

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

268 796

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl. ⁴
C 07 H 15/24

(21) PV 6881-83
(22) Přihlášeno 21 09 83
(30) Právo přednosti od 21 09 82 HU (3020/82)

(40) Zveřejněno 12 09 89
(45) Vydáno 20 01 92
(89) 185 121, 21 09 82 HU

(72) Autor vynálezu

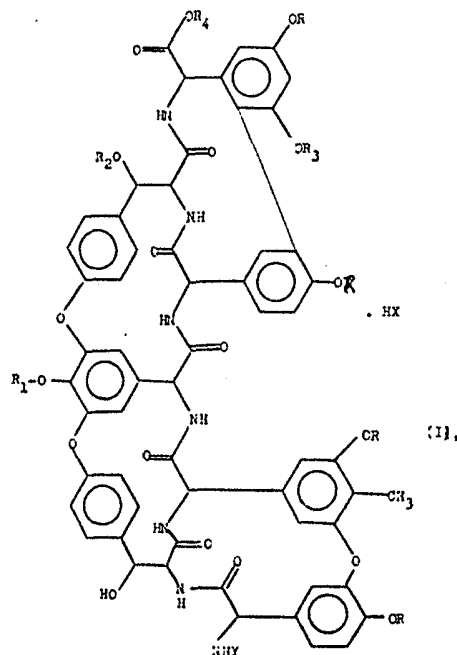
(73) Majitel patentu

RÁK KÁLMÁN dr.,
BODA ZOLTÁN dr.,
BOGNÁR REZSŐ dr. chem. ing.,
SZTARICSKAI FERENC dr., DEBRECÍN,
ZAJKA GABRIELLA, BUDAPEŠT (HU)
REANAL FINOMVEGYSZERGYÁR, BUDAPEŠT (HU)

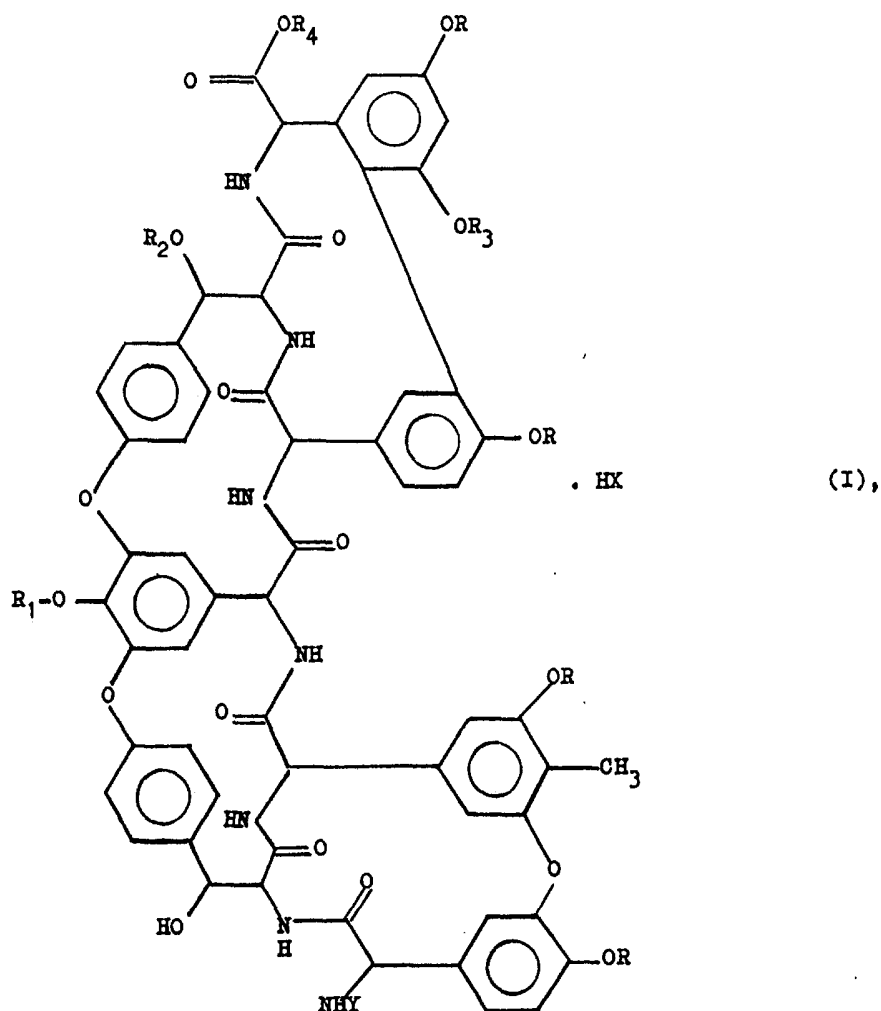
(54)

Způsob výroby ristomycinu A a/nebo
derivátů ristomycinu vysoké čistoty

(57) Řešení se týká způsobu výroby ristomycinu A a/nebo derivátů ristomycinu obecného vzorce I, vysoké čistoty, kde substituenty mají význam, uvedený v definici, jehož podstata spočívá v tom, že se hodnota pH 30 až 50 % vodného roztoku surové ristomycinové báze nastaví pomocí anorganické kyseliny, s výhodou zředěné kyseliny sírové na 6,7 až 7,0, s výhodou na 6,8, nebo se hodnota pH 30 až 50 % vodného roztoku znečištěného síranu ristomycinu A nastaví pomocí roztoku alkálie, s výhodou pomocí hydroxidu amonného na 6,7 až 7,0, načež se zpracuje 20 až 50 % (vol./vol) nitrilu nízké alifatické karboxylové kyseliny, mísitelným s vodou, s výhodou acetonitrilem, při teplotě místnosti, poté se nechá krystalovat při +4 °C a popřípadě se rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v alkanolu, obsahujícím 1 až 5 atomů uhlíku a potom se acyluje acylačním činidlem typu anhydridu kyseliny, s výhodou anhydridem kyseliny trifluorooctové při teplotě 0 až 20 °C a nakonec se získaný produkt popřípadě získané produkty izolují. Činidlo vhodné pro provádění pokusů s agregací trombocytů obsahuje produkt vyrobený shora uvedeným způsobem.



Vynález se týká způsobu výroby ristomycinu a/nebo derivátů ristomycinu obecného vzorce I



kde

- R znamená atom vodíku,
 R_1 znamená 0- α -D-araf/1 $\rightarrow$ 2/-O- α -D-manp/1 $\rightarrow$ 2/-O- α -L-rhap /-1 $\rightarrow$ 6/-O-beta-D-glop-skupinu,
 R_2 znamená 2,3,6-trideoxy-3-amino-/NHY/- α -L-ribohexapyranosylovou skupinu,
 R_3 je α -D-mannopyranosylová skupina,
 R_4 znamená alkylovou skupinu, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku,
X představuje zbytek anorganické kyseliny, přijatelné z farmaceutického hlediska,
Y znamená atom vodíku nebo skupinu obecného vzorce

$C(Z)_3-(CH)_n-CO-$, kde

Z je atom vodíku nebo atom halogenu a n je celé číslo mezi 0 a 5.

Je známo, že u řady vyšetření hemofilických nemocných (chorobou projevující se poruchou srážlivosti krve) se získají nejdůležitější data při posuzování funkcí krevních destiček pomocí zjišťování agregace trombocytů. Vedle rutinně používaných agregačních prostředků (například ADP, adrenalin, kolagen) hraje od roku 1971 důležitou roli substance, nazývaná ristocetin, která se předtím používala jako antibiotikum. Na základě pokusů Howarda a Firkina umožnil ristocetin rychlé a jednoduché poznání vrozené hemofilie, Willebrandovy nemoci [Thrombosis und Diathesis Haemorrhagica 26, 362 (1971)].

Podstatou Willebrandovy nemoci je chybění VIII. komplexu faktoru krevní srážlivosti. Nejdůležitější biologická úloha Willebrandova faktoru spočívá v podpoře adheze trombocytů k subendotheliálním formám. Chybění nebo kvalitativní porucha Willebrandova faktoru vyvolává klinický obraz nazývaný Willebrandovou nemocí, která představuje nejrozšířenější formu vrozené hemofilie. Je velmi důležité separovat nemocné, trpící Willebrandovou nemocí (dědičnost, rodinná anamnesa, léčení). Objasnění a rozlišení takového klinického obrazu má zejména před operativním zákrokem stěžejní důležitost.

Vynález spočívá na poznatku, že se v laboratorní praxi rozšířený ristocetin dá doko-nale nahradit jiným členem čeledi vancomycinových antibiotik - ristomycinem. Ristomycin se dá snáze a levněji vyrobit a při srážení proteinové plasmy se chová příznivěji. Na základě shora uvedených vlastností se ukázal být ristomycin při hematologických pokusech lepší. Ristomycin, používaný až dosud k léčení nemocí vyvolaných bakteriálními infekcemi lze s úspěchem používat i v této nové oblasti použití (pro diagnostické účely).

Sovětská vědecká izolovali ristomycinové antibiotikum z kultur *Proactinomyces fructiferi* var. ristomycinu adsorpcí (s výhodou na sloupci SzDSz -3 nebo SzDV -3 kationtomění-če) a elucí roztokem amoniaku v acetonu nebo puforem na bázi octanu amonného (pH = 9 až 10). Ristomycin byl izolován ve formě báze. Později byl ristomycin - podobně jako ristocetin - rozdělen ve dvě biologicky aktivní složky - ristomycin A a ristomycin B. Antibiotikum se vyrábělo v provozu ve velkém měřítku. Pro stanovení obsahu účinné látky ve fermentační břečce a intermediárním produktu byl vedle biologického zhodnocení vypracován i polari-metrický a UV-spektrofotometrický způsob [sovětský patent č. 180 754; Antibiotiki 8, 392 (1962); Antibiotiki 9, 884 (1964); Antibiotiki 10, 217 (1965); Antibiotiki 12, 129 (1967); Antibiotiki 16, 786 (1971)].

Po stanovení přesné struktury ristomycinu A [J. Org. Chem. 32, 2971 (1974); J. Anti-biot. 32, 446 (1979); Tetrahaedron Letters 21, 2983 (1980); JACS 102, 7093 (1980)] byl učiněn pokus o vysvětlení v jaké míře a jak daleko ovlivňují změny struktury sloučeniny popřípadě stupeň čistoty sloučeniny agregaci trombocytů.

Cílem vynálezu je zjištění struktury použitelné při biologických pokusech a vyvinutí způsobu výroby účinné látky ve vhodné a velmi vysoké čistotě.

Bylo zjištěno, že částečné nebo úplné odstranění skupin R_1 , R_2 , R_3 a R_4 , přítomných v obecném vzorci I popřípadě blokování funkčních hydroxylů těchto skupin a R skupiny (ve formě esteru nebo etheru) má za následek nežádoucí biologické účinky antibiotika a v mnohých případech i nepříznivou změnu rozpustnosti. Karboxyristomycin A, získaný náhradou skupiny R_4 atomem vodíku nevykazuje žádný účinek shlukující plasmu lidských trombocytů a nezabraňuje agregaci trombocytů, indukované ristomycinem. Derivát tetra-O-methylristomycin A ($R=R_4=CH_3$), blokový na fenolických hydroxyskupinách má rovněž nepříznivé vlastnosti. Peracetylovaný ristomycin A je za podmínek, použitých při pokusu nerozpustný a pro účely pokusu nevhodný. Ažkoliv eliminací uhlohydrátů získaný aglycoristomycin A ($R=R_1=R_2=R_3=Y=H$; $R=CH_3$) vyvolává aglutinaci, není tento derivát s ohledem na poměry pH a rozpustnosti rovněž optimální. Podle znalostí autorů není ani ristomycin B (tato sloučenina se liší od ostatních derivátů tím, že v obecném vzorci I v heterotetrasacharidovém řetězci R_1 2-O-D-arabinofuranosyl- alfa-D-mannopyranosylový podíl chybí (pro požadovaný diagnostický účel vhodný).

S překvapením bylo zjištěno, že účinná látka, použitá při testu krevní srážlivosti je tehdy a jen tehdy optimální, jestliže vykazuje vysokou čistotu a přesně definovanou

strukturu obecného vzorce I. Sloučeniny obecného vzorce I, ve kterých Y znamená vodík nebo skupinu $\text{CF}_3\text{-CO-}$, jsou ve vysoce čisté formě vhodné pro laboratorní diagnostické účely.

Na základě shora uvedených poznatků bylo zjištěno, že základní podmínka nezbytná pro vyvolání agregace normálních lidských trombocytů spočívá v tom, že v obecném vzorci I musí existovat čtyři volné hydroxyskupiny ($\text{R}=\text{H}$), C-terminální methoxykarbonylová skupina ($\text{R}_4 + \text{CH}_3$) a boční řetězec nedotčený ristotetrosyl ($= \text{R}_1$).

Vynález spočívá na poznatku, že ristomycin A vysoké čistoty a jeho deriváty, spadající pod obecný vzorec I, se výborně hodí pro provádění pokusů agregace trombocytů indukované ristomycinem A. (Obr. 1).

Při pokusech byly při použití šesti různých PRP (plazmy bohaté na trombocyty) a EDTA (ethyldiamintetraoctové kyseliny) PRP a zprůměrování získány body na křivce zobrazené na obr. 1. Na ose úseček je znázorněna koncentrace látek v mg/ml, na ose pořadnic změny optické hustoty v %. Údaje, získané pro ristocetin jsou znázorněny tečkami, údaje pro ristomycin čtverečky. Křivky ukazují podobný průběh a obsahují tři navzájem dobře oddělitelné úseky. Při nižší koncentraci (0,8 mg/ml) nejsou zjištěny žádné aglutinace. V oblasti od 0,8 až 2,0 mg/ml lze pozorovat lineární spojitost. Při koncentraci nad 2,0 mg/ml probíhají křivky dávek ve směru k hornímu maximu hodnot. Při dalším zvýšení dávky se srážení plazmy proteinu stává stále rušivějším faktorem. Při použití citrátu a EDTA-PRP jako substrátu se získají identické výsledky.

Na obr. 2 je znázorněno, že se ristomycin může velmi dobře použít ke kvantitativnímu stanovení VIII R:Ag-kofaktoru. Na ose úseček je znázorněn počet jednotek ristomycin-kofaktoru na ml, na ose pořadnic změny optické hustoty v %. Tak zvané ristomycin-kofaktor-assay-pokusy slouží k měření deficitu faktoru plazmy, vznikajícího při Willebrandově nemoci [J. Clin. Invest. 52, 2708 (1973); Thromb. Diath. Haemorrh. 34, 306 (1975)]. Výsledky ukazují, že se ristomycin rovněž výborně hodí k účelu kvantitativního pokusu a že pokus ristocetin-kofaktor a ristocetin-kofaktor-assay mohou být nahrazeny ristomycin-kofaktorem, popřípadě ristomycin-kofaktor-assay-pokusem. Stanovení ristomycin-kofaktoru lze provádět jak za použití promytých (obr. 2, horní křivka), tak i formalinem zpracovaných trombocytů (obr. 2, dolní křivka). Ristocetin a ristomycin vyvolávají při vyšších koncentracích srážení proteinu plazmy. Výsledky, získané při hodnotách mezi 1,5 až 3,5 mg/ml jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1

koncentrace (mg/ml)	absorpce světla (měřeno při 600 nm)	
	ristocetin	ristomycin
1,5	0,01	0,01
2,7	0,07	0,20
3,0	0,15	0,55
3,5	0,66	2,02

Ze shora uvedené tabulky je zřejmé, že se s ristomycinem, používaným podle vynálezu, získají vždy vyšší absorpční hodnoty než s ristocetinem.

S překvapením bylo zjištěno, že základní podmínka spolehlivosti pokusné metody podle vynálezu spočívá v tom, že činidlo použité pro pokus vykazuje vysokou čistotu a ristomycin A popřípadě jeho derivát má konstantní obsah účinné látky. Tento jev lze pravděpodobně odvozovat z toho, že ačkoliv ristocetin i ristomycin mají podobný antibakteriální účinek, mikroorganismy, které tyto sloučeniny vyrábějí mají velmi rozdílné vlastnosti. V závislosti na složení živné půdy a pochodech látkové výměny při biosyntéze, mohou vznikat naprosto odlišné znečištění, i když je zpracování identické. Dále je známo, že v břečce kultury mikroorganismů *Nocardia lurida* NRRL 2430 a *Proactinomyces fructiferi* var. ristomycini vzni-

kají dvě biologicky aktivní složky. Jestliže se antibiotikum použije jako antibakteriální léčivo pak přítomnost složky B v ristomycinu A neruší, neboť proti patogenním mikroorganismům jsou účinné obě účinné látky. Složka B vykazuje dokonce podstatně vyšší baktericidní účinek než složka A.

V protikladu ke shora uvedeným skutečnostem je ale při použití obou antibiotik pro hematologické pokusy cenná jen složka A. Článek Jenkinse a spolupracovníků [Thromb. Res. 7, 531 (1975)] rovněž poukazuje na tuto skutečnost. Tito autoři zjistili, že ristocetin B normální lidské trombocyty neagreguje.

Je známo, že při alkalických podmínkách fermentace a čištění iontoměničích mohou obě molekuly ristomycinu podlehnout rozkladu. Pro vysvětlení těchto pochodů byl vyroben jako modelová sloučenina karboxyristomycin A. Bylo zjištěno, že tato sloučenina normální lidskou plasmu trombocytů neagreguje a nebrání agregaci indukované ristomycinem A. To znamená, že hydrolýza C-terminální methoxykarbonylové skupiny velmi citlivé glykopeptidové molekuly, probíhající v důsledku působení alkálií (a eventuálně následující odštěpení retroaldolu na obou beta-hydroxyfenylserinových jednotkách), způsobí, že preparát ristomycinu A se stane pro hematologické účely zcela bezcenný a nepoužitelný. Podle zkušeností nelze ristomycin A zbavit pomocí překrystalování z vody a alkoholu, používaných při známých metodách těchto nežádoucích doprovodných látek.

Je nutné poukázat na to, že báze ristomycinu je krajně hygroskopická. Tato sloučenina může, je-li ponechána stát na vzduchu, pojmout během několika minut více než 15 % hmot. vlhkosti (vztaženo na hmotnost báze). Proto je téměř nemožné, z tohoto preparátu provést přesné odměření. Současně bylo s překvapením zjištěno, že aktivita agregace, vzorku ristomycinu během v laboratorní praxi obvykle prováděného sušení s oxidem fosforečným, podléhá nevratnému poškození.

Je nepochybné, že při izolaci antibiotika metody, používané až dosud pro důkaz eventuálního doprovodného prostředku a znečištění (totiž složky B a různých produktů, vzniklých v důsledku alkalického rozkladu) samy o sobě nepostačí (známé biologické metody prováděné testovacími mikroorganismy; UV spektrofotometrické stanovení účinné látky; měření optické otáčivosti). Doprovodné látky vykazují totiž při 280 nm rovněž absorpci UV záření a mají optickou otáčivost podobného směru.

Způsobem podle vynálezu se ristomycin A a/nebo deriváty ristomycinu obecného vzorce I, vysoké čistoty, vyrobí tak, že se hodnota pH 30 až 50% vodného roztoku surové ristomycinové báze nastaví pomocí anorganické kyseliny, s výhodou zředěné kyseliny sírové, mezi 6,7 až 7,0, s výhodou na 6,8, nebo se hodnota pH 30 až 50% vodného roztoku znečištěného síranu ristomycinu A nastaví pomocí roztoku alkálie, s výhodou pomocí hydroxidu amonného, na 6,7 až 7,0, načež se zpracuje s 20 až 50 % objemovými nitrilů nízké alifatické karboxylové kyseliny, mísitelným s vodou, s výhodou s acetonitrilem, při teplotě místnosti, poté se nechá krystalovat při +4 °C a popřípadě se rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v alkanolu, obsahujícím 1 až 5 atomů uhlíku a potom se acyluje acylačním činidlem typu anhydridu karboxylové kyseliny obecného vzorce $C(Z)_3-(CH_2)_n-COOH$, kde Z znamená atom vodíku nebo atom halogenu a n znamená celé číslo 0 až 5, s výhodou anhydridem kyseliny trifluorooctové při teplotě 0 až 20 °C a pak se získaný produkt nebo získané produkty izolují.

Takto získaný ristomycin anebo jeho derivát se rozpustí ve vodném roztoku pufru, s výhodou ve vodném roztoku tris-hydroxyaminomethanu. Takto vyrobený roztok se hodí pro účely pokusů agregace trombocytů a zejména k diagnostikování Willebrandovy nemoci.

Podle výhodného provedení způsobu podle vynálezu se ze surové báze ristomycinu, vyrobené známým fermentačním postupem, vyrobí rozpuštěním v destilované vodě při teplotě místnosti 30 až 50% roztok. Potom se hodnota pH tohoto roztoku nastaví anorganickou kyselinou, s výhodou zředěnou kyselinou sírovou na hodnotu mezi 6,7 a 7,0.

Jako výchozí látka se může používat rovněž surový síran ristomycinu A. V tomto případě se po rozpuštění nastaví požadovaná hodnota pH přidávkou zředěného roztoku alkálií,

s výhodou roztokem hydroxidu amonného. Nastavení optimální hodnoty pH se může provést pomocí měření pH-metrem nebo s výhodou při změně indikátoru bromthymolové modři ze žluté v nebesky modrou barvu. K takto připravenému roztoku se přidá 20 až 50 % objemových alkyl-nitrilu, mísitelného s vodou, s výhodou acetonitrilu, načež dojde ke krystalizaci.

Při krystalizaci surového produktu vyšší čistoty se může postupovat také tak, že se k vodnému roztoku síranu ristomycinu A, vyrobeného shora uvedeným způsobem, přidá nej-dříve 15 až 50 % objemových acetonitrilu, načež se hodnota pH nastaví na hodnotu mezi 6,7 až 7,0, opaleskující roztok se zahřívá až do rozpuštění a pomalu se nechá ochladit na teplotu místnosti.

Požadované krystaly se promyjí na filtru acetonem a potom se usuší ve vakuovém exsika-toru nad zahřátým chloridem vápenatým a parafinovými šponami až do konstantní hmotnosti. Tímto způsobem se získá ristomycin A nebo jeho síran, vykazující vynikající schopnost agregace, nehyroskopický, vysoké čistoty, ve výtěžku 60 až 80 % (v závislosti na obsahu účinné látky ve výchozím produktu).

Podle další výhodné formy provedení způsobu podle vynálezu se surový ristomycin A rozpustí popřípadě suspenduje v organickém rozpouštědle, s výhodou v alkanolu, načež se po kapkách přidá acylační činidlo (například anhydrid trifluoroctové kyseliny). Surový produkt se může v případě, že je to žádoucí, vyčistit překrystalováním.

Roztok obsahuje stabilní rostomycin nebo derivát ristomycinu, vyrobený způsobem podle vynálezu, standardizovaný, vysoce čistý, a vykazující konstantní hmotnost. Volné fenolické hydroxylové skupiny činidla mohou ale při delším skladování, v přítomnosti vzdušného kyslíku a za působení slunečního světla přijmout pro agregaci trombocytů nepříznivou chi-noidální strukturu. Tato změna je potvrzena dlouhodobým (40hodinovým) osvětlováním pevného preparátu ultrafialovým zářením. Se zřetelem na shora uvedené skutečnosti se má roztok ristomycinu pro přístrojovou diagnózu hemofilie ukládat do lahvíček vyrobených z hnědého skla a hermeticky uzavřených. Jednotlivá dávka roztoku je s výhodou 15 mg.

Nejdůležitější výhody předloženého vynálezu lze shrnout následovně:

1. Způsobem podle vynálezu lze vyrobit sloučeniny obecného vzorce I, vysoké čistoty, výborně použitelné při testech srážlivosti krve.
2. Roztok sloučenin obecného vzorce I lze použít s velkým úspěchem při kvantitativ-ních pokusech s krevní plasmou, což zajišťuje příznivější interval měření než známé prostředky a metody.
3. Roztok je poměrně stabilní, jeho hmotnost je konstantní, může být sterilizováno při 100 °C a dá se dobře skladovat.

Pokusy týkající se stability jasně prokázaly, že roztok krystalického monosíranu ristomycinu A v destilované vodě lze bez podstatného poškození sterilizovat 0,5 až 1,0 ho-dinu při 100 °C. Rovněž bylo zjištěno, že v TRIS pufru, pH = 7,4; koncentrace 15 mg/ml se může skladovat bez rozkladu při +4 °C 3 měsíce.

Další podrobnosti předloženého vynálezu lze seznati z následujících příkladů, aniž by se rozsah ochrany omezoval jen na tyto příklady.

Příklad 1

Výroba síranu ristomycinu A (R , R_1 , R_2 a R_3 jsou stejné jako vpředu; $R_4 = CH_3$; $X = HSO_4$; $Y = H$)

2 g surové báze ristomycinu, vyrobené známým způsobem, se rozpustí při teplotě míst-nosti v 5,0 ml destilované vody, načež se hodnota pH roztoku nastaví pomocí 1 N kyseliny sírové na 6,8; přesná hodnota pH se změří pH-metrem. Žlutý, slabě opaleskující roztok se vyčistí trochou kostního uhlí a zfiltruje. K získanému jasnému roztoku se po kapkách až do zákalu přidá 15 až 20 % (obj./obj.) acetonitrilu. Směs se nechá stát při teplotě místnosti tak dlouho až začne krystalovat. Toto opatření se v případě, že je to nutné opakuje během 2 až 3 dnů přidávkou dalšího malého množství acetonitrilu tak, aby se krystalizace dokon-

CS 268 796 B2

žila pomocí 24hodinového chlazení v ledničce při 4 °C.

Vzniklé čtverečné bílé krystaly se zfiltrují, nejdříve se promyjí dvakrát vždy po 1,0 ml ledově studené směsi acetonitrilu a vody (1 : 1) a potom dvakrát vždy 2 ml studeného acetonu, suší ve vakuovém exsikátoru, nad zahřátým chloridem vápenatým a parafinovými třískami při teplotě místnosti za sníženého tlaku až do konstantní hmotnosti. Výtěžek 71 %.

Příklad 2

Výroba síranu ristomycinu A

1,5 až 2,0 g surového síranu ristomycinu A, použitého jako výchozí látky, se rozpustí za stálého třepání ve 4,0 ml destilované vody. K silně pěnicímu roztoku se přidá 1,0 ml acetonitrilu, směs se vyčistí aktivním uhlím a zfiltruje. Hodnota pH se neutralizuje 2 N roztokem hydroxidu amonného v přítomnosti indikátoru bromthymolové modři (přechod ze žluté na nebesky modrou). K roztoku se přidává další množství acetonitrilu až do vzniku zákalu. Směs se až do počátku krystalizace nechá stát, vyloučené krystaly se zahřátím na vodní lázni opět rozpustí a roztok se nechá pomalu chladnout na teplotu místnosti. Další zpracování se provede způsobem popsáním v příkladu 1. Výtěžek 65 %.

Monosíran ristomycinu A, izolovaný podle obou metod má vynikající schopnosti agregovat trombocyty a odpovídá následujícím velmi vysokým kvalitativním předpisům:

a) Rozklad produktu začíná při 165 až 170 °C (měřeno v přístroji na měření teploty tání Mettler FP-5, s registrací fotobuňkami).

b) Pomocí vysokotlakého kapalinového chromatografu (Hewlett-Packard 1082), se z produktu zhotoví chromatogram vynikající kvality.

c) Produkt je podle chromatografie na vrstvě jednotný. Log ϵ hodnota naměřená ve vodném roztoku při 280 nm se pohybuje mezi 4,0 až 4,5, obsah síranu není vyšší než 25 %. Při odsávání, prováděném vodní vývěvou při teplotě varu acetonu kontinuálně 4 hodiny, činí ztráta hmotnosti monosulfátu ristomycinu A maximálně 1 až 2,5 %.

Charakteristika surového produktu pomocí chromatografie na tenké vrstvě a monosíranu ristomycinu A vyrobeného podle příkladu 1 a 2 se provede následovně:

Látky a činidla použité při stanovení:

1. čerstvě vyrobený 1 až 2% vodný roztok vzorku ristomycinu A.

II. 1. DC- Alurolle celulóza (Merck 0,1 mm) tenká vrstva.

2. Fixion 50x8 deska (Reanal)

III. směsi rozpouštědel jako eluční činidla:

a) n- butanol - pyridin - kyselina octová - voda (15 : 10 : 3 : 12) nebo

b) n- butanol - pyridin - n-propanol - kyselina octová - voda (20 : 10 : 5 : 3 : 32).

Horní organická fáze ke II. 1. tenká vrstva.

Pro ekvilibraci a start II. 2. vrstva se použije následující citrátový pufr (pH 6) v deionizované vodě:

7,0 g kyseliny citronové,

4,0 g hydroxidu sodného,

81,9 g chloridu sodného a

100 ml methylcellosolvu (2-methoxyethanolu),

se rozpustí v 1000 ml odměrné baňce a doplní se destilovanou vodou až po známku..

IV. Vyvíjecí činidlo: Paulyho činidlo

0,05 g diazotované sulfanylové kyseliny se rozpustí v 10 ml 10% roztoku uhličitanu sodného a čerstvě připravený roztok se použije.

Čerstvý surový produkt vykazuje na celulóзовé vrstvě ve směsích rozpouštědel a) a b) hodnoty $R_f=0,59$, popřípadě 0,52. Na desce Fixion 50x8 se v citrátovém pufru (pH = 6) naměřila hodnota $R_f=0,61$. Činidlo je velmi citlivé a detekuje prakticky všechny rozkladné produkty; dolní detekční mez činí 0,5 až 1,0 μg .

Měření na bázi vysokotlaké kapalinové chromatografie se provádí pomocí Hewlett - Packard 1082 HPLC přístroje s isochronním provozem. Při pokusech se používal laboratorně vyrobený analytický sloupec (C_6 - Lichrosorb, 10 μm). Obsah účinné látky ve vzorku ristomycinu A se stanoví pomocí UV detektoru, který pracuje při 254 nm. Ze vzorků se vyrobí 1 milimolární roztoky jejichž 20 až 30 μm alikvotní části se nastříká na sloupec. Chromatogramy se vyvíjí následovně:

- (I) v citrátovém pufru (pH 6,3), obsahujícím 12 % 2-methoxyethanolu, rychlost toku kapaliny 2,0 ml/min, rychlost posuvu papíru 0,1 cm/min.
- (II) v 0,1 molárním roztoku mravenčanu amonného (prostého kyseliny mravenčí), obsahujícího 10 % acetonitrilu (pH 7,4); rychlost toku kapaliny 3,0 ml/min; rychlost posuvu papíru 0,3 cm/min.

Shora uvedené podmínky se ukázaly být nejlepší.

Stabilita krystalického síranu ristomycinu A, vyrobeného podle příkladů 1 a 2, se stanoví po ozáření pevného vzorku ultrafialovým zářením a po tepelné sterilizaci vodných roztoků různých koncentrací popřípadě ponechání stát při 4 $^{\circ}\text{C}$ v TRIS pufru.

a) 50 až 100 mg ristomycinu A se ozařuje v malé lahvičce uzavřené zátkou, ultrafialovým světlem tak, že vzdálenost mezi lahvičkou obsahující vzorek a lampou je asi 20 cm. Po 40hodinovém ozařování je barva vyrobeného roztoku o něco tmavší; při koncentraci 15 mg/ml je agregace lidských trombocytů velmi pomalá,

b) z ristomycinu A se v destilované vodě vyrobí dva roztoky podobného ředění (0,39 mg/ml popřípadě 0,35 mg/ml) a jeden koncentrovanější roztok (6,8 mg/ml). Roztoky se udržují tři hodiny ve vodní lázni teplé 100 $^{\circ}\text{C}$. Odpařená voda se příležitostně doplňuje. Roztoky se ochladí na teplotu místnosti a hodnoty $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ se stanoví na základě intenzity absorpce světla, naměřené při 280 nm. Lze zjistit, že zvýšení absorpce světla roztoků udržovaných při 100 $^{\circ}\text{C}$ není lineární. V časovém rozmezí 0 až 1 hodiny nevykazují látky získané zpět lyofilizací na základě stanovení chromatografií na tenké vrstvě a vysokotlaké chromatografie kapalinové žádný rozklad. Látky agregují uspokojivě v požadovaných koncentracích normální lidské trombocyty.

Výsledky jsou graficky znázorněny na obr. 3, kde na ose úseček je znázorněn čas v minutách, na ose pořadnic extinkce $E_{1\text{cm}}^{1\%}$. Křivka 1 přísluší obsahu 3,99 mg ristomycinu A/10 ml, křivka 2 obsahu 3,56 mg/ml a křivka 3 obsahuje 68,77 mg/10 ml téže látky. Je zřejmé, že do 1 hodiny nedochází k žádnému rozkladu uvedené látky,

c) z ristomycinu A se vyrobí v TRIS pufru (pH = 7,4) roztok s koncentrací 15 mg/ml, který se uskladní po dobu 12 týdnů při 4 $^{\circ}\text{C}$ v lednici. Z tohoto kmenového roztoku se provádí po 2 týdnech obvyklý pokus agregace trombocytů popřípadě se po odpovídajícím zředění pufru (0,2 ml $\rightarrow$ 10 ml) se určuje hodnota $E_{1\text{cm}}^{1\%}$. Během pokusu zůstává agregační aktivita a hodnota $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ roztoku ristomycinu A nezměněna.

Příklad 3

Výroba bis-N,N'- trifluoracetylristomycinu A

206 mg ristomycinu A se suspenduje v 10 ml bezvodého methanolu, načež se za chlazení ledem přidá po kapkách 0,28 ml anhydridu kyseliny trifluoroctové. Reakční směs se nechá stát při teplotě místnosti a za sníženého tlaku se odpaří do sucha. Zbytek se opět rozpustí v bezvodém methanolu a znovu zahustí. Tento pochod se opakuje ještě třikrát, načež se produkt usuší ve vakuovém exsikátoru nad zahřátým chloridem vápenatým a kyselinou pafafinovou až do konstantní hmotnosti.

Takto získaný bis-N,N'- trifluoracetylristomycin A nevykazuje žádnou charakteristickou

CS 268 796 B2

teplotu tání (teplotu rozkladu). Standardizace: na vrstvě celulózy ve směsi rozpouštědel III a (viz příklad 2) činí hodnota R_f 0,45

Analýza: $C_{99}H_{108}O_{46}N_8F_6$ (2258):

vypočteno: F 5,05 % N 4,96 %

nalezeno: F 4,91 % N 4,86 %

4,88 4,74

Takto získaná sloučenina agreguje normální trombocyty stejně jako ristomycin A.

Příklad 4

Výroba činidel

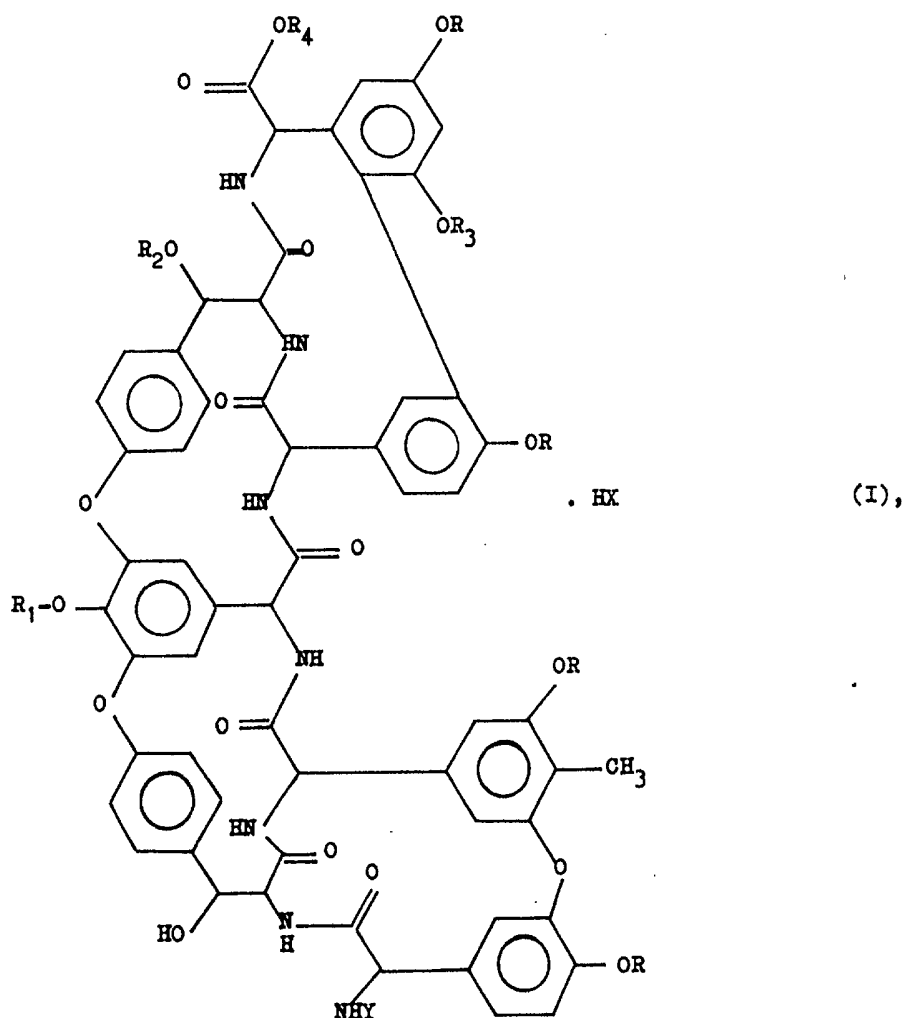
15,00 g monosíranu ristomycinu A, odpovídajícího shora uvedeným kvalitativním předpisům, se suspenduje v 1 litrové Erlenmayerově baňce ve 100 ml destilované vody (pH 6,8). Účinná látka, vyloučená na stěně baňky, se za stálého třepání převede dalším množstvím 400 až 500 ml destilované vody opět do roztoku. Takto získaný roztok, vykazující homogenní účinnou látku, se zfiltruje bez vláken do 100 ml odměrné baňky, baňka, používaná pro rozpouštění a filtr se kvantitativně promyje a odměrná baňka se doplní až po značku. Koncentrace monosíranu ristomycinu A v takto získaném roztoku činí 15 mg/ml (pro výrobu sterilního preparátu se roztok udržuje 30 až 60 minut při 100 °C a potom se ochladí na teplotu místnosti). Z tohoto roztoku se za použití automatického plnicího zařízení naplní za aseptických podmínek do hnědých tzv. lahviček s roztrhávacím uzávěrem, po 1,00 ml. Lahvičky se po rychlém zmrazení lyofilizují a uzavřou.

Jako kontrola přesného plnění a dokonalosti lyofilizace se obsah ristomycinu A (15 mg) vždy u několika lahviček určité šarže zkouší methodou HPLC a stanovením hmotnosti.

CS 268 796 B2

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby ristomycinu A a/nebo derivátů ristomycinu obecného vzorce I, vysoké čistoty



kde

R znamená atom vodíku,

R_1 znamená $O\text{-}\alpha\text{-D-araf/1}\longrightarrow 2\text{-}O\text{-}\alpha\text{-D-manp/1}\longrightarrow 2\text{-}O\text{-}\alpha\text{-L-rhaf/-/1}\longrightarrow 6\text{-}O\text{-}\beta\text{-D-glop-skupinu}$,

R_2 znamená 2,3,6-tridesoxy-3-amino-/NHY/- $\alpha\text{-L-ribo-hexapyranosylovou skupinu}$,

R_3 $\alpha\text{-D-mannopyranosylovou skupinu}$,

R_4 alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku,

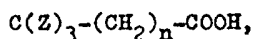
X znamená zbytek anorganické kyseliny, přijatelné z farmaceutického hlediska,

Y znamená atom vodíku nebo skupinu obecného vzorce

$C(Z)_3\text{-(CH}_2)_n\text{-CO-}$, kde

CS 268 796 B2

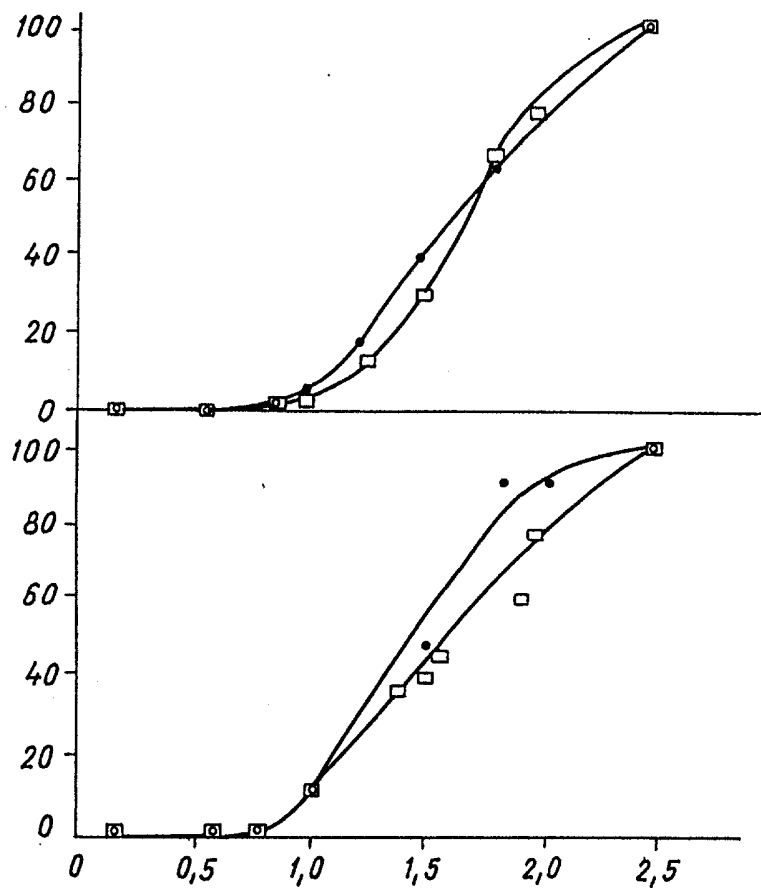
Z je atom vodíku nebo atom halogenu a n znamená celé číslo mezi 0 až 5, vyznačující se tím, že se hodnota pH 30 až 50% vodného roztoku surové ristomycinové báze nastaví pomocí anorganické kyseliny, s výhodou zředěné kyseliny sírové, mezi 6,7 až 7,0, s výhodou na 6,8, nebo se hodnota pH 30 až 50% vodného roztoku znečištěného síranu ristomycinu A nastaví pomocí roztoku alkálie, s výhodou pomocí hydroxidu amonného, na 6,7 až 7,0, načež se zpracuje s 20 až 50 % objemovými nitrilu nízké alifatické karboxylové kyseliny, mísitelným s vodou, s výhodou s acetonitrilem, při teplotě místnosti, poté se nechá krystalovat při +4 °C a popřípadě se rozpustí v organickém rozpouštědle, s výhodou v alkanolu, obsahujícím 1 až 5 atomů uhlíku a potom se acyluje acylačním činidlem typu anhydridu karboxylové kyseliny obecného vzorce



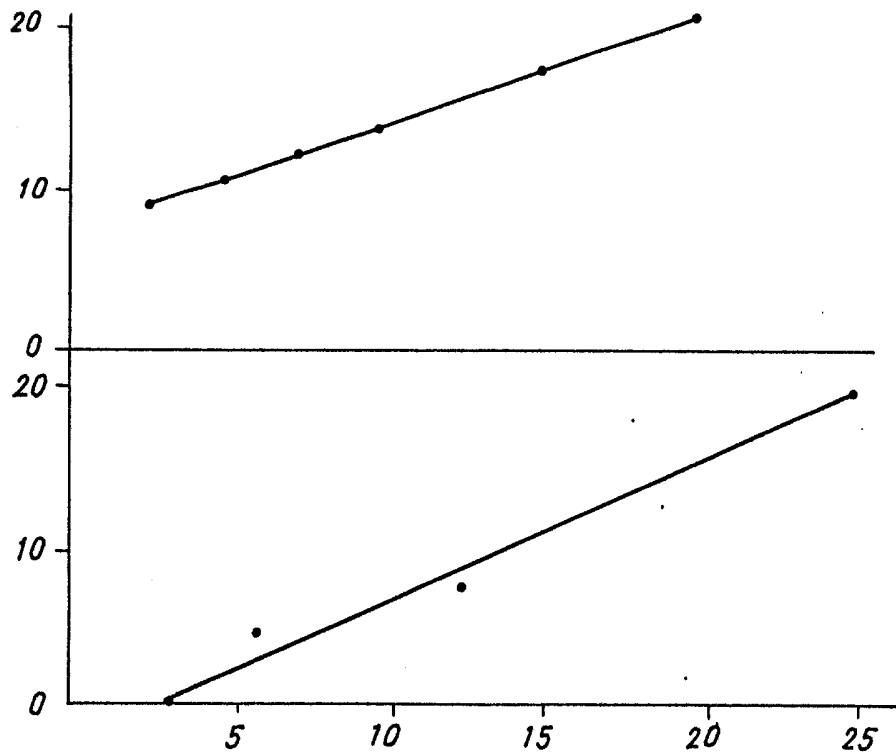
kde Z znamená atom vodíku nebo atom halogenu a
n znamená celé číslo 0 až 5,

s výhodou anhydridem kyseliny trifluorooctové při teplotě 0 až 20 °C a pak se získaný produkt nebo získané produkty izolují.

2 výkresy



OBR. 1



OBR. 2

