



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(11) 799668

- (61) Дополнительный к патенту -
(22) Заявлено 25.12.76 (21) 2433852/23-04
(23) Приоритет - (32) 26.07.76
(31) 88770/76 (33) Япония

(51) М. Кл.³

C 07 D 501/36
C 12 P 35/00#
A 61 K 31/545

Опубликовано 23.01.81. Бюллетень № 3

(53) УДК 547.869.

.1.07(088.8)

Дата опубликования описания 25.01.81

(72) Авторы
изобретения

Иностранцы
Хирочи Гусима, Кейсукэ Мураками, Исао Такахаси,
Хирочи Ямагути, Тосио Сасаки, Киёси Сусаки, Суити Такамура,
Тосияки Миёси, Такаси Осано, Ёсихико Ока, Сунити Ватанабе
и Такеси Саито
(Япония)

(71) Заявитель

Иностранная фирма
"Яманути Фармасьютикал Ко, Лтд"
(Япония)

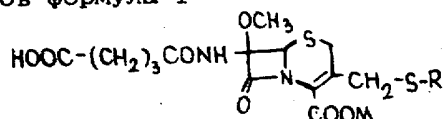
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 7-МЕТОКСИЦЕФАЛОСПОРИНОВ
ИЛИ ИХ СОЛЕЙ

Изобретение относится к способу получения цефалоспоринов с метоксильной группой в 7-ом положении, в частности к способу получения цефалоспоринов, имеющих метоксигруппу или 4-карбоксивбутирамидную группу в 7-ом положении и гетероциклическую тиометильную группу в 3-ом положении, ферментацией.

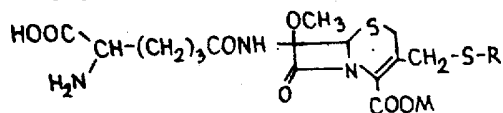
Известен способ получения 3-замещенной 7-метокси-7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-3-цефем-4-карбоновой кислоты или ее солей культивированием продуцирующего 7-метоксицефалоспориновый антибиотик микроорганизма в водной культуральной среде в аэробных условиях, введением в образующуюся 7-метокси-7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-3-(карбамоилоксиметил)-3-цефем-4-карбоновой кислоты вводят соответствующий заместитель в положение 3 и выделяют целевой продукт в виде свободной кислоты или соли. Эти соединения обладают физиологически активными свойствами [1].

Цель изобретения - получение новых производных цефалоспорина, расширяющих арсенал средств воздействия на живой организм.

Поставленная цель достигается способом получения 7-метоксицефалоспоринов формулы I



10 где R - азотсодержащая пяти- или шестичленная гетероциклическая группа; M - атом водорода или катионный остаток, образующий соль, заключающимся в том, что на соединении формулы II



20 где R и M имеют указанные значения, аэробно воздействуют мицелием микроорганизма рода Trigonopsis, продуцирующего окисляющий D-аминокислоту фермент, или обработанным продуктом мицелия и выделяют целевой продукт в виде свободной кислоты или соли. Примерами азотсодержащей пяти- или шестичленной гетероциклической группы служат пиридинная группа, 5-метил (или 5-карбоксиметилтио)-

30

-1,3,4-тиадиазол-2-ил и 1,3,4-тиадиазол-2-ил или 1-метилтетразол-5-ил.

Катионный остаток M для образования соли цефалоспоринона означает неорганический или органический остаток. Примерами неорганического остатка служат щелочные металлы (натрий и калий), щелочноземельные металлы (кальций, магний и барий), тяжелые металлы (железо, медь и цинк). Примерами органического остатка служат основания, образующие четвертичные соли, как соли аминов (триэтиламин, диэтанолламин, пиперидин и морфолин).

Штамм рода *Trigonopsis* выбирают из типовой культуры или выделяют из почвы. Для увеличения активности образования вещества формулы I можно применять мутанты, получаемые из указанных штаммов. В качестве микроорганизма, обладающего активностью ферментативного окисления D-аминокислоты, можно указать на *Trigonopsis variabilis*.

Для получения вещества I с помощью микроорганизма, имеющего ферментативную активность по окислению D-аминокислоты, предпочтительно микроорганизм сначала культивировать, а полученный мицелий или обработанный мицелий подвергать взаимодействию с цефалоспориновым соединением формулы II. В качестве метода культивирования с получением мицелия обычно применяют аэробное культивирование, еще лучше применять жидкое культивирование при перемешивании и при аэрации. В этом процессе применяют обычную культуральную среду. Можно применять искусственную, полусинтетическую или природную культуральные среды. В качестве источника углерода в такой среде применяют глюкозу, сахарозу, манитол, глицерин, декстрин, крахмал и растительное масло, в качестве источника азота применяют мясной экстракт, пептон, глютенную муку, муку из хлопковых семян, соевую муку, арахисовую муку, рыбную муку, кукурузную барду, сухие дрожжи, дрожжевой экстракт, сульфат аммония, нитрат аммония, мочевины и другие органические или неорганические азотсодержащие соединения.

При необходимости в культуральную среду добавляют металлические соли (сульфаты, нитраты, хлориды, карбонаты, фосфаты натрия, калия, магния, кальция, цинка и железа). Кроме того, при необходимости в культуральную среду добавляют метионин, цистеин, цистин, метилолеат, силиконовое масло, поверхностно-активное вещество в качестве промотора образования или противовспенивателя. Хорошие результаты получают при pH культуральной среды около 4-10, лучше 5-6.

В частности, если в культуральной среде содержится D-(или DL)-аминокислота, например D-(или DL)-ме-

тионин, D-(или DL)-эламин, D-(или DL-)валин, то достигается высокая активность фермента, окисляющего D-аминокислоту. Температура культивирования обычно составляет 18-37°C, лучше около 30°C. Длительность культивирования меняется в зависимости от условий культивирования, в частности используемого аппарата для культивирования, состава культуральной среды, температуры культивирования, но предпочтительно заканчивать культивирование, когда активность окисляющего D-аминокислоту фермента становится максимальной. Обычно для этого требуется 2-10 дней.

Полученный таким образом мицелий или обработанный мицелий применяют для окислительной реакции D-аминокислоты в исходном веществе формулы II. Обработанный мицелий означает мицелий, который превращен в форму для продуцирования вещества I путем увеличения активности окисляющего D-аминокислоту фермента применением его соответствующей обработки.

Например, активно окисляющий D-аминокислоту фермент обычно существует в мицелии, и обработанный мицелий означает освобожденный от клеток экстракт, с помощью физической или химической обработки мицелия, собранный из продукта культивирования штамма, продуцирующего окисляющий D-аминокислоту фермент. Промывают и частично или полностью очищают окисляющий D-аминокислоту фермент, полученный из несодержащих клеток экстракта путем применения методов разделения и очистки ферментов; активированный мицелий, полученный комбинацией частично или полностью очищенного окисляющего D-аминокислоту фермента, соединяют с водонерастворимым полимером или неорганическим носителем физическим или химическим методом и получают твердый активатор окисляющего D-аминокислоту фермента или мицелия, затем активатор или мицелий подвергают активирующей обработке.

Получение и циркуляция указанного растворимого фермента практически ограничены, но применение нерастворимого фермента, например активированного мицелия, удобно для промышленного применения, поскольку его можно легко выделить и применять повторно.

Активирующую обработку мицелия проводят путем нанесения мицелию слабого повреждения в такой степени, чтобы его не разрушить. Примером такой активирующей обработки служат: метод, по которому мицелий замораживают до температуры ниже -10°C при pH около 3-4, затем размораживают;

метод, по которому мицелий обрабатывают в ванне одним или несколькими органическими растворителями, например ацетоном, бутанолом, 2-фе-

нилэтанолам, диэтиловым эфиром, толуолом;

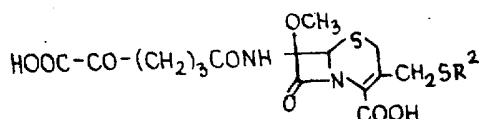
метод, по которому мицелий обрабатывают 0,1-10%-ным раствором поверхностно-активного вещества, например катионным поверхностно-активным веществом (цетилтриметиламмонием, цетилпиридинием, цетилдиметилбензиламмоний галоидом), анионным поверхностно-активным веществом (додецилсульфатом, алкиларилсульфонатом щелочного металла, дезоксихолатом натрия) или неионным поверхностно-активным веществом (монолауратом сорбитана, тритоном X-100 в его водном растворе);

метод, по которому мицелий обрабатывают разбавленным водным раствором гидроокиси калия или гидроокиси натрия и

метод, по которому мицелий суспендируют в растворе с большим осмотическим давлением, например 2M раствором сахара, а затем раствор быстро разбавляют водой.

На такую активирующую обработку сильно влияют разные факторы (например, температура, длительность обработки, величина pH, концентрация реагента и другие), следовательно, необходимо подбирать условия активации.

Кроме того, когда действие каталазы, обычно присутствующей в мицелии, не ингибируется, то окислительное декарбоксилирование в конечный продукт I становится неполным с образованием одновременно 7-(5-карбокси-5-оксвалерамидо)-7-метоксицефалоспоринового производного, представленного общей формулой III



Для селективного получения вещества I желательно ингибировать активность каталазы. Примерами соответствующих ингибиторов каталазы служат аскорбиновая кислота, 3-амино-1,2,4-триазол, азид щелочного металла (лучше азид натрия). Ингибитор можно добавлять в реакционную смесь во время превращения исходного вещества II в вещество I, или мицелий можно предварительно обработать ингибитором перед применением. Количество азиды натрия для этой цели составляет 1-100 мм.

Кроме того, каталазу в мицелии можно дезактивировать термообработкой мицелия до использования его в стадии превращения. При обработке мицелия при 40-60°C (лучше при 50°C) в течение не менее 3 ч значительно снижается активность каталазы, но активность D-аминокислотной оксидазы сохраняется. Термообработку мицелия

можно осуществлять в водном растворе или в буферной суспензии. Особенно эффективно применять одновременную термообработку и обработку активирующим реагентом. Например, проводя активирующую обработку мицелия при 50°C в течение 4 ч с применением такого растворителя, как толуол, одновременно удается ингибировать каталазу и активировать мицелий.

Реакцию энзимной смеси активированного мицелия и исходного вещества (2) обычно ведут при pH 6-8. Желательно проводить реакцию при 30-40°C. Длительность реакции зависит, главным образом, от активности энзима, но обычно она составляет 1-5 ч.

Энзимная реакция проводится в аэробных условиях, т.е. при аэрации воздухом или кислородом.

Выделение продукта формулы I можно вести при соответствующих условиях из ферментированного бульона исходного вещества формулы II после удаления из него мицелия, т.е. образовавшееся вещество I можно легко выделить экстракцией растворителем или сорбцией ионообменной смолой. Например, реакционную продуктовую смесь подкисляют до pH < 2,5, затем нужное вещество экстрагируют из этой смеси соответствующим органическим растворителем (этил-ацетатом, бутилацетатом, бутанолом). В этом случае лучшие результаты дает комбинация ионообменной смолы и экстракции растворителем. Соответствующими ионообменными смолами являются жидкие аминовые анионообменные смолы. Целевой продукт можно также выделить с помощью твердой ионообменной смолы. В этом случае хороший растворитель можно выбрать путем предварительного опыта.

Целевое вещество формулы I можно выделять не только в виде свободной кислоты, но и в виде его соли щелочного или щелочноземельного металла, соли органического амина.

Примеры исходных соединений формулы I:

7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-3-(5-карбоксиметилтио-1,3,4-триадиазол-2-ил)-тиометил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновая кислота (A);

7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-3-(1-метил-1H-тетразол-5-ил)-тиометил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновая кислота (B);

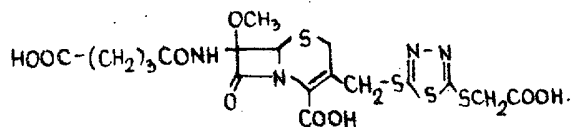
7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(5-метил-1,3,4-триадиазол-2-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновая кислота (C) и

7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-триадиазол-2-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновая кислота (D).

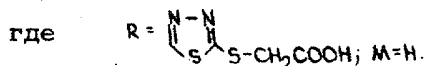
Примеры 7-метоксицефалоспориновых производных формулы (1), полученных

предлагаемым способом, и их свойства.

Пример 1. 7-(4-Карбокси-бутирамидо)-3-(5-карбоксиметилтио-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновая кислота (I)



Исходное соединение А формулы I,



Физические и химические свойства.

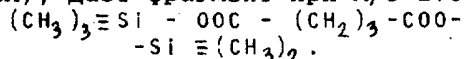
Белый порошок, т.пл. 75-78°C. Легко растворим в метаноле и этаноле, растворим в воде, этилацетате, бутилацетате и бутаноле, плохо растворим в других органических растворителях. Кислое вещество, дает отрицательную нингидриновую реакцию. Для УФ-спектра поглощения при определении в фосфорном буферном растворе 0,01 М и рН 6,5 максимум поглощения при 278 мкм. ИК-спектр поглощения (при определении в виде таблетки КВг) при 3250, 2925, 1770, 1715, 1520 и 1380 см⁻¹. ЯМР-спектр, определенный в TMS в качестве внутреннего стандарта в тяжелом метаноле, дает сигналы: величина δ (части/млн) 1,93 (2Н, мультиплет); 2,41 (4Н, мультиплет); 3,1 (3Н, синглет); 3,37-3,81 (2Н, кватер, J 18 Гц); 4,11 (2Н, синглет); 4,15-4,63 (2Н, кватер, J 14 Гц); 5,05 (1Н, синглет).

Элементный анализ для C₁₈H₂₀N₄O₉S₄ · 2H₂O.

Вычислено, %: С 35,99; Н 4,03; N 9,33.

Найдено, %: С 35,77; Н 3,81; N 9,12.

Масс-спектр, определенный после гидролиза вещества 6 н. соляной кислотой в течение 2,5 ч при 100°C, экстракции продукта этиловым эфиром, сушки продукта испарением и силилирования бис-триметилсилилацетамидом (БСА), дает фрагмент при м/е 276

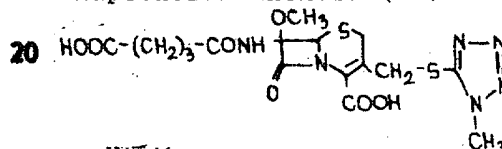


Конечное соединение представляет собой 7-метоксицефалоспориновое соединение, исходя из наличия, в частности, линий поглощения при 1770 см⁻¹ (циклический лактам) в инфракрасном спектре поглощения и из сигналов 3,5 (3Н, синглет, 7-OCH₃); 5,05 (1Н, синглет, 6-СН); 3,37-3,81 (2Н, кватер, J 18 Гц, 2-СН₂); 4,15-4,6 (2Н, кватер, J 14 Гц, 3 - боковая цепь СН₂) и 4,11 имп/мин (2Н,

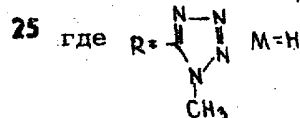
синглет, СН₂ цепи -S-СН₂-СООН). Кроме того, имеются сигналы 1,93 (2Н, мультиплет, β-СН₂) и 2,41 имп/мин (4Н, мультиплет, α, γ-СН₂); показывающие наличие 4-карбоксибутирамидо в спектре ЯМР, и масс-спектр производного данного целевого соединения, которое гидролизуеться соляной кислотой и силилируется, дает фрагмент м/е 276, поэтому конечное соединение (I) имеет указанную структуру, т.е.

5-амино-5-карбоксивалерамидогруппа в 7-ом положении исходного соединения подвергнута окислительному дезаминированию до 4-карбоксибутирамидогруппы.

Пример 2. 7-(4-Карбоксибутирамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновая кислота (II)



Исходное соединение В формулы I,



Физические и химические свойства.

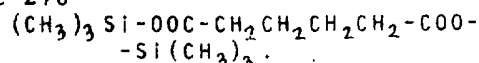
Белый порошок, т.пл. 80-83°C. Легко растворим в метаноле и этаноле, растворим в воде, этилацетате, бутилацетате и бутаноле, плохо растворим в других органических растворителях; натриевая соль легко растворима в воде. Кислое вещество, дает отрицательную нингидриновую реакцию. Для УФ-спектра в фосфатном буферном растворе 0,01 М с рН 6,5 максимум поглощения при 269 мкм. ИК-спектр определяют в виде таблетки КВг при 3420, 2940, 1765, 1680, 1610, 1525 и 1390 см⁻¹. ЯМР-спектр, определенный в TMS в качестве внутреннего стандарта в тяжелом метаноле, дает сигналы: величина δ (части/млн) 1,94 (2Н, мультиплет); 2,40 (4Н, мультиплет); 3,51 (3Н, синглет); 3,40-3,83 (2Н, кватер, J 18 Гц); 3,99 (3Н, синглет); 4,17-4,50 (2Н, кватер, J 14 Гц); 5,02 (1Н, синглет).

Элементный анализ для C₁₆H₂₀N₆O₇S₂ · 2H₂O.

Вычислено, %: С 37,79; Н 4,76; N 16,53.

Найдено, %: С 37,78; Н 4,75; N 16,41.

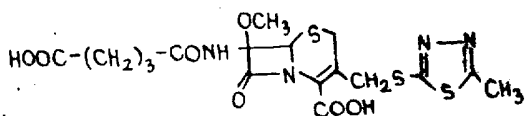
Масс-спектр, определенный после гидролиза вещества 6 н. соляной кислотой в течение 2,5 ч при 100°C, экстрагирования гидролизованного продукта этиловым эфиром, сушки испарением и силилирования БСА дает фрагмент при м/е 276



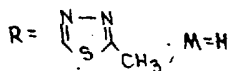
Конечное соединение представляет собой 7-метоксицефалоспориновое

соединение, исходя, в частности, из наличия линии поглощения при 1765 см^{-1} (циклический лактам) в инфракрасном спектре поглощения и из сигналов 3,51 (3H, синглет, 7-OCH₃); 5,02 (1H, синглет, 6-CH); 3,99 (3H, синглет, 7-OCH₃); 5,02 (1H, синглет, 6-CH); 3,99 (3H, синглет, N-CH₃ тетразола); 3,40-3,83 (2H, квартет, J 18 Гц, 2-CH₂) и 4,17-4,50 имп/мин (2H, квартет, J 14 Гц, 3 - боковая цепь CH₂). Кроме того имеются сигналы 1,94 (2H, мультиплет, β-CH₂) и 2,40 имп/мин (4H, мультиплет, α, γ-CH₂), показывающие наличие 4-карбоксивалер-амидо в спектре ЯМР, и масс-спектр производного данного целевого соединения, гидролизованного соляной кислотой и силилированного, дает фрагмент м/е 276, поэтому конечное соединение имеет указанную структуру, т.е. 5-амино-5-карбоксивалер-амидогруппа в 7-ом положении исходного соединения подвергнута окислительному дезаминированию до 4-карбоксивалер-амидогруппы.

Пример 3. 7-(4-Карбоксивалер-амидо)-7-метокси-3-(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновая кислоты (III)



Исходное соединение С формулы I,



Физические и химические свойства.

Белый порошок, т.пл. $95-99^\circ\text{C}$. Легко растворим в метаноле и этаноле; растворим в воде, этилацетате, бутилацетате и бутаноле, плохо растворим в других органических растворителях. Кислое вещество, дает отрицательную нингидриновую реакцию. Для УФ-спектра в фосфатном буферном растворе 0,01M при pH 6,5 максимум поглощения при 273 мкм. ИК-спектр определяют в виде таблеток KBr при $3260, 2925, 1773, 1515$ и 1375 см^{-1} .

ЯМР-спектр, определенный в качестве внутреннего стандарта в тяжелом метаноле, дает сигналы: величина δ (части/млн): 1,92 (2H, мультиплет); 2,40 (4H, мультиплет); 2,71 (3H, синглет); 3,38-3,80 (2H, квартет, J 18 Гц); 3,51 (3H, синглет); 4,17-4,64 (2H, квартет, J 14 Гц) и 5,03 имп/мин (1H, синглет).

Элементный анализ для $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_3$.
Вычислено, %: С 41,79; Н 4,1;
N 11,47.

Найдено, %: С 41,89; Н 4,27;

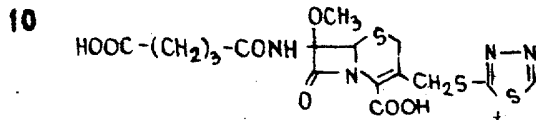
N 11,17.

Масс-спектр, определенный после гидролиза вещества 6 н. соляной кис-

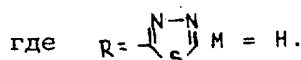
лотой при 100°C в течение 2,5 ч, экстрагирования продукта этиловым эфиром, сушки экстракта испарением и силилирования БСА дает фрагмент при м/е 276

5 $(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{OOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

Пример 4. 7-(4-Карбоксивалер-амидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновая кислота (IV)



15 Исходное соединение D формулы I,



20 Физические и химические свойства.
Белый порошок, т.пл. $88-92^\circ\text{C}$.

Легко растворим в метаноле и этаноле; растворим в воде, этилацетате, бутилацетате и бутаноле; ограниченно растворим в других органических растворителях. Кислое вещество, дает отрицательную нингидриновую реакцию. УФ-спектр при определении в фосфатном буферном растворе 0,01 M при pH 6,5 дает максимум поглощения при 274 мкм. ИК-спектр определяют в виде таблетки KBr при $3250, 2925, 1770, 1515$ и 1365 см^{-1} .

30 ЯМР-спектр, определенный в TMS в качестве внутреннего стандарта в тяжелом метаноле, дает сигналы: величина δ (части/млн): 1,92 (2H, мультиплет); 2,40 (4H, мультиплет); 3,39-3,83 (2H, квартет, J 18 Гц); 3,51 (3H, синглет); 4,24-4,73 (2H, квартет J 14 Гц); 5,03 (1H, синглет) и 9,35 имп/мин (1H, синглет).

Элементный анализ для $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$.

Вычислено, %: С 37,4; Н 3,96;

N 11,59.

Найдено, %: С 39,69; Н 3,87;

N 11,32.

50 Масс-спектр, определенный после гидролиза соединения 6 н. соляной кислотой в течение 2,5 ч при 100°C , экстрагирования продукта этиловым эфиром, сушки экстракта испарением и силилированием его БСА дает фрагмент при м/е 276

55 $(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{OOC}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COO}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

Конечное соединение представляет собой 7-метоксицефалоспориновое соединение исходя, в частности, из наличия линии поглощения при 1770 см^{-1} (циклический лактам) в инфракрасном спектре поглощения и из сигналов 3,51 (3H, синглет, 7-OCH₃); 5,03 (1H, синглет, 6-CH); 9,35 (1H, синглет, СН триадиазола); 3,39-3,83 (2H, квартет, J 18 Гц, 2-CH₂) и 4,24-4,73 имп/мин (2H, квартет, J 14 Гц, 3 боковые

цепи CH_2). Кроме того, имеются сигналы 1,92 (2H, мультиплет, $-\text{CH}_2$); и 2,40 имп/мин (4H, мультиплет, α , γ - CH_2), показывающие наличие 4-карб-оксипутирамида в спектре ЯМР, и масс-спектр производного, полученного путем гидролиза конечного соединения соляной кислотой и силилирования продукта, дает фрагмент м/е 276, конечное соединение имеет указанную структуру, т.е. 5-амино-5-карбоксивалер-амидогруппа в 7-ом положении исходного соединения подвергнута окислительному дезаминированию до 4-карб-оксипутирамидогруппы.

В табл. 1 представлены результаты анализа соединений I-IV и A-D тонко-слойной хроматографией.

| Соединение | Т а б л и ц а 1 | | Нин-гид-рино-вое окра-шивание |
|---|-----------------------|------|-------------------------------|
| | Система растворителей | | |
| | 1 | 2 | |
| Исходное соедине-ние А | 0,44 | 0,37 | + |
| Целевое соедине-ние I | 0,79 | 0,72 | - |
| Исходное соедине-ние В | 0,44 | 0,34 | + |
| Целевое соедине-ние II | 0,81 | 0,64 | - |
| Исходное соедине-ние С | 0,42 | 0,44 | + |
| Целевое соедине-ние III | 0,82 | 0,77 | - |
| Исходное соедине-ние D | 0,42 | 0,36 | + |
| Целевое соедине-ние IV | 0,81 | 0,65 | - |
| 7-(5-амино-5-карб-оксивалерамидо)-3-[(3-п-оксифенил-2-метоксипропеноил)-оксиметил]-7-метокси-3-цефем-4-карбоновая кислота | 0,66 | 0,67 | + |
| 7-(4-карбокси-бутирамидо)-3-[(3-п-оксифенил-2-метоксипропеноил)-оксиметил]-7-метокси-3-цефем-4-карбоновая кислота | 0,67 | 0,67 | - |

П р и м е ч а н и е. Разделительные системы растворителей: 1-Изопропанол:бутанол:уксусная кис-

лота:вода (21:3:7:9 по объему). 2-Бу-танол:уксусная кислота:вода (4:1:2 по объему).

5 Определение проводят при помощи нингидриновой реакции, ультрафиоле-тового поглощения 2536 Å или био-автографии (применяют *Proteus mi-rabilis*).

Все соединения дают положительный результат в двух последних пробах.

10 Результаты высокоскоростной жид-костной хроматографии приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

| Соединение | Время удерживания |
|--|-------------------|
| 15 Исходное соедине-ние А | 3 мин 14 с |
| 20 Целевое соедине-ние I | 13 мин 24 с |
| Исходное соедине-ние В | 1 мин 53 с |
| 25 Целевое соедине-ние II | 4 мин 54 с |
| Исходное соедине-ние С | 2 мин 55 с |
| 30 Целевое соедине-ние III | 11 мин 18 с |
| Исходное соедине-ние D | 1 мин 56 с |
| 35 Целевое соедине-ние IV | 5 мин 28 с |
| 40 7-(5-амино-5-карб-оксивалерамидо)-3-[(3-п-оксифенил-2-метоксипропеноил)-оксиметил]-7-метокси-3-цефем-4-кар-боновая кислота | 5 мин 18 с |
| 45 7-(4-карбоксибутир-амидо)-3-[(3-п-окси-фенил-2-метокси-пропеноил)-окси-метил]-7-метокси-3-цефем-4-карбоно-вая кислота | 5 мин 55 с |
| 55 П р и м е ч а н и е. Система растворителей ацетонитрил: 0,1%-ная уксусная кислота (1:9 по объему); рН 3,3. Для двух последних цефало-спориновых соединений отношение 2:8. | |
| 60 Действие соединений В, С, II и III в условиях <i>in vivo</i> определяют следующим образом. | |
| 65 В организм здоровых пяти мышей самцов вида ddy вводят путем внутри-брюшинной инъекции 10^6 клеток <i>E. coli</i> NIH _Y , и через два часа вводят | |

путем подкожной инъекции каждое со-единение и определяют процент выжи-вания после пяти дней. Аналогичные эксперименты осуществляют с вводом 10^5 клеток *Proteus mirabilis* 1287. Каждая контрольная группа включает 10 мышей. Результаты представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

| Со-единение | E. coli NIHU | | | | Proteus mirabilis 1287 | | | |
|-------------|--------------|-----|-----|---|------------------------|-----|-----|---|
| | Доза, мг | | | | | | | |
| | 3,0 | 1,0 | 0,5 | 0 | 3,0 | 1,0 | 0,5 | 0 |
| V | 100 | 100 | 100 | 0 | 40 | 20 | 0 | 0 |
| II | 100 | 100 | 0 | 0 | 60 | 20 | 0 | 0 |
| C | 80 | 80 | 40 | 0 | 100 | 20 | 20 | 0 |
| III | 80 | 60 | 0 | 0 | 40 | 20 | 20 | 0 |

П р и м е р 5.

а) В эрленмейеровские колбы объемом 500 мл помещают по 100 мл культуральной среды, содержащей (рН 6,0) 20 г глюкозы, 4 г двузамещенного фосфорнокислого калия, 1 г сульфата магния, 0,5 г хлористого кальция, 0,1 г борной кислоты, 0,04 г молибдата аммония, 0,04 г сульфата марганца, 0,04 г сульфата цинка, 0,045 г сульфата меди, 0,025 г сульфата железа (II), 20 мкг биотина, 2 мг хлоргидрата тиамина, 1 г DL-метионина и 1000 мл воды. После стерилизации на каждую порцию среды производят посев штамма 1 F0 0755 *Trigonopsis variabilis* и проводят культивирование при 30°C в течение 72 ч.

По окончании культивирования получают около 1000 мл бульонной культуры, которую подвергают центрифугированию при 4°C и 2000 об/мин в течение 30 мин, собирают мицелий и суспендируют его в 500 мл буферного раствора с рН 8,1, содержащего 0,1 М пиррофосфата; к полученной суспензии мицелия прибавляют 5 мл Tritona X-100 и, с целью активирования мицелия, в течение 20-40 мин взбалтывают смесь при 37°C, снова центрифугируют при 4°C и 2000 об/мин в течение 30 мин, отделенный активированный дважды мицелий промывают буферным раствором пиррофосфата с рН 7-8, снова суспендируют в 100-200 мл буферного раствора с рН 8,1, содержащего 0,1 М пиррофосфата, получая суспензию активированного мицелия.

б) В 10 мл 0,1 М пиррофосфатного буферного раствора с рН 8,1, содержащего 0,026% азида натрия, растворяют 54,5 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тиометил-3-це-

фем-4-карбоновой кислоты и, после прибавления к этому раствору 0,5 мл суспензии активированного мицелия, производят перемешивание его в условиях азирования на водяной бане с температурой 33°C. Каждые 30 мин реакционную систему проверяют с помощью аппарата Хитачи для скоростной жидкостной хроматографии. Система растворителей ацетонитрил: 0,1%-ная уксусная кислота (объемное отношение 1:9). Эту проверку осуществляют для определения окончания реакции, так как время задержки исходного соединения 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты 1 мин 53 с, а время задержки конвертированной при этом за счет окисления D-аминокислоты 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты 4 мин 54 с.

По окончании реакции мицелий уда-ляют центрифугированием, а всплывающий слой отделяют путем доведения рН до 1,5-2,0 с помощью разбавленного водного раствора соляной кислоты и четырехкратного экстрагирования равными объемами этилацетата. Экстракт в этилацетате отделяют и снова экстрагируют буферным раствором фосфата, имеющим рН 6,0. После этого буферный раствор доводят до рН 1,5-2,0 с помощью разбавленной соляной кислоты и снова экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата. Этилацетатные вытяжки соединяют, сушат безводным сульфатом натрия и выпаривают до суха, после чего продукт хроматографируют на колонке с микрокристаллической целлюлозой Avicel (торговая марка) и смесью растворителей н-бутанол: уксусная кислота: вода (объемное отношение 4:1:2) при промывании колонки той же смесью растворителей. Каждую фракцию проверяют на антимикробную активность по отношению к *Proteus mirabilis*, отбирая фракции, обладающие этой антимикробной активностью, хроматографируют на тонкослойной пластине Avicel SF (торговая марка) и разделяют с помощью смеси растворителей изопропанол: н-бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 21:3:7:9) и смеси н-бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2). После этого фракции, характеризующиеся ультрафиолетовым поглощением в области света 2536 Å аппарата Манасулу (фирмы Манасулу Кагаку Когю К.К.) и R_f 0,81 и R_f 0,64 соответственно, собирают, концентрируют и лиофилизуют, получая 35 мг чистой 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-

экстракта дрожжей 0,5; кислого фосфата калия 0,1; сульфата магния 0,05 и хлористого натрия 0,3, помещают в 500 мл колбы Сикагичи, по 100 мл в каждую, и стерилизуют при 120°C в течение 20 мин. В каждую порцию производят посев штамма *Y-G192 Streptomyces Organonensis*, а затем культивируют при 30°C в течение 48 ч.

Другую культуральную среду помещают в двухлитровые колбы Сикагичи, по 400 мл в каждую, стерилизуют при 120°C в течение 20 мин и производят посев 2-3%-ной бульонной культуры. Затем производят культивирование при 30°C в течение 24 ч и получают культуру для посева.

Отдельно в два 100-литровых ферментатора вместе с 10 мл *Adesanol* (торговая марка), помещают по 60 л культуральной среды, содержащей, %: крахмала 7; тонко размолотой клейковины 2,0; муки соевых бобов 2,0; глицерина 0,8; кислоты Казамино 0,1; сульфата железа(III) 0,01 и 55 г гидроокиси натрия, 30 мин стерилизуют при 120°C и производят посев 800 мл полученной ранее культуры для посева. Затем культивируют при 30°C в течение 24 ч. К полученному культуральному бульону прибавляют раствор 5-меркапто-1-метил-1Н-тетразол, приготовленный на водном растворе гидроокиси натрия и стерилизованный при высоком давлении так, что концентрация тетразола 0,05%. Культивирование ведут в течение 90 ч.

По окончании культивирования бульон доводят до pH 2,0 и к нему при перемешивании прибавляют *Radiolite* (торговая марка). Полученную смесь фильтруют на фильтр-прессе, фильтраты соединяют и получают 100 л смеси фильтратов, содержащих 100 мкг/мл 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

6) Фильтрат доводят до pH 3,0, пропускают через колонку с 12 л Амберлита XAD-2 (торговая марка), колонку промывают 30 л воды и элюируют 30 л 50%-ного раствора ацетона в воде. Элюат концентрируют до объема 5,5 л, доводят его pH до 7,5 с помощью водного раствора гидроокиси натрия, удаляют нерастворимый осадок и прибавляют к раствору 320 мл суспензии активированного мицелия штамма *Trigonopsis variabilis* I OF 0755. Смесь 4 ч перемешивают при аэрировании, доводят до pH 1,5-2,0 с помощью водного раствора соляной кислоты и экстрагируют 4 раза равными объемами этилацетата; экстракты соединяют, полученные 20 л экстракта в этилацетате снова экстрагируют 2 л буферного раствора фосфата, имеющего pH 6,0. Этот экстракт в фосфатном раство-

ре доводят водным раствором соляной кислоты до pH 1,5-2,0 и снова экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата. Этилацетатные вытяжки соединяют и полученные в результате 8 л экстракта упаривают в вакууме досуха, получая 15 г неочищенного продукта, который подвергают хроматографированию на колонке с порошком целлюлозы так же, как это производится в примере 5б и получают 6,1 г 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

Пример 9. На культуральной среде, содержащей, г: глюкозы 5,0; пептона 1,0; кислого фосфата калия 1,0; сульфата магния 0,5; экстракта солода 10,0; DL-метионина 1,0 и 1000 мл воды при pH 6,0 производят посев штамма *Trigonopsis variabilis* I FO 0755, затем культивируют по методике примера 5а и получают 1000 мл бульонной культуры, которую центрифугируют при 2000 об/мин и 4°C, и получают мицелий. Мицелий суспендируют в 200 мл 0,1 М пиррофосфатного буфера с pH 8,1. Полученную суспензию помещают, по 50 мл в каждую, 500 мл колбу Эрленмейера, прибавляют по 5 мл толуола и в течение 1 ч проводят культивирование при 37°C. После этого активированный мицелий отделяют на центрифуге при 2000 об/мин в течение 30 мин, промывают с помощью центрифуги 200 мл 0,1 М пиррофосфатного буферного раствора с pH 8,1. Активированный мицелий снова суспендируют в 200 мл 0,1 М пиррофосфатного буфера с pH 8,1, а суспензию нагревают при перемешивании на водяной бане при 50°C, чтобы инактивировать каталазную активность. 5 мл полученной суспензии активированного мицелия прибавляют к раствору 100 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты в 20 мл 0,1 М пиррофосфатного буферного раствора с pH 8,1; 5 ч перемешивают при 33°C при аэрировании, обрабатывают смесь, как указано в примере 5б, и получают 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбовую кислоту.

Пример 10. Мицелий, полученный из *Trigonopsis variabilis* по методике примера 5а, замораживают при температуре ниже -20°C больше 1 ч, а затем оставляют при комнатной температуре до замерзания и суспендируют в 200 мл 0,1 М пиррофосфатного раствора с pH 8,1; 5 мл этой суспензии прибавляют к раствору 100 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты в 20 мл 0,1 М пиррофосфатного

буферного раствора с pH 8,1, содержащего 0,026% азидата натрия. 5 ч перемешивают при аэрировании и 33°C и после обработки по методике примера 5б, получают 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновую кислоту.

Пример 11. К раствору 50 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-3-(3-п-оксифенил-2-метоксипропеноил)-оксиметил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновой кислоты в 10 мл 0,1 М пирофосфатного буферного раствора с pH 8,1, содержащего 0,026% азидата натрия, прибавляют 0,5 мл суспензии мицеллия, полученного из *Trigonopsis variabilis* по методике примера 5а, затем смесь обрабатывают, как в примере 5б, и получают 7-(4-карбоксивалерамидо)-3-(3-п-оксифенил-2-метоксипропеноил)оксиметил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновую кислоту.

Полученные фракции подвергают тонкослойной хроматографии на Avicel с использованием смеси растворителей изопропанол : н-бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 21:3:7:9) и бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2) и собирают фракции с R_f 0,67 и 0,67 соответственно. Время задержки фракции в скоростной жидкостной хроматографии 5 мин 55 с применяется смесь растворителей ацетонитрил : 0,1%-ный водный раствор уксусной кислоты (объемное отношение 2:8). Продукт имеет отрицательную реакцию с нингидрином.

Пример 12. В 10 мл 0,1 М пирофосфатного буферного раствора, содержащего 0,02% азидата натрия, растворяют 54,5 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты. После прибавления 0,5 мл суспензии активированного мицеллия, полученного по методике примера 5а, смесь перемешивают при аэрировании и 33°C (водяная баня). Окончание реакции определяют по проверке через каждые 30 мин на аппарате скоростной хроматографии Хитачи система растворителей - ацетонитрил : 0,1%-ный раствор уксусной кислоты, объемное отношение 1:9). Время задержки исходного соединения 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты 1м 1 мин 53 с, а время задержки 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты, получаемой путем окисления D-аминокислоты, 4 мин 54 с. По окончании реакции мицеллий отделяют центрифугированием при 4°C. Верхний слой отделяют, доводят до pH 1,5-2,0 с помощью разбав-

ленного водного раствора соляной кислоты и четыре раза экстрагируют равными объемами этилацетата. Экстракты в этилацетате соединяют и снова экстрагируют фосфатным буферным раствором с pH 6,0, эту вытяжку доводят до pH 1,5-2,0 с помощью разбавленного раствора соляной кислоты, а затем экстрагируют снова четыре раза равными объемами этилацетата. Объединенные экстракты в этилацетате сушат безводным сульфатом натрия и упаривают досуха. Остаток разделяют на колонке с микрокристаллической целлюлозой Avicel, применяя смесь растворителей н-бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2). Проверяют антимикробное действие каждой фракции по отношению к *Proteus mirabilis* и отбирают фракции, обладающие активностью по отношению к этим микроорганизмам, подвергают их тонкослойной хроматографии на Avicel SF, используя смесь растворителей изопропанол : бутанол : уксусная кислота : вода (21:3:7:9) и смесь бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:2). Собирают фракции, обладающие абсорбцией в ультрафиолетовой области света 2536 Å R_f 0,81 и 0,64 соответственно. Эти фракции соединяют, концентрируют и лиофилизируют, в результате чего получают 35 мг чистой 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

Пример 13. В 10 мл хлороформа суспендируют 100 мг 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты, к суспензии прибавляют 4 мл 1%-ного раствора диазометана в эфире, после чего 30 мин перемешивают при комнатной температуре. Полученную реакционную смесь промывают разбавленной уксусной кислотой и водой, сушат безводным сульфатом магния и концентрируют при пониженном давлении. Полученный остаток подвергают колоночной хроматографии, с применением силикагеля и смеси растворителей бензол : этилацетат (объемное отношение 1:3). Требуемые фракции собирают, концентрируют при пониженном давлении и получают 80 мг метилового эфира 7-метокси-7-(4-метоксикарбонилбутирамидо)-3-(1-метил-1Н-тетразол-5-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

ИК-спектр

KBr cm^{-1} 1760 (лактам $\text{O} \leq$)

$\gamma_{\text{макс}}$ 1725 (сложный эфир, карбонил).

Пример 14. В 10 мл 0,1 М пирофосфатного буферного раствора с pH 8,1, содержащего 0,026% азидата натрия, растворяют 50 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тио-

метил-3-цефем-4-карбоновой кислоты и, после прибавления к раствору 0,5 мл суспензии мицелия, приготовленного, как в примере 1а, из штамма *Trigonopsis variabilis* IF0 0755, смесь перемешивают при аэрировании и нагревании на водяной бане с температурой 33°C для окисления D-аминокислоты. Окончание реакции определяется по методу скоростной жидкостной хроматографии, описанному в примере 5б. Время задержки исходного продукта 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты 2 мин 55 с, а 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты, получаемой путем окисления D-аминокислоты, 11 мин 18 с.

По окончании реакции мицелий отделяют при 4°C, верхний слой собирают, доводят разбавленным раствором соляной кислоты в воде до pH 1,5-2,0 и четыре раза экстрагируют равными объемами этилацетата. Экстракты в этилацетате соединяют и снова экстрагируют буферным раствором фосфата с pH 6,0, экстракт доводят до pH 1,5-2,0 и повторно экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата. Экстракты в этилацетате соединяют, сушат безводным сульфатом натрия и упаривают досуха. Продукт разделяют на колонке с микрокристаллической целлюлозой, используя смесь растворителей н-бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2), как для растворенного продукта, так и для самой колонки. После этого фракции, обладающие антимикробной активностью по отношению к *Proteus mirabilis*, собирают, подвергают тонкослойной хроматографии на пластинах с Avicel SF и разделяют, используя смеси растворителей изопропанол : бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 21:3:7:9) и н-бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2), для получения фракций, отвечающих поглощению света в ультрафиолетовой части спектра 2536 Å по прибору Манасулу (фирмы Манасулу Кагаку Когю К.К.) и R_f 0,82 и 0,77 соответственно. Полученные фракции соединяют, концентрируют, лиофилизируют и получают 32 мг чистой 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(5-метил-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

Пример 15. В 5 мл буферного раствора 0,1 М пирогосфата (pH 8,1), содержащего 0,026% азиды натрия, растворяют 25 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-3-(5-карбоксиметилтио-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-7-

5 -метокси-3-цефем-4-карбоновой кислоты и после добавления к раствору 0,5 мл суспензии активированного мицелия, приготовленной как в примере 5а, смесь перемешивают при аэрировании и нагревании на водяной бане при 33°C для окисления D-аминокислоты. Течение процесса проверяют каждые 30 мин по скоростной хроматографии методом Хитачи, так же, как это производится в примере 5а, с целью определения окончания реакции. При этом время задержки исходного соединения 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-3-(5-карбоксиметилтио-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновой кислоты 3 мин 14 с, а вещества, полученного окислением D-аминокислоты- 7-(4-карбоксивалерамидо)-3-(5-карбоксиметилтио-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновой кислоты 13 мин 24 с.

10 По окончании реакции мицелий удаляют центрифугированием при 4°C, отделяют верхний слой, доводят его до pH до 1,5-2,0 с помощью разбавленного водного раствора соляной кислоты и экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата. Соединенные экстракты в этилацетате снова экстрагируют буферным фосфатным раствором, имеющим pH 6,0. Экстракт, в котором доводят pH до 1,5-2,0 с помощью разбавленного водного раствора соляной кислоты, снова экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата. 25 Последний экстракт соединяют и сушат сульфатом натрия, а затем упаривают в вакууме досуха.

30 Концентрат разделяют, используя смесь растворителей бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2) на колонке с микрокристаллической целлюлозой (А - торговая марка) и пользуясь тем же составом растворителей.

35 Проверая антимикробную активность каждой фракции, отбирают те фракции, которые обладают активностью по отношению к *Proteus mirabilis*, и подвергают их тонкослойной хроматографии на Avicel SF, применяя растворители изопропанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 21:3:7:9) и смесь бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2), для соответствующего отбора фракций, обладающих поглощением в ультрафиолетовой части спектра 2536 Å на приборе Манасулу и R_f 0,79 и 0,72 соответственно. Эти фракции концентрируют, лиофилизируют и получают 16 мг 40 чистой 7-(4-карбоксивалерамидо)-3-(5-карбоксиметилтио-1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-7-метокси-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

55 **Пример 16.** В 10 мл 0,1 М пирогосфатного буферного раствора, 65

pH 8,1, содержащего 0,026% азидата натрия, растворяют 50 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты, прибавляют к нему 0,5 мл суспензии, полученной с мицелием *Trigonopsis variabilis*, согласно методике примера 5а, смесь перемешивают при аэрировании на водяной бане при 33°C, осуществляя окисление D-аминокислоты. Окончание реакции определяют с помощью того же метода, что в примере 5б. Время задержки исходного продукта в скоростной жидкостной хроматографии 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)-тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты 1 мин 56 с, а 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил) тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты, полученной при окислении D-аминокислоты, 5 мин 28 с.

По окончании реакции мицелий удаляют при 4°C, верхний слой собирают, значение его pH доводят с помощью разбавленного водного раствора соляной кислоты до 1,5-2,0 и экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата. Соединенные этилацетатные экстракты экстрагируют буферным раствором фосфата, имеющим pH 6,0, а этот раствор снова экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата, экстракты соединяют, сушат безводным сульфатом натрия и упаривают в вакууме досуха.

Полученный продукт разделяют, применяя смесь растворителей бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2) и колонку, наполненную микрокристаллической целлюлозой и смесью растворителей такого же состава. При этом отбирают фракции, обладающие антимикробной активностью по отношению к *Proteus mirabilis*. Эти фракции подвергают тонкослойной хроматографии на Avicel SF и проявляют смесью растворителей изопропанол : бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 21:3:7:2) и бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2), собирая фракции с поглощением в ультрафиолетовой части спектра 2536 Å на приборе Манасулу и R_f 0,81 и 0,65 соответственно. Собранные фракции концентрируют, лиофилизируют и получают 40 мг чистой 7-(4-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

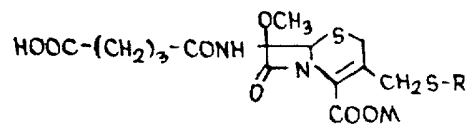
Пример 17. В 10 мл 0,1 М пирофосфатного буферного раствора с pH 8,1, содержащего 0,026% азидата натрия, растворяют 50 мг 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)тиометил-3-

-цефем-4-карбоновой кислоты, после того, как к раствору прибавят 0,5 мл суспензии активированного мицелия, приготовленной на *Trigonopsis variabilis*, таким же путем, как и в примере 5а. Смесь перемешивают при аэрировании и нагревании на водяной бане при 33°C для окисления D-аминокислоты. Окончание реакции определяют по методу скоростной жидкостной хроматографии. Время задержки исходного материала - 7-(5-амино-5-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты 1 мин 56 с, а полученного при окислении D-аминокислоты 5 мин 28 с.

По окончании реакции мицелий удаляют при 4°C, а верхний слой отделяют, разбавленным раствором соляной кислоты в воде доводят его до pH до 1,5-2,0 и четыре раза экстрагируют равными объемами этилацетата, экстракты соединяют и снова экстрагируют буферным раствором фосфата с pH 6,0. Эти экстракты доводят до pH 1,5-2,0 и повторно экстрагируют четыре раза равными объемами этилацетата, после соединения которых их сушат безводным сульфатом натрия и упаривают досуха в вакууме. Продукт разделяют, применяя смесь растворителей бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2) и колонку, наполненную микрокристаллической целлюлозой Avicel и смоченную той же смесью растворителей. При этом отбирают фракции, обладающие антимикробной активностью по отношению к *Proteus mirabilis*. Эти фракции подвергают тонкослойной хроматографии на Avicel SF, применяя смеси растворителей изопропанол : бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 21:3:7:9) и бутанол : уксусная кислота : вода (объемное отношение 4:1:2) соответственно, и собирают фракции, обладающие поглощением света в ультрафиолетовой части спектра света 2536 Å на приборе Манасулу. Фракции концентрируют, лиофилизируют и получают 40 мг чистой 7-(3-карбоксивалерамидо)-7-метокси-3-(1,3,4-тиадиазол-2-ил)тиометил-3-цефем-4-карбоновой кислоты.

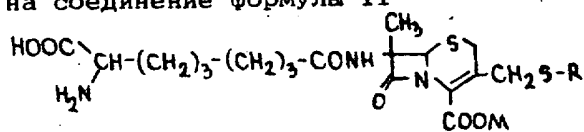
Формула изобретения

Способ получения 7-метоксицефалоспоринов или их солей формулы I



где R - азотсодержащая пяти- или шестичленная гетероциклическая группа,

М - атом водорода или катионный остаток, образующий соль, отличающийся тем, что, на соединение формулы II



где R и M имеют указанные значения,

аэробно воздействуют мицелием микроорганизма рода *Trigonopsis*, продуцирующего окисляющий D-аминокислоту фермент, или обработанным продуктом мицелия и выделяют целевой продукт в виде свободной кислоты или ее соли.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе
1. Патент Великобритании № 1321412, кл. С 2 А, опублик. 1973.

Составитель Э. Латыпова
 Редактор Г. Кацалап Техред Н. Бабурка Корректор И. Муска
 Заказ 10107/88 Тираж 454 Подписное
 ВНИИПИ Государственного комитета СССР
 по делам изобретений и открытий
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5
 филиал НИИ "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4