



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: C 12 P 35/00  
C 12 R 1/465

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENT SCHRIFT** A5

(11)

**631 487**

(21) Gesuchsnummer: 16056/76

(22) Anmeldungsdatum: 21.12.1976

(30) Priorität(en): 25.12.1975 JP 50-155646  
26.07.1976 JP 51-88770

(24) Patent erteilt: 13.08.1982

(45) Patentschrift veröffentlicht: 13.08.1982

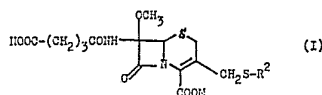
(73) Inhaber:  
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.,  
Chuo-ku/Tokyo (JP)

(72) Erfinder:  
Takashi Osono, Bunkyo-ku/Tokyo (JP)  
Yoshihiko Oka, Kawagoe-shi/Saitama (JP)  
Shunichi Watanabe, Omiya-shi/Saitama (JP)  
Takeshi Saito, Ota-ku/Tokyo (JP)  
Hiroshi Gushima, Ageo-shi/Saitama (JP)  
Keisuke Murakami, Wako-shi/Saitama (JP)  
Isao Takahashi, Itabashi-ku/Tokyo (JP)  
Hiroshi Yamaguchi, Omiya-shi/Saitama (JP)  
Toshio Sasaki, Itabashi-ku/Tokyo (JP)  
Kiyoshi Susaki, Ageo-shi/Saitama (JP)  
Shuichi Takamura, Ageo-shi/Saitama (JP)  
Toshiaki Miyoshi, Itabashi-ku/Tokyo (JP)

(74) Vertreter:  
Rebmann-Kupfer & Co., Zürich

(54) **Verfahren zur Herstellung von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-cephalosporinderivaten.**

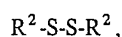
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von antibiotisch wirksamen 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-cephalosporinderivaten der allgemeinen Formel (I)



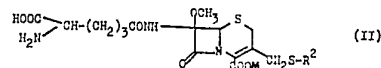
worin  $R^2$  eine Stickstoff als Ringheteroatom enthaltende heterocyclische Gruppe darstellt und M ein Wasserstoffatom, Alkalimetall, Erdalkalimetall, Schwermetall oder Basen, die quaternäre Salze oder Aminsalze bilden, darstellt, bei dem *Streptomyces ogarionensis* ATCC 31167 in einem Kulturmedium gezüchtet wird, welches Nährstoffe mit dem Zusatz eines heterocyclischen Thiois mit der Formel



oder eines Salzes des heterocyclischen Thiois oder eine Verbindung mit der Formel



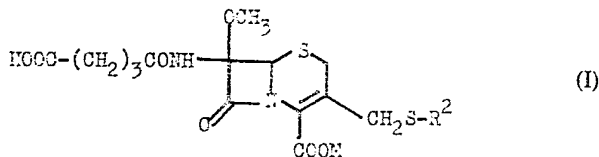
enthält, um 7-Methoxycephalosporinderivate mit der Formel (II)



herzustellen und dann aerob auf die Verbindung der Formel (II) das Mycel von D-Aminosäure oxidierenden Enzymen herstellenden Mikroorganismen vom Stamme *Trigonopsis* oder ein Mycelpräparat mit gesteigerter Enzymaktivität wirken lässt.

## PATENTANSPRÜCHE

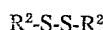
1. Verfahren zur Herstellung von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-cephalosporinderivaten der allgemeinen Formel (I)



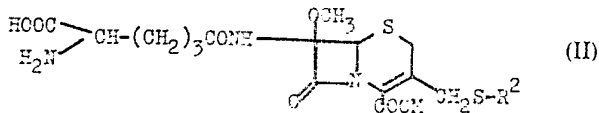
worin R<sup>2</sup> eine Stickstoff als Ringheteroatom enthaltende heterocyclische Gruppe darstellt und M ein Wasserstoffatom, Alkalimetall, Erdalkalimetall, Schwermetall oder Basen, die quaternäre Salze oder Aminsäure bilden, darstellt, dadurch gekennzeichnet, dass man Streptomyces oganensis ATCC 31167 in einem Kulturmedium züchtet, welches Nährstoffe mit dem Zusatz eines heterocyclischen Thiols mit der Formel



worin R<sup>2</sup> die vorstehend genannte Bedeutung hat, oder eines Salzes des heterocyclischen Thiols oder eine Verbindung mit der Formel



worin R<sup>2</sup> die gleiche schon genannte Bedeutung hat, enthält, um 7-Methoxycephalosporinderivate mit der Formel (II)



herzustellen, worin R<sup>2</sup> und M die vorstehend genannte Bedeutung haben, und dann aerob auf die Verbindung der Formel (II) das Mycel oder ein Mycelpräparat mit gesteigerter Enzymaktivität von D-Aminosäure oxidierenden Enzymen herstellenden Mikroorganismen von Stamme Tri-gonopsis wirken lässt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sup>2</sup> eine 1-Methyl-1H-tetrazol-5-ylgruppe ist und M ein Wasserstoffatom darstellt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sup>2</sup> eine 5-Carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-ylgruppe und M ein Wasserstoffatom darstellt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sup>2</sup> eine 5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylgruppe und M ein Wasserstoffatom darstellt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R<sup>2</sup> eine 1,3,4-Thiadiazol-2-ylgruppe und M ein Wasserstoffatom ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Behandlungsprodukt des Mycels mit gesteigerter Enzymaktivität der durch Anwendung physikalischer und/oder chemischer Einwirkungen gewonnene zellfreie Extrakt eingesetzt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Behandlungsprodukt des Mycels teilweise oder vollständig gereinigtes, D-Aminosäure oxydierendes Enzym, das aus dem zellfreien Extrakt durch Anwendung bekannter Enzymabtrennungs- und Reinigungsmethoden gewonnen wurde, eingesetzt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das partiell oder ganz gereinigte, D-Aminosäure oxydierende Enzym mit einem wasserunlöslichen Polymer oder

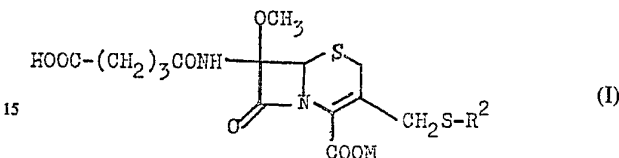
2

einem anorganischen Träger, durch physikalische oder chemische Mittel kombiniert, nach einer Aktivationsbehandlung eingesetzt wird.

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-cephalosporinderivaten der allgemeinen Formel (I)

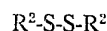
10



worin R<sup>2</sup> eine Stickstoff als Ringheteroatom enthaltende heterocyclische Gruppe darstellt und M ein Wasserstoffatom, Alkalimetall, Erdalkalimetall, Schwermetall oder Basen, die quaternäre Salze oder Aminsäure bilden, darstellt, dadurch gekennzeichnet, dass man Streptomyces oganensis ATCC 31167 in einem Kulturmedium züchtet, welches Nährstoffe mit dem Zusatz eines heterocyclischen Thiols mit der Formel

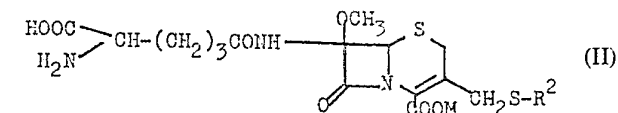


worin R<sup>2</sup> die vorstehend genannte Bedeutung hat, oder eines Salzes des heterocyclischen Thiols oder eine Verbindung mit der Formel



worin R<sup>2</sup> die gleiche schon genannte Bedeutung hat, enthält, um 7-Methoxycephalosporinderivate mit der Formel (II)

35



herzustellen, worin R<sup>2</sup> und M die vorstehend genannte Bedeutung haben, und dann aerob auf die Verbindung der Formel (II) das Mycel oder ein Mycelpräparat mit gesteigerter Enzymaktivität von D-Aminosäure oxidierenden Enzymen herstellenden Mikroorganismen von Stamme Tri-gonopsis wirken lässt.

Als die stickstoffhaltige heterocyclische Gruppe, die durch R<sup>2</sup> in der vorstehenden allgemeinen Formel angezeigt wird, werden zur Verdeutlichung genannt: eine 5-Carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl-Gruppe, eine 1-Methyl-1H-tetrazol-5-yl-Gruppe, eine 5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl-Gruppe, eine 1,3,4-Thiadiazol-2-yl-Gruppe usw.

Der durch M dargestellte kationische Rest, der das Salz des Cephalosporins bildet, bedeutet einen anorganischen Rest oder einen organischen Rest. Als anorganischer Rest wird ein Alkalimetall wie Natrium, Kalium usw.; ein Erdalkalimetall wie Calcium, Magnesium, Barium usw.; sowie ein Schwermetall wie Eisen, Kupfer, Zink usw. verwendet; als organischer Rest dienen Basen, die quaternäre Salze oder Aminsäure bilden zum Beispiel Triäthylamin, Diäthanolamin, Piperidin, Morpholin usw. Praktische Beispiele für Verbindungen dieser Erfindung sind

7-(4-Carboxybutyramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure,  
7-(4-Carboxybutyramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-7-methoxy- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure,  
7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure,

7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure sowie die Salze dieser Verbindungen.

Einige 7-Methoxy-3-heterocyclothiomethylcephalosporine sind in der GB-PS 1 321 412 (1970) als durch chemische Synthese erhältliche Verbindungen beschrieben, jedoch sind in dieser britischen Patentschrift keine praktischen physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Verbindungen angegeben.

Aufgabe dieser Erfindung ist es, neue 7-Methoxycephalosporinderivate und ein Verfahren zur Herstellung dieser Derivate durch Fermentation zur Verfügung zu stellen.

Cephalosporine besitzen ausgezeichnete antimikrobielle Aktivitäten gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, und unter diesen Verbindungen besitzen die Cephalosporinderivate mit einer Methoxygruppe in der 7-Position und einer heterocyclischen Thiomethylgruppe in der 3-Position ganz ausgezeichnete Wirkung bei der Behandlung von ernsthaften Erkrankungen, die durch die Infektion mit Bakterien, wie *Pseudomonas* und *Proteus* hervorgerufen werden, gegen die gewöhnliche Antibiotica nicht wirksam sind, oder die durch die Infektion mit den Bakterien hervorgerufen werden, die nicht empfindlich sind gegen gewöhnliche Cephalosporine, welche keine Methoxygruppe in der 7-Position aufweisen.

Diese Verbindungen werden gewöhnlich hergestellt, indem zuerst die entsprechenden Verbindungen, die eine Acetoxymethylgruppe oder eine Carbamoyloxymethylgruppe in der 3-Position aufweisen, hergestellt werden, und zwar durch ein Fermentationsverfahren, und dann werden diese Verbindungen mit einer heterocyclischen Thiolverbindung umgesetzt.

Einerseits hat die vorliegende Erfindung auch einen solchen Vorteil, dass die Verbindung mit einer heterocyclischen Thiomethylgruppe in der 3-Position direkt durch eine einzige Fermentationsstufe erhalten werden kann. Die so als Zwischenprodukt erhaltene Verbindung ist die Verbindung mit der allgemeinen Formel II).

Die Verbindungen der Formel (II) besitzen selbst ausgezeichnete antimikrobielle Aktivitäten, und weiterhin können die antimikrobiellen Eigenschaften und die antimikrobiellen Spektren der Verbindungen erhöht od. gewechselt werden, indem die Acylgruppen-Seitenkette in der 7-Position, dargestellt

durch 
$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ | \\ \text{HOOC} - \text{CH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CO} - \end{array}$$
 mit einer anderen Acyl-

gruppe, wie z.B.  $\alpha$ -Aminophenylacetylgruppe,  $\alpha$ -Carboxyphenylacetylgruppe,  $\alpha$ -Sulfophenylacetylgruppe,  $\alpha$ -Hydroxyphenylacetylgruppe, Pyridylthioacetylgruppe, Thiadiazolylthioacetylgruppe, Triazolylacetylgruppe, Cyanomethylthioacetylgruppe, Trifluormethylthioacetylgruppe usw., gewechselt oder ausgetauscht werden. So sind die Verbindungen mit der Formel (II) ebenfalls als Zwischenprodukte verwendbar, um diese Derivate mit diesen Acylgruppen herzustellen. Zum Beispiel: 7 $\beta$ -Cyanomethylthioacetamido-7 $\alpha$ -methoxy-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure und 7 $\alpha$ -Methoxy-3-(1-methyltetrazol-5-ylthiomethyl)-7 $\beta$ -(trifluormethylthioacetamido)- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure.

Die Verbindungen der Formel (II) besitzen die Eigenschaften wie ein amphoterer Material, denn die Verbindungen haben eine Aminogruppe und zwei Carboxygruppen im Molekül, und dadurch ist die Isolierung und Reinigung der hergestellten Verbindungen mühsam. Wenn jedoch die Verbindungen der Formel (II) in Verbindungen der Formel (I) umgewandelt werden, besitzen die Verbindungen mit der

Formel deutlich saure Eigenschaften, die die Isolierung und Reinigung der Verbindungen erleichtert, zumal die Verbindungen in organischen Lösungsmitteln löslich sind, wodurch sich Vorteile für die nachfolgende Reaktion ergeben. Daher sind die Verbindungen ebenfalls als Zwischenprodukte zur Herstellung der Derivate geeignet, die die vorstehend genannten Acylgruppen aufweisen.

Als Mikroorganismus, der zur Herstellung der 7-Methoxycephalosporin-Antibiotica Verwendung findet und der zu den Streptomyceten gehört, wird in dieser Erfindung ein neuer Stamm benutzt, nämlich *Streptomyces oganensis* Y-G19Z, der zuvor von den Erfindern aus dem Erdboden bei der Stadt Ogano, Chichibugun, Bezirk Saitama (Japan) isoliert worden ist. Dieser Stamm ist in dem Institut für Mikrobielle Industrie, Zweigstelle für Industrielle Wissenschaft und Technologie, Ministerium für Internationalen Handel und Industrie, Japan, unter einer Hinterlegungsnummer FERM-P 2725 und auch in der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 (USA) am 21. August 1975 unter ATCC No. 31167 hinterlegt worden. Die mykologischen Eigenschaften des Stammes sind die folgenden:

#### I. Morphologische Charakteristiken von *Streptomyces oganensis* Y-G19Z-Stamm:

Der Stamm wächst sowohl auf natürlichen wie auch auf synthetischen Medien unter Bildung eines gut verzweigten Substratmycel, während die Bildung von atmosphärischem Mycel nicht ausreichend ist, da die Sporenbildung zu gering ist. Die Sporenketten sind gerade, gehören zum R-(rectus) oder RF- (Rectiflexibles) Typ und tragen 10 bis 50 Sporen in jeder Kette. Die Sporen sind elliptisch, sphärisch oder zylindrisch geformt und weisen eine Grösse von 0,45 bis 0,60  $\times$  0,55 bis 0,90  $\mu$  auf. Die Sporenoberfläche ist glatt.

Es werden weder Flagellaten-Sporen noch Sporangium beobachtet.

#### II. Kultur-Charakteristika des Stammes *S. oganensis* Y-G19Z:

40

45

50

55

60

65

Medium	Wachstum	Atmosphärisches Mycel	Lösliches Pigment
Czapek's Agar	sehr gering weiss	spärlich weiss	nein
Glukose Czapek's Agar	gut cremegelb	leidlich gelblich-grau	nein sehr gering
Glukose Asparagin-Agar	gut weiss	gering weiss	nein
Glycerin Asparagin-Agar	gut weiss bis gelblich weiss	gering weiss bis gelblich weiss	nein
Anorganischer Salz-Stärke-Agar	gut gelblich grau bis schwach gelblich braun	gering gelblich grau	nein
Tyrosin-Agar	gut schwach gelb	gering gelblich grau	schwach schwach gelblich grau
Eisen und Hefeextrakt- Tyrosin-Agar	gut schwach gelb bis gelblich-braun	gut bräunlich weiss bis gelblich grau	sehr gering hell bräunlich-grau
Nährboden-Agar	gut schwach gelblich-braun	gut, pulverig schwach orange bis schwach braun	schwach gelblich-braun
Bennett's Agar	gut schwach gelblich-braun	gut bräunlich-grau, schwach orange bis schwach rosa	sehr schwach
Calciummalat-Agar	mässig cremefarbig	kein	kein
Kartoffelstücke	gut schwach gelblich-braun	gut gelblich-grau bis schwach bräunlich grau	bräunlich-grau bis dunkel gelblich-braun
Blut-Agar	gut olive-grau bis dunkel olive-grau	kein	gelblich-grau bis dunkel rötlich-braun
Loeffler's Serum Medium	gut	kein	kein

III. Physiologische Eigenschaften von *S. oganensis*  
Y-G19Z-Stamm:

Ausnutzung von Kohlenstoffverbindungen durch  
*S. oganensis* Y-G19Z

		55	Kohlenstoffquelle	Ausnutzung
Tyrosin-Formation	negativ		Glukose	+
Nitrat-Reduktion	positiv		Arabinose	+
Magermilch-Koagulation	positiv, schwach		Sukrose	—
Magermilch-Peptonisierung	positiv, schwach	60	Xylose	+
Hydrolyse von Stärke	positiv		Inositol	—
Verflüssigung von Gelatine	positiv, schwach		Mannitol	+
Cellulose-Abbau	negativ		Fruktose	+
Hämolyse	positiv	65	Rhamnose	—
Löslichmachung von Calciummalat	positiv		Raffinose	—

Charakteristische Merkmale für *Streptomyces oganonen-sis* Y-G19Z-Stamm: kann wie folgt zusammengefasst werden:

1. Es gehört zu dem nicht-chromogenen *Streptomyces* Stamm;
2. Sein atmosphärisches Mycel ist gerade ohne Verzweigung (R oder RF Typ);
3. Sporen sind sphärisch oder elliptisch;
4. Sporenoberfläche ist glatt;
5. Es gibt schwach gelblich graue bis schwach gelblich braune Gewächse auf verschiedenen Medien;
6. Die Farbe des sphärischen Mycels ist bräunlich-weiss, gelblich-weiss und gelblich-grau;
7. Die erzeugte antibiotische Substanz Y-G19Z-D3 gehört zur 7-Methoxycephalosporingruppe.

Bei der Durchforschung bekannter Stämme, die die vorstehenden Eigenschaften aufweisen, können als am nächsten kommende *Streptomyces* die folgenden angesehen werden:

*Streptomyces globisporus*, beschrieben in S.A. Waksman: «The Actinomycetes» 2, 218 (1961) und International Journal of Systematic Bacteriology, 18, (4) 324-325 (1968).

Wenn man jedoch den bekannten *S. globisporus*, der in der vorstehenden Literatur beschrieben ist, mit dem Stamm Y-G19Z vergleicht, weicht dieser in den folgenden Eigenschaften, die in der Tabelle angegeben sind, ab:

TABELLE

Eigenschaften:	Y-G19Z	<i>S. globisporus</i>
Grösse der Spore ( $\mu$ )	0,45 - 0,60 $\times$ 0,55 - 0,90	1,2 - 1,4 $\times$ 8 - 2,0 oder 0,9 - 1,4 kugelförmig
Flüssiges Pigment oder Glycerin-Asparagin-Medium	kein	gelblich bis grünlich-gelb
Rhamnose-Verwertung	negativ	positiv
Stärke-Hydrolyse	stark	schwach
Magermilch-Koagulation	positiv	negativ
Magermilch-Peptonisation	schwach	stark
Produktion von Cephalosporin-Antibiotica	positiv	negativ

Aus den in der vorstehenden Tabelle angegebenen Differenzen ergibt sich, dass der in dieser Erfindung benutzte Stamm ein neuer Stamm ist, der sich von den vorstehend genannten bekannten Stämmen unterscheidet.

Da der Y-G19Z-Stamm als ein neuer Stamm durch die vorstehenden Beobachtungsergebnisse bestätigt worden ist, ist er als «*Streptomyces oganonen-sis*» bezeichnet worden.

Wie schon bei den Ausführungen über den *Streptomyces oganonen-sis* Y-19Z-Stamm ausgeführt wurde, handelt es sich um einen 7-Methoxycephalosporin-Antibiotikum erzeugenden Stamm. Als ähnliche Stämme, die zu den *Streptomyces* gehören, sind als Erzeuger von 7-Methoxycephalosporin-Antibiotika die folgenden bekannt:

*Streptomyces griseus*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces fimbriatus*, *Streptomyces halstedii*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces cinnamomensis*, *Streptomyces chartreusis* und *Streptomyces lactamdurans* (vgl. Japanische Patent-Offenlegungsschrift 3286/'71 und Belgische Patent-schrift 764 160) sowie *Streptomyces lipmanii* (US-PS 3 719 563), *Streptomyces clavuligerus* (Japanisches Patent 45 594/'74), *Streptomyces wadayamensis* (Japanische Offenlegungsschrift 26 488/'74), *Streptomyces jumonjinensis*

(Japanische Offenlegungsschrift 42 893/'74), *Streptomyces heteromorphus* und *Streptomyces panayensis* (Japanische Offenlegungsschrift 53 594/'75), und *Streptomyces chartreusis* SF-1623 (Japanische Offenlegungsschrift 82 291/'75 und 121 488/'75).

Die Herstellung der besprochenen Verbindung der Formel (I) wird ausgeführt, indem man den erwähnten 7-Methoxycephalosporin-Antibiotika produzierenden Stamm kultiviert in einem üblichen Kulturmedium, dem ein Zusatz an heterocyclischer Thiolverbindung zugegeben wurde entsprechend der heterocyclischen Thiogruppe, die in die 3-Position eingeführt werden soll.

Beispiele für die heterocyclischen Thiole, die dem Kulturmedium in dieser Erfindung hinzugefügt werden, sind: Pyrrolthiol, Imidazolthiol, Dihydroimidazolthiol, Pyrazolthiol, Triazolthiol, Tetrazolthiol, Methyltetrazolthiol, Pyridinthiol, Diazinthiol, Thiazolthiol, Dihydrothiazolthiol, Thiadiazolthiol, Thiatriazolthiol, Oxazolthiol, Isoxazolthiol, Oxadiazolthiol, Indolthiol, Benzimidazolthiol, Benzoxazolthiol, Benzothiazolthiol, Triazolpyridinthiol, Purinthiol usw. Diese heterocyclischen Ringe können einen oder mehrere Substituenten aufweisen, wie ein Halogenatom, eine Amino-, Nitro-, Alkyl-, Hydroxy-, Alkoxy-, Aryl-, Aralkyl-, Furyl-, Thienyl-,

Oxazolyl-, Carboxy-, Carboxymethyl-, Carboxyalkylthio-, Carboxyalkyloxy-Gruppe usw.

Diese heterocyclischen Thiole können als ihre Salze verwendet werden. Diese Salze sind anorganische Salze, wie Alkalimetallsalze, Erdalkalimetallsalze, Ammoniumsalze usw., und die Salze mit organischen Basen, wie Triäthylamin, Triäthanolamin, Dicyclohexylamin, Lysin, Arginin, Histidin, basische wasserlösliche Antibiotika, z.B. Kanamycin, Alkaloide, basische Proteine usw.

Die Salze mit hoher Wasserlöslichkeit können selektiv verwendet werden, falls erforderlich, und ferner, wenn die heterocyclischen Thiole eine starke Toxizität zu den Antibiotika erzeugenden Stämmen aufweisen, können die nur spärlich in Wasser löslichen Salze selektiv verwendet werden.

Auch können zwei Moleküle der gleichen heterocyclischen Thiolverbindung, die durch die S-S-Bindung verbunden sind, Verwendung finden, wie z.B. R<sup>2</sup>S-SR<sup>2</sup>.

Die Herstellung der gemäß dieser Erfindung erhältlichen neuen Antibiotika wird durch Kultivierung des im Patentanspruch 1 genannten Stammes der Art Streptomyces in einem Kulturmedium unter Zugabe der vorstehend schon beschriebenen heterocyclischen Thiolverbindung oder des Salzes oder ihres Derivates R<sup>2</sup>-SS-R<sup>2</sup> durchgeführt.

Die Kultivierung wird nach den üblichen herkömmlichen Methoden zur Züchtung von Mikroorganismen durchgeführt, jedoch wird die submerse Kultur in einem flüssigen Kulturmedium bevorzugt. Jedes Kulturmedium, welches Nährstoffe für die 7-Methoxycephalosporin-Antibiotika herstellenden Stämme der Art Streptomyces enthält, kann verwendet werden. Es können synthetische Kulturmedien, halbsynthetische Kulturmedien und natürliche Kulturmedien, die die vorstehend genannten Nährstoffe enthalten, in dieser Erfindung Verwendung finden. Für die Zusammensetzung des Kulturmediums können Glukose, Sukrose, Mannitol, Glycerin, Dextrin, Stärke, vegetabile Öle usw. als Kohlenstoffquellen Verwendung finden, und Fleischextrakt, Peptone, Klebermehl, Baumwollsaatmehl, Sojabohnenmehl, Erdnussmehl, Fischmehl, Kornschlempe, Trockenhefe, Hefeextrakt, Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat, Harnstoff und andere organische und anorganische Stickstoffquellen können als Stickstoffspender Verwendung finden. Ebenso können, falls erforderlich, Metallsalze, wie Sulfate, Nitrate, Chloride, Carbonate, Phosphate usw. von Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Zink und Eisen zu dem Kulturmedium hinzugefügt werden. Weiterhin können, falls erforderlich, Materialien, die die Bildung der Antibiotika begünstigen, oder Entschäumungsmittel, wie Methionin, Cystein,

Cystin, Methyloleat, Lardöl, Siliconöl, oberflächenaktive Mittel usw., in geeigneter Weise zu dem Kulturmedium hinzugefügt werden.

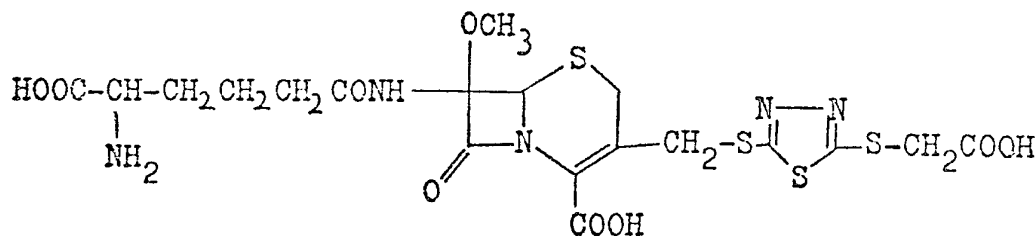
Das vorstehend genannte heterocyclische Thiol, dessen Salz oder dessen Derivat R<sup>2</sup>-SS-R<sup>2</sup> wird gewöhnlich in einer Konzentration von 0,1 - 5 mg/ml, vorzugsweise 0,5 - 2 mg/ml als heterocyclisches Thiol hinzugefügt. Es kann zu dem Kulturmedium als eine sturzartige Zugabe vor der Kultivierung oder auch in verschiedenen unterteilten Portionen in den Eingangsstufen der Kultivierung zugefügt werden. Es ist im allgemeinen günstig, die Kultivierung unter aeroben Bedingungen durchzuführen. Die Kultivierungstemperatur liegt gewöhnlich zwischen etwa 18°C bis etwa 35°C, vorzugsweise um 30°C. Gute Ergebnisse werden erhalten, wenn das pH des Kulturmediums auf etwa 5 - 10, vorzugsweise etwa 6 - 8 gehalten wird. Der Kultivierungszeitablauf hängt von der Zusammensetzung und der Temperatur des verwendeten Kulturmediums ab, aber im allgemeinen werden etwa 3 Tage bis etwa 10 Tage benötigt. Das hergestellte Material wird selektiv in dem Medium angereichert, nachdem die Kultivierung beendet ist.

Das hergestellte Material kann isoliert und aus der Kulturbrühe nach den üblichen Methoden gewonnen werden, die für das Isolieren von Antibiotika aus dem kultivierten Mycel-Nährboden üblich sind. Das hergestellte Antibiotikum der Formel (II) ist hauptsächlich in der Kulturbrühe anwesend. Nach der Abtrennung des Mycels von der Nährbodenlösung durch Zentrifugieren oder Filtrieren wird das hergestellte effektive Material aus dem Filtrat extrahiert; das heisst, das hergestellte Material wird abgetrennt, wieder ausgezogen und gereinigt vom Filtrat. Hierbei werden Vorrichtungen und Verfahren verwendet, die ganz allgemein für die Herstellung von Antibiotika Verwendung finden, wie Methoden, die die Unterschiede der Löslichkeit in einem geeigneten Lösungsmittel ausnutzen, die die Unterschiede der adsorptiven Affinität zu verschiedenen Adsorbentien ausnutzen oder die auf Unterschieden der Trennmethoden in zwei flüssigen Phasen beruhen.

Diese Methoden können, falls erforderlich, in einer geeigneten Kombination oder auch wiederholt angewandt werden.

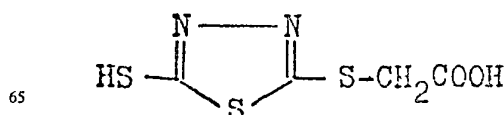
Einige praktische Beispiele der neuen 7-Methoxycephalosporin-Verbindungen der Formel (II) — Zwischenprodukte des erfindungsgemässen Verfahrens — werden nachfolgend genannt:

I. 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure;

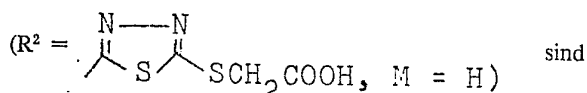


60 Additionsverbindung:

5-Mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-thioessigsäure;



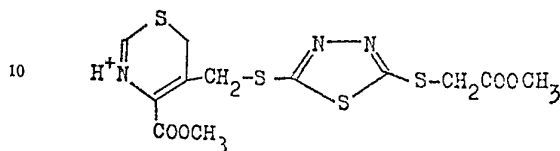
Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung I der allgemeinen Formel (II)



die folgenden:

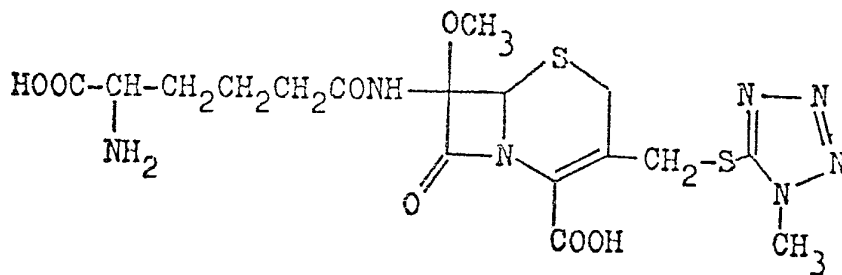
- (1.) weisses Pulver;
- (2.) Schmelzbeginn bei 156 - 160°C. Hierbei tritt Braunfärbung ein, und die Zersetzung beginnt ab etwa 170°C;
- (3.) leicht löslich in Wasser, spärlich löslich in Methanol, und sehr spärlich löslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
- (4.) amphoter Material mit positiver Ninhydrin-Reaktion;
- (5.) es besitzt das ultraviolette Absorptionsspektrum gemäss Fig. 1 der beigefügten Zeichnung, wenn es in einer 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 6,4 gemessen wird, wobei das Absorptionsmaximum bei 287 m $\mu$  liegt;
- (6.) es besitzt das Infrarot-Absorptionsspektrum gemäss Fig. 2, wenn es in der Kaliumbromid-Tablette gemessen wird. Es ergeben sich Absorptionen bei 3413 cm<sup>-1</sup>, 2920 cm<sup>-1</sup>, 1763 cm<sup>-1</sup>, 1620 cm<sup>-1</sup>, 1515 cm<sup>-1</sup> und 1380 cm<sup>-1</sup>;
- (7.) bei der Bestimmung des kernmagnetischen Resonanzspektrums unter Verwendung von TMS als äusserem Standard in schwerem Wasser werden folgende Signale erhalten:  
 $\delta$  Wert (p p m):  
 2,35 (4H, Multiplett), 2,96 (2H, Multiplett), 4,00 (3H, Singlett), 3,73 - 4,33 (2H, Quartett, J = 18 Hz), 4,25 (1H, Multiplett), 4,44 (2H, Singlett), 4,42 - 4,91 (2H, Quartett, J = 14 Hz), 5,63 (1H, Singlett);
- (8.) das im derzeit reinsten Zustand hergestellte Produkt besitzt die folgenden elementar-analytischen Werte:  
 C: 35,95%, H: 3,87%, N: 10,85%, S: 18,33%;

- (9.) es ergibt  $\alpha$ -Amino adipinsäure bei der Hydrolyse mit 6 n Chlorwasserstoffsäure;
- (10.) das Massenspektrum dieser Verbindung ergibt nach einer N-Chloracetylierung der Verbindung und Überführung des Produktes in den Methylester das folgende Fragment mit m/e 392, das heisst



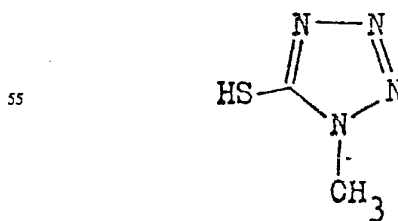
Unter Berücksichtigung aller vorstehenden Ergebnisse ist es ersichtlich, dass diese Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung ergibt eine Absorption bei 1763 cm<sup>-1</sup> (cyclisches Lactam) im Infrarot-Absorptionsspektrum, und die Gegenwart der Signale bei 4,00 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>), 5,63 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 3,73 - 4,33 (2H, Quartett, J = 18 Hz, 2-CH<sub>2</sub>) und 4,42 - 4,91 (2H, Quartett, J = 14 Hz, 3-Seitenkette CH<sub>2</sub>) in dem kernmagnetischen Resonanzspektrum. Die Verbindung ergibt  $\alpha$ -Amino adipinsäure bei der Säurehydrolyse, ferner ergibt die Verbindung Absorptionen bei 4,44 p p m (2H, Singlett, CH<sub>2</sub> von -S-CH<sub>2</sub>-COOH) im nuklearen magnetischen Resonanzspektrum und ausserdem das Fragment von m/e 392 im Massenspektrum des Derivates; aus diesen Gründen ist entschieden worden, dass die Verbindung die vorstehend genannte Struktur hat, in die das heterocyclische Thiol eingeführt worden ist.

II. 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:



Additionsverbindung:

50 5-Mercapto-1-methyl-1H-tetrazol;



60

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung II der Formel (II) ( $R_2 = \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{S} \text{---} \text{SCH}_2\text{COOH}$ ,

65

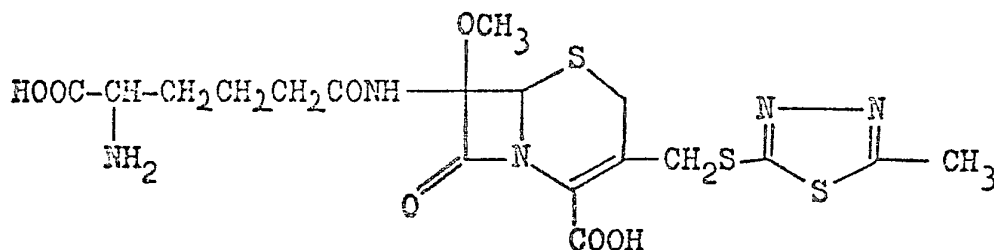
M = H) sind die folgenden:

- (1.) weisses Pulver;
- (2.) ergibt braune Verfärbung und Zersetzung bei 160 bis 170°C;
- (3.) leicht löslich in Wasser, gering löslich in Methanol und spärlich löslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
- (4.) amphoter Material mit positiver Ninhydrinreaktion;
- (5.) es wird das in Fig. 3 dargestellte Ultraviolett-Absorptionsspektrum bei Messung in 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 6,4 erhalten. Das Absorptionsmaximum liegt bei 273 mμ;
- (6.) es wird das in Fig. 4 dargestellte Infrarot-Absorptionsspektrum bei Messung der Kaliumbromidtablette erhalten. Es wurden Absorptionen bei 3413 cm<sup>-1</sup>, 2920 cm<sup>-1</sup>, 1765 cm<sup>-1</sup>, 1620 cm<sup>-1</sup>, 1515 cm<sup>-1</sup> und 1390 cm<sup>-1</sup> festgestellt;
- (7.) das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als externer Standard in schwerem Wasser ergab die folgenden Signale:  
 $\delta$  Wert (p p m):  
 2,36 (4H, Multipllett), 2,96 (2H, Multipllett), 3,98 (3H, Singlett), 4,38 (1H, Multipllett), 4,50 (3H, Singlett), 5,59 (1H, Singlett);

- (8.) das bis jetzt in reinstem Zustand erhaltene Material ergab die folgenden elementar-analytischen Werte:  
 C: 37,48%, H: 4,25%, N: 16,74%, und S: 10,90%;
- (9.) es wird  $\alpha$ -Aminoadipinsäure erhalten, wenn mit 6 n Chlorwasserstoffsäure hydrolysiert wurde. Es wird 5-Mercapto-1-methyl-1H-tetrazol durch Hydrolyse in Methanol durch Dowex 50 W (H-Typ) erhalten.

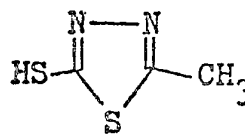
Berücksichtigt man die vorstehenden gesamten Ergebnisse, so ergibt sich, dass die Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung ergibt Signale bei 3,98 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>) und 5,59 p p m (1H, Singlett, 6-CH) bei den kernmagnetischen Resonanzspektren und Absorption bei 1765 cm<sup>-1</sup> (cyclisches Lactam) im Infrarot-Absorptionsspektrum. Ferner wird  $\alpha$ -Aminoadipinsäure durch Säurehydrolyse erhalten. Ferner ergibt sich aus der Tatsache der Absorption bei 450 p p m (3H, Singlett, Tetrazol-N-methyl) im kernmagnetischen Resonanzspektrum und auch aus der Tatsache, dass 5-Mercapto-1-methyl-1H-tetrazol durch milde Hydrolyse erhalten wird, dass der Verbindung die vorstehend erläuterte Struktur zuerkannt wurde, in die das heterocyclische Thiol eingeführt wurde.

III. 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure.

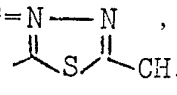


Additionsverbindung:

2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol:



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung III der Formel (II) ( $R^2 = \text{N} \text{---} \text{N}$ ),



M = H) sind die folgenden:

- (1.) leicht gelb-weisses Pulver;
- (2.) zeigt keinen bestimmten Schmelzpunkt, ergibt braune Verfärbung und Zersetzung bei etwa 170°C;
- (3.) leicht löslich in Wasser, schwach löslich in Methanol, aber unlöslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
- (4.) amphoter Material mit positiver Ninhydrinreaktion;
- (5.) ergibt das in Fig. 5 dargestellte Ultraviolett-Absorptionsspektrum, wenn in einer 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 6,4 gemessen wird, wobei das Absorptionsmaximum bei 272 mμ liegt;
- (6.) es wird das in Fig. 6 dargestellte Infrarot-Absorptionsspektrum erhalten, wenn als Kaliumbromid-Tablette gemessen wurde, mit Absorptionen bei 3420 cm<sup>-1</sup>, 2930 cm<sup>-1</sup>, 1765 cm<sup>-1</sup>, 1610 cm<sup>-1</sup>, 1515 cm<sup>-1</sup> und 1385 cm<sup>-1</sup>;



- (7.) das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als externer Standard in schwerem Wasser, ergibt die folgenden Signale:

$\delta$  Wert (p p m):

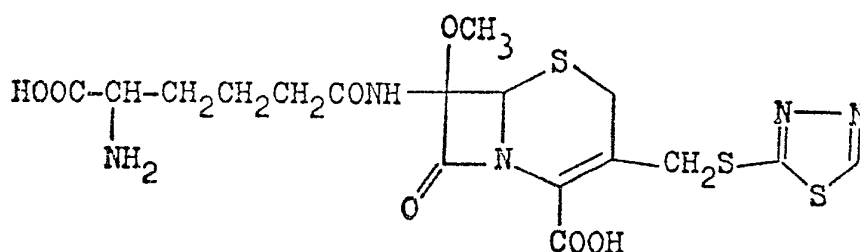
2,34 (4H, Multipllett), 2,95 (2H, Multipllett), 3,19 (3H, Singlett), 3,72 - 4,31 (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz), 3,99 (3H, Singlett), 4,26 (1H, Multipllett), 4,40 - 4,95 (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz), 5,63 (1H, Singlett);

- (8.) die gegenwärtig am reinsten hergestellte Verbindung weist die folgenden elementaranalytischen Werte auf: C: 37,82%, H: 4,01%, N: 12,90%, S: 14,97%;

- (9.) es wird  $\alpha$ -Aminoadipinsäure erhalten, wenn mit 6 n Chlorwasserstoffsäure hydrolysiert wird. Es wird auch 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol erhalten, wenn in Methanol mit Dowex 50 W (H-Typ) hydrolysiert wird.

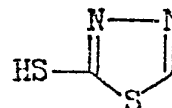
Wenn man alle vorstehenden Ergebnisse berücksichtigt, ist es ersichtlich, dass die Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung weist die Absorption bei  $1765\text{ cm}^{-1}$  (cyclisches Lactam) im Infrarot-Absorptionsspektrum auf. Ferner werden die Signale bei 3,99 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>), 5,63 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 3,72 - 4,31 p p m (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 4,40 - 4,95 (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz, 3-Seitenkette CH<sub>2</sub>) erhalten. Es wird  $\alpha$ -Aminoadipinsäure bei der Säurehydrolyse erhalten; und weiter aufgrund der Tatsache, dass die Absorption bei 3,19 p p m (3H, Singlett, Thiadiazol C-CH<sub>3</sub>) in dem kernmagnetischen Resonanzspektrum erhalten wird und auch 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol durch milde Hydrolyse erhalten wird, wird der Verbindung die vorstehend erläuterte Struktur zuerkannt, in die das heterocyclische Thiol eingeführt wurde.

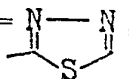
IV. 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure.



Additionsverbindung:  
2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol;

35



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung IV der Formel (II) ( $R^2 =$  ,  $M = H$ ) sind die folgenden:

- (1.) leicht gelb-weisses Pulver;  
(2.) sie zeigt keinen bestimmten Schmelzpunkt, jedoch erfolgen Braunverfärbung und Zersetzung bei etwa 175 bis  $180^\circ\text{C}$ ;  
(3.) leicht löslich in Wasser, schwach löslich in Methanol, jedoch in anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich;  
(4.) amphoterer Material mit positiver Ninhydrinreaktion;  
(5.) ergibt das in Fig. 7 dargestellte Ultraviolett-Absorptionsspektrum bei Messung in einer 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 6,4, Absorptionsmaximum bei 274 m $\mu$ ;  
(6.) es wird das in Fig. 8 dargestellte Infrarot-Absorptionsspektrum erhalten, wenn mit der Kaliumbromid-Tablette gemessen wurde, wobei die Absorptionen bei  $3400\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$ ,  $1765\text{ cm}^{-1}$ ,  $1610\text{ cm}^{-1}$ ,  $1515\text{ cm}^{-1}$  und  $1365\text{ cm}^{-1}$  liegen;  
(7.) das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als externer Standard in schwerem Wasser, ergibt die folgenden Signale:  
 $\delta$  Wert (p p m):  
2,30 (4H, Multipllett), 2,93 (2H, Multipllett), 3,69 - 4,29 (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz), 3,97 (3H, Singlett), 4,26 (1H, Multipllett), 4,45 - 4,99 (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz), 5,56 (1H, Singlett), 9,85 (1H, Singlett);

- (8.) das derzeit im reinsten Zustand erhaltene Produkt besitzt die folgenden elementaranalytischen Werte:  
C: 37,53%, H: 4,36%, N: 12,77%, S: 16,42%;
- (9.) es wird  $\alpha$ -Aminoadipinsäure bei der Hydrolyse mit 6 n Chlorwasserstoffsäure erhalten. Es wird auch 2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol bei der Hydrolyse in Methanol mit Dowex 50 W (H-Typ) erhalten.

Berücksichtigt man alle Ergebnisse, so ergibt sich, dass die Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung ergibt im Infrarot-Absorptionsspektrum eine Absorption bei  $1765\text{ cm}^{-1}$ , und es werden die Signale bei 3,97 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>), 5,56 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 3,69 - 4,29 p p m (2H, Quartett, J = 18 Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 4,45 - 4,99 (2H, Quartett, J = 14 Hz, 3-Seitenkette CH<sub>2</sub>), erhalten.  $\alpha$ -Aminoadipinsäure wird durch Säurehydrolyse erhalten. Aus den Tatsachen, dass die Absorption bei 9,85 p p m (1H, Singlett, Thiazol CH) im kernmagnetischen Resonanzspektrum vorhanden ist und 2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol bei milder Hydrolyse erhalten wird, ist der Verbindung die zuvor genannte Struktur zugeordnet worden, in die das heterocyclische Thiol eingeführt worden ist.

Nachfolgend werden die Ergebnisse von verschiedenen chromatographischen Analysen und papierelektrophoretischen Untersuchungen der als Zwischenprodukte hergestellten Verbindungen I, II, III und IV mit der Formel (II) angegeben.

Die erhaltenen Rf-Werte dieser Verbindungen in der Dünnschichtchromatographie unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel SF) sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

	1	2	3
Hergestellte Verbindung I	0,39	0,37	0,32
hergestellte Verbindung II	0,39	0,34	0,31
hergestellte Verbindung III	0,43	0,43	0,40
hergestellte Verbindung IV	0,39	0,38	0,33
Cephalosporin C	0,37	0,36	0,31
7-Methoxycephalosporin C	0,41	0,36	0,32
Cephameycin C	0,37	0,36	0,31
Y-G19Z-D3	0,26	0,26	0,22
Y-G19Z-D2	0,39	0,32	0,26

Verwendetes Entwicklungslösemittelsystem (Volumenverhältnis):

- Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9).
- n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2).
- n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5).

Die Kontrollprobe, Cephameycin C ist 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure.

Die Verbindungen Y-G19Z-D3 und Y-G19Z-D2, die in den vorstehenden Vergleichsuntersuchungen verwendet wurden, sind neue 7-Methoxycephalosporin-Verbindungen, die zuvor aus der Kulturflüssigkeit des Streptomyces oganensis durch die gleichen Erfinder (vgl. Japanische Patentanmeldungen Nr. 109 753/'74 und 146 593/'75) isoliert worden sind.

Die Rf-Werte, die bei der Papierverteilungschromatographie unter Verwendung von Wattman Nr. 1 Filterpapier und einem Entwicklungslösemittelsystem aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) bestimmt wurden, lauten:

	Rf-Wert
10 Hergestellte Verbindung I	0,40
hergestellte Verbindung II	0,39
Cephalosporin C	0,36
15 7-Methoxy-cephalosporin C	0,40
Cephameycin C	0,35
Y-G19Z-D3	0,24
20 Y-G19Z-D2	0,25

Dann wurden die Verbindungen unter Verwendung einer Hitachi 635 Hochgeschwindigkeits-Flüssigkeitschromatographie-Apparatur analysiert und dadurch folgende Resultate erzielt:

Säule: 3 × 500 mm Säule aus rostfreiem Stahl.

Kunstharz: Hitachi 2610 (kationisches Austauschharz).

Entwicklungslösemittelsystem: 0,2 M Citratpufferlösung (pH 3,6).

Fließgeschwindigkeit: 0,6 ml/min.

Schreibträgergeschwindigkeit: 1,0 cm/min.

	Retentionszeit
35 Hergestellte Verbindung I	5 min 33 sec
hergestellte Verbindung II	6 min 00 sec
40 hergestellte Verbindung III	9 min 35 sec
Cephalosporin C	5 min 18 sec
7-Methoxy-cephalosporin C	5 min 09 sec
Cephameycin C	5 min 18 sec
45 Y-G19Z-D3	3 min 42 sec
Y-G19Z-D2	3 min 42 sec

Nachstehend werden weitere Ergebnisse von Analysen unter Verwendung der vorstehend erläuterten Apparatur, die unter folgenden Bedingungen erhalten wurden, in der Tabelle angegeben:

Säule:  $\mu$  Bondapa C<sub>18</sub> (Hersteller: Waters Ltd.)

4 × 300 mm.

55 Entwicklungslösemittel-System: Acetonitril : 0,1% Essigsäurelösung (pH 3,3) (1 : 9 im Volumenverhältnis).

Fließgeschwindigkeit: 0,8 ml/min.

Schreibträgergeschwindigkeit: 1,0 cm/min.

	Retentionszeit
hergestellte Verbindung I	3 min 14 sec
hergestellte Verbindung II	1 min 52 sec
65 hergestellte Verbindung III	2 min 55 sec
hergestellte Verbindung IV	1 min 56 sec

Die durch Hochspannungs-Papierelektrophorese erhaltenen Ergebnisse sind die folgenden:

Filterpapier: Wattman Nr. 1.

Entwicklungslösemittel: 10%ige Essigsäure (pH 2,2).

Spannung: 42 Volt/cm.

Laufzeit: 1 Stunde.

	Migrationsentfernung
Hergestellte Verbindung I	— 3,6 cm
hergestellte Verbindung II	— 3,3 cm
hergestellte Verbindung III	— 3,6 cm
hergestellte Verbindung IV	— 3,9 cm
Cephalosporin C	— 3,5 cm
7-Methoxy-cephalosporin C	— 3,4 cm
Cephameycin C	— 3,5 cm
Y-G19Z-D3	— 6,1 cm
Y-G19Z-D2	— 6,1 cm
Cysteinsäure	— 7,5 cm
Glutathion	— 1,2 cm

Dann wurde die antibakterielle Aktivität der als Zwischenprodukte hergestellten Verbindungen I, II, III und IV der Formel (II) bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammen mit jenen von Cephalosporin C als Vergleichssubstanz angegeben.

Herzinfusions-Agar      Plattenmethode (verwendete 500  $\gamma$ /ml-Lösung).

Die Zahlenwerte in der Tabelle geben den Durchmesser (mm) der Inhibitionszone an.

	I	II	III	IV	C
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	0	0	0	0	14,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	0	0	0	0	12,8
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	0	0	0	23,1
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	19,2	18,7	14,2	13,0	10,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21,8	23,5	23,0	23,0	13,0
<i>Salmonella gallinarum</i>	24,0	25,2	23,5	25,1	23,5
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19	22,6	20,2	20,0	21,0	17,5
<i>Proteus mirabilis</i> IMF OM-9	22,2	19,8	19,5	23,0	23,0

Bemerkung: I: Verbindung I  
 II: Verbindung II  
 III: Verbindung III  
 IV: Verbindung IV  
 C: Cephalosporin C (Vergleich)

} Zwischenprodukte der Formel (II)

Als Ergebnis von weiteren fortgesetzten Untersuchungen des vorstehend erläuterten Themas haben die Erfinder wei-

ter gefunden, dass die Verbindung der Formel (II) in die Verbindung der Formel (I) überführt werden kann durch die Wirkung des Mycels des D-Aminosäure oxydierenden Enzym herstellenden Stammes, der zum Genus *Trigonopsis* oder des behandelten Mycels mit der Verbindung der Formel (II) oder deren Salz gehört oder weiter der fermentierten Gärbrühe, die diese enthält, und da die Verbindung der Formel (I) leicht in organischem Lösungsmittel aufgelöst werden kann, welches die Trennungs- und Reinigungsstufe erheblich vereinfacht.

Die so hergestellten Verbindungen der Formel (I) besitzen ausgezeichnete antimikrobielle Aktivitäten. Sie sind auch zusätzlich als Zwischenprodukte zur Herstellung von 7-Methoxycephalosporin-Derivaten zu gebrauchen, denen in die 7-Position andere Acylgruppen eingeführt worden sind, denn diese Verbindungen sind in organischen Lösungsmitteln löslich.

In dieser Ausführungsform der Erfindung wird der D-Aminosäure oxydierende Enzym herstellende Stamm, der zum Genus *Trigonopsis* gehört, passend verwendet. Ein derartiger Stamm kann aus der Typkultur ausgesucht werden, die in Stämme-Aufbewahrungsinstituten aufgehoben werden, oder er kann aus Erde isoliert werden.

Auch können zur Erholung der Bildungsaktivität des herzustellenden Materials der (I) Mutanten verwendet werden, die aus den vorerwähnten Stämmen durch übliche Vorrichtungen hergestellt werden. Die Verwendung solcher Mutanten ist kostengünstig. Als der Mikroorganismus, der die vorerwähnte D-Aminosäure oxydierende Enzym-Aktivität besitzt, wird zur Verdeutlichung *Trigonopsis variabilis* genannt. Dieser Stamm ist vom Institut für Fermentation, Osaka (Japan) unter der Stamm-Nr. IFO 0755 (ATCC 10679) und Stamm-Nr. IFO 0671 erhältlich.

Zur Herstellung der Verbindungen der Formel (I) unter Verwendung des Mikroorganismus, der eine solche D-Aminosäure oxydierende Enzym-Aktivität aufweist, wird es gewöhnlich bevorzugt, dass der Mikroorganismus erst kultiviert wird und das so erhaltene Mycel oder das so behandelte Mycel zu der Cephalosporin-Verbindung der allgemeinen Formel (II) unter geeigneten Bedingungen gebracht wird.

Als Kultivationsmethode zur Herstellung des Mycels wird es jedoch gewöhnlich bevorzugt, die aerobe Kultivierung zu verwenden. In einer bevorzugteren Ausführungsform wird eine flüssige Kultivierung unter Rühren und Belüftung verwendet. Herkömmliche Kulturmedien können für dieses Verfahren Verwendung finden.

So können synthetische Kulturmedien, halb-synthetische Kulturmedien oder natürliche Kulturmedien als Zubereitung für das Kulturmedium verwendet werden, wie Glukose, Sukrose, Mannitol, Glycerin, Dextrin, Stärke, vegetables Öl als Kohlenstoffquelle und Fleischextrakt, Pepton, Glutenmehl, Baumwollsaatmehl, Sojabohnenmehl, Erdnussmehl, Fischmehl, Kornschlempe, Trockenhefe, Hefeextrakt, Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat, Harnstoff und andere organische und anorganische Stickstoffverbindungen als Stickstoffquelle.

Ebenso werden, falls erforderlich, Metallsalze, wie Sulfate, Nitrate, Chloride, Carbonate, Phosphate usw. von Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Zink, Eisen usw. zu dem Kulturmedium hinzugefügt. Weiterhin werden, falls erforderlich, Methionin, Cystein, Cystin, Methylolact, Lardöl, Silikonöl, oberflächenaktive Mittel usw. dem Kulturmedium als ein Bildungs- oder Entschäumungsmittel zugesetzt. Die gewünschten Resultate werden durch Aufrechterhalten des pH des Kulturmediums bei etwa 4 - 10, vorzugsweise 5 - 6, erhalten.

Besonders wenn das Kulturmedium D-(oder DL-)Aminosäure, wie beispielsweise D-(oder DL-)Methionin, D-(oder

DL-)Alanin, D-(oder DL-)Valin usw. enthält, wird eine ausgezeichnete D-Aminosäure oxydierende Enzym-Aktivität erhalten. Die Kultivationstemperatur beträgt gewöhnlich 18 bis 37°C, vorzugsweise etwa 30°C. Der Zeitraum der Kultivierung ist unterschiedlich gemäss den Kultivationsbedingungen, insbesondere in Abhängigkeit von der Kultivationsapparatur, der Zusammensetzung des Kultivationsmediums, der Temperatur usw. Es wird jedoch bevorzugt, die Kultivierung zu vervollständigen, wenn die D-Aminosäure oxydierende Enzym-Aktivität ein Maximum besitzt. Gewöhnlich werden 2 - 10 Tage für die Kultivierung benötigt. Das so erhaltene Mycel oder das behandelte Mycel wird für die D-Aminosäure-Oxydationsreaktion des Ausgangsmaterials der Formel (II) verwendet. In diesem Falle wird unter behandeltem Mycel das Mycel verstanden, welches in eine brauchbare Form zur Herstellung des gewünschten Materials der Formel (I) überführt wurde, indem die D-Aminosäure oxydierende Enzym-Aktivität durch die Anwendung einer geeigneten Behandlung gesteigert wurde. Beispielsweise ist die D-Aminosäure oxydierende Enzym-Aktivität, die in dem Verfahren dieser Erfindung benutzt wird, gewöhnlich im Mycel vorhanden, und deshalb bedeutet das behandelte Mycel den zellfreien Extrakt, der durch Anwendung physikalischer und/oder chemischer Einwirkungen auf das Mycel gewonnen wurde, das aus dem Kultivationsprodukt der D-Aminosäure oxydierenden Enzym-Aktivität herstellenden Stämme gesammelt wurde, gewaschen wurde, oder teilweise oder vollständig gereinigtes D-Aminosäure oxydierendes Enzym, das aus dem zellfreien Extrakt durch Anwendung bekannter Enzymabtrennungs- und Reinigungsmethoden gewonnen wurde, oder weiterhin kann das aktivierte Mycel, das durch Kombinieren des partiell oder ganz gereinigten D-Aminosäure oxydierenden Enzyms mit einem wasserunlöslichen Polymer oder einem anorganischen Träger durch physikalische oder chemische Mittel erhalten worden ist, einen festen D-Aminosäure oxydierenden Enzym-Aktivator oder Mycel ergeben, und dann wird der Aktivator oder das Mycel einer Aktivationsbehandlung unterworfen.

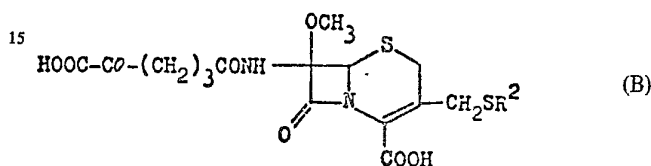
In dieser Erfindung ist die Herstellung und die Rückführung des vorstehend erläuterten löslichen Enzyms auf den praktischen Gebrauch beschränkt, aber die Verwendung des unlöslichen Enzyms, wie das aktivierte Mycel, ist besonders wirtschaftlich für den industriellen Gebrauch, wobei sie leicht abgetrennt und wiederverwendet werden können.

Die Aktivierungsbehandlung des Mycels, die vorstehend beschrieben ist, kann dadurch bewirkt werden, dass das Mycel eine gewisse milde Schädigung in einem solchen Ausmass erleidet, dass keine Zerstörung erfolgt.

Als Beispiel für eine solche Aktivationsbehandlung wird zur Verdeutlichung ein Verfahren genannt, bei dem das Mycel auf eine Temperatur unterhalb -10°C bei einem pH von etwa 3-4 eingefroren wird, dann aufgetaut und mit einem Lösungsmittel behandelt wird, wobei das Mycel in einem Bad von einem oder mehreren organischen Lösungsmitteln, wie Aceton, n-Butanol, 2-Phenyläthanol, Diäthyläther, Cyclohexan, Benzol, Toluol etc., behandelt wird, ein Verfahren, wobei das Mycel mit 0,1-10% oberflächenaktivem Mittel behandelt wird, beispielsweise einem kationischen oberflächenaktiven Mittel, wie Cetyltrimethylammonium, Cetylpyridiniumcetyltrimethylbenzyl-Ammoniumhalid usw., einem anionischen oberflächenaktiven Mittel, wie Dodecylsulfat, einem Alkalimetallalkylarylsulfonat, Natriumdesoxycholat usw., und einem nichtionischen oberflächenaktiven Mittel, wie Sorbitanmonolaurat, Triton X-100 usw., in ihrer wässrigen Lösung, ein Verfahren, bei dem das Mycel mit einer verdünnten wässrigen Lösung von Kaliumhydroxid oder Natriumhydroxid behandelt wird, oder ein Verfahren, bei dem das Mycel in einer Lösung suspendiert wird bei einem hohen osmotischen

Druck, beispielsweise 2 M Zuckerlösung, worauf die Lösung dann schnell mit Wasser verdünnt wird. Diese Aktivierungsbehandlungen sind durch verschiedene Faktoren beeinflusst, wie Temperatur, Zeitdauer der Bearbeitung, pH-Wert, der Konzentration des Reagenzes usw. Daher ist es erforderlich, die Aktivierungsbedingungen auszuwählen.

Auch wenn die Wirkung der Katalase, die gewöhnlich in einem Mycel vorhanden ist, nicht inhibiert wird, wird die oxydative Decarboxylierung zu dem gewünschten Material der Formel (I) nicht vollständig, um gemeinsam das 7-(5-Carboxy-5-oxo-6-oxo-7-methoxy-7-methoxy-cephalosporin-Derivat mit der allgemeinen Formel B



zu bilden.

Daher ist es erwünscht, um selektiv das gewünschte Material der Formel (I) zu erhalten, die Katalaseaktivität zu inhibieren. Beispiele für geeignete Katalase-Inhibitoren sind Ascorbinsäure, 3-Amino-1,2,4-triazol, Alkalimetallazide usw., und Natriumazid wird besonders bevorzugt. Der Inhibitor kann zu dem Reaktionsgemisch während der Umwandlung des Ausgangsmaterials der Formel (II) in das herzustellende Material der Formel (I) hinzugefügt werden. Auch das Mycel kann mit dem Inhibitor vorbehandelt werden bevor das Mycel für die vorstehend erläuterte Umwandlung Verwendung findet. Die Menge an Natriumazid, die für den angegebenen Zweck gebraucht wird, beträgt 1-100 mM. Weiterhin kann die Katalase in dem angegebenen Mycel inaktiviert werden, indem das Mycel einer Wärmebehandlung unterworfen wird, bevor es in der vorhin erwähnten Umwandlungsstufe verwendet wird. So kann das vorgenannte Mycel bei 40-60°C, vorzugsweise bei 50°C, für mindestens 3 Stunden vorbehandelt werden, wodurch die Katalaseaktivität erheblich abfällt, jedoch die D-Aminosäureoxydase-Aktivität bleibt unverändert. Die Wärmebehandlung des Mycels kann einfach durchgeführt werden, indem das Mycel in einer wässrigen Lösung oder einer Puffersuspension behandelt wird. Besonders wirksam ist es, das Mycel gleichzeitig der vorstehend erläuterten Wärmebehandlung und der «Aktivierungs»-Reagenzbehandlung zu unterwerfen. Beispielsweise kann durch Aktivationsbehandlung des Mycels bei 50°C für 4 Stunden unter Verwendung eines Lösungsmittels (Toluol) der Inhibitor der Katalaseaktivität und die Aktivierung des Mycels gleichzeitig durchgeführt werden.

Die Reaktion des Enzymsystems auf das vorstehend genannte aktivierte Mycel und das Ausgangsmaterial der Formel (II) wird gewöhnlich bei einem pH von 6-8 durchgeführt. Es ist wünschenswert, die Reaktion bei 30-40°C auszuführen. Der Zeitraum der Reaktion ist vor allem von der Potenz des Enzyms abhängig, gewöhnlich sind 1-5 Stunden erforderlich.

Da die vorstehend genannte Enzymreaktion unter aeroben Bedingungen ausgeführt wird, wird sie vorzugsweise unter Belüftung mit Luft oder Sauerstoff durchgeführt.

Wie schon erläutert, ist es schwierig, das Ausgangsmaterial der Formel (II) aus der fermentierten Brühe aufgrund der amphoteren Struktur zu extrahieren. Jedoch kann gemäss der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Abtrennung des hergestellten Produktes der Formel (I) unter einer geeigneten Bedingung aus der fermentierten Gärbrühe des Ausgangsmaterials der Formel (II) nach der Entfernung des Mycels durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass das hergestellte Material (I) leicht durch Lösungsmittel-

extraktion oder durch Adsorption mittels Ionenaustauscherharz abgetrennt werden kann.

Beispielsweise wird das Reaktionsproduktgemisch angesäuert unterhalb von pH 2,5, und dann wird das hergestellte Material aus dem Reaktionsgemisch mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel, wie Äthylacetat, n-Butanol usw., extrahiert. In diesem Falle liefert die Kombination eines Ionenaustauscherharzes und einer Lösungsmittelextraktion die besseren Ergebnisse. Geeignetes Ionenaustauscherharz ist ein flüssiges Amin-anionisches Austauscherharz. Beispiele für das bevorzugte Lösungsmittel sind Äthylacetat, Butylacetat, n-Butanol usw. Auch kann das hergestellte Produkt unter Verwendung von einem festen Ionenaustauscherharz vorgenommen werden. In diesem Falle kann ein geeignetes Lö-

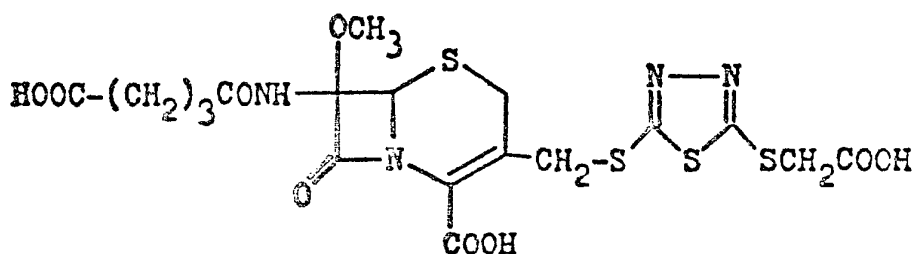
sungsmittel leicht durch eine geeignete Voruntersuchung gefunden werden.

Um das reine Produkt zu erhalten, werden gewöhnlich die üblichen Reinigungsmethoden für Antibiotika verwendet.

Das hergestellte Material der Formel (I) kann nicht nur im freien sauren Zustand abgetrennt werden, gewöhnliches Alkalimetallsalz, Erdalkalimetallsalz, organisches Aminsalz, usw.

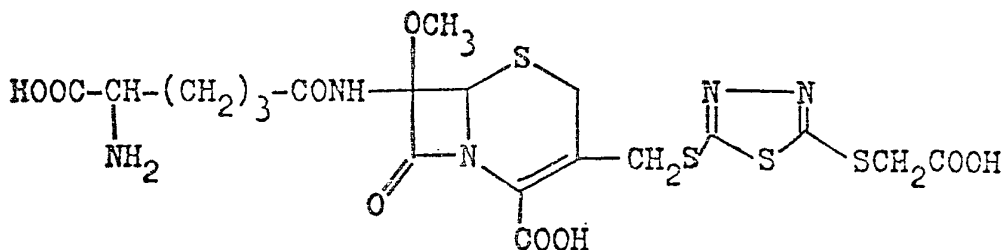
Einige neue 7-Methoxycephalosporin-Derivate der Formel (I), erhalten nach dem Verfahren dieser Erfindung werden nachfolgend zusammen mit ihren Eigenschaften beschrieben.

V. 7-(4-Carboxybutyramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure;



Ausgangsmaterial I:

7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure;



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung V der Formel I



50 sind die folgenden:

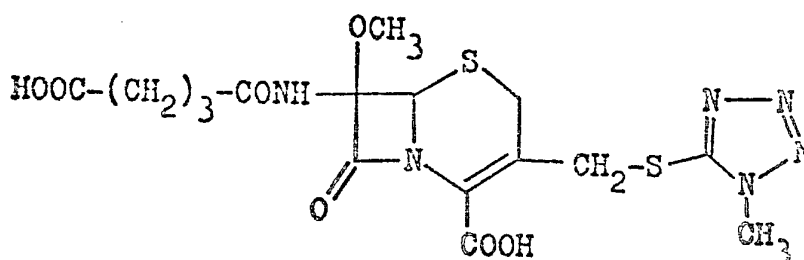
- (1.) weisses Pulver;
- (2.) Schmelzpunkt 75-78°C;
- (3.) leicht löslich in Methanol und Äthanol, löslich in Wasser, Äthylacetat, Butylacetat und Butanol, jedoch kaum löslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
- (4.) saures Material besitzt negative Ninhydrinreaktion;
- (5.) es zeigt das in Fig. 9 dargestellte Ultraviolett-Absorptionsspektrum, gemessen in einer 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 6,5, und das Absorptionsmaximum liegt bei 278 m $\mu$ ;
- (6.) Fig. 10 zeigt das Infrarot-Absorptionsspektrum aus der Messung mit der Kaliumbromid-Tablette und besitzt Absorptionen bei 3250 cm<sup>-1</sup>, 2925 cm<sup>-1</sup>, 1770 cm<sup>-1</sup>, 1715 cm<sup>-1</sup>, 1520 cm<sup>-1</sup>, 1380 cm<sup>-1</sup>;
- (7.) das kernmagnetische Resonanzspektrum unter Verwendung von TMS als innerer Standard in schwerem Methanol ist in Fig. 11 dargestellt und besitzt die folgenden Signale:  $\delta$  Wert (p p m): 1,93 (2H, Multipllett),

- 2,41 (4H, Multiplett), 3,51 (3H, Singlett), 3,37-3,81 (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz), 4,11 (2H, Singlett), 4,15-4,63 (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz), 5,05 (1H, Singlett);
- (8.) die folgenden elementar-analytischen Werte für  $C_{16}H_{20}N_4O_9S_1 \cdot 2H_2O$  werden erhalten:  
 ber.: C 35,99% H 4,03% N 9,33%  
 gef.: C 35,77% H 3,81% N 9,42%
- (9.) das Massenspektrum des hergestellten Materials V, gemessen nach der Hydrolyse des Materials in 6 n Chlorwasserstoffsäure für 2,5 Stunden bei 100°C, Extraktion des hydrolysierten Produktes mit Äthyläther, Trocknen des Produktes durch Abdampfen, und dann Silylieren mit BSA (Bis(trimethylsilyl)acetamid) ergibt das Fragment von  $m/e$  276 ( $(CH_3)_3Si-OOC-CH_2-CH_2-CH_2-COO-Si(CH_3)_3$ ).

Wenn man die vollständigen Gesamtergebnisse berücksichtigt, so ist ersichtlich, dass die hergestellte Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist. Dies ergibt sich aus der Gegenwart insbesondere der Absorption bei

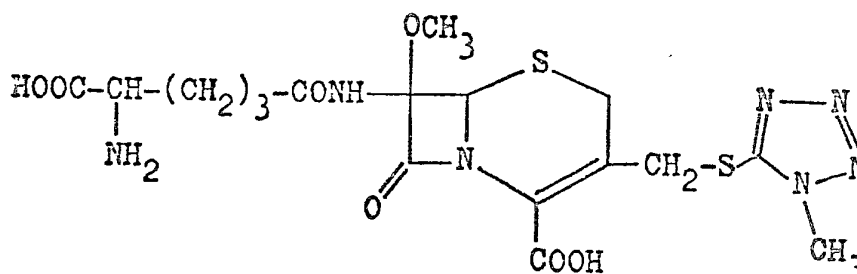
1770  $cm^{-1}$  (cyclisches Lactam) in dem Infrarot-Absorptionsspektrum, und der Signale bei 3,51 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>), 5,05 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 3,37-3,81 p p m (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 4,15-4,6 p p m (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz, 3-Seitenketten CH<sub>2</sub>), und weiter 4,11 p p m (2H, Singlett, CH<sub>2</sub> von -S-CH<sub>2</sub>-COOH) und weiter aus den Tatsachen, dass 1,93 p p m (2H, Multiplett,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>) und 2,41 p p m (4H, Multiplett,  $\alpha, \gamma$ -CH<sub>2</sub>) anwesend sind, wodurch die Anwesenheit von 4-Carboxybutyramido in dem kernmagnetischen Resonanzspektrum angezeigt wird, und das Massenspektrum des Derivates des hergestellten Materials, das mit Chlorwasserstoff hydrolysiert und silyliert wurde, das Fragment von  $m/e$  276 ergibt; die hergestellte Verbindung V dieser Erfindung besitzt die vorstehend angegebene Struktur, wobei die 5-Amino-5-carboxyvaleramido-Gruppe in der 7-Position des Ausgangsmaterials oxydativ deaminiert worden ist zur 4-Carboxybutyramido-Gruppe.

VI. 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure

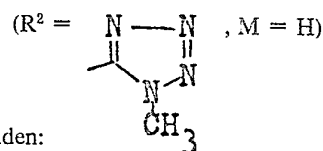


Ausgangsmaterial II:

7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure.



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung VI der Formel (I)



sind die folgenden:

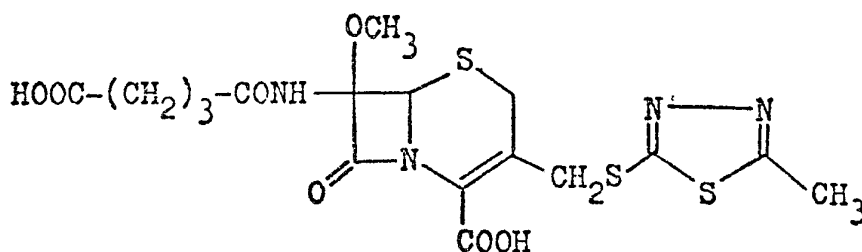
- (1.) weisses Pulver;
- (2.) Schmelzpunkt 80-83°C;
- (3.) leicht löslich in Methanol und Äthanol, löslich in Wasser, Äthylacetat, Butylacetat und Butanol, jedoch kaum löslich in anderen organischen Lösungsmitteln. Das Natriumsalz ist in Wasser leicht löslich;
- (4.) saures Material zeigt negative Ninhydrinreaktion;
- (5.) das erhaltene Ultraviolett-Absorptionsspektrum ist in Fig. 12 dargestellt; es wurde in 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 6,5 gemessen; das Absorptionsmaximum liegt bei 269 m $\mu$ ;
- (6.) das erhaltene Infrarot-Absorptionsspektrum ist in Fig. 13 dargestellt, gemessen mit der Kaliumbromid-Tablette, und besitzt die Absorptionen bei 3420  $cm^{-1}$ , 2940  $cm^{-1}$ , 1756  $cm^{-1}$ , 1680  $cm^{-1}$ , 1610  $cm^{-1}$ , 1525  $cm^{-1}$ , 1390  $cm^{-1}$ ;

- (7.) das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als innerer Standard in schwerem Methanol gibt die in Fig. 14 dargestellten Signale:  $\delta$  Wert (p p m): 1,94 (2H, Multiplett), 2,40 (4H, Multiplett), 3,51 (3H, Singlett), 3,40-3,83 (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz), 3,99 (3H, Singlett), 4,17-4,50 (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz), 5,02 (1H, Singlett);
- (8.) es werden die folgenden elementar-analytischen Werte für  $C_{16}H_{20}N_6O_7S_2 \cdot 2H_2O$  erhalten:  
 ber.: C 37,79% H 4,76% N 16,53%  
 gef.: C 37,78% H 4,75% N 16,41%
- (9.) das Massenspektrum des hergestellten Materials VI, gemessen nach der Hydrolyse des Materials in 6 n Chlorwasserstoffsäure für 2,5 Stunden bei 100°C, Extrahieren des hydrolysierten Produktes mit Äthyläther, Trocknen und Abdampfen und Silylierung mit BSA (Bis(trimethylsilyl)acetamid) ergibt das Fragment von  $m/z$  276  $(CH_3)_3Si-OOC-CH_2-CH_2-CH_2-COOSi(CH_3)_3$ .

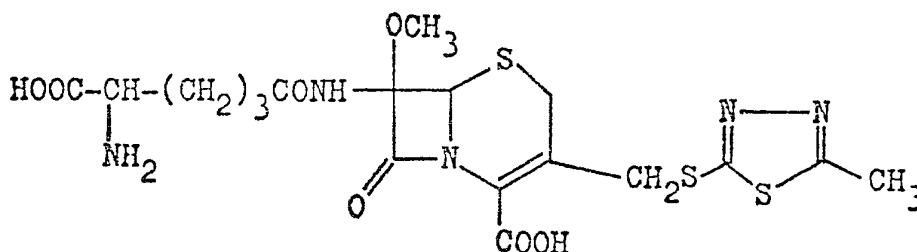
Berücksichtigt man die vorstehenden Gesamtergebnisse, so ergibt sich, dass die hergestellte Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, insbesondere die Existenz der Absorption bei  $1765\text{ cm}^{-1}$  (cyclisches Lactam) in dem Infrarot-Absorptionsspektrum und die Signale bei 3,51 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>), 5,02 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 3,99 p p m (3H, Singlett, N-CH<sub>3</sub> von Tetrazol), 3,40-3,83 p p m (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 4,17-4,50 p p m (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz, 3-Seitenketten CH<sub>2</sub>) und weiter aus den Tatsachen, dass anwesend sind 1,94 p p m (2H, Multiplett,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>) und 2,40 p p m (4H, Multiplett,  $\alpha, \gamma$ -CH<sub>2</sub>)

beweist die Existenz von 4-Carboxybutyramido in dem kernmagnetischen Resonanzspektrum und weiter das Massenspektrum des Derivates des hergestellten Materials, hydrolysiert mit Chlorwasserstoffsäure und silyliert, ergibt das Fragment von  $m/e$  276; die hergestellte Verbindung VI dieser Erfindung hat ergeben, dass sie die vorstehend angegebene Struktur besitzt und die 5-Amino-5-carboxyvaleramid-Gruppe in der 7-Position des Ausgangsmaterials oxydativ deaminiert wurde in die 4-Carboxybutyramid-Gruppe.

VII. 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:



Ausgangsmaterial III:



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung VII dieser Erfindung der Formel (I)

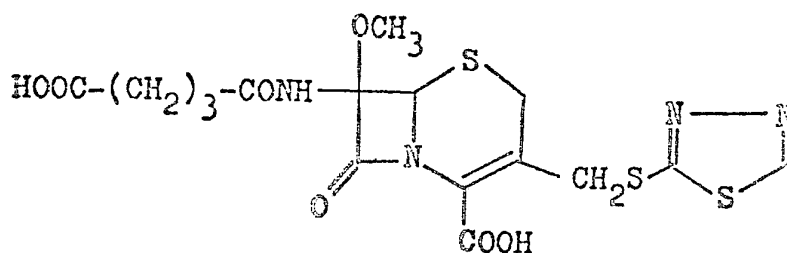
$R^2 =$   $CH_3, M = H)$  sind die folgenden:

- (1.) weises Pulver;
- (2.) Schmelzpunkt  $95-99^\circ\text{C}$ ;
- (3.) leicht löslich in Methanol und Äthanol, löslich in Wasser, Äthylacetat, Butylacetat und Butanol, aber kaum löslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
- (4.) saures Material ergibt negative Ninhydrinreaktion;
- (5.) es wurde das Ultraviolett-Absorptionsspektrum, wie in Fig. 15 dargestellt, erhalten, wenn in eine 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit pH 6,5 gemessen wurde. Das Absorptionsmaximum liegt bei  $273\text{ m}\mu$ ;
- (6.) es wird das Infrarot-Absorptionsspektrum gemessen als Kaliumbromid-Tablette erhalten und zeigt die Absorptionen bei  $3260\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$ ,  $1773\text{ cm}^{-1}$ ,  $1515\text{ cm}^{-1}$  und  $1375\text{ cm}^{-1}$ ;

- (7.) das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als innerer Standard in schwerem Methanol, ergibt die in Fig. 17 dargestellten Werte und besitzt die folgenden Signale:  
 $\delta$  Wert (p p m): 1,92 (2H, Multipl.) 2,40 (4H, Multipl.) 2,71 (3H, Singlett) 3,38-3,80 (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz) 3,51 (3H, Singlett) 4,17-4,64 (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz) 5,03 (1H, Singlett);
- (8.) es werden die folgenden elementar-analytischen Werte für  $C_{17}H_{29}N_4O_7S_3$  erhalten:  
 ber.: C 41,79% N 4,13% N 11,47%  
 gef.: C 41,89% H 4,27% N 11,17%
- (9.) Das Massenspektrum des hergestellten Materials VII, gemessen nach der Hydrolyse des Materials in 6 n Chlorwasserstoffsäure in 2,5 Stunden bei 100°C, Extrahieren des Produktes mit Äthyläther, Trocknen des Extraktes durch Abdampfen, Silylieren mit BSA (Bis(trimethylsilyl)acetamid) ergibt das Fragment von m/e 276 ( $(CH_3)_3Si-OOC-CH_2-CH_2-CH_2-CO-OSi(CH_3)_3$ ). Berücksichtigt man die vorstehend genannten Ergebnisse, so ist ersichtlich, dass die hergestellte Verbindung eine

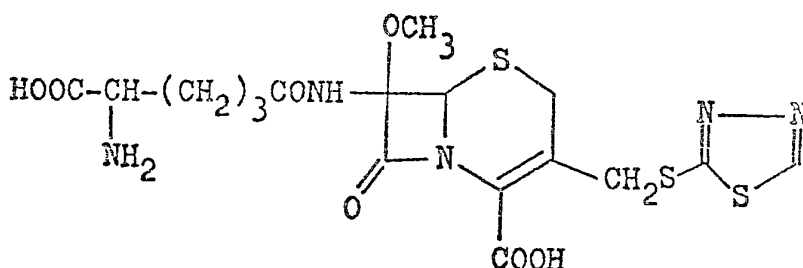
7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, insbesondere durch die Existenz der Absorption bei  $1773\text{ cm}^{-1}$  (cyclisches Lactam) in dem Infrarot-Absorptionsspektrum und die Signale bei 3,51 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>), 5,03 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 2,71 p p m (3H, Singlett, C-CH<sub>3</sub> von Thiadiazol), 3,38-3,80 p p m (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz, 2-CH<sub>2</sub>) und 4,17-4,64 p p m (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz, 3-Seitenketten CH<sub>2</sub>) und weiter aus den Tatsachen, dass 1,92 p p m (2H, Multipl.,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>) und 2,40 p p m (4H, Multipl.,  $\alpha,\gamma$ -CH<sub>2</sub>) anwesend sind, zeigen die Existenz von 4-Carboxybutyramid im kernmagnetischen Resonanzspektrum, und weiterhin ergibt das Massenspektrum des Derivates, hergestellt durch Hydrolyse der hergestellten Verbindung mit Chlorwasserstoffsäure und Silylieren des Produktes das Fragment von m/e 276. Der hergestellten Verbindung der Formel VII wurde die vorstehend angegebene Struktur zugesprochen, wobei die 5-Amino-5-carboxyvaleramido-Gruppe in der 7-Position des Ausgangsmaterials oxydativ deaminiert wurde in die 4-Carboxybutyramido-Gruppe.

VIII. 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:

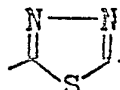


Ausgangsmaterial IV:

35 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung VII der Formel (I)

50 ( $R^2 =$  ,  $M = H$ ) sind die folgenden:

- (1.) weisses Pulver;
- 55 (2.) Schmelzpunkt  $88-92^\circ\text{C}$ ;
- (3.) leicht löslich in Methanol und Äthanol, löslich in Wasser, Äthylacetat, Butylacetat und Butanol, jedoch kaum löslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
- (4.) Saures Material besitzt negative Ninhydrin-Reaktion;
- 60 (5.) es wird das Ultraviolett-Absorptionsspektrum, wie in Fig. 18 dargestellt, erhalten, wenn in 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit pH 6,5, gemessen wurde; das Absorptionsmaximum liegt bei  $274\text{ m}\mu$ ;
- 65 (6.) es wird das Infrarot-Absorptionsspektrum, wie in Fig. 19 dargestellt, erhalten, wenn an einer Kaliumbromid-Tablette gemessen wurde; die Absorptionen liegen bei  $3250\text{ cm}^{-1}$ ,  $2925\text{ cm}^{-1}$ ,  $1770\text{ cm}^{-1}$ ,  $1515\text{ cm}^{-1}$  und  $1365\text{ cm}^{-1}$ ;



- (7.) das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter TMS als innerer Standard in schwerem Methanol, ergibt, wie in Fig. 20 dargestellt, die folgenden Signale:  $\delta$  Wert (p p m): 1,92 (2H, Multiplett), 2,40 (4H, Multiplett), 3,39-3,83 (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz), 3,51 (3H, Singlett), 4,25-4,73 (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz), 5,03 (1H, Singlett) und 9,35 (1H, Singlett);
- (8.) es werden die folgenden elementar-analytischen Werte für  $C_{16}H_{18}N_4O_7S_3 \cdot \frac{1}{2}H_2O$  erhalten:  
ber.: C 39,74% H 3,96% N 11,59%  
gef.: C 39,69% H 3,87% N 11,32%
- (9.) Das Massenspektrum der hergestellten Verbindung VIII, gemessen durch Hydrolyse der Verbindung in 6 n Chlorwasserstoffsäure für 2,5 Stunden bei 100°C, Extrahieren des Produktes mit Äthyläther, Trocknen des Extraktes durch Abdampfen und Silylieren mit BAS (Bis-trimethylsilylacetatamid) ergibt das Fragment von m/e 276 ( $CH_3)_3Si-OOC-CH_2-CH_2-CO-OSi(CH_3)_3$ .

Berücksichtigt man die vorstehenden Gesamtergebnisse, so ergibt sich, dass die Verbindung dieser Erfindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist. Dies wird abgestützt durch die Existenz der Absorption bei  $1770\text{ cm}^{-1}$  (cyclisches Lactam) in dem Infrarot-Absorptionsspektrum und den Signalen bei 3,51 p p m (3H, Singlett, 7-OCH<sub>3</sub>), 5,03 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 9,35 p p m (1H, Singlett, CH von Thiadiazol), 3,39-3,83 p p m (2H, Quartett,  $J = 18$  Hz, 2-CH<sub>2</sub>) und 4,24-4,73 p p m (2H, Quartett,  $J = 14$  Hz, 3-Seitenketten CH<sub>2</sub>) und weiter durch die Tatsachen, dass die Signale 1,92 p p m (2H, Multiplett, -CH<sub>2</sub>) und 2,40 p p m (4H, Multiplett, -CH<sub>2</sub>) anwesend sind, die die Existenz von 4-Carboxybutyramidoin dem kernmagnetischen Resonanzspektrum anzeigen, und weiterhin ergibt das Massenspektrum des Derivates, welches durch Hydrolyse der hergestellten Verbindung mit Chlorwasserstoffsäure und Silylierung des Produktes gewonnen wurde, das Fragment von m/e 276. Der hergestellten Verbindung VIII wurde die vorstehend angegebene Struktur zuerkannt, wobei die 5-Amino-5-carboxyvaleramido-Gruppe in der 7-Position des Ausgangsmaterials oxydativ deaminiert wurde in die 4-Carboxybutyramido-Gruppe.

Weiterhin zeigen die Analysenergebnisse der Dünnschichtchromatographie-Untersuchungen der Verbindungen V-VII der Formel (I) dieser Erfindung und Hochgeschwindigkeits-Flüssigkeitschromatographie, die in der folgenden Tabelle wiedergegeben sind, auch die Resultate, die für die Ausgangsmaterialien I-IV der Formel (II) erhaltenen Werte. Die Rf-Werte für die Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von mikrokristalliner Cellulose (Avicel) waren die folgenden:

TABELLE 1

	Lösungsmittelsystem		Ninhydrin Anfärbung
	1	2	
5 Ausgangsmaterial I	0,44	0,37	+
hergestellte Verbindung V	0,79	0,72	—
10 Ausgangsmaterial II	0,44	0,34	+
hergestellte Verbindung VI	0,81	0,64	—
Ausgangsmaterial III	0,42	0,44	+
hergestellte Verbindung VII	0,82	0,77	—
15 Ausgangsmaterial IV	0,42	0,36	+
hergestellte Verbindung VIII	0,81	0,65	—
20 7-(5-Amino-5-carboxy-valeramido)-3-[(3-p-hydroxyphenyl-2-methoxypropenoyl)oxymethyl]-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure	0,66	0,67	+
25 7-(4-Carboxybutyramido)-3-[(3-p-hydroxyphenyl-2-methoxypropenoyl)oxymethyl]-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure	0,67	0,67	—

Entwicklungslösungsmittelsystem:

1. Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser  
(21 : 3 : 7 : 9 Volumenverhältnis)
- 35 2. n-Butanol : Essigsäure : Wasser  
(4 : 1 : 2 Volumenverhältnis)

Nachweis: Ninhydrinreaktion oder Ultraviolettabsorption (Manasulu Light, 2536 Å) oder Bioautographie (unter Verwendung von Proteus mirabilis).

Die vollständigen Verbindungen geben positive Ergebnisse in den letzten beiden Testen.

Die Ergebnisse der Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

TABELLE 2

	Retentionszeit
50 Ausgangsmaterial I	3 Min. 14 Sek.
hergestellte Verbindung V	13 Min. 24 Sek.
55 Ausgangsmaterial II	1 Min. 53 Sek.
hergestellte Verbindung VI	4 Min. 54 Sek.
Ausgangsmaterial III	2 Min. 55 Sek.
60 hergestellte Verbindung VII	11 Min. 18 Sek.
Ausgangsmaterial IV	1 Min. 56 Sek.
hergestellte Verbindung VIII	5 Min. 28 Sek.
65 benutzte Säule: Waters LTD	$\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>

Lösungsmittelsystem : Acetonitril : 0,1% Essigsäure (pH 3,3)  
(1 : 9 im Volumenverhältnis)

Die Retentionszeiten der beiden Cephalosporinverbindungen bei der Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie waren die folgenden:

	Retentionszeit
7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-[(3-p-hydroxyphenyl-2-methoxypropenoyl)-oxymethyl]-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure	5 Min. 18 Sek.
7-(4-Carboxybutyramido)-3-[(3-p-hydroxyphenyl-2-methoxypropenoyl)-oxymethyl]-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure	5 Min. 55 Sek.
benutzte Säule: Waters Ltd.	$\mu$ Bondapak C 18

Lösungsmittelsystem: Acetonitril : 0,1% Essigsäure (pH 3,3) (2 : 8 Volumenverhältnis)

Die in vivo Effekte der Verbindungen II, III, VI und VII sind nachstehend angegeben:

An 5 gesunde, männliche Mäuse des ddY Stammes wurden  $10^6$  Zellen von *E. coli* NIHJ intraperitoneal injiziert. Nach 2 Stunden wurde jede Probe subkutan verabreicht. Die Überlebensprozentangaben nach 5 Tagen werden in der folgenden Tabelle angegeben. Ähnliche Untersuchungen wurden mit  $10^5$  Zellen von *Proteus mirabilis* 1287 ausgeführt.

Die Kontrollgruppe bestand jedesmal aus 10 Mäusen

	<i>E. coli</i> NIHJ				<i>Proteus mirabilis</i> 1287			
Dosis (mg/Maus)	3	1	0,5	0	3	1	0,5	0
Probe								
II	100	100	100	0	40	20	0	0
VI	100	100	0	0	60	20	0	0
III	80	80	40	0	100	20	20	0
VII	80	60	0	0	40	20	20	0

Nachstehend werden die Beispiele dieser Erfindung im einzelnen verdeutlicht.

#### Beispiel 1

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxy-methylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure I als Zwischenprodukt der Formel (II): Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in eine 500 ml Sakaguchiflasche mit je 100 ml eingefüllt und bei 120°C für 20 Minuten sterilisiert. Jede Flasche wurde mit *Streptomyces oganensis* Y-G19Z-Stamm beimpft und 48 Stunden bei 30°C kultiviert.

In weiteren Ansätzen wurde das gleiche Kulturmedium in 2000 ml Sakaguchiflaschen mit je 400 ml gefüllt und bei 120°C für 20 Minuten sterilisiert. Es wurde mit dem gleichen Stamm in einer Konzentration von 2-3% beimpft und 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um eine Kultur zu erhalten.

Weiterhin wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutemehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casamino-säure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, jeweils in zwei 100 Liter Fermentoren zusammen mit 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel eingefüllt. Es wurde 30 Minuten bei 120°C sterilisiert. Jedes Medium wurde mit 800 ml der Züchtungskultur beimpft, und dann wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert. In wässriger Natriumhydroxydlösung wurde 5-Mer-capto-1,3,4-thiadiazol-2-thioessigsäure aufgelöst, und die gebildete Lösung wurde bei hohem Druck sterilisiert und zu jedem Fermentor bis zu 0,05% des Impfmateri-als zugegeben und dann wurde 90 Stunden kultiviert.

Nach vollständiger Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und dann mit Radiolite (als Filterhilfsmittel) vermischt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die Filtrate wurden miteinander vereinigt, und es wurden 100 Liter Filtratgemisch erhalten. Die Filtrate wurden auf pH 3,0 mit wässriger Natriumhydroxid-lösung eingestellt und durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2 Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem Aceton eluiert. Das Eluat wurde gesammelt und eingengt auf 5,5 Liter. Nach Entfernung der sich gebildeten Verunreinigungen wurde Wasser zu dem Rückstand hinzugefügt, um 10 Liter Lösung zu erhalten. Die so erhaltene Lösung wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäure-lösung eingestellt und dann durch eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ)-Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit 6 Liter Wasser wurde mit wässriger Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurden etwa 5 Liter Lösung mit antimikrobiellem aktivem Material erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, durch eine ein Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben, und nach dem Waschen der Säule mit Wasser wurde die Säule mit wässrigem 50%igem Aceton gewaschen. Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung mit antimikrobiellem aktivem Material erhalten. Durch Lyophilisierung der Lösung wurde etwa 18 g Rohprodukt der hergestellten Verbindung 1 erhalten.

Dann wurde 18 g des rohen Pulvers einer Säulenchromatographie unter Verwendung von etwa 800 ml DEAE-Sephadex A-25 (Essigsäure-Typ) unterworfen. Die Säule war mit einer kleinen Menge 0,5 M Ammoniumbromid-Essigsäurepufferlösung gefüllt. Es wurde in die effektiven Komponenten fraktioniert. Die erhaltenen antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt, durch eine 500 ml Amberlite XAD-2-Säule gegeben, und nach dem Waschen der Säule mit Wasser wurde die Säule mit einer wässrigen 25%igen Acetonlösung eluiert. Die erhaltenen Eluate wurden zum Trocknen eingedampft.

Dann wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : Wasser (7 : 3 Volumenverhältnis) verwendet, um den erhaltenen Rückstand des Produktes einer Säulenchromatographie unter Verwendung von mikrokristalliner Cellulose (Avice), präpariert mit einem Lösungsmittelgemisch der gleichen, vorstehend angegebenen Zusammensetzung, zu unterwerfen. Die erhaltene antimikrobiell aktive Fraktion wurde tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avice SF aufgetragen, und mit einem Gemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 Volumenverhältnis) entwickelt. Dann wurde Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin aufgesprüht und anschliessend erwärmt, um die Färbung zu entwickeln. Dann wurden die Fraktionen mit einem Rf-Wert von 0,39 gesammelt, die Fraktion im Vakuum bei etwa 45-50°C zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde einer Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avice) unterworfen. Die Füllung war mit einem

Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 Volumenverhältnis) präpariert. Die so erhaltene antimikrobiell aktive Fraktion wurde dann einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF unter Verwendung des vorstehend genannten Lösungsmittelgemisches unterworfen und unter gleicher Nachbehandlung weiterverarbeitet. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Produktrückstand wurde mit mikrokristalliner Cellulosesäulenchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 im Volumenverhältnis) weitergereinigt. Die gereinigte aktive Fraktion wurde zur Trockne eingedampft und dann in einer kleinen Mengen destilliertem Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde in einer Säule Sephadex G-10 unter Verwendung von Wasser entwickelt. Die Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität wurden gesammelt und einer Dünnschichtchromatographie, wie schon vorstehend erläutert, unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 im Volumenverhältnis) unterworfen. Die Fraktionen mit Rf-Werten 0,32 wurden gesammelt, eingengt und dann einer Lyophilisation unterworfen. Es wurden etwa 80 mg weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiodiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäss den Angaben im Beispiel 10 zum Endprodukt weiter umgesetzt.

#### Beispiel 2

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure II als Zwischenprodukt der Formel (II):

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefextrakt, 0,1% Dicaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchi-Flaschen mit jeweils 100 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Dann wurde jedes Medium mit Streptomyces oganensis Y-G19Z-Stamm beimpft. Anschliessend wurde 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Dann wurde das schon genannte Kulturmedium in zwei Liter Sakaguchiflaschen mit jeweils 400 ml eingefüllt. Nach dem Sterilisieren für 20 Minuten bei 120°C wurde jedes Medium mit 2-3% der vorstehend erhaltenen Kulturbrühe beimpft und anschliessend weitere 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um einen Impfansatz zu erhalten.

60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenöl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminsäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, wurde in zwei Liter Fermentoren mit jeweils 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel gefüllt. Nach dem Sterilisieren für 30 Minuten bei 120°C wurde jedes Medium mit 800 ml des vorstehend hergestellten Impfansatzes versetzt, und anschliessend wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert. Dann wurde 1-Methyl-5-mercapto-1H-tetrazol in wässriger Natriumhydroxidlösung aufgelöst. Die Lösung wurde bei hohem Druck sterilisiert und zu der Kulturbrühe hinzugefügt, um deren Konzentration auf 0,05% einzustellen. Das Gemisch wurde 90 Stunden weiter kultiviert.

Nach vollständiger Kultivierung wurde die so gebildete Kulturbrühe auf pH 2.0 eingestellt und dann mit Radiolite als Hilfsmittel zum Filtrieren unter Rühren versetzt. Das Gemisch unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die erhaltenen Filtrate wurden vereinigt, und es wurden etwa 100 Liter Filtratgemisch erhalten.

Das Filtrat wurde auf pH 3.0 mit wässriger Natriumhydroxidlösung eingestellt, durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben, und nach dem Waschen der Säule mit 30 Liter Wasser wurde die Säule mit 30 Liter einer wässe-

rigen 50%igen Acetonlösung eluiert. Das Eluat wurde auf 5,5 Liter eingengt, und das Konzentrat wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und durch eine Dreiliter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ)-Säule geleitet. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, fraktioniert. Es wurden etwa 5 Liter einer Lösung, die ein antimikrobiell aktives Material enthielt, erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, durch eine Einliter Amberlite XAD-2-Säule gegeben, mit Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung von 50%igem Aceton eluiert. Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung, die das antimikrobiell aktive Material enthielt, gewonnen. Durch Lyophilisierung der Lösung wurde etwa 54 g des rohen Pulvers der hergestellten Verbindung II erhalten. Das rohe Pulver wurde einer Säulenchromatographie mit etwa 800 ml DEAE Sephadex A-25 (Essigsäure-Typ), gefüllt mit einer kleinen Menge 0,5 M Ammoniumbromid-Essigsäurepufferlösung, unterworfen, um die aktiven Komponenten zu fraktionieren. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt, durch eine 500 ml Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung von 25%igem Aceton eluiert. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt und dann im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Der gebildete Rückstand wurde der Säulenchromatographie unter Verwendung von mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen, gefüllt mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : Wasser (7 : 3 Volumenverhältnis) unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches mit der vorstehend angegebenen Zusammensetzung. Die erhaltene antimikrobiell aktive Fraktion wurde gesammelt, tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen, mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 Volumenverhältnis) entwickelt und eine Lösung von 0,25% Ninhydrin in Pyridin wurde aufgesprüht, und anschliessend wurde durch Erwärmen die Anfärbung entwickelt. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,31 gesammelt. Die Fraktionen wurden unter vermindertem Druck eingengt und getrocknet. Der gebildete Rückstand wurde einer Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen. Die Füllung war mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 Volumenverhältnis) präpariert. Die erhaltenen antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF mit dem Lösungsmittelgemisch mit der zuvor genannten gleichen Zusammensetzung unterworfen, wobei die gleiche Prozedur, wie vorstehend angegeben, angewendet wurde. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Der so gebildete Rückstand wurde einer mikrokristallinen Cellulosesäulenchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 Volumenverhältnis) unterworfen, um effektive Komponente zu reinigen. Die so gereinigte aktive Fraktion wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Sephadex G 10-Säule unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität wurden gesammelt und einer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 Volumenverhältnis), wie vorstehend angegeben, unterworfen. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,31 gesammelt, konzentriert und dann lyophilisiert. Es wurde etwa 60 mg weisses 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetra-

zol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäss den Angaben im Beispiel 8 Abschnitt b) zum Endprodukt weiter umgesetzt.

### Beispiel 3

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure III als Zwischenprodukt der Formel (II):

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchiflaschen mit je 100 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Jedes Medium wurde dann mit *Streptomyces oganensis* Y-G19Z Stamm beimpft und 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Ein weiteres Kulturmedium, wie vorstehend beschrieben, wurde in Zweiliter Sakaguchiflaschen mit je 400 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Jedes Medium wurde mit der vorstehend kultivierten Brühe mit einer 2-3%igen Konzentration beimpft und dann 24 Stunden bei 30°C kultiviert, wodurch eine Animpfkultur erhalten wurde.

Separat wurden je 60 Liter des Kulturmediums, das 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminsäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, in zwei 100 Liter Fermentoren zusammen mit 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel gefüllt. Es wurde 30 Minuten bei 120°C sterilisiert und mit 800 ml der Animpfkultur beimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert. Dann wurde 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol in wässriger Natriumhydroxidlösung gelöst und unter hohem Druck sterilisiert und zu der Kulturbrühe hinzugegeben, so dass die Konzentration davon 0,05% in der Brühe betrug, worauf 90 Stunden weiter kultiviert wurde.

Nach beendeter Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Rühren vermischt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert und die Filtrate wurden vereinigt und ergeben etwa 100 Liter Filtratgemisch.

Das Filtrat wurde auf pH 3,0 eingestellt durch Zugabe von wässriger Natriumhydroxidlösung und dann durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen. Es wurde mit 30 Liter wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde auf 5,5 Liter eingeeengt, und das Konzentrat wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und durch eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ) Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen. Es wurde mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurde etwa 5 Liter eines antimikrobiell aktiven Materials erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt und durch eine Einliter-Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit Wasser wurde die Säule mit einer wässrigen Lösung von 50%igem Aceton eluiert. Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung, die das antimikrobiell aktive Material enthielt, gewonnen. Das Produkt wurde lyophilisiert.

Unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 Volumenverhältnis) wurde der gebildete Rückstand einer Säulenchromatographie unterworfen unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel), gefüllt mit dem Lösungsmittelgemisch der vorstehend angegebenen gleichen Zusammensetzung. Dann wurden die erhaltenen antimikrobiell aktiven Fraktionen fraktioniert und tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte von Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch Iso-

propanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) entwickelt. Eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin wurde übersprüht und unter Erwärmen die Anfärbung entwickelt. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockne bei 45-50°C gebracht. Der erhaltene Rückstand wurde der Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen. Die Säule war präpariert mit einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril : Wasser (7 : 3 Volumenverhältnis). Die erhaltene antimikrobiell aktive Fraktion wurde einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF, wie bei der vorstehenden Prozedur unterworfen. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 gesammelt und zur Trockne eingedampft. Es wurde 0,78 g rohes Pulver erhalten.

Das Pulver wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Säule aus Sephadex G 10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden fraktioniert und einer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 Volumenverhältnis), wie vorstehend angegeben, unterworfen. Die Fraktionen mit den Rf-Wert 0,43 wurden gesammelt, eingeeengt und lyophilisiert. Es wurden 82 mg weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäss den Angaben im Beispiel 9 zum Endprodukt weiter umgesetzt.

### Beispiel 4

Durch Anwendung des gleichen Verfahrens, wie im Beispiel 1 angegeben, jedoch unter Verwendung einer Lösung von bis(5-Carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)disulfid, hergestellt durch Auflösen des Disulfids in wasserhaltigem Methanol und Sterilisation durch Filtration mittels Milliporefilter in diesem Beispiel anstelle der Lösung von 5-Mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-thioessigsäure, hergestellt in Wasser unter Verwendung wässriger Natriumhydroxidlösung und Sterilisation bei hohem Druck, wurde 23 g Rohpulver der hergestellten Verbindung I erhalten. Durch Reinigen des Produktes, wie im Beispiel 1 angegeben, wurde etwa 45 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure (hergestellte Verbindung I) als Zwischenprodukt erhalten.

### Beispiel 5

Durch Anwendung des gleichen Verfahrens, wie im Beispiel 2 angegeben, jedoch unter Verwendung einer Lösung von bis(1-Methyl-1H-tetrazol-5-yl)disulfid, hergestellt durch Auflösen des Disulfids in Wasser enthaltendem Methanol und Sterilisation durch Filtration mittels Milliporefilter in diesem Beispiel anstelle einer Lösung von 1-Methyl-5-mercapto-1H-tetrazol, hergestellt durch Auflösen des Tetrazols in Wasser unter Verwendung einer wässrigen Natriumhydroxidlösung und Sterilisation bei hohem Druck, wurde etwa 26 g des rohen Pulvers der hergestellten Verbindung II erhalten. Durch Reinigen des Produktes, wie im Beispiel 2 angegeben, wurde etwa 37 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-7-methoxy- $\lambda^3$ -cephem-4-carbonsäure (hergestellte Verbindung II) als Zwischenprodukt erhalten. Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäss den Angaben im Beispiel 8 Abschnitt b) zum Endprodukt weiter umgesetzt.

### Beispiel 6

Durch Anwenden des gleichen Verfahrens wie im Beispiel 3 angegeben, wurde durch Einsetzen einer Lösung von

bis(5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)disulfid, hergestellt durch Auflösen des Disulfids in wasserhaltigem Methanol, und Sterilisation durch Filtration mittels Milliporfilter in diesem Beispiel anstelle der Lösung von 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol, hergestellt in Wasser unter Verwendung einer wässrigen Natriumhydroxidlösung und Sterilisation bei hohem Druck, etwa 19 g rohes Pulver der hergestellten Verbindung III erhalten. Durch Reinigen des Produktes, wie im Beispiel 3 angegeben, wurde etwa 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure (hergestellte Verbindung III) als Zwischenprodukt erhalten. Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäss den Angaben im Beispiel 9 zum Endprodukt weiter umgesetzt.

#### Beispiel 7

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure IV als Zwischenprodukt der Formel (II):

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchiflaschen mit je 100 ml gefüllt, 20 Minuten bei 120°C sterilisiert und mit dem Streptomyces oganensis Y-G19Z-Stamm beimpft. Anschliessend wurde 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Ein weiteres vorstehendes Kulturmedium wurde in Zweiliter Sakaguchiflaschen mit jeweils 400 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Dann wurde mit 2-3% der Kulturbrühe, die gemäss dem vorstehenden Verfahren hergestellt wurde, angeimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um eine Animpfkultur zu erhalten.

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, das 7% Stärke, 2% Glutemehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminoäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid in zwei 100 Liter Fermentoren, zusammen mit 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel gefüllt und 30 Minuten bei 120°C sterilisiert. Dann wurde mit 800 ml der Animpfkultur beimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert. Dann wurde eine Lösung von 2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol, hergestellt durch Auflösen des Thiadiazols in Wasser unter Verwendung einer wässrigen Natriumhydroxidlösung und Sterilisation unter hohem Druck, zu der Kulturbrühe hinzugefügt, so dass die Konzentration des Thiadiazols 0,05% betrug. Der Ansatz wurde dann 90 Stunden weiter kultiviert.

Nach vollständiger Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und unter Rühren mit Radiolite als Filterhilfsmittel versetzt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert und die Filtrate wurden vereinigt, wodurch etwa 100 Liter des Filtratgemisches erhalten wurden.

Das Filtrat wurde auf pH 3,0 eingestellt, durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen. Es wurde mit 30 Liter wässriger 50%iger Acetonlösung eluiert. Die Eluate wurden bis auf 5,5 Liter eingengt. Das Konzentrat wurde auf pH 3,5 eingestellt und durch eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ)-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen. Eluiert wurde mit einer wässrigen Lösung (von pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt. Es wurden etwa 5 Liter einer Lösung, die antimikrobiell aktives Material enthielt, erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, durch eine Einliter-Amberlite XAD-2-Säule gegeben und mit Wasser gewaschen. Es wurde mit einer wässrigen 50%igen Acetonlösung gewaschen. Es wurden etwa 400 ml wässrige Lösung, die das antimikrobiell aktive Material enthielt, gewonnen. Die Lösung wurde lyophilisiert. Unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus

n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 Volumenverhältnis) wurde der gebildete Rückstand einer Säulenchromatographie unterworfen unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel) und mit dem Lösungsmittelgemisch der gleichen vorstehenden Zusammensetzung präpariert. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden fraktioniert, tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel gebracht, entwickelt unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9) im Volumenverhältnis. Dann wurde eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin aufgesprüht und durch Erwärmen die Anfärbung entwickelt. Hierauf wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 gesammelt und im Vakuum bei 45-50°C zur Trockne eingedampft. Der Produktrückstand wurde einer Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril : Wasser (7 : 3 Volumenverhältnis) präpariert. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden ebenfalls einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF wie in dem vorstehenden Verfahren unterworfen. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 wurden gesammelt, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Es wurde 0,92 g rohes Pulver erhalten.

Das rohe Pulver wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und dann einer Säulenchromatographie unter Verwendung von Amberlite CG-50 (H-Typ) mit destilliertem Wasser unterworfen, und die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Säule aus Sephadex G 10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt, die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die effektiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Gemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 Volumenverhältnis), wie vorstehend beschrieben, unterzogen. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,38 gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Es wurden weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure als Zwischenprodukt erhalten. Das erhaltene Zwischenprodukt wird gemäss den Angaben im Beispiel 18 zum Endprodukt weiter umgesetzt.

#### Beispiel 8

a) Ein Kulturmedium mit pH 6,0, bestehend aus 20 g Glukose, 4 g Kaliumdihydrogenphosphat, 1 g Magnesiumsulfat, 2 g Ammoniumsulfat, 0,5 g Calciumchlorid, 0,1 g Borsäure, 0,04 g Ammoniummolybdat, 0,04 g Mangansulfat, 0,04 g Zinksulfat, 0,45 g Kupfersulfat, 0,025 g Ferrisulfat, 20 mcg Biotin, 2 mg Thiaminhydrochlorid, 1 g DL-Methionin und 1000 ml Wasser wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben gefüllt und mit jeweils 100 ml Abfüllung versehen, dann in üblicher Weise sterilisiert. Jedes Medium wurde mit Trigonopsis variabilis IFO 0755-Stamm beimpft mit anschliessender Schüttelkultur für 72 Stunden bei 30°C.

Nach Abschluss der Kultivierung wurden etwa 1000 ml der Kulturbrühe gesammelt. Die Brühe wurde bei 2000 Umdrehungen/Minute für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Mycel wurde gesammelt und in 500 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung mit pH 8,1 suspendiert, um eine Mycelsuspension zu erhalten. Zu der Mycelsuspension wurden 5 ml Triton X-100 hinzugefügt, und das Gemisch wurde 20-40 Minuten bei 37°C geschüttelt, um das Mycel zu aktivieren. Dann wurde das geschüttelte Gemisch bei 2000 Umdrehungen/Minute 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das aktivierte Mycel wurde gesammelt, zweimal mit einer Pyrophosphatpufferlösung mit pH 7-8 gewaschen. Dann wurde 100-200 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung

mit pH 8,1 suspendiert, um eine Suspension des aktivierten Mycels zu erhalten.

b) In 10 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung mit pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, wurde 54,5 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure aufgelöst. Dann wurde 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension hinzugefügt. Das Gemisch wurde unter Belüftung in einem Wasserbad bei 33°C durchgerührt. Das Reaktionssystem wurde alle 30 Minuten mit einer Hitachi Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie-Apparatur unter Verwendung von  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub>, Hersteller: Waters Co., Lösungsmittelsystem: Acetonitril : Essigsäure (1 : 9 Volumenverhältnis) geprüft, um das Ende der Reaktion zu bestimmen. Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure beträgt 1 Minute 53 Sekunden, während die Retentionszeit von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, die durch die D-Aminosäure-Oxidation erhalten wurde, 4 Minuten 54 Sekunden beträgt.

Nach beendeter Reaktion wurde das Mycel durch Zentrifugieren entfernt. Das Überstehende wurde abgetrennt und wiedergewonnen, auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Hydrochlorwasserstoffsäurelösung eingestellt, und dann wurde viermal mit je einem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden gewonnen und mit Phosphatpufferlösung pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatpufferlösung wurde dann auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und weiter viermal mit jeweils dem gleichen Volumen an Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden kombiniert, mit wasserfreiem Natriumsulfat entwässert und zur Trockne verdampft. Das Produkt wurde einer Säulenchromatographie mit einer Füllung aus mikrokristalliner Cellulose (Avicel) mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unterworfen. Entwickelt und fraktioniert wurde mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion gegen *Proteus mirabilis* wurde geprüft und die Fraktionen mit der antimikrobiellen Aktivität wurden ausgesucht, tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF gebracht und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) und einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) entwickelt. Dann wurden die Fraktionen, die die Ultraviolettabsorption mit Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu/Kagaku Kogyo K.K.) zeigten und einen Rf-Wert 0,81 und bzw. Rf-Wert 0,64 besitzen, gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Es wurden 35 mg reine 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Dieses Material besitzt antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escheria coli*.

#### Beispiel 9

In 10 ml einer 0,1 M Pyrophosphatlösung von pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, wurde 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure aufgelöst. Zu der Lösung wurde 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension von *Trigonopsis variabilis* IFO 0755, in der gleichen Weise wie im Beispiel 8 beschrieben, zugefügt. Das Gemisch wurde unter Belüftung in einem Wasserbad bei 33°C gehalten, um die D-Aminosäure-Oxidation durchzuführen. Die Beendigung der Reaktion wurde mit der gleichen Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie-Apparatur, wie

im Beispiel 8 beschrieben, durchgeführt. Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials, 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure betrug 2 Minuten 55 Sekunden und die Retentionszeit der 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, die durch die D-Aminosäure-Oxidation erhalten wurde, betrug 11 Minuten 18 Sekunden.

Nach beendeter Reaktion wurde das Mycel bei 4°C entfernt, und das Überstehende wurde gewonnen, auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt, und es wurde viermal mit jeweils dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt und mit einer Phosphatpufferlösung von pH 6 extrahiert. Die Phosphatlösung wurde auf pH 1,5 bis 2,0 eingestellt und erneut viermal mit jeweils gleichem Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden gesammelt, mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockne eingedampft. Das Produkt wurde unter Verwendung einer Säule, gefüllt mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) und einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) gereinigt. Der Rückstand wurde unter Verwendung des gleichen, vorstehend angegebenen Lösungsmittelgemisches entwickelt. Die Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität gegen *Proteus mirabilis* wurden gesammelt, tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) und bzw. einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) entwickelt. Dann wurden die Fraktionen, die die Ultraviolettabsorption im Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu Kagaku Kogyo K.K.) aufwiesen und auch einen Rf-Wert 0,82 bzw. Rf-Wert 0,77 besaßen, gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Es wurden 32 mg reines 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Dieses Material besitzt antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escheria coli*.

#### Beispiel 10

In 10 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung von pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, wurde in 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure aufgelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension, hergestellt in der gleichen Weise wie im Beispiel 8a angegeben, wurde das Gemisch unter Rühren und Belüftung auf dem Wasserbad bei 33°C gehalten, um die D-Aminosäure-Oxidation durchzuführen. Das Ende der Reaktion wurde alle 30 Minuten mit der Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie-Apparatur, wie im Beispiel 8 angegeben, geprüft. Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure betrug 3 Minuten 14 Sekunden und die Retentionszeit von 7-(4-Carboxybutyramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, gebildet durch die Wirkung des D-Aminosäure oxidierenden Enzyms, betrug 13 Minuten 24 Sekunden.

Nach beendeter Umsetzung wurde das Mycel durch Zentrifugieren bei 4°C entfernt. Das Überstehende wurde wiedergewonnen und dann auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt. Es wurde viermal mit je gleichem Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden gewonnen und vereinigt.



Der Extrakt wurde mit einer Phosphatpufferlösung bei pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatpufferlösung wurde auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und erneut viermal mit einem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert.

Die Äthylacetatextrakte wurden gesammelt und mit entwässertem Natriumsulfat getrocknet und danach im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Der Rückstand wurde mit einem Lösungsmittelgemisch entwickelt aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung einer Säule mit einer Füllung aus mikrokristalliner Cellulose (Avicel) und des Lösungsmittelgemisches mit der gleichen vorstehenden Zusammensetzung. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität gegen *Proteus mirabilis* wurden gesammelt, tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis), bzw. einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) entwickelt. Dann wurden die Fraktionen, die die Ultraviolettabsorption im Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu Kagaku Kogyo K.K.) aufweisen und den Rf-Wert 0,79 bzw. 0,72 besitzen, gesammelt, eingeengt und lyophilisiert. Es werden 30 mg reine 7-(4-Carboxybutyramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Dieses Material besitzt antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escheria coli*.

#### Beispiel 11

a) Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchiflaschen in einer Menge von je 100 ml gefüllt. Jede Flasche wurde 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Jedes Medium wurde mit *Streptomyces oganensis* Y-G19Z-Stamm beimpft und 48 Stunden bei 30°C kultiviert.

Das Kulturmedium wurde ausserdem in Zweiliter Sakaguchiflaschen in einer Menge von jeweils 400 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Der Ansatz wurde mit 2-3% der Kulturbrühe, die wie vorstehend hergestellt wurde, beimpft und 24 Stunden bei 30°C kultiviert. Es wurde so eine Animpfkultur erhalten.

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminsäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid in zwei 100 Liter Fermentoren zusammen mit je 10 ml Adecanol als Antischaummittel versetzt, sterilisiert während 30 Minuten bei 120°C. Es wurde mit 200 ml der Animpfkultur, die gemäss der vorstehenden Vorschrift hergestellt worden war, beimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert. Dann wurde eine Lösung von 5-Mercapto-1-methyl-1H-tetrazol, hergestellt aus einer wässrigen Natriumhydroxidlösung und Sterilisation bei hohem Druck, zu der Kulturbrühe so hinzugegeben, dass die Konzentration des Tetrazols 0,05% betrug. Die Kultivierung wurde noch 90 Stunden ausgeführt.

Nachdem die Kultivierung vollständig war, wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Rühren vermischt. Das Gemisch wurde mit einer Filterpresse filtriert und die erhaltenen Filtrate wurden vereinigt. Es wurden 100 Liter Filtratgemisch mit einem Gehalt an 100 mcg/ml an 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

b) Das Filtrat wurde auf pH 3,0 eingestellt und durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem 50%igen Aceton eluiert. Das Eluat wurde bis auf 5,5 Liter eingeengt. Das Konzentrat wurde auf pH 7,5 unter Verwendung wässriger Natriumhydroxidlösung eingestellt. Nach Entfernen der gebildeten unlöslichen Anteile wurde 320 ml der aktivierten Mycelsuspension des *Trigonopsis variabilis* IFO 0755-Stammes, präpariert nach den Angaben im Beispiel 8a, zu der Lösung hinzugefügt. Das Gemisch wurde unter Belüften 4 Stunden durchgerührt, auf pH 1,5-2,0 mit wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt. Die Lösung wurde viermal unter Verwendung gleicher Volumenteile Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden gesammelt. 20 Liter des so erhaltenen Äthylacetatextraktes wurde dann mit 2 Liter Phosphatpufferlösung pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatlösung wurde auf pH 1,5-2,0 mit wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und erneut viermal mit dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatfiltrate wurden vereinigt. 8 Liter des so erhaltenen Extraktes wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft. Es wurden etwa 15 g Rohmaterial erhalten. Dieses Rohmaterial wurde der Säulenchromatographie unter Verwendung von Cellulosepulver in der gleichen Weise, wie im Beispiel 8b angegeben, unterworfen. Es wurde 6,1 g weisse 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

#### Beispiel 12

Ein Kulturmedium, welches 50 g Glukose, 10 g Pepton, 1 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,5 g Magnesiumsulfat, 10 g Malzextrakt, 1 g DL-Methionin und 1000 ml Wasser mit pH 6,0 enthielt, wurde mit dem *Trigonopsis variabilis* IFO 0755-Stamm beimpft. Anschliessend wurde kultiviert, wie im Beispiel 8a angegeben. 1000 ml der so gebildeten Kulturbrühe wurden gesammelt. Es wurden 1000 ml der Kulturbrühe bei 2000 Umdrehungen/Minute bei 4°C zentrifugiert. Das gebildete Mycel wurde gesammelt. Das Mycel wurde in 200 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1 suspendiert. Die Suspension des Mycels wurde in 500 ml Erlenmeyerkolben in 50 ml Portionen eingefüllt. Dann wurde nach der Zugabe von 5 ml Toluol zu der Suspension die Aktivierung eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Danach wurde das aktivierte Mycel durch Zentrifugieren während 30 Minuten bei 2000 Umdrehungen/Minuten aktiviert.

Dann wurde unter Zentrifugieren mit 200 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1 gewaschen. Das aktivierte Mycel wurde erneut in 200 ml 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1 suspendiert. Die Suspension wurde auf dem Wasserbad bei 50°C durchgeführt, um die Katalaseaktivität zu inaktivieren. Dann wurden 5 ml der aktivierten Mycelsuspension zu einer Lösung von 100 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure in 20 ml 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1 gegeben, und nach dem Durchrühren unter Belüftung für 5 Stunden bei 33°C wurde das Gemisch, wie im Beispiel 8b angegeben, behandelt. Es wurde dadurch 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure hergestellt.

#### Beispiel 13

Das Mycel, erhalten von *Trigonopsis variabilis* durch die gleiche Arbeitsweise, wie im Beispiel 8a beschrieben, wurde bei einer Temperatur unter -20°C für mehr als eine Stunde eingefroren. Dann wurde bei Zimmertemperatur zum

Auftauen stehen gelassen. Es wurde in 200 ml 0,1 M Pyrophosphatlösung pH 8,1 suspendiert. Danach wurde 5 ml der Suspension zu einer Lösung von 100 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure in 20 ml 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, hinzugefügt. Nach dem Durchrühren des Gemisches unter Belüftung während 5 Stunden bei 33°C wurde das Gemisch in der gleichen Weise, wie im Beispiel 8b angegeben, behandelt. Es wurde 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

#### Beispiel 14

Zu einer Lösung von 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(3-p-hydroxyphenyl-2-methoxypropenoyl)oxymethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure in 10 ml 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthält, wurde 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension, erhalten von *Trigonopsis variabilis*, gemäß dem im Beispiel 8a angegebenen Verfahren, hinzugefügt. Das Gemisch wurde, wie im Beispiel 8b angegeben, behandelt. Es wurde 7-(4-Carboxybutyramido)-3-(3-p-hydroxyphenyl-2-methoxypropenoyl)oxymethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Die erhaltenen Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) bzw. einem Lösungsmittelgemisch n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unterworfen. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,67 und Rf-Wert 0,67 wurden gesammelt. Die Fraktion besass die Retentionszeit 5 Minuten und 55 Sekunden in einer Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie-Apparatur unter Verwendung von  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub>, (Hersteller: Waters Co., Ltd.) und einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril : 0,1% wässriger Essigsäure (2 : 8 im Volumenverhältnis). Das Produkt besass negative Ninhydrinreaktion.

#### Beispiel 15

a) Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure.

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glucose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchiflaschen in jeweils einer Menge von 100 ml eingefüllt. Jedes Medium wurde 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Das sterile Kulturmedium wurde mit dem *Streptomyces oganensis* Y-G19Z-Stamm beimpft. Es wurde 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Das vorstehend hergestellte Kulturmedium wurde auch in zwei Liter Sakaguchiflaschen in einer Menge von jeweils 400 ml eingefüllt. Nach dem Sterilisieren des Mediums für 20 Minuten bei 120°C wurde das Kulturmedium mit der im vorstehenden Verfahren erhaltenen Kulturbrühe in einer Menge von 2-3% beimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um eine Animpfkultur zu erhalten.

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1 Casaminoäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, in zweihundert Liter Fermentoren zusammen mit je 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel eingefüllt. Jedes Kulturmedium wurde für 30 Minuten bei 120°C sterilisiert. Es wurde mit 800 ml der nach der vorstehenden Arbeitsweise hergestellten Animpfkultur beimpft. Dann wurde zu jedem Fermentor eine Lösung von 1-Methyl-

-5-mercapto-1H-tetrazol, hergestellt durch Auflösen in wässriger Natriumhydroxidlösung und Sterilisieren unter hohem Druck, so dass der Gehalt 0,05% betrug. Dann wurde die Kulturbrühe 90 Stunden weiter kultiviert. Nach beendeter Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Rühren vermischt. Das Gemisch wurde durch eine Filterpresse filtriert, und die Filtrate wurden zu etwa 100 Liter Filtratgemisch vereinigt.

Das Gemisch wurde auf pH 3,0 durch die Zugabe von wässriger Natriumhydroxidlösung eingestellt. Dann wurde durch eine 12 Liter-Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen. Es wurde mit 30 Liter wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde bis auf 5,5 Liter eingengt. Das Konzentrat wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und durch eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ) Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen und mit wässriger Lösung (pH 7,2), die 1 n Natriumnitrit und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurden etwa 5 Liter Lösung, die ein antimicrobiell aktives Material enthielt, gewonnen. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, und sie wurde durch eine 1 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen. Es wurde mit wässrigem 50%igem Aceton eluiert.

Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung mit antimicrobiell aktivem Material erhalten, welches lyophilisiert wurde. Es wurden etwa 54 g rohes Pulver erhalten. Das rohe Pulver wurde einer Säulenchromatographie unterworfen. Es wurden hierzu 800 ml DEAE Sephadex A-25 (Essigsäure-Typ) verwendet und mit einer kleinen Menge 0,5 M Ammoniumbromid-Essigsäurepufferlösung gefüllt. Es wurden die effektiven Fraktionen isoliert. Die so gesammelten antimicrobiell aktiven Fraktionen wurden durch eine 500 ml Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und mit wässrigem 25%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde dann im Vakuum zur Trockene eingedampft. Das getrocknete Produkt wurde einer Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : Wasser (7 : 3 im Volumenverhältnis) mittels mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen. Die Säule war mit dem Lösungsmittelgemisch der vorstehend angegebenen Zusammensetzung gefüllt. Die Fraktionen mit antimicrobieller Aktivität wurden tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 im Volumenverhältnis) entwickelt.

Eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin wurde aufgesprüht und die Anfärbung wurde durch Erwärmen entwickelt. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,31 wurden gesammelt, im Vakuum bei 45-50°C zur Trockene eingedampft und einer Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen. Die Säule enthielt ein Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis). Die antimicrobiell aktiven Fraktionen wurden dann ausgewählt und einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF unterworfen. Hierbei wurde das gleiche vorstehende Verfahren angewendet. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockene eingedampft.

Das getrocknete Produkt wurde in eine Chromatographiesäule mit mikrokristalliner Cellulose gegeben.

Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 im Volumenverhältnis) verwendet, um eine Reinigung der effektiven Komponente zu erzielen. Die gereinigten aktiven Fraktionen wurden durch Konzentration getrocknet, in einer kleinen Menge destillier-



tem Wasser gelöst und in einer Säule mit Sephadex G 10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft, und die effektiven Fraktionen wurden ausgewählt und einer Dünnschichtchromatographie unterworfen, wie dies vorstehend erläutert wurde.

Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 im Volumenverhältnis) verwendet. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,31 wurden gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Es wurde etwa 60 mg weiße 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

b) Herstellung von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:

In 10 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1, die 0,02% Natriumazid enthielt, wurde 54,5 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, hergestellt in Stufe a, aufgelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension, die in der gleichen Weise, wie im Beispiel 8a angegeben, hergestellt worden war, wurde das Gemisch unter Belüftung auf dem Wasserbad bei 33°C durchgerührt. Der vollständige Ablauf der Reaktion wurde durch Prüfung des Reaktionsansatzes in 30 Minuten Abständen mit Hilfe einer Hitachi Hochgeschwindigkeitsflüssigkeits-Chromatographieapparatur bestimmt (unter Verwendung von  $\mu$  Bandapak C<sub>18</sub>, Hersteller: Waters Ltd., Lösungsmittelsystem Acetonitril: 0,1% Essigsäurelösung 1 : 9 im Volumenverhältnis).

Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure betrug 1 Minute 53 Sekunden, und die Retentionszeit der 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, hergestellt durch D-Aminosäure-Oxidation, betrug 4 Minuten 54 Sekunden. Nach beendeter Umsetzung wurde das Mycel durch Abzentrifugieren bei 4°C entfernt. Das Überstehende wurde gesammelt, auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäure eingestellt. Dann wurde die Lösung viermal mit je einem gleichen Volumen an Äthylacetat extrahiert und dann mit einer Phosphatpufferlösung von pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatpufferlösung wurde dann eingestellt auf pH 1,5 bis 2,0 mit verdünnter Chlorwasserstoffsäurelösung und erneut viermal jeweils mit dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt und durch Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum zur Trockene eingedampft. Das Trockenprodukt wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung einer Säule mit einer Füllung aus mikrokristalliner Cellulose (Avicel) entwickelt, wobei das Lösungsmittelgemisch mit der gleichen vorstehenden Zusammensetzung verwendet wurde. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde gegen *Proteus mirabilis* geprüft. Die Fraktionen, die die antimikrobielle Aktivität enthielten, wurden ausgewählt und tropfenweise auf eine Dünnschichtplatte Avicel SF aufgetragen. Es wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) und einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) entwickelt. Die Fraktionen, die eine Ultraviolett-Absorption im Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu Kagaku Kogyo K.K.) aufwiesen und den Rf-Wert 0,81 bzw. Rf-Wert 0,64 besaßen, wurden gesammelt. Diese Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und lyophilisiert. Es

wurden 35 mg reines 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Dieses so hergestellte Material besaß antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escherichia coli*.


Zusätzlich wurde die Methylesterverbindung, die sich von dem in diesem Beispiel erhaltenen Produkt ableitet, durch das im folgenden Referenzbeispiel A angewendete Verfahren hergestellt. Dieser so erhaltene Methylester stimmte in seiner Struktur vollständig mit der entsprechenden Verbindung überein, die durch das synthetische Verfahren, welches nachstehend im Referenzbeispiel B angegeben wird, hergestellt wurde.

#### Referenz-Beispiel A:

In 10 ml Chloroform wurde 100 mg 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure suspendiert. Nach Zugabe von 4 ml einer 1%igen Diazomethan-Ätherlösung zu der Suspension wurde das Gemisch 30 Minuten bei Zimmertemperatur durchgerührt. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde mit verdünnter Essigsäure und Wasser gewaschen und mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde einer Säulenchromatographie unter Verwendung einer Silikagelsäule unterworfen. Es wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Benzol : Äthylacetat (1 : 3 im Volumenverhältnis) eluiert. Die die Verbindung enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und unter vermindertem Druck eingengt.

Es wurde 80 mg Methyl-7-methoxy-7-(4-methoxycarboxylbutyramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carboxylat erhalten.

#### Infrarot-Absorptionsspektrum:

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  cm<sup>-1</sup>: 1780 (Lactam )  
1725 (Ester, Carbonyl).

#### Kernmagnetisches Resonanzspektrum (CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$ : 2,03 (2H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-),

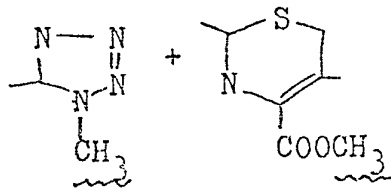
2,39 (4H, -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-),

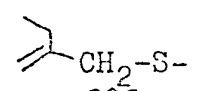
3,51 (3H, 7-position, -OCH<sub>3</sub>),

3,64 (3H, CH<sub>3</sub>-O-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-),

3,87 3H,

3,92 3H,



4,23, 4,53 (2H, )

5,04 (1H, 6-Position, -H).

#### Referenzbeispiel B:

a) In ein Gemisch aus 30 ml Äthylacetat und 50 ml Methanol wurden 1,0 g Diphenylmethyl 7 $\beta$ -(3,5-di-tert.-butyl-4-hydroxybenzylidenamino)-7 $\alpha$ -methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carboxylat und 1,8 g

Gilardreagenz aufgelöst. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei Zimmertemperatur durchgerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingeeengt, und der gebildete Rückstand wurde in 50 ml Äthylacetat aufgelöst und dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Die gebildete organische Lösungsmittelschicht wurde abgetrennt mit wasserfreiem Magnesiumsulfat. Dann wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Es wurde etwa 0,6 g rohes Diphenylmethyl-7 $\beta$ -amino-7 $\alpha$ -methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carboxylat erhalten. Das Produkt wurde in 10 ml Chloroform aufgelöst und nach dem Abkühlen der Lösung auf eine Temperatur von  $-20^\circ\text{C}$  bis  $-30^\circ\text{C}$  wurde 0,6 ml Methyl-4-chlor-formylbutyrat tropfenweise zu der Lösung unter Rühren hinzugefügt. Das Gemisch wurde dann noch eine Stunde bei der gleichen Temperatur durchgerührt. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit 20 ml Chloroform gemischt. Das Gemisch wurde mit 10 ml 1 n Chlorwasserstoffsäure gewaschen, und dann wurde mit 10 ml Wasser nachgewaschen. Die gebildete organische Lösungsmittelschicht wurde abgetrennt und mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der gebildete Rückstand wurde einer Silikagelsäulenchromatographie unterworfen. Die Säule wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Benzol : Äthylacetat (3 : 1 im Volumenverhältnis) eluiert. Es wurde 500 mg reines Diphenylmethyl-7 $\alpha$ -methoxy-7 $\beta$ -(4-methoxycarbonylbutyramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carboxylat mit den folgenden Eigenschaften erhalten.

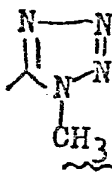
Kernmagnetisches Resonanzspektrum ( $\text{CDCl}_3$ ):

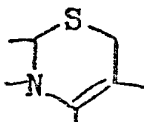
$\delta$ : 2,00 (2H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),

2,36 (4H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),

3,50 (3H, 7-Position,  $-\text{OCH}_3$ ),

3,63 [3H,  $\text{CH}_3-\text{O}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_3-$ ],

3,78 (3H, , ),

4,19, 4,44 (2H,   $\text{CH}_2-\text{S}-$  ),

5,04 (1H, 6-Position, H),


6,91 (1H,  $-\text{CH}-\begin{smallmatrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{smallmatrix}$ ),

7,32 (10H,  $-\text{CH}-\begin{smallmatrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{smallmatrix}$ ).

b) In 4 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Trifluoressigsäure : Anisol (4 : 1 im Volumenverhältnis) wurde 400 mg Diphenylmethyl 7 $\alpha$ -Methoxy-7 $\beta$ -(4-methoxycarbo-

nylbutyramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carboxylat bei Temperaturen von  $-10^\circ\text{C}$  bis  $-20^\circ\text{C}$  aufgelöst. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei der gleichen Temperatur gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Dann wurde Äther zu dem Rückstand hinzugegeben, wodurch rohe 7 $\alpha$ -Methoxy-7 $\beta$ -(4-methoxycarbonylbutyramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure ausfiel, die durch Filtration abgetrennt und in 10 ml Chloroform suspendiert wurde. Die Suspension wurde mit 0,4 ml einer 1%igen Diazomethan-Ätherlösung bei  $10-20^\circ\text{C}$  vermischt. Das Gemisch wurde 30 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt. Das gebildete Reaktionsgemisch wurde mit verdünnter Essigsäurelösung gewaschen, mit Wasser nachgewaschen. Es wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck abdestilliert. Der gebildete Rückstand wurde einer Silicagelsäulenchromatographie unterworfen. Die Säule wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Benzol : Äthylacetat (1 : 3 im Volumenverhältnis) eluiert. Die die Verbindung enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und unter vermindertem Druck eingeeengt. Es wurden 150 mg Methyl-7 $\alpha$ -methoxy-7 $\beta$ -(4-methoxycarbonylbutyramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carboxylat mit den folgenden Eigenschaften erhalten:

Infrarot-Absorptionsspektrum:

$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 1780 (Lactam  )

1725 (Ester, Carbonyl).

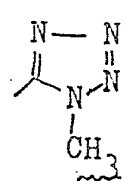
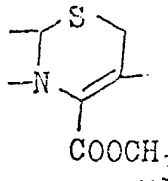
35 Kernmagnetisches Resonanzspektrum ( $\text{CDCl}_3$ ):

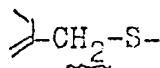
$\delta$ : 2,03 (2H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),

2,39 (4H,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$ ),

3,51 (3H, 7-Position  $-\text{OCH}_3$ ),

3,64 [3H,  $\text{CH}_3\text{OCO}(\text{CH}_2)_3-$ ],

3,87 (3H,  + ),

4,23, 4,53 (2H,   $\text{CH}_2-\text{S}-$  ),

5,04 (1H, 6-Position H).

#### Beispiel 16

a) Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure.

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchiflaschen in einer Menge von jeweils 100 ml eingefüllt. Jedes Medium wurde 20 Minuten bei  $120^\circ\text{C}$  sterilisiert. Das Kulturmedium wurde dann mit dem Streptomyces oganensis Y-G19Z-

Stamm beimpft. Anschliessend wurde 48 Stunden bei 30°C kultiviert.

Das vorstehende Kulturmedium wurde in 2 Liter Sakaguchiflaschen in einer Menge von jeweils 400 ml eingefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert.

Dann wurde mit 2-3% Kulturbrühe, gemäss dem vorstehenden Verfahren erhalten, angeimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um eine Animpfkultur zu erhalten.

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminosäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, in 200 Liter Fermentoren zusammen mit 10 ml Adecanol gefüllt und 30 Minuten bei 120°C sterilisiert. Dann wurde mit 800 ml Animpfkultur, hergestellt nach dem vorstehenden Verfahren, geimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert. In jeden Fermentor wurde eine Lösung von 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol, hergestellt mit wässriger Natriumhydroxidlösung und Sterilisieren bei hohem Druck, hinzugegeben, so dass ihr Gehalt 0,05% der Kulturbrühe betrug. Die Kultivierung wurde 90 Stunden fortgesetzt.

Nach vollständiger Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt. Radiolite wurde als Filterhilfsmittel unter Rühren zugesetzt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt und ergaben etwa 100 Liter Filtratgemisch.

Das Filtrat wurde auf pH 3,0 durch die Zugabe von wässriger Natriumhydroxidlösung eingestellt. Die Lösung wurde durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Das Eluat wird konzentriert bis zu 5,5 Liter, auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und in eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ) Säule gefüllt. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurden etwa 5 Liter einer Lösung, die antimikrobiell aktives Material enthielt, gewonnen. Die so erhaltene Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt und in eine 1 Liter Amberlite XAD-2-Säule eingefüllt. Die Säule wurde mit 50%igem wässrigem Aceton eluiert. Es wurden etwa 400 ml wässrige Lösung, die das antimikrobielle Material enthielt, gewonnen. Die Lösung wurde lyophilisiert. Das Produkt wurde einer Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung von mikrokristalliner Cellulose (Avicel) und einer Füllung mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch, wie vorstehend angegeben, unterworfen. Die erhaltenen antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen, und es wurde mit einem Lösungsmittelgemisch Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) entwickelt. Mit einer Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin wurde besprüht, um durch Erwärmen anzufärben. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 gesammelt und zur Trockene unter vermindertem Druck bei 45-50°C eingedampft. Das erhaltene Produkt wurde der Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel), gefüllt mit einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril : Wasser (7 : 3 im Volumenverhältnis) unterworfen. Die erhaltenen antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie auf Avicel SF, wie bei der vorstehenden Arbeitsweise, unterworfen. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 wurden gesammelt und zur Trockene unter vermindertem Druck eingedampft. Es wurden 0,78 g eines rohen Pulvers erhalten.

Das Produkt wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Säule aus Sephadex G 10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die effektiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie, wie vorstehend angegeben, unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unterworfen. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 gesammelt, eingengt und lyophilisiert. Es wurde 82 mg weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

b) Herstellung von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:

In 10 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, wurde 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure aufgelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension, hergestellt unter Verwendung des Trigonopsis variabilis IFO 0755-Stammes, wie im Beispiel 8a angegeben, wurde das Gemisch unter Belüftung auf einem Wasserbad bei 33°C durchgeführt, um die D-Aminosäure-Oxidation durchzuführen. Der vollständige Ablauf der Reaktion wurde durch Hochgeschwindigkeitsflüssigkeits-Chromatographie, wie im Beispiel 8b beschrieben, festgestellt. Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure betrug 2 Minuten 55 Sekunden und jene von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, hergestellt durch die D-Aminosäure-Oxidation, betrug 11 Minuten 18 Sekunden.

Nach beendeter Reaktion wurde das Mycel bei 4°C entfernt, und das Überstehende wurde abgetrennt, auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und viermal mit jeweils dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt, und mit einer Phosphatpufferlösung pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatlösung wurde dann auf pH 1,5 bis 2,0 eingestellt und dann viermal jeweils mit dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt mit wasserfreiem Natriumsulfat extrahiert und zur Trockene eingedampft. Das Produkt wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung einer Säule mit einer Füllung aus mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches mit der gleichen vorstehenden Zusammensetzung entwickelt. Dann wurden die Fraktionen, die antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis* besitzen, ausgewählt, tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen, und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) und einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) entwickelt, um die Fraktionen auszuwählen, die die Ultraviolett-Absorption im Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu Kagaku Kogyo K.K.) aufweisen und den Rf-Wert 0,82 bzw. Rf-Wert 0,77 besitzen. Die so ausgewählten Fraktionen wurden konzentriert und dann lyophilisiert. Es wurden 32 mg reine 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Dieses Material besitzt antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escherichia coli*.

## Beispiel 17

a) Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in eine 500 ml Sakaguchiflasche mit jeweils 100 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Jedes Kulturmedium wurde dann mit dem *Streptomyces oganensis* Y-G19Z-Stamm beimpft. Es wurde anschliessend 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Ein weiteres vorstehendes Kulturmedium wurde in 2000 ml Sakaguchiflaschen jeweils mit 400 ml gefüllt, und jedes Kulturmedium wurde 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Dann wurde mit 2-3% der Kulturbrühe, hergestellt nach dem vorstehenden Verfahren, beimpft und anschliessend 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um eine Animpfkultur zu erhalten.

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutemehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminsäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, in 200 Liter Fermentoren zusammen mit 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel gefüllt. Jedes Medium wurde 30 Minuten bei 120°C sterilisiert und mit 800 ml der Animpfkultur, hergestellt nach dem vorstehenden Verfahren, geimpft. Anschliessend wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert.

Dann wurde in jeden Fermentator eine Lösung von bis(5-Carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-disulfid, hergestellt durch Auflösen des Disulfids in wasserhaltigem Methanol, und Sterilisieren durch Filtration unter Verwendung eines Millipore-Filters, in einer solchen Menge zugefügt, dass der Gehalt 0,05% in der Kulturbrühe betrug. Die Kultivierung wurde 90 Stunden durchgeführt. Nach beendeter Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Rühren versetzt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt. Es wurden etwa 100 Liter eines Filtratgemisches erhalten. Das Filtrat wurde auf pH 3,0 durch die Zugabe einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung eingestellt. Es wurde die Lösung in eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule eingefüllt. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem 50%-igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde bis auf 5,5 Liter eingengt. Nach Entfernung der gebildeten unlöslichen Anteile wurde Wasser zu dem Konzentrat hinzugefügt, um 10 Liter Lösung zu erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt, durch eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ)-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurde etwa 5 Liter Lösung erhalten, die antimikrobiell aktives Material enthielt. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, in eine 1 Liter Amberlite XAD-2-Säule gefüllt. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und mit wässrigem 50%-igem Aceton eluiert. Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung, die antimikrobiell aktives Material enthielt, erhalten. Durch Lyophilisieren der wässrigen Lösung wurde etwa 23 g rohes Pulver erhalten. Dann wurde 23 g des rohen Pulvers einer Säulenchromatographie unter Verwendung von 800 ml DEAE-Sephadex A-25 (Essigsäure-Typ), gefüllt mit einer kleinen Menge 0,5 M Ammoniumbromid-Essigsäurepufferlösung, unterworfen, um die effektiven Komponenten abzutrennen. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt und in eine 500 ml Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen. Es wurde mit wässrigem 25%-igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde

zur Trockene im Vakuum eingedampft. Das Produkt wurde einer Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : Wasser (7 : 3 im Volumenverhältnis) unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen, wobei das Lösungsmittelgemisch verwendet wurde, das die gleiche Zusammensetzung wie bei der vorstehenden Fraktionierung der antimikrobiell aktiven Fraktionen hatte. Die so erhaltenen Fraktionen wurden tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) entwickelt. Dann wurde eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin aufgesprüht und die Anfärbung durch Erhitzen entwickelt. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 gesammelt, zur Trockene unter vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wurde einer Säulenchromatographie, mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) gefüllt, unterworfen. Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) verwendet. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt und einer Dünnschichtchromatographie auf einer Avicel SF Platte unterworfen. Das Lösungsmittelgemisch hatte die gleiche Zusammensetzung wie das vorstehende Gemisch. Es wurde hierbei, wie vorstehend schon beschrieben, verfahren. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockene eingedampft.

Das Konzentrat wurde mittels Säulenchromatographie unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose und eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 im Volumenverhältnis) gereinigt. Die gereinigten aktiven Fraktionen wurden im Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgenommen und mit einer Säule aus Sephadex G-10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die effektiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie, wie vorstehend angegeben, unterworfen. Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6 : 1,5 : 2,5 im Volumenverhältnis) verwendet. Die Fraktionen mit einem Rf-Wert 0,32 wurden gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Es wurden etwa 45 mg weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

b) Herstellung von 7-(4-Carboxybutyramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:

In 5 ml einer 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung von pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, wurde 25 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, die im vorstehenden Verfahren a) erhalten worden ist, aufgelöst. Zu der Lösung wurde 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension, hergestellt gemäss den Angaben im Beispiel 8a, hinzugefügt. Das Gemisch wurde unter Belüftung und Rühren bei 33°C auf dem Wasserbad gehalten, um die D-Aminosäure-Oxidation auszuführen. Zur Feststellung des Reaktionsendes wurde alle 30 Minuten unter Verwendung der Hitachi Hochgeschwindigkeitschromatographie-apparatur in der gleichen Weise, wie im Beispiel 8a beschrieben, die Prüfung ausgeführt. Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure betrug 3 Minuten 14 Sekunden, und jene von 7-(4-Carboxybutyramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-

-4-carbonsäure, hergestellt durch die D-Aminosäure-Oxidation, betrug 13 Minuten 24 Sekunden.

Nach beendeter Reaktion wurde das Mycel durch Zentrifugieren bei 4°C entfernt. Das Überstehende wurde abgetrennt, auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt. Dann wurde viermal jeweils mit dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt und mit einer Phosphatpufferlösung bei pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatlösung wurde auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und viermal jeweils mit dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden gesammelt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Das Konzentrat wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. Es wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung einer Säule mit einer Füllung aus mikrokristalliner Cellulose (Avicel) entwickelt.

Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die Fraktionen, die die antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis* besitzen, wurden tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) bzw. einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) entwickelt. Es wurden die Fraktionen gesammelt, die eine Ultraviolettabsorption im Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu Kagaku Kogyo K.K.) besitzen und den Rf-Wert 0,79 oder Rf-Wert 0,72 aufweisen. Die Fraktionen wurden konzentriert und lyophilisiert. Es wurde 16 mg reine 7-(4-Carboxybutyramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl-7-methoxy- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten. Dieses Material besitzt antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escherichia coli*.

#### Beispiel 18

In 10 ml 0,1 M Pyrophosphatpufferlösung von pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, wurde 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure aufgelöst. Dann wurde 0,5 ml der aktivierten Mycelsuspension, hergestellt unter Verwendung von *Trigonopsis variabilis*, wie im Beispiel 8a angegeben, hinzugefügt. Das Gemisch wurde unter Belüftung auf einem Wasserbad bei 33°C durchgerührt. Es wurde dabei die D-Aminosäure-Oxidation ausgeführt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch die Hochgeschwindigkeitsflüssigkeitschromatographie-Apparatur, wie im Beispiel 8b beschrieben, ausgeführt. Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials, 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure betrug 1 Minute und 56 Sekunden und jene von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, die durch die D-Aminosäure-Oxidation gebildet wurde, betrug 5 Minuten 28 Sekunden.

Nach beendeter Reaktion wurde das Mycel bei 4°C entfernt. Das Überstehende wurde abgetrennt und auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und viermal mit jeweils einem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt und mit einer Phosphatpufferlösung von pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatlösung wurde erneut viermal jeweils mit dem gleichen Volumen an Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden gesammelt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Das erhaltene Produkt wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 :

1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung einer Säule, gefüllt mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) und des Lösungsmittelgemisches der gleichen vorstehenden Zusammensetzung, entwickelt. Es wurden die Fraktionen, die antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis* besitzen, ausgewählt. Die so ausgewählten Fraktionen wurden auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF tropfenförmig aufgetragen. Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 2 im Volumenverhältnis) bzw. ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) zum Entwickeln verwendet. Die Fraktionen mit der Ultraviolett-Absorption im Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu Kagaku Kogyo K.K.) und mit dem Rf-Wert 0,81 bzw. Rf-Wert 0,65 wurden gesammelt. Die Fraktionen wurden eingengt und lyophilisiert. Es wurden 40 mg reines 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Dieses Material besass antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escherichia coli*.

#### Beispiel 19

a) Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure:

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchiflaschen mit jeweils 100 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Dann wurde jedes Kulturmedium mit dem *Streptomyces oganensis* Y-G19Z-Stamm beimpft. Anschliessend wurde 48 Stunden bei 30°C kultiviert. Ein weiteres vorstehendes Kulturmedium wurde in 2 Liter Sakaguchiflaschen mit jeweils 400 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120°C sterilisiert. Jedes Kulturmedium wurde mit der Kulturbrühe beimpft, die vorstehend hergestellt worden ist. Es wurde 24 Stunden bei 30°C kultiviert, um eine Animpfkultur zu erhalten. Separat wurden 60 Liter Kulturmedium, die 7% Stärke, 2% Gluttenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminoäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, in 200 Liter Fermentoren zusammen mit 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel gefüllt und 30 Minuten bei 120°C sterilisiert. Jedes Kulturmedium wurde dann mit 800 ml der Animpfkultur beimpft und anschliessend 24 Stunden bei 30°C kultiviert. Dann wurde eine Lösung von 2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol, hergestellt mit wässriger Natriumhydroxidlösung und Sterilisieren bei hohem Druck, zu jedem Fermentor in einer solchen Menge gegeben, dass der Gehalt 0,05% in der Kulturbrühe betrug.

Dann wurde die Kultivierung 90 Stunden fortgesetzt.

Nach vollständiger Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Rühren vermischt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt, und es wurden etwa 100 Liter Filtratgemisch erhalten. Das Filtrat wurde durch Zugabe einer wässrigen Natriumhydroxidlösung auf pH 3,0 eingestellt und in eine 12-Liter Amberlite XAD-2 Säule gefüllt. Die Säule wurde mit 30-Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem 50%-igen Aceton eluiert. Das Eluat wurde auf 5,5 Liter eingengt, auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäure eingestellt und dann in eine 3-Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ) Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen. Eluiert wurde mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt. Es wurden 5 Liter Lösung, die antimikrobiell aktives Mate-

rial enthält, gewonnen. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, in eine 1-Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und mit 50%igem Aceton eluiert. Es wurden etwa 400 ml wässrige Lösung, die antimikrobiell aktives Material enthielt, welches lyophilisiert wurde, erhalten.

Das erhaltene Produkt wurde einer Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (5 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel) als Füllung unterworfen, wobei das Lösungsmittelgemisch mit der gleichen vorstehend angegebenen Zusammensetzung Anwendung fand, um die antimikrobiell aktiven Fraktionen auszuwählen.

Die Fraktionen wurden tropfenweise auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen, und es wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9) entwickelt. Eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin wurde aufgesprüht, und durch Erwärmen wurde angefärbt. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 gesammelt, unter vermindertem Druck zur Trockene bei 45-50°C eingedampft. Dann wurden die Fraktionen einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF in der vorstehend beschriebenen Weise unterworfen, um die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 zu sammeln. Die Fraktionen wurden zur Trockene eingedampft, wobei 0,92 rohes Pulver erhalten wurde. Das Pulver wurde in einer kleinen Menge von destilliertem Wasser aufgelöst und einer Säulenchromatographie mit destilliertem Wasser unter Verwendung von Amberlite CG-50 (H-Typ) unterworfen, um die antimikrobiell aktiven Fraktionen auszuwählen. Die Fraktionen wurden dann konzentriert und lyophilisiert. Das Produkt wurde in einer kleinen Menge aus destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Säule aus Sephadex G-10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die effektiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie in der schon vorstehend erläuterten Weise unterworfen. Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) verwendet, um die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,38 zu sammeln. Die Fraktionen wurden eingeengt und lyophilisiert, und dabei wurden 75 mg weiße 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

b) In 10 ml einer 0,1 M Pyrophosphat-Pufferlösung mit pH 8,1, die 0,026% Natriumazid enthielt, wurden 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thia-

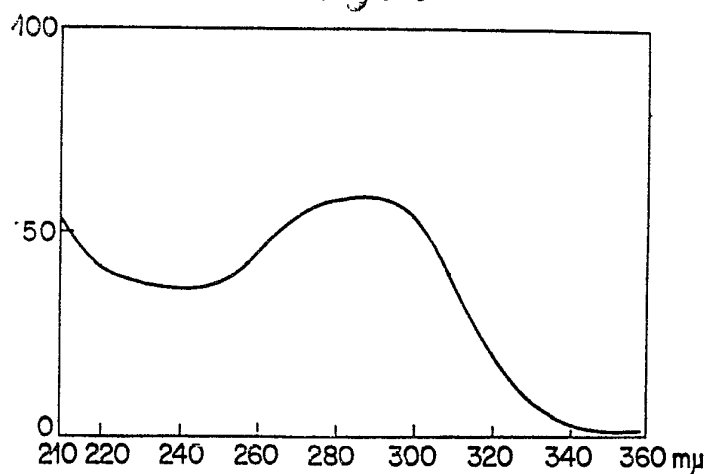
diazol-2-yl)-thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure aufgelöst. Dann wurde zu der Lösung 0,5 ml aktivierte Mycelsuspension, hergestellt unter Verwendung von *Trigonopsis variabilis*, wie in Beispiel 8a angegeben, hinzugefügt. Das Gemisch wurde unter Belüftung in einem Wasserbad bei 33°C gerührt, um die D-Aminosäureoxidation auszuführen. Der vollständige Ablauf der Umsetzung wurde mit der gleichen Hochgeschwindigkeitsflüssigkeits-Chromatographie-Apparatur, wie im Beispiel 8b beschrieben, überwacht. Die Retentionszeit des Ausgangsmaterials 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure betrug 1 Minute 56 Sekunden und die von 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure, gebildet durch die D-Aminosäure-Oxidation, betrug 5 Minuten 28 Sekunden.

Nach beendeter Reaktion wurde das Mycel bei 4°C entfernt. Das Überstehende wurde abgetrennt und auf pH 1,5-2,0 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäure eingestellt und viermal mit jeweils dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetat-Fractionen wurden vereinigt und mit Phosphat-Pufferlösung bei pH 6,0 reextrahiert. Die Phosphatlösung wurde dann auf pH 1,5-2,0 eingestellt und erneut viermal mit jeweils dem gleichen Volumen Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte wurden vereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet.

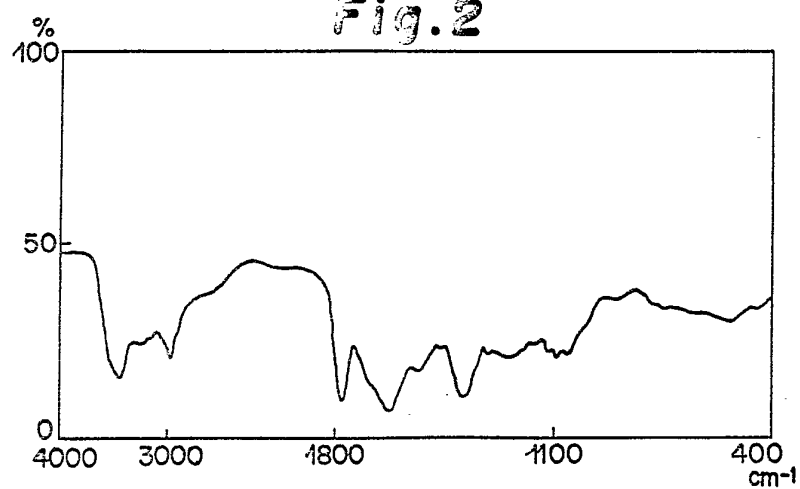
Es wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft. Das Produkt wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung einer Säule mit einer Füllung aus mikrokristalliner Cellulose (Avicel), wobei das Lösungsmittelgemisch die gleiche Zusammensetzung wie vorstehend beschrieben hatte, entwickelt, um die Fraktionen, die eine antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis* besitzen, auszuwählen. Die Fraktionen wurden tropfenweise auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21 : 3 : 7 : 9 im Volumenverhältnis) bzw. einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4 : 1 : 2 im Volumenverhältnis) entwickelt; dabei wurden die Fraktionen mit Ultraviolettabsorption im Manasululicht 2536 Å (Hersteller: Manasulu Kagaku Kogyo K.K.) gesammelt. Die Fraktionen wurden eingeengt und lyophilisiert. Es wurden 40 mg reine 7-(4-Carboxybutyramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- $\Delta^3$ -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Dieses Material besitzt eine antimikrobielle Aktivität gegen *Proteus mirabilis*, *Salmonella gallinarum* und *Escherichia coli*.

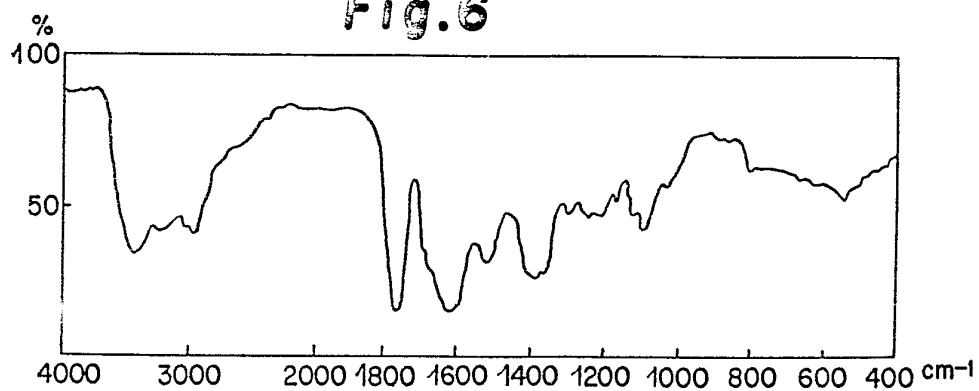
**Fig. 1**



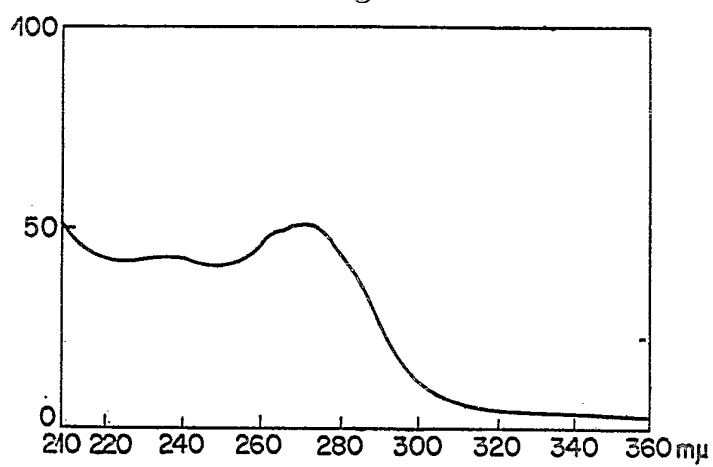
**Fig. 2**



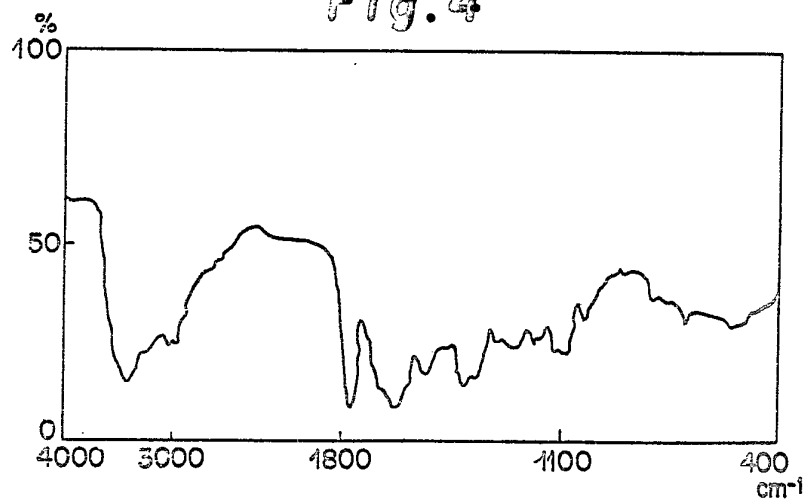
**Fig. 6**



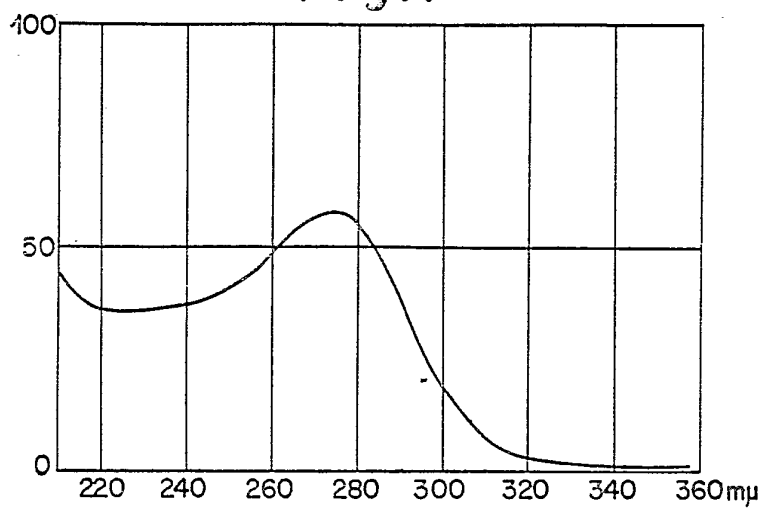
**Fig.3**



**Fig.4**

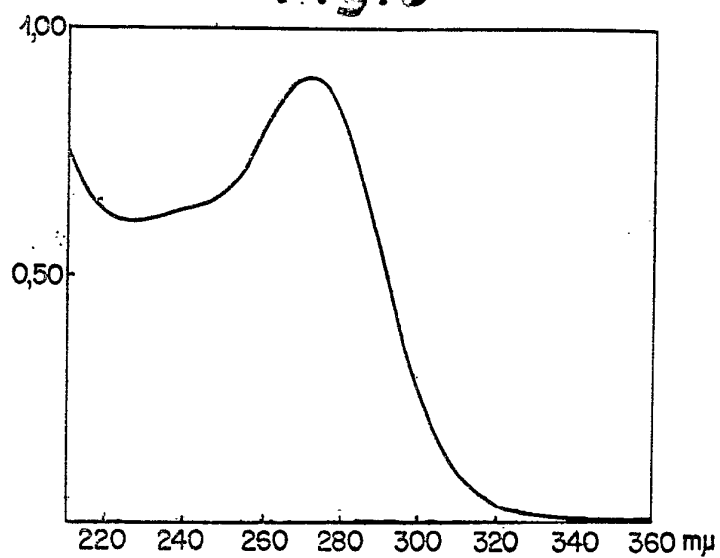


**Fig.7**

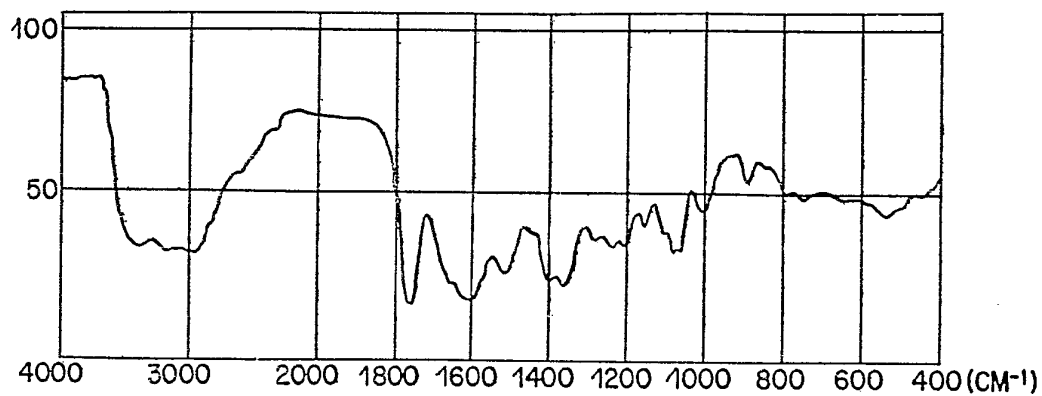




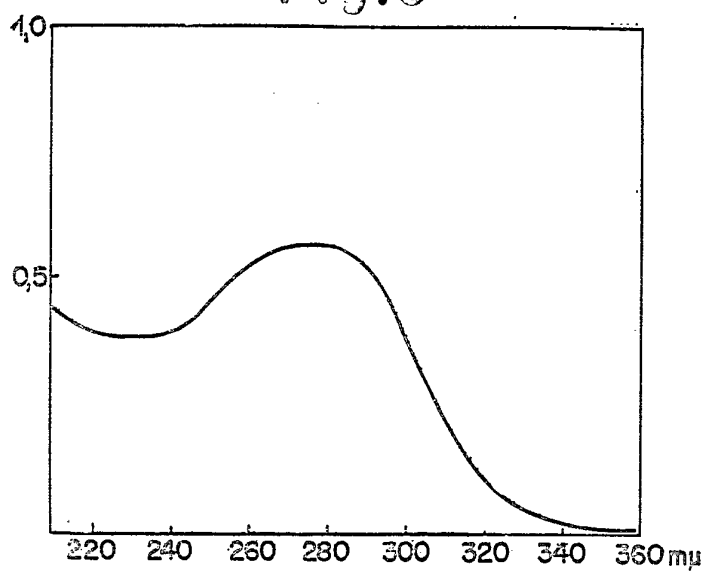
**Fig. 5**



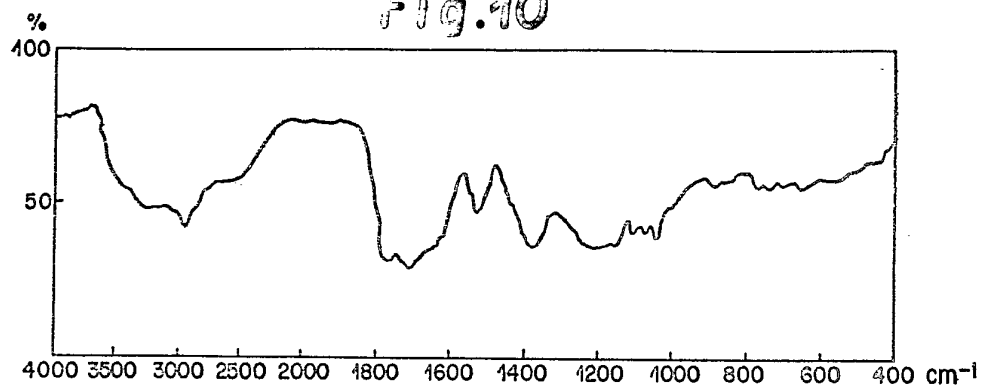
**Fig. 8**



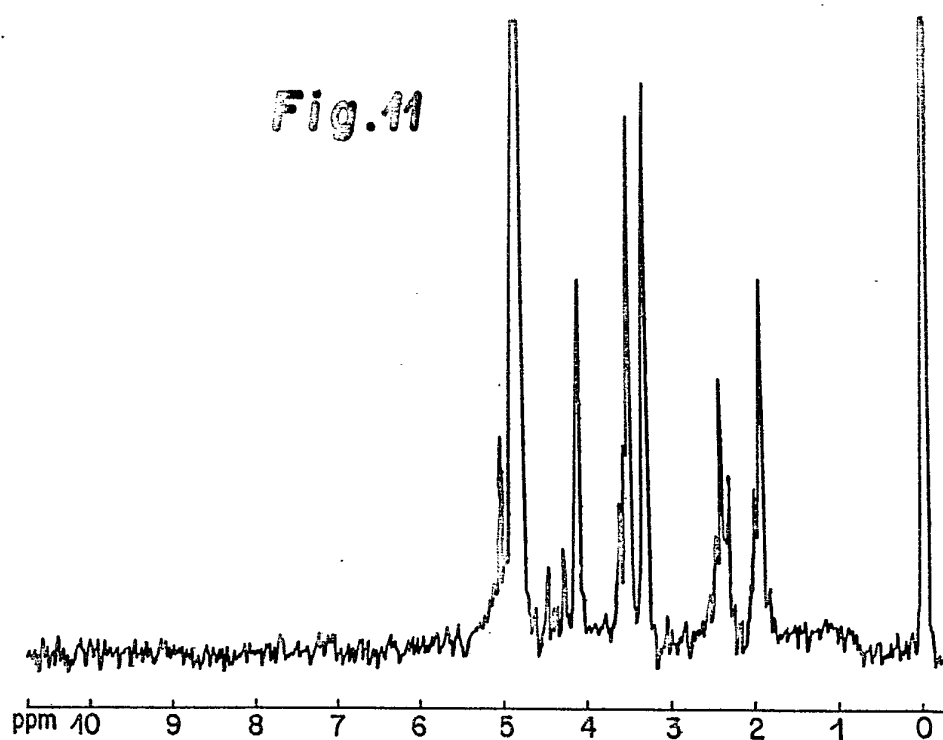
*Fig. 9*



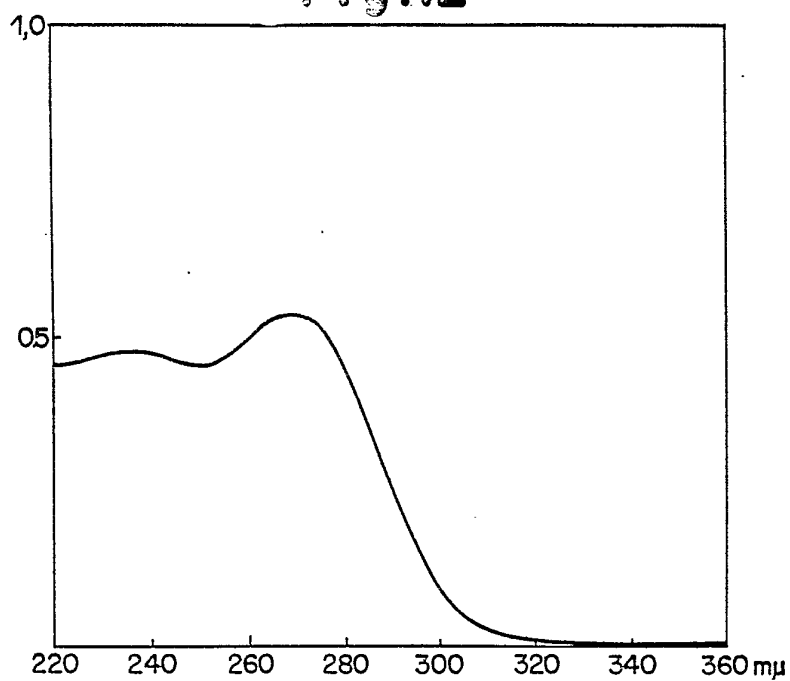
*Fig. 10*



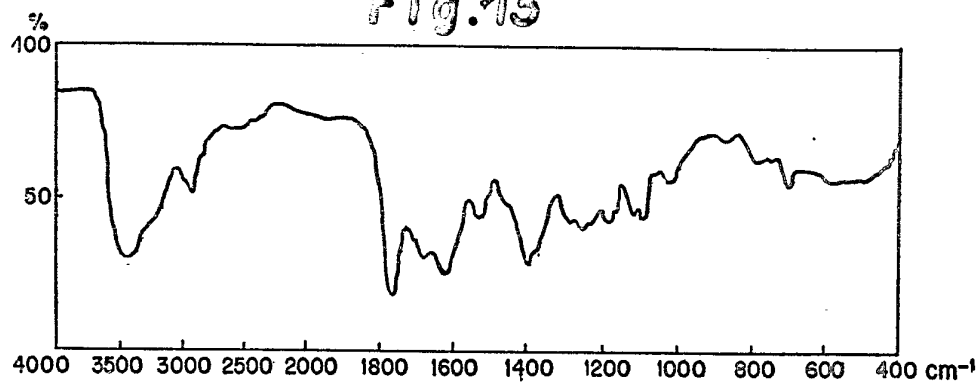
**Fig.11**



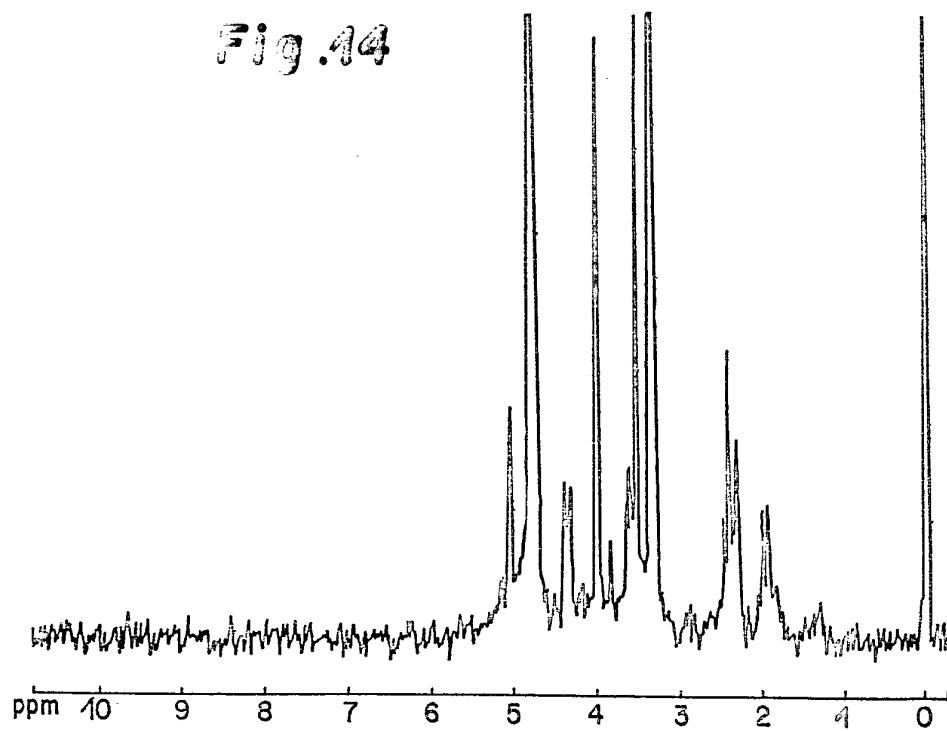
**Fig.12**



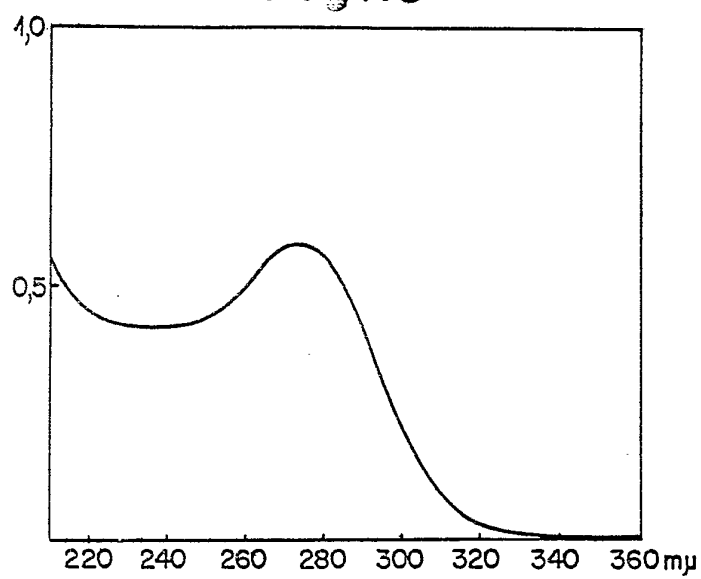
**Fig.13**



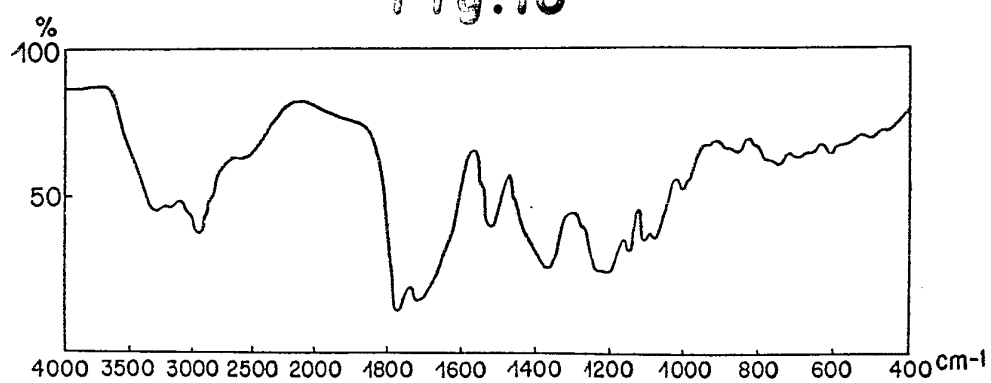
**Fig.14**



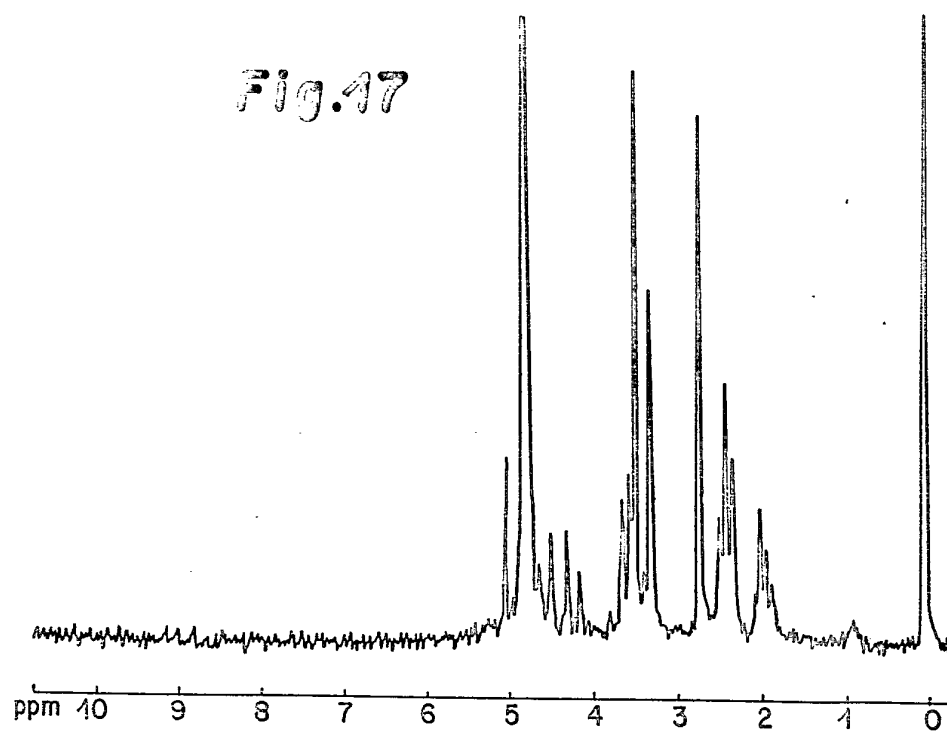
**Fig.15**



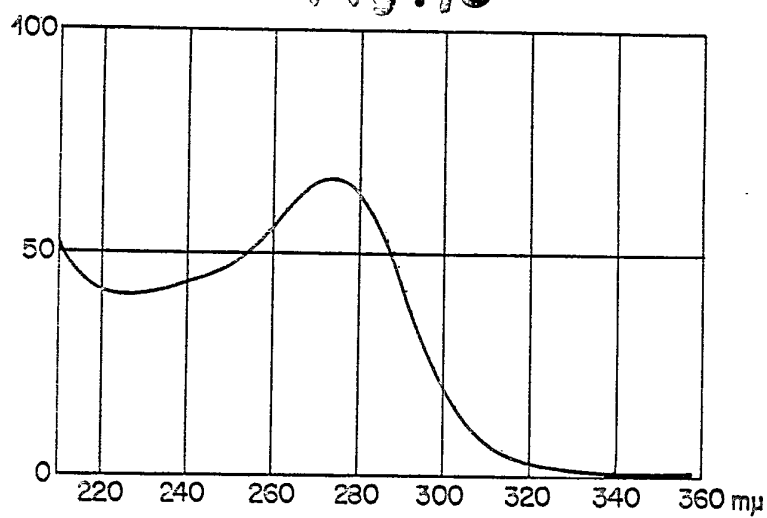
**Fig.16**



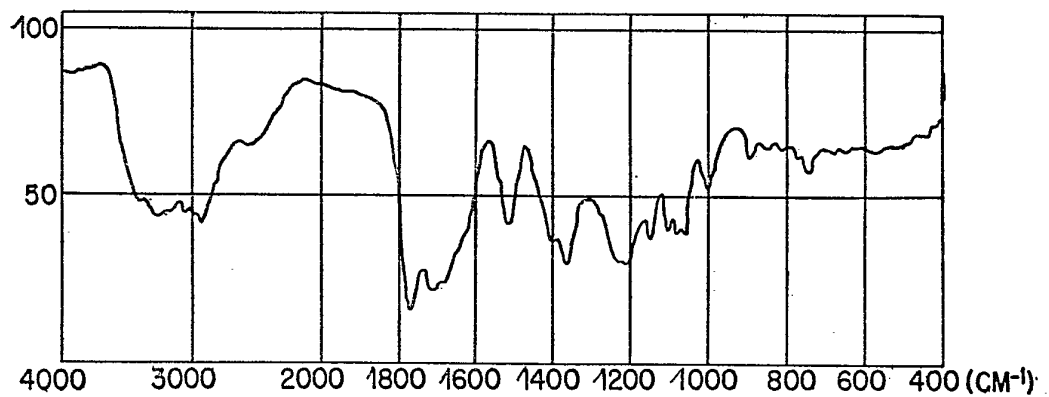
*Fig. 17*



*Fig. 18*



**Fig.19**



**Fig.20**

