

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

80 837

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 14.02.1970 (P. 138814)

Pierwszeństwo: 15.02.1969 dla zastrz. 8
04.11.1969 dla zastrz. 9 Japonia

Zgłoszenie ogłoszono: 20.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 25.05.1976

MKP C12d 9/14

Int. Cl.² C12D
9/14

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai,
Tokio (Japonia)

Sposób wytwarzania antybiotyków z grupy bleomycyn

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania antybiotyków z grupy bleomycyn, oparty na szczepieniu i aerobowej hodowli *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 lub jego wariantu ATCC 21678 w pożywce hodowlanej. Hodowlę prowadzi się w obecności aminozwiązku posiadającego przynajmniej jedną grupę $-\overset{|}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ i przynajmniej jedną zasadową grupę taką, jak grupa aminowa, iminowa, guanidynowa, amidynowa, sulfoniowa oraz związków cyklicznych, zawierających azot, lub związku, który w procesie fermentacji może być przekształcony w wyżej zdefiniowany aminozwiązek. W wyniku otrzymuje się selektywnie w pożywce znane i nowe bleomycyny, które wyodrębnia się z pożywki znanymi metodami.

Bleomycyny są antybiotykami przeciw tumorowi. Odkrył je Umezawa i współpracownicy. Otrzymuje się je przez aerobowe zaszczepienie odpowiednim szczepem należącym do grupy actinomycos *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 lub jego wariantu ATCC 21678 mechanicznie mieszanej pożywki zawierającej papkę z prosa (składnik główny — maltoza), glukozę, mączkę sojową, wyciąg z kukurydzy, chlorek sodowy, fosforan potasowy, siarczany cynku, siarczany miedzi i tym podobne. Otrzymane bleomycyny wyodrębnia się w postaci chlorowodorów lub siarcanów przy użyciu wymiennicy jonowych.

Wyodrębnione bleomycyny stanowią grupy: A₁,

2

A₂, A₂', A₃, A₄, A₅, A₆, B₁, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆ i ich pochodne. Nazwa bleomycyny zastrzeżona jest dla tych grup antybiotyków (brytyjski opis patentowy nr 1 038 242).

5 W warunkach normalnych otrzymuje się mieszaninę bleomycyn o różnym składzie, z przewagą bleomycyny A₂ i B₂.

W celu umożliwienia selektywnego otrzymania poszczególnych antybiotyków z grupy bleomycyn z dobrymi wydajnościami, wynalazcy ustalili strukturę bleomycyn, reprezentowaną przez ogólny wzór 1, w którym R oznacza grupę o wzorze: dla bleomycyny A₂-R oznacza grupę o wzorze 2,

15 dla bleomycyny A₂'-R oznacza grupę o wzorze $-\text{NH}-(\text{CH})_4-\text{NH}_2$,

dla bleomycyny A₅-R oznacza grupę o wzorze

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$,

dla bleomycyny A₆-R oznacza grupę o wzorze

$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$,

20 dla bleomycyny B₂-R oznacza grupę o wzorze 3, dla bleomycyny B₄-R oznacza grupę o wzorze 4.

Stwierdzono, że wprowadzenie do pożywki aminozwiązku, odpowiadającego grupie R łańcucha bocznego bleomycyny, lub związku, z którego taki aminozwiązek może powstać w procesie fermentacji prowadzi do selektywnego otrzymania określonej bleomycyny z dobrą wydajnością. Dodatek pewnych aminozwiązków prowadzi do otrzymania nowych bleomycyn, które można wyodrębnić z wysoką wydajnością.

Wyżej wymienione aminozwiązki stosowane w sposobie według wynalazku można podzielić na 5 grup związków o wzorach 5—9, w których X oznacza grupy o wzorach 10—14; R¹ i R² oznaczają atom wodoru, grupę alkilową lub grupy o wzorach 15—20, a R³, R⁴ i R⁵ oznaczają grupę alkilową; grupa o wzorze 21 oznacza grupy o wzorach 22—26, zaś grupa o wzorze 27 oznacza grupy o wzorach 28—30. We wzorach 10—30, n, n², n³, n⁴, n^{4'}, n^{4''}, n^{4'''} oznaczają liczbę całkowitą mieszczącą się w przedziale 1—8, n¹ oznacza liczbę całkowitą mieszczącą się w przedziale 0—8, R⁶, R^{6'}, R^{6''}, R⁷, R^{7'}, R⁸, R^{8'}, R^{8''}, R⁹, R^{9'}, R¹⁰, R^{10'}, R^{10''}, oznaczają atom wodoru lub grupy alkilowe. Linia kreskowana we wzorze, na przykład wzorze 31, oznacza, że każdy atom wodoru przy atomie węgla w łańcuchu może być zastąpiony grupą alkilową.

Szczepienie i hodowlę *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 lub jego wariantu ATCC 21678 w pożywce hodowlanej prowadzi się, dodając aminozwiązek o wzorze ogólnym 90, w którym A oznacza grupę o wzorze 91, w którym R¹ i R² oznaczają grupy alkilowe, grupę -NH₂, grupę o wzorze 92, grupę -NH-(CH₂)_{n₁}-NH₂, gdzie n₁ oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—6, grupę -NH-(CH₂)_{n₁}-NH-(CH₂)_{n₂}-NH₂, gdzie n₂ ma wyżej podane znaczenie, a n₂ oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—5, Y oznacza atom wodoru, grupę -COOH, grupę -CONH₂, Z oznacza atom wodoru, grupę -COR³, gdzie R³ oznacza grupę alkilową, zaś n oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—5, który powoduje selektywne powstawanie znanej lub nowej bleomycyny, posiadającej łańcuch boczny, odpowiadający dodanemu aminozwiązkowi lub aminozwiązkowi, powstającemu z dodanego aminozwiązku w czasie hodowli, a następnie bleomycynę wyodrębnia się z pożywki znanymi metodami.

Szczepienie i hodowlę *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 lub jego wariantu ATCC 21678 w pożywce hodowlanej prowadzi się, dodając aminozwiązki o wzorze ogólnym 93, w którym R oznacza grupy o wzorach 94—101, grupę o wzorze 21, w których to wzorach R¹ oznacza atom wodoru z wyjątkiem przypadku, gdy Y oznacza atom wodoru, grupę -COOH lub grupę -CONH₂, lecz nie jest wykluczone, gdy Y¹ oznacza grupę alkilową, grupę alkilową o wzorze 102 i 103, w których R⁶ oznacza atom wodoru lub grupę alkilową, Y² oznacza atom wodoru lub niższą grupę alkilową, n² oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—8, lub grupę cykloheksylową, R², R³ i R⁴ oznaczają grupę alkilową, grupę o wzorze 104 i 105, w których R⁶, Y² i n² mają wyżej podane znaczenie, lub grupę cykloheksylową, R⁵ i Y¹ oznaczają atom wodoru lub niższą grupę alkilową, n₁ oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—8, zaś grupa o wzorze 21 grupy o wzorach 22, 23, 24, 106, 26, w których R⁶ i Y² mają wyżej podane znaczenie, Y oznacza atom wodoru, niższą grupę alkilową, grupę -COOH lub -CONH₂, Z oznacza atom wodoru lub grupę acyloową, a n oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—8, przy czym Y, Y¹ i Y² mogą być podstawione w każdym miejscu prostego łańcucha węglowego z wyjątkiem przypadku, gdy oznaczają

atom wodoru, a dwupodstawiony pierścień benzenowy może być każdym z o-, m- i p-izomerów, który to dodatek aminozwiązku powoduje selektywne powstawanie nowej bleomycyny, posiadającej łańcuch boczny odpowiadający dodanemu aminozwiązkowi lub aminozwiązkowi powstającemu z dodanego aminozwiązku w czasie procesu hodowli, a następnie bleomycynę wyodrębnia się z pożywki znanymi metodami.

Poniżej przedstawione aminozwiązki lub produkty, z których powstają aminozwiązki stanowiące grupy R w związkach o ogólnym wzorze 5, 6, 7, 8 i 9.

15	1,2-dwuaminoetan	NH ₂ -(CH ₂) ₂ -NH ₂
	1,3-dwuaminopropan	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH ₂
	1,4-dwuaminobutan	NH ₂ -(CH ₂) ₄ -NH ₂
	1,5-dwuaminopentan	NH ₂ -(CH ₂) ₅ -NH ₂
	1,6-dwuaminoheksan	NH ₂ -(CH ₂) ₆ -NH ₂
20	N-(2-aminoetylo)-1,2-dwuaminoetan	NH ₂ -(CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂
	N-(3-aminopropilo)-1,3-dwuaminopropan	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₃ -NH ₂
	N-(3-aminopropilo)-1,4-dwuaminobutan (spermidyna)	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₄ -NH ₂
25	N-(5-aminopentylo)-1,5-dwuaminopentan	NH ₂ -(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₅ -NH ₂
	N,N'-dwi-(2-aminoetylo)-dwuaminometan	NH ₂ -(CH ₂) ₂ -NH-CH ₂ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂
30	N,N'-dwi-(2-aminoetylo)-1,2-dwuaminoetan	NH ₂ -(CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂
	N,N'-dwi-(3-aminopropilo)-1,6-dwuaminoheksan	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₆ -NH-(CH ₂) ₃ -NH ₂
35	N,N-dwi-(5-aminopentylo)-1,5-dwuaminopentan	NH ₂ -(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₅ -NH-(CH ₂) ₅ -NH ₂
	2,4,4-trójmetylopięciometylenodwuamina	wzór 32
	1,2-dwuaminopropan	wzór 33
40	N,N'-dwi-(3-aminopropilo)-1,4-dwuaminobutan (spermina)	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₄ -NH-(CH ₂) ₃ -NH ₂
	N-metylo-1,3-dwuaminopropan	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -NHCH ₃
45	N-butylo-1,3-dwuaminopropan	NH ₂ -CH ₂ /3-NHC ₄ H ₉
	N-oktylo-1,3-dwuaminopropan	NH ₂ -(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₇ -CH ₃
	N,N-dwumetylo-1,2-dwuaminoetan	wzór 34
50	N,N-dwuetylo-1,2-dwuaminoetan	wzór 35
	N,N-dwumetylo-1,3-dwuaminopropan	wzór 36
55	N,N-dwuetylo-1,3-dwuaminopropan	wzór 37
	Chlorek 3-aminopropilo-trójmetyloamoniowy	wzór 38
	Bromek 3-aminopropilo-trójmetyloamoniowy	wzór 39
60	N-(3-dwumetyloaminopropilo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 40
	N-(3-metyloaminopropilo)-1,2-dwuaminoetan	NH ₂ (CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₃ -NHCH ₃
65	N-(3-metyloaminopropilo)-1,4-dwuaminobutan	NH ₂ (CH ₂) ₄ -NH-(CH ₂) ₃ -NHCH ₃

N-(3-metyloaminopropylo)-1,6-dwuaminoheksan	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}-$ $-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$
N-(3-metyloaminopropylo)-1,8-dwuaminoheksan	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_8-\text{NH}-$ $-(\text{CH}_2)_3-\text{NHCH}_3$
N-butyl-N'-3-aminopropylo)-1,3-dwuaminopropan	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$ $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}_4\text{H}_9$
N-(2-dwumetyloaminoetylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 41
N-(4-dwumetyloaminobutylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 42
N-(6-dwumetyloaminoheksylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 43
N-(8-dwumetyloaminooktylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 44
N-(3-hydroksypropylo)-1,3-dwuaminopropan	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$ $-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$
N-(2-hydroksypropylo)-1,2-dwuaminoetan	wzór 45
N-(2-hydroksyetylo)-1,3-dwuaminopropan	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3(\text{NH}-$ $-(\text{CH}_2)_2-\text{OH})$
N-(3-metoksypropylo)-1,3-dwuaminopropan	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$ $-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}_3$
N-(3-oktyloksypropylo)-1,3-dwuaminopropan	$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$ $-(\text{CH}_2)_3\text{OC}_8\text{H}_{17}$
N-(3-amino-1-metylopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 46
N-(3-amino-1-etylopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 47
N,N-dwu-(3-aminopropylo)-metyloamina	wzór 48
N,N-dwu-(aminopropylo)-etyloamina	wzór 49
N,N-dwu-(3-dwuaminopropylo)-n-butylamina	wzór 50
bromek 3-aminopropylo-dwumetylosulfoniowy	wzór 51
chlorek 3-aminopropylo-dwumetylosulfoniowy	wzór 52
bromek 3-acetamidopropylo-dwumetylosulfoniowy	wzór 53
chlorek 3-karboksypropylo-dwumetylosulfoniowy	wzór 54
chlorek 3-karbonoilopropylo-dwumetylosulfoniowy	wzór 55
4-(aminobutylo)-guanidyna (agmatyna)	wzór 56
3-amidynopropyloamina	wzór 57
N-(3-aminopropylo)-pyrolidyna	wzór 58
N-(3-aminopropylo)-piperidyna	wzór 59
N-(2-aminoetylo)-piperazyna	wzór 60
N-(3-aminopropylo)-piperazyna	wzór 61
N-(3-aminopropylo)-morfolina	wzór 62
N-(3-aminopropylo)-N'-metylopiperazyna	wzór 63
N-(3-aminopropylo)-N'-etylopiperazyna	wzór 64
N,N'-dwu-(3-aminopropylo)-piperazyna	wzór 65
N-(3-pirolidynopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 66

N-(3-piperydynopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 67
N-(3-piperazynopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 68
5 N-(3-morfolinopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 69
N-benzyl-1,3-dwuaminopropan	wzór 70
10 N,N-dwubenzyl-1,3-dwuamino-propan	wzór 71
N-(1-feniloetylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 72
N-(p-metylobenzyl)-1,3-dwuaminopropan	wzór 73
15 m-ksylilenodwuamina	wzór 74
p-ksylilenodwuamina	wzór 75
N-cykloheksylo-1,3-dwuaminopropan	wzór 76
20 N-(2-feniloetylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 77
N-(2-p-toluiloetylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 78
N-benzyl-N-(3-aminopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 79
25 N-(1-feniloetylo)-N'-(3-aminopropylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 80
N-(2-furfurylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 81
30 N-(5-metylo-2-furfurylo)-1,3-dwuaminopropan	wzór 82
N,N-dwumetylo-1,3-dwuaminopropan	$\text{CH}_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CH}_3$
35 4-piperydyloametyloamina	wzór 83
2-(4-imidazoilo)-etyloamina (histamina)	wzór 84
N,N-dwumetylo-N-acetylo-1,3-dwuaminopropan	wzór 85
40 N,N-dwumetylo-N'-propionylo-1,3-dwuaminopropan	wzór 86
1-karboksy-4-dwumetyloaminobutyloamina	wzór 87
45 1-karbamoilo-4-dwumetyloaminobutyloamina	wzór 88
N,N-dwumetylo-N'-benzoilo-1,3-dwuaminopropan	wzór 89

Jeśli do hodowli, zawierającej szczep produkujący bleomycyny, na przykład *Streptomyces verticillus* ATCC 15003, doda się aminozwiązek na przykład bromku 3-aminopropylodwumetylosulfoniowego lub chlorku 3-amino-3-karboksypropylodwumetylosulfoniowego, to wzrasta wydajność bleomycyny A₂. Podobnie dodatek 1,4-dwuaminobutanu powoduje wzrost wydajności bleomycyny A₂, a dodatek chlorowodoru agmatyny powoduje wzrost wydajności bleomycyny B₂. Dodatek spermidyny wzmacnia wydajność bleomycyny A₅. Spermina powoduje powstawanie nie tylko bleomycyny A₄, posiadającej łańcuch boczny sperminy, lecz także bleomycyny A₅, posiadającej łańcuch boczny spermidyny. Spermidyna powstaje ze sperminy w procesie fermentacji.

W obecności szczepów, mających dużą zdolność do przekształcania sperminy w spermidynę, dodatek

sperminy powoduje powstawanie głównie bleomycyny A₅. Podobnie dodatek na przykład 1,2-dwuaminoetanu lub 1,3-dwuaminopropanu powoduje powstawanie nieopisanej 2-aminoetylobleomycyny lub 3-aminopropylbleomycyny. Dodatek N,N-dwu-(3-aminopropyl)-metyloaminy powoduje głównie powstawanie nieopisanej 3-(N-metylo-N-3-aminopropylamino)-propylaminobleomycyny posiadającej łańcuch boczny o tej samej budowie, jak wyjściowy związek aminowy. Ubocznie powstaje jeszcze jednak 3-N-metyloaminopropylaminobleomycyna z produktu rozpadu wyjściowego związku aminowego.

Mikroorganizmy powodują takie reakcje, jak: rozpad estrów, odalkilowanie i dekarboksylacja. Aminozwiązki dodawane w sposobie według wynalazku są przetwarzane w procesie fermentacji w związki, wprowadzające łańcuch boczny bleomycyn. Na przykład związki, w których grupa -NH₂ w produktach wyjściowych o ogólnym wzorze: 5, 6, 7, 8 i 9 została zacylowana, zalkilowana względnie, jeśli atom wodoru lub grupa metylenowa sąsiadująca z grupą NH₂ została podstawiona grupą karboksylową lub amidową, które łatwo można przekształcić w aminy, można użyć podobne związki aminowe o wzorach 5, 6, 7, 8 i 9.

Aminozwiązki, dodawane do hodowli, dozuje się na ogół w postaci soli kwasów nieorganicznych; stężenie zależy od rodzaju dodawanego składnika. Na przykład dla bromku 3-aminopropylodwumetylosulfoniowego, sperminy i spermidyny optymalne jest stężenie przynajmniej 0,2—9,4 mg/ml, natomiast dla chlorku 3-amino-3-karboksypropylodwumetylosulfoniowego optymalne jest znaczenie wyższe stężenie — przynajmniej 40 mg/ml. W przypadku N-(3-aminopropyl)-morfoliny i N-(3-morfolino-propyl)-1,3-dwuaminopropanu wystarcza stężenie 0,1—0,5 mg/ml, natomiast w przypadku N-(2-aminoetylo)-piperazy i N-(3-metoksypropyl)-1,3-dwuaminopropanu optymalne jest stężenie około 2 mg/ml. Na ogół stosuje się stężenie około 4 mg/ml.

Proces, sposobem według wynalazku, prowadzi się następująco:

Środowiskiem reakcji są na ogół węglowodany i organiczne związki azotu na przykład papka z prosa, skrobia, mączka sojowa, wyciąg z kukurydzy i tym podobne, do których dodaje się niewielkie ilości związków nieorganicznych, na przykład fosforanu potasu, siarczanu miedzi, siarczanu cynku, chlorku sodu, azotanów i tym podobnych. Do tej pożywki dodaje się szczep *Streptomyces verticillus* ATCC 15033 lub jego wariant ATCC 21678. Fermentację prowadzi się aerobowo w zwykle stosowanych warunkach. Następnie roztwór sący się, a przesącz poddaje się adsorpcji na kationowych wymieniaczach jonowych o grupie reaktywnej, na przykład karboksylowej i wymywa wodnym roztworem kwasu solnego. Następne procesy to adsorpcja na węglu aktywnym, wymywanie mieszaniną wodnego roztworu acetonu i kwasu solnego, adsorpcja na tlenku glinu, wymywanie metanolem, adsorpcja na „Sephadex” (nazwa handlowa organicznego adsorbentu), pochodnej dekstranu, wytwarzanego przez Pharmacia Fine Chemicals Inc. i wymywanie wodą destylowaną, po czym otrzymuje się chlorowoderek bleomycyny jako proszek. W celu oczyszczenia poddaje się chromatografii, używając jako nośnika „CM Sephadex” a jako roztworu do elucji wodnego roztworu chlorku amonu lub mrówczanu amonu. Następnie eluat adsorbuje się na węglu aktywnym przemywa dwukrotnie wodą i eluuje mieszaniną wodnego roztworu acetonu i kwasu solnego. W ten sposób otrzymuje się czystą bleomycynę.

Jeśli odpowiednia bleomycyna jest produkowana sposobem według wynalazku dostatecznie selektywnie, oczyszczanie na „CM Sephadex” jest niepotrzebne.

Bleomycyny tworzą chelaty ze związkami miedzi i są wyodrębniane z pożywki jako niebieskie proszki; miedź można usunąć zwykłymi, znanymi metodami.

Pewne własności bleomycyn otrzymanych sposobem według wynalazku podano w tablicy 1.

Tablica 1

Nr	Nazwa i własności fizyczne aminozwiązku	Zawartość nowego (głównego) składnika w surowej bleomycynie uzyskanej przez ekstrakcję w %	Nazwa i struktura łańcucha bocznego nowej (głównej) bleomycyny
1	2	3	4
1	Bromowoderek bromku 3-amino-propylodwumetylosulfoniowego temperatura topnienia 87—88°	72	Bleomycyna A ₂

1	2	3	4
2	Chlorek 3-amino- -3-karboksypro- pylodwumetylo- sulfoniowy temperatura topnienia 130—140° (rozkład)	87	Bleomycyna A ₂
3	Siarczan agmatyny temperatura topnienia 231°	76	Bleomycyna B ₂
4	1,2-dwuaminoetan temperatura topnienia 116—177°	80	2-aminoetyloamino- bleomycyna NH ₂ (CH ₂) ₂ -NH-
5	1,3-dwuaminopro- pan temperatura wrzenia 135—136°	85	3-aminopropyle- aminobleomycyna NH ₂ (CH ₂) ₂ -NH-
6	1,4-dwuaminobutan temperatura wrzenia 158—160°	85	Bleomycyna A' ₂
7	Spermidyna temperatura wrze- nia 115°/3 mm Hg	90	Bleomycyna A ₃
8	Spermina temperatura wrze- nia 150—160°/3 mm Hg	91	Bleomycyna A ₃
9	N,N-dwumetylo- -1,2-dwuaminoetan temperatura wrze- nia 105—108°	91	3-N,N-dwumetylo- aminoetyloamino- bleomycyna
10	N,N-dwuetylo- -1,2-dwuaminoetan temperatura wrze- nia 147—151°	84	3-N,N-dwuetylo- aminoetyloamino- bleomycyna
11	N,N-dwuetylo- -1,3-dwuamino- propan temperatura wrze- nia 166—172°	95	3-N,N-dwuetylo- aminopropyle- aminobleo- mycyna
12	N-butylo-N'-(3- -aminopropyle)- -1,3-dwuaminopro- pan temperatura wrzenia 125—126°/3 mm Hg	96	3-[-3-(N-butylo)- -aminopropyle]- aminopropyle- aminobleomycyna
13	N-(2-hydroksypro- pylo)-1,2-dwu- aminoetan temperatura wrze- nia 123—126°/12 mm Hg	95	2-(2-hydroksypro- pylo)-aminoetylo- aminobleomycyna

1	2	3	4
14	N-(3-aminopropylo)-piperazyna temperatura wrzenia 80—81°/2 mm Hg	80	3-piperazynopropyloaminobleomycyna
15	N-(1-fenylloetylo)-N-(3-aminopropylo)-1,3-dwuaminopropan temperatura wrzenia 150—153°	72	3-[3-(N-1-fenylloetylo)-aminopropylo]-aminopropyloaminobleomycyna
16	1,2-dwuaminopropan temperatura wrzenia 118—119°	90	2-aminopropyloamino-bleomycyna
17	N-metylo-1,3-dwuaminopropan temperatura wrzenia 138—142°	81	3-N-metyloaminopropyloaminobleomycyna $\text{CH}_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}-$
18	N-butylo-1,3-dwuaminopropan temperatura wrzenia 114—116°/20 mm Hg	85	3-N-butyloaminopropyloaminobleomycyna $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}-$
19	N,N-dwuetylo-1,3-dwuaminopropan temperatura wrzenia 132—135,5°	95	3-(N,N-dwumetylo)-aminopropyloaminobleomycyna
20	chlorek-3-aminopropylotrójmetyloamoniowy temperatura topnienia 200—204°	95	3-(N,N-trójmetylo)-aminopropyloaminobleomycyna
21	N-[3-(N,N-dwumetylo)-aminopropylo]-1,3-dwuaminopropan temperatura wrzenia 125°/23 mm Hg	85	3-[3-(N,N-dwumetylo)-aminopropylo]-aminopropyloaminobleomycyna
22	N,N-dwu(3-aminopropylo)-metyloamina temperatura wrzenia 97—100°/2 mm Hg	72	3-(N-metylo)-N-3-aminopropylo)-aminopropyloaminobleomycyna
23	N-(3-amino-1-metylopropylo)-1,3-dwuaminopropan temperatura wrzenia 123—125°/21 mm Hg	70	3-(-1-metylo-3-aminopropylo)-aminopropyloaminobleomycyna

1	2	3	4
24	N-3-aminopropylo- pirolidyna temperatura wrze- nia 185—189°	95	3-(pirolidyna)-pro- pyloaminobleomy- cyna
25	N-3-aminopropylo- piperydyna temperatura wrze- nia 100°/20 mm Hg	98	3-(piperydylo)-pro- pyloaminobleomy- cyna
26	N-3-aminopropylo- morfolina temperatura wrze- nia 219°/733 mm Hg	100	3-(morfolino)-pro- pyloaminobleomy- cyna
27	N-2-aminoetylopi- perazyna temperatura wrze- nia 280—281°	87	2-(piperazyno)- -etyloaminobleomy- cyna
28	N,N-dwu-3-amino- propylopiperazyna temperatura wrze- nia 188—202°/21 mm Hg	95	3-[-(4-(3-aminopro- pylo))-piperazyno]- propyloaminobleo- mycyna
29	N-[3-(pirolidyno)- propylo]-1,3-dwu- aminopropan temperatura wrze- nia 159—162°/22 mm Hg	76	3-[-3-(pirolidyno)- -propylo]-amino- propyloaminobleo- mycyna
30	N-[3-(piperydylo)- -propylo]-1,3-dwu- aminopropan temperatura wrze- nia 164—167°/21 mm Hg	89	3-[3-(piperydylo)- -propylo]-amino- propyloaminobleo- mycyna
31	N-[3-(morfolino)- -propylo]-1,3-dwu- aminopropan temperatura wrze- nia 176—180°/20 mm Hg	79	3-[3-(morfolino)- -propylo]-amino- propyloaminobleomy- cyna
32	N-(3-hydroksypro- pylo)-1,3-dwu- aminopropan (chlorowodorek) temperatura top- nienia 119—120°	85	3-(3-hydroksypro- pylo)-aminopro- pylobleomycyna NO-(CH ₂) ₃ -NH- (CH ₂) ₃ -NH-
33	N-(3-metyloksypro- pylo)-1,3-dwu- aminopropan (chlorowodorek) temperatura top- nienia 225°	88	3-(3-metoksypro- pylo)-aminopro- pyloaminobleomy- cyna CH ₃ O-(CH ₂) ₃ - -NH(CH ₂) ₃ -NH-

1	2	3	4
34	N-benzylo-1,3-dwu-aminopropan temperatura wrze- nia 150—155°/25 mm Hg	70	3-benzyloaminopro- pyloaminobleomy- cyna
35	N-(1-fenylloetylo)- -1,3-dwuamino- propan temperatura wrze- nia 148—150°/24 mm Hg	89	3-(1-fenylloetylo)- aminobleomycyna
36	m-ksyleno- dwuamina temperatura wrze- nia 138—139°/9 mm Hg	56	m-aminometylo- benzyloaminobleo- mycyna
37	p-ksylenodwuamina temperatura top- nienia 35°	68	p-aminometyloben- zyloaminobleomy- cyna
38	N-cykloheksylo- -1,3-dwuaminopro- pan temperatura wrze- nia 124—125°/21 mm Hg	89	3-cykloheksylo- aminopropylo- aminobleomycyna
39	N-(3-cykloheksylo- -aminopropylo)- -1,3-dwuaminopro- pan temperatura wrze- nia 180°/21 mm Hg	90	3-(3-cykloheksylo- aminopropylo)- -aminopropylo- aminobleomycyna
40	N-(2-furfurylo)- 1,3-dwuaminopro- pan temperatura wrze- nia 105—109°/3 mm Hg	42	3-[N-(2-furfurylo)]- -aminopropylo- -aminobleomycyna
41	4-piperydylometylo- amina temperatura wrze- nia 78°/5 mm Hg	73	4-piperydylome- tyloaminobleomy- cyna
42	2-(4-imidazoilo- etyloamina (chlorowodrek) temperatura top- nienia 247—250°	93	2-(4-imidazoilo)- etyloaminobleo- mycyna

Własności nowych (głównych) chlorowodorków bleomycyn

Tablica 1 (ciąg dalszy)

Nr	Analiza elementarna (%)				Moc (mcg/ mg)	Chromatografia (Rf)		Reakcje		Postać	Maksimum absorpcji w UV (mM)
	C	H	N	S		Cienko- warst- wowa	Bibu- lowa	N	S		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	44,13	6,14	15,51	6,43	941	0,39	0,85	—	—	niebieski proszek	293 243
2	44,13	6,14	15,51	6,43	941	0,39	0,85	—	—	niebieski proszek	293 243
3	43,92	6,31	17,41	3,34	3094	0,72	0,66	—	+	niebieski proszek	293 244
4	43,12	6,15	16,60	4,21	1700	0,62	0,80	+	—	niebieski proszek	293 244
5	43,15	6,20	16,51	4,18	1934	0,60	0,81	+	—	niebieski proszek	293 244
6	43,93	6,02	16,78	4,25	1232	0,66	0,81	+	—	niebieski proszek	293 244
7	43,81	6,34	16,39	4,05	2700	0,16	0,88	+	—	niebieski proszek	293 244
8	43,81	6,34	16,39	4,05	2700	0,16	0,88	+	—	niebieski proszek	293 244
9	43,20	6,25	16,48	4,13	897	0,46	0,86	—	—	niebieski proszek	294 244
10	45,01	6,35	16,14	3,91	1102	0,48	0,89	—	—	niebieski proszek	294 244
11	43,91	6,30	15,96	4,00	1036	0,40	0,87	—	—	niebieski proszek	294 244
12	43,00	6,62	16,40	3,78	5840	0,23	0,84	—	—	niebieski proszek	294 244
13	43,50	6,45	16,38	4,35	1020	0,65	0,84	—	—	niebieski proszek	294 244
14	44,91	6,21	16,50	3,91	726	0,30	0,84	—	—	niebieski proszek	294 244
15	45,51	6,42	16,45	3,20	2500	0,46	0,75	—	—	niebieski proszek	294 244
16	43,80	6,04	16,60	4,31	2173	0,66	0,81	+	—	niebieski proszek	294 244
17	43,97	6,24	16,42	4,18	860	0,51	0,83	—	—	niebieski proszek	294 244
18	43,30	6,31	16,20	4,32	1700	0,70	0,83	—	—	niebieski proszek	294 244
19	44,16	6,35	16,30	4,09	869	0,28	0,83	—	—	niebieski proszek	294 244
20	44,71	6,41	16,21	4,00	633	0,38	0,89	—	—	niebieski proszek	294 244
21	43,80	6,35	16,91	4,05	1200	0,14	0,83	—	—	niebieski proszek	294 244
22	43,20	6,20	17,00	4,09	1671	0,23	0,33	+	—	niebieski proszek	294 244

Tablica 1 (ciąg dalszy)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
23	43,42	6,25	16,80	4,11	1820	0,32	0,84	+	—	niebieski proszek	294 244
24	44,90	6,22	16,20	4,12	1066	0,36	0,88	—	—	niebieski proszek	294 244
25	44,71	6,38	16,17	4,21	1257	0,14	0,86	—	—	niebieski proszek	294 244
26	44,36	6,25	16,15	4,03	592	0,63	0,83	—	—	niebieski proszek	294 244
27	44,38	6,30	16,78	3,95	799	0,36	0,85	—	—	niebieski proszek	294 244
28	44,01	6,14	17,52	3,90	1130	0,25	0,86	+	—	niebieski proszek	294 244
29	44,20	6,41	16,80	3,98	2564	0,1	0,88	—	—	niebieski proszek	294 244
30	44,30	6,51	16,62	4,00	3580	0,14	0,88	—	—	niebieski proszek	294 244
31	44,52	6,30	16,20	3,89	1201	0,38	0,87	—	—	niebieski proszek	294 244
32	43,76	6,40	16,38	4,22	1300	0,63	0,86	—	—	niebieski proszek	294 244
33	43,91	6,35	16,21	4,10	1335	0,54	0,87	—	—	niebieski proszek	294 244
34	45,40	6,41	15,30	4,00	1986	0,53	0,70	—	—	niebieski proszek	294 244
35	45,39	6,42	15,13	4,13	2400	0,62	0,85	—	—	niebieski proszek	294 244
36	44,89	6,28	15,98	4,19	2546	0,61	0,66	—	—	niebieski proszek	294 244
37	44,80	6,30	15,70	4,18	2350	0,58	0,64	—	—	niebieski proszek	294 244
38	44,91	6,60	15,27	4,03	5335	0,57	0,79	—	—	niebieski proszek	294 244
39	44,02	6,63	16,48	4,02	11215	0,24	0,80	—	—	niebieski proszek	294 244
40	46,39	6,37	16,48	4,35	1450	0,67	0,83	—	—	niebieski proszek	294 244
41	44,60	6,43	16,20	4,25	1394	0,41	0,72	—	—	niebieski proszek	294 244
42	43,85	6,25	16,80	4,28	847	0,40	0,70	—	—	niebieski proszek	294 244

Widma w podczerwieni i w nadfiolecie pewnych związków z tablicy 1 uwidoczniono w załączonych wykresach przedstawionych na fig. 1—6.

Wykres	Widmo	Nazwa związku	Nr związku z tablicy 1
fig. 1	IR	3-[3-(N-butylo)-amino-propylo]-aminopropylaminobleomycyna	12
fig. 2	UV	3-[3-(N-butylo)-amino-propylo]-aminopropylaminobleomycyna	12
fig. 3	IR	3-(1-metylo-3-amino-propylo)-aminopropylaminobleomycyna	23
fig. 4	UV	3-(1-metylo-3-amino-propylo)-aminopropylaminobleomycyna	23
fig. 5	IR	3-(3-cykloheksyloaminopropylo)-aminopropylaminobleomycyna	39
fig. 6	UV	3-(3-cykloheksyloaminopropylo)-aminopropylaminobleomycyna	39

Uwagi do tablicy 1:

Zawartość nowej, czyli głównej bleomycyny oznaczono w następujący sposób: bleomycynę (mieszaninę składników) otrzymaną z hodowli rozdzielono na „CM Sephadex” i mierzono absorpcję w nadfiolecie.

Moc oznaczono stosując test biologiczny, używając chlorowodoru bleomycyny A₂ (wolnej od miedzi) jako substancji porównawczej i *M. tuberculosis* 607 jako mikroorganizmu porównawczego.

Chromatografia cienkowarstwowa:

adsorbent — żel krzemionkowy

rozpuszczalnik — mieszanina metanolu, 10% octanu i 10% wodnego roztworu amoniaku w stosunku 10 : 9 : 1.

Chromatografia bibułowa:

rozpuszczalnik — 10% wodny roztwór chlorku amonu

N = reakcja ninhydrynowa

S = reakcja Sakaguchi.

Jak wynika z tablicy 1 nowe bleomycyny, otrzymane sposobem według wynalazku, są zbliżone do znanych bleomycyn wyglądem i absorpcją w nadfiolecie, lecz na ogół różnią się mocą i wartością R_f. Jeżeli otrzymane bleomycyny hydrolizuje się silnym kwasem i hydrolizaty podda się chromatografii gazowej, to można wykryć aminozwiązki dodawane do hodowli, lub powstałe z nich w procesie fermentacji. W ten sposób potwierdzono budowę

łańcucha bocznego odpowiadającego budowie dodanych aminozwiązków lub związków z nich powstających.

Stosując sposób według wynalazku można wydzielić w stanie czystym, z dużymi wydajnościami bleomycyny przydatne do indywidualnych celów terapeutycznych. Można na przykład otrzymać bleomycyny A₂ i A₃ odznaczające się silnymi właściwościami antytumorowymi i o małej toksyczności. Można otrzymać nieznana 3-aminopropylaminobleomycynę o doskonałym działaniu i znikomej toksyczności.

Poniższe przykłady ilustrują sposób według wynalazku.

Przykład I. Do pożywki stanowiącej mieszaninę 6,4% papki z prosa, 0,5% glukozy, 3,5% mączki sojowej, 0,75% wyciągu z kukurydzy, 0,3% chlorku sodu, 0,1% drugorzędowego fosforanu potasu, 0,05% siarczanu cynku, 0,2% azotanu sodu, 0,1% siarczanu miedziowego i 0,01% o nazwie handlowej „Toho” środka powierzchniowo czynnego, czyli eteru polioksyetyleno-polioksypropylenowego dodano bromku 3-aminopropylodwumetylosulfonowego w ilości 0,4 mg/ml tak, aby wartość pH pożywki wynosiła 6,5.

Każde 100 ml pożywki umieszczono oddzielnie w kolbie Sakaguchi i sterylizowano. Zaszczepiono szczepem *Streptomyces verticillus* ATTC 15003 i poddano fermentacji w temperaturze 27°C w ciągu 8 dni mieszając z szybkością 130 obrotów/minutę. Po upływie tego czasu hodowlę (łącznie 4,5 l) przesączono otrzymując 3,0 l przesączu (moc 138,8 mg/ml, moc całkowita 416,4 mg). Otrzymany przesącz adsorbowano w kolumnie wypełnionej 200 ml Amberlitu IRC-50 (nazwa handlowa wymiennicza jonowego: typ N), przemyto wodą i eluowano 0,5 n kwasem solnym. 1 l eluatu zobojętniono, adsorbowano w kolumnie wypełnionej 100 ml węgla aktywnego, przemyto wodą i eluowano mieszaniną acetonu i 0,02 kwasu solnego. Frakcje czynne wobec *Mycobacterium* 607 połączono i odparowano do sucha.

Pozostałość rozpuszczono w 5 ml 80% wodnego metanolu, wprowadzono do kolumny zawierającej 30 ml obojętnego tlenku glinu i eluowano 80% wodnym roztworem metanolu. Frakcje zawierające bleomycynę odparowano do sucha, otrzymując 195 mg chlorowodoru bleomycyny (moc 650,7 mcg/mg, moc całkowita 127 mg). Wydajność (z przesączu) wynosiła 30,5%. Tak otrzymany produkt rozdzielono na poszczególne bleomycyny w kolumnie z CM Sephadexem wymywając wodnym roztworem mrówczynu amonu i stwierdzono, że zawiera on 72,2% bleomycyny A₂. Tę metodę rozdzielania oznacza się w dalszym ciągu opisu jako metodę CM Sephadex.

W analogiczny sposób postępowano stosując inne aminozwiązki, wymienione w tablicy 2. Opisano tam także stosowane warunki i uzyskane wyniki.

Tablica 2

Nazwa aminozwiązku	Stężenie (mg/ml)	Czas hodowli (godz.)	Ilość przesączu w 1	Moc (mg/ml)	Moc ogólna (mg)	Nazwa bleomycyny wydzielonej CM Sephadexem	Ilość (mg)	Moc (mcg/mg)	Moc całkowita (mg)	Wydajność z przesączu (%)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
bromowodorek bromku 3-aminopropylodwumetylosulfonowego	0,4	192	3,0	138,8	416,4	Bleomycyna (zawartość A ₂ 72,2%)	195	650,7	127,0	30,5
Chlorek 3-amino-3-karboksypropylodwumetylosulfoniowy	40,0	192	1,65	100,0	165,0	Bleomycyna (zawartość A ₂ 87,2%)	140	300,0	42,0	25,5
chlorowodorek agmatyny	2,0	240	2,0	200,0	400,0	Bleomycyna (zawartość B ₂ 76,2%)	164	800,0	131,2	32,8
speramina	0,2	264	1,1	150,0	150,0	Bleomycyna (zawartość A ₅ 90,8%)	62	1200,0	74,4	45,1

Przykład II. Do pożywki stanowiącej mieszaninę 6,4% papki z prosa, 0,5% glukozy, 3,5% mączki sojowej, 0,7% wyciągu z kukurydzy, 0,3% chlorku sodu, 0,1% drugorzędowego fosforanu potasu, 0,05% siarczanu cynku, 0,01% siarczanu miedziowego, 0,2% azotanu sodu i 0,01% „Toho” czyli eteru polioksyetylenopolioksypropylenowego dodano 1,2-dwuaminopropanu w ilości 2 mg/ml, tak by wartość pH pożywki wynosiła 6,5. Każde 100 ml pożywki umieszczono w kolbie Sakaguchi i sterylizowano. Zaszczepiono szczepem *Streptomyces verticillus* ATTC 15003 i poddane fermentacji w temperaturze 27°C w ciągu 192 godzin, mieszając z szybkością 130 obr/min. Po upływie tego czasu hodowlę (łącznie 4,5 l) przesączono uzyskując 3,5 l przesączu (moc 190 mcg/ml, moc całkowita 676,4 mg).

Otrzymany przesącz adsorbowano na kolumnie wypełnionej 200 ml Amberlitu IRC-50, przemyto wodą i eluowano mieszaniną acetonu i 0,02 n kwasu solnego (1:1). Frakcje czynne wobec *Mycobacterium* 607 zebrano i odparowano do sucha. Pozostałość rozpuszczono w 4 ml 80% metanolu i wprowadzono do kolumny wypełnionej 70 ml obojętnego tlenku glinu. Eluowano 80% wodnym roztworem metanolu. Frakcje zawierające bleomycynę zebrano, odparowano do sucha, pozostałość rozpuszczono w 2 ml wody, wprowadzono do kolumny wypełnionej 20 ml Sephadexu G-25 i eluowano wodą destylowaną.

Otrzymane niebiesko-zielone frakcje zawierające bleomycynę odparowano do sucha, pozostałość zawieszono w 0,02 n roztworze chlorku amonu, wprowadzono do kolumny wypełnionej 20 ml CH-Sephadexu i eluowano 0,1 m roztworem chlorku amonu.

Frakcje, zawierające oczekiwane substancje wprowadzono do kolumny, zawierającej 5 ml węgla aktywnego, i eluowano mieszaniną acetonu i 0,02 n kwasu solnego (1:1). Eluat odparowano do sucha otrzymując 35 mg 2-aminopropylodwuaminobleomycyny (moc 2,173 mcg/mg, moc całkowita 76,1 mg). Wydajność z przesączu wynosiła 11,25%.

25 mg tak otrzymanej substancji rozpuszczono w 1 ml metanolu i w ciągu 10 minut wprowadzono do roztworu gazowy siarkowodór. Roztwór przesączono i odparowano do sucha otrzymując 20 mg chlorowodorku 2-aminopropylodwuaminobleomycyny nie zawierającego miedzi (moc 2,000 mcg/mg, moc całkowita 40 mg). Ten produkt hydrolizowano 6 n kwasem solnym, otrzymany roztwór poddano elektroforezie na bibule pod napięciem 3000 V, przy wartości pH = 1,9 i stwierdzono obecność 1,2-dwuaminopropanu.

W analogiczny sposób postępowano stosując inne aminozwiązki, wymienione w tablicy 3. Opisano tam także stosowane warunki i uzyskane wyniki.

Nazwa aminozwiązku	Stę- żenie (mg/ ml)	Czas hodowli (godz.)	Ilość prze- sączu w l.	Moc (mcg/ml)	Moc ogólna (mg)	Nazwa bleomycyny wydzielonej CM Sephadexem	Ilość (mg)	Moc (mcg/mg)	Moc całko- wita (mg)	Wydaj- ność z prze- sączu (%)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1,2-dwuami- noetan	4,0	192	3,0	150,0	450,0	2-aminoety- loamino- bleomycyna	28,7	1700	488,0	10,8
N,N-dwumety- tylo-1,2-dwu- aminoetan	3,0	240	2,98	154,0	458,9	2-N,N-dwu- metyloamino- bleomycyna	140,0	897	125,6	27,4
N,N-dwuety- tylo-1,2-dwu- aminoetan	2,0	240	2,98	154,0	458,9	2-N,N-dwu- etyloamino- etyloamino- bleomycyna	140,0	1102	154,3	33,6
N,N-dwuety- tylo-1,3-dwu- aminopropan	2,0	240	2,84	181,3	514,9	3-N,N-dwu- etyloamino- propyloami- nobleomy- cyna	230,0	1036	238,3	46,3
N-butyl-N'- (3-aminopro- pylo)-1,3- -dwuamino- -propan	2,0	240	3,12	113,4	353,8	3-[3-(N-bu- tylo)-amino- propylo]- -aminobleo- mycyna	150,0	5840	876,0	24,8
N-(2-hydrok- sypropylo)- -1,2-dwuami- noetan	0,6	240	3,0	140,0	420,0	2-(2-hydrok- sypropylo)- -aminoetylo- aminobleo- mycyna	88,0	1020	898,0	21,4
N-(3-amino- propylo)- -piperazyna	0,6	240	2,98	123,1	366,8	3-piperazy- nopropylo- aminobleo- mycyna	103,0	726	74,8	20,4
N-(1-fenyl- etylo)-N'- -aminopro- pylo)-1,3- -dwuamino- propan	3,0	240	3,05	1020,0	3111,0	3-[3-(N-1- fenyloetylo)- -aminopro- pylo]-amino- propylo- amino- bleomycyna	240,0	2500	600,0	19,3
N-(2-furfury- lo)-1,3- dwuamino- propan	3,0	240	3,00	380,0	1140	3-[N-(2-fur- furylo)]- -aminopro- pyloamino- bleomycyna	86	1450	124,7	10,9
4-piperydylo- metyloamina	2,0	240	3,08	170,9	526,4	4-piperydylo- metyloamino- bleomycyna	130	1394	181,2	34,4
chlorowodo- rek 2-(4-im- dazoilo)- -etyloaminy	1,0	240	2,88	189,6	493,0	2-(4-imidazo- ilo)-etylo- aminobleo- mycyna	74	847	62,7	12,7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N-metylo- -1,3-dwu- aminopropan	1,5	264	3,10	129,8	402,4	3-N-metylo- aminopropy- loamino- bleomycyna	119,0	860	102,3	25,4
N-butylo- -1,3-dwu- aminopropan	4,0	264	3,40	525,0	1785,0	3-N-butylo- aminopropy- loamino- bleomycyna	214,7	1700	365,0	20,4
N,N-dwumetylo-1,3-dwu- aminopropan	2,0	240	3,04	164,8	470,6	3-(N,N-dwu- metylo)- -aminopropy- -loamino- bleomycyna	127,0	869	110,4	23,5
chlorek 3-aminopro- pylotrójme- tyloaminowy	1,0	288	3,20	118,0	377,6	3-(N,N,N- trójmetylo)- -aminopro- pyloamino- bleomycyna	124,0	633	78,5	20,8
N-[3-(N,N- dwumetylo)- -aminopro- pylo]-1,3- -dwuamino- propan	1,0	264	3,34	253,9	848,0	3-[3-(N,N- dwumetylo)- -aminopro- pylo-amino- propylo]- aminobleomycyna	162,5	1280	195,0	23,0
N,N-dwu- -(3-amino- propylo)-me- tyloamina	0,5	264	3,54	133,7	473,3	3-(N-metylo- -N-3-amino- propylo)- -aminopro- pyloamino- bleomycyna 3-N-metylo- propyloami- nobleomycyna	32,0	1671	53,5	11,4
N-(3-amino- -1-metylo- propylo)-1,3- -dwuamino- propan	0,1	264	3,20	331,0	1059,2	3-(1-metylo- -3-aminopro- pylo)-amino- propyloami- nobleomycyna	112,6	1820	205,0	19,4
N-3-amino- propylopiro- lidyna	0,1	288	3,30	281,0	927,3	3-(propyli- dyno)-pro- pyloamino- bleomycyna	355,0	1066	378,4	40,8
N-3-amino- propylopipe- rydyna	0,1	288	3,00	317,0	931,0	3-(pipery- dylo)-pro- pyloamino- bleomycyna	320,0	1257	402,20	42,3
N-3-amino- propylomor- folina	0,1	240	2,94	145,8	428,7	3-(morfoli- no)-propylo- aminobleomycyna	175,0	5922	103,6	24,2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N-2-amino-etylopipera- zyna	2,0	288	3,12	111,0	346,0	2-(piperazy- no)-etylo- aminobleo- mycyna	75,0	799	59,9	17,3
N,N-dwu- -3-aminopro- pylopipera- zyna	0,5	240	3,69	225,0	860,3	3-[-4-(3- -aminopro- pylo)]-pipe- razyno]-pro- pyloamino- bleomycyna	210,6	1180	248,5	29,9
N-(3-piroli- dynopropyl)- -1,3-dwu- aminopropan	1,0	3,08	465,6	1434,0	1434,0	3-[-3-(piro- lidyno)-pro- pylo]-amino- propylo- amino-bleo- mycyna	105,0	2564	269,2	18,8
N-(3-pipery- dynopropyl)- -1,3- -dwuamino- propan	0,5	264	3,10	543,5	1684,9	3-[-3(pipe- rydylo)-pro- pylo]-amino- propylo- aminobleo- mycyna	140,0	3580	501,2	29,7
N-(3-morfo- linopropyl)- -1,3-dwu- aminopropan	0,5	264	2,94	139,0	408,7	3-[-3-(morfo- lino)-propylo]- aminopro- paloamino- bleomycyna	70,0	1201	84,1	20,6
N-(3-hydro- ksypropyl)- -1,3-dwu- aminopro- pan (chloro- woderek)	0,7	264	3,02	227,4	186,7	3-(3-hydro- ksypropyl)- -aminopro- pyloamino- bleomycyna	168,1	1300	215,9	31,4
N-(3-meto- ksypropyl)- -1,3-dwu- aminopropan (chlorowo- derek)	1,35	288	3,10	282,5	875,8	3-(3-metoksy- propyl)- -aminopro- pyloamino- bleomycyna	336,0	1335	448,6	51,2
N-benzyl- -1,3-dwu- aminopro- pan	0,5	264	3,00	334,0	182,0	3-benzyl- aminopro- pyloamino- bleomycyna	40,0	1986	79,4	7,9
N-(1-fenyl- etylo-1,3- -dwuamino- propan	0,5	288	3,39	606,0	2054,3	3-(1-fenyl- etylo)-ami- nopropyl- aminobleo- mycyna	96,3	2400	231	11,2
m-ksyleno- dwuamino	2,0	288	2,77	292,4	809,9	m-amino- metyloben- zyloamino- bleomycyna	10,8	2546	27,5	3,4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
p-ksyleno- dwuamino	2,0	264	3,05	320,4	977,2	p-aminome- tylobenzyl- aminoble- omycyna	33,3	2670	89,0	9,1
N-cyklohek- sylo-1,3- dwuamino- propan	0,5	264	3,38	1354,0	4576,5	3-cyklohek- syloamino- propyloami- nobleomy- cyna	330,0	5355	1767,2	38,6
N-(3-cyklo- heksyloami- nopropylo)- -1,3-dwuami- nopropen	0,5	264	3,10	1600,0	4960,0	3-(3-cyklo- heksyloami- nopropylo)- propyloami- nobleomy- cyna	178,0	11215	1996,3	40,3

Przykład III. Do pożywki stanowiącej miesza-
ninę 6,4% papki prosa, 0,5% glukozy, 3,5% mączki
sojowej, 0,75% wyciągu z kukurydzy, 0,3% chlorku
sodu, 0,1% drugorzędowego fosforanu potasu, 0,05%
siarczynu cynku, 0,01% siarczynu miedziowego, 0,2%
azotanu sodu, 0,01% krzemionki i 0,01% „Toho”,
czyli eteru poliksyetylenopolioksypropylenowego do-
dano 1,3-dwuaminopropanu w ilości 2 mg/ml tak,
by wartość pH pożywki wynosiła 6,5. 12 l tak przy-
gotowanej pożywki umieszczono w szklanym tanku
fermentacyjnym o pojemności 20 l i sterylizowano.
Zaszczepiono 800 ml pożywki o tym samym skła-
dzie, w której znajdował się szczep *Streptomyces*
verticillius ATTC 15003.

Dodawanie pożywki trwało 48 godzin przy wstrzą-
saniu. Fermentację w temperaturze 27°C prowadzi-
no w ciągu 120 godzin, mieszając z szybkością
350—370 obrotów/minutę i wprowadzając do po-
żywki powietrze w ilości równej objętości pożywki,
na minutę. Po upływie tego czasu hodowlę (łącznie
7,7 l) przesączono i przesącz (5,6 l, moc 148,5
mcg/ml), moc całkowita 831,6 mg ekstrahowano
i oczyszczano jak podano w przykładzie I, otrzy-
mując 230 mg chlorowodoru bleomycyny (moc
734,8 mcg/mg, moc całkowita 169 mg). Wydajność
przesącza wynosiła 20,3%. Chlorowodorek analizo-
wano metodą CM Sephadex i ustalono, że zawiera
84,5% 3-aminopropyloaminobleomycyny. 200 mg
chlorowodoru rozpuszczono w 10 ml wody desty-
lowanej i roztwór wprowadzono do 50 ml kolumny
zawierającej CM Sephadex zawieszony w 0,02 n
roztworze mrówczanu amonu i eluowano 0,1 n
wodnym roztworem mrówczanu amonu otrzymując
frakcję zawierającą 3-aminopropyloaminobleomy-
cynę. Wprowadzono ją do kolumny zawierającej
10 ml węgla aktywnego, przemyto wodą i eluowano
mieszaniną acetonu i 0,02 n kwasu solnego (1:1).

Aktywną frakcję eluatu odparowano do sucha,
otrzymując 50 mg chlorowodoru 3-aminopropylo-

aminobleomycyny (moc 1,934 mcg/mg, moc całko-
wita 96,7 mg). Wydajność surowego chlorowodoru
wynosiła 65,8%.

Substancję hydrolizowano 6 n kwasem solnym.
Wprowadzono do 10% roztworu wodorotlenku sodu
i poddano chromatografii gazowej w kolumnie wy-
pełnionej „Fluoropac 80” (nazwa handlowa spolime-
ryzowanego fluorku etylenu wytwarzanego przez
Fluoro-Carbon Co.) pokrytego „Silicone SF 96”
(nazwa handlowa polimeru tlenku krzemooorganicz-
nego wytwarzanego przez General Electric CO.)
i zidentyfikowano maksimum 1,3-dwuaminopro-
panu.

30 mg oczyszczonego chlorowodoru 3-aminopro-
pyloaminobleomycyny (moc 1,934 mcg/mg, moc
całkowita 58,02 mg) rozpuszczono w 5 ml metanolu
i do roztworu wprowadzono w ciągu 30 minut ga-
zowy siarkowódór. Utworzony osad siarczynu mie-
dziowego odsączono i przemyto metanolem. Przesącz
i metanol z przemycia połączono i odparowano do
sucha otrzymując 25 mg chlorowodoru 3-amino-
propyloaminobleomycyny nie zawierającej miedzi
(moc 1,850 mcg/mg, moc całkowita 46,35 mg). Wy-
dajność w stosunku do produktu zawierającego
miedź wynosiła 79,7%.

20 mg tak oczyszczonego produktu (moc 1850
mcg/mg, moc całkowita 37 mg) rozpuszczono w 2 ml
wody destylowanej i wprowadzono do kolumny za-
wierającej 5 ml anionowego wymiennicza jonowe-
go „Amberlite IRA 400” (nazwa handlowa) i eluo-
wano wodą destylowaną. Eluat odparowano do
sucha otrzymując 15,5 mg siarczynu 3-aminopro-
pyloaminobleomycyny, pozbawionej miedzi (moc
1,850 mcg/mg, moc całkowita 28,68 mg). Wydajność
77,5%.

W ten sposób przeprowadzono eksperymenty
w szklanym tanku fermentacyjnym, stosując amino-
związki wymienione w tablicy 4. Opisano tam także
stosowane warunki i zestawiono wyniki.

Tablica 4

Nazwa amino- związku	Stę- żenie (mg/ ml)	Czas hodowli (godz.)	Ilość prze- sączu w l.	Moc (mcg/ml)	Moc ogólna (mg)	Nazwa bleomy- cyny wydzie- lonej CM Sep- hadexem	Ilość (mg)	Moc (mcg/mg)	Moc całko- wita (mg)	Wydaj- ność z prze- sączu (%)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1,4-dwuami- nobutan	2,0	120	4,9	140,0	686,0	Bleomycyny A ₂	71,8	1232	88,5	12,9
Spermidyna	0,4	163	5,0	122,2	611,0	Bleomycyna A ₅	44,7	2543	113,7	18,6

Przykład IV. Pożywkę zawierającą 4,0% mączki sojowej, 1,0% ekstraktu drożdżowego, 0,3 chlorku sodu, 100% oleju sojowego, 0,0007% uwodnionego siarczynu miedziowego, 0,0001% uwodnionego siarczynu żelazowego, 0,0008% uwodnionego siarczynu manganowego i 0,0002% uwodnionego siarczynu cynku doprowadzono do wartości pH = 7,0. Każde 120 ml pożywki umieszczono w kolbie Sakaguchi o pojemności 500 ml i sterylizo-

wano. Pożywkę zaszczepiono szczepem MA 267-A₁ wyodrębnionym w 1965 r. ze ścieków Musashinocho, Saitama-Ken, Japonia, zidentyfikowanego jako wariant *Streptomyces verticillus* ATCC 21678, produkującym specyficznie bleomycynę A₅.

Dodano fosforan spermidyny, wysterylizowany za pomocą Millipore (nazwa handlowa) w ilości 0,5 mg/ml i poddano fermentacji w temperaturze 27°C w ciągu 7 dni, przy mieszaniu z szybkością 130 obrotów/minutę. Po upływie tego czasu hodowlę (5,2 l) przesączono i przesącz (4,5 l, moc 196 mcg/ml, moc całkowita 253 mg) ekstrahowano i oczyszczano jak w przykładzie I, otrzymując 137 mg surowego, sproszkowanego chlorowodoru bleomycyny A₅ (moc 1,846 mcg/ml, moc całkowita 253 mg). Wydajność 28,8%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania antybiotyków z grupy bleomycyn oparty na szczepieniu i aerobowej hodowli *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 lub jego wariantu ATCC 21678 w pożywce hodowlanej, **znamienny tym**, że hodowlę prowadzi się w obecności aminozwiązku, posiadającego przynajmniej jedną grupę $-C-CH_2-NH_2$ i przynajmniej jedną zasadową grupę taką, jak grupa aminowa, iminowa, guanidynowa, amidynowa, sulfoniowa oraz związków cyklicznych, zawierających azot lub związków,

który w procesie fermentacji może być przekształcony w aminozwiązek zdefiniowany powyżej, a następnie znane lub nowe bleomycyny wyodrębnia się z pożywki znanymi metodami.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminozwiązki stosuje się aminozwiązki o wzorach 5—9, w których X oznacza grupy o wzorach 10—14, R¹ i R² oznaczają atom wodoru, grupę alkilową lub grupę o wzorach 15—20, R³, R⁴ i R⁵ oznaczają grupę alkilową, grupa o wzorze 21 oznacza grupy o wzorach 22—26, grupa o wzorze 27 oznacza grupy o wzorach 28—30, w których to wzorach 10—30 n, n², n³, n⁴, n^{4'}, n^{4''}, n^{4'''} oznaczają liczbę całkowitą w granicach 1—8, n¹ oznacza liczbę całkowitą w granicach 0—8, R⁶, R^{6'}, R^{6''}, R⁷, R^{7'}, R⁸, R^{8'}, R^{8''}, R^{8'''}, R⁹, R^{9'}, R¹⁰, R^{10'}, R^{10''} oznaczają atom wodoru lub grupę alkilową, a linia kreskowana we wzorze, na przykład 31 oznacza, że każdy atom wodoru przy atomie węgla w łańcuchu może być zastąpiony grupą alkilową.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako związek o wzorze 5 stosuje się 1,2-dwuaminoetan, 1,2-dwuaminopropan, 1,3-dwuaminopropan, 1,4-dwuaminobutan, agmatynę, spermidynę, sperminę, 1,2-dwuaminopropan, N-metylo-1,3-dwuaminopropan, N-butylo-1,3-dwuaminopropan, N,N-dwumetylo-1,2-dwuaminoetan, N,N-dwumetylo-1,2-dwuaminoetan, N,N-dwumetylo-1,3-dwuaminopropan, N,N-dwumetylo-1,3-dwuaminopropan, N-[3-(N,N-dwumetylo-3-aminopropyl)-1,3-dwuaminopropan, N,N-dwu-(3-aminopropyl)-metyloaminę, N-(3-aminopropyl)-1,3-dwuaminopropan, N-(2-hydroksypropyl)-1,2-dwuaminoetan, N-(3-hydroksypropyl)-1,3-dwuaminopropan, N-(3-metoksypyl)-1,3-dwuaminopropan, N-benzylo-1,3-dwuaminopropan, N-(1-feniloetylo)-1,3-dwuaminopropan, N-(1-feniloetylo)-N'-(3-aminopropyl)-1,3-dwuaminopropan, N-cykloheksylo-1,3-dwuaminopropan, N-cykloheksyloaminopropyl)-1,3-dwuaminopropan, N-butylo-N'-3-aminopropyl-1,3-dwuaminopropan, m-ksylenodwuaminę lub p-ksylenodwuaminę.

4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako związek o wzorze 6 stosuje się chlorek 3-aminopropylotrójmetyloamoniowy lub bromek 3-aminopropylotrójmetyloamoniowy.

5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako związek o wzorze 7 stosuje się bromek 3-aminopropylodwumetylosulfoniowy, bromek 3-acetaminopropylodwumetylosulfoniowy, chlorek 3-

-amino-3-karboksypropylodwumetylosulfoniowy lub chlorek 3-amino-3-karbamiloopropylodwumetylosulfoniowy.

6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako związek o wzorze 8 stosuje się N-3-aminopropylpiperolidynę, N-3-aminopropylpiperidynę, N-3-aminopropylmorfolinę, N-2-aminoetylopiperazynę, N-3-aminopropylpiperazynę, N,N-dwuaminopropylpiperazynę, N-(3-pirolidynopropyl)-1,3-dwuaminopropan, N-(3-piperidynopropyl)-1,3-dwuaminopropan, N-3-morfolinopropyl)-1,3-dwuaminopropan.

7. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako związek o wzorze 9 stosuje się (N-(2-furfurylo)-1,3-dwuaminopropan, 4-piperidylometyloaminę lub 2-(4-imidazolilo)-etyloaminę.

8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminozwiązek stosuje się aminozwiązek o wzorze ogólnym 90, w którym A oznacza grupę o wzorze 91, w którym R^1 i R^2 oznaczają grupy alkilowe, grupę $-NH_2$, grupę o wzorze 92, grupę $-NH-(CH_2)_{n_1}-NH_2$, gdzie n_1 oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—6, grupę $-NH-(CH_2)_{n_1}-NH-(CH_2)_{n_2}-NH_2$, gdzie n_1 ma wyżej podane znaczenie a n_2 oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—5, Y oznacza atom wodoru, grupę $-COOH$, grupę $-CONH_2$, Z oznacza atom wodoru, grupę $-COR^3$, gdzie R^3 oznacza grupę alkilową, zaś n oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—5, a następnie bleomycynę wyodrębnia się z pożywki znamiennymi metodami.

9. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminozwiązek stosuje się aminozwiązek o wzorze ogólnym 93, w którym B oznacza grupę o wzorze 94—101, grupę o wzorze 21, w których to wzorach R^1 oznacza atom wodoru, z wyjątkiem przypadku, gdy Y oznacza atom wodoru, grupę $-COOH$ lub grupę $-CONH_2$, lecz nie jest wykluczone, gdy Y^1 oznacza grupę alkilową, grupę alkilową, grupę o wzorze 102 i 103, w których R^6 oznacza atom wodoru lub grupę alkilową, Y^2 oznacza atom wodoru lub niższą grupę alkilową, n^2 oznacza liczbę całkowitą zawartą, w granicach 1—8, lub grupę cykloheksylową, R^2 , R^3 i R^4 oznaczają grupę alkilową, grupę o wzorze 104 i 105, w których R^6 , Y^2 i n^2 mają wyżej podane znaczenie, lub grupę cykloheksylową, R^5 i Y^1 oznaczają atom wodoru lub niższą grupę alkilową, n_1 oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—8, zaś grupa o wzorze 21 oznacza grupy o wzorach 22, 23, 24, 26, 106, w których R^6 i Y^2 mają wyżej podane znaczenie, Y oznacza atom wodoru, niższą grupę alkilową, grupę $-COOH$ lub $-CONH_2$, Z oznacza atom wodoru lub grupę acylową, a n oznacza liczbę całkowitą zawartą w granicach 1—8, przy czym Y, Y^1 i Y^2 mogą być podstawione w każdym miejscu prostego łańcucha węglowego z wyjątkiem przypadku, gdy oznaczają atom wodoru, a dwupodstawiony pierścień benzenowy może być każdym z o-, n- i p-izomerów, a następnie bleomycynę wyodrębnia się z pożywki znamiennymi metodami.

FIG. 1

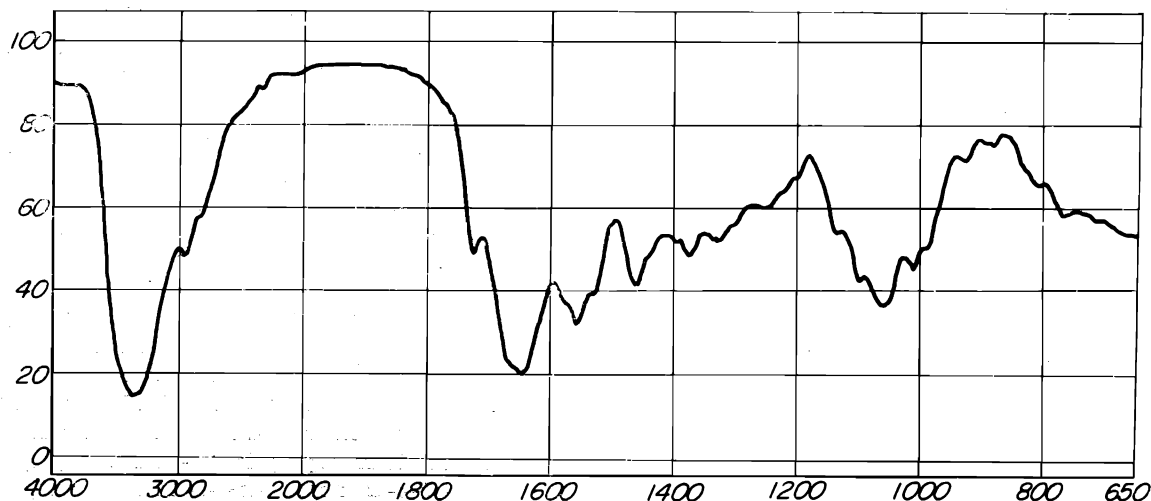


FIG. 2

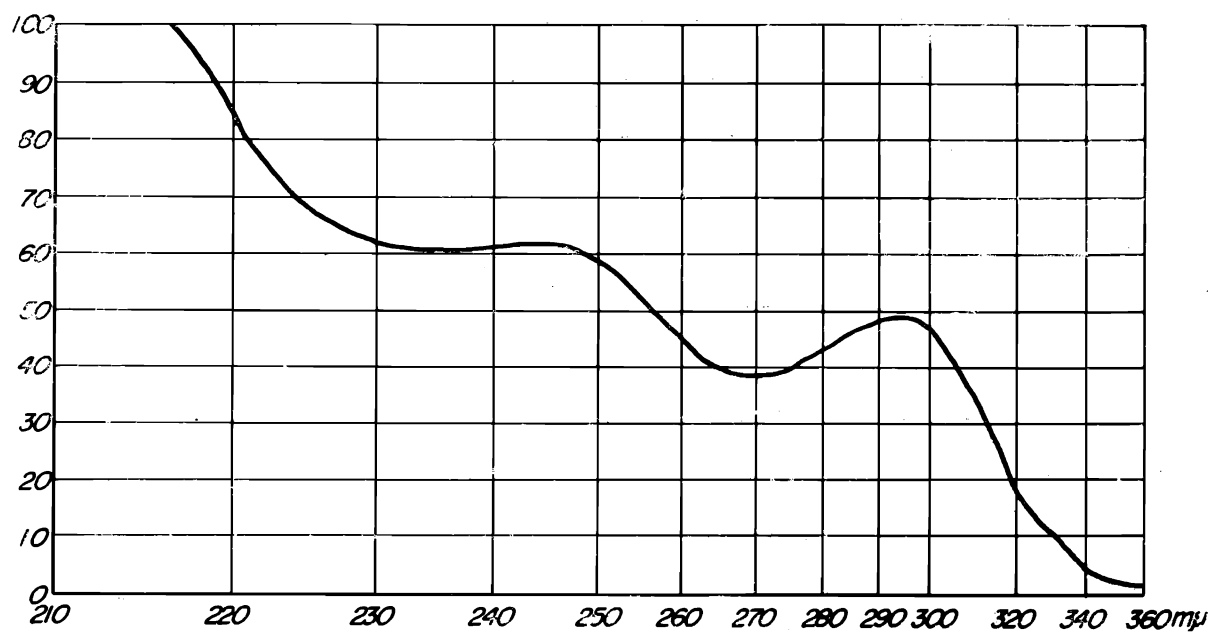


FIG. 3

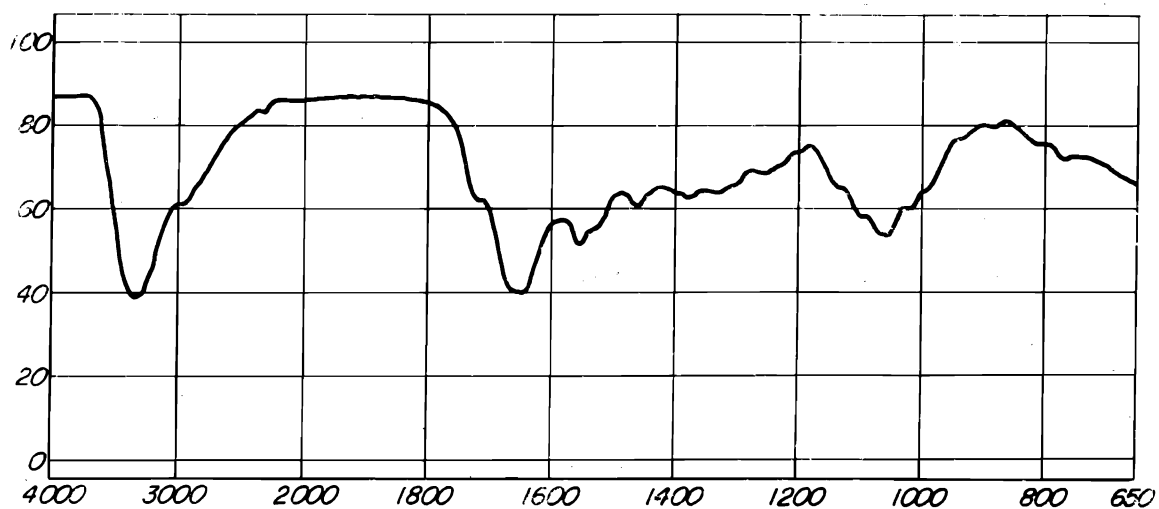


FIG. 4

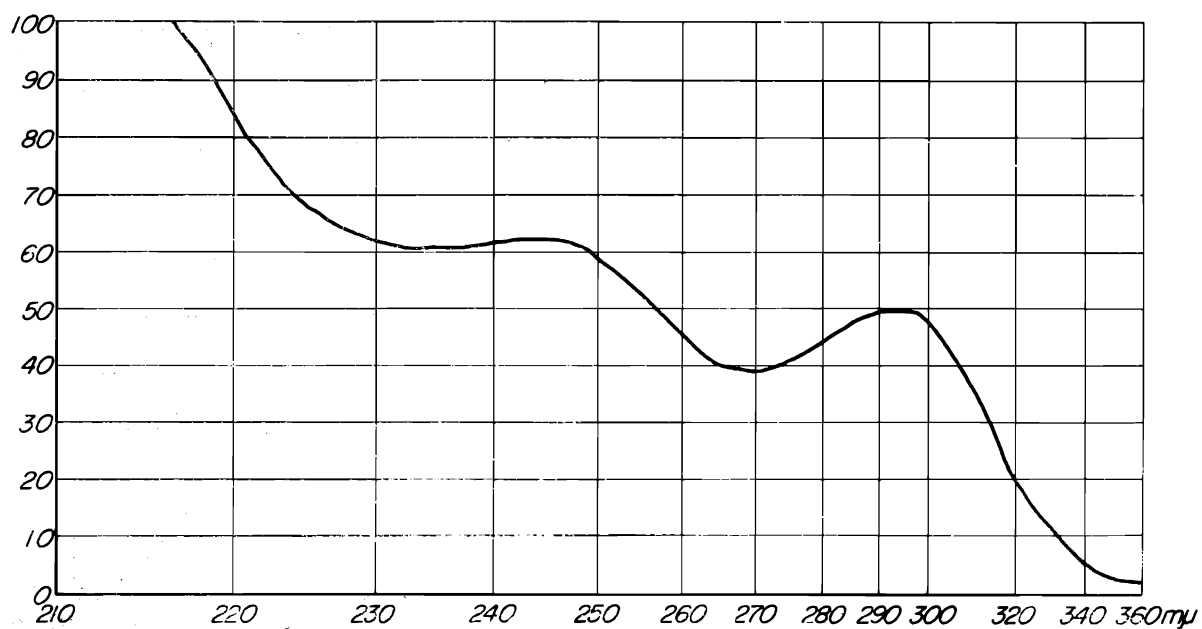


FIG. 5

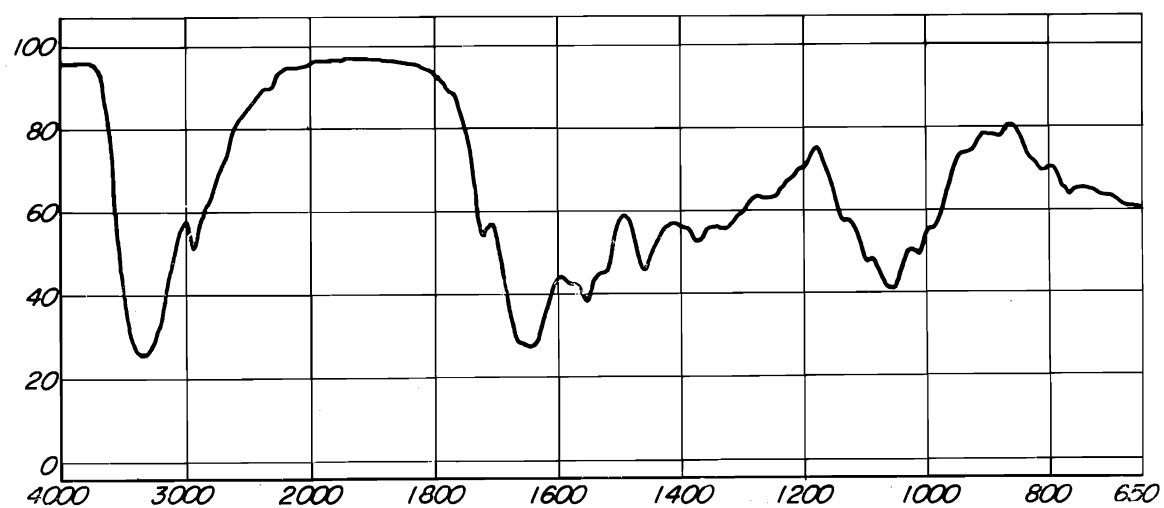
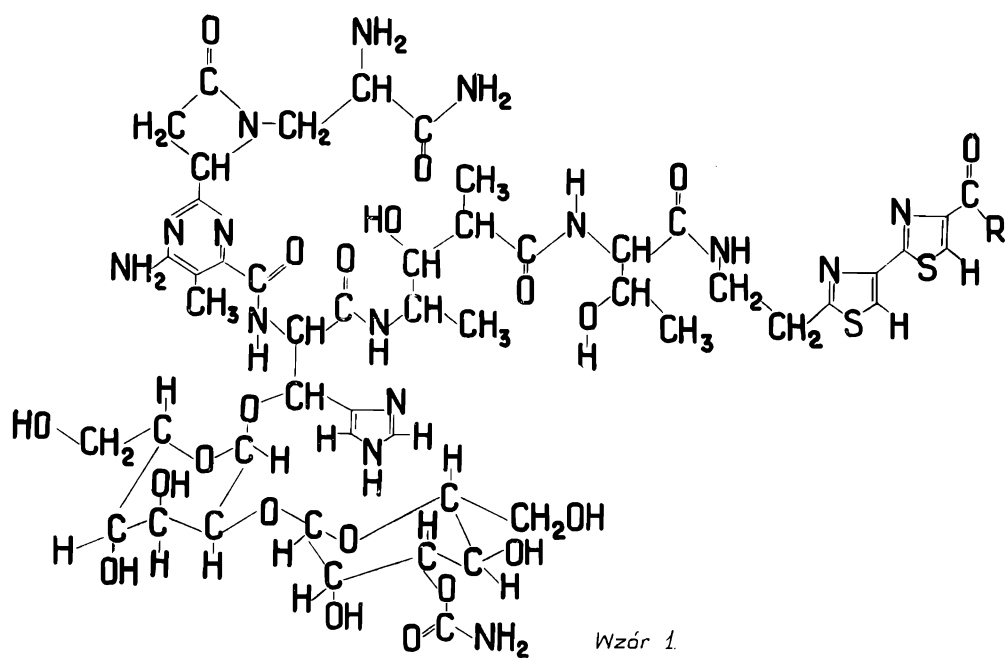
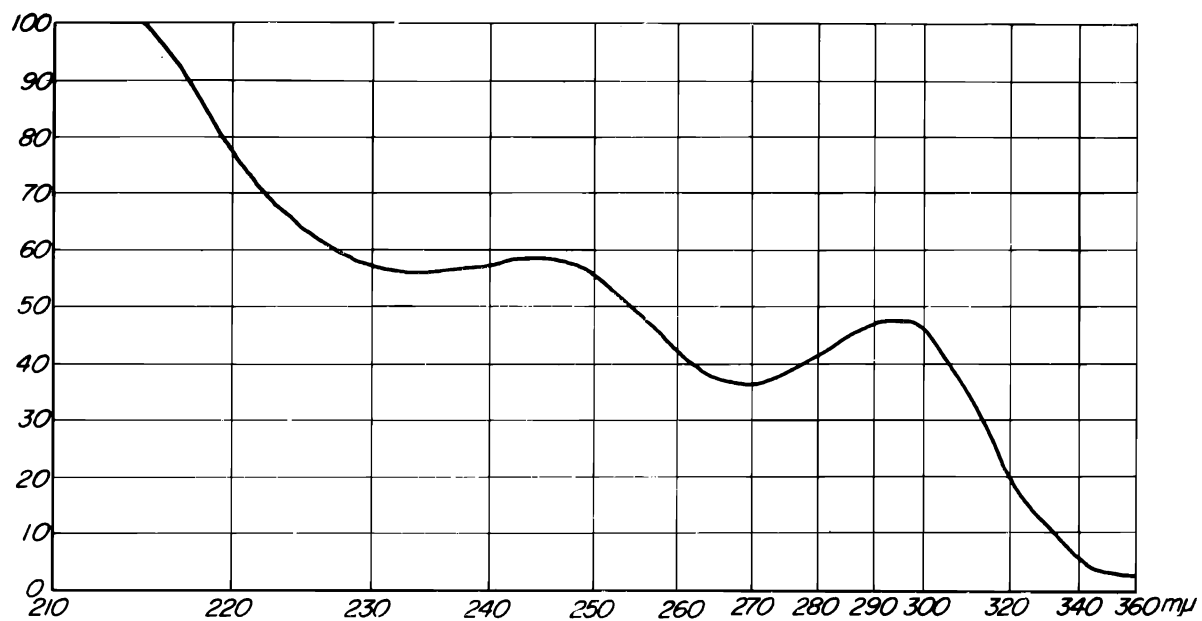
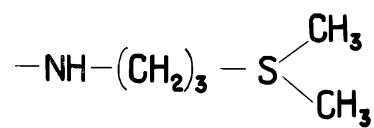
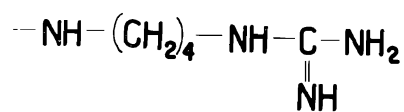


FIG. 6

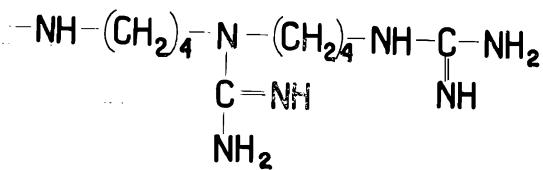




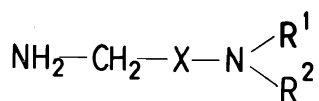
Wzór 2



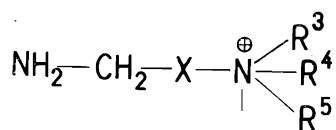
Wzór 3



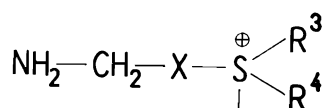
Wzór 4



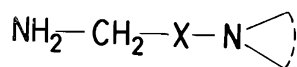
Wzór 5



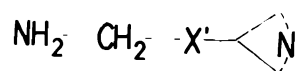
Wzór 6



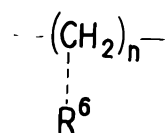
Wzór 7



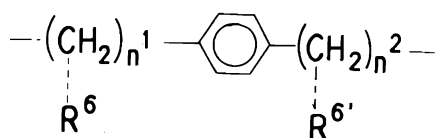
Wzór 8



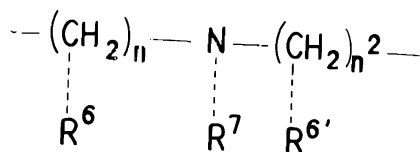
Wzór 9



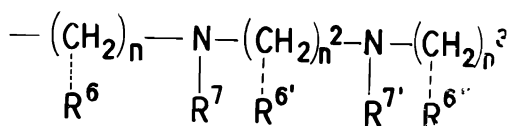
Wzór 10



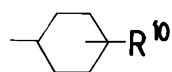
Wzór 11



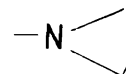
Wzór 12



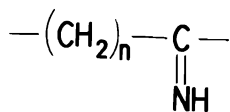
Wzór 13



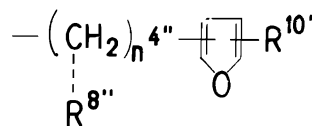
Wzór 17



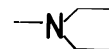
Wzór 21



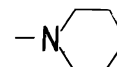
Wzór 14



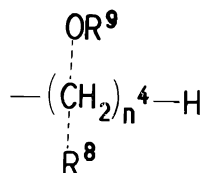
Wzór 18



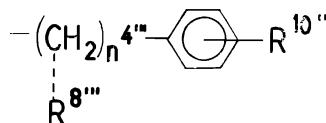
Wzór 22



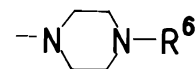
Wzór 23



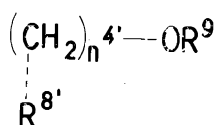
Wzór 15



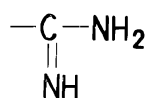
Wzór 19



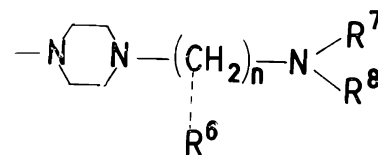
Wzór 24



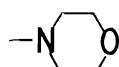
Wzór 16



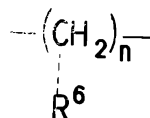
Wzór 20



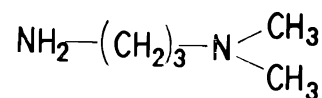
Wzór 25



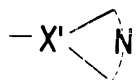
Wzór 26



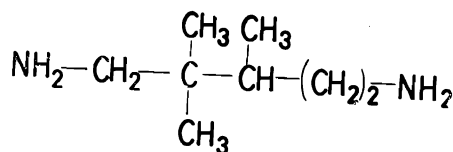
Wzór 31



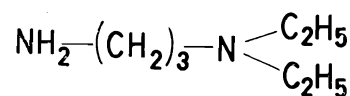
Wzór 36



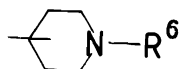
Wzór 27



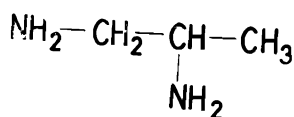
Wzór 32



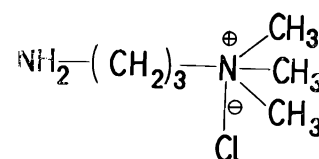
Wzór 37



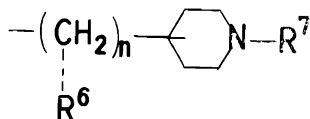
Wzór 28



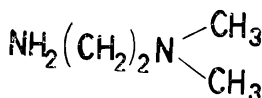
Wzór 33



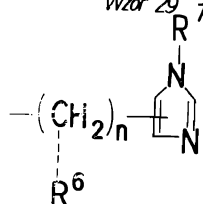
Wzór 38



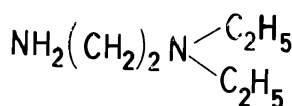
Wzór 29



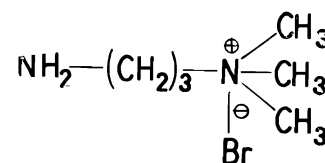
Wzór 34



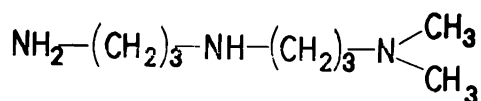
Wzór 30



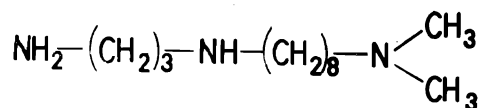
Wzór 35



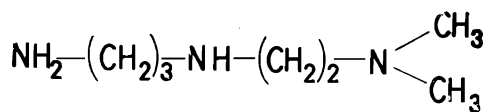
Wzór 39



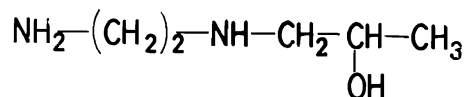
Wzór 40



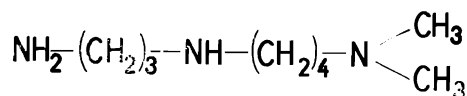
Wzór 44



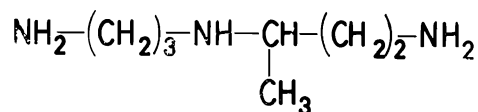
Wzór 41



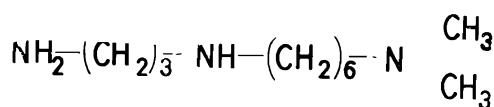
Wzór 45



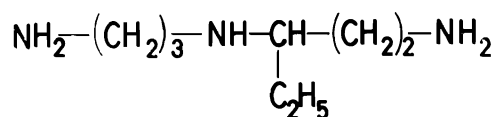
Wzór 42



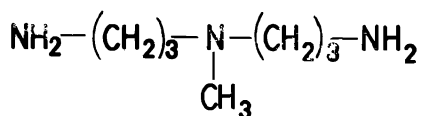
Wzór 46



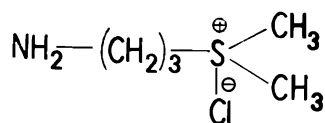
Wzór 43



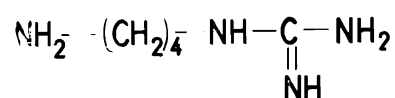
Wzór 47



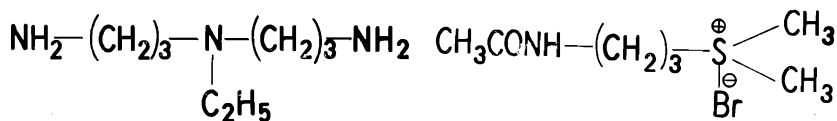
Wzór 48



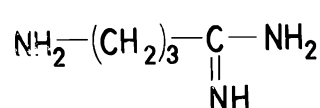
Wzór 52



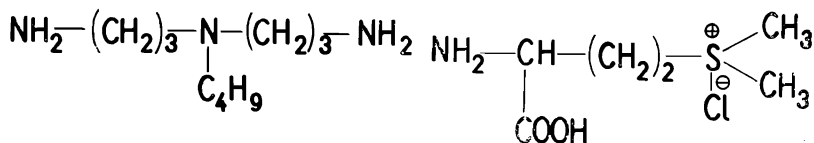
Wzór 56



Wzór 49

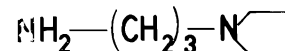


Wzór 57

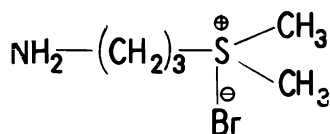


Wzór 50

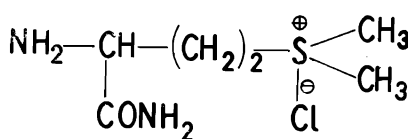
Wzór 54



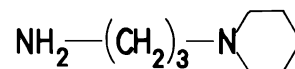
Wzór 58



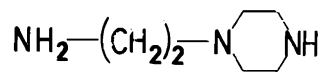
Wzór 51



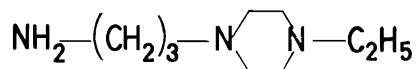
Wzór 55



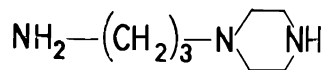
Wzór 59



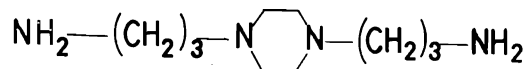
Wzór 60



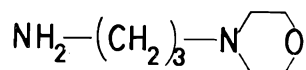
Wzór 64



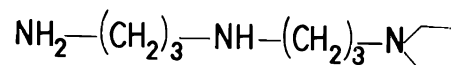
Wzór 61



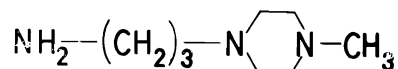
Wzór 65



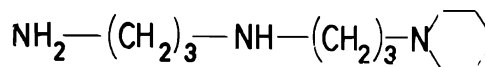
Wzór 62



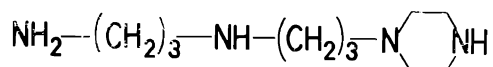
Wzór 66



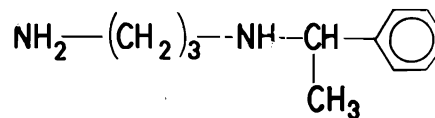
Wzór 63



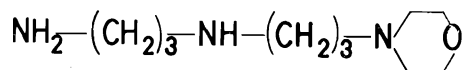
Wzór 67



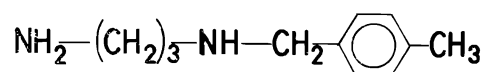
Wzór 68



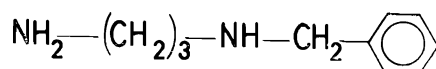
Wzór 72



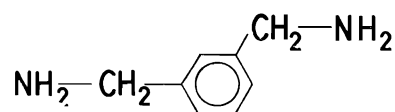
Wzór 69



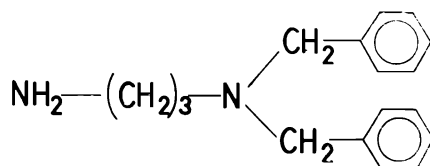
Wzór 73



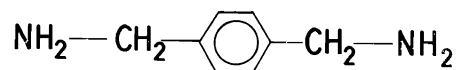
Wzór 70



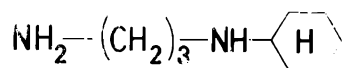
Wzór 74



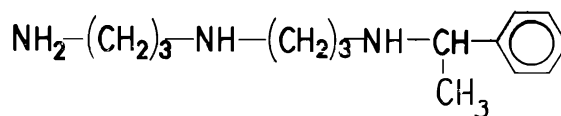
Wzór 71



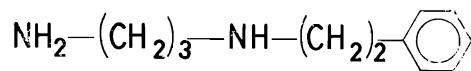
Wzór 75



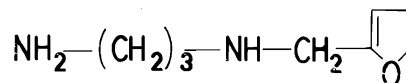
Wzór 76



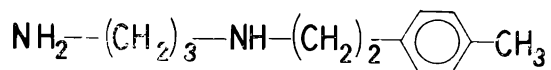
Wzór 80



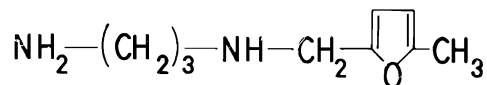
Wzór 77



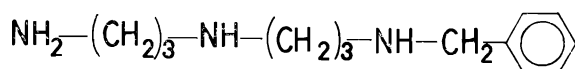
Wzór 81



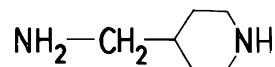
Wzór 78



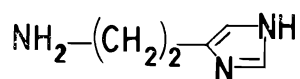
Wzór 82



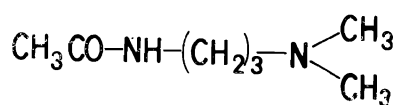
Wzór 79



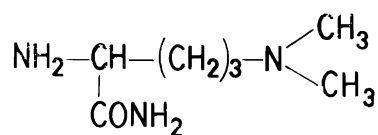
Wzór 83



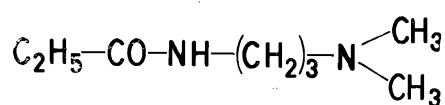
Wzór 84



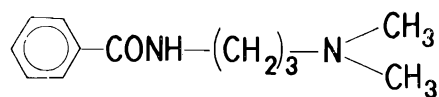
Wzór 85



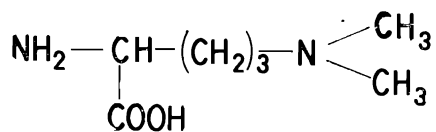
Wzór 88



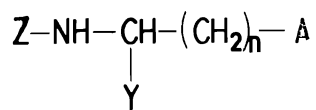
Wzór 86



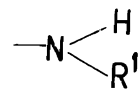
Wzór 89



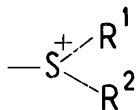
Wzór 87



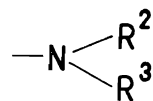
Wzór 90



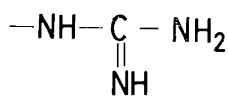
Wzór 94



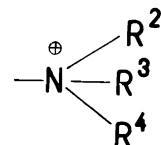
Wzór 91



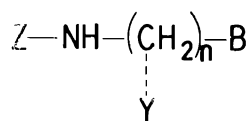
Wzór 95



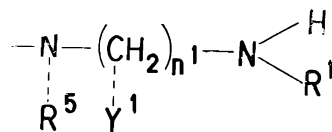
Wzór 92



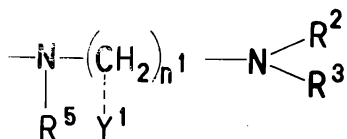
Wzór 96



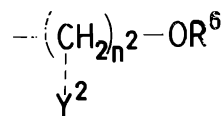
Wzór 93



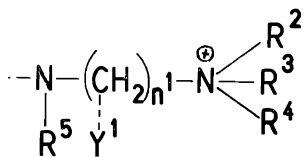
Wzór 97



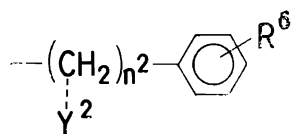
Wzór 98



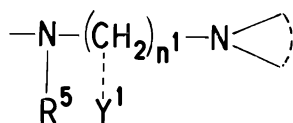
Wzór 102



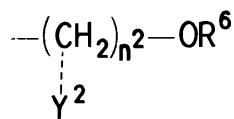
Wzór 99



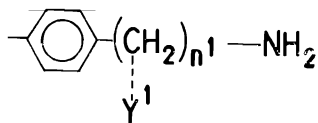
Wzór 103



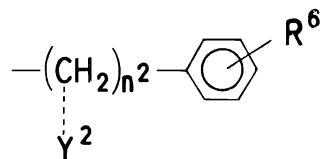
Wzór 100



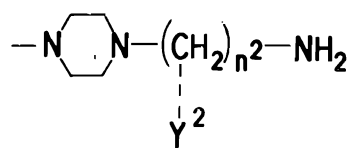
Wzór 104



Wzór 101



Wzór 105



Wzór 106

