

P.- 43.919

Pos 20712

Biseibutsu

376555



Memoria descriptiva

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION	C
NUM. C-12	
SERIALS	D

para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de Z Aidan HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI

entidad / ~~de nacionalidad~~ japonesa

con domicilio en 403, Nakamaru, Kamiosaki, Shinagawa-ku,
Tokyo, Japon

por: "PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR BLEOMICINAS ANTIBIOTICAS"
(Clase Internacional C07c, C07d)



La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para producir bleomicinas antibióticas. Más en particular, la invención se refiere a un nuevo procedimiento para producir bleomicinas antibióticas inoculando y cultivando aerobiamente, en un medio que contiene una fuente de nutriente, una cepa, productora de bleomicina, perteneciente a los actinomicetos, donde el cultivo se efectúa en presencia de un compuesto amino que tiene al menos un grupo α -CH₂-NH₂ y al menos un grupo básico elegido de entre los grupos amino, imino, guanidino, amidino y sulfonio, y compuestos cíclicos que contienen nitrógeno, o en presencia de un compuesto convertible, en el líquido de cultivo, en un compuesto amino como los antes mencionados, produciendo así selectivamente un componente de bleomicina conocido o nuevo, correspondiente al compuesto amino antes mencionado o a un compuesto amino derivado del compuesto antes mencionado, y luego se recupera la bleomicina conocida o nueva, por medios conocidos, del medio de cultivo.

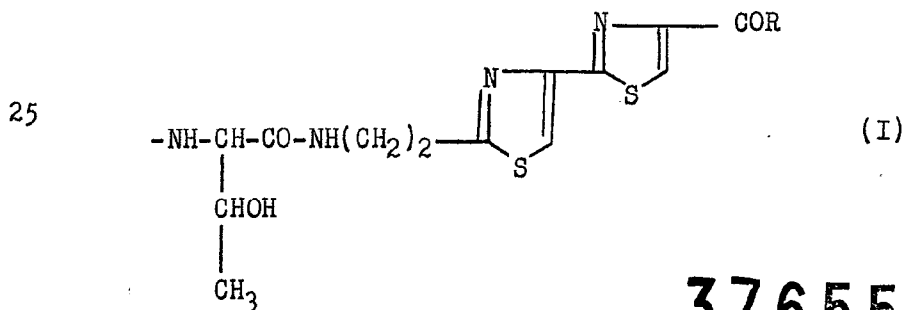
Las bleomicinas son antibióticos antitumor descubiertos por Umezawa y otros, y se obtienen de manera tal que una cepa productora de bleomicina, perteneciente al actinomiceto *Streptomyces verticillus* (por ejemplo ATCC nº 15003), es cultivada aerobiamente con agitación, en un medio nutriente que contiene jalea de mijo (componente principal, maltosa), glucosa, polvo de soja, líquido de maceración de maíz, cloruro sódico, fosfato potásico, sulfato de cinc, sulfato de cobre, etc., y la bleomicina resultante es aislada y recuperada del líquido de cultivo, en forma de clorhidrato o sulfato, por adopción de medios tales como el uso de resinas intercambiadoras de iones.



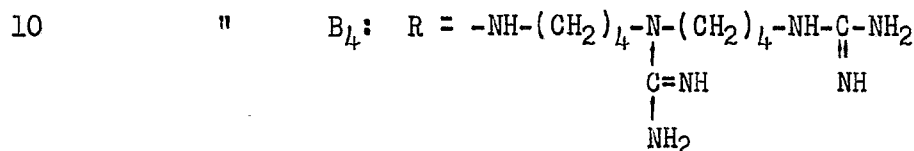
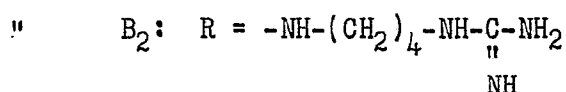
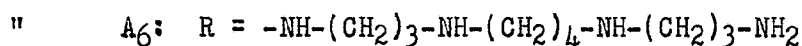
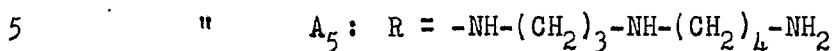
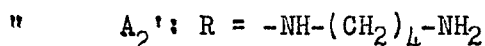
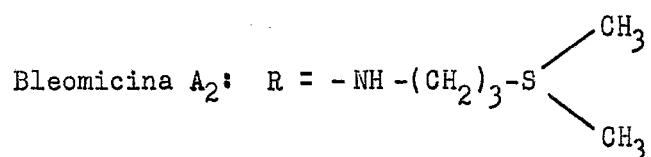
Contienen los componentes $A_1, A_2, A_2', A_3, A_4, A_5, A_6,$
 $B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6$ y similares (denominados en lo su-
cesivo componentes de bleomicina), y, cuando se someten
además a un tratamiento de eliminación de cobre, se obtie-
nen estos componentes de bleomicina en forma de polvos
blancos. El término bleomicina ha sido conocido como tér-
mino general para los antibióticos que contienen estos com-
ponentes (patente británica nº 1.038.242).

5
10 Cuando el cultivo se efectua bajo condiciones ordinarias, estos componentes de bleomicina son producidos simultáneamente, pero la proporción de componentes individuales no es definida, y en la mayoría de los casos se producen principalmente bleomicinas A_2 y B_2 .

15 Con objeto de conseguir un procedimiento en el que se puedan producir selectivamente, con rendimientos favorables, los componentes de bleomicina deseados entre los antes mencionados, los autores de la presente inven-
ción estudiaron las estructuras de las bleomicinas, hallan-
do que los componentes de bleomicina tienen una estructura
parcial tal como la representada por la fórmula (I) que se
20 presenta a continuación, y que en la fórmula R varía se-
gún la clase de componentes de bleomicina.



6.2.70



Basándose en el conocimiento antes mencionado, los autores de la invención volvieron a repetir los estudios, hallando que cuando se añaden a los líquidos de cultivo de cepas productoras de bleomicina diversos compuestos amino, correspondientes a la porción R de cadena secundaria de la fórmula (I) antes mencionada, o compuestos amino convertibles, durante el cultivo, en aminas correspondientes a la porción de cadena secundaria, se pueden obtener con rendimientos favorables los componentes de bleomicina deseados, y que cuando se añaden ciertas clases de compuestos amino se producen nuevas bleomicinas, diferentes de las bleomicinas antes mencionadas, y que cuando son separadas de los líquidos de cultivo y son purificadas, las nuevas bleomicinas pueden ser recuperadas con grandes rendimientos. Basándose en los anteriores hallazgos, los autores de la presente invención han conseguido la presente invención.

30

Los compuestos amino antes mencionados, usa

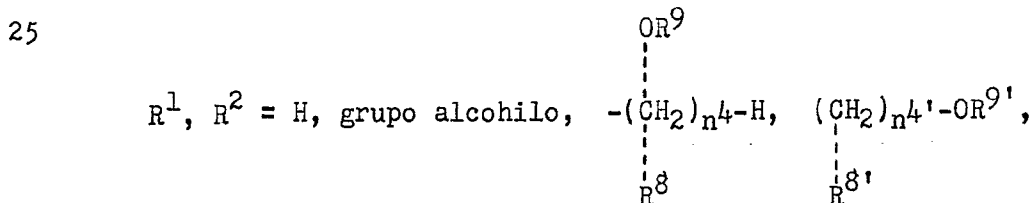
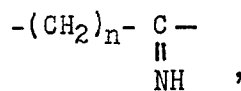
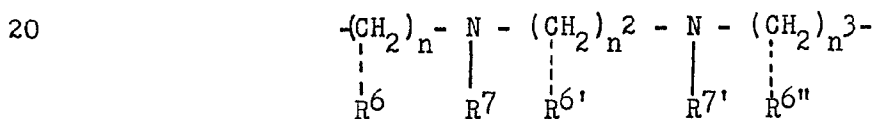
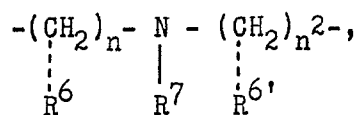
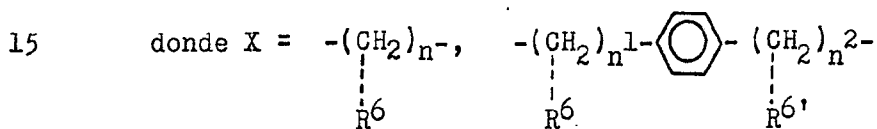
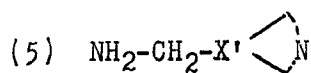
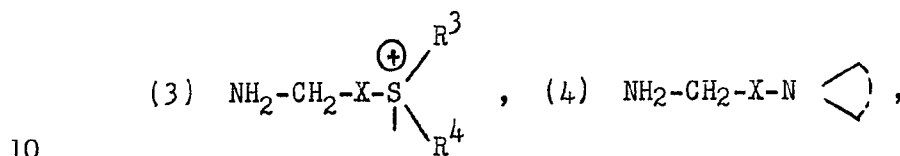
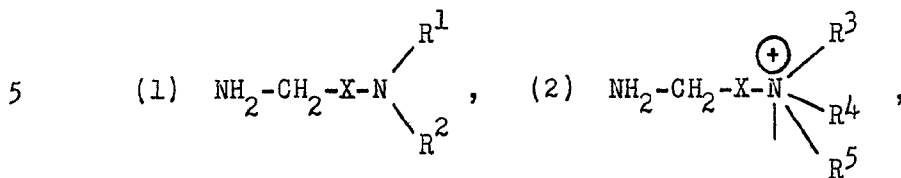
6.2.70

- 4 -

376555



dos en la presente invención, pueden ser representados por las 5 fórmulas generales siguientes:





quier posición del grupo alcohol. A continuación se presentan ejemplos típicos de los compuestos amino representados por las fórmulas generales antes mencionadas (1) a (5), y de los compuestos convertibles en dichos compuestos amino durante el cultivo.

- 5
- 1,2-diaminoetano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
- 1,3-diaminopropano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
- 1,4-diaminobutano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
- 1,5-diaminopentano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$
- 10 1,6-diaminohexano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$
- N-(2-aminoetil)-1,2-diaminoetano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
- N-(3-aminopropil)-1,3-diaminopropano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
- N-(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano (espermidina) $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
- 15 N-(5-aminopentil)-1,5-diaminopentano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$
- N,N'-bis-(2-aminoetil)-diaminometano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
- N,N'-bis-(2-aminoetil)-1,2-diaminometano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
- 20 N,N'-bis-(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano (espermina) $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_4-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
- N,N'-bis-(3-aminopropil)-1,6-diaminohexano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_6-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
- N,N'-bis-(5-aminopentil)-1,5-diaminopentano $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}(\text{CH}_2)_5-\text{NH}(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$
- 25 2,4,4-trimetilpentametilendiamina $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
- 1,2-diaminopropano $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_3$
- 30
- 6.2.70

376555



	N-metil-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$
	N-butil-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NHC}_4\text{H}_9$
	N-octil-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
5	N,N-dimetil-1,2-diaminoetano	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$
10	N,N-dietil-1,2-diaminoetano	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$
15	N,N-dimetil-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$
15	N,N-dietil-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$
20	Cloruro de 3-aminopropiltrimetilamonio	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\overset{\oplus}{\text{N}} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \\ \ominus \\ \text{Cl} \end{array}$
25	Bromuro de 3-aminopropiltrimetilamonio	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\overset{\oplus}{\text{N}} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \\ \ominus \\ \text{Br} \end{array}$
30	N-(3-dimetilaminopropil-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$

6.2.70

376555







	N-(3-metilaminopropil)-	
	1,2-diaminoetano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$
	N-(3-metilaminopropil)-	
	1,4-diaminobutano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$
5	N-(3-metilaminopropil)-	
	1,6-diaminohexano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$
	N-(3-metilaminopropil)-	
	1,8-diaminooctano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$
	N-butyl-N'-3-aminopropil-	
10	1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}_4\text{H}_9$
	N-(2-dimetilaminoetil)-	
	1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$
15	N-(4-dimetilaminobutil)-	
	1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_4-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$
20	N-(6-dimetilaminohexil)-	
	1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_6-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$
25	N-(8-dimetilaminoetil)-1,3-	
	diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_8-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$
	N-(3-hidroxipropil)-	
30	1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$

6.2.70












	N-(2-hidroxiopropil)- 1,2-diaminoetano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_3$
5	N-(2-hidroxietyl)-1,3- diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$
	N-(3-metoxipropil)-1,3- diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}_3$
	N-(3-octiloxipropil)-1,3- diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{OC}_8\text{H}_{17}$
10	N-(3-amino-1-metilpro- pil)-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
	N-(3-amino-1-etilpropil)- 1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\underset{\text{C}_2\text{H}_5}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$
15	N,N-bis-(3-aminopropil)metilamina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{CH}_3}{\text{N}}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
	N,N-bis(3-aminopropil)- etilamina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{C}_2\text{H}_5}{\text{N}}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
20	N,N-bis(3-aminopropil)- n-butilamina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{C}_4\text{H}_9}{\text{N}}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
25	Bromuro de 3-aminopropil- dimetilsulfonio	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{Br}}{\overset{\oplus}{\text{S}}}(\text{CH}_3)_2$



- 5 Cloruro de 3-aminopropil-
dimetilsulfonio $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{CH}_3)_2-\text{Cl}^-$
- 10 Bromuro de 3-acetamido-
propildimetilsulfonio $\text{CH}_3\text{CONH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{CH}_3)_2-\text{Br}^-$
- 15 Cloruro de 3-amino-3-car-
boxipropildimetilsulfonio $\text{NH}_2-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_2-\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{CH}_3)_2-\text{Cl}^-$
- 15 Cloruro de 3-amino-3-car-
bamóilpropildimetilsulfonio $\text{NH}_2-\underset{\text{CONH}_2}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_2-\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{CH}_3)_2-\text{Cl}^-$
- 20 4-(aminobutil)-guanidina
(agmatina) $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$
- 3-amidinopropilamina $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$
- 25 N-(3-aminopropil)-pi-
rrolidina $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 
- N-(3-aminopropil)-piperi-
dina $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 
- N-(2-aminoetil)-piperazina $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{N}$ 
- 30 N-(3-aminopropil)-piperazina $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 

6.3.70



	N-(3-aminopropil)-morfolina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 
5	N(3-aminopropil)-N'-metil-piperazina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$  $\text{N}-\text{CH}_3$
	N-(3-aminopropil)-N'-etil-piperazina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$  $\text{N}-\text{C}_2\text{H}_5$
10	N,N'-bis-(3-aminopropil)-piperazina	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$  $\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
15	N-(3-pirrolidino-propil)-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 
	N-(3-piperidino-propil)-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 
20	N-(3-piperazino-propil)-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 
25	N-(3-morfolinopropil)-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{N}$ 
	N-bencil-1,3-diaminopropano	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 

6.2.70



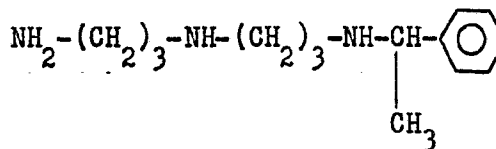
	N,N-dibencil-1,3-diaminopropano	<chem>NCCCN(Cc1ccccc1)Cc2ccccc2</chem>
5	N-(1-fenilettil)-1,3-diaminopropano	<chem>NCCCN(C)Cc1ccccc1</chem>
10	N-(p-metilbencil)-1,3-diaminopropano	<chem>NCCCN(Cc1ccc(C)cc1)</chem>
15	m-xililendiamina	<chem>NCCc1cccc(CN)c1</chem>
	p-xililendiamina	<chem>NCCc1ccc(CN)cc1</chem>
20	N-ciclohexil-1,3-diaminopropano	<chem>NCCCN(C1CCCCC1)</chem>
	N-(2-fenilettil)-1,3-diaminopropano	<chem>NCCCN(Cc1ccccc1)CC1=CC=CC=C1</chem>
25	N-(2-p-tolilettil)-1,3-diaminopropano	<chem>NCCCN(Cc1ccc(C)cc1)CC1=CC=CC=C1</chem>
30	N-bencil-N'-(3-aminopropil)1,3-diaminopropano	<chem>NCCCN(Cc1ccccc1)CCN</chem>

6.2.70



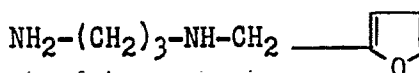
N-(1-feniletil)-N'-(3-aminopropil)-1,3-diaminopropano

5

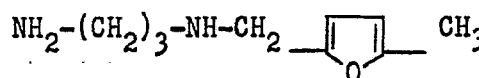


N-(2-furfuril)-1,3-diaminopropano

10

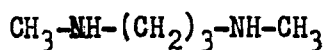


N-(5-metil-2-furfuril)-1,3-diaminopropano

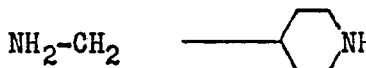


N,N-dimetil-1,3-diaminopropano

15

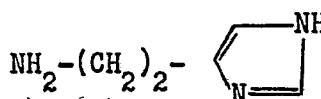


4-piperidilmetilamina



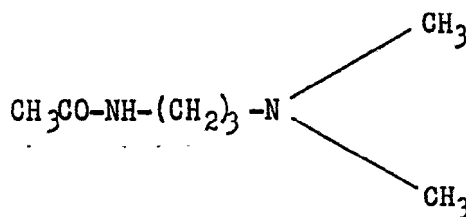
2-(4-imidazolil)-etilamina (histamina)

20



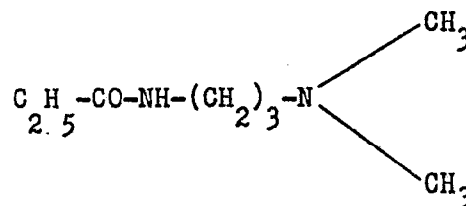
N,N-dimetil-N'-acetil-1,3-diaminopropano

25



N,N-dimetil-N'-pro-

pionil-1,3-diaminopropano



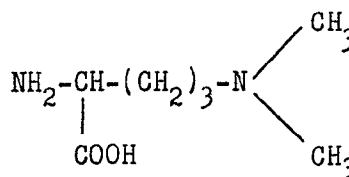
30

6.2.70

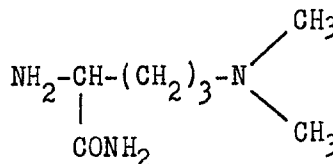
13 FEB. 1968



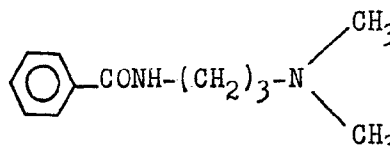
1-carboxi-4-dimetilamino-
butilamina



5 1-carbamoil-4-dimetil-
aminobutilamina



10 N,N-dimetil-N'-benzoil-
1,3-diaminopropano



15 Cuando se añade como compuesto amino, a un medio nutriente, bromuro de 3-aminopropil-dimetilsulfonio o cloruro de 3-amino-3-carboxipropildimetilsulfonio, por ejemplo, y se cultiva en dicho medio una cepa productora de bleomicina tal como *Streptomyces verticillus*, la productividad de bleomicina A₂ es reforzada, aumentando el contenido (%) de bleomicina A₂ entre todas las bleomicinas presentes en el líquido de cultivo. Análogamente, la adición de clorhidrato de agmatina aumenta el contenido (%) de bleomicina B₂, la adición de 1,4-diaminobutano aumenta el contenido (%) de bleomicina A₂¹, y la adición de espermidina aumenta el contenido de bleomicina A₅. Sin embargo, la adición de espermina no solo tiene como resultado la producción de bleomicina A₆, con la cadena secundaria correspondiente, sino también la producción de bleomicina A₅ que tiene en la cadena secundaria espermidina que se ha formado a partir de la espermina durante el cultivo. En el caso de una cepa que tenga fuerte capacidad de convertir la esper-

20

25

30

6.2.70

376555



mina en espermidina, la adición de espermina tiene como resultado principalmente la producción de bleomicina A₅. Análogamente, la adición de, por ejemplo 1,2-diaminoetano o 1,3-diaminopropano, tiene como resultado la producción de los nuevos productos 2-aminoetilaminobleomicina o 3-aminopropilaminobleomicina. Además, un compuesto poliaminico en cadena tal como la N,N-bis-(3-aminopropil)-metilamina produce principalmente una bleomicina nueva tal como 3-(N-metil-N-3-aminopropil)aminopropilaminobleomicina, que tiene la misma cadena secundaria que la del compuesto aña dido, y, además, implica una amina de bajo peso molecular, que se ha formado a partir de dicho aditivo durante el cultivo, produciendo como producto secundario 3-N-metilamino-propilaminobleomicina.

Era bien sabido que los microorganismos tienen capacidades tales como descomposición de ésteres, desalcoholación y descarboxilación, y los compuestos amino que se convierten durante el cultivo en las aminas de cadenas secundarias de bleomicina están implicados en la presente invención, igual que los compuestos amino representados por las fórmulas generales (1) a (5) antes mencionadas. Por ejemplo, se pueden usar, como compuestos amino representados por las fórmulas generales (1) a (5) antes mencionadas, compuestos en los que el NH₂- de las fórmulas generales (1) a (5) antes mencionadas ha sido acilado o alcoholado, o el hidrógeno del grupo metileno de la posición 2 del NH₂- ha sido sustituido por un grupo carboxílico o un grupo amida de ácido, y que sean fácilmente metabolizados a aminas.

En general, los compuestos amino a añadir



son usados tal cual o en forma de sales de ácido inorgánico, pero sus concentraciones en el líquido de cultivo varían según la clase. Por ejemplo, en el caso del bromuro de 3-aminopropildimetilsulfonio, espermina y espermidina, se requiere una concentración de al menos 0,2 a 9,4 mg/ml, mientras que en el caso del cloruro de 3-amino-3-carboxi-propildimetilsulfonio se requiere una concentración tan alta como al menos 40 mg/ml. Además, en el caso de la N-(3-aminopropil)-morfolina y del N-(3-morfolino-propil)-1,3-diaminopropano es suficiente una concentración de aproximadamente 0,1 a 0,5 mg/ml, mientras que en el caso de la N-(2-aminoetil)-piperazina y N-(3-metoxipropil)-1,3-diaminopropano es necesaria una concentración de aproximadamente 2 mg/ml. Sin embargo, generalmente es adecuada una concentración de aproximadamente 4 mg/ml.

El procedimiento de la presente invención se efectúa de la siguiente manera:

Para llevar a la práctica el presente procedimiento, es preferible usar un medio que esté compuesto principalmente por carbohidratos y sustancias orgánicas que contengan nitrógeno, tales como jalea de mijo, glucosa, almidón, polvo de soja, líquido de maceración de maíz, etc., y en el que se hayan incorporado pequeñas cantidades de sustancias inorgánicas tales como, por ejemplo, fosfato potásico, sulfato de cobre, sulfato de cinc, cloruro sódico, nitratos, etc. En este medio se cultiva aerobianamente, según métodos ordinarios, *Streptomyces verticillus* o una cepa productora de bleomicina, de entre las variantes del mismo. Después, el líquido de cultivo es filtrado y el filtrado es absorbido sobre, por ejemplo, una resina

6.2.70



intercambiadora de cationes que tenga un grupo reactivo
tal como un grupo carboxilo, y luego es eluido con solu-
ción acuosa de ácido clorhídrico. Subsiguientemente, el
eluido es sometido sucesivamente a las operaciones de absor-
5 ción sobre carbono activo, elución con solución acuosa de
acetona-ácido clorhídrico, absorción con alúmina, elución
con metanol, absorción sobre Sephadex (marca registrada
de un polvo seco insoluble compuesto por perlas microscó-
picas que son compuestos orgánicos sintéticos derivados
10 del polisacárido dextrano; fabricado y vendido por Pharma-
cia Fine Chemicals Inc.) y elución con agua destilada, con
lo que se obtiene un polvo de clorhidrato de bleomicina.
Para mayor purificación del polvo así obtenido, es prefe-
rible adoptar medios de elución cromatográfica con cloru-
15 ro amónico o solución acuosa de formato amónico, usando CM
Sephadex como vehículo. Finalmente, el eluato es adsorbido
sobre carbono activo y es sometido a las operaciones de
lavado con agua y elución con una solución acuosa de aceto-
na-ácido clorhídrico, con lo que se puede obtener un com-
20 ponente de bleomicina puro.

Si, según la presente invención, se ha produ-
cido en el medio de cultivo un componente de bleomicina
con la suficiente selectividad, se puede omitir la opera-
ción de separación usando CM Sephadex.

25 Las bleomicinas tienen la propiedad de
formar quelatos con cobre, y se obtienen como polvo azul
a partir del líquido de cultivo, pero el cobre puede ser
eliminado efectuando el tratamiento de eliminación de
cobre en cualquiera de las operaciones de extracción o
30 purificación.

6.2.70

376555

13A



En la tabla 1 se exponen varias propiedades de bleomicinas obtenidas según la presente invención.

6.2.70

- 19 -

376555

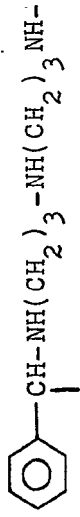
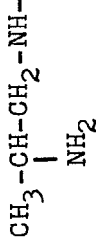
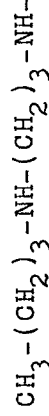
Tabla 1

Nº Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido de nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
1 Bromhidrato de bromuro de 3-aminopropildimetilsulfonio; p.f. 87-88°C	72	Bleomicina A ₂
2 Cloruro de 3-amino-3-carboxipropildimetilsulfonio; p.f. 139-140°C (descomp.)	87	Bleomicina A ₂
3 Sulfato de agmatina; p.f. 231°C	76	Bleomicina B ₂
4 1,2-diaminoetano; p.eb. 116-117°C	80	2-aminoetilaminobleomicina NH ₂ (CH ₂) ₂ NH-
5 1,3-diaminopropano; p.eb. 135-136°C	85	3-aminopropilaminobleomicina NH ₂ (CH ₂) ₃ NH-
6 1,4-diaminobutano; p.eb. 158-160°C.	85	Bleomicina A ₂



376555

Tabla 1 (cont.)

Nº	Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido de nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
15	N-(1-feniletíl)-N'-(3-aminopropil)-1,3-diaminopropano; p.eb. 150-153°C/ mm Hg.	72	3-[-3-(N-1-feniletíl)-aminopropil]-aminopropilaminobleomicina
16	1,2-diaminopropano; p.eb. 118-119°C	90	 2-aminopropilaminobleomicina
17	N-metil-1,3-diaminopropano; p.eb. 138-142°C	81	 3-N-metilaminopropilaminobleomicina
18	N-butíl-1,3-diaminopropano; p.eb. 114-116°C/ 20 mm Hg	85	 3-N-butilaminopropilaminobleomicina



376555

Tabla 1 (cont.)

Nº	Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido de nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
19	N, N-dimetil-1,3-diaminopropano; 132-135,5°C	95	3-(N, N-dimetil)-aminopropilaminobleomicina $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \qquad \qquad \text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}- \\ \diagdown \qquad \qquad \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$
20	Cloruro de 3-aminopropiltrimetilamino; p.f. 200-201°C	95	3-(N, N, N-trimetil)-aminopropilaminobleomicina $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}- \\ \diagdown \qquad \qquad \qquad \diagup \\ \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \end{array}$
21	N[3-(N, N-dimetil)-aminopropil]-1,3-diaminopropano; p.eb. 125°C/23 mm Hg	85	3-[3-(N, N-dimetil)-aminopropil]-aminopropilaminobleomicina $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \qquad \qquad \qquad \text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}- \\ \diagdown \qquad \qquad \qquad \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$



376555

Tabla 1 (cont.)

Contenido de nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)

Nombre y propiedades físicas del aditivo

22 N, N-bis-(3-aminopropil)-metilamina;
p.eb. 97-100°C/2 mm Hg

23 N-[3-amino-1-metilpropil]-1,3-diaminopropano; p.eb. 123-125°C/21 mm Hg

24 N-3-aminopropilpirrolidina; p.eb. 185-189°C

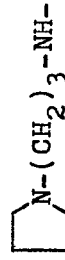
3-[N-metil-N-(3-aminopropil)]-amino-propilaminobleomicina
 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$



3-(1-metil-3-aminopropil)-amino-propilaminobleomicina
 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$






3-(pirrolidino)-propilaminobleomicina



376555

Tabla 1 (cont.)

Nº Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido de nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de candena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
25 N-3-aminopropilpiperidina; p.eb. 100°C/20 mm Hg	98	3-(piperidino)-propilaminobleomicina 
26 N-3-aminopropilmorfolina; p.eb. 219°C/733 mm Hg	100	3-(morfolino)-propilaminobleomicina 
27 N-2-aminoetilpiperazina; p.eb. 280-281°C	87	2-(piperazino)-etilaminobleomicina 

376555



Tabla 1 (cont.)

Nº Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido de nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
28 N, N-bis-3-aminopropilpiperazina; p.eb. 188-202°C/21 mm Hg	95	3-[1-[4-(3-aminopropil)]-piperazino]-propilaminobleomicina
29 N-(3-pirrolidinopropil)-1,3-diaminopropano; p.eb. 159-162°C/22 mm Hg	76	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -N-(CH ₂) ₃ -NH-3-[3-(pirrolidino)-propil]-amino-propilaminobleomicina
30 N-(3-piperidinopropil)-1,3-diaminopropano; p.eb. 164-167°C/21 mm Hg	89	N-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₃ -NH-3-[3-(piperidino)-propil]-amino-propilaminobleomicina

376555



Tabla 1 (cont.)



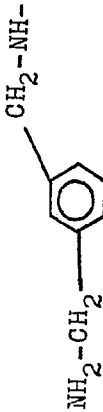
Nº Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido del nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
31 N-(3-morfolino-propil)-1,3-diaminopropano; p.eb. 176-180°C/20 mm Hg	79	3-[(3-(morfolino)-propil)-aminopropil]-aminobleomicina <chem>C1CCN(C1)N(CCC)N(CCC)N(CCC)N</chem>
32 N-(3-hidroxi-propil)-1,3-diaminopropano (clorhidrato); p.f. 119-120°C	85	3-(3-hidroxi-propil)-aminopropilamino-bleomicina <chem>OCCN(CCC)N(CCC)N(CCC)N</chem>
33 N-(3-metoxi-propil)-1,3-diaminopropano (clorhidrato); p.f. 225°C	88	3-(3-metoxi-propil)-aminopropilamino-bleomicina <chem>COC(CCC)N(CCC)N(CCC)N</chem>



37
6
51
51
51

6.2.70

Tabla 1 (cont.)

Nº Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido del nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
34 N-bencil-1,3-diaminopropano; p.eb. 150-155°C/25 mm Hg	70	3-bencilaminopropilaminobleomicina
35 N-(1-feniletil)-1,3-diaminopropano; p.eb. 148-150°C/24 mm Hg	89	
36 m-xiléndiamine; p.eb. 138-139°C/9 mm Hg	56	3-(1-feniletil)-aminopropilamino-bleomicina
		
		m-aminometilbencilaminobleomicina
		



376555


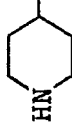

Tabla 1 (cont.)

Nº	Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido del nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
37	p-xiléndiamina; p.f. 35°C	68	p-aminometilbencilaminobleomicina
38	N-ciclohexil-1,3-diaminopropano; p.eb. 124-125°C/21 mm Hg	89	cina <chem>Nc1ccc(cc1)CN</chem>
39	N-(3-ciclohexilaminopropil)-1,3-diaminopropano; p.eb. 180°C/21 mm Hg	90	3-ciclohexilaminopropilaminobleomicina <chem>Nc1ccccc1NCCN</chem>

376555



Tabla 1 (cont.)

Nº Nombre y propiedades físicas del aditivo	Contenido del nuevo componente (principal) en la totalidad de bleomicinas obtenidas por extracción (%) (1)	Nombre y estructura de cadena secundaria de la bleomicina nueva (principal)
40 N-(2-furfuril)-1,3-diaminopropano; p.eb. 105-109°C/3 mm Hg	42	3-[-(2-furfuril)] ₂ -aminopropilamino-bleomicina
41 4-piperidilmetilamina; p.eb. 78°C/5 mm Hg	73	 -CH ₂ -NH-(CH ₂) ₃ -NH- 4-piperidilmetilaminobleomicina
42 Clorhidrato de 2-(4-imidazolil)-etilamina; p.f. 247-250°C	93	 CH ₂ -NH- 2-(4-imidazolil)-etilaminobleomicina
		 (CH ₂) ₂ -NH-

6 JU



376555

Propiedades del clorhidrato de bleomicinas nuevas (principales)											
Nº	Análisis elemental (%)			Potencia (mcg/mg) (2)	Cromatografía (Rf) (3)		Reacción (4)		Aspecto	Máximo de absorción ultravioleta	
	C	H	N		S	Capa delgada	Papel	N			S
1	44,13	6,14	15,51	6,43	941	0,39	0,85	-	-	Polvo azul	293 243
2	44,13	6,14	15,51	6,43	941	0,39	0,85	-	-	"	293 243
3	43,93	6,31	17,41	3,34	3094	0,72	0,66	-	+	"	293 244
4	43,12	6,15	16,60	4,21	1700	0,62	0,80	+	-	"	293 244



6.2.70

(cont.)

5	43,15	6,20	16,51	4,18	1934	0,60	0,81	+	-	"	293 244
6	43,93	6,02	16,78	4,25	1232	0,66	0,81	+	-	"	293 244
7	43,81	6,34	16,39	4,05	2700	0,16	0,88	+	-	"	293 244
8	43,81	6,34	16,39	4,05	2700	0,16	0,88	+	-	"	293 244
9	43,20	6,25	16,48	4,13	897	0,46	0,86	-	-	"	294* 244
10	45,01	6,35	16,14	3,91	1102	0,48'	0,89	-	-	"	294 244



(cont.)

11	43,91	6,30	15,96	4,00	1036	0,40	0,87	-	-	"	294 244
12	43,00	6,62	16,40	3,78	5840	0,23	0,84	-	-	"	294 244
13	43,50	6,45	16,38	4,35	1020	0,65	0,84	-	-	"	294 244
14	44,91	6,21	16,50	3,91	726	0,30	0,84	-	-	"	294 244
15	45,51	6,42	16,45	3,20	2500	0,46	0,75	-	-	"	294 244
16	43,80	6,04	16,60	4,31	2173	0,66	0,81	-	-	"	294 244



6.2.70

(cont.)

17	43,97	6,24	16,42	4,18	860	0,51	0,83	-	-	"	294 244
18	43,30	6,31	16,20	4,32	1700	0,70	0,83	-	-	"	294 244
19	44,16	6,35	16,30	4,09	869	0,28	0,83	-	-	"	294 244
20	44,71	6,41	16,21	4,00	633	0,38	0,89	-	-	"	294 244
21	43,80	6,35	16,91	4,05	1200	0,14	0,83	-	-	"	294 244
22	43,20	6,20	17,00	4,09	1671	0,23	0,33	+	-	"	294 244



6.2.70

(cont.)

23	43,42	6,25	16,80	4,11	1820	0,32	0,84	+	-	"	294 244
24	44,90	6,22	16,20	4,12	1066	0,36	0,88	-	-	"	294 244
25	44,71	6,38	16,17	4,21	1257	0,14	0,86	-	-	"	294 244
26	44,36	6,25	16,15	4,03	592	0,65	0,83	-	-	"	294 244
27	44,38	6,30	16,78	3,95	799	0,36	0,85	-	-	"	294 244
28	44,01	6,14	17,52	3,90	1130	0,25	0,86	+	-	"	294 244

376555



6.2.70

(cont.)

29	44,20	6,41	16,80	3,98	2564	0,1	0,88	-	-	"	294 244
30	44,30	6,51	16,62	4,00	3580	0,14	0,88	-	-	"	294 244
31	44,52	6,30	16,20	3,89	1201	0,38	0,87	-	-	"	294 244
32	43,76	6,40	16,38	4,22	1300	0,63	0,86	-	-	"	294 244
33	43,91	6,35	16,21	4,10	1335	0,54	0,87	-	-	"	294 244

15 FEB



6.2.70

(cont.)

34	45,40	6,41	15,30	4,00	1986	0,53	0,70	-	-	"	294 244
35	45,39	6,42	15,13	4,13	2400	0,62	0,85	-	-	"	294 244
36	44,89	6,28	15,98	4,19	2546	0,61	0,66	†	†	"	294 244
37	44,80	6,30	15,70	4,18	2350	0,58	0,64	†	†	"	294 244
38	44,91	6,60	15,27	4,03	5355	0,57	0,79	-	-	"	294 244



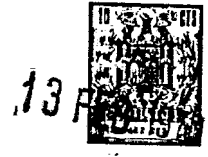
376555

13 FEB 1962

(cont.)

39	44,02	6,63	16,48	4,02	11215	0,24.	0,80	-	-	"	294 244
40	46,39	6,37	16,48	4,35	1450	0,67	0,83	-	-	"	294 244
41	44,60	6,43	16,20	4,25	1394	0,41	0,72	-	-	"	294 244
42	43,85	6,25	16,80	4,28	847	0,40	0,70	-	-	"	294 244

376555



El espectro infrarrojo de absorción y el espectro ultravioleta de absorción de varios compuestos de la tabla 1 se muestran en las figuras 1 a 6 adjuntas, como sigue:

Fig.	Espectro	Nombre del compuesto	Compuesto Nº
5	1 Infrarrojo	3-β-(N-butil)-aminopropil-7-aminopropilaminobleomicina	12
	2 Ultravioleta	"	"
10	3 Infrarrojo	3-(1-metil-2-aminopropil)-aminopropilaminobleomicina	23
	4 Ultravioleta	"	"
	5 Infrarrojo	3-(3-ciclohexilaminopropil)-aminopropilaminobleomicina	39
15	6 Ultravioleta	"	"

Notas:

(1) El contenido de bleomicina nueva (o principal) se midió de tal manera que la bleomicina (mezcla de componentes individuales) obtenida por cultivo y purificación, en cada uno de los ejemplos mostrados previamente, fué separada usando CM-Sephadex, y luego fué sometida a espectrofotometría de absorción ultravioleta.

(2) La potencia fué medida según determinación biológica, usando clorhidrato de bleomicina A₂ exento de cobre (potencia 940 mcg/mg) como sustancia patrón, y M. tuberculosis 607 como microorganismo de ensayo.

(3) Cromatografía en capa delgada:
Agente adsorbente: gel de sílice



Disolvente: mezcla 10:9:1 de metanol:acetato amónico al 10%:solución acuosa de amoniaco al 10%

Cromatografía en papel:

Disolvente: solución acuosa de cloruro amónico al 10%

5 (4) N = reacción de ninhidrina; S = reacción de Sakaguchi

Como está claro por la tabla 1, las nuevas bleomicinas obtenidas según la presente invención son similares a los componentes de bleomicina conocidos, en aspecto y curva de absorción ultravioleta, pero son evidentemente diferentes de ellos en potencia (mcg/mg) y valores Rf. Además, es digno de mención especial el que, cuando estas sustancias nuevas son hidrolizadas con ácido fuerte, y los hidrolizados son sometidos a cromatografía de gas, se detectan los compuestos amino usados como aditivos para el cultivo, o los compuestos amino formados durante el cultivo, y se ha confirmado que tienen cadenas laterales correspondientes a los compuestos amino añadidos o a los compuestos amino formados durante el cultivo.

20 Según la presente invención, se ha hecho primero posible que, entre los componentes de bleomicina, aquellos que son adecuados para fines terapéuticos individuales puedan ser recuperados selectivamente con grandes rendimientos y en formas puras. Por ejemplo, se pueden obtener selectivamente las bleomicinas A₂ y A₅, que son fuertes en cuanto a propiedades antitumor, y de menor toxicidad. Además, se ha hecho posible obtener bleomicinas nuevas tales como 3-aminopropilaminobleomicina, que es excelente en cuanto a efecto, y de menor toxicidad.

30 La presente invención se ilustra en detalle
6.2.70 - 41 -

376555



a continuación, con referencia a ejemplos.

Ejemplo 1

5 A un medio que tenía una composición de 6,4%
de jalea de mijo, 0,5% de glucosa, 3,5% de polvo de soja,
0,75% de líquido de maceración de maiz, 0,3% de cloruro
sódico, 0,1% de fosfato potásico secundario, 0,05% de sul-
fato de cinc, 0,01% de sulfato de cobre, 0,2% de nitrato
10 sódico y 0,01% de Toho nº 1 (marca registrada de un agen-
te tensoactivo), se añadió bromhidrato de bromuro de 3-
aminopropildimetilsulfonio, en proporción de 0,4 mg/ml,
para ajustar el pH del medio a 6,5. Cada porción de 100
ml del medio así tratado fué cargada separadamente en un
15 matraz Sakaguchi, y luego fué esterilizada. Subsiguiente-
mente se inoculó en el medio Streptomyces verticillus
(ATCC Nº 15003), y se cultivó durante 8 días, con agita-
ción a 130 rpm. Después, los líquidos de cultivo (4,5
litros) fueron recogidos y filtrados, obteniéndose 3,0
20 litros de un filtrado (potencia 138,8 mg/ml, potencia to-
tal 416,4 mg). Este filtrado de cultivo fué hecho pasar
por y adsorbido en una columna rellena con 200 ml de Am-
berlite IRC-50 (marca registrada de una resina intercam-
biadora de iones; tipo H), fué lavado con agua y fué
25 eluido con ácido clorhídrico 0,5N. Se neutralizó 1,0
litro de eluido, que fué hecho pasar por y absorbido
en una columna rellena con 100 ml de carbono activo, fué
lavado con agua y luego fué eluido usando una mezcla 1:1
(en volumen) de acetona y solución acuosa de ácido clorhí-
30 drico 0,02N, y las fracciones activas para el Mycobacte-
rium 607 fueron recogidas y concentradas a sequedad. El
6.2.70



7A

residuo resultante fué disuelto en 5 ml de una solución acuosa de metanol al 80%, y fué cargado en una columna rellena de 30 ml de alúmina neutra, seguido por elución con una solución acuosa de metanol al 80%. Subsiguientemente, las fracciones que contienen bleomicina fueron recogidas y concentradas a sequedad, obteniéndose 195 mg de clorhidrato de bleomicina (potencia 650,7 mcg/mg, potencia total 127 mg). El rendimiento a partir del filtrado de cultivo fué 30,5%.

El producto así obtenido fué separado en cada componente de bleomicina, con solución acuosa de formiato amónico en una columna de CM-Sephadex, hallándose que contenía 72,2% de bleomicina A₂. Este método de separación es designado en los ejemplos siguientes como método CM-Sephadex.

De la misma manera que antes, se efectuaron experimentos usando como aditivos compuestos aminos tales como los que se exponen en la tabla 2. Las condiciones empleadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

376555

Tabla 2

Nombre del aditivo	Concen- tración (mg/ml)	Tiempo de cul- tivo (horas)	Canti- dad de fil- trado (litros)	Poten- cia (mcg/ ml)	Poten- cia total (mg)	Nombre de la nueva bleomi- cina separada con CM-Sephadex	Peso (mg)	Poten- cia (mcg/ mg)	Poten- cia total (mg)	Rendimiento a partir del filtrado de cultivo (%)
Bromhidrato de bro- muro de 3-aminopro- pildimetilsulfonio	0,4	192	3,0	138,8	416,4	Bleomicina contenido de A ₂ , 72,2%	195	650,7	127,0	30,5
Cloruro de 3-amino- 3-carboxipropildime- tilsulfonio	40,0	192	1,65	100,0	165,0	Bleomicina (contenido de A ₂ , 87,2%)	140	300,0	42,0	25,5
Clorhidrato de agma- tina	2,0	240	2,0	200,0	400,0	Bleomicina (contenido de B ₂ , 76,2%)	164	800,0	131,2	32,8
Espermina	0,2	264	1,1	150,0	165,0	Bleomicina contenido de A ₅ , 90,8%	62	1200	74,4	45,1



13 FEB



Ejemplo 2

A un medio que tenía una composición de 6,4% de jalea de mijo, 0,5% de glucosa, 3,5% de polvo de soja, 0,75% de líquido de maceración de maíz, 0,3% de cloruro sódico, 0,1 % de fosfato potásico secundario, 0,05% de sulfato de cinc, 0,01% de sulfato de cobre, 0,2% de nitrato sódico y 0,01% de Toho nº 1 (marca registrada de un agente tensoactivo), se añadió 1,2-diaminopropano en proporción de 2 mg/ml, para ajustar el pH del medio a 6,5. Cada porción de 100 ml del medio así tratado fué cargada separadamente en un matraz Sakaguchi, y luego fué esterilizada. Subsiguientemente se inoculó en el medio *Streptomyces verticillus* (ATCC Nº 15003), y fué cultivado a 27°C durante 192 horas, con agitación a 130 rpm. Después, los líquidos de cultivo (4,5 litros) fueron recogidos y filtrados, obteniéndose 3,56 litros de un filtrado (potencia 190 mcg/ml, potencia total 676,4 mg). Este filtrado de cultivo fué hecho pasar por y adsorbido en una columna rellena de 200 ml de Amberlite IRC-50 (marca registrada de una resina sintética; forma H), fué lavado con agua, y luego fué eluído usando una mezcla 1:1 (en volumen) de acetona y solución acuosa de ácido clorhídrico 0,02N, y las fracciones activas para *Mycobacterium* 607 fueron recogidas y concentradas a sequedad. El residuo resultante fué disuelto en 4 ml de una solución acuosa de metanol al 80%, y fue cargado en una columna rellena de 70 ml de alúmina neutra, seguido por elución con una solución acuosa de metanol al 80%. Subsiguientemente, las fracciones que contenían bleomicina fueron recogidas y concentradas

6.2.70

- 45 -

376555



13 FEB

a sequedad, y el residuo fué disuelto en 2 ml de agua, y fué cargado en una columna rellena de 20 ml de Sephadex G-25, y luego se efectuó la elución usando agua destilada.

5 La resultante fracción verde azulada que contenía bleomicina fué recuperada, suspendida en una solución acuosa de cloruro amónico 0,02N, añadida a una columna rellena de 20 ml de CM-Sephadex, y luego fué eluída con una solución acuosa de cloruro amónico 0,1M.

10 Después, la fracción resultante, que contenía la sustancia deseada, fué recogida y hecha pasar por una columna rellena de 5 ml de carbono activo, para adsorber la sustancia deseada, que luego fué eluída con una mezcla 1:1 de acetona y solución acuosa de ácido clorhídrico 0,02N. Subsiguientemente, el eluato fué concentrado a sequedad, obteniéndose 35 mg de 2-aminopropilaminobleomicina (potencia 2173 mcg/mg, potencia total 76,1 mg.). El rendimiento a partir del filtrado de cultivo fué 11,25%.

20 Se disolvieron 25 mg de la sustancia así obtenida en 1 ml de metanol, y se introdujo en la solución sulfuro de hidrógeno gaseoso, durante 10 min. Después se filtró la solución, y el filtrado fué concentrado a sequedad, obteniéndose 20 mg de clorhidrato de 2-aminopropilaminobleomicina exento de cobre (potencia 2000 mcg/mg, potencia total 40 mg). Este producto exento de cobre fué hidrolizado con una solución acuosa de ácido clorhídrico 6N, y luego fué sometido a electroforesis en papel, a pH 1,9 y a un voltaje de 3000 voltios, con lo que se detectó 1,2-diaminopropano.

30 De la misma manera que antes, se efectua-

6.2.70

376555



ron experimentos usando los compuestos amino que se presentan como aditivos en la tabla 3. Las condiciones adoptadas en los experimentos, y los resultados, fueron según se muestra en la tabla 3.

Tabla 3

Expe- rien- cia Nº	Nombre del adi- tivo	Concen- tración de adi- tivo (mg/ml)	Tiem- po de cul- tivo (ho- ras)	Canti- dad de filtra- do (li- tros)	Poten- cia (mcg/ ml)	Poten- cia total (mg)	Nombre de la nueva bleomi- cina separada con CM-Sepha dex	Peso (mg)	Poten- cia (mcg/ mg)	Poten- cia total (mg)	Rendimiento del filtra- do de cul- tivo (%)
1	1,2-diaminoetano	4,0	192	3,0	150,0	450,0	2-aminoetilami- nobleomicina	28,7	1700	488	10,8
2	N,N-dimetil-1,2- diaminoetano	3,0	240	2,98	154,0	458,9	2-N,N-Dimetil- aminoetilami- nobleomicina	140	897	125,6	27,4
3	N,N-dietil-1,2- diaminoetano	2,0	240	2,98	154,0	458,9	2-N,N-dietil- aminoetil- aminobleomi- cina	140	1102	154,3	33,6
4	N,N-dietil-1,3- diaminopropano	2,0	240	2,84	181,3	514,9	3-N,N-dietil- aminopropil- aminobleomi- cina	230	1036	238,3	46,3
5	N-butil-N'-(3' aminopropil)-1,3- diaminopropano	2,0	240	3,12	113,4	353,8	3- -(N-butil)- aminopropil- aminopropil- aminobleomicina	150	5840	876,0	24,8



376555

6.2.70

Tabla 3 (cont.)

Experiencia nº	Nombre del aditivo	Concentración de aditivo (mg/ml)	Tiempo de cultivo (horas)	Cantidad de fitoestrógenos (g)	Potencia total (mcg/ml)	Potencia total (mg)	Nombre de la nueva bleomicina separada CM-Sephadex	Peso (mg)	Potencia (mcg/mg)	Potencia total (mg)	Rendimiento del fitoestrógeno cultivado (%)
6	N-(2-hidroxi-1,2-diamino)propil)octano	0,6	240	3,00	140,0	420,0	2-(2-hidroxi-1,2-diamino)propil)aminobleomicina	88	1020	898,0	21,4
7	N-(3-aminopropil) piperazina	0,6	240	2,98	123,1	366,8	3-piperazino-1,2-diamino)propil)aminobleomicina	103	726	74,8	20,4
8	N-(1-feniletil)-N'-(3-aminopropil)-1,3-diaminopropano	3,0	240	3,05	1020	3111	3-β-(N-1-feniletil)-aminopropil)aminobleomicina	240	2500	600,0	19,3
9	N-(2-furfuril)-1,3-diaminopropano	3,0	240	3,00	380,0	1140	3-α-(2-furfuril)aminobleomicina	86	1450	124,7	10,9

376555



Tabla 3 (cont.)

Expe- rien- cia	Nombre del adi- tivo	Concen- tración de adi- tivo (mg/ml)	Tiem- po de culti- vo (ho- ras) agita- dor	Canti- dad de filtra- do (li- tros)	Poten- cia (mcg/ ml)	Poten- cia total (mg)	Nombre de la nueva bleomi- cina separa- da CW-Sephadex	Peso (mg)	Poten- cia (mcg/ mg)	Poten- cia total (mg)	Reudi- miento del fil- trado de cultivo (%)
10	4-piperidilmetil- amina	2,0	240	3,08	170,9	526,4	4-piperidilmetil- aminobleomicina	130	1394	181,2	34,4
11	Clorhidrato de 2- (4-imidazolil)- etilamina	1,0	240	2,88	189,6	493,0	2-(4-imidazolil)- etilaminobleomi- cina	74	847	62,7	12,7
12	N-metil-1,3-diamino propano	1,5	264	3,10	129,8	402,4	3-N-metilamino- propilaminobleo- micina	119,0	860	102,3	25,4
13	N-butil-1,3-diamino propano	4,0	264	3,40	525,0	1785,0	3-N-butilamino- propilaminobleo- micina	214,7	1700	365,0	20,4
14	N,N-dimetil-1,3- diaminopropano	2,0	240	3,04	154,8	470,6	3-(N,N-dimetil)- aminopropilamino bleomicina	127,0	869	110,4	23,5

376555



6.2.70

Tabla 3 (cont.)

Experiencia nº	Nombre del aditivo	Concentración de aditivo (mg/ml)	Tiempo de cultivo (horas)	Cantidad filtrada (litros)	Potencia (mcg/ml)	Potencia total (mg)	Nombre de la nueva bleomicina separada con CM-Sephadex	Peso (mg)	Potencia (mcg/mg)	Potencia total (mg)	Rendimiento del filtrado de cultivo (%)
15	Cloruro de 3-aminopropiltrimetilammonio	1,0	288	3,20	118,0	377,6	3-(N,N,N-trimetil)-aminopropilaminobleomicina	124,0	633	78,5	20,8
16	N-(3-(N,N-dimetil)-aminopropil)-1,3-diaminopropano	1,0	264	3,34	253,9	848,0	3-(3-(N,N-dimetil)-aminopropil)-aminopropilaminobleomicina	162,5	1280	195	23,0
17	N,N-bis-(3-aminopropil)-metilamina	0,5	264	3,54	133,7	473,3	3-(N-metil-N-3-aminopropil)-aminopropilaminobleomicina	32,0	1671	53,5	11,4
18	N-(3-amino-1-metilpropil)-1,3-diaminopropano	1,0	264	3,20	331,0	1059,2	3-N-metilpropilaminobleomicina	24,0	860	20,6	4,4
							3-(1-metil-3-aminopropil)-aminopropilaminobleomicina	112,6	1820	205	19,4



376555

Tabla 3 (cont.)

Expe- rien- cia ni	Nombre del aditivo	Concen- tración de aditivo (mg/ml)	Tiempo de cul- tivo (horas)	Concen- tración de aditivo (mg/ml)	agita- dor	Canti- dad de filtra- do (li- tros)	Poten- cia (mcg/ ml)	Poten- cia total (mg)	Nombre de la nue- va bleomicina con CM-Sepha- dex	Peso (mg)	Poten- cia (mcg/ mg)	Poten- cia total (mg)	Rendimien- to del filtrado de cultivo (%)
19	N-3-aminopropilpi- rrolidina	1,0	288	3,30	281,0	927,3	355,0	1066	3-(pirrolidino)- propilaminobleo- micina	378,4	40,8	40,8	
20	N-3-aminopropil- piperidina	1,0	288	3,00	317,0	931,0	320,0	1257	3-(piperidino)- propilaminobleo- micina	402,2	42,3	42,3	
21	N-3-aminopropil- morfolina	0,1	240	2,94	145,8	428,7	175,0	5922	3-(morfolino)- propilamino- bleomicina	103,6	24,2	24,2	
22	N-2-aminoetilpi- perazina	2,0	288	3,12	111,0	346,0	75,0	799	2-piperazino- etilaminobleo- micina	59,9	17,3	17,3	
23	N,N-bis-3-amino- propilpiperazina	0,5	240	3,69	225,0	860,3	210,6	1180	3- $\sqrt{1-4-(3-aminopropil)}$ - piperazino- propilamino- bleomicina	248,5	29,9	29,9	



376555

Tabla 3 (cont.)

Experiencia Nº	Nombre del aditivo	Concentración de aditivo (mg/ml)	Tiempo de cultivo (horas)	Cantidad de filtrado (litros)	Potencia (mcg/ml)	Potencia total (mg)	Nombre de la nueva mezcla con CM-Sephadex	Peso (mg)	Potencia (mcg/mg)	Potencia total (mg)	Rendimiento del filtrado de cultivo (%)
24	N-(3-pirrolidino-propil)-1,3-diaminopropano	1,0	264	3,08	465,6	1434,0	3-β-(pirrolidino)-propilaminopropilamina nobleomicina	105,5	2564	269,2	18,8
25	N-(3-piperidino-propil)-1,3-diaminopropano	0,5	264	3,10	543,5	1684,9	3-β-(piperidino)-propilaminopropilamina nobleomicina	140,0	3580	501,2	29,7
26	N-(3-morfolino-propil)-1,3-diaminopropano	0,5	264	2,94	139,0	408,7	3-β-(morfolino)-propilaminopropilamina nobleomicina	70,0	1201	84,1	20,6
27	N-(3-hidroxi-propil)-1,3-diaminopropano (clorhidrato)	0,7	264	3,02	227,4	186,7	3-(3-hidroxi-propil)-aminopropilamina nobleomicina	166,1	1300	215,9	31,4



Tabla 3 (cont.)

Expe- rien- cia nº	Nombre del aditivo	Concen- tración de adi- tivo (mg/ml)	Tiempo de cul- tivo (horas) agita- dor	Canti- dad de filtra- do (li- tros)	Poten- cia (mcg/ ml)	Poten- cia total (mg)	Nombre de la nueva bleomi- cina con CM- Sephadex	Peso (mg)	Poten- cia (mcg/ mg)	Poten- cia total (mg)	Rendimien- to del filtrado de cuíti- vo (%)
28	N-(3-metoxipropil)- 1,3-diaminopropano (clorhidrato)	1,35	288	3,10	282,5	875,8	3-(3-metoxipropil)- aminopropil- aminobleomicina	336,0	1335	448,6	51,2
29	N-bencil-1,3-diami- nopropano	0,5	264	3,00	334,0	1182,0	3-bencilamino- propilamino- bleomicina	40,0	1986	79,4	7,9
30	N-(1-feniletil)-1,3- diaminopropano	0,5	288	3,39	606,0	2054,3	3-(1-feniletil)- aminopropilamino- bleomicina	96,3	2400	231	11,2
31	m-xiléndiamina	2,0	288	2,77	292,4	809,9	m-aminometil- bencilaminobleo- micina	10,8	2546	27,5	3,4
32	p-xiléndiamina	2,0	264	3,05	320,4	977,2	p-aminometilben- cilaminobleomi- cina	33,3	2670	89,0	9,1



376555

6.2.70

Tabla 3 (cont.)

Experiencia	Nombre del aditivo	Concen- tración de cul- tivo (mg/ml)	Tiempo de cul- tivo (horas)	Can- tidad de filtra- do (litros)	Poten- cia (mcg/ml)	Poten- cia total (mg)	Nombre de la nue- va bleomicina con CM-Sephadex	Peso (mg)	Poten- cia (mcg/mg)	Poten- cia total (mg)	Rendi- miento del filtrado de cultivo (%)
33	N-ciclohexil-1,3-dia- minopropano	0,5	264	3,38	1354,0	4576,5	3-ciclohexilamino- propilaminobleomi- cina	330,0	5355	1767,2	38,6
34	N-(3-ciclohexilamino- propil)-1,3-diamino- propano	0,5	264	3,10	1600,0	4960,0	3-(3-ciclohexilami- nopropil)-aminopropil- aminobleomicina	178,0	11215	1996,3	40,3

376555





Ejemplo 3

5 A un medio que tenía una composición de 6,4%
de jalea de mijo, 0,5% de glucosa, 3,5% de polvo de soja,
0,75% de líquido de maceración de maiz, 0,3% de cloruro
sódico, 0,1% de fosfato potásico secundario, 0,05% de sul-
fato de cinco, 0,01% de sulfato de cobre, 0,2% de nitrato
sódico, 0,01% de silicio y 0,01% de Toho nº 1 (marca re-
gistrada de un agente tensoactivo manufacturado por Toho
10 Chemical Industry Ltd.), se añadió 1,3-diaminopropano en
una proporción de 2 mg/ml, para ajustar el pH del medio
a 6,5. Se cargaron 12 litros del medio así tratado en un
fermentador de vidrio de 20 litros , y fué esterilizado. Se
inocularon en este medio 800 ml de un líquido de cultivo
15 de *Streptomyces verticillus* (ATCCNº 15003), que había sido
sometido a cultivo con agitación durante 48 horas, en un
medio de la misma composición antes mencionada, y fué cul-
tivado a 27°C, con agitación a de 350 a 370 rpm, durante
120 horas, mientras se introducía, por minuto, aire en
20 volumen igual al del medio. Se filtraron 7,7 litros del
líquido de cultivo, y el filtrado (5,6 litros, potencia
148,5 mcg/ml, potencia total 831,6 mg) fué sometido a ex-
tracción y purificado de la misma manera que en el ejemplo
1, obteniéndose 230 mg de clorhidrato de bleomicina (po-
25 tencia 734,8 mcg/mg, potencia total 169 mg). El rendi-
miento a partir del filtrado de cultivo fué 20,3%. Este
clorhidrato fué analizado según el método de CM-Sephadex,
hallándose que contenía 84,5% de 3-aminopropilaminobleo-
micina. Se disolvieron 200 mg del clorhidrato en 10 ml de
30 agua destilada, y la solución fué cargada en una columna

de 50 ml de volumen, rellena de CM-Sephadex suspendido en formiato amónico acuoso 0,02N, y luego fué revelada y eluída con solución acuosa de formiato amónico 0,1N, obteniéndose una fracción que contenía 3-aminopropilamino-bleomicina. Esta fracción fué hecha pasar por y adsorbida en una columna rellena de 10 ml de carbono activo, fué lavada con agua, y luego fué eluída mediante acetona y solución acuosa de ácido clorhídrico 0,02N (1:1 en volumen). Subsiguientemente, la fracción eluato activo resultante fué concentrada a sequedad, obteniéndose 50 mg de clorhidrato de 3-aminopropilaminobleomicina (potencia 1934 mcg/mg, potencia total 96,7 mg). El rendimiento a partir del clorhidrato antes mencionado fué 65,8%.

Esta sustancia fué hidrolizada con ácido clorhídrico 6N, fué introducida en una solución de sosa cáustica al 10%, y luego fué sometida a cromatografía de gas, usando una columna rellena de Fluropack 80 (marca registrada) revestido de Silicone SF 96 (marca registrada), con lo que se detectó un pico de 1,3-diaminopropano.

Se disolvieron en 5 ml de metanol 30 mg del clorhidrato de 3-aminopropilaminobleomicina así obtenido (potencia 1934 mcg/mg, potencia total 58,02 mg), y se introdujo sulfuro de hidrógeno gaseoso en la solución resultante, durante 30 min, depositándose un precipitado de sulfuro de cobre. Este precipitado fué recuperado por filtración y fué lavado con metanol. Después, el líquido de lavado y el filtrado fueron reunidos, y la mezcla fué concentrada a sequedad, obteniéndose 25 mg de clorhidrato de 3-aminopropilaminobleomicina exento de cobre (potencia 1850 mcg/mg, potencia total 46,35 mg). El rendimiento a

30
6.2.70

376555



partir de la sustancia que contiene cobre fué 79,7%.

5 Se disolvieron 20 mg de este clorhidrato de 3-aminopropilaminobleomicina exento de cobre (potencia 1850 mcg/mg, potencia total 37 mg), en 2 ml de agua destilada, se cargó en una columna rellena de 5 ml de la resina intercambiadora de aniones Amberlite IRA-400 (marca registrada de la resina intercambiadora de iones, del tipo de ácido sulfúrico, manufacturado por Rohm and Haas Co.), y luego fué eluído con agua destilada, y el eluído fué
10 concentrado a sequedad, obteniéndose 15,5 mg de sulfato de 3-aminopropilaminobleomicina exento de cobre (potencia 1850 mcg/mg, potencia total 28,68 mg). El rendimiento a partir del clorhidrato exento de cobre fué 77,5%.

15 De la misma manera que antes, se efectuaron experimentos en un fermentador de vidrio, usando como aditivos unos compuestos amino tales como los expuestos en la tabla 4. Las condiciones empleadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

20

376555

Tabla 4

Nombre del aditivo	Concen- tración de adi- tivo (mg/ml)	Tiem- po de culti- vo (ho- ras)	Canti- dad de filtra- do (li- tros)	Poten- cia (mcg/ ml)	Poten- cia total (mg)	Nombre de la bleomicina separada	Peso (mg)	Poten- cia (mcg/mg)	Poten- cia total (mg)	Rendimiento del filtrado de cultivo (%)
1,4-diaminobuta- no	2,0	120	4,9	140,0	686,0	Bleomicina A ₂	71,8	1,232	88,5	12,9
Espermidina	0,4	163	5,0	122,2	611,0	Bleomicina A ₅	44,7	2,543	113,7	18,6

13 FEB



376555



Ejemplo 4

Un medio que contenía 4,0% de polvo de soja, 1,0% de extracto de levadura, 0,3% de cloruro sódico, 1,0% de aceite de soja, 0,0007% de sulfato de cobre-5H₂O, 0,0001% de sulfato de hierro-7H₂O, 0,0008% de cloruro de manganeso-4N₂O y 0,0002% de sulfato de cinc-7H₂O, fue ajustado a pH 7,0. Cada porción de 120 ml de este medio fué cargada separadamente en un matraz Sakaguchi de 500 ml, y luego fué esterilizada. Se inoculó en el medio una cepa MA 267-A₁ aislada en 1965 del terreno de Musashino-cho, Saitama-ken, Japón, que había sido identificada como una variante de *Streptomyces verticillus* ATTC 21678, y que produce específicamente bleomicina A₅. Además se añadió fosfato de espermidina, que había sido sometido a un tratamiento de esterilización con filtro Millipore (marca registrada), de manera que la cantidad del mismo resultó ser 0,5 mg/ml, y la cepa fué cultivada a 27°C durante 7 días, con agitación a 130 rpm. Se recogieron y filtraron 5,2 litros de los líquidos de cultivo, y el filtrado (4,5 litros, potencia 196 mcg/ml, potencia total 253 mg) fué sometido a extracción y purificado de la misma manera que en el ejemplo 1, obteniéndose 137 mg de un polvo crudo de clorhidrato de bleomicina A₅ (potencia 1846 mcg/mg, potencia total 253). El rendimiento a partir del líquido de cultivo fué 28,8%. Este polvo crudo fué sometido a cromatografía usando una columna rellena de 25 ml de Sephadex G-50, y fué eluído con agua destilada. Las resultantes fracciones activas, coloreadas en azul, fueron recogidas y concentradas a sequedad, con lo que se obtuvieron 53,5 mg de un polvo

376555



azul (potencia 2613 mcg/mg, potencia total 140 mg), y solo se produjo bleomicina A₅. El rendimiento a partir del polvo crudo fué 55,4%. La extinción ($E_1^{1\%}$ cm) a 293 m μ , del producto así obtenido, fué 116, y la espermidina de la cadena secundaria del mismo fué detectada cuando se sometió a cromatografía de gas un hidrolizado del producto con ácido clorhídrico 6N.

Esta solicitud que corresponde a las presentadas en Japón, el día 15 de febrero de 1.969, bajo el N^o 10774/69 y el día 4 de noviembre de 1.969, bajo el N^o 87589/69, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- REIVINDICACIONES -

15

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 siguientes:

20

1.- Procedimiento para producir bleomicinas antibióticas inoculando y cultivando aerobiamente, en un medio que contiene una fuente de nutriente, una cepa productora de bleomicina perteneciente a los actinomicetos, donde el cultivo se efectúa en presencia de un compuesto amino que tiene al menos un grupo $-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ y al menos un grupo básico elegido de los grupos amino, imino, guanidino, amidino y sulfonio, y compuestos cíclicos que contienen nitrógeno, o en presencia de un compuesto convertible, en el líquido de cultivo, en un compuesto amino tal como los antes mencionados, produciendo así se-

30

6.2.70

- 61 -

376555

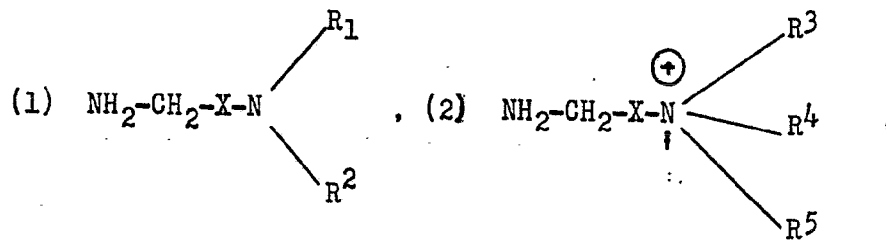


lectivamente un componente de bleomicina conocido o nuevo, correspondiente a dicho compuesto amino o a un compuesto amino derivado del compuesto antes mencionado, y luego se recupera la bleomicina conocida o nueva, del medio de cultivo, por medios conocidos.

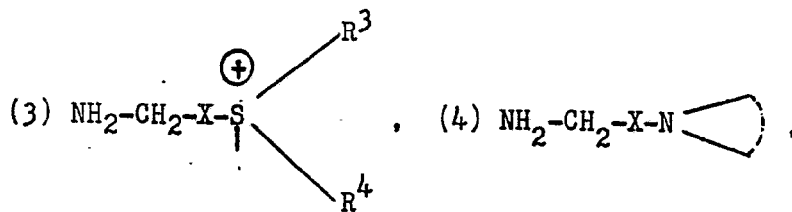
5

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, donde el compuesto amino está representado por cualquiera de las fórmulas generales:

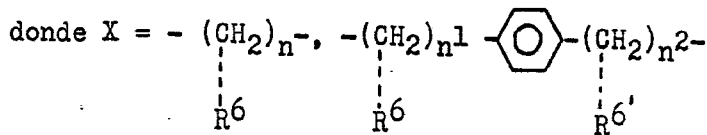
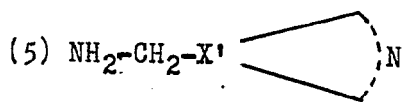
10



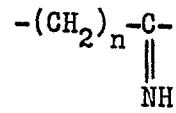
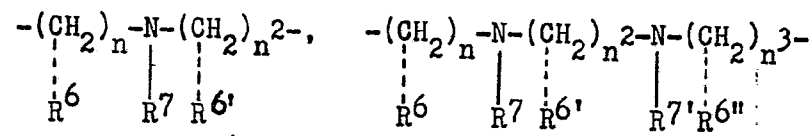
15



20

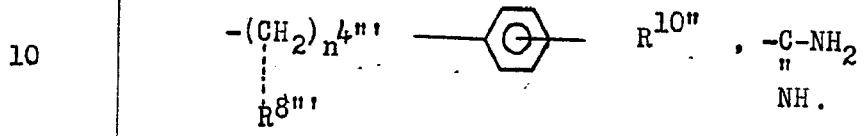
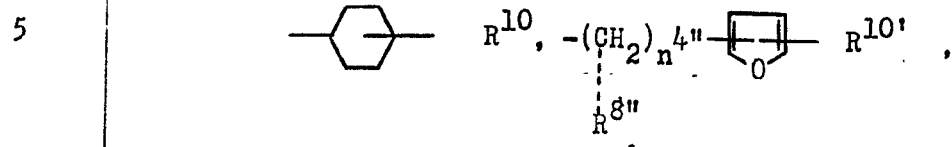
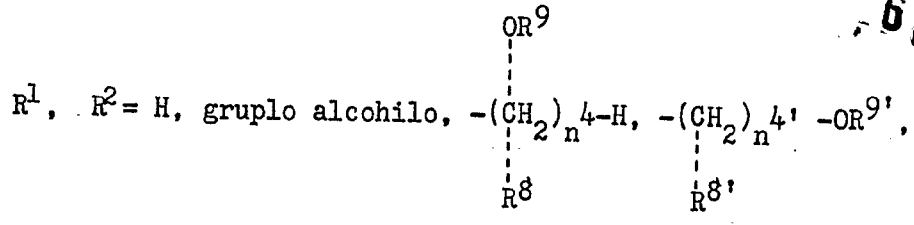


25

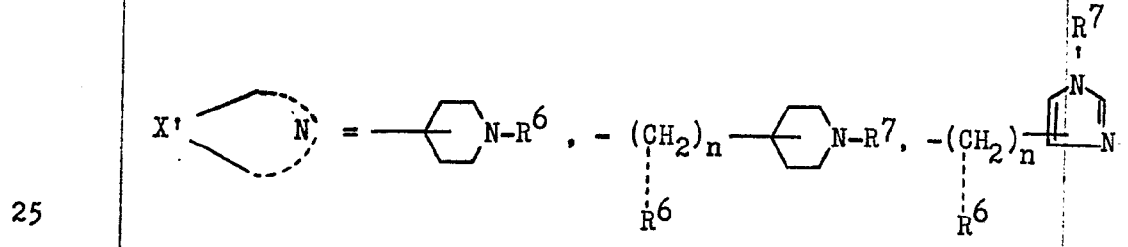
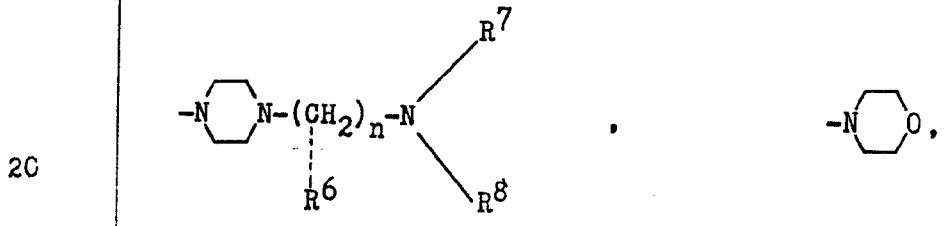
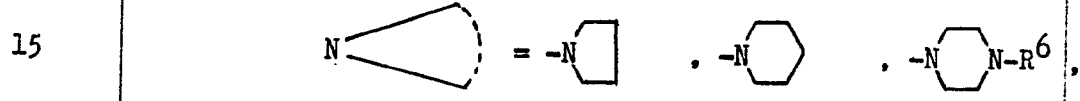


6.2.70

376555



$R^3, R^4, R^5 = \text{ grupo alcoholo}$



donde $n, n^2, n^3, n^4, n^4', n^4'', n^4''' = \text{ un entero de 1 a 8; } n^1 = \text{ un entero de 0 a 8; } R^6, R^6', R^6'', R^7, R^7', R^8, R^8', R^8'', R^8''', R^9, R^9', R^{10}, R^{10}', R^{10}'' = H, \text{ grupos alcoholo; y la línea de puntos de la fórmula (por ejemplo } -(\text{CH}_2)_n^4\text{-, etc.) muestra que un átomo de hidrógeno de una cadena de$

30
6.2.70

376555



carbono puede estar sustituido, en cualquier posición del grupo alcohol.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, donde $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-X-N}$ $\begin{matrix} \diagup \text{R}^1 \\ \diagdown \text{R}^2 \end{matrix}$ es 1,2-diaminoetano, 1,2-diaminopropano; 1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano, agmatina, espermidina, espermina, 1,2-diaminopropano, N-metil-1,3-diaminopropano, N-butil-1,3-diaminopropano, N,N-dimetil-1,2-diaminoetano, N,N-diethyl-1,2-diaminoetano, N,N-dimetil-1,3-diaminopropano, N,N-diethyl-1,3-diaminopropano, N-(3-(N,N-dimetil)-3-aminopropil)-1,3-diaminopropano, N,N-bis-(3-aminopropil)-metilamina, N-(3-amino-1-metil-propil)-1,3-diaminopropano; N-(2-hidroxi-propil)-1,2-diaminoetano, N-(3-hidroxi-propil)-1,3-diaminopropano, N-(3-metoxi-propil)-1,3-diaminopropano, N-bencil-1,3-diaminopropano, N-(1-fenetil)-1,3-diaminopropano, N-(1-feniletil)-N'-(3-aminopropil)-1,3-diaminopropano, N-ciclohexil-1,3-diaminopropano, N-(3-ciclohexilaminopropil)-1,3-diaminopropano, N-butyl-N'-(3-aminopropil)-1,3-diaminopropano, m-xiléndiamina o p-xiléndiamina.

4.- Procedimiento según la reivindicación 2, donde $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-X-N}$ $\begin{matrix} + \\ \diagup \text{R}^3 \\ \diagdown \text{R}^4 \\ \text{R}^5 \end{matrix}$ es cloruro de 3-aminopropiltrimetilamonio o bromuro de 3-aminopropiltrimetilamonio.

5.- Procedimiento según la reivindicación 2, donde $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-X-S}$ $\begin{matrix} \oplus \\ \diagup \text{R}^4 \\ \diagdown \text{R}^5 \end{matrix}$ es bromuro de 3-aminopropil-dimetilsulfonio, bromuro de 3-acetaminopropildimetilsulfonio, cloruro de 3-amino-3-carboxipropildimetilsulfonio o cloruro de 3-amino-3-carbamoylpropildimetilsulfonio.

6.- Procedimiento según la reivindicación 2, donde $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-X-N}$ $\begin{matrix} \diagup \\ \diagdown \end{matrix}$ es N-3-aminopropilpirrolidina, N-3-aminopropilpiperidina, N-3-aminopropilmorfolina, N-2-aminoetilpiperazina, N-3-aminopropilpiperazina, N,N-bis-


30
6.2.70

376555



aminopropilpiperazina, N-(3-pirrolidinopropil)-1,3-diaminopropano, N-(3-piperidinopropil)-1,3-diaminopropano, N-(3-morfolinopropil)-1,3-diaminopropano.

7.- Procedimiento según la reivindicación

5 2, donde NH₂-CH₂-X'  N es N-(2-furfuril)-1,3-diaminopropano, 4-piperidilmetilamina ó 2-(4-imidazolil)-etilamina.

8.- Procedimiento para producir bleomicinas antibióticas.


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.

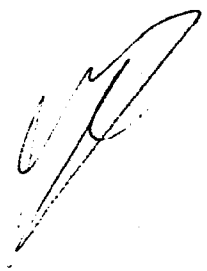
Esta Memoria consta de sesenta y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

15

Madrid, 7 ABR 1970

P.A.


Por el autor.



6.2.70

f.b.

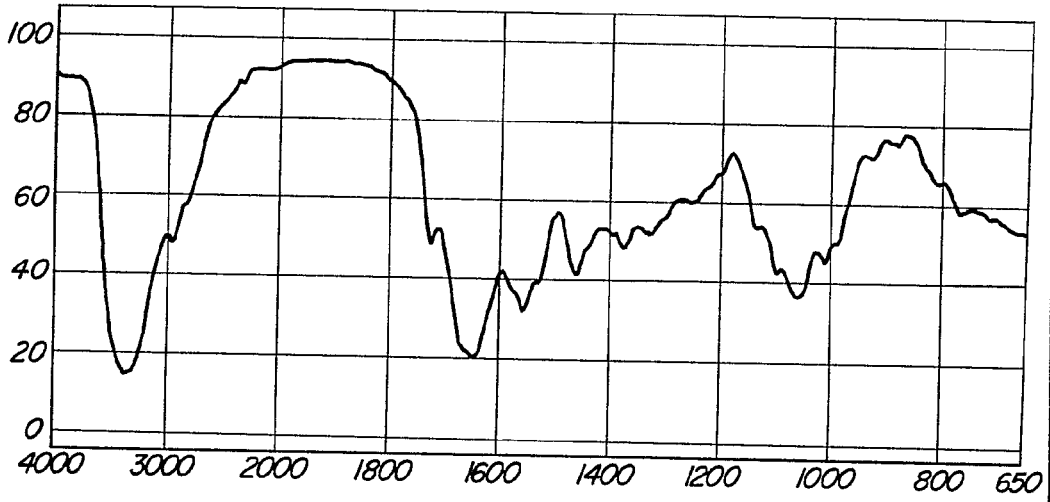
376555

13 FEB

376555



FIG. 1



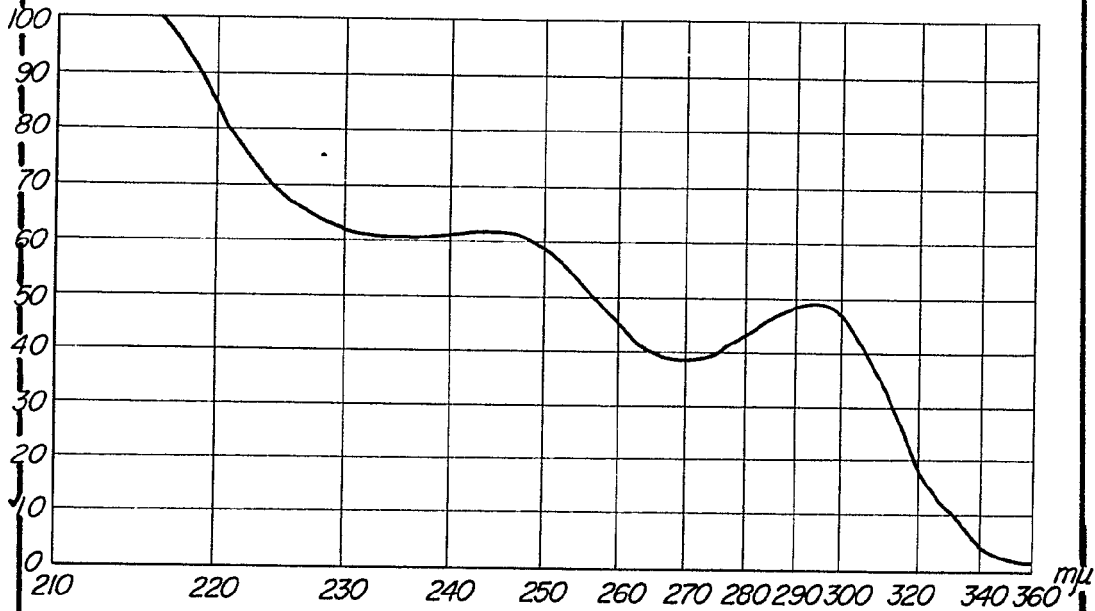
Attest:
Per P. 

137E



376555

FIG. 2



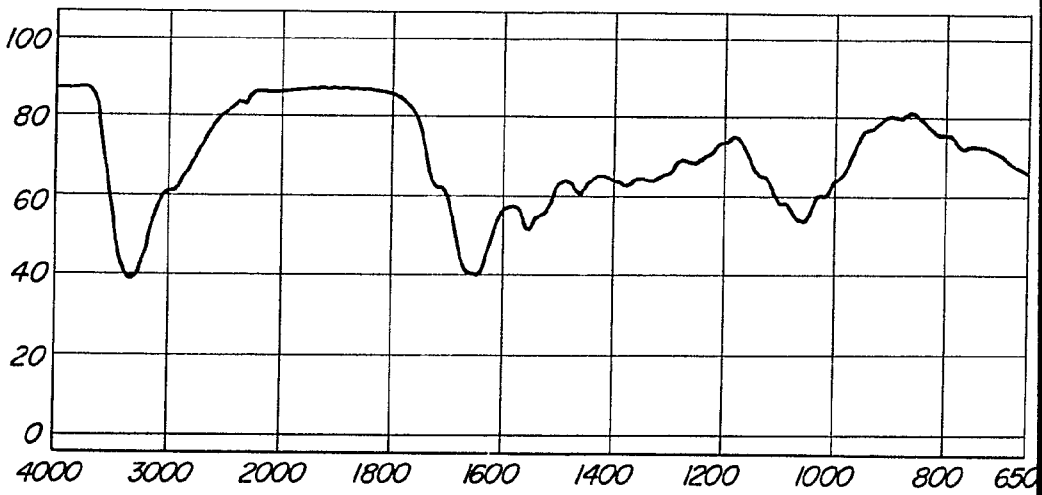
For This

376555

13 FEB



FIG. 3



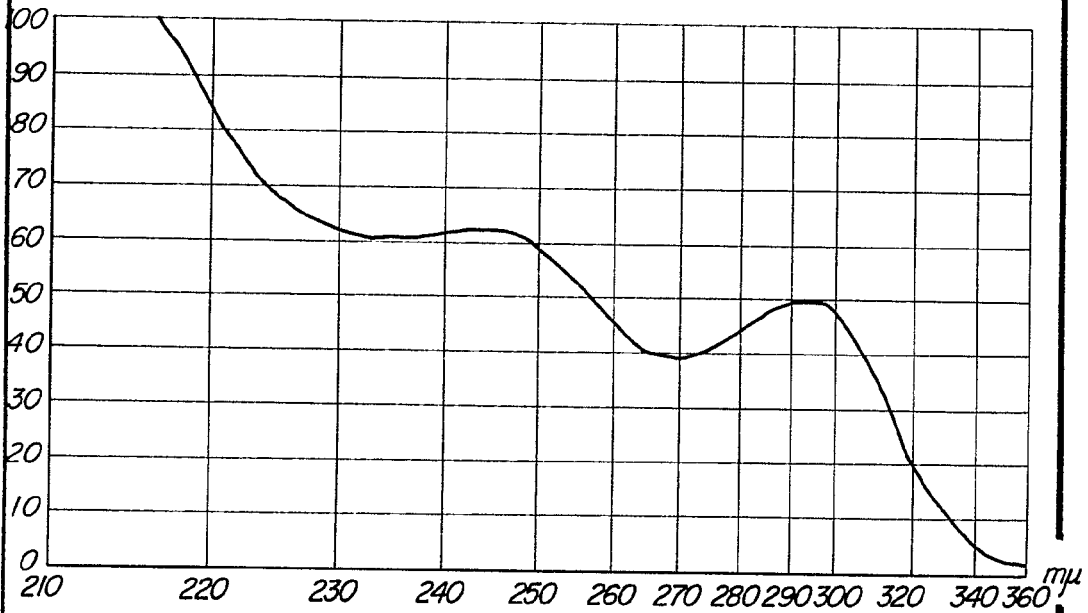
For ... *[Handwritten Signature]*

376355

13 FEB



FIG. 4

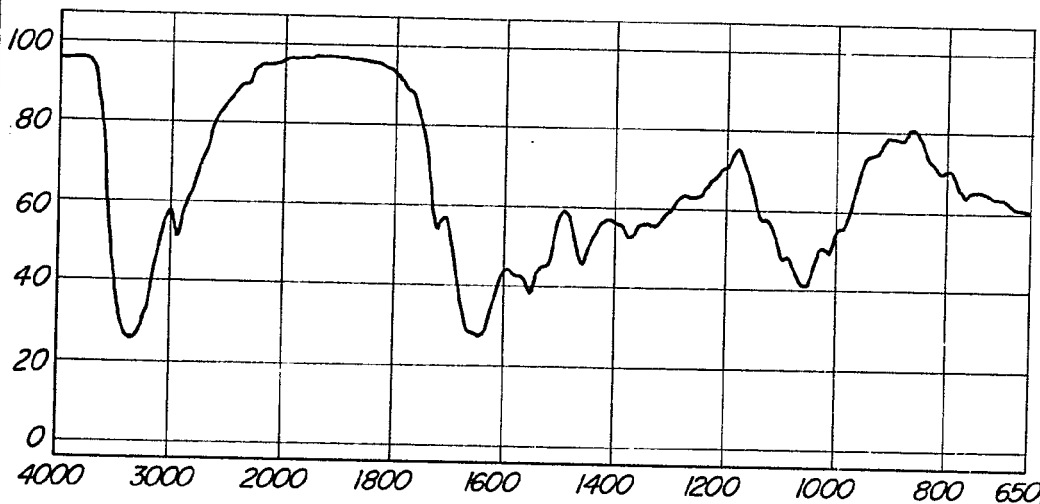


Albert J. de Li.
For Podor

376555



FIG. 5



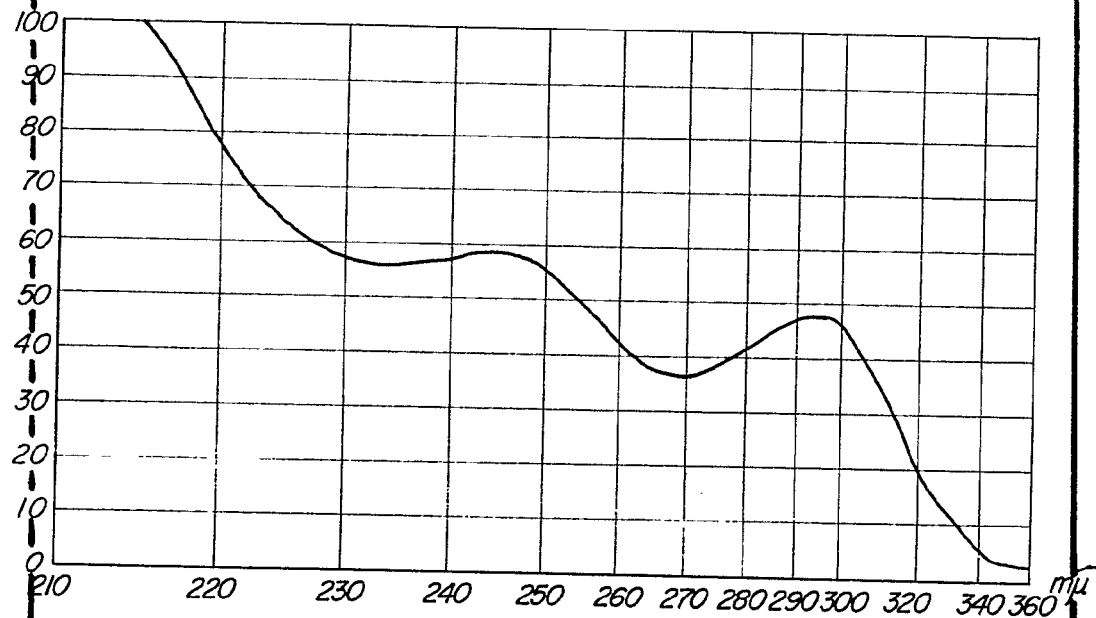
Albert G. ...
For Power ...

376555

13



FIG. 6



Albert J. [Signature]
For Pouse.