

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

⑲

N° 83 05858

⑤4 Nouveaux acides diphosphoniques, leurs sels, leur procédé de préparation et leur application en thérapeutique.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 F 9/38; A 61 K 31/66.

⑲ Date de dépôt..... 11 avril 1983.

⑳ ⑳ ㉑ Priorité revendiquée : IT, 15 avril 1982, n° 20781 A/82.

④1 Date de la mise à la disposition du public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 42 du 21-10-1983.

⑦1 Déposant : ISTITUTO GENTILI SPA. — IT.

⑦2 Invention de : Sergio Rosini et Giorgio Staibano.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

⑦4 Mandataire : Cabinet Malémont,
42, av. du Président-Wilson, 75116 Paris.

La présente invention concerne la préparation d'acides diphosphoniques et de leurs sels. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques convenables pour le traitement de l'urolithiase et pour l'inhibition de la réabsorption osseuse.

On sait depuis longtemps que de faibles concentrations de phosphates condensés peuvent prévenir le dépôt du carbonate de calcium des solutions ; outre cet effet, les phosphates condensés et parmi ceux-ci le pyrophosphate, sont capables d'inhiber la précipitation du phosphate de calcium lorsqu'ils sont ajoutés, même en faible concentration aux solutions de phosphate de calcium. Cette action inhibitrice se manifeste aussi bien en présence qu'en l'absence de cristaux d'apatite.

Les phosphates condensés ralentissent en outre la transformation du phosphate de calcium de sa phase amorphe à sa phase cristalline sans cependant influencer la formation de la phase amorphe.

L'effet marqué in vitro du pyrophosphate (PP) sur le phosphate de calcium, à des concentrations voisines de celles constatées dans les fluides biologiques, a suggéré que le pyrophosphate pourrait protéger les tissus mous contre la minéralisation. Dans l'os le PP pourrait régler le développement de la calcification et en outre influencer le métabolisme du calcium et du phosphate.

Le PP au niveau de l'os déjà minéralisé a une influence sur le mouvement du calcium et du phosphate vers l'intérieur et l'extérieur de l'os. Malgré toutes les connaissances acquises sur le PP, son emploi thérapeutique est impossible à cause de l'hydrolyse rapide qu'il subit quand il est administré soit par voie orale soit par voie systémique.

Etant donné le grand intérêt que présente le PP, on a effectué des recherches tendant à réaliser des substances ayant des effets analogues mais résistant à l'hydrolyse.

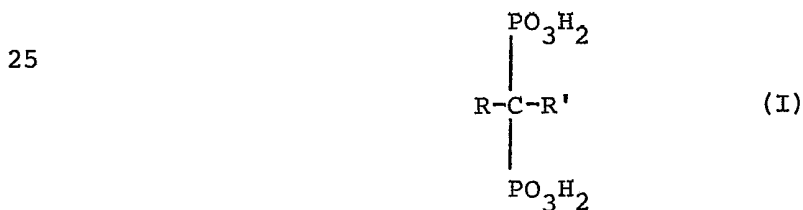
Ce but a été partiellement atteint par la synthèse de diphosphonates c'est-à-dire de composés caractérisés par une

liaison P-C-P au lieu de P-O-P. Les effets des diphosphonates sur les sels de calcium ressemblent étroitement à ceux du PP ; en effet, déjà à basse concentration :

- ils inhibent la précipitation du phosphate de calcium des solutions ;
- ils bloquent la transformation du phosphate de calcium amorphe dans la phase cristalline sans cependant inhiber la formation de la phase initiale ;
- ils bloquent l'agrégation des cristaux d'hydroxyapatite ;
- ils retardent le degré de dissolution des cristaux d'hydroxyapatite, après que ceux-ci aient absorbé à partir des solutions des diphosphonates.

Les nombreuses études pharmacologiques et cliniques décrites dans la littérature scientifique démontrent cependant que, malgré certaines analogies d'activités, les divers diphosphonates appliqués jusqu'à maintenant dans le traitement des ostéopathies, présentent des inconvénients plutôt graves en ce qui concerne le degré de toxicité chez les animaux et la tolérance ou l'induction d'effets secondaires négatifs chez l'homme.

On a trouvé surprenant que certains acides diphosphoniques de formule générale I :



dans laquelle R est un atome de fluor ou un résidu alkyle, linéaire ou ramifié, contenant de 1 à 5 atomes de carbone, éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants tels que des groupes amino et/ou des atomes de fluor et R' est un groupement hydroxyle ou le fluor, et leurs sels de métaux alcalins, avec des bases organiques et

des acides aminés basiques sont parfaitement adaptés pour le traitement de l'urolithiase et comme inhibiteurs de la réabsorption osseuse, parce qu'ils présentent une activité élevée non accompagnée par les effets secondaires précédemment décrits à propos du pyrophosphate (PP).

Divers acides diphosphoniques ont été décrits dans la littérature. En particulier des acides diphosphoniques de formule générale I dans laquelle R est un groupement alkyle non substitué et R' est un groupement hydroxyle, peuvent être préparés en faisant réagir un halogénure d'acyle ou l'anhydride d'un acide sur l'acide phosphoreux ou le trichlorure de phosphore. Bien que ce procédé donne de bons résultats dans le cas où R est un groupement éthyle, il est moins adapté pour obtenir des produits analogues contenant un résidu alkyle plus long et pratiquement irréalisable quand le résidu R est un groupement alkyle substitué par des groupements fonctionnels.

En outre, il n'est pas évidemment adapté pour obtenir des composés de formule I, dans lesquels R et/ou R' sont des atomes de fluor. On a trouvé maintenant que l'on peut obtenir des composés de formule générale I dans laquelle R est un groupement amino-alkyle et R' est un groupement hydroxyle, avec des rendements excellents et à l'état de pureté élevé lorsque l'on fait réagir un acide aminé sur l'acide phosphoreux (dans le but de bloquer la fonction amine réactive), fait réagir le produit résultant avec du trichlorure de phosphore puis hydrolyse le produit intermédiaire de réaction et isole le produit d'une façon convenable.

Au lieu du mélange d'acide phosphoreux et de trichlorure de phosphore on peut utiliser seulement du trichlorure de phosphore, en ajoutant la quantité stoechiométrique d'eau pour former l'acide phosphoreux correspondant.

Lorsque cela est possible, l'acide aminé peut être remplacé par l'un de ses précurseurs de façon à former l'acide aminé par hydrolyse, tel que le valérolactame ou le polyamide correspondant dans le cas de l'acide 5-aminovalérienique ou la pyrro-

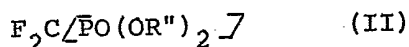
lidone dans le cas de l'acide-4-aminobutyrique.

La réaction s'effectue de préférence dans des solvants organiques aprotiques tels que les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et les hydrocarbures chlorés, mais elle peut
5 être effectuée également en l'absence de solvant.

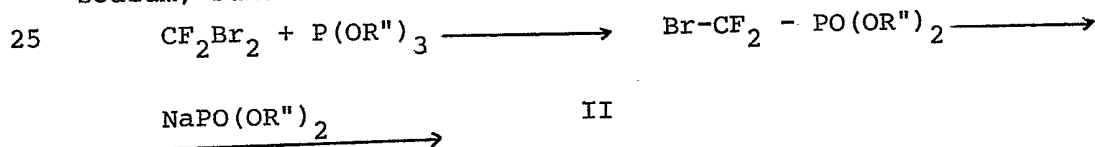
Pendant la réaction il se forme un solide pâteux dont la composition n'est pas définie, et duquel, par hydrolyse avec l'eau ou l'HCl aqueux, on obtient l'acide aminodiphosphonique désiré.

10 Le procédé décrit se prête facilement à la production industrielle des acides de formule I.

La préparation des acides diphosphoniques de formule générale I où R et R' sont tous deux des atomes de fluor peut être effectuée aisément et avec des rendements élevés en
15 hydrolysant les esters correspondants de formule générale II :



dans laquelle R'' est un résidu alkyle, linéaire ou ramifié contenant de 1 à 4 atomes de carbone. Les esters II s'obtien-
20 nent en faisant réagir l'ester correspondant de l'acide bromodifluorométhanephosphonique (que l'on peut obtenir à son tour en partant du dibromodifluorométhane et d'un trialkylphosphite) sur un dialkylphosphite d'un métal alcalin tel que le sodium, suivant le schéma :



L'hydrolyse de l'ester II en l'acide diphosphonique cor-
30 respondant est effectuée avec de l'eau et un acide minéral.

Les composés préférés que l'on peut obtenir par le procédé de la présente invention sont :

1'acide 5-amino-1-hydroxypentane-1,1-diphosphonique ;
1'acide 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonique ;
35 1'acide difluoro-méthanediphosphonique

et leurs sels de sodium, d'aniline ou de lysine.

A titre d'illustration, mais sans que cela représente une limitation du procédé, on fournit ci-après les exemples suivants :

5 Exemple 1 :

On prépare un mélange constitué par 117 g (1,0 mole) d'acide 5-aminovalérienique, 123 g (1,5 mole) d'acide phosphoreux et 500 ml de chlorobenzène anhydre. On chauffe au moyen d'un bain d'eau bouillante jusqu'à 100°C de façon à
10 solubiliser presque complètement le solide. En maintenant la température à 100°C et sous une vigoureuse agitation, on additionne lentement 206 g (1,5 mole) de trichlorure de phosphore. Environ 30 minutes après la fin de l'addition commence la formation d'une phase dense qui tente à augmenter et à durcir
15 avec le temps. On maintient pendant trois autres heures à 100°C puis on laisse refroidir sous agitation. De cette façon le solide se brise en petits morceaux et peut être filtré et lavé par du chlorobenzène.

On dissout le solide hygroscopique obtenu dans 500 ml
20 d'eau et on chauffe jusqu'à reflux pendant une heure. Après refroidissement, traitement de la solution par du carbone actif et filtration, on précipite l'acide brut au moyen de l'addition d'un excès de méthanol chaud et après séparation on cristallise dans un litre d'eau à 100°C.

25 On obtient 165 g (63 % du poids théorique) d'acide 5-amino-1-hydroxypentane-1,1-diphosphonique sous forme d'une poudre blanche cristalline avec p.f. = 235°C.

Analyses élémentaires

Trouvé : C = 22,69 ; H = 5,71 ; N = 5,14 ; P = 23,70

30 Calculé d'après la formule $C_5H_{15}NO_7P_2$: C = 22,82 ;
H = 5,75 ; N = 5,32 ; P = 23,54.

Spectre I.R.

Bande d'absorption à 3220, 1600 et 1510 cm^{-1}

Spectre 1H -R.M.N. (TMS comme référence)

35 $\delta = 1,8$ ppm (6H) ; $\delta = 3,0$ ppm (2H).

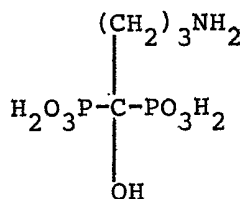
Exemple 2 :

Dans un réacteur vitrifié de 150 l on introduit 9,4 kg d'acide 5-aminovalérianique, 9,9 kg d'acide phosphoreux et 40 l de chlorobenzène anhydre. On chauffe sous agitation
5 jusqu'à 90-100°C et l'on ajoute en 30 minutes 16,5 kg de trichlorure de phosphore. Après avoir maintenu le mélange de réaction à 110°C pendant 3 heures on refroidit jusqu'à 80°C et l'on ajoute 50 l d'eau, de façon à solubiliser le solide. On laisse refroidir et l'on sépare la phase organique
10 de la phase aqueuse. Après traitement de la phase aqueuse par le carbone actif et filtration, on ajoute du méthanol en excès sous agitation de façon à faire précipiter l'acide aminodiphosphonique brut. On filtre et l'on cristallise dans 60 l d'eau bouillante. On obtient 12,4 kg de produit cristal-
15 lin formé par l'acide-5-amino-1-hydroxypentane-1,1-diphosphonique pur.

Exemple 3 :

Un mélange d'acide 4-aminobutyrique (1 mole), d'acide phosphoreux (1,5 mole) et de chlorobenzène anhydre (500 ml)
20 est chauffé à 100°C et en le maintenant à cette température, on le traite sous agitation énergique par du trichlorure de phosphore (1,5 mole). On agite pendant 3,5 heures à 100°C jusqu'à l'achèvement de la formation de la phase dense et puis on laisse refroidir. On filtre le solide, on le lave avec un
25 peu de chlorobenzène et on le dissout dans l'eau. On chauffe jusqu'à ébullition pendant une heure, on laisse refroidir et on ajoute du carbone actif. On filtre ensuite et l'on précipite le produit de la réaction avec un excès de méthanol à chaud. Le matériel brut ainsi obtenu est chauffé à reflux pen-
30 dant 8 heures dans de l'acide chlorhydrique à 20 % (dans l'eau). L'acide chlorhydrique est retiré par distillation et le résidu est cristallisé dans l'eau.

On obtient l'acide 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonique sous forme d'une poudre blanche cristalline dont la struc-
35 ture, comme le démontrent les données exposées ci-dessous, est :



5

Analyses élémentaires :

	Carbone	Hydrogène	Azote	Phosphore
	%	%	%	%
Trouvé	17,88	5,62	4,93	23,94
10 Calculé pour l'ABDP	19,28	5,26	5,64	24,86
Calculé pour				
1'ABDP.H ₂ O	17,98	5,66	5,24	23,19

Détermination de la teneur en humidité :

15 L'échantillon examiné suivant la méthode Karl Fischer présente une teneur en humidité d'environ 3,9 % en poids.

Titration potentiométrique

La courbe de titration potentiométrique est obtenue par addition de NaOH 0,1 N à une solution de 203 mg d'échantillons dissous dans 75 ml d'eau. Le profil de cette courbe est caractérisé par de nets points d'inflexion à pH 4,4 et 9,0 au moment de l'addition de 7,5 et 15,2 ml respectivement de la substance de titrage. En partant des valeurs trouvées, on calcule un poids équivalent de 270 pour la première neutralisation et de 264 pour la seconde et un poids équivalent moyen de 267. Le poids moléculaire de ABDP.H₂O est de 267,114.

25

Titration complexométrique

Le titrage complexométrique effectué avec du nitrate de thorium sur 41,47 mg de composés montre un point de virage net pour une addition de 5,4 ml d'agent titrant. De cette valeur il est possible d'obtenir pour le composé examiné un poids équivalent de 134, en accord avec la présence de deux groupes phosphoniques par molécule monohydratée.

30

Absorption infra-rouge

35 Le spectre infra-rouge enregistré sur une pastille de KBr présente des bandes caractéristiques à :

3600-2500 cm^{-1}

bande complexe due à la superposition des élongations des groupes OH acides et alcooliques, des groupes NH_3^+ et CH aliphatiques.

5 1650, 1605, 1500

bandes dues à la déformation du groupe NH_2 partiellement salifié par les groupes phosphoniques.

1160

élongation de la liaison P=O

10 1040

élongation de la liaison C-O

960, 930

élongation de la liaison P-O

600-400

15 bandes du squelette intéressant essentiellement la partie de la molécule contenant les atomes de phosphore.

Résonance magnétique nucléaire du proton (^1H -RMN)

20 Le spectre ^1H -RMN enregistré dans $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$ présente deux signaux élargis à $\delta 2,6$ ppm (CH_2 - β et CH_2 - γ du groupe NH_2) et 3,5 ppm (CH_2 - α du groupe NH_2) ayant une intensité relative 2:1.

Résonance magnétique nucléaire du carbone (^{13}C -RMN)

25 Le spectre ^{13}C -RMN enregistré dans $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$ présente des signaux à $\delta 20$ ppm (CH_2 - β du groupe NH_2), 28 ppm (CH_2 - γ du groupe NH_2), 39 ppm (CH_2 - α du groupe NH_2) et un triplet centré à 72 ppm (C- δ du groupe NH_2 , $J_{\text{C-P}}$ 156 Hz).

Résonance magnétique nucléaire du phosphore (^{31}P -RMN)

Le spectre ^{31}P -RMN enregistré dans $\text{D}_2\text{O}/\text{D}_2\text{SO}_4$ présente un signal unique à 9 ppm indiquant que les deux atomes de phosphore sont chimiquement et magnétiquement équivalents.

30 Exemple 4 :

Le diisopropylphosphite de sodium et le bromodifluorométhanephosphonate diisopropylique sont mis en réaction suivant des techniques habituelles pour donner l'ester tétraisopropylique de l'acide difluorométhanediphosphonique sous forme de 35 liquide incolore et inodore qui bout à 117°C (0,2 torr).

Spectre ^{19}F -R.M.N. : $\delta = 21,6$ (triplet, CF_2 , $J_{\text{F-P}} = 86,67$)

Spectre ^{31}P -R.M.N. : $\delta = 16,1$ (triplet, $J_{\text{F-P}} = 14,6$) ;

H_3PO_4 85 % comme l'étalon externe.

L'ester ainsi obtenu est hydrolysé en acide di-
 5 fluorométhanediphosphonique qui est obtenu sous forme cris-
 talline et maintenu dans un dessiccateur sur P_2O_5 et sous
 vide. C'est un solide hautement hygroscopique qui fond à
 90°C.

La courbe de titrage acide/base présente 2 points
 10 d'inflexion nets à pH 3,9 et 10,1 , correspondant, respecti-
 vement, aux sels disodique et tétrasodique, et un point d'in-
 flexion unique apparaissant à pH= 6,8 et correspondant au sel
 trisodique.

Le poids moléculaire correspondant auxdits points est de 210,3
 15 (théorique 211,99).

Exemple 5 :

A une suspension de 263 g d'acide 5-amino-1-hydroxypent-
 tan-1,1-diphosphonique dans 1 litre d'eau, on ajoute, en re-
 froidissant, une solution formée par 40 g d'hydroxyde de sodium
 20 dans 500 ml d'eau. On obtient une solution limpide qui, après
 traitement par du carbone actif, filtration et concentration,
 est maintenue sous une lente agitation en la refroidissant
 pendant 3 jours. On filtre le solide cristallin obtenu, on
 lave avec un peu d'eau froide et ensuite au méthanol.
 25 Après dessiccation à 110°C on obtient 199 g de sel monosodi-
 que de l'acide 5-amino-1-hydroxypent-1,1-diphosphonique.

Exemple 6 :

A partir de l'acide difluorométhanediphosphonique on obtient en
 opérant selon les techniques habituelles, le difluorométhane-
 30 diphosphonate trisodique sous forme de poudre cristalline
 blanche soluble dans l'eau.

Par le titrage acide/base on obtient un poids moléculai-
 re de 274,0 (théorique 277,9).

La solution aqueuse 0,1 M a un pH de 6,8.

Analyses élémentaires

Trouvé : C = 4,30 ; H = 0,52 ; P = 23,01 ; F = 12,90

Calculé pour $\text{CHF}_2\text{Na}_3\text{O}_6\text{P}_2$: C = 4,32 ; H = 0,36 ;
P = 22,29 ; F = 13,67.

5 Exemple 7 :

En partant de l'acide difluorométhanediphosphonique on obtient en opérant suivant les méthodes habituelles, le difluorométhanediphosphonate d'aniline qui, après recristallisation dans l'éthanol, fond à 163 - 165 °C.

10 Analyses élémentaires

Trouvé : C = 50,88 ; H = 6,02 ; N = 9,19 ; P = 9,90

Calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_6\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (sel tétraanilinique monohydraté) : C = 50,80 ; H = 5,57 ; N = 9,11 ; P = 10,08.

15 Spectre UV (en solution aqueuse) : maximum d'absorption à 279 nm ; $\epsilon \approx 3241$.

Exemple 8 :

A partir de l'acide difluorométhanediphosphonique on obtient, suivant la méthode de l'exemple 7, le difluorométhanediphosphonate de lysine. Le sel dilysinique obtenu dans l'eau se présente sous la forme d'une poudre blanche amorphe très soluble dans l'eau, hygroscopique. La solution 0,1 M a un pH de 4,0.

Analyses élémentaires

Trouvé : C = 30,03 ; H = 6,42 ; N = 10,87 ; P = 13,01

25 Calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{32}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{10}\text{P}_2$: C = 30,96 ; H = 6,39 ;
N = 11,11 ; P = 12,28.

ETUDE TOXICOLOGIQUE

L'étude a été effectuée sur les substances suivantes de l'invention :

30 acide 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonique
(AHB_UBP)

acide 5-amino-1-hydroxypentan-1,1-diphosphonique
(AHP_EBP)

35 acide difluorométhanediphosphonique (sel de Na)
(F₂MBP).

A titre de comparaison, on a utilisé les acides suivants :

acide 6-amino-1-hydroxyhexane-1,1-diphosphonique (AHE_XBP) (demande de brevet italien n° 19673 A/81) ; acide dichlorométhanediphosphonique (sel de Na) (Cl₂MBP) (connu).

Toxicité aiguë

On a utilisé pour l'étude des souris Swiss (mâles et femelles) de notre propre élevage : pendant l'expérience les animaux ont été alimentés comme cela est de règle avec de l'Altromine en pastilles. Pour l'administration orale et intrapéritonéale on a utilisé des solutions de gomme arabique à 5%, tandis que des solutions salines à pH = 4,0 ont été utilisées pour les injections i.v.

Les valeurs préliminaires de DL₅₀ ont été calculées suivant une méthode graphique.

Le tableau 1 indique les valeurs de la DL₅₀ chez les souris Swiss en mg/kg.

TABLEAU 1 : DL₅₀ - Souris Swiss - mg/kg

	os	i.p.	i.v.
AHB _U BP	> 2.000	-	85
AHP _E BP	1.500	75	85
AHE _X BP	> 2.000	125	75
F ₂ MBP	> 2.000	450	70
Cl ₂ MBP	> 2.000	750	130

Après l'administration par voie orale, même aux doses élevées, on n'a observé aucune altération du comportement de l'animal, il n'a pas été noté de mortalité et on observe seulement un certain ramollissement des fèces. L'autopsie des animaux morts a montré une légère modification des reins qui sont d'une couleur claire et anémiques.

Après l'injection i.v. les animaux meurent immédiatement aux doses les plus élevées avec convulsions et

dyspnée. A des doses inférieures à la léthalité, les convulsions sont moins accentuées et persistent pendant deux heures ; après retour à la normale, on observe des cas de décès après 2-4 jours avec dyspnée, érection des
 5 poils et activité motrice réduite. L'autopsie montre des reins rosés et jaunâtres avec des foyers hémorragiques. Les femelles présentent des ovaires hypertrophiés et hyperémiques. On en déduit que les nouveaux diphosphonates présentent une toxicité aiguë et chronique modérée.

10 Inhibition de la formation des cristaux

On a utilisé un système modèle pour évaluer la capacité des phosphonates à inhiber la formation des cristaux dans des solutions inorganiques.

Trois solutions de base ont été préparées suivant la
 15 méthode Fleisch.

1) - KH_2PO_4 0.0107 M ; KCl 0,117 M ; acide barbiturique 0,01 M.

2) - CaCl_2 0.0056 M ; KCl 0,138 M ; acide barbiturique 0,01 M.

20 3) - KCl 0,155 M, acide barbiturique 0,01 M.

Le pH a été porté à 7,4 par de la KOH. La concentration de Ca^{++} était de 6,7 mg%, niveau analogue à celui du calcium dans le sang d'ultrafiltration et la concentration du phosphate inorganique, Pi , a donné un produit $\text{Ca}^{++} \times \text{Pi} = 80$.
 25 La solution a été analysée pour doser Ca^{++} et Pi et distribuée dans des erlenmeyers, 12 ml pour chacun.

Les erlenmeyers ont été divisés en groupes comme suit :

- a) témoins
- b) $\text{AH}_{\text{EX}}\text{BP}$ 0,05 μM
- 30 c) $\text{AH}_{\text{EX}}\text{BP}$ 0,25 μM
- d) $\text{AH}_{\text{EX}}\text{BP}$ 0,5 μM
- e) $\text{AH}_{\text{EX}}\text{BP}$ 2,5 μM
- f) $\text{AH}_{\text{EX}}\text{BP}$ 5,0 μM
- g) Cl_2MBP 0,5 μM
- 35 h) Cl_2MBP 2,5 μM

	i)	Cl_2MBP	5,0 μM
	l)	F_2MBP	0,5 μM
	m)	F_2MBP	2,5 μM
	n)	F_2MBP	5,0 μM
5	o)	AHP_EBP	0,05 μM
	p)	AHP_EBP	0,25 μM
	q)	AHP_EBP	0,5 μM
	r)	AHP_EBP	2,5 μM
	s)	AHP_EBP	5,0 μM
10	t)	AHB_UBP	0,5 μM
	u)	AHB_UBP	2,5 μM
	v)	AHB_UBP	5,0 μM

et leurs contenus sont incubés et agités à 37°C pendant 2 jours

A la fin de l'incubation, les solutions ont été
 15 passées à travers des filtres millipores pour retenir les
 cristaux formés pendant l'incubation : le filtrat a été ensuite
 analysé pour doser le Ca^{++} et le Pi. Les résultats sont in-
 diqués sous la forme du produit $\text{Ca}^{++} \times \text{Pi}$ dans la solution
 à la fin de l'expérience dans le tableau 2.

20 Les données montrent que les diphosphonates de l'inven-
 tion induisent une nette activité inhibitrice sur la forma-
 tion et la croissance des cristaux d'apatite suivant un
 schéma fonction de la dose.

TABLEAU 2

5	Substance	Valeurs du produit Ca^{++} x Pi dans la solution		
		Concent. en μM	Avant l'incubation	Après l'incubation
	Contrôle	0,0	114,7	29
	Cl_2 MBP	0,5	"	44,0
10	Cl_2 MBP	2,5	"	60,4
	Cl_2 MBP	5,0	"	73,6
	F_2 MBP	0,5	"	44,6
	F_2 MBP	2,5	"	58,5
	F_2 MBP	5,0	"	72,0
15	AHE_X BP	0,05	"	30,0
	AHE_X BP	0,25	"	37,5
	AHE_X BP	0,5	"	59,6
	AHE_X BP	2,5	"	92,6
	AHE_X BP	5,0	"	95,3
20	AHP_E BP	0,05	"	36,7
	AHP_E BP	0,25	"	37,1
	AHP_E BP	0,5	"	68,6
	AHP_E BP	2,5	"	94,0
	AHP_E BP	5,0	"	97,5
25	AHB_U BP	0,5	"	53,2
	AHB_U BP	2,5	"	88,6
	AHB_U BP	5,0	"	93,5

ESSAI PHARMACOLOGIQUE

Le but de cette étude a été de déterminer l'effet d'une série de nouveaux diphosphonates sur des cellules de la voûte crânienne en culture et sur la réabsorption osseuse et la minéralisation in vivo.

Méthodes

1. Expérience sur les cellules de la voûte crânienne

Culture cellulaire : les cellules ont été cultivées comme indiqué par Fast et coll. (Biochem. J. 172, 97-107 (1978)). Autrement dit, brièvement, les cellules étaient prélevées sur des rats Wistar d'un jour et digérées par de la collagénase. Les cellules libérées étaient mises sur plaques à la concentration de 200.000 cellules par ml de milieu dans des disques "cluster" de culture à 24 évidements de 1,6 cm de diamètre contenant 0,5 ml de milieu. Les cellules étaient cultivées dans le milieu minimal essentiel contenant 10 % de sérum de veau foetal, sous une atmosphère de CO₂ à 5 % à 37°C jusqu'au 8ème jour.

Les diphosphonates ont été ajoutés au premier jour jusqu'à la fin de l'expérience. En moyenne, ils étaient renouvelés aux jours 1, 4 et 7.

Comptage cellulaire

Les cellules ont été comptées à l'aide d'un compteur Coulter après avoir été sorties des disques par digestion avec un mélange de collagénase et de trypsine

Détermination du lactate

Au 7ème jour le milieu était changé et les cellules incubées pendant 16 heures. Le lactate produit pendant cette période était mesuré dans un extrait dans HClO₄ du milieu en utilisant la lactato-déhydrogénase.

2. Expériences sur la réabsorption osseuse et sur la calcification in vivo

Des groupes de 5 rats Wistar pesant 180 à 200 g ont été traités pendant sept jours par 0,1, 1,0 et 10 mg de P/kg des acides diphosphoniques suivants :

acide difluorométhanediphosphonique (F_2 MBP) (sel de Na) ;
acide 4-amino-1-hydroxybutanediphosphonique (AH_{B_U} BP) ;
acide 5-amino-1-hydroxypentanediphosphonique (AH_{P_E} BP) ;
acide 6-amino-1-hydroxyhexanediphosphonique (AH_{E_X} BP) ;
5 acide dichlorométhan diphosphonique (Cl_2 MBP) (sel de Na)
(1 mg de P/kg).

Les témoins ont reçu le solvant avec NaCl. Tous les
traitements ont été effectués par voie sous-cutanée. Les
composés ont été dissous dans le NaCl pour les deux concen-
10 trations inférieures et dans l'eau pour la concentration
supérieure et administrés en un volume de 0,2 ml/100 g.

Les animaux ont été alimentés avec de l'Altromine 1314
contenant 1,1 g/100 g de Ca, 1,2 g/100 g de P et 250 IU/100 g
de vitamine D_3 . Le huitième jour les animaux étaient
15 sacrifiés et les tibias prélevés et fixés dans de l'éthanol
à 50 %. Les tibias ont été ensuite déshydratés dans des
concentrations croissantes d'éthanol et noyés dans du méthyl-
métacrylate avec addition de Plastoïd N. Les coupes frontales
ont été effectuées et polies à une épaisseur de 70-80 μ m et
20 on a effectué des microradiographies.

Ce procédé a permis l'estimation de la densité minérale
dans la métaphyse trabéculaire (Schenk et coll. Calc. Tiss.
Res. 11, 196-214, 1973).

Résultats

25 1. Expérience sur les cellules de la voûte crânienne

Comme l'indique le tableau 3, Cl_2 MBP provoque une diminu-
tion du nombre de cellules. Par contre, F_2 MBP a un effet nul
ou très faible à ce point de vue. Les dérivés aminés
présentent une différence en ce sens que les composés avec
30 un nombre impair d'atomes de carbone diminuent le nombre de
cellules beaucoup plus que ceux ayant un nombre pair d'atomes
de carbone.

TABLEAU 3 : Effet sur le nombre de cellules \pm S.E.M. (n) (Ecart-type)

Composé	% du témoin concentration (μ M)		
	2,5	25	250
Cl ₂ MBP	103,0 \pm 0,7 (4)	86,4 \pm 2,1(12)***	54,5 \pm 1,9(12)***
F ₂ MBP	88,1 \pm 1,4(12)***	92,4 \pm 1,9(12)**	99,3 \pm 2,0(16)
AH _U BP	100,5 \pm 1,6 (8)	101,0 \pm 1,5 (7)	74,2 \pm 4,7(15)***
AH _E BP	102,7 \pm 2,8 (8)	42,6 \pm 5,1(16)***	cellules mortes
AH _X BP	93,3 \pm 3,0 (8)*	95,2 \pm 2,2 (8)	87,0 \pm 3,4(20)*

Nombre de cellules du témoin : 0,5548 10^6 /disque \pm 0,05 (55) $\bar{x} \pm$ Ecart type (n)

Relativement à la production de lactate, Cl_2MBP la diminue, comme on le sait déjà. Par contre, F_2MBP n'a pas d'effet. Les dérivés aminés provoquent tous une augmentation de la production de lactate, plus prononcée avec les
5 composés à nombre impair d'atomes de carbone.

Les données sont fournies dans le tableau 4.

TABLEAU 4 - Effet sur la production de lactate + Ecart-type (n)

composé	% du témoin concentration (µM)	
	2,5	25
Cl ₂ MBP	87,5 ± 4,0 (4)*	67,1 ± 2,8(12)***
F ₂ MBP	112,1 ± 4,4(12)*	106,2 ± 3,9(12)
AHE _U BP	88,0 ± 1,5 (8)*	79,6 ± 4,1 (7)***
AHP _E BP	93,4 ± 3,0 (8)	354,1 ± 27,7(16)***
AHE _X BP	109,4 ± 6,0 (8)	108,3 ± 4,5 (8)
		250
		16,9 ± 2,2(12)***
		99,7 ± 4,7(16)
		179,8 ± 18,6(15)**
		cellules mortes
		164,7 ± 7,7(20)***

+ Dans une expérience le nombre de cellules était de 51,2 % de celles du témoin, dans trois expériences de 1 à 3 %. Cette concentration représente la limite pour laquelle les cellules meurent.

Production de lactate : 3,83 µmol/10⁶ cellules ± 0,10 (55) (\bar{x} ± Ecart-type (n))

Expériences sur la réabsorption osseuse et sur la calcification in vivo

On a étudié un animal par groupe. Les données sont indiquées dans le tableau 5.

Tableau 5 - Effet sur la réabsorption osseuse et sur la minéralisation des os

COMPOSE	Dose en mg	Réabsorption	Minéralisation
F ₂ MBP	10	-	-
	1	-	-
	0,1	-	-
AHB _U BP	10	+++	-/+
	1	++/+++	-
	0,1	+	
AHP _E BP	10	Expérience interrompue pour toxicité aiguë	
	1	+++	-
	0,1	+++	-
AHE _X BP	10	*	+++
	1	++	-
	0,1	-	-
Cl ₂ MBP	1	+ / ++	-

- = aucune inhibition de la réabsorption ou de la minéralisation

de + à +++ = augmentation de l'inhibition de la réabsorption ou de la minéralisation

* = effet non établi par suite de l'inhibition de la minéralisation.

Il apparaît que le AHP_EBP est le composé le plus puissant

dans l'inhibition de la réabsorption osseuse. Il se manifeste cependant une toxicité aux doses les plus élevées. AHB_UBP et AHE_XBP sont également actifs sur la réabsorption avec un effet légèrement supérieur à Cl₂MBP. Une différence
5 intéressante concerne la minéralisation étant donné que AHE_XBP induit une forte inhibition de la minéralisation à la dose de 10 mg de P/kg tandis que AHB_UBP n'a pas cet effet ou ne l'a que dans une très faible mesure.

Ces résultats mettent en évidence que les composés
10 aminés à nombre impair d'atomes de Carbone sont légèrement plus toxiques mais présentent un effet bien supérieur dans l'inhibition de la réabsorption osseuse. Ceux ayant un nombre pair d'atomes de carbone ont une activité légèrement supérieure à celle du Cl₂MBP. Un autre aspect est que le
15 AHB_UBP n'induit pas ou presque pas d'inhibition de la minéralisation aux fortes doses tandis que l'AHE_XBP présente une inhibition élevée. Par conséquent AHB_UBP semble plus approprié pour l'usage dans des maladies à réabsorption osseuse accrue chez l'homme. Enfin, il est intéressant de
20 noter que le F₂MBP n'a pas d'effet sur la réabsorption osseuse ou sur la minéralisation osseuse et étant donné qu'il inhibe la croissance in vitro des cristaux d'apatite il peut être utilisé avec succès dans l'urolithiase.

En effet, depuis longtemps on cherchait un diphosphonate
25 qui inhibe la croissance des cristaux sans influencer les os. On en conclut que le AHB_UBP et le AHP_EBP sont destinés à devenir des médicaments de choix pour inhiber la réabsorption osseuse et que F₂MBP sera utile pour le traitement de l'urolithiase.

Les compositions pharmaceutiques selon la présente invention peuvent être préparées sous forme de comprimés, granulés, dragées, sirops, solutions, émulsions, etc... pour l'administration par voie orale ou parentérale.

5 Ces compositions pharmaceutiques peuvent être utilisées, soit à l'état de produit pur, soit en présence des diluents inertes, des lubrifiants, des agents émulsionnants, des colorants, des substances aromatisantes, des excipients, etc..., qui sont tous des composés communément employés en technique pharmaceutique.

10 Les composés selon la présente invention peuvent être administrés par voie orale à des doses de 25-3000 mg/jour ou par voie parentérale à des doses de 15-300 mg/jour.

Le traitement est effectué durant 7 jours ou par cycles de 3 mois, le cas échéant en les répétant.

REVENDICATIONS

1. Compositions pharmaceutiques utiles pour le traitement de l'urolithiase et pour inhiber la réabsorption osseuse, caractérisées en ce que, à titre de principe actif, elles contiennent un acide diphosphonique de formule générale I



10

dans laquelle R est un atome de fluor ou un résidu alkyle linéaire ou ramifié, contenant de 1 à 5 atomes de carbone, éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants tels que des groupes amino et/ou des atomes de fluor et R' est un groupement hydroxyle ou du fluor, et leurs sels de métaux alcalins, avec des bases organiques et des aminoacides basiques.

2. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formulées pour l'administration par voie orale.

3. Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles sont formulées pour l'administration par voie systémique.

4. Procédé de préparation d'acides diphosphoniques de formule générale I selon la revendication 1, dans laquelle R est un résidu aminoalkyle et R' est un groupement hydroxyle, caractérisé en ce que l'on fait réagir un aminoacide ou l'un de ses précurseurs avec de l'acide phosphoreux et du trichlorure de phosphore dans un solvant inerte et que l'on hydrolyse le produit de la réaction.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'acide amino, l'acide phosphoreux et le trichlorure de phosphore sont mis en réaction dans un rapport de 1:1,5:1,5.

6. Acide 5-amino-1-hydroxypentane-1,1-diphosphonique.

5 7. Acide 4-amino-1-hydroxybutane-1,1-diphosphonique.

8. Acide difluorométhane diphosphonique.