

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 282 524

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1135-85**

(22) Přihlášeno: **29. 07. 83**

(40) Zveřejněno: **12. 03. 97**  
(Věstník č. 3/97)

(47) Uděleno: **04. 06. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **13. 08. 97**  
(Věstník č. 8/97)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 07 F 9/40**  
**C 07 F 9/58**  
**C 07 F 9/6541**  
**C 07 F 9/6512**  
**A 61 K 31/66**  
**A 61 K 31/675**

(73) Majitel patentu:

SANOFI S. A., Paříž, FR;

(72) Původce vynálezu:

Breliere Jean-Claude, Montpellier, FR;

Emonds-Alt Xavier, Montpellier, FR;

Garcia Georges, Saint-Gely-Du-Fesc, FR;

(74) Zástupce:

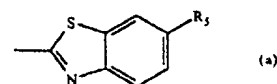
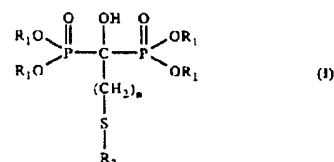
Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2,  
12000;

(54) Název vynálezu:

**Deriváty kyseliny methylen difosfonové,  
způsob jejich přípravy a protizánětový a  
protirevmatický farmaceutický prostředek**

(57) Anotace:

Deriváty kyseliny methylen difosfonové obecného vzorce I, ve kterém R<sub>1</sub> znamená vodík nebo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkyl, R<sub>2</sub> znamená C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> alkylovou skupinu, fenylovou skupinu, popřípadě substituovanou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alkylovou skupinou, pyridylovou nebo pyrimidinylovou skupinu, pětičlenný heterocyklus, kondenzovaný s benzenovým jádrem vzorce (a), ve kterém R<sub>5</sub> znamená atom halogenu, a n znamená celé číslo 1 až 10, s podmínkou, že je-li n=1, má R<sub>2</sub> uvedený význam s výjimkou alkylové nebo nesubstituované fenylové skupiny, a soli těchto sloučenin. Do rozsahu vynálezu náleží rovněž postup přípravy těchto sloučenin a protizánětový a protirevmatický prostředek.



CZ 282 524 B6

# Deriváty kyseliny methylen difosfonové, způsob jejich přípravy a protizánětlivý a protirevmatický farmaceutický prostředek

## 5 Oblast techniky

Vynález se týká derivátů kyseliny methylen difosfonové, způsobu přípravy těchto sloučenin a protizánětlivého a protirevmatického farmaceutického prostředku, obsahujícího tyto sloučeniny.

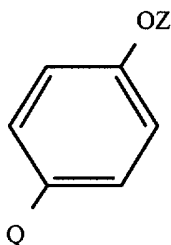
10

## Dosavadní stav techniky

Pokud se týče dosavadního stavu techniky, byly některé sloučeniny dále uvedeného obecného vzorce I již popsány, ale v žádném dokumentu nebyly popsány jejich terapeutické vlastnosti.

15

Například v patentu Spojených států amerických č. 4 071 584 se uvádí (ale nenárokuje v patentových nárocích) sloučeniny dále uvedeného obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená methylovou nebo ethylovou skupinu,  $R_2$  znamená zbytek obecného vzorce:



20

ve kterém:

Z znamená methylovou skupinu a Q znamená atom bromu nebo nitroskupinu, nebo

25

Z znamená atom vodíku a Q znamená atom bromu, nitroskupinu nebo atom chloru, a

$n$  je 0.

30

V tomto patentu Spojených států amerických je rovněž popsána kyselina dále uvedeného obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená atom vodíku a  $R_2$  znamená výše uvedený zbytek, ve kterém Z znamená atom vodíku a Q znamená atom chloru. Tyto produkty jsou transformačními produkty fosforových derivátů, přičemž jsou zde chráněny jako inhibitory koroze, aditiva pro oleje nebo jako samozhášecí přísady.

35

V časopise *Synthesis*, únor 1980, str. 127-129, se kromě jiného popisuje sloučenina dále uvedeného obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená ethylovou skupinu,  $R_2$  znamená fenylovou skupinu a  $n$  je rovno 0, přičemž ovšem zde není nikde autory uváděna jakákoliv terapeutická vlastnost této sloučeniny.

40

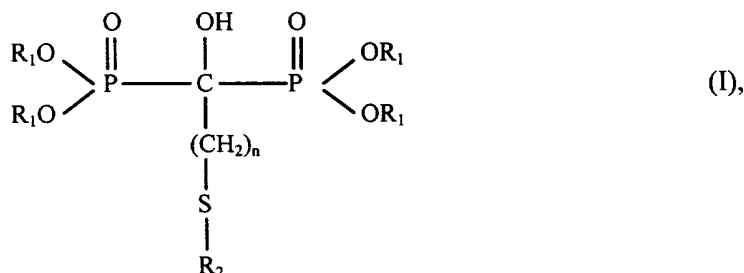
V japonské zveřejněné patentové přihlášce č. 80 98193 [*Chemical Abstracts* 93, 23648z (1980)] jsou jako herbicidně účinné látky uvedeny sloučeniny dále uvedeného obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená atom vodíku,  $R_2$  znamená pyridylovou skupinu a  $n$  je rovno 0.

45

V časopise *Für Praktische Chemie*, 1970 (3), str. 475-482, se popisuje sloučenina dále uvedeného obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená atom vodíku,  $R_2$  znamená methylovou skupinu a  $n$  je rovno 0. Tento článek popisuje pouze chemismus této sloučeniny.

Podstata vynálezu

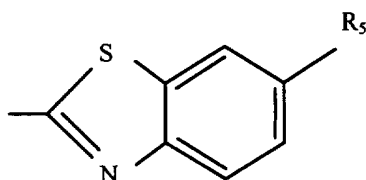
Podstatou předmětného vynálezu jsou deriváty kyseliny methylen difosfonové obecného vzorce I:



ve kterém:

$\text{R}_1$  znamená vodík nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem,

$\text{R}_2$  znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 5 atomů uhlíku, fenylovou skupinu, popřípadě substituovanou alkylovou skupinou, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, pyridylovou nebo pyrimidinylovou skupinu, pětičlenný heterocyklus, kondenzovaný s benzenovým jádrem vzorce:



ve kterém:

$\text{R}_5$  znamená atom halogenu, výhodně chloru, a

$n$  znamená celé číslo 1 až 10,

s podmínkou, že je-li  $n = 1$ , má  $\text{R}_2$  uvedený význam s výjimkou alkylové nebo nesubstituované fenylové skupiny,

a jejich soli s minerálními nebo organickými bázemi, je-li  $\text{R}_1$  atom vodíku.

Podstata postupu přípravy derivátů kyseliny methylen difosfonové výše uvedeného obecného vzorce I podle vynálezu spočívá v tom, že se chlorid kyseliny obecného vzorce II:



ve kterém má  $\text{R}_2$  stejný význam jako bylo uvedeno shora,

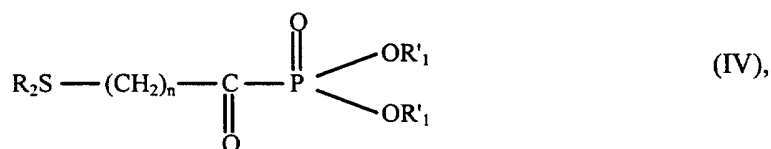
nechá reagovat při teplotě 20 °C až 50 °C s trialkylfosfitem obecného vzorce III:



ve kterém:

$\text{R}'_1$  představuje alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem,

a získaná sloučenina obecného vzorce IV:



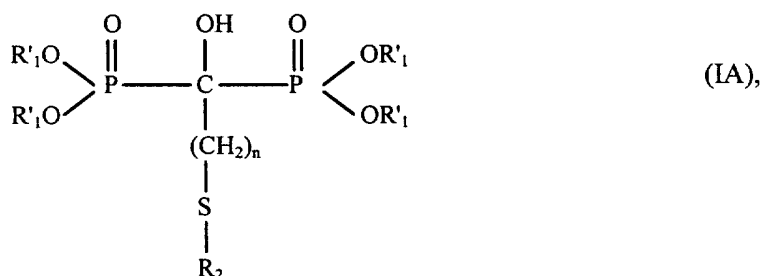
ve kterém mají  $R_2$  a  $R'_1$  stejný význam jako bylo uvedeno shora,

se nechá při teplotě 20 °C až 50 °C reagovat v přítomnosti sekundárního aminu s dialkylfosfitem obecného vzorce V:



ve kterém má  $R'_1$  stejný výše uvedený význam,

za vzniku sloučeniny obecného vzorce IA:



ve kterém:

$R'_1$  znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, která se popřípadě zmýdelní, popřípadě se získaná kyselina převede na sůl.

Podstata alternativního postupu přípravy derivátů kyseliny methylen difosfonové obecného vzorce I podle vynálezu spočívá v tom, že se halogenovaný chlorid kyseliny obecného vzorce VI:

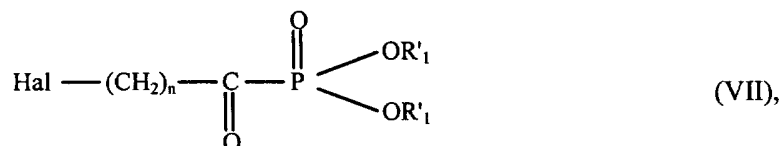


ve kterém Hal znamená atom halogenu,

nechá reagovat při teplotě 20 °C až 50 °C s trialkylfosfitem obecného vzorce III:



ve kterém  $R'_1$  představuje alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem, a vzniklá sloučenina vzorce VII:

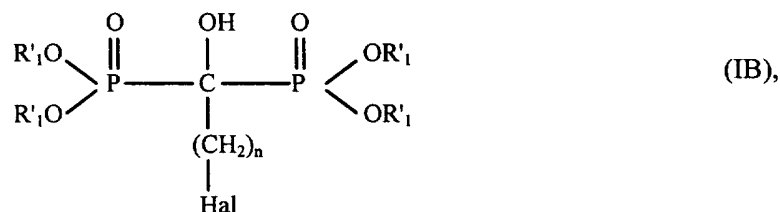


ve kterém mají Hal a  $R'_1$  stejný význam jako bylo uvedeno shora,

se při teplotě 20 °C až 50 °C podrobí v přítomnosti sekundárního aminu působení dialkylfosfitu obecného vzorce V:



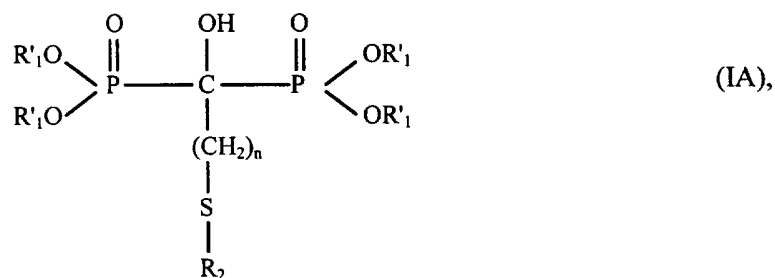
ve kterém má  $R'_1$  výše uvedený význam,  
za vzniku sloučeniny obecného vzorce IB:



- 5 ve kterém  $\text{Hal}$  a  $R'_1$  mají stejný význam jako bylo uvedeno shora,  
na kterou se v rozpouštědle a v přítomnosti 1,5-diazabicyklo[5,4,0]undec-5-enu působí thiolem  
obecného vzorce VIII:



- 10 ve kterém má  $R_2$  stejný význam jako bylo uvedeno shora,  
za vzniku sloučeniny obecného vzorce IA:

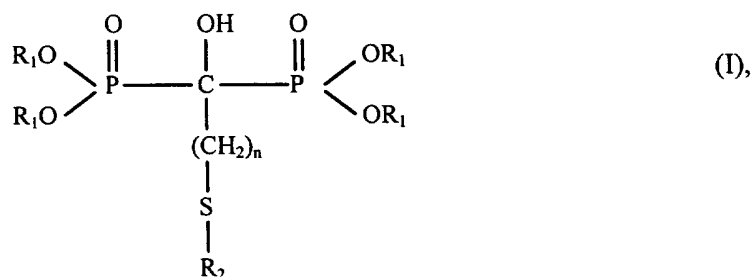


- 15 ve kterém:

$R'_1$  znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem, a

- 20  $R_2$  má stejný význam jako bylo uvedeno shora, která se popřípadě zmýdelní, popřípadě se získaná kyselina převede na sůl.

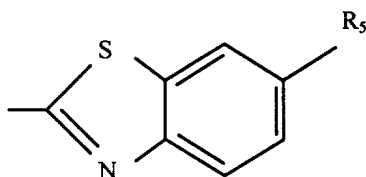
- 25 Do rozsahu předmětného vynálezu rovněž náleží protizánětlivý a protirevmatický farmaceutický prostředek, jehož podstata spočívá v tom, že v kombinaci s farmaceuticky přijatelným vehikulem obsahuje účinné množství alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I:



ve kterém:

- 30  $R_1$  znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem,

$R_2$  znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 5 atomů uhlíku, fenylovou skupinu, popřípadě substituovanou alkylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy, pyridylovou nebo pyrimidinyllovou skupinu, pětičlenný heterocyklus, kondenzovaný s benzenovým jádrem vzorce:



5

ve kterém:

$R_5$  znamená atom halogenu, výhodně chloru, a

10

$n$  znamená celé číslo 1 až 10,

nebo její soli s minerální nebo organickou bází, je-li  $R_1$  atom vodíku.

15

Pokud se týče výše uvedených postupů přípravy, potom se ve výhodném provedení použije při reakci sloučeniny obecného vzorce IV se sloučeninou obecného vzorce V jako sekundárního aminu dibutylaminu, přičemž rovněž je výhodné, jestliže se tato reakce provádí bez izolování sloučeniny obecného vzorce IV z reakční směsi.

20

Podle výše uvedeného alternativního postupu se chlorid kyseliny obecného vzorce II nahradí chloridem halogenované kyseliny obecného vzorce VII, přičemž tento postup vede ve dvou stupních ke sloučenině obecného vzorce IB.

25

Tento produkt obecného vzorce IB se uvede do reakce s thiolem výše uvedeného obecného vzorce VIII v rozpouštědle, kterým je například acetonitril, a v přítomnosti 1,5-diaza-5-bicyklo[5,4,0]undecenu při nízké teplotě, čímž se získá sloučenina obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená alkylovou skupinu.

30

Ze sloučenin obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená alkylovou skupinu, se získají sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém  $R_1$  znamená atom vodíku, zmýdlením. Při tomto postupu se postupuje tak, že se ester zahřívá ve zředěné kyselině chlorovodíkové při teplotě varu pod zpětným chladičem po dobu několika hodin až 24 hodin podle konkrétních použitých reakčních složek. Po oddělení, které se provede oddestilováním, může být takto získaná kyselina převedena známým způsobem v některou ze svých solí. Pracuje se v rozpouštědle za tepla přičemž sůl vykryštalizuje ochlazením.

35

Zmýdlení esteru může být rovněž provedeno působením trimethylsilylbromidu v rozpouštědle, jakým je například tetrachlormethan, při málo zvýšené teplotě, nejčastěji při teplotě místnosti.

Způsob podle vynálezu je blíže objasněn dále uvedenými příklady provedení.

40

#### Příklady provedení vynálezu

##### Příklad 1

45

Tetraethyl-[5-(4-fluorfenylthio)-1-hydroxy-1,1-pentyliden]-difosfonát  
(SR 41906)

K 12,1 g 5-(4-fluorfenylthio)valerylchloridu se v atmosféře dusíku přidá při teplotě 30 °C a za  
míchání 8,8 g triethylfosfitu. Směs se míchá při teplotě 35 °C po dobu 3 hodin, načež se ochladí  
na teplotu 0 °C. Potom se k ní přidá během 10 minut směs 0,45 ml dibutylaminu a 6,5 ml  
diethylfosfitu. Směs se míchá při teplotě 5 °C po dobu 1 hodiny, načež se k ní přidá 20 ml 1N  
5 vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové a 100 ml ethyletheru. Po rozmíchání se oddělí  
etherová vrstva a vodná fáze se reextrahuje 100 ml methylenchloridu. Organické extrakty se  
spojí, vysuší síranem sodným a rozpouštědla se odpaří za sníženého tlaku.

10 Zbytek se chromatografuje na sloupci silikagelu za použití směsi methylenchloridu s ethanolem  
v objemovém poměru 95 : 5 jako elučního činidla.

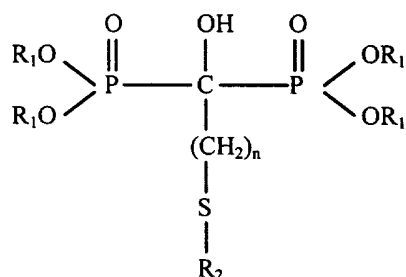
Tím se získá vyráběný produkt v podobě bezbarvého oleje v množství 8,7 g.

Chromatografie na tenké vrstvě silikagelu:

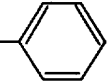
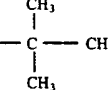
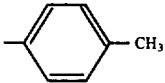
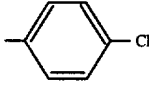
15  $R_f = 0,40$  (za použití směsi ethylacetátu s ethanolem v objemovém poměru 95 : 5 jako elučního  
činidla)

20 Stejným způsobem se za použití různých chloridů kyselin a/nebo fosfitů připraví sloučeniny  
obecného vzorce I, uvedené v následující tabulce I.

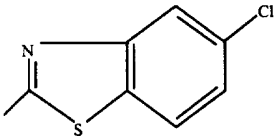
Tabulka I



25

| kódové<br>označení<br>sloučeniny | R <sub>1</sub>                 | R <sub>2</sub>                                                                      | n | charakteristika (chromatografie na<br>tenké vrstvě silikagelu)            |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------------------------------------------|
| SR 41 962                        | -CH <sub>3</sub>               | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>                                   | 3 | bezbarvý olej<br>$R_f=0,40$ (směs ethylacetátu<br>s ethanolem 80:20 obj.) |
| SR 41 963                        | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |  | 2 | bezbarvý olej<br>$R_f=0,30$ (směs ethylacetátu<br>s ethanolem 95:5 obj.)  |
| SR 42 292                        | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |  | 1 | bezbarvý olej<br>$R_f=0,30$ (směs ethylacetátu<br>s ethanolem 95:5 obj.)  |
| SR 41 940                        | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |  | 4 | bezbarvý olej<br>$R_f=0,50$ (směs ethylacetátu s<br>ethanol 90:10 obj.)   |
| SR 41 876                        | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |  | 3 | olej<br>$R_f=0,34$ (směs ethylacetátu<br>s ethanol 95:5 obj.)             |

Tabulka I - pokračování

| kódové<br>označení<br>sloučeniny | R <sub>1</sub>                 | R <sub>2</sub>                                                                    | n  | charakteristika (chromatografie na<br>tenké vrstvě silikagelu)                     |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------|
| SR 42 295                        | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> |  | 4  | bezbarvý olej<br>R <sub>f</sub> =0,25 (směs ethylacetátu<br>s ethanolem 95:5 obj.) |
| SR 42 014                        | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>                                 | 5  | bezbarvý olej<br>R <sub>f</sub> =0,30 (směs ethylacetátu<br>s ethanolem 95:5 obj.) |
| SR 42 089                        | -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> | -CH <sub>3</sub>                                                                  | 10 | bezbarvý olej<br>R <sub>f</sub> =0,25 (směs ethylacetátu<br>s ethanolem 95:5 obj.) |

## 5 Příklad 2

Tetraethyl-[5-(2-pyridylthio)-1-hydroxy-1,1-pentyliden]-difosfonát  
(SR 42 090)

- 10 a) Za použití 5-bromvalerylchloridu jakožto chloridu kyseliny se postupem podle příkladu 1 připraví tetraethyl-(5-brom-1-hydroxypentyliden)difosfonát. Tento produkt se izoluje v podobě oleje.

Chromatografie na tenké vrstvě silikagelu:

15

R<sub>f</sub> = 0,4 (směs ethylacetátu s ethanolem 80:20 obj.)

- 20 b) K roztoku 4,4 g produktu, získaného podle odstavce a) v 5 ml acetonitrilu, ochlazeného na teplotu 0 °C, se během 15 minut přidá směs 2,2 g 2-merkaptopyridinu s 2 g 1,5-diazabicyklo-[5,4-0]undec-5-enu v 6 ml acetonitrilu. Reakční směs se pak míchá hodinu při teplotě 0 °C, načež se chromatografuje na sloupci 150 g silikagelu. Po promytí methylenchloridem se sloupec eluuje směsí methylenchloridu s ethanolem v objemovém poměru 95:5.

Získá se vyráběný produkt v podobě nažloutlého oleje.

25

Chromatografie na tenké vrstvě silikagelu:

R<sub>f</sub> = 0,15 (směs ethylacetátu s ethanolem 95:5 obj.)

- 30 Nahražením 5-bromvalerylchloridu, uvedeného v odstavci a), 6-bromhexanoylchloridem se obdobným postupem připraví diethyl-(6-brom-1-hydroxy-1,1-hexyliden) difosfonát.

- 35 Tento produkt se zpracuje postupem, uvedeným v odstavci b), působením 5-chlor-2-merkaptobenzothiazolu na tetraethyl-6-[(5-chlor-2-benzothiazolyl)thio]-1-hydroxy-1,1-hexyliden-difosfonát (SR 42 294) v podobě bezbarvého produktu, o teplotě tání 72 °C (po překrystalování z isopropyletheru).

## Příklad 3

Bis-terc.butylaminová sůl kyseliny 4-(4-chlorfenylthio)-1-hydroxy-1,1-butyldifosfonové (SR 41 903)

5

Směs 5 g tetraethyl-[4-(4-chlorfenylthio)-1-hydroxy-1,1-butylden]difosfonátu s 50 ml 12 N kyseliny chlorovodíkové se zahřívá pod zpětným chladičem v atmosféře dusíku po dobu 12 hodin. Reakční směs se pak odpaří do sucha za sníženého tlaku, zbytek se rozpustí ve 100 ml destilované vody a roztok se dvakrát promyje 100 ml etheru. Vodná fáze se odpaří do sucha.

10

Bezbarvý tuhý zbytek se rozpustí ve 30 ml isopropanolu a ke vzniklému roztoku se přidá 3,6 ml terc.butylaminu. Vyloučená sraženina se odstředí a promyje isopropanolem, acetone a pak etherem. Po vysušení za sníženého tlaku se získá bezbarvý tuhý produkt (4 g) o teplotě tání 202 až 205 °C (za rozkladu).

15

Obdobným postupem se z tetraethylesteru, připraveného v příkladu 2, získá kyselina 5-(2-pyridylthio)-1,1-pentylidendifosfonová, izolovaná v podobě volné kyseliny (SR 42 099).

Teplota tání této kyseliny je v rozmezí 194 až 197 °C (po překrystalování z isopropylalkoholu).

20

## Příklad 4

Bis-terc.butylaminová sůl kyseliny 5-(4-fluorfenylthio)-1-hydroxypentylidendifosfonové (SR 41 909)

25

K roztoku esteru SR 41 906 (z příkladu 1), ochlazenému na teplotu 10 °C, v 15 ml tetrachlormethanu se za míchání přidá 5 ml trimethylbromsilanu a směs se ponechá při teplotě 25 °C po dobu 40 hodin. Pak se k reakční směsi přidá 40 ml vody a směs se hodinu míchá. Vodná fáze se dekantuje a dvakrát promyje 30 ml methylenchloridu. Vodná fáze se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Zbytek se vyjme 30 ml vody a roztok se znovu odpaří do sucha za sníženého tlaku.

30

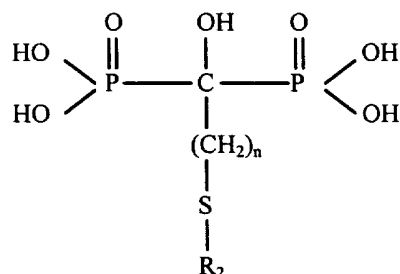
Sirupovitý zbytek se přemění v bis-terc.butylaminovou sůl postupem, uvedeným v příkladu 3. Získá se bezbarvý tuhý produkt o teplotě tání v rozmezí 211 až 215 °C.

35

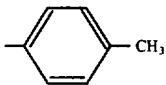
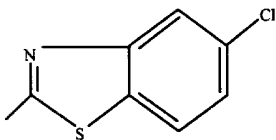
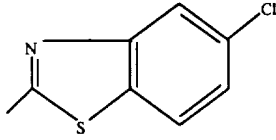
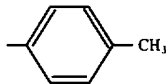
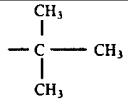
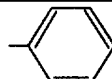
Obdobným postupem se z jednotlivých dříve připravených esterů vyrobí kyseliny, uvedené v následující tabulce II.

40

## Tabulka II



45

| kódové označení sloučeniny | n  | R <sub>2</sub>                                                                      | forma izolovaného produktu, vlastnosti                                         |
|----------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| SR 42 142                  | 10 |    | bis-terc.butylaminová sůl<br>teplota tání 242 až 246 °C                        |
| SR 42 097                  | 10 | -CH <sub>3</sub>                                                                    | bis-terc.butylaminová sůl<br>teplota tání 195 až 200 °C (za rozkladu)          |
| SR 42 304                  | 5  |    | volná kyselina, krystalující s 1 molekulou vody, teplota tání 205 až 208 °C    |
| SR 42 015                  | 5  | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                    | sůl s 2,5 molekulami terc.butylaminu, teplota tání 202 až 205 °C (za rozkladu) |
| SR 42 296                  | 4  |    | volná kyselina, teplota tání 165 až 168 °C                                     |
| SR 42 016                  | 4  |    | dvojsodná sůl, teplota tání vyšší než 300 °C                                   |
| SR 42 293                  | 1  |  | terc.butylaminová sůl (1,75 mol), teplota tání 220 až 225 °C (za rozkladu)     |
| SR 41 961                  | 3  | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>                                   | terc.butylaminová sůl (1,5 mol), teplota tání 175 až 178 °C                    |
| SR 42 017                  | 2  |  | volná kyselina, teplota tání 145 až 148 °C                                     |

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu, se s výhodou používají jakožto protizáněťová a protirevmatická léčiva; jejich farmakologické vlastnosti jsou prokázány dále uvedenými testy.

5

#### Testy in vitro

Tento test je založen na skutečnosti, že chondrocyty, kultivované na živném médiu, vylučují neutrální proteinázy po stimulaci faktorem, syntetizovaným peritoneálními makrofágy s monojadernými krevními buňkami.

10

Existence tohoto typu stimulace při revmatických onemocněních byla jednoznačně prokázána v četných publikacích.

15

Princip tohoto testu spočívá v tom, že se studuje vylučování neutrálních proteináz stimulovanými chondrocyty, a to jednak v přítomnosti účinných látek podle vynálezu, jednak v jejich nepřítomnosti. Přitom se používá níže popsání metodiky.

20

## Příprava chondrocytů

Chondrocyty se izolují z chrupavky, tvořící nosní přepážku telete, nebo z kloubní chrupavky zajíce enzymatickou digescí. Přenesou se do živného prostředí DMEM s 10 % telecího séra při hustotě buněk  $5 \times 10^5$  na jednu Petriho misku o průměru 10 cm. Živné prostředí se obnovuje každých 48 hodin.

Po týdenní kultivaci se buňky subkultivují působením trypsinu EDTA. Pak se převedou do živného prostředí s 10 % foetálního telecího séra při hustotě buněk  $2 \times 10^5$  na jednu zkušavku o průměru 16 mm. Konfluence se provede po 3 dnech kultivace.

## Příprava živného prostředí s peritoneálními makrofágy

Králičí peritoneální makrofágy se získají metodou, popsanou Deshmukh-Phadkem a kol. v časopise Biochemical Biophysical Research Communication, 85, str. 490 až 496 (1978).

Monojaderné buňky lidské krve se připraví a kultivují postupem, popsaným Dayerem a kol. v časopise The Journal of Immunology, 124, str. 1712 až 1720 (1980).

Po kultivaci se živné prostředí, obsahující "faktor, stimulující chondrocyty", izoluje, zfiltruje přes filtr typu Millipore 0,22  $\mu$  a zmrazí při teplotě -20 °C.

## Stimulace chondrocytů

Při konfluenci se živné prostředí chondrocytů zamění za živné prostředí DMEM s 1 % foetálního telecího séra, obsahující 20 % živného prostředí s obsahem faktoru, stimulujícího chondrocyty.

Testované produkty se do živného prostředí přidají současně s aktivačním prostředím v dávce, která vylučuje cytotoxicitu produktu a jeho nerozpustnost. Po třech dnech kultivace se v živném prostředí stanoví obsah neutrálních proteináz.

## Stanovení neutrálních proteináz

K tomuto stanovení se použije metodiky, popsané Vaesem a kol. v časopise Biochemical Journal, 172, str. 261 (1978).

Výsledky, získané s použitím sloučeniny SR 42 099 podle vynálezu, jsou vyjádřeny jako procentová inhibice vylučování neutrálních proteináz chondrocyty v přítomnosti testovaných sloučenin, vztažená na neinhibované vylučování neutrálních proteináz chondrocyty. U uvedené sloučeniny činí inhibice  $50 \pm 5 \%$ .

## Testy in vivo

Injekce druhu Mycobacterium vyvolá u myši polyartritidu, připomínající v některých ohledech revmatoidní artritidu u lidí.

## Metodika

Suspenze druhu *Mycobacterium tuberculosis* (0,4 mg v 0,05 ml parafinového oleje) se intradermálně injikuje do ocásků myších samečků typu Sprague-Dawley o průměrné hmotnosti 150 g.

Po 15 dnech se vyberou zvířata, která vykazují nejvýraznější symptomy artritidy. Tito samečci se rozdělí do skupin po pěti a každé skupině se po šest dnů v týdnu subkutánně injikuje vždy jedna testovaná sloučenina v dávce  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$ ; jedna skupina tvoří kontrolní skupinu a injikuje se jí pouze rozpouštědlo testovaných sloučenin.

Po třech týdnech takovéto aplikace se pokusná zvířata usmrtí a oddělí se jim pravá zadní tlapka v úrovni zánartního holenního kloubu, načež se zváží.

Pro každou skupinu myších jedinců se stanoví průměrná hmotnost tlapky a standardní chyba.

Účinnost jednotlivých testovaných sloučenin je vyjádřena jako procentová inhibice změny hmotnosti tlapky následkem artritidy. Tyto výsledky jsou vztaženy na hmotnost artritické tlapky zvířete, kterému nebyly aplikovány inhibující testované sloučeniny, a jsou uvedeny v následující tabulce III.

Tabulka III

| kódové označení sloučeniny | inhibice změny hmotnosti myší tlapky (%) |
|----------------------------|------------------------------------------|
| SR 41 961                  | 53                                       |
| SR 41 903                  | 55                                       |
| SR 41 909                  | 53                                       |
| SR 42 015                  | 47                                       |
| SR 42 017                  | 49                                       |
| SR 41 903                  | 55                                       |
| SR 42 016                  | 48                                       |
| SR 42 099                  | 44                                       |
| SR 42 097                  | 50                                       |

Sloučeniny, vyrobené způsobem podle vynálezu, jsou, jak bylo pokusy zjištěno, málo toxické.

Mohou být použity v humánní terapii k léčení onemocnění zánětlivého původu a zejména k léčení artritických onemocnění. Obzvláště mohou být sloučeniny podle vynálezu použity k léčení revmatoidní polyartritidy.

Sloučeniny podle vynálezu mohou být aplikovány v aplikačních formách, vhodných pro perorální, endorektální a parenterální aplikaci.

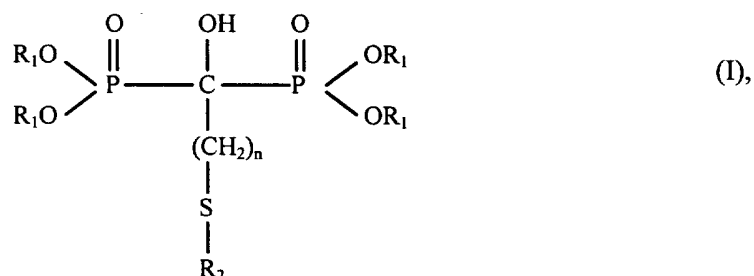
Jsou to zejména želatinové tobolky a tablety, které obsahují jednotkovou dávku 10 až 100 mg účinné látky. Denní dávkování těchto produktů může u dospělých činit 100 mg až 5 g na den, přičemž tato denní dávka může být rozdělena na několik menších dávek.

Jakožto příklad možné galenické formy lze uvést želatinovou tobolku, obsahující

|   |                   |        |
|---|-------------------|--------|
|   | CM 41 421         | 200 mg |
|   | Aerosil           | 1 mg   |
| 5 | Stearát hořečnatý | 3 mg   |
|   | Škrob STARX 1500  | 96 mg  |
|   |                   | -----  |
|   |                   | 300 mg |

## PATENTOVÉ NÁROKY

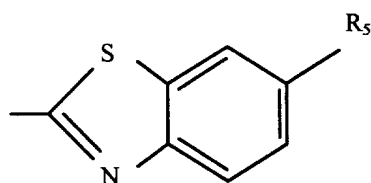
### 1. Deriváty kyseliny methylen difosfonové obecného vzorce I:



ve kterém :

R<sub>1</sub> znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem,

R<sub>2</sub> znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 5 atomů uhlíku, fenylovou skupinu, popřípadě substituovanou alkylovou skupinou, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, pyridylovou nebo pyrimidinylovou skupinu, pětičlenný heterocyklus, kondenzovaný s benzenovým jádrem vzorce:



ve kterém:

R<sub>5</sub> znamená atom halogenu, výhodně chloru, a

n znamená celé číslo 1 až 10,  
s podmínkou, že je-li n = 1, má R<sub>2</sub> uvedený význam s výjimkou alkylové nebo nesubstituované  
fenylové skupiny,

a jejich soli s minerálními nebo organickými bázemi, je-li  $R_1$  atom vodíku.

**2. Způsob přípravy derivátů kyseliny methylen difosfonové obecného vzorce I podle nároku 1, vyznačující se tím, že se chlorid kyseliny obecného vzorce II:**

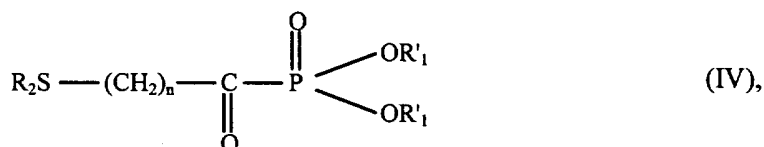


ve kterém má  $R_2$  stejný význam jako v nároku I,  
nechá reagovat při teplotě 20 °C až 50 °C s trialkylfosfitem obecného vzorce III:



ve kterém :

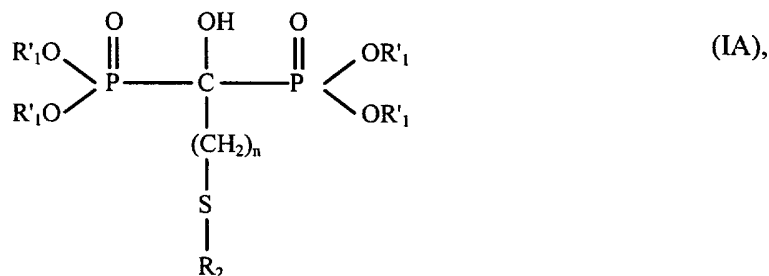
- 10  $R'_1$  představuje alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem,  
a získaná sloučenina obecného vzorce IV:



- 15 ve kterém mají  $R_2$  a  $R'_1$  stejný význam jako bylo uvedeno shora,  
se nechá při teplotě 20 °C až 50 °C reagovat v přítomnosti sekundárního aminu s dialkylfosfitem obecného vzorce V:



ve kterém má  $R'_1$  stejný výše uvedený význam,  
za vzniku sloučeniny obecného vzorce IA:



- 25 ve kterém :

- 30  $R'_1$  znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku,  
která se popřípadě zmýdelní, popřípadě se získaná kyselina převede na sůl.

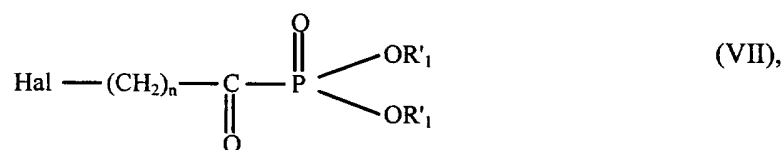
3. Způsob přípravy derivátů kyseliny methylen difosfonové obecného vzorce I podle  
nároku I, **vyznačující se tím**, že se halogenovaný chlorid kyseliny obecného vzorce VI:



- ve kterém Hal znamená atom halogenu,  
nechá reagovat při teplotě 20 °C až 50 °C s trialkylfosfitem obecného vzorce III:



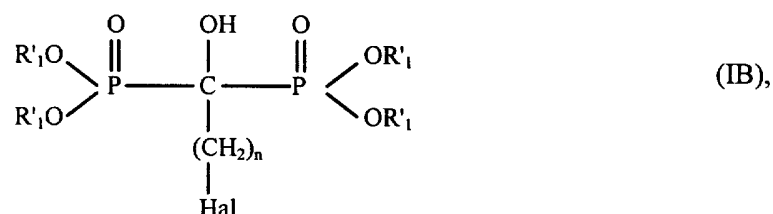
ve kterém  $R'_1$  představuje alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem,  
a vzniklá sloučenina vzorce VII:



ve kterém mají Hal a  $R'_1$  stejný význam jako bylo uvedeno shora,  
se při teplotě 20 °C až 50 °C podrobí v přítomnosti sekundárního aminu působení dialkylfosfitu  
obecného vzorce V:



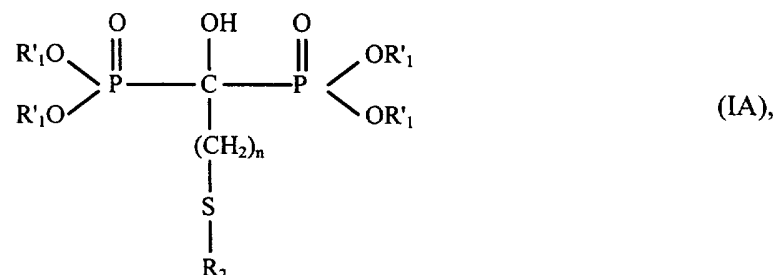
ve kterém má  $R'_1$  výše uvedený význam,  
za vzniku sloučeniny obecného vzorce IB:



ve kterém Hal a  $R'_1$  mají stejný význam jako bylo uvedeno shora,  
na kterou se v rozpouštědle a v přítomnosti 1,5-diazabicyklo[5,4,0]undec-5-enu působí thiolem  
obecného vzorce VIII:



ve kterém má  $R_2$  stejný význam jako bylo uvedeno v nároku 1,  
za vzniku sloučeniny obecného vzorce IA:

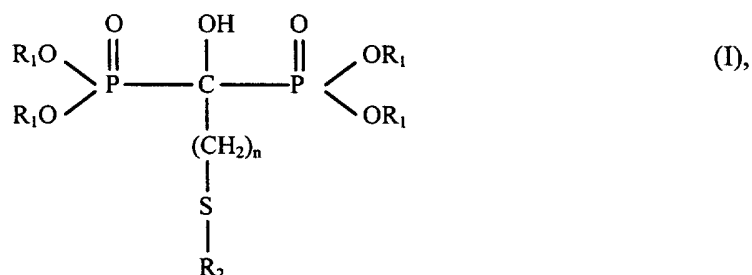


ve kterém:

$R'_1$  znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem, a

$R_2$  má stejný význam jako bylo uvedeno v nároku 1,  
která se popřípadě zmýdelní, popřípadě se získaná kyselina převede na sůl.

4. Protizánětový a protirevmatický farmaceutický prostředek, **vyznačující se tím**, že v kombinaci s farmaceuticky přijatelným vehikulem obsahuje účinné množství alespoň jedné sloučeniny obecného vzorce I:



5

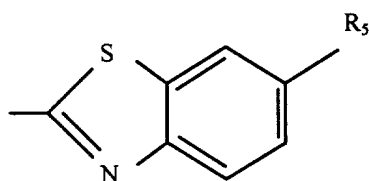
ve kterém:

$\text{R}_1$  znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, s přímým nebo rozvětveným řetězcem,

10

$\text{R}_2$  znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 5 atomů uhlíku, fenylovou skupinu, popřípadě substituovanou alkylovou skupinou s 1 až 4 uhlíkovými atomy, pyridylovou nebo pyrimidinylovou skupinu, pětičlenný heterocyklus, kondenzovaný s benzenovým jádrem vzorce:

15



ve kterém:

$\text{R}_5$  znamená atom halogenu, výhodně chloru, a

20

$n$  znamená celé číslo 1 až 10, nebo její soli s minerální nebo organickou bází, je-li  $\text{R}_1$  atom vodíku.

25

---

Konec dokumentu

---