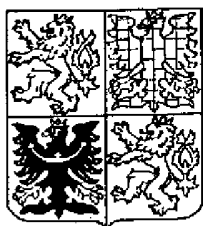


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 27.05.93
(32) 29.05.92, 30.04.93
(31) 92/891487, 93/052694
(33) US, US
(40) 13.09.95

(21) 2960-94

(13) A3

6(51)

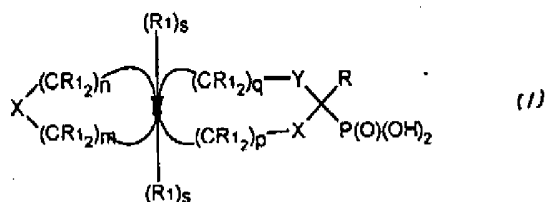
C 07 F 9/576
C 07 F 9/38
C 07 F 9/6561
C 07 F 9/572
C 07 F 9/60
A 61 K 31/66

(71) PROCTER & GAMBLE PHARMACEUTICALS, INC.,
Norwich, NY, US;

(72) Ebetino Frank H., Cincinnati, OH, US;
Kaas Susan M., Sherburne, NY, US;
Francis Marion David, Cincinnati, OH, US;

(54) Fosfonátové sloučeniny obsahující kvarterní
dusík, určené k léčení nenormálního
metabolismu vápníku a fosfátů

(57) Předkládané řešení se týká fosfonátů, které obsahují kvarterní dusík a nasycený nebo nenasycený, monocyklický nebo bicyklický cyklus, a jejich farmaceuticky přijatelných solí a esterů, které mají následující strukturu, obecného vzorce I a farmaceutických prostředků, které obsahují účinné a bezpečné množství této sloučeniny a farmaceuticky přijatelné excipienty. Dále se týká způsobů léčení nebo prevence patologických stavů charakterizovaných nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů u lidí nebo jiných savců. Tento způsob zahrnuje podávání bezpečného a účinného množství sloučeniny nebo prostředku podle předkládaného vynálezu lidem nebo jiným savcům, kteří takovou léčbu potřebují.



Fosfonátové sloučeniny obsahující kvarterní dusík, určené k léčení nenormálního metabolismu vápníku a fosfátů

Oblast techniky

ÚŘAD PRŮMYŠLEVNÍHO VLASTNICTVÍ	Došlo	20. IV. 95	Číslo 11 235 23

Tento vynález se týká nových, fosfonátových sloučenin obsahujících kvarterní dusík. Tento vynález se dále týká farmaceutických prostředků, které obsahují tyto nové sloučeniny, stejně jako způsobu léčení nebo prevence metabolických, kostních chorob, které charakterizuje nenormální metabolismus vápníku a fosfátů, pomocí sloučenin nebo farmaceutických prostředků podle předkládaného vynálezu. Konkrétně se tento vynález týká způsobu léčení nebo prevence osteoporózy a artritidy, zejména revmatické artritidy a osteoartritidy pomocí sloučenin nebo farmaceutických prostředků podle předkládaného vynálezu.

Dosavadní stav techniky

Množství patologických stavů, které postihují lidi a teplokrevné živočichy, zahrnuje nenormální metabolismus vápníku a fosfátů. Takové stavy lze rozdělit do dvou velkých kategorií:

(1) Stavy, které charakterizuje nenormální mobilizace vápníku a fosfátů, která vede k obecné nebo specifické ztrátě kostní hmoty, jako je osteoporóza a Pagetova nemoc, nebo přehnaně vysoká množství vápníku a fosfátů v tělesných tekutinách, jako je hyperkalcemie nebo počátek nádoru. Takové stavy se někdy označují jako patologická, vážná demineralizace tkání.

(2) Stavy, které jsou způsobeny nebo jsou důsledkem nenormálního ukládání vápníku a fosfátů v těle, jako je artritida, včetně revmatické artritidy a osteoartritidy. Tyto stavy se někdy označují jako patologická kalcifikace.

První kategorie zahrnuje nejběžnější metabolickou chorobu kostí, osteoporózu; osteoporóza je stav, při kterém se tvrdá kostní tkáň ztrácí neúměrně k tvorbě nové tvrdé tkáně. Osteoporózu lze obecně definovat jako snížení kvality kostí nebo atrofii kosterní tkáně. Prostor mezi morkem a kostí se zvětšuje, vláknité vazby se zeslabují a celá kost se stává křehčí. Osteoporózu lze dále klasifikovat jako menopausální, senilní, vyvolanou léky (např. adrenokortidy, která se může objevit

při steroidní léčbě), vyvolanou chorobou (artritida a nádor), atd., nicméně projevy jsou v zásadě stejné.

Obecně jsou dva typy osteoporózy: primární s sekundární. "Sekundární osteoporóza" je důsledkem různých chorobných procesů či agens. Nicméně, přibližně 90% všech případů osteoporózy jsou "primární osteoporózy". Primární osteoporóza zahrnuje postmenopausální osteoporózy, osteoporózy způsobené věkem (která postihuje většinu osob ve věku nad 70 až 80 let) a idiopatické osteoporózy, která postihují muže a ženy ve středním věku a mladší.

U některých osob postižených osteoporózou je ztráta kostní tkáně, tak velká, že způsobuje mechanické narušení kostní struktury. Často se objevují zlomeniny kostí, například kyčle a páteře u žen, které trpí osteoporózou. Výsledkem může být také kyfosa (nenormálně zvýšené prohnutí hrudní páteře).

O mechanismu ztráty kostní hmoty při osteoporóze se předpokládá, že zahrnuje nerovnováhu "obnovování kostí". Obnovování kostí probíhá celý život, díky tomu se obnovuje kostra a zachovává síla kostí. Toto obnovování zahrnuje rozpouštění a opětovné vyplnění určitých míst na povrchu kostí, pomocí organizovaných skupin buněk nazývaných "základní mnohobuněčné jednotky" ("basic multicellular units") nebo "BMU". BMU sestávají hlavně z "osteoklastů" a "osteoblastů" a jejich buněčných prekursorů. V obnovovacím cyklu je kost resorbována v místech "aktivovaných" BMU pomocí osteoklastů, které vytvoří resorpční dutinu. Tato dutina je vyplněna kostní hmotou pomocí osteoblastů.

Normálně vede obnovovací cyklus v dospělosti k malým ztrátám kostní hmoty z důvodu neúplného vyplnění resorpčních dutin. Takto se i u zdravých dospělých osob s věkem objevuje ztráta kostní hmoty. Nicméně u osob postižených osteoporózou může dojít k zvýšení počtu aktivovaných BMU. Tato zvýšená aktivita urychlí obnovování kostí, které pak vede k neobvykle vysoké ztrátě kostní hmoty.

Ačkoliv ještě nejsou zcela odhaleny důvody vzniku osteoporózy, existuje mnoho rizikových faktorů, které lze spojovat s osteoporózou. Ty zahrnují například nízkou tělesnou hmotnost, malý příjem vápníku, nízkou fyzickou aktivitu a nedostatek estrogenu.

Současná léčba osteoporózy zahrnuje především podávání vápníku a estrogenu.

Druhá kategorie zahrnuje stavy, které se projevují nenormálním ukládáním vápníku a fosfátů, včetně myositis ossificans progressiva, calcinosis universalis a takových chorob jako je artritida (včetně, například, revmatické artritidy a osteoartritidy), neuritidy, bursitidy, tendonitidy a dalších stavů, kterým předchází ukládání vápníku do tkáně.

Vedle osteoporézy, může být ztráta kostní hmoty způsobena artritidou, včetně revmatické artritidy a osteoartritidy. Rvmatická artritida je chronická, zánětlivá choroba, která postihuje celé tělo, a je charakterizována zeslabením kloubních jamek a šlach, které je následováno destrukcí chrupavky, šlach a kostí a snížením viskozity a dalšími změnami synoviální tekutiny. Příznaky revmatické artritidy jsou celkové oslabení, vysílení, místní bolest, ztuhlost, otoky a deformace kloubů. Rvmatická artritida je nejběžnější u žen mezi čtyřiceti a šedesáti lety věku.

Patogeneze revmatické artritidy, která vede k destrukci kloubů, je charakterizována dvěma fázemi: 1) exudativní fází, která zahrnuje mikrocirkulaci synoviálních buněk, která způsobí přívál plazmových proteinů a buněčných částí do kloubu a 2) chronická, zánětlivá fáze, která se objevuje v sub-synoviální a sub-chondrální kosti, která je charakterizována tím, že se v kloubním prostoru tvoří pannus (zrnitá tkáň), rozpouštěním kostí a destrukcí chrupavky. Pannus může způsobit přilnavost a zjizvení tkáně, které způsobí deformace kloubu, které jsou charakteristické pro revmatickou artritidu.

Důvody vzniku revmatické artritidy zůstávají nejasné. Byla prokázána účast infekčních agens jako jsou bakterie a viry. Nejnovější hypotéza předpokládá, že příčinou revmatické artritidy je Epsteinův-Barrův virus (EBV).

Současná léčba revmatické artritidy především zahrnuje odstraňování příznaků podáváním nesteroidních protizánětlivých léků. Léčení nesteroidními protizánětlivými léky je účinné především v ranných stadiích revmatické artritidy; je nepravděpodobné, že zmírní zánět kloubu, pokud choroba probíhá déle než rok. Zlato, methotrexát, imunosupresanty a kortikosteroidy byly testovány s omezenou úspěšností.

Na druhou stranu osteoartritida je od původu nezánnětlivá choroba pohybu kloubů, která je charakterizována zhoršením a odřením chrupavky stejně jako tvorbou nové kosti na povrchu kloubu. Jak osteoartritida postupuje, povrch chrupavky se poruší a opotřebované částice umožní přístup k synoviální tekutině,

kteřá naopak stimuluje fagocytózu pomocí buněk makrofágů. Tím se případně vyvolá při osteoartritidě zánětlivá odpověď. Běžné klinické příznaky osteoartrity zahrnují chrupavčité a kloubní zvětšení kloubů na prstech, ztuhnutí a bolestivý pohyb.

Běžné léčení příznaků osteoartrity zahrnuje analgetika, protizánětlivé léky, steroidy a fyzikální terapii.

Pro použití při léčení a profylaxi chorob, které se vyznačují nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů, bylo navrženo množství derivátů kyseliny polyfosfonové. Například množství dokumentů, které jsou zde uvedeny jako reference, popisuje prostředky, které obsahují polyfosfonaty, zejména difosfonaty, jako je 1-hydroxyethan-1,1-difosfonová kyselina ("EHDP") a její využití v inhibici nenormálního ukládání a mobilizace vápníku a fosfátů ve zvířecí tkáni: U. S. patenty 3,683,080, vydaný 8. 8. 1972 a 4,230,700, vydaný 28. 10. 1980 - oba Francis, a U. S. patent 4,868,164 - Ebetino, vydaný 19. 9. 1989. Množství dalších dokumentů popisuje substituované fosfonové kyseliny, které lze použít pro léčení osteoporózy a artritidy, a jsou zde uvedeny jako reference: U. S. patent 5,071,840 - Ebetino a kol., vydaný 10. 12. 1991, U. S. patent 4,868,164 - Ebetino a kol., vydaný 19. 9. 1989, U. S. patent 5,104,863 - Benedict a kol., vydaný 14. 4. 1992, U. S. patent 4,267,108 - Blum a kol., vydaný 12. 5. 1981, U. S. patent - Breliere a kol., vydaný 24. 5. 1988, U. S. patent 4,876,247 - Barbier a kol., vydaný 24. 10. 1989, evropská patentová publikace č. 100,718 - Breliere S. A., vydaná 15. 2. 1984, evropská patentová publikace č. 170,280 - Boeringer Mannheim GmbH, vydaná 5. 2. 1986, evropská patentová publikace č. 186,405 - Benedict a Perkins, vydaná 2. 7. 1986, evropská patentová publikace č. 298,553 - Ebetino, vydaná 11. 1. 1989, U. S. 4,754,993 - Bosies a kol., vydaný 15. 11. 1988, U. S. 4,939,130 - Jaeggi a kol., vydaný 3. 6. 1990, U. S. 4,971,958 - Bosies a kol., vydaný 20. 11. 1990, WO 91/12017 - Dunn a kol., vydaný 18. 10. 1990, WO 91/10646 - Youssefyeh R. a kol., vydaný 25. 7. 1991, AU-A-26738/88 - Jaeggi K. A., vydaný 15. 6. 1989, AU-A-45467/89 - Ciba-Geigy, vydaný 31. 5. 1990.

U. S. 4,208,401 - Bauman (přiděleno firmě Colgate-Palmolive), vydaný 17. 6. 1980 (U. S. '401) popisuje neheterocyklický kruh substituovaný kvarterními amoniiovými bisfosfonaty, které lze použít jako lék proti tvorbě kamenů.

DE 40 11 777 - Jaeggi a kol., vydaný 18. 12. 1990 (DE '777) popisuje heterocyklický kruh substituovaný difosfonátem, kde zmíněný heterocyklus může být substituován nižšími alkyly. Heterocyklus je připojen k fosfonové kyselině přes kvarterní dusíkový atom, který není součástí kruhu. DE '777 také popisuje, že sloučenina má zřetelný inhibiční účinek na resorpci kostí, a proto ji lze použít pro léčení osteoporézy, zánětlivých a degenerativních kloubních onemocnění, peridontitidy a hyperparathyroidismu. Objevy popsané v těchto referencích jsou zde zahrnuty jako reference.

Žádná z těchto referencí nicméně nepopisuje použití cyklických fosfonatových sloučenin, které obsahují kvarterní dusík, v prevenci a léčení osteoporézy, revmatické artritidy a osteoartritidy.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mají osteoochrannou aktivitu v místech narušení kloubu v podmínkách artritidy a poskytují tuto aktivitu při léčení artritidy navíc k pouhému ulehčení od příznaků zánětu. Termín "osteoochranná aktivita" tak, jak se používá v tomto dokumentu, znamená aktivitu, která upravuje chorobné projevy na kostech a okolní měkké tkáni v centrech narušení kloubu.

Překvapivě bylo zjištěno, že sloučeniny podle předkládaného vynálezu, v kterých cyklická fosfonatová sloučenina obsahuje dusíkový atom, který je kvarternizován, má větší antiresorpční aktivitu a terapeutické využití pro léčení osteoporézy a artritidy, než aktivní sloučeniny, které obsahují dusík, který není kvarternizován. Navíc sloučeniny podle předkládaného vynálezu vykazují dobré rozpouštěcí vlastnosti. Díky tomu mohou být sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou dobře orálně absorbovány. Lépe se absorbující a účinnější sloučeniny lze podávat v nižších dávkách. Nižší dávky jsou obecně preferovány, protože se sníží nežádoucí vedlejší efekty.

Proto je předmětem předkládaného vynálezu poskytnout nové účinnější sloučeniny, které jsou účinnější inhibiční agens resorpce kostí, které lze použít pro léčení osteoporézy, a protiartritidní agens, které lze použít pro léčení artritidy, zejména osteoartritidy a revmatické artritidy. Dalším předmětem předkládaného vynálezu je poskytnout farmaceutický prostředek, který lze použít pro léčení a profylaxi nenormálního metabolismu vápníku a fosfátů. Navíc je předmětem předkládaného vynálezu poskytnout způsob léčení nebo prevence chorob, které

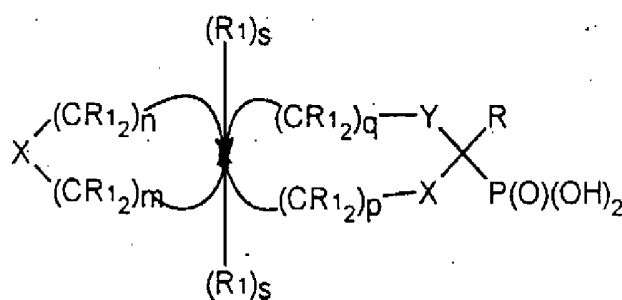
jsou charakterizovány nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů u lidí a ostatních savců.

Tyto a další předměty předkládaného vynálezu budou objasněny z detailního popisu předkládaného vynálezu uvedeného dále.

Podstata vynálezu

Shrnutí vynálezu

Předkládaný vynález se týká fosfonatů, které obsahují kvarterní dusík a nasycený nebo nenasycený, monocyklický nebo bicyklický kruh, a jejich farmaceuticky přijatelných solí a esterů, které mají následující strukturu, obecného vzorce I:



kde

- (a) X a Y jsou nezávisle na sobě buď nic nebo O, S, NR^1 a $\text{N}^+(\text{R}^2)_2$, pokud žádné R^1 není $\text{N}^+(\text{R}^2)_3$, pak musí být alespoň jedno z dvojice X a Y $\text{N}^+(\text{R}^2)_2$
- (b) m a n a m+n jsou celá čísla od 0 do 5, p a q a p+q jsou celá čísla od 0 do 3
- (c) s je celé číslo od 0 do 2 a když m+n = 0 a X není nic pak s = 2
- (d) každé R^1 je nezávisle buď nic a nebo je vybráno ze skupiny sestávající z $\text{N}^+(\text{R}^2)_3$, R^3SR^6 , SR^6 , vodíku, hydroxyly, substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu C_1 až C_8 , $-\text{OR}^3$, $-\text{CO}_2\text{R}^3$, $-\text{O}_2\text{CR}^3$, NR^3_2 , $-\text{N}(\text{R}^3)\text{C(O)}\text{R}^3$, $-\text{C(O)}\text{N}(\text{R}^3)_2$, halogenu, $-\text{C(O)}\text{R}^3$, arylalkylu, nitroskupiny, substituovaného nebo nesubstituovaného arylu a jejich kombinací

- (e) každé R^2 je nezávisle buď nic a nebo je vybráno ze skupiny sestávající ze substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu C_1 až C_{35} , substituovaného nebo nesubstituovaného fenylu, benzylu nebo R^9SR^6
- (f) každé R^3 je nezávisle vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu C_1 až C_8 a R^9SR^6
- (g) každé R^6 je nezávisle vybráno ze skupiny sestávající z H , $-C(O)R^7$, $C(O)OR^7$, $C(S)OR^7$, $C(S)R^7$, $C(O)NR^7_2$, $C(S)NR^7_2$, kde R^7 je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8
- (h) R je $COOH$, SO_3H_2 , PO_3H_2 nebo $P(O)(OH)R_4$, kde R_4 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 a
- (i) R^9 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 .

Předkládaný vynález se dále týká farmaceutických přípravků, které obsahují bezpečné a účinné množství sloučeniny podle předkládaného vynálezu a farmaceuticky přijatelných excipientů. Vynález se týká způsobů léčení nebo prevence patologických stavů, které jsou charakterizovány nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů u lidí nebo jiných savců. Tento způsob léčení zahrnuje podávání bezpečného a účinného množství sloučeniny nebo prostředku podle předkládaného vynálezu lidem nebo jiným savcům, kteří to potřebují.

Definice a použití termínů

Následuje seznam definic termínů, které jsou použity v tomto dokumentu.

"Heteroatom" je atom dusíku, síry nebo kyslíku. Skupina, která obsahuje jeden nebo více heteroatomů může obsahovat různé heteroatomy.

"Alkyl" je substituovaný nebo nesubstituovaný uhlovodíkový řetězec, který, pokud je nasycený, obsahuje od 1 do 8 atomů uhlíku a s výhodou, pokud není uvedeno jinak, od 1 do 4 atomů uhlíku, pokud je nenasycený, obsahuje od 2 do 8 atomů uhlíku a s výhodou, pokud není uvedeno jinak, od 2 do 4 atomů uhlíku. Takže termín "alkyl" tak, jak je použit v tomto dokumentu, zahrnuje alkenylové nenasycené řetězce, které mají přinejmenším jednu dvojnou vazbu a alkinylové nenasycené řetězce, které mají přinejmenším jednu trojnou vazbu. Preferované alkylové skupiny jsou methyl, ethyl, propyl, isopropyl a butyl, ale tímto výčtem nejsou nijak omezeny.

"Heteroalkyl" je substituovaný nebo nesubstituovaný, nasycený řetězec, který má 3 až 8 členů a obsahuje uhlíkové atomy a jeden nebo dva heteroatomy.

"Karbocyklický kruh" nebo "karbocyklus" tak, jak je použit v tomto dokumentu je substituovaný nebo nesubstituovaný, nasycený, nenasycený nebo aromatický uhlovodíkový cyklus. Karbocykly mohou být monocyklické nebo polycyklické. Monocyklické kruhy obecně obsahují od 3 do 8 atomů, s výhodou od 5 do 7 atomů. Polycyklické kruhy obsahující dva kruhy obsahují od 6 do 16, s výhodou od 10 do 12 atomů, a ty se třemi kruhy obecně obsahují od 13 do 17, s výhodou od 14 do 15 atomů.

"Heterocyklický kruh" nebo "heterocyklus" tak, jak je použit v tomto dokumentu je substituovaný nebo nesubstituovaný, nasycený, nenasycený nebo aromatický kruh, který obsahuje uhlíkové atomy a jeden nebo více heteroatomů v kruhu. Heterocykly mohou být monocyklické nebo polycyklické. Monocyklické kruhy obecně obsahují od 3 do 8 atomů, s výhodou od 5 do 7 atomů. Polycyklické kruhy obsahující dva kruhy obsahují od 6 do 16, s výhodou od 10 do 12 atomů. Polycyklické kruhy se třemi kruhy obecně obsahují od 13 do 17, s výhodou od 14 do 15 atomů. Každý heterocyklus musí obsahovat přinejmenším jeden atom dusíku. Další heteroatom může být vybrán nezávisle z dusíku, síry a kyslíku.

"Aryl" je aromatický karbocyklický kruh. Preferované arylové skupiny jsou fenylyl, tolylyl, xylylyl, kumenylyl a naftylyl, ale tímto výčtem nejsou nijak omezeny.

"Heteroaryl" je aromatický heterocyklus. Preferované heteroarylové skupiny jsou thienylyl, furylyl, pyrrolylyl, pyridinylyl, pyrazinylyl, oxazolyl, thiazolyl, chinolinylyl, pyrimidinylyl a tetrazolyl, ale tímto výčtem nejsou nijak omezeny.

"Alkoxy skupina" je kyslíkový atom, který je substituován uhlovodíkovým řetězcem, kde uhlovodíkový řetězec je alkyl nebo alkenyl (např. -O-alkyl nebo -O-alkenyl). Preferované alkoxy skupiny jsou methoxyl, ethoxyl, propoxyl a alkyloxy, ale tímto výčtem nejsou nijak omezeny.

"Hydroxyalkyl" je uhlovodíkový řetězec substituovaný hydroxylovým substituentem (např. -OH), který může mít i jiné substituenty. Preferované hydroxyalkylové skupiny jsou hydroxyethyl a hydroxypropyl, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny.

"Karboxyalkyl" je uhlovodíkový řetězec substituovaný karboxylovým substituentem (např. $-\text{COOH}$), který může mít i jiné substituenty. Preferované karboxyalkylové skupiny jsou karboxymethyl, karboxyethyl a jejich kyseliny a estery.

"Aminoalkyl" je uhlovodíkový řetězec (např. alkyl) substituovaný aminoskupinou (např. NH-alkyl), jako je aminomethylalkyl.

"Alkylamino skupina" je aminoskupina, která má jeden nebo dva alkylové substituenty (např. $-\text{N-alkyl}$), jako je dimethylamino skupina.

"Alkenylamino skupina" je aminoskupina, která má jeden nebo dva alkenylové substituenty (např. $-\text{N-alkenyl}$).

"Alkynylamino skupina" je aminoskupina, která má jeden nebo dva alkynylové substituenty (např. $-\text{N-alkynyl}$).

"Alkylimino skupina" je iminoskupina, která má jeden nebo dva alkylové substituenty (např. $-\text{N-alkyl}$).

"Arylalkyl" je alkylová skupina substituovaná arylovou skupinou. Preferované arylalkylové skupiny jsou benzyl a fenethyl.

"Arylamínová skupina" je aminová skupina substituovaná arylovou skupinou (např. $-\text{NH-aryl}$).

"Aryloxy skupina" je atom kyslíku, který má arylový substituent (např. $-\text{O-aryl}$).

"Acyl" nebo "karbonyl" je uhlík vázaný dvojnou vazbou na kyslík, např. R-C(=O) . Preferované acylové skupiny jsou acetyl, propionyl, butanoyl a benzoyl, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny.

"Acyloxy skupina" je atom kyslíku, který má acylový substituent (např. $-\text{O-acyl}$), například $-\text{O-C(=O)-alkyl}$.

"Acylamino skupina" je amino skupina, která má acylový substituent (např. $-\text{N-acyl}$), například $-\text{NH-C(=O)-alkyl}$.

"Halogen" je chlorový, bromový, jódový nebo fluorový zbytek. Chlor, brom a fluor jsou preferované halogeny.

Jako "nižší" uhlovodíková skupina (např. nižší alkyl) se v tomto dokumentu označuje uhlovodíkový řetězec, který obsahuje od 1 do 6 a s výhodou od 1 do 4, pokud není uvedeno jinak, uhlíkových atomů.

Tak jak se termín "thiosubstituent" (SR^6 nebo R^9SR^6) používá v tomto dokumentu, označuje thioly $[-\text{SH}]$, kde $\text{R}^6=\text{H}$, thioestery $[-\text{SC(O)R}^7]$, kde $\text{R}^6=\text{C(O)R}^7$, dithioestery $[-\text{SC(S)R}^7]$, kde $\text{R}^6=\text{C(S)R}^7$, thiokarbamáty $[-\text{SC(O)N(R}^7)_2]$, kde

$R^6=C(O)N(R^7)_2$, dithiokarbamáty $[-SC(S)N(R^7)_2]$, kde $R^6=C(S)N(R^7)_2$, thiouhličitaný $[-SC(O)OR^7]$, kde $R^6=C(O)OR^7$ a dithiouhličitaný $[-SC(S)OR^7]$, kde $R^6=C(S)OR^7$. R^7 je vodík nebo C_1 až C_8 alkyl. Kterýkoliv ze substituentů SR^6 může být sám substituován skupinou R^9 , kde R^9 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 . Na základě toho jsou další thiosubstituenty, označené R^9SR^6 , alkylthioly, alkylthioestery, alkylidithioestery, alkylthiokarbamáty, alkylidithiokarbamáty, alkylthiouhličitaný a alkylidithiouhličitaný.

Termín "bisfosfonat" a "bisfosfonová kyselina" tak, jak se používá v tomto dokumentu, označuje takové fosfonaty nebo fosfonové kyseliny, které mají dvě fosfonatové skupiny připojené k témuž uhlíkovému atomu, a používají se jako zaměnitelné s termínem "difosfonat" a "difosfonová kyselina". Ve vzorcích uvedených v tomto dokumentu je skupina $R PO_3H_2$.

"Farmaceuticky přijatelná" sůl je kationická sůl vytvořená jakoukoliv (např. karboxylovou) skupinou nebo anionická sůl vytvořená jakoukoliv bází (např. amino) skupinou. V této problematice je známo mnoho takových solí, jak je popsáno ve světové patentové publikaci 87/05297 - Johnston a kol., vydané 11. 9. 1987, která je zde uvedena jako reference. Preferované kationické soli jsou soli alkalických kovů (jako je sodík a draslík) a kovů alkalických zemin (jako je hořčík a vápník). Preferované anionické soli jsou halogenidy (jako je chlorid), octany a fosfáty.

"Biohydrolyzovatelný ester" je ester kvarterních, bicyklických sloučenin, které obsahují dusík, který neovlivňuje terapeutickou aktivitu sloučenin nebo je snadno lidmi nebo jinými savci metabolizován. V této problematice je známo mnoho takových esterů, jak je popsáno ve světové patentové publikaci 87/05297 - Johnston a kol., vydané 11. 9. 1987, která je zde uvedena jako reference. Takové estery jsou nižší alkylestery, nižší alkoxyalkylestery (jako jsou acetoxymethyl, acetoxyethyl, aminokarbonyloxymethyl, pivaloyloxymethyl a pivaloyloxyethyl estery), laktonylestery (jako jsou ftalidyl a thioftalidyl estery), nižší alkoxyacyloxyalkyl estery (jako jsou methoxykarbonyloxymethyl, ethoxykarbonyloxymethyl a isopropoxykarbonyloxyethyl estery), alkoxyalkylestery, cholinestery a acylaminoalkylestery (jako jsou acetamidomethylestery).

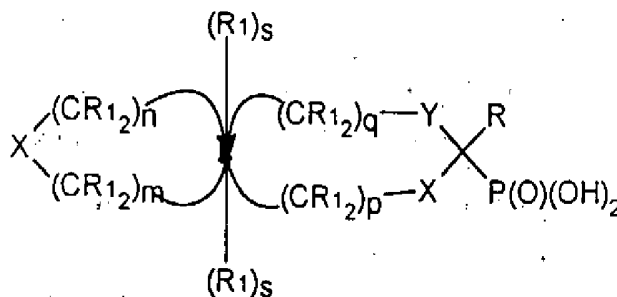
Jak již bylo zmíněno, substituent může být sám substituován. Substituován může být jedním nebo více substituenty. Takové substituenty jsou ty, které jsou uvedeny, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, v knize Substituent Constants for

Correlation Analysis in Chemistry and Biology (1979), která je zde uvedena jako reference. Preferované substituenty jsou alkyl, alkenyl, alkoxykupina, hydroxykupina, oxoskupina, aminoskupina, aminoalkyl (např. aminomethyl, atd.), nitrilová skupina, halogenid, karboxyl, alkoxyacetyl (např. karboethoxy, atd.), thioskupina, thiol, aryl, cykloalkyl, heteroalky, heterocykloalkyl (např. piperidiny, morfoliny, piperaziny, pyrrolidony, atd.), iminoskupina, thioxoskupina, hydroxyalkyl, aryloxyskupina, arylalkyl a jejich kombinace.

Podrobný popis vynálezu

Fosfonatové sloučeniny obsahující kvarterní dusík

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou cykly, které obsahují fosfonaty a jejich farmaceuticky přijatelné soli, které jsou substituovány na uhlíku nesoucím fosfonatovou skupinu, fosfonatovou skupinou, díky které je sloučenina bisfosfonatem, nebo karboxylovou skupinou, díky které je sloučenina fosfonokarboxylátem, nebo sulfo skupinou, díky které je sloučenina fosfonosulfátem, nebo fosfornanovou skupinou, díky které je sloučenina fosfonoalkylfosfinátem. Preferované fosfonatové sloučeniny, které jsou popsány v tomto dokumentu jsou bisfosfonaty nebo fosfonoalkylfosfináty. Fosfonatové sloučeniny mohou být monocyklické nebo polycyklické, karbocykly nebo heterocykly, ve kterých je uhlíkový atom nesoucí fosfonovou kyselinu, částí kruhu. Tato fosfonatová sloučenina, která obsahuje kvarterní dusík má strukturu obecného vzorce I:

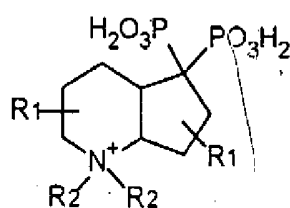


kde m a n a $m+n$ jsou celá čísla od 0 do 5 (s výhodou je $m+n = 3$ a nejvýhodněji je $m=0$ a $n=3$), p a q jsou celá čísla od 0 do 3, $p+q=3$, s je celé číslo od 0 do 2 a když $m+n = 0$ a X není nic pak $s = 2$. X a Y jsou nezávisle na sobě buď nic nebo O , S , NR^1 a $N^+(R^2)_2$. Každé R^1 je nezávisle buď nic a nebo je vybráno ze skupiny sestávající z $N^+(R^2)_3$, R^9SR^6 , SR^6 , vodíku, hydroxyly, substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu C_1 až C_8 , $-OR^3$, $-CO_2R^3$, $-O_2CR^3$, NR^3_2 , $-N(R^3)C(O)R^3$, $-C(O)N(R^3)_2$, halogenu, $-C(O)R^3$, arylalkylu, nitroskupiny, substituovaného nebo nesubstituovaného arylu a jejich kombinací, každé R^2 je nezávisle buď nic a nebo je vybráno ze skupiny sestávající ze substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu C_1 až C_{35} , substituovaného nebo nesubstituovaného fenylu, benzylu nebo R^9SR^6 každé R^3 je nezávisle vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu C_1 až C_8 (preferované R^3 je vodík, methyl a ethyl) a R^9SR^6 kde je každé R^6 nezávisle vybráno ze skupiny sestávající z H , $-C(O)R^7$, $C(S)R^7$, $-C(O)NR^7_2$, $-C(S)NR^7_2$, $-C(O)OR^7$, $-C(S)OR^7$ kde R^7 je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 . R^9 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 . R je nezávisle vybráno ze skupiny sestávající z $COOH$, SO_3H_2 , PO_3H_2 nebo $P(O)(OH)R_4$, kde R_4 je alkyl C_1 až C_8 .

Preferované R^1 není nic nebo je $N^+(R^2)_3$, R^9SR^6 , SR^6 , vodík, substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 , $-NR^3_2$ a hydroxy skupina. Preferované R^2 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, který má od 1 do 35 atomů uhlíku, nebo R^9SR^6 . Preferovanější R^1 je vodík, SR^6 , methyl, ethyl, $-NH_2$ a hydroxy skupina a nejpreferovanější R^1 je SH . Preferovanější R^2 je methyl a ethyl a nejpreferovanější R^2 je methyl.

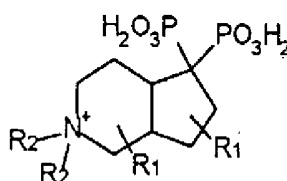
Jak již bylo zmíněno, pokud ani jedno R^1 není $N^+(R^2)_3$, pak přinejmenším jedno z dvojice X a Y musí být $N^+(R^2)_3$.

Preferované sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou substituované nebo nesubstituované oktahydrodifosfonopyrindinium a jeho farmaceuticky přijatelné soli struktur následujících obecných vzorců II až XII:



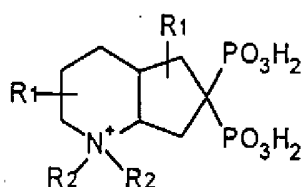
II

který je zde označován jako "substituované nebo nesubstituované oktahydro-5,5-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniové sloučeniny";



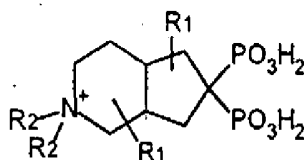
III

který je zde označován jako "substituované nebo nesubstituované oktahydro-5,5-difosfono-2,2-dialkyl-2-pyrindiniové soli"



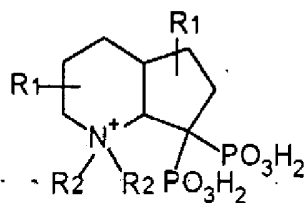
IV

který je zde označován jako "substituované nebo nesubstituované oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniové soli"



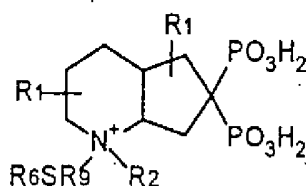
V

který je zde označován jako "substituované nebo nesubstituované oktahydro-6,6-difosfono-2,2-dialkyl-2-pyrindiniové soli"



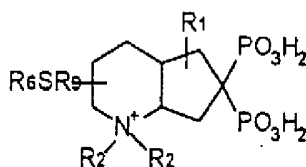
VI

který je zde označován jako "oktahydro-7,7-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniové soli"



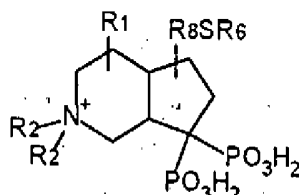
VII

který je zde označován jako "oktahydro-6,6-difosfono-1-alkyl-1-thioalkyl-1-pyrindiniové soli"



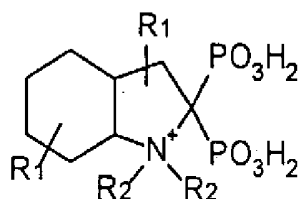
VIII

který je zde označován jako thiosubstituované "oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniové soli"



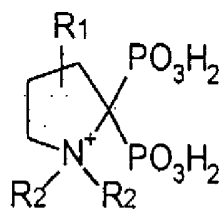
IX

který je zde označován jako "thiosubstituované oktahydro-7,7-difosfono-2,2-dialkyl-2-pyrindiniové soli".



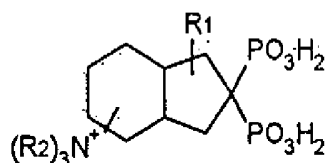
X

který je zde označován jako "2,2-difosfonoindoliniová sůl"



XI

který je zde označován jako "2,2-difosfonopyrrolidiniová sůl"



XII

který je zde označován jako "difosfonoamoniová sůl"

Preferovanější sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou substituované nebo nesubstituované oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniové soli a jejich farmaceuticky přijatelné soli a estery a substituované nebo nesubstituované oktahydro-6,6-difosfono-2,2-dialkyl-2-pyrindiniové soli, oktahydro-6,6-difosfono-1-alkyl-1-thioalkyl-1-pyrindiniové soli a jejich farmaceuticky přijatelné soli a estery. Nejpreferovanější sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou substituované nebo nesubstituované oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniové soli a oktahydro-6,6-difosfono-1-alkyl-1-thioalkyl-1-pyrindiniové soli a jejich farmaceuticky přijatelné soli a estery.

Konkrétní příklady sloučenin podle předkládaného vynálezu jsou:

oktahydro-1,1-dimethyl-5,5-difosfono-1-pyrindiniová sůl,

oktahydro-2,2-dimethyl-5,5-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-dimethyl-6,6-difosfono-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2,2-methyl-6,6-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-dimethyl-7,7-difosfono-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2,2-dimethyl-7,7-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-5,5-difosfono-1,1,2-trimethyl-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,3-diethyl-2,2-dimethyl-5,5-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-dimethyl-6,6-difosfono-7-hydroxy-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2,2-dimethyl-6,6-difosfono-4-methoxy-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-7,7-difosfono-1-ethyl-1-methyl-5-vinyl-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2,2-dimethyl-1-(dimethylamino)-7,7-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2-(3,4-dichlormethyl)-1,1-dimethyl-7,7-difosfono-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-diethyl-2-(p.-dimethylaminofenyl)-7,7-difosfono-1-pyrindiniová

sůl,

oktahydro-4-chlor-1,1-diethyl-6,6-difosfono-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-4-amino-6,6-difosfono-1-ethyl-1-propyl-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-7-karboxy-6,6-difosfono-1,1-dipropyl-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-5-(karboxymethylester)-1,1-dimethyl-6,6-difosfono-1-pyrindiniová

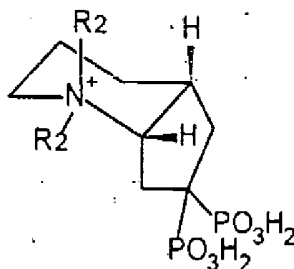
sůl,

oktahydro-2,2-diethyl-6,6-difosfono-4-hydroxy-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-5,5-difosfono-2-ethyl-7-(ethylketon)-2-methyl-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-dimethyl-6,6-difosfono-4-nitro-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-dimethyl-5,5-difosfono-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2,2-dimethyl-5,5-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-dimethyl-6,6-difosfono-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2,2-methyl-6,6-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-1,1-dimethyl-7,7-difosfono-1-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-2,2-dimethyl-7,7-difosfono-2-pyrindiniová sůl,
 oktahydro-6,6-difosfono-1,1,2-trimethyl-1-pyrindiniová sůl a
 oktahydro-4-amino-1,1-dimethyl-6,6-difosfono-1-pyrindiniová sůl.

a jejich farmaceuticky přijatelné soli a estery. Nejpreferovanější sloučeniny podle předkládaného vynálezu jsou oktahydro-6,6-difosfono-1-alkyl-1-thioalkyl-1-pyrindini-

ová sůl a oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniová sůl a jejich farmaceuticky přijatelné soli a estery.

Dále je žádoucí, aby bicyckická sloučenina podle předkládaného vynálezu měla spojení cyklů "cis". Proto je preferováno, například, aby oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dialkyl-1-pyrindiniová sůl měla strukturu, obecného vzorce XIII:



XIII

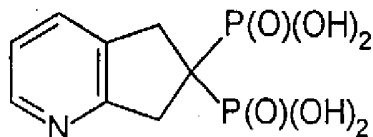
Termín "farmaceuticky přijatelné soli a estery" tak, jak je zde používán, znamená hydrolyzovatelné estery a soli difosfonatových sloučenin, které mají obecně tytéž farmakologické vlastnosti jako kyselina, z které jsou odvozeny, a které jsou přijatelné z hlediska jedovatosti.

Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují soli alkalických kovů (např. sodíku a draslíku), soli kovů alkalických zemin (např. vápníku a hořčíku), nejedovatých těžkých kovů (např. cínu a india) a soli amonné a amonné soli substituované nízkomolekulárními substituenty (např. mono-, di- a triethanolaminu). Preferované jsou sodné, draselné a amonné soli.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu vykazují výrazně lepší antiresorpční aktivitu u kostí než difosfonatové sloučeniny známé z této problematiky jako jsou ethan-1-hydroxy-1,1-difosfonová kyselina ("EHDP", popsaná v U. S. Patentu 3,683,080 - Francis, vydaném 8. 8. 1972) a azacyklopentan-2,2-difosfonová kyselina (popsaná v U. S. Patentu 3,988,443 - Ploger a kol., vydaném 26. 10. 1976). Překvapivě vykazují sloučeniny podle předkládaného vynálezu výrazně lepší antiresorpční aktivitu u kostí než sloučeniny, které mají velmi podobné chemické struktury. Například oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-1-pyrindinium chlorid podle předkládaného vynálezu je překvapivě mnohem účinnější inhibiční agens resorpce kostí než

následující, chemicky velmi podobné, sloučeniny (popsané v evropské patentové žádosti č. 189,662), strukturních vzorců XIV až XVI.

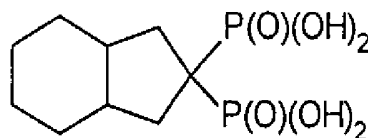
Dihydro-1-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina, strukturního vzorce XIV:



XIV

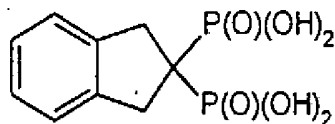
hexahydroindan-2,2-difosfonová kyselina, strukturního vzorce XV:

XV



indan-2,2-difosfonová kyselina, strukturního vzorce XVI:

XVI.



Navíc, sloučeniny podle předkládaného vynálezu vykazují velmi nízkou jedovatost, a proto se zdá, že vykazují dobré znaky pro terapeutické využití. Při účinné dávce sloučenin podle předkládaného vynálezu pro inhibici resorpce kostí se očekává, že dochází k nízké nebo žádné inhibici mineralizace kostí.

Aby se určila a stanovila farmakologická aktivita, byly cyklické fosfonatové sloučeniny testovány na zvířatech za použití různých zkoušek známých z této problematiky. *In vivo* resorpční aktivitu lze běžně stanovit použitím zkoušky určené k testování schopnosti těchto sloučenin inhibovat resorpci kostí, kdy je resorpce kostí charakteristická nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů. Jeden z takových testů známých z této problematiky je Schenkův model. Další použitelný test známý z této problematiky je test adjuvantní artritidy. Také je použitelný *in vitro* test inhibice

růstu hydroxyapatitových krystalů. Tyto a další vhodné testy farmakologické aktivity jsou popsány a/nebo referovány v Shinoda a kol., Calcified Tissue International, **35**, str. 87 až 99 (1983), Schenk a kol., Calcified Tissue Research, **11**, str. 196 až 214 (1973), Russel a kol., Calcified Tissue Research, **6**, str. 183 až 196 (1970), Muhlbauer a Fleisch, Mineral Electrolyte Metab., **5**, str. 296 až 303 (1981), Nancollas a kol., Oral Biol., **15**, 731 (1970), U. S. patentu 3,683,080 - Francis, vydaném 8. 8. 1972, U. S. patentu 4,134,969 - Schmidt-Dunker, vydaném 16. 1. 1979 a EPO patentové žádosti č. 189,662, vydaném 6. 8. 1986, jejichž poznatky jsou zde uvedeny jako reference.

Některé z těchto testů farmakologické aktivity jsou také podrobněji popsány v příkladech provedení tohoto vynálezu.

Kromě využití k léčení nebo prevenci patologických stavů charakterizovaných nenormálním metabolismem vápníku nebo fosfátů, mají sloučeniny podle předkládaného vynálezu i další využití. Například, lze sloučeniny podle předkládaného vynálezu po označení 99m-techneciem použít jako agens pro zkoumání kostí. Navíc lze sloučeniny podle předkládaného vynálezu použít jako maskovací činidla pro polyvalentní kovové ionty, zejména dvoj- (např. vápník a hořčík) a trojvalentní (např. indium) kovové ionty. Proto lze použít sloučeniny podle předkládaného vynálezu jako plnidla do detergentů nebo čistících prostředků nebo k čištění vody. Lze je také použít jako stabilizátory přípravků. Navíc je lze použít jako prevenci tvorby vinného kamenu (tj. ledvinových kamenů) a/nebo plaku na zubech. Sloučeniny podle předkládaného vynálezu lze použít jako herbicidy, které nejsou jedovaté pro zvířata.

Cyklické fosfonátové sloučeniny podle předkládaného vynálezu se připravují z komerčně dostupných materiálů podle příkladů 1 až 14, které tento vynález nikterak neomezuje. Obecně musí být syntetická reakce provedena následujícím způsobem: v prvním kroku se přeměňuje ester methan difosfonové kyseliny v roztoku na příslušný karbanion; v druhém kroku se k této reakci přidá roztok uhlovodíkové sloučeniny, která je vhodně aktivovaná pro dvojnásobnou nukleofilní substituci; třetí krok je nasycení všech případných nenasyčených míst v molekule, obvykle hydrogenací; nakonec se, ve čtvrtém kroku, amin kvarternizuje reakcí s alkylhalogenidem.

Nejběžněji se roztok esteru methan difosfonové kyseliny přidá k ochlazené suspenzi hydridu draselného v inertním organickém rozpouštědle a vzniklý roztok se míchá za laboratorní teploty. Vhodně aktivovaný uhlovodík se pak v roztoku přidá k reakční směsi a vzniklý roztok se zahřívá na 80°C dokud reakce zcela neproběhne. Po ochlazení se roztok filtruje a odpařuje. Odparek se chromatografuje na silica gelu, čímž získáme žádaný ester. Tento ester se hydrolyzuje zahříváním k varu v HCl a vzniklý produkt se odpařuje za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v H₂O a čistí aktivním uhlím. Následuje filtrace, roztok se odpaří a produkt suší za sníženého tlaku. Pokud je to nutné, produkt se hydrogenuje v roztoku nad vhodným katalyzátorem a pak čistí. Nakonec se amin kvarternizuje reakcí s alkylhalogenidem jako je methyljodid, nejběžněji ve směsi voda/ethanol nebo voda/DMSO. Ukázkové postupy syntézy sloučenin podle předkládaného vynálezu jsou popsány v příkladech 1 až 13 uvedených dále.

Prostředky, které obsahují nové, bicycklé sloučeniny obsahující kvarterní dusík

Nové, cycklé, fosfonatové sloučeniny obsahující kvarterní dusík podle předkládaného vynálezu, mohou být podávány lidem nebo jiným savcům různými způsoby, včetně orálních dávkovacích forem a injekcí (intravenózně, intramuskulárně, intraperitonálně a subkutánně). Mnoho dalších dávkovacích forem, které obsahují nové, kvarterní, cycklé, fosfonatové sloučeniny obsahující dusík podle předkládaného vynálezu, může být snadno popsáno člověkem vzdělaným v této problematice, díky využití vhodných farmaceutických excipientů, které jsou popsány dále. S ohledem na přání pacientů, jsou orální dávkovací formy obecně nejpreferovanější.

Termín "farmaceutický prostředek" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená kombinaci zahrnující bezpečné a účinné množství cycklé, fosfonatové sloučeniny obsahující kvarterní dusík jako aktivní složky nebo jejich směs a farmaceuticky přijatelné excipienty.

Termín "bezpečné a účinné množství" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená množství sloučeniny nebo prostředku, dostatečně veliké, aby pozitivně upravovalo příznaky a/nebo stavy, které mají být léčeny, ale dostatečně

malé, aby se zamezilo vedlejším efektům (při rozumném poměru riziko/užitek), v rámci medicínského posouzení. Bezpečné a účinné množství aktivní složky používané ve farmaceutických prostředcích, které se používají v metodách podle předkládaného vynálezu, se mění podle stavů, které se mají léčit, věku a fyzického stavu pacienta, který se má léčit, akutnosti stavu, trvání léčení, povahy doplňkového léčení, druhu použité aktivní složky, druhu použitých farmaceuticky přijatelných excipientů a dalších vlivů, podle znalostí a zkušeností lékaře.

Termín "farmaceuticky přijatelný excipient" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená fyziologicky inertní, farmaceuticky neaktivní materiál známý pro osoby vzdělané v této problematice, který je slučitelný s fyzikálními a chemickými vlastnostmi určité cyklické fosfonatové sloučeniny obsahující kvarterní dusík, vybrané jako aktivní složka. Farmaceuticky přijatelné excipienty zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, polymery, pryskyřice, změkčovadla, plnidla, pojiva, maziva, glidanty, dezintegrátory, rozpouštědla, kosolventy, pufrovací systémy, povrchově aktivní látky, stabilizační prostředky, sladidla, příchuti, farmaceutická barviva nebo pigmenty a viskózní agens.

Termín "orální dávkovací forma" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená, jakýkoliv farmaceutický prostředek určený pro systematické podávání osobám, vpravováním prostředku do gastrointestinálního traktu osoby, ústy. Pro účely tohoto vynálezu je prostředek ve formě tablet, potažených nebo nepotažených, roztoku, suspenze nebo kapsulí, potažených nebo nepotažených.

Termín "injekce" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená, jakýkoliv farmaceutický prostředek určený pro systematické podávání lidem nebo jiným savcům, vpravováním roztoku nebo emulze, která obsahuje aktivní složku, propíchnutím kůže, aby se vpravil roztok nebo emulze do oběhového systému, intavenózní, intramuskulární, intraperitoneální nebo subkutánní injekcí.

Úroveň systematického podávání lze uspokojivě kontrolovat někým kdo je vzdělaný v této problematice, změnou jedné nebo více následujících podmínek:

- (a) vlastnosti aktivní složky
- (b) farmaceuticky přijatelné excipienty, dokud nenastane varianta, kdy neinterferují s aktivitou určité vybrané aktivní složky
- (c) typ excipientu a příslušná požadovaná tloušťka a propustnost (vlastnosti při bobtnání) tohoto excipientu

- (d) časově závislé vlastnosti excipientu samotného a/nebo excipientů
- (e) velikost částic granulované aktivní složky
- (f) vlastnosti excipientů závislé na pH.

Zejména rozpustnost, kyselost a snadnost hydrolýzy různých kvarterních fosfonatových sloučenin obsahujících dusík, vybraných jako aktivní složka, jako jsou soli vzniklé přidáním kyseliny, soli tvořené karboxylovou skupinou, např. soli alkalických kovů, soli kovů alkalických zemin atd., estery, např. alkyl, alkenyl, aryl, arylalkyl, lze použít jako výchozí bod pro volbu požadovaných vlastností. Navíc lze vhodné pH podmínky v orální dávkové formě připravit přidáním vhodného pufru k aktivní složce v souladu s požadovanou rychlostí uvolňování.

Jak již bylo uvedeno, farmaceuticky přijatelné excipienty zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, pryskyřice, plnidla, pojiva, maziva, glidanty, dezintegrátory, rozpouštědla, kosolventy, pufrovací systémy, povrchově aktivní látky, stabilizační prostředky, sladidla, příchuti, farmaceutická barviva nebo pigmenty a viskózní agens.

Preferované rozpouštědlo je voda.

Mezi příchuti, které lze použít v tomto vynálezu, patří i ty popsané v knize Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. vydání, firma Mack Publishing, 1990, str. 1288-1330, která je zde uvedena jako reference. Farmaceutické prostředky vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, obsahují obecně od 0 do 2% příchuti.

Mezi barviva nebo pigmenty, které lze použít v tomto vynálezu, patří i ty popsané v knize Handbook of Pharmaceutical Excipients, str. 81-90, 1986, American Pharmaceutical Association & the Pharmaceutical Society of Great Britain, která je zde uvedena jako reference. Farmaceutické prostředky vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, obsahují obecně od 0 do 2% barviv nebo pigmentů.

Preferované kosolventy zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, ethanol, glycerin, propylenglykol, polyethylenglykoly. Farmaceutické prostředky vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, obsahují obecně od 0 do 50% kosolventů.

Preferované pufrovací systémy zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, kyseliny octovou, boritou, uhličitou, fosforečnou, jantarovou, jablečnou, vinnou, citrónovou, octovou, benzoovou, mléčnou, glycerovou, glukonovou,

glutarovou a glutamovou a jejich sodné, draselné, a amonné soli. Zejména preferované jsou kyseliny a soli fosforečné, vinné, citrónové a octové. Farmaceutické prostředky vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, obsahují obecně od 0 do 5% pufovacích systémů.

Preferované povrchově aktivní látky zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, estery polyoxyethylensorbitanu s mastnými kyselinami, monoalkyletherů polyoxyethylenu, monoestery sacharosy, a estery a étery lanolinu, soli alkylsulfátů, sodné, draselné a amonné soli mastných kyselin. Farmaceutické prostředky vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, obsahují obecně od 0 do 2% povrchově aktivních látek.

Preferované stabilizační prostředky zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, fenol, alkylestery kyseliny parahydroxybenzoové, o-fenylfenolbenzoovou kyselinu a její soli, boritou kyselinu a její soli, sorbovou kyselinu a její soli, chlorbutanol, benzylalkohol, thimerosal, octan a dusičnan fenylrtuťnatý, nitromersol, benzalkoniumchlorid, cetylpyridiniumchlorid, methylparaben a propylparaben. Zejména preferované jsou soli kyseliny benzoové cetylpyridiniumchlorid, methylparaben a propylparaben. Farmaceutické prostředky vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, obsahují obecně od 0 do 2% stabilizačních prostředků.

Preferovaná sladidla zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezena, sacharosu, glukosu, sacharin, sorbitol, manitol a aspartam. Zejména preferované jsou sacharosa a sacharin. Farmaceutické prostředky vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, obsahují obecně od 0 do 5% sladidel.

Preferovaná viskózní agens zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezena, methylcelulosu, karboxymethylcelulosu sodnou, hydroxypropylmethylcelulosu, alginát sodný, karbomer, povidon, arabskou gumu, guarovou gumu, xanthanovou gumu a tragacanth. Zejména preferované jsou methylcelulosa, karbomer, xanthanová guma, guarová guma, povidon, karboxymethylcelulosa sodná a křemičitan hořečnatohlinitý. Prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují od 0 do 5% viskózních agens.

Preferovaná plniva zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezena, laktosu, manitol, sorbitol, fosforečnan vápenatý, hydrogenfosforečnan vápenatý, slačitelný

cukr, škrob, síran vápenatý, dextrocelulosu a mikrokrytalickou celulosu. Prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují od 0 do 75% plniv.

Preferovaná maziva zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezena, stearát hořečnatý, kyselinu stearovou a talek. Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují od 0 do 5% maziv.

Preferované dezintegrátory zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezeny, škrob, sodný glykolát škrobu, kros повідon, kroskarmelát sodný a mikrokrytalickou celulosu. Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují od 4 do 15% dezintegrátorů.

Preferovaná pojiva zahrnují, ale nejsou tímto výčtem nijak omezena, akacii, tragakanth, hydroxypropylcelulosu, nahydrolyzovaný škrob, želatinu, повідon, hydroxypropylcelulosu, hydroxypropylmethylcelulosu, methylcelulosu; roztoky cukrů, jako jsou sacharosa a sorbitol, a ethylcelulosu. Prostředky podle předkládaného vynálezu obsahují od 1 do 10% pojiv.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou tvořit od 0.1 do 99.9% hmotnostních farmaceutického prostředku podle předkládaného vynálezu. S výhodou tvoří sloučeniny podle předkládaného vynálezu od 20% do 80% hmotnostních farmaceutického prostředku podle předkládaného vynálezu.

Farmaceutický prostředek podle předkládaného vynálezu obsahuje od 15 do 95% kvarterní fosfonatové sloučeniny obsahující dusík, jako aktivní složky, nebo jejich směsi, 0 až 2% příchuti, 0 až 50% kosolventu, 0 až 5% pufrovacího systému, 0 až 2% povrchově aktivních látek, 0 až 2% stabilizačních prostředků, 0 až 5% sladidel, 0 až 5% viskózních agens, 0 až 75% plnidel, 0.5 až 2% maziv, 1 až 5% glidantů, 4 až 15% dezintegrátorů a 1 až 10% pojiv.

Vhodné farmaceutické prostředky jsou popsány v tomto dokumentu v příkladech 17 až 19. Pro člověka vzdělaného v této problematice je snadné na základě těchto příkladů vyrobit širokou škálu dalších farmaceutických prostředků.

Volba farmaceuticky přijatelného excipientu, který se použije ve spojení s fosfonatovou sloučeninou podle předkládaného vynálezu je od základu určena způsobem jakým se bude fosfonatová sloučenina podávat. Pokud bude sloučenina injikována, je preferovaný farmaceutický nosič sterilní fyziologický roztok, jehož pH je upraveno na hodnotu 7.4. Vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče pro povrchovou

aplikaci jsou ty, které jsou určeny k použití v krémech, gelech, náplastech a podobně.

Preferovaný způsob podávání fosfonátových sloučenin podle předkládaného vynálezu je orální. Preferovanou jednotkovou dávkovací formou jsou proto tablety, kapsule a podobně, které obsahují bezpečné a účinné množství fosfonátové sloučeniny podle předkládaného vynálezu. S výhodou, prostředky obsahují od 1 mg P do 600 mg P fosfonátové sloučeniny podle předkládaného vynálezu. Farmaceuticky přijatelné nosiče vhodné k přípravě jednotkové dávkovací formy pro orální podávání jsou v této problematice dobře známy. Jejich výběr závisí na druhotných rozhodnutích jako chuť, cena, a stabilita při skladování, které nejsou rozhodující pro účely předkládaného vynálezu a může je učinit bez jakýchkoliv problémů osoba vzdělaná v této problematice.

Termín "mg P" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená hmotnost fosforu přítomného v množství fosfonátové sloučeniny podle předkládaného vynálezu. Tato jednotka se používá, aby se standardizovalo množství sloučenin difosfonové kyseliny podle předkládaného vynálezu, které se používá ve farmaceutických prostředcích a metodách podle předkládaného vynálezu. Například, dihydro-6,6-difosfono-1-methyl-1-pyridinium jodid má molekulovou hmotnost 421 g/mol, z které 15% (62 g/mol) tvoří dva atomy fosforu přítomné v molekule. Jeden miligram této sloučeniny je proto počítán tak, že obsahuje 0.15 mg P. K přípravě farmaceutického prostředku, který obsahuje 0.15 mg P této sloučeniny, by prostředek měl obsahovat 1 mg sloučeniny a dávka 0.15 mg P této sloučeniny na 50 kg hmotnosti pacienta, znamená, že pacient by měl dostat 50 mg této sloučeniny.

Farmaceuticky přijatelný nosič používaný ve spojení s fosfonátovými sloučeninami podle předkládaného vynálezu je používán v koncentraci postačující k tomu, aby se dosáhlo použitelné velikosti dávky. Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou celkově tvořit od 0.1 do 99.9% farmaceutického prostředku podle předkládaného vynálezu a s výhodou od 20% do 80%.

Způsoby léčení nebo prevence chorob charakterizovaných nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů.

V dalším bodě poskytuje předkládaný vynález, způsoby léčení nebo prevence chorob charakterizovaných nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů. Tyto metody zahrnují podávání bezpečného a účinného množství fosfonatových sloučenin podle předkládaného vynálezu.

Preferovaný způsob podávání je orální, ale i ostatní známé způsoby podávání se jeví stejně dobré, např. dermatomukosálně (například, dermálně, rektálně a podobně) a parentálně (například subkutánními injekcemi, intramuskulárními injekcemi, intraartikulárními injekcemi, intravenózními injekcemi a podobně). Lze použít i inhalaci. Způsoby podávání zahrnují, bez jakýchkoliv omezení, orální, transdermální, mukosální, sublinguální, intramuskulární, intravenózní, intraperitoneální a subkutánní podávání stejně jako povrchové podávání.

Termín "nenormální metabolismus vápníku a fosfátů" tak, jak je používán, v tomto dokumentu znamená (1) stavy, které jsou charakterizovány nenormální mobilizací vápníku a fosfátů, která vede k obecné nebo místní ztrátě kostní hmoty, nebo vysokému přebytku vápníku a fosfátů v tělních tekutinách, a (2) stavy, které způsobují nebo vedou k nenormálnímu ukládání vápníku a fosfátů v těle. První kategorie zahrnuje, ale není tím zcela vymezena, osteoporézu, Pagetovu chorobu, hyperarathryodismus, hyperkalcemii jako důsledek zhoubného bujení, heterotopickou osifikaci a osteolytické kostní metastázy. Druhá kategorie zahrnuje, ale není tím zcela vymezena, myositis ossificans progressiva, calcinosis universalis a takové choroby jako jsou artritida, osteoartritida, neuritida, bursitida, tendonitida a další zánětlivé stavy, kterým předchází ukládání fosforečnanu vápenatého do tkáně.

Termín "revmatická artritida" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená chronické kloubní zánětlivé onemocnění, které napadá celé tělo, s neznámou etiologií. Je charakterizováno destrukcí kloubních pouzder, chrupavek, šlach a kostí.

Termín "osteoartritida" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená nezánettivé onemocnění pohyblivých kloubů. Je charakterizováno zhoršením a odřením kloubních pouzder a tvorbou nové kosti na povrchu kloubu.

Termín "riziková osoba" a "osoba, která potřebuje takové léčení" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená jakoukoliv osobu nebo nižšího živočicha, který trpí významným rizikem nenormálního metabolismu vápníku a fosfátů pokud se ponechá bez léčení a jakoukoliv osobu nebo nižšího živočicha, u kterého je diagnostikován nenormální metabolismus vápníku a fosfátů. Například postmenopausální ženy, osoby podrobující se určité léčbě steroidy, osoby přijímající protikřečové léky, osoby, u kterých je diagnostikována Pagetova choroba, hyperarathryodismus, hyperkalcemie jako důsledek zhoubného bujení, nebo osteolytické kostní metastázy, osoby, u kterých je diagnostikována jedna nebo více různých forem osteoporézy, osoby, které patří k části populace, o které je známo, že má větší pravděpodobnost vzniku osteoporézy, např. postmenopausální ženy, muži nad 65 let věku a osoby, které se léčí léky, o kterých je známo, že způsobují osteoporézu jako vedlejší účinek, osoby, u kterých je diagnostikována myositis ossificans progressiva nebo calcinosis universalis a osoby, které trpí artritidou, osteoartritidou, neuritidou, bursitidou, tendonitidou a ostatními zánětlivými stavy, kterým předchází ukládání fosforečnanu vápenatého do tkání.

Termín "bezpečné a účinné množství" tak, jak je používán v tomto dokumentu, znamená množství sloučeniny nebo prostředku dostatečně velké, aby znatelně pozitivně upravovalo léčený stav, ale dostatečně malé, aby se zamezilo vážným vedlejším účinkům (při rozumném poměru užitek/riziko), v rámci medicínského posouzení. Bezpečné a účinné množství difosfonatové sloučeniny podle předkládaného vynálezu, se mění podle stavů, které se mají léčit, věku a fyzického stavu pacienta, který se má léčit, akutnosti stavu, trvání léčení, povahy doplňkového léčení, druhu použité difosfonatu, druhu použitých farmaceuticky přijatelných nosičů a dalších vlivů, podle znalostí a zkušeností lékaře. Nicméně, jednotlivá dávka se může měnit v rozmezí od 0.01 mg P do 3500 mg P nebo od 0.0002 do 70 mg P/kg tělesné hmotnosti (základem je tělesná hmotnost 50 kg). Preferované jednotlivé dávky jsou od 1 mg P do 600 mg P nebo od 0.02 mg P do 12 mg P/kg tělesné hmotnosti (základem je tělesná hmotnost 50 kg). Je možno podávat až čtyři jednotlivé dávky denně. Denní dávky vyšší než 500 mg P nezvyšují žádoucí

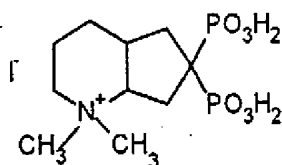
účinek a mohou vyvolat nežádoucí vedlejší účinky. Vyšší dávky jsou samozřejmě nutné při orálním podávání, z důvodu omezené absorpce.

Následující příklady dále popisují a ukazují preferované příklady v rámci předkládaného vynálezu. Příklady jsou uvedeny pouze za účelem ilustrace a nejsou míněny jako omezení předkládaného vynálezu v různých variantách, které jsou možné bez překročení naznačeného rámce a myšlenky vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-1-pyrindinium jodidu, strukturního vzorce XVII



XVII

(a) syntéza dihydro-1-pyridin-6,6-difosfonové kyseliny:

K roztoku 35% hydridu draselného v ropném oleji (5.2 g; 0.045 molů) v 70 ml DMSO (suchý), ochlazenému směsí voda/led se pod argonovou atmosférou přidá, za míchání, roztok tetraisopropylmethyldifosfonátu (7.82 g; 0.023 molů) v 30 ml DMSO. Po ukončení přidávání po kapkách se reakční směs dále míchá ještě jednu hodinu při laboratorní teplotě. Pak se pomalu přidá roztok 2,3-bis(chloromethyl)pyridinu (4.0 g; 0.023 molů) (surový produkt izolovaný podle Tsuda a kol., *Chem. Pharm. Bull.*, **1**, (1953), 142) v 15 ml DMSO a reakční směs se zahřívá na 90°C po dobu 1 hodiny. Po ochlazení se za vakua odpaří DMSO. 2.1 g požadovaného produktu se čistí chromatograficky na silica gelu za použití gradientu 5-15% ethanolu v dichlormethanu.

Ester (1.92 g; 0.0043 molů) se přidá k 38 ml HCl a, za míchání pod argonovou atmosférou, se zahřívá, po dobu 18 h, k varu. Výsledná sraženina se odfiltruje, promyje vodou (2 x 5 ml) a usuší. Výtěžek je 0.8 g téměř bílé krystalické látky.

(b) hydrogenace na hydrát oktahydro-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny:

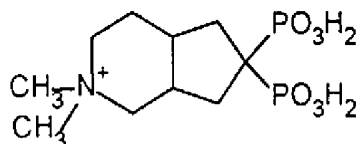
Dihydro-1-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina (0.86 g, která byla připravena podle návodu uvedeného pod bodem a), 70 ml destilované vody a PtO_2 (0.30 g) se umístí do Parrovy hydrogenační baňky o objemu 500 ml). Směs se hydrogenuje za laboratorní teploty (40 psi = 275,8 kPa) po dobu 2 dní. Roztok se odfiltruje a promyje horkou, destilovanou vodou. Filtrát se pak odpaří na rotační odparce. Výsledná pevná látka se suší za sníženého tlaku přes noc. Výtěžek je 0.75 g téměř bílých krystalů s teplotou tání 365°C .

(c) oktahydro-1-pyrindin-6,6-bisfosfonová kyselina (0.71 g, 2.49 mmolů) se rozpustí ve směsi DMSO (10 ml) a vody (50 ml). Pak se přidá methyljodid (5.30 g, 37.35 mmolů). Roztok se zahřívá pod dusíkovou atmosférou k varu, po dobu 3 dní. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku a kvarternizovaný produkt (1.01 g) se získá rekrystalizací ze směsi voda/isopropanol.

Různě substituované oktahydro-1-pyrindinium-6,6-difosfonové kyseliny se připraví tak, jak je popsáno v příkladu 1, tím, že se jako výchozí materiál použije vhodně substituovaný 2,3-bis(chlormethyl)pyridin. Tyto substituované výchozí materiály lze připravit (1) fotochemickou reakcí substituovaného 2,3-dimethylpyridinu s N-chlorsukcinimidem v CCl_4 nebo (2) esterifikací substituovaného 2,3-dikarboxypyridinu s MeOH/H^+ , která je následována redukcí LiAlH_4 a chlorací SOCl_2 . Takto se analogickým syntetickým postupem připraví následující sloučeniny (O-6,6-DP-1-P = oktahydro-6,6-difosfono-1-pyrindinium): 2-methyl-O-6,6-DP-1-P z 6-methyl-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu, 4-ethyl-2-methyl-O-6,6-DP-1-P z 4-ethyl-6-methyl-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu, 3-propyl-5-methyl-O-6,6-DP-1-P z 5-propyl-3-(1'-chlorethyl)-2-chlormethylpyridinu, 4-hydroxy-O-6,6-DP-1-P z 4-hydroxy-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu, 3-ethoxy-O-6,6-DP-1-P z 5-ethoxy-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu, 3-karboxy-7-ethyl-O-6,6-DP-1-P z 5-karboxy-3-chlormethyl-2-(1'-chlorpropyl)pyridinu, 2-fenyl-O-6,6-DP-1-P z 6-fenyl-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu, 3-(p-methoxybenzyl)-O-6,6-DP-1-P z 5-(p-methoxybenzyl)-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu, 4-amino-O-6,6-DP-1-P z 4-nitro-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu, 4-chlor-O-6,6-DP-1-P z 4-chlor-2,3-bis(chlormethyl)pyridinu a 5-karboxy-(methyl ester)-O-6,6-DP-1-P z 3-(2'-chlor-2'-acetát, methyl ester)-2-chlormethylpyridinu.

Příklad 2

Syntéza oktahydro-6,6-difosfono-2,2-dimethyl-2-pyrindinium jodidu,
strukturního vzorce XVIII



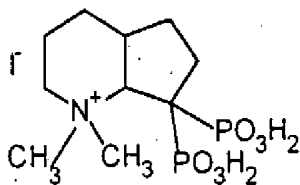
XVIII

Stejným postupem, jako je popsáno v příkladu 1 (a) se přemění tetraisopropylmethylendifosfonát na tetraisopropyldihydro-2-pyrindin-6,6-difosfonát reakcí s 3,4-bis(chlormethyl)pyridinem. Výsledný ester se hydrolyzuje jako v příkladu 1 (a) a poskytne dihydro-2-pyrindin-6,6-difosfonovou kyselinu. Pak je dihydro-2-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina přeměněna na oktahydro-2-pyrindin-6,6-difosfonovou kyselinu hydrogenací, která je přesně táž jako v příkladu 1 (b). Substituovaná oktahydro-2-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina se připraví tak, jak je popsáno v příkladu 1, z vhodně substituovaného 3,4-bis(chlormethyl)pyridinu.

Přesně týmž postupem jako v příkladu 1, se připraví z oktahydro-2-pyrindin-6,6-bisfosfonové kyseliny oktahydro-6,6-difosfono-2,2-dimethyl-2-pyrindinium jodid.

Příklad 3

Syntéza oktahydro-7,7-difosfono-1,1-dimethyl-1-pyrindinium jodidu,
strukturního vzorce XIX



XIX

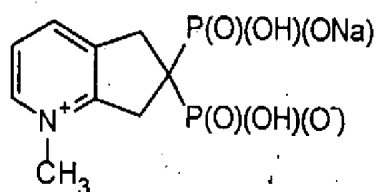
(a) syntéza nesubstituovaného nebo substituovaného
oktahydro-1-pyrindin-7,7-difosfonátu lze provést použitím syntetického postupu analogického postupu pro přípravu kyano sloučenin, popsanému v Crossley a Shepherd, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, (11), 2479-81 (1985). Tento článek je zde

uveden jako reference. K roztoku cyklopentenpyridinu (1 mmol) ve 2 ml THF (bezvodý), ochlazenému na 0°C, se přidají 3 ml předem připraveného roztoku, lithiiumdiisopropylamidu (2 mmoly). Po 30 min. míchání při 0°C, pod dusíkovou atmosférou, se přidá po kapkách diethylchlorfosfit ve 2 ml THF. Reakční směs se dále míchá 1 hodinu při 0°C a další hodinu při laboratorní teplotě. Reakce se ukončí přidávkem nasyceného roztoku chloridu amonného a extrahuje do dichlormethanu. Po usušení a odpaření rozpouštědla se získá surový produkt, který se chromatografuje, aby se získal čistý dihydropyrindin-7,7-difosfonát. Tato látka se hydrolyzuje a hydrogenuje přesně stejným postupem, který byl již popsán a vznikne oktahydro-1-pyrindin-7,7-difosfonová kyselina.

(b) oktahydro-1-pyrindin-7,7-difosfonová kyselina, připravená tak, jak je popsáno v příkladu 3 (a), se rozpustí ve směsi DMSO (10 ml) a vody (50 ml). K tomuto roztoku se přidá methyljodid (5.3 g, 37.35 mmolů) a zahřívá se pod dusíkovou atmosférou k varu po dobu 3 dnů. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku a kvarternizovaný produkt (1.01 g) se získá rekrytalizací ze směsi voda/isopropanol.

Příklad 4

Syntéza monosodné, vnitřní soli dihydro-6,6-difosfono-1-methyl-1-pyrindinia, strukturního vzorce XX



XX

Výše zobrazená sloučenina je připravována způsobem popsáným dále.

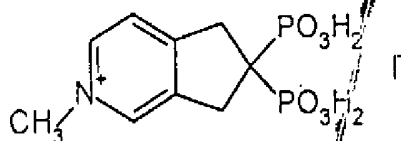
Syntéza dihydro-6,6-difosfono-1-methyl-1-pyrindinium jodidu

Dihydro-1-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina (0.5 g, 1.79 mmolů), připravená způsobem popsáným v příkladu 1 (a), se rozpustí v roztoku vody (14 ml) a 1N NaOH (4.5 ml). Přidá se methyljodid (0.56 g, 8.95 mmolů) v ethanolu (9 ml) a roztok se

zahřívá po dobu 18 hodin na 80°C. Během reakce se sleduje pH a přidává se báze tak, aby se pH udržovalo na hodnotě 7.0. Po skončení zahřívání se reakční směs ochladí a odpaří za sníženého tlaku. Pevný zbytek se trituruje acetonem a rekrystalizuje z vody a ethanolu.

Příklad 5

Syntéza dihydro-6,6-difosfono-2-methyl-1-pyrindinium jodidu, strukturního vzorce XXI

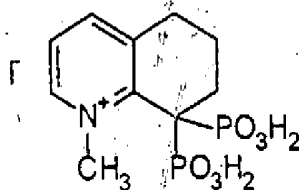


XXI

Přesně stejným postupem, jako je popsáno v příkladu 4, se dihydro-1-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina, připravená způsobem popsaným v příkladu 1 (a), přemění na dihydro-6,6-difosfono-2-methyl-1-pyrindinium jodid.

Příklad 6

Syntéza tetrahydro-8,8-difosfono-1-methylchinolinium jodidu, strukturního vzorce XXII



XXII

Tetrahydro-8,8-difosfono-1-methylchinolinium jodid se připravuje způsobem popsaným dále.

I. Syntéza tetraethyl esteru 5,6,7,8-tetrahydro-1chinolin-8,8-bisfosfonové kyseliny

Syntézu substituovaných a nesubstituovaných tetrahydro-1-chinolin-8,8-bisfosfonatových sloučenin lze provést způsobem, který je analogický k způsobu

výroby kyano sloučenin, který je popsán v Crossley a Sheperd, *J. Am. Soc., Perkin Trans. 1*, (11), 2479-81 (1985). Tento článek je zde uveden jako reference. K roztoku 5,6,7,8-tetrahydrochinolinu (1 mmol) v THF (2 ml), ochlazenému na 0°C, se přidají 3 ml předem připraveného roztoku, lithiumdiisopropylamidu (2 mmoly). Po 30 min. míchání při 0°C, pod dusíkovou atmosférou, se přidá po kapkách diethylchlorfosfit (2.2 mmolů) v THF (2 ml). Reakční směs se dále míchá 1 hodinu při 0°C a další hodinu při laboratorní teplotě. Reakce se ukončí přidávkem nasyceného roztoku chloridu amonného a extrahuje do dichlormethanu. Spojené organické podíly se suší síranem sodným, odfiltrují a odpaří za sníženého tlaku. Surový zbytek se chromatografuje, aby se získal čistý tetraethyl ester tetrahydro-tetraethyl-1-chinolin-8,8-bisfosfonové kyseliny.

II. Syntéza 5,6,7,8-tetrahydro-1-chinolin-8,8-bisfosfonové kyseliny

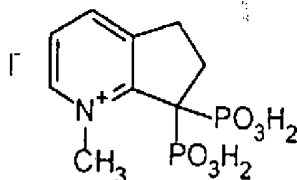
Tetraethyl ester (5.0 mmolů) se přidá k 6N HCl (38 ml) a zahřívá k varu, za míchání, pod dusíkovou atmosférou, po dobu 18 hodin. Reakční směs se ochladí na laboratorní teplotu a odpaří za sníženého tlaku. Pevný zbytek se trituruje acetonem a rekrystalizuje z vody a isopropanolu.

III. Syntéza 5,6,7,8-tetrahydro-8,8-difosfono-1-methyl-chinolinium jodidu

Přesně stejným postupem, jako je popsáno v příkladu 4, se 5,6,7,8-tetrahydro-1-chinolin-8,8-bisfosfonová kyselina přemění na 5,6,7,8-tetrahydro-8,8-difosfono-1-methyl-chinolinium jodid.

Příklad 7

Syntéza dihydro-7,7-difosfono-1-methyl-1-pyrindinium jodidu, strukturního vzorce XXIII

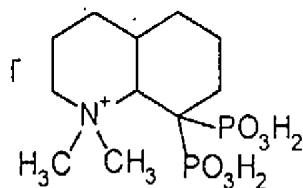


XXIII

Přesně stejným postupem, jako je popsáno v příkladu 4, se dihydro-1-pyrindin-7,7-bisfosfonová kyselina, připravená způsobem popsáním v příkladu 3, část a), přemění na dihydro-7,7-difosfono-1-methylpyrindinium jodid.

Příklad 8

Syntéza oktahydro-8,8-difosfono-1,1-dimethylchinolinium jodidu, strukturního vzorce XXIV



XXIV

I. Syntéza oktahydro-1-chinolin-8,8-bisfosfonové kyseliny

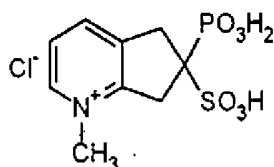
5,6,7,8-tetrahydro-1-chinolin-8,8-bisfosfonová kyselina (3.0 mmolů), připravená způsobem popsáným v příkladu 6, část II, voda (70 ml) a PtO_2 (0.03 g) se umístí do Parrovy hydrogenační nádoby o objemu 500 ml. Směs se hydrogenuje za laboratorní teploty (40 psi = 275.8 kPa) po dobu 2 dní. Roztok se odfiltruje a promyje horkou vodou. Výsledná pevná látka, oktahydro-1-chinolin-8,8-bisfosfonová kyselina, se suší za sníženého tlaku přes noc.

II. Syntéza oktahydro-8,8-difosfono-1,1-dimethyl-chinolinium jodidu

Přesně stejným postupem, jako je popsáno v příkladu 3, část (b), se oktahydro-1-chinolin-8,8-bisfosfonová kyselina přemění na oktahydro-8,8-difosfono-1,1-dimethylchinolinium jodid.

Příklad 9

Dihydro-1-methyl-6-fosfono-6-sulfono-1-pyrindinium chlorid, strukturního vzorce XXV



XXV

Výše zobrazená sloučenina je připravována způsobem popsáným dále.

I. Syntéza ethyl esteru dihydro-6-diethoxyfosfynyl-1-pyrindin-6-sulfonové kyseliny

K roztoku 35% hydridu draselného v ropném oleji (5.0 mmolů) v DMSO (7 ml), ochlazenému směsí voda/led se pod argonovou atmosférou přidá, za míchání, roztok ethyl esteru diethoxyfosfynylmethansulfonové kyseliny (2.5 mmolů) [přípraveného jak je popsáno v J. C. Carretero a kol., *Tetrahedron*, vol. 43, str. 5125 až 5134 (č. 21) 1987] v DMSO (5 ml). Po ukončení přidávání po kapkách se reakční směs dále míchá ještě jednu hodinu při laboratorní teplotě. Pak se pomalu přidá roztok 2,3-bis(chloromethyl)pyridinu (2.5 mmolů) [přípravený jak je popsáno v K. Tsuda a kol., *Chem. Pharm. Bull.*, 1, str. 142, 1953] v DMSO (2 ml) a reakční směs se zahřívá na 90°C po dobu 1 hodiny. Po ochlazení se za vakua odpaří DMSO. Požadovaný produkt se čistí chromatograficky na silica gelu za použití gradientu 5-15% isopropanolu v dichlormethanu.

II. Syntéza dihydro-6-diethoxyfosfynyl-6-ethoxysulfinyl-1-methyl-1-pyrindinium chloridu

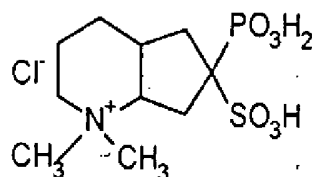
Ethyl ester dihydro-6-diethoxyfosfynyl-1-pyridin-6-sulfonové kyseliny (15 mmol) a methyljodid (45 mmolů) v suchém acetonitrilu (50 ml), se zahřívají k varu po dobu 48 hodin pod dusíkovou atmosférou. Po této době se reakční směs odpaří za sníženého tlaku a výsledná pevná látka se trituruje v diethyleteru a požadovaný produkt se čistí flash chromatografií na silica gelu za použití gradientu 5-15% isopropanolu v dichlormethanu.

III. Syntéza dihydro-1-methyl-6-fosfono-6-sulfono-1-pyrindinium chloridu

Pyridiniová sůl (10 mmolů) se zahřívá k varu v 6N HCl (35 ml) po dobu 24 hodin. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku a výsledná pevná látka se trituruje v ethanolu. Produkt se získá rekrystalizací z vody a isopropanolu.

Příklad 10

Syntéza oktahydro-1,1-dimethyl-6-fosfono-6-sulfono-1-pyrindinium chloridu, strukturního vzorce XXVI



XXVI

Výše zobrazená sloučenina je připravována způsobem popsaným dále.

I. Syntéza oktahydro-1-methyl-6-fosfono-6-sulfono-1-pyridinium chloridu

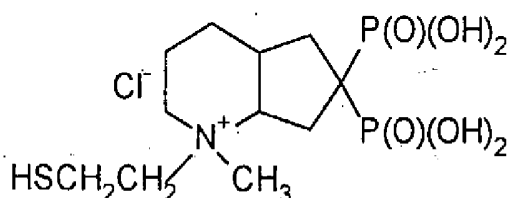
Dihydro-1-methyl-6-fosfono-6-sulfono-1-pyridinium chlorid (3 mmoly) [připravený způsobem popsaným v příkladu 9], destilovaná voda (70 ml) a PtO_2 (0.30 g) se umístí v Parrově hydrogenační nádobě o objemu 500 ml. Směs se hydrogenuje za laboratorní teploty (40 psi = 275.8 kPa) po dobu 2 dní. Roztok se zfiltruje přes celit a promyje horkou vodou. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku a vzniklá pevná látka se dále suší za sníženého tlaku přes noc.

II. Syntéza oktahydro-1,1-dimethyl-6-fosfono-6-sulfono-1-pyridinium chloridu

Oktahydro-1-methyl-6-fosfono-6-sulfono-1-pyridinium chlorid (1.8 mmolů) se rozpustí ve vodě (15 ml) a pH se upraví na 7 pomocí 1N NaOH. Pak se přidá methyljodid (9.0 mmol) v ethanolu (10 ml) a roztok se zahřívá na 80°C po dobu 18 hodin. Během reakce se sleduje pH a přidává se báze tak, aby pH bylo stále 7.0. Po ukončení zahřívání se reakční směs ochladí a odpaří za sníženého tlaku. Pevná látka se trituruje v acetonu a rekrystalizuje z vody a ethanolu.

Příklad 11

Syntéza oktahydro-6,6-difosfono-1-(2-merkaptoethyl)-1-methyl-1-pyridinium chloridu, strukturního vzorce XXVII



XXVII

Výše zobrazená sloučenina je připravována způsobem popsaným dále.

I. Syntéza oktahydro-1-methyl-1-pyridin-6,6-difosfonové kyseliny

Monosodná, vnitřní sůl dihydro-6,6-difosfono-1-methyl-1-pyridinia [připravená postupem popsaným v příkladu 4] se hydrogenuje přesně stejným způsobem jak je popsáno v příkladu 1 (část B), aby se získala oktahydro-1-methyl-1-pyridin-6,6-difosfonová kyselina.

II. Syntéza oktahydro-6,6-difosfono-1-(2-acetylthioethyl)-1-methyl-1-pyrindinium bromidu

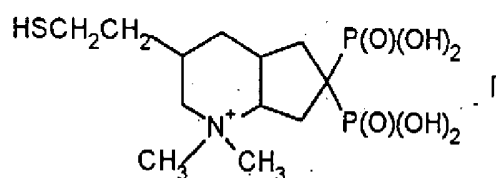
Oktahydro-1-methyl-1-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina (0.12 mmolů) se rozpustí ve směsi vody (25 ml) a DMSO (5 ml). Pak se přidá 2-acetylthioethyl bromid (0.60 mmolů) a reakční směs se zahřívá na 60°C po dobu 24 hodin. Reakční směs se ochladí, čistí aktivním uhlím, odfiltruje a odpaří za sníženého tlaku. Surová pevná látka se trituruje v diethyleteru a produkt se získá rekrystalizací pevné látky z vody a isopropanolu.

III. Syntéza oktahydro-6,6-difosfono-1-(2-merkaptethyl)-1-methyl-1-pyrindinium chloridu

Oktahydro-6,6-difosfono-1-(2-acetylthioethyl)-1-methyl-1-pyrindinium bromid (0.05 mmolů) se zahřívá k varu v 6N HCl (15 ml) pod dusíkovou atmosférou. Reakční směs se ochladí, čistí aktivním uhlím a odfiltruje. Filtrát se odpaří za sníženého tlaku. Vzniklá pevná látka se rekrystalizuje z vody a ethanolu na požadovaný produkt.

Příklad 12

Syntéza oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindinium jodidu, strukturního vzorce XXVIII



XXVIII

I. Syntéza tetraethyl esteru dihydro-3-brom-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny

K roztoku 35% hydridu draselného v ropném oleji (50 mmolů) v 70 ml DMSO (suchý), ochlazenému směsí voda/led se pod argónovou atmosférou přidá, za míchání, roztok tetraethylmethylen difosfonové kyseliny (23 mmolů) v 30 ml DMSO. Po ukončení přidávání po kapkách se reakční směs dále míchá ještě jednu hodinu

při laboratorní teplotě. Pak se pomalu přidá roztok 2,3-bis(chloromethyl)-5-brompyridinu (23 mmolů) [připravený přesně stejným postupem jako je popsán v K. Tsuda a kol., *Chem. Pharm. Bull.*, 1, (1953), 142] v 15 ml DMSO a reakční směs se zahřívá na 90°C po dobu 1 hodiny. Po ochlazení se za vakua odpaří DMSO. Požadovaný produkt se čistí chromatograficky na sílica gelu za použití gradientu 5-15% ethanolu v dichlormethanu.

II. Syntéza tetraethyl esteru dihydro-3-(2-hydroxyethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny

K roztoku tetraethyl esteru dihydro-3-brom-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny (10 mmolů) v THF (10 ml) ochlazenému na -78°C se přidá během 30 minut roztok n-butyllithia (2.1 ekv.) v hexanu. Reakce se dalších 30 minut chladí na -78°C. Pak se přidá 2-jódethanoltrimethylsilyl(TMS)ether (2.5 ekv.) a reakce se nechá během 30 minut ohřát na laboratorní teplotu. Po standardním vodném zpracování se izoluje dihydro-3-(2-hydroxyethanol, TMS ether)-1-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina a použije se bez čištění do další reakce.

Štěpení TMS etheru z produktu se provádí mícháním v THF a přidáním roztoku tetrabutylammonium fluoridu (1M v THF) po kapkách během 30 minut. Reakce se ukončí přidavkem nasyceného vodného roztoku chloridu amonného a směs se extrahuje dichlormethanem. Organické vrstvy se usuší síranem sodným, odfiltrují a odpaří za sníženého tlaku. Výsledný olej se přímo použije do další reakce.

III. Syntéza tetraethyl esteru dihydro-3-(2-acetylthioethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny.

a) směs tetraethyl esteru dihydro-3-(2-hydroxyethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny (10 mmolů), tetrabrommethanu (11 mmolů) a trifenyfosfinu (11 mmol) v dichlormethanu (100 ml) se míchá 5 hodin za laboratorní teploty. Pak se přidá voda a produkt se extrahuje dichlormetanem. Spojené organické vrstvy se suší a odpaří. Pevná látka se čistí flash kolonovou chromatografií na tetraethyl ester dihydro-3-(2-acetylthioethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny

b) roztok tetraethyl esteru dihydro-3-(2-acetylthioethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny (5.0 mmolů) se míchá v suchém acetonu (35 ml) a přidá se thiooctan sodný (5.2 mmol). Směs se míchá při 50°C po dobu 12 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu se za sníženého tlaku odpaří rozpouštědlo. Surový zbytek se

rozpustí v dichlormethanu a promyje vodou. Organická vrstva se suší a odpařuje za sníženého tlaku. Žádaný produkt se čistí flash chromatografií na silica gelu za použití gradientu 5-15% isopropanolu v dichlormethanu.

IV. Syntéza dihydro-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny

Přesně stejným postupem hydrolýzy, která je popsána v příkladu 11, část III, se tetraethyl ester dihydro-3-(2-acetylthioethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny převede na dihydro-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonovou kyselinu.

V. Syntéza oktahydro-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonové kyseliny

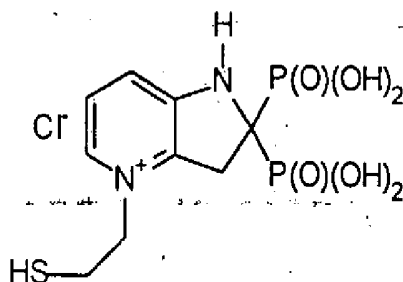
Přesně stejným hydrogenačním postupem, který je popsán v příkladu 1, část b, se dihydro derivát převede na oktahydro-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonovou kyselinu.

VI. Syntéza oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindinium jodidu

Přesně stejným postupem, který je popsán v příkladu 3, část b, se oktahydro-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindin-6,6-difosfonová kyselina převede na oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-3-(2-merkaptethyl)-1-pyrindinium jodid.

Příklad 13

Syntéza 1,3-dihydro-4-(2-merkaptethyl)-2,2-difosfono-2H-pyrrol[3,2-b]pyrindinium chloridu; strukturního vzorce XXIX



XXIX

I. Syntéza 1,3-dihydro-4-(2-acetylthioethyl)-2-oxo-2H-pyrrol[3,2-b]pyrindinium bromidu

K 1,3-dihydro-2H-pyrrol[3,2-b]pyrindin-2-onu (6.25 g, 0.05 molů) [připravený postupem popsáným v J. Org. Chem., vol. 37, str. 51-4, 1972] v acetonitrilu (500 ml) se přidá S-acetyl-2-bromethanthiol. Reakční směs se zahřívá k varu pod dusíkovou

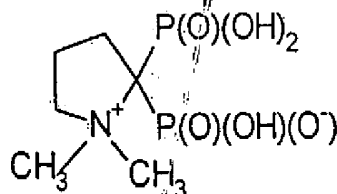
atmosférou po dobu 12 hodin. Reakční směs se odpaří za sníženého tlaku a surová pevná látka se trituruje v diethyletheru. Produkt lze dále čistit flash chromatografií na sílica gelu za použití 5% isopropanolu v dichlormethanu.

II. Syntéza 1,3-dihydro-4-(2-merkaptoethyl)-2,2-difosfono-2H-pyrrol[3,2-b]pyrindinium chloridu

Na 1,3-dihydro-4-(2-acetylthioethyl)-2-oxo-2H-pyrrol[3,2-b]pyrindinium bromid se působí kyselinou fosforitou (7.7 g) v chloubenzenu (28ml) a směs se zahřeje na 110°C. K rychle míchané směsi se přidá chlorid fosforitý (9.0 ml) a zahřívá se dalších 5 hodin. Po ochlazení na okolní teplotu se dekantuje rozpouštědlo a přidá se vodný roztok HCl (28 ml, 1M). Směs se zahřívá k varu po dobu dalších 12 hodin. Reakční směs se ochladí a odpaří do sucha. Po trituraci pevné látky několika díly acetonu, se získá bisfosfonová kyselina v čistém stavu.

Příklad 14

Syntéza vnitřní soli 2,2-difosfono-1,1-dimethylpyrrolidinium hydroxidu, strukturního vzorce XXX



XXX

I. Syntéza pyrrolidin-2,2-bisfosfonové kyseliny

Na pyrrolidinon (5 g, 58.7 mmolů) se působí kyselinou fosforitou (14.4 g, 176 mmolů) v chloubenzenu (75 ml) a směs se zahřeje na 110°C. K rychle míchané směsi se přidá chlorid fosforitý (15.4 ml, 176 mmolů) a zahřívá se dalších 5 hodin. Po ochlazení na okolní teplotu se dekantuje rozpouštědlo a k pevnému zbytku se přidá vodný roztok HCl (50 ml, 1M). Směs se zahřívá k varu po dobu dalších 12 hodin. Reakční směs se ochladí a odpaří do sucha. Po trituraci pevné látky několika díly acetonu, se získá bisfosfonová kyselina jako bílá pevná látka.

II. Syntéza vnitřní soli 2,2-difosfono-1,1-dimethylpyrrolidina

Pyrrolidin-2,2-bisfosfonová kyselina se rozpustí ve vodě (10 ml) a ethanolu (2 ml) a přidá se nadbytek methyljodidu. Reakční směs se zahřívá k varu pod dusíkovou atmosférou po dobu 48 hodin. Směs se ochladí, přefiltruje přes celit a odpaří do sucha. Produkt se získá rekrystalizací z vody a isopropanolu.

Příklad 15

Schenkův model

Sloučeniny vyvinuté pro inhibici resorpce kostí *in vivo* a inhibici mineralizace ve zvířecích modelových systémech je v oblasti metabolismu kostí známý jako Schenkův model. Obecné principy tohoto modelového systému popisuje Shinoda a kol., Calcif. Tissue Int., **35**, 87-99 (1983) a Schenk a kol., Calcif. Tissue Int., **11**, 196-214 (1973), jejichž objevy jsou zde zahrnuty jako reference.

Materiál a metody:

Zvířata

Samečci Sprague Dawley krysy (Charles River Breeding Laboratories), 17 dní staří (30 g), před odstavením jsou umístěni s matkami do plastických klíček tak, že matky jsou u vchodu. Po 19 dnech života dostanou mláďata libovolné množství krysí potravy (Rat Chow) a vody a jsou náhodně umístěny do léčených nebo kontrolních skupin, které obsahují sedm zvířat na skupinu. V den 1 a v den 7 dostanou všechna zvířata intraperitoneální ("IP") injekci Calceinu (1% roztok v 0.9% roztoku soli, dávkování 0.2 ml/100 g tělesné hmotnosti). V den 4 dostanou všechna zvířata IP injekci tetracyklinhydrochloridu (1% roztok v 0.9% roztoku soli, dávkování 0.2 ml/100 g tělesné hmotnosti). Tyto sloučeniny označí aktivně mineralizující kosti a chrupavky.

Roztoky dávek a postup dávkování

Všechny roztoky jsou připraveny pro subkutánní injekce v 0.9% roztoku soli s pH upraveným na hodnotu 7.4 pomocí NaOH a/nebo HCl. Výpočet roztoku dávky vychází z množství prášku (založeno na molekulové hmotnosti, hydratace) aktivního materiálu v mg/kg (tělesné hmotnosti), která odpovídá mg P/kg. Koncentrace jsou

založeny na dávkování 0.2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Typicky jsou všechny sloučeniny podávány v 0.01, 0.1, 1.0 a 10.0 mg P/kg/den po 7 dní. Sloučeniny vykazující aktivitu při 0.1 mg P/kg/den se pak testují jako logaritmický dekrement až k 0.001 mg P/kg/den. Nastavení dávky podle změn tělesné hmotnosti se provádí denně.

Nekropsie, zpracování tkání a histomorfometrie

V den 8 po započetí dávkování, jsou všechna zvířata usmrcena IP pentabarbitolem. Holeně jsou vyjmuty a umístěny do 70% ethanolu. Jedna hleň je dehydratována v odstupňovaných roztocích ethanolu a methylmetakrylátu, jak popisuje Schenk v knize Methods of Calcified Tissue Preparation (editor G. R. Dickson, Elsevier Science Publ., Nizozemí, 1984), která je zde ve své celistvosti zahrnuta jako reference. Hleň je longitudinálně rozdělena skrz metafysální prostor. Vzorky jsou na jedné straně pokryty dusičnanem stříbrným a umístěny na mikroskopická sklíčka k vyhodnocení Quantimet Image Analyzerem (Cambridge Instruments, Inc.) za použití viditelného i ultrafialového osvětlení. Metafysální obsah kosti je měřen v oblasti mezi fluorescenční značkou a růstovou destičkou: vyjádřeno jako procenta celkové plochy (kost + morek). Epifysální šířka růstové destičky se získá jako průměrná hodnota-10 měření vzorku.

Statistické vyhodnocení dat se provádí pomocí parametrické a neparametrické analýzy rozptylu a Wilcoxonsova testu součtových řad, aby se stanovila statistická významnost efektu ve srovnání s kontrolními zvířaty. Schenkův model poskytuje data pro inhibici resorpce sloučeninami *in vivo*.

Příklad 16

Model adjuvantní artritidy

Existuje mnoho zvířecích modelů artritidy, mezi, které patří i artritida vyvolaná adjuvanty, za použití *Mycobacterium butyricum*. Tento model v množství skutečností připomíná revmatickou artritidu u lidí (otok kloubu spojený s buněčnou invazí kloubního prostoru, resorpce kostí, uvolnění chemotaxních faktorů a lysozymálních složek do kloubního prostoru) (1,2). Množství profylaktických a terapeutických studií ukázalo potenciální využití protizánětlivých léků (3,4) a difosfonátů při léčení artritidy (5,6).

Reference

1. Pearson, C., Wood, F. (1959), Studies of Polyarthritis and Other Lesions Induced by Injection of Mycobacterial Adjuvant. 1. General Clinical and Pathological Characteristics and Some Modifying Factors, Arth. Rheum., 2: 440-459.
2. Blackman, A., Burns, J. W., Framer, J. B., Radziwonik, H., Westwick, J. (1977), An X-Ray Analysis of Adjuvant Arthritis in the Rat. The Effect of Prednisolone and Indomethacin, Agents and Actions, 7: 145-151.
3. Winter, C. A., Nuss, G. W. (1966), Treatment of Adjuvant Arthritis in Rats with Anti-inflammatory Drugs, Arth. Rheum., 9: 394-404.
4. Winder, C. V., Lembke, L. A., Stephens, M. D. (1969), Comparative Bioassay of Drugs in Adjuvant-Induced Arthritis in Rats: Flufenamic Acid, Mefenamic Acid a Phenylbutazone, Arth. Rheum., 12: 472-482.
5. Francis, M. D., Flora, L., King, W. R. (1972), The Effects of Disodium Ethane-1-Hydroxy-1-Diphosphonate on Adjuvant Induced Arthritis in Rats, Calcif. Tiss. Res., 9: 109-121.
6. Flora, L. (1979), Comparative Antiinflammatory and Bone Protective Effects of Two Diphosphonates in Adjuvant Arthritis, Arth. Rheum., 22: 340-346.

Adjuvantní artritida je náhle buněčně a synoviálně vyvolána u samců kryš (buď kmen Sprague Dawley nebo Lewis) pomocí subkutánní (SB) injekce *Mycobacterium butyricum* (8 mg/ml) v ropném oleji v den 0. Sloučeniny se dávají jednou denně buď orálně (PO) nebo parentálně (SC) a lze je testovat buď profylakticky (ode dne 0) nebo terapeuticky (ode dne 9, 10 nebo 14). Antiartritický účinek lze měřit jako snížení objemu končetin, ztráty tělesné hmotnosti, ztráty kostní hmoty nebo reakční tvorbu nové kosti, ve srovnání s kontrolní skupinou podrobenou léčení artritidy fyziologickým roztokem. Léčení lze ukončit při "plamenné" odezvě (prudké snížení zánětu), která ukazuje, že látka je schopna udržovat účinek.

Materiál a metody

A. Zvířata

Užívají se samci Lewisových kryš (LEW). Při přijetí jsou pomocí počítače, který generuje náhodná čísla, náhodně rozmístěni do jednotlivých drátěných klecí. Potrava a voda se podávají po celou dobu studie bez omezení. Běžná starost a

udržování zvířat se provádí podle státních a federálních omezení. Každá krysa je identifikována číslem umístěným na přední straně klece a na ocase krysy.

B. Experimentální postup

V den 1 se u všech krys změří tělesná hmotnost (body weight - BW) a objem zadních končetin (paw volume - PV) [měří se metodou vytlačování rtuti pomocí tlakového převodníku připojeného k počítači]. V den 0 se indukuje artritida pomocí MFA [*Mycobactericum butyricum* (Mb) 4.4 mg/kg v oleji] následujícím způsobem: krysy jsou anestetizovány a obdrží jednu SC injekci MFA do míst kde se napojuje ocas, za aseptických podmínek.

Objem končetin a tělesná hmotnost se dále měří v různé dny, obvykle dvakrát týdně. Při profylaktickém testu se krysy náhodně seskupí do skupin po 8 až 10 krysách a léčení začne v den 0 a pokračuje až do ukončení. Při terapeutickém testu se krysy náhodně seskupí do skupin po 8 až 10 krysách podle jejich PV v den 10. Dávkování začne v den 10 a pokračuje denně až do ukončení. Pro oba testy se zvířata umístí do klecí z krabic od bot s hlubokou podestýlkou buď v den nebo před dnem 10.

Dávkovací roztoky

Pro léky nepravděpodobně oxidovatelné

Léky se váží na kalibrovaných vahách a míchají s destilovanou vodou v odměrné baňce. pH roztoku se upraví pomocí 0.1N NaOH na hodnotu 7.4. Pak se roztok filtruje přes 0.45 mm sterilní filtr do sterilní skladovací nádoby. Pokud se nepoužívají, skladují se roztoky v lednici.

Pro léky pravděpodobně oxidovatelné

Léky se váží na kalibrovaných vahách a míchají s odkysličenou destilovanou vodou v odměrné baňce. Pak se zásobní roztok filtruje přes 0.45 mm sterilní filtr do sterilní skladovací nádoby. Pokud se nepoužívají, skladují se zásobní roztoky v lednici.

Denně se určité množství roztoku vyjme ze zásobního roztoku, umístí se do malé dávkovací kádinky a pak se upraví pH na hodnotu 7.4 podle předešlého

výpočtu. Lze provést i další ředění upraveného roztoku, pokud je potřeba (odkysličenou vodou).

Výpočty léků jsou založeny na molekulové hmotnosti, čistotě sloučeniny, množství založeném na mg/kg (tělesné hmotnosti) a žádané finální koncentraci v mg P/kg. Objem dávkovaný kryse je 0.1 ml/100 g tělesné hmotnosti, subkutánně, podávaná jako injekce do inguinálního záhybu zvířete, střídavě na obě strany každý den nebo 1 ml/200 g tělesné hmotnosti, orálně pomocí nerezové dávkovací trubice. Měření změn tělesné hmotnosti se dělá každý týden.

Radiografie, nekropsie a sbírka tkání

Při ukončení se každá krysa usmrtí 1 ml Socomb® intraperitoneálně (IP). Okamžitě po té se udělá radiograf celého těla pomocí rentgenové jednotky Torrox 120D při MA=5, ISUP=50 a času=60 sekund na medicínský film Kodak. Z každé krysy se vyjmou zadní končetiny a umístí do 10% pufovaného formalínového roztoku spolu s kusem jater, ledviny, sleziny a hypofýzy. Tibiotarsální klouby se odvápnují v 4% EDTA, pH 7.4 a zpracovávají obvykle v parafínových blocích a barví H+E. Části orgánů se také zpracovávají v parafínu a barví H+E.

Histologická část se provádí kvalitativně u kostí a měkkých tkání pomocí světelného mikroskopu. Radiografy resorpce kostí (bone resorption - BR) jsou hodnocené v 6 anatomických trabekulárních centrech kosti na každé zadní končetině a 4 centrech na každé přední končetině stupnicí od 0 do 3, která dá celkový součet 0 až 60 pro všechny čtyři končetiny. Pro reakční tvorbu nové kosti (reactive new bone formation - RNB) jsou radiografy hodnoceny stupnicí od 0 do 3 pro postranní a léčené povrchy holeně a pak od 0 do 2 pro všechny ostatní již zmíněné oblasti, které dají celkový součet 0 až 44.

D. Statistická analýza

Analýza údajů o objemu končetin, resorpce kostí a reakční tvorby nové kosti se provádí Studentovým t-testem a Tukeyovou jednosměrnou analýzou rozptylu (SAS) (12). Rozdíly se pokládají za významné při $p=0.05$ nebo menším.

Tento model poskytuje *in vivo* data pro účinnost antiartritických sloučenin, co se týče snížení otékání končetin, ztráty kostní hmoty a reakční tvorby nové kosti, ve srovnání a artritickými zvířaty, která se léčí fyziologickým roztokem.

Příklad 17

Připravované kapsule mají následující složení:

aktivní složka	mg na kapsuli
cis-oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-1-pyridinium jodidová sůl	350.0
excipienty	
laktosa	90.0
mikrokrystalická celulóza	60.0
stearát hořečnatý	1.0

- Kapsule zmíněného složení se připravují postupem popsaným dále:

Aktivní složka se mísí s mikrokrystalickou celulosou v otáčecím plášťovém mísiči po dobu deseti (10) minut.

Výsledná směs se vede skrz kladivový drtič se sítí 80 mesh.

Směs se vrátí zpět do dvojplášťového mísiče spolu s laktosou a mísí se patnáct (15) minut.

Dále se přidá stearát hořečnatý a mísí se dalších pět (5) minut. Výsledná směs se pak stlačí do pístového plniče kapsulí.

Kterákoliv sloučenina připravená, podle příkladů 1 až 13 může být použita jako aktivní složka v kapsuli připravené zmíněným postupem.

Příklad 18

Připravované tablety mají následující složení:

aktivní složka	mg na tabletu
oktahydro-4-amino-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-1-pyridinium chlorid	700.00
excipienty	
laktosa (sušená rozprašováním)	200.0
škrob (1500)	100.0

stearát hořečnatý

25.0

Tablety zmíněného složení se připravují běžným postupem popsaným dále:

Aktivní složka se rozmělnuje třicet (30) minut v kulovém mlýnu. Rozemletá aktivní složka se pak mísí, v dvojlopatkovém mísiči, s laktosou sušenou rozprašováním, po dobu dvaceti (20) minut.

Ke směsi se přidá škrob a míchá se po dobu dalších patnácti (15) minut. Směs se stlačí do podoby tablet na běžném tabletovacím lisu.

Kterákoliv sloučenina připravená, podle příkladů 1 až 13 může být použita jako aktivní složka v kapsuli připravené zmíněným postupem.

Příklad 19

Injikovatelné roztoky se připravují běžnými metodami, za použití 10 ml fyziologického roztoku a 7.0 mg P cis-oktahydro-6,6-difosfono-1,1-dimethyl-1-pyrindiniové soli s hodnotou pH upravenou na 7.4.

Jedna injekce, jednou denně po dobu 4 dnů, vede k znatelnému zmírnění hyperkalcemie, jako důsledku zhoubného bujení, u pacientů, kteří váží 70 kilogramů.

Kterákoliv sloučenina připravená, podle příkladů 1 až 14 může být použita jako aktivní složka v injekci připravené zmíněným postupem.

Příklad 20

Bílý muž, který váží 92 kg, ve věku 72 let, který trpí mírnými až prudkými bolestmi a občasnými otoky pravého kolena. Po jednom roce stálého zhoršování potíží, navštívil lékaře, který klinicky diagnostikoval osteoartritidu pravého kolena, která byla následně potvrzena rentgenovým vyšetřením.

Po léčbě různými NSAID, včetně aspirinu, naprosenu a ketoprofenu, se jeho potíže dále zhoršovaly a jeho stav se celkově zhoršil. Opět navštívil lékaře, který mu předepsal tablety, připravené tak, jak je popsáno v příkladu 18, dvakrát denně, dvě hodiny po nebo před jídlem, po dobu tří měsíců. Jeho klinické příznaky, bolesti a otoky, zejména citelné při chůzi, se významně zlepšily po tříměsíční terapii. Po ukončení tříměsíčního léčení při dávkování 2 tablety na den, se v léčení

pokračovalo s polovinou původně předepsané dávky (tj. 1 tableta na den) po neomezenou dobu.

Příklad 21

Černá žena, která váží 65 kg, ve věku 55 let, která trpí otoky a deformací kloubů na prstech obou rukou, s částečnou ztrátou síly a obratnosti prstů na rukou. Po vizuálním a rentgenovém vyšetření a vhodných klinických testech schválených Americkou revmatologickou asociací (American Rheumatological Association - ARA), u ní byla diagnostikována revmatická artritida.

Po neúspěšném analgetickém a protizánětlivém léčení, její lékař předepsal tablety, připravené tak, jak je popsáno v příkladu 18, dvakrát denně, dvě hodiny po nebo před jídlem, po dobu čtyř měsíců. Po měsíci léčení se její příznaky s otékáním kloubů na prstech znatelně zlepšily a rozsah pohyblivosti prstů se znatelně zlepšil. Léčení pokračovalo po zbytek čtyř měsíců, po kterých lékař léčení prodloužil ještě o další dva měsíce.

Příklad 22

Hispanšská žena, která váží 37 kg, ve věku 20 let, přišla k lékaři s idiopatickou, juvenilní, revmatickou artritidou. Její příznaky zahrnovaly, znatelný, zánět mnoha kloubů, komplikovaný pálením, citlivostí a rychlou, patologickou degenerací funkce kloubu.

Její lékař jí doporučil revmatologa, který jí ihned předepsal masivní léčbu intravenózním podáváním roztoku, připraveného tak, jak je popsáno v příkladu 19, po dobu tří dnů, v rozsahu 1 injekce denně. Po skončení intravenózního léčení, jí lékař předepsal tablety, připravené tak, jak je popsáno v příkladu 18, po dobu dvou měsíců, během, kterých došlo k znatelnému zlepšení pohyblivosti a snížení bolestí. Po dobu dalších dvou měsíců, lékař snižoval dávky až na 3/4 původně předepsané orální dávky, předepsáním 3 tablet na dva dny, dvou tablet obden až jedné tablety denně. Po ukončení tohoto režimu dávkování došlo k dalšímu snížení na 1/4 původní dávky, podáváním jedné tablety, popsané v příkladu 18, každý den po dobu dalších čtyř měsíců.

Příklad 23

Šedesátiletá, bílá žena, která váží 62 kg, trpí prudkými bolestmi zad. Její lékař, za pomoci radiologického vyšetření, určil, že má tříštivou zlomeninu L1 obratle, z důvodu osteoporetické ztráty kostní hmoty. Pacientce byla předepsána na dobu tří měsíců, jednou denně 700 mg tableta, připravená tak, jak je popsáno v příkladu 18. 700 mg tableta se podává buď dvě hodiny před, anebo dvě hodiny po jídle. Po třech měsících se dávka sníží na 350 mg kapsuli, připravenou tak, jak je popsáno v příkladu 17, podávanou každý další den až do doby tří měsíců. Její lékař ji dále převedl na udržovací dávku 100 mg kapsule každý den, po dobu šesti měsíců. Po šesti měsících udržovací dávky pacient necítil žádné další bolesti zad. Rentgen neukázal žádné zlomeniny.

Příklad 24

Sedmdesátipětiletá orientální žena, která váží 53 kg, utrpěla po pádu zlomeninu kyčle. Byla hospitalizována a byla u ní diagnostikována osteoporéza. Byly jí předepsány kalcitoninové injekce. Kalcitoninové injekce byly pro pacientku bolestivé a ta nebyla schopna vyhovět kalcitoninovému léčebnému režimu. Její lékař ji pak převedl na orální fosfonatový režim. Dostávala 700 mg tabletu, připravenou postupem, který je popsán v příkladu 18, dvakrát denně, po dobu dvou měsíců. Na konci měsíční terapie dostávala 700 mg tabletu, jednou denně, po dobu dvou měsíců. Po dvouměsíčním léčení dostávala 100 mg kapsuli, připravenou postupem, který je popsán v příkladu 17, jednou denně, po dobu tří měsíců. Následující návštěva u lékaře neukázala žádné znatelné snížení minerální hustoty předloktí, jak bylo stanoveno fotonovou absorptimetrií.

Příklad 25

Osmdesátipětiletý rodilý Američan, který váží 65 kg, přišel k svému lékaři s prudkými bolestmi zad. Rentgen ukázal mnohočetné mírné zborcení těla obratle, způsobené znatelnou ztrátou kostní hmoty díky osteoporéze. Pacientovi byla předepsána 700 mg tableta a 350 mg kapsule, připravené postupem, který je popsán v příkladech 17 a 18, které byly podávány v tentýž den po osmi hodinách, po dobu dvou měsíců. Po dvou měsících se dávka snížila na 350 mg tabletu, jednou denně po dobu dvou měsíců. Rentgen neukázal žádné další tříštivé zlomeniny.

Pacient byl pak převeden na udržovací dávku 100 mg kapsule, připravené postupem, který je popsán v příkladu 17, jednou denně po dobu šesti měsíců. Po šesti měsících nebylo pozorováno žádné znatelné snížení hustoty kostí.

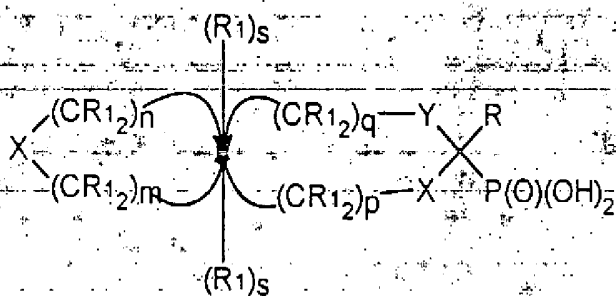
Průmyslová využitelnost

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu lze použít pro výrobu farmaceutických prostředků určených k léčení osteoporózy a artritidy.

23/23

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kvarterní fosfonatové sloučeniny, které obsahují dusík a kruh, které lze použít pro léčení nebo prevenci potíží s nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů, a jejich farmaceuticky přijatelné soli a estery, vyznačující se tím, že mají strukturu obecného vzorce I:



kde

- X a Y jsou nezávisle na sobě buď nic nebo O, S, NR^1 a $N^+(R^2)_2$, pokud žádné R^1 není $N^+(R^2)_3$, pak alespoň jedno z dvojice X a Y musí být $N^+(R^2)_2$, s výhodou pak $N^+(R^2)_2$, nic, NR^1
- m a n a m+n jsou celá čísla od 0 do 5, p a q a p+q jsou celá čísla od 0 do 3
- s je celé číslo od 0 do 2 a když m+n = 0 a X není nic pak s = 2
- každé R^1 je nezávisle buď nic a nebo je vybráno ze skupiny sestávající z $N^+(R^2)_3$, R^9SR^6 , SR^6 , vodíku, hydroxyly, substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu C_1 až C_8 , $-OR^3$, $-CO_2R^3$, $-O_2CR^3$, NR^3 , $-N(R^3)C(O)R^3$, $-C(O)N(R^3)_2$, halogenu, $-C(O)R^3$, arylalkylu, nitroskupiny, substituovaného nebo nesubstituovaného arylu, OH a jejich kombinací, s výhodou pak $N^+(R^2)_3$, R^9SR^6 , SR^6 , vodík, CO_2R^3 , $-OR^3$, $-NR^3$
- každé R^2 je nezávisle buď nic a nebo je vybráno ze skupiny sestávající ze substituované nebo nesubstituované alkylové skupiny z 1 až 35 uhlíkových atomů, substituovaného nebo nesubstituovaného fenylu, benzylu nebo R^9SR^6 , s výhodou pak nic, R^9SR^6 nebo substituovaná nebo nesubstituovaná alkylová skupina z 1 až 35 uhlíkových atomů
- každé R^3 je nezávisle vybráno ze skupiny sestávající z vodíku, substituovaného nebo nesubstituovaného alkylu, který má od 1 do 8

uhlíkových atomů a R^9SR^6 , s výhodou pak R^9SR^6 nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl, který má od 1 do 8 uhlíkových atomů

- (g) každé R^6 je nezávisle vybráno ze skupiny sestávající z H, $-C(O)R^7$, $C(O)OR^7$, $C(S)OR^7$, $C(S)R^7$, $C(O)NR^7$, $C(S)NR^7$, kde R^7 je vodík nebo substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8
- (h) R je PO_3H_2 nebo $P(O)(OH)R_4$, kde R_4 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 a
- (i) R^9 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl C_1 až C_8 .

2. Sloučenina podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že $m+n$ se rovná 3.

3. Sloučenina podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že $m+n$ se rovná 2.

4. Sloučenina podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Y není nic a $p+q$ se rovná 2.

5. Sloučenina podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že $p+q$ se rovná 3.

6. Sloučenina podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že Y je dusík a $p+q$ se rovná 1.

7. Sloučenina podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že X není nic a R^1 je $N^+(R^2)_3$.

8. Sloučenina podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že přinejmenším jedno Y není nic a R^1 je $N^+(R^2)_3$.

9. Farmaceutický prostředek, který se používá pro léčení patologických stavů spojených s nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

(a) bezpečné a účinné množství fosfonatové sloučeniny obsahující kvarterní dusík a cyklus, podle kteréhokoliv z předcházejících nároků

(b) farmaceuticky přijatelné excipienty.

10. Použití sloučeniny podle kteréhokoliv z předcházejících nároků pro výrobu medikamentů pro léčení nebo prevenci patologických stavů spojených s nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů u lidí nebo jiných savců, kteří takovou léčbu potřebují, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podávání bezpečného a

účinného množství fosfonatové sloučeniny obsahující kvarterní dusík a cyklus, podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, lidem nebo jiným savcům.

11. Způsob léčení nebo prevence patologických stavů spojených s nenormálním metabolismem vápníku a fosfátů u lidí nebo jiných savců, kteří takovou léčbu potřebují, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje podávání bezpečného a účinného množství fosfonatové sloučeniny, která obsahuje kvarterní dusík a cyklus, podle nároku 1.