



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 D 205/08
C 12 P 17/10

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



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

626 340

⑳① Gesuchsnummer:	5784/76	⑦③ Inhaber:	Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka (JP)
⑳② Anmeldungsdatum:	07.05.1976		
⑳③ Priorität(en):	07.05.1975 JP 50-55012	⑦② Erfinder:	Kiyohiko Kunugita, Takarazuka-shi (JP) Hatsuo Aoki, Ikeda-shi (JP) Hiroshi Imanaka, Mishima-gun/Osaka-fu (JP)
⑳④ Patent erteilt:	13.11.1981		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	13.11.1981	⑦④ Vertreter:	A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von 3-Amino-1-(alpha-carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon.**

⑤⑦ Durch N-Desacylierung von 3-(α -substituiertem oder -unsubstituiertem Glycinamido)-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon oder einem Salz oder Ester davon an der Carboxylgruppe erhält man 3-ANA oder ein Salz oder Ester davon an der Carboxylgruppe. Die N-Desacylierung erfolgt in Gegenwart einer Kulturbrühe eines Mikroorganismus, eines daraus erhaltenen Materials oder einer Aminopeptidase, die sich vom tierischen Körper ableitet, vorausgesetzt, dass ein jedes dieser Produkte fähig ist, die entsprechende Säureamidbindung enzymatisch zu hydrolysieren.

Die neuen Substanzen sind wichtige Zwischenprodukte zur Herstellung von anderen chemisch modifizierten Verbindungen, beispielsweise von 3-Acylaminoazetidinonderivaten, die eine antimikrobielle Wirkung aufweisen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von 3-Amino-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon, von Salzen oder von Estern davon an der Carboxylgruppe, dadurch gekennzeichnet, dass man

3-(α -substituiertes oder -unsubstituiertes Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon,

ein Salz davon oder einen Ester davon an der Carboxylgruppe, in Gegenwart einer Kulturbrühe eines Mikroorganismus oder eines daraus erhaltenen Materials oder einer Amino-peptidase, die sich von einem tierischen Körper ableitet, welche ein 3-(α -substituiertes oder -unsubstituiertes Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon,

ein Salz davon oder ein Derivat davon an der Carboxylgruppe zu N-desacylieren vermag, N-desacyliert, um zum 3-Amino-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon, einem Salz oder einem Ester davon an der Carboxylgruppe zu gelangen.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die N-Desacylierung in Gegenwart einer Kulturbrühe eines Mikroorganismus einer der folgenden Gattungen, nämlich:

Pseudomonas, *Xanthomonas*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Brevibacte-*

rium, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Kluyvera*, *Arthrobacter*, *Sarcina*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Thermopolyspora*, *Amorphosporangium*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhodotorula*, *Endomycopsis* oder *Lipomyces*, oder einem davon abgeleiteten Material erfolgt.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die N-Desacylierung in Gegenwart von Amino-peptidase M (E.C. 3.4.1.2) durchgeführt wird.

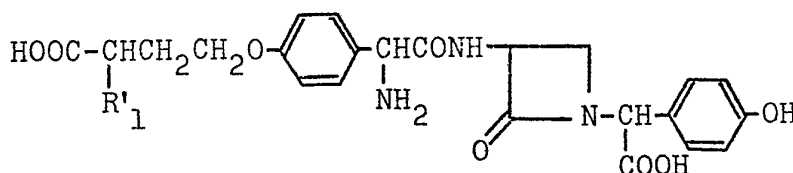
4. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Kulturbrühe des Mikroorganismus verwendet wird.

5. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein aus der Kulturbrühe des Mikroorganismus erhaltenes Material verwendet.

6. Verfahren nach Patentanspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man als Material ein Filtrat, eine obenauffließende Flüssigkeit, eine Zellsuspension oder ein gereinigtes Präparat, erhalten aus der Kulturbrühe verwendet.

7. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als 3-(α -substituiertes

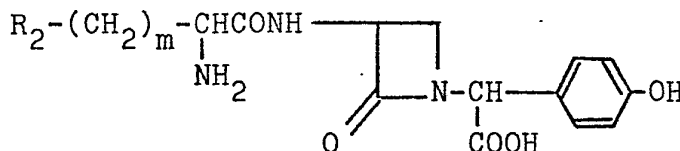
Glycinamido)-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon eine Verbindung der folgenden Formel:



worin R'_1 die Amino- oder eine Acylaminogruppe bedeutet, verwendet.

8. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

35 zeichnet, dass man als 3-(α -substituierte Glycinamido)-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinone eine Verbindung der folgenden Formel:



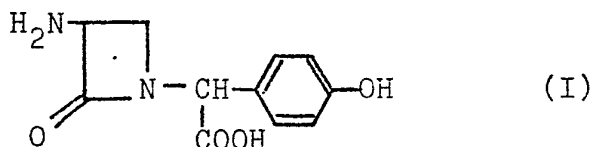
worin R_2 eine substituierte Arylgruppe oder eine heterocyclische Gruppe und m eine ganze Zahl von 0 bis 4 bedeutet, verwendet.

9. Verfahren nach Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet,

45 zeichnet, dass R'_1 eine Alkanoylaminogruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen bedeutet.

10. Verfahren nach Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass R'_1 eine Aroylaminogruppe mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen bedeutet.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues Verfahren zur Herstellung einer neuen Substanz, nämlich 3-Amino-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon (nachstehend als 3-ANA bezeichnet), welche der folgenden Formel entspricht:



und die als Schlüsselzwischenprodukt für die Herstellung von 3-Acylaminoazetidinonderivaten wertvoll ist.

55 Es ist bekannt, dass einige β -Lactame, wie z.B. die 7-Amino-3-methylcephemverbindungen, durch enzymatische N-Desacylierung hergestellt werden können (US-Patent Nr. 3 749 641, patentiert am 31. Juli 1973).

Aufgrund von Versuchen mit verschiedenen Arten von 60 Mikroorganismen und Enzymen wurde festgestellt, dass Mikroorganismen und ein Enzym, das sich aus einem gewissen tierischen Körper ableitet, bestehen, welche ein 3-(α -substituiertes oder -unsubstituiertes Glycinamido)-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon 65 unter Bildung von 3-ANA zu N-desacylieren vermögen. Es wurde ferner festgestellt, dass eine solche Reaktion dem Vermögen von Mikroorganismen oder dem Enzym zuzuschreiben ist, dank welchem die Säureamidbindung in der 3-Stellung eines

3-(α -substituierten oder -unsubstituierten Glycinamido)-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinons hydrolysiert wird.

Erfindungsgemäss gelangt man daher zu einer neuen Substanz, nämlich 3-ANA. Dieses neue Verfahren ist überdies wirtschaftlicher hinsichtlich der industriellen Herstellung von 3-ANA.

Erfindungsgemäss lässt sich die erwünschte Verbindung, nämlich 3-ANA der Formel I aus einem

3-(α -substituierten oder -unsubstituierten Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon

durch enzymatische N-Desacylierung in Gegenwart einer Kulturbühe eines Mikroorganismus, eines daraus erhaltenen Materials oder einer Amino-peptidase, die sich von einem tierischen Körper ableitet, herstellen, vorausgesetzt, dass ein jedes dieser Produkte fähig ist, die Säureamidbindung eines

3-(α -substituierten oder -unsubstituierten Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinons

zu hydrolysieren. Insbesondere erfolgt diese enzymatische N-Desacylierung dadurch, dass man ein

3-(α -substituiertes oder -unsubstituiertes Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon

mit einer Kulturbühe eines Mikroorganismus oder mit einem Verarbeitungsprodukt davon oder einer Amino-peptidase, die sich von einem tierischen Körper ableitet, behandelt.

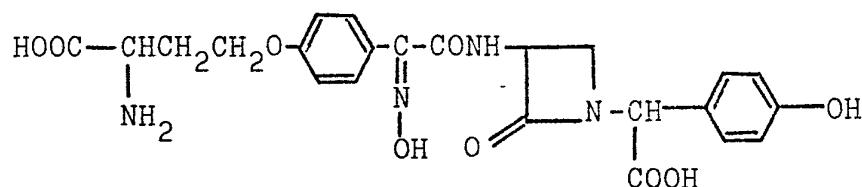
Die erfindungsgemässe Reaktion lässt sich durch das folgende Reaktionsschema wiedergeben:

3-(α -substituiertes oder -unsubstituiertes Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon (II)

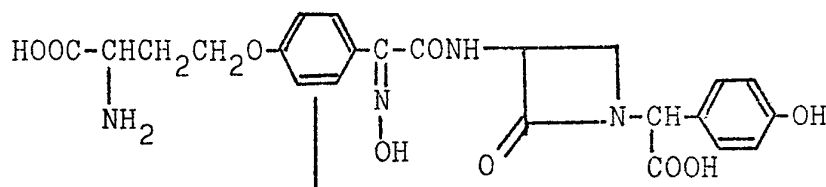
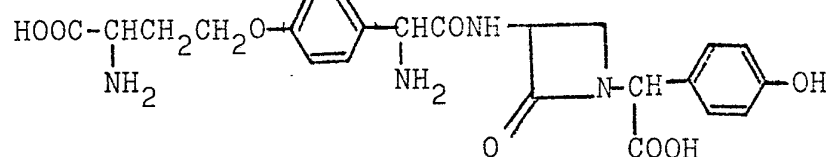
enzymatische
Desacylierung

3-ANA (I)



(FR-1923-Substanz)

Reduktion



Was die erfindungsgemäss zur Anwendung gelangenden Ausgangsmaterialien der Formel II betrifft, ist zu verstehen, dass es wichtig ist, dass das Ausgangsmaterial eine α -substituierte oder -unsubstituierte α -Amino-aceto-amidogruppe in der 3-Stellung im Azetdinskelett aufweist, wobei festgestellt worden ist, dass eine solche Verbindung sich enzymatisch N-desacylieren lässt, und zwar unter Bildung von 3-ANA. Dies will besagen, dass es wesentlich ist, dass für die enzymatische N-Desacylierung im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Acylaminogruppe in der 3-Stellung des Ausgangsmaterials der Formel II stets eine Aminogruppe in der α -Stellung des Acylteils aufweist.

Die als Ausgangsmaterialien verwendeten

3-(α -substituierten oder -unsubstituierten Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinone II

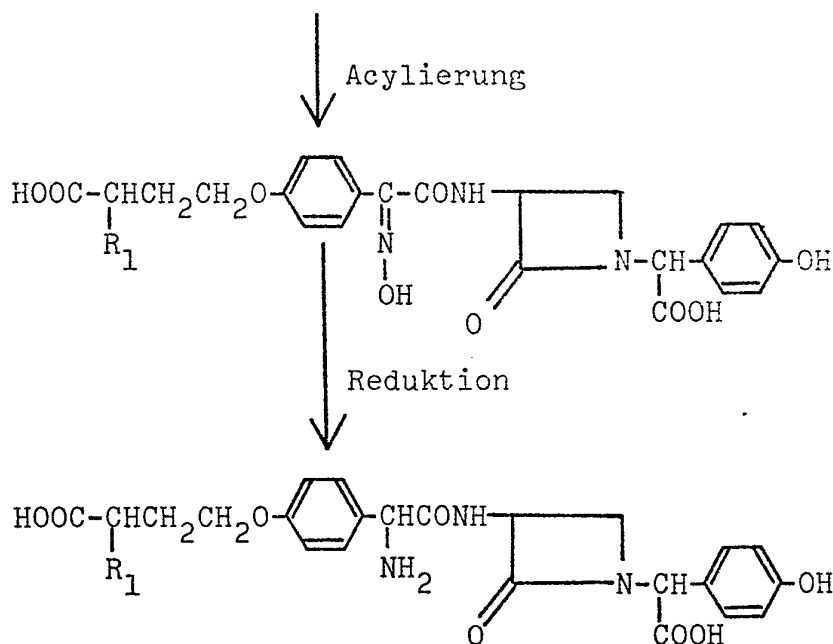
sind neue Verbindungen und lassen sich aus einer bekannten Verbindung, nämlich dem Antibiotikum FR-1923-Substanz, nach den Methoden, wie sie beispielsweise in den folgenden Reaktionsschemen (a) und (b) beschrieben sind, erhalten. Da-

bei ist zu bemerken, dass das besagte Antibiotikum, nämlich FR-1923-Substanz, in der amerikanischen Patentschrift Nr.

3 923 977 beschrieben wird, worin diese antibiotische FR-1923-Substanz nur durch verschiedene physikochemische Eigenschaften definiert wird, ohne dass man aber ihre chemische

Struktur beschrieben hätte. Aufgrund von weiteren Recherchen wurde deren chemische Struktur identifiziert, was dazu geführt hat, dass man schliesslich festgestellt hat, dass man damit 3-ANA als Schlüsselzwischenprodukt für die Synthese von anderen chemisch modifizierten Verbindungen, bei-

spielsweise von anderen 3-Acylaminoazetidinonderivaten als FR-1923-Substanz herstellen kann. Ferner ist zu bemerken, dass die FR-1923-Substanz sich nicht enzymatisch desacylieren lässt, wobei 3-ANA erhalten wird. Ferner wurde festgestellt, dass ein 3-(α -Amino)-acylazetidinonderivat aus FR-1923-Substanz enzymatisch desacyliert wird unter Bildung von 3-ANA, was letztendlich Ziel der vorliegenden Erfindung ist.



worin R_1 eine Acylaminogruppe bedeutet.

Wie oben erwähnt worden ist, gipfelt die vorliegende Erfindung in der Erkenntnis, dass sich nur die 3-(α -substituierten oder -unsubstituierten Glycinamido)-

1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon II unter Bildung von 3-ANA der Formel I enzymatisch desacylieren lassen, wobei ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Erfindung darin zu erblickt ist, dass eine Aminofunktion am α -Kohlenstoffatom einer Acylaminogruppe haftet, welche sich in der 3-Stellung einer Ausgangsverbindung der Formel

II (d.h. $\text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\overset{\alpha}{\text{CH}}}-\text{CONH}-\text{R}$; $\text{R}=\text{H}$ oder Substituent), befindet.

Dabei ist zu beachten, dass der Substituent R in der 3-(α -substituierten oder -unsubstituierten Glycinamido)-Komponente der Ausgangsverbindungen II nicht von besonderer Bedeutung ist, so dass dieser Substituent R beliebige organische, bekannte Reste sein kann. Beispiele hierfür sind gesättigte oder ungesättigte acyclische Kohlenwasserstoffreste, z.B. Alkyl, Alkenyl usw., gesättigte oder ungesättigte cyclische Kohlenwasserstoffreste, z.B. Cycloalkyl, Cycloalkenyl usw., aromatische Kohlenwasserstoffreste, z.B. Phenyl usw., heterocyclische Reste, z.B. 5- oder 6gliedrige heterocyclische Gruppen, welche mindestens ein Heteroatom, nämlich mindestens ein Schwefelatom, ein Sauerstoffatom und/oder ein Stickstoffatom enthalten, z.B. Thienyl usw., an einen Benzolkern anellierte heterocyclische Gruppen, z.B. Indolylgruppen usw., Reste, welche eine beliebige Kombination der vorgenannten Reste darstellen, z.B. Cycloalkylalkyl- und Aralkylreste, heterocyclische Alkylreste usw.

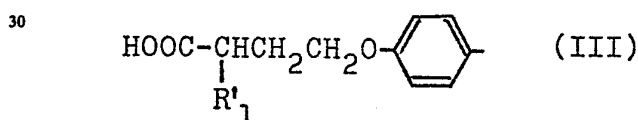
Bei den obenerwähnten organischen Resten kann die Kohlenwasserstoffkomponente gegebenenfalls durch mindestens ein Heteroatom, z.B. ein Sauerstoffatom, ein Stickstoffatom, ein Schwefelatom usw., eine mehratomige Gruppe (z.B. $-\text{SO}-$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{NH}-$, usw.), einen zweiwertigen aromatischen Ring

(z.B. , usw.), und/oder dreiwertigen heterocyclischen

Ring unterbrochen sein, wobei solche Kohlenwasserstoffreste, aromatische Ringe und/oder heterocyclische Ringe mindestens einen geeigneten Substituenten, z.B. mindestens eine Hydroxylgruppe, ein Halogenatom, eine Carboxylgruppe, eine Ami-

25 nogruppe, eine Hydroximinogruppe, eine Oxogruppe, eine Cyanogruppe, eine Sulfogruppe usw. enthalten können.

Beispiele der obenerwähnten Substituenten R sind Gruppen der folgenden Formeln:



35 worin R'_1 eine Aminogruppe oder eine Acylaminogruppe bedeutet, oder



40 worin R_2 eine substituierte Arylgruppe oder eine heterocyclische Gruppe und m die Zahlen 0 bis 4 bedeuten.

Bevorzugte Beispiele von Acylaminogruppen R'_1 der obigen Formel III sind Alkanoylreste mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, z.B. Formyl, Acetyl, Propionyl, Butyryl, Valeryl, Hexanoyl usw., Alkenoylreste mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen, z.B. Acryloyl, Crotonoyl, Methacaryloyl usw., Alkylcarbamoylreste mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen, z.B. N-Methylcarbamoyl, N-Äthylcarbamoyl, N-Propylcarbamoyl usw., Aroylreste mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, z.B. Benzoyl, Toluylyl, Naphthoyl usw., Aralkanoylreste mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, z.B. Phenylacetyl usw., Arylcarbamoylreste mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, wie z.B. N-Phenylcarbamoyl, N-Naphthylcarbamoyl usw., heterocyclische Carbonylreste, z.B. Thienoyl, Furoyl, Nicotinoyl usw.

55 Bevorzugte Beispiele von substituierten Arylresten R_2 in der obigen Formel II sind Hydroxyarylylreste mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, wie p-Hydroxyphenyl, p-Hydroxynaphthyl usw., und Halogenarylylreste mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, wie z.B. m-Chlorphenyl usw.

60 Bevorzugte Beispiele von heterocyclischen Resten R_2 der obigen Formel IV sind Thienyl, Furyl, Indolyl, Pyridyl usw.

Die erfindungsgemäss verwendbaren Ausgangsverbindungen der Formel II umfassen Ester sowie Salze an der Carboxylgruppe. Beispiele solcher Ester und Salze sind die folgenden:

(a) Ester: aliphatische Ester, z.B. Methyl ester, Propylester, Vinylester, Allylester, Äthylester usw.

(b) Salze: Salze mit anorganischen oder organischen Basen, z. B. Natriumsalze, Kaliumsalze, Magnesiumsalze, Calciumsalze, Ammoniumsalze, Dicyclohexylaminsalze, Pyridinsalze, Äthanolaminsalze usw.

Mikroorganismen, welche eine Desacylierung der Ausgangsverbindungen der Formel II unter Bildung von 3-ANA bewirken und für die vorliegende Erfindung verwendet werden können, lassen sich leicht aus dem Boden und anderen Quellen in bekannter Art isolieren und können leicht aus den bekannten Kulturen, welche dem Fachmann in den folgenden Stellen zugänglich sind, z. B. ATCC (American Type Culture Collection, Maryland, USA), IAM (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Japan), IFO (Institute For Fermentation, Osaka, Japan), HUT (Hiroshima University, Faculty of Engineering, Hiroshima, Japan), IID (The Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo, Japan), CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands), FERM (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Chiba, Japan) und NRRL (Northern Utilization Research and Development Division, US Department of Agriculture, Illinois, USA) usw., erhalten werden.

Für konkrete Beispiele der obigen Mikroorganismen sei auf die folgende Tabelle I verwiesen.

Tabelle I

Gattung	Mikro-organismus Nr.	Stamm
Pseudomonas	1	Pseudomonas schuylkiliensis I A M 1126
	2	Pseudomonas aureofaciens I F O 3523
	3	Pseudomonas putrefaciens I F O 3909
	4	Pseudomonas riboflavina I F O 3140
Xanthomonas	5	Xanthomonas campestris I A M 1671
Acetobacter	6	Acetobacter acetosus I A M 1803
	7	Acetobacter rancens I A M 1825
Gluconobacter	8	Gluconobacter capsulatus I A M 1813
Escherichia	9	Escherichia coli I A M 1204
Proteus	10	Proteus vulgaris I I D OX19US
Staphylococcus	11	Staphylococcus aureus I A M 1011
Aeromonas	12	Aeromonas hydrophila I A M 1018
Protaminobacter	13	Protaminobacter alboblavus I A M 1040
Bacillus	14	Bacillus subtilis I A M 1069

Tabelle I (Fortsetzung)

Gattung	Mikro-organismus Nr.	Stamm
	15	Bacillus cereus I A M 1072
	16	Bacillus megaterium I A M 1166
Azotobacter	17	Azotobacter vinelandii I A M 1078
Agrobacterium	18	Agrobacterium tumefaciens I A M 1037
Brevibacterium	19	Brevibacterium ammoniagenes I A M 1641
Micrococcus	20	Micrococcus luteus I A M 1097
Microbacterium	21	Microbacterium flavum I A M 1642
Mycobacterium	22	Mycobacterium tuberculosis I I D H37RV
Achromobacter	23	Achromobacter cycloclastes I A M 1013
Aerobacter	24	Aerobacter aerogenes I A M 1019
Alcaligenes	25	Alcaligenes faecalis I A M 1015
Corynebacterium	26	Corynebacterium fascians I A M 1079
Flavobacterium	27	Flavobacterium arborescens I F O 3750
Kluyvera	28	Kluyvera citrophila A T C C 21285
Arthrobacter	29	Arthrobacter simplex I A M 1660
Sarcina	30	Sarcina lutea I A M 1099
Serratia	31	Serratia marcescens I A M 1067
Streptomyces	32	Streptomyces arabis I F O 3406
	33	Streptomyces fradiae I F O 3123
	34	Streptomyces olivaceus I F O 3200
	35	Streptomyces shindenensis I F O 3399
Nocardia	36	Nocardia asteroides I F O 3384
Micromonospora	37	Micromonospora purpurea I F O 12575
Thermopolyspora	38	Thermopolyspora polyspora I F O 12134
Amorphosporangium	39	Amorphosporangium auranticolor I F O 12245
Spirillospora	40	Spirillospora albida I F O 12248

Tabelle I (Fortsetzung)

Gattung	Mikro- organismus Nr.	Stamm
Actinoplanes	41	Actinoplanes armeniacus I F O 12555
Aspergillus	42	Aspergillus oryzae I A M 2630
Penicillium	43	Penicillium casei I A M 7284
	44	Penicillium chrysogenum I A M 7106
Rhizopus	45	Rhizopus delemar I A M 6038
Mucor	46	Mucor fragilis I A M 6140
Rhodotorula	47	Rhodotorula rubra I F O 0002
Endomycopsis	48	Endomycopsis capsularis H U T 7236
Lipomyces	49	Lipomyces starkeyi H U T 7263

Unter die vorliegende Erfindung fällt auch die Verwendung von Mutanten, welche aus solchen Mikroorganismen in an sich bekannter Weise, z. B. durch Röntgenstrahlen, Ultraviolettbestrahlung, Behandlung mit Chemikalien, wie Salpetersäure, Stickstofflostgas, Azaserin, 2-Aminopurin, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) usw., erzeugt werden.

Dabei ist zu verstehen, dass ein erfindungsgemäss verwendeter Mikroorganismus keineswegs auf die Gattung, die Art oder die Mutante davon im obenerwähnten Sinne beschränkt sein soll.

Erfindungsgemäss lassen sich Mikroorganismen in Form einer Kulturbrühe verwenden, welche durch Züchtung des Mikroorganismus in geeigneter Weise erhalten wird. Man kann auch Verarbeitungsprodukte davon verwenden.

Die Züchtung der besagten Mikroorganismen lässt sich allgemein in bekannter Weise durchführen, wobei man mit Vorteil rührt, und zwar unter Belüftung. Als zu verwendendes Kulturmedium kann man ein Nährmedium verwenden, welches Quellen von assimilierbarem Kohlenstoff und Stickstoff und anorganische Salze enthält. Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Saccharose, Lactose, Glycerin und Stärke. Die bevorzugten Stickstoffquellen sind beispielsweise Fleischextrakt, Pepton, Glutemehl, Maismehl, Baumwollsaamenmehl, Sojabohnenmehl, Maisquellflüssigkeit, Hefeextrakt, Caseinhydrolysate und Aminosäuren sowie anorganische und organische Stickstoffverbindungen, wie Ammoniumsalze, z. B. Ammoniumnitrat, Ammoniumphosphat usw. Gewünschtenfalls kann man auch Mineralsalze, wie Calciumcarbonat, Natrium- oder Kaliumphosphat, Magnesiumsalze oder Kupfersalze und verschiedene Vitamine mitverwenden.

Um die Aktivität der Kulturbrühe oder des daraus gewonnenen Materials, welches eine Ausgangsverbindung der Formel II unter Bildung von 3-ANA der Formel I zu N-desacylieren vermag, zu erhöhen, kann man als Stimulans eine kleine Menge FR-1923-Substanz oder der Ausgangsverbindung der Formel II dem zu verwendenden Kulturmedium zugeben.

Der geeignete pH-Wert des Kulturmediums, die geeignete Züchtungstemperatur und die geeignete Züchtungsdauer schwanken je nach der Art des zu verwendenden Mikroorga-

nismus. Geeignete pH-Werte liegen normalerweise im Bereiche von 5 bis 8. Die Temperatur liegt üblicherweise bei ungefähr 20 °C bis ungefähr 37 °C und vorzugsweise bei 27 bis 33 °C. Die Züchtungsdauer liegt gewöhnlich zwischen 24 und 120 Stunden und vorzugsweise zwischen 40 und 100 Stunden.

Die so erhaltene Kulturbrühe und deren Verarbeitungsprodukte kann für die Herstellung von 3-ANA verwendet werden. Dabei ist unter Verarbeitungsprodukt der Kulturbrühe jedes Präparat zu verstehen, welches eine enzymatische N-Desacylierungsaktivität enthält und in an sich üblicher Weise zur Steigerung der besagten N-Desacylierungsaktivität behandelt worden ist.

Die N-Desacylierungsaktivität der Kulturbrühe ist in den Zellen (intracellular) und/oder ausserhalb der Zellen (extracellular) vorhanden.

Sofern die Aktivität zur Hauptsache in den Zellen liegt, so kann man das folgende Präparat als Verarbeitungsprodukt der Kulturbrühe verwenden:

(1) rohe Zellen: in an sich bekannter Weise, z. B. durch Filtrieren und Zentrifugieren, aus der Kulturbrühe abgetrennt;

(2) getrocknete Zellen: durch Trocknen der besagten rohen Zellen in an sich bekannter Weise, z. B. durch Lyophilisierung und Vakuumtrocknung, erhalten;

(3) zellenfreier Extrakt: erhalten durch Zerstörung der besagten rohen oder getrockneten Zellen in an sich bekannter Weise, z. B. durch Vermahlen der Zellen mit Aluminiumoxyd, Meersand usw. oder durch Behandeln der Zellen mit Ultraschallwellen, oder

(4) eine Enzymlösung: erhalten durch die Reinigung oder teilweise Reinigung der besagten zellenfreien Extrakte in an sich bekannter Weise.

Sofern die Aktivität zur Hauptsache von ausserhalb der Zellen herrührt, so kann man das folgende Präparat als Verarbeitungsprodukt verwenden:

(1) überstehende Flüssigkeit oder ein Filtrat: erhalten aus der Kulturbrühe in üblicher Weise; oder

(2) Enzymlösung: erhalten durch Reinigung oder teilweise Reinigung der überstehenden Flüssigkeit oder des Filtrats in an sich bekannter Weise.

Eine Aminopeptidase, die sich aus einem tierischen Körper ableitet und beim vorliegenden Verfahren verwendet werden kann, ist ein Enzym, welches das N-ständige Ende in einem Dipeptid oder Oligopeptid hydrolysiert.

Als Beispiele solcher Enzyme kann man Aminopeptidase M nennen, welche in einem tierischen Gewebe, z. B. in Nieren von Schweinen (E. C. 3.4.1.2) (vgl. The Enzyme, Bd. 3, S. 102) usw., vorkommt.

Die Aminopeptidase kann nicht nur in gereinigtem Zustand, sondern auch in rohem Zustand verwendet werden. Dies will besagen, dass die Aminopeptidase im Zustand eines zellenfreien Extraktes, welcher Aminopeptidase enthält, oder im Zustand eines Enzyms, welches durch Reinigung oder durch teilweise Reinigung eines zellfreien Extraktes in an sich bekannter Weise für die Reinigung von Enzymen erhalten wird, verwendet werden kann, unter der Bedingung, dass der Zustand des Enzyms die Reaktion nicht nachteilig beeinflusst.

Die erfindungsgemässe Reaktion erfolgt dadurch, dass man ein Ausgangsmaterial der Formel II mit der Kulturbrühe des Mikroorganismus oder eines Verarbeitungsproduktes davon oder einer Aminopeptidase behandelt.

Die enzymatische Reaktion erfolgt vorzugsweise in einem wässrigen Medium, z. B. Wasser oder einer Pufferlösung. Diese Umsetzung erfolgt gewöhnlich dadurch, dass man das Ausgangsmaterial der Formel II der Kulturbrühe des Mikroorganismus oder einem flüssigen Verarbeitungsprodukt, z. B. der überstehenden Flüssigkeit, dem Filtrat, der Enzymlösung usw., oder der Lösung oder der Suspension der Kulturbrühe oder eines Verarbeitungsproduktes oder einem Aminopeptidase-

präparat, das sich von einem tierischen Körper ableitet, in einem wässrigen Medium hinzugibt. In gewissen Fällen kann ein Schütteln oder Rühren des besagten Reaktionsgemisches von Vorteil sein.

Bevorzugte pH-Werte des Reaktionsgemisches, die Konzentration der Substrate, die Reaktionsdauer und die Reaktionstemperatur können je nach den Eigenschaften der Kulturbrühe oder des Verarbeitungsproduktes oder der zu verwendenden Amino-peptidase oder der Ausgangsverbindung der Formel II schwanken. Diese Umsetzung erfolgt aber vorzugsweise bei einem pH-Wertbereich von 4 bis 10, einer Temperatur von 20 bis 60 °C und während einer Dauer von 30 Minuten bis 5 Stunden. Die Konzentration der zu verwendenden Ausgangsverbindung der Formel II als Substrat im Reaktionsgemisch kann in einem Bereich von 0,1 bis 100 mg pro ml schwanken.

Ferner kann die erfindungsgemässe Umsetzung auch ein Verfahren umfassen, gemäss welchem man den Mikroorganismus in einem Kulturmedium züchtet, welches eine Ausgangsverbindung der Formel II enthält, wobei 3-ANA der Formel I im Kulturmedium gebildet wird.

Das so erhaltene 3-ANA der Formel I lässt sich aus dem Reaktionsgemisch in üblicher Weise abtrennen oder gewinnen.

Das erfindungsgemäss angestrebte Endprodukt 3-ANA stellt ein neues Schlüsselzwischenprodukt für die Herstellung von anderen 3-Acylaminoazetidinonderivaten dar. In diesem Zusammenhang kann man darauf hinweisen, dass das erfindungsgemäss erhältliche 3-ANA der 6-Aminopenicillansäure (6-APA) auf dem Penicillingebiet und 7-Aminocephalosporansäure (7-ACA) auf dem Cephalosporingebiet entspricht. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass 6-APA erhalten worden ist durch Desacylierung von Penicillin G, welches durch Fermentierung von *Penicillium chrysogenum* erzeugt worden ist, worauf manche halbsynthetische Penicilline durch Acylierung von 6-APA erhalten werden konnten. Auch wurde 7-ACA durch Desacylierung von Cephalosporin C erhalten, welches durch Fermentierung von *Cephalosporium acremonium* erzeugt worden war, worauf man manche halbsynthetische Cephalosporine durch Acylierung von 7-ACA herstellen konnte.

Die Bedeutung von 3-ANA auf dem neuen Azetidinon-Antibiotikagebiet lässt sich mit jener von 6-APA und 7-ACA vergleichen.

3-ANA, welches sich von der FR-1923-Substanz, erzeugt durch Fermentierung von *Nocardia uniformis* var. *Asuyamensis*, ableitet, muss somit als Schlüsselzwischenprodukt für die Herstellung vieler anderer verbesserter und wertvollerer 3-Acylaminoazetidinonderivate angesehen werden. Als Beispiel eines solchen Derivates, welches man durch Acylierung von 3-ANA erhalten kann, sei

1-(α -Carboxy-4-hydroxybenzyl)-3-[2-{2-(4-chlor-2-nitrophenoxy)-acetamido}-2-(2-thienyl)-acetamido]-2-azetidinon

genannt, welches hinsichtlich der antimikrobiellen Wirkung gegenüber pathogenen, grampositiven Bakterien verbesserte Eigenschaften aufweist.

Die folgenden Beispiele mögen die vorliegende Erfindung erläutern.

In den folgenden Beispielen wird das erfindungsgemäss angestrebte 3-ANA, welches im Reaktionsgemisch erhalten wird, qualitativ oder quantitativ in folgender Weise bestimmt:

(1) Verfahren zum qualitativen Nachweis der erfindungsgemäss erhältlichen Verbindung:

10 μ l des Reaktionsgemisches wurden auf ein Eastman Chromagram Sheet 13254 Cellulose (Wz., Eastman Kodak Co.) stellenweise aufgetragen und hierauf unter Verwendung einer Mischung von n-Propanol und Wasser im Mischungsverhältnis von 1:1 als Entwicklerlösungsmittel und unter Ver-

wendung von Ninhydrin als farberzeugendes Reaktionsmittel der Dünnschichtchromatographie unterworfen. Der Fleck der gewünschten Verbindung, nämlich 3-ANA, wurde als purpurrot gefärbte Stelle in der Nähe des Rf-Wertes von 0,77 beobachtet.

(2) Verfahren zur Bestimmung der gewünschten Verbindung:

40 μ l des Reaktionsgemisches wurden unter Verwendung eines Celluloseblattes in im wesentlichen gleicher Weise wie im obigen Absatz der Dünnschichtchromatographie unterzogen. Der Fleck der gewünschten Verbindung wurde als Ultraviolettstrahlung absorbierende Stelle in der Nähe des Rf-Wertes von 0,77 festgestellt, wobei man eine Ultraviolettlampe (2536 Å) verwendet. Dann wurde dieser Fleck aus dem Blatt herausgenommen und in ein Reagenzglas eingetragen. 4 ml einer 0,1n-Natriumhydroxydlösung wurden hierauf in das Reagenzglas gegossen und dieses anschliessend während 10 Minuten stehengelassen. Hierauf wurde das Gemisch im Reagenzglas während 5 Minuten bei 2500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wobei man eine überstehende Flüssigkeit erhielt. Die Ultraviolettabsorptionsintensität der überstehenden Flüssigkeit bei 247 nm wurde gemessen und die Ausbeute an 3-ANA auf der Basis des ϵ -Wertes von 12 000 einer authentischen Probe der gewünschten Verbindung berechnet.

Beispiel 1

100 ml eines Kulturmediums (pH 7,2), welches 2% «Kyokuto powdery Bouillon» (Wz. der Fa. Kyokuto Seiyaku Kogyo Co., Ltd.) in einem Sakaguchi-Kolben (Fassungsvermögen:

500 ml) enthielt, wurde in an sich bekannter Weise sterilisiert und hierauf mit einer 2 Tage alten Schrägkultur von *Pseudomonas schuylkiliensis* IAM 1126 geimpft. Hierauf wurde der Organismus im Medium während 48 Stunden unter Schütteln wachsen gelassen. Sechs Stunden nach Beginn des Wachstums

wurden 0,5 mg

3-[2-{4-(3-Amino-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon

dem Medium hinzugegeben. Nach der Züchtung wurde die Kulturbrühe während 15 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wobei man eine überstehende Flüssigkeit erhielt. 50 ml dieser Flüssigkeit wurden hierauf mit 1 g

3-[2-{4-(3-Amino-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon

versetzt und die Lösung auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und anschliessend während 4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden 120 mg 3-ANA im Reaktionsgemisch festgestellt. Hierauf wurden 50 ml des Reaktionsgemisches durch eine mit Aktivkohle in granulierter Form beschickten Säure hindurchgeleitet. Die Säule wurde mit 500 ml Wasser und anschliessend mit 500 ml einer 50%igen wässrigen Methanollösung gewaschen, worauf man die ge-

wünschte Verbindung mit 1500 ml einer 50%igen wässrigen Acetonlösung eluierte. 1500 ml dieses Eluats wurden unter vermindertem Druck eingeeengt, wobei man ein Konzentrat (50 ml) erhielt, das hierauf mit 250 ml Aceton versetzt wurde. Hierauf wurde das unlösliche Material durch Filtrieren entfernt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, und 20 ml des Konzentrates wurden auf einen pH-Wert von 2,0 eingestellt, worauf man das Konzentrat mit 20 ml n-Butanol versetzte. Hierauf wurde die Lösung gerührt und dann die n-Butanolschicht abgetrennt, worauf 100 ml Diäthyläther der n-Butanolschicht hinzugegeben wurden. Das Gemisch wurde filtriert, wobei man 40 mg eines weissen Pulvers erhielt, welches in einem kleinen Volumen Methanol gelöst und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen wurde. Auf diese Weise er-

hielt man 33 mg eines weissen kristallinen Produktes von 3-ANA. Smp. 203 bis 206 °C (Zersetzung).

Infrarotabsorptionsspektrum: ν max: 3140, 2400–2700, 1765, 1745, 1585 cm^{-1} .

Beispiel 2

Zellen von *Pseudomonas schuylkiliensis* IAM 1126, welche durch Zentrifugieren während 15 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 5000 Umdrehungen pro Minute einer Kulturbühe, welche im wesentlichen in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 erhalten worden ist, abgetrennt worden waren, wurden mit 50 ml einer 0,15molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,0) gewaschen und hierauf erneut zentrifugiert. Hierauf wurden die so behandelten Zellen in der gleichen, obenerwähnten Pufferlösung suspendiert, wobei man 10 ml einer Suspension erhielt. Zu dieser Suspension wurden hierauf 10 ml einer wässrigen Lösung mit einem pH-Wert von 7,0, welche 1 g 3-[2-{4-(3-Amino-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon enthält, hinzugegeben, worauf man das Gemisch während 4 Stunden bei 37 °C inkubieren liess. Nach erfolgter Umsetzung stellte man im Reaktionsgemisch 170 mg 3-ANA fest. Hierauf wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert, wobei man eine überstehende Flüssigkeit und 48 mg weisser Kristalle von 3-ANA nach der gleichen Reinigungsmethode von Beispiel 1 erhielt. Das Infrarotabsorptionsspektrum der so erhaltenen Verbindung war identisch mit jenem einer authentischen Probe von 3-ANA, wobei keine Schmelzpunktniedrigung beim Mischschmelzpunkt feststellbar war.

Beispiel 3

100 ml eines Kulturmediums (pH 7,2), welches 2% «Kyokuto Powdery Bouillon» enthält, wurde in bekannter Weise in jeweils 100 Sakaguchi-Kolben mit einem Fassungsvermögen von 500 ml sterilisiert und hierauf mit einer Öse voll einer 2tägigen Schrägkultur von *Pseudomonas schuylkiliensis* IAM 1126 inkubiert. Der Organismus wurde während 48 Stunden bei Schütteln im Medium bei 30 °C wachsen gelassen. Sechs Stunden nach Beginn des Wachstums gab man dem Medium 100 mg FR-1923-Substanz hinzu. Nach beendetem Wachstum erhielt man 9,5 Liter überstehende Flüssigkeit aus der Kulturbühe beim Zentrifugieren während 15 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute, worauf man unter reduziertem Druck konzentrierte. Ein Liter des Konzentrats wurde über Nacht gegen 10 Liter Wasser dialysiert und hierauf mittels Ammoniumsulfat einer Fraktionierung unterworfen, worauf 50 ml des Niederschlages bei einer Sättigung zwischen 40 bis 60% mittels Ammoniumsulfat durch eine Säule von DEAE-Sephadex A-24 (Wz. der Fa. Pharmacia AB), gesättigt mittels einer $1/15$ molaren Phosphatpufferlösung, hindurchgeleitet worden. Hierauf wurde diese Lösung durch eine mit der gleichen Phosphatpufferlösung gesättigte Hydroxyapatitsäule hindurchgeleitet, worauf man die gewünschte Verbindung mit 500 ml einer 0,2molaren Phosphatpufferlösung eluierte. 500 ml dieses Eluats wurden dann mittels Ammoniumsulfat einer Fraktionierung unterworfen. Die bis zu einer 70%igen Sättigung mit Ammoniumsulfat erhaltenen Ausfällungen wurden in 50 ml

einer $1/15$ molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,2) gelöst (nachstehend als behandeltes Material I von *Pseudomonas schuylkiliensis* bezeichnet). Zu 0,2 ml dieser Lösung gab man 0,2 ml einer wässrigen Lösung (pH 7,0) enthaltend 10 mg 3-[2-{4-(3-Amino-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon, hinzu. Das Gemisch wurde hierauf auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und dann während 30 Minuten bei 37 °C bebrütet, worauf man 4 mg 3-ANA im Reaktionsgemisch feststellen konnte.

Beispiel 4

10 Liter einer Kulturbühe von *Pseudomonas schuylkiliensis* IAM 1126, erhalten im wesentlichen gemäss Angaben in Beispiel 3, wurden während 15 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, wobei man 9,5 Liter einer überstehenden Flüssigkeit erhielt. Diese Flüssigkeit wurde hierauf unter vermindertem Druck eingengt, wobei man 1 Liter eines Konzentrats erhielt, welches über Nacht gegen 10 Liter Wasser dialysiert und hierauf mit Ammoniumsulfat einer Fraktionierung unterworfen wurde. 50 ml des Niederschlages mit einer Sättigung von 40 bis 60% mittels Ammoniumsulfat wurden durch eine Säule von DEAE-Sephadex A-25, gesättigt mittels einer $1/15$ molaren Phosphatpufferlösung, hindurchgeleitet. Dann wurden 25 μ l der hindurchgeleiteten Lösung in jedes von zwei Reagenzgläsern gegeben und jedes Glas mit 25 μ l einer $1/15$ molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,2), enthaltend 0,5 mg 1-(α -Carboxy-4-hydroxybenzyl)-3-[2-(4-hydroxyphenyl)glycinamido]-2-azetidinon oder 1-(α -Carboxy-4-hydroxybenzyl)-3-[3-(3-indolyl)-2-aminopropionamido]-2-azetidinon, hinzugegeben. Ein jedes dieser Gemische wurde während 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Umsetzung wurde das im Reaktionsgemisch erzeugte 3-ANA nach der obenerwähnten Methode bestimmt mit dem Unterschied, dass eine Mischung von n-Propanol und Wasser (Mischungsverhältnis 7:3) als Entwicklerlösungsmittel verwendet wurde. Die jeweilige Ausbeute betrug 0,1 mg.

Beispiel 5

Jeder Stamm der Bakterien von Mikroorganismen Nr. 2 bis 31, Actinomycetes von Mikroorganismen Nr. 32 bis 41, der Pilze von Mikroorganismen Nr. 42 bis 46 und der Hefen von Mikroorganismen Nr. 47 bis 49, wie sie in der obigen Tabelle I genannt worden sind, wurden in einem Medium und unter Kulturbedingungen gemäss folgender Tabelle II unter Schütteln zum Wachsen gebracht. Nach erfolgter Züchtung wurde jede der Kulturbühen (0,2 ml) mit 0,2 ml einer wässrigen Lösung (pH 8,2), enthaltend 10 mg 3-[2-{4-(3-Amino-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon, versetzt. Hierauf wurde jede Mischung bei 37 °C geimpft, worauf man nach Ablauf von 4 Stunden und 24 Stunden nach Beginn der Inkubation das in jedem Reaktionsgemisch erzeugte 3-ANA feststellte. Die Resultate finden sich in der folgenden Tabelle III.

Tabelle II

	Bakterium	Actinomycetes		Pilz und Hefe	
Medium	«Kyokuto Powdery Bouillon» 2% (vorausgesetzt, dass im Falle der Gattung <i>Acetobacter</i> und <i>Gluconobacter</i> 0,5% Calciumcarbonat dem Medium zugegeben worden ist)	Lactose	1,0%	Glucose	0,4%
		Pepton	0,5%	Pepton	1,0%
		Rindfleischextrakt	0,5%	Hefeextrakt	0,4%
		Natriumchlorid	0,5%	Calciumcarbonat	0,3%

Tabelle II (Fortsetzung)

	Bakterium	Actinomycetes	Pilz und Hefe
pH des Mediums	7,2	7,2	7,3
Temperatur der Kulturbrühe	30 °C	30 °C	25 °C
Dauer der Züchtung	48 Stunden	96 Stunden	96 Stunden

Tabelle III

Mikroorganismus Nr.	Ausbeute (mg) an 3-ANA 4 Stunden nach Beginn der Inkubation	24 Stunden nach Beginn der Inkubation
2	1,3	1,5
3	1,3	1,5
4	0,8	1,5
5	0,8	1,5
6	0,8	—
7	0,2	—
8	0,2	—
9	2,2	—
10	0,8	0,96
11	0,2	0,96
12	0,8	0,96
13	0,8	0,96
14	0,04	0,28
15	0,2	0,28
16	0,2	0,08
17	0,8	0,96
18	0,8	0,96
19	0,8	0,96
20	0,8	0,96
21	0,8	—
22	0,8	—
23	0,2	—
24	1,3	—
25	1,3	—
26	0,8	—
27	0,8	—
28	0,8	—
29	0,8	—
30	1,3	—
31	0,8	—
32	0,8	—
33	1,3	—
34	1,3	—
35	0,8	—
36	0,04	—
37	0,2	—
38	0,2	—
39	0,8	—
40	0,8	—
41	0,2	—
42	0	0,28
43	0	0,08
44	0,2	0,2
45	0,04	0,08
46	0,2	0,28
47	0	0,96
48	0	0,28
49	0	0,08

Beispiel 6

- 15 0,5 ml einer $1/15$ molaren Phosphatpufferlösung, enthaltend 10 mg 3-[2-{4-(3-Benzamido-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon, wurde zu 0,5 ml des gemäss Beispiel 1 erhaltenen, behandelten
- 20 Materials I von *Pseudomonas schuylkiliensis* hinzugegeben. Hierauf wurde das Gemisch während 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, worauf das im Reaktionsgemisch erzeugte 3-ANA nach der obenerwähnten Methode bestimmt wurde mit dem Unterschied, dass man eine Mischung von n-Butanol, Essigsäure und Wasser im Mischungsverhältnis 4:1:2 als Entwicklungslösungsmittel verwendete (Rf-Wert: 0,50). Ausbeute: 1,2 mg.

Beispiel 7

- 0,5 ml einer $1/15$ molaren Phosphatpufferlösung (pH 7,2),
- 30 enthaltend 10 mg 3-[2-{4-(3-Acetamido-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon, wurde zu 0,5 ml des gemäss Beispiel 3 erhaltenen behandelten
- 35 Materials I von *Pseudomonas schuylkiliensis* hinzugegeben. Hierauf wurde das Gemisch während 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, worauf man das im Reaktionsgemisch erzeugte 3-ANA nach der obenerwähnten Methode bestimmte mit dem Unterschied, dass man eine Mischung von n-Propanol und
- 40 Wasser im Mischungsverhältnis von 7:3 als Entwicklerlösungsmittel verwendete. (Rf-Wert: 0,46). Ausbeute: 0,7 mg.

Beispiel 8

- 50 Einheiten Aminopeptidase M Nr. A-7761 (Wz. der Fa. Sigma Chemical Co.) (abgeleitet von Schweinenierenmikrosomen) wurden in 40 ml einer wässrigen Lösung (pH 8,0), enthaltend 2 g 3-[2-{4-(3-Amino-3-carboxypropoxy)-phenyl}-glycinamido]-1-(α -carboxy-4-hydroxybenzyl)-2-azetidinon,
- 50 gelöst und das Gemisch dann während 25 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation stellte man 450 mg 3-ANA im Reaktionsgemisch fest.
- Hierauf wurde das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingeeengt, wobei man 4 ml eines Konzentrats erhielt, das man auf einen pH-Wert von 2,0 einstellte. Hierauf wurde dieses Gemisch unter Verwendung von Cellulose (Entwicklungslösungsmittel: mit Wasser gesättigtes n-Butanol) der Säulenchromatographie unterworfen. 150 ml Fraktionen, enthaltend 3-ANA, wurden gesammelt und unter vermindertem
- 60 Druck eingeeengt. 50 ml Äthyläther wurden hierauf 5 ml des Konzentrats hinzugegeben, wobei man einen Niederschlag erhielt, welcher durch Filtrieren gewonnen wurde. Dann wurde getrocknet, wobei man 85 mg eines weissen Pulvers erhielt. Dieses weisse Pulver wurde in einer kleinen Menge Methanol
- 65 gelöst und das Gemisch über Nacht stehengelassen, wobei man 65 mg weisse Kristalle von 3-ANA erhielt. Smp. 203 bis 206 °C (unter Zersetzung).