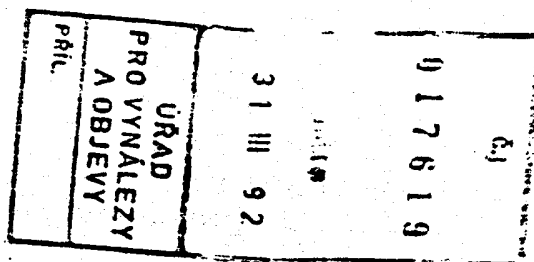


Deriváty kyseliny methyldifosfonové a léčiva tyto deriváty obsahující

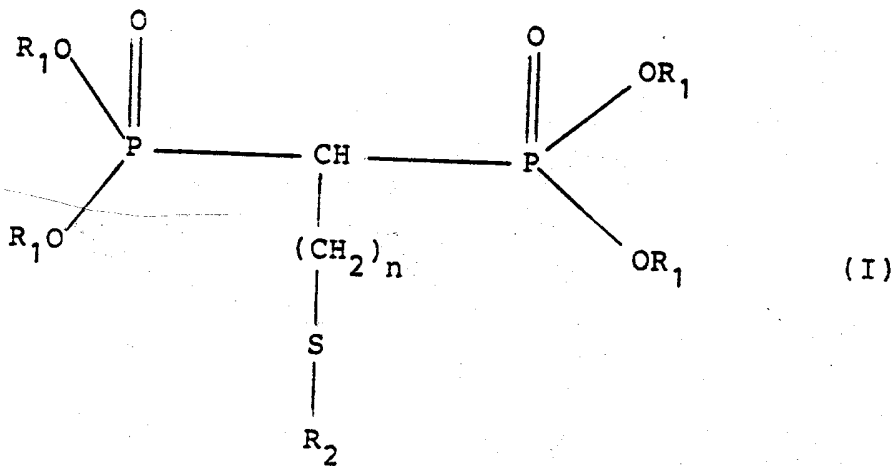


Oblast techniky

Vynález se týká nových derivátů kyseliny methyldifosfonové, které ma terapeutické vlastnosti umožňující použití těchto derivátů při léčení zánětových projevů.

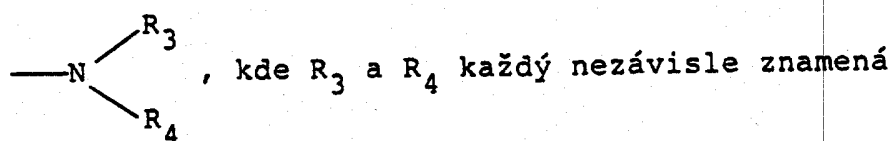
Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou deriváty kyseliny methyldifosfonové obecného vzorce I



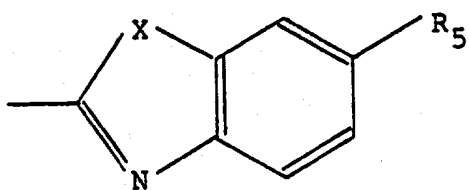
ve kterém

- R_1 znamená atom vodíku nebo přímou nebo rozvětvenou nižší alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy,
- n je rovno 0, 1, 2 nebo 3 a
- R_2 znamená
- alkylovou skupinu případně substituovanou hydroxyskupinou nebo skupinou



atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu,

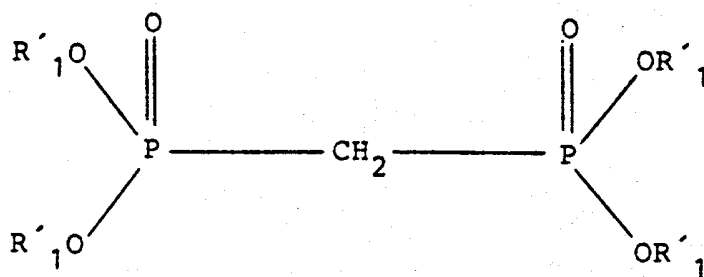
- fenylovou skupinu případně substituovanou atomem halogenu, nižší alkylovou skupinou, nižší alkoxylovou skupinou, skupinou NH_2 nebo skupinou COOH ,
- 5- nebo 6-člennou heterocyklickou skupinu obsahující dva heteroatomy zvolené z množiny zahrnující atom dusíku a atom síry, nebo
- 5-člennou heterocyklickou skupinu kondenzovanou s benzenovým jádrem obecného vzorce



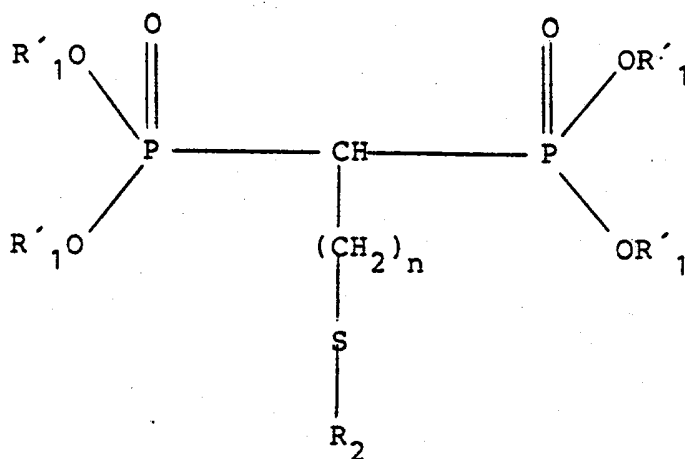
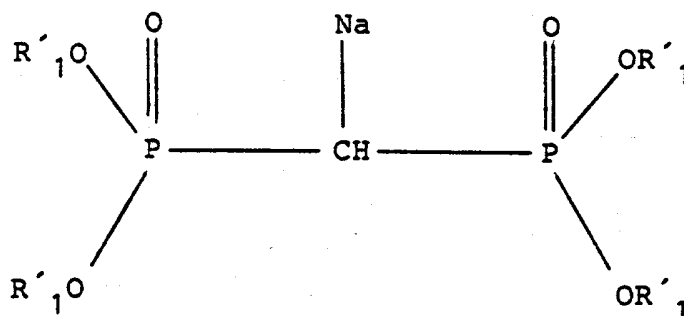
ve kterém X znamená atom kyslíku, atom dusíku nebo atom síry a R_5 znamená atom vodíku nebo atom halogenu, výhodně atom chloru.

V případě, že R_1 znamená atom vodíku, jsou kyseliny obecného vzorce I poskytovat soli s minerálními nebo organickými bázemi. Tyto soli tvoří rovněž součást vynálezu.

Sloučeniny obecného vzorce I mohou být připraveny postupem, který je ilustrován následujícím reakčním schématem.



(1) R'₁ = nižší alkyl



(I) R'₁ = nižší alkyl

Jako výchozí produkt se použije nižší alkylester kyseliny methyldifosfonové obecného vzorce 1, z něhož se připraví odpovídající sodný derivát působením sodík-zavádějícího činidla, jakým je hydrid sodný, ve vhodném rozpouštědle, jakým je benzenový uhlovodík, výhodně toluen, nebo dimethylformamid.

Uvedená reakce se provádí při teplotě 0 až 50 °C, s výhodou při okolní teplotě (20 °C).

Potom se provede substituce neizolovaného získaného sodného derivátu skupinou $-(CH_2)_n-S-R_2$.

V případě, že n je rovno 0, potom se na uvedený sodný derivát působí disulfidem obecného vzorce R_2S-S-R_2 v rozpouštědle, které bylo použito pro přípravu sodného derivátu. Použitá teplota a doba trvání reakce se mění v závislosti na použitých reakčních složkách. Reakční teplota se pohybuje v teplotním rozmezí od 20 °C a teplotou varu použitého rozpouštědla, zatímco doba trvání reakce se pohybuje od několika hodin do několika dnů.

V případě, že n je jiné než 0, potom se na uvedený sodný derivát působí halogenovanou sloučeninou obecného vzorce $Hal(CH_2)_n-S-R_2$ při teplotě z teplotního rozmezí od okolní teploty do teploty varu použitého rozpouštědla pod zpětným chladičem.

Konečně v případě, kdy $n = 3$, spočívá alternativní varianta výše uvedeného způsobu v tom, že se výše uvedený ester kyseliny difosfonové substituují allylhalogenidem, načež se na takto získaný allyldifosfonát působí thiolem obecného vzorce R_2SH . V případě, že použitý thiol R_2SH je těkavý, potom může být uveden v reakci v autoklávu při teplotě 80 až 150 °C.

Ve všech uvedených případech, jestliže skupina

$-(\text{CH}_2)_n-\text{S}-\text{R}_2$, která se zavádí do difosfonové struktury, obsahuje reakce schopné substituenty, potom musí být tyto substituenty předběžně blokovány ochrannými skupinami, které mohou být potom snadno odstraněny.

Tak skupiny OH mohou být například blokovány vytvořením dihydropyranového etheru, zatímco karboxylové zbytky mohou být blokovány ve formě sodné soli.

Ze sloučenin obecného vzorce I, ve kterém R_1 znamená alkylovou skupinu, mohou být zmýdelněním získány sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R_1 znamená atom vodíku.

Uvedený ester se zahřívá se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou k varu pod zpětným chladičem po dobu pohybující se pro každý daný případ od několika hodin do 24 hodin. Po izolaci odpařením může být takto získaná kyselina převedena známým způsobem na některou z jejích solí. Pracuje se v teplém rozpouštědle tak, aby sůl po ochlazení vykrytalizovala.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí příkladů jeho provedení, přičemž tyto příklady mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen formulací patentových nároků.

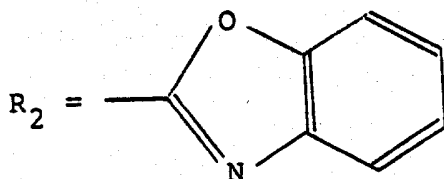
Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Tetramethylbenzoxazolyl-2-thiomethylendifosfonát

(SR 41625)

Obecný vzorec I: $\text{R}_1 = \text{CH}_3$,
 $n = 0$,



Ke směsi 24 g tetramethylmethylen difosfonátu a 50 ml dimethylformamidu se přidá pod atmosférou dusíku při teplotě 15 °C 2,5 g hydridu sodného. Tato reakční směs se potom míchá po dobu jedné hodiny při teplotě 15 °C, načež se při teplotě 20 °C přidá 44 g dibenzoxazolyl-2-disulfidu. V míchání směsi se potom pokračuje při teplotě 25 °C po dobu 68 hodin, načež se dimethylformamid odpaří za vakua při teplotě 20 °C. Zbytek rozpuštěný v methylenchloridu se chromatografuje na sloupci 500 g silikagelu.

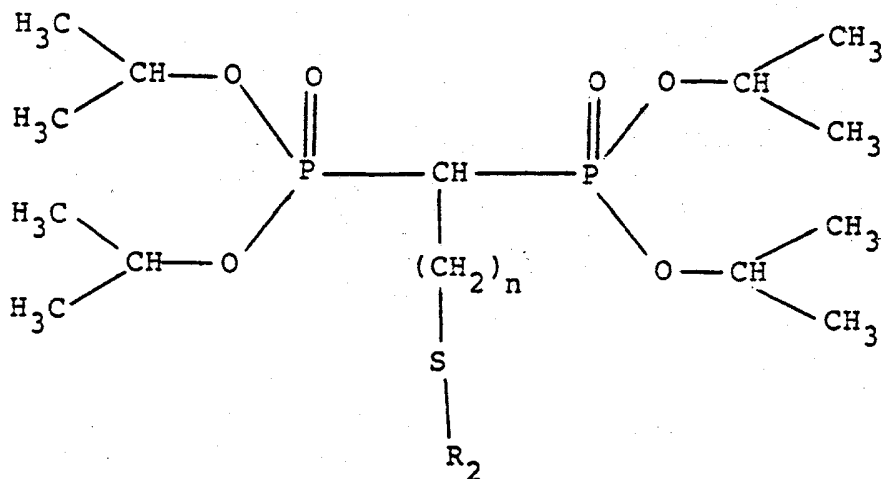
Elucí methylenchloridem se odstraní výchozí produkty, které během reakce nezreagovaly a následnou elucí směsí methylenchloridu a ethanolu v objemovém poměru 96:4 se získá ještě nečistý požadovaný produkt.

Za účelem vyčištění uvedeného produktu se provede další chromatografické čištění na sloupci 160 g silikagelu. V tomto případě se jako eluční soustava použije směs methylenchloridu a ethanolu v objemovém poměru 97:3, načež se po ochlazení příslušné frakce eluátu na teplotu 0 °C získá požadovaný čistý krystalický produkt.

Teplota tání: 76-78 °C.

Jestliže se postupuje stejným způsobem, přičemž se však použije tetraisopropylester kyseliny methylen difosfonové a obměňuje se použitý disulfid, potom se získají estery, které jsou uvedeny v následující tabulce 1.

Tabulka 1

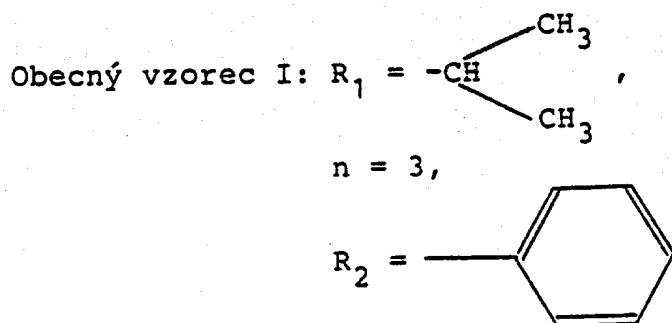


Číslo kódu	n	R ₂	Pracovní podmínky (teplota a doba zahřívání)	Fyzikální charakteristiky
SR-41265	0		90 °C, 5 hodin	140 °C (acetonitril)

SR-41452	0		25 °C, 6 hodin	žlutý olej, chromatografie na tenké vrstvě silikagelu: ethylacetát/ethanol 8:2 obj.. R _f =0,7
----------	---	--	----------------	--

Příklad 2

Tetraisopropyl-4-fenylthiobutylen-1,1-difosfonát
(SR 41341)



Sodný derivát tetraisopropylmethylen difosfonátu (34,4 g) se připraví stejně jako v příkladu 1. K tomuto sodnému derivátu se přidá 28,7 g 1-brom-3-fenylthiopropanu a směs se zahřívá na teplotu 100 °C po dobu jedné hodiny.

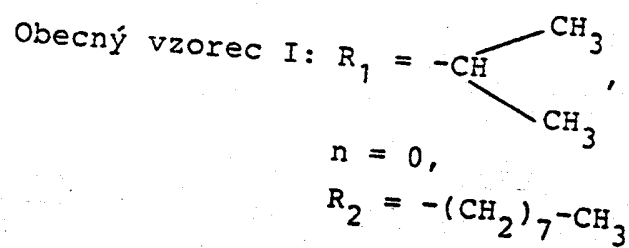
Rozpouštědlo se odpaří za vakua k suchu a zbytek se vyjme 500 ml vody a extrahuje methylenchloridem. Organická fáze se oddělí, vysuší nad síranem sodným a zbaví rozpouštědla za vakua. Zbytek se potom zahřeje za hlubokého vaku na teplotu 130 °C za účelem odstranění těkavých produktů a potom se chromatografuje na sloupci silikagelu, přičemž se jako eluční soustava použije směs chloroformu a methanolu v objemovém poměru 99:1.

Tímto způsobem se získá 23 g oleje, který se opětovně přečistí chromatografií na silikagelu za použití stejné eluční soustavy. Při chromatografii získaného produktu na tenké vrstvě silikagelu a za použití eluční soustavy tvořené směsí 2-butanonu a vody v objemovém poměru 95:5 se získá jediná skvrna mající $R_f = 0,57$.

Příklad 3

Tetraisopropyl-n-oktylthiomethylen difosfonát

(SR 41454)



Postupuje se stejně jako v příkladu 1, přičemž se jako rozpouštědlo použije směs bezvodého toluenu a dimethylformamidu.

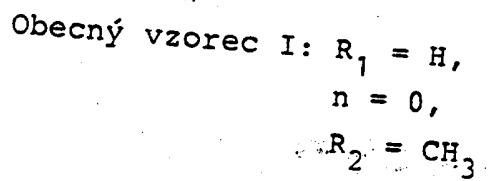
Po 16 hodinovém zahřívání na teplotu 100 °C se stejným zpracováním získá požadovaný produkt ve formě oleje, který má při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu a za použití eluční soustavy, tvořené směsí ethylacetátu a ethanolu v objemovém poměru 8:2, R_f rovné 0,65.

Jestliže se nahradí dioktyldisulfid ekvivalentním množstvím di-p-tolyldisulfidu, potom se stejným způsobem získá tetraisopropyl-p-tolythiomethylendifosfonát (SR 41455), který má formu oleje a při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu a za použití eluční soustavy, tvořené směsí ethylacetátu a ethanolu v objemovém poměru 8:2, má hodnotu R_f rovnou 0,57.

Příklad 4

Triterc.butylaminová sůl kyseliny methylthiomethylendifosfonové

(SR 41036)



Ke směsi 8,8 g tetraisopropylmethylendifosfonátu a 25 ml toluenu se přidá při teplotě 0 °C 0,65 g hydridu sodné-

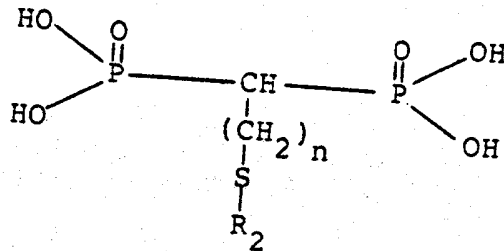
ho, načež se takto získaná směs míchá po dobu jedné hodiny při teplotě 15 °C. Přidá se 25 ml dimethyldisulfidu a směs se zahřívá na teplotu 60 °C po dobu 24 hodin. Směs se potom zahustí k suchu za vakua a zbytek se vyjme 250 ml isopropyl-etheru. Nerozpustný podíl se odfiltruje a zahustí k suchu. Zbytek se chromatografuje na sloupci aluminy (150 g). Sloupec se nejdříve eluuje isopropyletherem za účelem odstranění nečistot a potom methylenchloridem, přičemž se z požadované frakce eluátu získá požadovaný produkt.

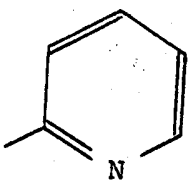
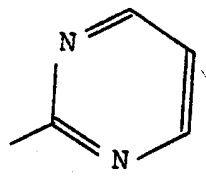
3 g výše uvedeným způsobem získaného esteru s 12 ml 6N vodného roztoku kyseliny chlorovodíkové se zahřívají k varu pod zpětným chladičem po dobu 5 hodin. Získaný roztok se třikrát promyje 30 ml pentanu, načež se vodná fáze odbarví aktivním uhlím a zahustí za vakua k suchu.

Takto získaná surová kyselina se potom převede na sůl přidáním 2,4 g terc.butylaminu ve 200 ml vroucího absolutního ethanolu. Po ochlazení se získá tri-terc.butylaminová sůl ve formě bezbarvého pevného produktu.
Teplota tání: 212 °C.

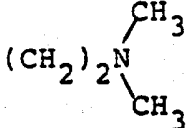
Stejným způsobem, avšak obměňováním použitého disulfidu se připraví kyseliny obecného vzorce I, které jsou uvedené v následující tabulce 2.

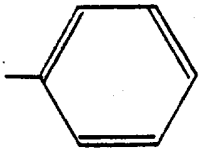
Tabulka 2



Číslo kódu	n	R ₂	Pracovní podmínky		Izolovaný produkt
			Substituční teplota a doba	Hydrolyzá konc.HCl a doba	
SR 41100	0	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{-CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} $	110 °C 24 hodin	6N HCl 5 hodin	diterc.butylaminová sůl, t.t.: 252 °C
SR 41179	0		20 °C 16 hodin	6N HCl	hydrochlorid, t.t. vyšší než 280 °C
SR 41264	0		20 °C 3 hodiny	6N HCl 8 hodin	hydrochlorid t.t. vyšší než 300 °C
SR 41266	0	(CH ₂) ₂ NH ₂	20 °C 2 hodiny	8N HCl 18 hodin	hydrochlorid, t.t.: 285-290 °C

Tabulka 2 (pokračování)

SR 41344	0		20 °C 20 hodin	8N HCl 18 hodin	hydrochlorid t.t.: 176 °C
-------------	---	---	-------------------	--------------------	------------------------------

SR 41482	0		110 °C 48 hodin	6N HCl 6 hodin	triterc.butylaminová sůl, t.t.: 24 °C (s 1/2H ₂ O)
-------------	---	---	--------------------	-------------------	---

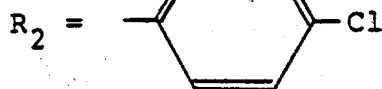
Příklad 5

Diterc.butylaminová sůl kyseliny (4-chlorfenyl)thiomethylen-
difosfonové

(SR 41319)

Obecný vzorec I: R₁ = H,

n = 0,



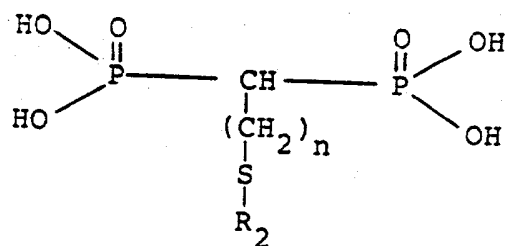
Postupuje se stejně jako v příkladu 4, přičemž se v roli rozpouštědla toluen nahradí dimethylformamidem.

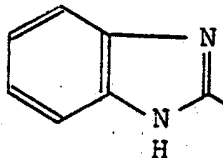
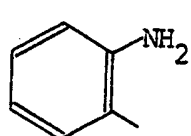
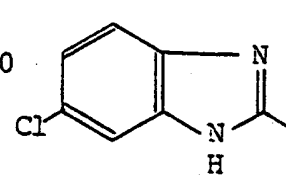
Za účelem provedení substituce se příslušný produkt zahřívá s disulfidem na teplotu 25 °C po dobu 6 hodin. Výše uvedeným způsobem se izoluje ester (viz příklad 4), který se potom zmýdelní působením 12N kyseliny chlorovodíkové po dobu 18 hodin. Kyselina se potom převede na diterc.butylaminovou sůl způsobem, který je rovněž uveden v příkladu 4.

Jestliže se obměňuje použitý disulfid, potom se stejným

způsobem získají sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu, které jsou uvedeny v následující tabulce 3.

Tabulka 3



Číslo	n	R ₂	Pracovní podmínky		Izolovaný produkt
			Substituční teplota a reakční doba	Hydrolyza konc.HCl a reakční doba	
SR 41263	0		20 °C 24 hodin	6N HCl 12 hodin	volná kyselina, t.t. vyšší než 300 °C
SR 41388	0		20 °C 4 hodiny	10N HCl 12 hodin	volná kyselina, t.t. = 272 °C (za rozkl.) (krystalizuje s 1 molekulou vody)
SR 41480	0		20 °C 16 hodin	6N HCl 16 hodin	volná kyselina, t.t. vyšší než 260 °C

Tabulka 3 (pokračování)

SR					
41552	0	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_6-$	20 °C 18 hodin	12N HCl 20 hodin	terc.butylami- nová sůl, t.t.: 218 °C

Příklad 6

Terc.butylaminová sůl kyseliny 3-methylthiopropyliden-1,1-difosfonové

(SR 41273)

Obecný vzorec I: $R_1 = \text{H}$,
 $n = 2$,
 $R_2 = \text{CH}_3$

Postupuje se stejně jako příkladu 4, přičemž se disulfid nahradí 1-brom-2-methylthioethanem. Po 20 hodinovém zahřívání na teplotu 30 °C se izoluje ester, který se potom hydrolyzuje postupem podle příkladu 4 zahříváním s 8N kyselinou chlorovodíkovou na teplotu varu pod zpětným chladičem po dobu 7 hodin. Nakonec se kyselina převede na sůl působením terc.butylaminu.

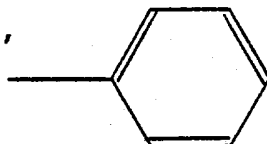
Teplota tání: 212-214 °C.

Příklad 7

Diterc.butylaminová sůl kyseliny 4-fenylthiobutyliden-1,1-difosfonové

(SR 41342)

Obecný vzorec I: $R_1 = \text{H}$,
 $n = 3$,
 $R_2 =$

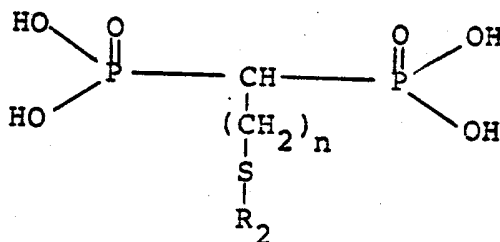


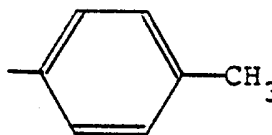
Roztok 5 g esteru SR 41341 (příklad 1) v 18 ml 6N kyseliny chlorovodíkové se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 7 hodin. Roztok se potom odpaří k suchu a zbytek se vyjme 25 ml vody. Směs se odstředí, sraženina se vysuší a rekrystalizuje z acetonitrilu, načež se převede na sůl působením terc.butylaminu.

Teplota tání: 223 °C.

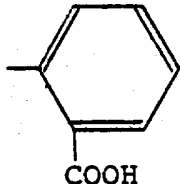
Jestliže se obměňuje výchozí ester, potom se stejným způsobem získají produkty, které jsou uvedeny v následující tabulce 4.

Tabulka 4



Číslo	n	R ₂	Hydrolyza konc.HCl a reakční doba	Izolovaný produkt
SR 41421	0	-(CH ₂) ₇ CH ₃	12N HCl 16 hodin	volná kyselina, t.t.: 155- 160 °C
SR 41456	0		12N HCl 16 H	dibutylaminová sůl, t.t.: 255- 260 °C (za rozkl.)

Tabulka 4 (pokračování)

SR				
41272	0		6N HCl 8 hodin	triterc.butylami- nová sůl, t.t.: 198-202 °C

Příklad 8

Monoamonná sůl kyseliny hexadecylthiomethylen-
difosfonové (SR 41453)

Obecný vzorec I: $R_1 = H,$
 $n = 0,$
 $R_2 = (CH_2)_{15}CH_3.$

postupuje se stejně jako v příkladu 4, přičemž se však jako rozpouštědlo použije směs toluenu a dimethylformamidu v objemovém poměru 40:2. Po 20 hodinovém zahřívání na teplotu 100 °C se získá odpovídající ester, který se hydrolyzuje zahříváním na teplotu varu pod zpětným chladičem s 12N kyselinou chlorovodíkovou. Surová kyselina se potom rozpustí v amoniaku za vzniku monoamonné soli.

Teplota tání: 103-110 °C.

Jestliže se obměňuje použitý disulfid, potom se stejným způsobem získá kyselina decylthiomethylen-
difosfonová, izolovaná ve formě dibutylaminové soli (SR 41457).

Teplota tání: 170-175 °C.

Příklad 9

Diterc.butylaminová sůl kyseliny (2-hydroxyethylthio)methylen-
difosfonové

(SR 41318)

Obecný vzorec I: $R_1 = H,$
 $n = 0,$
 $R_2 = HO-CH_2CH_2-$

a) Směs 35 g di(2-hydroxyethyl)disulfidu, 80 ml 3,4-dihydro-2H-pyranu a 0,1 g kyseliny paratoluensulfonové se zahřívá na teplotu 70 °C po dobu jedné minuty. Reakční směs se potom ochladí na teplotu 40 °C a míchá se po dobu 10 minut. Směs se potom nalije do 200 ml vody a extrahuje etherem. Etherový roztok se vysuší a odpaří k suchu, přičemž se získá 71 g disulfidu, jehož dvě alkoholové funkce jsou blokovány ve formě 3,4-dihydro-2H-pyranyletheru.

b) Potom se provede kondenzace výše uvedeného disulfidu s tetraisopropylmethylendifosfonátem postupem popsaným v příkladu 5, přičemž se směs zahřívá na teplotu 20 °C po dobu tří hodin.

c) Produkt získaný v předcházejícím stupni (18 g) se rozpustí ve 150 ml methanolu a k získanému roztoku se přidají 2 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Směs se potom zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny, načež se odežene methanol a zbytek se nalije do 200 ml vody. Směs se dvakrát extrahuje methylenchloridem, extrakt se vysuší a zahustí k suchu. Tímto způsobem se získá 13 g esteru prostého ochranných skupin.

d) Uvedený ester se zmydelní postupem uvedeným v příkladu 4, přičemž se zahřívá k varu pod zpětným chladičem s 6N kyselinou chlorovodíkovou po dobu 16 hodin.

Takto získaná kyselina se převede terc.butylaminem v ethanolu na diterc.butylaminovou sůl SR 41318.
Teplota tání: 168 °C.

Příklad 10

Dvojsodná sůl kyseliny methylthiomethylendifosfonové
(SR 41553)

Obecný vzorec I: $R_1 = H,$
 $n = 0,$
 $R_2 = CH_3$

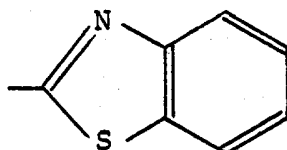
5 g kyseliny methylthiomethylendifosfonové (příklad 4) se rozpustí v 50 ml destilované vody obsahující 1,8 g 1,8 g rozpuštěného hydroxidu sodného. Roztok se potom zfiltruje, načež se přidá methanol (200 ml) a roztok se nechá vykrytalizovat. Pevný podíl se odstředí a promyje methanolem, načež se vysuší při teplotě 80 °C za vakua. Tímto způsobem se získá uvedená dvojsodná sůl krystalizující s 1/2 molekuly vody. Teplota tání: vyšší než 270 °C.

Příklad 11

Triterc.butylaminová sůl kyseliny benzothiazolyl-2-thiomethylendifosfonové

(SR 41481)

Obecný vzorec I: $R_1 = H,$
 $n = 0,$
 $R_2 =$



a) Di(benzothiazolyl-2)disulfid

K roztoku 30 g 2-merkaptobenzothiazolu a 1,6 g hydroxidu sodného v 800 ml ethanolu (absolutního) se po kapkách přidá roztok 20 g jodu a 115 g jodidu draselného ve 400 ml vody. Po ukončení tohoto přídatku se směs míchá při okolní teplotě po dobu 30 minut, načež se odstředí šraženina, která se promyje ethanolem a potom etherem. Po vysušení se získá 28 g disulfidu.

Teplota tání: 174 °C.

b) Výše uvedený disulfid se potom kondenzuje s tetramethylmethylen difosfonátem postupem podle příkladu 5 (zahřívání na teplotu 20 °C po dobu 2 hodin).

c) K roztoku 6,5 g výše uvedeným způsobem získaného tetramethylesteru v 80 ml tetrachlormethanu se pod atmosférou dusíku při teplotě 10 °C přidá 7 ml trimethylsilylbromidu a směs se při této teplotě míchá po dobu 30 minut. Přidá se 10 ml vody, oddělí se vodná fáze a tato fáze se promyje etherem. Odpařením vodné fáze se získají 4 g požadované kyseliny. Tato kyselina se potom převede na triterc.butylaminovou sůl působením terc.butylaminu v ethanolu.
Teplota tání: 202-204 °C.

Za použití di(thienyl-2)disulfidu se stejným způsobem nakonec získá kyselina thienyl-2-thiomethylen difosfonová, izolovaná ve formě triterc.butylaminové soli krystalizující se 2 molekulami vody (SR 41549).
Teplota tání: 210 °C.

Příklad 12

Terc.butylamonná sůl kyseliny 4-(methylthio)butyliden-1,1-difosfonové
(SR 41177)

Obecný vzorec I: $R_1 = H,$
 $n = 3,$
 $R_2 = CH_3$

a) Tetraisopropyl-3-butenylidien-1,1-difosfonát

Ke směsi 6,8 g tetraisopropylmethylen difosfonátu a 20 ml toluenu se přidá v průběhu 5 minut při teplotě 10 °C 0,5 g hydridu sodného. Směs se potom míchá po dobu jedné hodiny při teplotě 15 °C, načež se ke směsi přidá 15,5 ml allylbromidu a směs se míchá při teplotě 20 °C po dobu 20 hodin.

Reakční směs se potom vyjme 100 ml isopropyletheru a 50 ml vody. Organická fáze se dekantuje, třikrát promyje 50 ml vody, vysuší a odpaří k suchu. Získá se olejovitý produkt (4,5 g), který se destiluje za vakua. Teplota varu (2,66 Pa): 108-110 °C.

b) Tetraisopropyl-4(methylthio)butyliden-1,1-difosfonát

Směs 4,5 g produktu získaného výše uvedeným způsobem, 50 ml methylmerkaptanu a 0,1 g benzoylperoxidu se zahřívá na teplotu 130 °C po dobu 20 hodin. Po ukončení reakce se reakční směs destiluje za hlubokého vakua, přičemž se jímá frakce, která destiluje mezi 120 a 130 °C (2,66 mPa) (3,6 g).

c) Směs 3,6 g esteru získaného výše uvedeným způsobem a 14 ml 8N kyseliny chlorovodíkové se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po dobu 14 hodin. Reakční směs se potom odpaří k suchu za vakua a zbytek se vyjme ve 30 ml vody a 30 ml etheru. Vodná fáze se oddělí, přečistí se aktivním uhlím a znovu se odpaří k suchu. Zbytek se vyjme ve 20 ml ethanolu, načež se přidá 2,5 ml terc.butylaminu. Po přidání 20 ml etheru se získá 1,4 g požadované soli.

Teplota tání: 190 °C.

Sloučeniny podle vynálezu se s výhodou používají jako protizáněťová a protirevmatická léčiva, přičemž jejich farmakologické vlastnosti byly stanoveny následujícím způsobem.

Test in vitro

Tento test in vitro je založen na skutečnosti spočívající v tom, že kultivované chondrocyty vylučují po stimulaci faktorem, nazývaným "faktor stimulující chondrocyty" (chondrocyte stimulating factor) a syntetizovaným peritoneálními makrofágy, neutrální proteinázy.

Uplatnění tohoto typu stimulace při revmatických one-

mocněních bylo jednoznačně prokázáno v četných publikacích. Princip testu tedy spočívá ve srovnání sekrece neutrálních proteináz stimulovanými chondrocyty ošetřenými testovanými produkty a sekrece takto neošetřených stimulovaných chondrocytů.

Při tomto testu byla použita následující metodika.

Příprava chondrocytů

Chondrocyty použité při tomto testu se izolují z nosní přepážky telete enzymatickou digescí a takto získané chondrocyty se kultivují v kultivačním prostředí DMEM s 10% obsahem telecího séra v množství 5×10^{15} buněk na 10 cm Petriho misce. Kultivační prostředí se obnovuje každých 48 hodin.

Po týdenní kultivaci se buňky subkultivují působením trypsin-EDTA. Buňky se potom kultivují v kultivačním prostředí DMEM s 10% obsahem fetálního telecího séra v množství 2×10^5 buněk na 16 mm jamku. Slití se provede po 3 dnech kultivace.

Příprava kondicionovaného prostředí s peritoneálními makrofágy

Peritoneální makrofágy králíka se získají postupem, který je popsán Deshmukh-Phadke-m a kol. v Biochemical Biophysical Research Communication, 85, 490-6 (1978). Po kultivaci se prostředí obsahující "faktor stimulující chondrocyty" rekuperuje, zfiltruje přes Millipore 0,22 μ m a zmrazí při teplotě -20°C .

Stimulace chondrocytů

Použije se protokol, který je popsán Phadke-m a kol. v Biochemical Pharmacology, 28, 3671-3 (1979).

Testované produkty se zavedou do kultivačního prostře-

dí současně s aktivačním prostředím v koncentraci 5×10^{-4} M.

Stanovení neutrálních proteináz

Při tomto stanovení se použije metodika, která je popsána Vaes-em a kol. v Biochemical Journal, 172, 261 (1978).

Výsledky získané pro různé produkty jsou shrnuty v následující tabulce 5. Tyto výsledky jsou vyjádřené jako procentická inhibice sekrece neutrálních proteináz stimulovanými chondrocyty ošetřenými testovanými produkty, vztažená na sekreci neutrálních proteináz stimulovanými chondrocyty, které nebyly ošetřeny testovanými produkty.

Tabulka 5

Číslo kódu produktu	Inhibice sekrece neutrálních proteináz stimulovanými chondrocyty (%)
SR 41036	72 \pm 8
SR 41100	20 \pm 1
SR 41421	97 \pm 2
SR 41457	95 \pm 3
SR 41453	40 \pm 2
SR 41266	68 \pm 8
SR 41344	31 \pm 6
SR 41482	83 \pm 6
SR 41456	98 \pm 2
SR 41319	85 \pm 1
SR 41179	75 \pm 7

Tabulka 5 (pokračování)

SR 41264	50 ± 10
SR 41263	90 ± 1
SR 41480	56 ± 9
SR 41481	74 ± 9
SR 41177	69 ± 4
SR 41342	99 ± 1
SR 41388	90 ± 1

Test in vivo

Indukovaná artritida

Injekce mikroorganismu *Mycobacterium* aplikovaná kryse vyvolá u pokusného zvířete polyartritidu, která v některých aspektem připomíná lidskou revmatoidní artritidu.

Metodika

Krysím samečkům Sprague-Dawlwy s průměrnou tělesnou hmotností 150 g se nitrokožně injikuje do ocasu suspence *Mycobacterium tuberculosis* (0,4 mg v 0,05 ml parafinového oleje). Po 15 dnech se vytrídí pokusná zvířata, u kterých jsou symptomy artritidy nejmarkantnější. Tato pokusná zvířata se potom rozdělí do skupin po 5 jedincích, načež se každé skupině nitrokožně podává dávka testovaného produktu 10 mg/kg po dobu 6 dnů v týdnu. Kontrolní skupině pokusných zvířat se podává pouze rozpouštědlo.

Po třech týdnech se pokusná zvířata utratí, načež se jim oddělí pravá zadní tlapka v úrovni v úrovní tibiotalarského kloubu a tato tlapka se zvaží. Pro každou testovanou skupinu se stanoví střední standardní odchylka zjištěných hmotností.

Účinnost každého testovaného produktu je vyjádřena jako procentická změna střední hmotnosti tlapek ošetřených artritických krys vzhledem ke střední hmotnosti tlapek kontrolních artritických krys. Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce 6.

Tabulka 6

Číslo kódu produktu	Indukovaná artritida (hmotnost tlapky) Procentická inhibice (%)
SR 41036	23
SR 41100	37
SR 41421	55
SR 41454	33
SR 41453	58
SR 41266	29
SR 41344	35
SR 41388	42
SR 41319	29
SR 41452	15
SR 41272	25
SR 41179	25
SR 41 264	43

Tabulka 6 (pokračování)

SR 41263	
SR 41273	19
	39

Sloučeniny podle vynálezu jsou jen málo toxické.

Tyto sloučeniny podle vynálezu mohou být použity v humaní terapii při léčení nemocí zahrnujících zánětové symptomy a zejména při léčení artritických stavů. Sloučeniny podle vynálezu mohou být zejména použity při léčení revmatoidní polyartritidy.

Sloučeniny mohou mít libovolnou vhodnou galenickou formu použitelnou pro perorální, endorektální a parenterální podání. Zejména se může jednat o želatinové tobolky nebo tablety obsahující 10 až 500 mg účinné látky. Denní dávkování těchto produktů u dospělých osob se bude pohybovat od 100 mg do 5 g, přičemž tato denní dávka bude rozdělena na několik dílčích dávek.

Jakožto příklad těchto galenických forem lze uvést následující složení želatinových tobolek:

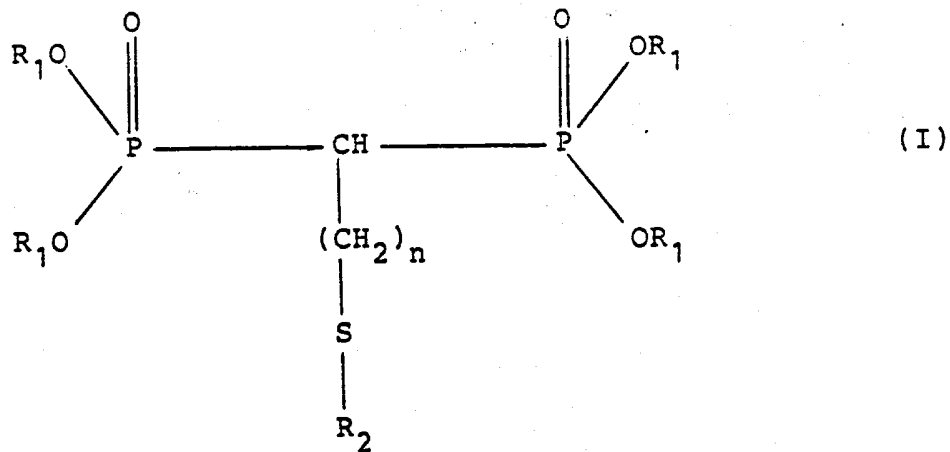
CM 41421	
Aerosil	200 mg
Stearát hořečnatý	1 mg
Škrob STA RX 1500	3 mg
	96 mg
	<hr/>
	300 mg.

PRIL.	URAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	3 1 III 9 2	0 1 7 6 1 9

41091-011

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

1. Deriváty kyseliny methylen difosfonové obecného vzorce I



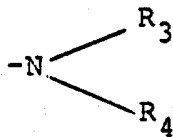
ve kterém

R_1 znamená atom vodíku nebo přímou nebo rozvětvenou nižší alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy,

n je rovno 0, 1, 2 nebo 3 a

R_2 znamená

- alkylovou skupinu případně substituovanou hydroxy-
skupinou nebo skupinou

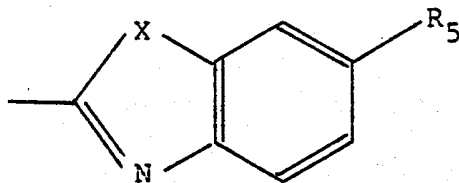


ve které R_3 a R_4 každý nezávisle znamená atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu,

- fenylovou skupinu případně substituovanou atomem halogenu, nižší alkylovou skupinou, nižší alkoxylovou skupinou, skupinou NH_2 nebo skupinou $COOH$,

- 5- nebo 6-člennou heterocyklickou skupinu obsahující 1 nebo 2 heteroatomy zvolené z množiny zahrnující atom dusíku a atom síry,

- 5-člennou heterocyklickou skupinu kondenzovanou s benzenovým jádrem obecného vzorce

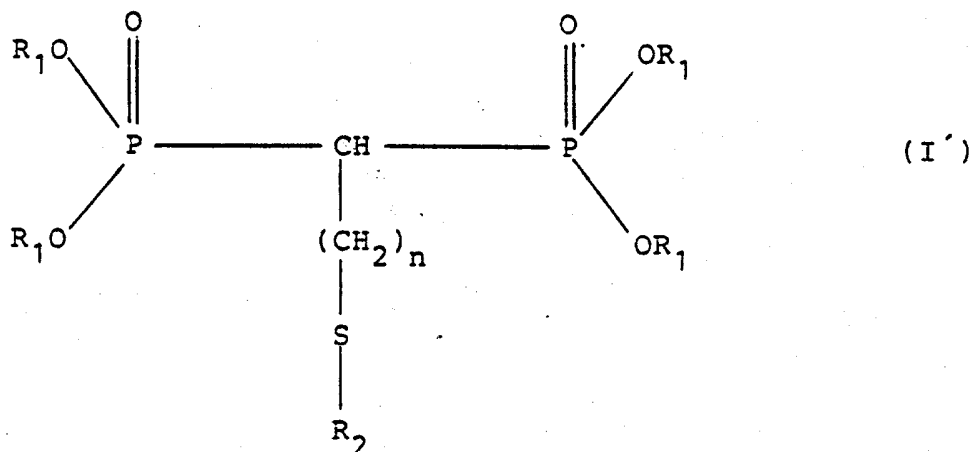


kde X může znamenat atom kyslíku, atom dusíku nebo atom síry a R₅ znamená atom halogenu, výhodně atom chloru,

za předpokladu, že když n = 0 a R₁ znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, potom R₂ nemůže znamenat případně substituovanou fenylovou nebo pyridylovou skupinu, a soli kyselin obecného vzorce I.

2. Kyselina (4-chlorfenyl)thiomethylendifosfonová a její farmaceuticky přijatelné soli.

3. Léčivo s protizáněťovým účinkem, v y z n a č e n é t í m , že obsahuje derivát kyseliny methyldifosfonové obecného vzorce I'

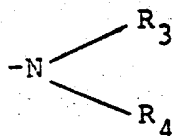


ve kterém

R₁ znamená atom vodíku nebo přímou nebo rozvětvenou niž-

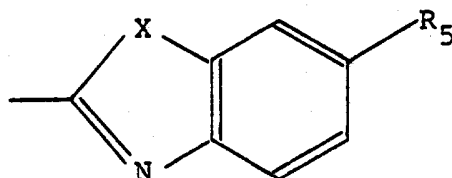
n
R₂ ší alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy,
je rovno 0, 1, 2 nebo 3 a
znamená

- alkylovou skupinu případně substituovanou hydroxy-
skupinou nebo skupinou



ve které R₃ a R₄ každý nezávisle znamená atom vodí-
ku nebo nižší alkylovou skupinu,

- fenylovou skupinu případně substituovanou atomem
halogenu, nižší alkylovou skupinou, nižší alkoxylo-
vou skupinou, skupinou NH₂ nebo skupinou COOH,
- 5- nebo 6-člennou heterocyklickou skupinu obsahující
1 nebo 2 heteroatomy zvolené z množiny zahrnující
atom dusíku a atom síry,
- 5-člennou heterocyklickou skupinu kondenzovanou s
benzenovým jádrem obecného vzorce



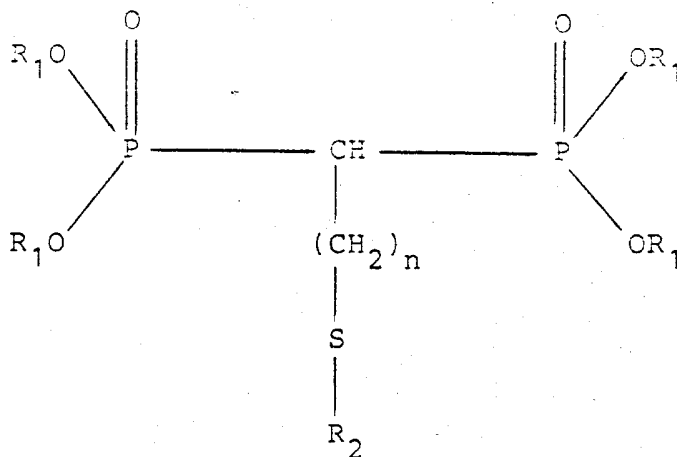
kde X může znamenat atom kyslíku, atom dusíku nebo
atom síry a R₅ znamená atom halogenu, výhodně atom
chloru,

a soli kyselin obecného vzorce I'.

4. Léčivo podle nároku 6, v y z n a č e n é t í m , že
obsahuje 10 až 500 mg produktu obecného vzorce I'.

Zastupuje:

Vzorec pro anotaci (I)



PRIL
PRO VYNALEZY A OBJEVY
URAD
31 III 52
017619
51