



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

211964

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 15/22

(22) Prihlášené 06 06 80

(21) (PV 4012-80)

(40) Zverejnené 31 07 81

(45) Vydané 29 07 83

(75)

Autor vynálezu

KUŠNÍŘ JAROSLAV RNDr. CSc., PREŠOV, BARNA KONŠTANTÍN prof. MUDr.
ing. CSc., FEDERIČOVÁ JANA MVDr., DOVIČÁK MICHAL RNDr., KOŠICE

(54) Aminoglykozidové antibiotiká zo skupiny kanamycínu, neomycínu
a gentamicínu značené fluorescamínom

Aminoglykozidové antibiotiká zo skupiny kanamycínu, neomycínu a gentamicínu značené fluorescamínom.

Vynález spadá do odboru biochémie a klinickej chémie a rieši problém fluorescenčného značenia antibiotík kanamycínu, neomycínu a gentamicínu využitím reakcie fluorescamínu, tj. 4-fenylspiro-[furán-2/3H,1'-ftalán] 3,3'-dionu s primárnymi aminoskupinami antibiotík. Reakcia prebieha v kyslej oblasti, s výhodou pH 5, čím sa dosiahne prednostne značenie na jednej aminoskupine molekuly. Takto značené antibiotikum si zachováva pôvodné antimikrobiálne vlastnosti a navyše získava schopnosť intenzívnej fluorescence v ultrafialovom svetle a možnosť jednoduchšej identifikácie v koncentráciách 10^{-9} mol/l. Z reakčnej zmesi sa izoluje buď stĺpcovou chromatografiou na anexe, alebo elektroforézou na celulóзовom nosiči.

Predpokladaná hlavná možnosť využitia takto značených antibiotík je v odbore analytickej biochémie, pri vypracovaní nových jednoduchších fluorescenčných imunoanalýz aminoglykozidových antibiotík a všade tam, kde sa vyžaduje jednoduchá a vysokocitlivá identifikácia týchto látok pri zachovaní pôvodných biologických vlastností. Uvedeným spôsobom modifikované antibiotiká prispievajú k objasneniu otázok chemickej štruktúry a biologického efektu.

Vynález sa týka aminoglykozidových antibiotík zo skupiny kanamycínu, neomycínu a gentamicínu značených pomocou činidla 4-fenylspiro[furán-2/3H,1'-ftalán]3,3'-dionu, t. j. fluorescamínu, pričom zostáva zachovaná ich protimikrobiálna aktivita.

Doposiaľ používané metódy na identifikáciu aminoglykozidových antibiotík, ktorých sledovanie je dôležité z hľadiska ich nežiadúcich účinkov, vychádzajú predovšetkým z ich mikrobiologického efektu. Časť metód využíva chemické postupy, či fyzikálne analytické metódy — vysokotlakú kvapalinovú chromatografiu a plynovú chromatografiu. Kvalitatívne nový prístup k analýzam antibiotík hlavne využitím imunológie vyžaduje nejakým spôsobom „značené“ antibiotiká. Využíva najmä izotopové značenie — enzýmové rádioaktívne metódy, alebo rádioimunoanalytické postupy, menej však chemické fluorescenčné značenie. Pritom citlivosť fluorescenčných metód sa blíži citlivosti rádioaktívneho značenia, navyiac je odstránená práca s rádioaktívnym materiálom. V roku 1977 bol zverejnený postup aj aparátúra na imunofluorescenčné stanovenie gentamicínu, pričom ako fluorofór sa využíva izotlokyanát fluoresceínu, ktorý sa viaže na antibiotikum. Reakcia prebieha v alkalickom prostredí počas 2 hodín pri laboratórnej teplote. Fluoreskujúci produkt je málo stály a udržiava sa pri teplote $+4^{\circ}\text{C}$. Náročnejší spôsob stanovenia aminoglykozidových antibiotík využíva lumíniscenciu luciferázovej reakcie s ATP v kombinácii s enzýmovou modifikáciou aminoglykozidov. V klasickom analytickom prevedení je známa reakcia 4-fenylspiro[furán-2/3H,1'-ftalán]3,3'-dionu s primárnymi amínmi za vzniku fluoreskujúcich produktov. Takto boli označené antibiotiká kanamycín, gentamycín a neomycín, pričom značenie prebiehalo v alkalickom prostredí. Vzniknuté fluorofóry umožnili identifikáciu uvedených antibiotík v koncentrácii 10^{-9} mol/l $^{-1}$ avšak ich biologická aktivita bola podstatne znížená.

Táto nevýhoda je odstránená spôsobom fluorescenčného značenia aminoglykozidových antibiotík podľa predloženého vynálezu, podstata ktorého spočíva v tom, že antibiotikum obsahuje väčší počet aminoskupín reaguje s 4-fenylspiro[furán-2/3H,1'-ftalán]3,3'-dionom v kyslom prostredí vodného roztoku s výhodou pH 5, pričom prednostne vznikajúci fluorofór so zachovanou biologickou aktivitou sa selektívne izoluje od prímiesi stĺpcovou chromatografiou na anexe alebo elektroforézou na celulóзовých nosičoch.

Výhoda značenia podľa vynálezu spočíva v tom, že v uvedenom prostredí z viacerých prítomných aminoskupín antibiotika zreaguje s 4-fenylspiro[furán-2/3H,1'-ftalán]3,3'-dionom prednostne len jedna aminoskupina, čím reakcia nezmení antimikrobiálne vlastnosti analyzovaného antibiotika. Vzniklý produkt — fluorofór I vykazuje okrem dobrej chemickej stability aj vysokú fluorescenčnú účinnosť. To umožňuje ľahko stanoviť antibiotikum až do koncentrácie 10^{-9} mol/l $^{-1}$

a nižšie. Hranica citlivosti je zrovnateľná so stanovením pomocou izotopových metód značenia, pri ktorom sú chemické operácie náročnejšie zo známych dôvodov škodlivosti ionizujúceho žiarenia na živý organizmus. Ďalšie podrobnosti vynálezu sú uvedené nižšie, kde je objasnená podstata vynálezu na konkrétnych prípadoch, pričom sa na nich neobmedzuje.

Na pripojených výkresoch je znázornený postup fluorescenčného značenia aminoglykozidových antibiotík kanamycínu, neomycínu a gentamicínu podľa vynálezu a príklad antimikrobiálneho účinku fluorofóru I. Na obr. 1 je celková schéma prípravy a izolácie značených antibiotík, t. j. fluorofórov I. Na obr. 2 je príklad antimikrobiálneho účinku fluorescenčne značeného gentamicínu na kmeň *Bacillus cereus*, pričom S = štandardný antibiotikový disk (30 μg gentamicínu), G = východzí gentamicín 50 μg , FG = zmes fluorofórov gentamicínu 50 μg , I = fluorofór I približne 5 μg , II–V = biologicky neaktívne vyššie fluorofóry gentamicínu.

Fluorescenčné značenie uvedených antibiotík sa robí tak, že potrebné množstvo antibiotika sa rozpustí v tlmivom roztoku, s výhodou pH 5. V polovičnom objeme acetónu sa rozpustí 4-fenylspiro[furán-2/3H,1'-ftalán]3,3'-dion v množstve odpovedajúcom 0,5 molu na jeden mol aminoskupiny antibiotika. Obidva roztoky sa zlejú za intenzívneho miešania. Podľa koncentrácie reagujúcich zložiek vzniká bezfarebný, alebo citrónovožltý roztok so silnou fluorescenciou v ultrafialovom svetle ($\lambda_{\text{exc.}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em.}} = 480 \text{ nm}$). Izolácia fluoróru sa robí na kolonke anexu na báze dextranových gélov stabilizovanej tlmivým roztokom s výhodou pH 6,3. Po nanesení reakčných produktov fluorofór I opúšťa kolonku ako prvá fluorescenčná frakcia. Ostatné prímiesi predstavujú fluorofóry s väčším počtom viazaných fluorescenčných zvyškov, nemajú antimikrobiálnu aktivitu. Alternatívne je možné izolovať menšie množstvo fluorofóru I elektroforézou na celulóзовom nosiči v alkalickom tlmivom roztoku s výhodou pH 9,2 pri napätí 1200 V. Frakcia s najmenšou pohyblivosťou k anóde predstavuje fluorofór I. Z nosiča sa eluuje čpavkovou vodou (0,250 ml/l) a lyofilizuje.

Príklad 1

Príprava fluorescenčne značeného kanamycínu. V 1 ml citrátového tlmivého roztoku 0,2 mol. l $^{-1}$ s pH 5 sa rozpustí 5 mg sulfátu kanamycínu. V 0,5 ml bezvodého acetónu sa rozpustí 3,5 mg fluorescamínu a roztok za prudkého miešania sa pridá k roztoku antibiotika. Žltý produkt so silnou fluorescenciou v ultrafialovom svetle sa zbaví prebytočného acetónu odparením v prúde dusíka. Zmes sa potom naniesie na kolonku $0,7 \times 3 \text{ cm}$ anexu na báze dextranu s výhodou sephadexu DEAE-A25 stabilizovanú tlmivým roztokom Tris-HCl 0,05 mol. l $^{-1}$ s pH 6,3. Po vsiaknutí vzorky sa kolonka premýva rovnakým roztokom. Kolonku opustí frakcia fluorofóru I, ostatné prímiesi

zostanú pevne zachytené na stĺpci a vytesnia sa roztokom NaCl 2 mol.l⁻¹ v tlmivom roztoku.

Takto značený kanamycín tvorí 50% výťažok.

Príklad 2

Príprava fluorescenčne značeného neomycínu a gentamicínu. V 1 ml citrátového tlmivého roztoku 0,2 mol.l⁻¹ s pH 5 sa rozpustí 5 mg sulfátu neomycínu alebo gentamicínu. V 0,5 ml bezvodého acetónu sa rozpustí 3 mg fluoescamínu pre neomycín a 3,3 mg fluoescamínu pre gentamicín. V ďalšom sa postupuje ako v príklade 1. Roztoky izolovaných fluorofórov sa lyofilizáciou prevedú do práškovej formy, kde ich chemická stabilita zodpovedá stabilite pôvodných antibiotík. Značený neomycín tvorí 75 % a značený gentamicín 48 %.

Pripravený fluorofór I antibiotík môže sa uplatniť pri štúdiu vzťahu štruktúry a biologic-

kého efektu. Vzhľadom na veľkú chemickú príbuznosť s pôvodnými antibiotikami a zhodné antibakteriálne vlastnosti a vysokú fluorescenciu plní funkciu značeného antibiotika so širokou paletou využitia, predovšetkým v oblasti imunofluorescenčného stanovenia príslušných antibiotík. Pri použití in vitro môže nahradiť radioaktívne značenie, pri pokusoch in vivo treba najprv preveriť jeho chovanie v makroorganizme. V prípade podobného chovania ako pôvodné antibiotikum, môže tento fluorofór nahradiť radioaktívne značenie aj in vivo. Vlastnosti fluorofórov ukazujú, že pokiaľ neide o meranie v intaktnom tkanive, fluorescenčné značenie by mohlo tvoriť rovnocennú náhradu. Fluorofór I odvodený od aminoglykozidových antibiotík môže byť použitý aj ako model pre využitie analogických fluorofórov iných, biologicky aktívnych amínov — hormónov, enzýmov, bielkovín. Fluorofór I ako samostatná zlúčenina je tiež novým semisyntetickým antibiotikom.

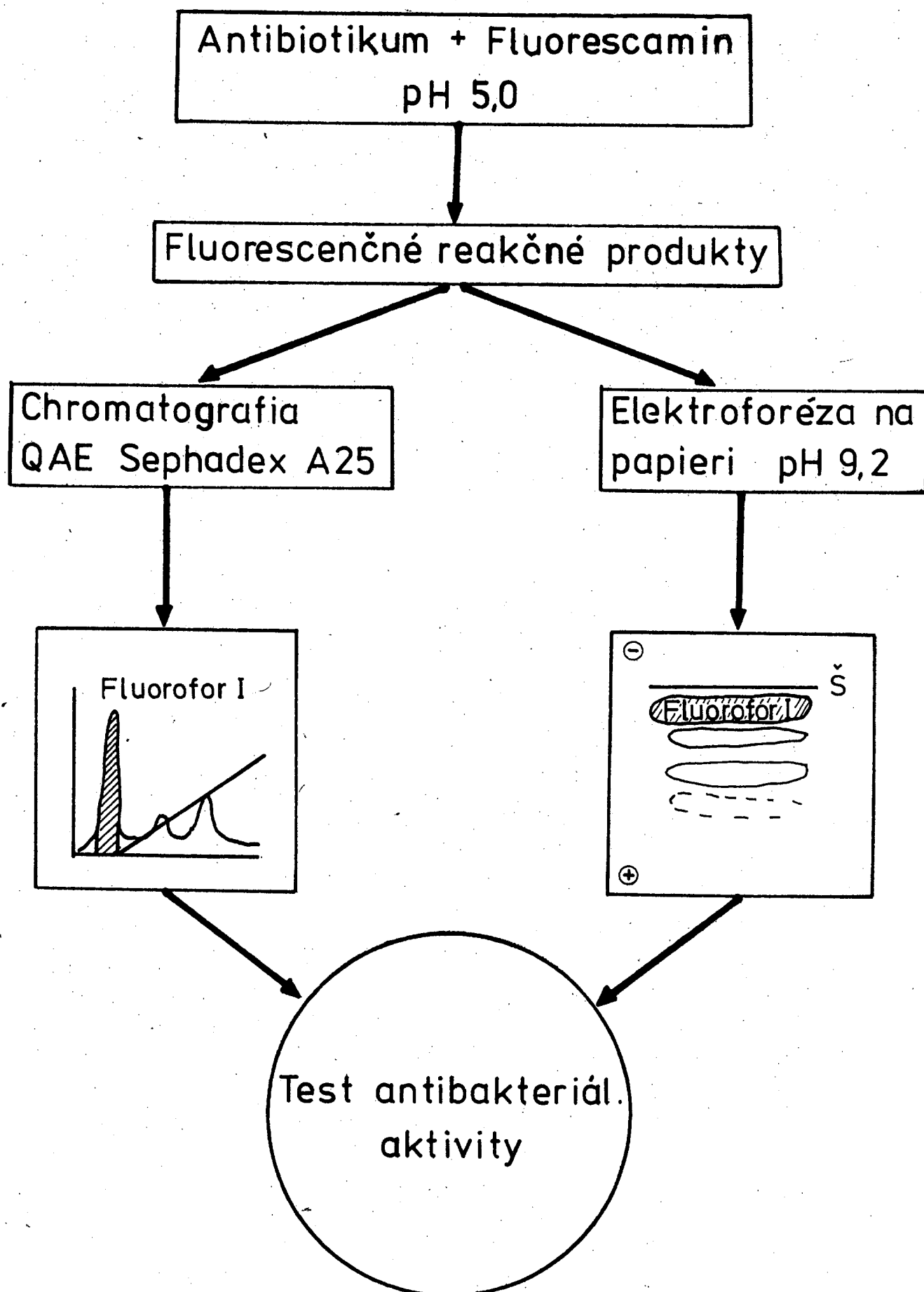
PREDMET VYNÁLEZU

1. Aminoglykozidové antibiotiká zo skupiny kanamycínu, neomycínu a gentamycínu značené fluoescamínom na jednej aminoskupine molekuly pripraviteľné reakciou uvedených antibiotík s 4-fenylspírol[furán-2/3H,1'-ftalán]3,3'-diónom vo vodnom roztoku v kyslej oblasti s výhodou pri pH 5.

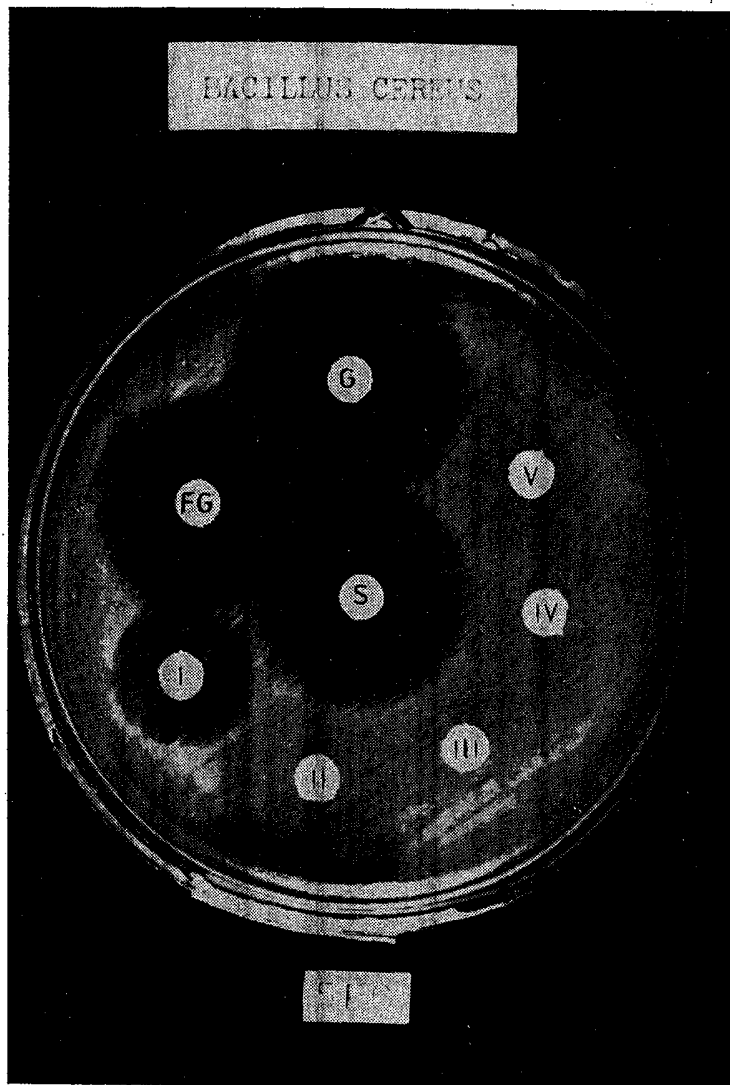
2. Spôsob prípravy značených aminoglykozidových antibiotík podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že uvedené antibiotiká reagujú s 4-fenyl-

spiro[furán-2/3H,1'-ftalán]3,3'-diónom vo vodnom roztoku v kyslej oblasti s výhodou pH 5 a vzniklý produkt sa z reakčnej zmesi izoluje.

3. Spôsob podľa bodu 2 vyznačujúci sa tým, že izolácia značených antibiotík sa robí stĺpcovou chromatografiou na anexe na báze dextranu vo vodnom prostredí s výhodou pH 6,3, alebo elektroforézou na celulóзовom nosiči v alkalickom prostredí s výhodou pH 9,2.



211964



Obr. 2