

19



Octroolraad  
Nederland

11 192562

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 8301324

51 Int.Cl.<sup>8</sup>  
A61K31/66

22 Ingediend: 15.04.83

30 Voorrang:  
15.04.82 IT 0002078182 Voorrang erkend

43 Ter inzage gelegd:  
01.11.83 I.E. 83/21

44 Openbaargemaakt:  
02.06.97 I.E. 97/06

47 Dagtekening:  
03.10.97

45 Uitgegeven:  
01.12.97 I.E. 97/12

73 Octroolhouder(s):  
Istituto Gentili S.p.A te Pisa, Italië (IT).

74 Gemachtigde:  
Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s. te 2587 BN Den  
Haag.

54 Farmaceutisch preparaat dat een  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$ -verbinding bevat.

Dit titelblad vervangt het foutieve titelblad van het geschrift met hetzelfde nummer, dat werd uitgegeven op: 01 december 1997 (01.12.97)

## Farmaceutisch preparaat dat een $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$ -verbinding bevat

De uitvinding heeft een betrekking op een farmaceutisch preparaat dat een  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$ -verbinding bevat.

5 Een dergelijk preparaat is bekend uit de Europese octrooiaanvraag 0.039.033. In dit document wordt de bereiding van  $\omega$ -amino-1-hydroxyalkaan-1,1-bisfosfonzuren, waaronder het 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur, beschreven. Overeenkomstige zouten zijn niet beschreven in EP-A-0.039.033. Op blz. 4, regels 6–18 wordt gesteld:

10 "De hier beschreven aminoalkaanbisfosfonzuren worden gekenmerkt door een hoog complexerend vermogen voor meerwaardige metaalionen, in het bijzonder voor aardalkali-ionen en zware metaalionen zoals ijzer en koper. Ze kunnen ook specifiek gebruikt worden voor waterontharding... Vanwege hun eigenschappen zijn ze ook geschikt voor de bereiding van cosmetische en farmaceutische preparaten."

15 De eigenschappen waarnaar in deze laatste zin verwezen wordt, zijn de complexerende (chelerende) eigenschappen voor zware metalen. Soms is het nodig complexerende (chelerende) middelen aan farmaceutische preparaten toe te voegen, omdat anders het geneesmiddel samen met een zwaar metaal kan neerslaan of oxidatieproblemen kunnen ontstaan.

Gevonden is, dat een  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$ -verbinding bijzonder geschikt is als geneesmiddel bij de behandeling van botziekten.

20 Het farmaceutische preparaat volgens de uitvinding wordt daarom daardoor gekenmerkt, dat een voor de behandeling van botziekten geschikt preparaat is, waarin het 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur als zodanig of in de vorm van een zout met een alkalimetaal, een organische base of een basisch aminozuur aanwezig is, met dien verstande dat, wanneer het 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur niet in de vorm van een zout aanwezig is, het de enige in het preparaat aanwezige farmaceutisch actieve stof is.

25 EP-A-0.039.033 leert de toepassing van  $\text{NH}_2\text{(CH}_2\text{)}_3\text{C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$  als sequestreermiddel, daarom zal een farmaceutische samenstelling volgens EP-A-0.039.033, noodzakelijkerwijs ten minste één farmaceutisch actieve verbinding anders dan genoemde  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$ -verbinding bevatten. Een dergelijk preparaat zal dus nimmer uitsluitend  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$  als farmaceutisch actieve verbinding bevatten.

30 Overigens werden bisfosfonaten voor het eerst gesynthetiseerd aan het eind van de vorige eeuw (Von Bayer en Hofman, Ber. 30, 1973 (1897)). Sedertdien zijn veel verschillende verbindingen gesynthetiseerd waarvan de toepassing werd gezocht in het gebruik als toevoegstoffen voor detergentia vanwege de sterke calcium- en magnesiumcomplexerende eigenschappen.

35 Er werd gesuggereerd dat bepaalde bisfosfonaten ook voor biologische doeleinden zouden kunnen worden toegepast. Een aantal vroege *in vitro* en *in vivo* studies toonde aan dat de werking van deze verbindingen niet alleen gebaseerd was op hun complexerende activiteit maar in het bijzonder ook op hun ingrijpen in het cellulaire metabolisme. Deze laatste eigenschap is afhankelijk van de gehele structuur en niet enkel de aanwezigheid van de bisfosfonogroep.

40 Tussen 1970 en 1980 werden slechts drie bisfosfonaten uitgebreid onderzocht op hun werking bij botziekten, te weten etidronaat ( $\text{H}_2\text{PO}_3\text{-C(CH}_3\text{)(OH)-PO}_3\text{H}_2$ ), clodronaat ( $\text{H}_2\text{PO}_3\text{-CCl}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$ ) en pamidronaat ( $\text{H}_2\text{PO}_3\text{-C(C}_2\text{H}_4\text{NH}_2\text{)(OH)-PO}_3\text{H}_2$ ). Geen van deze verbindingen is echter een ideaal geneesmiddel.

45 Etidronaat heeft als probleem dat bij de therapeutische dosis een remming van de normale mineralisatie van botweefsel optreedt. Dit leidt tot een ongewenst effect dat osteomalacia genoemd wordt. Het gevolg is abnormale botvorming; breuken zijn beschreven bij kinderen en vermoed bij volwassenen. Etidronaat kan derhalve niet gedurende een lange tijdsperiode gebruikt worden.

Clodronaat moet in hoge dosis worden toegepast – beschreven zijn doses tot 6400 mg per dag voor hypercalcemie –, waarbij zelfs bij die doseringen de effectiviteit een probleem bleef.

50 Pamidronaat, het enige aminobisfosfonaat in deze groep, heeft als nadeel, naast andere bijwerkingen, dat de orale formulering daarvan in doses die groot genoeg zijn om voldoende bio-beschikbaarheid (waarvan in 1980 reeds bekend was dat dat een probleem was) te verschaffen, onacceptabele maag-darmbijwerkingen veroorzaakt. In de periode 1979 tot 1981 werd bekend en uitvoerig beschreven, dat aan pamidronaat een aantal bezwaren kleefte, welke bezwaren te meer belangrijk zijn, daar het om een geneesmiddel gaat, dat over een lange periode toegediend moet worden.

55 Deze bezwaren zijn met name het koortsopwekkende effect (3 graden!), de maag-darmbezwaren, alsmede het opwekken van een immuun-deficiëntie door afbraak van witte bloedlichaampjes (gemiddeld 50%).

In dit verband kan gewezen worden op een publicatie in "The Lancet", 14 april 1979, blz. 799–805 van

Frijlink et al. en op een publicatie in "Arthritis Rheumatism", Vol. 23, No. 10, oktober 1980, blz. 1193–1203 van Bijvoet et al.

Op de CEMO conferentie (Symposium, CEMO "Diphosphonates and Bone", Nyon (Zwitserland 1–4 november 1981)) werd door Parsons et al. met betrekking tot pamidronaat gesteld dat het problemen geeft bij de opname in de darmen en het lijkt dat het in de toekomst het best intraveneus toegediend kan worden. ("The dose response to A.P.D. is variable due to intestinal absorption problems and in future it seems that in the emergency situation is best given intravenously.") Daarnaast was van pamidronaat toentertijd bekend dat het tijdelijk koorts, leucopenie, lymfopenie en een daling van het aantal bloedplaatjes veroorzaakte (de zogenaamde acute fase respons).

10 Aangezien de bijeffecten van pamidronaat niet optreden met clodronaat en etidronaat was te verwachten dat de ongewenste effecten van pamidronaat geassocieerd zijn met de aminogroep.

Alle verbindingen uit de stand van de techniek, en in het bijzonder pamidronaat, hadden significante bezwaren, hetgeen de ontwikkeling van die verbindingen tot veilige effectieve orale geneesmiddelen van osteoporose heeft tegengehouden. Verder is er in de techniek geen aanwijzing omtrent welke type chemische modificaties (zo deze er zijn) de waargenomen problemen zou omzeilen.

20 Geen van de voornoemde verbindingen heeft derhalve alle eigenschappen die nodig zijn om een veilige, effectieve, praktische behandeling van botziekten, in het bijzonder osteoporose, te verzekeren. Een geneesmiddel tegen osteoporose moet zeer effectief zijn (clodronaat is dat niet); het moet over een lange tijdsperiode de vorming van normaal botweefsel toestaan (etidronaat doet dat niet); en het moet een orale formulering zijn die vrij is van bijwerkingen ten aanzien van de maag (pamidronaat is dat niet). Botziekten, zoals osteoporose, zijn vaak "stille" ziekten; dat wil zeggen er hoeven geen pijnlijke symptomen te zijn die het geneesmiddel verzacht; de patiënt voelt zich niet noodzakelijkerwijs "beter" na het nemen van het medicijn. Enige bijwerking zal een patiënt er derhalve snel van weerhouden zich te houden aan een langdurig regime en zal dus een deskundige weerhouden om een dergelijk product te onderzoeken en/of

25 ontwikkelen.  
Daarnaast is beschreven (zie Michael et al., Calcif. Tissue Res. 23, (1977) 83–86; Recker en Saville, Toxic Appl. Pharmacol. 24, (1973) 580–589) dat de opname van bisfosfonaten in het lichaam tamelijk laag is (1–10% van een orale dosis). Bovendien is beschreven dat de opname omgekeerd evenredig is met de grootte van de actieve verbinding, waardoor grote polyfosfonaten in het geheel niet worden opgenomen. (Anbar et al., Food Cosmetics Tox 11, (1973) 1001–1010).

30 Volgens de onderhavige uitvinding is gevonden dat  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$  bijzonder geschikt is voor het behandelen van osteoporose en als remstof voor botreabsorptie, omdat het een hoge activiteit ontplooit die niet gepaard gaat met de neveneffecten van de voornoemde verbindingen. Met name bezit deze verbinding niet de nadelige eigenschappen van het aminobisfosfonaat pamidronaat en is ondanks de ketenverlenging van de aminozijketen van het bisfosfonaat geen hogere dosering benodigd in vergelijking met pamidronaat.

Het preparaat volgens de uitvinding is bij voorkeur in vaste vorm voor orale toediening.

Overigens zijn in de Franse octrooiaanvraag 2.259.615 naast pamidronaat een aantal 3-alkylamino-1-hydroxypropaan-1,1-bisfosfonzuren genoemd die analoga van pamidronaat zijn. Een modificatie waarbij de trimethyleenketen van het 3-amino-1-hydroxypropaan-1,1-bisfosfonzuur (pamidronaat) met een methyleen-eenheid wordt verlengd wordt echter niet beschreven noch gesuggereerd.

45 In het Amerikaanse octrooischrift 3.683.080 wordt een generische opsomming gegeven van een breed spectrum van  $\text{C}_{1-20}$  bis- en polyfosfonaten voor de behandeling van botziekten. De actieve verbinding volgens de onderhavige uitvinding wordt niet door deze opsomming omvat. Bovendien waren klinische resultaten van etidronaat, clodronaat en pamidronaat, en daarmee hun bijwerkingen, nog niet bekend toen dit Amerikaanse octrooischrift in augustus 1972 werd gepubliceerd.

Het is mogelijk  $\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(PO}_3\text{H}_2\text{)}_2\text{OH}$  in voortreffelijke opbrengsten en in een zeer zuivere vorm te bereiden, wanneer men 4-aminoboterzuur met fosforigzuur laat reageren, om de reactieve aminogroep te blokkeren, en vervolgens met fosfortrichloride omzet.

50 Het tussenproduct wordt vervolgens gehydrolyseerd en het gewenste product op een passende wijze geïsoleerd.

In plaats van een mengsel van fosforigzuur en fosfortrichloride is het ook mogelijk alleen fosfortrichloride toe te passen en een stoichiometrische hoeveelheid water toe te voegen om het overeenkomstige fosforigzuur te vormen.

55 Indien mogelijk kan het aminozuur worden vervangen door een voorloper die het aminozuur door hydrolyse kan vormen, zoals pyrrolidon. De reactie wordt bij voorkeur uitgevoerd bij aanwezigheid van een aprotisch organisch oplosmiddel, zoals een alifatische of aromatische koolwaterstof of een overeenkomstige

gechloreerde koolwaterstof, maar zij kan ook worden uitgevoerd bij afwezigheid van een oplosmiddel.

Tijdens de reactie wordt een pastavormig vast materiaal gevormd, dat niet nauwkeurig kan worden gedefinieerd, waaruit het gewenste aminobisfosfonzuur kan worden verkregen door een hydrolyse met water of zoutzuur. De voorkeursverbindingen die volgens de uitvinding kunnen worden toegepast zijn: 4-amino-1-

5 hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur, en zijn natrium-, aniline- en lysinezouten.

Het hierna volgende licht de bereiding van farmacologische eigenschappen van het 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur nader toe.

#### 10 Bereiding

Een mengsel van 1 mol 4-aminoboterzuur, 1,5 mol fosforigzuur en 500 cm<sup>3</sup> watervrij chloorbenzeen werd langzaam op 100°C verwarmd. Bij deze temperatuur werd 1,5 mol fosfortrichloride toegevoegd onder goed roeren. Het mengsel werd vervolgens 3,5 uur bij 100°C geroerd tot de vaste fase volledig was gevormd, en daarna afgekoeld. Het vaste materiaal werd gefiltreerd, met een kleine hoeveelheid chloorbenzeen

15 gewassen en in water opgelost. Deze oplossing werd 1 uur op het kookpunt verhit, daarna afgekoeld en ontkleurd met actieve kool. Het materiaal werd gefiltreerd en het product neergeslagen met een overmaat hete methanol. Het aldus verkregen onzuivere materiaal werd 8 uren in 20% zoutzuur onder terugvloei-koelen verhit. Dit zoutzuur werd vervolgens afgedestilleerd en het residu uit water herkristalliseerd. Het product was 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur (ABDP) in de vorm van een wit kristallijn poeder

20 met de hieronder weergegeven eigenschappen.

#### Elementaire-analyse

	C%	H%	N%	P%
Gevonden:	17,88	5,62	4,93	23,94
25 Ber. voor ABDP:	19,28	5,26	5,64	24,86
Ber. voor ABDP.H <sub>2</sub> O:	17,98	5,66	5,24	23,19

#### Bepaling van het vochtgehalte

Een monster, onderzocht volgens de Karl-Fischer methode, had een watergehalte van ca. 3,9 gew.%.  
30

#### Potentiometrische titratie

De kromme van de potentiometrische titratie werd verkregen door toevoeging van 0,1 N natronloog aan een oplossing van 203 mg van een monster opgelost in 75 cm<sup>3</sup> water. Het profiel van deze kromme wordt gekenmerkt door 2 duidelijke eindpunten bij pH 4,4 en 9, overeenkomend met een toevoeging van 7,5 en

35 15,2 cm<sup>3</sup> reagens. Uit de weergegeven cijfers kan een equivalentgewicht van 270 worden berekend voor de eerste neutralisatie en van 264 voor de tweede neutralisatie en een gemiddeld equivalentgewicht van 267. Het moleculegewicht van ABDP.H<sub>2</sub>O bedraagt 267,114.

#### Complexometrische titratie

40 Deze complexometrische titratie werd uitgevoerd met thoriumnitraat met 41,47 mg van de verbinding. Waargenomen werd een kleurverandering na een toevoeging van 5,4 cm<sup>3</sup> reagens. Uit dit cijfer kan men concluderen dat de onderzochte stof een equivalentgewicht bezit van 134, hetgeen overeenkomt met de aanwezigheid van twee fosfonogroepen in het molecule van het monohydraat.

#### 45 Infrarood absorptie

Het waargenomen infraroodspectrum op een tablet KBr vertoont karakteristieke banden bij:

3600 – 2500 cm<sup>-1</sup>: een complexe band door het overlappen van de invloed van de zure en alcoholische OH-groepen, groepen NH<sub>3</sub><sup>+</sup> en alifatische CH;

1560, 1605, 1500: banden veroorzaakt door deformatie van de groep NH<sub>2</sub>, gedeeltelijk in de zoutvorm door

50 de aanwezigheid van de fosfonogroepen;

1160: invloed van de P–O verbinding;

1040: invloed van de C–O verbinding;

960, 930: invloed van de P–O verbinding;

600–400: skeletbanden voornamelijk veroorzaakt door het stuk van het molecule dat fosforatomen bevat.

*Kernmagnetische resonantie op het proton (<sup>1</sup>H-NMR)*

Het <sup>1</sup>H-NMR spectrum bepaald in D<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vertoont twee vergrote signalen bij δ 2,6 ppm (CH<sub>2</sub>-β en CH<sub>2</sub>-γ door de NH<sub>2</sub> groep) en 3,5 ppm (CH<sub>2</sub>-α door de NH<sub>2</sub> groep) met een relatieve intensiteit 2:1.

5 *Kernmagnetische resonantie op koolstof (<sup>13</sup>C-NMR)*

Het <sup>13</sup>C-NMR spectrum bepaald in D<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vertoont signalen bij δ 20 ppm (CH<sub>2</sub>-β door de NH<sub>2</sub> groep), 28 ppm (CH<sub>2</sub>-γ door de NH<sub>2</sub> groep), 39 ppm (CH<sub>2</sub>-α door de NH<sub>2</sub> groep) en een centraal triplet bij 72 ppm (C-δ door de NH<sub>2</sub> groep, J<sub>c-p</sub> = 156 Hz).

10 *Kernmagnetische resonantie op fosfor (<sup>31</sup>P-NMR)*

Het <sup>31</sup>P-NMR spectrum bepaald in D<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vertoont een enkelvoudig signaal bij 9 ppm dat aangeeft dat twee fosforatomen chemisch en magnetisch equivalent zijn.

*Toxicologisch onderzoek*

15 Dit onderzoek werd uitgevoerd met 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur (AHB<sub>U</sub>BP).

Bij wijze van vergelijking werden de volgende stoffen toegepast: 6-amino-1-hydroxyhexaan-1,1-bisfosfonzuur (AHE<sub>X</sub>BP), bereid volgens de Italiaanse octrooiaanvraag 19.673 A/81; dichloormethaanbisfosfonzuur (clodronaat) als het natriumzout (Cl<sub>2</sub>MBP); 5-amino-1-hydroxypentaaan-1,1-bisfosfonzuur (AHP<sub>E</sub>BP); en difluormethaanbisfosfonzuur in de vorm van het natriumzout (F<sub>2</sub>MBP).

20

*Acute giftigheid*

Voor dit onderzoek werden Swiss muizen, zowel mannetjes als vrouwtjes, gebruikt; tijdens het experiment werden de dieren gevoed volgens de methode met Altromin in de vorm van tabletten. Voor de orale en intraperitoneale toediening werden 5%'s arabische gomoplossingen toegepast, terwijl fysiologische

25 zoutoplossingen met pH 4 werden toegepast voor de intraveneuze injecties.

De LD<sub>50</sub> waarden berekend volgens een grafische methode. Tabel A geeft de cijfers voor de LD<sub>50</sub> bij Swiss muizen in mg/kg.

TABEL A  
LD<sub>50</sub> bij Swiss muizen in mg/kg

30

Proefverbinding	os	i.p.	i.v.
AHB <sub>U</sub> BP	> 2,000	–	85
35 Ter vergelijking			
AHP <sub>E</sub> BP	1,500	75	85
AHE <sub>X</sub> BP	> 2,000	125	75
F <sub>2</sub> MBP	> 2,000	450	70
C1 <sub>2</sub> MBP	2,000	750	130

40

Na de orale toediening, ook bij hoge doseringen, werd geen wijziging in het gedrag van het dier waargenomen, geen dood genoteerd en als enig symptoom een zekere verzachting van de uitwerpselen waargenomen. Een autopsie van het gedode proefdier toont slechts een lichte verandering aan bij de nieren, die licht en anemisch van kleur waren.

45

Na de intraveneuze injecties overlieden de dieren onmiddellijk bij de hoge dosering met convulsies en dyspnoe. Bij een dosering lager dan de letale dosis zijn de convulsies minder duidelijk en duren ca. 2 uren; na terugkeer tot het normale vertonen de dieren in enkele gevallen een overlijden na twee tot vier dagen onder dyspnoe, haar-opzetten en vermindering van de motorische activiteit. Autopsie vertoont nieren met een roze tot geelachtige kleur en bloedingsplaatsen.

50

De vrouwelijke dieren vertonen hypertrofe en hyperemische ovariën. De conclusie is, dat de onderzochte bisfosfonaten een zekere acute giftigheid en een matige chronische giftigheid vertonen.

*Remming van de vorming van kristallen*

55 Een model-systeem werd toegepast ter bepaling van het vermogen van de fosfonaten om de vorming van kristallen in anorganische oplossingen te remmen. Drie oplossingen werden bereid volgens Fleisch:

1) 0,0107 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,117 M KCl; 0,01 M barbituurzuur;

2) 0,0156 M CaCl<sub>2</sub>; 0,138 M KCl; 0,01 M barbituurzuur;

3) 0,155 M KCl; 0,01 M barbituurzuur.

De pH werd met kaliumhydroxide op 7,4 gebracht. De concentratie aan Ca<sup>++</sup> bedroeg 6,7 mg.%, een niveau dat overeenkomt met calcium in bloed dat is geülfrafiltrerd, en de concentratie van anorganisch fosfaat (Pi) levert een product Ca<sup>++</sup> x Pi = 114,7. De oplossing werd geanalyseerd op Ca<sup>++</sup> en Pi en werd verdeeld in Erlenmeyer kolven (12 cm<sub>3</sub> in elke). De kolven werden als volgt in groepen verdeeld.

	a) Controle	
	b) AHE <sub>x</sub> BP	0,05 μM
	c) AHE <sub>x</sub> BP	0,25 μM
10	d) AHE <sub>x</sub> BP	0,5 μM
	e) AHE <sub>x</sub> BP	2,5 μM
	f) AHE <sub>x</sub> BP	5,0 μM
	g) Cl <sub>2</sub> MBP	0,5 μM
	h) Cl <sub>2</sub> MBP	2,5 μM
15	i) Cl <sub>2</sub> MBP	5,0 μM
	l) F <sub>2</sub> MBP	0,5 μM
	m) F <sub>2</sub> MBP	2,5 μM
	n) F <sub>2</sub> MBP	5,0 μM
	o) AHP <sub>e</sub> BP	0,05 μM
20	p) AHP <sub>e</sub> BP	0,25 μM
	q) AHP <sub>e</sub> BP	0,05 μM
	r) AHP <sub>e</sub> BP	2,5 μM
	s) AHP <sub>e</sub> BP	5,0 μM
	t) AHB <sub>u</sub> BP	0,5 μM
25	u) AHB <sub>u</sub> BP	2,5 μM
	v) AHB <sub>u</sub> BP	5,0 μM

en vervolgens onder roeren twee dagen bij 37°C geïncubeerd.

Na afloop van deze incubatie werden de oplossingen door millipore filters geleid om de tijdens de incubatie gevormde kristallen op te vangen; vervolgens werd het filtraat opnieuw op Ca<sup>++</sup> en Pi geanalyseerd. De resultaten zijn in tabel B weergegeven als het product van Ca<sup>++</sup> x Pi in de oplossing bij het einde van het experiment.

De cijfers tonen aan, dat de onderzochte bisfosfonaten de vorming en de groei van apatietkristallen duidelijk remmen volgens een patroon dat afhankelijk is van de dosis.

35

TABEL B

Stof	Conc. μM	Waarde voor het product Ca <sup>++</sup> x Pi in oplossing	
		vóór incubatie	na incubatie
40	Ter vergelijking		
	Controle	0,0	114,7
	Cl <sub>2</sub> MBP	0,5	"
	Cl <sub>2</sub> MBP	2,5	44,0
	Cl <sub>2</sub> MBP	2,5	60,4
	Cl <sub>2</sub> MBP	5,0	73,6
45	F <sub>2</sub> MBP	0,5	"
	F <sub>2</sub> MBP	2,5	44,6
	F <sub>2</sub> MBP	2,5	58,5
	F <sub>2</sub> MBP	5,0	72,0
	AHE <sub>x</sub> BP	0,05	"
	AHE <sub>x</sub> BP	0,05	30,0
	AHE <sub>x</sub> BP	0,25	"
	AHE <sub>x</sub> BP	0,25	37,5
50	AHE <sub>x</sub> BP	0,5	"
	AHE <sub>x</sub> BP	0,5	59,6
	AHE <sub>x</sub> BP	2,5	"
	AHE <sub>x</sub> BP	2,5	92,6
	AHE <sub>x</sub> BP	5,0	"
	AHE <sub>x</sub> BP	5,0	95,3
	AHP <sub>e</sub> BP	0,05	"
	AHP <sub>e</sub> BP	0,05	36,7
	AHP <sub>e</sub> BP	0,25	"
	AHP <sub>e</sub> BP	0,25	37,1
55	AHP <sub>e</sub> BP	0,5	"
	AHP <sub>e</sub> BP	0,5	68,6
	AHP <sub>e</sub> BP	2,5	"
	AHP <sub>e</sub> BP	2,5	94,0

TABEL B (vervolg)

Stof	Conc. $\mu\text{M}$	Waarde voor het product $\text{Ca}^{++} \times \text{Pi}$ in oplossing vóór incubatie	
			na incubatie
5			
AHP <sub>E</sub> BP	5,0	"	97,5
Toegepast bij uitvinding			
AHB <sub>U</sub> BP	0,5	"	53,2
10 AHB <sub>U</sub> BP	2,5	"	88,6
AHB <sub>U</sub> BP	5,0	"	93,5

*Farmacologische proeven*

- 15 Het doel van dit onderzoek is het effect na te gaan van een reeks bisfosfonaten op een cultuur van schedelcellen en op de botreabsorptie en de mineralisatie in vivo.

*Toegepaste methoden**1. Experimenten op schedelcellen*

- 20 Celcultuur: de cellen werden gekweekt volgens de methode van Fast et al. (Biochem. J. 172, 97–107 (1978)). Samengevat: schedels van één dag oude Wistar ratten werden met collagenase behandeld. De vrijgestelde cellen werden op een plaat aangebracht in een concentratie van 200.000 cellen per cc medium in schijfclusters die geschikt zijn voor deze cultuur, waarbij de platen 24 schotelvormige uitsparingen hadden van 1,6 cm diameter waarin 0,5 cm<sup>3</sup> medium lag. De cellen werden gekweekt in het essentiële minimum
- 25 medium met daarin 10% foetaal kalversum in een atmosfeer van 5% CO<sub>2</sub> bij 37°C tot de achtste dag. De bisfosfonaten werden op de eerste dag tot het eind van het experiment toegevoegd. Het medium werd vervangen op de eerste, de vierde en de zevende dag.

*Celltelling*

- 30 De cellen werden geteld met een Coulter teller nadat zij waren vrijgesteld uit de schijven door een digeren met een mengsel van collagenase en trypsine.

*Lactaatbepaling*

- 35 Op de zevende dag werd het medium gewijzigd en de cellen 16 uren geïncubeerd. Het in deze periode geproduceerde lactaat werd gemeten in een extract in HClO<sub>4</sub> van het medium onder toepassing van lactatodehydrogenase.

*2. Experimenten op de botreabsorptie en in vivo calcificatie*

- 40 Groepen van vijf Wistar ratten van 180–200 g werden behandeld gedurende zeven dagen met respectievelijk 0,1, 1,0 en 10 mg P/kg van de volgende bisfosfonzuren:  
4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur (AHB<sub>U</sub>BP) en ter vergelijking:  
difluormethaanbisfosfonzuur (F<sub>2</sub>MBP) (in de vorm van het natriumzout);  
5-amino-1-hydroxypentaaan-1,1-bisfosfonzuur (AHP<sub>E</sub>BO);  
6-amino-1-hydroxyhexaan-1,1-bisfosfonzuur (AHE<sub>X</sub>BP);  
45 dichloormethaanbisfosfonzuur (Cl<sub>2</sub>MBP) (in de vorm van het natriumzout; toegepaste hoeveelheid: 1 mg P/kg).

- De dieren die als blanco's werden genomen werden slechts ingespoten met oplosmiddel en daarin NaCl. Alle behandelingen werden uitgevoerd langs de subcutane weg. De verbindingen werden opgelost in NaCl-houdend water bij de twee laagste concentraties en in zuiver water voor de hogere concentratie en
- 50 werden toegediend in een volume van 0,2 cm<sup>3</sup> per 100 g. De dieren werden gevoederd met Altromine 1314 met daarin 1,1 g/100 g P en 250 IE/100 g vitamine D<sub>3</sub>. Op de achtste dag werden de dieren gedood en de tibiae verwijderd en gefixeerd in 50% ethanol. De tibiae werden vervolgens gedehydrateerd in toenemende concentraties ethanol en geïmpregneerd in methylmethacrylaat na een toevoeging van Plastoid N. De frontale secties werden verwijderd en gesneden tot een dikte van 70–80  $\mu\text{m}$  waarna deze secties gemicro-
- 55 radiografeerd werden. Deze procedure maakt het mogelijk de dichtheid van het mineraal in de trabeculaire metaphyse volgens de methode van Schenk et al., te bepalen (Calc. Tissue Res. 11, 196–214 (1973)).

## Resultaten

### 1. Experimenten met schedelcellen

Als weergegeven in tabel C veroorzaakt  $Cl_2MBP$  een verlaging in het aantal cellen. Anderzijds heeft  $F_2MBP$  geen effect of een zeer gering effect in dit verband. De aminoderivaten vertonen een verschil omdat de 5 verbindingen met een oneven aantal koolstofatomen het aantal cellen veel sterker verlagen dan de verbindingen met een even aantal koolstofatomen.

TABEL C  
Effect op het aantal cellen  $\pm$  Standaarddeviatie (n)

10		% van de controle concentratie ( $\mu M$ )		
Verbinding		2,5	25	250
15				
AHB <sub>U</sub> BP	(uitv.)	100,5 $\pm$ 1,6 (8)	101,0 $\pm$ 1,5 (7)	74,2 $\pm$ 4,7 (15)***
$Cl_2MBP$		103,0 $\pm$ 0,7 (4)	86,4 $\pm$ 2,1 (12)***	54,5 $\pm$ 1,9 (12)***
$F_2MBP$		88,1 $\pm$ 1,4 (12)***	92,4 $\pm$ 1,9 (12)**	99,3 $\pm$ 2,0 (16)
AHP <sub>E</sub> BP		102,7 $\pm$ 2,8 (8)	42,6 $\pm$ 5,1 (16)***	dode cellen
AHE <sub>X</sub> BP		93,3 $\pm$ 3,0 (8)*	95,2 $\pm$ 2,2 (8)	87,0 $\pm$ 3,4 (20)*

20 Aantal cellen per schijf bij controle:  
(0,5548  $\pm$  0,05) 10<sub>6</sub> (55) ( $\bar{x}$   $\pm$  Standaarddeviatie (n)).  
\* betrouwbaarheidsinterval  $p < 0,05$ .  
\*\* betrouwbaarheidsinterval  $p < 0,01$ .  
\*\*\* betrouwbaarheidsinterval  $P < 0,001$ .

25 Wat betreft de productie van lactaat, deze wordt door  $Cl_2MBP$  verminderd, zoals wel bekend is. Anderzijds heeft  $F_2MBP$  hierop geen effect. De aminoderivaten vertonen een toename in de productie van het lactaat, een feit dat sterker is bij de verbindingen met een oneven aantal koolstofatomen. De cijfers zijn weergegeven in tabel D.

30

TABEL D  
Effect op de productie van lactaat  $\pm$  standaarddeviatie (n)

35		% van de controle concentratie ( $\mu M$ )		
Verbinding		2,5	25	250
40				
AHB <sub>U</sub> BP	(uitv.)	88,0 $\pm$ 1,5 (8)*	79,6 $\pm$ 4,1 (7)***	179,8 $\pm$ 18,6 (15)**
$Cl_2MBP$		87,5 $\pm$ 4,0 (4)	67,1 $\pm$ 2,8 (12)***	16,9 $\pm$ 2,2 (12)***
$F_2MBP$		112,1 $\pm$ 4,4 (12)***	106,2 $\pm$ 3,9 (12)	99,7 $\pm$ 4,7 (16)
AHP <sub>E</sub> BP		93,4 $\pm$ 3,0 (8)	354,1 $\pm$ 27,7 (16)***	dode cellen
AHE <sub>X</sub> BP		109,4 $\pm$ 6,0 (8)	108,3 $\pm$ 4,5 (8)	164,7 $\pm$ 7,7 (20)***

45 Bij één experiment bedroeg het aantal cellen 51,2% van de controle, bij drie experimenten bedroeg dit 1-3%. Deze concentraties geven de grens weer, waarbij de cellen afsterven.  
Normale productie aan lactaat:  
3,83  $\pm$  0,10  $\mu Mol/10_6$  cellen (55) ( $\bar{x}$   $\pm$  Standaarddeviatie (n)).  
\* betrouwbaarheidsinterval  $p < 0,05$ .  
\*\* betrouwbaarheidsinterval  $p < 0,01$ .  
\*\*\* betrouwbaarheidsinterval  $p < 0,001$ .

50

### Experimenten op de botreabsorptie en calcificatie in vivo

Een dier per groep werd bekeken. De cijfers zijn weergegeven in tabel E.



TABEL E  
Effect op de botreabsorptie en de mineralisatie van botten

Verbinding	Dosis (mg)	Reabsorptie	Mineralisatie
5			
AH <sub>B</sub> <sub>U</sub> BP	10	+++	-/+
	1	++/+++	-
	0,1	+	
Ter vergelijking			
10			
AH <sub>P</sub> <sub>E</sub> BP	10	Dit experiment werd afgebroken vanwege de acute giftigheid	
	1	+++	-
	0,1	+++	-
AH <sub>E</sub> <sub>X</sub> BP	10	*	+++
15			
	1	++	-
	0,1	-	-
Cl <sub>2</sub> MBP	1	+ / ++	-
F <sub>2</sub> MBP	10	-	-
	1	-	-
20			
	0,1	-	-

- = Geen remming van de reabsorptie of de mineralisatie.

Tussen + en +++ = toename in de remming van de reabsorptie of de mineralisatie.

\* = Effect kon niet worden vastgesteld door remming van de mineralisatie.

25 Uit deze tabel blijkt, dat AH<sub>P</sub><sub>E</sub>BP het meest actief is bij het remmen van de botreabsorptie. Er werd evenwel een duidelijke giftigheid waargenomen bij de hoogste dosering. De stoffen AH<sub>B</sub><sub>U</sub>BP en AH<sub>E</sub><sub>X</sub>BP zijn eveneens actief op de reabsorptie met een resultaat dat enigszins beter is dan dat van Cl<sub>2</sub>MBP. Een duidelijk verschil is er wat betreft de mineralisatie, omdat AH<sub>E</sub><sub>X</sub>BP een sterke remming van de mineralisatie in een dosis van 10 mg P/kg veroorzaakt, terwijl AH<sub>B</sub><sub>U</sub>BP hierop slechts een betrekkelijk gering effect heeft.

30 Deze resultaten tonen aan, dat de aminoverbindingen met een oneven aantal koolstofatomen enigszins giftig zijn, maar veel actiever bij het remmen van de botreabsorptie. De verbindingen met een even aantal koolstofatomen hebben een activiteit die enigszins beter is dan die van Cl<sub>2</sub>MBP. Een ander significant feit is, dat AH<sub>B</sub><sub>U</sub>BP geen of slechts een geringe remming van de mineralisatie veroorzaakt bij een hoge dosering, terwijl AH<sub>E</sub><sub>X</sub>BP een sterke remming veroorzaakt. AH<sub>B</sub><sub>U</sub>BP blijkt dus meer geschikt bij ziekten met een  
35 toegenomen botreabsorptie bij mensen. Tenslotte is het van belang op te merken, dat F<sub>2</sub>MBP geen effect heeft op de botreabsorptie noch op de botmineralisatie.

Bisfosfonaten die de groei van kristallen kunnen remmen zonder het bot zelf aan te tasten zijn dus uitgebreid onderzocht. Uit de resultaten kan worden geconcludeerd, dat AH<sub>B</sub><sub>U</sub>BP een goed geneesmiddel kan vormen voor het remmen van de botreabsorptie.

40 Het onderhavige farmaceuticum (4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur) kan worden bereid voor toepassing in de vorm van capsules of tabletten of als oplossing voor orale toediening of systemische toediening. Deze preparaten worden liefst tezamen met inerte dragers, zoals suikers (saccharose, glucose en lactose), zetmeel en derivaten daarvan, cellulose en derivaten daarvan, gommen, vetzuren en hun zouten, polyalcoholen, talk en aromatische esters bereid.

45 De farmaceutische preparaten kunnen oraal worden toegediend in doses van 25 tot 3200 mg per dag of langs parenterale weg in doses van 15 tot 300 mg per dag. De behandeling wordt meestal uitgevoerd gedurende zeven dagen of gedurende perioden van drie maanden, al naar gelang de behoeften.

## 50 Conclusies

1. Farmaceutisch preparaat dat een NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C(P O<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH-verbinding bevat, met het kenmerk, dat het een voor de behandeling van botziekten geschikt preparaat is, waarin het 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur als zodanig of in de vorm van een zout met een alkalimetaal, een organische base of een  
55 basisch aminozuur aanwezig is, met dien verstande dat, wanneer het 4-amino-1-hydroxybutaan-1,1-bisfosfonzuur niet in de vorm van een zout aanwezig is, het de enige in het preparaat aanwezige farmaceutische actieve stof is.

2. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het preparaat in vaste vorm voor orale toediening is.