 53.2, 155.5, 171.1

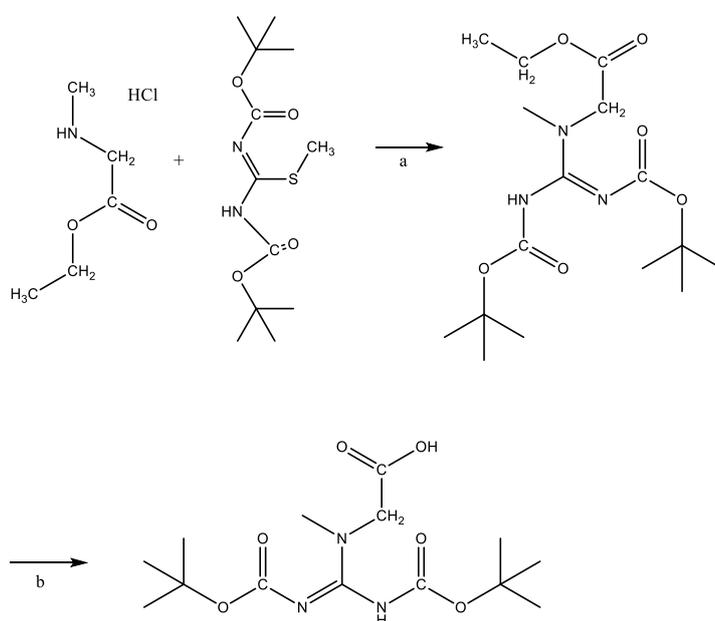
La resa totale del processo a partire da S-metilisotiourea è circa del 48%.

## CAPITOLO 5 : RISULTATI E DISCUSSIONE

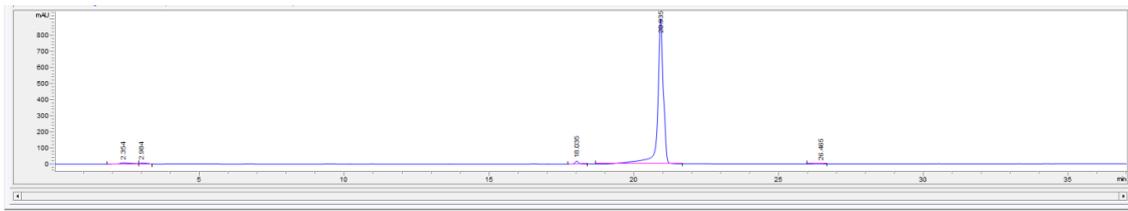
### PARTE 1: DERIVATI DELLA CREATINA

#### 5.1 (BOC)<sub>2</sub>-CREATINA E SUA STABILITÀ

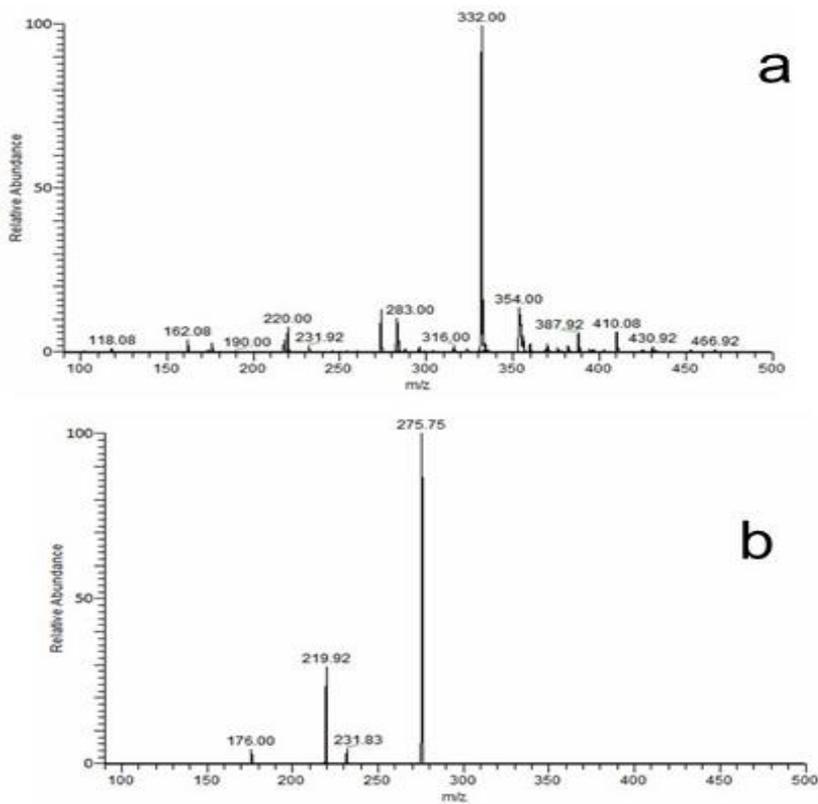
La sintesi chimica di derivati creatina è complicata dalle caratteristiche chimiche della creatina stessa. Essa reagisce con difficoltà con altre molecole a causa della sua natura zwitterionica che, favorendo la formazione di una sorta di sale interno, ne diminuisce la reattività. Proteggendo gli azoti del gruppo guanidinico è possibile attivare il gruppo carbossilico mediante uno specifico attivante, per facilitarne la reazione con un appropriato composto nucleofilo. A tale scopo è stata sintetizzata la (Boc)<sub>2</sub>-creatina, che è una forma di creatina in cui i due atomi di azoto del gruppo guanidinico sono protetti da due gruppi t-Boc. Questo particolare derivato è stato sintetizzato partendo dalla sarcosina, un composto con uno scheletro carbonioso simile alla creatina ma privo della porzione guanidinica. Alla sarcosina è stato unito un gruppo guanidinico già protetto con gruppi protettori t-Boc ad entrambi gli azoti. L'unione delle due porzioni ha portato alla formazione dell'estere della (Boc)<sub>2</sub>-creatina, che per idrolisi basica ha permesso di ottenere la molecola finale (Boc)<sub>2</sub>-creatina (fig.24). Lo svolgimento della reazione è stato monitorato mediante HPLC analitico (fig.25) ed il prodotto purificato mediante HPLC preparativo è stato analizzato mediante spettrometro di massa (fig.26).



**Fig. 24 sintesi della (Boc)<sub>2</sub>-creatina:** la prima fase consiste nella reazione tra la sarcosina etilestere e la N,N-Di(tertbutilossimetilioura) per ottenere la (Boc)<sub>2</sub>creatina etilestere. la seconda fase consiste nell'idrolisi basica del gruppo estereo ad ottenere la (Boc)<sub>2</sub>-creatina. a) DMF, TEA, HgCl<sub>2</sub>, T.amb ; b) NaOH:CH<sub>3</sub>CN 1:1, T.amb



**Fig.25 HPLC analitico della (Boc)<sub>2</sub>creatina:** è possibile visualizzare il picco relativo alla molecola (Boc)<sub>2</sub>creatina con T<sub>R</sub>: 21 min ad una λ=254



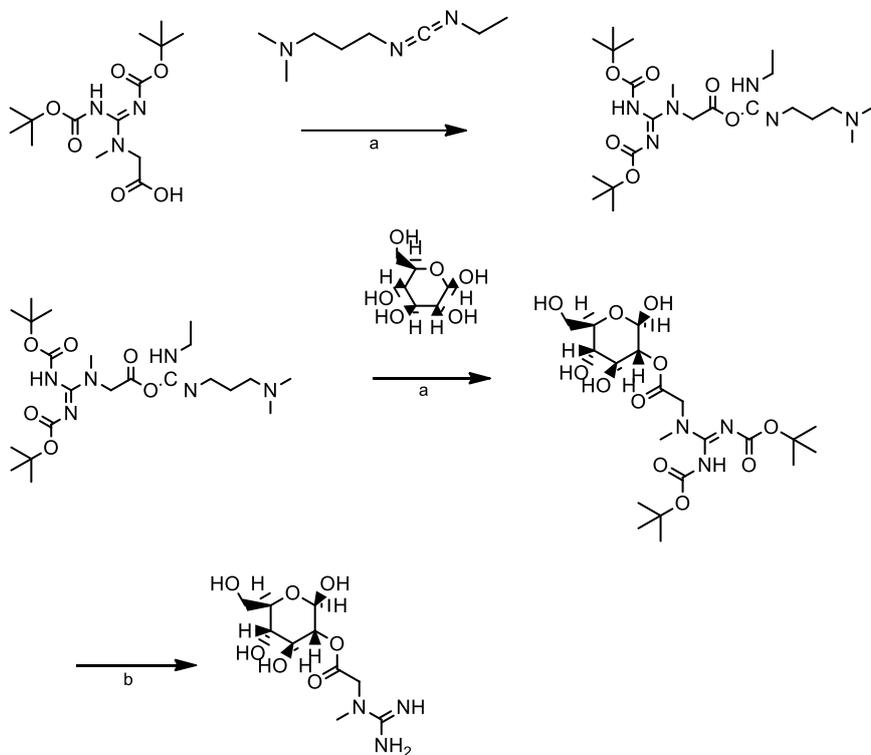
**Fig. 26 spettri di (Boc)<sub>2</sub>creatina** ottenuti mediante analisi ESI-MS ed ESI-MS<sup>2</sup>. a) (Boc)<sub>2</sub>creatina,ESI-MS m/z =332 [M+H]<sup>+</sup>. b) spettro ESI-MS<sup>2</sup> di (Boc)<sub>2</sub>creatina.

Una volta ottenuta la molecola in purezza elevata è stata testata la sua stabilità a temperatura ambiente come residuo secco. Questa molecola ha dimostrato una buona stabilità, tanto che dopo 6 mesi a temperatura ambiente era presente circa il 99% del prodotto. La stabilità è stata anche valutata in soluzione acquosa, in particolare in ACSF: dopo 3 ore era ancora presente il 96,6% del valore iniziale. La realizzazione della (Boc)<sub>2</sub>-creatina quale intermedio di sintesi ha quindi permesso di superare le limitazioni date dalle caratteristiche chimiche della creatina, la quale presenta una reattività molto scarsa ed è quasi insolubile nei solventi organici, oltre a degradare facilmente a creatinina. Il gruppo guanidinico protetto della (Boc)<sub>2</sub>-creatina conferisce a tale molecola una alta reattività sul gruppo carbossilico opportunamente attivato; essa inoltre è solubile nei solventi organici non degrada a creatinina e presenta una elevata stabilità come residuo secco. I gruppi protettori t-Boc possono inoltre essere facilmente rimossi in ambiente acido una volta che la sintesi del derivato finale è stata completata. Per tutti questi vantaggi la (Boc)<sub>2</sub>-creatina è stata utilizzata come intermedio per la sintesi dei derivati glucidici creatina-glucosio e creatina-glucosamina.

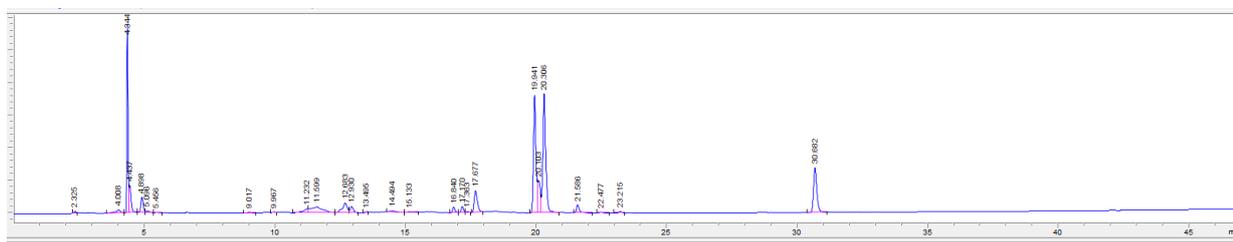
#### ***derivati glucidici della creatina a partire dalla (Boc)<sub>2</sub>-creatina***

Partendo dalla (Boc)<sub>2</sub>-creatina sono stati realizzati due derivati glucidici, creatina-glucosio e creatina-glucosammina, attivando il gruppo carbossilico della (Boc)<sub>2</sub>-creatina con un opportuno attivante (EDC) e successivamente coniugando la molecola con la porzione glucidica; infine sono stati rimossi i gruppi protettori t-Boc (fig.27,31). L'andamento delle reazioni è stato monitorato mediante HPLC analitico (fig.28,32) tranne l'ultima fase (rimozione dei gruppi protettori) che è stata controllata durante il suo svolgimento mediante analisi effettuate con spettrometro di massa (fig.29). I prodotti finali purificati sono stati caratterizzati mediante spettrometro di massa (fig.30,33).

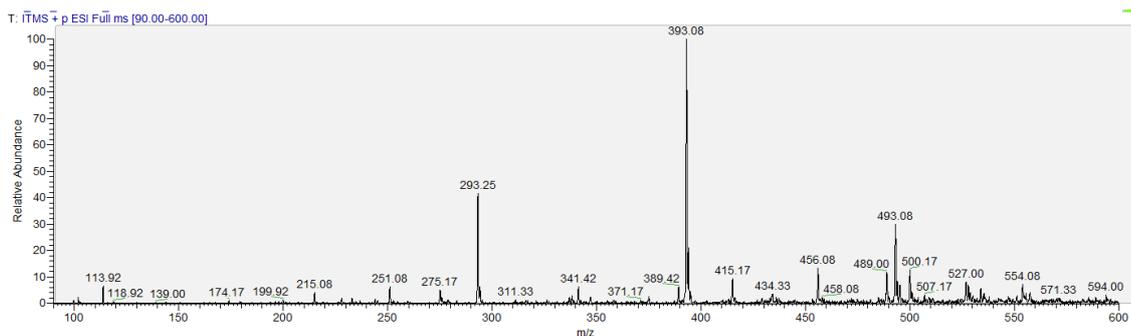
## sintesi del derivato creatina-glucosio



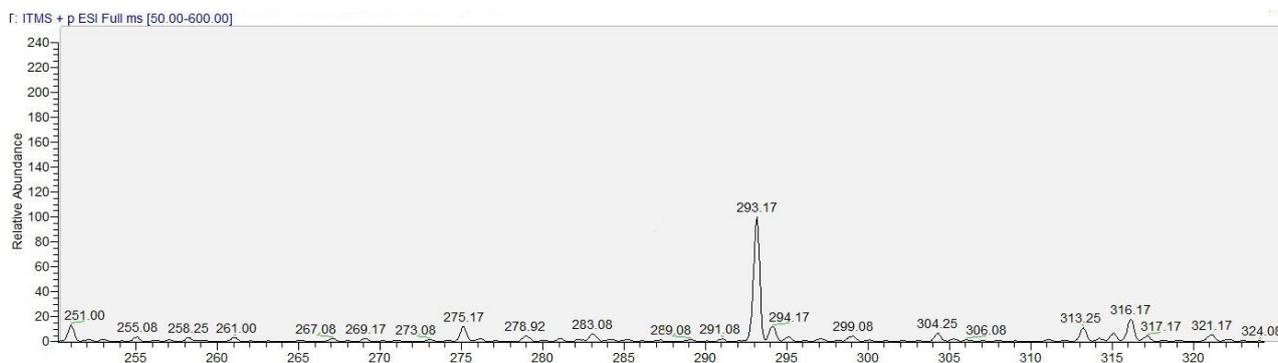
**Fig.27 sintesi del derivato creatina-glucosio:** nella prima fase di reazione il gruppo carbossilico della (Boc)<sub>2</sub>creatina è stato attivato con EDC a dare un intermedio più elettrofilo che nella seconda fase ha reagito con il glucosio rimuovendo il gruppo uscente. Nella terza fase di reazione sono stati rimossi i gruppi protettori t-Boc. a)DMF,TEA, 40°C b)TFA: DCM 1:1 0°C



**Fig.28 HPLC analitico del derivato (Boc)<sub>2</sub>creatina-glucosio**

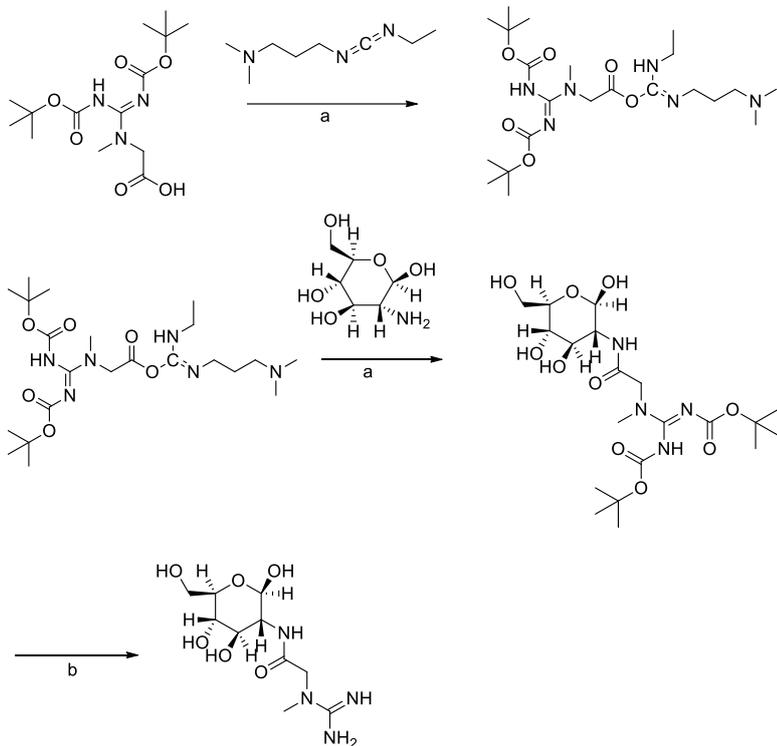


**Fig. 29** spettro di massa della miscela di reazione trattata con DCM:TFA 1:1 dopo 2 ore dall'inizio della reazione, durante il monitoraggio della rimozione dei gruppi protettori t-Boc. Si possono individuare il peso molecolare del prodotto finale creatina-glucosio (ESI-MS  $m/z=293$   $[M+H]^+$ ), quello del prodotto intermedio (Boc)creatina-glucosio dotato di un solo gruppo t-Boc (ESI-MS  $m/z=393$   $[M+H]^+$ ) e il prodotto di partenza (Boc)<sub>2</sub>creatina-glucosio (ESI-MS  $m/z=493$   $[M+H]^+$ )



**Fig. 30** spettro di massa della molecola creatina-glucosio ESI-MS  $m/z= 293,17$   $[M+H]^+$

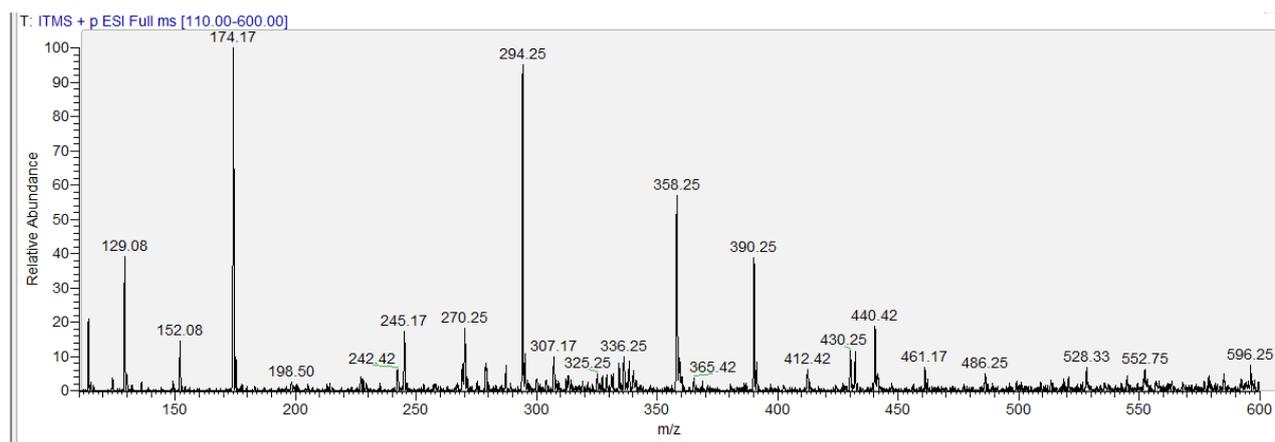
## sintesi del derivato creatina-glucosammina



**Fig.31 sintesi del derivato creatina-glucosammina** nella prima fase di reazione il gruppo carbossilico della (Boc)<sub>2</sub>-creatina è stato attivato con EDC a dare un intermedio più elettrofilo che nella seconda fase ha reagito con la glucosammina rimuovendo il gruppo uscente. Nella terza fase di reazione sono stati rimossi i gruppi protettori t-Boc. a)DMF,TEA, 40°C b)TFA: DCM 1:1 0°C



**Fig.32 HPLC analitico del derivato (Boc)<sub>2</sub>creatina-glucosammina**



**Fig.33 spettro di massa del prodotto creatina-glucosamina ESI-MS  $m/z = 294,25 [M+H]^+$**

I derivati glucidici creatina-glucosio e creatina-glucosamina sono stati sintetizzati a partire dall'intermedio  $(Boc)_2$ -creatina, attivata opportunamente sul gruppo carbossilico. Tali derivati, ottenuti in buona resa e purezza e caratterizzati, sono stati testati per quanto riguarda la loro stabilità in mezzo acquoso, rivelando una migliore stabilità del derivato creatina-glucosamina rispetto alla creatina-glucosio (dati non mostrati), probabilmente dovuta ad una minore sensibilità all'idrolisi del legame ammidico rispetto a quello estereo.

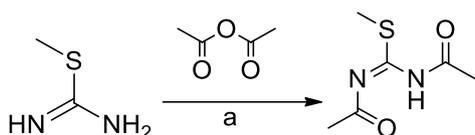
## 5.2 SINTESI DEI DERIVATI DELLA DIACETILCREATINA

La sintesi dei derivati della diacetilcreatina si è svolta in due fasi:

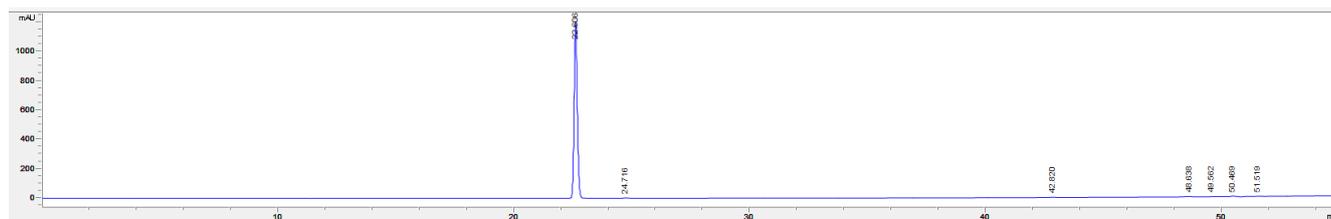
-l'acetilazione dell'agente guanilante S-metilisotiourea ad ottenere il derivato diacetilato (fig.34), caratterizzato mediante HPLC analitico (fig.35) e spettrometria di massa (fig.36).

-la coniugazione della N,N-diacetilmetilisotiourea con la sarcosina etilestere o terbutilestere, ad ottenere derivati caratterizzati mediante HPLC analitico e spettrometria di massa.

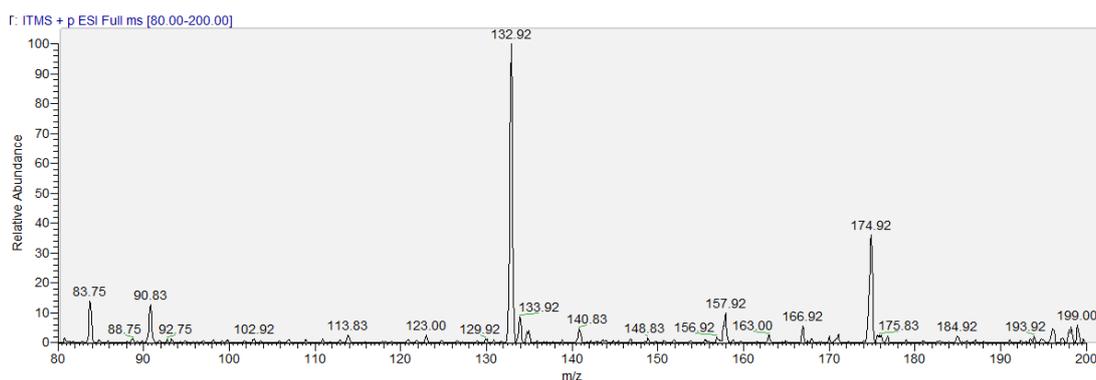
*acetilazione dell'agente guanilante S-metilisotiourea ad ottenere N,N-diacetil-S-metilisotiourea*



**Fig.34 acetilazione della S-metilisotiourea a) DCM,TEA,T.amb**



**Fig.35 HPLC analitico della N,N-diacetil-S-metilisotiurea** il prodotto della prima fase di reazione della sintesi dei derivati della diacetilcreatina e dei derivati del diacetilguanidinoacetato.  $T_R$ : 22,6 min



**Fig.36 spettro di massa della N,N-diacetil-S-metilisotiurea:** Si può individuare il peso molecolare del prodotto diacetilato (ESI-MS  $m/z$  174,92  $[M+H]^+$ ) ed il suo frammento ottenuto dalla perdita di un gruppo acetile (ESI-MS  $m/z$  132,92  $[M+H]^+$ )

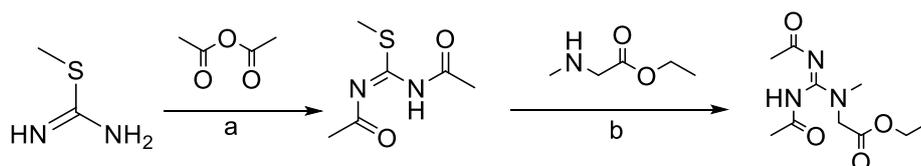
### sintesi della diacetilcreatina etilestere

La diacetilcreatina etilestere è stata sintetizzata mediante due fasi (fig.37):

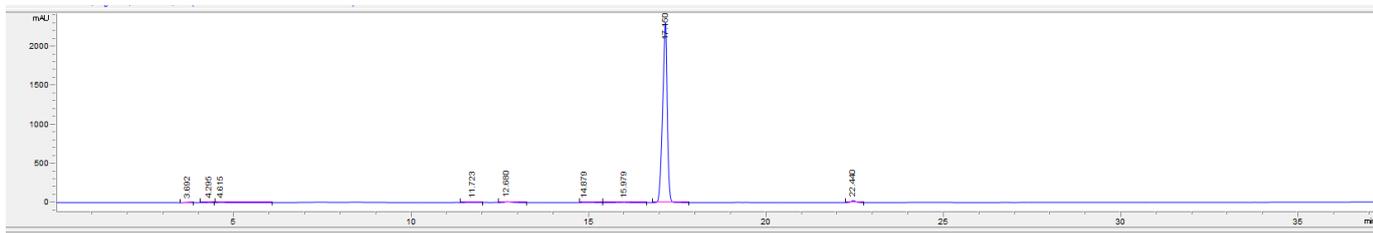
-l'acetilazione dell'agente guanilante

-la coniugazione di tale agente con un'ammina secondaria esterificata, la sarcosina etilestere.

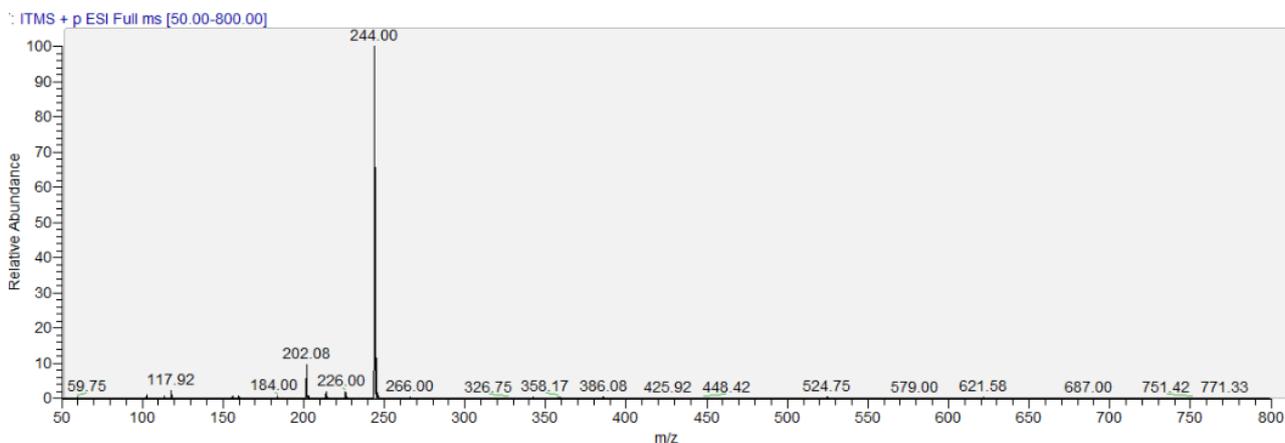
L'andamento della reazione è stato monitorato mediante HPLC analitico in entrambe le fasi (fig.35,38) ed il prodotto è stato caratterizzato mediante spettrometro di massa (fig.39).



**Fig.37 sintesi del derivato diacetilcreatina-etilestere:** la prima fase consiste nella acetilazione della S-metilisotiurea ottenendo la N,N-diacetil-metilisotiurea, che nella seconda fase di reazione è coniugata con la sarcosina etilestere a dare il prodotto finale. a) DCM, TEA, T. amb b) THF, TEA,  $HgCl_2$



**Fig.38 HPLC analitico del derivato diacetilcreatina etilestere  $T_R$  :17,15 min**



**Fig.39 spettro di massa del derivato diacetilcreatina etilestere.** Si può individuare il picco corrispondente allo ione molecolare (ESI-MS  $m/z$  244  $[M+H]^+$ ) ed il peso molecolare del prodotto monoacetilato ottenuto dalla perdita di un gruppo acetile (ESI-MS  $m/z$  202  $[M+H]^+$ )

Il derivato diacetilcreatina etilestere è stato testato per quanto riguarda la stabilità in ACSF, gli effetti sulla vitalità di fettine di ippocampo, la sua capacità di revertire gli effetti da blocco dell'SLC6A8 mediante GPA e il suo effetto biochimico di aumentare il contenuto di creatina e fosfocreatina in fettine di ippocampo. Essendo un derivato molto più lipofilo della creatina, si ipotizza che possa attraversare le membrane cellulari per diffusione passiva e quindi anche in condizioni di trasportatore bloccato. I gruppi acetilici posti sulla funzione guanidinica determinano quindi dei cambiamenti nell'attività rispetto alla creatina etilestere, probabilmente dovuti all'aumentata lipofilicità.

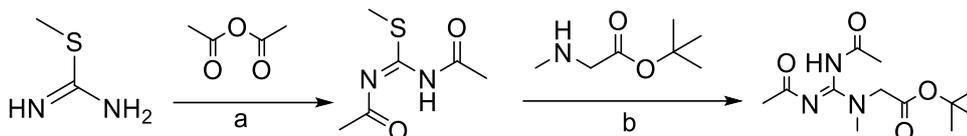
## sintesi della diacetilcreatina terbutilestere

La diacetilcreatina terbutilestere è stata sintetizzata mediante due fasi (fig.40) :

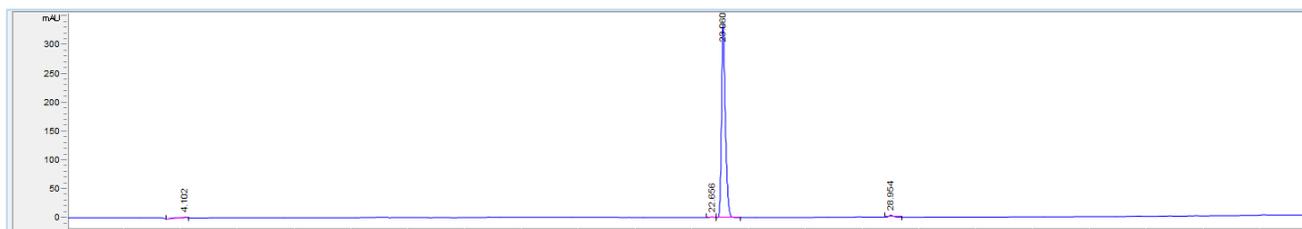
-l'acetilazione dell'agente guanilante

-la coniugazione di tale agente con un'ammina secondaria esterificata, la sarcosina terbutilestere.

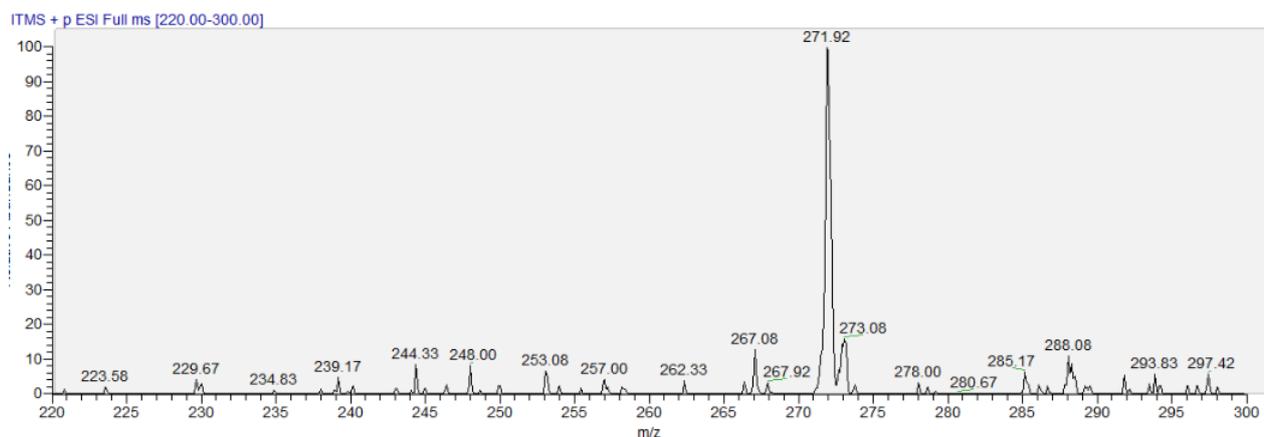
L'andamento della reazione è stato monitorato mediante HPLC analitico in entrambe le fasi (fig.35,41) ed il prodotto è stato caratterizzato mediante spettrometro di massa (fig.42).



**Fig.40 sintesi della diacetilcreatina terbutilestere:** la prima fase consiste nella acetilazione della S-metilisotiurea ottenendo la N,N-diacetil-metilisotiurea, che nella seconda fase di reazione è coniugata con la sarcosina terbutilestere a dare il prodotto finale. a) DCM, TEA, T. amb b) THF, TEA, HgCl<sub>2</sub>, T. amb



**Fig. 41 HPLC analitico della molecola diacetilcreatina terbutilestere** Tr: 23 min



**Fig. 42 spettro di massa della diacetilcreatina terbutilestere:** si può individuare il picco corrispondente allo ione molecolare (ESI-MS m/z 271,92 [ M+H]<sup>+</sup>)

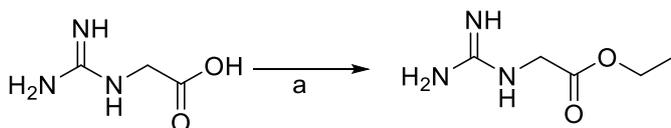
Il derivato diacetilcreatina terbutilestere è stato testato per quanto riguarda la stabilità in ACSF. Essa rappresenta un derivato della diacetilcreatina con una porzione esterea più ingombrante rispetto a quella della diacetilcreatina etilestere; l'aumento di apolarità si può evincere anche dal  $T_R$  più esteso in HPLC (23 min della diacetilcreatina terbutilestere vs 17,15 min della diacetilcreatina etilestere).

### 5.3 SINTESI DEI DERIVATI DELL'ACIDO GUANIDINOACETICO

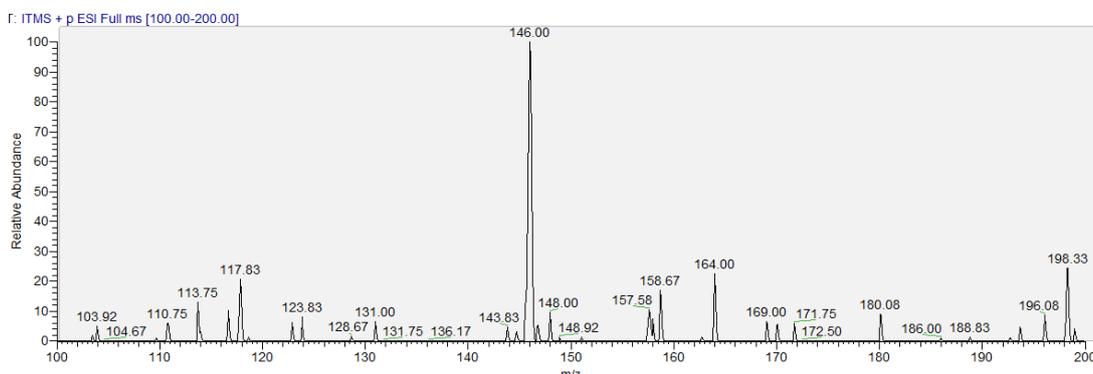
#### esteri dell'acido guanidinoacetico

Gli esteri dell'acido guanidinoacetico sono stati sintetizzati mediante esterificazione diretta dell'acido guanidinoacetico attivato con trimetilclorosilano. Lo svolgimento delle reazioni è stato monitorato mediante TLC e spettrometria di massa (fig.44,46).

*sintesi del guanidinoacetato etilestere (fig.43)*

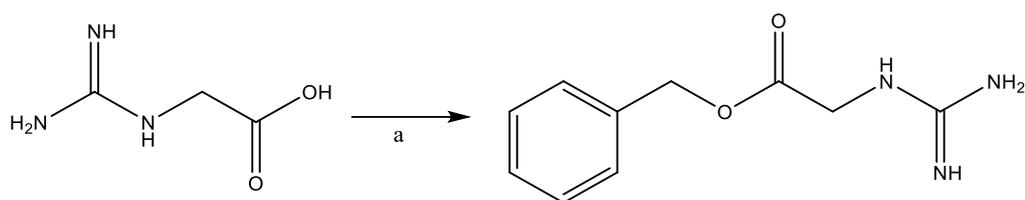


**Fig. 43 sintesi del derivato guanidinoacetato etilestere** per esterificazione diretta con alcol etilico. a)  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ , T.amb

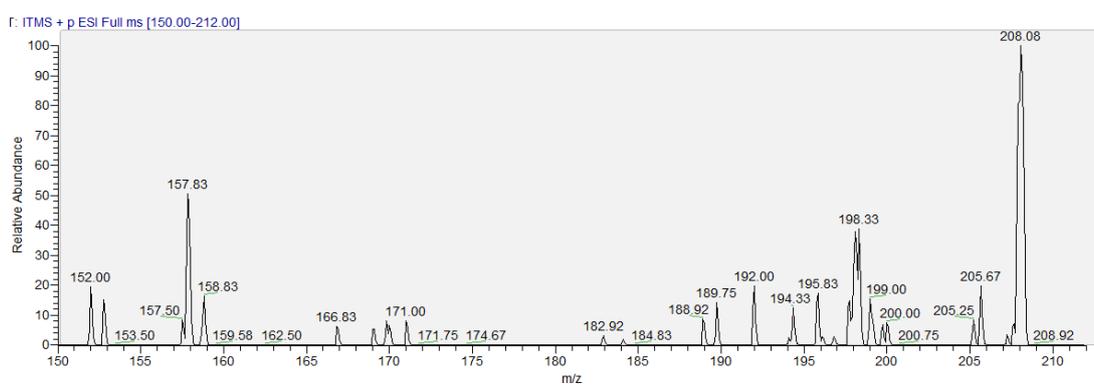


**Fig. 44 Spettro di massa del guanidinoacetato etilestere** : si può individuare il picco corrispondente allo ione molecolare (ESI-MS  $m/z$  146  $[\text{M}+\text{H}]^+$ )

### sintesi del guanidinoacetato benzilestere (fig.45)



**Fig.45 sintesi del derivato guanidinoacetato benzilestere** ottenuto per esterificazione diretta dell'acido guanidinoacetico con alcol benzilico. a)  $C_7H_8O$ ,  $(CH_3)_3SiCl$ , T.amb



**Fig. 46 Spettro di massa del guanidinoacetato benzilestere** : si può individuare il picco corrispondente allo ione molecolare (ESI-MS  $m/z$  208,08  $[M+H]^+$ )

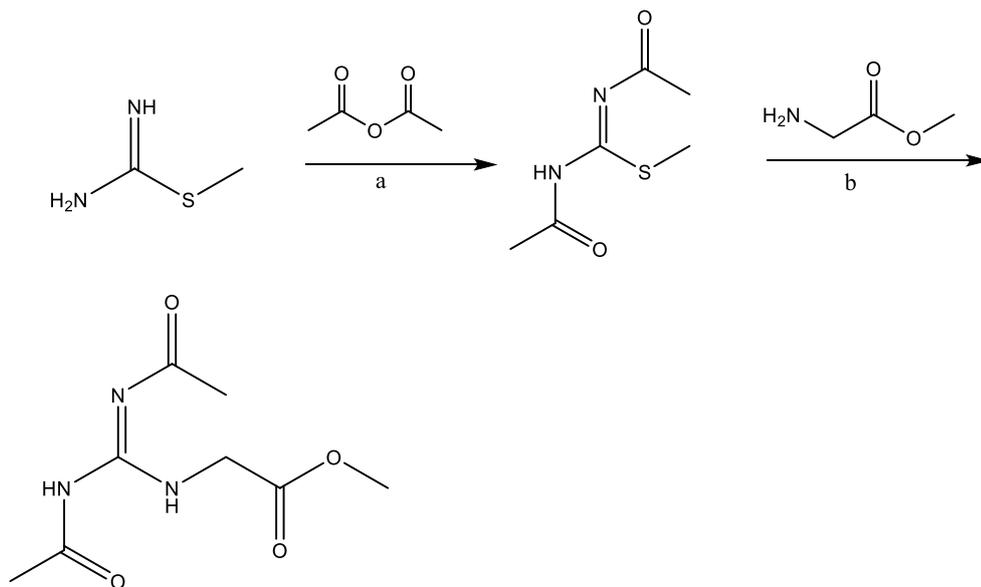
Tali esteri sono composti maggiormente lipofili rispetto all'acido guanidinoacetico, precursore demetilato della creatina. Poichè anche l'acido guanidinoacetico è soggetto al trasporto mediante SLC6A8 per entrare nelle cellule dove viene convertito a creatina, può essere utile ottenere derivati della molecola in grado di poter attraversare le membrane delle cellule anche in modo indipendente dal trasportatore, al fine di poter essere considerati una potenziale strategia nel trattamento del deficit dell'SLC6A8 e di altre patologie neurologiche.

### sintesi dei derivati del diacetilguanidinoacetato

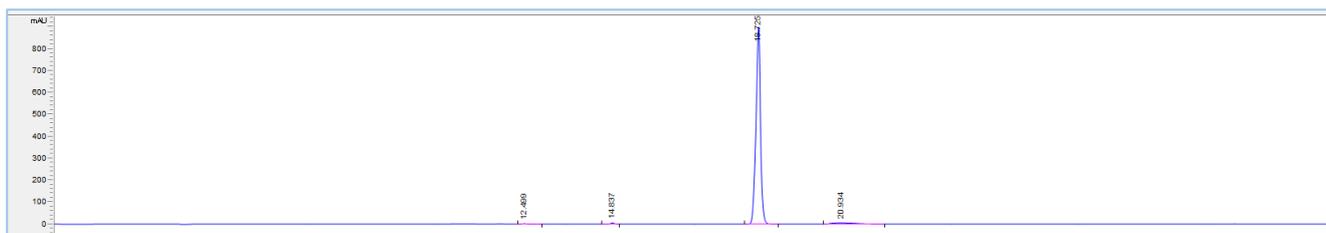
La sintesi dei derivati dell'acido guanidinoacetico esterificato diacetilato è stata svolta con modalità analoga a quella con cui sono state prodotte la diacetilcreatina etilestere e terbutilestere, utilizzando la glicina esterificata invece della sarcosina esterificata, in modo tale da ottenere un derivato demetilato rispetto al suo analogo. Le reazioni sono state monitorate mediante HPLC analitico

(fig.48,51) ed i prodotti una volta cristallizzati sono stati caratterizzati mediante spettrometria di massa (fig.49,52).

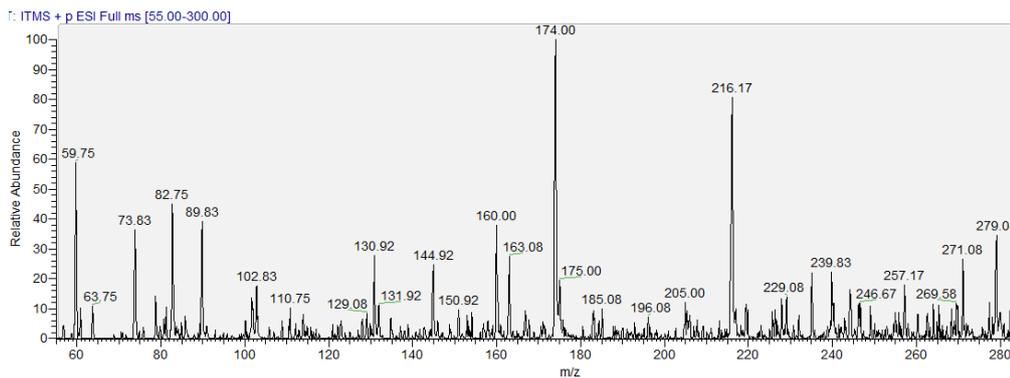
*sintesi del diacetilguanidinoacetato metilestere (fig.47)*



**Fig. 47 sintesi del diacetilguanidinoacetato metilestere:** la prima fase di reazione consiste nell'acetilazione della S-metilisotiurea, ad ottenere la N,N-diacetilmetilisotiurea che nella seconda fase è coniugata con la glicina metilestere, ottenuta per esterificazione della glicina con l'alcol metilico. a) DCM,TEA,T.amb b)THF,HgCl<sub>2</sub>,TEA,T.amb

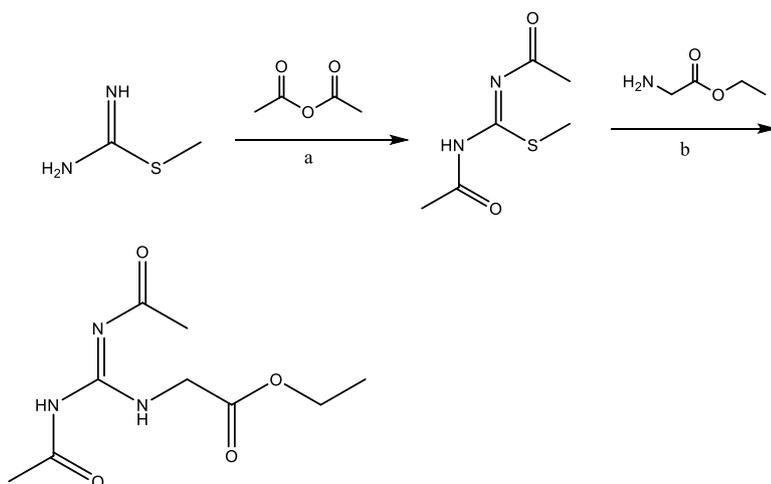


**Fig. 48 HPLC analitico del derivato diacetilguanidinoacetato metilestere** T<sub>R</sub> : 18,72 min

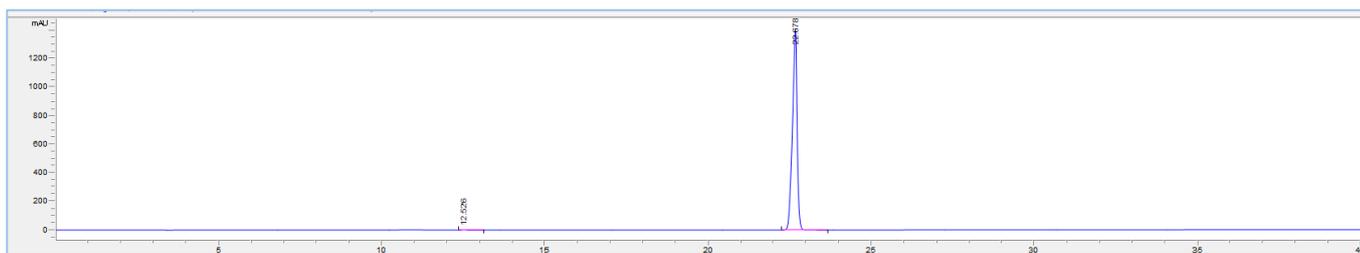


**Fig. 49 spettro di massa diacetilguanidinoacetato metilestere** : si può individuare il picco relativo allo ione molecolare (ESI-MS m/z 216,17 [M+H]<sup>+</sup>) ed il picco relativo ad un suo frammento ottenuto per perdita di un gruppo acetile ( ESI-MS m/z 174 [M+H]<sup>+</sup>)

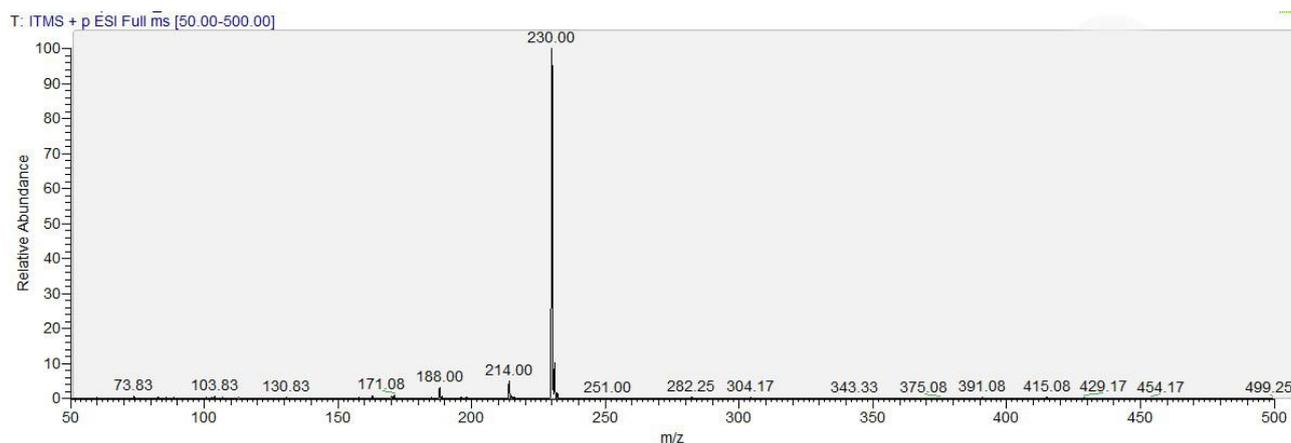
*sintesi del diacetilguanidinoacetato etilestere (fig.50)*



**Fig.50 sintesi del diacetilguanidinoacetato etilestere:** la prima fase di reazione consiste nell'acetilazione della S-metilisotiurea, ad ottenere la N,N-diacetilmetilisotiurea che nella seconda fase è coniugata con la glicina etilestere, disponibile commercialmente. a) DCM,TEA,T.amb b)THF,HgCl<sub>2</sub>,TEA,T.amb



**Fig.51 HPLC analitico del derivato diacetilguanidinoacetato etilestere** T<sub>R</sub> : 22,67 min



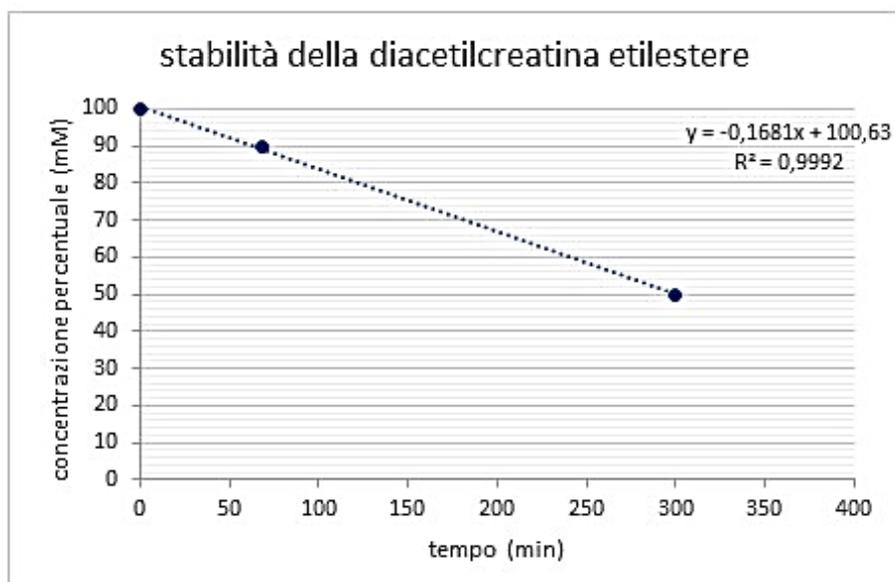
**Fig. 52 Spettro di massa diacetilguanidinoacetato etilestere ESI-MS m/z 230 [M+H]<sup>+</sup>**

I derivati dell'acido diacetilguanidinoacetico sono maggiormente lipofili del precursore della creatina acido guanidinoacetico, in particolare il diacetilguanidinoacetato etilestere presenta una apolarità maggiore del derivato metilestere, come si evince dai diversi tempi di ritenzione in HPLC (22,67 min vs 18,72 min). Il diacetilguanidinoacetato etilestere costituisce l'analogo demetilato della diacetilcreatina etilestere e di esso sono state valutate la stabilità in mezzo acquoso ACSF e gli effetti sulla vitalità delle fettine misurati mediante metodi elettrofisiologici.

#### 5.4 STABILITÀ DEI COMPOSTI DIACETILCREATINA ETILESTERE, DIACETILCREATINA TERBUTILESTERE E DIACETILGUANIDINOACETATO ETILESTERE

##### stabilità della diacetilcreatina etilestere

Nel grafico sottostante (fig.53) vengono illustrati i dati, rilevati mediante analisi HPLC, riguardanti la stabilità della DAC nel tempo in mezzo ACSF. Si può notare come dal tempo 0, in cui la concentrazione della molecola è pari al 100%, dopo 300 minuti (5 ore) , si ha un dimezzamento della sua concentrazione.

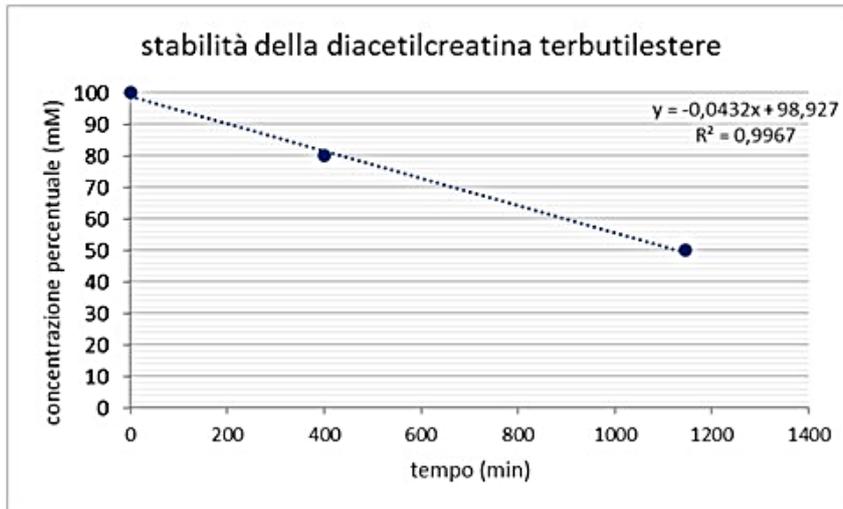


**Fig. 53 degradazione della DAC in soluzione acquosa.** Sull'asse delle ascisse è indicato il tempo mentre su quello delle ordinate la concentrazione della DAC presente nella soluzione, espressa in percentuale.  $T_{1/2} = 300$  min

La stabilità della diacetilcreatina etilestere in mezzo fisiologico risulta essere ottimale, soprattutto se paragonata con molecole quali la creatina etilestere, che degrada molto velocemente (6 minuti) a creatinina a pH fisiologico mentre è più stabile a pH acido. I gruppi acetilici presenti sulla funzione guanidinica conferiscono quindi alla molecola una maggiore stabilità in mezzo fisiologico, ritardandone la degradazione ed impedendo la ciclizzazione a creatinina.

### **stabilità della diacetilcreatina terbutilestere**

Nel grafico sottostante (fig.54) vengono illustrati i dati, rilevati mediante analisi HPLC, riguardanti la stabilità della diacetilcreatina terbutilestere nel tempo in mezzo ACSF. Si può notare come dal tempo 0, in cui la concentrazione della molecola è pari al 100%, dopo 1146 minuti (circa 19 ore) si ha un dimezzamento della sua concentrazione.

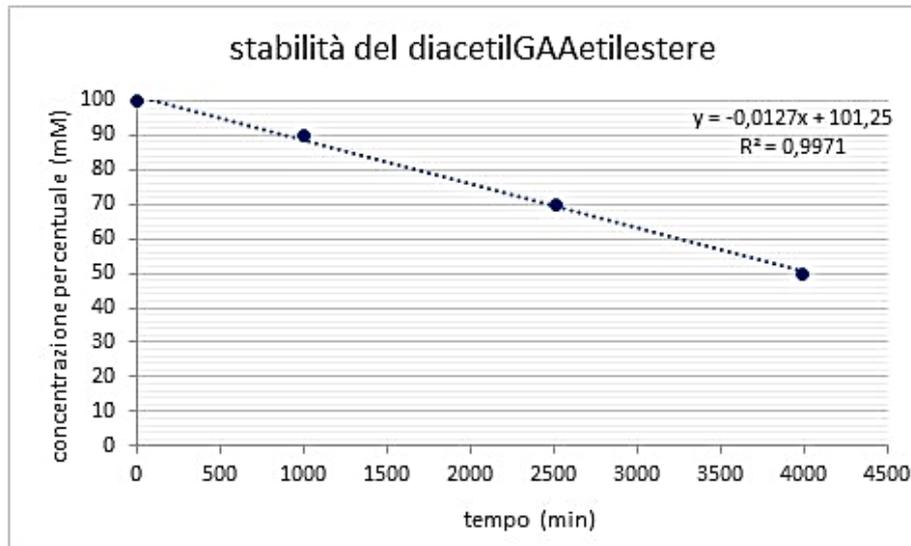


**Fig. 54 degradazione della diacetilcreatina terbutilestere in soluzione acquosa.** Sull'asse delle ascisse è indicato il tempo mentre su quello delle ordinate la concentrazione della DAC presente nella soluzione, espressa in percentuale.  $T_{1/2} = 1146$  min

Anche nel caso della diacetilcreatina terbutilestere i dati della stabilità in mezzo fisiologico sono molto buoni; essa risulta essere ancora più stabile del derivato etilestere; la modificazione sul gruppo estereo, quindi, sembrerebbe rallentare la sua degradazione e aumentare la sua emivita in fluido biologico.

### **stabilità del diacetilguanidinoacetato etilestere**

Nel grafico sottostante (fig.55) vengono illustrati i dati, rilevati mediante analisi HPLC, riguardanti la stabilità dell'acido guanidinoacetato etilestere nel tempo in mezzo ACSF. Si può notare come dal tempo 0, in cui la concentrazione della molecola è pari al 100%, dopo 4000 minuti (circa 66 ore) si ha un dimezzamento della sua concentrazione.



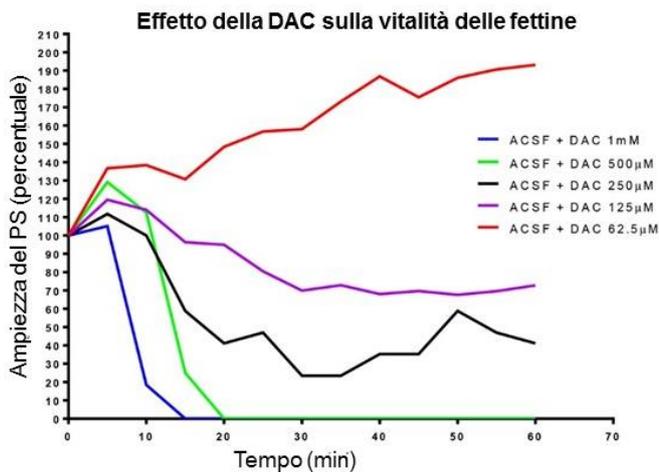
**Fig. 55 degradazione dell'acido guanidinoacetato etilestere in soluzione acquosa.** Sull'asse delle ascisse è indicato il tempo mentre su quello delle ordinate la concentrazione della DAC presente nella soluzione, espressa in percentuale.  $T_{1/2} = 4000$  min

Anche il derivato diacetilguanidinoacetato etilestere si è rivelato molto stabile in ambiente fisiologico, con una emivita maggiore rispetto ai derivati della diacetilcreatina.

### **5.5 RISPOSTA ELETTROFISIOLOGICA DELLA DIACETILCREATINA ETILESTERE E DEL DIACETILGAA ETILESTERE**

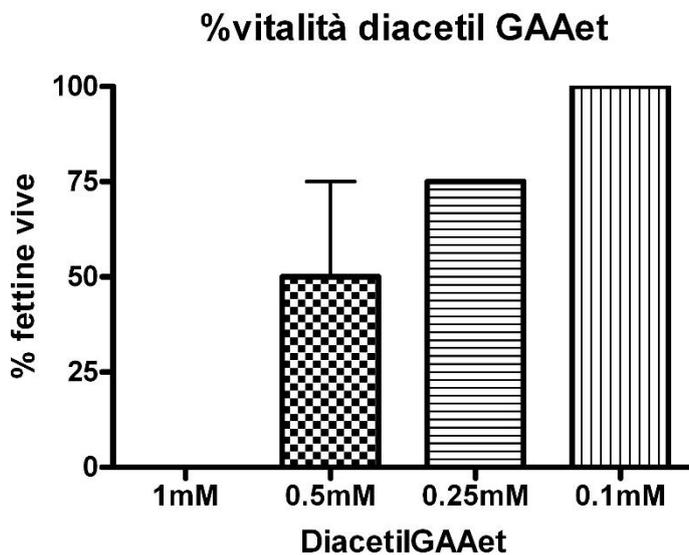
#### **effetti della DAC e del DiacetilGAA etilestere sulla vitalità delle fettine**

Sono stati eseguiti esperimenti per verificare gli effetti della DAC sulla vitalità delle fettine a diverse concentrazioni, rappresentati nel grafico seguente. In particolare DAC 1mM e DAC 500  $\mu$ M inibiscono il PS, DAC 250  $\mu$ M e 125  $\mu$ M ne determinano una grave depressione. I trattamenti con DAC 62,5 $\mu$ M invece non mostrano una diminuzione del PS ma un suo progressivo aumento in ampiezza. (fig.56). Quest'ultimo dato probabilmente indica un danno meno grave che in tale lasso di tempo assume la forma di un'ipereccitabilità neuronale.



**Fig. 56 Effetti delle diverse concentrazioni di DAC sull'ampiezza del population spike.** Sull'asse delle ascisse indicato il tempo, mentre su quello delle ordinate l'ampiezza del PS espressa in percentuale. Come si può notare tutte le concentrazioni di DAC sono risultate essere dannose.

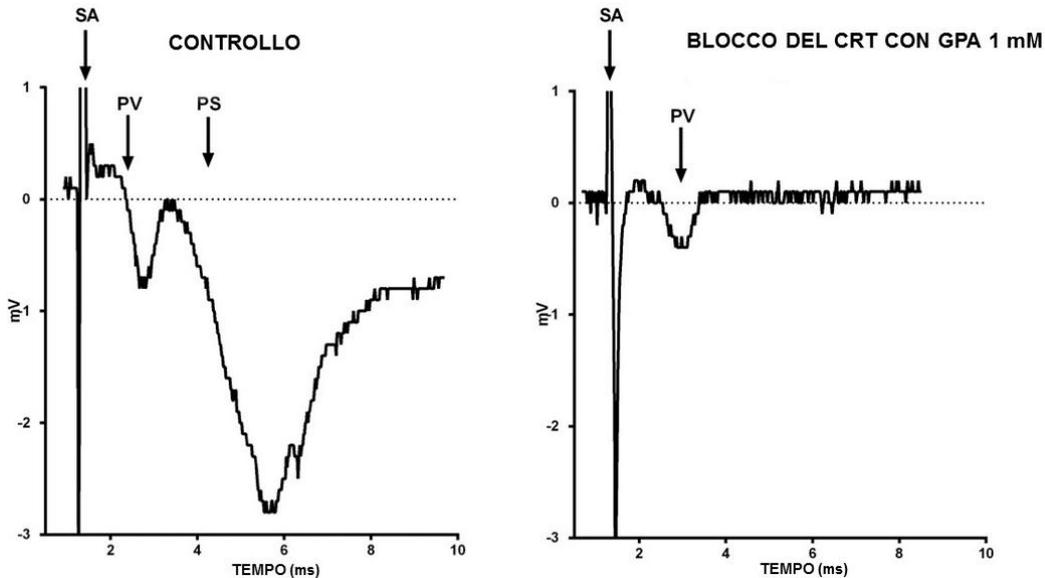
Anche lo studio degli effetti del diacetilGAAetilestere sulla vitalità delle fettine ha mostrato una attività tossica della molecola. Sono stati eseguiti esperimenti per verificare gli effetti della molecola sulla vitalità delle fettine a diverse concentrazioni, rappresentati nel grafico seguente (fig.57):



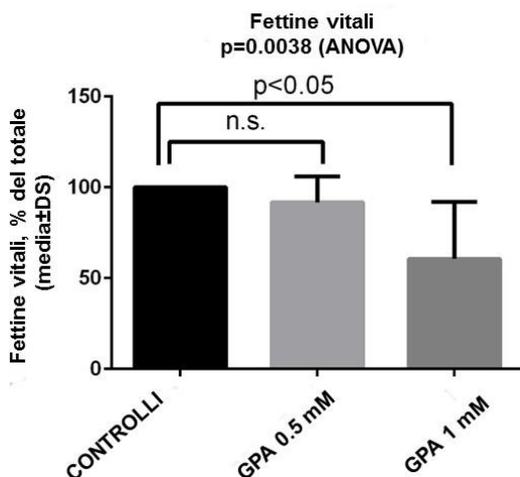
**Fig.57 effetti del DiacetilGAAetilestere sulla vitalità delle fettine:** le concentrazioni 1 mM, 0,5 mM e 0,25 mM mostrano una diminuzione in percentuale delle fettine vitali. I trattamenti con diacetilGAAetilestere 100 μM ,invece, non mostrano un danno significativo.

### effetto del blocco del trasportatore sulla vitalità delle fettine

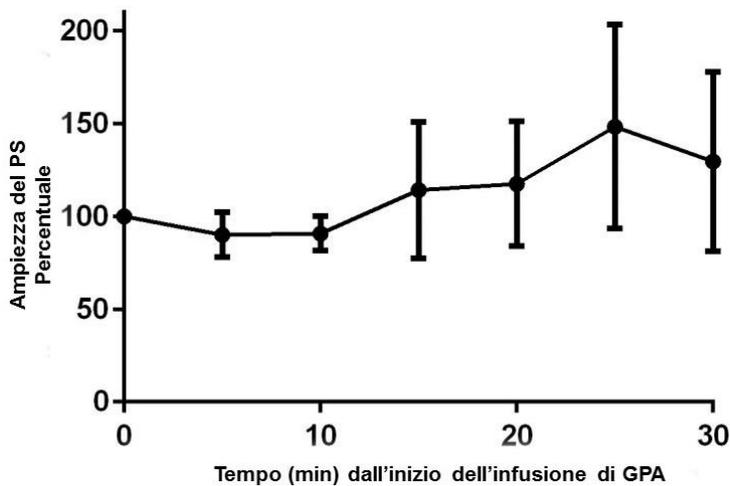
Dagli esperimenti sulle fettine di ippocampo incubate con il bloccante del CRT acido guanidinopropionico si è potuto dedurre che esso stesso presenta un effetto tossico sulla vitalità delle fettine, come mostrano i grafici seguenti, (fig.58,59), che però non si verifica con incubazioni in GPA a breve termine (30 minuti) nel modello sperimentale descritto (fig.60).



**Fig.58** effetto del GPA sulla vitalità delle fettine: a sinistra fettine con trasportatore CrT funzionante, con misurazione del segnale elettrico in cui si possono distinguere il PV ed il PS. A destra la presenza del GPA come inibitore del CrT porta all'annullamento della capacità delle fettine di generare il PS.



**Fig. 59** effetto dose-dipendente del GPA sulla vitalità delle fettine: la percentuale di fettine vitali diminuisce aumentando la concentrazione di GPA; l'effetto tossico del GPA è quindi dose-dipendente, in particolare con una concentrazione di 1 mM viene praticamente dimezzata la percentuale di fettine vitali rispetto al controllo.

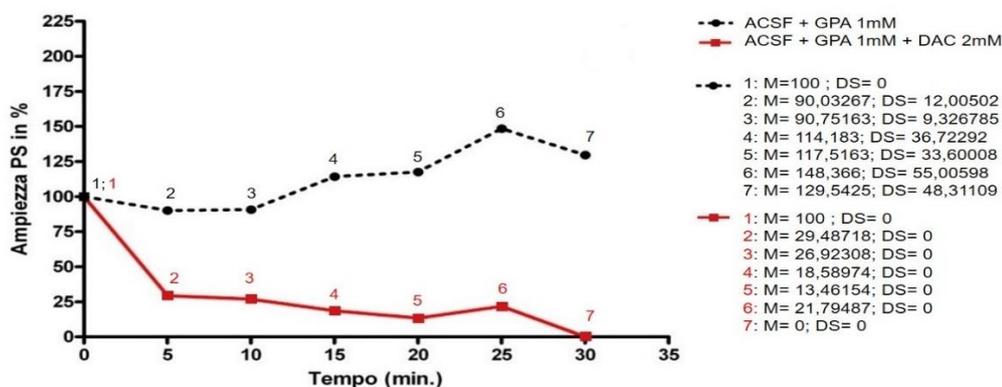


**Fig.60 effetto dell'incubazione a breve termine di GPA sulle fettine:** con una incubazione con GPA di massimo 30 minuti non si è riscontrata una variazione significativa sull'ampiezza del PS, indicatore di vitalità delle fettine nel modello sperimentale utilizzato, ritenendo perciò valido tale modello come rappresentativo del blocco del trasportatore senza ulteriori effetti tossici indotti dal GPA stesso.

### **effetto della DAC sulla vitalità delle fettine in condizioni di blocco del trasportatore**

Si è investigato se la DAC fosse in grado di sovvertire l'effetto del GPA. Il GPA in concentrazione 1 mM permetteva la trasmissione sinaptica solo nel  $61 \pm 31\%$  dei casi, un dato statisticamente significativo rispetto ai controlli. Nel grafico sottostante (fig.61) sono indicati i risultati ottenuti in seguito agli esperimenti di elettrofisiologia. E' rappresentata la variazione dell'ampiezza del population spike, indicativo della vitalità cellulare, delle fettine di ippocampo trattate. Si può notare come la DAC ad una concentrazione di 2mM determini un significativo decadimento della vitalità cellulare e quindi non dimostri effetti migliorativi al trattamento con GPA 1mM.

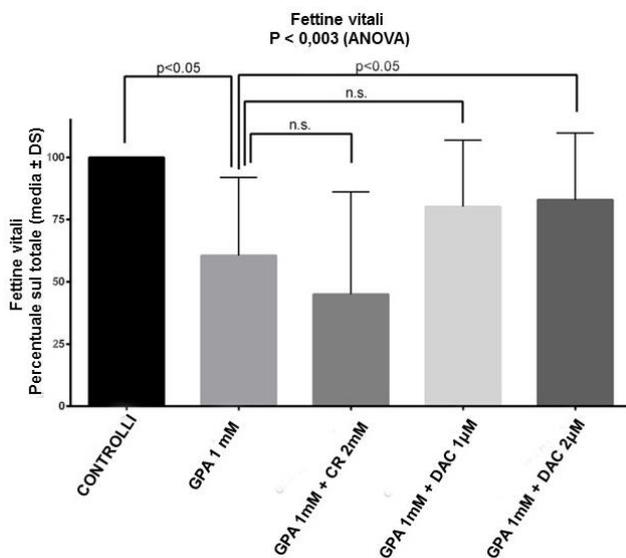
Ampiezza del population spike in funzione del tempo dopo somministrazione di GPA 1mM oppure Diacetil creatina 2mM + GPA 1mM



**Fig.61** Nel grafico sono indicati sull'asse delle ascisse il tempo mentre su quello delle ordinate l'ampiezza del population spike espressa in percentuale. Si può notare come la somministrazione di DAC 2mM (linea rossa) tenda nel tempo ad annullare completamente il segnale di trasmissione nervosa e quindi abbia un effetto peggiorativo rispetto alla sola somministrazione di GPA (linea nera tratteggiata). A destra sono indicati la media (M) e la deviazione standard (DS) di ogni punto indicato nel grafico.

Si sono quindi svolti trattamenti delle fettine variando le concentrazioni di DAC per verificare se la molecola a concentrazioni minori di 2 mM fosse in grado di migliorare i danni indotti dal GPA (bloccante del trasportatore della creatina).

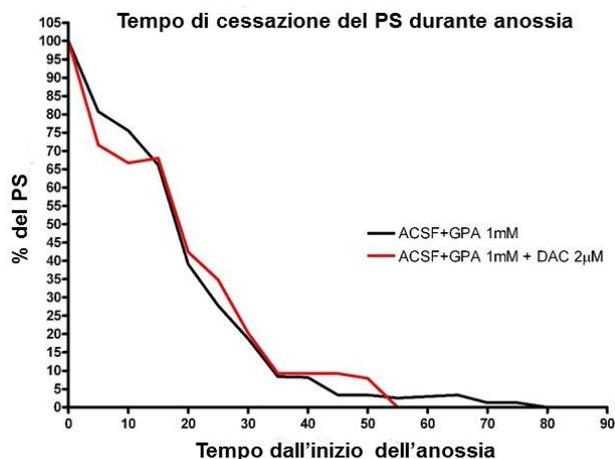
La creatina non si è mostrata in grado di sovvertire gli effetti del GPA; come si evince dal grafico sottostante,(fig.62), infatti, l'aggiunta di creatina 2mM alla soluzione contenente ACSF+GPA 1mM non dimostra nessun miglioramento della vitalità delle fettine in quanto la situazione di blocco del CRT non permette alla creatina di entrare all'interno delle cellule e manifestare così le sue proprietà. La DAC al contrario, alla concentrazione di 1  $\mu$ M e 2  $\mu$ M, ha mostrato un chiaro miglioramento dell'effetto tossico indotto da GPA. La vitalità delle fettine misurata è stata  $80\pm 27\%$  e  $83\pm 27\%$  rispettivamente dei gruppi a concentrazione 1  $\mu$ M e 2  $\mu$ M.



**Fig.62 effetto della DAC in condizioni di blocco di trasportatore della creatina sulla vitalità delle fettine.** Nel grafico sono indicati sull'asse delle ascisse i composti testati e sull'asse delle ordinate la percentuale di fettine vitali osservate per ogni rilevazione. Le fettine incubate solo in ACSF (controlli) mostrano una vitalità del 100%. Con l'aggiunta al medium di incubazione di GPA 1mM si nota una netta riduzione della percentuale di vitalità cellulare che risulta essere del 58%. Diverso invece è il risultato ottenuto nel trattamento con DAC 1 $\mu$ M e DAC 2 $\mu$ M: nel primo caso si nota un trend di aumento della percentuale di fettine vitali, segno che la DAC è in grado di minimizzare i danni indotti dal GPA; nel secondo caso si verifica un ulteriore aumento, che si dimostra essere quindi statisticamente significativo.

### **esperimenti in condizione di anossia**

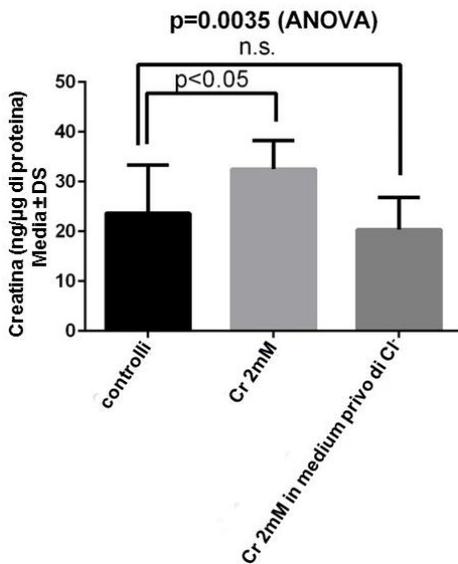
Nel grafico sottostante (fig.63) vengono rappresentati gli effetti della somministrazione di DAC 2 $\mu$ M in seguito a danno indotto da anossia in assenza del trasportatore della creatina. In questo caso la sostanza non è stata in grado di fornire un miglioramento e quindi una neuroprotezione.



**Fig.63** In questo grafico sulle ascisse è rappresentato il tempo a partire dall'induzione dell'anossia (tempo 0), mentre sulle ordinate l'ampiezza del population spike in percentuale. Come si può notare nel caso delle fettine pre-incubate in ACSF + GPA 1mM (linea nera) vi è una netta diminuzione della vitalità cellulare con il passare del tempo dalla privazione dell'ossigeno. Anche in quelle pre-incubate in ACSF + GPA 1mM + DAC 2 $\mu$ M (linea rossa) non si nota nessuna attenuazione del decadimento del population spike osservato nel precedente trattamento.

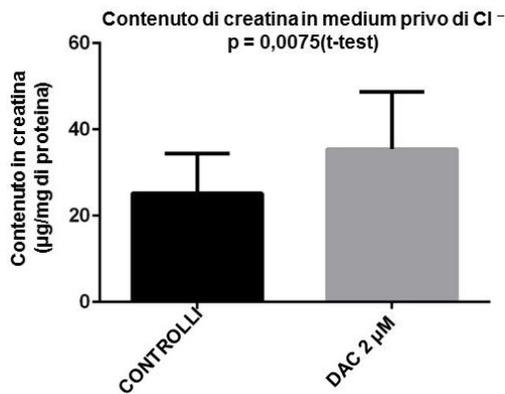
## 5.6 EFFETTI BIOCHIMICI DELLA DIACETILCREATINA ETILESTERE SULLA CONCENTRAZIONE DI CREATINA E FOSFOCREATINA

Per determinare se la DAC fosse in grado o meno di aumentare le concentrazioni di Cr e PCr nel cervello in condizioni di blocco del trasportatore si è utilizzato un medium di incubazione per le fettine privo di  $\text{Cl}^-$  e si è avuta la conferma che tale trattamento inibisse l'attività del CRT (fig.64).



**Fig.64** l'incubazione delle fettine in medium privo di cloro impedisce l'uptake di Cr: la misurazione biochimica del contenuto di Cr tissutale rivela che trattando le fettine con Cr 2 mM si ha un aumento significativo dei contenuti di Cr (che viene quindi captata dal tessuto), mentre la stessa incubazione con medium privo di  $\text{Cl}^-$  determina addirittura una diminuzione del contenuto di Cr tissutale rispetto ai controlli. Ciò conferma che l'incubazione in medium privo di  $\text{Cl}^-$  impedisce il reuptake di Cr e quindi ha la funzione di blocco del CRT. <sup>213</sup>

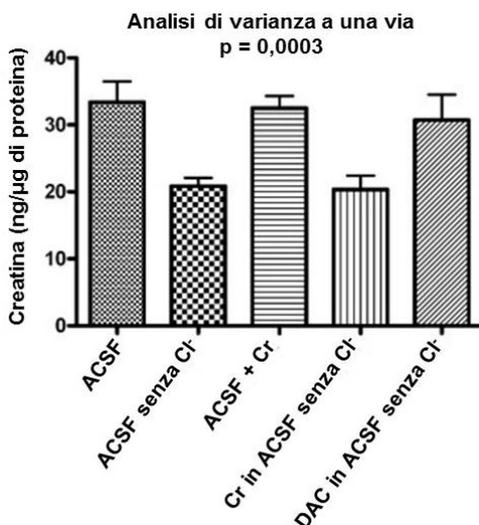
L'incubazione delle fettine in un medium contenente DAC aumentano il contenuto in Cr delle fettine nonostante il blocco del trasportatore (fig.65)



**Fig.65 L'aumento del contenuto di Cr nei tessuti dopo trattamento con DAC 2µM:** utilizzando un medium privo di Cl<sup>-</sup>, e quindi in situazione di CrT bloccato, la DAC incubata con le fettine è in grado di aumentare significativamente il contenuto tissutale di Cr, facendo quindi supporre che essa riesca ad attraversare le barriere cellulari utilizzando un metodo alternativo all'uso del CrT e rilasciando poi Cr nel tessuto.

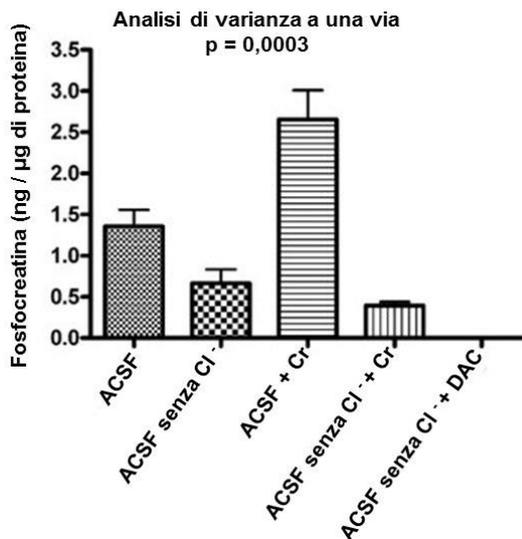
In seguito ad analisi HPLC è stato possibile verificare gli effetti del trattamento con DAC 2µM sulla concentrazione intracellulare rispettivamente di creatina e fosfocreatina nelle fettine di ippocampo (fig.66).

L'incubazione in ACSF senza cloruro diminuisce la concentrazione intracellulare di creatina all'interno delle fettine. Allo stesso modo, l'aggiunta di creatina a tale medium non comporta un aumento della concentrazione della creatina stessa a riprova del fatto che, in presenza del trasportatore bloccato (inibito dall'assenza del cloruro), la creatina non è in grado di attraversare la barriera neuronale. Il trattamento con DAC 2 µM, invece, è in grado di innalzare i livelli di creatina tissutale ai limiti della significatività.



**Fig.66 aumento della concentrazione di fosfocreatina tissutale in seguito al trattamento con DAC 2 µM in situazione di blocco del trasportatore :** vengono confrontate le attività di Cr e DAC in condizioni di blocco del trasportatore. La DAC è in grado di aumentare significativamente il contenuto di Cr tissutale in condizioni di blocco del trasportatore in modo più marcato rispetto alla Cr stessa. Quest'ultima, d'altro canto, presenta una diminuzione di attività nel medium senza Cl<sup>-</sup> rispetto a quello con il Cl<sup>-</sup>.

Il grafico seguente (fig.67) è analogo a quello appena analizzato ma relativo alla concentrazione di fosfocreatina. Come si può notare la creatina è in grado di alzare notevolmente i livelli intracellulari di fosfocreatina all'interno del tessuto quando il trasportatore è attivo, cosa che non si verifica quando quest'ultimo è inibito. In questo caso ,però, non è stato possibile rilevare concentrazioni di fosfocreatina in seguito a trattamento con DAC 2µM.

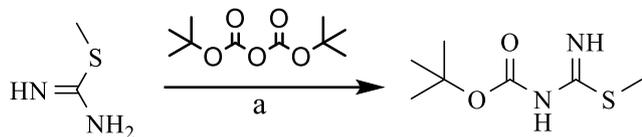


**Fig.67 aumento della concentrazione di fosfocreatina tissutale in seguito al trattamento con DAC 2 µM in situazione di blocco del trasportatore:** vengono confrontate le attività di Cr e DAC in condizioni di blocco del trasportatore. La DAC non si è mostrata in grado di aumentare il contenuto di PCr tissutale, mentre la Cr presenta una marcata diminuzione di attività nel medium senza Cl<sup>-</sup> rispetto a quello con il Cl<sup>-</sup>.

## PARTE 2: FOSFOCREATINA

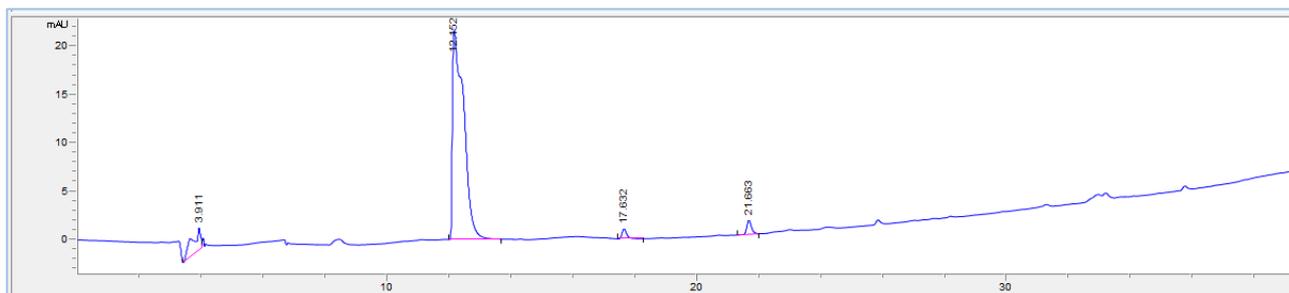
### 5.7 SINTESI DELLA FOSFOCREATINA

La nuova metodica di sintesi della fosfocreatina che è stata svolta si è articolata in cinque fasi: sintesi della t-Boc-metilisotiourea (fig.68), caratterizzata in HPLC analitico (fig.69) e spettrometria di massa (fig.70)

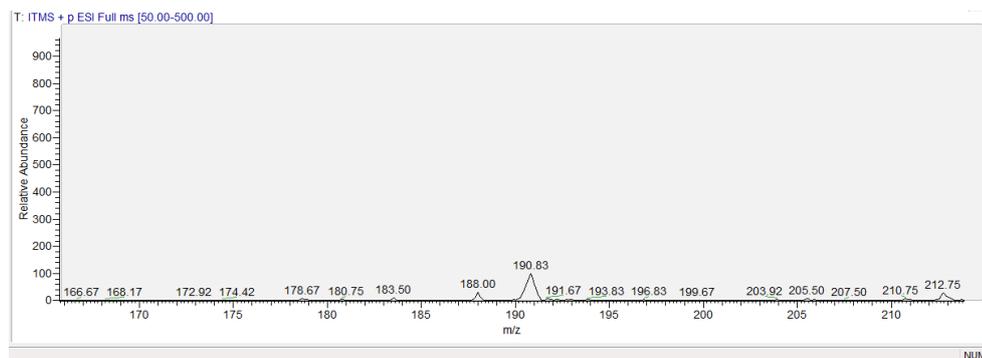


**Fig.68** sintesi della t-Boc-metilisotiourea: la S-metilisotiourea viene fatta reagire con di-tert-butilossi-dicarbonato

a) DCM, NaOH 1N, 0°C

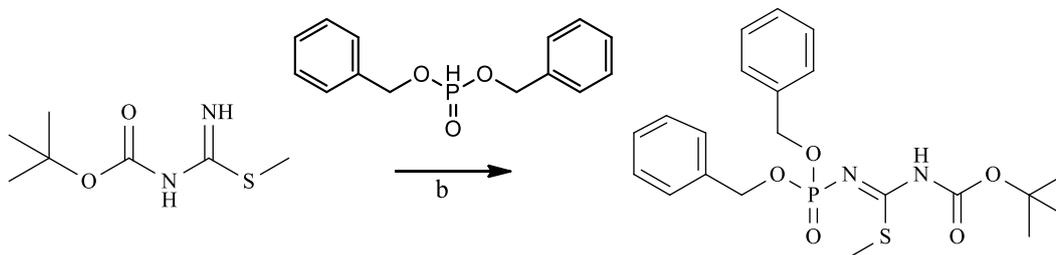


**Fig.69** HPLC analitico dell'N-tert-butilossicarbonil-S-metilisotiourea. TR 12,1 min

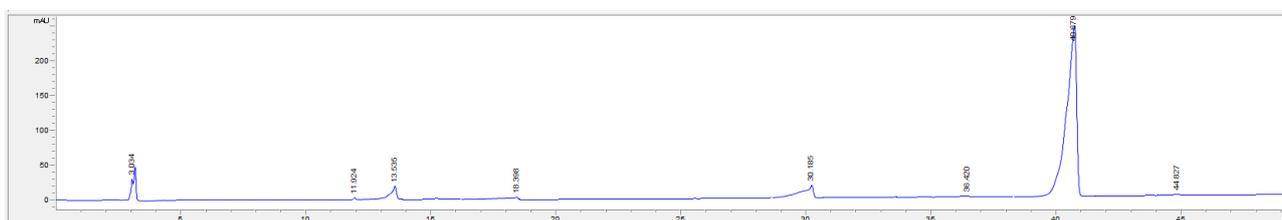


**Fig.70** Spettro di massa della t-Boc-metilisotiourea

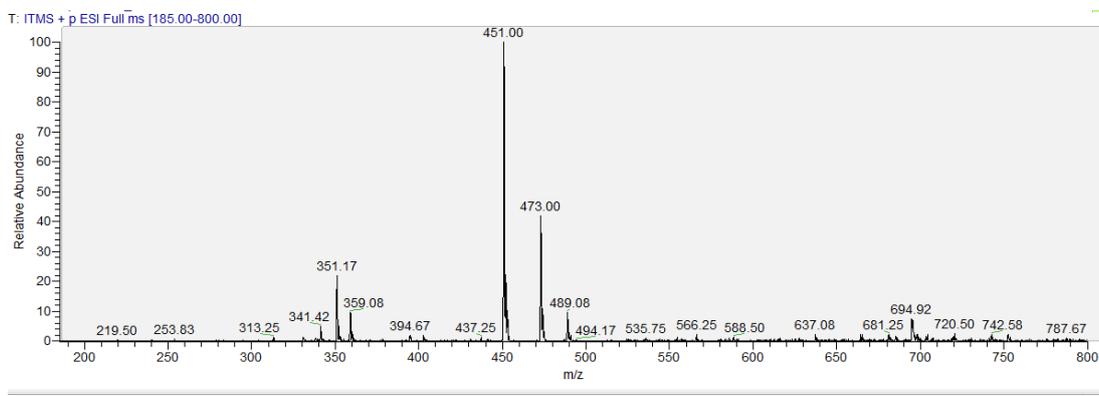
fosforilazione della t-Boc-metilisotiurea (fig.71); la caratterizzazione dell'intermedio è stata effettuata mediante HPLC analitico (fig.72) e spettrometria di massa (fig.73)



**Fig.71** la t-Boc-metilisotiurea viene fatta reagire con dibenzilfosfito. b) CCl<sub>4</sub>, NaOH 0.8 N, T.amb

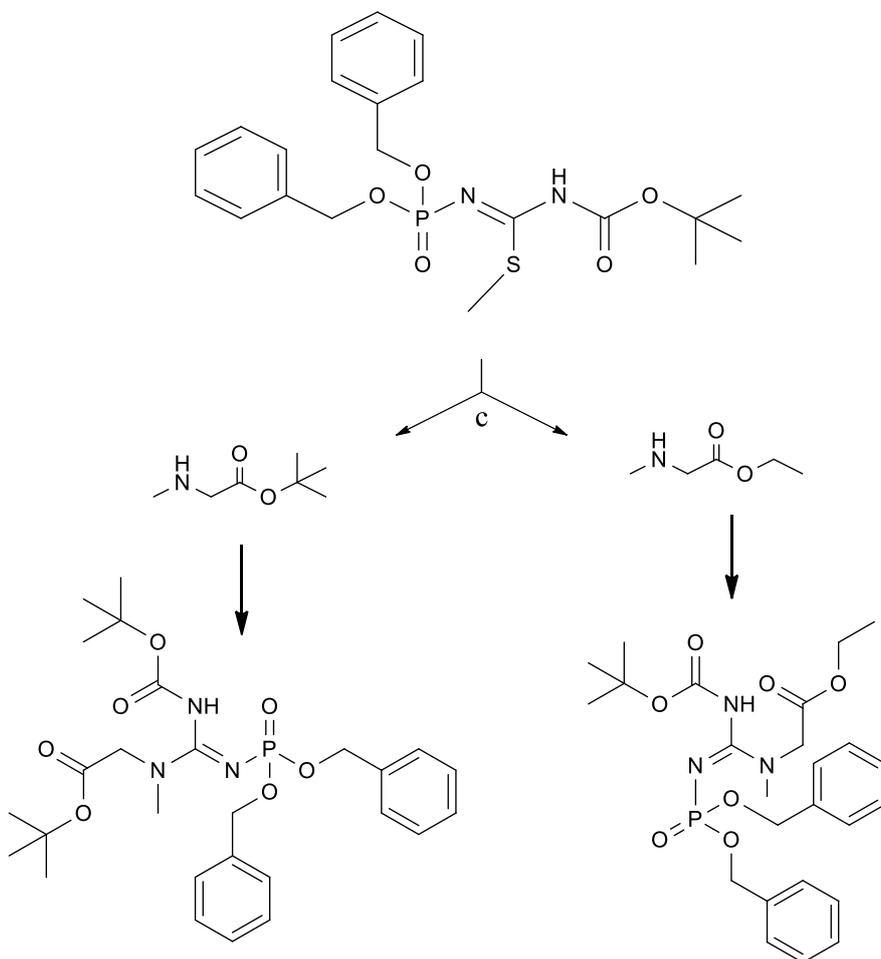


**Fig. 72** HPLC analitico del tert-butil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbammato. T<sub>R</sub>: 40,67 min

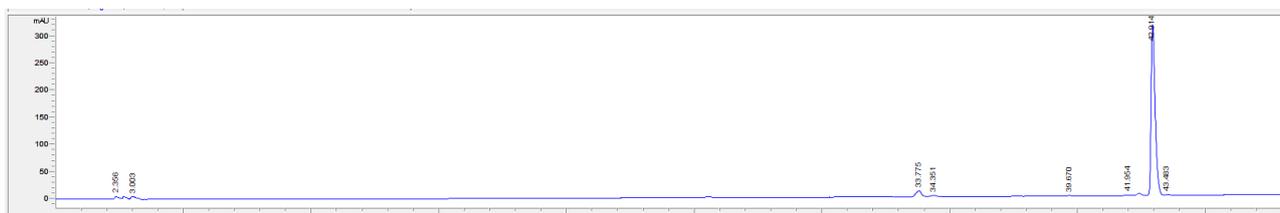


**Fig.73** spettro di massa del tert-butil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbammato. ESI-MS m/z :451 [M+H]<sup>+</sup>

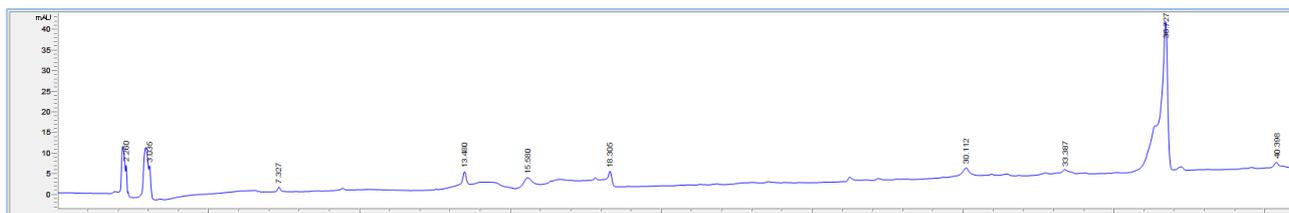
coniugazione con la sarcosina etilestere o terbutilestere (fig.74); i prodotti sono stati caratterizzati mediante HPLC analitico (fig.75,76), e spettrometria di massa (fig.77,mostrato solo lo spettro del prodotto di coniugazione con la sarcosina etilestere)



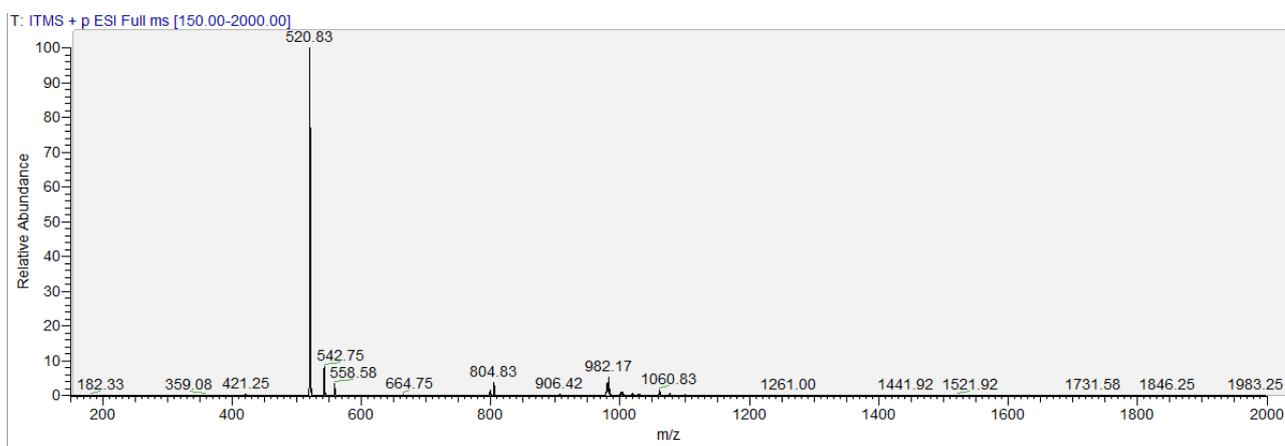
**Fig.74** coniugazione del tert-butil(((di(benzilossi)fosforil)ammino)(metiltio)metil)carbamato con sarcosina terbutilestere ed etilestere ad ottenere rispettivamente i derivati tert-butil 2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato ed etil 2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato c)  $\text{HgCl}_2$ , DMF, TEA, T.amb



**Fig.75** HPLC analitico del tert-butil 2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato.  
 $T_R$  42,91 min

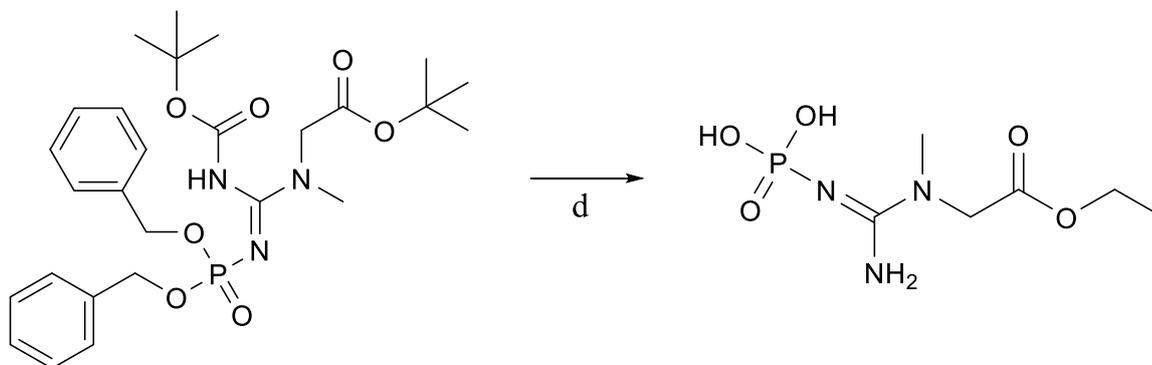


**Fig.76 HPLC analitico dell'etil 2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato.  $T_R$  36,7 min**

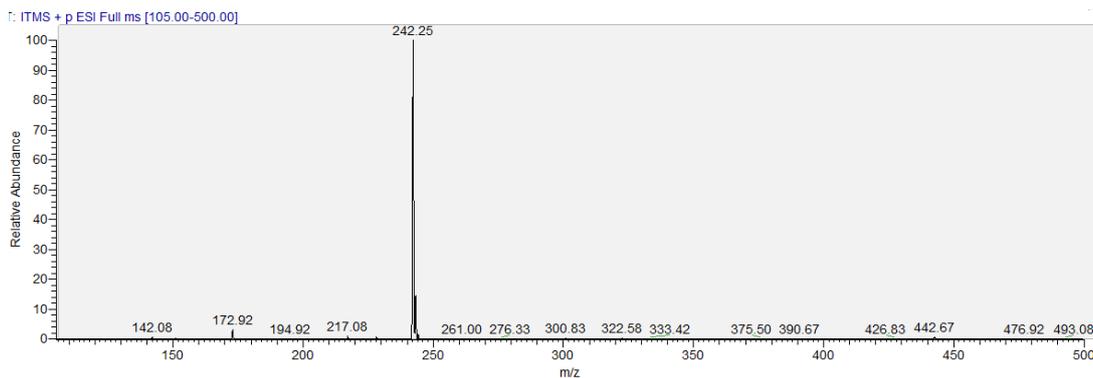


**Fig.77 spettro di massa dell'etil 2-(2-(di(benzilossi)fosforil)-3-(tert-butilossicarbonil)-1-metilguanidino)acetato. ESI-MS m/z: 520  $[M+H]^+$**

rimozione dei gruppi protettori benzilici e t-Boc (fig.78); il prodotto è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa (fig.79)

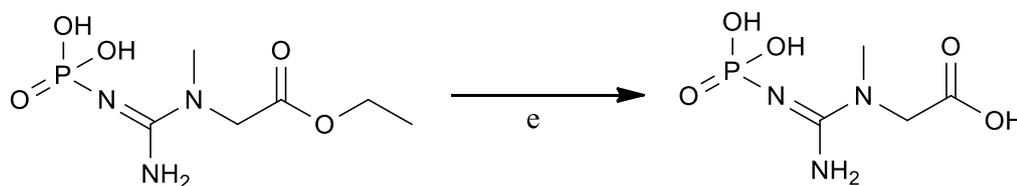


**Fig.78 Rimozione dei gruppi protettori d) TFA:DCM 1:1 0°C**

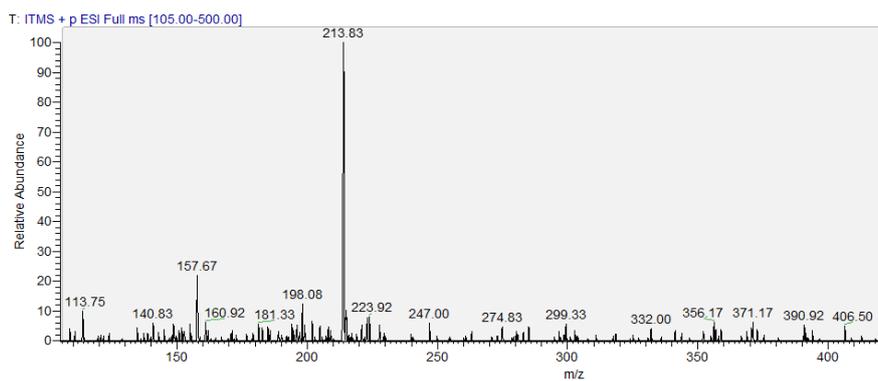


**Fig.79 spettro di massa dell'acido ammino((2-etossi-2-ossietil)(metil)ammino)metilene fosforamidico (fosfocreatina etilestere) ESI-MS m/z: 242 [M+H]<sup>+</sup>**

idrolisi enzimatica del gruppo estereo ed ottenimento della molecola finale fosfocreatina (fig.80); il prodotto è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa (fig.81)



**Fig.80 idrolisi della fosfocreatina etilestere e) PLE, CH<sub>3</sub>OH, T.amb**



**Fig.81 spettro di massa dell'acido 2-(1-metil-2-fosfoguanidino)-acetico (fosfocreatina) ESI-MS m/z: 213,83 [M+H]<sup>+</sup>**

Ognuna delle fasi è stata monitorata mediante HPLC analitico e ogni prodotto intermedio è stato caratterizzato mediante spettrometria di massa, fino alle ultime due fasi di rimozione dei gruppi protettori e dell'idrolisi, che invece sono state seguite soltanto mediante spettrometria di massa.

## CAPITOLO 6

### CONCLUSIONI

#### *PARTE 1*

Il deficit del trasportatore SLC6A8 è una rara malattia genetica responsabile di alterazioni dello sviluppo neurocognitivo causato dalla carenza cerebrale di creatina. La creatina, essendo un amminoacido estremamente polare, può attraversare le membrane cellulari solo mediante il suo trasportatore specifico e pertanto, nel contesto di questa patologia dove si ha un deficit funzionale del trasportatore, essa non può passare dal plasma al cervello mediante la BEE e neanche le è permesso il passaggio a livello intracerebrale tra le cellule che la sintetizzano e quelle che ne effettuano l'uptake. Tuttavia anche in presenza del trasportatore la creatina attraversa la BEE e le membrane cellulari lentamente e con difficoltà, pertanto alcune malattie neurologiche in cui si verifica ischemia a livello cerebrale potrebbero trarre giovamento da un massivo e rapido accumulo di creatina nel cervello. L'obiettivo di questa tesi è stato quello di sviluppare e testare derivati della creatina con caratteristiche che ne permettessero il passaggio attraverso le barriere biologiche in condizione di assenza di funzionalità dell' SLC6A8. Derivati con tali caratteristiche potrebbero essere proposti quali profarmaci per la terapia del Deficit del trasportatore SLC6A8 e di altre malattie neurologiche. La sintesi dei derivati della creatina ha seguito due diverse strategie:

1. la modificazione della struttura chimica della creatina in modo tale da ottenere un profarmaco molto più lipofilo della molecola madre, che potesse passare le membrane biologiche per diffusione passiva
2. la sintesi di derivati in cui la creatina sia legata covalentemente ad una molecola che possa utilizzare un trasportatore diverso dall'SLC6A8, in questo caso il trasportatore degli esosi.

Per quanto riguarda la prima strategia, la sintesi dei derivati lipofili è stata effettuata dalla reazione tra un agente guanilante, a cui si sono aggiunti gruppi acetilici sulla funzione guanidinica, con un amminoacido esterificato. Con tale metodo di sintesi si sono ottenuti i derivati della diacetilcreatina, etilestere e terbutilestere ed i derivati del guanidinoacetato, precursore demetilato della creatina, il diacetilguanidinoacetato metilestere ed etilestere, mentre due esteri dell'acido guanidinoacetico e precisamente il guanidinoacetato etilestere e benzilestere sono stati sintetizzati per esterificazione diretta. Sono state valutate le stabilità in mezzo ACSF di entrambi i derivati della diacetilcreatina e del diacetilguanidinoacetato etilestere, con risultati ottimali (rispettivamente 5,19 e 66 ore di emivita), che hanno quindi posto un buon punto di partenza per i successi test biologici. Sono stati testati gli effetti sulla vitalità di fettine di ippocampo mediante esperimenti di elettrofisiologia dei composti diacetilcreatina etilestere e diacetilguanidinoacetato etilestere, per valutarne la concentrazione tossica e quindi trovare la concentrazione ottimale per poter effettuare i successivi test. Per quanto

riguarda la diacetilcreatina etilestere, tale molecola ha mostrato un effetto di abbassamento della vitalità delle fettine a concentrazioni superiori a 2 per cui i successivi test si sono svolti con concentrazioni dell'ordine di 1 e 2  $\mu\text{M}$ . La diacetilcreatina etilestere (DAC) è un composto altamente lipofilo che viene assorbito molto efficacemente dalle sezioni cerebrali, alle quali conferisce un aspetto traslucido. Tuttavia, questo massivo assorbimento potrebbe danneggiare l'attività neuronale delle fettine di ippocampo avvolgendo fisicamente le loro membrane e/o il citoplasma compromettendone gravemente la funzione biologica. Questa ipotesi è stata almeno parzialmente supportata dalla dimostrazione che tale molecola non annulla solamente il PS ma anche il PV, che è l'espressione dell'attivazione pre-sinaptica della collaterale di Schaffer. In questo modo la diacetilcreatina etilestere ad alte concentrazioni sembrerebbe danneggiare l'attività nervosa in modo aspecifico, coerentemente con l'ipotesi di un suo effetto fisico piuttosto che biochimico. Il trattamento con tale composto a 1  $\mu\text{M}$  e fino a 2  $\mu\text{M}$  non determina tossicità cellulare. Alla concentrazione di 2  $\mu\text{M}$  il composto mostra un significativo miglioramento dei danni indotti dal GPA. Dal momento che tali risultati non sono invece riscontrabili somministrando creatina esogena, questo fa supporre che la DAC, essendo più lipofila, riesca a penetrare nelle cellule e svolgere la sua azione biologica in modo indipendente dal trasportatore. Il fatto che basse concentrazioni di DAC risultino efficaci nel contrastare il danno indotto da GPA sulla sopravvivenza delle fettine, indica che questa sostanza è in grado di contrastare l'effetto del blocco del trasportatore in condizioni fisiologiche, e quindi potrebbe essere utile nel curare il deficit del trasportatore della creatina. Ciò è confermato dal fatto che, in presenza del trasportatore bloccato, la DAC è in grado di alzare i valori di creatina tissutale, fenomeno che non si verifica per esempio con la somministrazione di creatina esogena. Al contrario non sono stati riscontrati effetti positivi sull'incremento dei valori di fosfocreatina tissutale in seguito a somministrazione della medesima molecola. Per quanto riguarda i danni indotti da anossia, la DAC non ha mostrato capacità migliorative sulla vitalità cellulare in presenza del blocco del trasportatore e non è in grado di migliorare il danno neuronale in seguito ad un evento anossico. Questo potrebbe essere ricondotto al fatto che la bassa concentrazione della molecola (DAC 2  $\mu\text{M}$ ) può non essere sufficiente a contrastare tale gravissimo danno; tuttavia concentrazioni più elevate indurrebbero a loro volta un ulteriore insulto determinato dalla tossicità della molecola stessa. Il derivato diacetilguanidinoacetato etilestere invece non ha mostrato tossicità anche a concentrazioni più elevate (intorno a 100  $\mu\text{M}$ ) tale da permetterne il possibile utilizzo anche a concentrazioni così alte. Per quanto riguarda la seconda strategia impiegata, la natura zwitterionica della creatina ha reso necessario l'utilizzo di una forma modificata di creatina, denominata (Boc)<sub>2</sub>-creatina, da utilizzare come intermedio di sintesi per superare le limitazioni chimiche della molecola madre. Tale molecola presenta due gruppi tert-butile (t-Boc) su due atomi di azoto del gruppo guanidinico per permettere alla stessa di reagire unicamente con il gruppo carbossilico. Essa è in grado quindi di reagire con composti nucleofili dopo opportuna attivazione del suo gruppo carbossilico. Essa è anche facilmente solubile nei solventi organici, non degrada a creatinina ed è estremamente stabile. Mediante questo

intermedio è stato possibile sintetizzare due derivati glucidici della creatina, creatina-glucosio e creatina-glucosamina, in cui la porzione glucidica è legata alla creatina rispettivamente con un legame estereo ed ammidico; Tali derivati sono stati infatti pensati per riuscire a trasportare la creatina attraverso le membrane biologiche per poi rilasciarla all'interno della cellula per poter esercitare i propri effetti benefici. Sono in corso prove biologiche a supporto di tale teoria e per dimostrare come tale strategia possa fornire in futuro molecole utili per diventare profarmaci derivati della creatina da utilizzare per la cura del Deficit del trasportatore SLC6A8 e nella terapia umana di altre gravi malattie neurologiche.

## **PARTE 2**

Il secondo argomento sviluppato durante questo lavoro di tesi è stato la messa a punto di una metodica per la sintesi di fosfocreatina in buona resa e purezza. La fosfocreatina esogena viene infatti prodotta con il nome di "Neoton" dalla casa farmaceutica Alfa Wasserman S.p.A. (Italia), ed assieme alla corvitina (quercetina idrosolubile) e al preductal (trimetazidin), fa parte del gruppo di farmaci metabolici utilizzati nella protezione del miocardio in aggiunta alle soluzioni cardioplegiche, allo scopo di ottenere un recupero più rapido dopo interventi di cardiocirurgia. In particolare il Neoton somministrato per via parenterale previene lo sviluppo di aritmie ventricolari (soprattutto la fibrillazione ventricolare) in situazioni di ischemia acuta del miocardio. La fosfocreatina infatti esercita un duplice effetto che la rende un potenziale agente terapeutico cardioprotettivo: l'attività di conservazione dell'energia miocardica mediante il ripristino delle riserve di ATP e l'azione protettiva verso le membrane biologiche, legandosi ad esse ed esercitando un forte effetto stabilizzante contro stress meccanici o ossidativi. La maggior parte delle metodiche pubblicate finora per la sintesi della fosfocreatina conducono ad un prodotto ottenuto in bassa resa e con molti sottoprodotti; la bassa resa è probabilmente dovuta ad una scarsa reattività dell'agente guanilante utilizzato, quando esso è costituito da un derivato della cianoammide. Per aumentare la reattività dell'agente guanilante utilizzato, si è deciso di utilizzare un agente guanilante recante un gruppo protettivo ed in particolare il gruppo tert-butossi carbonilico (t-Boc) che si è rivelato essere il più appropriato oltre ad aumentare notevolmente la solubilità della molecola nei solventi organici. Come agente guanilante è stata utilizzata la S-metilisotiourea, cui è stato aggiunto un gruppo protettore t-Boc su uno dei due atomi di azoto guanidinici; in seguito è stata fosforilata inserendo il gruppo fosfato recante due gruppi benzilici come gruppi protettori ed infine la molecola è stata coniugata con la sarcosina etilestere, per ottenere l'estere etilico della fosfocreatina. L'idrolisi dell'estere ha permesso l'ottenimento di un prodotto in buona resa e purezza. (Resa: 48%, purezza 98%).

## BIBLIOGRAFIA

1. Fiske, C. H.; Subbarow, Y. The Nature of the "Inorganic Phosphate" in Voluntary Muscle. *Science* **1927**, 65, 401-3.
2. Harris, R.C.; Soderlund, K; Hultman, E. Elevation of Creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond)* **1992**, 83, 367-74.
3. Wyss, M.; Kaddurah-Daouk, R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* **2000**, 80, 1107-213.
4. Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E. Creatine metabolism and the urea cycle. *Mol Genet Metab* **2010**, 100 Suppl 1, S49-52.
5. da Silva, R. P.; Nissim, I; Brosnan, M. E.; Brosnan, J. T. Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**, 296, E256-61.
6. Stead, L. M. ; Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E.; Vance, D. E.; Jacobs, R. L. Is it time to reevaluate methyl balance in humans? *Am J Clin Nutr* **2006**, 83, 5-10.
7. Brosnan, J. T.; Brosnan, M. E. Creatine: endogenous metabolite, dietary and therapeutic supplement. *Annu Rev Nutr* **2007**, 27, 241-61.
8. Edison, E. E.; Brosnan, M. E.; Meyer, C.; Brosnan, J. T. Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* **2007**, 293, F1799-804.
9. Walker J. B. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **1979** 50:177-242.
10. Cannata, D. J.; Ireland, Z.; Dickinson, H.; Snow, R. J.; Russel, A. P.; West, J. M.; Walker, D. W. Maternal creatine supplementation from mid-pregnancy protects the diaphragm of the newborn spiny mouse from intrapartum hypoxia-induced damage. *Pediatr Res* **2010**, 68, 393-8.
11. Ohtsuki, S.; Tachikawa, M.; Takanaga, H.; Shimizu, H.; Watanabe, M.; Hosoya, K.; Terasaki, T. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**, 22:1327-35.
12. Guimbal, C; Kilimann, M. W. A Na<sup>+</sup>-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart and kidney. cDNA cloning and functional expression. *J Biol Chem* **1993**, 268, 8418-21.
13. Nash, S. R.; Giros, B.; Kingsmore, S. F.; Rochell, J. M.; Suter, S. T.; Gregor, P.; Seldin, M. F.; Caron, M. G. Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels* **1994**, 2, 165-74.
14. Gregor, P.; Nash, S. R.; Caron, M. G.; Seldin, M. F.; Warren, S. T. Assignment of the creatine transporter gene (SLC6A8) to human chromosome Xq28 telomeric to G6PD. *Genomics* **1995**, 25, 332-3.

15. Sandoval, N; Bauer, D.; Brenner, V.; Coy, J. F.; Drescher, B.; Kioschis, P.; Korn, B.; Nyakatura, G.; Poustka, A.; Reichwald, K.; Rosenthal, A.; Platzer, M. The genomic organization of a human creatine transporter (CRTR) gene located in Xq28. *Genomics* **1996**, 35, 383-5.
16. Iyer, G. S.; Krahe, R.; Goodwin, L. A.; Doggett, N. A.; Siciliano, M. J.; Funanage, V. L.; Proujansky, R. Identification of a testis-expressed creatine transporter gene at 16p11.2 and confirmation of the X-linked locus to Xq28. *Genomics* **1996**, 34, 143-6.
17. Walzel, B.; Speers, O.; Boehm, E.; Kristiansen, S.; Chan, S.; Clarke, K.; Magyar, J.; Richter, E.A.; Wallimann, T. New creatine transporter assay and identification of distinct creatine transporter isoforms in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2002**, 283: E390-E401.
18. Walzel, B.; Speers, O.; Zanolta, E.; Eriksson, O.; Bernardi, P.; Wallimann, T. Novel mitochondrial creatine transport activity. *J Biol Chem* **2002**, 277:37503-37511.
19. Sora, I.; Richman, J.; Santoro, G.; Wei, H; Wang, Y.; Vanderah, T.; Horvath, R.; Nguyen, M.; Waite, S.; Roeske, W.R.; et al. The cloning and expression of a human creatine transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 204, 419-27.
20. Wallimann, T.; Tokarska-Schlattner, M.; Schlattner, U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* **2011**, 40, 1271-96.
21. 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**, 31, 230-9.
22. Braissant, O.; Henry, H.; Loup, M.; Eilers, B.; Bachmann, C. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* **2001**, 86, 193-201.
23. Dringen, R.; Verleysdonk, S.; Hamprecht, B.; Willker, W.; Leibfrit, D.; Brand, A. Metabolism of glycine in primary astroglial cells: Synthesis of creatine, serine and glutathione. *Journal of Neurochemistry* **1998**, 70, 835-840.
24. Beard, E.; Braissant, O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem* **2010**, 115, 297-313.
25. Tachikawa, M.; Fujinawa, J.; Takahashi, M.; Kasai, Y.; Fukaya, M.; Sakai, K.; Yamazaki, M.; Tomi, M.; Watanabe, M.; Sakimura, K.; Terasaki, T.; Hosoya, K. Expression and possible role of creatine transporter in the brain and at the blood-cerebrospinal fluid barrier as a transporting protein of guanidinoacetate, an endogenous convulsant. *J Neurochem* **2008**, 107, 768-78.
26. Tachikawa, M.; Kasai, Y.; Takahashi, M.; Fujinawa, J.; Kitaichi, K.; Terasaki, T.; Hosoya, K. The blood-cerebrospinal fluid barrier is a major pathway of cerebral creatinine clearance: involvement of transporter-mediated process. *J Neurochem* **2008**, 107, 432-42.
27. Carducci, C.; Santagata, S.; Adriano, E.; Artiola, C.; Thellung, S.; Gatta, E.; Robello, M.; Florio, T.; Antonozzi, I.; Leuzzi, V.; Balestrino, M. In vitro study of uptake and synthesis of creatine and its precursors by cerebellar granule cells and astrocytes suggests some hypotheses on the physiopathology of the inherited disorders of creatine metabolism. *BMC Neurosci*, **2012** 13, 41.

28. Braissant, O.; Beard, E.; Torrent, C.; Henry, H.; Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiol Dis* **2010**, 37, 423-33.
29. Saks, V.; Chernousova, G.; Gukovsky, D.; Smirnov, V.; Chazov, E. Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isoenzyme of creatine phosphokinase: kinetic properties and regulatory action of Mg<sup>2+</sup> ions. *Eur J Biochem*, **1975**, 57, 273-290.
30. Seraydarian, M.; Abbott, B. The role of the creatine-phosphorylcreatine system in muscle. *J Mol Cell Cardiol* J, **1976**, 8-10, 741-6.
31. Joseph, J; Cardesa, A.; Carreras, J. Creatine kinase activity and isoenzymes in lung, colon and livercarcinomas. *Br J Cancer*, **1997**, 76-5: 600-5.
32. Griffiths, J; Creatine kinase isoenzyme 1. *Clin Lab Med* ,**1982**, 2-3, 493-506.
33. Walliman,T.; Wyss, M.; Brdiczka, D.; Nicolay, K.; Eppenberger, H.M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem J* ,**1992**, 281 (Pt 1), 21-40.
34. Longo, N; Ardon, O.; Vanzo, R.; Schwartz, E.; Pasquali, M. Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **2011**, 157, 72-8.
35. Bessman, S.; Fonyo, A. The possible role of the mitochondrial bound creatine kinase in regulation of mitochondrial respiration. *Biochem Biophys Res Commun*, **1966**, 22-5, 597-602
36. Balestrino, M.; Young, J.; Aitken, P. Block of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain Res*, **1999**, 838, 37-44.
37. Greenhaff, PL. The creatine-phosphocreatine system: there’s more than one song in its repertoire. *J Physiol*, **2001**, 537 (Pt 3), 657.
38. Veech, R.L.; Lawson, J. W.; Cornell, N. W.; Krebs, H.A. Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem* **1979**, 254, 6538-47.
39. Nioka, S.; Argov, Z.; Dobson, G. P.; Forster, R.E.; Subramanian, H.V.; Veech, R.L.; Chance, B. Substrate regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in hypercapnic rabbit muscle. *J Appl Physiol*,**1992**, 72, 521-8.
40. Iyengar, M. Creatine kinase as an intracellular regulator. *J Muscle Res Cell Motil*, **1984** ,5, 527-34.
41. Iyengar, M.; Fluellen, C.E.; Iyengar, C. Creatine kinase from the bovine myometrium: purification and characterization. *J Muscle Res Cell Motil*, **1982**, 3, 231-46.
42. Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. “Fondamenti di biochimica”, **2003**, Ed. Zanichelli, Bologna, pag.418.
43. Kass, I.S.; Lipton, P. Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. *J Physiol*, **1982**, 332, 459-72.
44. Lawler, J.M.; Barnes, W.S.; Wu G.Y.; Song,W.; Demaree,S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**, 290,1,47-52.

45. Sestili, P.; Martinelli, C.; Bravi, G.; Piccoli, G.; Curci, R.; Battistelli, M.; Falcieri, E.; Agostini, D.; Gioacchini, A.M.; Stocchi, V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity, *Free Radic Biol Med*, **2006**, 40,837-849.
46. Guidi, C.; Potenza, L.; Sestili, P.; Martinelli, C.; Guescini, M.; Stocchi, L.; Zeppa, S.; Polidori, E.; Annibalini, G.; Stocchi, V. Differential effect of creatine on oxidatively-injured mitochondrial and nuclear DNA. *Biochim Biophys Acta*, **2008**, 1780, 16-26.
47. Sestili, P.; Martinelli, C.; Colombo, E.; Barbieri, E.; Potenza, L.; Sartini, S.; Fimognari, C. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids*, **2011**, 40, 1385-96.
48. Saraiva, A.L.; Ferreira, A.P.; Silva, L.F.; Hoffman, M.S.; Dutra, F.D.; Furian, A.F.; Oliveira, M.S.; Figuera, M. R.; Royes, L.F. Creatine reduces oxidative stress markers but does not protect against seizure susceptibility after severe traumatic brain injury. *Brain Res Bull* **2011**, 87,180-6.
49. Kolling, J.; Wyse, A.T.; Creatine prevents the inhibition of energy metabolism and lipid peroxidation in rats subjected to GAA administration. *Metab Brain Dis* **2010**, 25, 331-8.
50. Sakellaris, G.; Nasis, G.; Kotsiou, M.; Tamiolaki, M.; Charissis, G.; Evangelidou, A. Prevention of traumatic headache, dizziness and fatigue with creatine administration. A pilot study. *Acta Paediatr*, **2008**, 97, 31-451.
51. Dolder, M.; Walzel, B.; Speer, O.; Schlattner, U.; Wallimann, T. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* **2003**, 278, 17760-6.
52. O'Gorman, E.; Beutner, G.; Dolder, M.; Koretsky, A. P.; Brdiczka, D.; Wallimann, T. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett* **1997**, 414, 253-7.
53. Meyer, L. E.; Machado, L. B.; Santiago, A. P.; da-Silva, W. S.; De Felice, F. G.; Holub, O.; Oliveira, M. F.; Galina, A. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem* **2006**, 281, 37361-71.
54. Bizzi, A.; Bugiani, M.; Salomons, G. S.; Hunneman, D. H.; Moroni, I.; Estienne, M.; Danesi, U.; Jakobs, C.; Uziel, G. X-linked creatine deficiency syndrome: a novel mutation in creatine transporter gene SLC6A8. *Ann Neurol* **2002**, 52, 227-31.
55. Almeida, L. S.; Salomons, G. S.; Hogenboom, F.; Jakobs, C.; Schoffemeer, A. N. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* **2006**, 60, 118-23.
56. van de Kamp, J. M.; Jakobs, C.; Gibson, K. M.; Salomons, G. S. New insights into creatine transporter deficiency: the importance of recycling creatine in the brain. *J Inherit Metab Dis* **2012**, 36,155-6.
57. Peral, M. J.; Vazquez-Carretero, M. D.; Ilundain, A. A. Na(+)/Cl(-)/creatine transporter activity and expression in rat brain synaptosomes. *Neuroscience* **2010**, 165, 53-60. 87.

58. Watanabe, A.; Kato, N.; Kato, T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. *Neurosci Res* **2002**, 42, 279-85.
59. McMorris, T.; Mielcarz, G.; Harris, R. C.; Swain, J. P.; Howard, A. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn* **2007**, 14, 517-28.
60. Rawson, E. S.; Persky, A. M.; Price, T. B.; Clarkson, P. M. Effects of repeated creatine supplementation on muscle, plasma, and urine creatine levels. *J Strength Cond Res*, **2004**, 18, 162-7.
61. Hultman, E.; Soderlund, K.; Timmons, J. A.; Cederblad, G.; Greenhaff, P. L. Muscle creatine loading in men. *J Appl Physiol* **1996**, 81, 232-7.
62. Gualano, B.; Roschel, H.; Lancha-Jr, A. H.; Brightbill, C. E.; Rawson, E. S. In sickness and in health: the widespread application of creatine supplementation. *Amino Acids*, **2012**, 43, 519-29.
63. Persky, A. M.; Rawson, E. S. Safety of creatine supplementation. *Subcell Biochem*, **2007**, 46, 275-89.
64. Vannas-Sulonen, K.; Sipila, I.; Vannas, A.; Simell, O.; Rapola, J. Gyrate atrophy of the choroid and retina. A five-year follow-up of creatine supplementation. *Ophthalmology*, **1985**, 92, 1719-27.
65. Perasso, L.; Lunardi, G. L.; Risso, F.; Pohvozcheva, A. V.; Leko, M. V.; Gandolfo, C.; Florio, T.; Cupello, A.; Burov, S. V.; Balestrino, M. Protective effects of some creatine derivatives in brain tissue anoxia. *Neurochem Res*, **2008**, 33, 765-75.
66. Li, T.; Wang, N.; Zhao, M. Neuroprotective effect of phosphocreatine on focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Biomed Biotechnol* **2012**, 2012, 168756.
67. Gualano, B.; Artioli, G. G.; Poortmans, J. R.; Lancha Junior, A. H. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids*, **2010**, 38, 31-44.
68. Gualano, B.; V, D. E. S. P.; Roschel, H.; Artioli, G. G.; Neves, M., Jr.; De Sa Pinto, A. L.; Da Silva, M. E.; Cunha, M. R.; Otaduy, M. C.; Leite Cda, C.; Ferreira, J. C.; Pereira, R. M.; Brum, P. C.; Bonfa, E.; Lancha, A. H., Jr. Creatine in type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Med Sci Sports Exerc*, **2011**, 43, 770-8.
69. Korzun, W. J. Oral creatine supplements lower plasma homocysteine concentrations in humans. *Clin Lab Sci*, **2004**, 17, 102-6.
70. Wyss, M.; Schulze, A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience*, **2002**, 112, 243-60.
71. Nomura, A.; Zhang, M.; Sakamoto, T.; Ishii, Y.; Morishima, Y.; Mochizuki, M.; Kimura, T.; Uchida, Y.; Sekizawa, K. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol*, **2003**, 139, 715-20.
72. Brewer, G. J.; Wallimann, T. W. Protective effect of the energy precursor creatine against

- toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem*, **2000**, 74, 1968-78.
73. Genius, J.; Geiger, J.; Bender, A.; Moller, H. J.; Klopstock, T.; Rujescu, D. Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. *PLoS One*, **2012**, 7, e30554.
  74. Malcon, C.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M. F. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. *Brain Res*, **2000**, 860, 195-8.
  75. Allen, P. J. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev* **2012**, 36, 1442-62.
  76. Perasso L, Cupello A, Lunardi GL, Principato C, Gandolfo C, Balestrino M. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat. *Brain Res*, **2003**, 974, 37-42.
  77. Whittingham TS, Lipton P. Cerebral synaptic transmission during anoxia is protected by creatine. *J Neurochem*, **1981**, 37, 1618-1621.
  78. Lipton P, Whittingham TS. Reduced ATP concentration as a basis for synaptic transmission failure during hypoxia in the in vitro guinea-pig hippocampus, *J Physiol*, **1982**, 325, 51-65.
  79. Fukuzako, H. Neurochemical investigation of the schizophrenic brain by in vivo phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *World J Biol Psychiatry*, **2001**, 2, 70-82.
  80. Hoerst, M.; Weber-Fahr, W.; Tunc-Skarka, N.; Ruf, M.; Bohus, M.; Schmahl, C.; Ende, G. Metabolic alterations in the amygdala in borderline personality disorder: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Biol Psychiatry*, **2009**, 67, 399-405.
  81. New, A. S.; Hazlett, E. A.; Newmark, R. E.; Zhang, J.; Triebwasser, J.; Meyerson, D.; Lazarus, S.; Trisdorfer, R.; Goldstein, K. E.; Goodman, M.; Koenigsberg, H. W.; Flory, J. D.; Siever, L. J.; Buchsbaum, M. S. Laboratory induced aggression: a positron emission tomography study of aggressive individuals with borderline personality disorder. *Biol Psychiatry*, **2009**, 66, 1107-14.
  82. Gemar, M. C.; Segal, Z. V.; Mayberg, H. S.; Goldapple, K.; Carney, C. Changes in regional cerebral blood flow following mood challenge in drug-free, remitted patients with unipolar depression. *Depress Anxiety* **2007**, 24, 597-601.
  83. Roitman, S.; Green, T.; Osher, Y.; Karni, N.; Levine, J. Creatine monohydrate in resistant depression: a preliminary study, *Bipolar Disord*, **2007**, 9, 754-8.
  84. Alger, J. R.; Frank, J. A.; Bizzi, A.; Fulham, M. J.; DeSouza, B. X.; Duhaney, M. O.; Inscoe, S. W.; Black, J. L.; van Zijl, P. C.; Moonen, C. T.; et al. Metabolism of human gliomas: assessment with H-1 MR spectroscopy and F-18 fluorodeoxyglucose PET, *Radiology*, **1990**, 177, 633-41.
  85. Yue, Q.; Liu, M.; Nie, X.; Wu, Q.; Li, J.; Zhang, W.; Huang, X.; Gong, Q. Quantitative 3.0T MR spectroscopy reveals decreased creatine concentration in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with social anxiety disorder. *PLoS One*, **2012**, 7, e48105.
  86. Ipser, J. C.; Syal, S.; Bentley, J.; Adnams, C. M.; Steyn, B.; Stein, D. J. 1H-MRS in autism spectrum disorders: a systematic meta-analysis. *Metab Brain Dis*, **2012**, 27, 275-87.
  87. Nilsen, L. H.; Melo, T. M.; Saether, O.; Witter, M. P.; Sonnewald, U. Altered neurochemical

- profile in the McGill-R-Thy1-APP rat model of Alzheimer's disease: a longitudinal in vivo <sup>1</sup>H MRS study. *J Neurochem* **2012**, 123, 532-41.
88. Li, B. S.; Wang, H.; Gonen, O. Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain MR spectroscopy. *Magn Reson Imaging* **2003**, 21, 923-8.
  89. Czeh, B.; Michaelis, T.; Watanabe, T.; Frahm, J.; de Biurrun, G.; van Kampen, M.; Bartolomucci, A.; Fuchs, E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 98, 12796-801.
  90. Beal MF. Neuroprotective effects of creatine, *Amino Acids*, **2011**, 40,1305-13.
  91. Chaturvedi, R. K.; Beal, M. F. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci*, **2008**, 1147, 395-412.
  92. Gallant, M.; Rak, M.; Szeghalmi, A.; Del Bigio, M. R.; Westaway, D.; Yang, J.; Julian, R.; Gough, K. M. Focally elevated creatine detected in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice and Alzheimer disease brain tissue. *J Biol Chem* **2006**, 281, 5-8.
  93. Burklen, T. S.; Schlattner, U.; Homayouni, R.; Gough, K.; Rak, M.; Szeghalmi, A.; Wallimann, T. The creatine kinase/creatine connection to Alzheimer's disease: CK-inactivation, APP-CK complexes and focal creatine deposits. *J Biomed Biotechnol* **2006**, 35936.
  94. Adihetty, P. J.; Beal, M. F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med* **2008**, 10, 275-90.
  95. Matthews, R. T.; Ferrante, R. J.; Klivenyi, P.; Yang, L.; Klein, A. M.; Mueller, G.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M. F. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Exp Neurol*, **1999**,157,142-9.
  96. Investigators, N. N.-P. A pilot clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease: 18-month results. *Clin Neuropharmacol*, **2008**, 31, 141-50.
  97. Investigators, N. N.-P. A randomized, double-blind, futility clinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. *Neurology* **2006**, 66, 664-71.
  98. Klivenyi, P.; Ferrante, R. J.; Matthews, R. T.; Bogdanov, M. B.; Klein, A. M.; Andreassen, O. A.; Mueller, G.; Wermer, M.; Kaddurah-Daouk, R.; Beal, M. F. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med*, **1999**, 5, 347-50.
  99. Atassi, N.; Ratai, E. M.; Greenblatt, D. J.; Pulley, D.; Zhao, Y.; Bombardier, J.; Wallace, S.; Eckenrode, J.; Cudkovicz, M.; Dibernardo, A. A phase I, pharmacokinetic, dosage escalation study of creatine monohydrate in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, **2010**, 11, 508-13.
  100. Beal, M. F.; Ferrante, R. J. Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* **2004**, 5, 373-84.

101. Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, KaddurahDaouk R, Hersch SM, Beal MF. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*, **2000**, 20,4389-97.
102. Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Jenkins BG, Ferrante KL, Thomas M, Friedlich A, Browne SE, Schilling G, Borchelt DR, Hersch SM, Ross CA, Beal MF. Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, **2001**, 8,479-91.
103. Hersch, S. M.; Gevorkian, S.; Marder, K.; Moskowitz, C.; Feigin, A.; Cox, M.; Como, P.; Zimmerman, C.; Lin, M.; Zhang, L.; Ulug, A. M.; Beal, M. F.; Matson, W.; Bogdanov, M.; Ebbel, E.; Zaleta, A.; Kaneko, Y.; Jenkins, B.; Hevelone, N.; Zhang, H.; Yu, H.; Schoenfeld, D.; Ferrante, R.; Rosas, H. D. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH<sup>2</sup>'dG. *Neurology* **2006**, 66, 250-2.
104. Granholm L, Kaasik AE, Nilsson L, Siesjo BK. The lactate-pyruvate ratios of cerebrospinal fluid of rats and cats related to the lactate-pyruvate, the ATP-ADP, and the phosphocreatine-creatine ratios of brain tissue. *Acta Physiol Scand*, **1968**, 74, 398-409.
105. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Ann Rev Biochem*, **2002**, 71, 511-535.
106. Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol. Rev*, **2001**, 81,1065-1096.
107. Gandolfo C, Del Sette M, Balestrino M. *Malattie cerebrovascolari*. In: Loeb C., Favale E (Eds.), *Neurologia di Fazio Loeb*. Società Editrice Universo, **2003**, Rome, pp. 913-987.
108. Clarke DD, Sokoloff L. *Circulation and energy metabolism of the brain*. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, and M.D. Uhler, eds., **1999**, (New York: Lippincott-Raven), pp. 637–669.
109. Lensman M, Korzhevskii DE, Mourovets VO, Kostkin VB, Izvarina N, Perasso L, Gandolfo C, Otellin VA, Polenov SA e Balestrino M. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Research*, **2006**, 1114, 187-194.
110. Lunardi G, Parodi A, Perasso L, Pohvozcheva AV, Scarrone S, Adriano E, Florio T, Gandolfo C, Cupello A, Burov SV, Balestrino M. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience*, **2006**, 142, 991–997.
111. Perasso L, Lunari GL, Risso F, Pohvozcheva AV, Leko MV, Gandolfo C, Florio T, Cupello A, Burov SV, Balestrino M. Protective Effects of Some Creatine Derivatives in Brain Tissue Anoxia. *Neurochem Res*, **2008**, 33, 765–775.
112. Stockler, S.; Schutz, P. W.; Salomons, G. S. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem*, **2007**, 46, 149-66.
113. Schulze A. Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem*, **2003**, 244, 143–150.
114. Stöckler-Ipsiroglu S. Creatine deficiency syndromes: a new perspective on metabolic

- disorders and a diagnostic challenge. *J Pediatr*, **1997**, 131, 510-511.
115. Leuzzi V. Inborn errors of creatine metabolism and epilepsy: Clinical features, diagnosis, and treatment. *Journal of child Neurology*, **2002**, 17, Suppl 3,3S89-97; discussion 3S97.
  116. Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S. Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes. *Acta Biochimica Polonica*, **2004**, 51, 875-882.
  117. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: an introduction. *J Inher Metab Dis*, **2006**, 29, 261-74.
  118. Item, C. B.; Stockler-Ipsiroglu, S.; Stromberger, C.; Muhl, A.; Alessandri, M. G.; Bianchi, M. C.; Tosetti, M.; Fornai, F.; Cioni, G. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet*, **2001**, 69, 1127-33.
  119. Stockler, S.; Holzbach, U.; Hanefeld, F.; Marquardt, I.; Helms, G.; Requart, M.; Hanicke, W.; Frahm, J. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* **1994**, 36, 409-13.
  120. Schulze, A.; Battini, R. Pre-symptomatic treatment of creatine biosynthesis defects. *Subcell Biochem*, **2007**, 46, 167-81.
  121. Salomons GJ, van Dooren SJM, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, DeGraw TJ, Jacobs C. X-linked creatine transporter (SLC6A8 gene)defect: a new creatine deficiency syndrome. *Am J Hum Genet*, **2001**, 68,1497-1500.
  122. Cecil KM, Salomons GS, Ball WS Jr, Wong B, Chuck G, Verhoeven NM, Jakobs C, DeGraw TJ. Irreversible brain creatine deficiency with elevated serum and urine creatine: a creatine transporter defect? *Ann Neurol*, **2001**, 49, 401-4.
  123. Item BC, Stöckler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Mühl A, Alessandri MG, Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Cioni G. Arginine:Glycine Amidinotransferase Deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet*, **2001**, 69:1127-1233.
  124. Schulze A, Hess T, Wevers R, Mayatepek E, Bachert P, Marescau B, Knopp M, De Deyn PP, Bremer HJ, Rating D. Creatine deficiency syndrome caused by guanidinoacetate methyltransferase deficiency: diagnostic tools or a new inborn error of metabolism. *J Pediatr*, **1997**, 131, 626-631.
  125. Leuzzi V, Bianchi MC, Tosetti M, Carducci CI, Cerquiglini A, Cioni G, Antonozzi I. Brain creatine depletion: guanidinoacetate methyltransferasedeficiency (improving with creatine supplementation). *Neurology*, **2000**, 55, 1407-1409.
  126. Ganesan V, Johnson A, Connelly A, Eckhardt S, Surtees AH. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: new clinical features. *Pediatr Neurol*, **1997**, 17,155-157.
  127. Schulze A, Mayatepek E, Rating D. Improved treatment of guanidinoacetato methyltransferase (GAMT) deficiency. *J Inher Metab Dis*, **2000**, 23, 211.
  128. Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Marsden D, Schwartz C, Cecil KM, DeGraw TJ,

- Jakobs C. X-linked creatine transporter defect: an overview. *J Inherit Metab Dis*, **2003**, 26, 309-18.
129. Stöckler S, Schutz PW, Salomons GS. Cerebral creatine deficiency syndromes: clinical aspects, treatment and pathophysiology. *Subcell Biochem*, **2007**, 46,149-66.
130. Pyne-Geithman GJ, deGraw TJ, Cecil KM, Chuck G, Lyons MA, Ishida Y, Clark JF. Presence of normal creatine in the muscle of a patient with a mutation in the creatine transporter: A case study. *Molecular and cellular Biochemistry*, **2004**, 262, 35-39.
131. Braissant, O. Current concepts in the pathogenesis of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab*, **2010**, 100 Suppl 1, S3-S12.
132. Valle, D.; Walser, M.; Brusilow, S.; Kaiser-Kupfer, M. I.; Takki, K. Gyrate atrophy of the choroid and retina. Biochemical considerations and experience with an arginine-restricted diet. *Ophthalmology*, **1981**, 88, 325-30.
133. Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S, Salomons GS. Creatine Deficiency Syndromes. *Gene Reviews*, **2011**. Edited by Roberta A Pagon, Editor-in-chief, Margaret P Adam, Thomas D Bird, Cynthia R Dolan, Chin-To Fong, and Karen Stephens. Seattle (WA) 1993-2013.
134. Struys EA, Jansen EE, Ten Brink HJ, Verhoeven NM, van der Knaap MS, Jakobs C. An accurate stable isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric approach to the diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *J. Pharm Biomed Anal*, **1998**, 18, 659-665.
135. Carducci CI, Birarelli M, Leuzzi V, Carducci C, Battini R, Cioni G, Antonozzi I. Guanidinoacetate and creatine plus creatinina assessment in physiologic fluids: an effective tool for the biochemical diagnosis of arginine:glycine amidinotransferase and guanidinoacetate methyltransferase deficiencies. *Clin Chem*, **2002**, 48, 1772-1778.
136. Betsalel, O. T.; Pop, A.; Rosenberg, E. H.; Fernandez-Ojeda, M.; Jakobs, C.; Salomons, G. S. Detection of variants in SLC6A8 and functional analysis of unclassified missense variants. *Mol Genet Metab*, **2012**, 105, 596-601.
137. Betsalel, O. T.; Rosenberg, E. H.; Almeida, L. S.; Kleefstra, T.; Schwartz, C. E.; Valayannopoulos, V.; Abdul-Rahman, O.; Poplawski, N.; Vilarinho, L.; Wolf, P.; den Dunnen, J. T.; Jakobs, C.; Salomons, G. S. Characterization of novel SLC6A8 variants with the use of splice-site analysis tools and implementation of a newly developed LOVD database. *Eur J Hum Genet*, **2011**, 19, 56-63.
138. Jager, R.; Purpura, M.; Shao, A.; Inoue, T.; Kreider, R. B. Analysis of the efficacy, safety, and regulatory status of novel forms of creatine. *Amino Acids*, **2011**, 40, 1369-83.
139. Gualano, B.; de Salles Painelli, V.; Roschel, H.; Lugaresi, R.; Dorea, E.; Artioli, G. G.; Lima, F. R.; da Silva, M. E.; Cunha, M. R.; Seguro, A. C.; Shimizu, M. H.; Otaduy, M. C.; Sapienza, M. T.; da Costa Leite, C.; Bonfa, E.; Lancha Junior, A. H. Creatine supplementation does not impair

- kidney function in type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Eur J Appl Physiol*, **2010**, 111, 749-56.
140. Poortmans, J. R.; Kumps, A.; Duez, P.; Fofonka, A.; Carpentier, A.; Francaux, M. Effect of oral creatine supplementation on urinary methylamine, formaldehyde, and formate. *Med Sci Sports Exerc*, **2005**, 37, 1717-20.
  141. Rang, H.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; *Farmacologia*, **2010**, Cap.7 pg 98-102, Sesta Ediz., Elsevier Masson.
  142. Rang, H.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J.; *Farmacologia*, **2010**, Cap.7 pg 108, Sesta Ediz., Elsevier Masson.
  143. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood–brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, **2004**, 16, 1–13.
  144. Tilling, T.; Korte, D.; Hoheisel, D.; Galla, H. J. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem*, **1998**, 71, 1151-7.
  145. Robert, A. M.; Robert, L. Extracellular matrix and blood-brain barrier function. *Pathologie Biologie*, **1998**, 46, 535-542.
  146. Dityatev, A.; Seidenbecher, C. I.; Schachner, M. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci*, **2010**, 33, 503-12.
  147. Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauß B, Schmid EM, Öcalan M, Farrell C, Risau W. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells: effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci*, **1994**, 107, 1347-1357.
  148. Cipolla, M. J. Cerebral circulation. **2009**.
  149. Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW, Pape PC. O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with 18O<sub>2</sub> indicator-dilution technique. *J Appl Physiol*, **1985**, 58, 1929-41
  150. Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, **2010**, 37, 13-25.
  151. Omid, Y.; Barar, J. Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors. *Bioimpacts*, **2012**, 2, 5-22.
  152. Wolburg, H.; Noell, S.; Mack, A.; Wolburg-Buchholz, K.; Fallier-Becker, P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*, **2009**, 335, 75-96.
  153. Hawkins, B. T.; Davis, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, **2005**, 57, 173-85.
  154. Abbott, N. J.; Ronnback, L.; Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **2006**, 7, 41-53.
  155. Liu, S.; Agalliu, D.; Yu, C.; Fisher, M. The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr Pharm Des*, **2012**, 18, 3653-62.
  156. Pardridge, W. M. Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right? *Drug Discov Today*,

**2001**, 6, 1-2.

157. Banks WA. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol*, **2009** 12, 9 Suppl 1:S3.
158. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Res*, **1997**, 23, 3-25.
159. Thomsen LB, Lichota J, Eskehave TN, Linemann T, Mortensen JH, du Jardin KG, Moos T. Brain delivery systems via mechanism independent of receptor-mediated endocytosis and adsorptive-mediated endocytosis. *Curr Pharm Biotechnol*, **2012**, 13, 2349-54.
160. Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics*, **2004**, 104, 29– 45.
161. Deer, T. R.; Smith, H. S.; Burton, A. W.; Pope, J. E.; Doleys, D. M.; Levy, R. M.; Staats, P. S.; Wallace, M. S.; Webster, L. R.; Rauck, R. L.; Cousins, M. Comprehensive consensus based guidelines on intrathecal drug delivery systems in the treatment of pain caused by cancer pain. *Pain Physician*, **2011**, 14, E283-312.
162. Ammar, A.; Ughratdar, I.; Sivakumar, G.; Vloeberghs, M. H. Intrathecal baclofen therapy--how we do it. *J Neurosurg Pediatr*, **2012**, 10, 439-44.
163. Ramachandran, A.; Klein, R. Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome (PRES) After Combination Chemotherapy for Lymphoma. *Am J Ther*, **2012**.
164. Hanson, L. R.; Frey, W. H., 2nd. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci*, **2008**, 9 Suppl 3, S5.
165. Neuwelt, E. A.; Hill, S. A.; Frenkel, E. P. Osmotic blood-brain barrier modification and combination chemotherapy: concurrent tumor regression in areas of barrier opening and progression in brain regions distant to barrier opening. *Neurosurgery*, **1984**, 15, 362-6.
166. McDannold, N.; Vykhodtseva, N.; Raymond, S.; Jolesz, F. A.; Hynynen, K. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol*, **2005**, 31, 1527-37.
167. Vykhodtseva, N.; McDannold, N.; Hynynen, K. Progress and problems in the application of focused ultrasound for blood-brain barrier disruption. *Ultrasonics*, **2008**, 48, 279-96.
168. Chen, Y.; Liu, L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, **2011**, 64, 640-65.
169. Wu, D.; Yang, J.; Pardridge, W. M. Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *J Clin Invest*, **1997**, 100, 1804-12.
170. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, **2000**, 65, 271-84.

171. Pardridge, W. M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, **2005**, 2, 3-14.
172. Pardridge, W. M. The blood-brain barrier and neurotherapeutics. *NeuroRx*, **2005**, 2, 1-2.
173. Cornford, E. M.; Braun, L. D.; Oldendorf, W. H.; Hill, M. A. Comparison of lipid-mediated blood-brain-barrier penetrability in neonates and adults. *Am J Physiol*, **1982**, 243, C161-8.
174. Bianchi, M. C.; Tosetti, M.; Fornai, F.; Alessandri, M. G.; Cipriani, P.; De Vito, G.; Canapicchi, R. Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. *Ann Neurol*, **2000**, 47, 511-3.
175. Anselm, I. A.; Alkuraya, F. S.; Salomons, G. S.; Jakobs, C.; Fulton, A. B.; Mazumdar, M.; Rivkin, M.; Frye, R.; Poussaint, T. Y.; Marsden, D. X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis*, **2006**, 29, 214-9.
176. Poo-Arguelles, P.; Arias, A.; Vilaseca, M. A.; Ribes, A.; Artuch, R.; Sans-Fito, A.; Moreno, A.; Jakobs, C.; Salomons, G. X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis*, **2006**, 29, 220-3.
177. Arias, A.; Corbella, M.; Fons, C.; Sempere, A.; Garcia-Villoria, J.; Ormazabal, A.; Poo, P.; Pineda, M.; Vilaseca, M. A.; Campistol, J.; Briones, P.; Pampols, T.; Salomons, G. S.; Ribes, A.; Artuch, R. Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clin Biochem*, **2007**, 40, 1328-31.
178. van de Kamp, J. M.; Pouwels, P. J.; Aarsen, F. K.; ten Hoopen, L. W.; Knol, D. L.; de Klerk, J. B.; de Coo, I. F.; Huijmans, J. G.; Jakobs, C.; van der Knaap, M. S.; Salomons, G. S.; Mancini, G. M. Longterm follow-up and treatment in nine boys with X-linked creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis*, **2012**, 35, 141-9.
179. Fons, C.; Sempere, A.; Arias, A.; Lopez-Sala, A.; Poo, P.; Pineda, M.; Mas, A.; Vilaseca, M. A.; Salomons, G. S.; Ribes, A.; Artuch, R.; Campistol, J. Arginine supplementation in four patients with Xlinked creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis*, **2008**, 31, 724-8.
180. Chilosi, A.; Leuzzi, V.; Battini, R.; Tosetti, M.; Ferretti, G.; Comparini, A.; Casarano, M.; Moretti, E.; Alessandri, M. G.; Bianchi, M. C.; Cioni, G. Treatment with L-arginine improves neuropsychological disorders in a child with creatine transporter defect. *Neurocase*, **2008**, 14, 151-61.
181. Mercimek-Mahmutoglu, S.; Connolly, M. B.; Poskitt, K. J.; Horvath, G. A.; Lowry, N.; Salomons, G. S.; Casey, B.; Sinclair, G.; Davis, C.; Jakobs, C.; Stockler-Ipsiroglu, S. Treatment of intractable epilepsy in a female with SLC6A8 deficiency. *Mol Genet Metab*, **2010**, 101, 409-12.
182. Perasso, L.; Adriano, E.; Ruggeri, P.; Burov, S. V.; Gandolfo, C.; Balestrino, M. In vivo neuroprotection by a creatine-derived compound: phosphocreatine-Mg-complex acetate. *Brain Res*, **2009**, 1285, 158-63.
183. Adriano, E.; Garbati, P.; Damonte, G.; Salis, A.; Armirotti, A.; Balestrino, M. Searching for a

- therapy of creatine transporter deficiency: some effects of creatine ethyl ester in brain slices in vitro. *Neuroscience*, **2011**, 199, 386-93.
184. Fons, C.; Arias, A.; Sempere, A.; Poo, P.; Pineda, M.; Mas, A.; Lopez-Sala, A.; Garcia-Villoria, J.; Vilaseca, M. A.; Ozaez, L.; Lluch, M.; Artuch, R.; Campistol, J.; Ribes, A. Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency. *Mol Genet Metab*, **2010**, 99, 296-9.
  185. Gufford, B.T.; Ezell, E.L.; Robinson, D. H.; Miller, D.W.; Miller, N.J.; Gu, X.; Vennerstrom, J. L. pH-Dependent Stability of Creatine Ethyl Ester: Relevance to Oral Absorption, *J Diet Suppl*, **2013**, 10, 241–251.
  186. La Du, B. Plasma esterase activity and the metabolism of drugs with ester groups. *Ann N Y Acad Sci*, **1971**, 179, 684-94.
  187. Ling, J.; Kritikos, M.; Tiplady, B. Cognitive effects of creatine ethyl ester supplementation. *Behav Pharmacol*, **2009**, 20, 673-9.
  188. Garbati, P.; Salis, A.; Adriano, E.; Galatini, A.; Damonte, G.; Balestrino, M.; Millo, E. A new method to synthesize creatine derivatives. *Amino Acids*, **2013**, 45, 821-33.
  189. Burov, S.; Leko, M.; Dorosh, M.; Dobrodumov, A.; Veselkina, O. Creatinyl amino acids: new hybrid compounds with neuroprotective activity. *J Pept Sci*, **2011**, 17, 620-6.
  190. Garbati P, Adriano E, Salis A, Ravera S, Damonte G, Millo E, Balestrino M. Effects of amide creatine derivatives in brain hippocampal slices, and their possible usefulness for curing creatine transporter deficiency. *Neurochem Res*, **2014**, 39, 37-45.
  191. Kurosawa, Y.; Degrauw, T. J.; Lindquist, D. M.; Blanco, V. M.; Pyne-Geithman, G. J.; Daikoku, T.; Chambers, J. B.; Benoit, S. C.; Clark, J. F. Cyclocreatine treatment improves cognition in mice with creatine transporter deficiency. *J Clin Invest*, **2012**, 122, 2837-46.
  192. Adriano, E.; Garbati, P.; Salis, A.; Damonte, G.; Millo, E.; Balestrino, M. Creatine salts provide neuroprotection even after partial impairment of the creatine transporter. *Neuroscience*, **2017**, 340,299-307.
  193. Datsenko, V.; Moybenko, O.; Pavlyuchenko, V.; Parchomenko, A. Cardioprotective effect of exogenous phosphocreatine (Neoton) in the heart injuries of different genesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **2007**, S238-S246.
  194. Balestrino, M.; Sarocchi, M.; Adriano, E.; Spallarossa, P. Potential of creatine of phosphocreatine supplementation in cerebrovascular disease and in ischemic heart disease. Review article. *Amino Acids*, **2016**, 48,1955-1967.
  195. Taegtmeyer, H. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation*, **2004**, 110, 84-6.
  196. Neubauer, S. The Failing Heart- An Engine Out of Fuel. Review article. *N Engl J Med*, **2007**, 356, 1140-51.

197. Bessman SP; Geiger, PJ. Transport of energy in the muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science*, **1981**, 211,448-52.
198. Liao, R.; Nascimben, L.; Friedrich, J.; Gwathmey,JK, Ingwall JS. Decreased energy reserve in an animal model of dilated cardiomyopathy: relationship to contractile performance. *Circ Res*, **1996**, 78, 893-902.
199. Neubauer, S.; Horn, M.; Cramer, M; et al. Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **1997**, 96, 2190-6.
200. Landoni, G.; Zangrillo, A.; Lomivotov, VV.; Likhvantsev, V.; Ma, J.; De Simone, F.; Fominskiy, E. Cardiac protection with phosphocreatine: a meta-analysis. *Interact CardioVasc Thorac Surg*, **2016**, 23, 637-47.
201. Clark, JF. Creatine and Phosphocreatine: a Review of their use in Exercise and Sport. *Journal of Athletic Training*, **1997**, Vol 32, Nr 1, pg 48-49.
202. Tang L.; Wang, J; Zhu, G.; *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, **2009**,40, 172-173
203. Pavan, B.; Dalpiaz, A.; Ciliberti, N.; Biondi, C.; Manfredini, S.; Vertuani, S. Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. *Molecules*, **2008**, 13, 1035-1065.
204. Pardrige, W.M. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev*, **1983**, 63, 1481.535.
205. Nishizaki T, Kammesheidt A, Sumikawa K, Asada T, Okada Y. A sodium- and energy dependent glucose transporter with similarities to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessel. *Neurosci Res*, **1995**, 22, 13-22.
206. Edgar G, Shiver HE. The equilibrium between creatine and creatinine in aqueous solution. The effect of the hydrogen ion. *J Am Chem Soc*, **1925**, 47,1179–1188.
207. Windholz M, Budavari S, Stroumtsos Y, Fertig MN. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, **1976**, 9th edn. Merck, NJ.
208. Howard AN, Harris RC. Compositions containing creatine, **1999**, US Patent number 5968544 A.
209. Katseres NS, Reading DW, Shayya L, Di Cesare JC, Purser GH. Non-enzymatic hydrolysis of creatine ethyl ester. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2009**, 386:363-367.
210. Katseres NS, Reading DW, Shayya L, Di Cesare J, Purser GH. Hydrolysis of creatine ethyl ester. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **2009**, 237.
211. Trotier-Faurion A, Dézard S, Taran F, Valayannopoulos V, de Lonlay P, Mabondzo A. Synthesis and biological evaluation of new creatine fatty esters revealed dodecyl creatine ester as a promising drug candidate for the treatment of the creatine transporter deficiency. *J Med Chem*, **2013**, 56, 5173-81.

212. Balestrino M, Rebaudo R, Lunardi G Exogenous creatine delays anoxic depolarization and protects from hypoxic damage: dose-effect relationship. *Brain Res*, **1999**, 816, 124-130.
213. Dai W, Vinnakota S, Qian X, Kunze DL, Sarkar HK. Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Arch Biochem Biophys*, **1999** 361:75-84.

## RIFERIMENTI A BREVETTI:

Burov, SV.; Khromova, NV.; Khromova, AA.; Khromov PA. Amides of creatine, method of their preparation, and remedy possessing a neuroprotective activity, **2008**, US 20110269986 A1.

Chaudhuri, S.; Macdougall, J.; Peters, J.; Ramsbottom, J. Creatine-fatty acids, **2007**, WO 2008101310 A1.

Dezard, S.; Taran, F.; Trotier-Fauron, A.; Mabondzo, A. Method for preparing creatine fatty esters, creatine fatty esters thus prepared and uses thereof, **2012**, EP 2692719 A1.

Guerrato, A. Process for preparing n-(dibenzoyloxyphosphoryl)-cyanamide and processes using said compounds as intermediate for the synthesis of phosphagen substances, **1989**, EP 0150883 B1.

Heuer, M.; Molino, M.; Macdougall, J. Creatine sugar amides and salts thereof, **2009**, WO 2009143630 A1.

Jesus, A. Process for the preparation of phosphocreatine and/or phosphocreatinine, **1962**, US 3036087 A.

Miller, D.; Augustine, S.; Wagner, J.; McDonald, T.; Robinson, D. Creatine ester anti-inflammatory compounds and formulations, **2003**, US 20030212130 A1.

Oellianne P.M.J. Process for the preparation of n<sup>2</sup>-di-chlorophosphoryl-creatinine, **1972**, US 3632603 A.

Vennerstrom, J. Production of creatine esters using in situ acid production, **2005**, US 6897334 B2.

Novel method for preparing high-purity creatine phosphate sodium, **2011**, CN 102558227 B.

Synthetic method for disodium creatine phosphate, **2008**, CN 101274943 A.

Preparation method of phosphocreatine disodium salt, **2013**, CN 103172661 A.

## ABSTRACT

Maria Arkel , E.Adriano , A. Salis , G. Damonte , E. Millo , M. Balestrino , Umberto Benatti

*Synthesis of creatine derivatives for the treatment of creatine deficiency disorders*

Presentazione poster presso Riunione Nazionale dei Dottorandi di Biochimica Brallo di Pergola (PV)

07/06/2016

Presentazione poster presso 3rd International Conference on Drug Discovery and Designing, Vienna

03/10/2017

## PUBBLICAZIONI

Arkel, M.; Garbati, P.; Salis ,A.; Damonte, G.; Liessi,N.; Adriano, E.;Benatti, U.; Balestrino,M.; and Millo,E. *A novel method to synthesize phosphocreatine and phosphocreatine prodrugs*, 2017 Nov, Medicinal Chemistry Bentham Science

Adriano, E.;Gulino, M.; Arkel, M.; Salis, A.; Damonte, G.;Millo, E.; Garbati, P.; Balestrino,M. *Di-acetyl creatine ethyl ester, a new creatine derivative for the possible treatment of creatine transporter deficiency*, 2017 Sett, Neuroscience Letters

Liessi, N.; Cichero, E.; Pesce, E.; Arkel, M.; Salis, A.; Tomati, V; Paccagnella, M.; Damonte, G.; Tasso, B.; Galietta, L.; Pedemonte,N.; Fossa, P. *Synthesis and biological evaluation of novel thiazole- VX-809 hybrid derivatives as F508del correctors by QSAR-based filtering tools*, 2017 Ago, European Journal of Medicinal Chemistry