

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

210673
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 19/58

(22) Přihlášeno 29 06 78
(21) (PV 4304-78)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 18 08 77
(98997/77) Japonsko
(40) Zveřejněno 29 05 81
(45) Vydáno 15 07 84

(72)
Autor vynálezu

KUNISHIMA MAMORU, TOKOROZAWA-SHI, YAMAZAKI TADAO, YONO-SHI, HAYASHI HIROYUKI, KITA-KU, TAKAHASHI ICHIRO, KWAGUCHI-SHI, NOZAKI MITSUO, SHINGAI YASUICHI, TOMITA KATSUHISA, KITA-KU, TAKADA KUNIO, BUNKYO-KU, UMEZAWA HAMAO, NERIMA-KU

(73)
Majitel patentu

(Japonsko)
NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA, CHIYODA-KU (Japonsko)

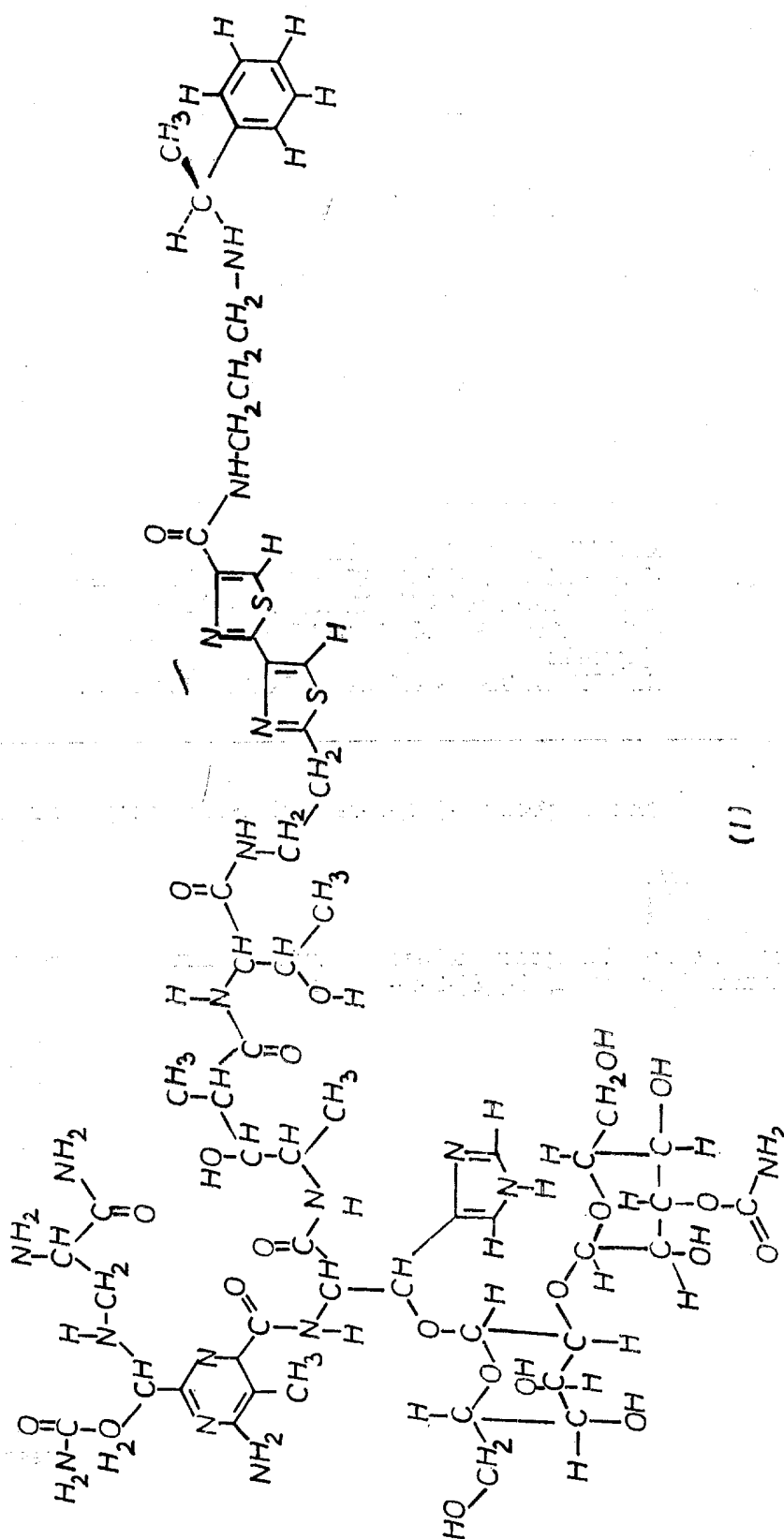
(54) Způsob výroby 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu

1

Vynález se týká způsobu výroby nového opticky aktivního bleomycinu, 3-[(S)-1'-fe-

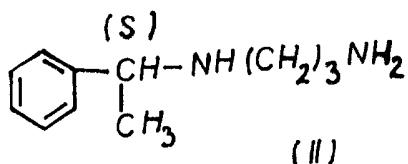
2

nylethylamino]propylaminobleomycinu vzor-
ce I



Podstata výroby 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu způsobem podle vynálezu spočívá v tom, že se kmen mikroorganismu *Streptomyces verticillus* FERM-P číslo 4108 (ATCC 31 307) nebo mutační kmen mikroorganismu *Streptomyces verticillus*

FERM-P číslo 4108 (ATCC 31 307) získaný ozářením ultrafialovými paprsky nebo/a paprsky X naočkuje do živného prostředí a kultivuje v přítomnosti N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu vzorce II



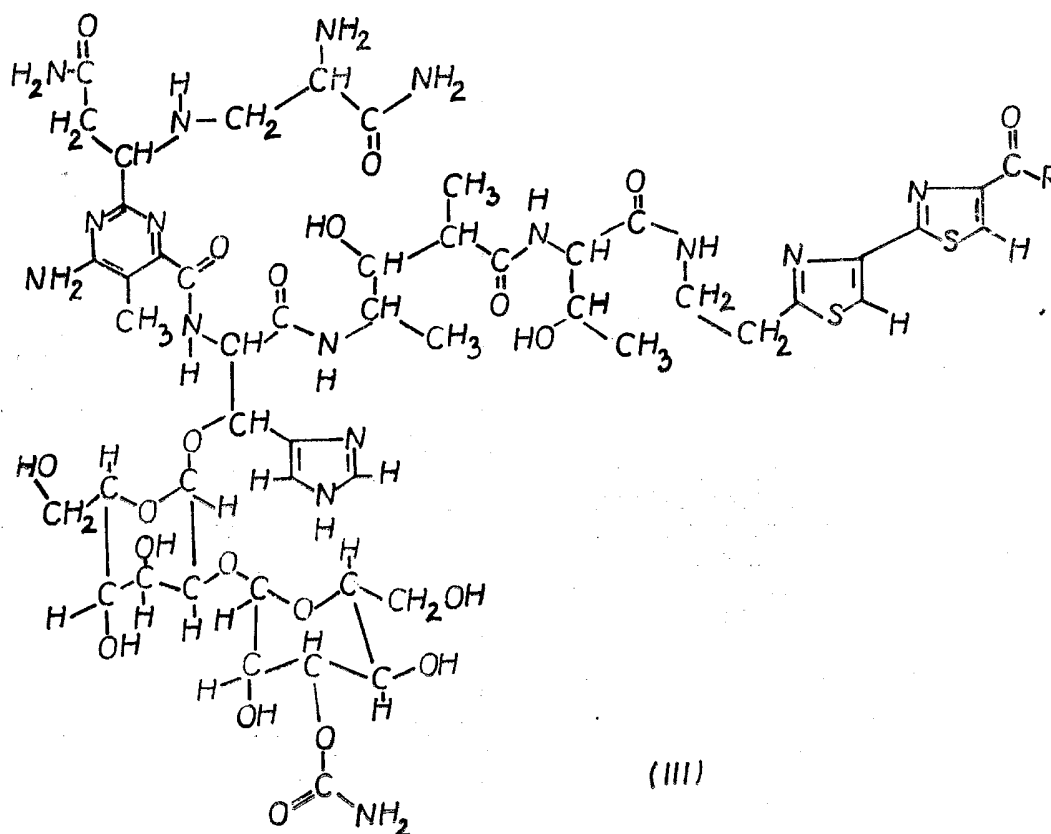
nebo jeho soli při teplotě 23 až 37 °C po dobu 5 až 10 dní za selektivního vzniku 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu, který se pak z kultivační kapaliny izoluje.

N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan nebo jeho sůl se přidává do kultivační kapaliny účelně v koncentraci 0.2 až 2 mg/m³ prostředí.

Jako soli N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu se s výhodou používá hydrochloridu, síranu nebo octanu.

Bleomycin je antineoplasticky účinné antibiotikum objevené Umezawou a spolupracovníky [Umezawa a sp.: Journal of Antibiotics, 19A, 200 (1966)]. Je to bazický, ve vodě rozpustný cukerný peptid, schopný vytvářet chelát s jedním atomem dvojjazné mědi. Lze ho získat kultivací kmene mikroorganismů produkujících bleomycin, příslušejícího k *Streptomyces verticillus*, v živném prostředí za provzdušňování a míchání a pak izolací produktu z kultivační kapaliny vhodnými způsoby, jako například za použití iontoměničových pryskyřic. Při běžném způsobu kultivace vzniká a bylo izolováno 16 různých druhů bleomycinu viz například Umezawa a spolupracovníci: Journal of Antibiotics, 19A, 210 (1966).

Je rovněž známo, že uvedené bleomyciny mají následující obecný vzorec III



ve kterém

R je u jednotlivých druhů bleomycinů různé.

V USA patentovém spisu č. 3 846 400 je rovněž popsáno, že pěstuje-li se kmen mikroorganismů produkujících bleomycin v živném prostředí obsahujícím aminosloučeninu, vestavuje se zmíněná aminosloučenina do molekuly bleomycinu ve formě postranního

řetězce představovaného substituentem R v obecném vzorci III a vzniká nový bleomycin, který se liší od kteréhokoliv známého bleomycinu a který nelze získat obvyklým kultivačním způsobem.

Příklady některých těchto nových bleomycinů jsou uvedeny níže:

Substituent R	Název bleomycinu
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{—N—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—S—CH}_3 \end{array}$	demethyl A ₂ 3-(methylmerkapt)propylaminobleomycin
$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \text{O} \\ \qquad \\ \text{—N—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—S—CH}_3 \end{array}$	A ₁
$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \text{CH}_3 \\ \qquad + \\ \text{—N—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—S} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$	A ₂
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{—N—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	A ₅
$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \text{NH} \\ \qquad \\ \text{—N—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—NH—C—NH}_2 \end{array}$	B ₂
—NH—(CH ₂) ₃ —NHCH ₃	3-(methylamino)propylaminobleomycin
—NH—(CH ₂) ₃ NHC ₄ H ₉	3-(butylamino)propylaminobleomycin
$\text{—NH—(CH}_2\text{)}_3\text{—N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	3-(pyrrolidino)propylaminobleomycin

Z uvedených bleomycinů se směsí mědi prostých bleomycinů A₁, A₂, A₅, B₂, demethyl-A₂ a některých dalších (v dalším popisu vynálezu je tato směs bleomycinů označována jako „bleomycinový komplex“) v současné době v širokém měřítku úspěšně používá v klinické praxi k léčení rakoviny, zvláště k léčení epidermálního karcinomu kůže, karcinomu kůže hlavy a krku, rakoviny krčku děložního, karcinomu plic, maligního lymfomu a podobných rakovinných onemocnění.

Z hlediska vedlejších účinků má však bleomycin některé nežádoucí vlastnosti, například, že vyvolává fibrosu plic. Fibrosa plic je nejnebezpečnějším vedlejším účinkem bleomycinu. Lze snadno odvodit, že kdyby se podařilo tento vedlejší účinek nějakým způsobem potlačit, dalo by se karcinostatické účinnosti bleomycinu v klinické praxi ještě lépe využít.

Z výše uvedených důvodů zabývali se autoři vynálezu několik let přípravou různých bleomycinů a v testech na zvířatech sledovali jejich karcinostatickou účinnost a toxicitu, hlavně jejich vliv na vyvolávání fibrosy plic. Výsledkem jejich studia bylo nalezení nového bleomycinu, jmenovitě 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu shora uvedeného vzorce I (v dalším popisu je tento nový bleomycin označován symbolem „NK 631“, který zahrnuje jak formu obsahující měď, tak formu prostou mědi), který lze

získávat kultivací kmene mikroorganismů produkujících bleomycin v přítomnosti N-[(S)-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu jako prekursoru, a který není v karcinostatickém účinku horší než v současné době dostupný bleomycinový komplex nebo kterýkoliv jiný známý bleomycin, u kterého je však výrazně potlačen vedlejší účinek způsobující fibrosu plic.

Shora uvedené je podstatou vynálezu. Účelem vynálezu je zajistit fermentativní způsob výroby nového bleomycinu NK 631. Bližší podrobnosti vynálezu vyplnou z následujícího popisu.

Jednou z nejvýznamnějších biochemických reakcí, ke které dochází při růstových procesech mikroorganismů, je isomerisace, při které se různé opticky aktivní látky často přeměňují na své antipody nebo na racemické sloučeniny. Nehledě na to, je rovněž zřejmá možnost, že u opticky aktivní aminosloučeniny může dojít k nebiochemické racemisasi během sterilizace půdy nebo během kultivace mikroorganismů. Četné výzkumy objasnily, že jedna opticky aktivní sloučenina se zřetelně liší od druhé ve schopnosti pronikání stěnou mikrobiální buňky nebo buněčnou membránou, a rovněž specifitou k substrátu a afinitou k enzymům, které se zúčastňují biochemických a metabolických pochodů.

Bylo přirozeně očekáváno, že při biosynté-

do jisté míry selektivním způsobem, a že nelze vyloučit možnost, že aminosloučenina ze bleomycinu se bude mikrob chovat při přijímání opticky aktivní aminosloučeniny nebo výsledný bleomycin podlehnou racemisaci.

Autoři vynálezu analyzovali níže popsaným způsobem složení bleomycinu, získaného kultivací kmene mikroorganismů produkujících bleomycin v živném prostředí obsahujícím N-[(R,S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan jako prekursor, a našli, že zbytek N-[1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu vestavěný do molekuly bleomycinu má vždy téměř konstantní poměr R/S rovný 4:1. I když není znám důvod, proč vznikající bleomycin není RS-formou, z výše uvedeného experimentálního faktu zřetelně vyplývá, že v biosyntetickém systému mikroorganismů kmene *Streptomyces verticillus* produkujících bleomycin dochází k zavádění opticky aktivní aminosloučeniny do molekuly bleomycinu se signifikantní selektivitou tak, že se vždy přednostně vestavuje R-forma před S-formou.

Z uvedeného důvodu bylo možné očekávat, že provede-li se kultivace v prostředí obsahujícím N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan jako prekursor, bude neobyčejně nesnadné zavést selektivně zmíněnou aminosloučeninu do molekuly bleomycinu a tak získat bleomycin NK 631 ve vysoké optické čistotě a ve vysokém výtěžku.

Přes výše uvedený experimentální fakt autoři vynálezu neočekávaně našli, že přidá-li se opticky čistý N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan do kultivačního systému, nepodléhá racemisaci a je překvapivě vestavován do molekuly bleomycinu v té-

měř stejném poměru R/S jako v případě, když se do kultivačního prostředí přidá aminosloučenina v čisté formě.

Ačkoliv v současné době nemůže být podáno jednoznačné vysvětlení uvedeného zjevu, je možno připustit hypotézu, že R forma aminosloučeniny působí kompetitivně nebo antagonisticky a výsledkem je, že zavádění S-formy aminosloučeniny je bržděno a tvorba R-formy bleomycinu probíhá přednostně. Tak byl nalezen způsob přípravy poskytující ve vysokém výtěžku nový bleomycin NK 631, který má velký význam pro léčení rakoviny. Uvedený objev je podstatou předloženého vynálezu. Vynález poprvé umožňuje s úspěchem fermentativně vyrábět opticky aktivní bleomycin.

N-[(S)-1'-Fenylethyl]-1,3-diaminopropan, používaný jako prekursor při způsobu podle vynálezu, je novou sloučeninou, která byla poprvé syntetizována autory tohoto vynálezu. Lze ho připravit následujícím způsobem:

K fenylethylaminu, ochlazenému předem na 0 °C, se přidá přibližně ekvivalentní množství akrylonitrilu a směs se pak zahřívá 10 až 24 hodin na 85 až 100 °C. Po skončení reakce se přebytečný akrylonitril oddestiluje za sníženého tlaku a zbývající surový produkt se předestiluje rovněž za sníženého tlaku. Získaný 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propionitril se zredukuje obvyklým způsobem, na příklad vodíkem v přítomnosti Raneyova niklu, a získá se žádaný N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan (v dalším popisu je pro tuto látku používán název „aminosloučenina“).

Fyzikálně-chemické vlastnosti zmíněné aminosloučeniny jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Fyzikálně-chemické vlastnosti

N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu

	Volná báze	Dihydrochlorid
1) Vzhled	bezbarvá kapalina (při teplotě místnosti)	bílé jehličkovité krystalky
2) Teplota tání	—	223,5 až 224 °C
3) Teplota varu	95 až 103 °C (při 0,27 kPa)	
4) Ultrafialové absorpční maximum (nm)	241, 247, 252, 257, 263, 267 (methanol)	250, 256, 259, 266 (destilovaná voda)
5) Molární extinkční koeficient ϵ (při 256 nm)	—	206 (v destilované vodě)
6) Specifická rotace $[\alpha]_D^{25}$	—	—20,6 ° (c=1, destilovaná voda)
α_D^{26}	—56,38 ° (neředěno, l=1)	—

7) Tenkovrstevná chromatografie (R_F) n-propanol — pyridin — — kyselina octová — voda (14 : 10 : 3 : 12, V/V) Avicell-SF (R)	0,73	0,73
8) Vysokovoltová elektroforesa (R_m) kyselina mravenčí — — kyselina octová — — voda (25 : 75 : 900, V/V) Avicell-SF (R) 800 V, 10 minut R_m alaninu položeno rovno 1,0	1,52	1,52
9) Infračervené absorpční spektrum (cm^{-1} , KBr tableta)	700, 760, 820, 910, 1025, 1080, 1130, 1200, 1305, 1350, 1370, 1450, 1495, 1605, 2850, 2940, 3300, 3375	690, 740, 820, 910, 980, 1020, 1065, 1075, 1150, 1205, 1385, 1460, 1500, 1515, 1590, 2500, 2850, 3000, 3500
10) Sumární vzorec (molekulová hmotnost)	$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2$ (178,28)	$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Cl}_2$ (251,20)

Při praktickém provádění způsobu podle vynálezu se ke kultivaci mikroorganismů s výhodou používá živného prostředí obsahujícího hlavně cukry a organické dusíkaté látky, jako například prosnou kaši, glukózu, škrob, sójovou moučku, kukuřičný výluh a podobné, a kromě toho obsahujícího malá množství anorganických látek, jako fosforečnanu draselného, síranu měďnatého, síranu zinečnatého, kuchyňské soli, dusičnanů a podobných (tento typ živné půdy je popsán například v USA patent. čís. 3 681 491 a 3 846 400).

N-[(S)-1'-Fenylethyl]-1,3-diaminopropan, používaný jako prekursor, lze k živné půdě přidat buď před zahájením kultivace, nebo po částech během kultivace, anebo ho přidávat kombinovaně oběma způsoby. Přidávaná aminosloučenina se obvykle napřed zneutralizuje kyselinou chlorovodíkovou a používá se ve formě hydrochloridu. Je však možné přidávat do živného prostředí volnou aminosloučeninu. V posléze uvedeném případě se upraví pH prostředí jako celku a pak se zahájí kultivace.

Koncentrace N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu v živném prostředí se pohybuje obvykle v rozmezí od 0,2 do 2 mg/ml, výhodně je 1 mg/ml. Po vysterilizování se živná půda naočkuje mikroorganismy produkujícími bleomycin, příslušejícími ke kměnu *Streptomyces verticillus*, například mikroorganismy kmene *Streptomyces verticillus* NK 68-144, uloženým v japonském výzkumném ústavu pro fermentaci (Fermen-

tation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Japonsko) pod označením FERM-P číslo 4108, a v americké sbírce typových kultur (Americal Type Culture Collection) pod označením ATCC 31307, nebo se naočkuje násadovou kulturou mikroorganismů produkujících bleomycin, patřících k dalším odrůdám kmene *Streptomyces verticillus*, a mikroorganismy se pak kultivují při 23 až 37 °C, za provzdušňování a míchání, obvykle po dobu 5 až 10 dnů.

Kultivace se skončí, když se dosáhne maxima antimikrobiální mohutnosti v živném prostředí (sledováno biologickým testem za použití *Mycobacteria* 607 jako testovaného mikroorganismu). Po skončení kultivace se kultivační kapalina zfiltruje a filtrát se nechá protékat přes sloupec anexové pryskyřice nesoucí vhodné reaktivní skupiny, jako karboxylové skupiny. Žádaný produkt se při tom naadsorbuje na pryskyřici a pak se eluuje vodnou kyselinou chlorovodíkovou.

Eluát se zneutralizuje, rozpuštěný surový bleomycin se naadsorbuje na aktivní uhlí, produkt se eluuje směsí acetonu s kyselinou chlorovodíkovou, eluát se zahustí a pak lyofilizuje. Surový produkt se vyjme do methanolu, roztok se chromatografuje na kysličníku hlinitém za použití methanolu jako elučního činidla, eluát se zahustí a lyofilizuje. Získaný produkt se chromatografuje na sloupci Sephadexu (R) G-25 (obchodní značka pro gelový filtrační materiál, složený z

mikroskopických kuliček zesíťovaného dextranu, vyráběný a prodáváný firmou Pharmacia Fine Chemicals Inc., Švédsko), a pak se znovu chromatografuje na sloupci CM Sephadexu® C-25 (obchodní značka pro katexový typ Sephadexu, který se skládá z mikroskopických kuliček karboxymethylovaného polysacharidu dextranu, a který vyrábí a prodává firma Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Švédsko), za použití vodného roztoku chloridu amonného jako elučního činidla. Získá se eluát obsahující žádaný bleomycin NK 631 ve formě obsahující měď. Podíl obsahující zmíněný bleomycin se nalije na sloupec iontoměničové pryskyřice

značky Diaion® HP 40, sloupec s naadsorbovaným produktem se promyje postupně vodným roztokem dvojsodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (v dalším popisu je pro tuto sůl používána zkratka „EDTA. Na“), vodným roztokem síranu sodného a vodou, a posléze se produkt eluuje směsí acetonu s vodou. Eluát se zahustí a lyofilizuje; získá se monosulfát bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) ve formě světle žlutobílé zbarveného amorfního prášku.

Monosulfát bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) získaný způsobem podle vynálezu se za účelem indikace a stanovení optické čistoty hydrolyzuje silnou kyselinou, hydrolyzát se rozdělí vysokovoltovou papírovou elektroforézou a dvojrozměrnou papírovou chromatografií a látky se detegují ninhydrinem; tím se prokáže přítomnost N-(1'-fenylethyl)-1,3-diaminopropanu.

Hydrolyzou uvolněný amin se izoluje a přečistí, změří se jeho specifická rotace a absorbance v ultrafialovém světle, a z naměřených hodnot se zjistí optická čistota bleomycinu NK 631. Konkrétně se při stanovení optické čistoty postupuje následujícím způsobem:

Asi 50 mg monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) se zahřívá s 6 N kyselinou chlorovodíkovou 16 hodin k varu pod zpětným chladičem (na teplotu 110 až 115 stupňů Celsia). Hydrolyzou vzniklý N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan se ze směsi rozkladných produktů izoluje, přečistí a pak se stanoví jeho optická rotace (při $\lambda = 365$ nm) při teplotě 25 °C, za použití polarimetru značky Perkin-Elmer 141. Poté se stanoví jeho absorbance při $\lambda = 256$ nm a registruje se celá křivka v ultrafialové oblasti. Křivka v oblasti 280 až 310 nm se

extrapoluje na $\lambda = 256$ nm, a tato hodnota se použije jako základní čára při 256 nm.

Hodnotu x optické čistoty lze vyjádřit následujícími rovnicemi:

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

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

ve kterých

S = levotočivá optická rotace,

R = pravotočivá optická rotace,

α = pozorovaná optická rotace a

OD = pozorovaná absorbance.

Monosulfát bleomycinu NK (forma prostá mědi) připravený způsobem podle vynálezu poskytne po kyselé hydrolyze N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan, u něhož se v typickém případě nalezne specifická rotace $[\alpha]_{365}^{25} = -64,18^\circ$ ($c = 0,38$, voda). Optická čistota tohoto monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi), vypočtená podle shora uvedených rovnic, je 98,5 %.

V tabulce 2 a 3 jsou uvedeny základní fyzikální a chemické vlastnosti bleomycinu NK 631.

Struktura bleomycinu NK 631 znázorněná vzorcem I byla potvrzena tím způsobem, že monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi) byl rozpuštěn v těžké vodě a změřeno jeho ^{13}C -NMR spektrum metodou potlačení protonového šumu, za použití dioxanu jako vnitřního standardu.

Byly zaznamenány následující signály:

19,4, 26,3, 37,0, 43,5, 58,9, 128,3 (dva signály), 130,0 (dva), 130,2 a 136,3 ppm,

které lze přisoudit jedenácti ^{13}C atomům přítomným ve zbytku aminosloučeniny v postranním řetězci molekuly bleomycinu NK 631, jmenovitě 3-[(3)-1'-fenylethylamino]-propylaminovém zbytku. Všechny ostatní pozorované signály uhlíkových atomů odpovídaly charakteristickým signálům zbývajících bleomycinových molekul, tak jak jsou popsány v literatuře [viz Naganawa a spolupracovníci: Journal of Antibiotics, svazek 30, str. 388 (1977)].

Tabulka 2

Fyzikální a chemické vlastnosti bleomycinu

NK 631 (formy obsahující měď)

	Dihydrochlorid	Monosulfát
1. Vzhled	modře zbarvený amorfní prášek	modře zbarvený amorfní prášek
2. Rozpustnost	rozpustný ve vodě, methanolu, kyselině octové, dimethylsulfoxidu a dimethylformamidu; málo rozpustný v dioxanu; nerozpustný v ethanolu, acetonu, etheru a benzenu,	stejná jako u dihydrochloridu
3. Teplota tání (rozkladu) °C	205 až 207	205 až 207
4. Specifická rotace [α] ₄₃₆ ²⁵ (destilovaná voda, c=1,0)	— 95,6°	— 93,7°
5. Tenkovrstevná chromatografie (R _F) (viz poznámku 1)	a) 0,72 b) 0,75	a) 0,72 b) 0,75
6. Elektroforéza (R _m) (R _m alaninu položeno rovno 1,0; (viz poznámku 2)	0,80	0,80

Poznámka 1:

a) na adsorbentu značky Silica gel G [®]
(obchodní značka pro silikagel určený pro tenkovrstevnou chromatografii, vyráběný firmou Merck Inc., USA), v soustavě methanol — 10% octan amonný — 10% vodný amoniak (10 : 9 : 1, V/V).

b) na adsorbentu značky Avicel SF [®]
(obchodní značka pro adsorbent určený pro tenkovrstevnou chromatografii, tvořený krys-

talnickou celulórou, vyráběný firmou FMC Corporation, USA), v soustavě n-propanol — pyridin — kyselina octová — voda (15 : 10 : 3 : 12).

Poznámka 2:

na adsorbentu značky Avicel SF [®]
v soustavě kyselina mravenčí — kyselina octová — voda (25 : 75 : 900, V/V), 800 V, 15 minut.

Tabulka 3

Fyzikální a chemické vlastnosti bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi)

	Dihydrochlorid	Monosulfát	Diacetát
1. Vzhled	světle žlutobíle zbarvený amorfní prášek	světle žlutobíle zbarvený amorfní prášek	světle žlutobíle zbarvený amorfní prášek
2. Rozpustnost	rozpustný ve vodě methanolu, kyselině octové, dimethylsulfoxidu a dimethylformamidu; málo rozpustný v dioxanu; neroz- pustný v ethanolu, acetonu, etheru a benzenu	stejná jako u dihydrochloridu (viz vlevo)	stejná jako u dihydrochloridu (viz vlevo)
3. Teplota tání (rozkladu) °C	195 až 197	196 až 198	188 až 190
4. Specifická rotace $[\alpha]_{436}^{25}$ (destilovaná voda, c = 1,0)	— 2,1°	— 2,0°	— 2,0°
5. Tenkovrstevná chromatograf (R_F) (viz poznámku 1)	a) 0,56 b) 0,70	a) 0,56 b) 0,70	a) 0,56 b) 0,70
6. Elektroforéza (R_m) (R_m alaninu položeno rovno 1,0; viz poznámku 2)	0,94	0,94	0,94

Poznámka 1:

1: a) na adsorbentu značky Silica gel G (R) v soustavě methanol — 10 % octan amonný — 10 % vodný amoniak (10 : 9 : 1, V/V)

b) na adsorbentu značky Avicel SF (R) v soustavě n-propanol — pyridin — kyselina octová — voda (15 : 10 : 3 : 12)

Poznámka 2:

na adsorbentu značky Avicel SF (R) v soustavě kyselina mravenčí — kyselina octová — voda (25 : 75 : 900, V/V), 800 V, 15 minut.

V příloze jsou na obr. 1 a 2 znázorněny ultrafialové absorpční křivky, a na obr. 3 a 4 infračervené absorpční křivky bleomycinu NK 631 vzorce 1. Obr. 1 znázorňuje ultrafialovou absorpční křivku dihydrochloridu 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu vzorce I (formy obsahující měď), obr. 2 znázorňuje ultrafialovou absorpční křivku odpovídajícího monosulfátu (formy prosté mědi); obr. 3 znázorňuje infračervenou absorpční křivku dihydrochloridu 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu (formy obsahující měď), měřenou v tabletě bromidu draselného, a obr. 4 znázorňuje infračervenou absorpční křivku odpovídajícího monosulfátu (formy prosté mědi), měřenou stejným způsobem.

Vynikající biologická účinnost bleomycinu NK 631 podle vynálezu vyplývá z níže uvedených výsledků experimentálního hodnocení.

Biologická účinnost bleomycinu NK 631 byla srovnávána s účinností komerčního bleomycinového komplexu a s účinností monosulfátu 3-[(R,S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu (formy prosté mědi) (v dalším je pro tuto látku používáno označení „RS-forma“) v následujících čtyřech testech:

- 1) účinek na vyvolávání fibrosy plic
- 2) antineoplastická účinnost
- 3) antimikrobiální účinnost
- 4) toxicita

Ke srovnání použita RS forma antibiotika byla získána fermentačním způsobem popsaným v USA patentu č. 3 846 400.

1. Toxicita vůči plicím u myši (vyvolání fibrosy)

K testování byly použity dvanáctičetné skupiny myších samců kmene ICR ve stáří 15 týdnů. Testované látky byly podávány v konstantní dávce 5 mg/kg ve formě intraperitoneálních injekcí jednou denně po dobu 10 po sobě následujících dnů. Po skončení aplikace látek byly myši chovány a pozorovány 5 týdnů. Pak byla zvířata usmrcena a pitevou zjištěn rozsah fibrosy plic.

Výskyt a stupeň vyvolané fibrosy plic u skupiny myši, které byl podáván monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi) byl porovnán s výskytem a stupněm fibrosy plic u skupin myši, kterým byla podávána RS forma antibiotika a bleomycinový komplex. Nalezené výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4

	Počet myši s fibrosou plic (%)	Výskyt Relativní hodnota	Stupeň onemocnění	
			Celkové zhodnocení stupně fibrosy plic: celkový počet vzorků (viz poznámka)	Relativní hodnota
monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi)	4/12 (0,33)	0,36	6/36 (0,17)	0,25
RS forma	7/12 (0,58)	0,63	12/36 (0,33)	0,49
bleomycinový komplex	11/12 (0,92)	1,0	24/36 (0,67)	1,0

Poznámka:

Stupnice používaná k hodnocení stupně fibrosy plic:

0 bod — žádná fibrosa

1 bod — hromadění exudátu v plicích

sklípících a fibrose podobné změny v alveolárních přepážkách

2 body — fibrosa na několika místech

4 body — roztroušená fibrosa

6 bodů — fibrosa na více než dvou třetinách celé plochy

Jak vyplývá z tabulky 4, monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi) snižuje ve srovnání s RS formou antibiotika výskyt a rozsah fibrosy plic asi na polovinu, a ve srovnání s bleomycinovým komplexem výskyt fibrosy asi na polovinu a její rozsah na čtvrtinu. Nalezené výsledky zřetelně prokazují výhodnost monosulfátu bleomycinu NK 631 pro klinické použití.

2. Antineoplastická účinnost

2—1. Účinek in vitro na kultury HeLa S₃ buněk

Pro každý shora uvedený bleomycin byla stanovena hodnota ID₅₀ inhibice množení HeLa S₃ buněk po 72 hodinách kultivace v přítomnosti testovaného bleomycinu. Pro bleomycinový komplex byla nalezena ID₅₀ = 1,70 µg/ml a pro bleomycin NK 631 ID₅₀ = 0,82 µg/ml. Z uvedených hodnot vyplývá, že bleomycin NK 631 inhibuje množení HeLa S₃ buněk dvakrát silněji než bleomycinový komplex. Pro RS formu antibiotika bylo na-

lezeno LD₅₀ = 0,80 µg/ml, z čehož vyplývá, že inhibiční činek tohoto bleomycinu je srovnatelný s inhibičním účinkem monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi).

2—2. Karcinostatický účinek na myších Ehrlichův karcinom (solidní nádor)

Myším samcům kmene ICR, starým 6 týdnů, bylo transplantováno podkožně do tříselné oblasti po 2×10^6 buněk. Po 24 hodinách po transplantaci byl každé myši aplikován testovaný preparát stejným způsobem jak bylo popsáno výše v testu 1. Patnáctý den po subkutánní transplantaci byly myším nádory vyjmuty a zváženy, a hmotnosti srovnány s hmotnostmi tumorů, které se vyvinuly u kontrolní skupiny myší, které nebyly ošetřeny, a bylo zjištěno procento inhibice.

Jak vyplývá z tabulky 5, je karcinostatická účinnost monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) srovnatelná s účinností RS formy antibiotika a asi 1,4 krát vyšší než účinnost bleomycinového komplexu.

Tabulka 5

Dávka (mg/kg × 10)	Monosulfát NK 631 (forma prostá mědi)	Stupeň inhibice (v %) RS-forma antibiotika	Bleomycinový komplex
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/den)	0,35	0,31	0,49

2—3. Karcinostatická účinnost vůči ascitickému hepatomu u krys (ascitický typ)

Krysám kmene Donryu bylo do břišní dutiny transplantováno po 1×10^6 AH 66 buněk. Za 24 hodin po transplantaci byl intra-peritoneálně aplikován testovaný preparát a

v jeho podávání bylo pokračováno jednou denně po dobu deseti po sobě následujících dnů. Během 30 dnů po transplantaci byla sledována tělesná hmotnost krys a počet přežívajících zvířat. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6

Relativní hodnoty průměrného přežití (počet dnů)

Dávka (mg/kg × 10)	Monosulfát NK 631 (forma prostá mědi)	RS-forma antibiotika	Bleomycinový komplex
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

Jak vyplývá z tabulky 6, je účinnost monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) vůči AH 66 ascitickému hepatomu srovnatelná s účinností RS formy antibiotika a je ve všech dávkách vyšší než účinnost bleomycinového komplexu.

2—4. Antikarcinogenní účinek vůči epidermálnímu karcinomu kůže vyvolanému 20-methylcholanthrenem u myši

Roztok 20-methylcholanthrenu (v dalším je tato látka označována jako 20-Mc) v acetonu byl dvakrát týdně, po dobu 18 týdnů, lokálně aplikován na oholený hřbet samců

myši kmene ddy, starých 10 týdnů. Za šest týdnů od začátku aplikace 20-MC byl intraperitoneálně aplikován testovaný preparát v dávce 62,5 μ g/myš a v jeho podávání bylo pokračováno dvakrát týdně po dobu 15 týdnů. Za jeden týden po skončení podávání testovaného preparátu byla patologicky vyšetřena oblast kůže, na kterou byl aplikován 20-MC a sledován výskyt karcinogenesy.

Jak vyplývá z tabulky 7, inhibují monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi) a RS forma antibiotika o něco málo intenzivněji karcinogenesu vyvolanou 20-MC, než bleomycinový komplex.

Tabulka 7

	Úmrtnost	Stupeň karcinogenese (v %)	Stupeň inhibice (v %)
Monosulfát NK 631 (forma prostá mědi)	1/12	5/11 (45,4)	47,8
RS forma	1/12	5/11 (45,4)	47,8
bleomycinový komplex	2/12	5/10 (50,0)	42,5
kontrola	1/24	20/23 (86,9)	0

Ze všech shora uvedených testů vyplývá, že monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi) má ve srovnání s komerčně dostupným bleomycinovým komplexem zřetelně vyšší antineoplastickou účinnost.

nismům *Mycobacterium* 607 a *Bacillus subtilis* PCI byla zjišťována diskovou metodou za použití bleomycinu A₂ jako standardu (účinnost 1000 j/mg). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

3. Antimikrobiální účinnost

Antimikrobiální účinnost vůči mikroorga-

Tabulka 8

	<i>Mycobacterium</i> 607	<i>Bacillus subtilis</i> PCI
Monosulfát NK 631 (forma prostá mědi)	7848	1550
RS forma antibiotika	7535	1400
Bleomycinový komplex	1234	886

Jak vyplývá z tabulky 8, vykazují monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi) a RS forma antibiotika mnohem vyšší antimikrobiální účinnost než bleomycinový komplex.

Jak vyplývá z tabulky 9, jsou hodnoty LD₅₀ u krysy nalezené pro monosulfát bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) přibližně stejné jako hodnoty nalezené u bleomycinového komplexu a RS formy antibiotika.

4. Toxicita

4—1. Akutní toxicita u krysy (LD₅₀) při intraperitoneálním podávání

Tabulka 9

		LD ₅₀ (mg/kg)	Meze spolehlivosti (5% hladina významnosti)
krysa	Monosulfát NK 631 (forma prostá mědi)	155,0	133,6 až 179,8
	RS forma antibiotika	150,6	129,0 až 170,6
	bleomycinový komplex	168,0	130,0 až 217,0

4-2. Subakutní a chronická toxicita u krys a psů

Subakutní a chronická toxicita monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) u krys a psů je srovnatelná s analogickými toxicitami bleomycinového komplexu. Je však třeba rovněž poznamenat, že monosulfát bleomycinu NK 631 (forma prostá mědi) nevyvolává u psů nekrosu v místě vpichu, zatím co bleomycinový komplex způsobuje nekrosu v místě vpichu u všech psů ve skupině, které byla podávána vysoká dávka látky (1,2 mg/kg, 90 krát), i když zmíněná výška dávky byla u obou druhů bleomycinu stejná. Bleomycin NK 631 vykazuje rovněž nižší toxicitu vůči plicím než bleomycinový komplex.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že toxicita monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) jest srovnatelná s toxicitou bleomycinového komplexu, s výjimkou toxicity vůči plicím a vyvolávání nekrosy, které jsou u bleomycinu NK 631 podstatně nižší.

5. Souhrn

Ze shora uvedených výsledků testů lze učinit závěr, že bleomycin NK 631 jest nová sloučenina, která má následující přednosti:

- extrémně nízkou toxicitu vůči plicím,
- antimikrobiální a antineoplastickou účinnost vyšší než komerčně dostupný bleomycinový komplex,
- obecnou toxicitu srovnatelnou s toxicitou komerčně dostupného bleomycinového komplexu a
- nižší lokální toxicitu v místě vpichu injekce než komerčně dostupný bleomycinový komplex.

Z uvedených důvodů lze očekávat, že nový bleomycin NK 631 bude výhodný při klinickém použití.

Způsob podle vynálezu je podrobněji objasněn v následujících příkladech provedení, které však rozsah vynálezu žádným způsobem neomezuje.

Příklady provedení

Příklad 1

Jeden litr živné půdy (pH 7,0) obsahující 2 % glukózy, 0,75 % peptonu, 0,75 % masového extraktu a 0,3 % chloridu sodného, se vnese do pětilitrové Erlenmeyerovy baňky, půda se vysterilizuje, naočkuje mikroorganismy druhu *Streptomyces verticillus* NK-68-144 (FERM-P číslo 4108, ATCC číslo 31387) a mikroorganismy se kultivují při 28 °C po dobu 48 hodin za míchání a třepání; získá se nasadní kultivační kapalina.

Současně se k živné půdě, obsahující 7,17 procenta prosné kaše, 0,5 % glukózy, 3,5 % sójové moučky, 0,75 % kukuřičného výluhu, 0,3 % chloridu sodného, 0,1 % hydrogenufosforečnanu draselného, 0,05 % síranu zinečnatého, 0,01 % síranu měďnatého, 0,2 % dusičnanu sodného a 0,03 % povrchově aktivní látky značky Pronal ST-1 [®] (neionogenní povrchově aktivní činidlo a odpěňovadlo, vyráběné firmou Toho Kakagu) přidá hydrochlorid N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-di-

aminopropanu v množství 1 mg/ml půdy a pH směsi se upraví na 6,5.

Dvacet litrů uvedené živné půdy se vnese do fermentačního kotlíku o objemu 39 litrů a vysterilizuje se. Živná půda se naočkuje shora uvedeným způsobem připravenou nasadní kultivační kapalinou v množství 10 %. Kultivace se provádí za provzdušňování a míchání rychlostí 400 otáček za minutu po dobu 7 dnů při 28 °C. Po dokončení fermentace se kultivační kapalina, po přidání 5 % infusoriové hlinky, zfiltruje filtrem značky

(obchodní název pro křemelici [®] Daikalite nový filtrační prostředek vyráběný a prodáván firmou Toa Kasei Co., Japonsko) a získá se 10 litrů filtrátu o antimikrobiální mohutnosti 326 j/ml (3,26 g-mohutnosti).

Filtrát se spojí s promývací vodou a roztok se nechá protéci sloupцем připraveným z 630 ml Amberlitu [®] IRC-50 (H-forma), přičemž se žádaný produkt na sloupci na-

adsorbuje. Sloupec se promyje vodou a produkt se eluuje 80 litry 0,5 N kyseliny chlorovodíkové. Eluát se zneutralizuje, nerozpustný podíl se odfiltruje a filtrát se nechá protéci sloupцем připraveným z 50 ml aktivního uhlí. Sloupec se promyje vodou a produkt se eluuje 750 ml směsí 0,02 N kyseliny chlorovodíkové s acetone (1:1). Elu-

át se zneutralizuje Dowexem $\textcircled{R}$ obchodní název anexové pryskyřice složené z kopolymeru epichlorhydrinu s amoniakem, vyráběné a prodávané firmou Dow Chemical Co., USA), kapalina se zahustí a zahuštěný roztok se lyofilizuje. Získaný produkt se rozpustí v trojnásobku vody, roztok se přikape do 9 objemů methanolu a vyloučené nerozpustné podíly se odfiltrují. Methanolický roztok se nechá protéci sloupцем připraveným z 25 ml kysličníku hlinitého a produkt se eluuje 90% methanolem. Eluát se zneutralizuje, zahustí a pak lyofilizuje. Odparek se rozpustí v 10 ml vody, produkt se naadsorbuje na sloupci připraveném ze 100 ml

G-25 a pak se eluuje vodou; $\textcircled{R}$ Sephadexu jímají se modře zbarvené frakce.

Modře zbarvené frakce se spojí, roztok se nechá protéci sloupцем připraveným ze 100 mililitrů CM-Sephadexu $\textcircled{R}$ C-25 a produkt se eluuje vodným roztokem chloridu amonho, jehož koncentrace stoupá od 0,05 do 1 M. Ke spojeným frakcím obsahujícím bleomycin NK 631 se přidá 1 g EDTA-Na. pH roztoku se upraví 12 N kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 0,5 a pak se roztok zneutralizuje 5 N roztokem hydroxidu sodného. Produkt se naadsorbuje na sloupci připra-

veném z 50 ml Diáionu $\textcircled{R}$ HP-40 (obchodní název pro absorpční pryskyřici tvořenou styren — divinylbenzenovým kopolymerem, vyráběnou a prodávanou firmou Mitsubishi Chemical Co., Japonsko).

Sloupec se promyje 5% roztokem EDTA-Na (dvojnásobkem objemu sloupce), pak 5% vodným roztokem síranu sodného (1,5 násobkem objemu slouce), vodou a produkt se eluuje 50% vodným acetone (trojnásobkem objemu sloupce), Eluát se zahustí a zahuštěný roztok se lyofilizuje. Získá se 100 mg konečného produktu, monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) o mohutnosti 8,30 mg. Výtěžek tohoto produktu je 25,4 %, počítáno na obsah ve zfiltrované kultivační kapalině. Analýzou za použití metody s CM-Sephadexem $\textcircled{R}$ byl nalezen obsah 98,7 % bleomycinu NK 631. Jeho optická čistota byla 98,5 %, stanoveno metodou uvedenou v popisu vynálezu.

Získaný produkt má následující spektrální a antimikrobiální charakteristiky:

Ultrafialové absorpční spektrum:

$$\text{maximum při } 290 \text{ nm, } E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 106 \text{ v } 0,1$$

N kyselině chlorovodíkové

Antimikrobiální mohutnost: 8077 j/mg.

Příklad 2

Do fermentačního tanku o objemu 200 litrů se vnese 120 litrů živné půdy mající stejné složení jako půda popsáná v příkladu 1, k roztoku se přidá 120 g N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu, pH se upraví na hodnotu 6,5 a směs se vysterilizuje. Poté se živné prostředí naočkuje, v množství 10 %, nasadní kultivační kapalinou mikroorganismů druhu *Streptomyces verticillus* NK 68-144 (FERM-P číslo 4108, ATCC 31307) připravenou stejným postupem a za stejných podmínek jak bylo popsáno v příkladu 1. Mikroorganismy se kultivují za provzdušňování a za míchání rychlostí 350 otáček za minutu po dobu 7 dnů při 28 °C.

Po skončení kultivace se filtrát (107 litrů, antimikrobiální mohutnost 671 j/ml, 72 g-mohutnosti) zpracuje stejným způsobem jako v příkladu 1. Po extrakci a uvedeném způsobu čištění se získá 4,7 g monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) (38,9 g-mohutnosti). Výtěžek je 47 %, počítáno na obsah bleomycinu ve zfiltrované fermentační kapalině. Analýzou za použití metody s CM-Sephadexem $\textcircled{R}$ bylo nalezeno, že získaný produkt obsahuje 99,6 % bleomycinu NK 631. Získaný bleomycin NK 631 má optickou čistotu 99,1 %, stanoveno shora popsanou metodou.

Produkt má následující spektrální a antimikrobiální charakteristiky:

$$\text{Ultrafialové absorpční maximum při } 290 \text{ nm, } E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 107, \text{ v } 0,1 \text{ N kyselině chlorovodíkové.}$$

Antimikrobiální mohutnost: 8027 j/mg.

Příklad 3

Syntéza N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu

K 50 g (S)-1-fenylethylaminu, ochlazeném na 0 °C, se zamíchání přidá 33 g akrylonitrilu. Na baňku s reakční směsí se nasadí zpětný chladič opatřený chlorkalciovým uzávěrem a směs se za míchání zahřívá 18 hodin na 93 °C.

Po skončení reakce se přebytek akrylonitrilu oddestiluje za sníženého tlaku a zbývající surový produkt se podrobí frakcionované destilaci rovněž za sníženého tlaku;

jímá se frakce vroucí při 142 až 145 °C při 0,933 kPa. Získá se 53,5 g 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propionitrilu.

Získaný nitril se vnese do hydrogenačního autoklávu, přidá se 5 g Raneyova niklu W-7 a 50 ml ethanolu obsahujícího 15 % amoniaku a směs se hydrogenuje, za míchání rychlostí 1000 otáček za minutu, při teplotě 50 až 58 °C, vodíkem pod parciálním tlakem 10 až 4 MPa po dobu 1,5 hodiny. Po skončení hydrogenace se kapalná reakční směs předestiluje za sníženého tlaku a jímá se frakce vroucí při 95 až 103 °C při 0,266 kPa. Získá se 48,3 g N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu [výtěžek 66 % teorie, počítáno na výchozí (S)-1-fenylethylamin].

Příklad 4

Do živné půdy obsahující stejné složky jaké byly použity v příkladu 1 se přidá hydrochlorid N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu v množství 0,2 mg/ml půdy a pH půdy se upraví na 6,5. Dvacet litrů kultivace se vnese do kultivační nádoby o objemu 30 litrů a vysterilizuje se, načež se naočkuje v množství 10% násadní kultivační kapalinou *Streptomyces verticillus* NK 71-125 (který je mutačním kmenem získaným ze *Streptomyces verticillus* FERM-P číslo 4108, ATCC 31 307 ozářením ultrafialovými paprsky), připravenou za stejných podmínek jako v příkladu 1. Kultivace se provádí po dobu 5 dnů při 37 °C za současného provzdušňování a míchání rychlostí 350 otáček za minutu. Po ukončení kultivace je antimikrobiální mohutnost NK 631 v kultivační půdě 376 j/ml.

Příklad 5

Do živné půdy obsahující stejné složky ja-

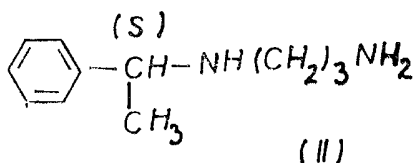
ké byly použity v příkladu 1 se přidá hydrochlorid N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu v množství 2 mg/ml půdy a pH půdy se upraví na 6,5. Dvacet litrů kultivace se vnese do kultivační nádoby o obsahu 30 litrů a vysterilizuje se, načež se naočkuje v množství 10 % násadní kultivační kapalinou *Streptomyces verticillus* NK 71-054 (což je mutační kmen získaný z mikroorganismu *Streptomyces verticillus* FERM-P číslo 4108, ATCC 31 307 dvojnásobným ozářením ultrafialovými paprsky a jedním ozářením X-paprsky) připravenou ze stejných podmínek jako v příkladu 1. Kultivace se provádí za současného provzdušňování a míchání rychlostí 400 otáček za minutu při teplotě 23 °C. Po ukončení kultivace je antimikrobiální mohutnost NK 631 v kultivačním prostředí 571 j/mg.

Příklad 6

Do živné půdy obsahující stejné složky jaké byly použity v příkladu 1, se přidá hydrochlorid N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu v množství 0,5 mg/ml a pH půdy se upraví na hodnotu 6,5. Dvacet litrů kultivace se vnese do kultivační nádoby o objemu 30 litrů a vysterilizuje se, načež se naočkuje v množství 10% násadní kapalinou *Streptomyces verticillus* NK 71-058 (což je mutační kmen získaný z mikroorganismu *Streptomyces verticillus* FERM-P číslo 4108, ATCC 31 307 dvojnásobným ozářením ultrafialovými paprsky a dvojnásobným ozářením paprsky X) připravenou za stejných podmínek jako v příkladu 1. Kultivace se provádí 7 dnů při teplotě 30 °C a za současného míchání rychlostí 400 otáček za minutu. Po ukončení kultivace je antimikrobiální mohutnost NK 631 v kultivačním prostředí 820 j/ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby 3-[(S)-1'-fenylethyl]propylaminobleomycinu, vyznačující se tím, že se kmen mikroorganismu *Streptomyces verticillus* FERM-P číslo 4108 (ATCC 31 307) nebo mutační kmen, získaný z mikroorganismu *Streptomyces verticillus* FERM-P číslo 4108 (ATCC 31 307) ozářením ultrafialovými paprsky a/nebo X paprsky naočkuje do živného prostředí a kultivuje v přítomnosti N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu vzorce II



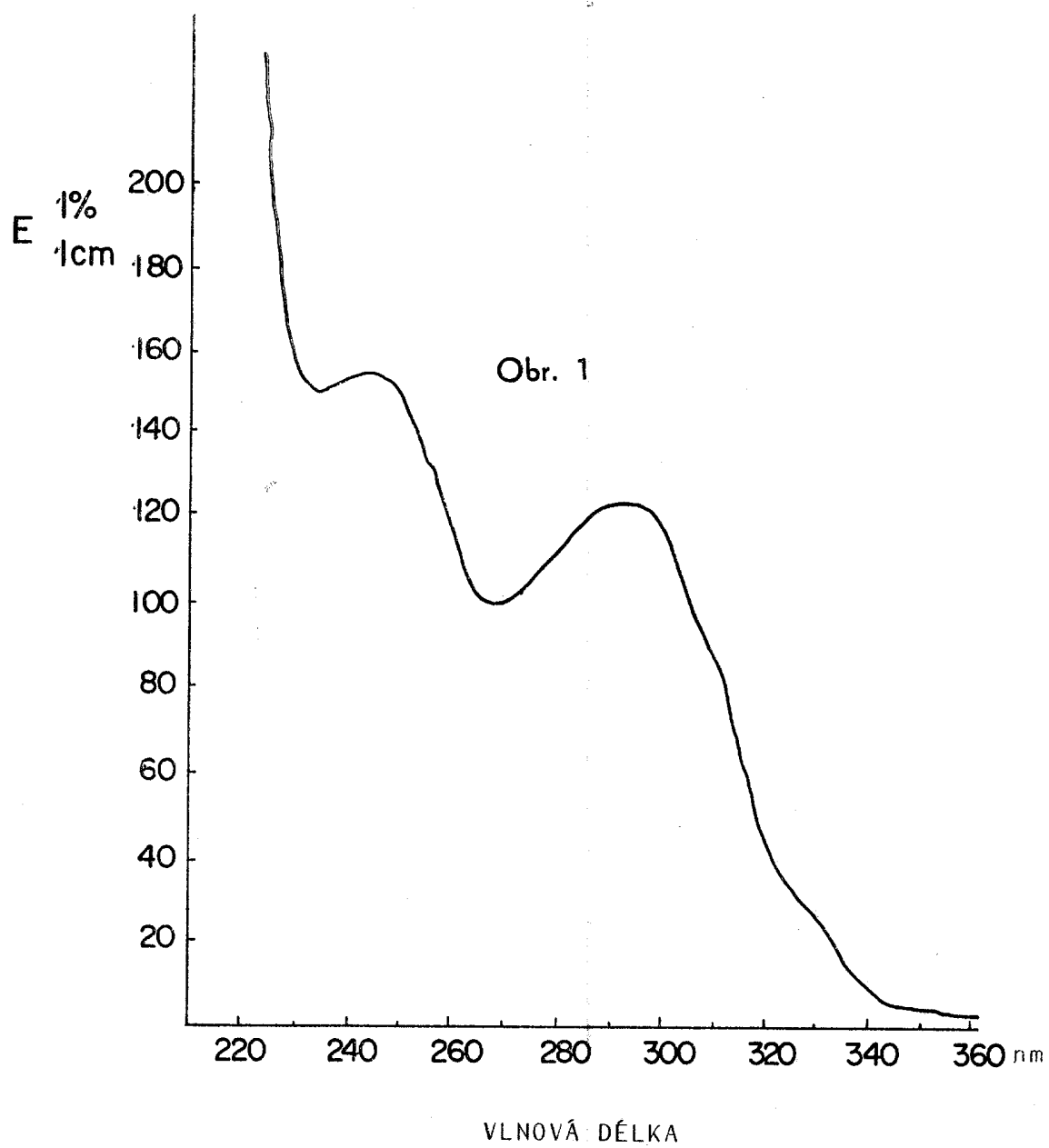
nebo jeho soli při teplotě 23 až 37 °C po dobu 5 až 10 dní za selektivního vzniku 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu, který se pak z kultivační kapaliny izoluje.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan nebo jeho sůl přidává do kultivační kapaliny v koncentraci 0,2 až 2 mg/ml prostředí.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako soli N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu používá hydrochloridu, síranu nebo octanu.

3 listy výkresů

210673



210673

