



Erfnungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

632 011

⑬ Gesuchsnummer: 4921/81

⑭ Inhaber:
Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.,
Chuo-ku/Tokyo (JP)

⑮ Teilgesuch von: 16056/76

⑯ Erfinder:
Takashi Osono, Bunkyo-ku/Tokyo (JP)
Yoshihiko Oka, Kawagoe-shi/Saitama (JP)
Shunichi Watanabe, Omiya-shi/Saitama (JP)
Takeshi Saito, Ota-ku/Tokyo (JP)
Hiroshi Gushima, Ageo-shi/Saitama (JP)
Keisuke Murakami, Wako-shi/Saitama (JP)
Isao Takahashi, Itabashi-ku/Tokyo (JP)
Hiroshi Yamaguchi, Omiya-shi/Saitama (JP)
Toshio Sasaki, Itabashi-ku/Tokyo (JP)
Kiyoshi Susaki, Ageo-shi/Saitama (JP)
Shuichi Takamura, Ageo-shi/Saitama (JP)
Toshiaki Miyoshi, Itabashi-ku/Tokyo (JP)

⑭ Anmeldungsdatum: 21.12.1976

⑰ Vertreter:
Rebmann-Kupfer & Co., Zürich

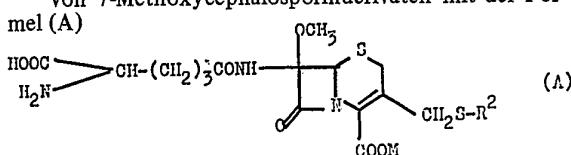
⑮ Priorität(en): 25.12.1975 JP 50-155646

⑯ Patent erteilt: 15.09.1982

⑰ Patentschrift veröffentlicht: 15.09.1982

⑲ Verfahren zur Herstellung von 7-Methoxycephalosporinderivaten.

⑳ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 7-Methoxycephalosporinderivaten mit der Formel (A)



Die erfindungsgemäss hergestellten Produkte haben antibiotische Eigenschaften. Ferner können sie als Zwischenprodukte zur Herstellung wertvoller Antibiotika Verwendung finden.

worin R² eine Stickstoff als Ringheteroatom enthaltende heterocyclische Gruppe darstellt und M bedeutet ein Wasserstoffatom, Alkalimetall, Erdalkalimetall, Schwermetall oder Basen, die quaternäres Salz oder Aminsalz bilden, dadurch gekennzeichnet, dass Streptomyces oganensis ATCC 31167 in einem Kulturmedium gezüchtet wird, welches Nährstoffe mit dem Zusatz eines heterocyclischen Thiols mit der Formel



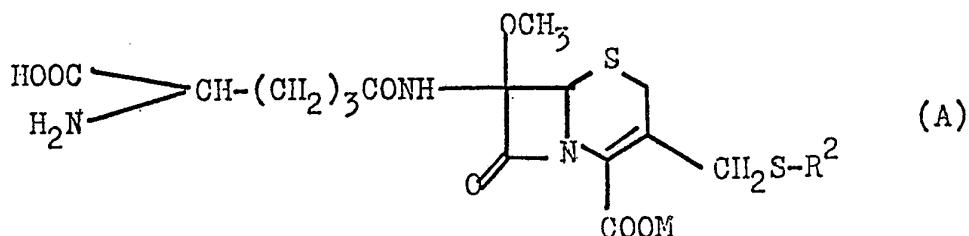
worin R² die vorstehend genannte Bedeutung hat, oder eines Salzes des heterocyclischen Thiols oder eine Verbindung mit der Formel



worin R² die gleiche schon genannte Bedeutung hat, enthält.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von 7-Methoxycephalosporinderivaten mit der Formel (A)



worin R² eine Stickstoff als Ringheteroatom enthaltende heterocyclische Gruppe darstellt und M bedeutet ein Wasserstoffatom, Alkalimetall, Erdalkalimetall, Schwermetall oder Basen die quaternäres Salz oder Aminsalz bilden, dadurch gekennzeichnet, dass Streptomyces organonensis ATCC 31167 in einem Kulturmedium gezüchtet wird, welches Nährstoffe mit dem Zusatz eines heterocyclischen Thiols mit der Formel



worin R² die vorstehend genannte Bedeutung hat, oder eines Salzes des heterocyclischen Thiols oder eine Verbindung mit der Formel



15 worin R² die gleiche schon genannte Bedeutung hat, enthält.

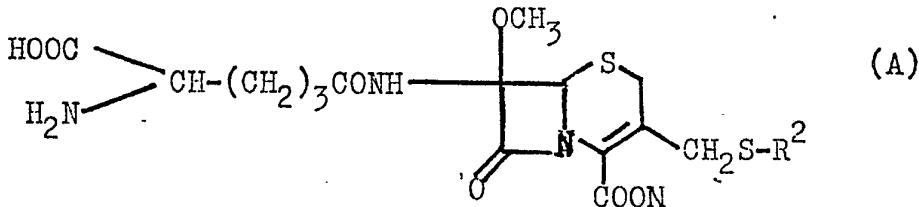
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R² eine 1-Methyl-1H-tetrazol-5-ylgruppe ist und M ein Wasserstoffatom darstellt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R² eine 5-Carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-ylgruppe und M ein Wasserstoffatom darstellt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R² eine 5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-ylgruppe und M ein Wasserstoffatom darstellt.

25 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R² eine 1,3,4-Thiadiazol-2-ylgruppe und M ein Wasserstoffatom ist.

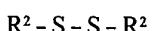
Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von 7-Methoxycephalosporinderivaten mit der 35 Formel (A)



worin R² eine Stickstoff als Ringheteroatom enthaltende heterocyclische Gruppe darstellt und M bedeutet ein Wasserstoffatom, Alkalimetall, Erdalkalimetall, Schwermetall oder Basen, die quaternäres Salz oder Aminsalz bilden, dadurch gekennzeichnet, dass Streptomyces organonensis ATCC 31167 in einem Kulturmedium gezüchtet wird, welches Nährstoffe mit dem Zusatz eines heterocyclischen Thiols mit der Formel



worin R² die vorstehend genannte Bedeutung hat, oder eines Salzes des heterocyclischen Thiols oder eine Verbindung mit der Formel



worin R² die gleiche schon genannte Bedeutung hat, enthält.

Als stickstoffhaltige heterocyclische Gruppe, die durch R² in der vorstehenden allgemeinen Formel angezeigt wird, werden zur Verdeutlichung genannt: eine Carboxymethylthio-1,3-thiadiazol-2-yl-Gruppe, eine 1-Methyl-1H-tetrazol-5-yl-Gruppe, eine 5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl-Gruppe, eine 1,3,4-Thiadiazol-2-yl-Gruppe usw.

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

55 sind 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure, 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure, 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure, 7-(5-

60 Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure, sowie die Salze dieser Verbindungen.

Einige 7-Methoxy-3-heterocyclothiomethylcephalosporine 65 sind in der GB-PS 1 321 412 (1970) als durch chemische Synthese erhältliche Verbindungen beschrieben, jedoch sind in dieser britischen Patentschrift keine praktischen physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser Verbindungen angegeben.

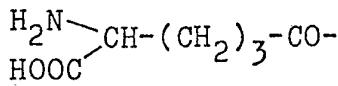
Aufgabe dieser Erfindung ist es, neue 7-Methoxycephalosporinderivate und ein Verfahren zur Herstellung dieser Derivate durch Fermentation zur Verfügung zu stellen.

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

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

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

Die Verbindungen der Formel A besitzen selbst ausgezeichnete antimikrobielle Aktivitäten, und weiterhin können die antimikrobiellen Eigenschaften und die antimikrobiellen Spektren der Verbindungen erhöht oder gewechselt werden, indem die Acylgruppen-Seitenkette in der 7-Position, dargestellt durch



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

Die Verbindungen der Formel A besitzen die Eigenschaften wie ein amphoteres Material, denn die Verbindungen haben eine Aminogruppe und zwei Carboxygruppen im Molekül, und dadurch ist die Isolierung und Reinigung der hergestellten Verbindungen mühsam.

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

Die mykologischen Eigenschaften des Stammes sind die folgenden:

I. Morphologische Charakteristiken von *Streptomyces oganonensis* Y-G19Z-Stamm

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

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

15

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

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

Tyrosin-Formation	negativ
Nitrat-Reduktion	positiv
Magermilch-Koagulation	positiv, schwach

Magermilch-Peptonisation	positiv, schwach
Hydrolyse von Stärke	positiv
Verflüssigung von Gelatine	positiv, schwach
Cellulose-Abbau	negativ
Hämolyse	positiv
Löslichmachung von Calciummalat	positiv

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

Kohlenstoffquelle	Ausnutzung
Glukose	+
Arabinose	+
Sukrose	-
Xylose	+
Inositol	-
Mannitol	+
Fruktose	+
Rhamnose	-
Raffinose	-

Charakteristische Merkmale für *Streptomyces oganensis* Y-G19Z-Stamm können wie folgt zusammengefasst werden:

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

Bei der Durchforschung bekannter Stämme, die die vorstehenden Eigenschaften aufweisen, können als am nächsten kommende Streptomyceten die folgenden angesehen werden: *Streptomyces globisporus*, beschrieben in S. A. Waksman: «The Actinomycetes» 2, 218 (1961) und International Journal of Systematic Bacteriology, 18, (4) 324-325 (1968).

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

Tabelle

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

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

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

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

Streptomyces griseus, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces fimbriatus*, *Streptomyces halstedii*, *Streptomyces charles* treusis und *Streptomyces lactamdurans* (vgl. Japanische Patent-Offenlegungsschrift 3286/71 und Belgische Patent-schrift 764 160) sowie *Streptomyces lipmanii* (US-PS 3 719 563), *Streptomyces clavuligerus* (Japanisches Patent 45 594/74), *Streptomyces wadayamensis* (Japanische Offenlegungsschrift 15 26488/74), *Streptomyces jumonjinensis* (Japanische Offenlegungsschrift 42893/74), *Streptomyces heteromorphus* und *Streptomyces panayensis* (Japanische Offenlegungsschrift 53594/75), und *Streptomyces chartreusis* SF-1623 (Japanische Offenlegungsschriften 82291/75 und 121 488/75).

Die Herstellung der besprochenen Verbindung wird ausgeführt, indem man den erwähnten 7-Methoxycephalosporin-Antibiotika produzierenden Stamm kultiviert in einem üblichen Kulturmedium, dem ein Zusatz an heterocyclischer Thiolverbindung zugegeben wurde entsprechend der heterocyclischen

Thiogruppe, die in die 3-Position eingeführt werden soll. Beispiele für die heterocyclischen Thiole, die dem Kulturmedium in dieser Erfindung hinzugefügt werden, sind: Pyrrolthiol, Imidazolthiol, Dihydroimidazolthiol, Pyrazolthiol, Triazolthiol, Tetrazolthiol, Methyltetrazolthiol, Pyridinthiol, Diazothiol, Thiazolthiol, Dihydrothiazolthiol, Thiadiazolthiol, Thiatriazolthiol, Oxazolthiol, Isoxazolthiol, Oxadiazolthiol, Indolthiol, Benzimidazolthiol, Benzoxazolthiol, Benzothiazolthiol, Triazolpyridinthiol, Purinthiol usw. Diese heterocyclischen Ringe können einen oder mehrere Substituenten aufweisen, wie ein Halogenatom, eine Amino-, Nitro-, Alkyl-, Hydroxy-, Alkoxy-, Aryl-, Aralkyl-, Furyl-, Thienyl-, Oxazolyl-, Carboxy-, Carboxymethyl-, Carboxyalkylthio-, Carboxyalkyloxy-Gruppe usw.

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

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

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

Die Herstellung der gemäss dieser Erfindung erhältlichen neuen Antibiotika wird durch Kultivierung des im Patentanspruch 1 genannten Stammes der Art *Streptomyces* in einem Kulturmedium unter Zugabe der vorstehend schon beschriebenen heterocyclischen Thiolverbindung oder des Salzes oder ihres Derivates R^2S-S-R^2 durchgeführt. Die Kultivierung wird nach den üblichen herkömmlichen Methoden zur Züchtung von Mikroorganismen durchgeführt, jedoch wird die submerse Kultur in einem flüssigen Kulturmedium bevorzugt. Jedes Kulturmedium, welches Nährstoffe für die 7-Methoxycephalosporin-Antibiotika herstellenden Stämme der Art *Streptomyces* enthält, kann verwendet werden. Es können synthetische Kulturmedien, halb-synthetische Kulturmedien und natürliche Kulturmedien, die die vorstehend genannten Nährstoffe enthalten, in dieser Erfindung Verwendung finden. Für die Zusammenstel-

lung des Kulturmediums können Glukose, Sukrose, Mannitol, Glycerin, Dextrin, Stärke, vegetabile Öle usw. als Kohlenstoffquellen Verwendung finden, und Fleischextrakt, Peptone, Klebermehl, Baumwollsaatmehl, Sojabohnenmehl, Erdnussmehl, Fischmehl, Kornschempe, Trockenhefe, Hefeextrakt, Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat, Harnstoff und andere organische und anorganische Stickstoffquellen können als Stickstoffspender der Verwendung finden. Ebenso können, falls erforderlich, Metallsalze, wie Sulfate, Nitrate, Chloride, Carbonate, Phosphate usw. von Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium, Zink und Eisen zu dem Kulturmedium hinzugefügt werden. Weiterhin können, falls erforderlich, Materialien, die die Bildung der Antibiotika begünstigen, oder Entschäumungsmittel, wie Methionin, Cystein, Cystin, Methyloleat, Lardöl, Siliconöl, oberflächenaktive Mittel usw., in geeigneter Weise zu dem Kulturmedium hinzugefügt werden.

Das vorstehend genannte heterocyclische Thiol, dessen Salz oder dessen Derivat $R^2-S-S-R^2$ wird gewöhnlich in einer Konzentration von 0,1–5 mg/ml, vorzugsweise 0,5–2 mg/ml als heterocyclisches Thiol hinzugefügt. Es kann zu dem Kulturmedium als eine sturzartige Zugabe vor der Kultivierung oder auch in verschiedenen unterteilten Portionen in den Eingangsstufen der Kultivierung zugefügt werden. Es ist im allgemeinen günstig, die Kultivierung unter aeroben Bedingungen durchzuführen. Die Kultivierungstemperatur liegt gewöhnlich zwischen etwa 18 °C bis etwa 35 °C, vorzugsweise um 30 °C. Gute Ergebnisse werden erhalten, wenn das pH des Kulturmediums auf etwa 5–10, vorzugsweise etwa 6–8 gehalten wird. Der Kultivationszeitablauf hängt von der Zusammensetzung und der

Temperatur des verwendeten Kulturmediums ab, aber im allgemeinen werden etwa 3 Tage bis etwa 10 Tage benötigt. Das hergestellte Material wird selektiv in dem Medium angereichert, nachdem die Kultivierung beendet ist.

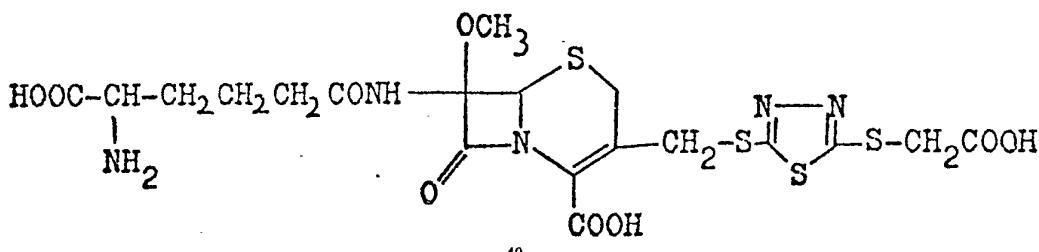
Das gemäß dieser Erfindung hergestellte Material kann isoliert und aus der Kulturbrühe nach den üblichen Methoden gewonnen werden, die für das Isolieren von Antibiotika aus dem kultivierten Mycel-Nährboden üblich sind. Das erfindungsgemäß hergestellte Antibiotikum ist hauptsächlich in der Kulturbrühe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

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

Einige praktische Beispiele der neuen 7-Methoxycephalosporin-Verbindungen dieser Erfindung werden nachfolgend genannt.

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

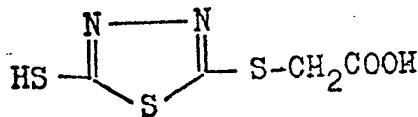
30



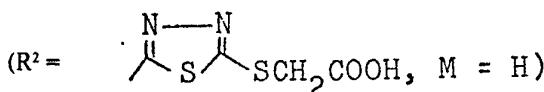
40

Additionsverbindung:

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



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung I mit der allgemeinen Formel A



sind die folgenden:

1. weisses Pulver;
2. Schmelzbeginn bei 156–160 °C. Hierbei tritt Braunfärbung ein, und die Zersetzung beginnt ab etwa 170 °C;
3. leicht löslich in Wasser, spärlich löslich in Methanol, und sehr spärlich löslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
4. amphoteres Material mit positiver Ninhydrin-Reaktion;
5. es besitzt das ultraviolette Absorptionsspektrum gemäß Fig. 1 der beigelegten Zeichnung, wenn es in einer 1/100 M

Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 6,4 gemessen wird, wobei das Absorptionsmaximum bei 287 m μ liegt;

6. es besitzt das Infrarot-Absorptionsspektrum gemäß Fig. 45 2, wenn es in der Kaliumbromid-Tablette gemessen wird. Es ergeben sich Absorptionen bei 3413 cm⁻¹, 2920 cm⁻¹, 1763 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹, 1515 cm⁻¹ und 1380 cm⁻¹;

7. Bei der Bestimmung des kernmagnetischen Resonanzspektrums unter Verwendung von TMS als äusserem Standard 50 in schwerem Wasser werden folgende Signale erhalten:

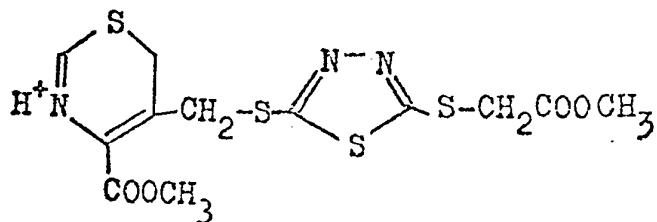
δ -Wert (ppm):
2,35 (4H, Multiplett), 2,96 (2H, Multiplett),
4,00 (3H, Singlett), 3,73 – 4,33 (2H, Quartett, J = 18 Hz),
4,25 (1H, Multiplett), 4,44 (2H, Singlett),
5,42 – 4,91 (2H, Quartett, J = 14 Hz),
5,63 (1H, Singlett);

8. Das im derzeitig reinsten Zustand hergestellte Produkt besitzt die folgenden elementar-analytischen Werte:

C: 35,95%, H: 3,87%, N: 10,85%, S: 18,33%;

60 9. es ergibt α -Aminoadipinsäure bei der Hydrolyse mit 6 n Chlorwasserstoffsäure;

10. das Massenspektrum dieser Verbindung ergibt nach einer N-Chloracetylierung der Verbindung und Überführung des Produktes in den Methylester das folgende Fragment mit m/e 65 392, das heißt,



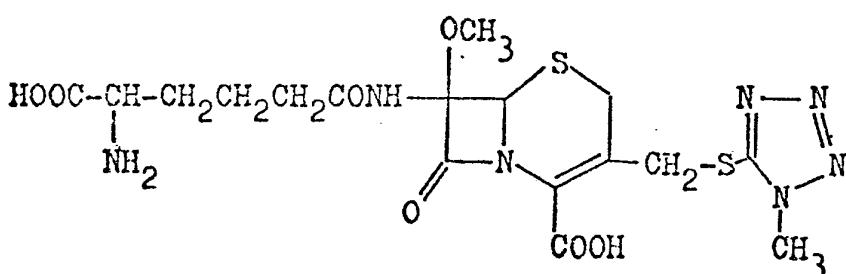
Unter Berücksichtigung aller vorstehenden Ergebnisse ist es ersichtlich, dass diese Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung ergibt eine Absorption bei 1763 cm^{-1} (cyclisches Lactam) im Infrarot-Absorptionsspektrum, und die Gegenwart der Signale bei 4,00 p p m

(3H, Singlett, 7-OCH₃), 5,63 p p m (1H, Singlett, 6-CH), 3,73 – 4,33 (2H, Quartett, J = 18 Hz, 2-CH₂) und 4,42 – 4,91 (2H, Quartett, J = 14 Hz, 3-Seitenkette CH₂) in dem kernmagnetischen Resonanzspektrum. Die Verbindung ergibt α -Aminoadipinsäure bei der Säurehydrolyse, ferner ergibt die Verbindung Absorptionen bei 4,44 p p m (2H, Singlett, CH₂ von -S-CH₂-COOH) im nuklearmagnetischen Resonanzspektrum und ausserdem das Fragment von m/e 392 im Massenspektrum des Derivates; aus diesen Gründen ist entschieden worden, dass die

¹⁰ Verbindung die vorstehend genannte Struktur hat, in die das heterocyclische Thiol eingeführt worden ist.

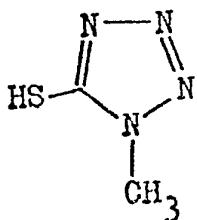
II. 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure:

15

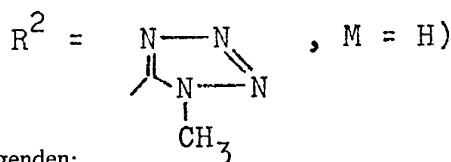


Additionsverbindung:

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



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung II der Formel A



sind die folgenden:

1. weisses Pulver;
2. ergibt braune Verfärbung und Zersetzung bei 160–170 °C;
3. leicht löslich in Wasser, gering löslich in Methanol und spärlich löslich in anderen organischen Lösungsmitteln;
4. amphoteres Material mit positiver Ninhydrinreaktion;
5. es wird das in Fig. 3 dargestellte Ultraviolet-Absorptionspektrum bei Messung in 1/100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH von 6,4 erhalten. Das Absorptionsmaximum liegt bei 273 m μ ;
6. es wird das in Fig. 4 dargestellte Infrarot-Absorptionspektrum bei Messung der Kaliumbromidtablette erhalten. Es

wurden Absorptionen bei 3413 cm $^{-1}$, 2920 cm $^{-1}$, 1765 cm $^{-1}$, 1620 cm $^{-1}$, 1515 cm $^{-1}$ und 1390 cm $^{-1}$ festgestellt;

⁷ das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als externem Standard in schwefelhaltigem Wasser, ergab die folgenden Signale:

8-Wert (p p m):

2,36 (4H, Multiplett), 2,96 (2H, Multiplett), 3,98 (3H, Singlett), 4,38 (1H, Multiplett),

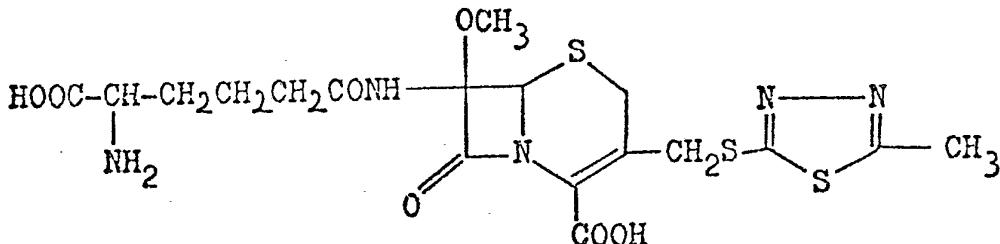
³⁵ 4,50 (3H, Singlett), 5,59 (1H, Singlett);

⁸ das bis jetzt in reinstem Zustand erhaltene Material ergab die folgenden elementar-analytischen Werte: C: 37,48%, H: 4,25%, N: 16,74% und S: 10,90%;

⁹ es wird α -Aminoadipinsäure erhalten, wenn mit 6 n Chlorwasserstoffsaure hydrolysiert wurde. Es wird 5-Mercapto-1-methyl-1H-tetrazol durch Hydrolyse in Methanol durch Dowex 50 W (H-Typ) erhalten;

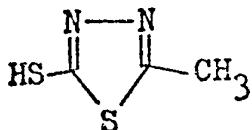
Berücksichtigt man die vorstehenden gesamten Ergebnisse, so ergibt sich, dass die Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung ergibt Signale bei 3,98 p p m (3H, Singlett, 7-OCH₃) und 5,59 p p m (1H, Singlett, 6-CH) bei den kernmagnetischen Resonanzspektren und Absorption bei 1765 cm^{-1} (cyclisches Lactam) im Infrarot-Absorptionspektrum. Ferner wird α -Aminoadipinsäure durch Säurehydrolyse erhalten. Ferner ergibt sich aus der Tatsache der Absorption bei 450 p p m (3H, Singlett, Tetrazol-N-methyl) im kernmagnetischen Resonanzspektrum und auch aus der Tatsache, dass 5-Mercapto-1-methyl-1H-tetrazol durch milde Hydrolyse erhalten wird, dass der Verbindung die vorstehend erläuterte Struktur zuerkannt wurde, in die das heterocyclische Thiol eingeführt wurde.

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

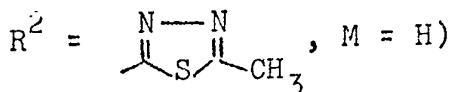


Additionsverbindung:

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



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung III mit der Formel A



sind die folgenden:

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

7. das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als externem Standard in schwerem Wasser, ergibt die folgende Signale:

δ -Wert (ppm):

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

8. die gegenwärtig am reinsten hergestellte Verbindung

10 weist die folgenden elementar-analytischen Werte auf:

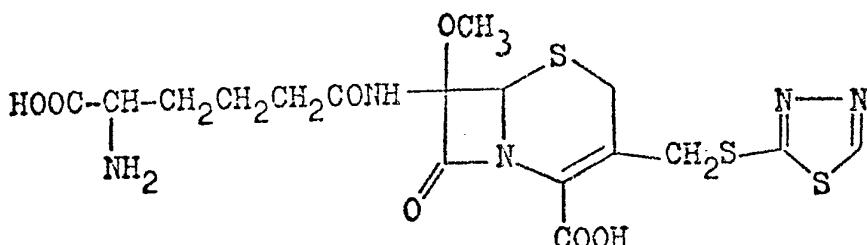
C: 37,82%, H: 4,01%, N: 12,90%, S: 14,97%

9. es wird α -Aminoadipinsäure erhalten, wenn mit 6 n Chlorwasserstoffsäure hydrolysiert wird. Es wird auch 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol erhalten, wenn in Methanol mit Dowex 15 50 W (H-Typ) hydrolysiert wird.

Wenn man alle vorstehenden Ergebnisse berücksichtigt, ist es ersichtlich, dass die Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung weist die Absorption bei 1765 cm $^{-1}$ (cyclisches Lactam) im Infrarot-Absorptionspektrum auf. Ferner werden die Signale bei 3,99 ppm (3H, Singlett, 7-OCH $_3$), 5,63 ppm (1H, Singlett, 6-CH), 3,72–4,31 ppm (2H, Quartett, $J = 18$ Hz, 2-CH $_2$), 4,40–4,95 (2H, Quartett, $J = 14$ Hz, 3-Seitenkette CH $_2$) erhalten. Es wird α -Aminoadipinsäure bei der Säurehydrolyse erhalten; und weiter auf 25 Grund der Tatsache, dass die Absorption bei 3,19 ppm (3H, Singlett, Thiadiazol C-CH $_3$) in dem kernmagnetischen Resonanzspektrum erhalten wird und auch 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol durch milde Hydrolyse erhalten wird, wird der Verbindung die vorstehend erläuterte Struktur zugekannt, in 30 die das heterocyclische Thiol eingeführt wurde.

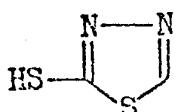
IV. 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure.

35

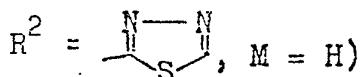


Additionsverbindung:

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



Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der hergestellten Verbindung IV der Formel A



sind die folgenden:

1. leicht gelbweisses Pulver;
2. sie zeigt keinen bestimmten Schmelzpunkt, jedoch erfolgen Braunverfärbung und Zersetzung bei etwa 175–180 °C;
3. leicht löslich in Wasser, schwach löslich in Methanol,

jedoch in anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich;

50 4. amphoteres Material mit positiver Ninhydrin-Reaktion;

5. ergibt das in Fig. 7 dargestellte Ultraviolet-Absorptionspektrum bei Messung in einer 1:100 M Phosphat-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 6,4, Absorptionsmaximum bei 274 m μ ;

6. es wird das in Fig. 8 dargestellte Infrarot-Absorptionspektrum erhalten, wenn mit der Kaliumbromid-Tablette gemessen wurde, wobei die Absorptionen bei 3400 cm $^{-1}$, 2925 cm $^{-1}$, 1765 cm $^{-1}$, 1610 cm $^{-1}$, 1515 cm $^{-1}$ und 1365 cm $^{-1}$ liegen;

60 7. das kernmagnetische Resonanzspektrum, gemessen unter Verwendung von TMS als externem Standard in schwerem Wasser, ergibt die folgenden Signale:

δ -Wert (ppm):

- 2,30 (4H, Multiplett), 2,93 (2H, Multiplett), 3,69–4,29 (2H, Quartett, $J = 18$ Hz), 3,97 (3H, Singlett), 4,26 (1H, Multiplett), 4,45–4,99 (2H, Quartett, $J = 14$ Hz), 5,56 (1H, Singlett), 9,85 (1H, Singlett);

65 8. das derzeit im reinsten Zustand erhältene Produkt besitzt die folgenden elementar-analytischen Werte:

C: 37,53%, H: 4,36%, N: 12,77%, S: 16,42%;

9. es wird α -Aminoadipinsäure bei der Hydrolyse mit 6 n Chlorwasserstoffsäure erhalten. Es wird auch 2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol bei der Hydrolyse in Methanol mit Dowex 50 W (H-Typ) erhalten.

Berücksichtigt man alle Ergebnisse, so ergibt sich, dass die Verbindung eine 7-Methoxycephalosporin-Verbindung ist, denn die Verbindung ergibt im Infrarot-Absorptionsspektrum eine Absorption bei 1765 cm^{-1} , und es werden die Signale bei $3,97\text{ p p m}$ (3H, Singlett, 7-OCH₃), $5,56\text{ p p m}$ (1H, Singlett, 6-CH), $3,69\text{--}4,29\text{ p p m}$ (2H, Quartett, J=18 Hz, 2-CH₂), $4,45\text{--}4,99\text{ p p m}$ (2H, Quartett, J=14 Hz, 3-Seitenkette CH₂) erhalten. α -Aminoadipinsäure wird durch Säurehydrolyse erhalten. Aus den Tatsachen, dass die Absorption bei $9,85\text{ p p m}$ (1H, Singlett, Thiazol CH) im kernmagnetischen Resonanzspektrum vorhanden ist und 2-Mercapto-1,3,4-thiadiazol bei milder Hydrolyse erhalten wird, ist der Verbindung die zuvor genannte Struktur zugeordnet worden, in die das heterocyclische Thiol eingeführt worden ist.

Nachfolgend werden die Ergebnisse von verschiedenen chromatographischen Analysen und Papierelektrophoretischen Untersuchungen der hergestellten Verbindungen I, II, III und IV angegeben.

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

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

Verwendetes Entwicklungslösemittelsystem (Volumenverhältnis):

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

Die Kontrollprobe, Cephamycin C, ist 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-carbomoyloxymethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure.

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

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

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

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

- 5 Säule: 3 × 500 mm Säule aus rostfreiem Stahl
 Kunsharz: Hitachi 2610 (kationisches Austauschharz)
 Entwicklungslösungsmittelsystem: 0,2 M Citratpufferlösung (pH 3,6).
 Fliessgeschwindigkeit: 0,6 ml/min.
 Schreibträgergeschwindigkeit: 1,0 cm/min.

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

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

- Säule: μ Bondapak C₁₈ (Hersteller: Waters Ltd.) 4 × 300 mm.
 Entwicklungslösungsmittel-System: Acetonitril: 0,1 % Essigsäurelösung (pH 3,3) (1 : 9 im Volumenverhältnis).
 Fliessgeschwindigkeit: 0,8 ml/min.
 Schreibträgergeschwindigkeit: 1,0 cm/min.

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

Die durch Hochspannungs-Papierenktrophorese erhaltenen Ergebnisse sind die folgenden:

- Filterpapier: Wattman Nr. 1
 Entwicklungslösungsmittel: 10 %ige Essigsäure (pH 2,2).
 Spannung: 42 Volt/cm.

Laufzeit: 1 Stunde.

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

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

Herzinfusions-Agar Plattenmethode
 (verwendete 500 μ g/ml-Lösung)

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

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

Bemerkung:

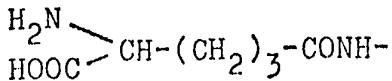
- I: Verbindung I dieser Erfindung
 II: Verbindung II dieser Erfindung
 III: Verbindung III dieser Erfindung
 IV: Verbindung IV dieser Erfindung
 C: Cephalosporin C (Vergleich)

Jede der erfundungsgemäss hergestellten Verbindungen I, II, III und IV kann in verschiedenen Formen, einzeln oder in Kombination mit anderen Medikamenten, verwendet werden. Dies bedeutet, dass die Verbindungen dieser Erfindung oral, durch intramuskuläre Injektionen, durch intravenöse Injektion etc. in der Form von Kapseln, Tabletten, Pulver, Granulaten, Lösungen und Suspensionen verabreicht werden können. Verschiedene Träger werden den Zubereitungen hinzugefügt, zum Beispiel Mannitol, Sukrose, Glukose, sterilisiertes destilliertes Wasser, Salzlösung und ein vegetables Öl, wie Erdnussöl, Sesamöl. Weiterhin können andere Ingredientien, wie Stabilisatoren, Bindemittel, Antioxidantien, Konservierungsmittel, ein Gleitmittel bei der Herstellung von Tabletten, Suspendiermittel, Viskositätsmittel, Duftstoff usw., hinzugefügt werden.

Als Salze der Verbindungen der Formel A werden die Salze mit den im Patentanspruch 1 definierten Kationen M, die pharmakologisch nichttoxisch oder brauchbar sind, verwendet. Die Dosierung der Medikamente hängt hauptsächlich von dem Zustand und dem Gewicht des Wirtes ab. Sie hängt auch von der Verabreichungsart ab, z. B. orale oder parenterale Verabreichung. Im allgemeinen werden 50 mg/kg in einer Dosis oder in einigen aufgeteilten Dosen pro Tag verabreicht.

Die Verbindungen A 1 dieser Erfindung besitzen ausgezeichnete antimikrobielle Aktivitäten; diese werden für die Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen bei Mensch und Tier verwendet. Ferner können sie auch in geeigneter Weise als Zwischenprodukte zur Herstellung anderer effektiver 7-Methoxycephalosporin-Derivate Verwendung finden. In solchen Fällen wird es bevorzugt, die Verbindung der Formel A 1 als reines Produkt oder als ein hochkonzentriertes Rohprodukt zu isolieren.

Besonders wenn die Substituentengruppe



in der 7-Position der Verbindung der Formel A durch eine andere Acylamidgruppe ersetzt wird, verschwinden die amphoteren Eigenschaften und das so modifizierte saure Produkt wird zur Isolierung gut geeignet, und es wird in organischen Lösungsmitteln löslich. Daher wird die Modifikation der Verbindung der Formel A, wie vorstehend schon erläutert, für die Anwendung in der industriellen Praxis bevorzugt.

Die In-vivo-Effekte der Verbindungen II, III sind nachstehend angegeben:

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

Die Kontrollgruppe bestand jedesmal aus 10 Mäusen

5	Dosis (mg/Maus)	E. coli NIHJ			Proteus mirabilis 1287			
		3	1	0,5	0	3	1	0,5
10	Probe II	100	100	100	0	40	20	0
10	Probe III	80	80	40	0	100	20	20

Nachstehend werden die Beispiele dieser Erfindung im einzelnen verdeutlicht.

15

Beispiel 1

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxy-methylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl) thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure I:

20 Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in eine 500 ml Sakaguchiflasche mit je 100 ml eingefüllt und bei 120° C für 20 Minuten sterilisiert. Jede Flasche 25 wurde mit Streptomyces organonensis Y-G19Z-Stamm beimpft und 48 Stunden bei 30° C kultiviert.

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

Weiterhin wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminosäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, jeweils in zwei 100 Liter Fermentoren zusammen mit 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel eingefüllt. Es wurde 30 Minuten bei 120° C sterilisiert. Jedes Medium wurde mit 800 ml der Züchtungskultur beimpft, und dann wurde 24 Stunden bei 30 °C kultiviert. In wässriger Natriumhydroxidlösung 40 wurde 5-Mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-thioessigsäure aufgelöst, und die gebildete Lösung wurde bei hohem Druck sterilisiert und zu jedem Fermentor bis zu 0,05% des Impfmaterials zugegeben und dann wurde 90 Stunden kultiviert.

Nach vollständiger Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf 45 pH 2,0 eingestellt und dann mit Radiolite (als Filterhilfsmittel) vermischt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die Filtrate wurden miteinander vereinigt, und es wurden 100 Liter Filtratgemisch erhalten. Die Filtrate wurden auf pH 3,0 mit wässriger Natriumhydroxidlösung einge stellt und durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2 Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem Aceton eluiert. Das Eluat wurde gesammelt und eingegengt auf 5,5 Liter. Nach Entfernung der sich gebildeten Verunreinigungen wurde Wasser zu dem Rückstand hinzugefügt, um 10 Liter Lösung zu erhalten. Die so erhaltene Lösung wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwas serstoffsäurelösung eingestellt und dann durch eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ)-Säule gegeben. Nach Waschen der Säule mit 6 Liter Wasser wurde mit wässriger Lösung (pH 7,2), 55 die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurden etwa 5 Liter Lösung mit antimikrobiellem aktivem Material erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,0 einge stellt, durch eine 1 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben, und nach dem Waschen der Säule mit Wasser wurde die Säule 60 mit wässrigem 50%igem Aceton gewaschen. Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung mit antimikrobiellem aktivem Material erhalten. Durch Lyophilisierung der Lösung wurde etwa 18 g Rohprodukt der hergestellten Verbindung I erhalten.

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

Dann wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : Wasser (7:3 Volumenverhältnis) verwendet, um den erhaltenen Rückstand des Produktes einer Säulenchromatographie unter Verwendung von mikrokristalliner Cellulose (Avicel), präpariert mit einem Lösungsmittelgemisch der gleichen, vorstehend angegebenen Zusammensetzung, zu unterwerfen. Die erhaltene antimikrobiell aktive Fraktion wurde tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen, und mit einem Gemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21:3:7:9 Volumenverhältnis) entwickelt. Dann wurde Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin aufgesprühnt und anschliessend erwärmt, um die Färbung zu entwickeln. Dann wurden die Fraktionen mit einem Rf-Wert von 0,39 gesammelt, die Fraktion im Vakuum bei etwa 45–50 °C zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde einer Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen. Die Füllung war mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21:3:7:9 Volumenverhältnis) präpariert. Die so erhaltene antimikrobiell aktive Fraktion wurde dann einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF unter Verwendung des vorstehend genannten Lösungsmittelgemisches unterworfen und unter gleicher Nachbehandlung weiterverarbeitet. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Produktrückstand wurde mit mikrokristalliner Cellulosesäulenchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6:1,5:2,5 im Volumenverhältnis) weitergereinigt. Die gereinigte aktive Fraktion wurde zur Trockne eingedampft und dann in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgenommen. Die Lösung wurde in einer Säule Sephadex G-10 unter Verwendung von Wasser entwickelt. Die Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität wurden gesammelt und einer Dünnschichtchromatographie, wie schon vorstehend erläutert, unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6:1,5:2,5 im Volumenverhältnis) unterworfen. Die Fraktionen mit Rf-Werten 0,32 wurden gesammelt, eingeengt und dann einer Lyophilisation unterworfen. Es wurden etwa 80 mg weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Beispiel 2

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure II:

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1 Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchi-Flaschen mit jeweils 100 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Dann wurde jedes Medium mit Streptomyces oganonensis Y-G197-Stamm beimpft. Anschliessend wurde 48 Stunden bei 30 °C kultiviert. Dann wurde das schon genannte Kulturmedium in zwei Liter Sakaguchiflaschen mit jeweils 400 ml eingefüllt. Nach dem Sterilisieren für 20 Minuten bei 120 °C wurde jedes Medium mit 2–3% der vorstehend erhaltenen Kulturbrühe beimpft und anschliessend weitere 24 Stunden bei 30 °C kultiviert, um einen

Impfansatz zu erhalten.

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

Nach vollständiger Kultivierung wurde die so gebildete Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und dann mit Radiolite als Hilfsmittel zum Filtrieren unter Röhren versetzt, das Gemisch unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die erhaltenen Filtrate wurden vereinigt, und es wurden etwa 100 Liter Filtratgemisch erhalten.

Das Filtrat wurde auf pH 3,0 mit wässriger Natriumhydroxidlösung eingestellt, durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben, und nach dem Waschen der Säule mit 30 Liter Wasser wurde die Säule mit 30 Liter einer wässrigen 50%igen Acetonlösung eluiert. Das Eluat wurde auf 5,5 Liter eingeengt, und das Konzentrat wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und durch eine Dreiliter Amberlite IRA-68 (Cl-Typ)-Säule geleitet. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, fraktioniert. Es wurden etwa 5 Liter einer Lösung, die ein antimikrobiell aktives Material enthielt, erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, durch eine Einliter Amberlite XAD-2-Säule gegeben, mit Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung von 50%igem Aceton eluiert. Es 35 wurde etwa 400 ml wässrige Lösung, die das antimikrobiell aktive Material enthielt, gewonnen. Durch Lyophilisierung der Lösung wurde etwa 54 g des rohen Pulvers der hergestellten Verbindung II erhalten. Das rohe Pulver wurde einer Säulenchromatographie mit etwa 800 ml DEAE Sephadex A-25 (Essigsäure-Typ), gefüllt mit einer kleinen Menge 0,5 M Ammoniumbromid-Essigsäurepufferlösung, unterworfen, um die aktiven Komponenten zu fraktionieren. Die antimikrobiell aktiven Komponenten wurden gesammelt, durch eine 500 ml Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung von 25%igem Aceton eluiert. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt und dann im Vakuum zur Trockne eingedampft.

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

Zusammensetzung unterworfen, wobei die gleiche Prozedur, wie vorstehend angegeben, angewendet wurde. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockne eingedampft.

Der so gebildete Rückstand wurde einer mikrokristallinen Cellulosesäulenchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6:1,5:2,5 Volumenverhältnis) unterworfen, um die effektive Komponente zu reinigen. Die so gereinigte aktive Fraktion wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Sephadex G 10-Säule unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität wurden gesammelt und einer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (6:1,5:2,5 Volumenverhältnis), wie vorstehend angegeben, unterworfen. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,31 gesammelt, konzentriert und dann lyophilisiert. Es wurde etwa 60 mg weisses 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Beispiel 3

Herstellung von 7-(5-Amido-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure III:

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500 ml Sakaguchi-Flaschen mit je 10 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Jedes Medium wurde dann mit Streptomyces oganensis Y-G19Z Stamm beimpft und 48 Stunden bei 30 °C kultiviert. Ein weiteres Kulturmedium, wie vorstehend beschrieben, wurde in Zweiliter-Sakaguchi-Flaschen mit je 400 ml gefüllt und 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Jedes Medium wurde mit der vorstehend kultivierten Brühe mit einer 2-3%igen Konzentration beimpft und dann 24 Stunden bei 30 °C kultiviert, wodurch eine Animpfkultur erhalten wurde.

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

Nach beendeten Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Röhren vermischt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert und die Filtrate wurden vereinigt und ergeben etwa 300 Liter Filtratgemisch.

Das Filtrat wurde auf pH 3,0 eingestellt durch Zugabe von wässriger Natriumhydroxidlösung und dann durch eine 12 Liter Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen. Es wurde mit 30 Liter wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde auf 5,5 Liter eingeengt, und das Konzentrat wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt und durch eine 3 Liter Amberlite IRA-68 (cl-Typ)Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen. Es wurde mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurden etwa 5 Liter eines antimikrobiell aktiven Materials erhalten. Die Lösung wurde

auf pH 3,0 eingestellt und durch eine Einliter-Amberlite XAD-2-Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit Wasser wurde die Säule mit einer wässrigen Lösung von 50%igem Aceton eluiert. Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung, die das antimikrobiell aktive Material enthielt, gewonnen. Das Produkt wurde lyophilisiert.

Unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol:Essigsäure:Wasser (4:1:2 Volumenverhältnis) wurde der gebildete Rückstand einer Säulenchromatographie unterworfen unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel), gefüllt mit dem Lösungsmittelgemisch der vorstehend angegebenen gleichen Zusammensetzung. Dann wurden die erhaltenen antimikrobiell aktiven Fraktionen fraktioniert und tropfenförmig auf eine Dünnschichtplatte von Avicel SF aufgetragen und mit einem Lösungsmittelgemisch Isopropanol : n-Butanol : Essigsäure : Wasser (21:3:7:9 im Volumenverhältnis) entwickelt. Eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin wurde übergesprührt und unter Erwärmung die Anfärbung entwickelt. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockne bei 45–50 °C gebracht. Der erhaltene Rückstand wurde der Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen. Die Säule war präpariert mit einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril : Wasser (7:3 Volumenverhältnis). Die erhaltene antimikrobiell aktive Fraktion wurde einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF, wie bei der vorstehenden Prozedur unterworfen. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 gesammelt und zur Trockne eingedampft. Es wurde 0,78 g rohes Pulver erhalten.

Das Pulver wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Säule aus Sephadex G 10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden fraktioniert und einer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus n-Butanol : Essigsäure : Wasser (4:1:2 Volumenverhältnis), wie vorstehend angegeben, unterworfen. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,43 wurden gesammelt, eingeengt und lyophilisiert. Es wurden 82 mg weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Beispiel 4

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

Beispiel 5

Durch Anwendung des gleichen Verfahrens, wie im Beispiel 2 angegeben, jedoch unter Verwendung einer Lösung von bis(1-Methyl-1H-tetrazol-5-yl)disulfid, hergestellt durch Auflösen des Disulfids in Wasser enthaltendem Methanol und Sterilisation durch Filtration mittels Milliporefilter in diesem Beispiel anstelle einer Lösung von 1-Methyl-5-mercaptop-1H-tetrazol, hergestellt durch Auflösen des Tetrazols in Wasser unter Verwendung einer wässriger Natriumhydroxidlösung und Sterilisation bei hohem Druck, wurde etwa 26 g des rohen Pulvers der hergestellten Verbindung II erhalten. Durch Reinigen des Produktes, wie im Beispiel 2 angegeben, wurde etwa 37 mg 7-(5-

Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure (hergestellte Verbindung II) erhalten.

Beispiel 6

Durch Anwenden des gleichen Verfahrens wie im Beispiel 3 angegeben, wurde durch Einsetzen einer Lösung von bis (5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)disulfid, hergestellt durch Auflösen des Disulfids in wasserhaltigem Methanol, und Sterilisation durch Filtration mittels Milliparfilter in diesem Beispiel anstelle der Lösung von 2-Mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol, hergestellt in Wasser unter Verwendung einer wässrigen Natriumhydroxidlösung und Sterilisation bei hohem Druck, etwa 19 g rohes Pulver der hergestellten Verbindung III erhalten. Durch Reinigen des Produktes, wie im Beispiel 3 angegeben, wurde etwa 50 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure (hergestellte Verbindung III) erhalten.

Beispiel 7

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure IV.

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

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

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

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

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

Das rohe Pulver wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und dann einer Säulenchromatographie unter Verwendung von Amberlite CG-50 (H-Typ) mit destilliertem Wasser unterworfen, und die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in einer kleinen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Säule aus Sephadex G 10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die effektiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Gemisches aus n-Butanol:Essigsäure:Wasser (4:1:2 Volumenverhältnis), wie vorstehend beschrieben, unterzogen.

Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,38 gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Es wurden weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Beispiel 8

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

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

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminosäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid in zwei 100-Liter-Fermentoren zusammen mit je 10 ml Adecanol als Antischaummittel versetzt, sterilisiert während 30 Minuten bei 120 °C. Es wurde mit 800 ml der Animpfkultur, die gemäss der vorstehenden Vorschrift hergestellt worden war, beimpft. Es wurde 24 Stunden bei 30 °C kultiviert. Dann wurde eine Lösung von 5-Mercapto-1-methyl-1H-tetrazol, hergestellt aus einer wässrigen Natriumhydroxidlösung und Sterilisation bei hohem Druck, zu der Kulturbrühe so hinzugegeben, dass die Konzentration des Tetrazols 0,05% betrug. Die Kultivierung wurde noch 90 Stunden ausgeführt.

Nachdem die Kultivierung vollständig war, wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfs-

mittel unter Rühren vermischt. Das Gemisch wurde mit einer Filterpresse filtriert, und die erhaltenen Filtrate wurden vereinigt. Es wurden 100 Liter Filtratgemisch mit einem Gehalt an 100 mcg/ml an 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure erhalten.

b) Das Filtrat wurde auf pH 3,0 eingestellt und durch eine 12-Liter-Amberlite-XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde bis auf 5,5 Liter eingeengt. Das Konzentrat wurde auf pH 7,5 unter Verwendung wässriger Natriumhydroxidlösung eingestellt und die hergestellte Verbindung isoliert.

Beispiel 9

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

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

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminosäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, in 200-Liter-Fermentoren zusammen mit je 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel eingefüllt. Jedes Kulturmedium wurde für 30 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Es wurde mit 800 ml der nach der vorstehenden Arbeitsweise hergestellten Animpfkultur beimpft. Dann wurde zu jedem Fermentor eine Lösung von 1-Methyl-5-mercaptop-1H-tetrazol, hergestellt durch Auflösen in wässriger Natriumhydroxidlösung und Sterilisieren unter hohem Druck, so dass der Gehalt 0,05% betrug. Dann wurde die Kulturbrühe 90 Stunden weiter kultiviert. Nach beendet Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Rühren vermischt. Das Gemisch wurde durch eine Filterpresse filtriert, und die Filtrate wurden zu etwa 100 Liter Filtratgemisch vereinigt.

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

Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung mit antimikrobiell aktivem Material erhalten, welches lyophilisiert wurde. Es wurden etwa 54 g rohes Pulver erhalten. Das rohe Pulver wurde

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

Eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin wurde aufge-20 sprüht, und die Anfärbung wurde durch Erwärmen entwickelt. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,31 wurden gesammelt, im Vakuum bei 45–50 °C zur Trockene eingedampft und einer Säulenchromatographie mit mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen. Die Säule enthielt ein Lösungsmittelgemisch aus 25 Isopropanol:n-Butanol:Essigsäure:Wasser (21:3:7:9 im Volumenverhältnis). Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden dann ausgewählt und einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF unterworfen. Hierbei wurde das gleiche vorstehende Verfahren angewendet. Die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 30 wurden gesammelt und im Vakuum zur Trockene eingedampft.

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

Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol:Essigsäure:Wasser (6:1,5:2,5 im Volumenverhältnis) verwendet, um 35 eine Reinigung der effektiven Komponente zu erzielen. Die gereinigten aktiven Fraktionen wurden durch Konzentration getrocknet, in einer kleinen Menge destilliertem Wasser gelöst und in einer Säule mit Sephadex G 10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft, und die effektiven Fraktionen 40 wurden ausgewählt und einer Dünnschichtchromatographie unterworfen, wie dies vorstehend erläutert wurde.

Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol:Essigsäure:Wasser (6:1,5:2,5 im Volumenverhältnis) verwendet. Die 45 Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,31 wurden gesammelt, konzentriert und lyophilisiert. Es wurde etwa 60 mg weisse 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Beispiel 10

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

Ein Kulturmedium, welches 1% Stärke, 1% Glukose, 1,5% Sojabohnenmehl, 0,5% Hefeextrakt, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat und 0,3% Natriumchlorid enthielt, wurde in 500-ml-Sakaguchiflaschen in einer Menge von jeweils 100 ml eingefüllt. Jedes Medium wurde 20 Minuten bei 120 °C sterilisiert. Das Kulturmedium wurde dann mit dem Streptomyces organonensis Y-G19Z-Stamm beimpft. Anschließend wurde 48 Stunden bei 30 °C kultiviert.

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

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

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7%

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

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

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

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

Beispiel 11

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure.

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

Separat wurden 60 Liter eines Kulturmediums, welches 7% Stärke, 2% Glutenmehl, 2% Sojabohnenmehl, 0,8% Glycerin, 0,1% Casaminosäure, 0,01% Ferrisulfat und 55 g Natriumhydroxid enthielt, in 200-Liter-Fermentoren zusammen mit 10 ml Adecanol als Entschäumungsmittel gefüllt. Jedes Medium wurde 30 Minuten bei 120 °C sterilisiert und mit 800 ml der Animpfkultur, hergestellt nach dem vorstehenden Verfahren, geimpft. Anschliessend wurde 24 Stunden bei 30 °C kultiviert. Dann wurde in jeden Fermentator eine Lösung von bis(5-Carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-disulfid, hergestellt durch Auflösen des Disulfids in wasserhaltigem Methanol, und Sterilisieren durch Filtration unter Verwendung eines Millipore-Filters, in einer solchen Menge zugefügt, dass der Gehalt 0,05% in der Kulturbrühe betrug. Die Kultivierung wurde 90 Stunden durchgeführt. Nach beendeter Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0 eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Rühren versetzt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt. Es wurden etwa 100 Liter eines Filtratgemisches erhalten. Das Filtrat wurde auf pH 3,0 durch die Zugabe einer wässrigen Natriumhydroxidlösung eingestellt. Es wurde die Lösung in eine 12-Liter-Amberlite-XAD-2-Säule eingefüllt. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde bis auf 5,5 Liter eingeengt. Nach Entfernung der gebildeten unlöslichen Anteile wurde Wasser zu dem Konzentrat hinzugefügt, um 10 Liter Lösung zu erhalten. Die Lösung wurde auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäurelösung eingestellt, durch eine 3-Liter-Amberlite-IRA-68-(Cl-Typ)-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen und mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt, eluiert. Es wurde etwa 5 Liter Lösung erhalten, die antimikrobiell aktives Material enthielt. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, in eine 1-Liter-Amberlite-XAD-2-Säule gefüllt. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und mit wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Es wurde etwa 400 ml wässrige Lösung, die antimikrobiell aktives Material enthielt, erhalten. Durch Lyophilisieren der wässrigen Lösung wurde etwa 23 g rohes Pulver erhalten. Dann wurde 23 g des rohen Pulvers einer Säulenchromatographie unter Verwendung von 800 ml DEAE-Sephadex A-25 (Essigsäure-Typ), gefüllt mit einer kleinen Menge 0,5 M Ammoniumbromid-Essigsäurepufferlösung, unterworfen, um die effektiven Komponenten abzutrennen. Die antimikrobiell aktiven Fraktionen wurden gesammelt und in eine 500-ml-Amberlite-XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen. Es wurde mit wässrigem 25%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde zur Trockene im Vakuum eingedampft. Das Produkt wurde einer Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol:Wasser (7:3 im Volumenverhältnis) unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel) unterworfen, wobei

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

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

Beispiel 12

Herstellung von 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure.

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

Dann wurde die Kultivierung 90 Stunden fortgesetzt. Nach vollständiger Kultivierung wurde die Kulturbrühe auf pH 2,0

eingestellt und mit Radiolite als Filterhilfsmittel unter Röhren vermischt. Das Gemisch wurde unter Verwendung einer Filterpresse filtriert. Die Filtrate wurden vereinigt, und es wurden etwa 100 Liter Filtratgemisch erhalten. Das Filtrat wurde durch Zugabe einer wässrigen Natriumhydroxidlösung auf pH 3,0 eingestellt und in eine 12-Liter-Amberlite-XAD-2-Säule gefüllt. Die Säule wurde mit 30 Liter Wasser gewaschen und mit 30 Liter wässrigem 50%igem Aceton eluiert. Das Eluat wurde auf 5,5 Liter eingeengt, auf pH 3,5 mit verdünnter wässriger Chlorwasserstoffsäure eingestellt und dann in eine 3-Liter-Amberlite-IRA-68-(Cl-Typ)Säule gegeben. Die Säule wurde mit 6 Liter Wasser gewaschen. Eluiert wurde mit einer wässrigen Lösung (pH 7,2), die 1 M Natriumnitrat und 0,1 M Natriumacetat enthielt. Es wurden 5 Liter Lösung, die antimikrobiell aktives Material enthält, gewonnen. Die Lösung wurde auf pH 3,0 eingestellt, in eine 1-Liter-Amberlite-XAD-2-Säule gegeben. Die Säule wurde mit Wasser gewaschen und mit 50%igem Aceton eluiert. Es wurden etwa 400 ml wässrige Lösung, die antimikrobiell aktives Material enthielt, welches lyophilisiert wurde, erhalten.

Das erhaltene Produkt wurde einer Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol:Essigsäure:Wasser (4:1:2 im Volumenverhältnis) unter Verwendung mikrokristalliner Cellulose (Avicel) als Füllung unterworfen, wobei das Lösungsmittelgemisch mit der gleichen vorstehend angegebenen Zusammensetzung Anwendung fand, um die antimikrobiell aktiven Fraktionen auszuwählen.

Die Fraktionen wurden tropfenweise auf eine Dünnschichtplatte aus Avicel SF aufgetragen, und es wurde mit einem Lösungsmittelgemisch aus Isopropanol:n-Butanol:Essigsäure:Wasser (21:3:7:9) entwickelt. Eine Pyridinlösung von 0,25% Ninhydrin wurde aufgesprührt, und durch Erwärmen wurde angefärbt. Dann wurden die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 gesammelt, unter verminderter Druck zur Trockene

eingedampft. Dann wurden die Fraktionen einer Dünnschichtchromatographie mit Avicel SF in der vorstehend beschriebenen Weise unterworfen, um die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,39 zu sammeln. Die Fraktionen wurden zur Trockene eingedampft, wobei 0,92 rohes Pulver erhalten wurde. Das Pulver wurde in einer kleinen Menge von destilliertem Wasser aufgelöst und einer Säulenchromatographie mit destilliertem Wasser unter Verwendung von Amberlite CG-50 (H-Typ) unterworfen, um die antimikrobiell aktiven Fraktionen auszuwählen. Die Fraktionen wurden dann konzentriert und lyophilisiert. Das

Produkt wurde in einer kleinen Menge aus destilliertem Wasser aufgelöst und in einer Säule aus Sephadex G-10 unter Verwendung von destilliertem Wasser entwickelt. Die antimikrobielle Aktivität jeder Fraktion wurde geprüft. Die effektiven Fraktionen wurden einer Dünnschichtchromatographie in der schon vorstehend erläuterten Weise unterworfen. Es wurde ein Lösungsmittelgemisch aus n-Butanol:Essigsäure:Wasser (4:1:2 im Volumenverhältnis) verwendet, um die Fraktionen mit dem Rf-Wert 0,38 zu sammeln. Die Fraktionen wurden eingeengt und lyophilisiert, und dabei wurden 75 mg weiße 5-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure erhalten.

Arzneimittel, welche Verbindungen der Formel A enthalten, können, wie nachstehend angegeben, hergestellt werden:

a) Trocken gefüllte Kapseln mit 120 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure pro Kapsel

7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure 120 mg

65 Laktose 20 mg

Magnesiumstearat 5 mg

Kapsel Nr. 3 145 mg

7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure wurde zu einem Pulver Nr. 60 verrieben, und dazu wurden Laktose und Magnesiumstearat durch ein Siebtuch Nr. 60 gegeben. Die vereinigten Ingredientien wurden 10 Minuten zusammen gemischt und dann in trockene Gelatinekapseln Nr. 3 abgefüllt.

b) Tabletten mit 150 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure

	pro Tablette	10
7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure	150 mg	
Dicalciumphosphat J.P.	115 mg	
Magnesiumstearat	3 mg	
Laktose J.P.	39 mg	

Die aktive Komponente wird mit dem Dicalciumphosphat und der Laktose gemischt. Das Gemisch wird mit 15%iger

Kornstärkepaste (4 mg) granuliert und grob gesiebt, bei 40 °C getrocknet und erneut durch ein Sieb Nr. 16 gesiebt. Das Magnesiumstearat wird hinzugefügt, und das Gemisch wird in Tabletten mit annähernd 0,8 cm Durchmesser gepresst.

c) Parenterale Lösung mit 500 mg 7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)-thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure

pro Ampulle

7-(5-Amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carbonsäure 500 mg

Die aktive Verbindung (50,0 g) wird in 150 ml steriles Wasser für Injektionszwecke gegeben. Die erhaltene Lösung wird auf pH 8,0 durch Zugabe von verdünnter Natriumhydroxidlösung eingestellt. Das Volumen der Lösung wird auf 200 ml aufgefüllt. Die Lösung wird in 100 Ampullen abgefüllt, lyophilisiert und verschmolzen.

Fig.1

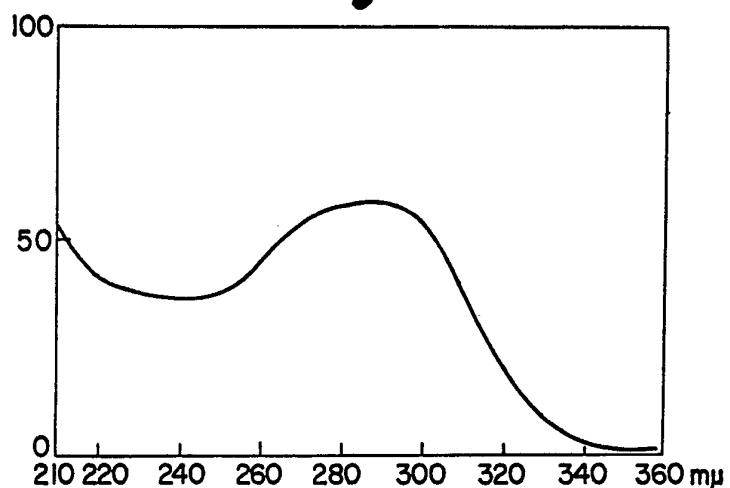


Fig.2

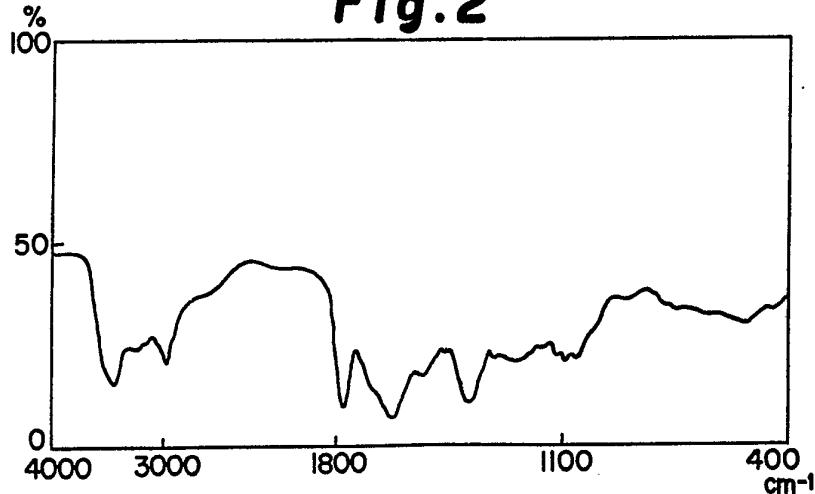


Fig.5

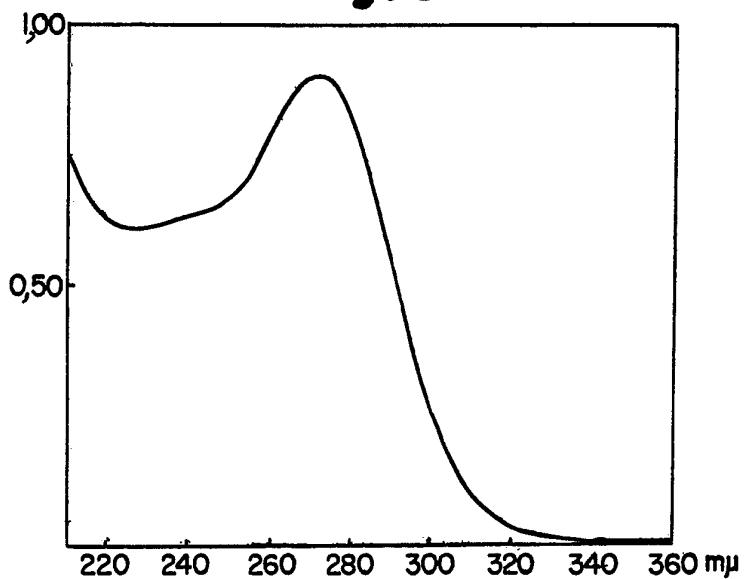


Fig. 3

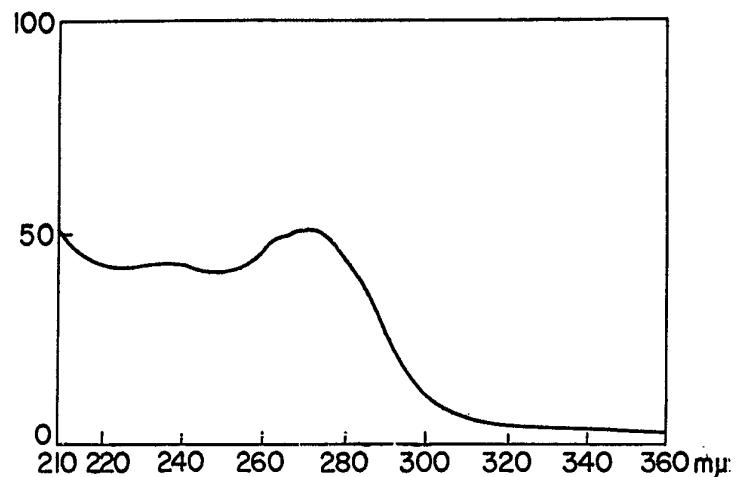


Fig. 4

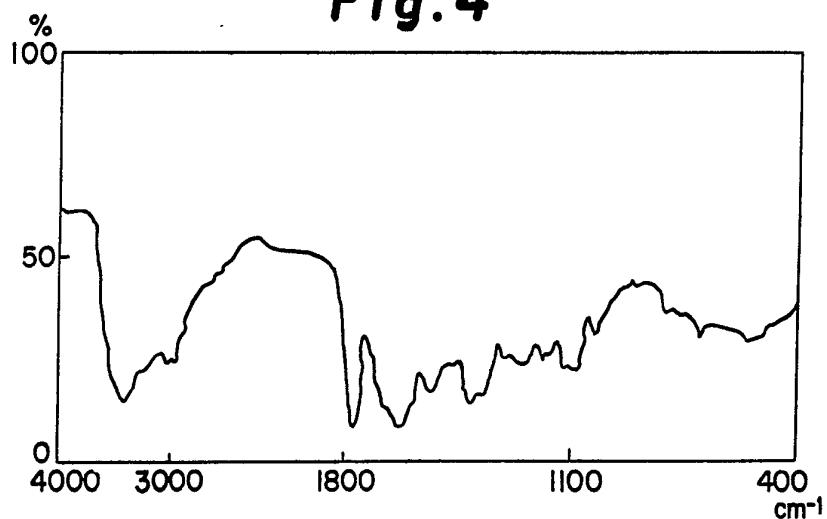


Fig. 6

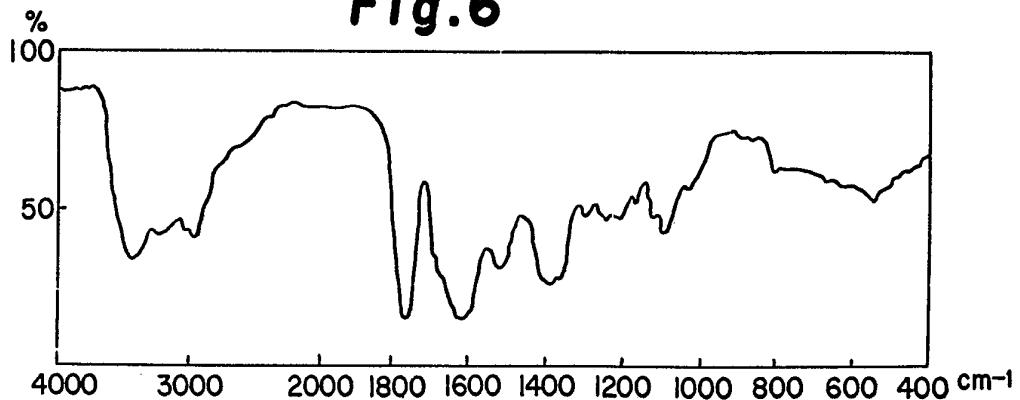


Fig. 7

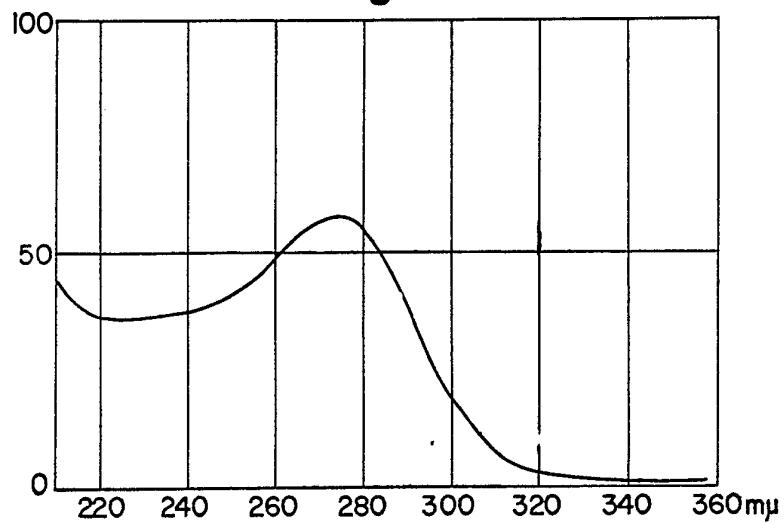


Fig. 8

