



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 D 487/04
C 07 F 9/65



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

632 509

⑳ Gesuchsnummer: 14622/76

㉔ Anmeldungsdatum: 19.11.1976

㉓ Priorität(en): 21.11.1975 US 634291

㉔ Patent erteilt: 15.10.1982

㉔ Patentschrift
veröffentlicht: 15.10.1982

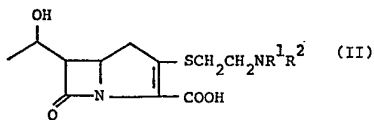
㉓ Inhaber:
Merck & Co., Inc., Rahway/NJ (US)

㉔ Erfinder:
Louis Barash, Westfield/NJ (US)
Burton Grant Christensen, Metuchen/NJ (US)
John Hannah, Matawan/NJ (US)
William Joseph Leanza, Berkeley Heights/NJ (US)
David Houng-Min Shih, Edison/NJ (US)

㉔ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von N-Acylderivaten und phosphorhaltigen N-Acylderivaten des Antibiotikums Thienamycin.**

⑤⑦ N-Acylderivate und phosphorhaltige N-Acylderivate des Antibiotikums Thienamycin der allgemeinen Formel (II)



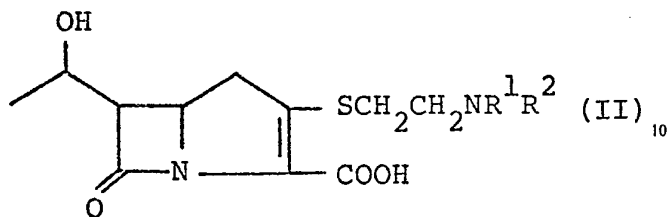
worin

R^1 und R^2 unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff, Acyl und phosphorhaltigem Acyl, mit der Einschränkung, dass R^1 und R^2 nicht beide Wasserstoff sind und dass, wenn R^1 oder R^2 Acetyl bedeutet, R^2 oder R^1 anders als Wasserstoff ist, und deren nicht-toxische, pharmazeutisch annehmbaren Salze, werden erhalten, indem man Thienamycin mit einem entsprechenden Acylierungsmittel behandelt und erhaltene Verbindungen der Formel (II) gegebenenfalls in deren nicht-toxische, pharmazeutisch annehmbare Salze überführt.

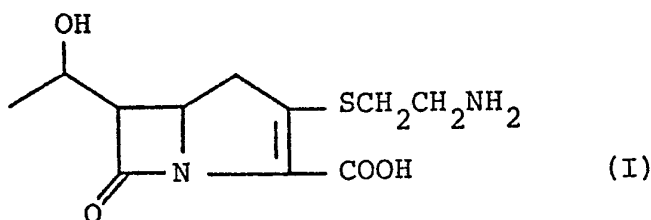
Die erhaltenen Verbindungen und deren pharmazeutisch annehmbaren Salze sind als Antibiotika geeignet.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von N-Acylderivaten und phosphorhaltigen N-Acylderivaten des Antibiotikums Thienamycin der Formel (II)

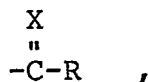


worin R¹ und R² unabhängig voneinander Wasserstoff, Acyl oder phosphorhaltiges Acyl bedeuten, unter der Massnahme dass R¹ oder R² nicht beide Wasserstoff sind und dass, wenn R¹ oder R² Acetyl bedeutet, R² oder R¹ verschieden von Wasserstoff ist, und deren nicht-toxische, pharmazeutisch annehmbare Salze, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel



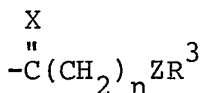
mit einem entsprechenden Acylierungsmittel behandelt und erhaltene Verbindungen der Formel (II) gegebenenfalls in deren nicht-toxische, pharmazeutisch annehmbare Salze überführt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der N-Acyrest die folgende Formel aufweist



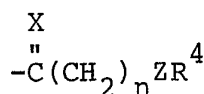
worin X O oder S bedeutet und R Wasserstoff, Amino, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Acylrest die folgende Formel aufweist



worin X O oder S bedeutet; Z die Bedeutung hat von Carbonyl, wobei R³ die Bedeutung hat: Amino, Mercapto, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; und n null oder 1 bis 4 ist.

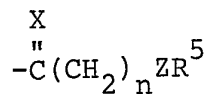
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Acylrest die folgende Formel aufweist



worin X O oder S bedeutet; Z Sauerstoff ist, wobei R⁴ die Bedeutung hat: Amino, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl,

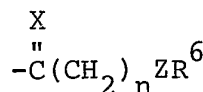
Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; und n null oder 1 bis 4 ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Acylrest die folgende Formel aufweist



worin X O oder S bedeutet; Z Schwefel ist, wobei R⁵ die Bedeutung hat: Mercapto, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; und n null oder 1 bis 4 ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Acylrest die folgende Formel aufweist



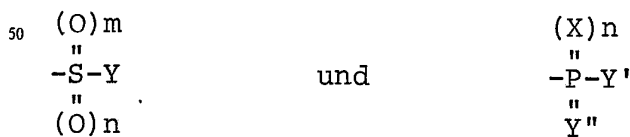
worin X O oder S bedeutet; Z NH ist, wobei R⁶ die Bedeutung hat: Amino, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; und n null oder 1 bis 4 ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Acylrest die folgende Formel aufweist



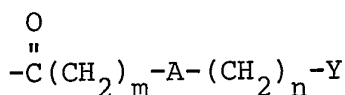
worin X O oder S bedeutet; R⁷ die Bedeutung hat H, Amino, Mercapto, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; R⁷ die Bedeutung hat Amino, Hydroxy, Azido, Carbamoyl, Guanidino, Acyloxy, Halogen, Sulfamino, Tetrazolyl, Sulfo, Carboxy, Carbalkoxy, Phosphono, Alkoxy oder Arylthio mit der Ausnahme, dass R⁷ und R⁷ gleichzeitig nicht die Bedeutung Hydroxy, Amino oder Mercapto haben können.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Acylrest ausgewählt ist aus den Gruppen, bestehend aus:



worin X O oder S bedeutet; m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 sind; Y = O[⊖]M[⊕], -N(R⁸)₂ oder R⁸, worin M⁺ ausgewählt ist aus Wasserstoff, Alkali- und Erdalkalitionen oder einer organischen Base; R⁸ Wasserstoff, Amino, Mercapto, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aralkoxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl ist, Y' und Y'' unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus O[⊖]M[⊕], -N(R⁸)₂ und R⁸; und Y' und Y'' zusammen verbunden sein können mit dem Phosphoratom, an welches sie gebunden sind, unter Ausbildung eines cyclischen Esters oder Amids.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Acylrest die folgende Formel aufweist



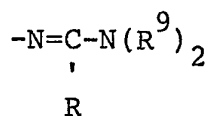
worin m und n 0 oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind; A die Bedeutung hat: O, NR' (R' = Wasserstoff oder Niedrigalkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen), S oder A eine Einfachbindung bedeutet und Y aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

1.) Amino oder substituiertes Amino:



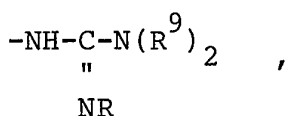
worin die Werte für R⁹ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus: Wasserstoff; N(R')₂ (R' ist Wasserstoff oder Niedrigalkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen); Niedrigalkyl und Niedrigalkoxyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen; Niedrigalkoxyniedrigalkyl, worin die Alkoxygruppe 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält und die Alkylgruppe 2 bis 6 Kohlenstoffatome enthält; Cycloalkyl und Cycloalkylalkyl, worin die Cycloalkylgruppe 3 bis 6 Kohlenstoffatome und die Alkylgruppe 1 bis 3 Kohlenstoffatome enthält; und zwei R⁹-Gruppen miteinander verbunden sein können mit dem Stickstoffatom, an welches sie gebunden sind, unter Ausbildung eines Ringes mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen;

2.) Amidino und substituiertes Amidino:



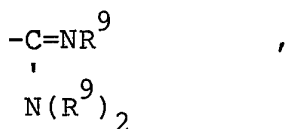
worin die Werte für R⁹ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus: Wasserstoff; N(R')₂ (R' ist Wasserstoff oder Niedrigalkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen); Niedrigalkyl und Niedrigalkoxyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen; Niedrigalkoxyniedrigalkyl, worin die Alkoxygruppe 1 bis 6 Kohlenstoffatome und die Alkylgruppe 2 bis 6 Kohlenstoffatome enthält (und wenn der Niedrigalkoxyniedrigalkylrest an das Kohlenstoffatom der Alkylgruppe gebunden ist, diese 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält); Cycloalkyl und Cycloalkylalkyl, worin der Alkylrest 1 bis 3 Kohlenstoffatome enthält und zwei R⁹-Gruppen miteinander verbunden sein können mit dem Atom, an welches sie gebunden sind unter Ausbildung eines Ringes mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen;

3.) Guanidino und substituiertes Guanidino:



worin R⁹ die unter 2.) angegebene Bedeutung hat;

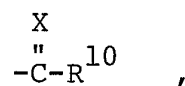
4.) Guanyl und substituiertes Guanyl:



worin R⁹ die unter 2.) (oben) angegebene Bedeutung hat;

5.) Stickstoff enthaltende mono- und bicyclische Heterocyclen (aromatisch und nicht-aromatisch) mit 4 bis 10 Kernkohlenstoffatomen, worin das Heteroatom oder die Heteroatome, zusätzlich zu dem Stickstoffatom ausgewählt sind aus der Gruppe Sauerstoff und Schwefel.

10. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ Wasserstoff ist und R² einen Acylrest der folgenden Formel bedeutet

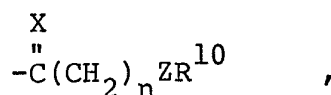


5

worin bedeuten: R¹⁰ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Benzyl, p-Hydroxybenzyl, 4-Amino-4-carboxybutyl, Methyl, Cyanomethyl, 2-Pentenyl, n-Amyl, n-Heptyl, Äthyl, 3- und 4-Nitrobenzyl, Phenäthyl, β,β-Diphenyläthyl, Methylphenylmethyl, Triphenylmethyl, 2-Methoxyphenyl, 2,6-Dimethoxyphenyl, 2,4,6-Trimethoxyphenyl, 3,5-Dimethyl-4-isoxazolyl, 3-Butyl-5-methyl-4-isoxazolyl, 5-Methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl, 3-(2-Chlorphenyl)-5-methyl-4-isoxazolyl, 3-(2,6-dichlorphenyl)-5-methyl-4-isoxazolyl, D-4-Amino-4-carboxybutyl, D-4-N-Benzoyl-amino-4-carboxy-n-butyl, p-Aminobenzyl, o-Aminobenzyl, m-Aminobenzyl, p-Dimethylaminobenzyl, (3-Pyridyl)-methyl, 2-Äthoxy-1-naphthyl, 3-Carboxy-2-chinoxaliny, 3-(2,6-Dichlorphenyl)-5-(2-furyl)-4-isoxazolyl, 3-Phenyl-4-isoxazolyl, 5-Methyl-3-(4-guanidinophenyl)-4-isoxazolyl, 4-Guanidinomethylphenyl, 4-Guanidinomethylbenzyl, 4-Guanidinobenzyl, 4-Guanidinophenyl, 2,6-Dimethoxy-4-guanidinophenyl, o-Sulfobenzyl, p-Carboxymethylbenzyl, p-Carbamoylmethylbenzyl, m-Fluorbenzyl, m-Brombenzyl, p-Chlorbenzyl, p-Methoxybenzyl, 1-Naphthylmethyl, 3-Isotiazolylmethyl, 4-Isotiazolylmethyl, 5-Isotiazolylmethyl, Guanylthiomethyl, 4-Pyridylmethyl, 5-Isoxazolylmethyl, 4-Methoxy-5-isoxazolylmethyl, 4-Methyl-5-isoxazolylmethyl, 1-Imidazolylmethyl, 2-Benzofuranylmethyl, 2-Indolylmethyl, 2-Phenylvinyl, 2-Phenyläthynyl, 1-Aminocyclohexyl, 2- und 3-Thienylaminomethyl, 2-(5-Nitrofuranyl)-vinyl, Phenyl, o-Methoxyphenyl, o-Chlorphenyl, o-Phenylphenyl, p-Aminomethylbenzyl, 1-(5-Cyanotriazolyl)-methyl, Difluormethyl, Dichlormethyl, Dibrommethyl, 1-(3-Methylimidazolyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Carboxymethylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(4-Carbamoylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Methylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Methoxythienyl)-methyl, 2- oder 3-(4-Chlorthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Sulfothienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Carboxythienyl)-methyl, 3-(1,2,5-Thiadiazolyl)-methyl, 3-(4-Methoxy-1,2,5-thiadiazolyl)-methyl, 2-Furylmethyl, 2-(5-Nitrofuryl)-methyl, 3-Furylmethyl, 2-Thienylmethyl, 3-Thienylmethyl, Tetrazolylmethyl, Benzamidinomethyl und Cyclohexylamidinomethyl.

40

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ Wasserstoff bedeutet und R² einen Acylrest der folgenden Formel darstellt

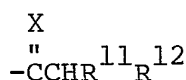


45

worin der Rest -(CH₂)_n ZR¹⁰ des Acylrestes ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: Allylthiomethyl, Phenylthiomethyl, Butylmercaptomethyl, α-Chlorcrotylmercaptomethyl, Phenoxy-methyl, Phenoxyäthyl, Phenoxybutyl, Phenoxybenzyl, Diphenoxymethyl, Dimethylmethoxymethyl, Dimethylbutoxymethyl, Dimethylphenoxymethyl, 4-Guanidinophenoxy-methyl, 4-Pyridylthiomethyl, p-(Carboxymethyl)-phenoxy-methyl, p-(Carboxymethyl)-phenylthiomethyl, 2-Thiazolylthiomethyl, p-(Sulfo)-phenoxy-methyl, p-(Carboxymethyl)-phenylthiomethyl, 2-Pyrimidinylthiomethyl, Phenäthylthiomethyl, 1-(5,6,7,8-Tetrahydronaphthyl)-oxymethyl, N-Methyl-4-pyridiniumthio, Benzyloxy, Methoxy, Äthoxy, Phenoxy, Phenylthio, Amino, Methylamino, Dimethylamin, Pyridiniummethyl, Trimethylammoniummethyl, Cyanomethylthiomethyl, Trifluormethylthiomethyl, 4-Pyridyl-äthyl, 4-Pyridylpropyl, 4-Pyridylbutyl, 3-Imidazolyläthyl, 3-Imidazolylpropyl, 3-Imidazolylbutyl, 1-Pyrroloäthyl, 1-Pyrrolopropyl und 1-Pyrrolobutyl.

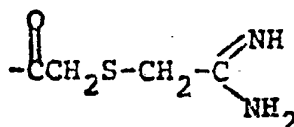
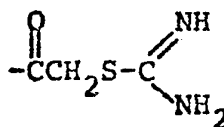
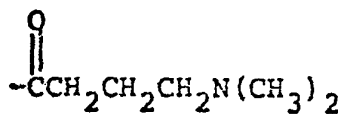
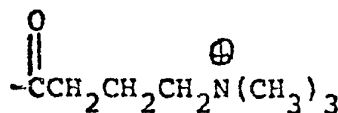
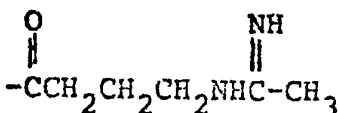
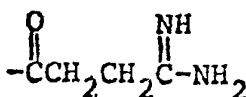
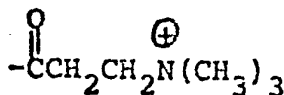
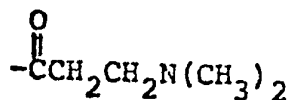
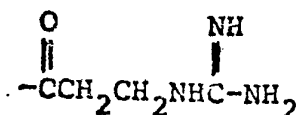
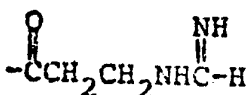
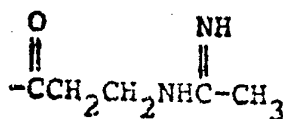
65

12. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ Wasserstoff ist und R² einen Acylrest der folgenden Formel bedeutet

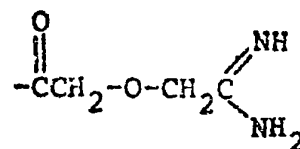


worin die Gruppe -CHR¹¹R¹² des Acylrestes ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: α -Aminobenzyl, α -Amino-(2-thienyl)-methyl, α -(Methylamino)-benzyl, α -Amino-methylmercaptopropyl, α -Amino-3- oder 4-chlorbenzyl, α -Amino-3- oder 4-Hydroxybenzyl, α -Amino-2,4-dichlorbenzyl, α -Amino-3,4-dichlorbenzyl, D(-)- α -Hydroxybenzyl, α -Carboxybenzyl, α -Amino-(3-thienyl)-methyl, D(-)- α -Amino-3-chlor-4-hydroxybenzyl, α -Amino-(cyclohexyl)-methyl, α -(5-Tetrazolyl)-benzyl, 2-Thienylcarboxymethyl, 3-Thienylcarboxymethyl, 2-Furylcarboxymethyl, 3-Furylcarboxymethyl, α -Sulfaminobenzyl, 3-Thienylsulfaminomethyl, α -(N-Methylsulfamino)-benzyl, D(-)-2-Thienylguanidinomethyl, D(-)- α -guanidinobenzyl, α -Guanyluroidobenzyl, α -Hydroxybenzyl, α -Azidobenzyl, α -Fluorbenzyl, 4-(5-Methoxy-1,3-oxadiazolyl)-aminomethyl, 4-(5-Methoxy-1,3-oxadiazolyl)-hydroxymethyl, 4-(5-Methoxy-1,3-sulfadiazolyl)-hydroxymethyl, 4-(5-Chlorthienyl)-aminomethyl, 2-(5-Chlorthienyl)-hydroxymethyl, 2-(5-Chlorthienyl)-carboxymethyl, 3-(1,2-Thiazolyl)-aminomethyl, 3-(1,2-Thiazolyl)-hydroxymethyl, 3-(1,2-Thiazolyl)-carboxymethyl, 2-Thiazolylaminomethyl, 2-Thiazolylhydroxymethyl, 2-Thiazolylcarboxymethyl, 2-Benzothienylcarboxymethyl, 2-Benzothienylhydroxymethyl, 2-Benzothienylcarboxymethyl, α -Sulfobenzyl, α -Phosphonobenzyl, α -Diäthylphosphono und α -Monoäthylphosphono.

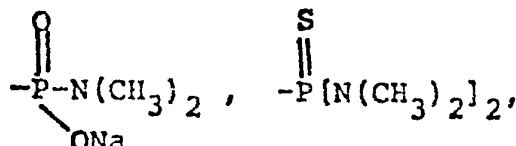
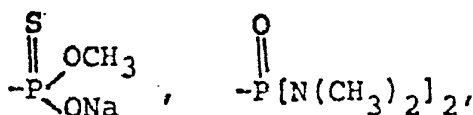
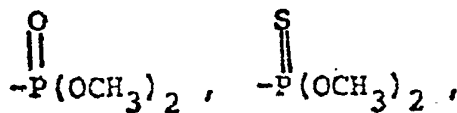
13. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ Wasserstoff ist und R² ein Acylrest der folgenden Formel ist

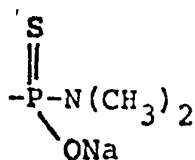


oder

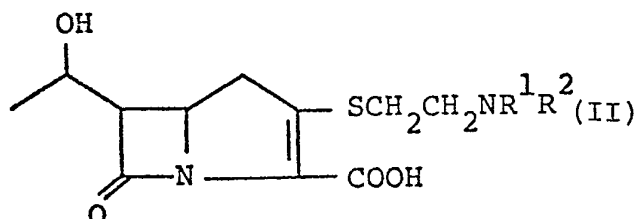


14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R¹ Wasserstoff ist und R² ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: Formyl, Propionyl, Butyryl, Chloracetyl, Methoxyacetyl, Aminoacetyl, Methoxycarbonyl, Äthoxycarbonyl, Methylcarbamoyl, Äthylcarbamoyl, Phenylthiocarbonyl, 3-Aminopropionyl, 4-Aminobutyryl, N-Methylaminoacetyl, N,N-Dimethylaminoacetyl, N,N,N-Trimethylaminoacetyl, 3-(N,N-Dimethyl)-aminopropionyl, 3-(N,N,N-Trimethyl)-aminopropionyl, N,N,N-Triäthylaminoacetyl, Pyridiniumacetyl, Guanylylthioacetyl, Guanidinacetyl, 3-Guanidinopropionyl, N³-Methylguanidinopropionyl, Hydroxyacetyl, 3-Hydroxypropionyl, Acryloyl, Propionyl, Malonyl, Phenoxyacetyl, Amidinoacetyl, Acetamidinoacetyl, Amidinopropionyl, Acetamidinopropionyl, Guanylureidoacetyl, Guanylcarbamoyl, Carboxymethylaminoacetyl, Sulfoacetylaminoacetyl, Phosphonoacetylaminoacetyl, N³-Dimethylaminoacetamidinopropionyl, Ureidocarbonyl, Dimethylaminoguanylthioacetyl, 3-(1-Methyl-4-pyridinyl)-propionyl, 3-(5-Aminoimidazol-1-yl)-propionyl, 3-Methyl-1-imidazoliumacetyl, 3-Syndonylacetyl, o-Aminomethylbenzoyl, o-Aminobenzoyl,



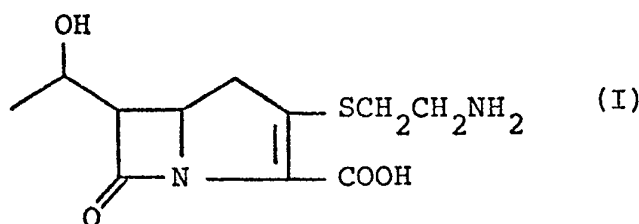


Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von N-Acylderivaten und phosphorhaltigen N-Acylderivaten des Antibiotikums Thienamycin der Formel



worin R¹ und R² unabhängig voneinander Wasserstoff, Acyl oder phosphorhaltiges Acyl bedeuten, unter der Massnahme dass R¹ und R² nicht beide Wasserstoff sind und dass, wenn R¹ oder R² Acetyl bedeutet, R² oder R¹ verschieden von Wasserstoff ist, und deren nicht-toxische, pharmazeutisch annehmbare Salze.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel



mit einem entsprechenden Acylierungsmittel behandelt und erhaltene Verbindungen der Formel (II) gegebenenfalls in die entsprechenden Salze überführt.

Die erfindungsgemäss erhaltenen Verbindungen sowie deren pharmazeutisch annehmbaren Salze sind als Antibiotika geeignet.

Durch den weiter oben angeführten Disclaimer werden bereits bekannte Verbindungen ausgeklammert.

Thienamycin ist das Ausgangsmaterial, das zur Herstellung der beschriebenen Verbindungen benötigt wird und es ist in der US-PS 3 950 357 beschrieben. Thienamycin hat die weiter oben angegebene Formel I.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen können einfacher durch die folgende Formel dargestellt werden:



worin «Th» den bicyclischen Kern des Thienamycins wiedergibt und die OH-, Amino- und Carboxygruppen des Thienamycins angegeben sind.

M bedeutet Wasserstoff oder ein Salzkation, aus-Alkali- oder Erdalkalimetallen, wie Natrium, Kalium oder Calcium

oder ein Aminsalt, wie NH₃, N(R')₃, worin R' Alkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen ist, und dergleichen.

R¹ und R² sind weiter oben definiert. Bevorzugte erfindungsgemässe Verbindungen sind solche, in denen R¹ Wasserstoff und R² Acyl ist. Der Ausdruck «Acyl» schliesst durch Definition die Alkanoyl-, einschliesslich Derivate und Analoge davon, ein, wie z. B. die Thioanalogen, bei denen der Carbonylsauerstoff durch Schwefel ersetzt ist, sowie auch Diacylreste, bei denen R¹ und R² miteinander verbunden sind. Eingeschlossen sind auch Schwefel- und Phosphor-Acylanaloge, wie substituierte Sulfonyl-, Sulfinyl- und Sulfenyl-Reste und substituierte P(III)- und P(V)-Reste, wie die substituierten Phosphor-, phosphorig-, phosphonig- und phosphinig-Reste. Solche bevorzugte Acylreste werden nachfolgend näher definiert.

Es besteht ein ständiger Bedarf an neuen Antibiotika, denn es gibt bisher keine statische Wirksamkeit für ein gegebenes Antibiotikum, weil die fortwährende Anwendung im breiten Umfang eines solchen Antibiotikums selektiv die Bildung von resistenten Stämmen von Pathogenen erhöht. Darüber hinaus haben die bekannten Antibiotika den Nachteil, dass sie nur gegen gewisse Typen von Mikroorganismen wirksam sind. Deshalb wird immer noch nach neuen Antibiotika geforscht.

Unerwarteterweise wurde nun gefunden, dass die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen der Formel II Antibiotika mit breitem Spektrum darstellen, die sowohl für Tiere und für die Humantherapie und in unbesetzten Systemen nützlich sind.

Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung einer neuen Klasse von Antibiotika zur Verfügung zu stellen, welche die grundlegende Kernstruktur des Thienamycins (I) haben, die jedoch N-Acylderivate davon darstellen. Diese Antibiotika sind in einem breiten Bereich von Pathogenen, für welche sowohl gram-positive Bakterien repräsentativ sind, wie S. aureus, Strep. pyogenes und B. subtilis, und gram-negative Bakterien, wie E. coli, Proteus morganii, Serratia und Klebsiella, wirksam.

Bevorzugte Acylreste R¹ oder R² sind unter z. B. substituierte oder unsubstituierte aliphatische, aromatische oder heterocyclische, araliphatische oder heterocyclaliphatische Carboxylsäurereste, ein substituiertes oder unsubstituiertes Carbamylrest oder ein Carbothiosäurerest.

Eine bevorzugte Gruppe von Acylresten weist z. B. die folgende Formel auf



worin X Sauerstoff oder Schwefel bedeutet und R'' die folgende Bedeutung hat: Wasserstoff, Amino; substituiertes Amino, wie Alkyl- und Dialkylamino, worin der Alkylrest 1 bis 6 Kohlenstoffatome umfasst; substituierte oder unsubstituierte Reste, wie geradkettige oder verzweigte Alkylreste, worin der Alkylrest 1 bis 6 Kohlenstoffatome umfasst; Mercapto, wie Alkylthio, typischerweise umfassend 1 bis 6 Kohlenstoffatome; Arylthio, typischerweise umfassend 6 bis 10 Kohlenstoffatome; Hydroxy, wie Alkoxy, typischerweise umfassend 1 bis 6 Kohlenstoffatome; Aryloxy, welches typischerweise 6 bis 10 Kohlenstoffatome umfasst; Alkenyl- oder Alkynylgruppen, die typischerweise 2 bis 6 Kohlenstoffatome umfassen; Aryl wie Phenyl; Alkyl, wie Benzyl; Cycloalkyl, welches typischerweise 3 bis 6 Kohlenstoffatome umfasst; oder eine Heteroaryl- oder Heteroaralkylgruppe (mono- oder bicyclische), worin die Alkylgruppe typischerweise 1 bis 3 Kohlenstoffatome umfasst und der heterocyclische Ring typischerweise 4 bis 10 Atome enthält und das Heteroatom oder die Heteroatome ausgewählt sind aus O, N und S; die vorgenannten Gruppierungen können unsubstituiert sein oder sie können substituiert sein durch Reste, wie OH, SH, SR (R ist Niedrigalkyl oder

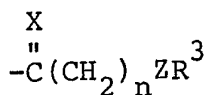
Aryl, wie Phenyl), Alkyl oder Alkoxygruppen mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, Halogen, Cyano, Carboxy, Sulfamino, Carbamoyl, Sulfonyl, Azido, Amino, substituiertes Amino, wie Alkylamino einschliesslich quaternäres Ammonium, worin die Alkylgruppen 1 bis 6 Kohlenstoffatome haben, Halogenalkyl, wie Trifluormethyl, Carboxyalkyl, Carbamoylalkyl, N-substituiertes Carbamoylalkyl, worin die Alkylgruppe der vorgenannten vier Reste 1 bis 6 Kohlenstoffatome umfasst, Amidino, Guanidino, N-substituiertes Guanidino, Guanidinoniedrigalkyl und dergleichen. Typische Beispiele für solche Acylgruppen, die hier erwähnt werden können, sind solche, bei denen R⁴ die folgende Bedeutung aufweist: Benzyl, p-Hydroxybenzyl, 4-Amino-4-carboxybutyl, Methyl, Cyanomethyl, 2-Pentenyl, n-Amyl, n-Heptyl, Äthyl, 3- oder 4-Nitrobenzyl, Phenäthyl, β,β-Diphenyläthyl, Methyl-diphenylmethyl, Triphenylmethyl, 2-Methoxyphenyl, 2,6-Dimethoxyphenyl, 2,4,6-Trimethoxyphenyl, 3,5-Dimethyl-4-isoxazolyl, 3-Butyl-5-methyl-4-isoxazolyl, 5-Methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl, 3-(2-Chlorphenyl)-5-methyl-4-isoxazolyl, 3-(2,6-Dichlorphenyl)-5-methyl-4-isoxazolyl, D-4-Amino-4-carboxybutyl, D-4-N-Benzoylamino-4-carboxy-n-butyl, p-Aminobenzyl, o-Aminobenzyl, m-Aminobenzyl, p-Dimethylaminobenzyl, (3-Pyridyl)-methyl, 2-Äthoxy-1-naphthyl, 3-Carboxy-2-chinoxaliny, 3-(2,6-Dichlorphenyl)-5-(2-furyl)-4-isoxazolyl, 3-Phenyl-4-isoxazolyl, 5-Methyl-3-(4-guanidinophenyl)-4-isoxazolyl, 4-Guanidinomethylphenyl, 4-Guanidinomethylbenzyl, 4-Guanidinobenzyl, 4-Guanidinophenyl, 2,6-Dimethoxy-4-guanidino, o-Sulfobenzyl, p-Carboxymethylbenzyl, p-Carbamoylmethylbenzyl, m-Fluorobenzyl, m-Brombenzyl, p-Chlorbenzyl, p-Methoxybenzyl, 1-Naphthylmethyl, 3-Isothiazolylmethyl, 4-Isothiazolylmethyl, 5-Isothiazolylmethyl, Guanylthiomethyl, 4-Pyridylmethyl, 5-Isoxazolylmethyl, 4-Methoxy-5-isoxazolylmethyl, 4-Methyl-5-isoxazolylmethyl, 1-Imidazolylmethyl, 2-Benzofuranylmethyl, 2-Indolylmethyl, 2-Phenylvinyl, 2-Phenyläthynyl, 1-Aminocyclohexyl, 2- und 3-Thienylaminomethyl, 2-(5-Nitrofuranyl)-vinyl, Phenyl, o-Methoxyphenyl, o-Chlorphenyl, o-Phenylphenyl, p-Aminomethylbenzyl, 1-(5-Cyanotriazolyl)-methyl, Difluormethyl, Dichlormethyl, Dibrommethyl, 1-(3-Methylimidazolyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Carboxymethylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(4-Carbamoylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Methylthienyl)-methyl, 2- oder 2-(Methoxythienyl)-methyl, 2- oder 3-(4-Chlorthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Sulfothienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Carboxythienyl)-methyl, 3-(1,2,5-Thiadiazolyl)-methyl, 3-(4-Methoxy-1,2,5-thiadiazolyl)-methyl, 2-Furylmethyl, 2-(5-Nitrofuryl)-methyl, 3-Furylmethyl, 2-Thienylmethyl, 3-Thienylmethyl, Tetrazolylmethyl, Benzamidinomethyl und Cyclohexylaminomethyl.

Ein derartiger bevorzugter Acylrest weist z. B. die folgende Formel auf



worin X O oder S bedeutet und R Wasserstoff, Amino, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkiny, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl ist.

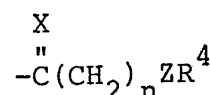
Ein weiterer bevorzugter Acylrest besitzt die folgende Formel



worin X O oder S bedeutet; Z die Bedeutung hat von Carbonyl, wobei R³ die Bedeutung hat: Amino, Mercapto, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkiny, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl oder dem weiter oben definierten Rest R⁴ entspricht und n null oder 1 bis 4 ist.

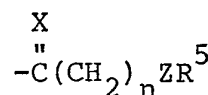
Derartige Reste sind z. B. Allylthiomethyl, Phenylthiomethyl, Butylmercaptomethyl, α-Chlorocrotylmercaptomethyl, Phenoxyethyl, Phenoxyäthyl, Phenoxybutyl, Phenoxybenzyl, Diphenoxymethyl, Dimethylmethoxymethyl, Dimethylbutoxymethyl, Dimethylphenoxyethyl, 4-Guanidinophenoxyethyl, 4-Pyridylthiomethyl, p-(Carboxymethyl)-phenoxyethyl, p-(Carboxymethyl)-phenylthiomethyl, 2-Thiazolylthiomethyl, p-(Sulfo)-phenoxyethyl, p-(Carboxymethyl)-phenylthiomethyl, 2-Pyrimidinylthiomethyl, Phenäthylthiomethyl, 1-(5,6,7,8-Tetrahydronaphthyl)-oxomethyl, N-Methyl-4-pyridylthio, Benzyloxy, Methoxy, Äthoxy, Phenoxy, Phenylthio, Amino, Methylamino, Dimethylamino, Pyridiniummethyl, Trimethylammoniummethyl, Cyanomethylthiomethyl, Trifluormethylthiomethyl, 4-Pyridyläthyl, 4-Pyridylpropyl, 4-Pyridylbutyl, 3-Imidazolyläthyl, 3-Imidazolylpropyl, 3-Imidazolylbutyl, 1-Pyrroloäthyl, 1-Pyrrolopropyl und 1-Pyrrolobutyl.

Insbesondere sind Acylreste der Formel



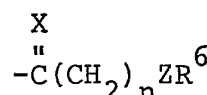
worin X O oder S bedeutet; Z Sauerstoff ist, wobei R⁴ die Bedeutung hat: Amino, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkiny, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; und n 0 oder 1 bis 4 ist, besonders bevorzugt.

Ein weiterer bevorzugter Acylrest besitzt die folgende Formel



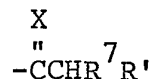
worin X O oder S bedeutet; Z Schwefel ist, wobei R⁵ die Bedeutung hat: Mercapto, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkiny, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; und n null oder 1 bis 4 ist.

Ebenfalls sind Acylreste der Formel



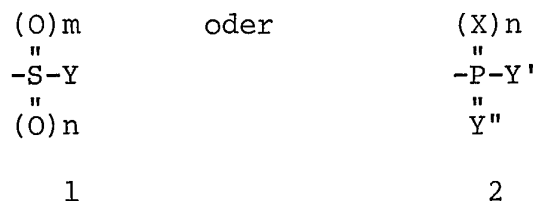
worin X O oder S bedeutet; Z NH ist, wobei R⁶ die Bedeutung hat: Amino, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkiny, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; und n null oder 1 bis 4 ist, bevorzugt.

Zu den bevorzugten Acylresten gehören auch eine Gruppe der Formel



worin X O oder S bedeutet; R⁷ die Bedeutung hat H, Amino, Mercapto, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aryloxy, Alkenyl, Alkiny, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl; R' die Bedeutung hat Amino, Hydroxy, Azido, Carbamoyl, Guanidino, Acyloxy, Halogen, Sulfamino, Tetrazolyl, Sulfo, Carboxy, Carbalkoxy, Phosphono, Alkoxy oder Arylthio mit der Ausnahme, dass R' und R gleichzeitig nicht die Bedeutung Hydroxy, Amino oder Mercapto haben können.

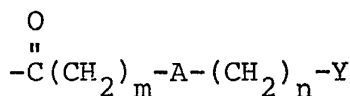
In besonders bevorzugten erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen weisen die Acylreste die folgenden Formeln auf



worin X O oder S bedeutet; m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 sind; Y = O⁺M⁺, -N(R⁸)₂ oder R⁸, worin M⁺ ausgewählt ist aus Wasserstoff, Alkali- und Erdalkalitionen oder einer organischen Base; R⁸ Wasserstoff, Amino, Mercapto, Hydroxy, Alkylamino, Dialkylamino, Alkyl, Alkylthio, Arylthio, Alkoxy, Aralkoxy, Alkenyl, Alkynyl, Aryl, Aralkyl, Cycloalkyl, Heteroaryl oder Heteroaralkyl ist, Y' und Y'' unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus O⁺M⁺, -N(R⁸)₂ und R⁸; und Y' und Y'' zusammen verbunden sein können mit dem Phosphoratom, an welches sie gebunden sind, unter Ausbildung eines cyclischen Esters oder Amids.

Typische Beispiele für 1 sind N-(Methylsulfonyl)-thienamycin, N-(o-Nitrophenylsulfonyl)-thienamycin, N-(p-Chlorphenylsulfonyl)-thienamycin, N-(o-Nitrophenylsulfonyl)-thienamycin, N-Sulfamoylthienamycin, N-Dimethylsulfamoylthienamycin und das Natriumsalz von Thienamycin-N-sulfonsäure. Typische Beispiele für 2 sind N-(Dimethoxyphosphino)-thienamycin, N-Dibenzoyloxyphosphino)-thienamycin, N-(Dihydroxyphosphino)-thienamycin, N-(Dimethoxyphosphinyl)-thienamycin, N-(Dimethoxyphosphinothioyl)-thienamycin, N-(Dibenzoyloxyphosphinyl)-thienamycin und N-(Dihydroxyphosphinyl)-thienamycin, Natriumsalz.

Weitere bevorzugte Acylreste besitzen die Formel



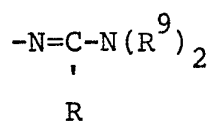
worin m und n 0 oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind; A die Bedeutung hat: O, NR' (R = Wasserstoff oder Niedrigalkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen), S, oder A eine Einfachbindung bedeutet und Y aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:

1.) Amino oder substituiertes Amino:



worin die Werte für R⁹ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus: Wasserstoff; N(R')₂ (R' ist Wasserstoff oder Niedrigalkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen); Niedrigalkyl und Niedrigalkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen; Niedrigalkoxyniedrigalkyl, worin die Alkoxygruppe 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält und die Alkylgruppe 2 bis 6 Kohlenstoffatome enthält; Cycloalkyl und Cycloalkylalkyl, worin die Cycloalkylgruppe 3 bis 6 Kohlenstoffatome und die Alkylgruppe 1 bis 3 Kohlenstoffatome enthält; und zwei R⁹-Gruppen miteinander verbunden sein können mit dem Stickstoffatom, an welches sie gebunden sind, unter Ausbildung eines Ringes mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen;

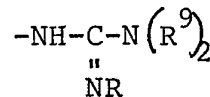
2.) Amidino und substituiertes Amidino:



worin die Werte für R⁹ unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus: Wasserstoff; N(R')₂ (R' ist Wasserstoff oder Niedrigalkyl mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen); Niedrigalkyl und Niedrigalkoxy mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen; Niedrigalkoxyniedrigalkyl, worin die Alkoxygruppe 1 bis

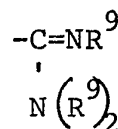
6 Kohlenstoffatome und die Alkylgruppe 2 bis 6 Kohlenstoffatome enthält (und wenn der Niedrigalkoxyniedrigalkylrest an das Kohlenstoffatom der Alkylgruppe gebunden ist, diese 1 bis 6 Kohlenstoffatome enthält); Cycloalkyl und Cycloalkylalkyl, worin der Alkylrest 1 bis 3 Kohlenstoffatome enthält und zwei R⁹-Gruppen miteinander verbunden sein können mit dem Atom, an welches sie gebunden sind unter Ausbildung eines Ringes mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen;

3.) Guanidino und substituiertes Guanidino:



15 worin R die unter 2.) angegebene Bedeutung hat:

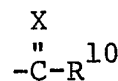
4.) Guanyl und substituiertes Guanyl:



worin R⁹ die unter 2.) angegebene Bedeutung hat;

5.) Stickstoff enthaltend emono- und bicyclische Heterocyclen (aromatisch und nicht-aromatisch) mit 4 bis 10 Kernkohlenstoffatomen, worin das Heteroatom oder die Heteroatome, zusätzlich zu dem Stickstoffatom ausgewählt sind aus der Gruppe Sauerstoff und Schwefel.

30 Ein bevorzugter Acylrest R² besitzt die folgende Formel

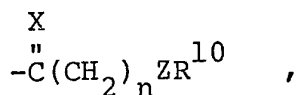


35

worin bedeuten: R¹⁰ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Benzyl, p-Hydroxybenzyl, 4-Amino-4-carboxybutyl, Methyl, Cyanomethyl, 2-Pentenyl, n-Amyl, n-Heptyl, Äthyl, 3- und 4-Nitrobenzyl, Phenäthyl, β,β-Diphenyläthyl, Methylphenylmethyl, Triphenylmethyl, 2-Methoxyphenyl, 2,6-Dimethoxyphenyl, 2,4,6-Trimethoxyphenyl, 3,5-Dimethyl-4-isoxazolyl, 3-Butyl-5-methyl-4-isoxazolyl, 5-Methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl, 3-(2-Chlorphenyl)-5-methyl-4-isoxazolyl, 3-(2,6-dichlorphenyl)-5-methyl-4-isoxazolyl, D-4-Amino-4-carboxybutyl, D-4-N-Benzoylamino-4-carboxy-n-butyl, p-Aminobenzyl, o-Aminobenzyl, m-Aminobenzyl, p-Dimethylaminobenzyl, (3-Pyridyl)-methyl, 2-Äthoxy-1-naphthyl, 3-Carboxy-2-chinoxaliny, 3-(2,6-Dichlorphenyl)-5-(2-furyl)-4-isoxazolyl, 3-Phenyl-4-isoxazolyl, 5-Methyl-3-(4-guanidinophenyl)-4-isoxazolyl, 4-Guanidinomethylphenyl, 4-Guanidinomethylbenzyl, 4-Guanidinobenzyl, 4-Guanidinophenyl, 2,6-Dimethoxy-4-guanidinophenyl, o-Sulfobenzyl, p-Carboxymethylbenzyl, p-Carbamoylmethylbenzyl, m-Fluorbenzyl, m-Brombenzyl, p-Chlorbenzyl, p-Methoxybenzyl, 1-Naphthylmethyl, 3-Isotiazolylmethyl, 4-Isotiazolylmethyl, 5-Isotiazolylmethyl, Guanylthiomethyl, 4-Pyridylmethyl, 5-Isoxazolylmethyl, 4-Methoxy-5-isoxazolylmethyl, 4-Methyl-5-isoxazolylmethyl, 1-Imidazolylmethyl, 2-Benzofuranylmethyl, 2-Indolylmethyl, 2-Phenylvinyl, 2-Phenyläthynyl, 1-Aminocyclohexyl, 2- und 3-Thienylaminomethyl, 2-(5-Nitrofuranyl)-vinyl, Phenyl, o-Methoxyphenyl, o-Chlorphenyl, o-Phenylphenyl, p-Aminomethylbenzyl, 1-(5-Cyanotriazolyl)-methyl, Difluormethyl, Dichlormethyl, Dibrommethyl, 1-(3-Methylimidazolyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Carboxymethylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(4-Carbamoylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Methylthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Methoxythienyl)-methyl, 2- oder 3-(4-Chlorthienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Sulfothienyl)-methyl, 2- oder 3-(5-Carboxythienyl)-methyl, 3-(1,2,5-Thiadiazolyl)-methyl, 3-(4-Methoxy-1,2,5-thiadiazolyl)-methyl, 2-Furylmethyl, 2-(5-Nitrofuryl)-methyl, 3-Furylmethyl,

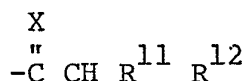
2-Thienylmethyl, 3-Thienylmethyl, Tetrazolylmethyl, Benzamidinomethyl und Cyclohexylamidinomethyl, sind ebenfalls bevorzugt.

Für den Acylrest R² steht insbesondere ein Rest der Formel



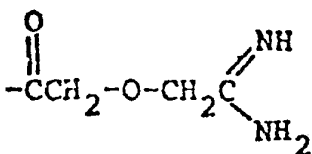
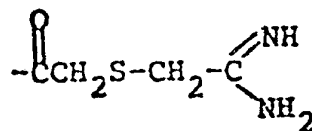
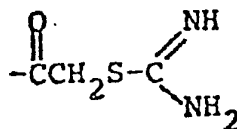
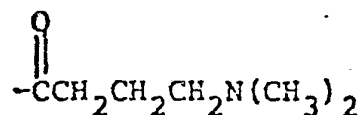
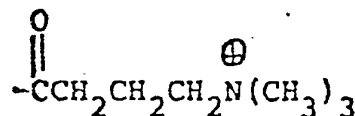
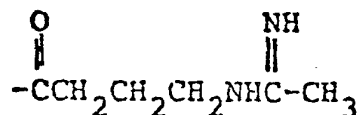
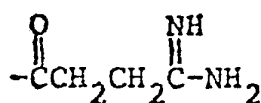
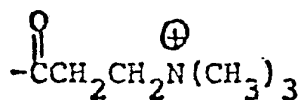
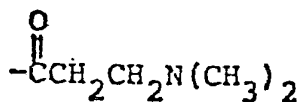
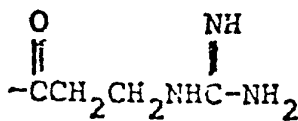
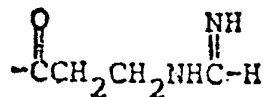
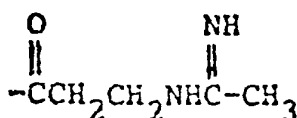
worin der Rest $-(\text{CH}_2)_n \text{ZR}^{10}$ des Acylrestes ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: Allylthiomethyl, Phenylthiomethyl, Butylmercaptomethyl, α -Chlorcrotylmercaptomethyl, Phenoxy-methyl, Phenoxyäthyl, Phenoxybutyl, Phenoxybenzyl, Diphe-noxymethyl, Dimethylmethoxymethyl, Dimethylbutoxymethyl, Dimethylphenoxy-methyl, 4-Guanidinophenoxy-methyl, 4-Pyri-dylthiomethyl, p-(Carboxymethyl)-phenoxy-methyl, p-Carboxy-methyl)-phenylthiomethyl, 2-Thiazolylthiomethyl, p-(Sulfo)-phe-noxymethyl, p-(Carboxymethyl)-phenylthiomethyl, 2-Pyrimidi-nylthiomethyl, Phenoäthylthiomethyl, 1-(5,6,7,8-Tetrahydro-naphthyl)-oxymethyl, N-Methyl-4-pyridiniumthio, Benzyloxy, 20 Methoxy, Äthoxy, Phenoxy, Phenylthio, Amino, Methylamino, Dimethylamin, Pyridiniummethyl, Trimethylammoniummethyl, Cyanomethylthiomethyl, Trifluormethylthiomethyl, 4-Pyridy-läthyl, 4-Pyridylpropyl, 4-Pyridylbutyl, 3-Imidazolyläthyl, 3-Imi-dazolylpropyl, 3-Imidazolylbutyl, 1-Pyrroloäthyl, 1-Pyrroloprop-yl und 1-Pyrrolobutyl.

Weitere bevorzugte Acylreste R² weisen die folgende Formel auf



worin die Gruppe $-\text{CHR}^{11}\text{R}^{12}$ des Acylrestes ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: α -Aminobenzyl, α -Amino-(2-thienyl)-methyl, α -(Methylamino)-benzyl, α -Amino-methylmercaptoprop-yl, α -Amino-3- oder 4-chlorbenzyl, α -Amino-3- oder 4-Hydro-xybenzyl, α -Amino-2,4-dichlorbenzyl, α -Amino-3,4-dichlorben-zy, D(-)- α -Hydroxybenzyl, α -Carboxybenzyl, α -Amino-(3-thie-nyl)-methyl, D(-)- α -Amino-3-chlor-4-hydroxybenzyl, α -Amino-40 (cyclohexyl)-methyl, α -(5-Tetrazolyl)-benzyl, 2-Thienylcarboxy-methyl, 3-Thienylcarboxymethyl, 2-Furylcarboxymethyl, 3-Furylcarboxymethyl, α -Sulfaminobenzyl, 3-Thienylsulfamino-methyl, α -(N-Methylsulfamino)-benzyl, D(-)-2-Thienylguanidi-nomethyl, D(-)- α -guanidinobenzyl, α -Guanyldureidobenzyl, α -Hydroxybenzyl, α -Azidobenzyl, α -Fluorbenzyl, 4-(5-Methoxy-1,3-oxadiazolyl)-aminomethyl, 4-(5-Methoxy-1,3-oxadiazolyl)-hydroxymethyl, 4-(5-Methoxy-1,3-sulfadiazolyl)-hydroxymethyl, 4-(5-Chlorthienyl)-aminomethyl, 2-(5-Chlorthienyl)-hydroxyme-thyl, 2-(5-Chlorthienyl)-carboxymethyl, 3-(1,2-Thiazolyl)-amino-methyl, 3-(1,2-Thiazolyl)-hydroxymethyl, 3-(1,2-Thiazolyl)-carbo-xymethyl, 2-Thiazolylaminomethyl, 2-Thiazolylhydroxymethyl, 2-Thiazolylcarboxymethyl, 2-Benzothienylcarboxymethyl, 2-Benzothienylhydroxymethyl, 2-Benzothienylcarboxymethyl, α -Sulfobenzyl, α -Phosphonobenzyl, α -Diäthylphosphono und 55 α -Monoäthylphosphono.

Ebenfalls sind erfindungsgemäss erhaltene Verbindungen, in welchen R¹ Wasserstoff ist und R² einen Acylrest der folgen-den Formel bedeutet

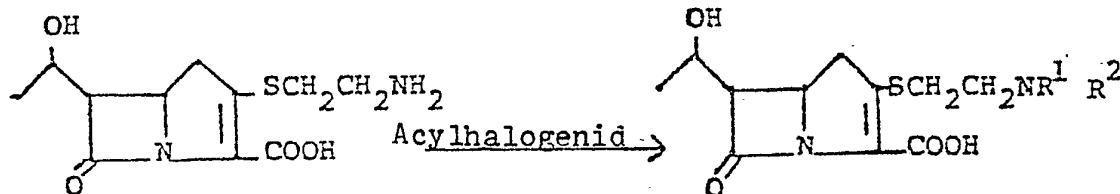


besonders bevorzugt.

In einer weiteren bevorzugten Gruppe von erfindungsge-mäss herstellbaren Verbindungen bedeuten R¹ Wasserstoff und

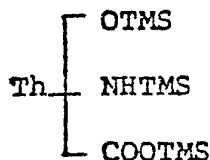
Die Acylierungsreaktion kann durchgeführt werden bei Temperaturen im Bereich von -20 bis $+100$ °C, aber vorzugsweise wendet man Temperaturen an im Bereich von -8 °C bis 25 °C. Jedes Lösungsmittel, in dem die Reaktanten löslich sind und das im wesentlichen inert ist, kann verwendet werden, beispielsweise polare Lösungsmittel, wie Wasser, Alkohole und polare organische Lösungsmittel im allgemeinen, wie Dimethylformamid (DMF), Hexamethylphosphoramid (HMPA), Aceton, Dioxan, Tetrahydrofuran (THF), Acetonitril, heterocyclische Amine, wie Pyridin, Äthylacetat, wässrige Mischungen der vorgenannten, sowie auch halogenierte Lösungsmittel, wie

Methylenchlorid und Chloroform. Die Umsetzung wird üblicherweise während einer Zeitspanne durchgeführt, die im Bereich von etwa 5 Minuten bis zu einem Maximum von 3 Stunden liegt, aber im allgemeinen recht eine Reaktionszeit von etwa 0,5 bis etwa 1 Stunde aus. Die folgende Bleichung kann dieses Verfahren unter Verwendung eines Carbonsäurehalogenids beschreiben; es ist jedoch selbstverständlich, dass man durch Verwendung eines Carbonsäureanhydrids oder eines anderen funktionellen äquivalenten Acylierungsmittels gleiche Produkte erhalten kann:



Im allgemeinen, wenn bei der oben beschriebenen Acylierungsreaktion ein Säurehalogenid (geeignete Halogenide sind z. B. Chloride, Jodide oder Bromide) oder ein Säureanhydrid verwendet wird, wird die Umsetzung in Wasser oder einer wässrigen Mischung eines polaren organischen Lösungsmittels, wie Aceton, Dioxan, THF, DMF, Acetonitril und dergleichen in Gegenwart eines geeigneten basischen Akzeptors, wie NaHCO_3 , MgO , NaOH , K_2HPO_4 und dergleichen vorgenommen.

Beim Durchführen der hier beschriebenen Umsetzung ist es im allgemeinen nicht notwendig, die 2-Carboxygruppe oder die 1'-Hydroxygruppe zu schützen; in den Fällen, in denen das Acylierungsmittel ausserordentlich wasserempfindlich ist, ist es manchmal vorteilhaft, die Acylierung in einem nicht-wässrigen Lösungsmittelsystem vorzunehmen. Triorganosilyl (oder Zinn)-Derivate des Thienamycins ergeben schnell die Tris-Triorganosilylderivate, beispielsweise Tris-Trimethylsilylthienamycin Th (TMS):



Diese Derivate, die leicht löslich in organischen Lösungsmitteln sind, können auf einfache Weise hergestellt werden, indem man Thienamycin mit einem Überschuss an Hexamethyldisilazan und einer stöchiometrischen Menge von Trimethylchlorosilan bei 25 °C unter kräftigem Rühren unter einer N_2 -Atmosphäre umsetzt.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Produkte (II) können eine Vielzahl von pharmakologisch annehmbaren Salzen mit anorganischen und organischen Basen bilden; eingeschlossen sind beispielsweise Metallsalze aus Alkali- und Erdalkalihydroxiden, -carbonaten oder -bicarbonaten und Salze, die sich ableiten von primären, sekundären oder tertiären Aminen, wie Monoalkylaminen, Dialkylaminen, Trialkylaminen, Niedrigalkanolaminen, Diniedrigalkanolaminen, Niedrigalkylendiaminen, N,N-Diarylalkyl-niedrigalkylendiaminen, Aralkylaminen, aminosubstituierten Niedrigalkanolen, N,N-di-niedrigalkylaminosubstituierte Niedrigalkanoole, Amino-, Polyamine- und guanidinosubstituierte Niedrigalkansäuren und stickstoffhaltenden heterocyclischen Aminen. Typische Beispiele schliessen Salze ein, die sich ableiten von Natriumhydroxid, Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Kaliumcarbonat, Kaliumhydroxid, Calciumcarbonat, Trimethylamin, Triäthylamin, Piperidin, Mor-

pholin, Chinin, Lysin, Protamin, Arginin, Procain, Äthanolamin, Morphin, Benzylamin, Äthylendiamin, N,N'-Dibenzyläthylendiamin, Diäthanolamin, Piperazin, Dimethylaminoäthanol, 2-Amino-2-methyl-1-propanol, Theophyllin, N-Methylglucamin und dergleichen. Säureadditionssalze, beispielsweise solche mit Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefel-, Salpeter-, p-Toluolsulfon- und Methansulfonsäure können auch verwendet werden und zwar in den Fällen, in denen der Acylrest eine basische Gruppe enthält.

Die Salze können Monosalze sein, wie das Mononatriumsalz, welches man vorzugsweise erhält, wenn man 1 Äquivalent Natriumhydroxid mit einem Äquivalent des Produktes (II) umsetzt, ebenso können es gemischte Di-Salze sein. Solche Salze erhält man, indem man beispielsweise 1 Äquivalent einer Base mit einem zweiwertigen Kation, wie Calciumhydroxid, mit einem Äquivalent des Produktes (II) umsetzt. Diese Salze sind pharmakologisch annehmbare nicht-toxische Derivate, die als aktive Bestandteile in geeigneten pharmazeutischen Einzeldosierungsformen verwendet werden können; sie können auch mit anderen Arzneimitteln kombiniert werden zur Herstellung von Zusammensetzungen mit einem breiteren Aktivitätsspektrum.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Thienamycinderivate sind wertvolle antimikrobe Substanzen, die aktiv sind gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Pathogene, wie *Bacillus subtilis*, *Salmonella schottmuelleri* und *Proteus vulgaris*. Die freien Säuren und insbesondere deren Salze, wie Amin- und Metallsalze, insbesondere die Alkali- und Erdalkalisalze, sind brauchbare Bacterizide und können verwendet werden, um beeinflussbare Pathogene von zahnärztlichen und medizinischen Ausrüstungsgegenständen zu entfernen, um Mikroorganismen abzutrennen und für therapeutische Behandlungen bei Menschen und Tieren. Für den letzteren Anwendungszweck können pharmakologisch annehmbare Salze mit anorganischen Basen, wie sie aus dem Stand der Technik bekannt sind und wie sie bei der Anwendung von Penicillinen und Cephalosporinen verabreicht werden, verwendet werden. Beispielsweise können für diesen Zweck die Alkali- und Erdalkalisalze und primäre, sekundäre und tertiäre Aminsalze verwendet werden. Diese Salze können kombiniert werden mit pharmazeutisch annehmbaren Flüssigkeiten und festen Trägerstoffen, um geeignete Einzeldosierungsformen, wie Pillen, Tabletten, Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Elixiere und dergleichen zuzubereiten nach Verfahren, wie sie aus dem Stand der Technik bekannt sind.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen sind neue wertvolle Antibiotika, die aktiv sind gegen verschiedene gram-positive und gram-negative Bakterien und die deshalb in

der Human- und Veterinärmedizin Verwendung finden können. Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen können deshalb als antibakterielle Arzneimittel für die Behandlung von Infektionen verwendet werden, die durch gram-positive und gram-negative Bakterien verursacht werden, beispielsweise gegen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Strep. pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhosa*, *Pseudomonas* und *Bacterium proteus*. Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen können weiter verwendet werden als Additive für Futtermittel und zum Konservieren von Nahrungsmitteln und als Desinfektionsmittel. Sie können beispielsweise in wässrigen Zusammensetzungen in Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 100 Teile des Antibiotikums pro Million Teile Lösung verwendet werden, um beispielsweise das Wachstum von schädlichen Bakterien auf medizinischen und dental-technischen Ausrüstungen zu zerstören oder zu inhibieren und auch als Bakterizide bei industriellen Anwendungen, beispielsweise bei auf Wasser aufgebauten Anstrichmitteln, beim Weisswasser von Papiermühlen, um das Wachstum von schädlichen Bakterien zu inhibieren.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Produkte können allein verwendet werden oder in Kombination mit aktiven Bestandteilen in einer Vielzahl von pharmazeutischen Zubereitungen. Diese Antibiotika und ihre entsprechenden Salze können in Form von Kapseln oder als Tabletten, als Pulver oder als flüssige Lösungen oder als Suspensionen und Elixiere verwendet werden. Sie können oral, intravenös oder intramuskulär verabreicht werden.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen können in einer solchen Form zubereitet werden, dass sie im Magen-Darm-Kanal absorbiert werden. Tabletten und Kapseln für eine orale Verabreichung können in Einzeldosierungsform vorliegen und können übliche Excipientien, wie Bindemittel, enthalten, beispielsweise Sirup, Gummi arabicum, Gelatine, Sorbose, Tragant oder Polyvinylpyrrolidon; Füllstoffe, beispielsweise Lactose, Zucker, Maisstärke, Calciumphosphat, Sorbose oder Glycerin; Schmiermittel, beispielsweise Magnesiumstearat, Talkum, Polyäthylenglykol, Siliciumdioxid; Zerfallmittel, beispielsweise Kartoffelstärke oder geeignete Befeuchtungsmittel, wie Natriumlaurylsulfat. Die Tabletten können in bekannter Weise beschichtet werden. Orale flüssige Präparationen können in Form von wässrigen oder öligen Suspensionen, Lösungen, Emulsionen, Sirupen, Elixieren und dergleichen vorliegen oder können als trockenes Produkt hergestellt werden, damit sie dann mit Wasser oder einem anderen geeigneten Trägermaterial vor ihrer Verwendung angemacht werden können. Solche flüssigen Zubereitungen können übliche Additive, wie Suspensionsmittel, beispielsweise Sorbose, Sirup, Methylcellulose, Glukose/Zuckersirup, Gelatine, Hydroxyäthylcellulose, Carboxymethylcellulose, Aluminiumstearatgel oder hydrierte essbare Öle enthalten, beispielsweise Mandelöl, fraktioniertes Kokosnussöl, Ölester, Propylenglykol oder Äthylalkohol enthalten; Konservierungsmittel, beispielsweise Methyl- oder Propyl-p-hydroxybenzoat oder Sorbinsäure. Suppositorien können die üblichen hierfür geeigneten Substanzen, beispielsweise Kakaobutter oder andere Glyceride, enthalten.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen können für Injektionen in Einzeldosierungen in Form von Ampullen hergestellt werden oder in Behältern mit zugesetzten Konservierungsmitteln für Mehrfachdosierungen. Die Zusammensetzungen können in Form von Suspensionen, Lösungen oder Emulsionen in Öl oder wässrigen Trägermaterialien und sie können Formulierungsmittel, wie Suspensionsmittel, Stabilisierungsmittel und/oder Dispergiermittel enthalten. Alternativ können die aktiven Bestandteile in Form von Pulver vorliegen, damit sie mit einem geeigneten Trägermaterial, beispielsweise sterilem, keimfreien Wasser vor der Anwendung angemacht werden können.

Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen können auch in geeigneten Formen für die Absorption zubereitet werden durch die Schleimhäute der Nase und das Hals- und Bronchialgewebe und sie können in einfacher Weise auch in Form von pulverigen oder flüssigen Sprays für Inhalationen zubereitet werden oder in Form von Pastillen oder Zubereitungen für Halspinselung. Für die medizinische Anwendung an den Augen oder Ohren können die Zubereitungen als besondere Kapseln in flüssiger oder halbflüssiger Form vorliegen oder sie können als Tropfen und dergleichen verwendet werden. Für topische Anwendungen kann man hydrophobe oder hydrophile Basen als Salben, Cremes, Lotionen, Salbungsmittel oder Pulver formulieren.

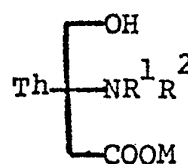
Ausser einem Trägermaterial können die genannten Zusammensetzungen auch weitere Bestandteile, wie Stabilisatoren, Bindemittel, Antioxidantien, Konservierungsmittel, Schmiermittel, Suspensionsmittel, Viskositätsmittel oder Geschmacksstoffe und dergleichen enthalten. Darüber hinaus können in den Zusammensetzungen auch andere aktive Bestandteile vorhanden sein, um ein breiteres Spektrum der antibiotischen Aktivität zu bewirken.

Für die Veterinärmedizin können diese Zusammensetzungen beispielsweise als innerhalb der Brust einlegbare Zubereitungen mit einer entweder schnellen oder langsamen Abgabewirkung formuliert werden.

Die zu verabreichenden Dosierungen hängen zu einem erheblichen Teil von dem Zustand des behandelten Patienten ab und von dem Gewicht des Patienten, der Verabreichungsroute und der Häufigkeit der Verabreichung, wobei die parenterale Route für allgemeine Infektionen bevorzugt wird und die orale Route für Infektionen der Eingeweide. Im allgemeinen kann eine tägliche orale Dosierung etwa 15 bis etwa 600 mg aktiven Bestandteil pro kg Körpergewicht des Patienten bei einer oder mehreren Verabreichungen pro Tag enthalten. Eine bevorzugte tägliche Dosierung für Erwachsene liegt im Bereich von etwa 80 bis 120 mg an aktivem Bestandteil pro kg Körpergewicht.

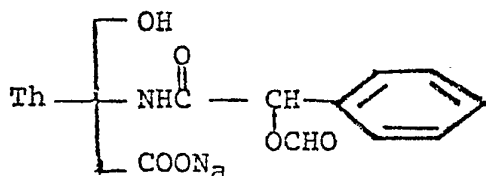
Die beschriebenen Zusammensetzungen können in verschiedenen Einzeldosierungsformen verabreicht werden, beispielsweise in festen oder in flüssigen oral aufnehmbaren Dosierungsformen. Die Zusammensetzungen pro Einzeldosierung, ob sie flüssig oder fest ist, kann etwa 0,1% bis 99% an aktivem Material enthalten, wobei der bevorzugte Bereich zwischen etwa 10 und 60% liegt. Die Zusammensetzungen können im allgemeinen etwa 15 mg bis etwa 1500 mg an aktivem Bestandteil enthalten; im allgemeinen ist es jedoch bevorzugt, eine Dosierungsmenge im Bereich von etwa 250 bis 1000 mg zu verwenden. Bei einer parenteralen Verabreichung ist die Einzeldosierung im allgemeinen die reine Verbindung in einer leicht angesäuerten wässrigen Lösung oder in Form eines löslichen Pulvers, das zum Auflösen bestimmt ist.

In den folgenden Beispielen, welche die Erfindung beschreiben, ohne diese jedoch zu beschränken, werden die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen durch das nachstehende Symbol gekennzeichnet:



worin die drei funktionellen Gruppen dargestellt sind.

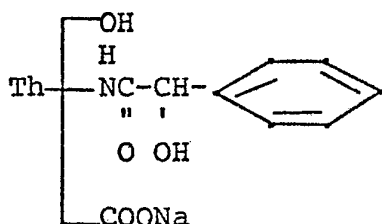
Beispiel 1



Herstellung des Natriumsalzes von N-(O-Formyl)-D-mandeloylthienamycin

Zu Thienamycin (40 mg) in 10 ml Wasser werden nach und nach bei 0 °C 124 mg NaHCO₃, 8 ml Dioxan und dann unter Rühren 1,2 Äquivalente N-(O-Formyl)-1-mandeloylchlorid während eines Zeitraumes von einer Minute zugegeben. Nach 6minütiger Gesamtreaktionszeit wird die Mischung dreimal mit kaltem Äthyläther extrahiert. Die Elektrophorese eines wässrigen Anteils (0,05m, pH 7, wässriger Phosphatpuffer, 50 V/cm, 20 Minuten) zeigt eine 67%ige Umwandlung zu dem gewünschten Produkt an. Der pH wird mit 1m H₃PO₄-Lösung auf 2,2 eingestellt und die Lösung wird dreimal extrahiert mit Äthylacetat. Die Äthylacetat (EtOAc)-Lösung wird über Magnesiumsulfat getrocknet und zweimal mit zwei Äquivalenten einer NaHCO₃-Lösung extrahiert. Der wässrige, gefriergetrocknete Extrakt enthält 164 optische Dichteeinheiten (ODU) bei 302 nm bei einer UV-Analyse bei pH 7,0, von denen 95% nach Behandlung mit Hydroxylamin während einer Stunde ausgelöscht werden. Die Ausbeute beträgt 53%. Eine Elektrophorese, wie zuvor durchgeführt, zeigt einen Punkt mittels Bioautographie 4 cm in Richtung der Anode an. KMR (δD₂O) 1,30 (d, J = 6 Hz), CH₃CH; 2,8–3,7 (m, CH₂), 4,0–4,5 (m, CH β-Lactam), 4,73, HDO; 5,97 (s, C₆H₅CHCHO), 7,53 (s, C₆H₅), 8,30 (s, C₆H₅CHOCHO).

Beispiel 2



Herstellung des Natriumsalzes von N-D-Mandeloylthienamycin

Die in der Überschrift beschriebene Verbindung wird nach der Verfahrensweise des Beispiels 1 hergestellt, aber vor der EtOAc-Extraktion lässt man den wässrigen Extrakt eine Stunde bei 25 °C stehen. Die Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7, wässriges Phosphat, 0,05m) zeigt einen Punkt bei der Bioautographie, 4 cm in Richtung zur Anode; KMR (δ, D₂O) 1,50 (d, J = 6 Hz), CH₃CH; 2,8–3,8 (m, CH₂), 4,2–4,6 (m, CH β-Lactam),

4,96 (s, HDO); 5,40 (s, C₆H₅CH).

Beispiel 3

Natriumsalz von N-Propionylthienamycin

Zu Thienamycin (25 mg in 6 ml Wasser bei 0 °C) werden nacheinander gegeben 38,6 mg NaHCO₃, 5 ml Dioxan und dann unter Rühren ein Äquivalent von Propionsäureanhydrid während eines Zeitraumes von 3 Minuten. Nach 10 Minuten wird die Mischung dreimal mit kaltem Äthyläther extrahiert. Die Elektrophorese des wässrigen Extraktes (0,05m, pH 7, Phosphatpuffer, 50 V/cm, 20 Minuten) zeigt an, dass kein freies Thienamycin vorhanden ist. Der wässrige Extrakt wird auf pH 6,8 eingestellt und enthält 600 ODU bei 302 nm mittels UV-Analyse, welche zu 95% nach einstündiger Behandlung mit Hydroxylamin ausgelöscht wird. KMR (δ, D₂O) 1,42 (m CH₂CH₃, CH₃CH); 2,48 (q, CH₂CH₃); 2,86–2,90 (m, CH₂), 4,30–4,70 (m, CH β-Lactam), 4,86 (HDO).

5

Beispiel 4

Natriumsalz von N-(Methoxyacetyl)-thienamycin

Zu Thienamycin (55 mg in 6 ml Wasser bei 0 °C) werden nach und nach 68 mg NaHCO₃, 6 ml Dioxan und unter Rühren während eines Zeitraumes von 1,5 Minuten 1,1 Äquivalente Methoxyacetylchlorid gegeben. Die Mischung wird weitere 10 Minuten gerührt. Die Mischung wird dreimal mit kaltem Äthyläther extrahiert. Die Elektrophorese eines wässrigen Extraktes (0,05m, pH 7, Phosphatpuffer, 50 V/cm, 20 Minuten) zeigt an, dass kein freies Thienamycin vorhanden ist. Der wässrige Extrakt wird auf pH 6,8 eingestellt und enthält 105 ODU bei 302 nm mittels UV-Analyse, welche zu 95% nach einstündiger Behandlung mit Hydroxylamin ausgelöscht wird. KMR (δ, D₂O) 1,56 (m, CHCH₃), 2,84–3,60 (CH₂), 3,72 (s, OCH₃), 4,29 (s, OCH₂), 4,98 (s, HDO).

Beispiel 5

Lithiumsalz von N-(p-Nitrobenzoyloxycarbonyl)-thienamycin

Zu Thienamycin (220 mg in 60 ml Wasser bei 0 °C) werden nach und nach 679 mg NaHCO₃, 60 ml Dioxan und dann unter Rühren 1,1 Äquivalente p-Nitrobenzoylchlorformat während eines Zeitraumes von 1,5 Minuten zugegeben. Man lässt die Mischung 10 Minuten reagieren und extrahiert sie dann dreimal mit kaltem Äthyläther. Die Elektrophorese (0,05m, pH 7, Phosphatpuffer, 50 V/cm, 20 Minuten) zeigt, dass kein freies Thienamycin vorhanden ist. Der wässrige Extrakt wird mit 1m H₃PO₄-Lösung auf pH 2,2 eingestellt und dreimal mit Äthylacetat extrahiert. Der Äthylacetatextrakt wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mit 0,1n LiOH nochmals extrahiert bis zu einem pH von 8,2. Der endgültige pH wird auf 7,0 mit 1m H₃PO₄ eingestellt und die Probe wird gefriergetrocknet. Die Ausbeute beträgt 205 mg (54%).

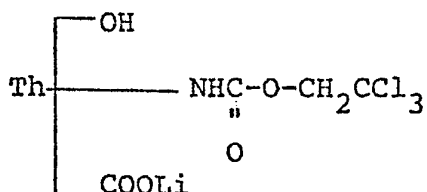
Beispiel 6

Herstellung des Natriumsalzes von N-(o-Nitrobenzoyloxycarbonyl)-thienamycin

Zu Thienamycin (43 mg bei 0 °C) wird eine 1:1-Mischung von Tetrahydrofuran-H₂O (10 ml) gegeben. Die Mischung wird schnell gerührt während 132 mg NaHCO₃ (10 Äquivalente) zugegeben werden und dann werden unter Rühren während 2 Minuten tropfenweise 4 Äquivalente o-Nitrobenzoylchlorformt zugegeben. Nach 30 Minuten wird der pH mit 25%iger H₃PO₄-Lösung auf 7 eingestellt und die Lösung wird dreimal mit Äther extrahiert. Der wässrige Anteil wird im Vakuum bei 25 °C verdampft und dann auf den pH 2,2 bei 0 °C gebracht. Man gibt festes NaCl hinzu und die kalte saure Lösung wird dreimal mit Calciumäthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte werden kombiniert und schnell rückgewaschen mit kalter Salzlösung und dann getrocknet über Magnesiumsulfat, filtriert und rückextrahiert mit 10 ml Wasser, enthaltend 1,7 Äquivalente festes NaHCO₃. Der Extrakt wird im Vakuum gefriergetrocknet bei Umgebungstemperatur und enthält 366 ODU bei 303 nm mittel UV-Analyse in H₂O bei pH 7,0, welche zu 95% nach 1,5stündiger Behandlung mit Hydroxylamin ausgelöscht werden. Die Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7, 0,05m Phosphatpuffer) zeigt einen Punkt mittel Bioautographie (MB-108 Staph. aureus), 3,7 cm in Richtung zur Anode. IR (μ, Film) 5,62 (β-Lactam); 5,78 breit (Urethan). Das KMR stimmt mit der Struktur überein.

Beispiel 7

Herstellung des Lithiumsalzes von N-(Trichloräthoxycarbonyl)-thienamycin



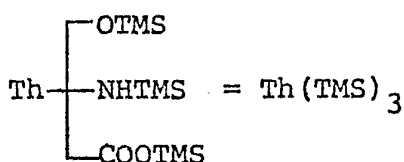
Zu Thienamycin (40 mg in 18 ml 1:1 THF-H₂O bei 0 °C) werden unter Rühren 225 mg (15,2 Äquivalente) NaHCO₃ gegeben und dann gibt man während 2 Minuten tropfenweise unter Rühren 1,8 Äquivalente Trichloräthylchlorformat, gelöst in 0,6 ml THF, hinzu. Nach 6 Minuten wird der pH auf 7,2 mit 25%iger H₃PO₄ eingestellt und die Lösung wird mit Äther extrahiert. Der wässrige Anteil wird nach Entfernung von jeglichen Mengen anhaftendem Äther im Vakuum dann bei 0 °C auf pH 2,5 gebracht und mit kaltem Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte werden vereint und schnell mit kalter Salzlösung rückgewaschen, getrocknet mit wasserfreiem MgSO₄, filtriert und rückextrahiert mit 0,01 m LiOH bis zum pH 6,8. Der wässrige Extrakt wird von jeglichem Äthylacetat im Vakuum befreit und gefriergetrocknet. Der restliche Rückstand enthält 936 ODU (39,7%) gemessen durch UV-Analyse bei 302 nm welche nach Behandlung mit Hydroxylamin während einer Stunde in 0,05m Phosphatpuffer (pH 7) zu 90% ausgelöscht werden. Die Ausbeute beträgt 32 mg. Die Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7, 0,05m Phosphat) zeigt eine Zone mittels Bioautographie (MB 108, Staph. aureus), 2,4 cm in Richtung zur Anode. Flüssigchromatographie auf C₁₈ Bondapak (Waters Assoc.) in wässrigem 10%igem THF zeigt einen Hauptpeak, frei von jeglichem unreaktiertem Thienamycin.

Beispiel 8

Herstellung von N-Bromacetylthienamycin

Zu einer gekühlten Lösung von Thienamycin (28,8 mg) und Natriumbicarbonat (0,3 g) in 10 ml Wasser und 8 ml Dioxan wird unter Rühren eine Lösung aus 0,25 g Bromessigsäureanhydrid in 2 ml Dioxan während eines Zeitraumes von 20 Minuten gegeben. Der pH wird auf 8 bis 8,3 aufrechterhalten. Die Mischung wird weitere 10 Minuten gerührt, mit Äther überschichtet und durch Zugabe von 8%iger Salpetersäure bis zum pH 7 neutralisiert. Die ätherische Schicht wird abgetrennt und die wässrige Schicht wird zweimal mit Äther extrahiert. Die wässrige Schicht wird unter vermindertem Druck auf 0,5 ml eingedampft, mit 2 ml Wasser verdünnt und auf 50 ml XAD-2 Harz gegeben. Die Säule wird mit Wasser eluiert. Die ersten 80 ml werden verworfen und die nächsten 100 ml werden gesammelt. Das Lösungsmittel wird dann ausgetauscht gegen 10%iges THF und weitere 100 ml werden gesammelt. Die vereinten Eluate werden auf pH 7 eingestellt, unter vermindertem Druck auf 5 ml abgedampft und gefriergetrocknet, wobei man das Natriumsalz von N-Bromacetylthienamycin in 60%iger Ausbeute erhält. UV λ_{max} 302 mμ.

Beispiel 9



[TMS=Trimethylsilyl]

Herstellung von silyliertem Thienamycin

Thienamycin (80,0 mg) werden in 40 ml Tetrahydrofuran (THF) suspendiert unter einer N₂-Atmosphäre und dann auf 10

ml konzentriert; dazu gibt man Hexamethyldisilazan (1,0 ml) und Trimethylchlorsilan (300 μl). Die Mischung wird 20 Minuten bei 25 °C unter heftigem Rühren reagieren gelassen. Die Suspension wird dann zur Entfernung von Ammoniumchlorid zentrifugiert. Das Überstehende wird zu einem Öl eingedampft unter einem Stickstoffstrom für die weitere Umsetzung.

Beispiel 10

Herstellung von N-(O-Nitrobenzyloxycarbonyl)-thienamycin aus Th(TMS)₃

Zu Th(TMS)₃ (24 mg) in 0,8 ml trockenem THF werden 23 mg o-Nitrocarbonyloxychlorid gegeben und anschliessend daran 0,015 ml Triäthylamin. Nach 30minütigem Vibrieren bei 25 °C wird die Mischung in einem trockenen Stickstoffstrom getrocknet und konzentriert. Der pastöse Rückstand wird dreimal mit Petroläther gewaschen. Der Rückstand wird mit einer Mischung aus 1,5 ml THF und 10 ml eines pH 7 Phosphatpuffers 20 Minuten gerührt und dann auf eine Säule von 30 ml Dowex 50 (Na₊)-Harz gegeben. Die Säule wird mit Wasser eluiert und das Abfließende wird durch UV-Absorption bei 302 nm kontrolliert. Die Fraktionen, enthaltend das Produkt, werden vereint und gefriergetrocknet.

Beispiel 11

Herstellung des Natriumsalzes (I) und Lithiumsalzes (II) von N-(p-Methoxybenzyloxycarbonyl)-thienamycin

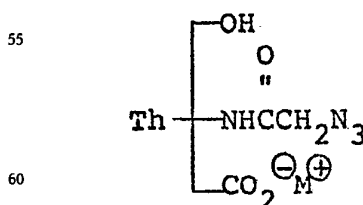
Zu Thienamycin (20 mg in 5 ml Wasser bei 0 °C) gibt man 105 mg NaHCO₃ (20 Äquivalente), 5 ml Dioxan und dann unter Rühren tropfenweise während einer Minute 10 Äquivalente p-Methoxybenzylchlorformat. Nach 15 Minuten wird der pH mit 1m H₃PO₄ auf 7,5 eingestellt und die Lösung wird dreimal mit Äther extrahiert. Der wässrige Anteil wird dann bei 0 °C auf pH 2,2 eingestellt und dreimal mit Äthylacetat extrahiert. Das Äthylacetat wird schnell mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mit einigen ml Wasser, enthaltend 6,3 mg NaHCO₃, extrahiert. Der erste Extrakt wird gefriergetrocknet und enthält 172 ODU bei 303 nm mittels UV-Analyse in H₂O bei pH 7,0, welche zu 95% nach einstündiger Behandlung mit Hydroxylamin ausgelöscht werden. Die Ausbeute von I beträgt 16 mg. Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7 Phosphatpuffer) zeigt mittels Bioautographie einen Punkt 4 cm in Richtung der Anode.

KMR (δ, D₂O): 1,49 (d, J = 6 Hz, CH₃CH); 2,8–3,7 (m, CH₂); 3,99 (s, OMe); 4,0–4,6 (m, β-Lactam CH); 4,92 (s, HCO); 5,20 (s, OCH₂); 7,13 (d, J = 8 Hz, C₆H₄).

Extrahiert man die Äthylacetatlösung mit 0,1n LiOH bis zum pH 7,8 und gefriergetrocknet dann, so erhält man das Lithiumsalz II. Die Spektral- und elektrophoretischen Eigenschaften von II sind die gleichen wie von I.

Beispiel 12

Herstellung des Natrium(I)- und Lithium(II)-Salzes von N-Azidoacetylthienamycin



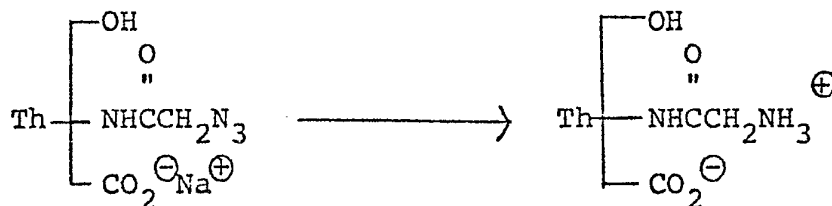
M=Na, Li

Thienamycin (48 mg, 0,18 mMol) wird in 10 ml kaltem Wasser gelöst und bei 0 °C gehalten. Zu der Lösung wird Natriumbicarbonat (147 mg, 17,6 mMol) und Dioxan (10 ml) gegeben. Azidoacetylchlorid (60 mg, 0,05 mMol) wird zu der Lösung während

eines Zeitraumes von 2 Minuten gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 15 Minuten gerührt und dann mit 30%iger Phosphorsäure auf pH 7,0 neutralisiert und wird dann in einen Scheidetrichter überführt. Die Lösung wird mit zweimal 50 ml Äther extrahiert. Die wässrige Schicht wird auf 5 ml konzentriert und dann auf eine Ionenaustauschharz-Säule aus Dowex AG-50×8 (Natrium-Form) gegeben. Die gewünschten Fraktionen, gemessen durch UV, wurden vereint und gefriergetrocknet, wobei man 21 mg des Produktes (I) erhält. Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten in pH 7 Phosphatpuffer) des Produktes zeigt ein einzelnes bio-aktives Band, das sich 4 cm in Richtung zur Anode bewegt.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 300 nm;

KMR (100 MHz, D₂O): 1,26 (d, CH₃CH), 2,93–3,43 (m, 3CH₂ und C₆-H), 4,01 (s, CH₂N₃) und 4,20 ppm (m, C₅-H und C₇-H).



Herstellung von N-Glycyl-Thienamycin

Platinoxid (60 mg) und 2 ml Wasser werden in einen Hydrierkolben gegeben und unter 1 Atmosphäre Wasserstoff 20 Minuten bei 25 °C gerührt. Zu dem Kolben wird N-Azidoacetylthienamycin-Natriumsalz (6,0 mg, 0,02 mMol in 4 ml Wasser) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei 25 °C unter 1 Atmosphäre Wasserstoff 30 Minuten gerührt. Die erhaltene Mischung (pH 8,7) wird auf pH 7,0 mit 30%iger Phosphorsäure eingestellt und vom Katalysator abfiltriert. Die wässrige Lösung wird auf 2 ml konzentriert und dann auf eine Ionenaustauschsäule von Dowex AG-50×8 (Natrium-Form) gegeben. Die gewünschten Fraktionen, gemessen durch UV, werden vereint und gefriergetrocknet, wobei man 3,8 mg des Produktes erhält. Die Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten) des Produktes sind pH 7,0 Phosphatpuffer zeigt am Anfang ein einziges bio-aktives Band.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 300 nm; KMR (100 MHz, D₂O): δ 1,27 (d, CH₃CH), 2,96–3,37 (m, 3CH₂ und C₆-H), 3,70 (s, COCH₂NH₂), und 4,20 ppm (m, C₅-H und C₇-H).

Beispiel 14

Herstellung von N-Benzoyloxycarbonylthienamycin

Eine Lösung aus 14 mg Thienamycin in 4 ml 0,05 m pH 7 Phosphatpuffer und 2 ml Dioxan in einem Dreihals-Kolben, der mit einem Rührer, einem Thermometer, einer pH-Elektrode und der Einlaufspitze eines automatischen Titrators ausgerüstet ist, wird in einem Methanol-Eis-Bad auf –8 °C gekühlt. Der pH wird durch Zugabe von 0,2n Natriumhydroxid in 50%igem wässrigem Dioxan auf 8,2 eingestellt und dazu wird eine Lösung von 0,015 ml Carbobenzyloxychlorid in 2 ml Dioxan gegeben. Die Mischung wird gerührt bei –6 °C und pH 8,2 für 10 Minuten, dann wird mit Äther überschichtet und der pH wird durch Zugabe von Chlorwasserstoffsäure auf pH 7 eingestellt. Die Schichten werden durch Zentrifugieren getrennt und die wässrige Phase wird zweimal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird mit Äthylacetat überschichtet und auf pH 2 eingestellt. Das Äthylacetat wird abgetrennt und die wässrige Schicht wird wiederum mit Äthylacetat extrahiert. Die vereinten Äthylacetatschichten werden mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Die Filtrate werden mit Wasser gerührt und der pH wird auf 7 durch Zugabe von verdünnter Natriumbicarbonatlösung eingestellt. Die wässrige Phase wird abgetrennt und gefriergetrocknet, wobei man das Natriumsalz von N-Benzyl-

Thienamycin (76,2 mg, 0,28 mMol) wird in 10 ml kaltem Wasser gelöst und bei 0 °C gehalten. Zu der Lösung gibt man 0,6 ml 1,0n Lithiumhydroxidlösung und 10 ml Dioxan zu. Nach einminütigem Rühren gibt man innerhalb von 2 Minuten Azidoacetylchlorid (33,6 mg, 0,28 mMol) hinzu. Das Reaktionsgemisch wird eine weitere Minute gerührt und sodann mit 30%iger Phosphorsäure auf pH 7,0 neutralisiert. Nach Extraktion mit Äther wird die wässrige Lösung auf 5 ml konzentriert und wird auf eine Ionenaustauschsäule (Lithium-Form) von Dowex AG-50×8 gegeben. Die gewünschten Fraktionen, gemessen durch UV, werden vereint und gefriergetrocknet, wobei man 38 mg des Produktes (II) erhält. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 300 nm.

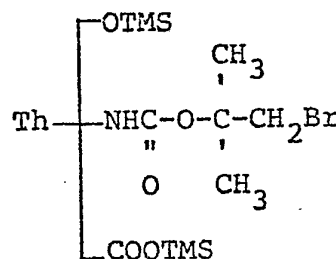
Beispiel 13

25 oxycarbonylthienamycin in einer Menge von 10 mg (46%) erhält. Das UV-Spektrum λ_{max} 303 m μ , E% 147 (ϵ 6290) zeigt etwa 80%ige Reinheit an. Elektrophorese bei 50 V/cm während 20 Minuten bei pH 7 und anschließende Bioautographie an *S. aureus* zeigt eine Inhibierungszone bei +2,5 cm an.

Beispiel 15

Herstellung von N-(Brom-tert.-Butoxycarbonyl)-O-trimethylsilyl-thienamycin-trimethylsilylester

35 lyl-thienamycin-trimethylsilylester



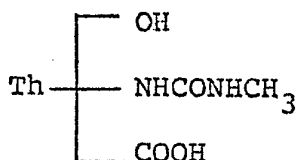
45 Th(TMS)₃ (16 mg), erhalten wie vorher angegeben, wird in 0,4 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und dazu werden 20 μ l (28 mg, 0,13 mMol) Brom-tert.-butylchlorformat (Kp 35°/0,9 mm) und 8 μ l (5,67 mg, 0,057 mMol) Triäthylamin (rückdestilliert aus BaO) gegeben. Die Mischung wird 20 Minuten bei 25 °C geschüttelt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels und der überschüssigen Reagentien erhält man das gewünschte Produkt.

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOAc}}$ 320 nm (ϵ 9000).

Stufe B

Herstellung von N-(Brom-tert.-butoxycarbonyl)-thienamycin N-Brom-tert.-butoxycarbonyl-O-trimethylsilyl-thienamycin-trimethylsilylester (3 mg) wird in 0,1 ml Tetrahydrofuran, zu dem 0,5 ml eines 0,1m pH 7,0 Phosphatpuffers gegeben worden sind, gelöst. Die Lösung lässt man 20 Minuten bei 25 °C stehen und gibt sie dann über eine Säule (5 ml) von Dowex 50×8 (Na⁺-Form), woei das Eluat durch UV überwacht wird. Die korrekten Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet, wobei man das gewünschte Produkt erhält. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{Puffer}}$ 304 nm (ϵ 9000); Elektrophorese bei 50 V/cm während 20 Minuten in pH 7,0 Puffer zeigt eine einzige bio-aktive Zone, die sich 31,5 mm in Richtung zur Anode bewegt.

Beispiel 16

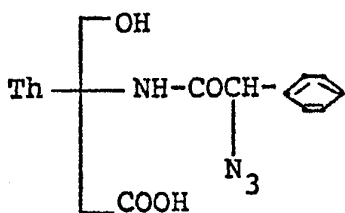


N-(Methylcarbamy)-thienamycin

O,N-Bistrimethylsilylthienamycin-trimethylsilylester [Th(TMS)₃, hergestellt nach Beispiel 9] aus 66 mg (0,24 mMol) Thienamycin werden in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst. Die Lösung wird bei 25 °C gerührt und dazu werden 80 mg (1,1 mMol) von frischdestilliertem Methylisocyanat gegeben. Nach einer Stunde zeigt das IR-Spektrum der Tetrahydrofuranlösung Banden bei 6,0 µ (-NH-CO-NH-) und 6,5 µ (-NH-). Die Reaktionslösung wird zur Trockne eingedampft zur Entfernung des überschüssigen Methylisocyanats; der Rückstand wird in 5 ml trockenem Tetrahydrofuran gelöst und nochmals zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 5 ml 0,1n pH 7,0 Natriumphosphatpuffer gelöst und über eine Säule von 80 ml Dowex 50×8 (Na⁺) chromatographiert unter Verwendung von entionisiertem Wasser als Eluierungsmittel. Fraktionen von 8 ml werden in einer Menge von 8 ml/5 Minuten genommen und das Abfließende aus der Kolonne wird durch UV-Absorption und durch den Refraktionsindex überwacht. Das Produkt wird in den Fraktionen 4 bis 9 festgestellt, die vereint werden und auf ein Volumen von 12 ml konzentriert werden. Das Konzentrat wird über eine Säule von 80 ml XAD-2 Harz chromatographiert unter Verwendung von entionisiertem Wasser als Eluierungsmittel. Fraktionen von 8 ml werden alle 5 Minuten entnommen und die Kolonne wird überwacht durch UV-Absorption und den Refraktionsindex. Aliquote (Menge hängt von der UV-Absorption ab) der Fraktionen 11, 15, 17, 20, 22, 25 und 30 werden einer Papierelektrophorese unterworfen bei 50 V/cm während 15 Minuten unter Verwendung eines 0,5n pH 7,0 Phosphatpuffers. Die Papierstreifen werden ausgewertet unter Verwendung von Agarplatten, enthaltend *S. aureus*. Charakteristische Zonen des Ausgangsmaterials Thienamycin, welche praktisch keine elektrophoretische Beweglichkeit bei pH 7,0 aufweisen, sind in keiner der geprüften Fraktionen vorhanden, während man Zonen für N-(Methylcarbamy)-thienamycin in den Fraktionen 11, 15, 17, 20, 22, 25 und 30 etwa 3,5 cm vom Ausgangspunkt in Richtung der Anode beobachtet. Fraktionen 14 bis 35 werden vereint (158 ml) und auf ein Volumen von etwa 20 ml konzentriert. Eine Probe von 158 ml der Lösung, verdünnt 1:4 mit Wasser, ergibt ein UV-Maximum bei 303 nm; A = 1,38. Die Lösung wird gefriergetrocknet, wobei man das gewünschte Derivat in einer Menge von 29,8 mg erhält λ_{max} 303 nm E% = 285.

Das KMR-Spektrum (D₂O) von N-(Methylcarbamy)-thienamycin zeigt, zusätzlich zu den für die anderen Funktionen erwarteten Resonanzen, ein Singulett bei δ 2,88 für die CONHCH₃-Gruppe.

Beispiel 17



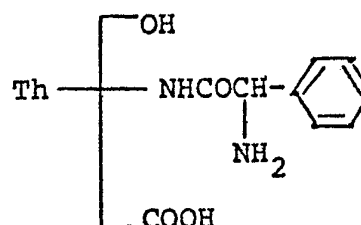
N-(α-Azidophenylacetyl)-thienamycin

Eine Lösung aus 39 mg (0,14 mMol) Thienamycin in 10 ml Dioxan-Wasser (1:1) wird mit 176 mg (2,1 mMol) NaHCO₃ behandelt und auf 0 °C gekühlt. Eine 100-µl-Portion einer Lösung aus 295 mg α-Azidophenylacetylchlorid in Dioxan (Gesamtvolumen 0,5 ml) wird unter schnellem Rühren zugegeben. Nach 15 Minuten werden zwei weitere 50-µl-Portionen zu der α-Azidophenylacetylchlorid-Lösung in 15minütigen Intervallen gegeben. 15 Minuten nach der letzten Zugabe des Säurechlorids wird das Reaktionsgemisch mit zwei 5-ml-Portionen Äther extrahiert; 15 ml Äthylacetat werden zugegeben und die wässrige Phase wird schnell gerührt und mit Phosphorsäure auf den pH 2,2 bis 2,5 angesäuert. Die Äthylacetatschicht wird abgetrennt und die wässrige Phase wird mit 5 ml Äthylacetat gewaschen. Die vereinte Äthylacetatlösung wird getrocknet (MgSO₄) und nach Entfernung des Trocknungsmittels werden 20 ml Wasser zugegeben. Das N-α-Azidophenylacetyl)-thienamycin wird in die wässrige Lösung durch Zugabe von 103 mg NaHCO₃ bei 0 °C unter Rühren extrahiert. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und der pH wird durch Zugabe einer geringen Menge NaHCO₃ auf 7,2 eingestellt.

Eine 0,5 ml Probe wird mit 2,5 ml D₂O verdünnt und für die KMR-Spektralanalyse gefriergetrocknet. Resonanzen bei δ 5,0 und 7,48 sind charakteristisch für die -CH- und C₆H₅ Gruppen.



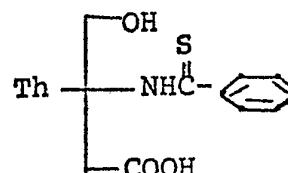
Beispiel 18



N-(α-Aminophenylacetyl)-thienamycin

Eine wässrige Lösung (6 ml) von 6 mg von N-(α-Azidophenylacetyl)-thienamycin wird mit 60 mg eines 10% Pd/C-Katalysators bei 25 °C 30 Minuten bei einer Atmosphäre Wasserstoffdruck gerührt. Das Reaktionsgemisch wird durch Supercel filtriert und dann mit neun 1-ml-Anteilen Wasser gewaschen. Das Filtrat und die Waschlösungen werden vereint (15 ml) und 4-µl-Proben werden einer Papierelektrophorese unterworfen in einem pH 7 Puffer bei 50 V/cm während 15 Minuten. Die Elektrophorese wird ausgewertet durch Bioautographie über MB-108-Agar-Platten und zeigt bioaktive Zonen bei +0,5 cm (Durchmesser 32 mm) für N-(α-Aminophenylacetyl)-thienamycin; +3,0 cm (Durchmesser 16 mm) für N-(α-Azidophenylacetyl)-thienamycin und 4,5 cm (Durchmesser 22 mm) für ein Nebenprodukt.

Beispiel 19



N-(Thiobenzoyl)-thienamycin

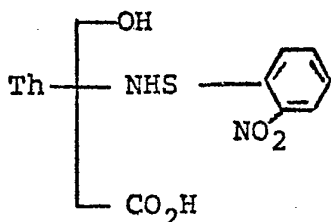
Eine Lösung aus 55,8 mg (0,2 mMol) Thienamycin in 18 ml Dioxan-Wasser (1:1) wird mit 263 mg (3,1 mMol) NaHCO₃ behandelt und auf 0 °C gekühlt. Zwei 200-µl-Anteile einer Lösung von 100 mg Thiobenzoylchlorid in 0,6 ml trockenem Dioxan werden zu der schnell gerührten Reaktionslösung in

Eine Lösung aus Natrium-N-bromacetylthienamycin (84 mg) in 20 ml Wasser wird mit 20 ml 0,1n Natriumthiosulfat behandelt und die Mischung wird 18 Stunden bei 4 °C stehengelassen. Die Lösung wird auf 10 ml konzentriert und auf eine Säule von 230 ml XAD-2 Harz gegeben. Die Säule wird mit Wasser eluiert und die Fraktionen werden überwacht durch UV-Absorption und Messung des Refraktionsindex. Die korrekten Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet, wobei man das gewünschte Produkt erhält: (75 mg, UV $\lambda_{\max}$ 302 nm E% 89).

Die Elektrophorese einer Probe (bei 50 V/cm, pH 7, 20 Minuten) zeigt eine bio-aktive Zone, die sich 9 cm in Richtung zur Anode bewegt.

Beispiel 24

Herstellung von N-o-Nitrobenzolsulfonylthienamycin



Zu einer gekühlten Lösung von Thienamycin (2,4 mg) in 1,5 ml 0,05m, pH 7, Phosphatpuffer und 0,75 ml Dioxan wird eine Lösung aus o-Nitrobenzolsulfonylchlorid (10 mg) in 0,75 ml Dioxan gegeben. Der pH wird durch Zugabe von 0,1n Natriumhy-

droxid auf 8,2 gehalten. Nach 10 Minuten wird die Lösung mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure auf pH 7 eingestellt und dreimal mit Äther extrahiert. Die wässrige Lösung wird gefriergetrocknet, wobei man das Natriumsalz von N-o-Nitrobenzolsulfonylthienamycin erhält.

Elektrophorese bei 50 V/cm, pH 7, während 20 Minuten und anschließende Bioautographie zeigt eine einzelne Inhibitionszone bei 2,5 cm in Richtung zur Anode.

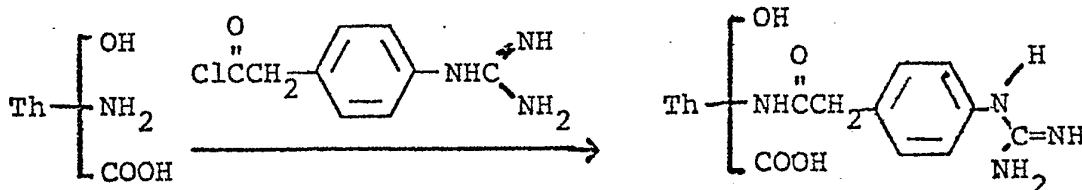
10 Beispiel 25

Herstellung von p-Brombenzoylthienamycin

Thienamycin (45,6 mg) wird in einer Mischung aus 0,05m pH 7 Phosphatpuffer (4 ml) und Dioxan (2 ml) gelöst und die Lösung wird mit 0,2n NaOH in 1:1 Dioxan-Wasser auf den pH 8,2 gebracht. Die Lösung wird auf -8 °C gekühlt und während 3 Minuten wird p-Brombenzoylchlorid (45 mg) in Dioxan (2 ml) gegeben. Durch Zugabe von 0,2n NaOH wird der pH zwischen 7,6 und 8,4 für weitere 10 Minuten gehalten. Die Lösung wird auf pH 7 neutralisiert und dreimal mit 8-ml-Anteilen Äther extrahiert. Die wässrige Phase wird gefriergetrocknet, wobei man das Natriumsalz von N-p-Brombenzoylthienamycin UV $\lambda_{\max}$ 303 nm, 866 ODU, erhält. Elektrophorese bei 50 V/cm, pH 7, während 20 Minuten und anschließende Bioautographie zeigt eine Inhibitionszone von 22 mm Durchmesser bei -0,5 cm entsprechend Thienamycin und von 41 mm Durchmesser bei +2,5 cm entsprechend der in der Überschrift genannten Verbindung.

Beispiel 26

Herstellung von N-p-Guanidinophenylacetylthienamycin



Thienamycin (60 mg) wird in einem pH 7,0 Phosphatpuffer (0,05n, 6 ml) gelöst und gründlich auf einem Eisbad gekühlt. Die Lösung wird dann auf den pH 8,3 unter Verwendung einer Ausgabe-Autoburette mit 1,0n NaOH eingestellt. Zu der gerührten Lösung wird in verschiedenen Anteilen p-Guanidinophenylacetylchlorid-hydrochlorid (64 mg, 259 μ Mol) gegeben, wobei durch die Autoburette der pH nahe 8,3 gehalten wird. Nach wenigen Minuten wird die Reaktionslösung angesäuert (10%ige H_3PO_4 -Lösung) auf pH 7,0 und auf 60 g XAD-2 Harz chromatographiert. Die Säule wird mit Wasser eluiert und dann mit einer 10%igen wässrigen Tetrahydrofuranlösung, welche das Produkt eluiert. Die Produktfraktionen werden vereint und gefriergetrocknet, wobei man einen weissen, lockeren Feststoff erhält (45 mg, $\lambda_{\max}$ 301 nm (ϵ 7020)). Das Produkt hat eine elektrophoretische Mobilität von 2,5 cm in Richtung zur Anode bei 50 V/cm für 25 Minuten. Das KMR stimmt überein mit dem für das Produkt erwarteten. Das IR (Nujol mull) zeigt eine Bande bei 1775 cm^{-1} (β -Lactam).

Beispiel 27

Herstellung von N-Pyridiniumacetylthienamycin

Eine Mischung von 10 mg N-Bromacetylthienamycin-Natriumsalz und 0,5 ml Pyridin in 1 ml HMPA wird bei 25 °C 4 Stunden gerührt. Das überschüssige Pyridin wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand wird in 3 ml Wasser aufgenommen und auf eine Säule von 20 ml eines XAD-2 Harzes gegeben. Nach dem Eluieren mit Wasser wird das Produkt mit 10%igem wässrigem THF eluiert. Die Lösung hat eine optische

40

Dichte von 93 bei $\lambda_{\max}$ 261 nm und 71 bei $\lambda_{\max}$ 297 nm. Elektrophorese und Bioautographie zeigen eine grössere Inhibitionszone bei -1 cm, entsprechend dem gewünschten Produkt N-Pyridiniumacetylthienamycin.

Beispiel 28

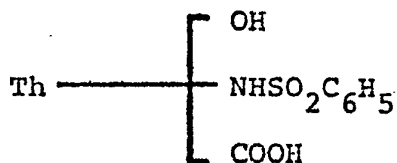
Herstellung von N-Carbomethoxythienamycin

Thienamycin (49 mg) wird in 0,05m pH 7,0 Phosphatpuffer (14 ml) gelöst und auf einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wird der pH unter Verwendung einer automatischen Burette auf 8,2 eingestellt. Eine Lösung von Methylchlorformat (46 μ l), 600 μ Mol in p-Dioxan (580 μ l) wird auf einmal hinzugegeben, wobei man eine homogene Lösung erhält. Anschliessend wird der pH unter Verwendung einer automatischen Burette auf 8,2 gehalten. Nach 10 Minuten wird die Lösung auf einen pH von 7,0 eingestellt unter Verwendung von verdünnter Phosphorsäurelösung und man wäscht dreimal mit gleichen Volumina Diäthyläther. Die wässrige Lösung wird dann auf 4,5 ml konzentriert und auf einer XAD-2 Harzsäule chromatographiert. Das mit einer wässrigen 5%igen Tetrahydrofuranlösung (nach einer Wasser-Eluierung) eluierte Produkt wird gefriergetrocknet, wobei man 28,9 mg des Produkts erhält.

UV (pH 7,0 Phosphatpuffer 0,1n) $\lambda_{\max}$ 303 nm (ϵ 6450) Elektrophorese (20 Minuten, 0,1n pH 7,0 Phosphatpuffer 50 V/cm) Mobilität 3,5 cm in Richtung zur Kathode.

Beispiel 29

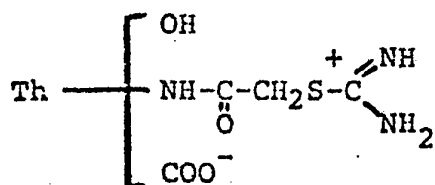
Herstellung von N-Benzolsulfonylthienamycin



Thienamycin (52 mg) wird in pH 7,01n Phosphatpuffer (25 ml) gelöst und auf einem Eisbad magnetisch gerührt. Der pH wird auf 8,2 mit 2,5n NaOH eingestellt unter Verwendung einer automatischen Ausgabeburette und dazu wird auf einmal Benzolsulfonylchlorid (227 µl, 226 µMol) in 500 ml p-Dioxan gegeben. Der pH wird unter Verwendung der automatischen Burette 30 Minuten auf 8,2 gehalten und dann unter Verwendung von wässriger, verdünnter Phosphorsäure auf den pH 7,0 eingestellt. Die Reaktionslösung wird auf 15 ml konzentriert und über einem XAD-2 Harz (50 cm³) chromatographiert. Die Säule wird mit Wasser eluiert und anschliessend wird das Produkt mit 10%igem wässrigem Tetrahydrofuran eluiert. Das 10%ige wässrige Tetrahydrofuran eluat wird auf ein Drittel seines Volumens konzentriert und gefriergetrocknet, wobei man 28 mg erhält. Die elektrophoretische Mobilität des Produktes (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7, 0,05n Phosphatpuffer) beträgt 3,5 cm in Richtung zur Kathode. λ_{max} 303 (ϵ 3650) in pH 7 0,1n Phosphatpuffer.

Beispiel 30

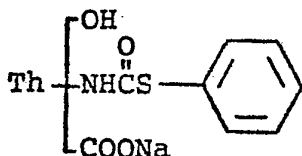
Herstellung von N-Guanylthioacetylthienamycin



Eine Lösung aus 90 mg Natrium-N-bromacetylthienamycin in 40 ml Wasser wird auf pH 6 eingestellt und dazu werden 36 mg Thioharnstoff gegeben. Die Lösung wird 5 Tage auf 4 °C gehalten. Die Lösung wird über 80 ml eines XAD-2 Harzes chromatographiert. Durch Eluieren mit 400 ml Wasser wird der Thioharnstoff entfernt und eine geringe Menge des Ausgangs-Bromacetylderivats und Thienamycins. Beim Eluieren mit 120 ml 10%igem Tetrahydrofuran erhält man eine Lösung, welche das N-Guanylthioacetylderivat des Thienamycins enthält. Durch eine hochdruckflüssigkeits-chromatographische Analyse über Bondapak C18 Porasil mit 10%igem THF Lösungsmittel stellt man einen grösseren Peak von mehr als 90%iger Reinheit fest. Die Lösung wird auf 15 ml eingedampft (pH 5,5) und gefriergetrocknet. Ausbeute: 40 mg eines weissen Pulvers. UV λ_{max} 299 E% 173.

Beispiel 31

Herstellung des Natriumsalzes von Thienamycin-N-(S-phenyl-carbothioat)



Zu Thienamycin (37 mg, 0,14 mMol) in 24 ml 1:1 Dioxan-H₂O bei 0 °C gibt man unter Rühren 150 mg (1,78 mMol, 12 Äquivalente) NaHCO₃ und dann tropfenweise unter Rühren während 4 Minuten 1,5 Äquivalente (39 mg, 0,22 mMol) Phenylchlorthioformat in 0,6 ml Dioxan. Nach 15 Minuten wird der pH mit

wässriger 25%iger H₃PO₄ auf 5,9 eingestellt und die Lösung wird mit Äther extrahiert. Die wässrige Schicht wird nach Entfernung von jeglichem eingeschlossenem Äther im Vakuum auf den pH 2,5 bei 0 °C gebracht und mit Äthylacetat extrahiert.

Die Äthylextrakte werden vereint und schnell mit kalter Salzlösung gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mit Wasser zurückextrahiert, enthaltend 1,5 Äquivalente NaOH bis zu einem End-pH von 6,8. Die wässrige Schicht wird im Vakuum von jeglichem Äthylacetat befreit und gefriergetrocknet. Die wässrige Lösung enthält 486 ODU bei 302 nm (UV-Analyse in H₂O bei pH 7,0), welche nach einstündiger Behandlung mit Hydroxylamin zu 95% ausgelöscht werden. Die Ausbeute beträgt 17,7 mg (29%). Elektrophorese (50 V/cm während 18 Minuten, pH 7,0 wässriges Phosphat, 0,05 m) zeigt einen Spot durch Bioautographie 3,6 cm in Richtung zur Anode.

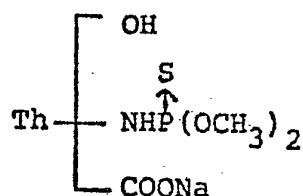
Beispiel 32

Herstellung des Natriumsalzes von Thienamycin-N-(O-phenyl-carbothioat)

Zu Thienamycin (46,5 mg, 0,17 mMol) in 26 ml 1:1 Dioxan-H₂O bei 0 °C werden unter Rühren 220 mg (2,62 mMol, 15 Äquivalente) NaHCO₃ gegeben und dann während 4 Minuten tropfenweise 1,5 Äquivalente Phenoxythiocarbonylchlorid in 0,6 ml Dioxan. Nach 8 Minuten wird der pH auf 7,0 eingestellt und dann wird die Lösung mit Äther extrahiert. Die wässrige Schicht wird nach Entfernung jeglichen anhaftenden Äthers im Vakuum auf den pH 2,5 bis 0 °C gebracht und mit Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte werden vereint, schnell mit kaltem Salzwasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und zurückextrahiert mit Wasser, enthaltend 1,5 Äquivalente 0,1m NaOH bis zu einem pH von 6,8. Die wässrige Schicht wird von jeglichem Äthylacetat im Vakuum befreit und gefriergetrocknet. Die wässrige Lösung enthält 572 ODU bei 302 nm (UV-Analyse in H₂O bei pH 7,0), welche nach einstündiger Behandlung mit Hydroxylamin zu 95% ausgelöscht werden. Die Ausbeute beträgt 19 mg (26% der Theorie). Elektrophorese (50 V/cm während 18 Minuten; pH 7 wässriges Phosphat, 0,05m) zeigt einen Spot durch Bioautographie 3,3 cm in Richtung zur Anode.

Beispiel 33

Herstellung des Natriumsalzes von N-(Dimethoxyphosphinothioyl)-thienamycin

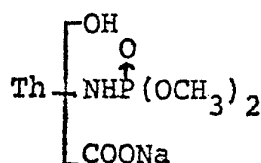


Zu dem Trimethylsilylderivat Th(TMS)₃, hergestellt aus 214 mg Thienamycin in 25 ml trockenem THF, werden 227 mg Dimethylphosphorchloridthionat in 2 ml THF gegeben und anschliessend 0,18 ml (130 mg) Triäthylamin. Nach Rühren unter Stickstoff für annähernd 2 Stunden wird der Inhalt zu einem viskosen Rückstand im Vakuum konzentriert. Der pastöse Rückstand wird in 40 ml Äthylacetat, enthaltend 5 ml enionisiertes Wasser, suspendiert und mit verdünnter wässriger Phosphorsäure auf den pH 3,5 gebracht und 10 Minuten gerührt. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und mit zweimal 20 ml Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte werden vereint, schnell getrocknet mit wasserfreiem Magnesiumsulfat und filtriert. Zu dem kalten Äthylacetatextrakt werden 20 ml Wasser gegeben und der pH wird mit verdünnter NaOH auf 7 eingestellt. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und im Vakuum auf

ein kleineres Volumen (7 ml) konzentriert und auf eine 35×4 cm Säule, enthaltend 500 ml XAD-2 Harz, gegeben. Die Säule wird mit Wasser eluiert und anschliessend mit 6%igem wässrigen THF und schliesslich mit 10%igem wässrigem THF. Die mit 10%igem THF eluierte Fraktion (Röhrchen 99–150, 14 ml/Röhrchen) hat ein $\lambda_{\max}$ 304 nm und enthält das gewünschte Produkt. Elektrophorese (50 V/cm, 16 Minuten bei pH 7, wässriges Phosphat, 0,05m) zeigt nur durch Bioautographie eine Zone (MB-108 Staph. aureus) 3 cm in Richtung zur Anode. Gefriertrocknung ergibt 39 mg (10,5% Ausbeute) des Natriumsalzes von N-(Dimethoxyphosphinothioyl)-thienamycin. KMR (δ D₂O), 4,0 (d, J = 10 Hz · P-OCH₃).

Beispiel 34

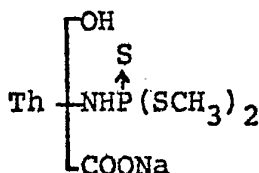
Herstellung des Natriumsalzes von N-(Dimethoxyphosphinyl)-thienamycin



Zu dem Trimethylsilylderivat Th(TMS)₃, hergestellt aus 93 mg Thienamycin in 2 ml trockenem THF, werden 88 mg Dimethylphosphorchlorid in zwei Portionen gegeben und anschliessend 45 g (0,06 ml) Triäthylamin. Nach heftigem Rühren während einer Stunde wird der Inhalt zu einem viskosen Rückstand im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wird in 10 ml Äthylacetat suspendiert und 3 ml eines pH 3 Phosphatpuffers werden zugegeben und das Ganze wird 10 Minuten geführt. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und mit zweimal 3 ml Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte werden vereint, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Zu dem kalten Äthylacetatextrakt gibt man 6 ml H₂O und bringt den pH mit verdünnter NaOH auf 7. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und im Vakuum konzentriert, wobei man 18 mg (13%ige Ausbeute) des Natriumsalzes von N-(Dimethoxyphosphinyl)-thienamycin erhält; $\lambda_{\max}$ 303 nm; Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7 wässriges Phosphat, 0,05m) zeigt eine Zone 3,2 in Richtung zur Anode (Bioautographie MB-108 Staph. aureus). KMR (δ D₂O) ~ 4,0 (d 5 = 10 Hz POCH₃)

Beispiel 35

Herstellung des Natriumsalzes von N-(Bis-(methylthio)-phosphinothioyl)-thienamycin

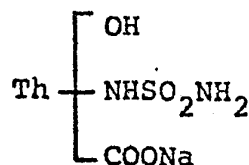


Zu dem Trimethylsilylderivat Th(TMS)₃, hergestellt aus 213 mg Thienamycin in 20 ml trockenem THF, werden 300 mg Dimethylphosphorchloridotrithioat in 2 ml THF gegeben und anschliessend 0,18 ml (130 mg) Triäthylamin. Nach 3stündigem

Rühren unter trockenem Stickstoff wird der Inhalt im Vakuum zu einem viskosen Rückstand konzentriert. Der pastöse Rückstand wird in 25 ml Äthylacetat, enthaltend 5 ml H₂O, suspendiert und der pH wird mit verdünnter wässriger Phosphorsäure auf 3,5 gebracht und das Ganze wird 10 Minuten gerührt. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und mit zweimal 10 ml Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte werden zusammen mit wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und filtriert. Zu dem kalten Äthylacetatextrakt gibt man 5 ml H₂O und bringt den pH mit verdünnter NaOH auf 7. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und im Vakuum auf ein kleineres Volumen (7 ml) konzentriert und auf eine 30×3 cm Säule, enthaltend 150 ml XAD-2 Harz, gegeben. Die Säule wird mit H₂O gewaschen und anschliessend mit wässrigem 9%igem THF, welches das Produkt, nämlich das Natriumsalz von N-(Bis-(methylthio)-phosphinothioyl)-thienamycin entfernt ($\lambda_{\max}$ 306 nm), das gefriertrocknet wird, wobei man 69 mg eines gelb-hell-orangen Feststoffes (19,6%) erhält. Bei der Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7 wässriges Phosphat, 0,05m) stellt man nur eine Zone fest 3 cm in Richtung zur Anode (Bioautographie MB 108 Staph. aureus).

Beispiel 36

Herstellung des Natriumsalzes von N-Sulfamoyl-thienamycin

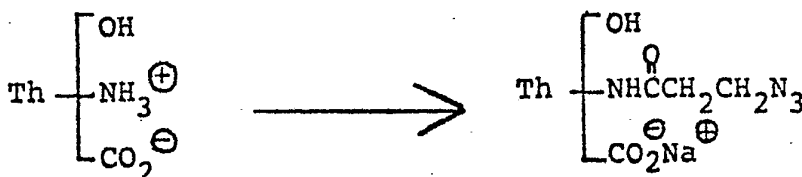


Zu dem Trimethylsilylderivat Th(TMS)₃, hergestellt aus 210 mg Thienamycin in 10 ml THF, werden 223 mg Sulfamoylchlorid in 5 ml THF gegeben und anschliessend 0,25 ml (180 mg) Triäthylamin. Nach Rühren unter trockenem Stickstoff während 2 Stunden wird die Mischung zu einem viskosen Rückstand im Vakuum konzentriert. Der pastöse Rückstand wird in 50 ml Äthylacetat, enthaltend 5 ml H₂O, suspendiert und der pH wird auf 3,5 gebracht und das Ganze wird 10 Minuten gerührt. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und einmal mit 10 l Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatextrakte werden zusammen getrocknet mit wasserfreiem MgSO₄ und filtriert. Zu dem kalten Äthylacetatextrakt gibt man 18 ml H₂O und stellt den pH mit verdünnter NaOH auf 7,0 ein. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und im Vakuum auf ein kleineres Volumen eingeeengt und auf eine 33×4 cm Säule, enthaltend 500 ml XAD-2 Harz, gegeben. Die Säule wird mit H₂O eluiert, wobei man N-Sulfamoylthienamycin-Natriumsalz erhält. $\lambda_{\max}$ 303 nm. Elektrophorese (50 V/cm, 20 Minuten, pH 7 wässriger Phosphatpuffer 0,05m) zeigt eine Zone 3,2 cm in Richtung der Anode (Bioautographie MB-108 Staph. aureus). Gefriertrocknung der obengenannten Lösung ergibt 90 mg (41%) des Natriumsalzes von N-Sulfamoylthienamycin als gelben Feststoff.

IR Nujol β -Lactam C = 0 1750 Schulter 1770 (5,61 + 5,65 μ) und 1150 cm⁻¹ (8,65 μ) für HN-SO₂NH₂.

Beispiel 37

Herstellung von N-(β -Azidopropionyl)-thienamycin

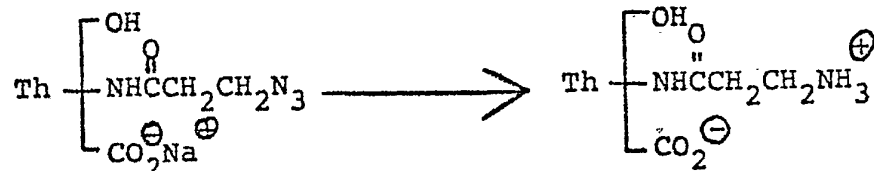


Thienamycin (184 mg) wird in 30 ml Wasser gelöst und auf 0 °C gehalten. Zu der Lösung gibt man 0,52 g NaHCO₃, 30 ml Dioxan und 163 mg β-Azidopropionylchlorid. Die Mischung wird 15 Minuten gerührt und dann mit 30%iger H₃PO₄ neutralisiert und mit Äther extrahiert. Die wässrige Schicht wird abgetrennt und auf 5 ml konzentriert. Das rohe Produkt wird chromatographiert über eine Dowex 50 W×8 (Natrium-Form) Ionenaustauschsäule (1"×10"). Die Kolonne wird eluiert mit H₂O,

wobei man 81 mg des gewünschten Produktes erhält, das eine UV-Absorption bei $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ von 306 nm zeigt. Elektrophorese des Produktes bei 2 KV in 0,1m pH 7,0 Phosphatpuffer während 2 Stunden zeigt eine einzelnen bio-aktive Zone, die sich 30 mm in Richtung der Anode bewegt.

Beispiel 38

Herstellung von N-(β -Alanyl)-thienamycin



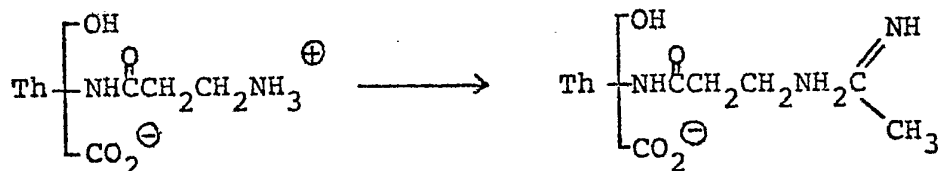
Die wässrige Lösung von N-(β -Azidopropionyl)-thienamycin (40 mg in 20 ml Wasser) wird unter 1 Atmosphäre Wasserstoff und in Gegenwart von 200 mg Palladium 40 Minuten bei 25 °C hydriert. Die erhaltene Lösung (pH 9,0) wird mit 30%iger H_3PO_4 neutralisiert und vom Katalysator abfiltriert. Die Mischung wird über einer Dowex 50 W $\times$ 8 (Natrium-Form) Ionenaustauschsäule (1" $\times$ 10") chromatographiert und die

Säule wird eluiert mit Wasser, wobei man 20 mg des gewünschten Produktes erhält, welches ein UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ von 302 nm zeigt. Die Elektrophorese des Produktes bei 2 KV in 0,1m pH 7,0 20 Phosphatpuffer während 20 Minuten zeigt eine einzelne bioaktive Zone, die sich 10 mm in Richtung zur Kathode bewegt.

Beispiel 39

Beispiel 59

Herstellung von N-(N'-Acetimido-yl-β-alanyl)-thienamycin



Die wässrige Lösung von N-(β -Alanyl)-thienamycin (125 mg in 15 ml Wasser) wird bei 0 °C gehalten und man hält einen pH von 8,5 aufrecht, indem man 2,5n NaOH zugibt während O-Äthylacetimidat-hydrochlorid (350 mg) während eines Zeitraumes von 10 Minuten portionsweise zu der Lösung gegeben wird. Die Mischung wird 1 Stunde gerührt und dann mit 2,5n HCl neutralisiert und auf 15 ml konzentriert. Das so erhaltene Rohprodukt wird zweimal über eine Dowex 50W $\times$ 8 (Natrium-Form) Säule (1" $\times$ 10") chromatographiert, wobei man 25 mg erhält. Das Produkt wird mit Wasser eluiert und die Lösung gefriergetrocknet. Beim Kristallisieren des Produktes aus Wasser erhält man einen kristallinen Feststoff, welcher ein IR-Spektrum (Nujol mull) wie folgt zeigt: 1769 cm⁻¹ (β -Lactam); KMR (D_2O , 100 MHz): 2,20 ppm (s, Acetimidoyl CH₃);

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 302 nm. Elektrophorese des Produktes bei 2 KV in 0,1m pH 7,0 Phosphatpuffer während 20 Minuten zeigt eine einzige bio-aktive Zone, die sich 10 mm in Richtung zur Kathode bewegt.

Beispiel 40

Arbeitet man nach den Verfahren, wie sie in den Beispielen 37, 38 und 39 beschrieben worden sind, mit der Ausnahme, dass 1.) O-Äthylacetimidhydrochlorid ersetzt wird durch eine

äquivalente Menge von O-Methylformimidathydrochlorid in
Beispiel 39;

35 2.) β -Azidopropionylchlorid ersetzt wird durch eine äquivalente Menge von Azidoacetylchlorid in Beispiel 37;

3.) N-(β -Azidopropionyl)-thienamycin ersetzt wird durch eine äquivalente Menge von N-(Azidoacetyl)-thienamycin in Beispiel 38;

40 4.) N-(β -Alanyl)-thienamycin ersetzt wird durch eine äquivalente Menge von N-Glycylthienamycin in Beispiel 39;

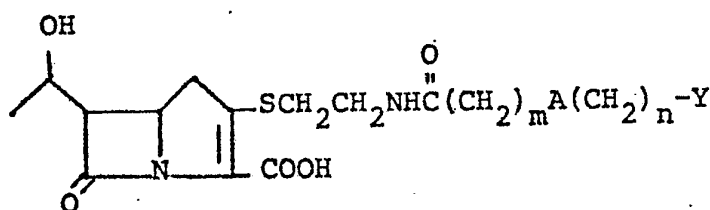
5.) O-Äthylacetimidat-Hydrochlorid ersetzt wird durch eine äquivalente Menge an O-Methylformimidat-Hydrochlorid und N-(β -Alanyl)-thienamycin ersetzt wird durch N-Glycylthienamycin in Beispiel 39;

6.) O-Äthylacetimidhydrochlorid ersetzt wird durch eine äquivalente Menge von Methylsulfat in Beispiel 39;

7.) O-Äthylacetimidathydrochlorid ersetzt wird durch eine äquivalente Menge Methylsulfat und N-(β-Alanyl)-thienamycin 50 ersetzt wird durch N-Glycylthienamycin in Beispiel 39 und

8.) N-(β -Azidopropionyl)-thienamycin ersetzt wird durch eine äquivalente Menge von N-(2-Azidoäthoxycarbonyl)-thienamycin in Beispiel 38,

so erhält man die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Verbindungen:



Verbindung	m	n	A	Y
1.)	1	1	-	$\begin{array}{c} \oplus \text{ NH} \\ -\text{NH}_2 \text{ C}-\text{H} \end{array}$
2.)	1	0	-	$-\text{N}_3$
3.)	1	0	-	$\begin{array}{c} \oplus \\ -\text{NH}_3 \end{array}$
4.)	1	0	-	$\begin{array}{c} \oplus \text{ NH} \\ -\text{NH}_2 \text{ C}-\text{CH}_3 \end{array}$
5.)	1	0	-	$\begin{array}{c} \oplus \text{ NH} \\ -\text{NH}_2 \text{ C}-\text{H} \end{array}$
6.)	1	0	-	$\begin{array}{c} \oplus \\ -\text{N}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$
7.)	1	0	-	$\begin{array}{c} \oplus \\ -\text{N}(\text{CH}_3)_3 \end{array}$
8.)	0	2	Sauerstoff	$\begin{array}{c} \oplus \\ -\text{NH}_3 \end{array}$

Beispiel 41

Herstellung des Natriumsalzes von N-Phenoxyacetylthienamycin

Zu einem 250-ml-Kolben, enthaltend Thienamycin (190 mg),⁴⁰ werden 30 ml Wasser, 0,6 g Natriumbicarbonat und 30 ml Dioxan gegeben. Während man die Mischung rührt und auf 0 °C hält, wird dazu dem Kolben während eines Zeitraumes von 10 Minuten Phenoxyacetylchlorid (170 mg) gegeben. Die Lösung wird weitere 10 Minuten gerührt und dann mit 30%iger Phosphorsäure auf pH 4,5 angesäuert. Die angesäuerte Lösung wird schnell extrahiert mit 50 ml Äther, um überschüssiges Reagenz zu entfernen und dessen hydrolysiertes Produkt Phenoxyessigsäure. Die wässrige Schicht, die so erhalten wurde, wird weiter angesäuert mit 30%iger Phosphorsäure auf pH 2,0 und mit 50 ml Äthylacetat extrahiert. Die organische Schicht, welche die freie Säure von N-Phenoxyacetylthienamycin enthält, wird abgetrennt und rückextrahiert mit 30 ml einer wässrigen Lösung, enthaltend 60 mg Natriumbicarbonat. Die wässrige Schicht wird gefriergetrocknet, wobei man 120 mg des Natriumsalzes von N-Phenoxyacetylthienamycin erhält. Die Elektrophorese (0,5m, pH 7,0, Phosphatpuffer, 2 KV während 20 Minuten): Eine einzelne bio-aktive Zone, die sich 45 mm in Richtung zur Anode bewegt. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 302 nm.

Beispiel 42

N-β-Guanidinopropionylthienamycin

Stufe A:

β-Guanidinopropionylchlorid-hydrofluorid

β-Guanidinopropionsäure (130 mg) werden in Portionen zu 65 1 ml Thionylchlorid in einem zentrifugierten Röhrchen unter Stickstoff gegeben. Die pastöse Reaktionsmischung wird mit einem Gasstab gerieben, bis sie zu kristallisieren beginnt. Das

überschüssige Thionylchlorid wird in einem Stickstoffstrom abgedampft, wobei ein fester Rückstand von β-Guanidinopropionylchlorid-hydrochlorid zurückbleibt.

$\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{IR } 5,6 \mu \text{ } (-\text{C}=\text{Cl}); \text{ breites Band } 6-6,3 \mu \text{ (Guanidino).} \end{array}$

Stufe B:

Thienamycin (54 mg) wird in 1 ml wasserfreiem Dimethylformamid suspendiert. Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt und β-Guanidinopropionylchlorid-hydrochlorid (37 mg) wird unter Rühren zugegeben und unmittelbar daran eine Lösung aus 25,8 mg Diisopropyläthylamin in 0,1 ml DMF. Nach weiteren 5 50 Minuten wird das Produkt mit Äther niedergeschlagen. Der Äther wird dekantiert und der Rückstand wird mit 2 ml Wasser gelöst, mit Natriumbicarbonat auf pH 6,8 eingestellt und über 75 ml eines XAD-2 Harzes chromatographiert. Nach Eluieren mit Wasser wird das Produkt mit 10%igem wässrigem THF 55 eluiert, konzentriert und gefriergetrocknet. UV λ_{max} 303 mμ E% 157. Elektrophorese (1 Stunde, 50 V/cm, pH 7) zeigt einen einzelnen bioaktiven Spot, der sich 4,5 cm in Richtung zur Kathode bewegt und der einen positiven Sakaguchi-Farbstest ergibt.

60

Beispiel 43

Herstellung von N-Guanylcabamoylthienamycin

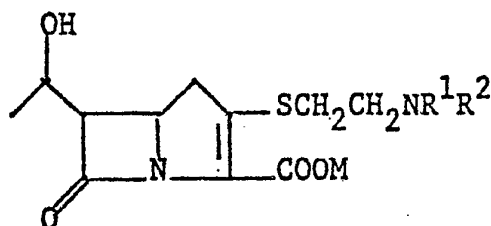
Thienamycin (253 mg) wird in 0,1n pH 7 Phosphatpuffer (11 ml) gelöst, auf einem Eisbad gekühlt und unter Verwendung von 1n NaOH, die aus einer Autoburette ausgegeben wird, auf einen pH von 8,5 eingestellt. Zu dieser Lösung wird eine kalte Lösung (2,5 ml) von 1-Amidino-semicarbaziddihydrochlorid (354 mg) und Natriumnitrit (128 mg) gegeben. Der pH steigt auf

9,0 und nach 10 Minuten wird der pH eingestellt und aufrechterhalten auf 8,2. Nach 30 Minuten bildet sich ein Niederschlag und der pH wird unter Verwendung von 1n HCl auf 7,0 eingestellt. Die Mischung wird filtriert und das Filtrat chromatographiert über einer Säule eines XAD-2 Harzes (120 ml), die mit Wasser und anschliessend mit wässrigem 10%igem Tetrahydrofuran eluiert wird. Das N-Guanylcarbamoylethienamycin-Derivat eluiert in wässrigem Tetrahydrofuran und wird gefriertrocknet zu einem Feststoff. UV (pH 7 0,1n Phosphatpuffer) $\lambda_{\max}$ 298 nm (ϵ 5500) HPLC C_{18} Bondapak, wässriges 10%iges

Tetrahydrofuran) Retentionszeit 2,0fache der von Thienamycin. Elektrophoretische Beweglichkeit (40 V/cm, pH 7 0,1n Phosphatpuffer, 20 Minuten) beträgt 2 cm in Richtung zur Anode.

Beispiel 44

Arbeitet man nach den vorhergehenden Beispielen und Beschreibungen, so werden die nachfolgend definierten Verbindungen erhalten:



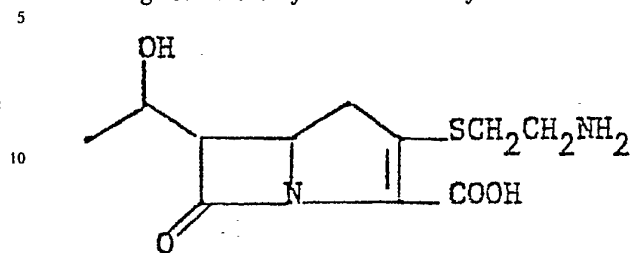
Verbindung	M	R ¹	R ²
1.)	Na	H	$\begin{array}{c} \text{---C---CH=CH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$
2.)	Na	H	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_2\text{O---C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{O} \end{array}$
3.)	Na	H	$\begin{array}{c} \text{---C---NH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$
4.)	H	H	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C---CH}_2\text{N---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$
5.)	H	H	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_2\text{N(CH}_3)_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$
6.)	H	H	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{---C---CH}_2\text{---N---C---NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \text{N} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$
7.)	Na	H	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_2\text{---S---CH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$
8.)	Na	H	$\begin{array}{c} \text{---C---CH(-OCH}_3)_2 \\ \\ \text{O} \end{array}$
9.)	Na	H	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$

Bevorzugte Herstellung von alternativen Ausgangsmaterialien:

Ausser Thienamycin ist es für den Fachmann ersichtlich, dass dessen verschiedene Isomere allein oder als Mischungen als Ausgangsstoffe bei der Herstellung der erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen verwendet werden können. Einige dieser Isomeren sind beispielsweise aus natürlichen Produkten der Fermentation erhältlich (siehe unten). Durch Totalsynthese werden jedoch alle Isomere erhältlich (siehe unten) in Form einer Mischung von 4 Diastereoisomeren, welche bakterizide Aktivität aufweisen und die nach üblichen technischen Verfahren aufgetrennt werden können. Die 4 Diastereoisomere (2 cis, 2 trans) können chromatographisch getrennt werden. Die Auftrennung von jeweils einem gegebenen d/l-Paar mit optisch aktiven Säuren oder Basen läuft z. B. nach üblichen Verfahren ab. Dabei soll festgehalten werden, dass die absolute Konfigu-

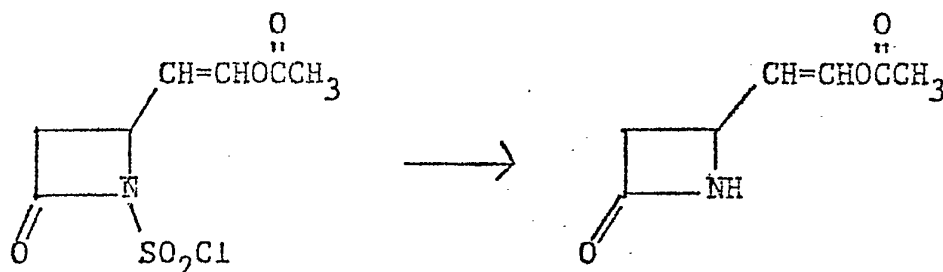
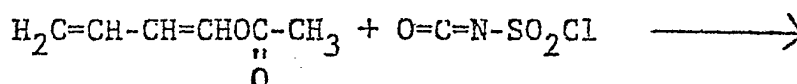
ration des zuerst identifizierten Ausgangsmaterials (I) 5R 6S 8R ist.

Herstellung von Thienamycin durch Totalsynthese



15 Stufe A:

Herstellung von 4-(2-Acetoxyvinyl)-azetidin-2-on



Eine Lösung aus 1,0 ml destilliertem Chlorsulfonylisocyanat (1,65 g, 11,7 mMol) in 2,5 ml wasserfreiem Diäthyläther wird unter N₂ in einem Bad von -20 °C gekühlt.

Eine Lösung von 2,5 g L-Acetoxybutadien (22 mMol) in 2,5 ml wasserfreiem Äther wird ähnlich gekühlt unter Stickstoff in einem -20 °C Bad.

Die Chlorsulfonylisocyanatlösung wird tropfenweise zu der Acetoxybutadienlösung hinzugegeben mittels eines in die CSI-Lösung eintauchenden Polytetrafluoräthylenrohres und wird mit N₂ unter Druck gesetzt. Die Zugabe dauert 10 Minuten. Wenig oder keine Farbe ist erkennbar und die Reaktion wird 0,5 Stunden bei -20 °C gerührt. Die Lösung ist klar und hat eine hellgelbe Farbe.

Eine Lösung aus 2 g Natriumsulfit und 5 g K₂HPO₄ in 20 ml H₂O wird hergestellt während der vorerwähnten 0,5 Stunden Reaktionszeit und auf einem Eisbad gekühlt; 20 ml Äther werden zu der Mischung unter heftigem Rühren auf einem Eisbad hinzugegeben. Nach Ende der 30minütigen Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch, wiederum unter Anwendung von N₂-Druck und einem Polytetrafluoräthylenrohr aus dem Reaktionskolben, der in einem Bad von -20 °C gehalten wird, zu der heftig gerührten Hydrolysemischung überführt. Die schnelle, tropfenweise Zugabe ist nach 5 Minuten beendet. Man lässt die Hydrolyse weitere 5 Minuten stattfinden. Die Hydrolysemischung hat einen pH von 6-8, vorzugsweise pH 8.

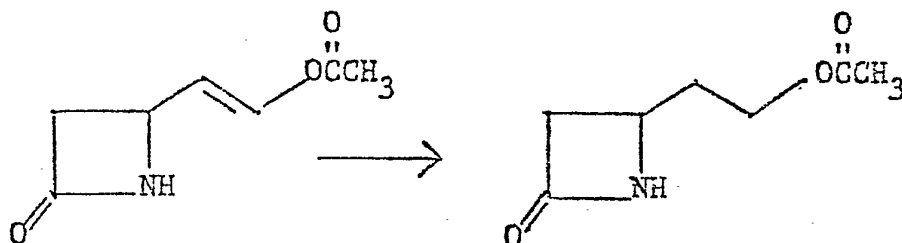
Die Phasen werden getrennt, wobei ein gelb-oranges Harz in der wässrigen Phase verbleibt. Die Ätherphase wird direkt über MgSO₄ getrocknet. Die wässrige Harzphase wird dreimal mit 50-ml-Anteilen Äther extrahiert, wobei jeder Anteil zu der Ausgangs-Äther/MgSO₄-Mischung gegeben wird.

Die getrockneten Extrakte werden filtriert und unter einem N₂-Strom auf 5 ml konzentriert; ein Teil des Produktes ist kristallisiert in diesem Stadium.

Man stellt eine Säule aus 10 g Baker-Kieselgel, gepackt in Äther, her und das Ätherkonzentrat wird obenauf gegeben und durchlaufen gelassen. Der im Kolben enthaltene Rückstand wird dreimal mit 2 ml Äther gespült, jedesmal abpipettiert und auf die Säule gegeben. Dann wird mit Äther eluiert. Die ersten 25 ml sind hauptsächlich Leervolumen. Die nächsten 5 10-ml-Fractionen werden gesammelt und anschliessend daran 3 50-ml-Fractionen und alle werden unter einem N₂-Strom im Volumen vermindert. Das Produkt kristallisiert aus den Fraktionen 4 bis 6 mit Spuren in 3 und 7. Die Fraktionen 1 bis 3 enthalten ein gelbliches, scharf-riechendes Material, das beim Stehen harzförmig wird. Ausbeute: 100 mg als Mischung aus den cis- und trans-Isomeren.

Stufe B:

Herstellung von 4-(2-Acetoxyäthyl)-2-acetidinon

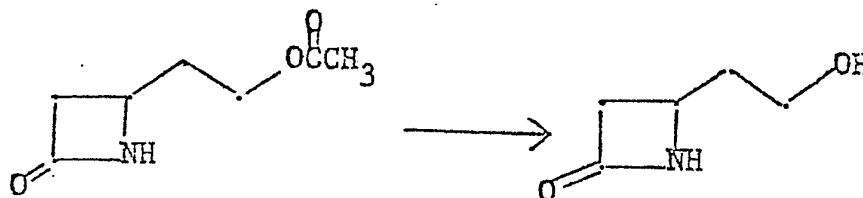


Eine Lösung von 4-(2-Acetoxyvinyl)-2-azetidinon (10,0 g, 0,065 Mol) in 200 ml Äthylacetat, enthaltend 100 mg eines 10% Palladium/C-Katalysators, wird in einem Parr-Schüttler hydriert bei 25 °C unter einem Druck von 2,8 kg/cm² im Laufe von 15 Minuten. Die Mischung wird durch ein Bett aus Supercel filtriert und mit zusätzlichem Äthylacetat gewaschen. Das vereinte Filtrat wird im Vakuum gewaschen, wobei man als kristallinen Feststoff 4-(2-Acetoxyäthyl)-2-azetidinon (10,0 g) erhält. Beim Umkristallisieren aus Äther erhält man weisse Kristalle: F. 44 bis 47 °C; IR (CHCl₃) μ 5,66, 5,74; KMR (CDCl₃) τ

3,44 (breites s, 1, NH), 5,82 (m, 2, CH₂OCOCH₃), 6,29 (m, 1, C-4H, 6,87 (½ AB Muster wird weiterhin vierfach aufgeteilt durch C-4H und NH, 1, J_{gem} = 12,8 Hz, J = 4,5 Hz, J_{NH} = 1,9 Hz, 7,38 (½ AB Muster wird weiterhin vierfach aufgeteilt durch C-4H und 5 NH, 1, J_{gem} = 12,8 Hz, J = 2,3 Hz, J_{NH} = 1,0 Hz). 7,93 und 8,02 (s an m, total 5, OCOCH₃ und CH₂CH₂OCOCH₃, entsprechend).

Stufe C:

Herstellung von 4-(2-Hydroxyäthyl)-2-azetidinon

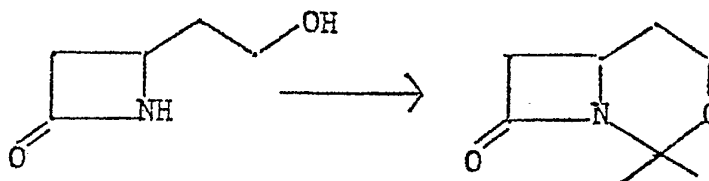


Unter Stickstoff bei 0 °C wird eine Lösung aus 4-(2-Acetoxy-20 äthyl)-2-azetidinon (2,24 g, 0,014 Mol) in 25 ml wasserfreiem Methanol mit einer Lösung von Natriummethylat (77 mg, 1,4 mMol) in 5 ml wasserfreiem Methanol behandelt. Nach einstündigem Rühren wird die Lösung mit Eisessig neutralisiert. Die Entfernung des Methanols im Vakuum ergibt das rohe 4-(2-Hydroxyäthyl)-2-azetidinon als ein Öl. Das Produkt wird chromatographisch über Kieselgel gereinigt, indem man es mit 10% Methanol/CHCl₃ eluiert, wobei man 1,55 g des Alkohols erhält: F. 50 °C; IR (CHCl₃) μ 5,67; KMR (CDCl₃) τ 3,20 (breites s, 1,

NH), 6,24 und 6,28 (m an t, total 3, C-4H und CH₂OH entsprechend), 6,90 (breites s an ½ AB Muster spaltet weiter auf in vier durch C-4H und NH, total 2, OH und C-3H entsprechend, J_{gem} = 13,0 Hz, J_{vic} = 4,2 Hz, J_{NH} = 1,6 Hz), 7,42 (½ AB Muster spaltet weiter auf in vier durch C-4H und NH, 1, C-3H, J_{gem} = 13,0 25 Hz, J_{vic} = 2,2 Hz, J_{NH} = 1,1 Hz), 8,16 (m, 2, CH₂CH₂OH).

Stufe D:

Herstellung von 8-Oxo-2,2-dimethyl-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan



Eine Lösung aus 4-(2-Hydroxyäthyl)-2-azetidinon (1,87 g, 0,016 Mol) und 2,2-Dimethoxypropan (1,69 g, 0,016 Mol) in 25 ml wasserfreiem Methylchlorid wird mit Bortrifluoridätherat (0,201 ml, 0,002 Mol) bei 25 °C behandelt. Die erhaltene Lösung wird 10 Minuten gerührt. Beim Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck erhält man ein Öl (2,5 g). Die Chromatographie des Rohproduktes über einer Kieselgelsäule unter Verwendung von 2:1 Äthylacetat/Benzol als Eluierungsmittel ergibt 8-Oxo-2,2-di-methyl-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan (1,59 g) als kristallinen Feststoff. Beim Umkristallisieren aus Äther/Hexan erhält man ein Produkt mit dem F. 60 bis 61 °C.

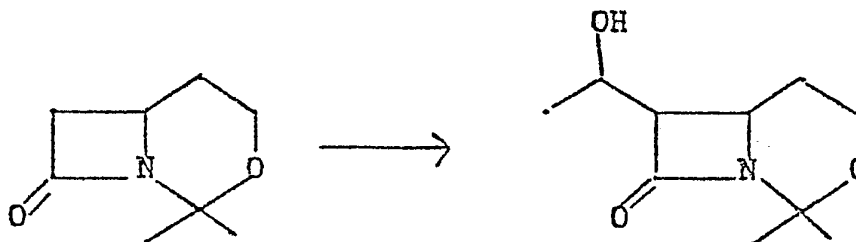
IR (CHCl₃) μ : 5,73 (β-Lactam)

KMR (CDCl₃) τ :

6,02–6,28, m, 2H, C-4 Methylen
40 6,22–6,62, m, 1H, C-6 Methin
6,90, dd, 1H, J_{7,7} = 14 Hz, J_{6,7} = 4,5 Hz
C-7 Proton cis bis C-6H
7,47, dd, 1H, J_{7,7} = 14 Hz, J_{6,7} = 2 Hz
C-7 Proton trans bis D-6H
7,82–8,68, m, 2H, C-5 Methylen
8,23, s, 3H
8,57, s, 3H C-2 Methyle

Stufe E:

50 Herstellung von 8-Oxo-2,2-dimethyl-7α- und β-(1-hydroxyäthyl)-(3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan



Zu einer Lösung aus 1,1 Äquivalenten von frisch hergestelltem Lithiumdiisopropylamid in wasserfreiem Tetrahydrofuran unter einer Stickstoffatmosphäre bei –78 °C wird eine Lösung aus 8-Oxo-2,2-dimethyl-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan in wasserfreiem Tetrahydrofuran, das auf –78 °C gekühlt worden ist,

zugegeben. Nach 2 Minuten wird das erhaltene Lithiumenolat mit überschüssigem Acetaldehyd behandelt. Die Lösung wird 30 Minuten bei –78 °C gerührt und dann in Wasser gegossen. Die wässrige Phase wird mit Natriumchlorid gesättigt und mit Äthylacetat extrahiert. Die vereinten Äthylacetatlösungen

werden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck eingedampft, wobei man das rohe Produkt erhält. Durch Reinigung mittels Chromatographie über Kieselgel unter Verwendung von Äthylacetat/Benzol erhält man 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 α - und - β -(1-hydroxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan.

Daten für 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 β -(1-hydroxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan:

IR (CH₂Cl₂) μ :

5,72 μ (β -Lactam)

KMR (CDCl₃) τ :

5,53–6,43, m, 4H, C-4 Methylen + C-6 Methin + C-9 Methin

6,90, dd auf breitem s, 2H, $J_{7,9} = 9$ Hz

$J_{6,7} = 5,5$ Hz, C-7 Methin + OH

7,70–8,83, m, 2H, C-5 Methylen

8,27, s, 3H

8,60, s, 3H C-2 Methyl

8,78, d, 3H, $J_{9,10} = 6,5$ Hz, C-10 Methyl

Daten für 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 α -(1-hydroxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan:

IR (CHCl₃) μ :

2,9 breites O–H

5,73 β -Lactam

KMR (Aceton - d₆) δ :

4,23–3,33, m, C-6 Methin

3,33, breites s, OH

2,83, dd, $J = 2$ Hz, 6 Hz

10 2,67, dd, $J = 2$ Hz, 8 Hz C-7 Methin

1,93–1,63, m, C-5 Methylen

1,63, 2

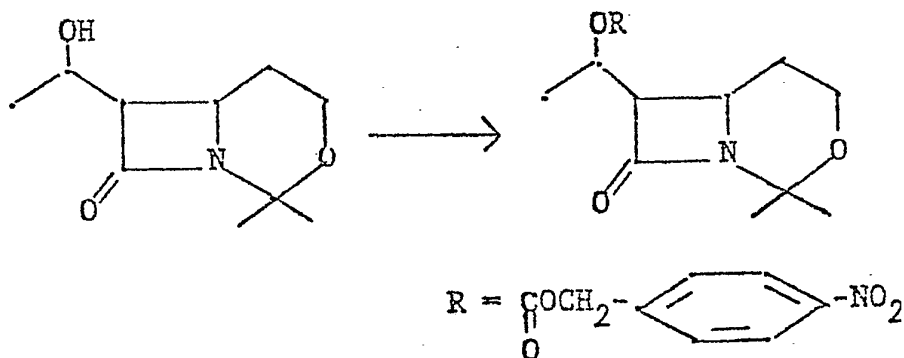
1,40, s C-2 Methyl

1,23, d, $H = 6,5$ Hz, C-10 Methyl

15

Stufe F:

Herstellung von 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 α -(1-p-nitrobenzyl-carbonyldioxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan



Unter wasserfreien Bedingungen wird eine Lösung aus 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 α -(1-hydroxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan (60 mg, 0,302 mMol) in 0,6 ml Äther mit pulverisiertem Kaliumhydroxid (19 mg, 0,332 mMol) behandelt. Nach 15 Minuten wird p-Nitrobenzylchlorformat (65 mg, 0,302 mMol) zu der Reaktionsmischung gegeben. Man rührt weitere 15 Stunden bei 25 °C. Die Mischung wird aufgeteilt zwischen 1 m pH 7 Phosphatpuffer und weiterem Äther. Die Ätherphase wird mit Wasser und Salzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Beim Abdampfen des Filtrates unter vermindertem Druck erhält man 67 mg eines farblosen Öls. Reinigung durch präparative Dickschicht-Chromatographie über Kieselgel und Entwickeln mit 1:9 Äthylacetat/Benzol ergibt 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 α -(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan (40 mg) als Mischung der Diastereomeren.

IR (CH₂Cl₂) μ :

5,68 (β -Lactam und Carbonat), 6,19 und 6,54 (Nitro)

35 KMR (CDCl₃):

1,67, d, 2H, ArH

2,37, d, 2H, ArH

4,67, s, 2H, ArCH₂

4,67–5,22, m, CH₃CH

40 5,98–6,25, m, 2H, C-4 Methylen

6,25–6,62, m, 1H, C-6 Methin

7,75–8,83, m, 2H, C-5 Methylen

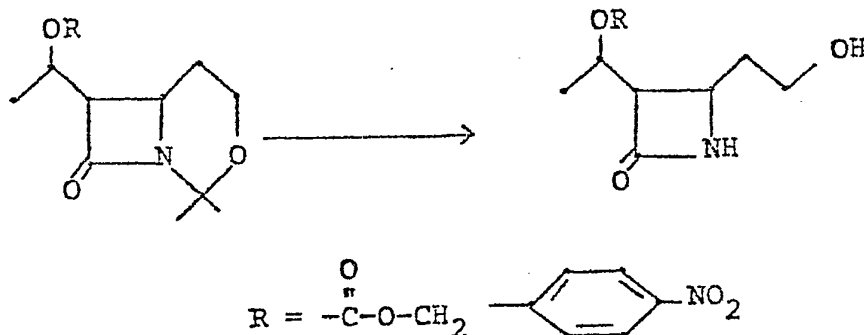
8,22, s, 3H, C-2 Methyl

8,50–8,59, m, 5H, C-2 Methyl + CH₃CH

Die 7 β -Diastereoisomeren oder die 7 α - und 7 β -Mischungen werden in analoger Weise erhalten.

Stufe G:

Herstellung von Cis- und Trans-3-(1-p-Nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-(2-hydroxyäthyl)-2-azetidinon



8-Oxo-3-oxa-2,2-dimethyl-7 α -(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan (1,0 g) wird in 8 ml Essigsäure

und 2 ml Wasser gelöst und 1,25 Stunden auf 65 °C erhitzt. Die Essigsäure und das Wasser werden unter vermindertem Druck

entfernt und der Rückstand wird aufgenommen in Benzol und eingedampft, wobei man Trans-3-(1-p-Nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-(2-hydroxyäthyl)-2-azetidinon als Mischung der Diastereoisomeren erhält.

IR (CH₂Cl₂) μ :

5,67 (β -Lactam), 5,72 Schulter, 6,20 und 6,57 (Nitro)

KMR (CDCl₃):

1,73, d, 2H, H = 8,5 Hz, ArH

2,43, d, 2H, J = 8,5 Hz, ArH

3,63, breites s, 1H, NH

4,37–5,13, m, 1H, CH₃CH

4,72, s, 2H, ArCH₂

6,07–6,53, m, 1H, C-4 Methin

6,23, t, 2H, J = 5,5 Hz, CH₂OH

6,73–6,93, m, 1H, C-3 Methin

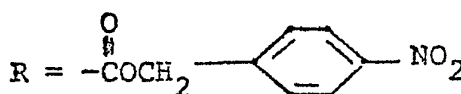
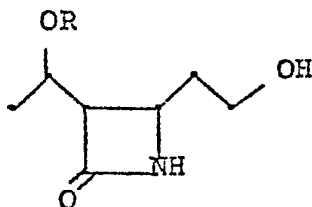
7,63–8,97, m, 3H, CH₂CH₂OH

⁵ 8,53, d, J = 6,5 Hz, CH₃CH

Die Cis-Diastereoisomeren oder die Cis-trans-Mischung wird in analoger Weise erhalten.

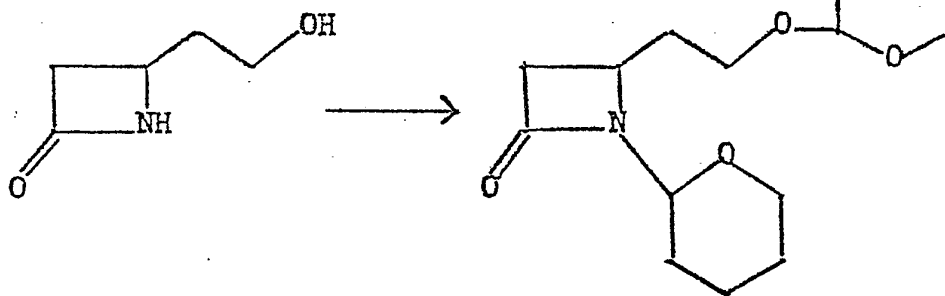
Stufen D', E', F' und G' als Alternative zu den Stufen D, E, F

¹⁰ und G für die Herstellung von 3-(1-p-Nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-(2-hydroxyäthyl)-azetidinon



Stufen D', E', F' und G'

Herstellung von 1-(2-Tetrahydropyranyl)-4-[2-tetrahydropyranyl-oxyäthyl]-2-azetidinon



Unter Stickstoff und bei 25 °C wird eine Lösung aus 4-(2-Hydroxyäthyl)-2-azetidinon (62 mg, 0,539 mMol) in 0,5 ml wasserfreiem p-Dioxan mit 2,3-Dihydropyran (0,98 ml, 1,08 mMol) und p-Toluolsulfonsäuremonohydrat (19 mg, 0,10 mMol) behandelt. Die erhaltene Lösung wird während 60 Minuten gerührt und dann zwischen 10 ml eines 0,5m pH 7 Phosphatpuffers und 10 ml Äthylacetat geteilt. Die wässrige Phase wird ein zweites Mal mit Äthylacetat extrahiert. Die vereinten Äthylacetatlösungen werden mit Salzwasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck eingedampft, wobei man 216 mg des Rohproduktes erhält. Reinigung durch präparative Dickschicht-Chromatogra-

phie und Entwickeln mit Äthylacetat ergibt 80 mg 1-(2-Tetrahydropyranyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon als ein Öl.

⁴⁵ KMR (CDCl₃) τ :

5,13–5,60, m, OCH

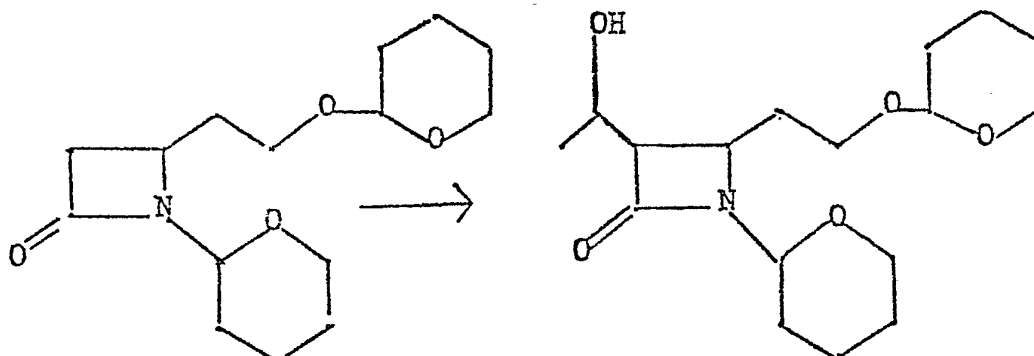
5,83–6,85, m, C4H + OCH₂

6,95, dd, J = 5 Hz und 15 Hz

7,35, dd, J = 3 Hz und 15 Hz C-3Methylen

⁵⁰ 7,62–8,95, m, CHCH₂CH₂CH₂CH₂ + CHCH₂CH₂O

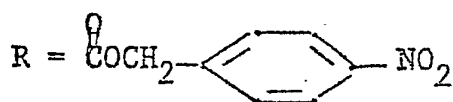
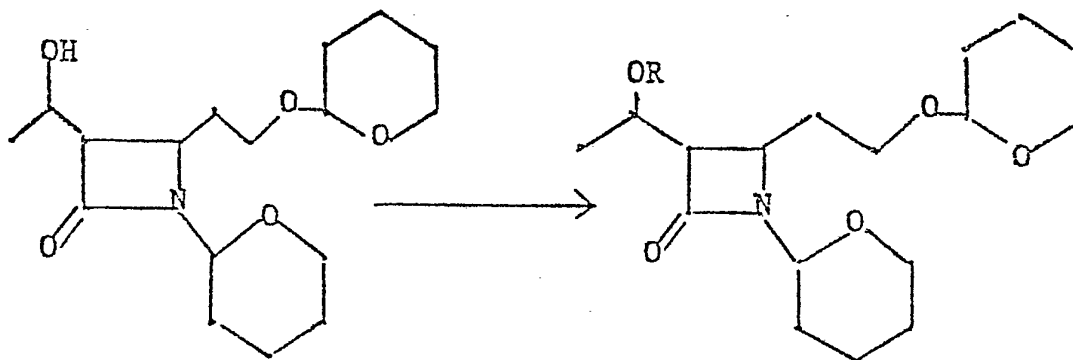
Herstellung von Cis- und Trans-1-(2-Tetrahydropyranyl)-3-(1-hydroxyäthyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon



Arbeitet man in der für die Herstellung von 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 α - und β -(1-hydroxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan aus 8-Oxo-2,2-dimethyl-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan beschriebenen Weise und verwendet 1-(2-Tetrahydropyranyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon, so erhält man eine diastereomere Mischung von sowohl Cis- und Trans-1-(2-

Tetrahydropyranyl)-3-(1-hydroxyäthyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon.

Herstellung von Cis- und Trans-1-(2-Tetrahydropyranyl)-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon



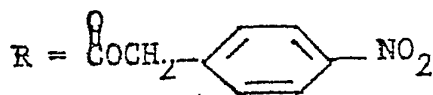
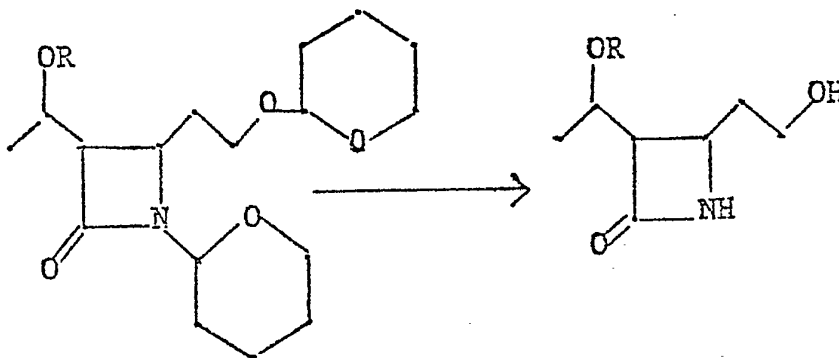
30

Arbeitet man wie bei der Herstellung von 8-Oxo-2,2-dimethyl-7 α -(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-8-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan aus 8-Oxo-2,2-dimethyl-7-(1-hydroxyäthyl)-3-oxa-1-azabicyclo-[4,2,0]-octan und verwendet trans-1-(2-Tetrahydropyranyl)-3-(1-hydroxyäthyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon, so erhält man Trans-1-(2-

Tetrahydropyranyl)-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon. Das Cis-Diastereoisomere wird in analoger Weise erhalten.

35

Herstellung von Cis- und Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-(2-hydroxyäthyl)-2-azetidinon



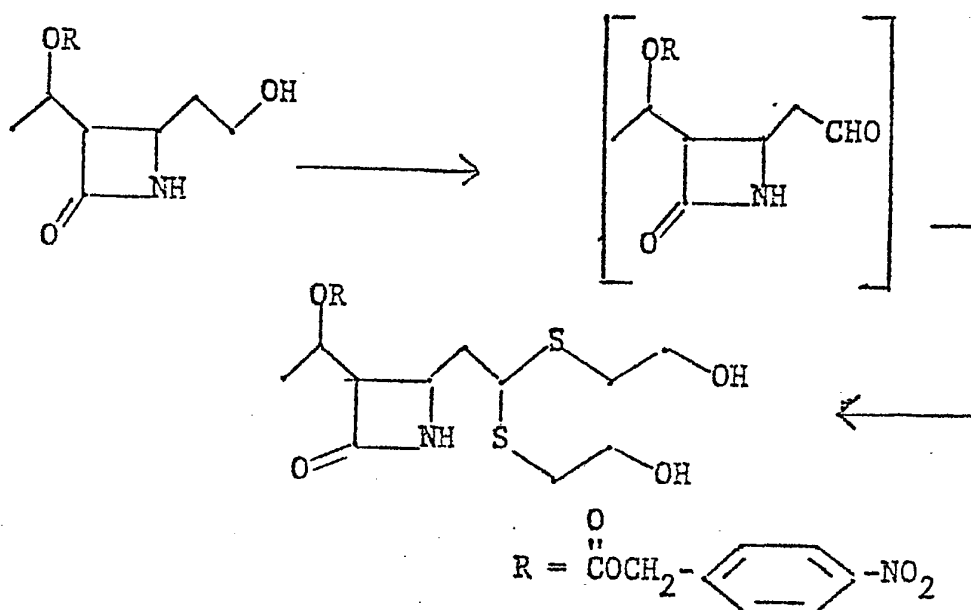
60

Eine Lösung aus Trans-1-(2-tetrahydropyranyl)-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2-(2-tetrahydropyranyl)-oxyäthyl]-2-azetidinon in Methanol bei 25 °C wird mit einem 0,1 molaren Äquivalent von p-Toluolsulfonsäuremonhydrat behandelt. Die Lösung wird 2 Stunden gerührt und dann mit 1m pH 7 Phosphatpuffer neutralisiert. Das Produkt wird in Äthylacetat extrahiert. Die Äthylacetatlösung wird mit Salzwasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wird

unter vermindertem Druck eingedampft, wobei man Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-(2-hydroxyäthyl)-2-azetidinon erhält. Das Cis-Diastereoisomere wird in analoger Weise erhalten.

65

Stufe H:
Herstellung von Cis- und Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2,2-bis-(2-hydroxyäthyl)-thioäthyl]-2-azetidinon



Unter Stickstoff bei 25 °C wird eine Mischung aus wasserfreiem Pyridin (0,146 ml, 1,81 mMol) und wasserfreiem, gepulvertem Chromtrioxid (92 mg, 0,916 mMol) in 8 ml wasserfreiem Acetonitril 30 Minuten gerührt. Zu der erhaltenen dunkelbraunen Lösung werden 250 mg trockenes Supercel gegeben und anschliessend daran eine Lösung von Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-(2-hydroxyäthyl)-2-azetidinon (186 mg, 0,550 mMol) in 1 ml wasserfreiem Acetonitril. Nach einstündigem Rühren wird das Reaktionsgemisch durch ein gemischtes gepacktes Bett aus 2 g von jeweils Kieselgel und Magnesiumsulfat filtriert. Das Bett wird wiederholt gewaschen mit insgesamt 30 ml zusätzlichem Acetonitril. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bei 25 °C auf ein Volumen von 3 ml konzentriert. Durch Dünnschicht-Chromatographie (Kieselgel; Äthylacetat/Benzol 2:1) wird festgestellt, dass diese Lösung ein Produkt enthält ($R_f = 0,38$), das weniger polar ist als das Ausgangsmaterial ($R_f = 0,21$).

Die Acetonitrillösung von Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-(2-oxoäthyl)-2-azetidinon, die wie oben hergestellt worden ist, wird unter Stickstoff bei 0 °C mit 2-Mercaptoäthanol (0,386 ml, 5,5 mMol) behandelt und unmittelbar darauf mit Bortrifluorid-ätherat (0,176 ml, 1,43 mMol). Nach 15minütigem Rühren wird diese Lösung geteilt zwischen wässrigem Dikaliumhydrogenphosphat (1,5 g in 4 ml Wasser) und 12 ml Äthylacetat. Die wässrige Phase wird ein zweites Mal mit Äthylacetat extrahiert. Die vereinten Äthylacetatlösungen werden mit Salzlösungen gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck

eingedampft, wobei man 229 mg eines Öles erhält. Das Produkt wird durch präparative Dickschichtchromatographie über Kieselgel gereinigt und mit Äthylacetat entwickelt, wobei man 118 mg Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2,2-bis-(2-hydroxyäthyl)-thioäthyl]-2-azetidinon als ein farbloses Öl erhält.

IR (CH_2Cl_2) μ :

30 5,75 (5,79 Schulter), β -Lactam und Carbonat 6,20, 6,55 Nitro

KMR (Aceton- d_6) τ :

1,70, d, $J = 8,5$ Hz, 2H, ArH

2,28, d, $J = 8,5$ Hz, 2H, ArH

2,48–2,88, m, 1H, NH

35 4,63, s, ArCH_2

4,63–5,12, m, CH_3CH 3H

5,80, t, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH} \begin{matrix} \text{S} \\ \text{S} \end{matrix} \} 13 \text{ H}$

40 5,80–7,45, m, C-4H + C-3H + $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

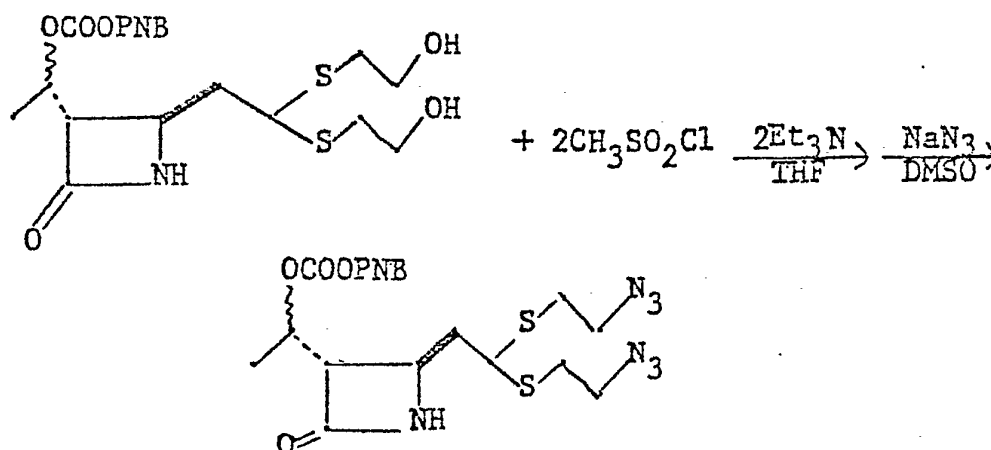
7,63–8,33, m, 2H, CH_2CH

8,53, d, $J = 6,5$ Hz 3 H, CH_3CH

Die Cis-Diastereoisomeren werden in analoger Weise hergestellt. Alternativ werden die gemischten Diastereoisomeren erhalten, wenn man als Ausgangsmaterial eine Mischung der Diastereoisomeren verwendet.

Stufe I:

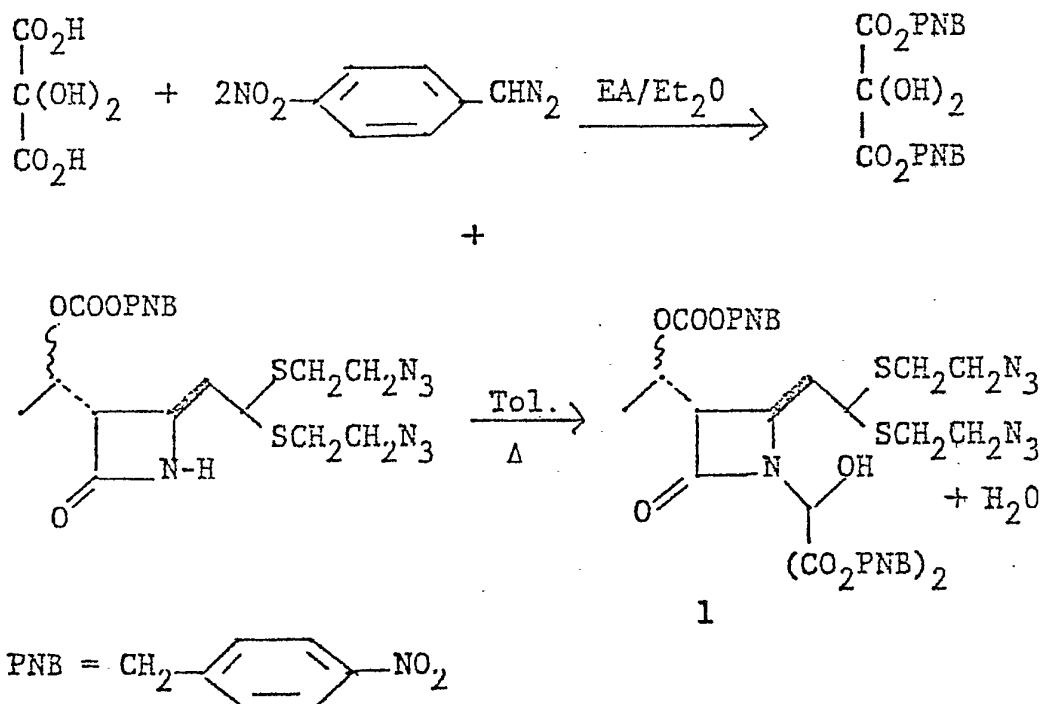
Herstellung von Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2,2-bis-(2-azidoäthyl)-thioäthyl]-2-azetidinon



Zu einer Lösung aus 211 mg (Molgewicht = 474; 0,445 mmol) Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2,2-bis-(2-hydroxyäthyl)-thioäthyl]-2-azetidinon in 5 ml Tetrahydrofuran (THF) (destilliert aus Lithiumaluminiumhydrid) bei 0 °C werden 103 mg Mesylchlorid (Molgewicht = 114; 0,904 mmol) in 1 ml Tetrahydrofuran gegeben und unmittelbar darauf 134 µl Triäthylamin (Molgewicht 101; $\epsilon = 0,729$; 0,967 mmol). Das Reaktionsgemisch wird 1 Stunde unter N₂ gerührt. Das Triäthylamin-hydrochlorid wird unter N₂ filtriert und mit einigen ml zusätzlichem THF gewaschen. Das klare farblose Filtrat wird unter einem Strom von N₂ konzentriert und anschliessend im Hochvakuum 10 Minuten gepumpt. Das Dimesylat wird unmittelbar darauf aufgelöst in 5 ml DMSO (destilliert aus CaH₂ bei 8 mm und gelagert über einem 4A Linde Molekularsieb) in Gegenwart von 347 mg NaN₃ (Molgewicht = 65; 5,34 mmol).

Nach Rühren über Nacht und unter N₂ werden 10 ml H₂O und 20 ml Äthylacetat (EA) zugegeben. Die Schichten werden getrennt und die wässrige Schicht wird dreimal mit 10 ml EA gewaschen, wobei jede organische Schicht noch einmal gewaschen wird mit 10 ml H₂O und 10 ml Salzlösung. Die vereinten Äthylacetatschichten werden über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert und unter einem N₂-Strom konzentriert, wobei man das rohe Diazid erhält. Durch präparative Dünnschichtchromatographie über Kieselgel erhält man Trans-3-(1-p-nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2,2-bis-(2-azidoäthyl)-thioäthyl]-2-azetidinon. Die Cis-Diastereoisomeren oder die Cis-trans-Mischung werden in analoger Weise erhalten.

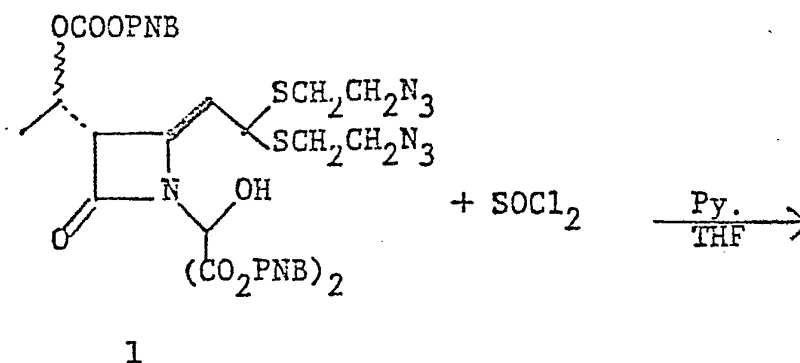
Stufe J:

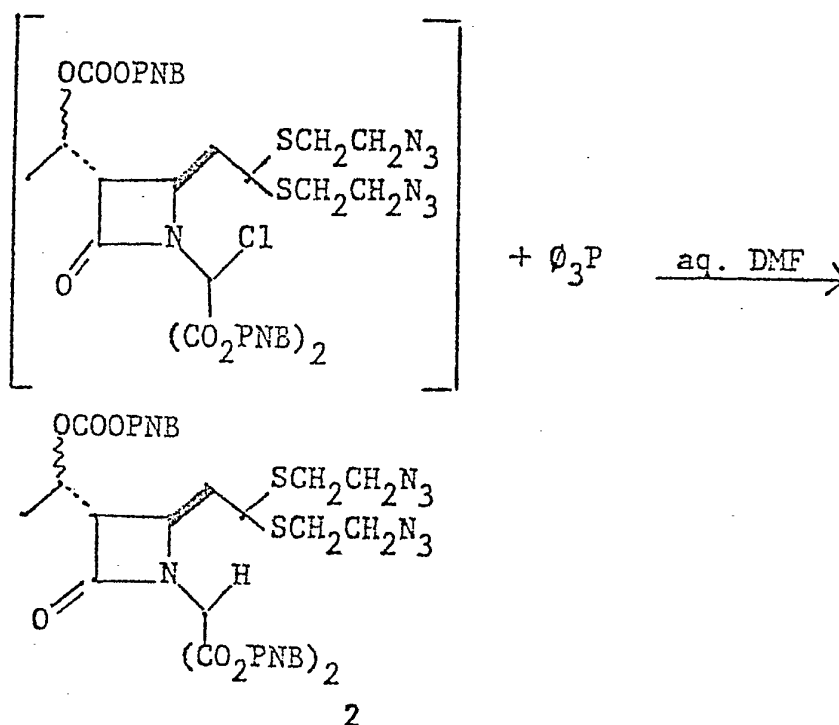


Eine frisch zubereitete (H. Davies und M. Schwarz, J.O.C., 30, 1242 [1965]) Lösung aus p-Nitrophenyldiazomethan (29 mmol) in 150 ml Äther wird unter Rühren zu einer Lösung aus 1,0 g Oxomalonsäuremonohydrat (Molgewicht = 136; 7,35 mmol) in 50 ml Äthylacetat (EA) bei 0 °C gegeben. Nach 2½ Stunden wird die gelbe Lösung auf einem Drehverdampfer unter schwachem Erhitzen auf ungefähr das halbe Volumen konzentriert, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und wie oben beschrieben, zu einem Öl konzentriert. Zu dem rohen p-Nitrobenzylester in 50 ml Toluol (Tol.) gibt man 3,54 mg Trans-3-(1-p-Nitrobenzylcarbonyldioxyäthyl)-4-[2,2-bis-(2-azidoäthyl)-thioäthyl]-2-azetidinon (Molgewicht = 524; 6,75 mmol). Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren erhitzt auf einem Ölbad, wobei man ungefähr ½ des Toluols abdestillieren

lässt. Toluol (getrocknet über einem 3A ½" Linde Molekularsieb) wird wiederum zugegeben, um das Volumen auf 50 ml aufzufüllen und der Azeo-Trocknungsprozess wird dreimal wiederholt. Die Lösung wird dann unter N₂ eine Stunde rückflussbehandelt und der Azeo-Trocknungsprozess wird ein letztes Mal wiederholt und die Rückflussbehandlung wird eine weitere Stunde fortgesetzt. Beim Konzentrieren der erhaltenen Lösung unter einem Strom von N₂ erhält man rohes 1. Das Rohmaterial wird chromatographiert über Kieselgel, wobei man 1 erhält. Die Cis-Diastereoisomeren oder die Cis-trans-Mischung wird in analoger Weise erhalten.

Stufe K:

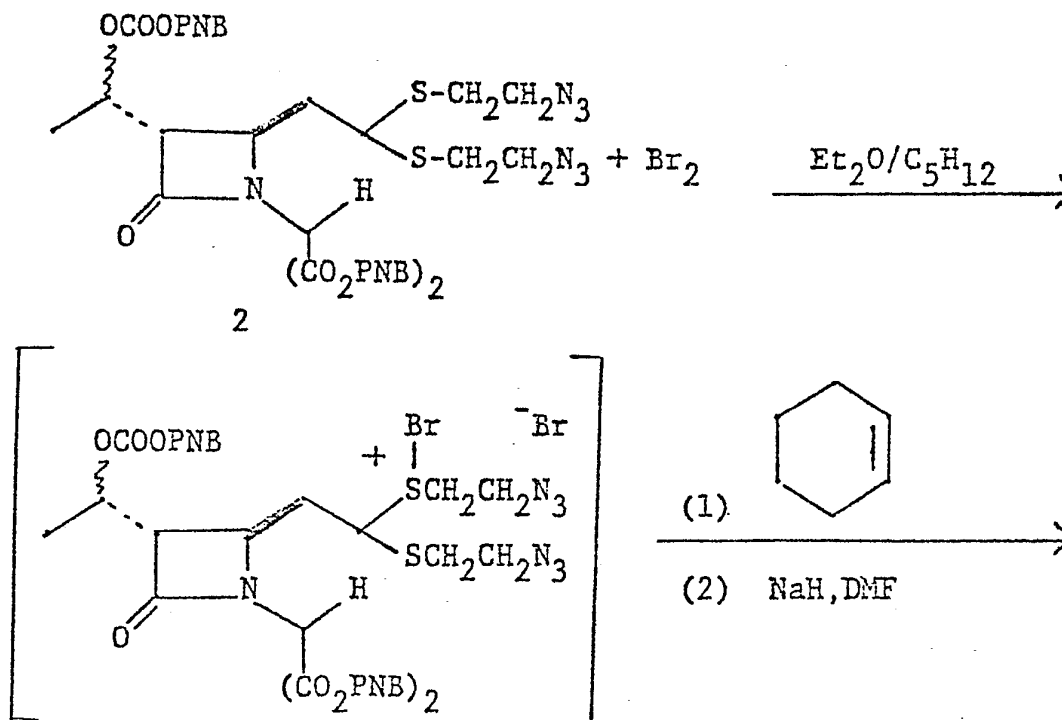


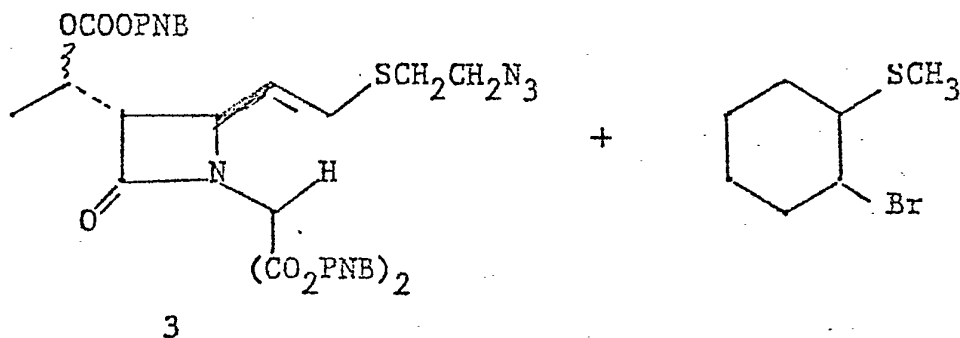


Zu einer Lösung aus 2,80 g 1 (Molgewicht = 912; 3,07 mMol) in 35 ml THF (destilliert aus Lithiumaluminiumhydrid) bei -20°C werden 0,3 ml Pyridin (Molgewicht = 79; $\epsilon = 0,982$; 3,73 mMol) (destilliert aus NaH und gelagert über einem 4A Linde Molekularsieb) gegeben. Unter Rühren unter N_2 werden tropfenweise 0,438 g Thionylchlorid (Molgewicht = 119; 3,68 mMol) in 1 ml (THF zugegeben. Die Reaktionsmischung wird unter N_2 5 Minuten bei -20°C gerührt und dann $\frac{1}{2}$ Stunde bei 0°C und schliesslich 1 Stunde bei 25°C . Das Pyridinhydrochlorid wird unter N_2 abfiltriert und zweimal mit Benzol (getrocknet über einem 3A $\frac{1}{16}$ " Linde Molekularsieb) gewaschen. Die vereinten Filtrate und Waschlösungen werden unter einem N_2 -Strom konzentriert, in einem geringen Volumen Benzol mit wasserfreiem MgSO_4 aufgeschlämmt, unter N_2 filtriert und dann unter einem N_2 -Strom konzentriert. Beim Pumpen unter Hochvakuum während $\frac{1}{2}$ Stunde erhält man ein Öl. Zu dieser

frisch zubereiteten Chlorverbindung gibt man unter Rühren 0,885 g Triphenylphosphin (Molgewicht = 262; 3,38 mMol) in 66 ml 9:1 Dimethylformamid (DMF)/ H_2O und anschliessend 550 mg K_2HPO_4 (Molgewicht = 174; 3,16 mMol). Das Reaktionsgemisch wird 35 Minuten bei 25°C gerührt. Nach Verdünnen mit EA und Kochsalzlösung werden die Schichten getrennt und die wässrige Schicht wird dreimal mit EA extrahiert. Die vereinten EA-Schichten werden mit Kochsalzlösung gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter einem N_2 -Strom konzentriert, wobei man rohes 2 erhält. Das Material wird über Kieselgel chromatographiert, wobei man 2 erhält. Die Cis-Diastereoisomeren oder die Cis-trans-Mischung wird in analoger Weise erhalten.

Stufe L:

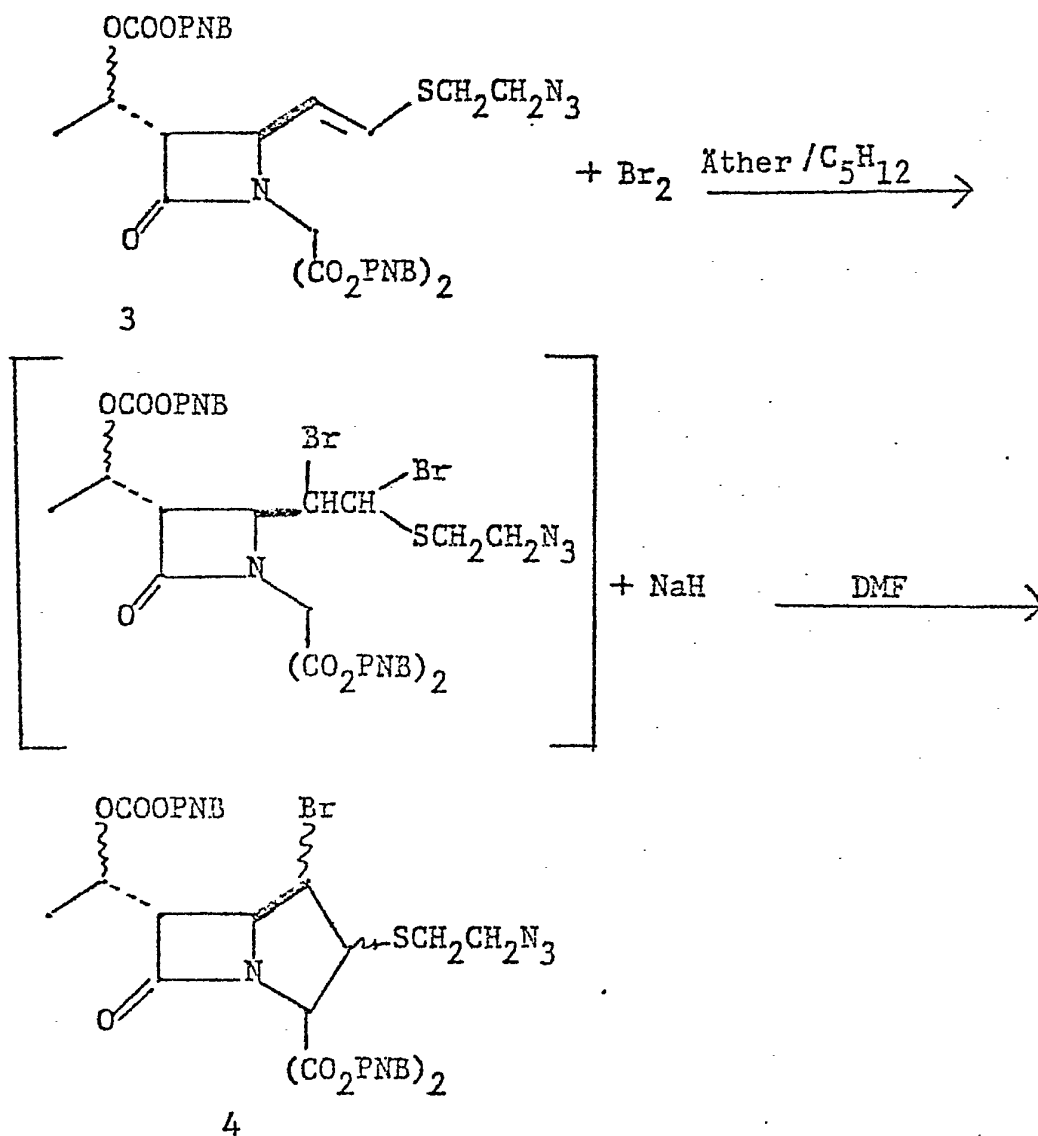




Zu 7,8 ml Pentan (getrocknet über einem 4A Linde Molekularsieb) werden 0,2 ml Br₂ (Molgewicht = 160; $\epsilon = 3,12$; 3,9 mMol) gegeben. Zu einer Lösung aus 950 mg 2 (Molgewicht = 896; 1,06 mMol) in 15 ml Diäthyläther (getrocknet über einem 3A 1/6" Linde Molekularsieb) gibt man bei 0 °C und unter N₂ unter Rühren tropfenweise 2,3 ml der obigen 0,49m Br₂-Lösung (1,13 mMol). Nach 10minütigem Rühren bei 0 °C werden 114 μ l Cyclohexen (Molgewicht = 82, $\epsilon = 0,81$; 1,13 mMol) zugegeben. Nach 5 Minuten bei 0 °C werden 53 mg 57%iges NaH (57% von 53 mg = 30,2 mg, Molgewicht 24, 1,26 mMol) in Mineralöl zu der gerührten Reaktionsmischung gegeben. Darauf unmittelbar gibt man 14 ml eiskaltes DMF (destilliert aus wasserfreiem CaSO₄ bei 40 mm und gelagert über einem 4A Linde Molekularsieb). Das Rühren wird unter N₂ bei 0 °C 3 Stunden fortge-

führt. Das Reaktionsgemisch wird auf eine gerührte eiskalte Mischung aus 2,5 ml 1m KH₂PO₄-40 ml H₂O-75 ml EA gegossen. Nach Trennung der Schichten wird die wässrige Schicht mit NaCl gesättigt und nochmals mit EA extrahiert. Die vereinigten organischen Schichten werden einmal mit Kochsalzlösung extrahiert, über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet, filtriert und unter einem N₂-Strom konzentriert und anschliessend in einem Hochvakuum gepumpt, wobei man das rohe 3 erhält. Durch präparative Dünnschichtchromatographie über Kieselgel erhält man 3. Die Cis-Diastereoisomeren oder die Cis-trans-Mischung erhält man in analoger Weise.

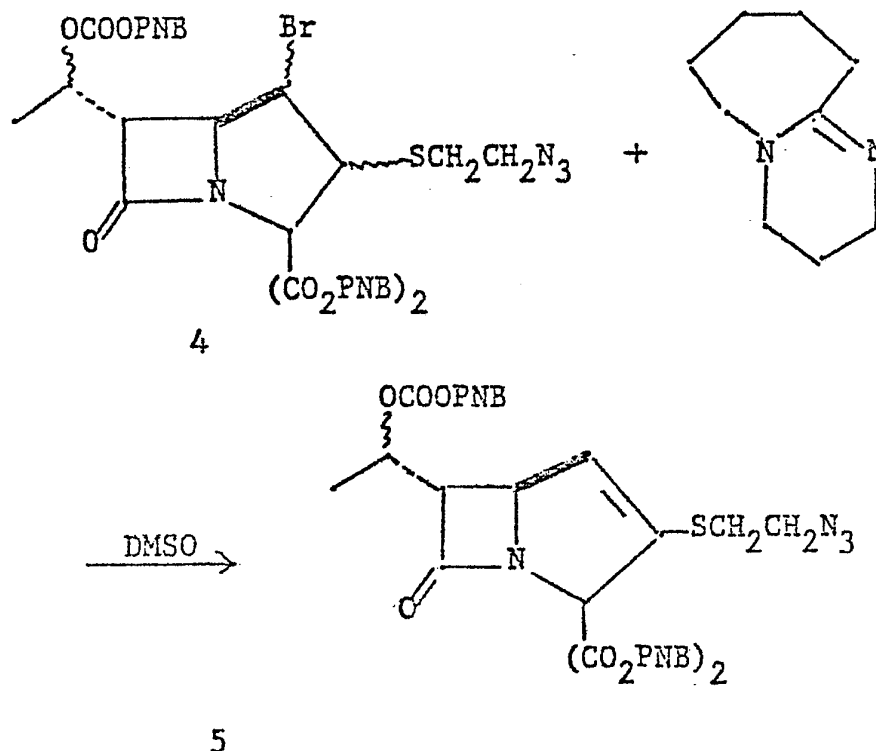
Stufe M:



Zu 9,16 ml Pentan (getrocknet über einem 4A Linde Molekularsieb) gibt man 0,2 ml Br₂ (Molgewicht = 160; 3,9 mMol). Zu 474 mg 3 (Molgewicht = 793; 0,598 mMol) in 13 ml Diäthyläther (getrocknet über einem 3A 1/16" Linde Molekularsieb) bei 0 °C unter N₂ gibt man tropfenweise unter Rühren 1,52 ml der obengenannten 0,42m Br₂-Lösung (0,63 mMol). Nach 15 Minuten bei 0 °C werden 33 mg 57%iges NaH (57% von 33 mg = 18,8 mg; Molgewicht = 24; 0,78 mMol) zugegeben und unmittelbar daran gibt man 6,35 ml eiskaltes DMF (destilliert aus wasserfreiem CaSO₄ bei 40 mm und aufbewahrt über einem 4A Linde Molekularsieb) hinzu. Das Reaktionsgemisch wird 1 1/2 Stunden bei 0 °C gerührt, dann zu einer gerührten eiskalten Mischung

von 1,6 ml 1m KH₂PO₄-20 ml H₂O und 20 ml EA gegossen. Die Schichten werden getrennt und die wässrige Schicht wird mit NaCl gesättigt und nochmals mit weiterem EA extrahiert. Die vereinten organischen Schichten werden einmal mit Salzwasser gewaschen, getrocknet über wasserfreiem Magnesiumsulfat und filtriert. Das Filtrat wird konzentriert unter einem N₂-Strom und dann an ein Hochvakuum gelegt, wobei man das rohe 4 erhält. Durch präparative Dünnschichtchromatographie über Kieselgel erhält man 4. Die Cis-Diastereoisomeren oder die Cis-trans-Mischung wird in analoger Weise erhalten.

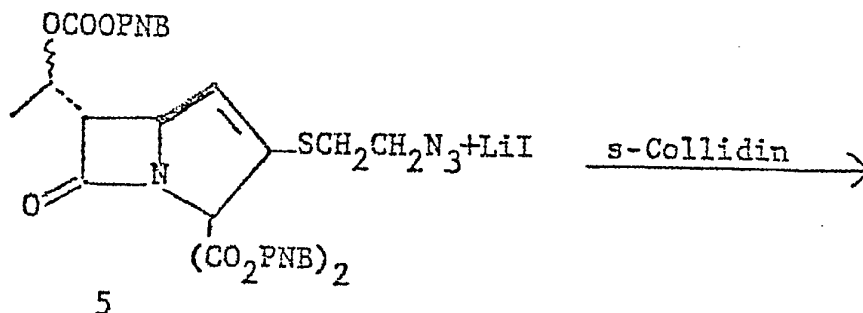
Stufe N:

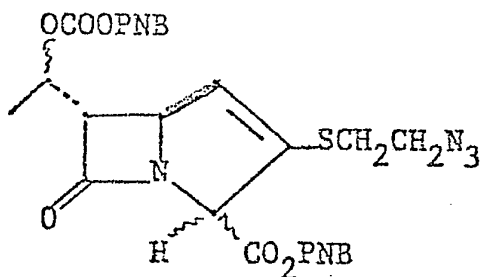


Zu 210 mg 4 (Molakulargewicht = 871; 0,241 mMol), gelöst in 0,5 ml DMSO (destilliert aus CaH₂ bei 8 mm und aufbewahrt über einem 4A Linde Molekularsieb) werden bei 25 °C unter Rühren 40 mg 1,5-Diazobicyclo-[5,4,0]-undec-5-en (destilliert bei 80 °C/2 mm) (Molekulargewicht = 152; 0,263 mMol) in 0,7 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gegeben. Die Lösung wird 4 Stunden unter N₂ gerührt und dann zu einer gerührten eiskalten Mischung von 0,48 ml 1m KH₂PO₄, 7 ml H₂O und 10 ml EA gegeben. Nach Trennung der Schichten wird die wässrige Schicht wiederum mit EA extrahiert. Die vereinten organi-

45 schen Schichten werden einmal mit Salzwasser gewaschen und dann über wasserfriem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter einem N₂-Strom konzentriert und anschliessend an ein Hochvakuum gelegt, wobei man das rohe 5 erhält. Durch präparative Dünnschichtchromatographie über Kieselgel 50 erhält man 5. Die cis-Diastereoisomeren oder die cis-trans-Mischung wird in analoger Weise erhalten.

Stufe O:





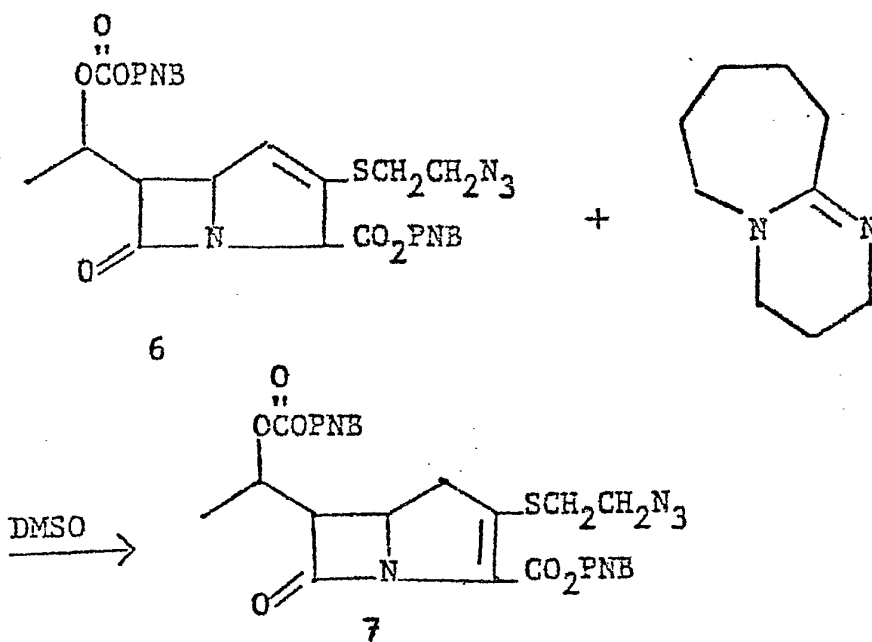
6

Zu einer Lösung aus 187 mg 5 (Molekulargewicht = 791; 0,236 mMol) in 2,5 ml s-Collidin (destilliert aus gepulvertem KOH bei 30 mm Druck) werden 45 mg wasserfreies LiJ (getrocknet für einige Stunden bei 100 °C über P₂O₅ unter Vakuum) (Molekulargewicht = 134; 0,336 mMol) gegeben. Unter Rühren unter N₂ wird das Reaktionsgemisch auf einem Ölbad auf 120 °C erhitzt. Nach insgesamt 25 Minuten wird die Reaktionsmischung auf 25 °C abgekühlt, mit CH₂Cl₂ verdünnt und in einen Rundkolben überführt, um unter einem N₂-Strom und im Hochvakuum zu konzentrieren. Der Rückstand wird zwischen 10 ml EA und 1,8 ml 1M KH₂PO₄ in 10 ml H₂O geteilt

15 und anschliessend wird die wässrige Schicht zwei weitere Male mit EA extrahiert. Die vereinten organischen Schichten werden mit Salzwasser extrahiert, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und unter einem Stickstoffstrom konzentriert, wobei man rohes 6 erhält. Durch präparative Dünnschichtchromatographie über Kieselgel erhält man 6. Die Cis-Diastereoisomeren oder die Cis-trans-Mischung wird in analoger Weise erhalten.

Stufe P:

25



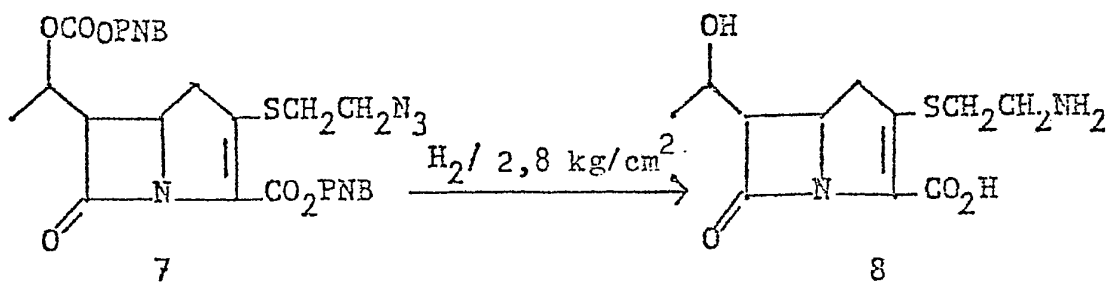
6

7

Zu einer Lösung der gemischten Diastereoisomeren 6 (34 mg; Molekulargewicht = 612; 0,055 mMol) in 0,2 ml DMSO (destilliert aus CaH₂ bei 8 mm und aufbewahrt über einem 4A Linde Molekularsieb) werden unter Rühren zugegeben 9,5 µl 1,5-Diazobicyclo-[5,4,0]-undec-5-en (destilliert bei -80 °C/2 mm) 55 (Molekulargewicht = 152; ε = 1; 0,0625 mMol). Die Lösung

wird unter Stickstoff 15 Minuten gerührt und zu einem Gesamtvolumen von 1 ml mit CHCl₃ verdünnt und unmittelbar auf 2 bis 1000 µ Kieselgelplatten gegeben. Die Bande des Produktes zeigt 7 an als Mischung von Cis- und Transdiastereoisomeren.

Stufe Q:



7

8

In Gegenwart von 61 mg PtO_2 werden 61 mg 7 (Molekulargewicht = 612; 0,1 mMol) in 6 ml Dioxan, 6 ml THF, 3 ml H_2O 4 Stunden bei einem Druck von 2,8 kg/cm² mit Wasserstoff hydriert. Das Reaktionsgemisch wird durch ein Celite-Filter filtriert und mit 2 ml 0,1n pH 7 Phosphatpuffer gewaschen. Nach dem Konzentrieren im Vakuum bis zum Trübungspunkt wird die wässrige Mischung mit Äthylacetat extrahiert. Die wässrige Schicht wird zu einem geringen Volumen konzentriert und auf eine Säule von 100 g XAD-2 Harz gegeben. Beim Eluieren mit H_2O und Verwerfen der Anfangsfractionen werden die Fractionen, welche das Produkt enthalten, gefriergetrocknet, wobei man 8 als Mischung von Cis- und Trans-Diastereoisomeren erhält.

Die nachfolgend beschriebene Verfahrensweise für die enzymatische N-Deacylierung von Thienamycin ist anwendbar für alle Isomeren des Thienamycins, besonders für die ausgeprägten N-Acetyl-Isomeren 890A und 890A₃, die nachfolgend beschrieben sind.

Deacetylierung von N-Acetylthienamycin

Eine 1%ige (Gewicht/Volumen) Suspension von fruchtbarer Rasenerde wird hergestellt, indem man 1 g der Rasenerde in 100 ml sterile Phosphatpuffer-Salzlösung gibt, wobei die Phosphatpuffer-Salzlösung die folgende Zusammensetzung hat:

Phosphatpuffer-Salzlösung	
NaCl	8,8 g
1m Phosphatpuffer, pH 7,5*	10 ml
destilliertes Wasser	1000 ml

*1m Phosphatpuffer, pH 7,5

16 ml 1m KH_2PO_4 werden gemischt mit 84 ml 1m K_2HPO_4 . der pH des Phosphatpuffers wird durch Zugabe einer geringen Menge von entweder 1m KH_2PO_4 oder 1m K_2HPO_4 auf 7,5 eingestellt.

Aliquote dieser 1%igen Vorratserde-Suspension werden hergestellt zur Zubereitung von 10 $\times$ -, 100 $\times$ - und 1000 $\times$ -Verdünnungen.

1-ml-Anteile der Vorratssuspension oder 1-ml-Anteile der 10 $\times$ -, 100 $\times$ - und 1000 $\times$ -Verdünnungen werden zu 2-ml-Anteilen von sterilen, 1,0%igen Agarlösungen bei 48 °C gegeben. Die Mischung wird schnell über die Oberfläche von sterilen Petrischalen von 85 mm Durchmesser, enthaltend 20 ml des Mediums A, gegossen. Medium A hat die folgende Zusammensetzung:

Medium A	
KH_2PO_4	3,0 g
K_2HPO_4	7,0 g
MgSO_4	0,1 g
destilliertes H_2O	1000 ml
N-Acetylthanolaminlösung*	8,5 ml

*N-Acetylthanolaminlösung

N-Acetylthanolamin wird 10 $\times$ in H_2O verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavenbehandlung zugegeben.

Für feste Medien: Man gibt 20 g Agar zu.

Die Petrischalen werden 19 Tage bei 28 °C inkubiert. Eine gut isolierte Kolonie wird aufgenommen und auf einer Petrischale, enthaltend Medium B, ausgebreitet. Medium B hat die folgende Zusammensetzung:

Medium B	
Tomatenpaste	40 g
gemahlenes Weizenmehl	15 g
destilliertes Wasser	1000 ml

pH: eingestellt auf pH 6 unter Verwendung von NaOH
Für feste Medien: gibt man 20 g Agar hinzu.

Eine einzelne Kultur wird ausgewählt und 2 Tage bei 28 °C auf einer Agarkultur des Mediums B wachsen gelassen. Ein Teil des Wachstums dieser Kultur wird auf die Oberfläche von 6 Kulturen, die aus dem Medium B hergestellt worden sind, ausgebreitet. Diese Kulturen werden 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Diese Kultur wurde identifiziert als Protaminobacter ruber und bezeichnet mit MB-3528 in der Kulturkollektion von Merck & Co., Inc, Rahway, N.J., USA und eine Probe wurde hinterlegt beim Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Accession No. NRRL B-8143.

Ein Teil des Wachstums der Agarkultur von Protaminobacter ruber MB-3528 wird verwendet, um einen 250-ml-Erlenmeyer-Kolben, enthaltend 50 ml des Mediums C, zu beimpfen. Medium C hat die folgende Zusammensetzung:

Medium C	
Dextrose	20 g
Pharmamedia	8 g
Flüssigkeit von eingeweichem Mais (Nassbasis)	5 g
destilliertes Wasser	1000 ml
pH: eingestellt auf 7 mit NaOH oder HCl	
N-Acetylthanolaminlösung*	8,5 ml

*N-Acetylthanolaminlösung

N-Acetylthanolamin wird 10 $\times$ in H_2O verdünnt und membransterilisiert. Diese Lösung wird nach der Autoklavenbehandlung zugegeben.

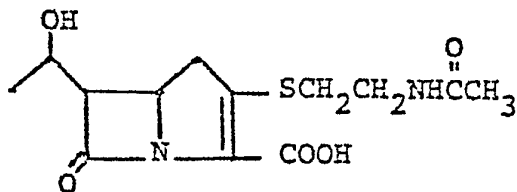
Der Kolben wird bei 28 °C und 220 U/min auf einem Rüttler 4 Tage geschüttelt. Eine 25-ml-Portion aus dem Kolben wird 15 Minuten mit 8000 U/min zentrifugiert. Das Überstehende wird entfernt und die Zellen an der Oberflächen des festen Mediums werden abgekratzt und zu einem 0,5 ml 0,05m Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4, gegeben. Die erhaltene Suspension wird einer Ultraschallbehandlung unterworfen unter Verwendung eines Branson Instruments Modell LS-75 Sonifier mit einer 1/2 Inch Sonde bei einer Einstellung 4 mit vier 15-Sekunden-Intervallen, während die Suspension während und zwischen den Unterbrechungen in Eiswasser gekühlt wird. Ein 10- μ l-Anteil des schallbehandelten Produktes wird mit 25 μ l Lösung, enthaltend 840 μ g/ml N-Acetylthienamycin in 10 mMol Kaliumphosphatpuffer, pH 7, vermischt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Kontrollen, welche das Antibiotikum und Puffer allein enthalten und beschallte Zellen und Puffer ohne Antibiotikum wurden auch vorgenommen. Nach einer Inkubierung über Nacht bei 28 °C werden 2- μ l-Mengen auf cellulosebeschichtete Dünnschichtchromatographie-Platten gegeben, die entwickelt wurden in Äthanol: H_2O , 70:30. Nach dem Trocknen an der Luft wird die Dünnschichtchromatographie-Platte auf eine mit Staphylococcus aureus ATCC 6538P infizierte Platte 5 Minuten gegeben.

Die infizierten Platten sind wie folgt hergestellt worden: Das Über-Nacht-Wachstum des für die Infizierung verwendeten Organismus Staphylococcus aureus ATCC 6538P in Fleischbrühe plus 0,2% Hefeextrakt wird mit Fleischbrühe plus 0,2% Hefeextrakt zu einer Suspension verdünnt, die eine 60%ige Durchlässigkeit bei einer Wellenlänge von 660 nm hat. Diese Suspension wird zu Difco-Nähragar, ergänzt mit 2,0 g/l Difco-Hefeextrakt, bei 37 bis 48 °C gegeben, um eine Zusammensetzung zu erhalten, die 33,2 ml der Suspension pro Liter Agar enthält. 40 ml dieser Suspension werden auf Petrischalen, 22,5 $\times$ 22,5 cm gegossen und diese Platten werden gekühlt und bei 4 °C gehalten bis sie verwendet werden (5 Tage Maximum).

Die Dünnschichtchromatographie-Platte wird entfernt und die den Organismus enthaltende Platte wird über Nacht bei 35 °C inkubiert. Ausser dem nicht umgesetzten bio-aktiven

N-Acetylthienamycin mit einem Punkt bei R_f 0,7–0,89 wurde ein bio-aktiver Punkt beobachtet bei R_f 0,44–0,47, der dem Thienamycin zugeschrieben wird. Kontrollinkubationsmischungen des Antibiotikums plus Puffer, schallbehandelte Zellen plus Puffer und Antibiotikum plus Puffer, zu denen schallbehandelte Zellen zugegeben worden waren kurz vor der Dünnschichtchromatografie-Anwendung, zeigten kein bio-aktives Material bei R_f 0,44–0,47.

Herstellung von 890A₁, einem speziellen Isomeren



Ein Röhrchen einer gefriergetrockneten Kultur von *Streptomyces flavogriseus* MA-4434 (NRRL 8139) wird aseptisch geöffnet und der Inhalt wird in ein Röhrchen suspendiert, welches 0,8 ml steriles Davis-Salz der folgenden Zusammensetzung enthält:

Davis-Salz	
Natriumcitrat	0,5 g
K ₂ HPO ₄	7,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
destilliertes Wasser	1000 ml

Diese Suspension wird verwendet zum Bebrüten von vier Kulturen des Mediums A mit der folgenden Zusammensetzung:

Medium A	
Glycerin	20,0 g
primäre Hefe	5,0 g
Fischmehl	15,0 g
destilliertes Wasser	1000 ml
Agar	20,0 g

pH: eingestellt auf 7,2 unter Verwendung von NaOH

Die beimpften Kulturen werden eine Woche bei 27–28 °C bebrütet und dann bis zur Verwendung bei 4–6 °C aufbewahrt. Eine 1/2-Portion des Wachstums von drei Kulturen wird verwendet, um 9 mit einem Stopfen versehene Erlenmeyer-Kolben, enthaltend 50 ml Medium B der folgenden Zusammensetzung, zu beimpfen:

Medium B	
Hefeautolysat (*Ardamire)	10,0 g
Glukose	10,0 g
Phosphatpuffer**	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
destilliertes Wasser	1000 ml

pH: eingestellt auf 6,5 unter Verwendung von HCl oder NaOH

*Ardamire: Yeast Products Corporation

**Phosphatpufferlösung

KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
destilliertes Wasser	1000 ml

Die die Keime enthaltenden Kolben werden 1 Tag bei 27–28 °C auf einem Rüttler mit 220 U/min geschüttelt. Die Kolben und die Inhalte werden 1 Tag bei 4 °C aufbewahrt.

33 2-l-Erlenmeyer-Kolben, jeder enthaltend 250 ml des

Mediums C, werden mit 8 ml pro Kolben des Wachstums aus dem die Keime enthaltenden Kolben beimpft. Das Medium C hat die folgende Zusammensetzung:

5 Medium C	
Tomatenpaste	20,0 g
primäre Hefe	10,0 g
Dextrin (Amidex)	20,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mg
10 destilliertes Wasser	1000 ml

pH: eingestellt auf 7,2–7,4 durch NaOH

Nach der Beimpfung werden die Produktionskolben bei 24 °C bebrütet unter Schütteln auf einem Rüttler, der mit 212 U/min betrieben wird und zwar für 4 Tage. Die Kolben werden dann entleert und der Inhalt auf Aktivität untersucht unter Verwendung von Standard *Salmonella gallinarum* MB-1287 und *Vibrio percolans* ATCC-8461-Platten unter Anwendung von 1,25-cm-Scheiben, welche in die zentrifugierten Brühproben eingetaucht wurden. Die Proben werden mit 0,02M Phosphatpuffer, pH 7,0, nötigenfalls verdünnt. Die Ergebnisse werden nachfolgend angegeben:

25 Zeitpunkt der Ernste (Harvest Age hours) h	96
pH	7,2
<i>Salmonella gallinarum</i> (mm Zone)	29,5
<i>Vibrio percolans</i> 1/10-Verdünnung (mm Zone)	31
890 Prüfeinheiten	40

30 7 l der gesamten Fermentationsbrühe werden auf 3 °C abgekühlt und in 200-ml-Anteilen mit 9000 U/min 15 Minuten jeweils zentrifugiert.

Zu den vereinten überstehenden Flüssigkeiten werden 7 ml 0,1M neutrales EDTA gegeben und die ganze Probe wird auf eine Dowex-1 × 2 (Cl⁻), 50–100 Maschen-Säule gegeben mit Bettdimensionen von 5,1 × 25 cm und einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/min. Die Säule wird mit 500 ml entionisiertem Wasser, enthaltend 5 ml 1M Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, und 25 µMol neutrales EDTA, gewaschen. Das Antibiotikum wird mit 1 Liter entionisiertem Wasser, enthaltend 50 g Natriumchlorid, eluiert und die Säule wird dann mit 300 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Fraktionen von 100 ml werden gesammelt, ausgehend vom ersten Auftreten des Salzes am Säulenausgang. Die Bio-Aktivität liegt in den Fraktionen 1 bis 10 mit einem Peak bei der Fraktion 2 vor. Die Fraktionen 2 bis 5, welche 17% der angewandten Aktivität enthalten, werden zusammengegeben.

Die zusammengegebenen Fraktionen werden auf 110 ml konzentriert mittels eines Drehverdampfers unter vermindertem Druck und der pH wird auf 5,8 eingestellt durch Zugabe von 4,2 ml 1M HCl. Das so eingestellte Konzentrat wird auf eine Säule von XAD-2 gegeben mit einer Bettdimension von 3,8 × 50 cm, die vorher gewaschen worden war mit 3 l 60%igem wässrigem Aceton (Volumen/Volumen) und anschliessend mit 3 l entionisiertem Wasser, 3 l von 5%igem (Gewicht/Volumen) Natriumchlorid und 1 l 25%igem (Gewicht/Volumen) Natriumchlorid in entionisiertem Wasser. Das angewendete Konzentrat lässt man auf das Niveau des Bettes abfließen. Das Antibiotikum wird eluiert mit entionisiertem Wasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml/min. 22 Fraktionen von jeweils 100 ml werden gesammelt, gerechnet von der ersten Anwendung der Probe. Die Bio-Aktivität erscheint in den Fraktionen 6 bis 22 mit einem Peak bei den Fraktionen 9 und 10. Fraktionen 9 bis 20 werden für die weitere Verarbeitung vereint. Ähnlich hergestellte Fraktionen werden vereint und die vereinten Fraktionen werden auf 70 ml konzentriert mittels eines Drehverdampfers unter vermindertem Druck.

Das Konzentrat wird auf eine Dowex-1 × 4 (Cl⁻) 400

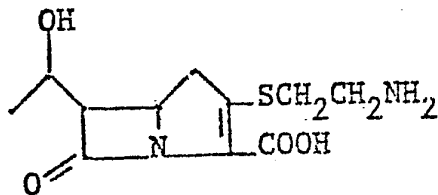
Maschen Säule mit einer Bettdimension von 2,2×27 cm gegeben. Die Säule wird mit 50 ml entionisiertem Wasser gewaschen und das Antibiotikum eluiert mit 2 l 0,070 m NaCl + 0,005 m NH₄Cl + 0,0001 m NH₃ in entionisiertem Wasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min. Fraktionen von 9,5 ml werden gesammelt.

Der Hauptpeak des Antibiotikums wird eluiert in den Fraktionen 142 bis 163. Die Fraktionen 146 bis 157 werden vereint für die weitere Verarbeitung.

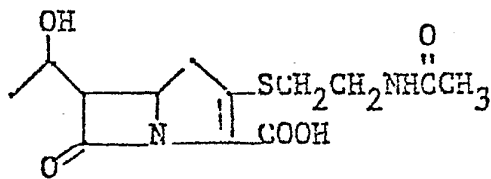
Die vereinten Fraktionen 146–157 werden konzentriert auf 3 ml durch Verdampfen unter vermindertem Druck auf einem Drehverdampfer und das Konzentrat wird durch Zugabe von 5 µl 1 m NH₃ auf pH 6,5 gebracht. Das Konzentrat wird auf eine Säule (2,2×70 cm) eines Bio-Gel P-2 (200 bis 400 Maschen) gegeben, die vorher gewaschen worden war mit 20 ml 5 m NaCl und 500 ml entionisiertem Wasser. Nachdem das Konzentrat auf das Bettniveau abgelaufen war, wurden 2 Spülungen mit jeweils 1 ml entionisiertem Wasser vorgenommen und wiederum bis zum Bettniveau ablaufen gelassen. Die Säule wird dann eluiert mit entionisiertem Wasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min. Fraktionen von 2,9 ml werden gesammelt.

Der Hauptpeak des Antibiotikums wird eluiert in den Fraktionen 63 bis 70. Fraktionen 64 und 65 werden für die weitere Aufarbeitung zusammengegeben.

Die vereinten Fraktionen 64 und 65 werden auf einem Dünnschichtverdampfer unter vermindertem Druck auf 2 ml konzentriert und dann in einer Umhüllung gefroren und lyophilisiert während 8 Stunden in einem 14 ml mit Schraubverschluss versehenen Gefäß, wobei man 2,25 mg des im wesentlichen reinen Antibiotikums 890A₁ erhält. Die N-Acetylgruppe wird abgespalten, wie vorher beschrieben, wobei man die freie Base erhält:



Herstellung von 890A₃, einem speziellen Isomeren



Ein Röhrchen einer lyophilisierten Kultur von *Streptomyces flavogriseus* MA-4434 (NRRL 8139) wird aseptisch geöffnet und der Inhalt wird suspendiert in einem Röhrchen, enthaltend 0,8 ml einer sterilen Davis-Salzlösung der folgenden Zusammensetzung:

Davis-Salz	
Natriumcitrat	0,5 g
K ₂ HPO ₄	7,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
destilliertes Wasser	1000 ml

Diese Suspension wird verwendet, um 4 Kulturen des Mediums A der folgenden Zusammensetzung zu beimpfen:

Medium A	
Glycerin	20,0 g

primäre Hefe	5,0 g
Fischmehl	15,0 g
destilliertes Wasser	1000 ml
Agar	20,0 g

pH: eingestellt auf 7,2 unter NaOH

Die beimpften Kulturen werden 1 Woche bei 27–28 °C bebrütet und dann bei 4–6 °C bis zur Verwendung aufbewahrt (nicht länger als 21 Tage).

Ein 1/3-Anteil des Wachstums aus 4 Kulturen wird zum Beimpfen von 12 verstöpselten 250-ml-Erlenmeyer-Kolben, enthaltend 50 ml Medium B der folgenden Zusammensetzung, verwendet:

Medium B	
Hefeautolysat (*Ardamine)	10,0 g
Glucose	10,0 g
Phosphatpuffer**	2,0 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg
destilliertes H ₂ O	1000 ml

pH: eingestellt auf 6,5 unter HCl oder NaOH

*Ardamine: Yeast Products Corporation

**Phosphatpufferlösung	
KH ₂ PO ₄	91,0 g
Na ₂ HPO ₄	95,0 g
destilliertes Wasser	1000 ml

Die Flasche mit den Keimen wird 1 Tag bei 27–28 °C auf einer Rüttelmaschine mit 220 U/min geschüttelt. Die Flasche und der Inhalt werden 1 Tag bei 4 °C stationär aufbewahrt.

44 2-l-Erlenmeyer-Kolben, jeweils enthaltend 200 ml von Medium C, werden mit 8 ml pro Kolben des Wachstums aus den beimpften Flaschen versetzt. Medium C hat die folgende Zusammensetzung:

Medium C	
Tomatenpaste	20,0 g
primäre Hefe	10,0 g
Dextrin (Amidex)	20,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 mg
destilliertes Wasser	1000 ml

45 pH: eingestellt auf 7,2–7,4 mit NaOH

Nach der Beimpfung werden die Produktionskolben bei 24 °C 4 Tage und 5 Stunden auf einer Schüttelmaschine, die mit 212 U/min betrieben wird, gerüttelt. Die Kolben werden dann entleert und auf Aktivität untersucht unter Verwendung von Standard *Salmonella gallinarum* MB-1287 und *Vibrio percolans* ATCC-8461-Probeplatten unter Verwendung von 1,25-cm-Probeplatten, die in die zentrifugierten Proben der Brühe eingetaucht wurden. Die Proben werden verdünnt mit 0,2 m Phosphatpuffer, pH 7,0, falls erforderlich. Die Ergebnisse werden nachstehend angegeben:

Zeitpunkt der Ernte (Harvest Age hours) h	101
pH	7,2
<i>Salmonella gallinarum</i> (mm Zone)	35
<i>Vibrio percolans</i> 1/10 Verdünnung (mm Zone)	34
890 Probeinheiten	121

Aus dieser Fermentation werden insgesamt 7 l der gesamten Brühe erhalten und diese werden auf 3 °C abgekühlt und zentrifugiert in 200-ml-Portionen bei 9000 U/min während jeweils 15 Minuten. Zu den vereinten überstehenden Lösungen werden 1,7 ml von 0,1 m neutralem EDTA zugegeben und der Ansatz wird auf 3 °C gehalten.

Die obengenannte Fermentation wird unter identischen Bedingungen wiederholt mit der Ausnahme, dass die 44 2-l-Erlenmeyer-Kolben mit 7 ml pro Flasche des Wachstums aus den die Kulturen enthaltenden Flaschen beimpft werden; der pH und die erhaltenen Prüfergebnisse werden nachfolgend angegeben:

Zeitpunkt der Ernte (Harvest Age hours) h	101
pH	7,3
Salmonella gallinarum (mm Zone)	38
Vibrio percolans $\frac{1}{10}$ Verdünnung (mm Zone)	39
890 Probeinheiten	92,8

Insgesamt 7,4 l der gesamten Brühe, die aus dieser Fermentation erhalten worden sind, werden auf 3 °C abgekühlt und jeweils 15 Minuten in 200-ml-Portionen bei 9000 U/min zentrifugiert. Zu den vereinten überstehenden Lösungen gibt man 1,8 ml 0,1m neutrales EDTA.

Das Überstehende von den zentrifugierten Brühen, wie es aus den beiden obengenannten Fermentationen in diesem Beispiel erhalten wurde, wird vereint, wobei man ein Gesamtvolumen von 13 l erhält.

Die vereinten überstehenden Lösungen werden durch eine Säule aus Dowex-1 $\times$ 2 (Cl⁻), 50–100 Maschen mit einer Bettdimension von 4,7 $\times$ 50 cm und einer Fließgeschwindigkeit von 60 25 ml/min gegeben. Die Säule wird gewaschen mit 1 l entionisiertem Wasser und das Antibiotikum wird mit 5 l einer 5%igen (Gewicht/Volumen) NaCl-Lösung, enthaltend 0,01m Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, und 25 μ Mol EDTA eluiert. Fraktionen von 220 ml werden gesammelt mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/min und die Fraktionen werden geprüft gegenüber *Salmonella gallinarum* MB-1287-Platten.

Antibiotische Aktivität liegt vor in den Fraktionen 3 bis 26 mit einem Peak bei den Fraktionen 5 und 6. Die Fraktionen 5 bis 9 werden vereint für die weitere Verarbeitung. Der pH der zusammengegebenen Fraktionen ist 10,8 und die zusammengegebenen Fraktionen enthalten 24% der Anfangs-Bioaktivität, gemessen gegenüber *Salmonella gallinarum* MB-1287-Platten.

Die vereinten Fraktionen 5 bis 9 werden auf 150 ml mittels eines Drehverdampfers unter vermindertem Druck konzentriert und auf eine Säule (4,9 $\times$ 47 cm) von XAD-2 gegeben, die vorher gewaschen worden war mit 5 l 60%igem (Volumen/Volumen) wässrigem Aceton und anschließend mit 5 l entionisiertem Wasser und 5 l 50 g/l NaCl in entionisiertem Wasser. Die Probe wird in 20-ml-Anteilen angewendet, wobei die Säule auf das Bettniveau jedesmal getränkt wird. Wenn die Anwendung beendet ist, werden drei 20-ml-Portionen von entionisiertem Wasser zugegeben und jedesmal auf das Bettniveau fließen gelassen. Die Probe wird eluiert mit entionisiertem Wasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min. Alle Massnahmen, bei denen die XAD-Säule verwendet wird, werden durchgeführt bei Raumtemperatur (24 °C) und die eluierten Fraktionen werden schnell abgekühlt in einem Eisbad unmittelbar nach dem Sammeln. Fraktionen von 95 bis 230 ml werden gesammelt.

Die antibiotische Aktivität erscheint in Fraktionen 2 bis 21, wie aus einer Probe von *Salmonella gallinarum* MB 1287-Platten gemessen wurde, mit einem Peak bei Fraktionen 5 bis 7 (die 510 bis 895 ml an eluiertem Volumen ausmachen, gerechnet von der ersten Anwendung des entionisierten Wassers). Fraktionen 6 bis 21 werden zusammengegeben.

Die zusammengegebenen Fraktionen 6 bis 21 werden unter vermindertem Druck auf einem Drehverdampfer auf 68 ml konzentriert und dann durch Zugabe von entionisiertem Wasser auf 112 ml verdünnt. Das Konzentrat wird auf eine Säule (2,2 $\times$ 21 cm) von Dowex-1 $\times$ 4 (Cl⁻) 400 Maschen gegeben. Die Säule wird mit 20 ml entionisiertem Wasser gewaschen und das Antibiotikum wird eluiert mit 2 l 0,07m NaCl + 0,005m NH₄Cl + 0,0001m NH₃ in entionisiertem Wasser mit einer Fließge-

schwindigkeit von 1,6 ml/min. Es werden Fraktionen von jeweils 8 ml gesammelt. Fraktionen 157 bis 179 haben die grösste Aktivität und werden zusammengegeben.

Diese zusammengegebenen Fraktionen werden konzentriert auf einem Drehverdampfer unter vermindertem Druck auf 7 ml, der pH wird auf 7,5 durch Zugabe von 20 μ l 1m NaOH eingestellt. Die Lösung wird weiter konzentriert auf 5 ml und auf eine Säule gegeben (2,2 $\times$ 75 cm) von Bio-Gel P-2, 200 bis 400 Maschen. Die Probe wird in dem Säulenbett mit zwei Waschun- 5 gen von jeweils 1 ml entionisiertem Wasser gewaschen und eluiert mit entionisiertem Wasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min. Zehn Fraktionen von 3,3 ml und anschließend 60 Fraktionen von 2,65 ml und zehn Fraktionen von 2,0 ml werden gesammelt.

Die Fraktionen werden auf den pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,0 durch Zugabe von 1,5 bis 2,5 μ l 0,1m NaOH eingestellt. Die Fraktionen 62, 63, 64 und 65 werden gefroren und einzeln in 14-ml-Glasröhrchen lyophilisiert und bei -20 °C unter Vakuum aufbewahrt.

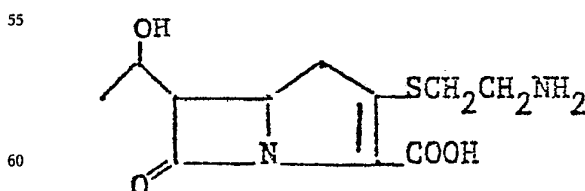
Zur Isolierung des Antibiotikums 890A₃ aus 890A₁ macht man von dem Vorteil Gebrauch der relativ höheren Beständigkeit des Antibiotikums 890A₃ gegen Abbau durch Penicillinase in der folgenden Weise:

Bio-Gel Fraktion 63 wird kombiniert mit Fraktionen 61, 66 und 67 aus der Bio-Gel-Säule. Zu diesen vier vereinten Fraktionen werden 0,2 ml 1m Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, und 0,2 ml Penicillinase (Difco «Bacto-Penase») gegeben. Nach 113 Minuten bei 23 °C werden weitere 0,2 ml Penicillinase hinzugefügt. Nach weiteren 7 Stunden bei Raumtemperatur werden weitere 0,2 ml 30 Penicillinase zugegeben, und nach weiteren 2 Stunden bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch auf einem Eisbad abgekühlt. Das fertige Reaktionsgemisch wird auf 15 ml durch Zugabe von 5 ml entionisiertem Wasser verdünnt.

Das Reaktionsgemisch wird adsorbiert an einer Dowex⁻¹ $\times$ 35 4 (Cl⁻) 400 Maschen-Säule, Bettdimension 2,15 $\times$ 40 cm. Das Antibiotikum 890A₃ wird eluiert mit 0,07m NaCl + 0,005m NH₄Cl + 0,0001m NH₃ in entionisiertem Wasser mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min. Fraktionen von 13,8 ml werden jeweils gesammelt. Fraktionen 187 bis 200 werden 40 zusammengegeben.

Die vereinigten Fraktionen werden konzentriert auf 4 ml mittels eines Drehverdampfers unter vermindertem Druck und das Konzentrat wird auf eine Säule (2,2 $\times$ 70 cm) Bio-Gel P-2, 200–400 Maschen, aufgegeben. Das Antibiotikum 890A₃ wird 45 mit entionisiertem Wasser eluiert mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min. 30 Fraktionen von 3,3 ml und anschließend 50 Fraktionen von 2,65 ml werden gesammelt.

Fraktionen 66 bis 70 werden vereint und die vereinten Proben werden auf 1,5 ml unter vermindertem Druck mittels eines 50 Drehverdampfers konzentriert und das Konzentrat wird gefroren und gefriergetrocknet, wobei man 5,4 mg eines Feststoffes erhält, der das Antibiotikum 890A₃ und restliches Salz enthält. Die N-Acetylgruppe ist abgespalten, wie vorher beschrieben, so dass man die freie Base erhält:



Das Antibiotikum Thienamycin und seine Herstellung sind beschrieben in DT-OS 25 52 638. Es ist erhältlich durch Züchten des Mikroorganismus *Streptomyces cattleya* (MA-4297), von dem eine Kultur bei der Kultursammlung der Northern Regional Research Laboratories, Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, V.St.A. hinterlegt und mit NRRL 8057 bezeichnet ist.