



⑪

634 582

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑯1 Gesuchsnummer: 7076/78

⑯3 Inhaber:
Nippon Kayaku Kabushiki Kaisha, Tokyo (JP)

⑯2 Anmeldungsdatum: 29.06.1978

⑯2 Erfinder:
Tomohisa Takita, Asaka-shi (JP)
Akio Fujii, Kamakura-shi (JP)
Takeyo Fukuoka, Kita-ku/Tokyo (JP)
Yasuhiko Muraoka, Kitamoto-shi (JP)
Osamu Yoshioka, Yono-shi (JP)
Hamao Umezawa, Nerima-ku/Tokyo (JP)

⑯4 Patent erteilt: 15.02.1983

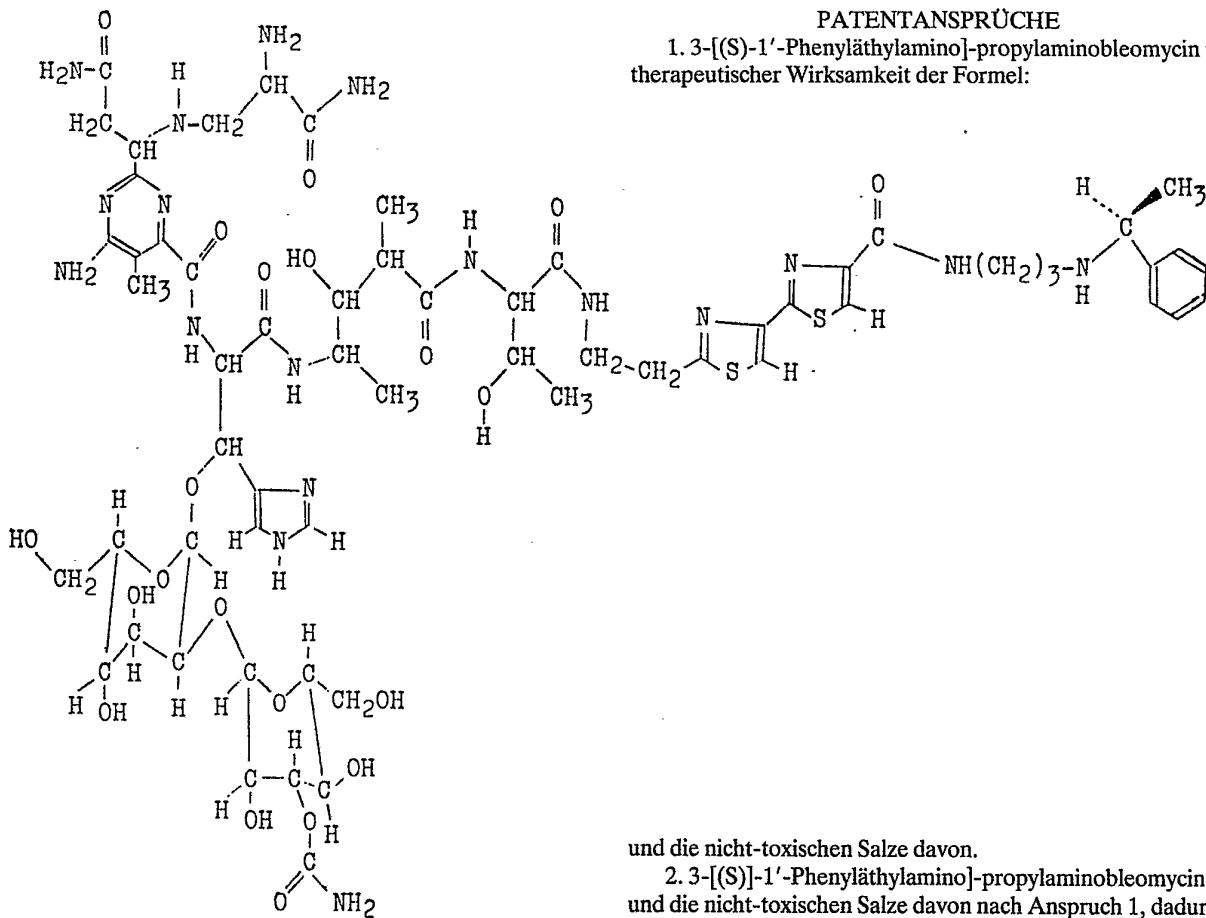
⑯4 Vertreter:
Ammann Patentanwälte AG Bern, Bern

⑯5 3-((S)-1'-Phenyläthylamino)-propylaminobleomycin, Verfahren zu seiner Herstellung und diese Verbindung enthaltendes Arzneimittel.

⑯6 Die Erfindung betrifft das neue 3-[(S)-1'-Phenyläthylamino]propylaminobleomycin, das durch Umsetzung eines reaktiven Derivats der Carboxylgruppe von Bleomycinsäure N-[(S)-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan erhalten wird, sowie die nicht-toxischen Salze von dem neuen Bleomycin und ein Verfahren zur Herstellung des neuen Bleomycins. Bei dem neuen Bleomycin sind die Nebenwirkungen, die eine Lungenfibrose verursachen, verringert. Das neue Bleomycin ist somit ein nützlicheres Arzneimittel als ein im Handel erhältlicher Bleomycinkomplex, der unerwünschte Nebenwirkungen ergibt.

PATENTANSPRÜCHE

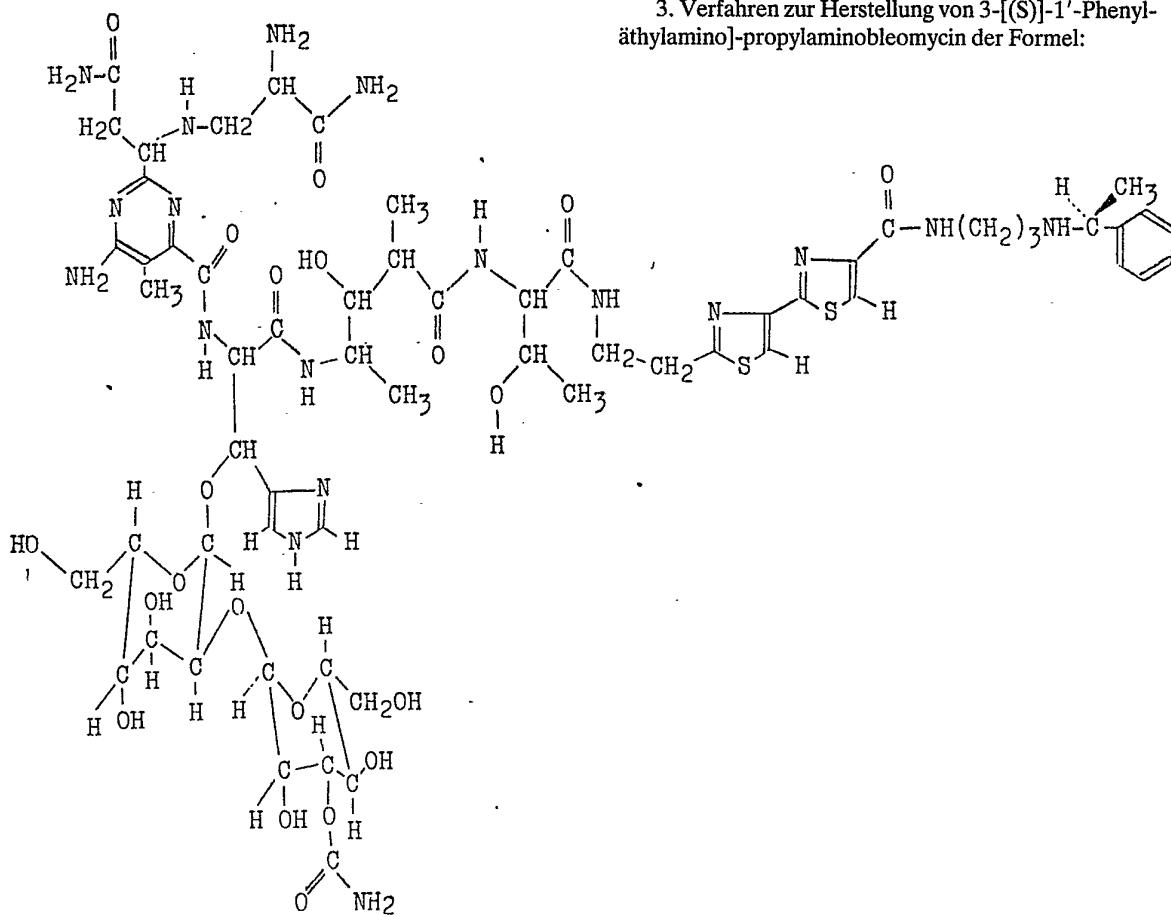
1. 3-[*(S)*-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin mit therapeutischer Wirksamkeit der Formel:



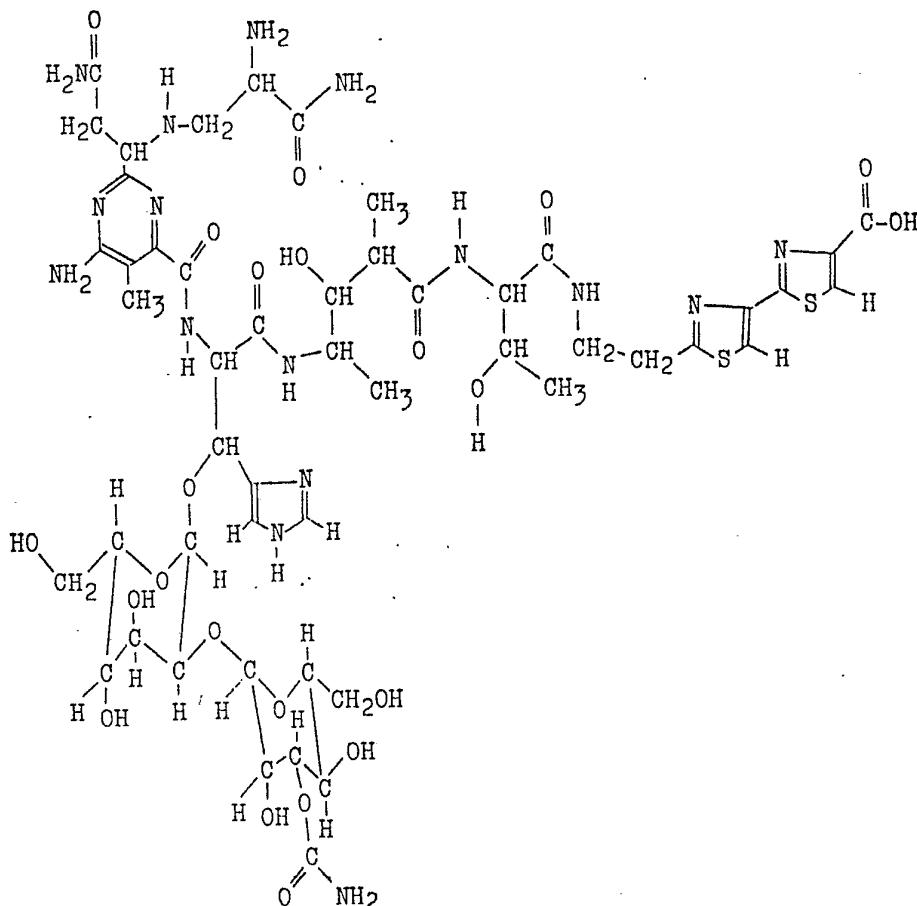
und die nicht-toxischen Salze davon.

2. 3-[*(S)*-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin und die nicht-toxischen Salze davon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das nicht-toxische Salz das Hydrochlorid, ³⁵ Sulfat oder Essigsäuresalz ist.

3. Verfahren zur Herstellung von 3-[*(S)*-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin der Formel:



und der nicht-toxischen Salz davon, dadurch gekennzeichnet, dass man ein reaktives Derivat der Carboxylgruppe der Bleomycinsäure der Formel:



mit N-[*(S)*-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan in einem Lösungsmittel umsetzt und erforderlichenfalls das Produkt in ein nicht-toxisches Salz umwandelt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das nicht-toxische Salz das Hydrochlorid, Sulfat oder Essigsäuresalz ist.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man das reaktive Derivat der Carboxylgruppe der Bleomycinsäure in der Weise herstellt, dass man eine Verbindung aus der Gruppe 6-Chlor-1-p-chlorbenzolsulfonyloxybenzotriazol, N-Äthyl-5-phenylisooocazolum-3'-sulfonat, N-tert.-Butyl-5-methylioxazoliumperchlorat, N-Äthoxycarbonyl-2-äthoxy-1,2-dihydrochinolin, Di-p-nitrophenylsulfit, Tri-p-nitrophenylphosphit, p-Nitrophenyltrichloracetat, N-Hydroxysuccinimid, Dicyclohexylcarbodiimid, 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid, Diphenylcarbodiimid, Di-p-toluylcarbodiimid, Diisopropylcarbodiimid, p-Nitrophenol, Pentachlorphenol und Benzylalkohol mit Bleomycinsäure reagieren lässt.

6. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als reaktives Derivat der Carboxylgruppe der Bleomycinsäure den 3-Aminopropylester verwendet.

7. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man als reaktives Derivat der Carboxylgruppe der Bleomycinsäure den N-monosubstituierten 3-Aminopropylester verwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als N-monosubstituierten 3-Aminopropylester einen

Ester aus der Gruppe 3-Acetylaminopropylester, 3-Succinylaminopropylester, 3-Benzoylaminopropylester, 3-Benzylaminopropylester, 3-p-Toluolsulfonylaminopropylester, 3-(2,4-Dinitrophenyl)-aminopropylester, 3-(3,5-Dimethyl-3-oxocyclohexen-1-yl)-aminopropylester, 3-(tert.-Butoxycarbonyl)-aminopropylester und 3-(Salicylidene)-iminopropylester verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man 1 bis 10 Äquivalente von N-[*(S)*-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan pro 1 Äquivalent Bleomycinsäure einsetzt.

⁵⁰ 10. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die Bleomycinsäure und das N-[*(S)*-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan 1 bis 24 h lang bei 0 bis 30 °C reagieren lässt.

⁵⁵ 11. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man 1 bis 10 Äquivalente N-[*(S)*-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan pro 1 Äquivalent Bleomycinsäure-3-aminopropylester oder eines N-monosubstituierten Derivats davon einsetzt.

12. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, ⁶⁰ dass man den Bleomycinsäure-3-aminopropylester oder ein N-monosubstituiertes Derivat davon und das N-[*(S)*-1'-Phenyläthyl]-diaminopropan 1 bis 72 h lang bei 0 bis 80 °C reagieren lässt.

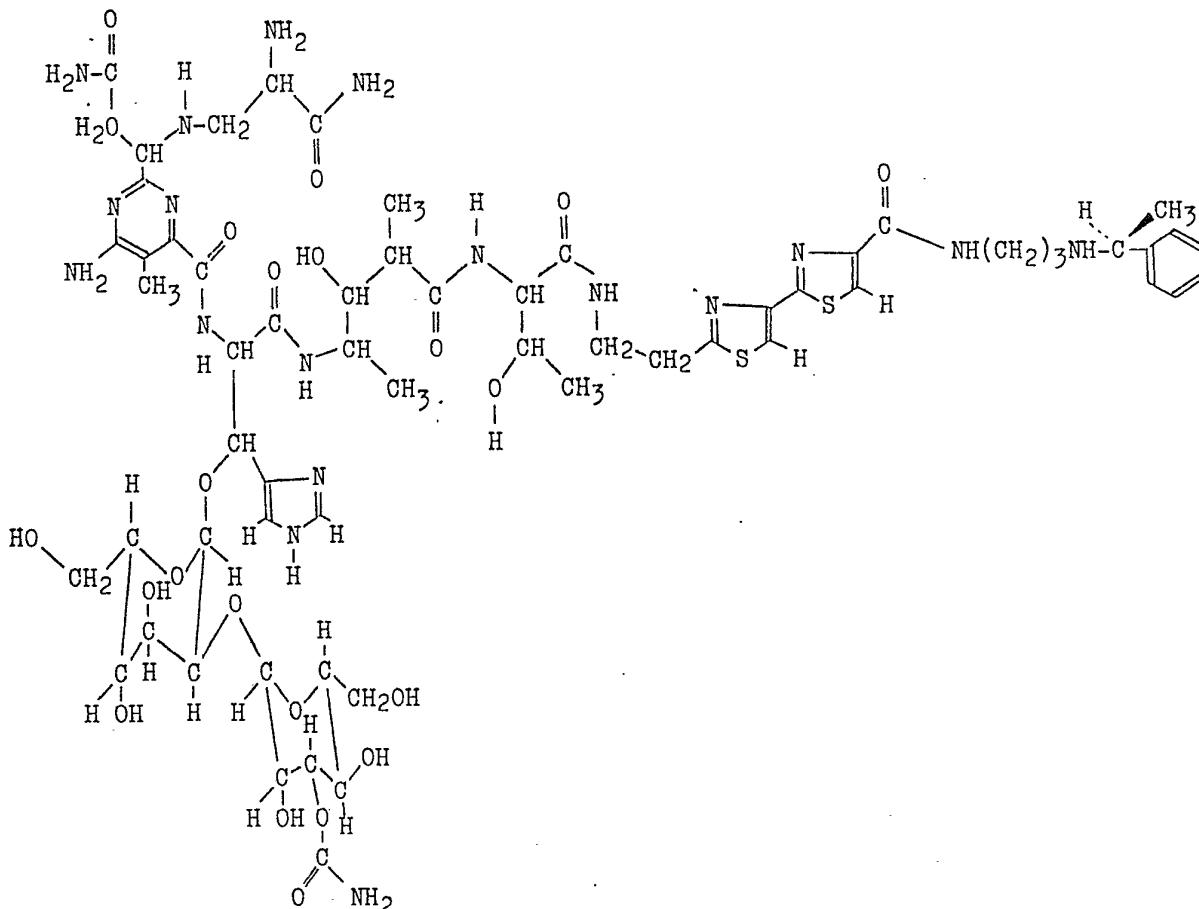
13. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, ⁶⁵ dass man als Lösungsmittel Wasser, Methanol, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder ein Gemisch davon verwendet.

14. Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, dass es neben üblichen Hilfs- und Trägerstoffen 3-[*(S)*-1'-Phenyläthylamino]-

propylaminobleomycin oder ein nicht-toxisches Salz davon enthält.

Die Erfindung betrifft eine neue Bleomycinverbindung, ihre nicht-toxischen Salze und ein Verfahren zur Herstellung dieser

neuen Bleomycinverbindung. Die Erfindung betrifft insbesondere 3-[(S)-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin mit therapeutischer Wirksamkeit der Formel:



und die nicht-toxischen Salze davon sowie ein Verfahren zur Herstellung dieses neuen Bleomycins.

Bleomycin sind karzinostatische Antibiotika, die von Umezawa et al entdeckt wurden [Journal of Antibiotics, 19A, 200 (1966)]. Es handelt sich um wasserlösliche basische Glycopeptide, die durch Actinomycete Streptomyces verticillus erzeugt werden. Diese Verbindungen sind dazu imstande, leicht ein Atom von zweiwertigem Kupfer zu chelieren. Bei der normalen Kultivierung werden 16 Komponenten von Bleomycinen erzeugt und isoliert [vgl. z.B. Umezawa et al., Journal of Antibiotics, 19A, 210 (1966)]. Von den Bleomycinen wird ein Gemisch von kupferfreiem A₁, A₂, A₅, B₂ und Demethyl-A₂ (nachstehend als Bleomycinkomplex bezeichnet) im weiten Ausmass in der Klinik zur Therapie von Krebs verwendet. Dieses Gemisch hat sich als besonders erfolgreich bei der Therapie von schuppigem Zellenkarzinom als Hauptziel, von Hautkrebs, Kopf- und Nackenkrebs, des Gebärmutterhalses, von Lungenkrebs und von malignem Lymphom erwiesen.

Was die Nebenwirkungen anbelangt, so sind jedoch Fälle von Lungenfibrose und anderen unerwünschten Zuständen berichtet worden. Von den Nebenwirkungen der Bleomycine ist die am meisten gefürchtete Nebenwirkung die Lungenfibrose. Es ist sehr leicht vorstellbar, dass die karzinostatische Aktivität der Bleomycine in der Klinik wirksamer ausgenutzt werden könnte, wenn die obengenannte Nebenwirkung mehr oder weniger vermindert werden könnte.

Über Jahre wurde daher die Synthese von verschiedenen Bleomycinen untersucht. Bei verschiedenen Tieren wurden Tests hinsichtlich der karzinostatischen Aktivität und der Toxizität mit Einschluss der Lungenfibrose als Haupttestgesichtspunkt durchgeführt. Als Ergebnis wurde gefunden, dass bei 45 3-[(S)-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin (nachstehend als «NK631» abgekürzt, und zwar mit Einschluss sowohl der Kupfer enthaltenden als auch der kupferfreien Formen), nämlich einem neuen Bleomycin, das durch Umsetzung eines reaktiven Derivats der Carboxylgruppe von Bleomycinsäure mit N-[(S)-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan erhalten wird, die Nebenwirkung der Lungenfibrose ausgeprägt vermindert wird 50 und dass im Vergleich zu einem handelsüblichen Bleomycinkomplex und anderen bekannten Bleomycinen die karzinostatische Aktivität nicht verringert ist.

Die ausgezeichnete Bioaktivität des erfindungsgemäßen 55 Bleomycins der Formel I wird nachstehend anhand der Ver- suchsbeispiele näher erläutert.

Die Bioaktivität von NK631 wurde hinsichtlich der folgenden vier Testgesichtspunkte untersucht, wobei ein Vergleich mit einem handelsüblichen Bleomycinkomplex und 3-[(R, S)-1'-60 Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin-monosulfat (kupferfreie Form) (nachstehend als «RS-Form» bezeichnet) durchgeführt wurde. Die RS-Form wurde durch ein Fermentationsverfahren gemäß der US-PS 3 846 400 erhalten.

1. Lungenfibrose
 2. Antitumoraktivität
 3. antimikrobielle Aktivität
 4. Toxizität.
1. Toxizität gegenüber der Lunge von Mäusen (Fibrose):

Mäuse vom ICR-Stamm (männlich, Alter 15 Wochen), 12 Stück pro Gruppe, wurden bei diesem Test verwendet. Die Dosis jeder pharmazeutischen Testzubereitung betrug 5 mg/kg.

Die Dosis wurde durch intraperitoneale Injektion einmal täglich über 10 aufeinanderfolgende Tage lang verabreicht. Nach der Verabreichung wurden die Mäuse 5 Wochen lang aufgezogen. Nach der Beobachtung wurden die Mäuse getötet und einer Autopsie unterworfen, um das Ausmass der Lungenfibrose zu bestimmen. Das Auftreten und der Grad der Lungenfibrose bei den Mäusen, die das neue erfundungsgemäße Bleomycin, einen handelsüblichen Bleomycinkomplex und die RS-Form erhalten hatten, wurden miteinander verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I

	Auftreten		Grad		relativer Wert
	Anzahl der Mäuse mit Lungenfibrose %	relativer Wert	Gesamtbewertung* der Lungenfibrose/Gesamtzahl der Proben	relativer Wert	
NK631-Monosulfat (kupferfreie 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	
Bleomycinkomplex	11/12 (0,92)	1,0	24/36 (0,67)	1,0	

Fussnote: *0 Punkte: keine Fibrose
1 Punkt: Ansammlung von Exudat in den Lungenbläschen und fibroseartige Veränderungen im Alveolar-Septum
2 Punkte: Fibrose in mehreren Bereichen
4 Punkte: gestreute Fibrose
6 Punkte: Fibrose in mehr als zwei Dritteln des Gesamtbereichs

Aus den oben angegebenen Ergebnissen wird ersichtlich, dass im Vergleich zur RS-Form und zum Bleomycinkomplex die auf NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) zurückzuführende Fibrose im Auftreten auf etwa $\frac{1}{2}$ bzw. $\frac{1}{3}$ und im Grad auf etwa $\frac{1}{2}$ bzw. $\frac{1}{4}$ vermindert worden war. Dies weist auf die Einsetzbarkeit von NK631-Monosulfat in der Klinik hin.

2. Antitumoraktivität:
2-1. Wirkung auf kultivierte HeLa-S₃-Zellen:
Die ID₅₀-Werte für jedes Bleomycin wurden aus der prozentualen Wachstumsemmung in 72 h Kultivierung in Gegenwart von jedem Bleomycin errechnet. Der ID₅₀-Wert für NK631 wurde als 0,82 mcg/ml ermittelt. Dies steht einem Wert von 1,70 mcg/ml für den Bleomycinkomplex gegenüber, was darauf hinweist, dass NK631 das Zellwachstum zweimal so stark hemmt wie der Bleomycinkomplex. Der ID₅₀-Wert für die RS-Form wurde als 0,80 mcg/ml ermittelt, was darauf hinweist, dass der Hemmeffekt mit demjenigen von NK631-Monosulfat (kupferfrei Form) vergleichbar war.

2-2. Karzinostatische Aktivität beim Ehrlich-Krebs der Maus (fester Tumor):

Jeweils 2×10^6 Zellen wurden subkutan in den Leibbereich von Mäusen vom ICR-Stamm (männlich, 6 Wochen alt) transplantiert. Nach 24 h erhielt jede Maus Testzubereitungen in der gleichen Weise, wie oben unter 1-2 beschrieben. Am 15. Tag nach der subkutanen Transplantation wurden die Tumore von jeder Maus herausgenommen und ihr Gewicht wurde mit demjenigen von Tumoren verglichen, welche sich in der Kontrollgruppe, die keine Behandlung erfahren hatte, entwickelt hatten. Auf diese Weise wurde die prozentuale Hemmung bestimmt.

Wie aus Tabelle II ersichtlich wird, ist die karzinostatische Aktivität von NK631-Monosulfat (kupferfrei) mit derjenigen der RS-Form vergleichbar, und sie ist etwa 1,4-mal so hoch wie diejenige des Bleomycinkomplexes.

Tabelle II

	Dosis mg/kg $\times 10$	Prozentuale Hemmung		
		NK631-Monosulfat (Cu-frei)	RS-Form	Bleomycin-komplex
2. Antitumoraktivität:				
2-1. Wirkung auf kultivierte HeLa-S ₃ -Zellen:	40 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
2-2. Karzinostatische Aktivität beim Ehrlich-Krebs der Maus (fester Tumor):	ID ₅₀ mg/kg/Tag	0,35	0,31	0,49

2-3. Karzinostatische Aktivität gegen Ascites Hepatoma (Ascites-Typ) bei Ratten:

Jeweils 1×10^6 AH66-Zellen wurden intraperitoneal in Ratten vom Donryu-Stamm transplantiert. Nach 24 h wurde die Testzubereitung intraperitoneal einmal täglich über 10 aufeinanderfolgende Tage lang verabreicht. Während einer Periode von 30 Tagen nach der Transplantation wurde das Gewicht jeder Ratte und die Anzahl der toten und überlebenden Tiere bestimmt.

Tabelle III

Relativer Wert der mittleren Überlebenstage

Dosis mg/kg $\times 10$	Relativer Wert der mittleren Überlebenstage		
	NK631-Monosulfat (Cu-frei)	RS-Form	Bleomycin-komplex
65 3,12	296	298	241
1,56	269	257	257

Tabelle III (Fortsetzung)

Relativer Wert der mittleren Überlebenstage

Dosis mg/kg × 10	NK631- Monosulfat (Cu-frei)	RS-Form	Bleomycin- komplex
0,78	216	196	145
0,39	163	149	116
0,19	116	121	110
0	100	100	100

Wie aus Tabelle III ersichtlich wird, war die Aktivität von NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) gegenüber AH66-Asciates Hepatoma mit derjenigen der RS-Form vergleichbar. Sie war bei jeder Dosis derjenigen des Bleomycinkomplexe überlegen.

2-4. Hemmaktivität gegen schwammiges Zellkarzinom bei der Maus, das durch 20-Methylcholanthren induziert wird (nachstehend als «20-MC» abgekürzt):

Eine Acetonlösung von 20-MC wurde topisch auf den rasierten Rücken von Mäusen vom ddy-Stamm (männlich, 10 Wochen alt) zweimal pro Woche über einen Zeitraum von 18 Wochen aufgebracht. Nach 5 Wochen vom Beginn der 20-MC-Behandlung wurde die Testzubereitung in einer Menge von 62,5 mcg/Maus intraperitoneal zweimal wöchentlich und über einen Zeitraum von 15 Wochen verabreicht. Innerhalb der ersten Woche nach Beendigung der Verabreichung der Testzubereitung wurde der Bereich; wo das 20-MC aufgebracht worden war, pathologisch auf das Auftreten einer Karzinogenese untersucht.

Wie aus Tabelle IV ersichtlich ist, sind NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) und die RS-Form geringfügig wirksamer als der Bleomycinkomplex bei der Hemmung der Karzinogenese, die auf 20-MC zurückzuführen ist.

Tabelle IV

Mortalität	Auftreten einer Karzinogenese (%)	prozentuale Hemmung
NK631- Monosulfat (kupferfrei)	1/12	5/11 (45,4)
RS-Form	1/12	5/11 (45,4)
Bleomycin- komplex	2/12	5/10 (50,0)
Kontrolle	1/24	20/23 (86,9)
		0

Aus den obigen Ergebnissen wird ersichtlich, dass NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) im Vergleich zu einem handelsüblichen Bleomycinkomplex eine ausgeprägt überlegene Antitumoraktivität besitzt.

3. Antimikrobielle Aktivität:

Die antimikrobielle Aktivität wurde nach der Schalenmethode gegen Mycobacterium 607 und Bacillus subtilis PCI unter Verwendung von Bleomycin A₂ als Standard (1000 U/mg) getestet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle V zusammengestellt.

Tabelle V

	M. 607	B. Sub.
NK631-Monosulfat (Cu-frei)	7848	1550
RS-Form	7535	1400
Bleomycinkomplex	1234	886

Wie aus Tabelle V ersichtlich wird, zeigen das NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) und die RS-Form eine weitaus bessere antimikrobielle Aktivität als der Bleomycinkomplex.

5. Toxizität:

4-1. Akute Toxizität bei intraperitonealen Weg (LD_{50}) bei Ratten:

Wie aus Tabelle VI hervorgeht, ist der LD_{50} -Wert von NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) bei Ratten ungefähr vergleichbar zu demjenigen des Bleomycinkomplexes und der RS-Form.

Tabelle VI

	LD_{50} mg/kg	Vertrauens- grenzen (Si- gnifikanzwert von 5%)
20	NK631- Monosulfat (kupferfrei)	155,0
25 Ratte	RS-Form	150,6
	Bleomycinkomplex	168,0

4-2. Subakute und chronische Toxizität bei Ratten und Hunden:

30 NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) ist hinsichtlich der subakuten und chronischen Toxizität bei Ratten und Hunden mit dem Bleomycinkomplex vergleichbar. Weiterhin sollte die Tatsache speziell erwähnt werden, dass in allen Fällen, wo Hunden eine hohe Dosis des Bleomycinkomplexes (1,2 mg/kg, 90 35 Injektionen) injiziert wurde, eine Nekrose auftrat, dass dies jedoch bei keinem der Fälle erfolgte, wo den Hunden die gleiche Dosis von NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) verabreicht wurde. Die Toxizität von NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) gegenüber der Lunge war ebenfalls niedriger als bei dem 40 Bleomycinkomplex.

Aus den obigen Ergebnissen ergibt sich, dass die Toxizität von NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) mit derjenigen des 45 Bleomycinkomplexes, ausgenommen der Toxizität gegenüber der Lunge und der Nekrose vergleichbar ist.

5. Zusammenfassung:

Aus den oben angegebenen Testergebnissen kann die 50 Schlussfolgerung gezogen werden, dass NK631 eine neue Verbindung ist, die die folgenden Eigenschaften hat:

(1) Eine extrem niedrige Toxizität gegenüber der Lunge;

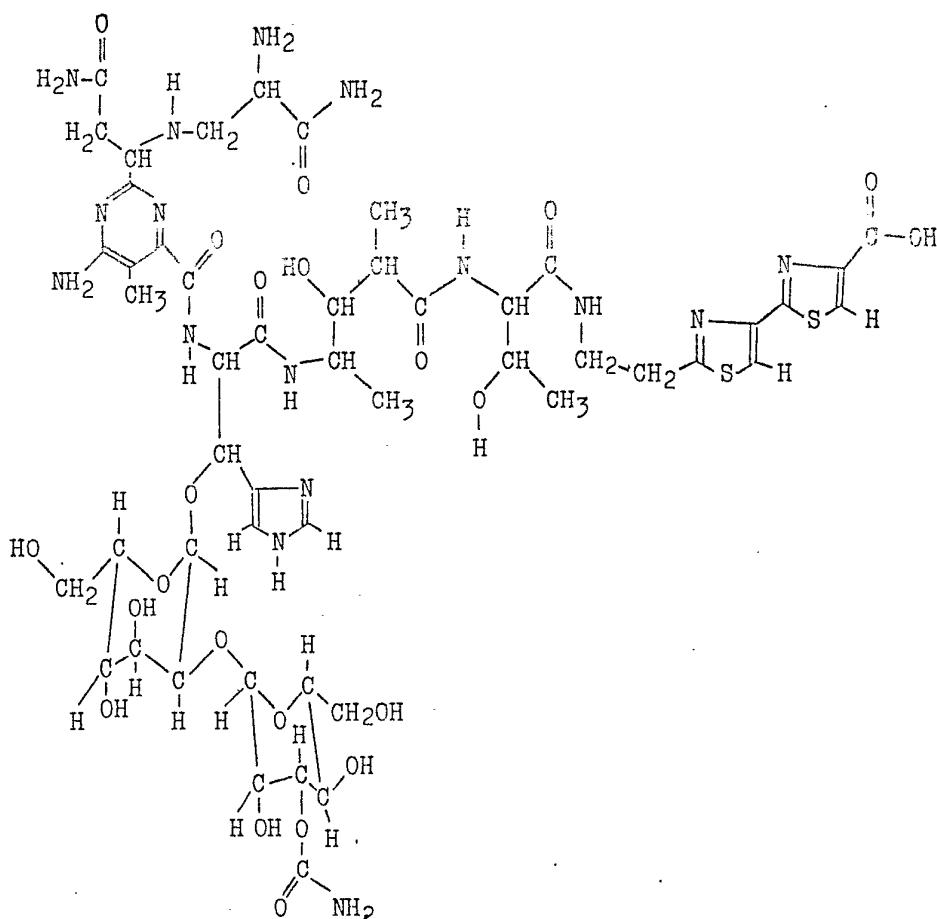
55 (2) eine antimikrobielle und Antitumoraktivität, die derjenigen des handelsüblichen Bleomycinkomplexes überlegen ist;

(3) eine systemische Toxizität, die mit derjenigen des handelsüblichen Bleomycinkomplexes vergleichbar ist; und

60 (4) eine niedrige lokale Toxizität an der Injektionsstelle.

Es kann daher angenommen werden, dass NK631 für klinische Zwecke geeignet ist.

65 Das neue erfindungsgemäße Bleomycin NK631 wird in der Weise synthetisiert, dass man ein reaktives Derivat der Carboxylgruppe der Bleomycinsäure der Formel:



mit N-[*(S*)-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan umsetzt. Die Verbindung kann man insbesondere dadurch herstellen, dass man (1) Bleomycinsäure mit N-[*(S*)-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan in Gegenwart eines Aktivierungsmittels umsetzt oder (2) Bleomycinsäure-3-aminopropylester oder das N-monosubstituierte Derivat davon mit N-[*(S*)-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan zur Umsetzung bringt.

Nachstehend wird eine detaillierte Beschreibung dieser Verfahrensweisen gegeben.

Die bei dem Verfahren (1) verwendete Bleomycinsäure ist eine bekannte Verbindung, die durch enzymatische Spaltung von Bleomycin B₂ nach der Methode gemäss den US-PS 3 843 448 und 3 846 400 erhalten wird.

Das andere Ausgangsmaterial, d.h. N-[*(S*)-1'-Phenyläthyl]-

35 1,3-diaminopropan ist eine neue Verbindung, die auf folgende Weise zuerst synthetisiert worden ist.

Auf etwa 0 °C abgekühltes Phenyläthylamin wird mit einer ungefähr äquivalenten Menge von Acrylnitril vermischt. Das Gemisch wird 10 bis 24 h bei 80 bis 100 °C gehalten, um die 40 Reaktion zu vervollständigen. Überschüssiges Acrylnitril wird sodann bei verminderter Druck abdestilliert und der Rückstand wird weiter destilliert, wodurch 3-[*(S*)-1'-Phenyläthylamino]-propionitril erhalten wird. Die auf diese Weise erhaltene Verbindung wird in üblicher Weise, beispielsweise in Gegenwart von Raney-Nickel, reduziert, wodurch das angestrebte 45 N-[*(S*)-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan (nachstehend als «Aminoverbindung» bezeichnet) erhalten wird. In Tabelle VII sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Verbindung zusammengestellt.

50

Tabelle VII

	Freie Base	Dihydrochlorid
(1) Aussehen	farblose Flüssigkeit bei Raumtemperatur	weisse nadelförmige Kristalle
(2) Schmelzpunkt	—	223,5 bis 224 °C
(3) Siedepunkt	95 bis 103 °C (2 mm Hg)	—
(4) UltraviolettabSORPTIONS-Maxima (mμ)	241, 247, 252, 257, 263, 267 (Methanol)	250, 256, 259, 266 (destilliertes Wasser)
(5) molekularer Extinktionskoef-fizient, ε (256 mμ)	—	206 (destilliertes Wasser)

Tabelle VII

	Freie Base	Dihydrochlorid
(6) spezifische Drehung $[\alpha]$ ²⁵ D	-	- 20,6° (c=1, destilliertes Wasser)
D ²⁶ D	- 56,38° (unverdünnt, l=1)	-
(7) Rf-Wert bei der Dünnschicht- chromatographie, n-Propanol/Py- ridin/Essigsäure/Wasser (15:10:3:12 V/V), Avicel-SF	0,73	0,73
(8) Rm-Wert bei der Hochspannungs- elektrophorese, Ameisensäure/ Essigsäure/Wasser (25:75:900 V/V), Avicel-SF, 800 V, 10 min, Rm-Wert von Alanin = 1,0	1,52	1,52
(9) IR-Absorptionsspektrum, cm ⁻¹ , KBr	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) Molekularformel (Molekulargewicht)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ (178,28)	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ Cl ₂ (251,20)

Beispiele für geeignete Aktivierungsreagentien sind 6-Chlor-1-p-chlorbenzolsulfonyloxybenzotriazol (CCBT), N-Äthyl-5-phenylioxazolium-3'-sulfonat (NEPIS), N-tert.-Butyl-5-methylioxazoliumperchlorat, N-Äthoxy carbonyl-2-äthoxy-1,2-dihydrochinolin, Di-p-nitrophenylsulfit, Tri-p-nitrophenylphosphit, p-Nitrophenyltrichloracetat, N-Hydroxy-succinimid, Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, 1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)-carbodiimid, Diphenylcarbodiimid, Di-p-toluylcarbodiimid, Diisopropylcarbodiimid, p-Nitrophenol, Pentachlorphenol und Benzylalkohol.

Detaillierte Beschreibung des Verfahrens (1):

Bleomycinsäure (Kupfer enthaltende Form) wird in Wasser, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder einem Gemisch davon aufgelöst. Zu der Lösung wird unter Röhren bei 0 bis 30 °C eines der oben angegebenen Aktivierungsreagentien gegeben. Die resultierende Lösung wird auf einen für die Aktivierung geeigneten pH-Wert von 3 bis 10 durch Zugabe einer anorganischen Säure oder Base, wie Salzsäure oder Natriumhydroxid, oder durch Zugabe einer organischen Säure oder Base, wie z.B. Trichloressigsäure oder N-Methylmorpholin, eingestellt. Nach einer solchen Behandlung wird die Aktivierung der Carboxylgruppe der Bleomycinsäure eingeleitet. Unmittelbar oder innerhalb von 30 min nach der Behandlung wird die Ausgangslösung mit der Aminoverbindung (wie vorstehend definiert) so, wie sie ist, oder nach Einstellung des pH-Werts auf etwa 7,0 vermischt. Das Gemisch wird sodann 1 bis 24 h bei 0 bis 30 °C gehalten, um die Reaktion ablaufen zu lassen. Auf diese Weise wird NK631 erhalten. Eine geeignete Verhältnismenge des Aktivierungsreagens oder der Aminoverbindung ist 1 bis 10 Äquivalente für 1 Äquivalent der Bleomycinsäure.

Um das NK631 aus dem Reaktionsgemisch zu isolieren, werden zuerst die Bleomycinverbindungen durch Zugabe von 5 bis 10 Volumeneilen Aceton pro 1 Volumeneil des Reaktionsgemisches erschöpfend ausgefällt. Der Niederschlag wird durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen und in der kleinstmöglichen Menge destilliertem Wasser aufgelöst. Die resultie-

rende wässrige Lösung wird sofort mit Salzsäure oder dergleichen auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und auf eine chromatographische Säule aufgegeben, welche CM-Sephadex C-25 ³⁵ (vom NH₄-Typ von Pharmacia Fine Chemicals), eingepackt in eine wässrige Ammoniumchloridlösung, enthält. Die nicht-umgesetzte Bleomycinsäure läuft durch die Säule, ohne adsorbiert zu werden. Das auf dem Harz adsorbierte NK631 wird mit wässrigen Ammoniumchloridlösungen mit Konzentrationsgradienten, die stufenweise oder kontinuierlich von 0,05 M bis 1,0 M erhöht sind, eluiert. NK631 ist in den blauen Abstromfraktionen mit einer Ammoniumchloridkonzentration von etwa 0,35 M bis 0,45 M enthalten, die eine UltraviolettabSORption bei 292 mμ zeigen. Diese Fraktionen werden gesondert gesammelt ⁴⁵ und durch Amberlite XAD-2 (Röhm & Haas Co.) oder Diaion HP40 (Mitsubishi Chemical Co.) geleitet. Das adsorbierte NK631 wird mit Wasser gewaschen und eluiert, wodurch ein entsalzter Abstrom erhalten wird, aus dem ein reines blaues amorphes Pulver von NK631 (Kupfer enthaltende Form) erhalten ⁵⁰ wird. Das Hydrochlorid und das Sulfat von NK631 werden erhalten, indem man mit wässrigem Methanol eluiert, das Salzsäure bzw. Schwefelsäure enthält. Bei diesem Verfahren kann nicht-umgesetzte Bleomycinsäure leicht wiedergewonnen werden. Die oben beschriebene Verfahrensstufe, bei der CM-Sephadex C-25 (Sephadex ist ein Warenzeichen für einen Kationenaustauscher aus mikroskopisch kleinen Perlen eines Carboxymethylgruppenderivats von Polysacchariddextran, von Pharmacia Fine Chemicals Inc., Schweden) verwendet wird, ist nur ein der Veranschaulichung dienendes Beispiel. Die Verfahrensweise kann bis zu einem gewissen Ausmass modifiziert werden, ohne dass die Ergebnisse wesentlich beeinflusst werden. So kann z.B. wässrige Natriumchlorid- oder wässrige Ammoniumsulfatlösung als Eluierungsmittel verwendet werden.

Die Entfernung des Kupfers aus dem oben erhaltenen Kupfer ⁶⁵ enthaltenden NK631 kann nach bekannten Methoden geschehen. So kann beispielsweise das Kupfer in der Weise entfernt werden, dass man eine Umsetzung mit Schwefelwasserstoff vornimmt, um das Kupfer in Kupfer(II)-sulfid umzuwan-

dein, das ausgefällt wird. Das Kupfer kann auch zu nullwertigem Kupfer mit einem Reduktionsmittel reduziert werden (vgl. US-PS 3 646 197). Man kann das Kupfer auch mit einem organischen Lösungsmittel extrahieren, das einen Chelatbildner, wie z.B. Dithizon, enthält (vgl. Umezawa et al., Journal of Antibiotics, 19A, 210 (1960)). Schliesslich kann man beispielsweise auch ein nicht-ionogenes makroretikuläres Austauscherharz verwenden (vgl. US-PS 3 929 993). Nachstehend wird ein Beispiel für das Verfahren zur Entfernung des Kupfers angegeben.

NK631 (Kupfer enthaltende Form) wird in destilliertem Wasser aufgelöst und die Lösung wird in eine Harzsäule gegossen, die Amberlite XAD-2 (Warenzeichen für ein absorbierendes Harz aus Styrol-Divinylbenzol-Copolymerem von Röhm & Haas Co., USA) oder Diaion HP40 (Warenzeichen für ein absorbierendes Harz aus einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymerem von Mitsubishi Chemical Co., Japan), gepackt in destilliertem Wasser, enthält, um das NK631 adsorbieren zu lassen. Die Säule wird sodann mit einer 5%igen wässrigen Lösung von Äthyldiamintetraessigsäuredinatriumsalz (nachstehend als «EDTA.Na₂» bezeichnet) gewaschen, wodurch die Kupferionen durch die EDTA.Na₂-Lösung weggetragen werden. Kupferfreies NK631 bleibt auf dem Harz zurück. Das Harz wird mit einer wässrigen Lösung eines Salzes, z.B. von Natriumchlorid, Natriumsulfat oder Natriumacetat, zur Entfernung von EDTA.Na₂ und sodann mit destilliertem Wasser gewaschen. Schliesslich wird ein angesäuertes Methanol/Wasser-Gemisch, beispielsweise ein Gemisch aus Methanol und 0,0025N-Salzsäure (1:1 Volumenverhältnis) durch die Säule geleitet, um eine Substanz zu eluieren, die eine Ultraviolettabsoption bei 290 μm hat. Diese Fraktion wird gesammelt, konzentriert, auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und gefriergetrocknet, wodurch ein hellgelblich weisses amorphes Pulver von NK631-Dihydrochlorid (kupferfreie Form) erhalten wird.

Als Säure zur Herstellung des angesäuerten Methanol/Wasser-Gemisches können alle beliebigen Säuren verwendet werden, sofern sie pharmazeutisch annehmbar sind. Wenn beispielsweise Schwefelsäure oder Essigsäure verwendet wird, dann wird ein Pulver von NK631-Monosulfat oder dem Diessigsäuresalz (kupferfreie Form) erhalten.

Das erfindungsgemäße NK631 kann in üblicher Weise in andere nicht-toxische Salze, beispielsweise in das Sulfat- und Essigsäuresalz, umgewandelt werden. Diese Salze können auch in der Weise erhalten werden, dass man in entsprechender Weise die beim Eluieren verwendete Säure verändert.

Da bei dem Verfahren (1) sich die Aminoverbindung mit der aktivierte Carboxylgruppe der Bleomycinsäure aufgrund des Vorhandenseins eines Aktivierungsgenases, das bei der Polypeptidsynthese verwendet wird, umsetzt, schreitet die Kondensationsreaktion glatt und unter extrem milden Bedingungen voran. Es setzt sich daher nur die primäre Aminogruppe der Aminoverbindung mit der aktivierte Carboxylgruppe um, während die sekundäre Iminogruppe an der Reaktion nicht teilnimmt, wodurch bevorzugt NK631 erhalten wird. Dies stellt einen erheblichen Vorteil des Verfahrens (1) dar.

Detaillierte Beschreibung des Verfahrens (2):

Der beim Verfahren (2) verwendete 3-Aminopropylester der Bleomycinsäure wird leicht in Form des Dihydrochlorids (Kupfer enthaltende Form) erhalten, indem man thermisch Bleomycin A₂ unter Bildung von 3-(Methylmercapto)-propylaminobleomycin zerstetzt und das resultierende Bleomycin mit einem Halogenenitril, einer Halogenessigsäure, einem Halogenacetatester oder einem Halogenacetamid in einer sauren Lösung umsetzt (US-PS 3 886 133).

Das N-monosubstituierte Derivat des 3-Aminopropylesters der Bleomycinsäure, bei dem die Aminogruppe geschützt ist, wird in hoher Ausbeute erhalten, indem man das Dihydrochlorid des 3-Aminopropylesters von Bleomycinsäure in Wasser oder einem organischen Lösungsmittel, wie Methanol, oder ei-

nem Gemisch davon auflöst und sodann langsam unter heftigem Röhren zu der resultierenden Lösung eine äquivalente Menge oder einen geringen Überschuss eines der bekannten Aminogruppen schützenden Reagentien in Form eines Pulvers oder als Lösung in einem organischen Lösungsmittel, wie Methanol, gibt und indem man die Reaktion bei Raumtemperatur oder unter Eiskühlung ablaufen lässt, wobei man kontinuierlich den pH-Wert des Reaktionsgemisches bei 5,0 bis 7,5 durch Zugabe einer organischen Base, wie z.B. von Trimethylamin, Triäthylamin, Pyridin, 1,3-Diazabicyclo-[5,4,0]-7-undecen, 1,5-Diazabicyclo-[3,4,0]-5-nonen 1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-octan oder N-Methylmorpholin, hält. Typische solche N-monosubstituierten Derivate sind das Monohydrochlorid des 3-Acetylaminopropylesters von Bleomycinsäure, des 3-Succinylaminopropyl esters der Bleomycinsäure, das Monohydrochlorid des 3-Benzoylaminopropylesters von Bleomycinsäure, das Monohydrochlorid des 3-Benzylloxycarbonylaminopropylesters von Bleomycinsäure, das Monohydrochlorid von 3-p-Toluolsulfonylamino-propylesters von Bleomycinsäure, das Monohydrochlorid des 3-(2,4-Dinitrophenyl)-aminopropylesters der Bleomycinsäure, das Monohydrochlorid des 3-(3,5-Dimethyl-3-oxocyclohexen-1-yl)-aminopropylesters der Bleomycinsäure, das Monohydrochlorid des 3-N-tert.-Butoxycarbonylpropylesters der Bleomycinsäure und das Monohydrochlorid des 3-N-Salicylideneiminopropylesters der Bleomycinsäure (US-PS 3 886 133).

Bei dem Verfahren (2) wird NK631 durch Umsetzung des 3-Aminopropylesters oder N-monosubstituierten 3-Aminopropylesters der Bleomycinsäure mit der Aminoverbindung gebildet. Wenn der N-monosubstituierte 3-Aminopropylester der Bleomycinsäure als Ausgangsmaterial verwendet wird, dann kann entweder ein reines Material oder ein Reaktionsgemisch, das konzentriert sein kann, erhalten aus dem 3-Aminopropylester der Bleomycinsäure und einem Aminogruppenschutzmittel, verwendet werden.

Bevorzugte Lösungsmittel, die bei der Umsetzung des 3-Aminopropylesters oder des N-monosubstituierten 3-Aminopropylesters der Bleomycinsäure mit der Aminoverbindung verwendet werden, sind Wasser und organische Lösungsmittel, wie z.B. Methanol, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid.

Das Reaktionsgemisch wird 1 bis 72 h lang bei 0 bis 80 °C bei neutralen oder alkalischen Bedingungen stehen gelassen, damit die Aminolysereaktion ablaufen kann. Auf diese Weise wird NK631 gebildet. Bei den Bedingungen eines höheren pH-Werts ist eine verlängerte Reaktionszeit bei verhältnismässig niedrigen

Temperaturen zweckmässig, während bei den Bedingungen eines niedrigeren pH-Wertes eine kürzere Reaktionszeit bei höheren Temperaturen bevorzugt wird. Die geeignete Verhältnismenge der Aminoverbindung in dem Reaktionsgemisch ist 1 bis 10 Äquivalente pro 1 Äquivalent des 3-Aminopropylesters der Bleomycinsäure oder des N-monosubstituierten Derivats davon.

Zur Isolierung des NK631 aus dem Reaktionsgemisch werden zuerst die Bleomycinkomponenten durch Zugabe von 2- bis 5-fachen Volumenmenge Aceton zu dem Reaktionsgemisch erschöpfend ausgefällt. Der Niederschlag wird durch Filtration gesammelt, gründlich mit Aceton gewaschen und sodann in der geringstmöglichen Menge von destilliertem Wasser aufgelöst.

Die resultierende wässrige Lösung wird rasch auf einen pH-Wert von 6,0 durch Zugabe von Salzsäure oder dergleichen eingestellt und in eine chromatographische Säule aus CM-Sephadex C-25 (vom NH₄⁺-Typ von Pharmacia Fine Chemicals), das in eine 0,05 M-wässrige Ammoniumchloridlösung eingelegt ist, eingegossen, damit die Bleomycinkomponenten auf dem Harz adsorbiert werden können. Durch Durchlaufenlassen durch die Säule einer wässrigen Ammoniumchloridlösung, deren Konzentration stufenweise oder kontinuierlich von 0,05 M auf 1,0 M erhöht wird, werden der nicht-umgesetzte 3-Aminopropylester der Bleomycinsäure oder ein N-monosubstitu-

iertes Derivat davon und NK631 eluiert, die blaue Bänder (UV-Absorption bei 292 m μ) in dem Abstrom bei Ammoniumchloridkonzentrationen von 0,15 bis 0,20 M bzw. 0,35 bis 0,45 M bilden. Diese Fraktionen werden gesondert gesammelt und durch Adsorption auf Amberlite XAD-2 oder Diaion HP40, Waschen mit Wasser und Elution entsalzt, wodurch ein blaues amorphes Pulver von NK631 (Kupfer enthaltende Form) erhalten wird. Das Hydrochlorid und das Sulfat werden erhalten, wenn man Methanol/Wasser-Gemische, die mit Salzsäure bzw. Schwefelsäure angesäuert worden sind, als Elutionsmittel verwendet. Der nichtumgesetzte 3-Aminopropylester der Bleomycinsäure oder ein N-monosubstituiertes Derivat davon können in geeigneter Weise gewonnen werden. Die oben beschriebene Verfahrensstufe, bei der CM-Sephadex C-25 verwendet wird, ist ein typisches, der Veranschaulichung dienendes Beispiel. Sie kann bis zu einem gewissen Ausmass modifiziert werden, ohne dass die Ergebnisse praktisch verändert werden. So kann z.B. als Eluierungsmittel wässrige Natriumchlorid- oder wässrige Ammoniumsulfatlösung verwendet werden.

Das nach dem Verfahren (2) erhaltene NK631 kann in die kupferfreie Form durch Anwendung bekannter Kupferentfer-

nungsmethoden umgewandelt werden, wie sie oben im Zusammenhang mit der Verfahrensweise (1) beschrieben wurden. Erforderlichenfalls ist es möglich, die Verbindung in ein anderes nicht-toxisches Salz, beispielsweise das Hydrochlorid, Sulfat oder Essigsäuresalz, umzuwandeln.

In den Tabellen VIII und IX sind die hauptsächlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften von NK631 zusammenge stellt.

Die Strukturformel I von NK631 wurde auf folgende Weise bestätigt: NK631-Monosulfat (kupferfreie Form) wurde in schwerem Wasser aufgelöst. ^{13}C -NMR wurde nach der Protonenengerasch-Entkopplungsmethode gemessen, wobei Dioxan als innerer Standard verwendet wurde. Signale, die auf insgesamt 11 ^{13}C -Atome, die in der Aminoverbindung in der Seitenkette und der 3-[(S) -1'-Phenyläthylamino]-propylamino-Gruppierung enthalten waren, zurückzuführen sind, wurden bei 19,4, 26,3, 37,0, 43,5, 58,9, 128,3 (zwei Signale), 130,0 (zwei Signale) und 136,3 ppm festgestellt. Auf andere Kohlenstoffatome zurückzuführende Signale entsprachen alle den Signalen, die der Bleomycinfamilie gemeinsam waren [Naganawa et al., Journal of Antibiotics, 30, 388 (1977)].

Tabelle VIII
Physikalisch-chemische Eigenschaften von NK631 (Kupfer enthaltende Form)

	Dihydrochlorid	Monosulfat
(1) Aussehen	blaues amorphes Pulver	blaues amorphes Pulver
(2) Löslichkeit	löslich in Wasser, Methanol, Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid; geringfügig löslich in Dioxan; unlöslich in Äthanol, Aceton, Äther, Benzol.	gleiche Löslichkeit wie im Falle des Dihydrochlorids
(3) Schmelzpunkt (Zers.), °C	205 bis 207	205 bis 207
(4) spezifische Drehung (destilliertes Wasser, $C=1,0) [\alpha]$	$25_{436}^{-95,6^\circ}$	$-93,7^\circ$
(5) Dünnschichtchromatographie ¹⁾ R_f -Wert	(a) 0,72 (b) 0,75	(a) 0,72 (b) 0,75
(6) Elektrophorese ²⁾ Rm-Wert (Alanin=1)	0,80	0,80

¹⁾(a) Silica Gel G (Warenzeichen für ein Adsorptionsmittel für die Dünnschichtchromatographie aus Silicagel, hergestellt von Merck Inc., USA); Methanol/10% Ammoniumacetat/10% Ammoniak (10:9:1 V/V)

(b) Avicel SF (Warenzeichen für ein Adsorptionsmittel für die Dünnschichtchromatographie aus kristalliner Cellulose, hergestellt von FMC Corporation, USA); n-Propanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser (15:10:3:12).

²⁾ Avicel SF; Ameisensäure/Essigsäure/Wasser (25:75:900 V/V); 800 V; 15 min.

Tabelle IX
Physikalisch-chemische Eigenschaften von NK631 (kupferfreie Form)

	Dihydrochlorid	Monosulfat	Di-(essigsäure)-salz
(1) Aussehen	hell-gelblich weisses amorphes Pulver	hell-gelblich weisses amorphes Pulver	hell-gelblich weises amorphes Pulver
(2) Löslichkeit	löslich in Wasser, Methanol, Essigsäure, DMSO, DMF; geringfügig löslich in Dioxan; unlöslich in Äthanol, Aceton, Äther, Benzol.		

Tabelle IX (Fortsetzung)
Physikalisch-chemische Eigenschaften von NK631 (kupferfreie Form)

	Dihydrochlorid	Monosulfat	Di-(essigsäure)-salz
(3) Schmelzpunkt (Zers.), °C	195 bis 197	196 bis 198	188 bis 190
(4) spezifische Drehung (destilliertes Wasser, $c=1,0$) [α] $\frac{25}{436}$	-2,1°	-2,0°	-2,0°
(5) Dünnschichtchromato- graphie ¹⁾ R _f -Wert	(a) 0,56 (b) 0,70	(a) 0,56 (b) 0,70	(a) 0,56 (b) 0,70
(6) Elektrophorese ²⁾ R _m -Wert (Alanin = 1,0)	0,94	0,94	0,94

¹⁾(a) Silica Gel G; Methanol/10% Ammoniumacetat/10% Ammoniak (10:9:1 V/V)
(b) Avicel SF; n-Propanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser (15:10:3:12)

²⁾Avicel SF; Ameisensäure/Essigsäure/Wasser (25:75:900 V/V); 800 V; 15 min

In den beigefügten Zeichnungen zeigen die Figuren 1 und 2 die UltraviolettabSORPTIONSKURVEN des erfundungsgemäßen Bleomycins NK631 und die Figuren 3 und 4 zeigen die InfrarotabsORPTIONSKURVEN von NK631.

Die Figur 1 zeigt somit die UltraviolettabSORPTIONSKURVE von 3-[(S)-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin-dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form). Die Figur 2 zeigt die UltraviolettabSORPTIONSKURVE von 3-[(S)-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin-monosulfat (kupferfrei Form). Die Figur 3 zeigt die InfrarotabsORPTIONSKURVE von 3-[(S)-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin-dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form), gemessen in Form einer Kaliumbromidtablette, und die Figur 4 zeigt die InfrarotabsORPTIONSKURVE von 3-[(S)-1'-Phenyläthylamino]-propylaminobleomycin (kupferfrei Form), gemessen in Form einer Kaliumbromidtablette.

Die Erfindung wird in den Beispielen erläutert.

Beispiel 1

Synthese des Dihydrochlorids (Kupfer enthaltende Form) und des Monosulfats (kupferfrei Form) von NK 631:

Stufe A: In 400 ml Dimethylformamid wurden 15,0 g Bleomycinsäure (Kupfer enthaltende Form) gelöst. Zu dieser Lösung wurden, während sie durch Kühlen bei 0 °C gehalten wurde, 1,1 ml N-Methylmorpholin und 10,3 g CCBT gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei 0 °C gerührt und sodann wurden 5,3 g der Aminoverbindung zugemischt. Es wurde 1 h lang weiter gerührt. Nachdem die Umsetzung durch Zugabe von 200 ml einer 25%igen wässrigen Essigsäurelösung beendigt worden war, wurde das Reaktionsgemisch mit 5 l kalten Acetons vermischt, um das Reaktionsprodukt zur Ausfällung zu bringen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen und in 500 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die resultierende wässrige Lösung wurde sofort auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und in eine Säule gegossen, die 2 l CM-Sephadex C-25 (vom NH₄⁺-Typ), gepackt in eine 0,05 M-wässrige Ammoniumchloridlösung, enthielt, um die Bleomycine zu adsorbieren.

Mit einer wässrigen Ammoniumchloridlösung wurde die Elution durchgeführt, indem durch die Säule 20 l des Elutionsmittels durchgeleitet wurden, bei dem die Konzentration von Ammoniumchlorid kontinuierlich von 0,05 auf 1,0 M erhöht wurde. Die nicht-umgesetzte Bleomycinsäure wurde in dem Abstrom bei einer Ammoniumchloridkonzentration von etwa 0,05 M festgestellt. Das NK631 wurde bei einer Ammonium-

chloridkonzentration von etwa 0,45 M festgestellt. Beide Fraktionen, die eine UV-Absorption bei 292 m μ zeigten, wurden gesondert gesammelt. Die das NK631 enthaltende Fraktion wurde in eine Harzsäule gegossen, die 2,6 l Amberlite XAD-2 enthielt. Die Säule wurde sodann gründlich mit Wasser gewaschen und mit 0,01N-Salzsäure in Methanol/Wasser (4:1 V/V) eluiert. Insgesamt 2,5 l der blauen Fraktion, die eine UV-Absorption bei 292 m μ zeigte, wurden gesammelt. Nach Abdampfen des Methanols aus der eluierten Fraktion wurde das Konzentrat mit Dowex 44 (OH-Typ) (Warenzeichen für ein Anionenaustauscherharz, bestehend aus einem Copolymeren von Epichlorhydrin und Ammoniak, hergestellt von Dow Chemical Co., USA) auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Das Filtrat wurde gefriergetrocknet, wodurch 16,1 g (Ausbeute 92%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers erhalten wurden.

Durch eine ähnliche Behandlung wurden 280 mg nicht-umgesetzte Bleomycinsäure (Kupfer enthaltende Form) gewonnen.

Die UltraviolettabSORPTIONSMAXIMA und die antimikrobielle Aktivität des NK631-Dihydrochlorids (Kupfer enthaltende Form) sind nachfolgend angegeben.

UV-Absorptionsmaxima: m μ	1% (E 1 cm , destilliertes Wasser)
242	(151)
292	(121)
Antimikrobielle Aktivität: 8100 u/mg	

(Fussnote: Die antimikrobielle Aktivität wurde unter Verwendung von Mycobacterium smegmatis ATCC 607 als Testorganismus bestimmt. Die Aktivität von Bleomycin A₂ (kupferfrei Form) wurde als 1000 u/mg angesetzt. Das Gleiche gilt für die späteren Ausführungen).

Stufe B: In 200 ml destilliertem Wasser wurden 10,0 g NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Die Lösung wurde in eine Säule gegossen, die 600 ml Amberlite XAD-2, gepackt in destilliertes Wasser, enthielt. Die Säule wurde sodann nacheinander mit 2 l einer wässrigen Lösung, die 5% EDTA.Na₂ enthielt, 2,5 l einer 5%igen wässrigen Natriumsulfatlösung und 630 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Säule wurde sodann mit 0,0025N-Schwefelsäure in einem Methanol/Wasser-Gemisch (1:1 V/V) eluiert. Insgesamt 900 ml Fraktionen, die eine Substanz enthielten, welche eine UV-Absorption bei 290 m μ zeigte, wurden gesammelt. Nach dem Abde-

stillieren des Methanols wurde die zurückgebliebene Flüssigkeit mit Dowex 44 (OH⁻-Typ) auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und gefriergetrocknet, wodurch 9,3 g (Ausbeute 95%) von NK631-Monosulfat (kupferfrei Form) in Form eines hellgelblich weissen amorphen Pulvers erhalten wurden. Dieses Produkt zeigte ein UV-Absorptionsmaximum und eine antimikrobielle Aktivität wie folgt:

UV-Absorptionsmaximum:

mμ	(E 1% 0,1N-HCl) 1 cm
290	(106)

Antimikrobielle Aktivität: 7865 u/mg

Wert von 4,5 eingestellt. Nach Zugabe von 530 mg der Aminoverbindung wurde das Gemisch erneut mit 1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 5,0 eingestellt und 20 h lang bei 27 °C stehen gelassen. Zu dem Reaktionsgemisch wurden unter Röhren 5400 ml kaltes Aceton gegeben, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende wässrige Lösung wurde nach der Arbeitsweise der Stufe A des Beispiels 1 gereinigt, wodurch 440 mg (Ausbeute 25%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers erhalten wurden, das eine antimikrobielle Aktivität von 7985 u/mg hatte.

15

Beispiel 2

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 40 ml destilliertem Wasser wurden 1,5 g Bleomycinsäure (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Zu der gerührten Lösung wurden bei 26 °C 800 mg NEPIS gegeben, wobei der pH-Wert des Reaktionsgemisches durch Zugabe einer 0,1N-wässrigen Natriumhydroxidlösung bei 4,8 bis 5,5 gehalten wurde. Nach 30 min wurde zu dem Gemisch eine Lösung gegeben, die in der Weise hergestellt worden war, dass 1,8 g der Aminoverbindung in 20 ml destilliertem Wasser aufgelöst wurden und mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt wurde. Das Gemisch wurde 26 h bei 26 °C stehen gelassen. Zu dem Reaktionsgemisch wurden sodann unter Röhren 600 ml kaltes Aceton gegeben, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende wässrige Lösung wurde nach der Verfahrensweise der Stufe A des Beispiels 1 gereinigt, wodurch 932 mg (Ausbeute 53%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 8073 u/mg erhalten wurden.

Beispiel 3

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 40 ml Dimethylsulfoxid wurden 1,5 g Bleomycinsäure (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Zu der gerührten Lösung von 30 °C wurden 740 mg N-Äthoxycarbonyl-2-äthoxy-1,2-dihydrochinolin und 0,1 ml N-Methylmorpholin gegeben. Zu dem Gemisch, das 30 min gerührt worden war, wurden unter Röhren 530 mg der Aminoverbindung gegeben und das Gemisch wurde 3 h lang bei 30 °C stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde sodann unter Röhren mit 600 ml kaltem Aceton versetzt, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende wässrige Lösung wurde in ähnlicher Weise wie in Stufe A des Beispiels 1 behandelt, wodurch 809 mg (Ausbeute 46%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers erhalten wurden, das eine antimikrobielle Aktivität von 8028 u/mg zeigte.

Beispiel 4

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 40 ml destilliertem Wasser wurden 1,5 g Bleomycinsäure (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Nach Zugabe von 1,2 g 1-Äthyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid von 27 °C wurde das Gemisch mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-

Beispiel 5

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 16 ml Methanol wurden 9,0 g Bleomycinsäure-3-N-benzoylaminopropylester-monohydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Unter Kühlen auf 0 °C wurde die Lösung mit 9,16 g der Aminoverbindung versetzt. Nach weiterem 40-stündigen Röhren bei 0 °C wurde kaltes Aceton zu dem Reaktionsgemisch gegeben, um die Reaktionsprodukte auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen und in 300 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die Lösung wurde sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und in eine Säule 1 CM-Sephadex C-25 (NH₄⁺-Typ), gepackt in 0,05M-wässrige Ammoniumchloridlösung, enthielt, um die Bleomycine adsorbieren zu lassen. Unter Verwendung von wässriger Ammoniumchloridlösung als Elutionsmittel wurde die Elution durchgeführt, wobei durch die Säule 10 l eines Elutionsmittels geleitet wurden, bei dem die Konzentration von Ammoniumchlorid kontinuierlich von 0,05 auf 1,0M erhöht wurde. Der nicht-umgesetzte 3-N-Benzoylaminopropylester der Bleomycinsäure wurde in dem Abstrom bei einer Ammoniumchloridkonzentration von etwa 0,2M festgestellt. Das NK631 wurde bei einer Ammoniumchloridkonzentration von etwa 0,45M festgestellt. Beide Fraktionen, die eine UV-Absorption bei 272 mμ zeigten, wurden gesondert gesammelt. Die NK631 enthaltende Fraktion wurde in eine Harzsäule gegossen, die 1,3 l Amberlite XAD-2 enthielt. Die Säule wurde sodann gründlich mit Wasser gewaschen und mit 0,01N-Salzsäure in einem Methanol/Wasser-Gemisch (4:1 V/V) eluiert. Insgesamt 2,5 l der blauen Fraktion, die eine UV-Absorption bei 292 mμ zeigte, wurden gesammelt. Nachdem das Methanol abdestilliert worden war und der pH-Wert mit Dowex 44 (OH⁻-Typ) auf 6,0 eingestellt worden war, wurde die Fraktion gefriergetrocknet, wodurch 8,2 g (Ausbeute 90%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers erhalten wurden, das eine antimikrobielle Aktivität von 8030 u/mg hatte.

Durch eine ähnliche Behandlung wurden 910 mg nicht-umgesetztes Bleomycinsäure-3-N-benzoylaminopropylester-monohydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) gewonnen.

Beispiel 6

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 3 ml Methanol wurden 950 mg Bleomycinsäure-3-N-p-tolulsulfonylaminopropylester-monohydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Zu der Lösung wurden unter Röhren bei 0 °C 980 mg der Aminoverbindung gegeben und das Gemisch wurde 48 h bei 0 °C gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden unter Röhren 15 ml kaltes Aceton gegeben, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-

Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende Lösung wurde nach der Verfahrensweise der Stufe A des Beispiels 5 gereinigt, wodurch 833 mg (Ausbeute 85%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers erhalten wurden, das eine antimikrobielle Aktivität von 8010 u/mg hatte.

Beispiel 7

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 5 ml Dimethylformamid wurden 850 mg Bleomycinsäure-3-acetylaminopropylester-monohydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Zu der Lösung wurden unter Röhren bei 0 °C 950 mg der Aminoverbindung gegeben und das Gemisch wurde 45 h bei 0 °C gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden unter Röhren 20 ml kaltes Aceton zugesetzt, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende Lösung wurde in der gleichen Weise wie in Stufe A des Beispiels 5 behandelt, wodurch 570 mg (Ausbeute 63%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 8010 u/mg erhalten wurden.

Beispiel 8

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 3 ml Dimethylsulfoxid wurden 900 mg Bleomycinsäure-3-N-(2,4-dinitrophenyl)-aminopropylester-monohydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Zu der Lösung wurden unter Röhren bei 0 °C 793 mg der Aminoverbindung gegeben und das Gemisch wurde 24 h bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Röhren mit 15 ml kaltes Aceton versetzt, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende wässrige Lösung wurde nach der Verfahrensweise der Stufe A des Beispiels 5 gereinigt, wodurch 690 mg (Ausbeute 78%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 8010 u/mg erhalten wurden.

Beispiel 9

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) und des kupferfreien Dihydrochlorids:

In 10 ml Methanol wurden 1,0 g Bleomycinsäure-3-amino-propylester-dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Die heftig gerührte Lösung wurde tropfenweise mit 104 mg Benzoylchlorid im Verlauf von 30 min versetzt, wobei der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-octan bei 6,5 bis 7,5 gehalten wurde. Nach weiterem 30-minütigen Röhren wurde das Reaktionsgemisch auf 2 ml konzentriert. Zu dem konzentrierten Material, das auf 0 °C abgekühlt war, wurden unter Röhren 1,1 g der Aminoverbindung gegeben und das Gemisch wurde 72 h bei 0 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Röhren mit 6 ml kaltes Aceton versetzt, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende wässrige Lösung wurde in eine Säule gegossen, die 100 ml CM-Sephadex (NH_4^+ -Typ), gepackt in eine 0,05M-wässrige Ammoniumchloridlösung, enthielt, um die Bleomycin-komponenten adsorbieren zu lassen. Das adsorbierte Material

wurde in ähnlicher Weise wie in Stufe A des Beispiels 5 behandelt, wodurch 779 mg (Ausbeute 73%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 8000 u/mg erhalten wurden.

Zusätzlich wurden 240 mg nicht-umgesetztes Bleomycinsäure-3-N-benzoylaminopropylester-monohydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) wiedergewonnen.

Stufe B: In 20 ml destilliertem Wasser wurden 700 mg 10 NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form), erhalten in Stufe A oben, aufgelöst. Die Lösung wurde in eine Säule gegossen, die 65 ml Diaion HP-40, gepackt in destilliertes Wasser enthielt, um die Bleomycinkomponenten adsorbieren zu lassen. Die Säule wurde sodann mit 200 ml einer wässrigen Lösung, die 15 5% EDTA-Na₂ enthielt, sodann mit 250 ml einer 5%igen wässrigen Natriumchloridlösung und schliesslich mit 100 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Säule wurde sodann mit einem Gemisch aus Methanol und 0,0025N-wässriger Salzsäure (1:1 V/V) eluiert. 98 ml einer Fraktion mit einer UltraviolettabSORPTION bei 290 m μ wurden gesammelt. Nach dem Abdestillieren des Methanols bei verminderter Druck wurde die zurückgebliebene Flüssigkeit mit Dowex 44 (OH⁻-Typ) auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und gefriergetrocknet, wodurch 658 mg (Ausbeute 98%) NK631-Dihydrochlorid (kupferfreie Form) in 25 Form eines hell-gelblich weissen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 7834 u/mg erhalten wurden.

Beispiel 10

30 Synthese von NK631-Monosulfat (Kupfer enthaltende Form) und des Diessigsäuresalzes (kupferfreie Form):

Stufe A: In 10 ml Methanol wurden 1,0 g Bleomycinsäure-3-aminopropylester-dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Die heftig gerührte Lösung wurde bei Raumtemperatur tropfenweise mit 104 mg Benzoylchlorid im Verlauf von 30 min versetzt, während der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von N-Methylmorpholin bei 5,0 bis 7,5 gehalten wurde.

Nach weiteren 30-minütigen Röhren wurde das Reaktionsgemisch mit 50 ml Aceton versetzt, um die Bleomycinkomponen-

40 ten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen und erneut in 3 ml Methanol aufgelöst. Zu der Methanol-Lösung wurden unter Kühlen auf 0 °C und Röhren 597 mg Aminoverbindung gegeben und das Gemisch wurde 42 h bei 0 °C gerührt. Zu dem Reaktionsge-

45 misch wurden unter Röhren 10 ml kaltes Aceton gegeben, um das Reaktionsprodukt zur Ausfällung zu bringen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die

50 wässrige Lösung wurde mit CM-Sephadex in ähnlicher Weise wie in Stufe A des Beispiels 5 behandelt. Die Fraktion, die die Reaktionsprodukte enthielt, wurde in eine Säule gegossen, die 65 ml Diaion HP-40 gepackt in destilliertes Wasser, enthielt, um die Bleomycinkomponenten auf dem Harz adsorbieren zu

55 lassen. Nach dem Waschen mit Wasser wurde die adsorbierte Phase mit einem Gemisch aus Methanol und 0,01N-wässriger Schwefelsäure (1:1 V/V) eluiert. 130 ml einer Fraktion, die eine UltraviolettabSORPTION bei 292 m μ zeigte, wurden gesammelt. Nach dem Abdestillieren des Methanols wurde die zurückge-

60 bliebene Flüssigkeit mit Dowex 44 (OH⁻-Typ) auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt und gefriergetrocknet, wodurch 813 mg (Ausbeute 75%) NK631-Monosulfat (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 7819 u/mg erhalten wurden.

65 Stufe B: Die Kupferentfernungsbehandlung von 800 mg des NK631-Monosulfats (Kupfer enthaltende Form), erhalten in Stufe A oben, wurde in der gleichen Weise wie in Stufe B des Beispiels 9 durchgeführt, mit der Ausnahme, dass in der Elu-

tionsstufe eine 5%ige wässrige Ammoniumacetatlösung und ein Gemisch aus Methanol und 0,01N-wässrige Essigsäure (1:1 V/V) anstelle der 5%igen wässrigen Natriumchloridlösung bzw. des Gemisches aus Methanol und 0,0025N-wässriger Salzsäure (1:1 V/V) verwendet wurden. Auf diese Weise wurden 748 mg (Ausbeute 96%) NK631-Diessigsäuresalz (kupferfreie Form) in Form eines hellgelblich weissen amorphen Pulvers erhalten. Das UV-Absorptionsmaximum und die antimikrobielle Aktivität dieses Produkts sind wie folgt:

UV-Absorptionsmaximum:

$\text{m}\mu$ (E 1% 0,1N-HCl)
1 cm

290 (105)
Antimikrobielle Aktivität: 7620 u/mg.

Beispiel 11

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) und des kupferfreien Dihydrochlorids:

In 3 ml Methanol wurden 1,0 g Bleomycinsäure-3-amino-propylester-dihydrochlorid aufgelöst. Die Lösung wurde tropfenweise bei Raumtemperatur mit 193 mg S-tert.-Butoxycarbonyl-4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidin im Verlauf von 60 min versetzt, während der pH-Wert durch Zugabe von 14% Triäthylamin in Methanol bei 6,0 bis 7,4 gehalten wurde. Das Gemisch wurde weitere 2 h gerührt, wodurch der 3-N-tert.-Butoxycarbonylaminopropylester der Bleomycinsäure erhalten wurde. Das Gemisch wurde sodann auf 0 °C abgekühlt, mit 1,2 g der Aminoverbindung vermischt und 70 h lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 10 ml kaltem Aceton versetzt, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende wässrige Lösung wurde nach der Verfahrensweise der Stufe A des Beispiels 5 gereinigt, wodurch 597 mg (Ausbeute 56%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 8010 u/mg erhalten wurden.

Stufe B: In 50 ml Methanol wurden 500 mg NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form), erhalten in Stufe A oben, aufgelöst. In die heftig gerührte Lösung wurde Schwefelwasserstoff durch eine Düse mit einem Innendurchmesser von 1 mm, die in die Lösung eingetaucht war, 1 h lang eingeleitet, um einen grossen Überschuss von Schwefelwasserstoff in der Lösung aufzulösen. Nach Beendigung der Einführung von Schwefelwasserstoff wurde die Lösung 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das ausgefällte Kupfersulfid wurde abfiltriert und mit 50 ml Methanol gewaschen, das mit Schwefelwasserstoff gesättigt war. Das Filtrat und die Waschwässer wurden kombiniert und von Methanol und Schwefelwasserstoff durch Destillation unter verminderterem Druck befreit. Der Rückstand wurde in 50 ml Methanol aufgelöst und mit 100 ml Äthyläther vermischt. Der gebildete Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Äther gewaschen und getrocknet, wodurch 394 mg (Ausbeute 82%) von NK631-Dihydrochlorid (kupferfreie Form) in Form eines hellgelblich weissen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 7820 u/mg erhalten wurden.

Beispiel 12

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) und des kupferfreien Dihydrochlorids:

Stufe A: In 2 ml Methanol wurden 1,0 g Bleomycinsäure-3-aminopropylester-dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Zu der heftig gerührten Lösung von Raumtemperatur

wurden 98 mg Salicylaldehyd gegeben, während der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Triäthylamin bei 7,0 bis 7,4 gehalten wurde. Auf diese Weise wurde Bleomycinsäure-3-N-salicylideminopropylester erhalten. Nach 1-stündigem weitergeführten Röhren wurde das auf 0 °C abgekühlte Gemisch unter Röhren mit 600 mg der Aminoverbindung versetzt. Das Gemisch wurde 30 h lang gerührt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden 10 ml kaltes Aceton gegeben, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt, mit Aceton gewaschen, sodann in 30 ml destilliertem Wasser aufgelöst und sofort mit 0,1N-Salzsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die resultierende wässrige Lösung wurde wie in Stufe A des Beispiels 5 gereinigt, wodurch 501 mg (Ausbeute 47%) NK 631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) mit einer antimikrobiellen Aktivität von 8013 u/mg erhalten wurden.

Stufe B: In 25 ml einer 0,5N-wässrigen Salzsäurelösung wurden 450 mg NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form), erhalten in Stufe A oben, aufgelöst. Zu der Lösung wurden 25 ml einer Chloroformlösung, enthaltend 0,2% Dithizon (Diphenylthiocarbazon) gegeben. Nach heftigem Schütteln und Mischen wurde das Gemisch stehen gelassen. Hierdurch schied sich das Gemisch in zwei Schichten ab. Die untere Schicht (Chloroformschicht) wurde abgezogen und die obere Schicht wurde mit 25 ml einer frischen Chloroformlösung, die Dithizon enthielt, vermischt. Die obigen Massnahmen des Schüttels, der Phasentrennung und der Zugabe einer frischen Chloroformlösung, die Dithizon enthielt, wurde achtmal wiederholt. Schliesslich wurde die obere Schicht (wässrige Schicht) mit Chloroform gewaschen und die abgetrennte wässrige Schicht wurde mit Dowex 44 (OH⁻-Typ) auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Die auf diese Weise behandelte wässrige Schicht wurde bei verminderterem Druck zur Trockene eingedampft, wodurch 415 mg (Ausbeute 96%) NK631-Dihydrochlorid (kupferfreie Form) in Form eines hellgelben weissen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 7845 u/mg erhalten wurden.

Beispiel 13

Synthese von NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form):

In 2 ml Methanol wurden 1,0 g Bleomycinsäure-3-amino-propylester-dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) aufgelöst. Zu der auf 0 °C abgekühlten Lösung wurden unter Röhren 1,0 g der Aminoverbindung gegeben und das Gemisch wurde weitere 72 h lang gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Röhren mit 6 ml kaltem Aceton versetzt, um die Bleomycinkomponenten auszufällen. Der Niederschlag wurde wie in Stufe A des Beispiels 5 gereinigt, wodurch 128 mg (Ausbeute 12%) NK631-Dihydrochlorid (Kupfer enthaltende Form) in Form eines blauen amorphen Pulvers mit einer antimikrobiellen Aktivität von 8015 u/mg erhalten wurden.

Referenzbeispiel 1

Synthese von N-[*(S*)-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan:
Zu 50 g (*S*)-1-Phenyläthylamin von 0 °C wurden unter Kühlen 33 g Acrylnitril gegeben. Das Gemisch wurde in einen Kolben gebracht, der mit einem Rückflusskühler ausgestattet war, welcher an ein Calciumchloridrohr angeschlossen war. Das Gemisch wurde auf 93 °C erhitzt, bei welcher Temperatur das Gemisch 18 h lang gerührt wurde. Nach beendigter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch von überschüssigem Acrylnitril durch Destillation unter verminderterem Druck befreit. Der Rückstand wurde unter verminderterem Druck destilliert. Eine Fraktion mit einem Siedepunkt von 142 bis 145 °C/7 mm Hg wurde gesammelt, wodurch 53,5 g 3-[*(S*)-1'-Phenyläthylamino]-propionitril erhalten wurden. Dieses Nitril wurde in einen Autoklaven zusammen mit 5 g Raney-Nickle W-7 und 50 ml Äthanol, das 15% Ammoniak enthielt, gegeben. Das Gemisch

wurde mit einer Geschwindigkeit von 1000 Upm 1,5 h lang bei 50 bis 58 °C und bei einem Wasserstoffpartialdruck von 100 bis 40 kg/cm² gerührt. Nach beendigter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch bei verminderter Druck destilliert. Eine Frak-

tion mit einem Siedepunkt von 95 bis 103 °C/2 mm Hg wurde gesammelt, wodurch 48,3 g N-[*(S)*-1'-Phenyläthyl]-1,3-diaminopropan erhalten wurden [66% theoretische Ausbeute von (*S*)-1-Phenyläthylamin].

634 582
2 Blätter Nr. 1*

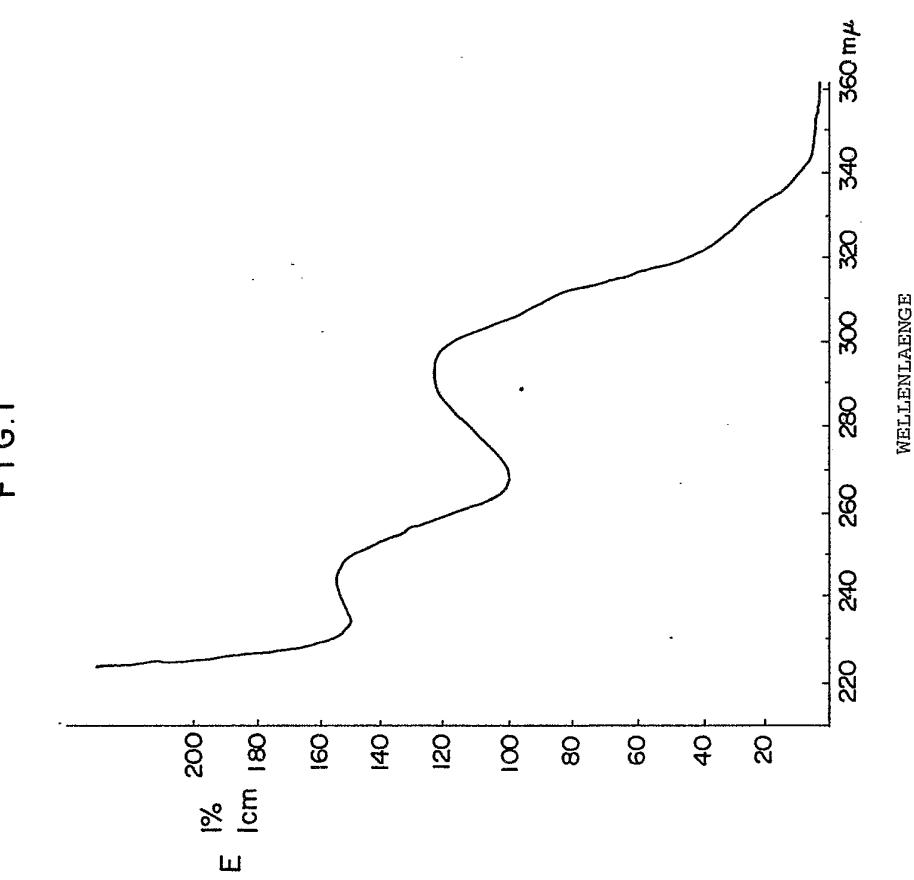
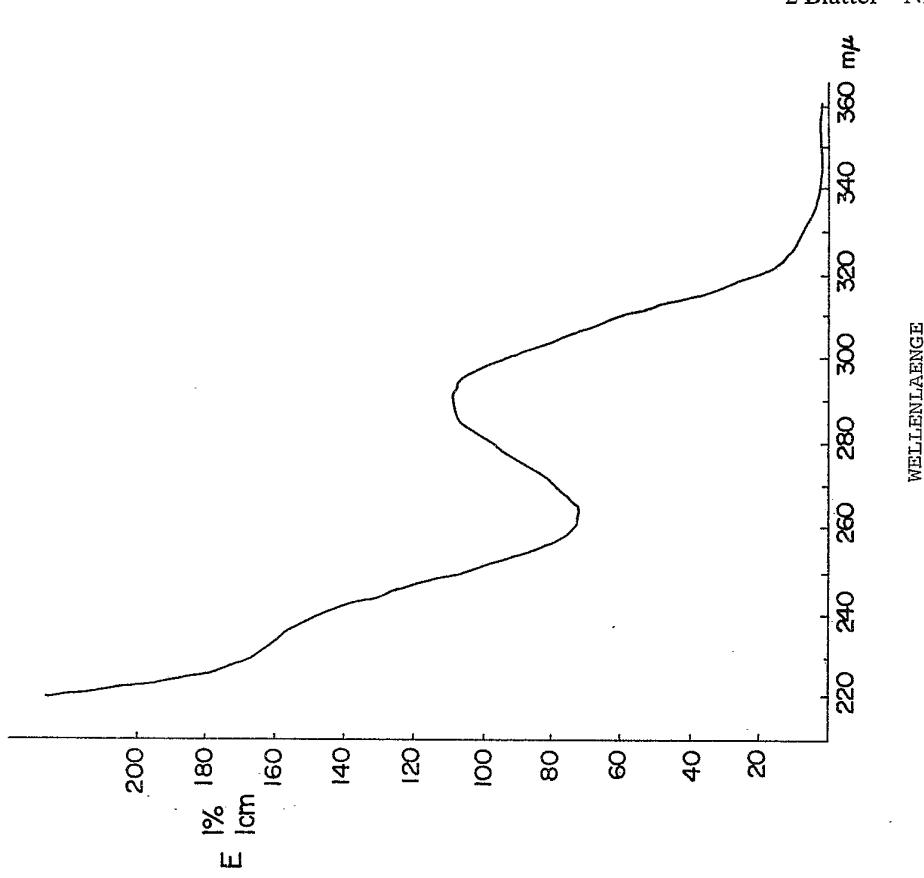


FIG. 2



634 582

2 Blätter Nr. 2*

FIG.3

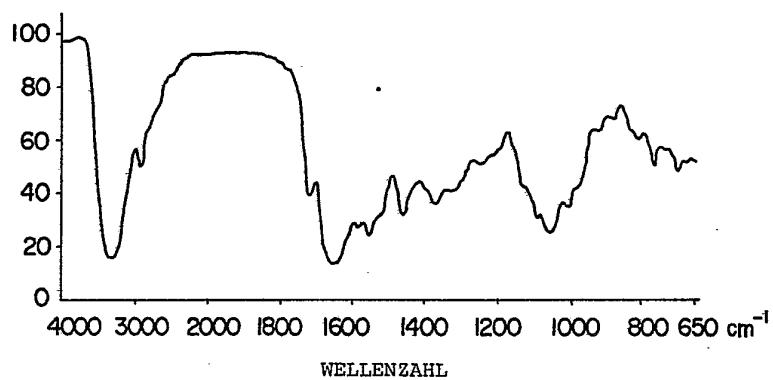


FIG.4

