



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

**205126**  
(11) (B2)

(22) Přihlášeno 29 06 78  
(21) (PV 4301-78)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 14 10 77  
[122485/77] Japonsko

(40) Zveřejněno 31 07 80

(45) Vydáno 15 01 84

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 H 15/26//  
A 61 K 31/71

(72)  
Autor vynálezu

TAKITA TOMOHISA, ASAKA-SHI, FUJII AKIO, KAMAKURA-SHI,  
FUKUOKA TAKEYO, TOKIO, MURAOKA YASUHIKO, KITAMOTO-SHI,  
YOSHIOKA OSAMU, YONO-SHI, UMEZAWA HAMAO, TOKIO [Japonsko]

(73)  
Majitel patentu

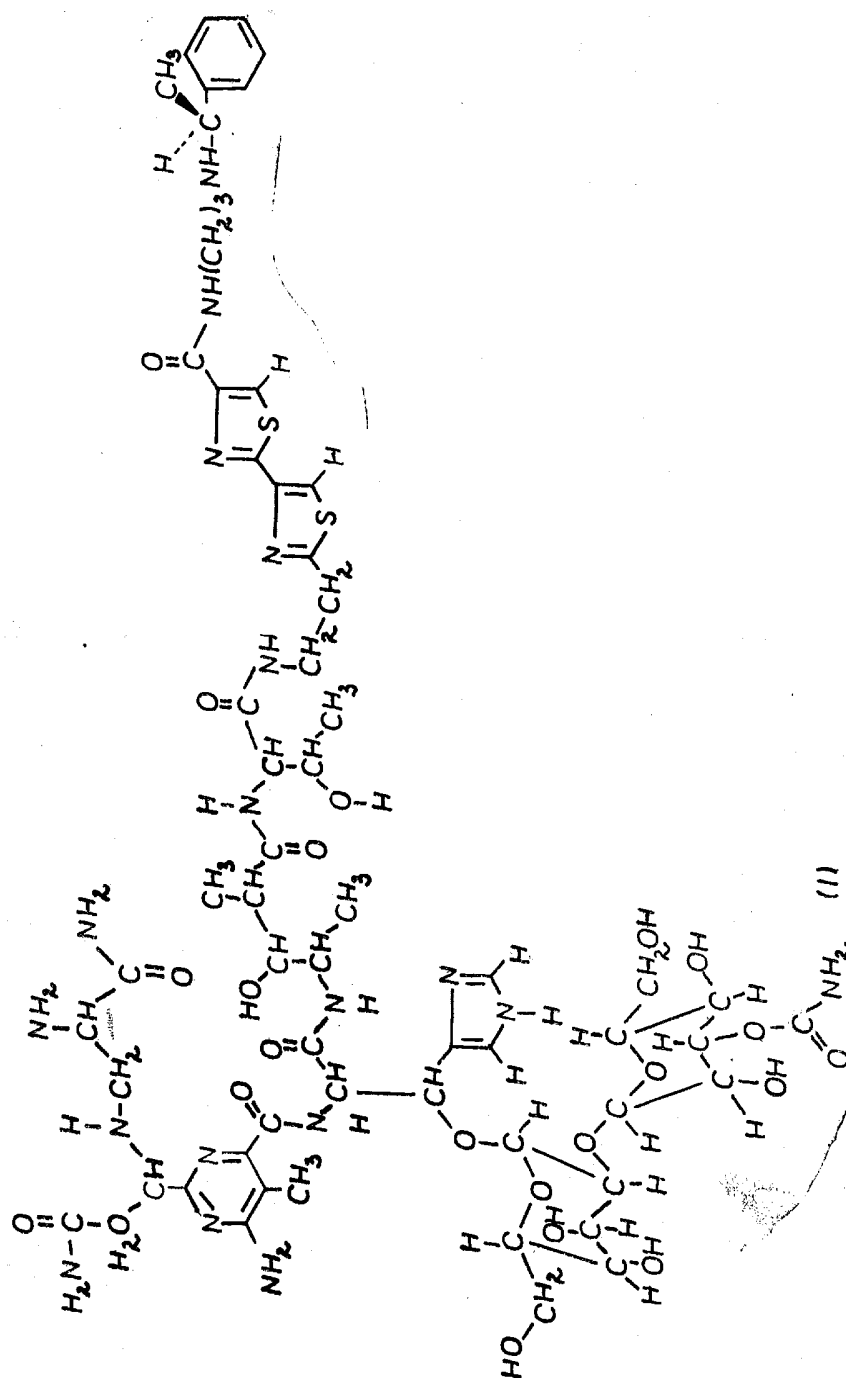
NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA, TOKIO [Japonsko]

(54) Způsob výroby 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu  
a jeho netoxických solí

**1**

**2**

Vynález se týká způsobu výroby nového 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylamino-  
bleomycinu vzorce I a jeho netoxických solí.



Bleomyciny jsou karcinostatická antibiotika objevená Umezawou, jedním z autorů předloženého vynálezu, a jeho spolupracovníky [Journal of Antibiotics, 19A, 200 (1966)]. Jsou to ve vodě rozpustné basické glykopeptidy produkované kmenem aktinomyces *Streptomyces verticillus*, které snadno tvoří cheláty s jedním atomem dvojmocné mědi. Při normální kultivaci je produkováno 16 složek bleomycinu, které byly všechny izolovány [viz například Umezawa a spolupracovníci, Journal of Antibiotics, 19A, 210 (1966)]. Ze známých bleomycinů se k léčbě rakoviny v klinické praxi všeobecně po-

užívá směs mědi prostých bleomycinů A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>5</sub>, B<sub>2</sub> a demethyl-A<sub>2</sub> (pro tuto směs se v dalším popisu používá názvu „bleomycinový komplex“). Zmíněný bleomycinový komplex se osvědčil hlavně v terapii epidermálních karcinomů kůže, karcinomů hlavy a krku, rakoviny krčku děložního, plic a maligního lymfomu.

Pokud se týká vedlejších účinků, bylo referováno, že u léčených pacientů dochází k fibrose plic a k dalším nežádoucím účinkům. Z vedlejších účinků vyvolávaných bleomycinem je nejobávanější fibrosa plic. Lze si snadno představit, že karcinostatická účinnost

bleomycinů by se při klinické aplikaci ještě více projevila, kdyby se shora uvedený vedlejší účinek podařilo více či méně potlačit.

Vzhledem k těmto okolnostem zabývali se autoři vynálezu několik let syntesou různých bleomycinů a v testech na zvířatech sledovali jejich karcinostatickou účinnost a toxicitu, včetně vlivu na vyvolání fibrosy plic jako hlavního testu. Výsledkem jejich studia bylo, že objevili 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycin (v dalším popisu je tento nový bleomycin označován symbolem „NK 631“, který zahrnuje jak formu obsahující měď, tak formu prostou mědi), který je novým bleomycinem získaným reakcí reaktivního derivátu karboxylové skupiny bleomycinové kyseliny s N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanem, a u kterého je výrazně potlačen vedlejší účinek způsobující fibrosu plic, přičemž jeho karcinostatická účinnost není ve srovnání s komerčním bleomycinovým komplexem a jinými známými bleomycinů snížena. Na základě tohoto objevu byl realizován předložený vynález. Účelem vynálezu je zajistit způsob výroby nového bleomycinu vzorce I, 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu, a jeho netoxických solí. Bližší podrobnosti vynálezu vyplynou z následujícího popisu.

Vynikající biologická aktivita nového bleomycinu vzorce I vyplývá z níže uvedených experimentálních testů.

Biologická účinnost bleomycinu NK 631 byla hodnocena tím způsobem, že byla srov-

nána s účinností monosulfátu 3-[(R,S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu (formy prosté mědi) (v dalším popisu je pro tento bleomycin používáno označení „RS-forma“) a s účinností bleomycinového komplexu ve čtyřech následujících testech:

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

Ke srovnání použita RS forma bleomycinu byla získána fermentačním způsobem, popsaným v US patentu číslo 3 846 400.

- 1) Toxicita vůči plícím u myši (vliv na vznik fibrosy)

K testování byly použity dvanáctičetné skupiny myších samců kmene ICR ve stáří 15 týdnů. Každý testovaný farmaceutický přípravek byl aplikován v dávce 5 mg/kg. Dávky byly podávány ve formě intraperitoneálních injekcí, jednou denně, po dobu deseti po sobě následujících dnů. Po skončení aplikace byly myši chovány dalších 5 týdnů. Po uvedené době pozorování byly myši usmrceny a pitvou zjištěn rozsah fibrosy plic. Byl porovnán výskyt a stupeň fibrosy plic vyvolané u myši po podávání nového bleomycinu vzorce I, obchodního bleomycinového komplexu a RS formy antibiotika. Nalezené výsledky jsou uvedeny v tabulce I.

Tabulka 1

|                                             | Výskyt fibrosy                             |                      | Stupeň onemocnění                                               |                      |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------|----------------------|
|                                             | Počet myší<br>s pulmonární<br>fibrosou (%) | Relativní<br>hodnota | Celkové bodové<br>stupně fibrosy plic*:<br>celkový počet vzorků | Relativní<br>hodnota |
| Monosulfát<br>NK 631 (forma<br>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<br>komplex                     | 11/12 (0,92)                               | 1,0                  | 24/36 (0,67)                                                    | 1,0                  |

\*/ Hodnocení stupně fibrosy plic:

0 bodu — žádná fibrosa

1 bod — hromadění exudátu v plicních sklípcích a fibrose podobné změny v alveolárních přepážkách

2 body — fibrosa na několika místech plic

4 body — roztroušená fibrosa

6 bodů — fibrosa na více než dvou třetinách celé plochy plic

Jak je zřejmé z nalezených výsledků, je fibrosa plic vyvolaná monosulfátem NK 631 (formou prostou mědi), ve srovnání s fibrosou plic vyvolanou RS formou antibiotika a bleomycinovým komplexem snížena asi na 1/2, popřípadě 1/3, pokud se týká výskytu, a asi na 1/2, popřípadě 1/4, pokud se týká stupně onemocnění. Z toho vyplývá výhodnost monosulfátu NK 631 pro klinické použití.

## 2. Antineoplastická účinnost

### 2 až 1. Účinek in vitro na kultury HeLa S<sub>3</sub> buněk

Pro každý shora uvedený bleomycin bylo stanoveno procento inhibice růstu buněk po 72 hodinách kultivace v přítomnosti testovaného bleomycinu a vypočteno hodnota ID<sub>50</sub>. Bylo nalezeno, že látka NK 631 má ID<sub>50</sub> = 0,82 µg/ml, na rozdíl od bleomycinového komplexu, který má ID<sub>50</sub> = 1,70 µg/ml, což znamená, že bleomycin NK 631 inhibuje růst buněk dvakrát silněji než bleomycinový komplex. Hodnota ID<sub>50</sub> pro RS formu an-

tibiotika je rovna 0,80 µg/ml, což znamená, že jeho inhibiční efekt na růst buněk je srovnatelný s efektem monosulfátu NK 631 (formy prosté mědi).

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

Myším samcům kmene ICR, starým 6 týdnů, bylo transplantováno podkožně do tříselné oblasti každému po  $2 \times 10^6$  buněk. Po 24 hodinách byl každé myši podán testovaný preparát stejným způsobem jak bylo popsáno výše v testu 1. Patnáctý den po subkutánní transplantaci byly myším nádory odstraněny a jejich hmotnosti byly srovnány s hmotností nádorů, které se vyvinuly u kontrolní skupiny myši, které nebyly ošetřeny, a bylo stanoveno procento inhibice.

Jak je zřejmé z tabulky 2, je karcinostatická účinnost monosulfátu NK 631 (formy prosté mědi) srovnatelná s účinností RS formy antibiotika a asi 1,4× vyšší než účinnost bleomycinového komplexu.

Tabulka 2

| Dávka mg/kg × 10              | monosulfát NK 631<br>(prostý mědi) | Procenta inhibice<br>RS forma | bleomycinový<br>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 <sub>50</sub><br>mg/kg/den | 0,35                               | 0,31                          | 0,49                    |

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

Krysám kmene Donryu bylo transplantováno intraperitoneálně po  $1 \times 10^6$  AH 66 buněk. Za 24 hodin po transplantaci bylo započato s aplikací testovaného preparátu,

který byl podáván intraperitoneálně jednou denně po dobu deseti po sobě následujících dnů. Během 30 dnů po transplantaci byla sledována hmotnost jednotlivých krys a počet uhynulých a přežívajících zvířat. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Relativní hodnoty průměrného přežití zvířat (počet dnů)

| Dávka<br>mg/kg × 10 | monosulfát NK 631<br>(prostý mědi) | RS forma<br>antibiotika | bleomycinový<br>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 3, je účinnost monosulfátu 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. Inhibiční účinek vůči epidermálnímu karcinomu kůže vyvolávanému 20-methylcholanthrenem

Roztok 20-methylcholanthrenu (dále označovaný jako „20-MC“) v acetonu byl dvakrát týdně, po dobu 18 týdnů, lokálně aplikován na ostrihaný hřbet myši kmene ddy (sam-

ci 10 týdnů starí). Za pět týdnů od začátku aplikace 20-MC bylo započato s podáváním testovaného preparátu, který byl aplikován intraperitoneálně v dávce 62,5  $\mu\text{g}/\text{myš}$ , dvakrát týdně, po dobu 15 týdnů. Během prvního týdne po skončení podávání testovaného preparátu byla pathologicky vyšetřována oblast kůže, na kterou byl aplikován 20-MC a sledován výskyt karcinomu.

Jak vyplývá z tabulky 4, jsou monosulfát NK 631 (forma prostá mědi) a RS-forma antibiotika o něco málo účinnější pokud se týká inhibice karcinogenesy vyvolané 20-MC, než bleomycinový komplex.

Tabulka 4

|                                 | Úmrtnost | Výskyt karcinomů (%) | Procento inhibice |
|---------------------------------|----------|----------------------|-------------------|
| Monosulfát NK 631 (prostý mědi) |          | 5/11 (45,4)          | 47,8              |
| RS-forma                        | 1/12     | 5/11 (45,5)          | 47,8              |
| Bleomycinový komplex            | 2/12     | 5/10 (50,0)          | 42,5              |
| kontrola                        | 1/24     | 20/23 (86,9)         | 0                 |

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

nismům *Mycobacterium* 607 a *Bacillus subtilis* PCI byla zjišťována diskovou metodou za použití bleomycinu A<sub>2</sub> jako standardu (1000 j/mg). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

### 3. Antimikrobiální účinnost

Antimikrobiální účinnost vůči mikroorga-

Tabulka 5

|                                 | M. 607 | B. Sub. |
|---------------------------------|--------|---------|
| monosulfát NK 631 (prostý mědi) | 7 848  | 1 550   |
| RS-forma                        | 7 535  | 1 400   |
| bleomycinový komplex            | 1 234  | 886     |

Jak vyplývá z tabulky 5, vykazují monosulfát NK 631 (forma prostá mědi) a RS forma antibiotika mnohem vyšší antimikrobiální mohutnost než bleomycinový komplex.

Jak vyplývá z tabulky 6, jsou hodnoty LD<sub>50</sub> u krysy nalezené pro monosulfát NK 631 (formy prosté mědi) přibližně stejně vysoké jako hodnoty nalezené u bleomycinového komplexu a RS formy antibiotika.

### 4. Toxicita

4—1. Akutní toxicita u krys (LD<sub>50</sub>) při intraperitoneálním podávání

Tabulka 6

|       |                                    | LD <sub>50</sub><br>mg/kg | Meze spolehlivosti<br>(5% hranice<br>významnosti) |
|-------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|
| krysa | monosulfát NK 631<br>(prostý mědi) | 155,0                     | 133,6—179,8                                       |
|       | RS forma                           | 150,6                     | 129,0—170,6                                       |
|       | bleomycinový<br>komplex            | 168,0                     | 130,0—217,0                                       |

#### 4—2. Subakutní a chronická toxicita u krys a psů

Subakutní a chronická toxicita monosulfátu NK 631 (formy prosté mědi) u krys a psů je srovnatelná s analogickou toxicitou bleomycinového komplexu. Je však třeba se speciálně zmínit o tom, že v místě vpichu injekce byla pozorována u psů nekrosa ve všech případech, kdy byly podány vysoké dávky bleomycinového komplexu (90 injekcí v dávce 1,2 mg/kg), ale v žádném případě, kdy byla podána psům stejná dávka monosulfátu NK 631 (formy prosté mědi). Toxicita monosulfátu NK 631 (formy prosté mědi) vůči plicím je rovněž nižší než toxicita bleomycinového komplexu.

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

#### 5. Souhrn

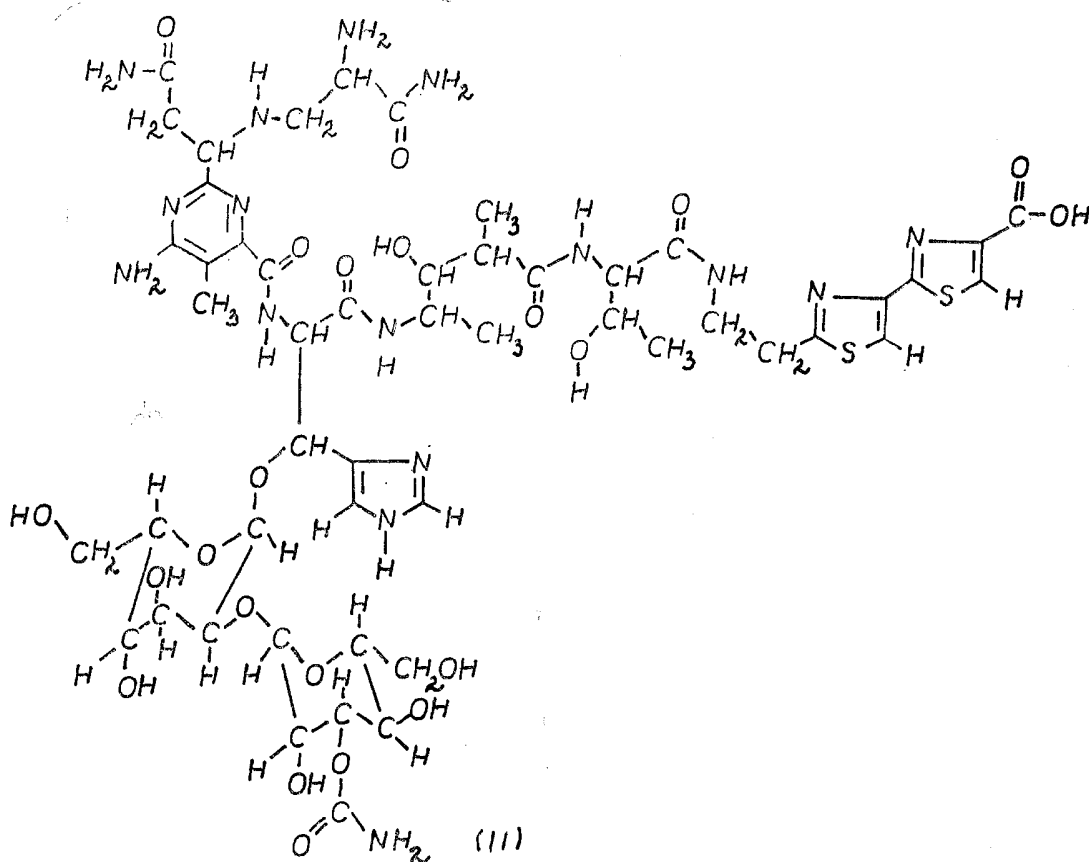
Ze shora uvedených výsledků testů lze

učinít závěr, že bleomycin NK 631 jest nová sloučenina mající následující výhodné vlastnosti:

- extrémně nízkou toxicitu vůči plicím,
- antimikrobiální a antineoplastickou účinnost vyšší než komerční bleomycinový komplex,
- systemickou toxicitu srovnatelnou s toxicitou komerčního bleomycinového komplexu, a
- nízkou lokální toxicitu v místě vpichu injekce.

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

Podstata výroby nového bleomycinu NK 631 shora uvedeného vzorce I způsobem podle vynálezu je v tom, že se kyselina bleomycinová vzorce II



Kyselina bleomycinová používaná jako výchozí látka při postupu jest známá slouče-

K fenylethylaminu, ochlazenému asi na 0 °C, se přidá asi ekvivalentní množství akrylonitrilu a reakce se dokončí zahříváním směsi na 80 °C až 100 °C po dobu 10 až 24 hodin. Přebytek akrylonitrilu se oddestiluje za sníženého tlaku a zbývající surový produkt se předestiluje za sníženého tlaku. Získaný 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propionitril se zredukuje obvyklým způsobem, například vodíkem v přítomnosti Raneyova niklu, a získá se žádaný N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropan (v dalším popisu je tato látka označována jako „aminosloučenina“). Fyzikálně-chemické vlastnosti uvedeně aminosloučeniny jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7

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

|                                                                                                                                                                                                                       | Volná base                                                                                                      | Dihydrochlorid                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Vzhled                                                                                                                                                                                                             | při teplotě místnosti<br>bezbarvá kapalina                                                                      | bílé jehličkovité krystalky                                                                                          |
| 2. Teplota tání                                                                                                                                                                                                       | —                                                                                                               | 223,5 — 224 °C                                                                                                       |
| 3. Teplota varu                                                                                                                                                                                                       | 95 — 103 °C při 0,267 kPa                                                                                       | —                                                                                                                    |
| 4. Absorpční maxima<br>v ultrafialové oblasti<br>(nm)                                                                                                                                                                 | 241, 247, 252, 257, 263<br>267 (methanol)                                                                       | 250, 256, 259, 266<br>(destilovaná voda)                                                                             |
| 5. Molekulární extinkční<br>koeficient, $\epsilon$ (256 nm)                                                                                                                                                           | —                                                                                                               | 206 (destilovaná voda)                                                                                               |
| 6. Specifická optická<br>otáčivost $[\alpha]_D^{25}$<br>$D_D^{26}$                                                                                                                                                    | —<br>—56,38 ° (neředěno, $\lambda = 1$ )                                                                        | —20,6 ° ( $c = 1$ , destilovaná<br>voda)<br>—                                                                        |
| 7. Hodnota $R_F$ při tenko-<br>vrstevné chromatografii,<br>soustava n-propanol-pyri-<br>din-kys.octová-voda<br>(15 : 10 : 3 : 12, obj/obj),<br>deska zn. Avicel-SF <sup>R</sup>                                       | 0,73                                                                                                            | 0,73                                                                                                                 |
| 8. Hodnota $R_m$ při vysoko-<br>voltové elektroforese,<br>soustava kys. mravenčí-<br>-kys. octová-voda<br>(25 : 75 : 900, obj/obj),<br>deska zn. Avicel-SF <sup>R</sup> ,<br>800 V, 10 min., $R_m$ alani-<br>nu = 1,0 | 1,52                                                                                                            | 1,52                                                                                                                 |
| 9. IČ absorpční spektrum,<br>$\text{cm}^{-1}$ , KBr tableta                                                                                                                                                           | 700, 760, 820, 910, 1025,<br>1080, 1130, 1200, 1305, 1350,<br>1370, 1450, 1495, 1605, 2850,<br>2940, 3300, 3375 | 690, 750, 820, 910, 980,<br>1020, 1065, 1075, 1150, 1205,<br>1385, 1460, 1500, 1515, 1590,<br>2500, 2850, 3000, 3500 |
| 10. Sumární vzorec<br>(molekulová hmotnost)                                                                                                                                                                           | $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2$<br>(178,28)                                                              | $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Cl}_2$<br>(251,20)                                                        |

Jako vhodných aktivačních činidel lze při postupu podle vynálezu používat například

6-chlor-1-p-chlorbenzensulfonyloxybenzo-  
triazolu (CCBT),

N-ethyl-5-fenylisoxazolium-3'-sulfonátu  
(NEPIS),

N-terc.butyl-5-methylisoxazoliumperchlorá-  
tu,

N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochi-  
nolinu,

di-p-nitrofenylsulfitu,

tri-p-nitrofenylfosfitu,

p-nitrofenyl-trichloracetátu,

N-hydroxysukcinimidu,

dicyklohexylkarbodiimidu (DCC),

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodi-  
imidu,

1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)karbodi-  
imidu,

difenylkarbodiimidu,

di-p-toluyلكarbodiimidu,

diisopropylkarbodiimidu,

p-nitrofenolu,  
pentachlorfenolu a  
benzylalkoholu.

#### Podrobný popis postupu

Kyselina bleomycinová (forma obsahující měď) se rozpustí ve vodě, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu nebo v jejich směsích. K roztoku se při teplotě 0 °C až 30 °C, za míchání, přidá jedno ze shora uvedených aktivačních činidel. Získaný roztok se upraví na pH 3 až 10, které je vhodné k aktivaci karboxylové skupiny, přidáním buď anorganické kyseliny nebo base, jako kyseliny chlorovodíkové nebo hydroxidu sodného, nebo přidáním organické kyseliny nebo base, jako kyseliny trichloroctové nebo N-methyl-morfolinu. Po uvedeném úpravě dojde k aktivaci karboxylové skupiny bleomycinové kyseliny. Bezprostředně poté, nebo během 30 minut po úpravě pH, se k roztoku této reakční složky přidá aminosloučenina (definovaná výše), buď jako taková nebo ve formě roztoku upraveného na pH 7,0. Reakční směs se udržuje 1 až 24 hodin při teplotě 0 až 30 °C, přičemž proběhne reakce a vznikne bleomycin NK 631 vzorce 1. Vhodný poměr reakčních složek jest 1 až 10 ekvivalentů aktivačního činidla nebo aminosloučeniny na 1 ekvivalent kyseliny bleomycinové.

Za účelem izolace látky NK 631 z reakční směsi se nejprve bleomycinové složky úplně vysráží přidáním 5 až 10 objemů acetonu na 1 objem reakční směsi. Vyloučená sraženina se odfiltruje, promyje důkladně acetonem a rozpustí v nejmenším možném objemu destilované vody. Získaný vodný roztok se okamžitě upraví kyselinou chlorovodíkovou nebo podobnou kyselinou na pH 6,0 a nanese se na horní konec chromatografického sloupce, připraveného z CM-Sephadexu <sup>®</sup> C-25

(NH<sub>4</sub><sup>+</sup> forma; vyráběný firmou Pharmacia Fine Chemicals), rozmíchaného ve vodném roztoku chloridu amonného. Nezreagovaná kyselina bleomycinová projde sloupcem aniž by byla adsorbována. Bleomycin NK 631 se adsorbuje na pryskyřici a eluuje se vodným roztokem chloridu amonného se stoupající koncentrací, zvyšující se stupňovitě nebo plynule od 0,05 M do 1,0 M. Bleomycin NK 631 jest obsažen v modře zbarvených frakcích, vytékajících ze sloupce při koncentracích asi 0,35 M až 0,45 M chloridu amonného, které vykazují absorpci v ultrafialové oblasti při 292 nm. Uvedené frakce se separátně spojí a nechají se protéci přes sloupec Amberlitu <sup>®</sup> XAD-2 (výrobek firmy

Rohm and Haas Co.) nebo Diaionu <sup>®</sup> HP 40 (výrobek firmy Mitsubishi Chemical Co.). Adsorbovaný bleomycin NK 631 se promyje vodou a pak se eluuje; získá se solí zbarvený efluent, ze kterého se získá čistý, modře

zbarvený, amorfni práškovitý NK 631. Hydrochlorid nebo síran bleomycinu NK 631 se získají elucí látky ze sloupce vodným methanolem obsahujícím kyselinu chlorovodíkovou, popřípadě kyselinu sírovou. Při tomto postupu se s výhodou regeneruje nezreagovaná kyselina bleomycinová.

Shora popsáný způsob, při kterém se k izolaci bleomycinu NK 631 používá CM-Sep-

hadexu <sup>®</sup> C-25 (obchodní značka pro měnič kationtů, tvořený mikroskopickými kuličkami karboxymethylovaného derivátu polysacharidu dextranu, vyráběný a prodáváný firmou Pharmacia Fine Chemicals Inc., Švédsko), jest uveden jen jako názorný příklad, a lze ho v určitých mezích modifikovat, aniž by se tím podstatněji ovlivnily výsledky. Tak například lze použít jako elučního činidla vodného roztoku chloridu sodného nebo síranu amonného.

Uvedeným postupem získaný bleomycin NK 631 obsahuje měď, které se dá zbavit kteroukoliv známou metodou, například působením sirovodíku, při kterém se měď vysráží ve formě sírníku měďnatého, nebo vyredukováním mědi ve formě kovu vhodným redukčním činidlem (postupem podle US patentu číslo 3 646 197), nebo extrakcí mědi organickým rozpouštědlem obsahujícím chelatotvorné činidlo, jako dithizon [viz Umezawa a spolupracovníci, Journal of Antibiotics, 19A, 210 (1960)], nebo pomocí neionogenní makroskopicky síťované výměnné pryskyřice (postupem podle US patentu číslo 3 929 993). Jeden příklad způsobu odstraňování mědi jest popsán níže.

Bleomycin NK 631 (forma obsahující měď) se rozpustí v destilované vodě a roztok se nalije na sloupec pryskyřice značky Amber-

lite <sup>®</sup> XAD-2 (obchodní značka pro absorpční pryskyřici na bázi styren-divinylbenzenového kopolymeru, vyráběnou a prodávanou firmou Rohm & Haas Co., USA) nebo

pryskyřice značky Diaion <sup>®</sup> HP 40 (obchodní značka pro absorpční pryskyřici tvořenou styren-divinylbenzenovým kopolymerem, vyráběnou a dodávanou firmou Mitsubishi Chemical Co., Japonsko), připravený rozmícháním pryskyřice v destilované vodě. Sloupec s naadsorbovaným bleomycinem NK 631 se promyje 5% vodným roztokem dvojsodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (v dalším je tato látka označována jako „EDTA.Na<sub>2</sub>“), přičemž se měďnatý iont roztokem EDTA.Na<sub>2</sub> vymyje ze sloupce a na pryskyřici zůstane naadsorbován bleomycin NK 631 prostý mědi. Pryskyřice se promyje za účelem odstranění EDTA.Na<sub>2</sub> vodným roztokem vhodné soli, jako chloridu sodného, síranu sodného nebo octanu sodného, a pak destilovanou vodou. Posléze se sloupcem nechá protékat okyselená směs methanolu s vodou, jako například směs methanolu s 0,0025 N kyselinou chlorovodíkovou (1 : 1, V/V), přičemž se eluuje látka mající absorp-

ci v ultrafialové oblasti při 290 nm. Frakce s touto absorpcí se spojí, zahustí, roztok se upraví na pH 6,0 a rozpouštědlo se odstraní lyofilizací. Získá se dihydrochlorid NK 631 (forma prostá mědi) ve formě světležlutě bílého amorfního prášku.

K přípravě okyseleného vodného methanolu potřebného k eluci se dá použít jakékoliv farmaceuticky vhodné kyseliny. Použije-li se například kyseliny sírové nebo kyseliny octové, získá se uvedeným postupem práškovitý monosulfát nebo diacetát bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi).

Bleomycin NK 631 vzorce I lze převádět obvyklými způsoby na jiné netoxické soli, jako například na sulfát nebo sůl s kyselinou octovou, které lze rovněž získat tak, že se, jak bylo uvedeno výše, příslušným způsobem zamění kyselina používaná při eluci bleomycinu ze sloupce.

Vzhledem k tomu, že při postupu 1 reaguje aminosloučenina s karboxylovou skupinou kyseliny bleomycinové aktivovanou přítomností aktivačního činidla používaného při syntese polypeptidů, probíhá kondensační reakce hladce a za extrémně mírných podmínek. V důsledku toho reaguje s akti-

vovanou karboxylovou skupinou pouze primární aminoskupina aminosloučeniny, zatím co sekundární iminoskupina se reakce nezúčastňuje, a při reakci vzniká přednostně bleomycin NK 631. To je významná přednost postupu.

Základní fyzikálně-chemické vlastnosti bleomycinu NK 631 jsou uvedeny v tabulkách 8 a 9.

Strukturní vzorec I bleomycinu NK 631 byl potvrzen následujícím způsobem: monosulfát NK 631 (forma prostá mědi) byl rozpouštěn v těžké vodě a změřeno jeho  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrum metodou potlačení protonového šumu, za použití dioxanu jako vnitřního standardu. Signály příslušející všem jedenácti  $^{13}\text{C}$  atomům obsaženým ve zbytku 3-[S]-1'-fenylethylamino]propylaminu v postranním řetězci bleomycinu NK 631 byly zaznamenány při 19,4, 26,3, 37,0, 43,5, 58,9, 128,3 (dva signály), 130,0 (dva signály) a 136,3 ppm. Signály vyvolané ostatními atomy uhlíku odpovídají signálům charakteristickým pro látky bleomycinové skupiny [viz Naganawa a spolupracovníci, Journal of Antibiotics, 30, 388 (1977)].

Tabulka 8

Fyzikálně-chemické vlastnosti bleomycinu NK 631  
(formy obsahující měď)

| Sůl                                                                                              | Dihydrochlorid                                                                                                                                 | Monosulfát                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Vzhled                                                                                        | modrý amorfni prášek                                                                                                                           | modrý amorfni prášek          |
| 2. Rozpustnost                                                                                   | rozpustný ve vodě, methanolu, dimethylsulfoxidu, dimethylformamidu; málo rozpustný v dioxanu; nerozpustný v ethanolu, acetonu, etheru, benzenu | stejná jako u dihydrochloridu |
| 3. Teplota tání (rozkladu), °C                                                                   | 205 až 207                                                                                                                                     | 205 až 207                    |
| 4. Specifická rotace (destilovaná voda, $c = 1,0$ )<br>[ $\alpha$ ] <sub>436</sub> <sup>25</sup> | −95,6°                                                                                                                                         | −93,7°                        |
| 5. TL-chromatografie <sup>1/</sup><br>$R_F$ hodnota                                              | a) 0,72      b) 0,75                                                                                                                           | a) 0,72      b) 0,75          |
| 6. Elektroforeza <sup>2/</sup><br>RM hodnota (alanin = 1)                                        | 0,80                                                                                                                                           | 0,80                          |

Poznámky:

<sup>1/</sup> a) na tenké vrstvě Silica Gelu G <sup>®</sup> (obchodní značka adsorbentu pro tenkovrstevnou chromatografii, tvořený silikagelem, vyráběný firmou Merck Inc., USA), v soustavě methanol — 10% octan amonný — 10% amoniak (10 : 9 : 1, obj/obj).

b) na tenké vrstvě Avicelu SF <sup>®</sup> (obchodní značka adsorbentu pro tenkovrstevnou chromatografii, tvořený krystalinickou celulosou, vyráběný firmou FMC corporation, USA), v soustavě n-propanol — pyridin — kyselina octová — voda (13 : 10 : 3 : 12).

<sup>2/</sup> Na Avicelu SF <sup>®</sup> v soustavě kyselina mravenčí — kyselina octová — voda (25 : 75 : : 900, obj/obj); 800 V; 15 minut.

Tabulka 9

Fyzikálně-chemické vlastnosti bleomycinu NK 631  
(formy prosté mědi)

| Sůl                                                                                                     | Dihydrochlorid                                                                                                                                                  | Monosulfát                                     | Diacetát                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 1. Vzhled                                                                                               | světle žlutobíle<br>zbarvený amorfní<br>prášek                                                                                                                  | světle žlutobíle<br>zbarvený amorfní<br>prášek | světle žlutobíle<br>zbarvený amorfní<br>prášek |
| 2. Rozpustnost                                                                                          | Rozpustný ve vodě, methanolu, kyselině octové, dimethylsulfoxidu, dimethylformamidu; málo rozpustný v dioxanu; nerozpustný v ethanolu, acetonu, etheru, benzenu |                                                |                                                |
| 3. Teplota tání<br>(rozkladu),<br>°C                                                                    | 195—197                                                                                                                                                         | 196—198                                        | 188—190                                        |
| 4. Specifická rotace<br>(destilovaná voda,<br>c = 1,0)<br>[α] <sub>D</sub> <sup>25</sup> <sub>436</sub> | −2,1°                                                                                                                                                           | −2,0°                                          | −2,0°                                          |
| 5. TL-chromatografie,<br><sup>1/</sup><br>R <sub>F</sub> hodnota                                        | a) 0,56    b) 0,70                                                                                                                                              | a) 0,56    b) 0,70                             | a) 0,56    b) 0,70                             |
| 6. Elektroforesa, <sup>2/</sup><br>R <sub>m</sub> hodnota (alanin = 1)                                  | 0,94                                                                                                                                                            | 0,94                                           | 0,94                                           |

Poznámky:

<sup>1/</sup> a) Silica Gel G (E); methanol — 10% octan amonný — 10% amoniak (10 : 9 : 1, obj/obj)

b) Avicel SF (R); n-propanol — pyridin — kyselina octová — voda (15 : 10 : 3 : 12)

<sup>2/</sup> Avicel SF (R); kyselina mravenčí — kyselina octová — voda (25 : 75 : 900, obj/obj); 800 V; 15 minut.

V příloze jsou na obrázcích 1 a 2 znázorněny ultrafialové absorpční křivky, a na obrázcích 3 a 4 infračervené absorpční křivky bleomycinu NK 631 vzorce I.

Obrázek 1 znázorňuje ultrafialovou absorpční křivku dihydrochloridu 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu (formy obsahující měď), obrázek 2 ultrafialovou absorpční křivku monosulfátu 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu (formy prosté mědi), na obrázku 3 je znázorněna infračervená absorpční křivka dihydrochloridu 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu (formy obsahující měď) měřená v tabletě bromidu draselného, a na obrázku 4 je znázorněna infračervená absorpční křivka 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu (formy prosté mědi) změřená rovněž v tabletě bromidu draselného.

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

## Příklady provedení

### Příklad 1

Synthesa dihydrochloridu (formy obsahující měď) a monosulfátu (formy prosté mědi) bleomycinu NK 631

Stupeň A: K roztoku 15,0 g kyseliny bleomycinové (formy obsahující měď) ve 400 ml dimethylformamidu se za chlazení na 0 °C přidá 1,1 ml N-methylmorpholinu a 10,3 gramu činidla CCBT, roztok se míchá 5 minut při 0 °C, pak se k němu přidá 5,3 g aminosloučeniny a směs se míchá další 1 hodinu. Reakce se přeruší přidáním 200 ml 25% vodného roztoku kyseliny octové a roztok se zředí 5 litry chladného acetonu. Vysrážený surový reakční produkt se odfiltruje, promyje acetonem a rozpustí v 500 ml destilované vody. Vodný roztok se ihned okyslí na pH 6,0 a nalije na sloupec připravený ze 2 litrů CM-Sephadexu (R) C-25 (NH<sub>4</sub>

+ forma] nasuspendovaného v 0,05 M vodném roztoku chloridu amonného.

Naadsorbované bleomyciny se eluují vodným roztokem chloridu amonného tím způsobem, že se sloupцем nechá protéci 20 litrů eluentu, ve kterém koncentrace chloridu amonného kontinuálně stoupá z 0,05 M na 1,0 M. Nezreagovaná kyselina bleomycinová vytéká ze sloupce při koncentraci chloridu amonného asi 0,05 M, a bleomycin NK 631 při koncentraci chloridu amonného asi 0,45 M. Frakce obsahující shora uvedené bleomyciny, vykazují absorpci v ultrafialové oblasti při 292 nm, se separátně spojí.

Frakce obsahující bleomycin NK 631 se nalije na sloupec iontoměniče, připravený ze 2,6 litrů Amberlitu  $\textcircled{R}$  XAD-2. Sloupec s naadsorbovanou látkou se promyje důkladně vodou a produkt se eluuje 0,01 N roztokem kyseliny chlorovodíkové ve směsi methanolu s vodou (4 : 1, obj/obj). Jímá se celkem 2,5 litrů modře zbarvených frakcí, které vykazují UF absorpci při 292 nm. Ze spojených eluátů se odpaří methanol, vodný koncentrát se upraví na pH 6,0 Dowexem

$\textcircled{R}$  44 v  $\text{OH}^-$  formě (obchodní značka pro anexovou pryskyřici složenou z kopolymeru epichlorhydrinu s amoniakem, vyráběnou a dodávanou firmou Dow Chemical Co., USA) a rozpouštědlo se odstraní lyofilisací. Získá se 16,1 g (výtěžek 92 %) dihydrochloridu bleomycinu NK 631 (formy obsahující měď) ve formě modře zbarveného amorfního prášku.

Podobným způsobem se z dříve přecházejících frakcí zregeneruje 280 mg nezreagované kyseliny bleomycinové (formy obsahující měď).

Získaný dihydrochlorid bleomycinu NK 631 (forma obsahující měď) má následující spektrální a antimikrobiální charakteristiky:

Absorpční maxima v ultrafialové oblasti:

| $\lambda_{\text{max}}$ (nm) | E 1cm | 1% destilovaná voda |
|-----------------------------|-------|---------------------|
| 242                         | (151) |                     |
| 292                         | (121) |                     |

Antimikrobiální mohutnost: 8 100 j/mg

Poznámka:

Antimikrobiální mohutnost byla stanovena za použití *Mycobacteria smegmatis* ATCC 607 jako testovacího mikroorganismu, ve srovnání s antibakteriální mohutností bleomycinu A<sub>2</sub> (formy prosté mědi) rovné 1 000 j/mg. Stejným způsobem byla testována antimikrobiální mohutnost u níže uvedených bleomycinů.

Stupeň B: Roztok 10 g dihydrochloridu bleomycinu NK 631 (formy obsahující měď)

ve 200 ml destilované vody se nalije na sloupec Amberlitu  $\textcircled{R}$  XAD-2, připravený nasuspendováním 600 ml iontoměniče v destilované vodě. Sloupec se postupně promývá 2 litry 5% vodného roztoku EDTA.Na<sub>2</sub>, 2,5 litry 5% vodného roztoku síranu sodného a 630 ml destilované vody. Poté se produkt ze sloupce eluuje 0,0025 N roztokem kyseliny sírové ve směsi methanolu s vodou (1 : 1, obj/obj). Jímají se frakce obsahující látku vykazující absorpci v UF oblasti při 290 nm (celkem 900 ml). Ze spojených frakcí se oddestiluje methanol, zbývající vodný roztok se upraví Dowexem  $\textcircled{R}$  44 (v  $\text{OH}^-$  formě) na pH 6,0 a rozpouštědlo se odstraní lyofilisací. Získá se 9,3 g (výtěžek 95 %) monosulfátu bleomycinu NK 631 (formy prosté mědi) ve formě světle žlutobíle zbarveného amorfního prášku. Uvedený produkt má následující spektrální a antimikrobiální charakteristiky:

Absorpční maxima v ultrafialové oblasti:

| $\lambda_{\text{max}}$ (nm) | E 1cm | 1% 0,1 N HCl |
|-----------------------------|-------|--------------|
| 290                         | (106) |              |

Antimikrobiální mohutnost: 7 865 j/mg.

Příklad 2

Synthesa dihydrochloridu NK 631 (formy obsahující měď)

K roztoku 1,5 g kyseliny bleomycinové (formy obsahující měď) ve 40 ml destilované vody se za míchání, při teplotě 26 °C, přidá 800 mg činidla NEPIs, přičemž se pH reakční směsi udržuje přidáváním 0,01 N vodného roztoku hydroxidu sodného v rozmezí 4,8 až 5,5. Po 30 minutách se ke směsi přidá roztok připravený rozpuštěním 1,8 g aminosloučeniny ve 20 ml destilované vody a upravením pH kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 7,0. Reakční směs se nechá stát 20 hodin při 26 °C a pak se k roztoku za míchání přidá 600 ml chladného acetonu. Vyloučená sraženina bleomycinových složek se odfiltruje, promyje acetonem, rozpustí ve 30 ml destilované vody a roztok se ihned okyslí 0,1 N kyselinou chlorovodíkovou na pH 6,0. Získaný vodný roztok se čistí způsobem popsaným ve stupni A příkladu 1 a získá se 932 mg (výtěžek 53 %) dihydrochloridu bleomycinu NK 631 (formy obsahující měď) ve formě modře zbarveného amorfního prášku vykazujícího antimikrobiální mohutnost rovnou 8 073 j/mg.

## Příklad 3

Synthesa dihydrochloridu NK 631 (formy obsahující měď)

K roztoku 1,5 g kyseliny bleomycinové (formy obsahující měď) ve 40 ml dimethylsulfoxidu se při teplotě 30 °C, za míchání, přidá 740 mg N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinu a 0,1 ml N-methylmorfolinu. Roztok se míchá 30 minut, pak se za stálého míchání přidá 530 mg aminosloučeniny a směs se nechá stát 3 hodiny při 30 stupních Celsia. Bleomycinové složky se za míchání vysráží přidáním 600 ml chladného acetonu, sraženina se odfiltruje, promyje acetonem, rozpustí ve 30 ml destilované vody a roztok se ihned okyslí 0,1 N kyselinou chlorovodíkovou na pH 6,0. Získaný vodný roztok se zpracuje způsobem popsaným ve stupni A příkladu 1 a získá se 809 mg (výtěžek 46 %) dihydrochloridu bleomycinu NK 631 (formy obsahující měď) ve formě modře zbarveného amorfního prášku, který vykazuje antimikrobiální mohutnost 8 028 j/mg.

## Příklad 4

Synthesa dihydrochloridu NK 631 (formy obsahující měď)

K roztoku 1,5 g kyseliny bleomycinové (formy obsahující měď) ve 40 ml destilované vody se při 27 °C přidá 1,2 g hydrochloridu 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu a směs se okyslí 0,1 N kyselinou chlorovodíkovou na pH 4,5. Poté se přidá 530 mg aminosloučeniny, pH roztoku se upraví 1 N kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 5,0 a směs se nechá stát 20 hodin při 27 °C. K reakční směsi se za míchání přidá 400 ml chladného acetonu a vysrážené bleomycinové složky se odfiltrují a promyjí acetonem. Surový produkt se rozpustí ve 30 ml destilované vody a roztok se ihned upraví 0,1 N hydroxidem sodným na pH 6,0. Získaný vodný roztok se čistí způsobem popsaným ve stupni A příkladu 1 a získá se 440 mg (výtěžek 25 %) dihydrochloridu bleomycinu NK 631 (formy obsahující měď) ve formě modře zbarveného amorfního prášku, který vykazuje antimikrobiální mohutnost 7 985 j/mg.

## Příklad 5

Synthesa dihydrochloridu NK 631 (formy obsahující měď)

K roztoku 9,0 g monohydrochloridu 3-N-benzoylaminopropylesteru kyseliny bleomycinové (formy obsahující měď) se za chlazení na 0 °C přidá 9,16 g aminosloučeniny. Reakční směs se míchá 40 hodin při 0 °C a pak se přidá dostatečné množství chladného acetonu, kterým se vysráží reakční pro-

dukty. Sraženina se odfiltruje, promyje acetonem a rozpustí v 300 ml destilované vody. Roztok se ihned okyslí 0,1 N kyselinou chlorovodíkovou na pH 6,0 a nalije na sloupec

připravený z 1 litru CM-Sephadexu (®) C-25 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> forma) rozmíchaného v 0,05 M vodném roztoku chloridu amonného. Sloupec s naadsorbovanými bleomyciny se promývá 10 litry vodného roztoku chloridu amonného, jehož koncentrace se kontinuálně zvyšuje z 0,05 M až na 1,0 M. Nezreagovaný 3-N-benzoylaminopropylester kyseliny bleomycinové se vymývá ze sloupce roztokem chloridu amonného o koncentraci asi 0,2 M, a bleomycin NK 631 chloridem amonným o koncentraci asi 0,45 M. Frakce obsahující tyto bleomyciny, vykazující absorpci v UF oblasti při 272 nm, se separátně spojí. Podíl obsahující bleomycin NK 631 se nalije na sloupec iontoměničové pryskyřice, připrave-

ný z 1,3 litru Amberlitu (®) XAD-2. Sloupec se promyje důkladně vodou a produkt se eluuje 0,01 N roztokem kyseliny chlorovodíkové ve směsi methanolu s vodou (4 : 1, obj/obj). Jímá se celkem 2,5 litrů modře zbarvených frakcí, které vykazují absorpci v UF oblasti spektra při 292 nm. Ze spojených frakcí se oddestiluje methanol, zbylý vodný roztok bleomycinu se upraví Dowexem

(®) 44 (v OH<sup>-</sup> formě) na pH 6,0 a pak se lyofilisuje. Získá se 8,2 g (výtěžek 90 %) dihydrochloridu bleomycinu NK 631 (formy obsahující měď) ve formě modře zbarveného amorfního prášku, který vykazuje antimikrobiální mohutnost 8 030 j/mg.

Podobným způsobem se z dříve přecházejících frakcí získá 910 mg nezreagovaného monohydrochloridu 3-N-benzoylaminopropylesteru kyseliny bleomycinové (formy obsahující měď).

## Příklad 6

Synthesa N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu („aminosloučenina")

K 50 g (S)-1-fenylethylaminu se za chlazení na 0 °C a za míchání 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 zahřívání se přebytečný akrylonitril oddestiluje za sníženého tlaku a zbývající surový produkt se předestiluje za sníženého tlaku; jímá se frakce vroucí při 142 až 145 °C při 0,93 kPa. Získá se 53,5 g 3-[(S)-1'-fenylethylamino]-propionitrilu.

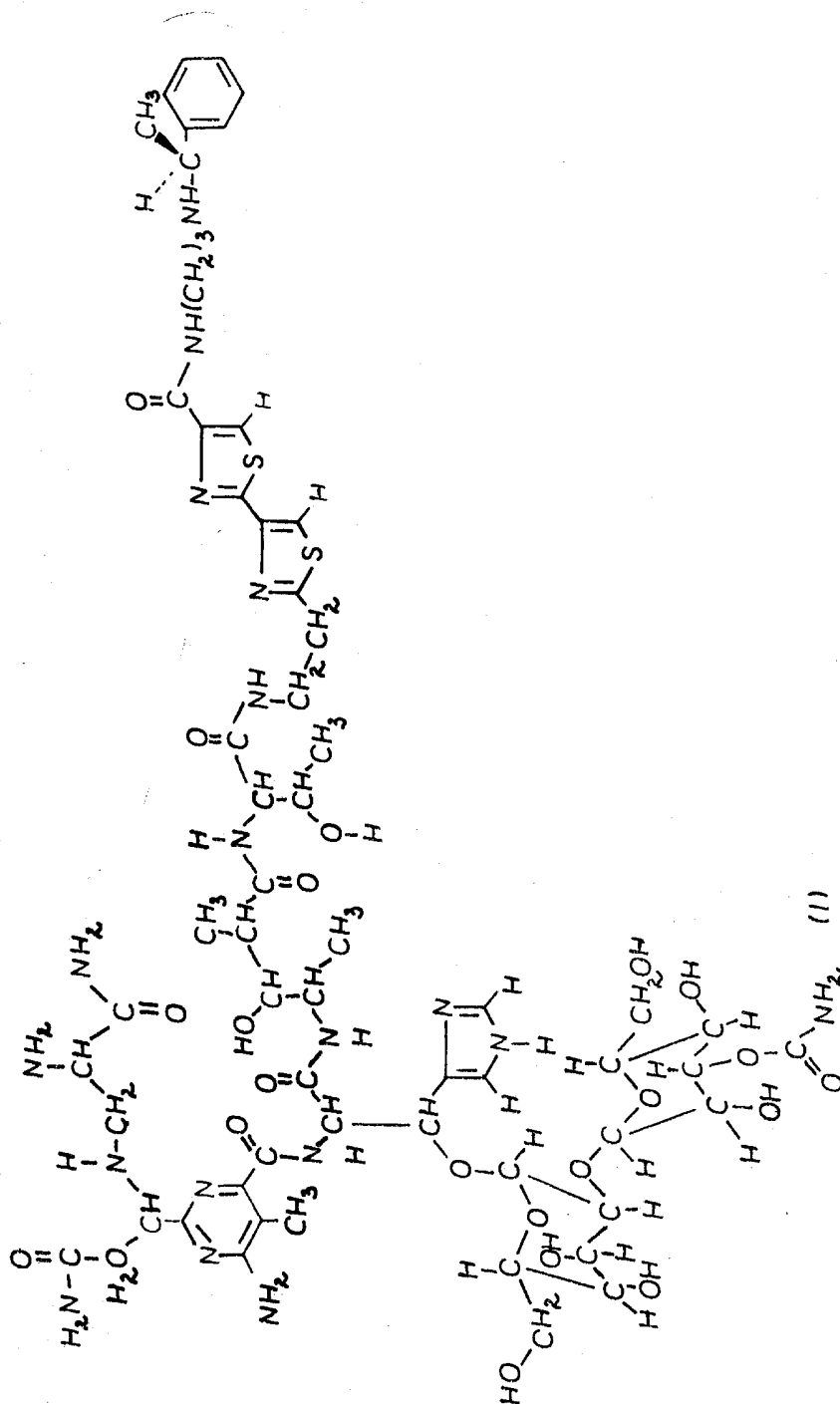
Získaný nitril se vnese do hydrogenačního autoklávu, přidá se 5 g Raneyova niklu W-7 a 50 ml ethanolu obsahujícího 15 % amoniaku a směs se hydrogenuje, za míchání rychlostí 1000 otáček za minutu, při teplotě 50 až 58 °C, vodíkem pod parciálním tla-

kem 10 až 4 MPa po dobu 1,5 hodiny. Po skončení hydrogenace se reakční směs destiluje za sníženého tlaku a jímá se frakce vroucí při 95 až 103 °C při 0,27 kPa. Získá

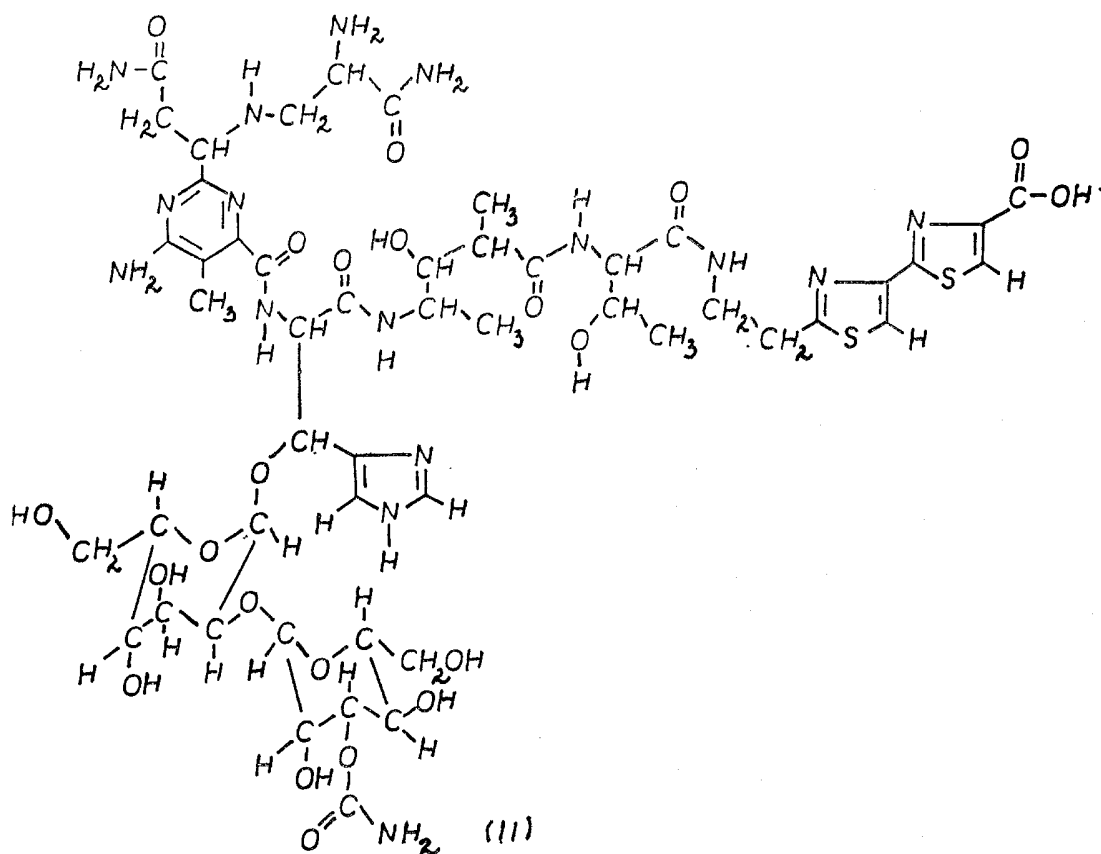
se 48,3 g N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu (výtěžek 66 % teorie, počítáno na výchozí (S)-1-fenylethylamin).

# PŘEDMĚT VYNÁLEZU

## 1. Způsob výroby 3-[(S)-1'-fenylethylamino]propylaminobleomycinu vzorce I



a jeho netoxických solí, vyznačující se tím, že se kyselina bleomycinová vzorce II



uvede do reakce s N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanem v prostředí rozpouštědla a v přítomnosti aktivačního činidla, při teplotě 0 až 30 °C po dobu 1 až 24 hodin, nebo se kyselina bleomycinová uvede do reakce nejprve s aktivačním činidlem a potom s N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanem za uvedených reakčních podmínek, a získaný produkt se popřípadě převede působením kyselinou na příslušnou netoxickou sůl.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se na jeden ekvivalent kyseliny bleomycinové po-

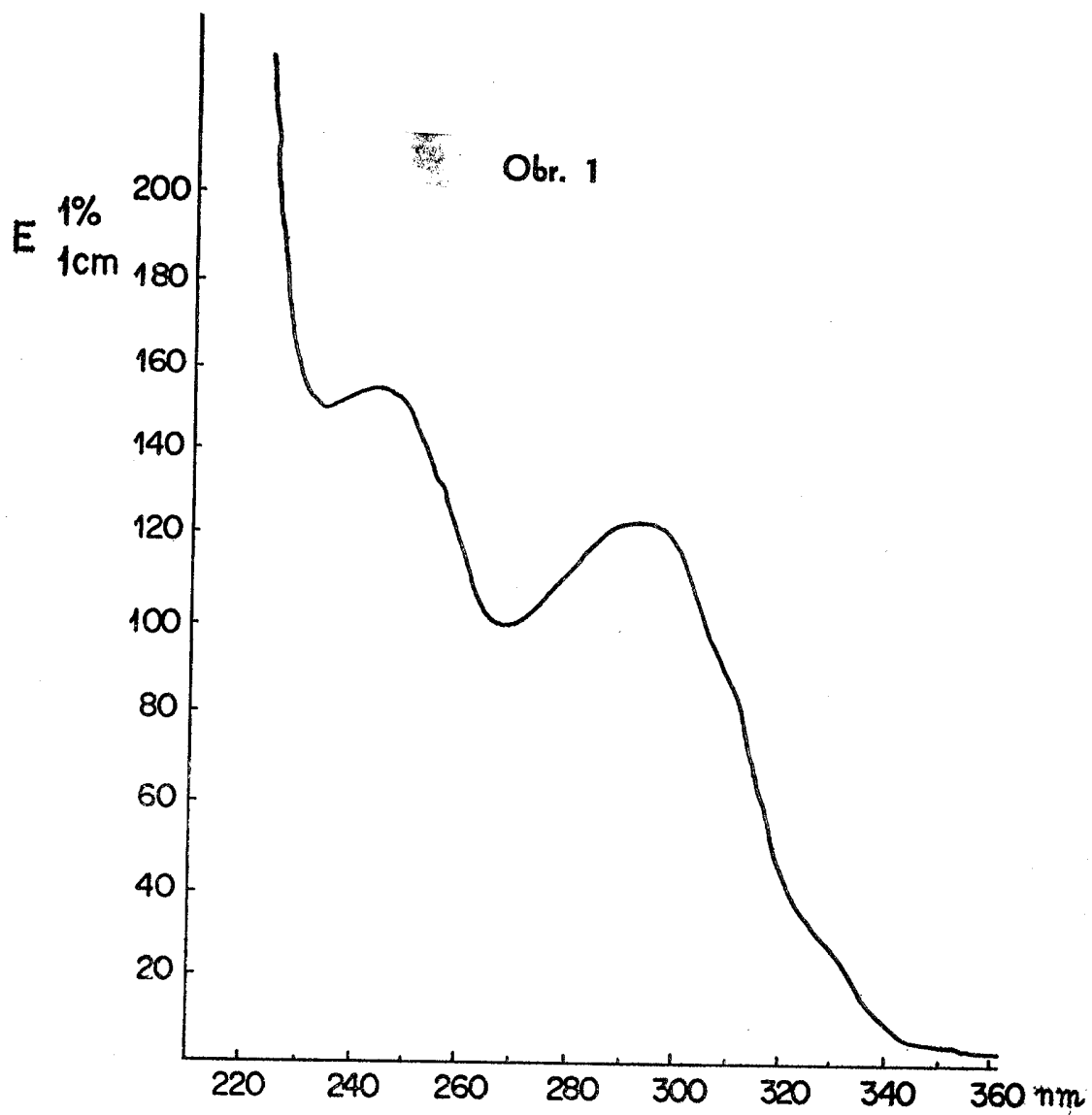
užívá 1 až 10 ekvivalentů N-[(S)-1'-fenylethyl]-1,3-diaminopropanu.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako rozpouštědla používá vody, methanolu, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu nebo jejich směsi.

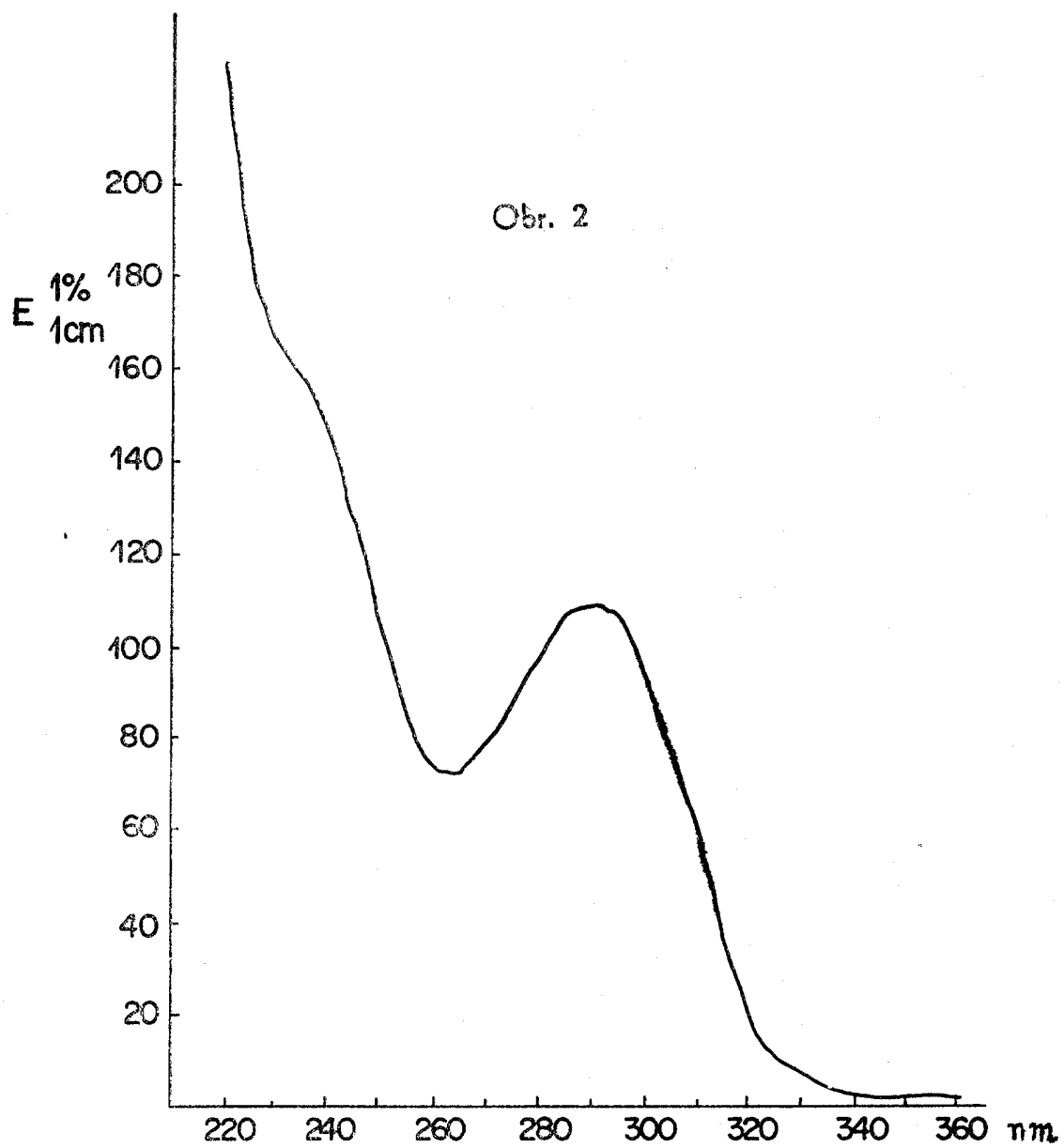
4. Způsob podle bodů 1 až 3 vyznačující se tím, že se získaný produkt převede působením kyseliny chlorovodíkové, kyseliny sírové nebo kyseliny octové na příslušnou netoxickou sůl.

3 listy výkresů

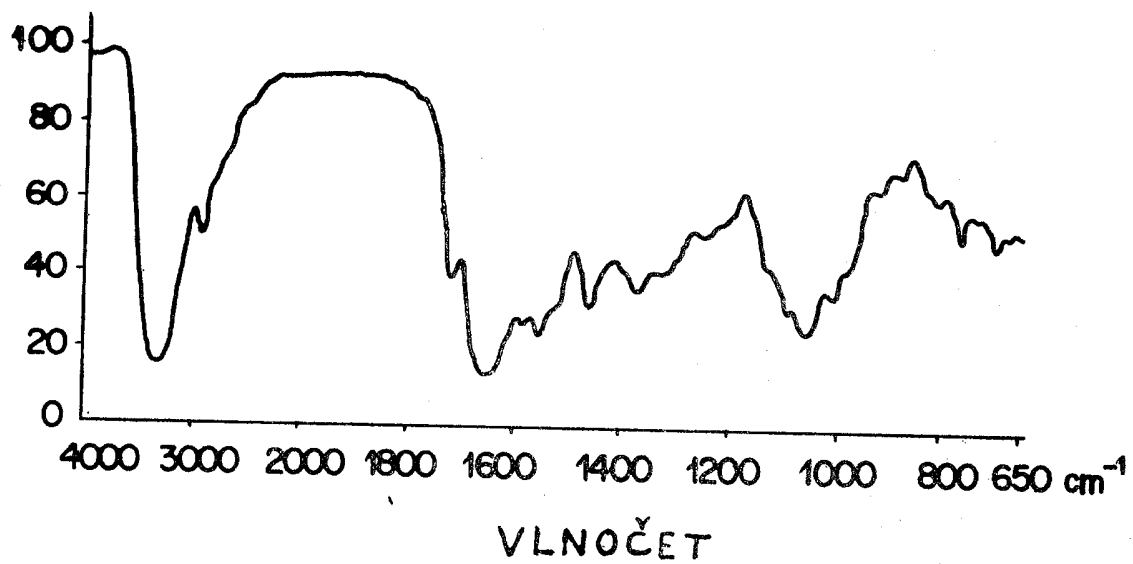
205126



205126



Obr. 3



Obr. 4

