



ESPAÑA

20 DIC. 1978

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

NUMERO	74710007
FECHA DE PRESENTACION	30-Junio-1.978

A1

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
98997/77	18-8-77	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D/AGAK	

54 TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE 3-L(S)-1'-FENILETILAMINO PROPILAMINOBLEOMICINA"

71 SOLICITANTE (S)
NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA (A3113-01 KAYAKU)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
2-1, Marunouchi-1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo, Japón

72 INVENTOR (ES)
Mamoru Kunishima, Tadao Yamazaki, Hiroyuki Hayashi, Ichiro Takahashi, Mitsuo Nozaki, Yasuichi Shingai, Katsuhisa Tomita, Kunio Takada y Hamao Umezawa.

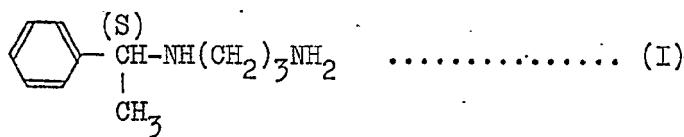
73 TITULAR (ES)

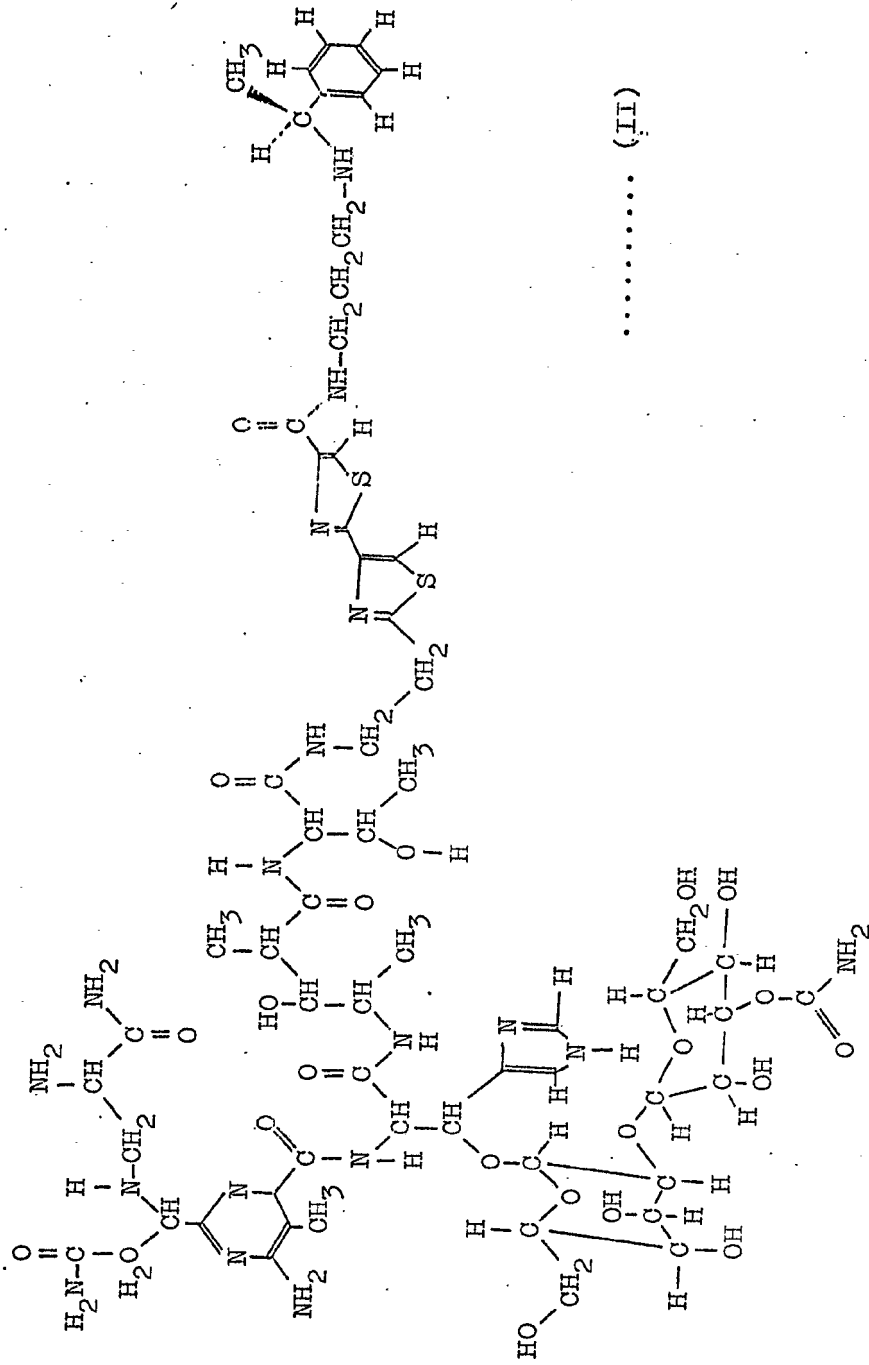
74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-69.351)

MCS/.

POOR
QUALITY

1 Esta invención se refiere a un procedimiento pa-
 ra producir una nueva bleomicina ópticamente activa repre-
 sentada por la fórmula (II) que se muestra abajo. Más par-
 ticularmente, se refiere a un procedimiento para producir
 5 una nueva 3- $\left[\text{(S)-1'-feniletilamino} \right]$ propilaminobleomicina
 representada por la fórmula (II) caracterizado por inocu-
 lar una cepa productora de bleomicina que pertenece al gé-
 nero Streptomyces en un medio, cultivar la cepa en presen-
 cia de N- $\left[\text{(S)-1'-feniletil} \right]$ -1,3-diaminopropano represen-
 10 tado por la fórmula (I) o su sal a fin de producir selec-
 tivamente 3- $\left[\text{(S)-1'-feniletilamino} \right]$ propilaminobleomicina
 representada por la fórmula (II) y, después de ello, aislar
 y recoger la bleomicina formada a partir del fluido de cul-
 tivo.





23068

1 La bleomicina es una sustancia antibiótica anti-
tumoral descubierta por Umezawa y otros [Umezawa y otros:
Journal of Antibiotics, 19A, 200 (1966)]. Es un azúcar-
5 -péptido básico y soluble en agua, capaz de formar un que-
lato con un átomo de cobre divalente. Puede obtenerse cul-
tivando una cepa productora de bleomicina perteneciente a
Streptomyces verticillus en un medio nutriente con airea-
ción y agitación, y aislando luego el producto del fluido
10 de cultivo por algún medio tal como resina de intercambio
de iones. De acuerdo con el procedimiento de cultivo usual,
se producen y aíslan 16 clases de bleomicinas [por ejem-
plo, Umezawa y otros: Journal of Antibiotics, 19A, 210
(1966)].

15 Es sabido también que estas bleomicinas se re-
presentan por la fórmula general siguiente (III) en la que
R es diferente entre las bleomicinas individuales.

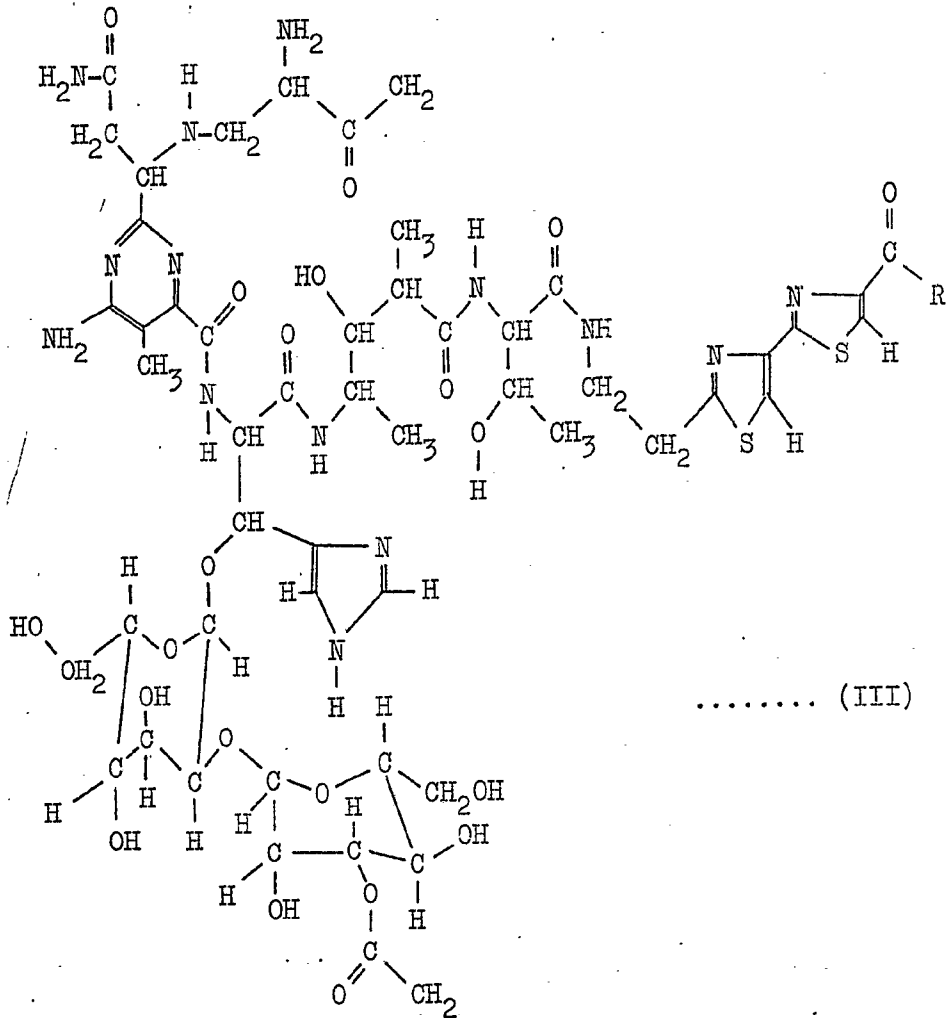
1

5

10

15

20



..... (III)

25

Se describe también en la Patente de EE.UU. No 3.846.400 que, si la cepa productora de bleomicina se cultiva en un medio que contiene un compuesto aminado, la bleomicina resultante incorpora dicho compuesto aminado en sí misma como su cadena lateral, representada por R en la fórmula (III), para formar una nueva bleomicina que es diferente de cualquiera de las bleomicinas conocidas y que no puede obtenerse por cualquiera de los procedimientos de cultivo usuales.

30

Algunos ejemplos de tales nuevas bleomicinas se

1. muestran a continuación:

	<u>R</u>	<u>Nombre de Bleomicina</u>
	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	desmetil-A ₂ (3-(metilmercapto)propilaminobleomicina)
5	$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \qquad \qquad \text{O} \\ \qquad \qquad \qquad \parallel \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	A ₁
	$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \qquad \qquad + \\ \qquad \qquad \qquad \diagup \quad \diagdown \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S} \quad \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \end{array}$	A ₂
10	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	A ₅
	$\begin{array}{c} \qquad \qquad \qquad \text{NH} \\ \qquad \qquad \qquad \parallel \\ \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$	B ₂
15	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$	3-(metilamino)propilaminobleomicina
	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NHC}_4\text{H}_9$	3-(butilamino)propilaminobleomicina
20	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$	3-(pirrolidino)propilaminobleomicina

Entre estas bleomicinas, A₁, A₂, A₅, B₂, desmetil A₂ y algunas otras se utilizan extensivamente en la forma de una mezcla exenta de cobre (de aquí en adelante, se hace referencia a su mezcla de la que se ha eliminado el cobre como "complejo de bleomicina") para el tratamiento clínico del cáncer, en particular para el tratamiento del carcinoma de las células escamosas, así como del cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del cuello uterino, cáncer de pulmón, linfoma maligno y similares.

1 con resultados satisfactorios en el momento presente.

Desde el ángulo de los efectos secundarios, sin embargo, la bleomicina tiene algunas propiedades indeseables tales como el ser causa de fibrosis pulmonar. La fibrosis pulmonar es el más peligroso entre los efectos secundarios de la bleomicina. Se deduce fácilmente que si este efecto secundario puede mitigarse en cierto grado la eficacia carcinostática de la bleomicina se exhibirá más plenamente en el campo clínico.

10 En vista de lo que antecede, los autores de la presente invención han preparado diversas bleomicinas y han examinado sus actividades carcinostáticas y toxicidades, particularmente el efecto sobre la fibrosis pulmonar, mediante experimentos repetidos en animales a lo largo de muchos años. Como resultado, se ha encontrado que la nueva bleomicina representada por la fórmula (II) antes mencionada, a saber, 3-[(S) -1'-feniletilamino]propilamino-bleomicina (a la que se hace referencia aquí como "NK 631" para abarcar tanto la forma que contiene cobre como la forma exenta de cobre), obtenible por cultivo de una cepa productora de bleomicina en presencia de N-[(S) -1'-feniletil]-1,3-diaminopropano como precursor, no es en modo alguno inferior en efecto carcinostático a los complejos de bleomicina comercialmente asequibles en el momento presente o a cualesquiera otras bleomicinas descritas y tiene una posibilidad muy disminuida de causar fibrosis pulmonar.

25 Esta invención se ha culminado sobre la base del descubrimiento arriba mencionado.

Es un objeto de esta invención proporcionar un procedimiento fermentativo para producir una nueva bleo-

1 micina NK631.

Otros objetos y ventajas de esta invención serán evidentes a partir de las descripciones dadas a continuación.

5 Hablando en términos generales, la isomerización es una de las reacciones bioquímicas más importantes que tienen lugar en el procedimiento de crecimiento de los microbios, por el cual diversas sustancias ópticamente activas se convierten con frecuencia en sustancias antípodas o racémicas. Aparte de ello, la posibilidad de que un compues-
10 to aminado ópticamente activo pueda experimentar una racemización no bioquímica en el curso de la esterilización o del cultivo es también innegable. Muchas investigaciones han revelado que una sustancia ópticamente activa difiere
15 claramente de otra sustancia ópticamente activa en permeabilidad a través de la pared de las células microbianas o membrana celular, así como en especificidad para un sustrato y afinidad para las enzimas que participan en los sistemas biosintéticos y metabólicos.

20 En el sistema biosintético de la bleomicina, se espera naturalmente que el microbio se comporte de algún modo selectivo cuando el mismo incorpora un compuesto aminado ópticamente activo en sí mismo y que el compuesto aminado o la bleomicina resultante pueda sufrir posiblemente
25 una racemización.

De hecho, los inventores analizaron, por el procedimiento que se menciona más adelante, la bleomicina obtenible por cultivo de una cepa productora de bleomicina en un medio que contenía N-[(R,S)-1'-feniletil]-1,3-diaminopropano como precursor y encontraron que el N-[1'-fé-

1 - feniletil- γ -1,3-diaminopropano introducido en la bleomicina
mantiene siempre una relación R/S casi constante de 4:1.
Aunque se desconoce la razón por la que la bleomicina re-
sultante no era la forma RS, el hecho experimental arriba
5 mencionado sugiere evidentemente que, en el sistema bio-
sintético de la cepa productora de bleomicina pertenecien-
te a Streptomyces verticillus, la introducción de un com-
puesto aminado ópticamente activo en la molécula de bleomi-
cina progresa con una selectividad notable de tal modo que
10 la introducción de la forma R tiene siempre preferencia
sobre la de la forma S.

Se espera, como consecuencia de este hecho, que
cuando el cultivo se lleva a cabo en un medio que contie-
ne N- γ -(S)-1'-feniletil- γ -1,3-diaminopropano como precur-
15 sor, será extremadamente difícil introducir selectivamente
el compuesto aminado en la molécula de bleomicina y obte-
ner de este modo NK 631 de pureza óptica elevada con un
rendimiento alto.

A pesar del hecho experimental arriba menciona-
20 do, los estudios de los inventores han revelado que, si
se añade N- γ -(S)-1'-feniletil- γ -1,3-diaminopropano al sis-
tema de cultivo, no sufre racemización alguna y, sorpren-
dentemente, puede incorporarse en la molécula de bleomi-
cina con exactamente la misma relación R/S que en el caso
25 en que se añade un compuesto aminado de forma R pura al
sistema de cultivo. Aunque no puede darse ninguna explica-
ción decisiva en el momento actual, una posible hipótesis
que explica el hecho puede ser que el compuesto aminado
de la forma R actúa competitivamente o antagonísticamente
30 y, como resultado de ello, la introducción del compuesto

1 aminado de la forma S se ve impedida y la formación de
bleomicina de forma R progresa abrumadoramente. Así, se ha
establecido un procedimiento para obtener, con rendimiento
alto, una nueva bleomicina NK 631 que es muy importante
5 para el tratamiento del cáncer. Sobre la base de este descubrimiento, se ha puesto a punto esta invención. Esta invención es el primer logro en la producción fermentativa de bleomicina ópticamente activa.

El N- γ (S)-1'-feniletil- γ -1,3-diaminopropano
10 utilizado en la presente invención es un compuesto nuevo que los inventores han sintetizado por primera vez. Dicho compuesto puede sintetizarse de la manera siguiente.

Se añade una cantidad aproximadamente equivalente de acrilonitrilo a feniletilamina previamente enfriada
15 a 0°C. La mezcla se mantiene a 85°-100°C durante 10-24 horas para completar la reacción. Después de ello se separa por destilación el exceso de acrilonitrilo a presión reducida, y el residuo se destila adicionalmente para obtener
3- γ (S)-1'-feniletilamino- γ propionitrilo. Este último se
20 reduce por el método convencional en presencia de, por ejemplo, níquel Raney como catalizador para obtener el N- γ (S)-1'-feniletil- γ -1,3-diaminopropano buscado (al que se hace referencia de aquí en adelante como "compuesto aminado"). La Tabla 1 presenta las propiedades físicas y
25 químicas del compuesto aminado

1

Tabla 1

71297

	Base libre .	Diclorhidrato
(1) Aspecto	Líquido incoloro (temperatura ambiente)	Agujas blancas
(2) Punto de fusión	-	223,5° - 224°C
(3) Punto de ebullición	95° - 103°C (2 mmHg)	-
(4) Máximo de absorción en ultravioleta (m μ)	241, 247, 252, 257, 263, 267 (metanol)	250, 256, 259, 266 (agua destilada)
(5) Coeficiente de extinción molar ϵ (256 m μ)	-	206 (agua destilada)
(6) Rotación específica $[\alpha]_D^{25}$ α_D^{26}	- -56,38° (no diluida, C = 1)	-20,6° (C = 1, (agua destilada) -
(7) Cromatografía en capa delgada (R _f) n-Propanol-piridina-ácido acético-agua (15:10:3:12 vol/vol) Avicell-SF [®]	0,73	0,73
(8) Electroforesis de alto voltaje (R _m)		

23068

(continúa)

1

Tabla 1 (continuación)

Acido fórmico- ácido acético- agua (25:75:900 vol/vol) Avicell-SF [®] , 800 V, 10 minutos. Se toma alamina como 1,0	1,52	1,52
(9) Espectro de absorción en infrarrojo (cm ⁻¹) (método de KBr)	700, 760, 820, 910, 1025, 1080, 1130, 1200, 1305, 1350, 1370, 1450, 1495, 1605, 2850, 2940, 3300, 3375,	690, 750, 820, 910, 980, 1020, 1065, 1075, 1150, 1205, 1385, 1460, 1500, 1515, 1590, 2500, 2850, 3000, 3500
(10) Fórmula molecular (peso molecular)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ (178,28)	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ Cl ₂ (251,20)

5

10

15

20

25

En la práctica de esta invención, es aconsejable utilizar un medio compuesto principalmente de hidratos de carbono y materias orgánicas que contienen nitrógeno tales como gelatina de mijo, glucosa, almidón, polvo de semilla de soja, líquido de maceración de maíz y similares y que contenga adicionalmente una pequeña cantidad de materias inorgánicas tales como fosfato de potasio, sulfato de cobre, sulfato de zinc, sal comestible, nitrato y similares (este tipo de medios se mencionan en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 3.681.491 y 3.846.400). El N-(S)-1'-feniletil-7-1,3-diaminopropano utilizado como precursor puede incorporarse en el medio previamente, o añadirse al mismo por porciones en el transcurso del cultivo, o añadirse de manera combinada. Usualmente, el compuesto aminado a añadir se neutraliza previamente con ácido clorhídrico y

30

1 se utiliza en la forma de clorhidrato. Sin embargo, es tam-
bién permisible añadir un compuesto aminado libre al medio.
En el último caso, el valor del pH del medio se ajusta como
un todo y, después de ello, se inicia el cultivo.

5 La concentración de N-[(S)-1'-feniletil]-1,3-
-diaminopropano en el medio está comprendida dentro del in-
tervalo de 0,2 a 2 mg/ml, preferiblemente 1 mg/ml. Después
que se ha esterilizado el cultivo, se inocula el mismo con
una cepa productora de bleomicina perteneciente a Strepto-
10 myces verticillus tal como Streptomyces verticillus NK
68-144 depositada en el Fermentation Research Institute,
Agency of Industrial Science and Technology, Japón, como
FERM-P Nº 4108 y en la American Type Culture Collection
como ATCC 31307 o con un fluido de cultivo de siembra de
15 una cepa productora de bleomicina perteneciente a la varie-
dad de Streptomyces verticillus, y luego se cultiva entre
23º y 37º C con aireación y agitación, usualmente durante
un período de aproximadamente 5 a 10 días. El cultivo se
completa cuando se alcanza la potencia máxima del caldo,
20 lo que se determina por bioensayo utilizando mycobacterium
607 como bacteria de ensayo. Una vez completado el cultivo,
el fluido de cultivo se filtra junto con un coadyuvante de
filtración, se hace pasar el filtrado a través de una resi-
na de intercambio de anión que tiene grupos reactivos tales
25 como carboxilo para adsorber el producto deseado sobre la
resina, el producto se eluye con ácido clorhídrico acuoso,
y se neutraliza el producto eluido. El soluto se adsorbe
una sola vez sobre carbón vegetal activado, se eluye con
acetona-ácido clorhídrico, se concentra y se liofiliza.
30 Se extrae con metanol, se somete a cromatografía sobre

1 alúmina, se eluye con metanol, y el eluato se concentra y
se liofiliza. Después de ello se somete a cromatografía so-
bre Sephadex [®] G-25 (un nombre comercial de un filtrante de
5 gel, compuesto de bolitas microscópicas de dextrana reticu-
lada, fabricado y vendido por Pharmacia Fine Chemicals Inc.,
Suecia), después de lo cual se somete de nuevo a cromatogra-
fía sobre CM Sephadex [®] C-25 (un nombre comercial para un
Sephadex de intercambio de catión compuesto de bolitas mi-
croscópicas de un derivado del polisacárido dextrana que
10 contiene grupos carboximetilo, fabricado y vendido por Phar-
macia Fine Chemicals Inc., Suecia) y se eluye con solución
acuosa de cloruro de amonio, con lo que se obtiene un elua-
to que contiene la forma deseada NK 631 que contiene cobre.
Esta fracción se vierte en una columna de resina Diaion [®]
15 HP 40 para adsorber el producto sobre la resina, se lava su-
cesivamente con una solución de etilendiaminotetraacetato
disódico (a la que se hace referencia de aquí en adelante
como "EDTA.Na₂"), una solución de sulfato de sodio y agua,
y finalmente se eluye con mezcla acetona-agua. El eluato
20 se concentra y se liofiliza para dar un polvo amorfo de co-
lor amarillento-blanco pálido de monosulfato de NK 631 (for-
ma exenta de cobre).

El monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre)
obtenido de acuerdo con esta invención se hidrolizó con un
25 ácido fuerte, el producto hidrolizado se reveló por medio
de electroforesis de alto voltaje sobre papel y cromatogra-
fía en dos dimensiones sobre papel, y se ensayó por la reac-
ción de la ninhidrina. Así, se confirmó la presencia de
N-[1'-feniletil]-1,3-diaminopropano.

Después de ello se aisló y purificó la amina, y

471297

1 se midieron su rotación específica y su absorbancia en ultravioleta para determinar la pureza óptica del NK 631. El procedimiento concreto de la determinación fue como sigue:

5 Aproximadamente 50 mg de monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) se mezclan con ácido clorhídrico 6N y se calientan a la temperatura de reflujo de 110° a 115°C durante 16 horas. Se aísla el N-[(S)-1'-feniletil]-1,3-diaminopropano del producto de descomposición y se purifica, después de lo cual se mide su rotación óptica

10 ($\lambda = 365 \text{ nm}$) a 25°C con un polarímetro Perkin-Elmer 141. Se miden después la absorbancia para $\lambda = 256 \text{ nm}$ y la curva completa en la región ultravioleta. La curva en el intervalo de 280-310 nm se extrapola a $\lambda = 256 \text{ nm}$, que se utiliza como línea base para 256 nm.

15 Cuando la pureza óptica se expresa por x, se obtienen las ecuaciones siguientes:

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

20 $x = 0,5 + 5,735 \times \frac{\alpha}{OD} \dots\dots (2)$

donde S: rotación óptica levorrotatoria

R: rotación óptica dextrorrotatoria

α : rotación óptica observada

25 OD: absorbancia observada.

El monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) obtenido de acuerdo con esta invención da, por hidrólisis ácida, N-[(S)-1'-feniletil]-1,3-diaminopropano, cuya rotación específica observada $[\alpha]_{365}^{25}$ es -64,18° (C = 0,38, H₂O) en un caso típico. La pureza óptica del monosulfato

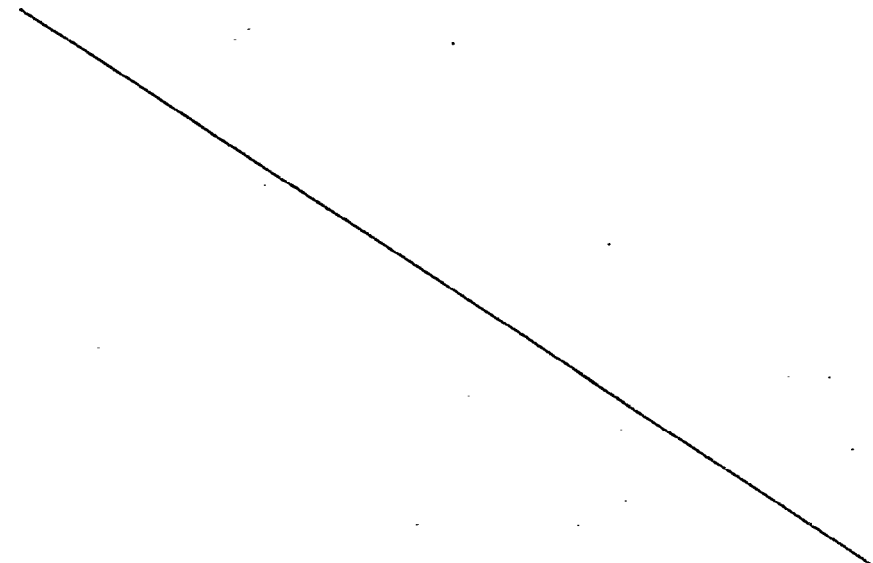
30

1 de NK 631 de partida (forma exenta de cobre) calculada de acuerdo con la ecuación arriba mencionada es 98,5%.

Las tablas 2 y 3 enumeran las principales características físicas y químicas de NK 631.

5 La estructura de NK 631 representada por la fórmula (II) se ha comprobado por disolución de monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) en agua pesada y midiendo ^{13}C -RMN por el método de desacoplamiento del ruido protónico con dioxano como patrón interno. Así, las señales
10 siguientes pueden observarse como un todo a:

15 19,4, 26,3, 37,0, 43,5, 58,9, 128,3 (dos), 130,0 (dos), 130,2 y 136,3 ppm que son asignables a los once átomos de ^{13}C presentes en el compuesto aminado que constituye la cadena lateral, a saber el resto de 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilamino. Todas las restantes señales debidas al átomo de carbono son señales características de la bibliografía mencionada de las bleomicinas generales γ Naganawa y otros: Journal of Antibiotics, Vol. 30, pág. 388 (1977).



1

Tabla 2

Propiedades físicas y químicas de NK 631 (forma que contiene cobre)

	Diclorhidrato	Monosulfato
5 (1) Aspecto	Polvo amorfo azul	Polvo amorfo azul
10 (2) Solubilidad	Soluble en agua, metanol, ácido acético, sulfóxido de dimetilo y dimetilformamida; ligeramente soluble en dioxano; insoluble en etanol, acetona, éter y benceno	Lo mismo que a la izquierda
(3) Punto de fusión (descomposición) (°C)	205 - 207	205 - 207
15 (4) Rotación específica $[\alpha]_{436}^{25}$ (agua destilada, C = 1,0)	-95,6°	-93,7°
20 (5) Cromatografía en capa delgada (R _F) (Véase Nota 1)	(a) 0,72 (b) 0,75	(a) 0,72 (b) 0,75
25 (6) Electroforesis (R _m) (Se toma la alanina como 1,0; véase Nota 2)	0,80	0,80

(Nota 1) (a) Gel de sílice G[®] (nombre comercial de un adsorbente para cromatografía en capa delgada compuesto de gel de sílice fabricado por Merck Inc. EE.UU.), metanol-acetato de amonio al 10%-agua amoniacal al 10% (10:9:1 (vol/vol)).

1

(b) Avicell SF[®] (nombre comercial de un adsorbente para cromatografía en capa delgada compuesto de celulosa cristalina fabricado por FMC Corporation, EE.UU.), n-propanol-piridina-ácido acético-agua (15:10:3:12)

5

(Nota 2) Avicell SF[®], ácido fórmico-ácido acético-agua (25:75:900 vol/vol), 800 V, 15 minutos.

Tabla 3
Propiedades físicas y químicas de NK 631 (forma exenta de cobre)

	Diclorhidrato	Monosulfato	Disal de ácido acético
(1) Aspecto	Polvo amorfo pálido blanco amarillento	Polvo amorfo pálido blanco amarillento	Polvo amorfo pálido blanco amarillento
(2) Solubilidad	Soluble en agua, metanol, ácido acético, sulfóxido de dimetilo y dimetilformamida; ligeramente soluble en dióxano; insoluble en etanol, acetona, éter y benceno	Lo mismo que a la izquierda	Lo mismo que a la izquierda
(3) Punto de fusión (descomposición) (°C)	195 - 197	196 - 198	188 - 190
(4) Rotación específica [α] _D ²⁵ (agua destilada, C = 1,0)	-2,1º	-2,0º	-2,0º

Tabla 3 (continuación)

(5) Cromatografía en capa delgada (R _f) (véase Nota 1)	(a) 0,56 (b) 0,70	(a) 0,56 (b) 0,70	(a) 0,56 (b) 0,70
(6) Electroforesis (R _m) (Se toma la alanina como 1,0; véase Nota 2)	0,94	0,94	0,94

(Nota 1) (a) Gel de sílice G[®], metanol-acetato de amonio al 10% -agua amoniaca
al 10% (10:9:1 vol/vol)

(b) Avicell SF[®], n-propanol-piridina-ácido acético-agua (15:10:3:12)

(Nota 2) Avicell SF[®], ácido fórmico-ácido acético-agua (25:75:900 vol/vol), 800 V,
15 minutos.

1 En los dibujos que se adjuntan, las Figuras 1 y
2 ilustran las absorciones en ultravioleta de NK 631 de es-
ta invención, y las Figuras 3 y 4 ilustran sus absorciones
en infrarrojo. Es decir, que la Figura 1 es la curva de
5 absorción en ultravioleta del diclorhidrato de 3- $\left[\begin{array}{c} \text{S} \\ \text{---} \end{array} \right]$ -1'-
-feniletilamino $\left[\begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array} \right]$ propilaminobleomicina (forma que contiene
cobre). La Figura 2 es la curva de absorción en ultravio-
leta del monosulfato correspondiente (forma exenta de co-
bre). La Figura 3 es la curva de absorción en infrarrojo
10 del correspondiente diclorhidrato (forma que contiene co-
bre) medida en el estado de tableta de bromuro de potasio.
La Figura 4 es la curva de absorción en infrarrojo del co-
rrespondiente monosulfato (forma exenta de cobre) medida
de la misma manera que arriba.

15 Haciendo referencia a ejemplos experimentales,
se ilustrarán a continuación las excelentes actividades
biológicas del NK 631 de esta invención.

 A partir de los cuatro puntos de vista siguien-
tes, se comparó la actividad biológica del NK 631 con las
20 del complejo de bleomicina comercial y del monosulfato
de 3- $\left[\begin{array}{c} \text{R,S} \\ \text{---} \end{array} \right]$ -1'-feniletilamino $\left[\begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \end{array} \right]$ propilaminobleomicina (for-
ma exenta de cobre) (al que se hace referencia de aquí en
adelante como "forma RS"). Dicha forma RS se había produ-
cido de acuerdo con el procedimiento de fermentación de
25 la Patente de EE.UU. Nº 3.846.400.

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

30

1. Toxicidad pulmonar en el ratón (fibrosis)

1. Se utilizaron ratones macho de la raza ICR (de 15 semanas de edad) tomando 12 animales por grupo. A una dosis fija de 5 mg/kg, el agente se inyectó intraperitonealmente una vez al día durante 10 días sucesivos. Después de la administración, se alimentaron durante 5 semanas y se observaron. Pasado este período, se mataron y se sometieron a autopsia para determinar la extensión de la fibrosis pulmonar.

5 Se compararon la incidencia y el grado de fibrosis pulmonar en el grupo sometido a la administración del agente entre los animales administrados con monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre), la forma RS y el complejo de bleomicina. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

15 Tabla 4

	Incidencia		Grado	
	Nº de ratones que tienen fibrosis pulmonar (%)	Relación	¹⁵ Grado total de fibrosis pulmonar/número de muestra total	Relación
20 Monosulfato de NK-631 (forma exenta de Cu)	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
25 Complejo de bleomicina	11/12 (0,92)	1,0	24/36 (0,67)	1,0

¹⁵ Grado 0: No se observa fibrosis en absoluto.

Grado 1: Se observa acumulación de exudado en los alvéolos, y se aprecia un cambio semejante a fibrosis

1 en el septo alveolar.

Grado 2: Se observa fibrosis en varias posiciones.

Grado 4: Se observa fibrosis dispersa

5 Grado 6: Se observa fibrosis en un área extensa que ocupa 2/3 o más.

10 Como se muestra en la Tabla 4, el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) da aproximadamente 1/2 de incidencia y grado cuando se compara con la forma RS, y da aproximadamente 1/3 de incidencia y 1/4 de grado cuando se compara con el complejo de bleomicina. Estos hechos sugieren evidentemente su utilidad clínica.

2. Actividad antitumoral

2-1. Acción sobre la célula HeLa S₃

15 Se determinó la DI₅₀ de cada agente a partir de la tasa de inhibición de la multiplicación de la célula HeLa S₃ después del cultivo durante 72 horas en presencia del agente. El complejo de bleomicina dió DI₅₀ de 1,70 mcg/ml. El producto NK 631 dió 0,82 mcg/ml, lo que demostraba que el mismo inhibía la multiplicación de la célula HeLa S₃ dos veces más intensamente que el complejo de bleomicina. La forma RS dió 0,80 mcg/ml, lo que indicaba que era comparable al monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) en el efecto inhibitor.

25 2-2. Acción carcinostática sobre el cáncer Ehrlich del ratón (cáncer sólido)

30 Se transplantaron 2 x 10⁶ células subcutáneamente en la región inguinal de ratones macho de la raza ICR (de 6 semanas de edad). Transcurridas 24 horas desde dicha operación, se inició la administración del agente de la misma manera que en 1-2. Quince días después del transplan-

1 te subcutáneo, el tumor se separó y se pesó, comparándose su peso con el del grupo testigo sin tratar para determinar la tasa de inhibición.

5 Como se muestra en la Tabla 5, el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) era comparable a la forma RS y exhibía aproximadamente 1,4 veces la actividad carcinostática del complejo de bleomicina.

Tabla 5

Dosis (mg/kg x 10)	Grado de Inhibición (%)		
	Monosulfato de NK 631 (forma exenta de Cu)	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. Acción carcinostática sobre el hepatoma de ascitis de la rata (tipo ascítico)

25 Se transplantaron 1×10^6 células AH 66 en la cavidad abdominal de ratas de la raza Donryu. Veinticuatro horas después de esta operación, se administró el agente por vía intraperitoneal, y se continuó la administración durante 10 días sucesivos con una frecuencia de una vez al día. Treinta días después del trasplante, se compro-

1 baron el peso corporal y la tasa de supervivencia.

Tabla 6. Valores relativos del número medio de días de supervivencia

Dosis (mg/kg x 10)	Monosulfato de NK 631 (forma exenta de Cu)	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

5

10

15

Como se muestra en la Tabla 6, en el caso del hepatoma de ascitis AH 66, el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) es comparable a la forma RS en actividad carcinostática y es superior al complejo de bleomicina en toda la gama de dosificación.

2-4. Efecto anti-carcinogénico frente al carcinoma de las células escamosas del ratón inducido por el 20-metil-colantreno.

Al espinazo trasquilado de ratones machos de la raza ddy (de 10 semanas de edad) se aplicó una solución saturada de 20-metil-cloantreno (al que se hace referencia de aquí en adelante como 20-MC) en acetona durante 18 semanas con una frecuencia de dos veces por semana. Seis semanas después del comienzo del tratamiento con 20-MC, se administró intraperitonealmente el agente a una dosis de 62,5 mcg/ratón, y se continuó la administración durante 15 semanas con una frecuencia de dos veces por semana. Una se-

20

25

30
23068

1 mana después de completarse la administración, se observó la incidencia de la carcinogénesis o se estudió patológicamente en el lugar al que se había aplicado el 20-MC.

5 Como se muestra en la Tabla 7, el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) y la forma RS inhibían la carcinogénesis debida al 20-MC un poco más intensamente que el complejo de bleomicina.

Tabla 7

10		Mortalidad	Tasa de carcinogénesis (%)	Tasa de inhibición (%)
	Monosulfato de NK 631 (forma exenta de Cu)	1/12	5/11 (45,4)	47,8
	Forma RS	1/12	5/11 (45,4)	47,8
15	Complejo de bleomicina	2/12	5/10 (50,0)	42,5
	Testigo	1/24	20/23 (86,9)	0

20 Los resultados demuestran claramente que el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) es superior al complejo de bleomicina existente en actividad antitumoral.

3. Actividad antimicrobiana

25 Por el método de la copa, con bleomicina A₂ como patrón (1000 U/mg), se midió la potencia antimicrobiana de los agentes de ensayo contra Mycobacterium 607 y Bacillus subtilis PCI. Los resultados fueron como se muestra en la Tabla 8.

1

Tabla 8

	M. 607	B. sub.
Monosulfato de NK 631 (forma exenta de Cu)	7848	1550
Forma RS	7535	1400
Complejo de bleomicina	1234	886

5

10

Los datos de la Tabla 8 demuestran claramente que el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) y la forma RS son muy superiores al complejo de bleomicina en actividad antimicrobiana.

4. Toxicidad

15

4-1. Toxicidad aguda (DL_{50}) en la administración intraperitoneal a las ratas.

Como se muestra en la Tabla 9, el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) era comparable al complejo de bleomicina y a la forma RS en DL_{50} para las ratas.

Tabla 9

20

		DL_{50} (mg/kg)	Límite de confianza (nivel de significación 5%)
Rata	Monosulfato de NK 631 (forma exenta de Cu)	155,0	133,6 - 179,8
	Forma RS	150,6	129,0 - 170,6
	Complejo de bleomicina	168,0	130,0 - 217,0

25

30

4-2. Toxicidad subaguda y crónica en la rata y el perro.

23068

1 El monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre)
era comparable al complejo de bleomicina en toxicidad sub-
aguda y crónica en la rata y el perro. Debe observarse tam-
bién que el monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre)
5 no causaba necrosis en absoluto en los puntos de inyección
en ningún perro, mientras que el complejo de bleomicina
causaba necrosis en el lugar de la inyección en la totali-
dad de los perros del grupo de dosis alta (1,2 mg/kg, 90
veces), aunque el nivel de dosis era el mismo entre los di-
10 ferentes agentes. Asimismo, el NK 631 exhibía una menor to-
xicidad pulmonar que el complejo de bleomicina.

Los resultados antes mencionados indican que el
monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) es compara-
ble al complejo de bleomicina en toxicidad, con la excep-
15 ción de los casos de toxicidad pulmonar y necrosis.

5. Conclusión

De los resultados antes mencionados, puede lle-
garse a la conclusión de que el NK 631 es un compuesto nue-
vo que tiene los rasgos característicos siguientes:

- 20 (1) una toxicidad pulmonar muy baja,
(2) actividades antimicrobiana y antitumoral su-
periores a las del complejo de bleomicina
existente,
(3) una toxicidad general comparable a la del
25 complejo de bleomicina existente, y
(4) una toxicidad local menor que la del comple-
jo de bleomicina existente en el punto de
inyección.

De acuerdo con ello, se espera que NK 631 sea
útil en el campo clínico.

1 Esta invención se ilustrará más concretamente ha-
ciendo referencia a los ejemplos siguientes que se dan sin
ningún carácter limitante.

Ejemplo 1

5 Un litro de un medio (pH 7,0) que contenía 2% de
glucosa, 0,75% de peptona, 0,75% de extracto de carne y
0,3% de cloruro de sodio, colocado en un matraz Erlenmeyer
de 5 litros y se esterilizó, se inoculó con Streptomyces
verticillus NK 68-144 (FERM-P No 4108, ATCC 31387) y se
10 cultivó a 28°C durante 48 horas con rotación y agitación
para preparar un fluido de cultivo de siembra.

 Por otra parte, se añadió clorhidrato de N-(S)-
-1'-feniletil-7-1,3-diaminopropano, en una proporción de
1 mg/ml, a un cultivo que contenía 7,17% de gelatina de mi-
15 jo, 0,5% de glucosa, 3,5% de polvo de semilla de soja,
0,75% de líquido de maceración de maíz, 0,3% de cloruro de
sodio, 0,1% de hidrogeno-fosfato dipotásico, 0,05% de sul-
fato de zinc, 0,01% de sulfato de cobre, 0,2% de nitrato
de sodio y 0,03% de Pronal ST-1[®] (agente tensioactivo no
20 iónico y antiespumante fabricado por Toho Kagaku) y se ajus-
tó el valor del pH a 6,5. Se pusieron 20 litros del culti-
vo en una botella de cultivo de tipo jarro que tenía una
capacidad de 30 litros y se esterilizaron, inoculándose el
todo con el fluido de cultivo de siembra arriba mencionado
25 en la proporción de 10%. Se llevó a cabo el cultivo con ai-
reación y agitación durante 7 días a 28°C y a 400 revolu-
ciones por minuto. Una vez completado el cultivo, se fil-
tró el fluido de cultivo junto con 5% del coadyuvante de
filtración de tierra de diatomeas Daikalite[®] (nombre co-
mercial de un coadyuvante de filtración de tierra de diato-

1 meas fabricado y vendido por Toa Kasei Co., Japón) para
obtener 10 litros de filtrado (326 u/ml, 3,26g-título).
Se mezcló con el agua de lavado y se hizo pasar a través
de una columna rellena con 630 ml de Amberlite[®] IRC-50
5 (forma H) para adsorber el producto deseado. Se lavó la
columna con agua y se eluyó después con 80 litros de ácido
clorhídrico 0,5 N. Se neutralizó el eluato, se separó la
materia insoluble por filtración, y se hizo pasar el fil-
trado a través de una columna rellena con 50 ml de carbón
10 vegetal activado. La columna se lavó con agua y se eluyó
con 750 ml de ácido clorhídrico 0,02 N-acetona (1:1). El
eluato se neutralizó con Dowex[®] (un nombre comercial de
una resina de intercambio de anión compuesta de un copo-
límero de epicalorhidrina y amoníaco, fabricada y vendida
15 por Dow Chemical Co., EE.UU.), se concentró y se liofili-
zó. Se disolvió en tres veces su cantidad de agua, se ver-
tió en 9 volúmenes de metanol, y luego se filtró. La so-
lución metanólica se hizo pasar a través de una columna
rellena con 25 ml de alúmina y se eluyó con metanol al
20 90%. El producto eluido se neutralizó, concentró y liofi-
lizó. Se disolvió en 10 ml de agua, se adsorbió en una
columna rellena con 100 ml de Sephadex[®] G-25 y se reveló
después con agua para recoger las fracciones de color
azul.

25 Las fracciones de color azul se hicieron pasar
a través de una columna rellena con 100 ml de Sephadex
CM[®] C-25 y se eluyeron con cloruro de amonio 0,05 a 1 M.
Se añadió 1 g de EDTA.Na₂ a la fracción de eluato corres-
pondiente a NK 631, se ajustó de nuevo el pH a 0,5 con
30 ácido clorhídrico 12 N, y se neutralizó después con hi-

1 dróxido de sodio 5 N. Se adsorbió en una columna rellena
 con 50 ml de Diaion[®] HP-40 (nombre comercial de una re-
 sina adsorbente compuesta de un copolímero de estireno-
 5 -divinilbenceno fabricada y vendida por Mitsubishi Chemi-
 cal Co., Japón). La columna se lavó con dos veces su volu-
 men de EDTA.Na₂ al 5%, se lavó con 1,5 veces su volumen
 de sulfato de sodio al 5%, se lavó luego con agua, y se
 eluyó después con tres veces su volumen de acetona acuosa
 al 50%. El eluato se concentró y se liofilizó para obtener
 10 el producto final. De este modo se obtuvieron 100 mg de
 monosulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) (830 mg de
 potencia). Su rendimiento fue 25,5% basado en el filtrado
 del fluido de cultivo. Un análisis por el método de Sepha-
 dex-CM[®] reveló que el producto contenía 98,7% de NK 631.
 15 Su pureza óptica era 98,5%, medida por el método antes men-
 cionado.

El máximo de absorción en ultravioleta y la po-
 tencia antimicrobiana de este producto eran como sigue:

Máximo de absorción en ultravioleta:

20 290 m μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 106 en ácido clorhídrico
 0,1 N)

Potencia antimicrobiana: 8077 u/mg

Ejemplo 2

25 Se pusieron 120 litros de un medio que tenía la
 misma composición que en el Ejemplo 1 en un depósito de
 cultivo que tenía una capacidad de 200 litros, se añadie-
 ron a lo anterior 120 g de N-[γ (S)-1'-feniletil]-1,3-dia-
 minopropano, se ajustó el pH a 6,5, y se esterilizó la mez-
 30 cla. Se inoculó en este medio, en la proporción de 10%, un
 fluido de cultivo de siembra de Streptomyces verticillus

471297

1 NK 68-144 (FERM-P Nº 4108, ATCC 31307) preparado en las
 mismas condiciones que en el Ejemplo 1. Se cultivó con ai-
 reación y agitación durante 7 días a 28°C y a 350 revolu-
 5 el filtrado (107 litros, 671 u/ml, 72 g de potencia) por
 repetición del procedimiento del Ejemplo 1. Así, después
 de extracción y purificación, se obtuvieron 4,7 g de mono-
 sulfato de NK 631 (forma exenta de cobre) (38,9 g de poten-
 cia). Su rendimiento fue 47% basado en el filtrado del flui-
 10 do de cultivo. Un análisis por el método de Sephadex-CM[®]
 reveló que este producto contenía 99,6% de NK 631. El
 NK 631 tenía una pureza óptica de 99,1% medida por el mé-
 todo antes mencionado.

15 El máximo de absorción en ultravioleta y la po-
 tencia antimicrobiana de este producto era como sigue:

Máximo de absorción en ultravioleta:

290 m μ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 107, en ácido clorhídrico 0,1 N)

Potencia antimicrobiana: 8027 u/mg

20 Ejemplo de Referencia: Síntesis de N-(S)-1'-
 -feniletil-7-1,3-diaminopropano.

25 A 50 g de (S)-1-feniletilamina enfriada a 0°C,
 se añadieron 33 g de acrilonitrilo, con agitación. Después
 de ello, se elevó la temperatura de la mezcla de reacción
 hasta 93°C en un matraz equipado con un condensador de re-
 flujo que tenía un tubo de cloruro de calcio, donde se con-
 tinuó la agitación durante 18 horas.

Una vez que se hubo completado la reacción, se
 separó por destilación el exceso de acrilonitrilo a presión
 reducida y se sometió el residuo a destilación fraccionada
 a presión reducida.

1 Las fracciones que destilaban a temperatura comprendida entre 142° y 145°C bajo una presión de 7 mm de Hg se recogieron, y se obtuvieron 53,5g de 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propionitrilo.

5 Se mezcló este producto con 5 g de níquel Raney γ -7 y 50 ml de etanol amoniacal al 15% y se redujo en un autoclave a una presión parcial de hidrógeno de 100-40 kg/cm² a una temperatura de 50° a 58°C durante un período de tiempo de 1,5 horas con agitación a una velocidad de rotación de 1000 revoluciones por minuto.

10 Después que se hubo completado la reducción, la mezcla de reacción líquida se destiló a presión reducida para recoger las fracciones que destilaban en el intervalo de temperatura de 95° a 103°C a una presión de 2 mm de Hg. Así, se obtuvieron 48,3 g de N- γ (S)-1'-feniletil γ -1,3-diaminopropano. Su rendimiento fue 66% basado en la (S)-1'-feniletilamina.

1

REIVINDICACIONES

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 procedimiento para la obtención de 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilaminobleomicina, caracterizado por inocular una cepa productora de bleomicina perteneciente al género Streptomyces en un medio nutriente, cultivar dicha cepa en presencia de N- γ (S)-1'-feniletil γ -1,3-diaminopropano o su sal a fin de producir selectivamente 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilaminobleomicina, y después de ello aislar y recoger la 3- γ (S)-1'-feniletilamino γ propilaminobleomicina a partir de la mezcla cultivada.

15

20

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha cepa productora de bleomicina es Streptomyces verticillus FERM-P N.º 4108 (ATCC 31307).

25

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el cultivo se lleva a cabo a una temperatura de 23º a 37ºC.

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que el cultivo se lleva a cabo durante un período de 5 a 10 días.

30

5ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicho N- γ (S)-1'-feniletil γ -1,3-diaminopropano o su sal añadido al medio tiene una con-

1 centración de 0,2 a 2 mg/ml de medio.

5 6ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que dicha sal de N-[(S)-1'-feniletil]-1,3-diaminopropano es la sal clorhidrato, sulfato o acetato.

7ª.- Un procedimiento para la obtención de 3-[(S)-1'-feniletilamino]propilaminobleomicina.

10 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.

Esta Memoria consta de treinta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 JUN. 1978

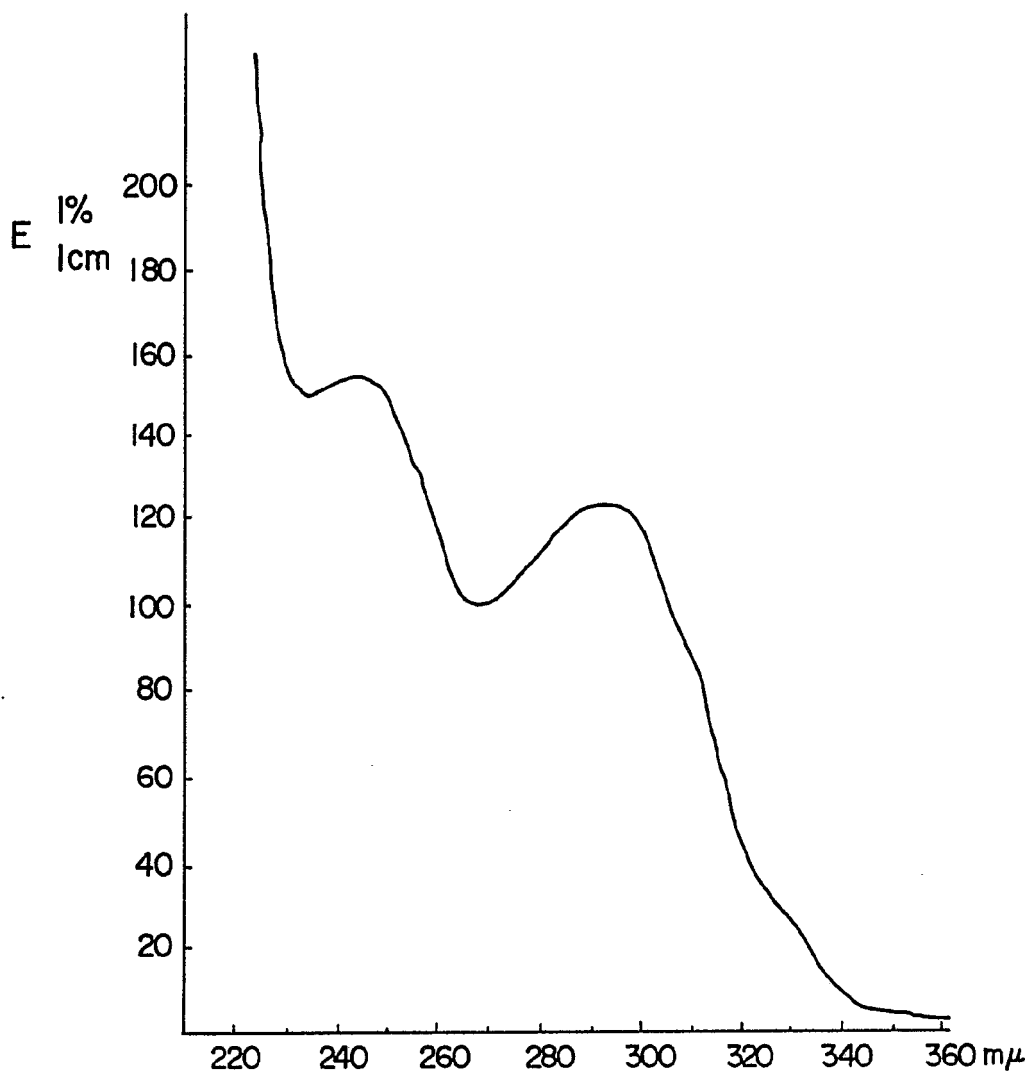
P.A.

Alberto de Euzkadi
Por Poder



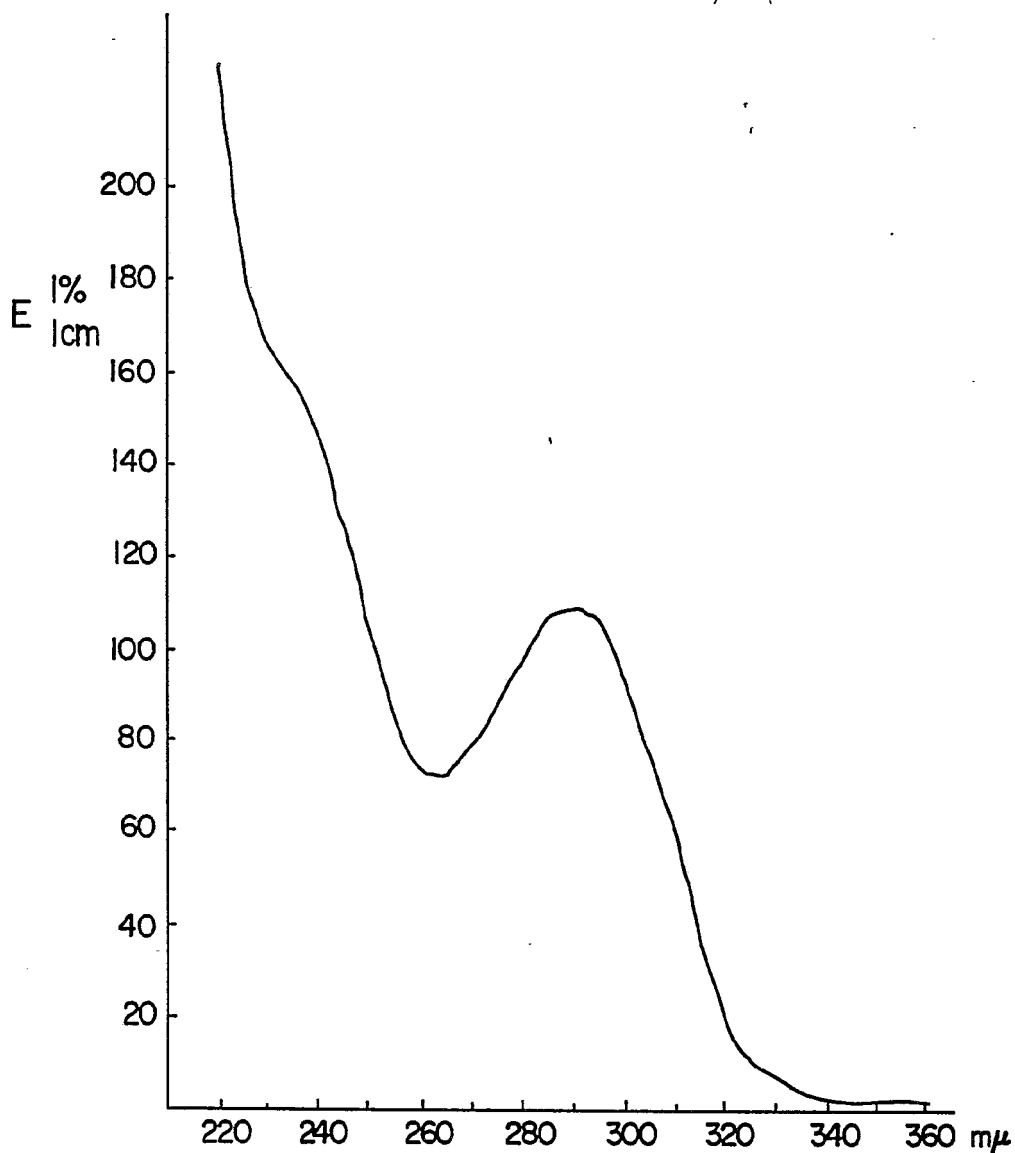
69351

FIG.1



Albert de Fozzart
Per Fozzart

FIG.2



Albert de Toulon
Paris

FIG.3

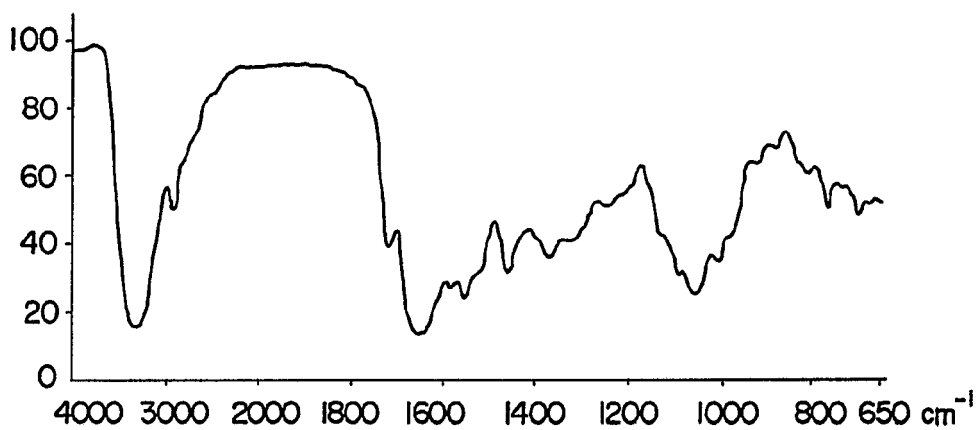
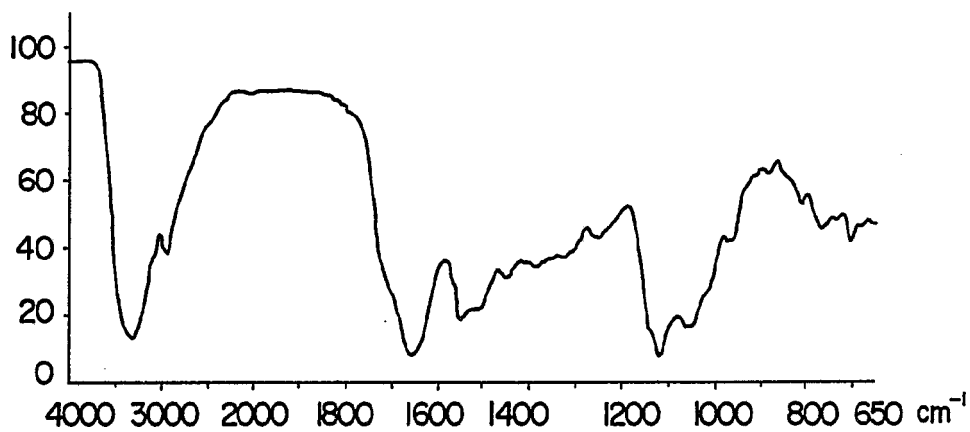


FIG.4



Amu