



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **148808 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: **2674/78**

(51) Int.Cl.⁴: **C 12 P 19/58**
C 07 K 7/02

(22) Indleveringsdag: **14 jun 1978**

(41) Alm. tilgængelig: **19 feb 1979**

(44) Fremlagt: **07 okt 1985**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **18 aug 1977 JP 98997/77**

(71) Ansøger: ***NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA; Tokyo, JP.**

(72) Opfinder: **Mamoru *Kunishima; JP, Tadao *Yamazaki; JP, Hiroyuki *Hayashi; JP, Ichiro *Takahashi; JP, Mitsuo *Nozaki; JP, Yasukazu *Shingai; JP, Katsuhisa *Tomita; JP, Kunio *Takada; JP, Hamao *Umezawa; JP.**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af**
3-((S)-1'-phenylethylamino)propyl-
aminobleomycin

DK 148808 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt, optisk aktivt bleomycin nemlig 3-[(S)-1'-phenylethylamino]propylaminobleomycin med formlen (II). Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er af den art, hvor en bleomycinproducerende stamme af slægten Streptomyces dyrkes i et næringsmedium i nærværelse af en N-[1-phenylethyl]-1,3-diaminopropan eller et salt deraf som precursor, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der som precursor anvendes optisk rent N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan med den nedenfor anførte formel (I) eller et salt der-

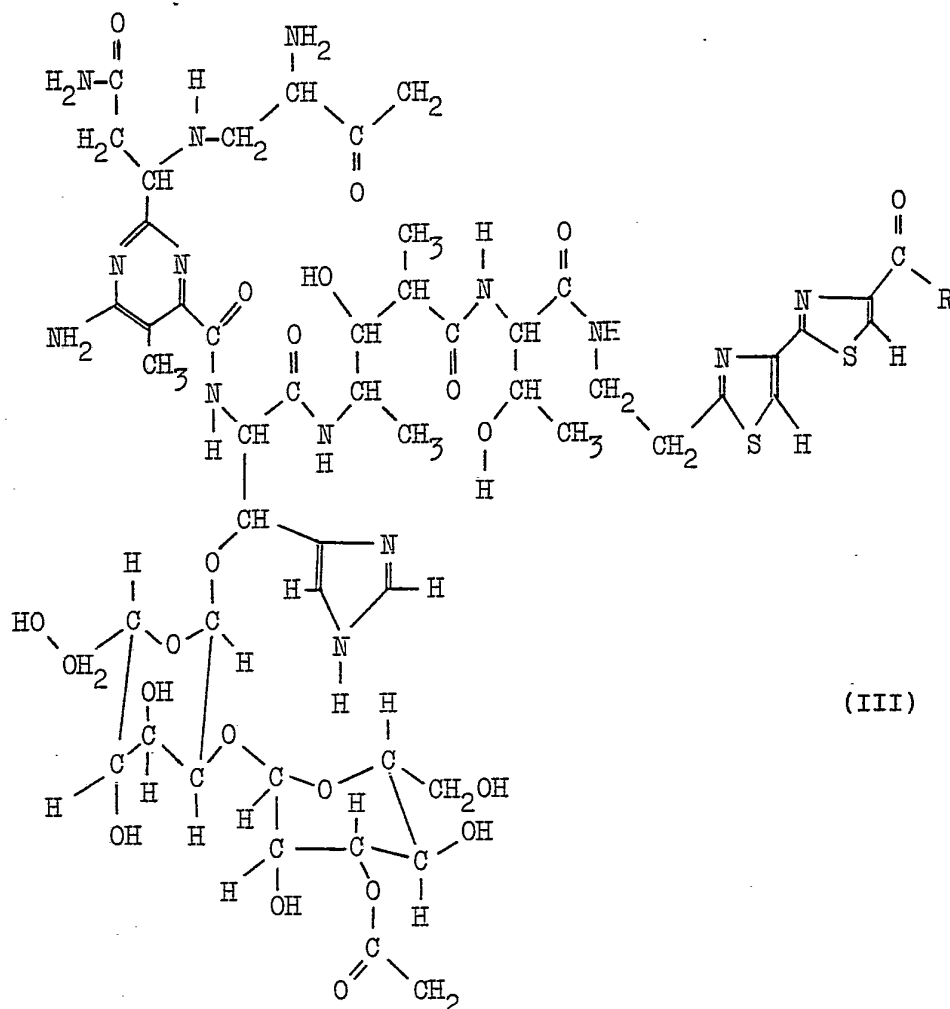
af i en koncentration på 0,2-2 mg/ml substrat, og at det selektivt dannede 3-[(S)-1'-phenylethylamino]-propylaminobleomycin med formlen (II) isoleres fra dyrkningsvæsken.

$$(I) \quad \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}(\text{S})\text{CH}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$$

(II)

Bleomycin er betegnelsen for en blanding af glyco-peptider med antitumor virkning og antibiotisk virkning. Det er beskrevet af Umezawa et al., Journal of Antibiotics, 19A, 200 (1966). Det kan danne et chelat med et atom divalent kobber. Det kan fås ved dyrkning af en bleomycinproducerende stamme af arten *Streptomyces verticillus* i et næringssubstrat med beluftning og omrøring, hvorpå den dannede forbindelse isoleres fra dyrkningsvæsken, f.eks. under anvendelse af ionbytningsteknik. Ved en gængs dyrkningsproces er der dannet en blanding, hvorfra der er isoleret 16 enkelte bleomyciner, jfr. f.eks. Umezawa et al., Journal of Antibiotics, 19A, 210 (1966)).

Det er endvidere kendt, at disse bleomyciner kan repræsenteres ved nedenstående almene formel (III), hvor R er forskellige for de enkelte bleomyciner.



Fra beskrivelsen til US-patent nr. 3.846.400 og dansk patent nr. 123.605 er det kendt, at når den bleomycinproducerende stamme dyrkes i et medium indeholdende en aminoforbindelse, vil den dannede bleomycin indeholde aminoforbindelsen i form af en sidekæde repræsenteret ved R i formelen (III), hvorved der er dannet et bleomycin, der er forskelligt fra de bleomyciner, som kan fremstilles under anvendelse af de gængse dyrkningsprocesser. I det følgende er anført eksempler på disse bleomyciner:

<u>R</u>	<u>Bleomycin</u>
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	demethyl A ₂ (3-(methylmercapto) propylaminobleomycin)
$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \text{O} \\ \qquad \parallel \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	A ₁
$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \qquad \text{CH}_3 \\ \qquad \qquad \diagup \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}^+- \\ \qquad \qquad \diagdown \qquad \text{CH}_3 \end{array}$	A ₂
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	A ₅
$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \qquad \text{NH} \\ \qquad \qquad \parallel \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$	B ₂
$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$	3-(methyلامino)propyl- aminobleomycin
$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NHC}_4\text{H}_9$	3-(butylamino)propyl- aminobleomycin
$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	3-(pyrrolidino)propyl- aminobleomycin
$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}_6\text{H}_5$	3-(1'-phenylethylamino)- propylaminobleomycin (blanding af R og S-for- men, jfr. nedenfor)

Blandt disse bleomyciner anvendes A_1 , A_2 , A_5 , B_2 , demethyl A_2 og visse andre i udstrakt grad i form af en kobberfri blanding, der i det følgende betegnes "bleomycinkompleks", til klinisk behandling af cancer, især til behandling af squamøs cellecarcinoma samt hudcancer, hoved- og halscancer, livmoderhalscancer, lungecancer, malign lymphoma og lignende, og der opnås for tiden gode resultater.

Med hensyn til bivirkninger har bleomycin imidlertid nogle uønskede egenskaber, f.eks. at det fremkalder lungefibrose. Lungefibrosen er den mest farlige blandt bleomycins bivirkninger. Det er indlysende, at såfremt denne bivirkning kan mildnes eller fjernes i en vis udstrækning, vil bleomycins carcinostatisk virkning kunne udnyttes bedre på det kliniske område.

Det har nu vist sig, at det hidtil ukendte 3-[(S)-1'-phenylethylamino]propylaminobleomycin med ovenstående formel (II), som fås ved dyrkning som omtalt ovenfor af en bleomycinproducerende stamme i nærværelse af N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan som precursor, har en mindst lige så god carcinostatisk virkning som de for tiden kommerciel tilgængelige bleomycinkomplekser og andre kendte bleomyciner herunder 3-[1'-phenylethylamino]propylaminobleomycin og tillige fremkalder lungefibrose i langt mindre grad. I det følgende betegnes 3-[(S)-1'-phenylethylamino]propylaminobleomycin med formlen (II) som "NK 631", og denne betegnelse dækker såvel de kobberholdige som de kobberfri former.

Sædvanligvis er isomerisering en af de vigtigste biokemiske reaktioner, som finder sted under dyrkningen af mikroorganismer, hvorved forskellige optisk aktive stoffer ofte omdannes til antipoder eller racemiske stoffer. Bortset derfra er der mulighed for, at en optisk aktiv aminoforbindelse kan undergå en ikke-biokemisk racemisering under sterilisationen eller dyrkningen. Mange undersøgelser har vist, at et optisk aktivt stof klart afviger fra et andet optisk aktivt stof med hensyn til permeabilitet gennem mikroorganismecellelevægge eller cellemembraner samt med hensyn til substratspecificitet og affinitet til enzymer, som deltager i biosyntetiske og metaboliske systemer.

Med biosyntesen af bleomyciner måtte man naturligvis forvente, at mikroorganismen ville udvise en eller anden form for selektivitet ved optagelse af en optisk aktiv aminoforbindelse, og at aminoforbindelsen eller det dannede bleomycin eventuelt ville undergå en racemisering.

Anvendelse af analysemetoder, som omtales nærmere i det følgende, har vist, at det bleomycin, som fås ved dyrkning af en bleomycinproducerende stamme i et medium indeholdende N-[(R,S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan som precursor, altid indeholder N-[1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan i et næsten konstant R/S forhold på 4:1. Skønt årsagen til at det dannede bleomycin ikke er RS-formen ikke kendes med sikkerhed, tyder ovennævnte eksperimentelle faktum på, at i det biosyntetiske system af den bleomycinproducerende stamme hørende til arten *Streptomyces verticillus* foregår indførelsen af optisk aktiv aminoforbindelse i bleomycinmolekylet med en signifikant selektivitet, således at indførelsen af R-formen altid dominerer over indførelsen af S-formen.

På baggrund af ovenstående måtte det forventes, at når dyrkningen gennemføres i et medium indeholdende N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan som precursor, vil det være særdeles vanskeligt at foretage selektiv indførelse af aminoforbindelsen i bleomycinmolekylet og derved fremstille NK 631 med stor optisk renhed i højt udbytte.

Til trods for ovenstående eksperimentelle fakta har det overraskende vist sig, at når optisk ren N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan sættes til dyrkningssystemet, undergår det ikke racemisering. Selv om der for tiden ikke kan gives nogen udtømmende forklaring på dette forhold, er det muligt at R-formen af aminoforbindelsen virker kompetitivt eller antagonistisk og som følge deraf hindres indførelsen af S-formen af aminoforbindelsen, og dannelsen af R-formen af bleomycinet dominerer kraftigt. Der er således tilvejebragt en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt bleomycin NK 631, som er et vigtigt middel til behandling af cancer. Udbyttet af NK 631 er stort, og det er for første gang lykkedes at fremstille optisk aktiv bleomycin ved en fermenteringsfremgangsmåde.

N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan, som anvendes i forbindelse med den foreliggende opfindelse, er en hidtil ukendt forbindelse, som er blevet syntetiseret for første gang. Den kan fremstilles på følgende måde:

En omtrentlig ækvivalent mængde acrylonitril sættes til phenylethylamin, som forinden er afkølet til 0°C. Blandingen holdes ved 85-100°C i 10-24 timer for at opnå fuldstændig reaktion. Overskud af acrylonitril destilleres under formindsket tryk, og remanensen destilleres yderligere, hvorved fås 3-[(S)-1'-phenylethylamino]-propionitril. Denne forbindelse reduceres på i og for sig kendt måde i nærværelse af f.eks. en Raney nikkel katalysator til dannelsen af N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan, som i det følgende betegnes som "aminoforbindelse". I den efterfølgende tabel I er anført fysiske og kemiske egenskaber for aminoforbindelsen.

Tabel I

	Fri base	Dihydrochlorid
(1) Udseende	Farveløs væske (stuetempera- tur)	Hvide nåle
(2) Smeltepunkt	-	223,5-224°C
(3) Kogepunkt	95°C-103°C (2 mm Hg)	-
(4) Ultraviolet absorptions- maksima (mμ)	241, 247, 252, 257, 263, 267 (methanol)	250, 256, 259, 266 (destilleret vand)
(5) Molær extinctions- koeff. ε (256 mμ)	-	206 (destilleret vand)
(6) Specifik drejning $[\alpha]_D^{25}$ α_D^{26}	- -56,38° (ufor- tyndet, $\ell = 1$)	-20,6° (C = 1 destilleret vand) -
(7) Tyndtlags chroma- tografi (R_f) n-Propanol-pyridin- eddikesyre-vand (15:10:3:12 v/v) "Avicell"-SF®	0,73	0,73

Tabel I (fortsat)

	Fri base	Dihydrochlorid
(8) Højspændings- elektrophorese (R_m) Myresyre-eddike- syre-vand (25:75:900 V/V) "Avicell"-SF [®] 800 V, 10 minutter Alanin sættes til 1,0	1,52	1,52
(9) IR absorptions- spektrum (cm^{-1}) (KBr metoden)	700, 760, 820, 910, 1025, 1080 1130, 1200, 1305, 1350, 1370, 1450, 1495, 1605, 2850, 2940, 3300, 3375	690, 750, 820, 910, 980, 1020, 1065, 1075, 1150, 1205, 1385, 1460, 1500, 1515, 1590, 2500, 2850, 3000, 3500
(10) Molekylformel (molekylvægt)	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2$ (178,28)	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Cl}_2$ (251,20)

Ved den praktiske gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det tilrådeligt at anvende et substrat, som hovedsagelig består af carbohydrater og nitrogenholdige organiske stoffer såsom hirsegelé, glucose, stivelse, sojabønnepulver, majsstøbevand og lignende, og som yderligere indeholder en lille mængde uorganiske stoffer såsom kaliumphosphat, kobbersulfat, zinksulfat, kobbersulfat, zinksulfat, natriumchlorid, nitrat og lignende. Substrater af denne type er beskrevet i f.eks. beskrivelsen til US-patent nr. 3.681.491 og nr. 3.846.400. N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan, der anvendes som precursor, kan i forvejen være inkorporeret i mediet, eller det kan tilsættes portionsvis i løbet af dyrkningen, eller begge tilsætningsmåder kan anvendes. Sædvanligvis foretages der forudgående neutralisering af aminoforbindelsen, som skal tilsættes, med saltsyre, og aminoforbindelsen anvendes i form af hydrochloridet. Det er imidlertid også muligt at sætte

en fri aminosyreforbindelse til substratet. I sidstnævnte tilfælde indstilles det færdige substrats pH-værdi, hvorefter dyrkningen påbegyndes.

Koncentrationen af N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan i substratet ligger i området fra 0,2 til 2 mg/ml, fortrinsvis 1 mg/ml. Efter sterilisering af dyrkningsmediet inoculeres det med en bleomycinproducerende stamme af *Streptomyces verticillus*, f.eks. *Streptomyces verticillus* NK 68-144, som er deporneret i Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, under betegnelsen FERM-P No. 4108, og i American Type Culture Collection under betegnelsen ATCC 31307, eller der podes med en flydende podekultur af en bleomycinproducerende stamme af *Streptomyces verticillus*, hvorpå dyrkningen gennemføres ved 23-37°C under beluftning og omrøring, sædvanligvis i et tidsrum på fra ca. 5 til 10 dage. Dyrkningen er færdig, når dyrkningsvæsken har maksimal styrke, hvilken konstateres ved en biotest under anvendelse af *Mycobacterium* 607 som testbakterie. Efter endt dyrkning filtreres dyrkningsvæsken under anvendelse af et filterhjälpemiddel, filtratet ledes gennem en anionbytterharpiks med reaktive grupper, f.eks. carboxylgrupper, til adsorption af det ønskede produkt på harpiksen, hvorefter produktet elueres med vandig saltsyre, og eluatet neutraliseres. Det opløste stof adsorberes på aktivt trækul, elueres med en blanding af acetone og saltsyre, koncentrerer og frysetørres. Der foretages ekstraktion med ethanol, hvorpå der chromatograferes på aluminiumoxid, elueres med methanol, og eluatet koncentrerer og frysetørres. Derpå underkastes produktet chromatografering på en søjle af "Sephadex"® G-25 (varemærke for en gelfiltrant bestående af mikroskopiske perler af tværbunden dextran), hvorpå der foretages chromatografering på en søjle af CM "Sephadex" C-25 (varemærke for en kationbytter bestående af mikroskopisk perler af carboxymethylgruppederivater af dextran), og der elueres med en vandig ammoniumchloridopløsning, hvorved der fås et eluat indeholdende den tilsigtede NK 631 kobberholdige form. Denne fraktion hældes på en søjle af "Diaion" HP 40 harpisk til adsorption af produktet på harpiksen, hvorpå der vaskes med en opløsning af natriumethyldiamintetraacetat (EDTA·Na₂), derpå med en opløsning af natriumsulfat og vand og til sidst elueres med en blanding af acetone og vand. Eluatet

koncentreres og frysetørres, og der fås et lyst gulligt amorph pulver af NK 631 monosulfat (kobberfri form).

Det fremkomne NK 631 monosulfat (kobberfri form) hydrolyseres med en stærk syre, hydrolysatet fremkaldes under anvendelse af højspændingspapirelektroforese og todimensionel papirchromatografi, hvorpå det afprøves ved hjælp af ninhydrinreaktionen. På denne måde bekræftes tilstedeværelsen af N-[1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan.

Derpå isoleres aminen og renses, og dens optiske drejningsevne og ultraviolette absorptionsspektrum optages til bestemmelse af den optiske renhed af NK 631. Ved målingerne anvendes følgende fremgangsmåde:

Ca. 50 mg NK 631 monosulfat (kobberfri form) blandes med 6 N saltsyre og opvarmes til tilbagesvalingstemperaturen på 110-115°C i 16 timer. N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan isoleres fra sønderdelingsproduktet og renses, hvorefter det optiske drejningsevne ($\lambda = 365$ nm) måles ved 25°C med et polarimeter (Perkin-Elmer 141). Derpå måles absorbansen ved $\lambda = 256$ nm, og hele kurven i det ultraviolette område bestemmes. Kurven i området 280-310 nm ekstrapoleres til $\lambda = 256$, som anvendes som basislinie ved 256 nm.

Kaldes den optiske renhed x, fås følgende ligninger:

$$x = \frac{S}{S + R} \quad (1)$$

$$x = 0,5 + 5,735 \times \frac{\alpha}{OD} \quad (2)$$

hvor S er den venstre drejende optiske drejningsevne,
R er den højre drejende optiske drejningsevne,
 α er den konstaterede optiske drejningsevne, og
OD er den konstaterede absorbans.

Det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede NK 631 monosulfat (kobberfri form) giver ved sur hydrolyse N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan, som i et typisk tilfælde har en konstateret specifik drejningsevne på $[\alpha]_{365}^{25} = -64,18^\circ$ ($C = 0,38$, H_2O). Den optiske renhed af det som udgangsmateriale anvendte NK 631 monosulfat (kobberfri form) beregnet i overensstemmelse ovenstående ligning er 98,5%.

I de efterfølgende tabeller II og III er anført væsentlige fysiske og kemiske egenskaber for NK 631.

Strukturen af NK 631 repræsenteret ved formlen (II) er blevet verificeret ved opløsning af NK 631 monosulfat (kobberfri form) i tungt vand og optagelse af ^{13}C -NMR spektret ved hjælp af protonstøjdekoblingsmetoden med dioxan som indre standard. Der kan således konstateres følgende signaler:

19,4, 26,3 37,0, 43,5, 58,9, 128,3 (to),
130,0, (to), 130,2 og 136,3 ppm

som kan tillægges de elleve ^{13}C atomer, som findes i amino-forbindelsen, der udgør sidekæden, nemlig 3-[(S)-1'-phenylethyl-amino]propylamino resten. Alle de andre signaler, som skyldes carbonatomer, er karakteristiske signaler, som generalt er omtalt i litteraturen om bleomyciner, jfr. Naganawa et al., Journal of Antibiotics, bind 30, side 388 (1977)).

Tabel II

Fysiske og kemiske egenskaber for NK 631 (kobberholdig form)

	Dihydrochlorid	Monosulfat
(1) Udseende	blåt amorft pulver	blåt amorft pulver
(2) Opløselighed	opløseligt i vand, methanol, eddikesyre, dimethylsulfoxid og dimethylformamid, tungt- opløseligt, i dioxan og uopløseligt i ethanol, acetone, ether og benzen	som for dihydrochloridet
(3) Smeltepunkt (sønderdeling) (°C)	205-207	205-207
(4) Specifik drejning $[\alpha]_{436}^{25}$ (destilleret vand, C = 1,0)	-95,6°	-93,7°
(5) Tyndtlagschromatografi (R_f) (Se note 1)	(a) 0,72 (b) 0,75	(a) 0,72 (b) 0,75
(6) Elektrophorese (R_m) (Alanin sættes lig med 1,0, se note 2)	0,80	0,80

(Note 1) (a) Silikagel G et adsorptionsmiddel til tyndtlagschromatografi fra (Merck Inc. U.S.A.), methanol-10% ammoniumacetat-10% ammoniakvand (10 : 9 : 1 vol/vol)

(b) "Avicell" SF [®] adsorptionsmiddel til tyndtlagschromatografi bestående af krystallinsk cellulose fra FMC Corporation, U.S.A.), n-propanol-pyridin-eddikesyre-vand (15 : 10 : 3 : 12)

(Note 2) "Avicell" SF, myresyre-eddikesyre-vand (25 : 75 : 900 vol/vol), 800 V, 15 min.

Tabel III

Fysiske og kemiske egenskaber for NK 361 (kobberfri form)

	Dihydrochlorid	Monosulfat	Di-(eddikesyre)-salt
(1) Udseende	Lyst gullighvidt amorf pulver	Lyst gullighvidt amorf pulver	Lyst gullighvidt amorf pulver
(2) Opløselighed	Opløseligt i vand, methanol, eddikesyre, dimethylsulf-oxid og dimethylformamid, tungt-opløseligt i dian-xan, uopløseligt i ethanol, acetone, ether og benzen	Som for dihydrochloridet	Som for dihydrochloridet
(3) Smeltepunkt (sønderdeling) (°C)	195-197	196-198	188-190
(4) Specifik drejning (α) _D ²⁵ (destilleret vand, C = 1,0)	-2,1°	-2,0°	-2,0°
(5) Tyndtlagschromatografi (R _F) (se note 1)	(a) 0,56 (b) 0,70	(a) 0,56 (b) 0,70	(a) 0,56 (b) 0,70
(6) Elektrophorese (R _m) (Alanin sættes lig med 1,0, se note 2)	0,94	0,94	0,94

Til tabel III

- (note 1) (a) Silikagel G, methanol-10%'s ammoniumacetat-10%'s ammoniakvand (10 : 9 : 1 vol/vol)
(b) "Avicell" SF, n-propanol-pyridin-eddikesyre-vand (15 : 10 : 3 : 12)
(note 2) "Avicell" SF, myresyre-eddikesyre-vand (25 : 75 : 900 vol/vol, 800 V, 15 min.

På tegningen viser fig. 1 og fig. 2 det ultraviolette absorptionsspektret for NK 631, og fig. 3 og 4 illustrerer IR-absorptionsspektrene. Nærmere betegnet viser fig. 1 det ultraviolette absorptionsspektrum for 3-[(S)-1'-phenylethylamino]-propylaminobleomycin-dihydrochlorid (kobberholdig form). Fig. 2 viser det ultraviolette absorptionsspektrum for det tilsvarende monosulfat (kobberfri form). Fig. 3 viser det infrarøde absorptionsspektrum for det tilsvarende dihydrochlorid (kobberholdig form), hvor stofprøven har foreligget i en kaliumbromidtablet. Fig. 4 viser det infrarøde absorptionsspektrum for det tilsvarende monosulfat (kobberfri form) målt på samme måde som ovenfor.

NK 631's fremragende biologiske virkninger illustreres i det følgende under henvisning til forsøgseksempler.

Den biologiske virkning af NK 631 sammenlignes med virkningen af kommercielt bleomycinkompleks og 3-[(R,S)-1'-phenylethylamino]propylaminobleomycin-monosulfat (kobberfri form) (i det følgende kaldet "RS-form"). RS-formen er fremstillet under anvendelse af fermenteringsfremgangsmåden ifølge beskrivelsen til U.S. patent nr. 3.846.400. Der foretages sammenligning med hensyn til følgende egenskaber:

1. Lungefibrose
2. Antitumorstyrkning
3. Antimikrobiel virkning
4. Toksicitet

1. Lungetoksicitet på mus (fibrose)

Til forsøget anvendes 15 uger gamle hanmus (stamme ICR) idet der anvendes 12 dyr pr. gruppe. Forbindelsen injiceres intraperitonealt i en fast dosis på 5 mg/kg en gang om dagen i 10 på hinanden følgende dage. Efter indgivelsen holdes dyrene under observation i 5 uger. Derpå aflives de og autopses til bestemmelse af graden af lungefibrose.

Hyppigheden og graden af lungefibrose bestemmes hos dyr, som er indgivet hhv. NK 631 monosulfat (kobberfri form), RS-formen og bleomycinkompleks. Resultaterne er anført i nedenstående tabel IV.

Tabel IV

	Hyppighed		Grad	
	Antal mus med lungefibrose (%)	forhold	* Samlet grad af lungefibrose/samlet antal dyr	forhold
NK 631 monosulfat (Cu-fri form)	4/12 (0,33)	0,36	6/36 (0,17)	0,25
RS-form	7/12 (0,58)	0,63	12/36 (0,33)	0,49
Bleomycin-kompleks	11/12 (0,92)	1,0	24/36 (0,67)	1,0

* Grad 0: Ingen fibrose.

Grad 1: Akkumulering af exudat konstateres i alveoler, og en fibroseagtig ændring konstateres i alveolevæggene.

Grad 2: Fibrose konstateres flere steder.

Grad 4: Spredt fibrose konstateres.

Grad 6: Fibrose konstateres i et større område på mindst 2/3.

Det fremgår af tabel IV, at NK 631 monosulfat (kobberfri form) kun giver ca. 1/2 så stor hyppighed og grad sammenlignet med RS-formen og kun ca. 1/3 så stor hyppighed og 1/4 så stor grad sammenlignet med bleomycinkompleks. Disse resultater viser klart den kliniske anvendelighed af NK 631 monosulfat (kobberfri form).

2. Antitumorstyrkning

2-1. Virkning på kultiverede HeLa S₃ celler.

ID₅₀ for hver af forbindelserne bestemmes ud fra deres inhibering af formeringen af HeLa S₃ celler efter dyrkning i 72 timer i nærværelse af forsøgsforbindelsen. Med bleomycinkompleks fås en ID₅₀-værdi på 1,70 mcg/ml. Med NK 631 opnås en værdi på 0,82 mcg/ml, hvilket viser, at det inhiberer formeringen af HeLa S₃

celler dobbelt så kraftigt som bleomycinkompleks. Med RS-formen fås en værdi på 0,80 mcg/ml, hvilket indikerer, at det har om trentlig samme inhiberende virkning som NK 631 monosulfat (kobberfri form).

2-2. Carcinostatisk virkning på Ehrlich musecancer (fast cancer).

2×10^6 celler transplanteres subkutant til inguinalområdet på 6 uger gamle hanmus (stamme ICR). 24 timer senere påbegyndes indgivelsen af forsøgsforbindelsen på samme måde som beskrevet i forsøgseksempel 1-2. 15 dage efter den subkutane transplantation udtages tumoren og vejes, og der foretages sammenligning med tumorer fra den ubehandlede kontrolgruppe til bestemmelse af inhiberingsgraden.

Resultaterne anføres i den efterfølgende tabel V, hvoraf det fremgår, at NK 631-monosulfat (kobberfri form) har stort set samme kvantitative virkning som RS-formen og har ca. 1,4 gange så kraftig carcinostatisk virkning som bleomycinkomplekset.

Tabel V

Dosis (mg/kg x 10)	Inhibering (%)		
	NK 631- monosulfat (Cu-fri form)	RS-form	Bleomycin- kompleks
2,7	84	78	67
0,9	68	60	55
0,3	39	51	49
0,1	24	51	24
0,03	19	13	21
0	0	0	0
ID ₅₀ (mg/kg/dag)	0,35	0,31	0,49

2-3. Carcinostatisk virkning på ascitec hepatoma hos rotter (ascitisk type).

1×10^6 AH 66 celler transplanteres til bughulen hos rotter (stamme Donryu). 24 timer senere indgives forsøgsforbindelsen intraperitonealt, og indgivelsen fortsættes i 10 på hinanden følgende dage med 1 dags mellemrum. 30 dage efter transplan-

tationen bestemmes rotternes legemesvægt og antallet af overlevende rotter. Resultaterne er anført i den efterfølgende tabel VI.

Tabel VI

Relative værdier for det gennemsnitlige antal levedage.

Dosis (mg/kg x 10)	NK 631- monosulfat (Cu-fri form)	RS-form	Bleomycin- kompleks
3,12	296	298	241
1,56	269	257	257
0,78	216	196	145
0,39	163	149	116
0,19	116	121	110
0	100	100	100

Det fremgår af tabel VI, at i tilfældet med ascites hepatoma AH 66, har NK 631-monosulfat (kobberfri form) stort set samme carcinostatisk virkning som RS-formen og en væsentlig bedre virkning end bleomycinkomplekset i hele dosisområdet.

2-4. Anticarcinogen virkning mod 20-methyl-cholanthren-induceret squamosuscellecarcinom hos mus.

På ryggen af 10 uger gamle hanmus (stamme ddy), hvor ryggen er blevet klippet, påføres en mættet opløsning af 20-methylcholanthren, der i det følgende betegnes 20-MC, i acetone i 18 uger, idet påføringen foretages to gange om ugen. 6 uger efter starten af behandlingen med 20-MC indgives forsøgsforbindelsen intraperitonealt i en mængde på 62,5 mcg/mus, og indgivelsen fortsættes to gange om ugen i 15 uger. 1 uge efter endt indgivelse undersøges dyrene for hyppigheden af carcinogenese, eller de undersøges patologisk på stedet, hvor 20-MC er blevet påført.

Resultaterne fremgår af den efterfølgende tabel VII, der viser, at NK 631-monosulfat (kobberfri form) og RS-formen inhiberer carcinogenesen fremkaldt af 20-MC i lidt større grad end det er tilfældet med bleomycinkomplekset.

Tabel VII

	Dødelighed	Carcinogenese (%)	Inhibering (%)
NK 631-monosulfat (Cu-fri form)	1/12	5/11 (45,4)	47,8
RS-form	1/12	5/11 (45,4)	47,8
Bleomycinkompleks	2/12	5/10 (50,0)	42,5
Kontrol	1/24	20/23 (86,9)	0

De ovenfor anførte forsøgsresultater viser klart, at NK 631-monosulfat (kobberfri form) har en væsentlig bedre antitumorstyrke end bleomycinkomplekset.

3. Antimikrobiel virkning

Den antimikrobielle virkning bestemmes ved hjælp af plademethoden med bleomycin A₂ som standard (1000 E/mg), og virkningen af forsøgsforbindelserne måles på Mycobacterium 607 og Bacillus subtilis PCI. Resultaterne er anført i den efterfølgende tabel VIII.

Tabel VIII

	M. 607	B. sub.
NK 631-monosulfat (Cu-fri form)	7848	1550
RS-form	7535	1400
Bleomycinkompleks	1234	886

Det fremgår af de i tabel VIII anførte data, at NK 631-monosulfat (kobberfri form) og RS-formen har en langt bedre antimikrobiel virkning end bleomycinkomplekset.

4. Toksicitet

4-1. Akut toksicitet (LD₅₀) ved intraperitoneal indgift til rotter.

Forsøgsresultaterne er anført i nedenstående tabel IX, hvoraf det fremgår, at NK 631-monosulfat (kobberfri form) har stort set samme LD₅₀-værdi som bleomycinkomplekset og RS-formen.

Tabel IX

		LD ₅₀ (mg/kg)	Konfidensgrænse (signifikans- niveau 5%)
Rot- te	NK 631-monosul- fat (Cu-fri form)	155,0	133,6 - 179,8
	RS-form	150,6	129,0 - 170,6
	Bleomycin- kompleks	168,0	130,0 - 217,0

4-2. Subakut og kronisk toksicitet hos rotter og hunde.

NK 631-monosulfat (kobberfri form) har omtrentlig samme subakutte og kroniske toksicitet hos rotter og hunde som bleomycinkomplekset. Det skal endvidere bemærkes, at NK 631-monosulfat (kobberfri form) ikke fremkalder necrose på injektionsstedet på en eneste af hundene, hvorimod bleomycinkomplekset fremkalder necrose på injektionsstedet hos alle hundene i gruppen med den høje dosis (1,2 mg/kg, 90 gange), selv om der anvendes samme dosisniveau af de to forsøgsforbindelser. Desuden har NK 631 en mindre pulmonær toksicitet end bleomycinkomplekset.

De ovenførte anførte resultater indicerer, at NK 631-monosulfat (kobberfri form) kan sammenlignes med bleomycin-komplekset hvad angår toksicitet med undtagelse af tilfældene med pulmonær toksicitet og necrose.

5. Konklusion

Det fremgår af de ovenfor anførte forsøgsresultater, at NK 631, der er en hidtil ukendt forbindelse, har følgende karakteristiske egenskaber:

- (1) meget lav pulmonær toksicitet,
- (2) overraskende god antimikrobiel og antitumorstyrkning i forhold til det kendte bleomycinkompleks,
- (3) en almen toksicitet, der er sammenlignelig med toksiciteten af det kendte bleomycinkompleks, og
- (4) en mindre lokal toksicitet på injektionsstedet end det er tilfældet med det kendte bleomycinkompleks.

Følgelig kan det forventes, at NK 631 kan anvendes til kliniske formål.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler.

Eksempel 1

En liter af et substrat indeholdende 2% glucose, 0,75% pepton, 0,75% kødekstrakt og 0,3% natriumchlorid og med en pH-værdi på 7,0 anbringes i en 5 liter Erlenmeyer kolbe og steriliseres, hvorpå der inokuleres med *Streptomyces verticillus* NK 68-144 (FERM-P No. 4108, ATCC 31387), og dyrkningen gennemføres ved 28°C i 48 timer under omrøring og rystning, hvorved fås en flydende podekultur.

N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan-hydrochlorid sættes i en mængde på 1 mg/ml til et substrat indeholdende 7,17% hirsegelé, 0,5% glucose, 3,5% sojabønnepulver, 0,75% majsstøbe- vand, 0,3% natriumchlorid, 0,1% dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% zinksulfat, 0,01% kobbersulfat, 0,2% natriumnitrat og 0,03% "Pronal ST-1" (ikke-ionisk, overfladeaktivt antiskummiddel fra firmaet Toho Kagaku), og pH-værdien indstilles på 6,5. 20 liter af dette substrat anbringes i en krukkeformet dyrkningsbeholder med en kapacitet på 30 liter og steriliseres, hvorpå den ovenfor fremstillede flydende podekultur tilsættes i en mængde på 10%. Dyrkningen gennemføres med beluftning og omrøring på 400 omdrejninger pr. minut i 7 dage ved 28°C. Efter endt dyrkning filtreres dyrkningsvæsken under anvendelse af 5% "Daikalite" diatoméjordfilterhjælpemiddel (fra firmaet Toa Kasei Co., Japan), og der fås 10 liter filtrat (326 u/ml, 3,26 g-titer). Filtrat og vaskevand blandes og ledes gennem en søjle pakket med 630 ml "Amberlite"® IRC-50 (H-form) til adsorption af det ønskede produkt. Søjlen vaskes med vand, hvorpå der elueres med 80 liter 0,5 N saltsyre. Eluatet neutraliseres, det uopløselige materiale frafiltreres, og filtratet ledes gennem en søjle pakket med 50 ml aktivt trækul. Søjlen vaskes med vand og elueres med 750 ml 0,02 N saltsyre-acetone (1:1). Eluatet neutraliseres med "Dowex"® (anionbytterharpiks af copolymer af epichlorhydrin og ammoniak for firmaet Dow Chemical Co., USA), hvorpå der koncentrerer og frysetørres. Produktet opløses i den tredobbelte mængde vand, sættes til ni rumfangsdele methanol, hvorpå der filtreres. Den methanoliske opløsning ledes gennem en søjle pakket med 25 ml aluminiumoxid, og der elueres med 90%'s methanol.

Eluatet neutraliseres, koncentrerer og frysetørres. Produktet opløses i 10 ml vand, adsorberes på en søjle pakket med 100 ml "Sephadex" G-25, hvorpå der fremkaldes med vand, og fraktionerne med blå farve opsamles.

Fraktionerne med blå farve ledes gennem en søjle pakket med 100 ml CM-"Sephadex" C-25 og elueres med 0,05-1 M ammoniumchlorid. Til eluatfraktionen svarende til NK 631 sættes 1 g EDTA- Na_2 , pH-værdien indstilles en gang på 0,5 med 12 N saltsyre, hvorpå der neutraliseres med 5 N natriumhydroxidopløsning. Derpå foretages adsorption på en søjle pakket med 50 ml "Diaion" HP-40 (adsorptionsmiddel bestående af styren-divinylbenzencopolymer fra firmaet Mitsubishi Chemical Co., Japan). Søjlen vaskes med det dobbelte rumfang 5% EDTA- Na_2 , vaskes med 1,5 gange dens rumfang af 5% natriumsulfat, derpå med vand, hvorpå der elueres med det tredobbelte rumfang 50%'s vandig acetone. Eluatet koncentrerer og frysetørres, hvorved fås det færdige produkt. På denne måde fås 100 mg NK 631-monosulfat (kobberfri form) med en styrke på 830 mg. Udbyttet af 25,5% baseret på filtratet fra dyrkningsvæsken. En analyse ved hjælp af CM-Sephadexmetoden viser, at det indeholder 98,7% NK 631. Dets optiske renhed er 98,5% bestemt ved den tidligere anførte metode. Produktet har følgende UV-absorptionsmaksima og antimikrobielle styrke:

Ultraviolet absorptionsmaksimum: 290 m μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 106 i
0,1 N saltsyre)

Antimikrobiel styrke: 8077 E/mg

Eksempel 2

120 liter af et substrat med den i eksempel 1 anførte sammensætning anbringes i en 200 liters dyrkningsbeholder, og der tilsættes 120 g N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan, hvorefter pH-værdien indstilles på 6,5, og blandingen steriliseres. Til dette substrat sættes en flydende podekultur af *Streptomyces verticillus* NK 68-144 (FERM-P No. 4108, ATCC 31307) i en mængde på 10% og fremstillet under samme betingelser som i eksempel 1. Dyrkningen gennemføres med beluftning og omrøring på 350 omdrejninger pr. minut i 7 dage ved 28°C. Efter endt dyrkning underkastes filtratet (107 liter, 671 μ /ml, 72 g-styrke) samme oparbejdning som beskrevet i eksempel 1. Efter ekstraktion og rensning fås således 4,7 g NK 631-monosulfat (kobberfri form) (38,9 g-styrke). Dette udbytte er 47% beregnet på filtratet fra dyrk-

ningsvæsken. En analyse under anvendelse af CM-"Sephadex"-metoden viser, at dette produkt indeholder 99,6% NK 631. NK 631 har en optisk renhed på 99,1% målt ved den tidligere anførte fremgangsmåde.

Produktet har følgende ultraviolette absorptionsmaksimum og antimikrobielle styrke:

Ultraviolet absorptionsmaksimum: 290 mμ ($E_1^{1\%}$ 107 i 0,1 N saltsyre)

Antimikrobiel styrke: 8027 · E/mg

Fremstilling af N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan.

Til 50 g (S)-1-phenylethylamin afkølet til 0°C sættes 33 g acrylonitril under omrøring. Derpå hæves temperaturen i reaktionsblandingen til 93°C i en kolbe forsynet med en tilbagesvaler med et calciumchloridrør, hvor omrøringen fortsættes i 18 timer.

Efter endt omsætning afdestilleres overskud af acrylonitril under formindsket tryk, og remanensen underkastes fraktioneret destillation under formindsket tryk.

Fraktionerne, som destillerer ved 142-145°C under et tryk på 7 mm Hg, opsamles, og der fås 53,5 g 3-[(S)-1'-phenylethylamino]propionitril.

Dette stof blandes med 5 g Raney nikkel W-7 og 50 ml 15%'s ammoniakalsk ethanol, og der foretages reduktion i en autoklav med en hydrogenpartialtryk på 100-40 kg/cm² og ved en temperatur på 50-58°C i tidsrum på 1,5 timer under omrøring på 1000 omdrejninger pr. minut.

Efter endt reduktion destilleres den flydende reaktionsblanding under formindsket tryk, og fraktionerne, som destillerer i temperaturområde 95-103°C under et tryk på 2 mm Hg, opsamles. Der fås således 48,3 g N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan. Udbyttet er 66% beregnet på (S)-1-phenylethylamin.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af 3-[(S)-1'-phenylethylamino]propylaminobleomycin, hvilken fremgangsmåde er af den art, hvor en bleomycinproducerende stamme af slægten *Streptomyces* dyrkes i et næringsmedium i nærværelse af en N-[1-phenylethyl]-1,3-diaminopropan eller et salt deraf som precursor, k e n d e t e g n e t ved, at der som precursor anvendes optisk rent N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropan eller et salt deraf i en koncentration på 0,2-2 mg/ml substrat, og at det selektivt dannede 3-[(S)-1'-phenylethylamino]-propylaminobleomycin isoleres fra dyrkningsvæsken.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den bleomycinproducerende stamme er *Streptomyces verticillus* FERM-P No. 4108 (ATCC 31307).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at N-[(S)-1'-phenylethyl]-1,3-diaminopropansaltet er hydrochloridet, sulfatet eller acetatet.

Fremdragne publikationer:

DK patent nr. 123605.

FIG. 1

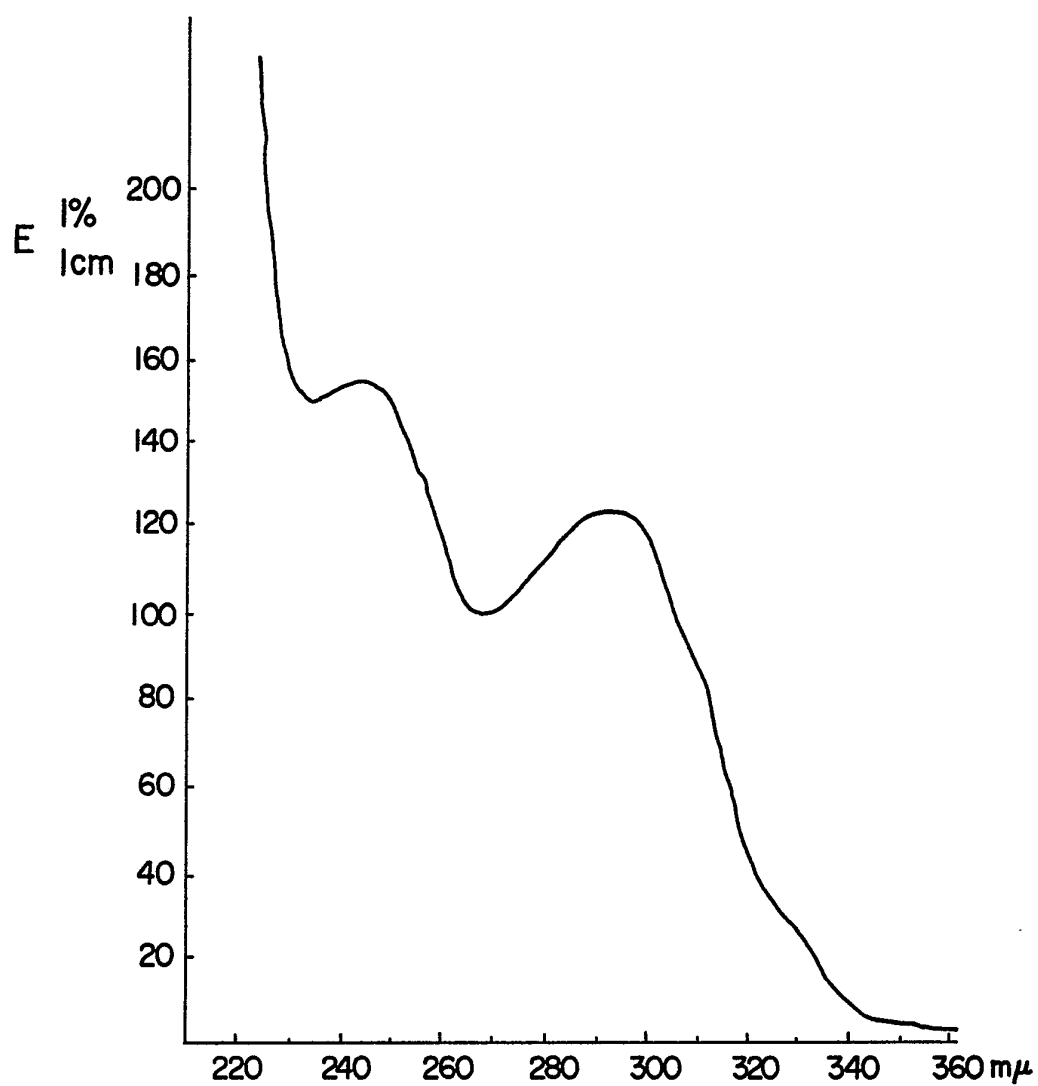


FIG.2

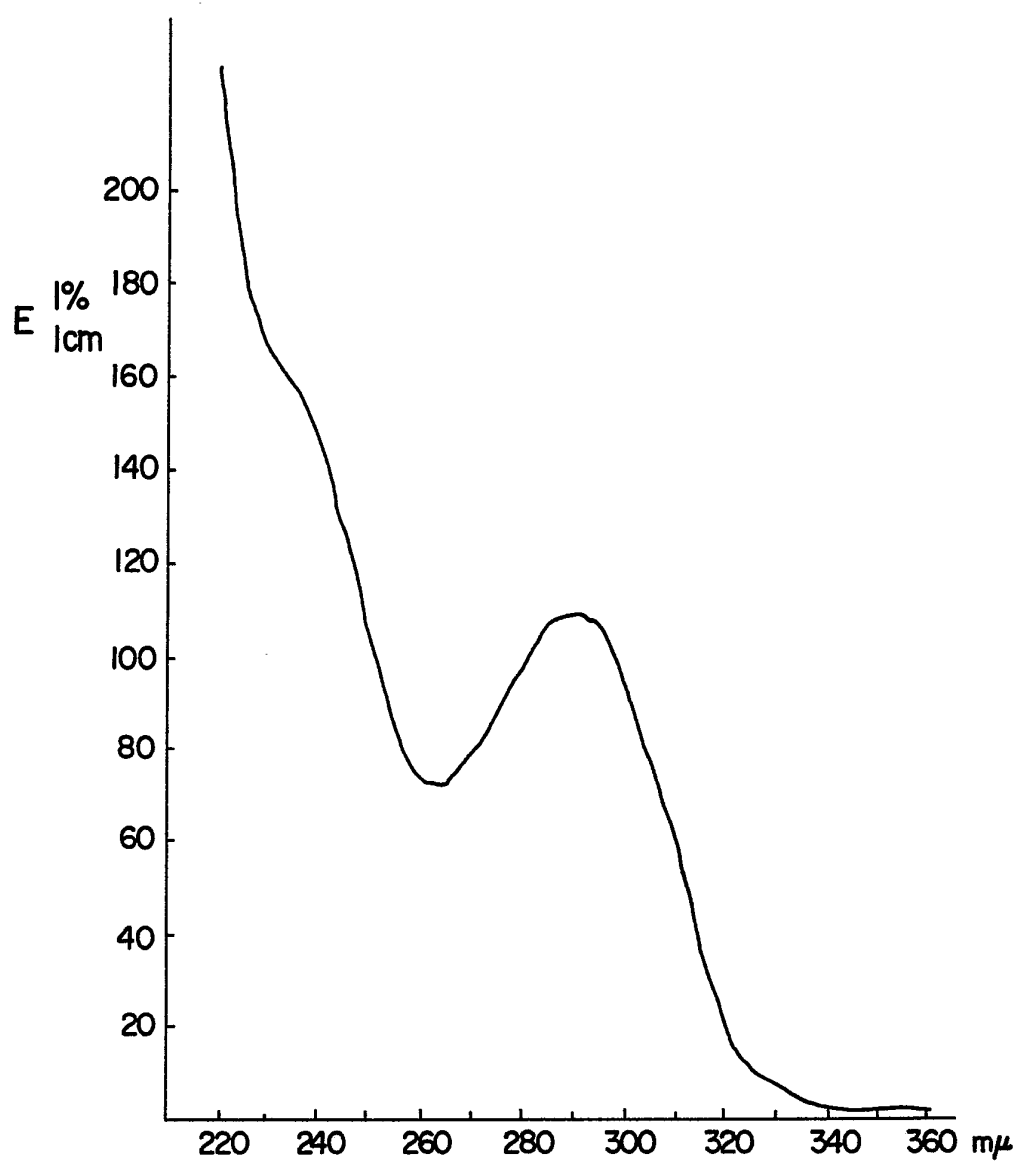


FIG.3

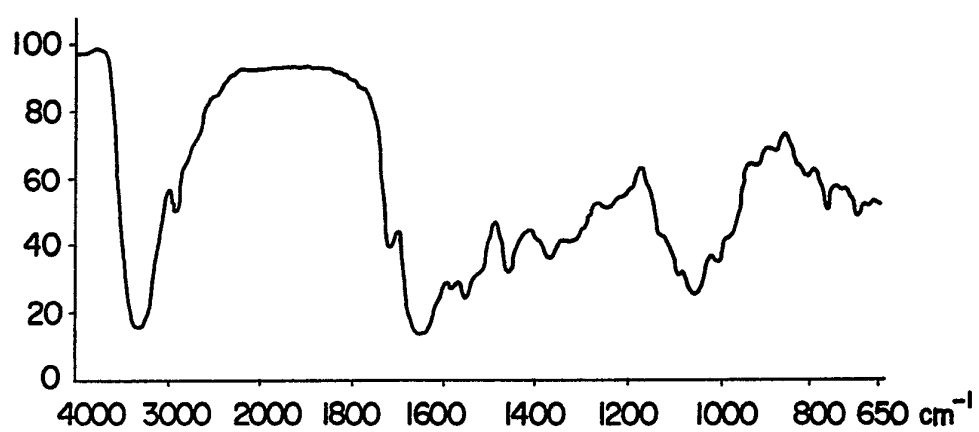


FIG.4

