



20 DIC. 1978
Concedido el Registro de Patentes
con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la memoria adjunta.

| | |
|-----------------------|-----------|
| NUMERO | 471.257 |
| FECHA DE PRESENTACION | 29-6-1978 |

10 A1

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|---|--------------------------------|--------------------------------------|
| 30 PRIORIDADES: | | |
| 31 NUMERO | 32 FECHA | 33 PAIS |
| 77770/77 122485/77 | 1-7-1977 14-10-1977 | Japón " |
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 51 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
| | C07H; A61K | |
| 54 TITULO DE LA INVENCION | | |
| "UN METODO PARA PRODUCIR 3-[(S) -1'-FENILETILAMINO/PROPILAMINO BLEOMICINA" | | |
| 71 SOLICITANTE (S) | | |
| NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA | | (A 3112-10 KAYAKU) |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE | | |
| 2-1, Marunouchi-1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón | | |
| 72 INVENTOR (ES) | | |
| Tomohisa TAKITA, Akio FUJII, Takeyo FUKUOKA, Yasuhiko MURAOKA, Osamu YOSHIOKA y Hamao UMEZAWA | | |
| 73 TITULAR (ES) | | |
| 74 REPRESENTANTE | | |
| DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ | | (P.-69.350) |

jga

1 Esta invención se refiere a una nueva bleomicina,
a sus sales no tóxicas, y a un método para producir dicha
nueva bleomicina. Más en particular, se refiere a la 3- \square (S)-
-1'-feniletilamino- \square propilaminobleomicina representada por
5 la fórmula

10

15

20

25

30

1

(I),

5

10

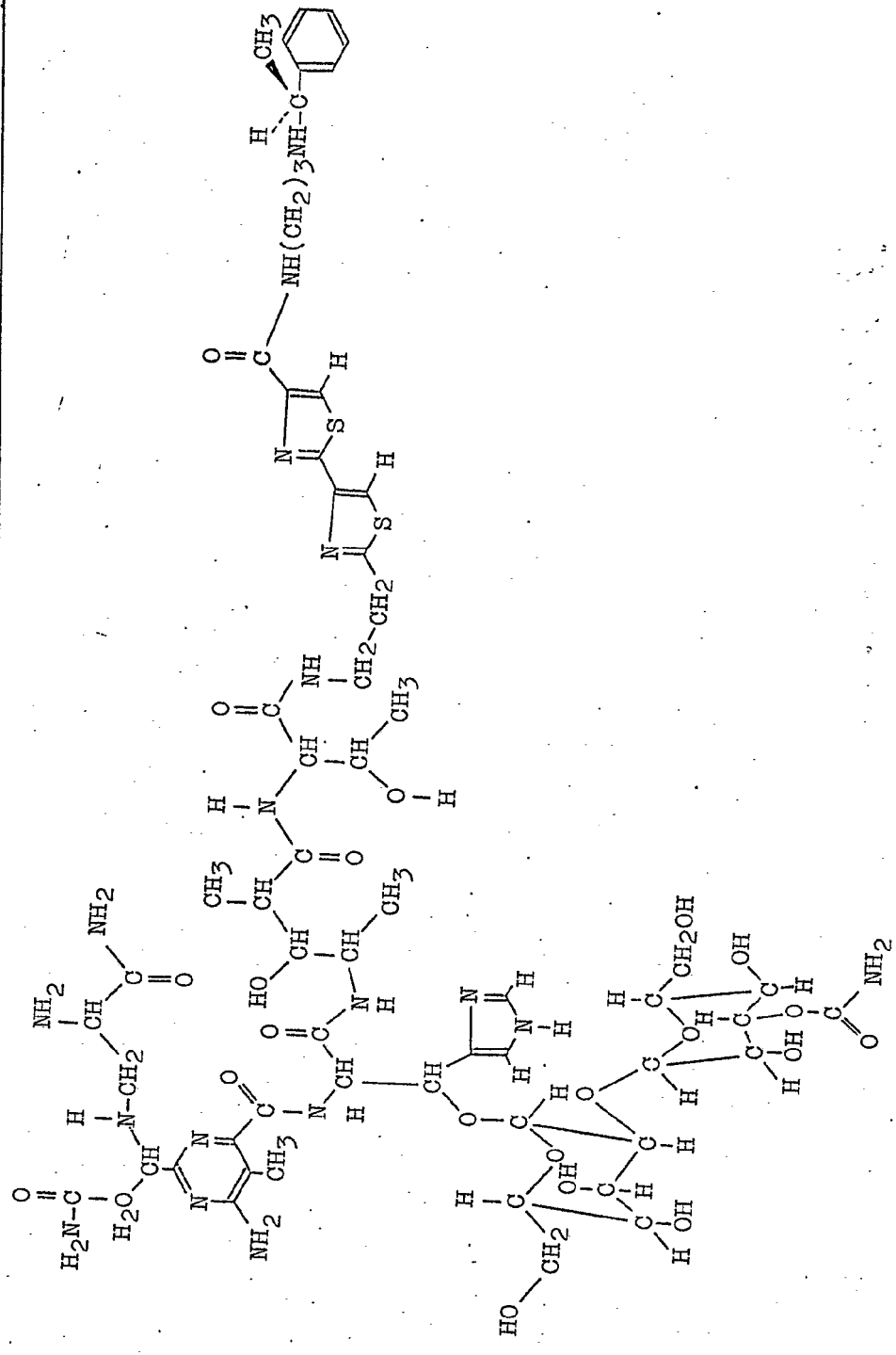
15

20

25

30

28068



1 a sus sales no tóxicas y a un método para producir dicha
nueva bleomicina.

5 Las bleomicinas son sustancias antibióticas car-
cinostáticas descubiertas por Umezawa, uno de los presen-
tes inventores, y colaboradores [Journal of Antibiotics
19A, 200 (1966)], que son glicopéptidos básicos solubles
en agua, producidos por el Actinomycete Streptomyces verti-
10 cillus y que son capaces de formar fácilmente un quelato
con un átomo de cobre divalente. En el cultivo normal se
producen 16 componentes de bleomicinas y se aíslan [por
ejemplo, Umezawa y otros, Journal of Antibiotics, 19A, 210
(1966)]. De entre las bleomicinas se ha utilizado amplia-
mente en los sectores clínicos de la terapéutica del cán-
cer, una mezcla de A₁, A₂, A₅, B₂ y desmetil A₂ (denomina-
15 da en lo que sigue "complejo de bleomicina") y ha demostra-
do tener éxito, en particular, en la terapia del carcinoma
de células escamosas como principal objetivo, del cáncer
de piel, del cáncer de cabeza y de cuello, del cáncer del
cuello uterino, del cáncer de pulmón y del linfoma maligno.

20 Sin embargo, en lo que respecta al efecto secun-
dario, se ha informado de casos de fibrosis pulmonar y de
otros incidentes indeseables. De los efectos secundarios
mostrados por las bleomicinas, el más temible es la fibro-
sis pulmonar. Es fácilmente imaginable que la actividad car-
25 cinostática de las bleomicinas podría manifestarse con más
efectividad en los sectores clínicos, si el efecto secunda-
rio arriba mencionado pudiera reducirse más o menos.

30 En estas circunstancias, los presentes invénto-
res se dedicaron durante años a sintetizar diversas bleomi-
cinas y a ensayar en diversos animales su actividad carci-

1 nostática, así como su toxicidad, incluyendo la fibrosis
pulmonar como principal tema de ensayo. Como resultado se
encontró que la 3- $\left[\text{(S)-1'-feniletilamino} \right]$ propilaminobleo-
micina (denominada en lo que sigue "NK631", incluyendo tan-
5 to la forma que contiene cobre, como la que está exenta de
cobre), que es una nueva bleomicina obtenida mediante reac-
ción de un derivado reactivo del grupo carboxilo del ácido
bleomicínico con N- $\left[\text{(S)-1'-feniletil} \right]$ -1,3-diaminopropano,
10 presenta unos efectos secundarios notablemente reducidos
como causa de la fibrosis pulmonar, sin que se deteriore
su actividad carcinostática, en comparación con un complejo
de bleomicina comercial y con otras bleomicinas conocidas.
La presente invención se ha realizado sobre la base del ha-
llazgo anterior.

15 Un objeto de esta invención es proporcionar una
nueva bleomicina, la 3- $\left[\text{(S)-1'-feniletilamino} \right]$ propilami-
nobleomicina, una sal no tóxica de la misma, y un método
para producir dicha nueva bleomicina.

20 Otros objetos y ventajas de esta invención resul-
tarán evidentes de la descripción siguiente.

La excelente bioactividad de la presente bleomi-
cina representada por la fórmula (I) se ilustra en lo que
sigue con referencia a los Ejemplos experimentales.

25 Se examinó la bioactividad de la NK631 en lo que
respecta a los cuatro siguientes temas de ensayo, comparán-
dola con un complejo de bleomicina comercial y con el mono-
sulfato de 3- $\left[\text{(R,S)-1'-feniletilamino} \right]$ -propilaminobleomi-
cina (forma exenta de cobre) (denominada en lo que sigue
"forma RS"). La forma RS se obtuvo por un método de fermen-
30 tación descrito en la patente de Estados Unidos 3.846.400.

- 1 1. Fibrosis pulmonar
2. Actividad antitumoral
3. Actividad antimicrobiana
4. Toxicidad

5

1. Toxicidad para el pulmón de ratones (fibrosis)

Se utilizaron ratones de raza ICR (machos, de 15 semanas de edad), en número de 12 por grupo. La dosificación de cada preparación farmacéutica de ensayo fue 5 mg/kg.

10

La dosis se administró por inyección intraperitoneal, una vez por día, durante 10 días consecutivos. Después de la administración, se criaron los ratones durante 5 semanas. Después de someterlos a observación, se sacrificaron los ratones y se sometieron a la autopsia, para determinar el grado de fibrosis pulmonar. La incidencia y el grado de fibrosis pulmonar en los ratones a los que se había administrado la nueva bleomicina de esta invención, se compararon con las de un complejo de bleomicina comercial y con las de la forma RS. Los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la Tabla 1.

15

20

25

30

Tabla 1

| | Incidencia | | Grado | |
|---|---|----------------|---|----------------|
| | Número de ratones con fibrosis pulmonar (%) | Valor relativo | Puntuación (-) fibrosis pulmonar/número total de muestras | Valor relativo |
| Monosulfato NK631 (forma exenta de cobre) | 4/12 (0,33) | 0,36 | 6/36 (0,17) | 0,25 |
| Forma RS | 7/12 (0,58) | 0,63 | 12/36 (0,33) | 0,49 |
| Complejo de bleomicina | 11/12 (0,92) | 1,0 | 24/36 (0,67) | 1,0 |

Nota: (-) 0 puntos: ausencia de fibrosis

1 punto : Acumulación de exudado en el alveolo y alteración similar a la fibrosis en el tabique alveolar.

2 puntos: Fibrosis en varias zonas.

4 puntos: Fibrosis esparcida

6 puntos: Fibrosis en más de los dos tercios del área total

1 Como resulta evidente de los resultados anteriores, en comparación con los casos de la forma RS y del complejo de bleomicina, la fibrosis debida al monosulfato NK631 (forma exenta de cobre) se redujo aproximadamente a
5 la mitad y a un tercio respectivamente, en cuanto a la incidencia, y aproximadamente a la mitad y a un cuarto, respectivamente, en cuanto al grado, lo que indica la utilidad del monosulfato de NK631 en los sectores clínicos.

10 2. Actividad antitumoral

 2-1. Acción sobre células HeLa S₃ cultivadas.

 Se calculó la DI₅₀ para cada una de las bleomicinas, partiendo del porcentaje de inhibición del crecimiento del cultivo en 72 horas, en presencia de cada una de las
15 bleomicinas. La DI₅₀ de la NK631 resultó ser 0,82 microgramos/ml, en contraste con los 1,70 microgramos/ml para el complejo de bleomicina, lo que indicaba que la NK631 inhibía el crecimiento celular con una intensidad doble que el complejo de bleomicina. La DI₅₀ para la forma RS resultó
20 ser de 0,80 microgramos/ml, lo que indicaba que el efecto inhibitor era comparable al del monosulfato de NK631 (forma exenta de cobre).

 2-2. Actividad carcinostática para el cáncer de Ehrlich (tumor sólido).

25 Cada una de las 2×10^6 células se trasplantaron subcutáneamente a la región inguinal de ratones de raza ICR (machos, de 6 semanas de edad). Al cabo de 24 horas se administraron a cada uno de los ratones preparaciones de ensayo, de la misma manera que se ha descrito en el párrafo
30 1-2 anterior. Al 15º día después del trasplante subcutáneo,

1 se extirparon los tumores de cada uno de los ratones y se comparó su peso con el de los tumores desarrollados en el grupo testigo, el cual no había recibido ningún tratamiento, para determinar el porcentaje de inhibición.

5 Como se muestra en la Tabla 2, la actividad carcinostática del monosulfato de NK631 (exento de cobre) era comparable a la de la forma RS y era aproximadamente 1,4 veces mayor que la del complejo de bleomicina.

10 Tabla 2

| Dosificación mg/kg x 10 | Porcentaje de inhibición | | |
|-------------------------------|--|----------|---------------------------|
| | Monosulfato de NK631 (exento de cobre) | Forma RS | Complejo de bleomicina |
| 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 |
| DI ₅₀ mg/kg/día | 0,35 | 0,31 | 0,49 |

2-3. Actividad carcinostática contra el hepatoma ascítico (tipo ascítico) en ratas.

25 Cada una de 1×10^6 células AH66 se trasplantaron intraperitonealmente a ratas de raza Donryu. Al cabo de 24 horas, se administró la preparación de ensayo, por vía intraperitoneal, una vez al día, durante 10 días consecutivos. Durante un periodo de 30 días después del trasplante, se

30 observó el peso de cada rata y el número de ratas muertas

1 y supervivientes.

Tabla 3

Valor relativo de días de supervivencia media.

| Dosificación mg/kg x 10 | Monosulfato de NK631 (exento de cobre) | Forma RS | Complejo de bleomicina |
|----------------------------|--|----------|---------------------------|
| 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 |

15

Como se muestra en la Tabla 3, la actividad del monosulfato de NK631 (forma exenta de cobre) contra el hepatoma ascítico AH66 era comparable a la de la forma RS y superior a la del complejo de bleomicina, para cada dosificación.

20

2-4. Actividad inhibidora contra el carcinoma de células escamosas en ratones, inducido por el 20-metilcolantreno (denominado en lo que sigue "20-MC").

25

Se aplicó tópicamente una solución en acetona de 20-MC, al lomo tonsurado de ratones de raza ddy (machos, de 10 semanas de edad), dos veces por semana, durante 18 semanas. Al cabo de 5 semanas de iniciado el tratamiento con 20-MC, se aplicaron 62,5 microgramos/ratón de la preparación de ensayo, por vía intraperitoneal, dos veces por

30

1 semana, durante un periodo de 15 semanas. En la primera se-
mana después de completada la administración de la prepara-
ción de ensayo, se examinó patológicamente la zona a la que
se había aplicado el 20-MC para observar la incidencia de
5 carcinogénesis.

Como se muestra en la Tabla 4, el monosulfato de
NK631 (forma exenta de cobre) y la forma RS eran ligeramen-
te más eficaces que el complejo de bleomicina, para inhi-
bir la carcinogénesis debida al 20-MC.

10

Tabla 4

| | Mortalidad | Incidencia de carcinogéne- sis (%) | Porcentaje de inhibi- ción | |
|----|--|--|----------------------------------|------|
| 15 | Monosulfato de NK631 (exento de cobre) | 1/12 | 5/11 (45,4) | 47,8 |
| | Forma RS | 1/12 | 5/11 (45,4) | 47,8 |
| | Complejo de bleomicina | 2/12 | 5/10 (50,0) | 42,5 |
| 20 | Testigo | 1/24 | 20/23 (86,9) | 0 |

25 Como se ve por los resultados anteriores, el mono-
sulfato de NK631 (forma exenta de cobre) mostraba claramen-
te una actividad antitumoral superior, en comparación con
un complejo de bleomicina comercial.

3. Actividad antimicrobiana.

30 Se ensayó la potencia antimicrobiana por el méto-
do de la copa, contra el Mycobacterium 607 y el Bacillus
Subtilis PCI, utilizando bleomicina A₂ como patrón (1.000

28068

1 U/mg). Los resultados fueron los que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

| | | | |
|---|--|--------|---------|
| 5 | | M. 607 | B. Sub. |
| | Monosulfato de NK631 (exento de cobre) | 7848 | 1550 |
| | Forma RS | 7535 | 1400 |
| | Complejo de bleomicina | 1234 | 886 |

10

Como se ve por la tabla 5, el monosulfato de NK631 (forma exenta de cobre) y la forma RS mostraron potencias antimicrobianas muy superiores a las del complejo de bleomicina.

15

4. Toxicidad

4-1. Toxicidad aguda por vía intraperitoneal (DL₅₀) en ratas.

20

Como se muestra en la Tabla 6, el valor DL₅₀ del monosulfato de NK631 (forma exenta de cobre) para ratas, es aproximadamente comparable al del complejo de bleomicina y al de la forma RS.

Tabla 6

25

| | | DL ₅₀ mg.(peso)/kg | Límites de confianza (5% nivel de significancia) |
|--|---|----------------------------------|---|
| | Monosulfato de NK631 (exento de cobre) | 155,0 | 133,6 - 179,8 |
| | Rata Forma RS | 150,6 | 129,0 - 170,6 |
| | Complejo de bleomicina | 168,0 | 130,0 - 217,0 |

30

28068

1 4-2. Toxicidad subaguda y crónica en ratas y
perros.

5 La toxicidad subaguda y crónica del monosulfato
de NK631 (forma exenta de cobre), para ratas y perros, era
comparable a las del complejo de bleomicina. Debe hacerse
especial mención, además, del hecho de que la necrosis del
punto de la inyección fue observada en todos los casos de
perros a los que se administró una elevada dosis de comple-
jo de bleomicina (1,2 mg/kg, 90 inyecciones), pero en nin-
10 guno de los casos de perros a los que se administró una
dosis idéntica de monosulfato de NK631 (forma exenta de co-
bre). También la toxicidad del monosulfato de NK631 (forma
exenta de cobre) para el pulmón fue también inferior a la
del complejo de bleomicina.

15 De los resultados anteriores se deduce que la to-
xicidad del monosulfato de NK631 (forma exenta de cobre)
es comparable con la del complejo de bleomicina, a excepción
de lo que respecta a la toxicidad para el pulmón y a la ne-
crosis.

20 5. Resumen

De los resultados de los ensayos descritos arriba
se saca la conclusión de que la NK631 es un nuevo compuesto
que tiene las características de:

- 25 (1) una toxicidad extremadamente baja para el pul-
món;
- (2) una actividad antimicrobiana y antitumoral
superior a la del complejo de bleomicina co-
mercial;
- 30 (3) una toxicidad sistémica comparable a la del

1

complejo de bleomicina comercial; y
(4) una baja toxicidad local para el punto de
la inyección.

5

Por consiguiente, se espera que la NK631 sea útil
para los sectores clínicos.

10

La nueva bleomicina de esta invención, la NK631,
se sintetiza por reacción de un derivado reactivo del gru-
po carboxilo del ácido bleomicínico representado por la
fórmula

15

20

25

30

(II)

1

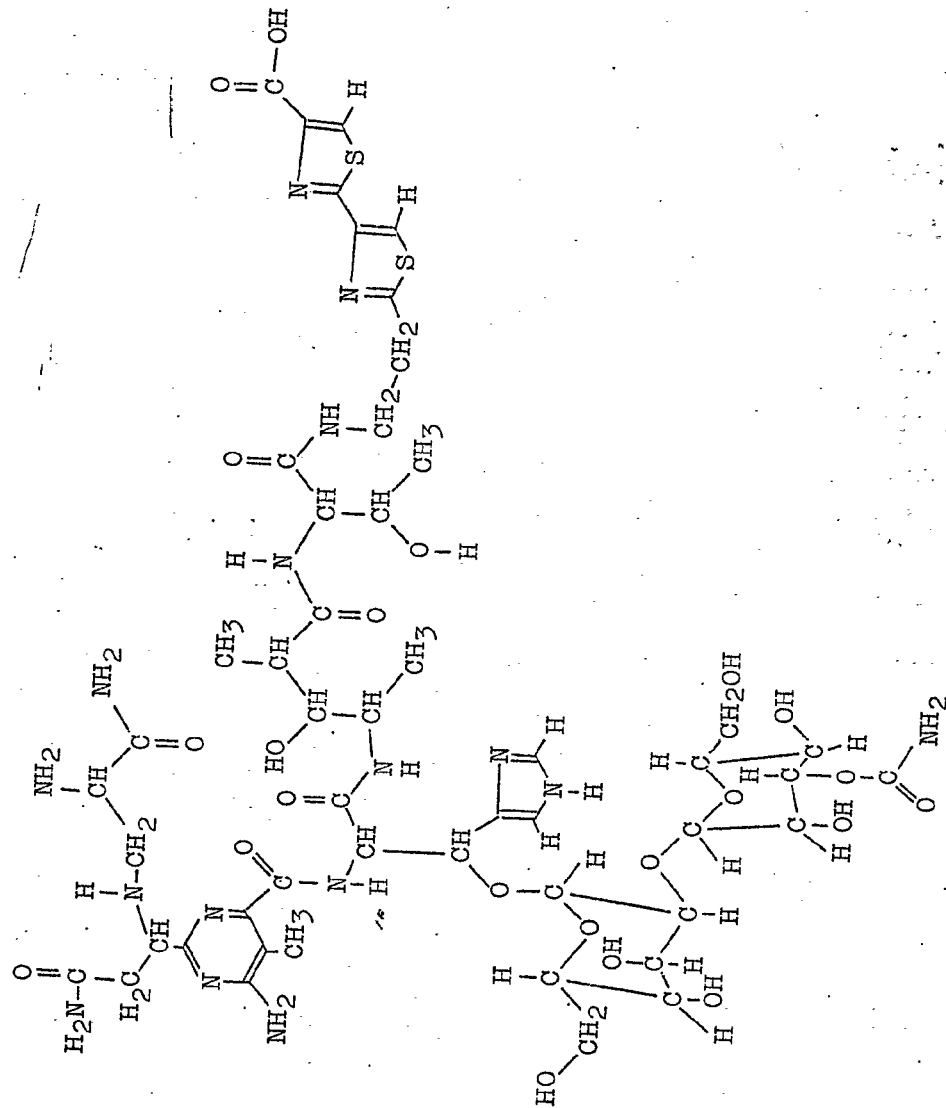
5

10

15

20

25



con N-[(S)-1'-feniletil]-1,3-diaminopropano. Más en particular, puede prepararse mediante (1) reacción del ácido bleomicínico con N-[(S)-1'-feniletilamino]-1,3-diaminopropano en presencia de un reactivo activador, o (2) reac-

30

28068

1 -ción del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico o de
su derivado N-monosustituído, con N-[γ (S)-1'-feniletil]- γ -
-1,3-diaminopropano. Seguidamente, se da una detallada des-
cripción de estos métodos.

5 El ácido bleomicínico utilizado en el método (1)
es un compuesto conocido, obtenido mediante escisión enzi-
mática de la bleomicina B₂ de acuerdo con el método descri-
to en las patentes de Estados Unidos 3.843.448 y 3.846.400.

10 Otro material de partida es decir el N-[γ (S)-1'-
-feniletil]- γ -1,3-diaminopropano, es un nuevo compuesto sin-
tetizado primeramente por los presentes inventores, de la
siguiente manera.

15 Feniletilamina enfriada a unos 0°C se mezcla con
una cantidad aproximadamente equivalente de acrilonitrilo.
La mezcla se mantiene a 80-100°C durante 10 a 24 horas,
hasta completar la reacción. Seguidamente, el exceso de
acrilonitrilo se separa por destilación bajo presión redu-
cida y el residuo se destila adicionalmente para obtener
20 3-[γ (S)-1'-feniletilamino]- γ propionitrilo. El compuesto así
obtenido se reduce de la manera acostumbrada, por ejemplo,
en presencia de níquel Raney, para obtener el N-[γ (S)-1'-
-feniletil]- γ -1,3-diaminopropano buscado (denominado en lo
que sigue "compuesto amino"). Las propiedades físicoquími-
cas de este compuesto son las relacionadas en la Tabla 7.

25

30

28068

28068

30

25

20

15

10

5

1

Tabla 7

| | Base libre | Diclorhidrato |
|--|--|-------------------------------------|
| (1) Aspecto | Líquido incoloro a la temperatura ambiente | Cristales aciculares blancos |
| (2) Punto de fusión | - | 223,5° - 224°0 |
| (3) Punto de ebullición | 95° - 103°0 (2 mmHg) | - |
| (4) Absorción ultravioleta máxima (m μ) | 241, 247, 252, 257, 263, 267 (metanol) | 250, 256, 259, 266 (agua destilada) |
| (5) Coeficiente de extinción molecular, ϵ (256 m μ) | - | 206 (agua destilada) |
| (6) Rotación específica $[\alpha]_D^{25}$ $[\alpha]_D^{26}$ | -56,38° (sin diluir, $\lambda = 1$) | -20,6° (c = 1, agua destilada) |
| (7) Valor Rf en cromatografía de capa delgada, n-propenol-piridina-ácido acético-agua (15:10:3:12 volumen/volumen), Avicel-SF(R) | 0,73 | 0,73 |

1

5

10

15

20

25

30

28068

Tabla 7 (continuación)

| | Base libre | Diclorhidrato |
|--|---|---|
| (8) Valor R _m en electroforesis a alta tensión, ácido fórmico-ácido acético-agua (25:75:900 volumen/volumen), Avicel-SF(R), 800 voltios, 10 minutos, R _m de la alanina = 1,0 | 1,52 700, 760, 820, 910, 1.025, 1.080, 1.130, 1.200, 1.305, 1.350, 1.370, 1.450, 1.495, 1.605, 2.850, 2.940, 3.300, 3.375 | 1,52 690, 750, 820, 910, 980, 1.020, 1.065, 1.075, 1.150, 1.205, 1.385, 1.460, 1.500, 1.515, 1.590, 2.500, 2.850, 3.000, 3.500 |
| (9) Espectro de absorción IR, cm ⁻¹ , KBr | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ (178,28) | C ₁₁ H ₂₀ N ₂ Cl ₂ (251,20) |
| (10) Fórmula molecular (peso molecular) | | |

1 Los ejemplos de los reactivos activadores útiles
incluyen 6-cloro-1-p-clorobencenosulfoniloxibenzotriazol
(CCBT), 3'-sulfonato de N-etil-5-fenilisoaxazolio (NEPIS),
perclorato de N-terc-butil-5-metilisoaxazolio, N-etoxi-car-
5 bonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína, sulfito de di-p-nitro
fenilo, fosfito de tri-p-nitrofenilo, tricloroacetato de
p-nitrofenilo, N-hidroxisuccinimida, dicitclohexilcarbodiimida
10 da (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,
1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida, difenilcar-
bodiimida, di-p-toluilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimi-
da, p-nitrofenol, pentaclorofenol y alcohol bencílico.

Descripción detallada del método (1):

Se disuelve ácido bleomicínico (forma que contie-
ne cobre) en agua, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo
15 o en una mezcla de los mismos. A la solución, mientras se
agita a 0-30°C, se añade uno de los reactivos activadores
relacionados arriba. La solución resultante se ajusta a
pH 3-10, adecuado para la activación, mediante la adición
de un ácido o base inorgánicos, tales como ácido clorhídri-
20 co o hidróxido sódico, o mediante la adición de un ácido
o base orgánicos, tales como ácido tricloroacético o N-me-
tilmorfolina. Con dicho tratamiento se inicia la activación
del grupo carboxílico del ácido bleomicínico. Inmediatamen-
te o dentro de los 30 minutos después del tratamiento, se
25 mezcla la solución reaccionante con el compuesto amino (de-
finido antes) como tal o después de haber sido ajustado a
aproximadamente pH 7,0. Seguidamente, se mantiene la mezcla
a 0-30°C durante 1 a 24 horas para permitir que transcurra
la reacción, obteniéndose así NK631. Una proporción adecua-
da del reactivo activador o del compuesto amino es de 1 a

1 - 10 equivalentes por cada equivalente de ácido bleomicínico.

Con el fin de aislar la NK631 de la mezcla de reacción, se precipitan primero exhaustivamente los compuestos de bleomicina mediante la adición de 5 a 10 volúmenes de acetona por cada volumen de la mezcla de reacción.

5 El precipitado se recoge por filtración, se lava con acetona y se disuelve en la menor cantidad posible de agua destilada. La solución acuosa resultante se ajusta inmediatamente a pH 6,0 con ácido clorhídrico o similar, y se aplica a la parte alta de una columna cromatográfica que contiene CM-Sephadex^(R) C-25 (tipo NH_4^+ suministrado por Pharmacia Fine Chemicals) como relleno en una solución acuosa de cloruro amónico. El ácido bleomicínico sin reaccionar

10 pasa a través de la columna sin ser adsorbido. La NK631 adsorbida sobre la resina se eluye con soluciones acuosas de cloruro amónico, de concentraciones en gradiente que aumentan escalonadamente o de modo continuo desde 0,05 molar hasta 1,0 molar. La NK631 está contenida en fracciones de efluente azules, a una concentración de cloruro amónico

15 de aproximadamente 0,35 molar a 0,45 molar, que muestran absorciones ultravioleta a 292 m μ . Estas fracciones se recogen separadamente y se hacen pasar por Amberlite^(R) XAD-2 (Rohm and Haas Co.) o Diaion^(R) HP40 (Mitsubishi Chemical Co.). La NK631 adsorbida se lava con agua y se eluye

20 para dar un efluente desalinizado, del cual se obtiene un polvo puro, azul, amorfo, de NK631 (forma que contiene cobre). El clorhidrato y el sulfato de la NK631 se obtienen por elución con metanol acuoso que contiene ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, respectivamente. En este procedimiento se puede recuperar convenientemente el ácido bleo-

25

30

1 micínico sin reaccionar. La etapa del método descrita arriba,
ba, en la que se emplea CM-Sephadex^(R) C-25 (marca de un
Sephadex cambiador de cationes, compuesto por glóbulos mi-
croscópicos de grupos carboximetílicos derivados del dextra
5 no polisacárido, fabricado y vendido por Pharmacia Fine
Chemicals Inc., Suecia), es un ejemplo ilustrativo y puede
modificarse hasta cierto punto sin afectar sustancialmente
a los resultados. Por ejemplo, se puede utilizar como elu-
yente cloruro sódico acuoso o sulfato amónico acuoso.

10 La separación de cobre de la NK631 que contiene
cobre obtenida arriba, puede efectuarse mediante la apli-
cación de cualquiera de los métodos conocidos, en los cua-
les se separa cobre por reacción con sulfuro de hidrógeno
para convertir el cobre en sulfuro cúprico, que se preci-
15 pita; por reducción del cobre a cobre de valencia cero, con
un agente reductor (patente de Estados Unidos 3.646.197);
por extracción del cobre con un disolvente orgánico que
contiene un agente de formación de quelatos, tal como di-
tizona [Umezawa y otros, Journal of Antibiotics, 19A, 210
20 (1960)]⁷; o mediante el uso de una resina macrorreticular,
cambiadora de iones, no iónica (patente de Estados Unidos
3.929.993). Un ejemplo del método de separación de cobre
se describe a continuación.

25 La NK631 (forma que contiene cobre) se disuelve
en agua destilada y la solución se vierte en una columna
de resina, que contiene Amberlite^(R) XAD-2 (una marca de
una resina absorbente compuesta por un copolímero de esti-
reno-divinilbenceno, fabricada y vendida por Rohm & Haas
Co., Estados Unidos) o Diaion^(R) HP40 (marca de una resina
30 absorbente, compuesta por un copolímero de estireno-divi-

1 nilbenceno, fabricada y vendida por Mitsubishi Chemical
Co., Japón), como relleno en agua destilada, para permitir
la adsorción de la NK631. Seguidamente, se lava la columna
5 con una solución acuosa al 5% de sal disódica del ácido
etilendiaminotetraacético (denominada en lo que sigue
"EDTA.Na₂"), con lo que el ión cobre es arrastrado por la
solución de EDTA.Na₂, dejando atrás, sobre la resina,
NK631 exenta de cobre. La resina se lava con una solución
10 acuosa de una sal tal como cloruro sódico, sulfato sódico
o acetato sódico, para separar el EDTA.Na₂, y seguidamente,
con agua destilada. Finalmente, se hace pasar por la co-
lumna una mezcla acidificada de metanol y agua, tal como
por ejemplo, una mezcla de metanol y ácido clorhídrico
0,0025 Normal (1:1 volumen/volumen) para eluir una sustan-
15 cia que muestra absorción ultravioleta a 290 mμ. Esta
fracción se recoge, se concentra, se ajusta a pH 6,0 y se
seca por congelación, para dar un polvo amorfo, de color
blanco amarillento pálido, de diclorhidrato de NK631 (for-
ma exenta de cobre).

20 Como ácido para utilizarlo en la preparación de
una mezcla acidificada de metanol y agua, se pueden utili-
zar cualesquiera ácidos, siempre que estos sean farmacéuti-
camente aceptables. Por ejemplo, cuando se utiliza ácido
sulfúrico o ácido acético, se obtiene un polvo de monosul-
25 fato de NK631 o una sal de ácido tiacético de NK631 (forma
exenta de cobre).

La NK631 de esta invención puede convertirse de
la manera acostumbrada, en otras sales no tóxicas, tales
como por ejemplo, sulfato y sal del ácido acético, las cua-
30 les pueden obtenerse también variando arbitrariamente el

1 -ácido empleado en la elución.

En el método (1), como el compuesto amino reacciona con el grupo carboxilo activado del ácido bleomicínico, debido a la presencia de un reactivo activador empleado en la síntesis del polipéptido, la reacción de condensación transcurre suavemente en condiciones extremadamente suaves. Por consiguiente, solamente reacciona con el grupo carboxilo activado, el grupo amino primario del compuesto amino, mientras que el grupo imino secundario no participa en la reacción, obteniéndose así preferentemente NK631. Esto constituye una notable ventaja del método (1).

Descripción detallada del método (2) :

El éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico empleado en el método (2) se obtiene fácilmente en forma de diclorhidrato (forma que contiene cobre) mediante descomposición térmica de la bleomicina A₂ para formar la 3-(metilmercapto)propilaminobleomicina y haciendo reaccionar la bleomicina resultante con un halógenonitrilo, ácido halógeno acético, éster halógenoacetato o halógenoacetamida, en una solución ácida (patente de Estados Unidos 3.886.133).

El derivado N-monosustituído del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico, que tiene protegido su grupo amino, se obtiene con alto rendimiento, disolviendo diclorhidrato del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico, en agua o en un disolvente orgánico, tal como metanol o una mezcla del mismo, añadiendo después lentamente, a la solución resultante, mientras se agita vigorosamente, una cantidad equivalente o un ligero exceso de uno de los reactivos conocidos protectores de los grupos amino, en

1 forma de polvo o de solución en un disolvente orgánico, tal
como metanol, y dejando que transcurra la reacción a la
temperatura ambiente o a la temperatura del enfriamiento
con hielo, mientras se mantiene de modo continuo el pH de
5 la mezcla reaccionante en 5,0 a 7,5, añadiendo una base
orgánica, tal como por ejemplo, trimetilamina, trietilami-
na, piridina, 1,3-diazabicyclo-[5,4,0]-7-undeceno, 1,5-
-diazabicyclo-[3,4,0]-5-noneno, 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-
-octano o N-metilmorfolina. Son típicos de tales derivados
10 N-monosustituídos, el monoclóhidrato del éster 3-acetila-
minopropílico del ácido bleomicínico, el éster 3-succini-
laminopropílico del ácido bleomicínico, el monoclóhidrato
del éster 3-benzoilaminopropílico del ácido bleomicínico,
el monoclóhidrato del éster 3-benciloxicarbonilaminopro-
15 pílico del ácido bleomicínico, el monoclóhidrato del éster
3-p-toluensulfonilaminopropílico del ácido bleomicínico,
el monoclóhidrato del éster 3-(2,4-dinitrofenil)aminopro-
pílico del ácido bleomicínico, el monoclóhidrato del éster
20 3-(3,5-dimetil-3-oxociclohexen-1-il)aminopropílico del áci-
do bleomicínico, el monoclóhidrato del éster 3-N-terc-bu-
toxicarbonilpropílico del ácido bleomicínico, y el monocló-
hidrato del éster 3-N-saliciliden-iminopropílico del ácido
bleomicínico (patente de Estados Unidos 3.886.133).

25 En el método (2), la NK631 se forma mediante reac-
ción entre el éster 3-aminopropílico o el éster 3-aminopro-
pílico N-monosustituído del ácido bleomicínico, y el com-
puesto amina. En el caso del éster 3-aminopropílico N-mono-
sustituído del ácido bleomicínico como material de partida,
puede utilizarse bien sea un material puro o una mezcla de
30 reacción, que puede ser concentrada, obtenida a partir del

1 -éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico y un reacti-
vo protector del grupo amino.

Los disolventes preferidos utilizados en la reac-
ción del éster 3-aminopropílico o del éster 3-aminopropíli-
5 co N-monosustituído del ácido bleomicínico, y el compuesto
amino, son el agua y los disolventes orgánicos, tales como
metanol, dimetilformamida y sulfóxido de dimetilo. La mez-
cla reaccionante se deja en reposo a 0-80°C, durante 1 a
72 horas, en condiciones neutras o alcalinas, para permi-
10 tir que transcurra la reacción de aminólisis, con lo que
se forma la NK631. En las condiciones de un pH más alto,
es deseable un tiempo de reacción prolongado a temperaturas
comparativamente bajas, mientras que en las condiciones de
un pH más bajo, se prefiere un tiempo de reacción corto a
15 temperaturas más altas. La proporción adecuada del compues-
to amino en la mezcla reaccionante, es de 1 a 10 equivalen-
tes por cada equivalente del éster 3-aminopropílico del
ácido bleomicínico o de un derivado N-monosustituído del
mismo.

20 Para aislar la NK631 de la mezcla de reacción,
se precipitan primero exhaustivamente los componentes de
bleomicina mediante la adición de acetona en un volumen de
2 a 5 veces mayor que el volumen de la mezcla de reacción.
El precipitado se recoge por filtración, se lava a fondo
25 con acetona y, seguidamente, se disuelve en la menor canti-
dad posible de agua destilada. La solución acuosa resultan-
te se ajusta rápidamente a pH 6,0, mediante la adición de
ácido clorhídrico o similar, y se vierte en una columna cro-
matográfica de CM-Sephadex^(R) C-25 (tipo NH₄⁺, suministrado
30 por Pharmacia Fine Chemicals) como relleno en una solución

1 acuosa de cloruro amónico 0,05 molar, para permitir que
los componentes de bleomicina sean adsorbidos sobre la re-
sina. Haciendo pasar por la columna una solución acuosa de
cloruro amónico, en la que la concentración se aumenta
5 escalonadamente o continuamente desde 0,05 molar hasta 1,0
molar, se eluyen el éster 3-aminopropílico del ácido bleo-
micínico o un derivado N-monosustituído del mismo, sin
reaccionar, y la NK631, formando bandas azules (absorción
UV a 292 m μ) en la corriente de efluente para concentra-
10 ciones de cloruro amónico de 0,15 - 0,20 molar y de 0,35
a 0,45 molar, respectivamente. Estas fracciones se recogen
por separado y se desalinizan mediante adsorción sobre
Amberlite^(R) XAD-2 o Diaion^(R) HP40, lavado con agua y elu-
ción para obtener un polvo amorfo azul de NK631 (forma que
15 contiene cobre). Se obtienen el clorhidrato y el sulfato,
utilizando mezclas de metanol y agua acidificadas con áci-
do clorhídrico y con ácido sulfúrico, respectivamente, co-
mo eluyentes. El éster 3-aminopropílico del ácido bleomici-
nico, o un derivado N-monosustituído del mismo, sin reac-
20 cionar, pueden ser recuperados convenientemente. La etapa
del método descrita arriba, en la que se emplea CM-Sepha-
dex^(R) C-25, es un ejemplo ilustrativo típico y puede modi-
ficarse hasta cierto punto, sin afectar sustancialmente a
los resultados. Por ejemplo, se puede utilizar como eluyen-
25 te, cloruro sódico acuoso o sulfato amónico acuoso.

La NK631 así obtenida mediante el método (2) pue-
de ser convertida en la forma exenta de cobre, mediante
la aplicación de métodos conocidos para la separación del
cobre, descritos arriba en relación con el método (1). Si
30 es necesario, es posible convertirla en otras sales no tó-

1 -xicas, tales como, por ejemplo, clorhidrato, sulfato y sal
de ácido acético.

Las principales propiedades físicoquímicas de la
NK631 son como se muestran en las tablas 8 y 9.

5 La fórmula estructural (I) de la NK631 fue con-
firmada de la siguiente manera: Se disolvió monosulfato de
NK631 (forma exenta de cobre) en agua pesada, y se determi-
nó mediante resonancia magnética nuclear del C^{13} por el mé-
todo de desacoplamiento del ruido protónico, utilizando
10 dioxano como patrón interno. Las señales debidas a un to-
tal de 11 átomos de carbono 13 contenidos en el compuesto
amino con cadena lateral y resto de 3- \square (S)-1'-feniletila-
mino \square -propilamino se reconocieron a 19,4, 26,3, 37,0, 43,5,
58,9, 128,3 (dos señales), 130,0 (dos señales) y 136,3 par-
tes por millón. La totalidad de las señales debidas a otros
15 átomos de carbono correspondieron a las señales comunes a
la familia de las bleomicinas \square Naganawa y otros., Journal
of Antibiotics, 30, 388 (1977) \square .

20

25

30

28068

Tabla 8. Propiedades físicoquímicas de la NK631
(forma que contiene cobre)

| | Diclorhidrato | Monosulfato |
|--|---|----------------------------|
| (1) Aspecto | Polvo amorfo azul | Polvo amorfo azul |
| (2) Solubilidad | Soluble en agua, metanol, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida; escasamente soluble en dioxano; insoluble en etanol, acetona, éter, benceno. | Igual que el diclorhidrato |
| (3) Punto de fusión (descomposición), °C | 205 - 207 | 205 - 207 |
| (4) Rotación específica (agua destilada, C = 1,0). $[\alpha]_D^{25}$ 436 | -95,6° | -93,7° |
| (5) Cromatografía de capa delgada, valor R_f | (a) 0,72 (b) 0,75 | (a) 0,72 (b) 0,75 |
| (6) Electroforesis, valor R_m (alanina = 1) | 0,80 | 0,80 |

28068

30

25

20

15

10

5

1

- Nota: 1) (a) Gel de sílice G(R) (marca de un adsorbente para cromatografía de capa delgada compuesto por gel de sílice, fabricado por Merck Inc., Estados Unidos); metanol/acetato amónico al 10%/amoníaco al 10% (10:9:1 volumen/volumen).
- (b) Avicel SF(R) (marca de un adsorbente para cromatografía de capa delgada, compuesto por celulosa cristalina, fabricado por FMC Corporation, Estados Unidos); n-propanol/piridina/ácido acético/agua (15:10:3:12)
- 2) Avicel SF(R); ácido fórmico/ácido acético/agua (25:75:900 volumen/volumen); 800 voltios; 15 minutos.

28068 30 25 20 15 10 5 1

Tabla 2. Propiedades físicoquímicas de la NK631 (forma exenta de cobre)

| | Diclorhidrato | Monosulfato | Sal de di(ácido acético) |
|---|--|---|---|
| (1) Aspecto | Polvo amorfo de color blanco amarillento pálido | Polvo amorfo de color blanco amarillento pálido | Polvo amorfo de color blanco amarillento pálido |
| (2) Solubilidad | Soluble en agua, metanol, ácido acético, sulfóxido de dimetilo, dimetilformamida; escasamente soluble en dióxano; insoluble en etanol, acetona, éter, benceno. | | |
| (3) Punto de fusión (descomposición), °C | 195 - 197 | 196 - 198 | 188 - 190 |
| (4) Rotación específica (agua destilada, c = 1,0) $[\alpha]_{436}^{25}$ | -2,1° | -2,0° | -2,0° |
| (5) Cromatografía capa delgada, valor Rf | (a) 0,56 (b) 0,70 | (a) 0,56 (b) 0,70 | (a) 0,56 (b) 0,70 |
| (6) Electroforesis, valor Rm (alanina = 1,0) | 0,94 | 0,94 | 0,94 |

Nota: 1) (a) gel de sílice G(R); metanol/acetato amónico al 10%/amoníaco al 10% (10:9:1 volumen/volumen)
 (b) Avicel SF(R); n-propanol/piridina/ácido acético/agua (15 : 10 : 3 : 12)
 2) Avicel SF(R); ácido fórmico/ácido acético/agua (25 : 75 : 900 volumen/volumen); 500 voltios; 15 minutos.

1 En los dibujos que se acompañan, las figuras 1 y 2 muestran las curvas de absorción ultravioleta de la bleomicina NK631 de esta invención, y las figuras 3 y 4 muestran curvas de absorción infrarroja de la NK631.

5 Es decir, la figura 1 muestra la curva de absorción ultravioleta del diclorhidrato de 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilaminobleomicina (forma que contiene cobre), la figura 2 muestra la curva de absorción ultravioleta del monosulfato de 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilaminobleomicina (forma exenta de cobre), la figura 3 muestra la curva de absorción infrarroja del diclorhidrato de 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilaminobleomicina (forma que contiene cobre) determinada en forma de tableta de bromuro potásico, y la figura 4 muestra la curva de absorción infrarroja de la 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilaminobleomicina (forma exenta de cobre) determinada en forma de tableta de bromuro potásico.

15 La invención se ilustra seguidamente con detalle, con referencia a los ejemplos, pero la invención no está limitada a los ejemplos.

Ejemplo 1

25 Síntesis del diclorhidrato (forma que contiene cobre) y del monosulfato (forma exenta de cobre) de la NK631.

Etapa A: En 400 ml de dimetilformamida se disolvieron 15,0 g de ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A la solución, mientras se mantenía a 0°C mediante enfriamiento, se añadieron 1,1 ml de N-metilmorfolina y 10,3 g de COBT. La mezcla se agitó durante 5 minutos a 0°C.

1 se mezcló seguidamente con 5,3 g del compuesto amino y se
agitó adicionalmente durante una hora. Después de termina-
da la reacción mediante la adición de 200 ml de una solu-
ción acuosa de ácido acético al 25%, se mezcló la mezcla
5 de reacción con 5 litros de acetona fría, para precipitar
el producto de reacción. El precipitado se recogió por fil-
tración, se lavó con acetona y se disolvió en 500 ml de
agua destilada. La solución acuosa resultante se ajustó in-
mediatamente a pH 6,0 y se vertió en una columna que con-
10 tenía 2 litros de CM-Sephadex^(R) C-25 (tipo NH₄⁺) como re-
lleno en solución acuosa de cloruro amónico 0,05 molar, pa-
ra adsorber las bleomicinas.

La elución se efectuó utilizando solución acuosa
de cloruro amónico, haciendo pasar por la columna 20 litros
15 de eluyente, en el que la concentración de cloruro amónico
se aumentó continuamente desde 0,05 a 1,0 molar. El ácido
bleomicínico sin reaccionar se encontró en el efluente a
la concentración de cloruro amónico de aproximadamente 0,05
molar y la NK631 a la concentración de cloruro amónico de
20 aproximadamente 0,45 molar. Ambas fracciones, que mostra-
ban absorción UV a 292 m μ , se recogieron separadamente.
La fracción que contenía la NK631 se vertió en una columna
de resina que contenía 2,6 litros de Amberlite^(R) XAD-2.
Seguidamente, la columna se lavó a fondo con agua y se elu-
25 yó con ácido clorhídrico 0,01 N en metanol-agua (4:1 volu-
men/volumen). Se recogieron un total de 2,5 litros de la
fracción azul, que mostraba absorción UV a 292 m μ . Después
de separar el metanol por evaporación de la fracción de elu-
yente, se ajustó el concentrado a pH 6,0 con Dowex^(R) 44
30 (tipo OH⁻), (marca de una resina cambiadora de aniones

1 -compuesta por un copolímero de epíclorhidrina y amoníaco,
 producida y vendida por Dow Chemical Company, Estados Uni-
 dos), y se liofilizó para obtener 16,1 g (rendimiento 92%)
 de diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre) en
 5 forma de polvo amorfo azul.

Mediante un tratamiento similar se recuperaron
 280 mg del ácido bleomicínico sin reaccionar (forma que
 contiene cobre).

10 Los máximos de absorción ultravioleta y la poten-
 cia antimicrobiana del diclorhidrato de NK631 (forma que
 contiene cobre) fueron como se muestran a continuación.

Máximos de absorción UV:

| mp | (E _{1%} ¹ 1 cm, | agua destilada) |
|--------|--|-----------------|
| 15 242 | | (151) |
| 292 | | (121) |

Potencia antimicrobiana: 8.100 u/mg.

20 [Nota: La potencia antimicrobiana se determinó utilizando
 Mycobacterium smegmatis ATCC 607 como organismo de
 ensayo, y suponiendo que la potencia de la bleomi-
 cina A₂ (forma exenta de cobre) es 1.000 u/mg. Lo
 mismo es aplicable en lo que sigue.]

25 Etapa B: En 200 ml de agua destilada se disolvie-
 ron 10,0 g del diclorhidrato de NK631 (forma que contiene
 cobre). La solución se vertió en una columna que contenía
 600 ml de Amberlite^(R) XAD-2 como relleno en agua destila-
 da. Seguidamente, se lavó la columna sucesivamente con 2
 litros de una solución acuosa que contenía un 5% de EDTA.Na₂,
 2,5 litros de una solución acuosa al 5% de sulfato sódico,
 30 y 630 ml de agua destilada. A continuación, se eluyó la

1 - columna con ácido sulfúrico 0,0025 N en una mezcla de metanol y agua (1:1 volumen/volumen). Se recogió un total de 900 ml de fracciones que contenían una sustancia que mostraba absorción UV a 290 m μ . Después de separar el metanol por destilación, se ajustó el líquido residual a pH 6,0, con Dowex^(R) 44 (tipo OH⁻) y se liofilizó para obtener 9,3 g (rendimiento 95%) de monosulfato de NK631 (forma exenta de cobre) en forma de un polvo amorfo, de color blanco amarillento pálido. Este producto mostraba un máximo de absorción UV y una potencia antimicrobiana como se muestran a continuación.

Máximo de absorción UV:

m μ (E₁^{1%}_{1 cm} 0,1 N HCl)

15 290 (106)

Potencia antimicrobiana: 7.865 u/mg

Ejemplo 2

20 Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre).

En 40 ml de agua destilada se disolvieron 1,5 g de ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A la solución agitada a 26°C se añadieron 800 mg de NEPIS, mientras se mantenía el pH de la mezcla reaccionante a 4,8 - 5,5, mediante la adición de solución acuosa de hidróxido sódico 0,1 N. Al cabo de 30 minutos se añadió a la mezcla una solución preparada por disolución de 1,8 g del compuesto amino en 20 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 7,0 con ácido clorhídrico. La mezcla se dejó en reposo durante 20 horas a 26°C. A la mezcla de reacción se añadieron, agitan-

1 do, 600 ml de acetona fría para precipitar los componentes
de bleomicina. El precipitado se recogió por filtración,
se lavó con acetona y, seguidamente, se disolvió en 30 ml
de agua destilada, ajustándose inmediatamente a pH 6,0 con
5 ácido clorhídrico 0,1 N. La solución acuosa resultante se
purificó siguiendo el procedimiento descrito en la etapa
A del ejemplo 1, para obtener 932 mg (rendimiento 53%) de
diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre) en forma
de un polvo amorfo azul, que tenía una potencia antimicro-
10 biana de 8.073 u/mg.

Ejemplo 3

Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que
contiene cobre).

15 En 40 ml de sulfóxido de dimetilo se disolvieron
1,5 g de ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A
la solución agitada a 30°C, se añadieron 740 mg de N-etoxi-
carbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína y 0,1 ml de N-metil-
20 morfolina. A la mezcla, que había sido agitada durante 30
minutos, se añadieron, con agitación, 530 mg del compuesto
amino y se dejó la mezcla en reposo durante 3 horas a 30°C.
A la mezcla de reacción se añadieron, con agitación, 600
ml de acetona fría para precipitar los componentes de bleo-
micina. El precipitado se recogió por filtración, se lavó
25 con acetona y, seguidamente, se disolvió en 30 ml de agua
destilada, ajustándose inmediatamente a pH 6,0 con ácido
clorhídrico 0,1 N. La solución acuosa resultante se trató
de una manera similar a la de la etapa A del ejemplo 1,
para obtener 809 mg (46% de rendimiento) de diclorhidrato
de NK631 (forma que contiene cobre) en forma de un polvo
30

1 amorfo azul, que mostraba una potencia antimicrobiana de
8.028 u/mg.

Ejemplo 4

5 Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que
contiene cobre).

En 40 ml de agua destilada se disolvieron 1,5 g
de ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). Después
de añadir 1,2 g de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino-
10 propil)-carbodiimida a 27°C, se ajustó la mezcla a pH 4,5,
con ácido clorhídrico 0,1 N. Después de añadir 530 mg del
compuesto amino, se ajustó nuevamente la mezcla a pH 5,0,
con ácido clorhídrico 1 N, y se dejó en reposo durante 20
horas a 27°C. A la mezcla de reacción se añadieron, con
15 agitación, 400 ml de acetona fría para precipitar los com-
ponentes de bleomicina. El precipitado se recogió por fil-
tración, se lavó con acetona y, seguidamente, se disolvió
en 30 ml de agua destilada, ajustándose inmediatamente a
pH 6,0 con hidróxido sódico 0,1 N. La solución acuosa resul-
20 tante se purificó siguiendo el procedimiento descrito en
la etapa A del ejemplo 1, para obtener 440 mg (rendimiento
25%) de diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre)
en forma de un polvo amorfo azul, que tenía una potencia
antimicrobiana de 7.985 u/mg.

25

Ejemplo 5.

Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que
contiene cobre).

En 16 ml de metanol se disolvieron 9,0 g del mo-
noclorhidrato del éster 3-N-benzoilaminopropílico del ácido
30

1 -bleomicínico (forma que contiene cobre). Mientras se en-
friaba a 0°C se añadieron a la solución 9,16 g del compues-
to amino. Después de continuar la agitación durante 40 ho-
5 ras a 0°C, se añadió a la mezcla de reacción acetona fría,
para precipitar los productos de reacción. El precipitado
se recogió por filtración, se lavó con acetona y se disol-
vió en 300 ml de agua destilada. La solución se ajustó in-
mediatamente a pH 6,0, con ácido clorhídrico 0,1 N, y se
vertió en una columna que contenía 1 litro de CM-Sephadex^(R)
10 C-25 (tipo NH_4^+) como relleno en solución acuosa de cloruro
amónico 0,05 M, para permitir la adsorción de las bleomici-
nas. Utilizando como eluyente una solución acuosa de cloru-
ro amónico, se efectuó la elución, haciendo pasar a través
15 de la columna 10 litros de eluyente, en el cual se aumentó
continuamente la concentración de cloruro amónico desde
0,05 hasta 1,0 molar. El éster 3-N-benzoilaminopropílico
del ácido bleomicínico, sin reaccionar, se encontró en el
efluente a la concentración de cloruro amónico de aproxi-
madamente 0,2 molar, y la NK631 a la concentración de clo-
20 ruro amónico de aproximadamente 0,45 molar. Ambas fraccio-
nes, que mostraban absorción UV a 272 m μ , se recogieron
separadamente. La fracción que contenía la NK631 se vertió
en una columna de resina que contenía 1,3 litros de Amber-
lite^(R) XAD-2. Seguidamente, se lavó la columna a fondo con
25 agua y se eluyó con ácido clorhídrico 0,01 N en una mezcla
de metanol y agua (4:1 volumen/volumen). Se recogió un to-
tal de 2,5 litros de la fracción azul, que mostraba una ab-
sorción UV a 292 m μ . Después de haber liberado la fracción
del metanol mediante destilación, y de haber ajustado el
30 pH a 6,0 con Dowex^(R) 44 (tipo OH^-), se secó por congelación

28068

1 la fracción para obtener 8,2 g (rendimiento 90%) de dicloro-
hidrato de NK631 (forma que contiene cobre) en forma de un
polvo amorfo azul, que tenía una potencia antimicrobiana
de 8.030 u/mg.

5 Mediante un tratamiento similar se recuperaron
910 mg del monoclórhidrato del éster 3-N-benzoilaminopropi-
lico del ácido bleomicínico, sin reaccionar, (forma que
contiene cobre).

10 Ejemplo 6

Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que
contiene cobre).

15 En 3 ml de metanol se disolvieron 950 mg de mono-
clórhidrato del éster 3-N-p-toluensulfonilaminopropílico
del ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A la so-
lución, mientras se agitaba a 0°C, se le añadieron 980 mg
del compuesto amino y se agitó la mezcla durante 48 horas
a 0°C. A la mezcla de reacción se añadieron, con agitación,
20 15 ml de acetona fría, para precipitar los componentes de
bleomicina. El precipitado se recogió por filtración, se
lavó con acetona y, seguidamente, se disolvió en 30 ml de
agua destilada, ajustándose inmediatamente a pH 6,0 con
ácido clorhídrico 0,1 N. La solución resultante se purifi-
có siguiendo el procedimiento descrito en la etapa A del
25 ejemplo 5 para obtener 833 mg (rendimiento 85%) de dicloro-
hidrato de NK631 (forma que contiene cobre) en forma de un
polvo amorfo azul, que tenía una potencia antimicrobiana
de 8.010 u/mg.

30 Ejemplo 7

Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que

1 - contiene cobre).

En 5 ml de dimetilformamida se disolvieron 850 mg de monoclórhidrato del éster 3-acetilaminopropílico del ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A la solución, mientras se agitaba a 0°C, se añadieron 950 mg del compuesto amino, y la mezcla se agitó durante 45 horas a 0°C. A la mezcla de reacción se añadieron, con agitación, 20 ml de acetona fría, para precipitar los componentes de bleomicina. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con acetona y, seguidamente, se disolvió en 30 ml de agua destilada, ajustándose inmediatamente a pH 6,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. La solución resultante se trató de la misma manera que en la etapa A del Ejemplo 5, para obtener 570 mg (rendimiento 63%) de diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre) en forma de un polvo amorfo azul, que tenía una potencia antimicrobiana de 8.010 u/mg.

Ejemplo 8

20 Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre).

En 3 ml de sulfóxido de dimetilo se disolvieron 900 mg de monoclórhidrato del éster 3-N-(2,4-dinitrofenil)-aminopropílico del ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A la solución, mientras se agitaba a 0°C, se le añadieron 793 mg del compuesto amino, y la mezcla se agitó durante 24 horas a 0°C. A la mezcla de reacción se añadieron, con agitación, 15 ml de acetona fría, para precipitar los componentes de bleomicina. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con acetona y, seguidamente, se disolvió en 30 ml de agua destilada, ajustándose inmediata-

30
28068

1 mente a pH 6,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. La solución
acuosa resultante se purificó siguiendo el procedimiento
descrito en la etapa A del Ejemplo 5, para obtener 690 mg
(rendimiento 78%) de diclorhidrato de NK631 (forma que con-
5 tiene cobre) en forma de un polvo amorfo azul, que tenía
una potencia antimicrobiana de 8.010 u/mg.

Ejemplo 9

10 Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que
contiene cobre) y del diclorhidrato exento de cobre.

En 10 ml de metanol se disolvieron 1,0 g del di-
clorhidrato del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicí-
nico (forma que contiene cobre). A la solución vigorosamen-
te agitada se añadieron, gota a gota, 104 mg de cloruro de
15 benzoilo, durante un período de 30 minutos, mientras se
mantenía el pH de la solución a 6,5 - 7,5, mediante la adi-
ción de 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octano. Después de agitar
durante 30 minutos más, se concentró la mezcla de reacción
hasta 2 ml. El material concentrado se enfrió a 0°C, se le
20 añadieron, con agitación, 1,1 g del compuesto amino y la
mezcla se agitó durante 72 horas a 0°C. A la mezcla de reac-
ción se añadieron, con agitación, 6 ml de acetona fría pa-
ra precipitar los componentes de bleomicina. El precipita-
do se recogió por filtración, se lavó con acetona y, segui-
25 damente, se disolvió en 30 ml de agua destilada, ajustándo-
se inmediatamente a pH 6,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. La
solución acuosa resultante se vertió en una columna que
contenía 100 ml de CM-Sephadex^(R) (tipo NH₄⁺) como relleno
en solución acuosa de cloruro amónico 0,05 M, para permi-
30 tir la adsorción de los componentes de bleomicina. El mate-

1 -rial adsorbido se trató de una manera similar a la de la
etapa A en el ejemplo 5, para obtener 779 mg (73% de rendi-
miento) de diclorhidrato de NK631 (forma que contiene co-
bre) en forma de un polvo amorfo azul, que tenía una poten-
5 cia antimicrobiana de 8.000 u/mg.

Además, se recuperaron 240 mg del monoclorhidra-
to del éster 3-N-benzoilaminopropílico del ácido bleomicí-
nico (forma que contiene cobre).

Etapa B: En 20 ml de agua destilada se disolvie-
10 ron 700 mg del diclorhidrato de NK631 (forma que contiene
cobre) obtenido en la etapa A anterior. La solución se
vertió en una columna que contenía 65 ml de Diaion^(R) HP-40
como relleno en agua destilada, para permitir la adsorción
de los componentes de bleomicina. Seguidamente, se lavó la
15 columna con 200 ml de una solución acuosa que contenía un
5% de EDTA.Na₂, a continuación con 250 ml de una solución
acuosa de cloruro sódico al 5% y, finalmente, con 100 ml
de agua destilada. A continuación, se eluyó la columna con
una mezcla de metanol y ácido clorhídrico acuoso 0,0025 N
20 (1:1 volumen/volumen) y se recogieron 98 ml de la fracción
que mostraba absorción ultravioleta a 290 m μ . Después de
separar el metanol por destilación bajo presión reducida,
se ajustó el líquido residual a pH 6,0, con Dowex^(R) 44
(tipo OH⁻) y se liofilizó para obtener 658 mg (rendimiento
25 98%) de diclorhidrato de NK631 (forma exenta de cobre) en
forma de un polvo amorfo de color blanco amarillento páli-
do, que tenía una potencia antimicrobiana de 7.834 u/mg.

Ejemplo 10

30 Síntesis del monosulfato de NK631 (forma que con-

28068

1 tiene cobre) y de la sal del ácido diacético (forma exenta de cobre).

Etapa A: En 10 ml de metanol se disolvieron 1,0 g del diclorhidrato del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A la solución vigorosamente agitada, a la temperatura ambiente, se añadieron, gota a gota, 104 mg de cloruro de benzoilo, durante un periodo de 30 minutos, mientras se mantenía el pH de la solución a 5,0 - 7,5, mediante la adición de N-metilmorfolina. Después de agitar durante otros 30 minutos, se añadieron a la mezcla de reacción 50 ml de acetona, para precipitar los componentes de bleomicina. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con acetona y se disolvió de nuevo en 3 ml de metanol. A la solución metanólica, mientras se enfriaba a 0°C y se agitaba, se le añadieron 597 mg del compuesto amino, y se agitó la mezcla durante 42 horas a 0°C. A la mezcla de reacción se añadieron, con agitación, 10 ml de acetona fría, para precipitar el producto de reacción. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con acetona y, seguidamente, se disolvió en 30 ml de agua destilada, ajustándose inmediatamente a pH 6,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. La solución acuosa se trató con CM-Sephadex (R) de una manera similar a la de la etapa A del ejemplo 5. La fracción que contenía los productos de reacción se vertió en una columna que contenía 65 ml de Diaion^(R) HP-40 como relleno en agua destilada para permitir la adsorción sobre la resina de los componentes de bleomicina. Después de lavar con agua, se eluyó la fase adsorbida con una mezcla de metanol y ácido sulfúrico acuoso 0,01 N (1:1 volumen/volumen) y se recogieron 130 ml de

1 una fracción que mostraba absorción ultravioleta a 292 m μ .
 Después de separar el metanol por destilación, se ajustó
 el líquido residual a pH 6,0 con Dowex^(R) 44 (tipo OH⁻) y
 se liofilizó para obtener 813 mg (75% de rendi-
 5 miento) de monosulfato de NK631 (forma que contiene cobre)
 en forma de un polvo amorfo azul, que tenía una potencia
 antimicrobiana de 7.819 u/mg.

Etapa B: Se aplicó el tratamiento de separación
 del cobre a 300 mg del monosulfato de NK631 (forma que con-
 10 tiene cobre) obtenido en la etapa A anterior, de la misma
 manera que en la etapa B del ejemplo 9, a excepción de que
 en la operación de elución se utilizaron una solución acuo-
 sa de acetato amónico al 5% y una mezcla de metanol y ácido
 acético acuoso 0,01 N (1:1 volumen/volumen), en lugar de la
 15 solución acuosa de cloruro sódico al 5% y de la mezcla de
 metanol y ácido clorhídrico acuoso 0,0025 N (1:1 volumen/
 volumen), respectivamente. Se obtuvieron así 748 mg (ren-
 dimiento 96%) de sal del ácido tiacético de NK631 (forma
 exenta de cobre) en forma de un polvo amorfo de color blan-
 20 co amarillento pálido. El máximo de absorción ultravioleta
 y la potencia antimicrobiana de este producto, fueron como
 se muestran a continuación.

Máximo de absorción ultravioleta:

| | | |
|----|---------|---|
| 25 | m μ | (E _{1 cm} ^{1%} 0,1 N HCl) |
| | 290 | (105) |

Potencia antimicrobiana: 7.620 u/mg

Ejemplo 11.

30 Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que
 28068

1 contiene cobre) y del diclorhidrato exento de cobre.

5 En 3 ml de metanol se disolvieron 1,0 g de diclorhidrato del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico. A la solución se añadieron, gota a gota, a la temperatura ambiente, 193 mg de S-terc-butoxicarbonil-4,6-dimetil-2-
10 -mercaptopirimidina, durante un periodo de 60 minutos, mientras se mantenía el pH a 6,0 - 7,4, mediante la adición de trietilamina al 14% en metanol. La mezcla se agitó durante otras 2 horas para dar el éster 3-N-terc-butoxicarbonilaminopropílico del ácido bleomicínico. Seguidamente, se enfrió la mezcla a 0°C, se mezcló con 1,2 g del compuesto amino, y se agitó durante 70 horas. A la mezcla de reacción se añadieron 10 ml de acetona fría para precipitar los componentes de bleomicina. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con acetona y, seguidamente, se disolvió en
15 30 ml de agua destilada, ajustándose inmediatamente a pH 6,0 con ácido clorhídrico 0,1 N. La solución acuosa resultante se purificó siguiendo el procedimiento utilizado en la etapa A del ejemplo 5, para obtener 597 mg (rendimiento
20 56%) de diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre) en forma de un polvo amorfo azul, que tenía una potencia antimicrobiana de 8.010 u/mg.

25 Etapa B: En 50 ml de metanol se disolvieron 500 mg de diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre) obtenido en la etapa A anterior. En la solución vigorosamente agitada se introdujo sulfuro de hidrógeno a través de una boquilla de un diámetro interior de 1 mm, sumergida en la solución, durante una hora, hasta disolver un gran exceso de sulfuro de hidrógeno en la solución. Después de
30 terminada la introducción del sulfuro de hidrógeno, se de-

1 -jó la solución en reposo durante 30 minutos a la temperatu
ra ambiente. El sulfuro de cobre precipitado se recogió por
filtración y se lavó con 50 ml de metanol saturado con sul
furo de hidrógeno. El filtrado y las aguas de lavado se
5 combinaron y se liberaron del metanol y del sulfuro de hi
drógeno mediante destilación bajo presión reducida. El re
siduo se disolvió en 50 ml de metanol y se mezcló con 100
ml de éter etílico. El precipitado formado se recogió por
filtración, se lavó con éter y se secó para obtener 394
10 mg (rendimiento 82%) de diclorhidrato de NK631 (forma exen
ta de cobre) en forma de un polvo amorfo de color blanco
amarillento pálido, que tenía una potencia antimicrobiana
de 7.820 u/mg.

15 Ejemplo 12

Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que
contiene cobre) y del diclorhidrato exento de cobre.

Etapa A: En 2 ml de metanol se disolvieron 1,0 g
del diclorhidrato del éster 3-aminopropílico del ácido
20 bleomicínico (forma que contiene cobre). A la solución vi
gorosamente agitada, a la temperatura ambiente, se añadie
ron 98 mg de aldehído salicílico, mientras se mantenía el
pH de la solución a 7,0-7,4 mediante la adición de trieti
lamina, para dar el éster 3-N-salicilideniminopropílico del
25 ácido bleomicínico. Al cabo de una hora de agitación conti
nuada, se añadieron a la mezcla, enfriada a 0°C, y con agi
tación, 600 mg del compuesto amino. La mezcla se agitó du
rante 30 horas. A la mezcla de reacción se añadieron 10 ml
de acetona fría para precipitar los componentes de bleomi
30 cina. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con

1 - acetona y, seguidamente, se disolvió en 30 ml de agua des-
tilada, ajustándose inmediatamente a pH 6,0 con ácido clor-
hídrico 0,1 N. La solución acuosa resultante se purificó
5 como en la etapa A del ejemplo 5, para obtener 501 mg (ren-
dimiento 47%) de diclorhidrato de NK631 (forma que contie-
ne cobre) que tenía una potencia antimicrobiana de 8.013
u/mg.

Etapa B: En 25 ml de ácido clorhídrico acuoso
0,5 N se disolvieron 450 mg del diclorhidrato de NK631 (for-
10 ma que contiene cobre) obtenido en la etapa A anterior. A
la solución se añadieron 25 ml de una solución clorofórmi-
ca que contenía 0,2% de ditizona (difeniltiocarbazona).
Después de una rápida agitación por sacudidas y mezclado,
se dejó la mezcla en reposo hasta que se separó la mezcla
15 en dos capas. Se retiró la capa inferior (capa clorofórmi-
ca) y la capa superior se mezcló con 25 ml de solución clo-
rofórmica de nueva aportación, que contenía ditizona. Se
repitió ocho veces el procedimiento anterior de agitación
por sacudidas, separación de fases y adición de solución
20 clorofórmica que contenía ditizona de nueva aportación.
Finalmente, la capa superior (capa acuosa) se lavó con clo-
roformo y la capa acuosa separada se ajustó a pH 6,0 con
Dowex^(R) 44 (tipo OH⁻). La capa acuosa así tratada se eva-
poró hasta sequedad bajo presión reducida, para obtener
25 415 mg (rendimiento 96%) de diclorhidrato de NK631 (forma
exenta de cobre) en forma de un polvo amorfo, de color
blanco amarillento pálido, que tenía una potencia antimi-
crobiana de 7.845 u/mg.

Ejemplo 13

Síntesis del diclorhidrato de NK631 (forma que

1 - contiene cobre).

En 2 ml de metanol se disolvieron 1,0 g de diclorhidrato del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico (forma que contiene cobre). A la solución enfriada a 5 0°C se añadieron, con agitación, 1,0 g del compuesto amino, y la mezcla se agitó durante otras 72 horas. A la mezcla de reacción se añadieron, con agitación, 6 ml de acetona fría para precipitar los componentes de bleomicina. El precipitado se purificó como en la etapa A del Ejemplo 5 para obtener 128 mg (rendimiento 12%) de diclorhidrato de NK631 (forma que contiene cobre) en forma de un polvo amorfo azul, que tenía una potencia antimicrobiana de 8.015 u/mg.

15

Ejemplo de referencia 1

Síntesis del N-[(S)]-1'-feniletil]-1,3-diaminopropano.

A 50 g de (S)-1-feniletilamina, a 0°C, con enfriamiento, se añadieron con agitación, 33 g de acrilonitrilo. La mezcla se colocó en un matraz provisto de un condensador de reflujo conectado a un tubo de cloruro cálcico, y se calentó hasta 93°C, temperatura a la cual se agitó la mezcla durante 18 horas. Después de completada la reacción se liberó la mezcla de reacción del exceso de acrilonitrilo, mediante destilación bajo presión reducida. El residuo se destiló bajo presión reducida y se recogió una fracción que hervía a 142° - 145°C/7 mm de Hg para obtener 53,5 g de 3-[(S)]-1'-feniletilamino]-propionitrilo. Este nitrilo se colocó en un autoclave junto con 5 g de níquel Raney 25 W-7 y 50 ml de etanol que contenía 15% de amoníaco. La mez-

30

28068

1 — cla se agitó a una velocidad de 1.000 revoluciones por mi-
nuto durante 1,5 horas, a 50-58°C, y bajo una presión par-
cial de hidrógeno de 100-40 kg/cm². Después de completada
la reducción se destiló la mezcla de reacción bajo presión
5 reducida. Se recogió una fracción que hervía a 95-103°C/2
mm de Hg, para obtener 48,3 g de N-[(S)-1'-feniletil]-1,3-
-diaminopropano [66% de rendimiento teórico con relación
a la (S)-1-feniletilamina].

10

15

20

25

30

- REIVINDICACIONES -

1

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método para producir 3- \square (S)-1'-feniletilamino \square propilaminobleomicina representada por la fórmula

15

20

25

30

28068

1

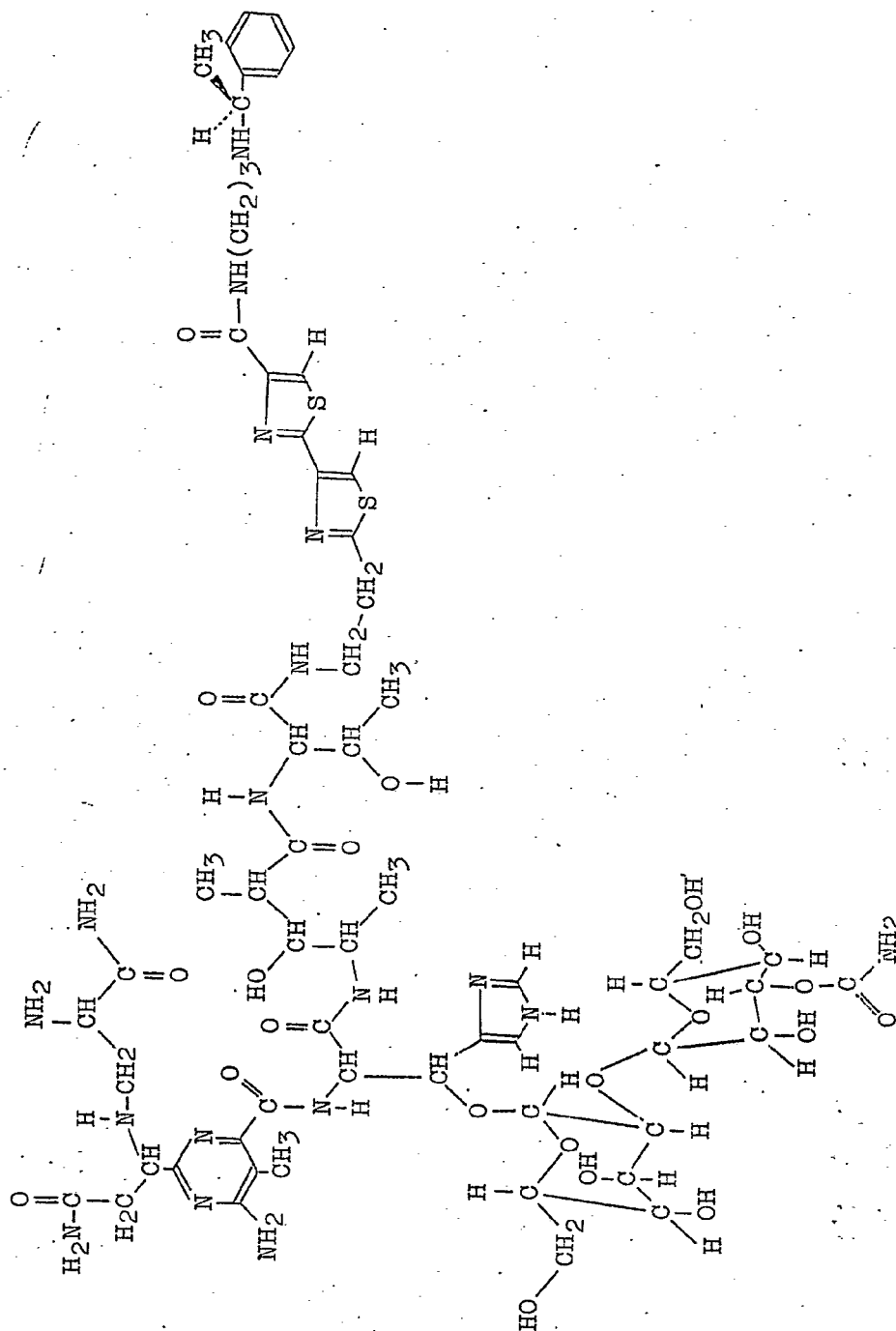
5

10

15

20

25



y una sal no tóxica de la misma, que comprende hacer reaccionar un derivado reactivo del grupo carboxílico del ácido bleomicínico representado por la fórmula

30

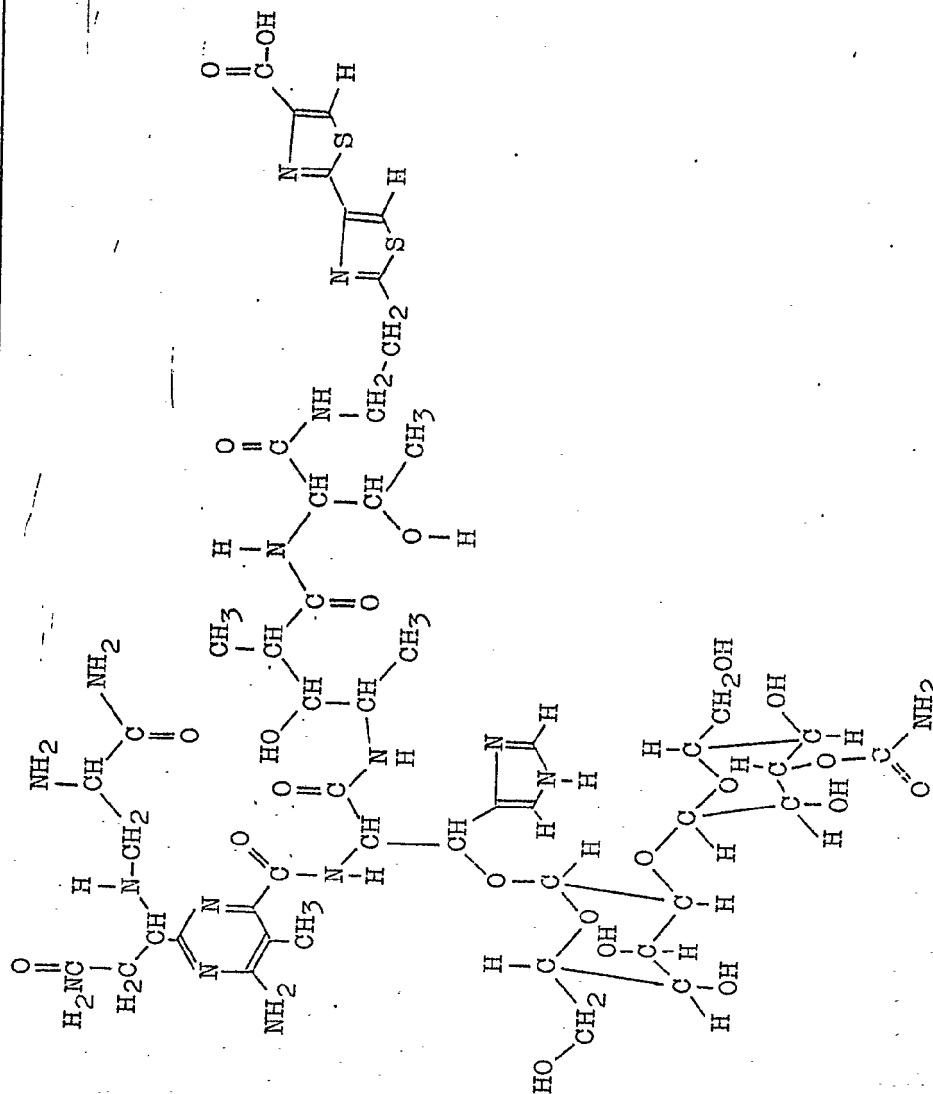
1

5

10

15

20



con N-(S)-1'-feniletíl-7-1,3-diaminopropano, en un disolvente y, si es necesario, convertir el producto en una sal no tóxica.

25

2ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual la sal no tóxica es clorhidrato, sulfato o sal de ácido acético.

30

3ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual el derivado reactivo del grupo carboxilo del ácido bleomicínico se prepara utilizando un compuesto

28068

1 -seleccionado del grupo consistente en 6-cloro-1-p-cloro-
bencenosulfoniloxibenzotriazol, 3'-sulfonato de N-etil-5-
-fenilisoaxazolio, perclorato de N-terc-butil-5-metilisoxa-
zolio, N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína, sul-
5 fito de di-p-nitrofenilo, fosfito de tri-p-nitrofenilo,
tricloroacetato de p-nitrofenilo, N-hidroxisuccinimida, di-
ciclohexilcarbodiimida, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)car-
bodiimida, 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida,
difenilcarbodiimida, di-p-toluilcarbodiimida, diisopropil-
10 carbodiimida, p-nitrofenol, pentaclorofenol y alcohol ben-
cílico.

4ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación
1ª, en el cual el derivado reactivo del grupo carboxilo del
ácido bleomicínico es el éster 3-aminopropílico.

15 5ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación
1ª, en el cual el derivado reactivo del grupo carboxilo
del ácido bleomicínico es el éster N-monosustituído-3- amino-
propílico.

20 6ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación
2ª, en el cual el éster N-monosustituído-3-aminopropílico
es un éster seleccionado del grupo consistente en éster
3-acetilaminopropílico, éster 3-succinilaminopropílico,
éster 3-benzoilaminopropílico, éster 3-bencilaminopropíli-
co, éster 3-p-toluensulfonilaminopropílico, éster 3-(2,4-
25 -dinitrofenil)aminopropílico, éster 3-(3,5-dimetil-3-oxo-
ciclohexen-1-il)aminopropílico, éster 3-(terc-butoxicarbo-
nil)aminopropílico y éster 3-(saliciliden)-iminopropílico.

30 7ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación
1ª, en el cual se utilizan de 1 a 10 equivalentes del
N-[(S)]-1'-feniletil-7-1,3-diaminopropano por cada equiva-

1 - lente del ácido bleomicínico.

5 8ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual el ácido bleomicínico y el N- γ -(S)-1'-feniletil- γ -1,3-diaminopropano se hacen reaccionar a 0º - 30ºC, durante 1 a 24 horas.

10 9ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual se utilizan de 1 a 10 equivalentes del N- γ -(S)-1'-feniletil- γ -1,3-diaminopropano, por cada equivalente del éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico o de un derivado N-monosustituído del mismo.

15 10ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual se hacen reaccionar el éster 3-aminopropílico del ácido bleomicínico o un derivado N-monosustituído del mismo, y el N- γ -(S)-1'-feniletil- γ -1,3-diaminopropano, a 0º - 80ºC, durante 1 a 72 horas.

11ª.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el cual el disolvente es agua, metanol, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo o una mezcla de los mismos.

20 12ª.- Un método para producir 3- γ -(S)-1'-feniletilamino- γ propilaminobleomicina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

25 Esta Memoria consta de cincuenta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31.AGO.1978

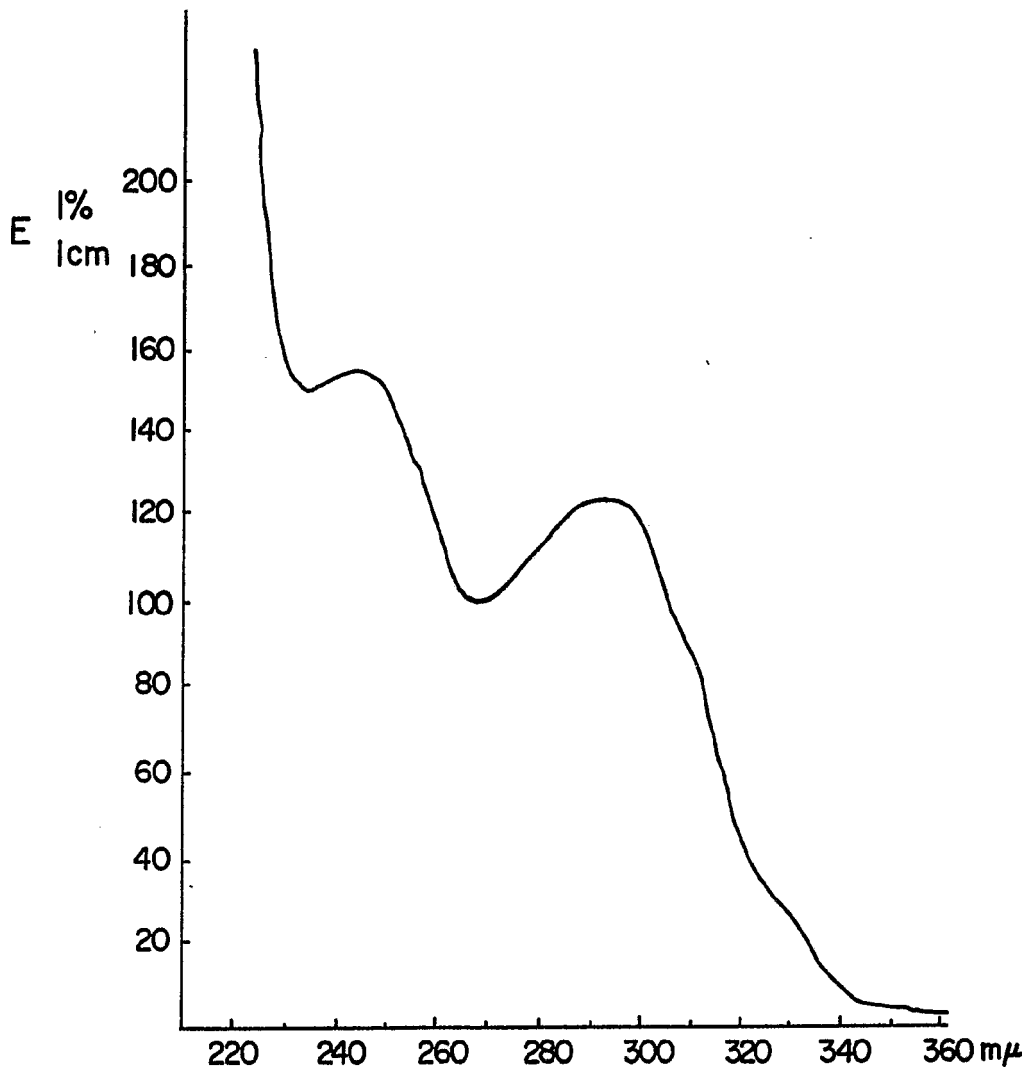
P.A.

Alberto de Elzabur
Por red.

DNM30

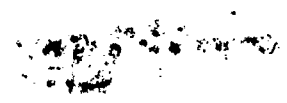
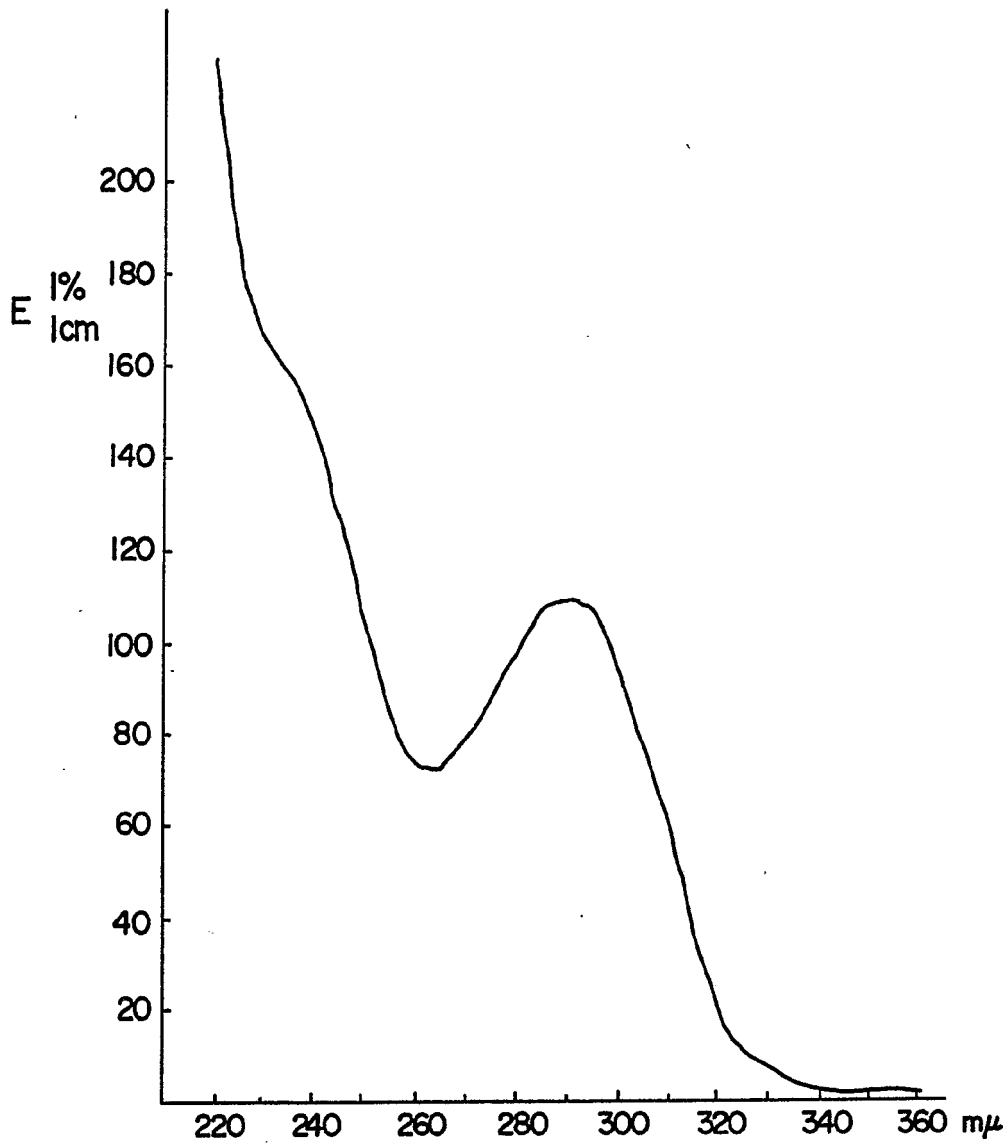
28068

FIG.1



NIHON DAIYAKU KABUSHIKI KAISHA

FIG.2



6-350

FIG.3

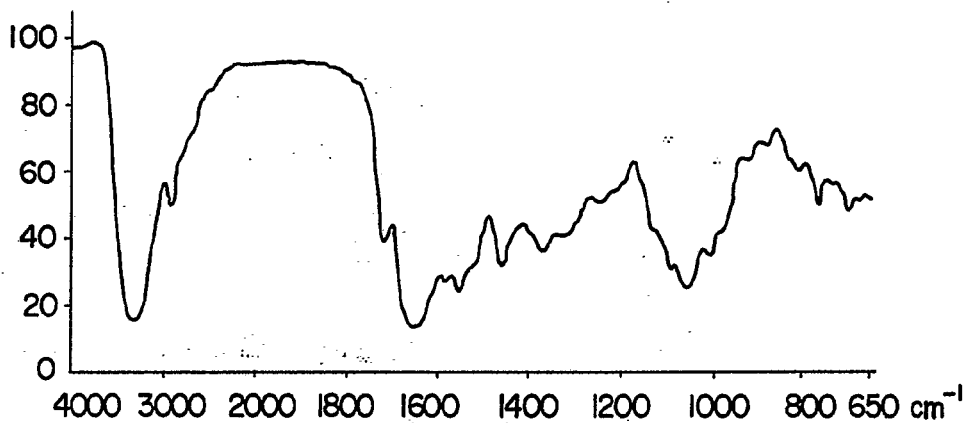


FIG.4

