



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145583 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Ansøgning nr. 2834/81

(51) Int.Cl.³ C 12 P 35/08

(22) Indleveringsdag 26. jun. 1981

C 07 D 501/57

(24) Løbedag 22. dec. 1976

(41) Alm. tilgængelig 26. jun. 1981

(44) Fremlagt 13. dec. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. 5797/76

(30) Prioritet 25. dec. 1975, 155646/75, JP

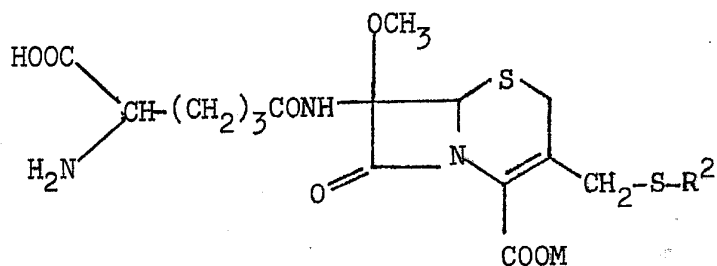
(71) Ansøger YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO. LTD., Tokyo, JP.

(72) Opfinder Takashi Osono, JP: Yoshihiko Oka, JP: Shunichi Watanabe, JP: Takeshi Saito, JP: Hiroshi Gushima, JP: m. fl.

(74) Fuldmægtig Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af
7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxycephalosporin-derivater.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-cephalosporin-derivater med den almene formel



145583 B

hvor R^2 betyder en 5-leddet heterocyclisk gruppe, som indeholder 2-4 nitrogenatomer og yderligere kan indeholde et svovlatom og som kan være substitueret med en lavere-alkylgruppe eller en carboxylavere-alkylthiogruppe, og M betyder et hydrogenatom eller en saltdannende kation udvalgt blandt alkalimetaller, jordalkalimetaller, tungmetaller og baser, der danner kvaternære salte eller aminsalte.

Som eksempler på den heterocycliske gruppe angivet for R^2 i den ovenstående formel kan nævnes 5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl, 1-methyl-1H-tetrazol-5-yl, 5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl og 1,3,4-thiadiazol-2-yl.

Eksempler på alkalimetaller er natrium og kalium, eksempler på jordalkalimetaller er calcium, magnesium og barium, eksempler på tungmetaller er jern, kobber og zink, og eksempler på baser, der danner kvaternære salte eller aminsalte er triethylamin, diethanolamin, piperidin og morpholin.

Nogle af de forbindelser, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er angivet at være fremstillet ved kemiske synteser i britisk patentskrift nr. 1 321 412 (1970), men der er ikke angivet nogen praktiske fysiske og kemiske egenskaber for disse forbindelser i det britiske patentskrift.

De ved den foreliggende fremgangsmåde fremstillede 7-methoxycephalosporinderivater må derfor betragtes som hidtil ukendte.

Cephalosporiner viser udmærkede antimikrobielle aktiviteter overfor Gram-positive og Gram-negative bakterier, men de foreliggende cephalosporinderivater, som har en methoxygruppe i 7-stillingen og en heterocyclisk thiomethylgruppe i 3-stillingen, viser særlig udmærket virkning ved behandling af alvorlige sygdomme forårsaget af infektion med sådanne bakterier som Pseudomonas- og Proteus-arter, overfor hvilke almindelige antibiotica er ineffektive, eller med bakterier, som er resistente overfor almindelige cephalosporiner, der ikke har nogen methoxygruppe i 7-stillingen.

Cephalosporansyre-derivater med en heterocyclisk thiomethylgruppe

i 3-stillingen fremstilles sædvanligvis ved først at fremstille de tilsvarende forbindelser, som har en acetoxymethylgruppe eller en carbamoyloxymethylgruppe i 3-stillingen, ved en gæringsmetode og derpå omsætte produkterne med en heterocyklisk thiolforbindelse.

Det har imidlertid ifølge den foreliggende opfindelse vist sig, at forbindelserne, som har en heterocyklisk thiomethylgruppe i 3-stillingen, kan opnås direkte ved et enkelt gæringstrin.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

De fremstillede forbindelser viser som nævnt udmærkede antimikrobielle aktiviteter i sig selv, og yderligere kan forbindelsernes antimikrobielle aktivitet forøges og deres antimikrobielle spektre ændres ved udskiftning af acylsidekæden i 7-stillingen, dvs.

$\begin{matrix} \text{H}_2\text{N} \\ \text{HOOC} \end{matrix} \text{---} \text{CH}-(\text{CH}_2)_3\text{---CO-}$, med andre acylgrupper, som f.eks. α -aminophenylacetyl, α -carboxylphenylacetyl, α -sulfophenylacetyl, α -hydroxyphenylacetyl, pyridylthioacetyl, thiadiazolylthioacetyl, triazolylacetyl, cyanmethylthioacetyl og trifluormethylthioacetyl, således at forbindelserne med formlen Aa også er nyttige som mellemprodukter ved fremstilling af derivaterne med disse acylgrupper, f.eks. 7 β -cyanmethylthioacetamido-7 α -methoxy-3-(1-methyltetrazol-5-yl-thiomethyl)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre og 7 α -methoxy-3-(1-methyltetrazol-5-yl-thiomethyl)-7 β -(trifluormethylthioacetamido)- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

En særlig foretrukken mikroorganisme, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er en hidtil ukendt stamme, som betegnes *Streptomyces oganensis* Y-G19Z, og som er isoleret fra jorden i Ogano-Town, Chichibugun, Saitama Prefecture, Japan. Denne stamme er blevet deponeret i the Institute of Microbial Industry, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japan, under accessionsnr. FERM-P 2725 og også i the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville Maryland 20852, USA under accessionsnr. ATCC 31167. Stammens mycologiske egenskaber er som følger:

I. Morphologiske egenskaber af stammen *S. oganensis* Y-G19Z: den vokser både på naturlige og syntetiske medier under dannelse

af et velforgrenet substratmycelium, medens dannelsen af luftmycelium ikke er tilstrækkelig og dannelsen af sporer derfor ringe. Sporekæder er lige, tilhører R (rectus) eller RF (rectiflexibiles) type og bærer 10-50 sporer på hver kæde. Sporerne er elliptiske, sfæriske eller cylindriske af form og har en størrelse på 0,45-0,60 x 0,55-0,90 μ m. Sporeoverfladen er glat. Der blev hverken iagttaget flagellatsporer eller sporangium.

II. Kulturegenskaber af stammen *S. oganonensis* Y-G19Z:

Medium	Vækst	Luftmycelium	Opløseligt pigment
Czapek's agar	meget ringe hvid	sparsomt hvidt	intet
Czapek's glucose-agar	god flødegul	moderat gulliggråt	intet meget lidt
glucose-asparagin-agar	god hvid	ringe hvidt	intet
glycerol-asparagin-agar	god hvid til gullighvid	ringe hvidt til gullighvidt	intet
uorganisk saltstivelse-agar	god gulliggrå til blegt gulligbrun	ringe gulliggråt	intet
tyrosin-agar	god bleggul	ringe gulliggråt	lidt blegt gulliggråt
jern og gærekstrakt-tyrosin-agar	god bleggul til gulligbrun	godt brunlig hvidt til gulliggråt	meget lidt lyst brunliggråt
nærings-agar	god blegt gulligbrun	godt, pulveragtigt blegt orange til blegt brunt	lidt gulligbrunt

Medium	Vækst	Luftmycelium	Opløseligt pigment
Bennett's agar	god blegt gulligbrun	godt brunliggråt blegt orange til blegt lyserødt	meget lidt
calciummalat-agar	moderat flødefarvet	intet	intet
kartoffelprop	god blegt gulligbrun	godt gulliggråt til blegt brunliggråt	brunliggråt til mørkt gullig- brunt
blodagar	god olivengrå til mørk olivengrå	intet	gulliggråt til mørkt rødlig- brunt
Loeffler's serummedium	god	intet	intet

III. Fysiologiske egenskaber af stammen *S. oganonensis* Y-G19Z:

tyrosinasedannelse	negativ	
nitratreduktion	positiv	
koagulering af skummetmælk	positiv,	svagt
peptonisering af skummetmælk	positiv,	svagt
hydrolyse af stivelse	positiv	
smeltning af gelatine	positiv	
cellulosenedbrydning	negativ	
hæmolyse	positiv	
solubilisering af calciummalat	positiv	

Udnyttelse af carbonforbindelser:

Carbonkilde	Udnyttelse
glucose	+
arabinose	+
saccharose	-
xylose	+
inositol	-
mannitol	+
fructose	+
rhamnose	-
rhaffinose	-

Karakteristiske træk ved stammen *Streptomyces oganonensis* Y-G19Z kan sammenfattes som følger:

1. Den tilhører de ikke-chromogene *Streptomyces*-stammer.
2. Dens luftmycelium er lige, uden verticillier (R eller RF type).
3. Sporerne er sfæriske eller elliptiske.
4. Sporeoverfladen er glat.
5. Den giver blegt gulliggrå til blegt gulligbrun vækst på forskellige medier.
6. Luftmyceliets farve er brunlighvid, gullighvid og gulliggrå.
7. Den producerer et antibiotisk stof kaldet Y-G19ZD3 tilhørende gruppen 7-methoxycephalosporiner.

Ved eftersøgelse af kendte stammer med de ovennævnte egenskaber kan der som den nærmest beslægtede stamme nævnes *Streptomyces globisporus*, beskrevet i S.A. Waksman: the Antinomycetes 2, 218 (1961) og International Journal of Systematic Bacteriology, 18, (4) 324-325 (1968).

Ved sammenligning med den ovennævnte *S. globisporus* adskiller stamme Y-G19Z sig imidlertid fra denne på de punkter, som er anført i den følgende tabel:

Egenskab	Y-G19Z	S. globisporus
sporestørrelse (μm)	0,45-0,60 x 0,55-0,90	1,2-1,4 x 1,8-2,0 eller 0,9-1,4 sfærisk
opløseligt pigment på glycerol-aspara- gin-medium	intet	gult til grønliggult
rhamnoseudnyttelse	negativ	positiv
stivelsehydrolyse	stærk	svag
koagulering af skummetmælk	positiv	negativ
peptonisering af skummetmælk	svag	stærk
produktion af cephalosporin- antibiotica	positiv	negativ

Som det klart fremgår af de forskelle, som er anført i den ovenstående tabel, er stammen Y-G19Z, som kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, en hidtil ukendt stamme. Den har fået navnet "Streptomyces oganonensis" og er deponeret under nr. ATCC 31167.

Ud over denne hidtil ukendte stamme kan de følgende kendte stammer anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen: Streptomyces viridochromogenes IFO 13347, Streptomyces rochei IFO 12908, Streptomyces lipmanii IFO 13306 (se US patentskrift nr. 3 719 563) og Streptomyces clavuligerus IFO 13307 (se japansk fremlæggeskrift nr. 45 594/74).

Fremstillingen af de ønskede forbindelser med formlen Aa udføres ved dyrkning af en af de ovennævnte stammer i et almindeligt næringsmedium, hvortil der er sat en heterocyclisk thiol svarende til den heterocycliske thiogruppe, som skal indføres i 3-stillingen.

Som eksempler på de heterocycliske thiolere, som kan tilsættes næringsmediet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan nævnes imidazolthiol, dihydroimidazolthiol, pyrazolthiol, triazolthiol, tetrazolthiol, thiadiazolthiol og thiatriazolthiol. Disse heterocycliske ringe kan være substitueret med en lavere alkylgruppe eller en carboxy-lavere-alkylthiogruppe.

Disse heterocycliske thiolere kan anvendes som saltene deraf, og disse salte kan være uorganiske salte, såsom alkalimetalsalte, jordalkalimetalsalte, ammoniumsalte osv., og salte med organiske baser, såsom triethylamin, triethanolamin, dicyclohexylamin, lysin, arginin, histidin, et basisk vandopløseligt antibiotikum, f.eks. kanamycin, alkaloid, basisk protein, osv. Der kan om nødvendigt vælges salte med høj vandopløselighed, og hvis de heterocycliske thiolere viser en stærk toxicitet overfor de antibiotica-producerende stammer, kan der vælges salte, som er tungtopløselige i vand.

Også to molekyler af den samme heterocycliske thiol bundet sammen af S/S-bindingen, dvs. R^2S-SR^2 , kan anvendes.

Fremstillingen af de ønskede antibiotica ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres ved dyrkning af en af de ovennævnte stammer i et næringsmedium med tilsætning af den ovenfor beskrevne heterocycliske thiol eller et salt eller et derivat deraf. Dyrkningen udføres ved konventionelle metoder til dyrkning af mikroorganismer, men sædvanligvis foretrækkes submers dyrkning i et flydende dyrkningsmedium. Ethvert dyrkningsmedium, som indeholder næringsstoffer for den anvendte stamme, kan anvendes. Det kan være både syntetiske og halvsyntetiske dyrkningsmedier og naturlige dyrkningsmedier indeholdende de førnævnte næringsstoffer. Til sammensætning af dyrkningsmediet kan glucose, saccharose, mannitol, glycerol, dextrin, stivelse, vegetabiliske olier osv. anvendes som carbonkilder, og kødekstrakt, pepton, glutenmel, majsfrømel, sojabønneemel, jordnøddemel, fiskemel, majsstøbevand, torgær, gærekstrakt, ammoniumsulfat, ammoniumnitrat, urinstof og andre organiske og uorganiske nitrogenkilder som nitrogenkilder. Om nødvendigt kan der også sættes et metalsalt, såsom sulfaterne, nitraterne, carbonaterne og phosphaterne af Na, K, Mg, Ca, Zn og Fe, til dyrkningsmediet. Endvidere kan der om nødvendigt sættes materialer til fremme af

dannelsen af antibiotica eller skumdæmpende midler, såsom methionin, cystein, cystin, methyloleat, svinefedt, siliconeolie, overfladeaktive midler osv., til dyrkningsmediet.

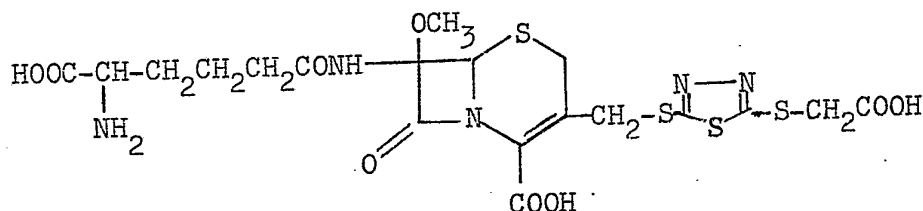
Den førnævnte heterocycliske thiol eller saltet eller derivatet deraf tilsættes sædvanligvis i en koncentration på 0,1-5 mg/ml, fortrinsvis 0,5-2 mg/ml, beregnet som den heterocycliske thiol, og kan tilsættes dyrkningsmediet på én gang før dyrkningens begyndelse eller i flere opdelte portioner i de første stadier af dyrkningen.

Det er almindeligvis ønskeligt at udføre dyrkningen under aerobe forhold, og dyrkningstemperaturen er sædvanligvis fra omkring 18 til omkring 35°C, fortrinsvis omkring 30°C. Endvidere opnås ønskelige resultater, når dyrkningsmediets pH-værdi holdes ved fra omkring 5 til omkring 10, fortrinsvis 6-8. Dyrkningstiden afhænger af det anvendte dyrkningsmediums sammensætning og temperaturen, men er almindeligvis fra omkring 3 dage til omkring 10 dage, og således er det ønskede materiale selektivt dannet i mediet efter dyrkningens afslutning.

Det ønskede produkt kan isoleres eller udvindes fra dyrkningsvæsken på konventionel måde til isolering af antibiotica fra dyrkningsvæsken eller myceliet. Det ønskede antibioticum indeholdes hovedsageligt i dyrkningsvæsken, og derfor fjernes myceliet derfra ved centrifugering eller filtrering, og det effektive materiale ekstraheres fra filtratet. Det ønskede materiale adskilles, udvindes og renses fra filtratet ved midler, der almindeligvis anvendes til fremstilling af antibiotica, såsom udnyttelse af forskellene i opløselighed i et egnet opløsningsmiddel, forskellene i adsorbtiv affinitet til forskellige adsorbenser eller forskellene i opdeling mellem 2 væskefaser. Disse metoder kan anvendes hver for sig eller om nødvendigt som en passende kombination, eller de kan gentages flere gange.

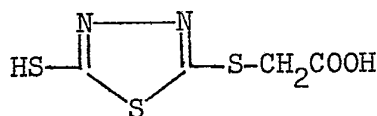
Flere praktiske eksempler på de hidtil ukendte 7-methoxycephalosporinforbindelser, som kan fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er anført nedenfor:

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

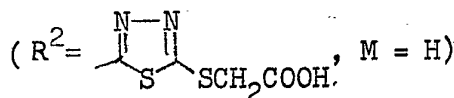


Tilsætningsforbindelse:

2-carboxymethylthio-5-mercapto-1,3,4-thiadiazol;



De fysiske og kemiske egenskaber af den ovennævnte forbindelse I med den almene formel Aa



er som følger

- (1) hvidt pulver;
- (2) begynder at smelte ved 156-160°C og bliver brunt og dekomponeres fra omkring 170°C;
- (3) letopløselig i vand, tungtopløselig i methanol og næsten uopløselig i andre organiske opløsningsmidler;
- (4) amphotert materiale, som viser positiv ninhydrin-reaktion;
- (5) giver et ultraviolet absorptionspektrum som vist i fig. 1 på tegningen, målt i en 1/100 M fosfatpufferopløsning med en pH-værdi på 6,4 og viser absorptionsmaksimum ved 287 nm;
- (6) giver et infrarødt absorptionspektrum som vist i fig. 2, målt som kaliumbromidtablet, og viser absorptioner ved 3413 cm⁻¹, 2920 cm⁻¹, 1763 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹, 1515 cm⁻¹ og 1380 cm⁻¹;
- (7) giver de følgende signaler i det magnetiske kerneresonansspektrum, målt under anvendelse af TMS som ydre standard i tungt vand

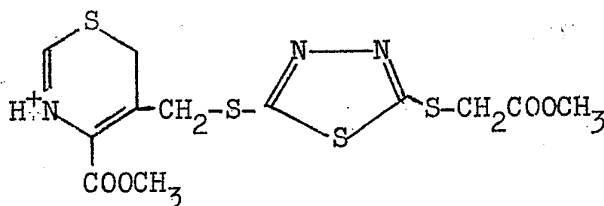
δ værdi (ppm):

2,35 (4H, multiplet), 2,96 (2H, multiplet),
4,00 (3H, singlet), 3,73-4,33 (2H, kvartet, $J=18\text{Hz}$),
4,25 (1H, multiplet), 4,44 (2H, singlet),
4,42-4,91 (2H, kvartet, $J=14\text{Hz}$),
5,63 (1H, singlet);

(8) produktet opnået i den hidtil reneste tilstand viser de følgende elementanalytiske værdier:

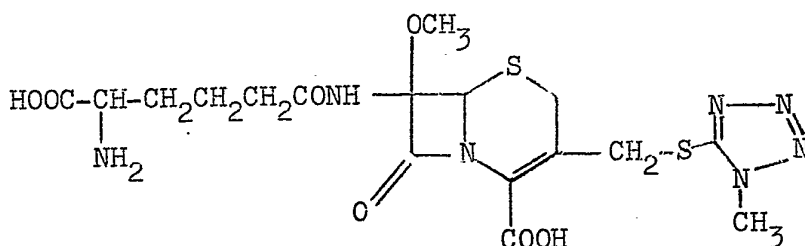
C: 35,95%; H: 3,87%; N: 10,85%, S: 18,33%;

- (9) giver α -aminoadipinsyre, når den hydrolyseres med 6N saltsyre;
(10) forbindelsens massespektrum efter N-chloracetylering af forbindelsen og omdannelse af produktet til methylesteren giver det følgende fragment med m/e 392, dvs.



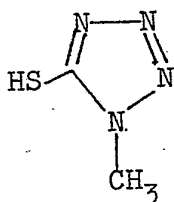
I betragtning af alle de ovennævnte resultater er det klart, at denne forbindelse er en 7-methoxycephalosporin-forbindelse, da den giver en absorption ved 1763 cm^{-1} (cyklisk lactam) i det infrarøde absorptionsspektrum og viser signalerne ved 4,00 ppm (3H, singlet, 7-OCH₃), 5,63 ppm (1H, singlet, 6-CH), 3,73-4,33 (2H, kvartet, $J=18\text{ Hz}$, 2-CH₂) og 4,42-4,91 (2H, kvartet, $J=14\text{ Hz}$, 3-sidekæde-CH₂) i det magnetiske kerneresonansspektrum, og den giver α -aminoadipinsyre ved sur hydrolyse, og da den yderligere giver absorptionen ved 4,44 ppm (2H, singlet, CH₂ i -S-CH₂-COOH) i det magnetiske kerneresonansspektrum og giver fragmentet med m/e 392 i derivatets massespektrum, er forbindelsen blevet bestemt til at have den førnævnte struktur, hvori der er indført den heterocykliske thiol.

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



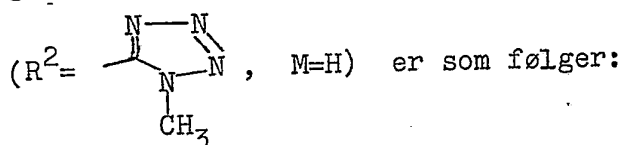
Tilsætningsforbindelse:

5-mercapto-1-methyl-1H-tetrazol.



De fysiske og kemiske egenskaber af den ovennævnte forbindelse II

med formlen Aa



- (1) hvidt pulver;
- (2) giver brun misfarvning og dekomponering ved 160-170°C;
- (3) letopløselig i vand, tungtopløselig i methanol og næsten uopløselig i andre organiske opløsningsmidler;
- (4) amphotert materiale som viser positiv ninhydrin-reaktion;
- (5) giver det i fig. 3 viste ultraviolette absorptionsspektrum, målt i en 1/100 M phosphatpufferopløsning med en pH-værdi på 6,4, og har absorptionsmaksimum ved 273 nm;
- (6) giver det i fig. 4 viste infrarøde absorptionsspektrum, målt som kaliumbromidtablet, og viser absorptioner ved 3413 cm⁻¹, 2920 cm⁻¹, 1765 cm⁻¹, 1620 cm⁻¹, 1515 cm⁻¹ og 1390 cm⁻¹;
- (7) det magnetiske kerneresonansspektrum, målt under anvendelse af TMS som ydre standard i tungt vand, viser de følgende signaler:

δ værdi (ppm):

2,36 (4H, multiplet), 2,96 (2H, multiplet),
 3,98 (3H, singlet), 4,38 (1H, multiplet),
 4,50 (3H, singlet), 5,59 (1H, singlet);

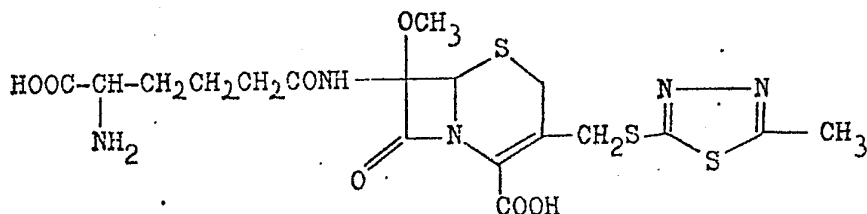
(8) Det ovennævnte materiale, opnået i den hidtil reneste tilstand, viser de følgende elementanalytiske værdier:

C: 37,48%, H: 4,25%, N: 16,74% og S: 10,90%;

(9) Forbindelsen giver α -aminoadipinsyre, når den hydrolyseres med 6 N saltsyre, og giver 5-mercapto-1-methyl-1H-tetrazol, når den hydrolyseres i methanol med "Dowex [®] 50 W" (H-type).

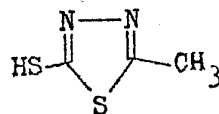
I betragtning af alle de ovennævnte resultater er det klart, at forbindelsen er en 7-methoxycephalosporin-forbindelse, da den giver signalerne ved 3,98 ppm (3H, singlet, 7-OCH₃) og 5,59 ppm (1H, singlet, 6-CH) i det magnetiske kerneresonansspektrum, absorptionen ved 1765 cm⁻¹ (cyklisk lactam) i det infrarøde absorptionsspektrum og giver α -aminoadipinsyre ved sur hydrolyse, og da den yderligere viser absorptionen ved 4,50 ppm (3H, singlet, tetrazol-N-methyl) i det magnetiske kerneresonansspektrum og også giver 5-mercapto-1-methyl-1H-tetrazol ved mild hydrolyse, er forbindelsen blevet bestemt til at have den før nævnte struktur, hvori der er indført den heterocykliske thiol.

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

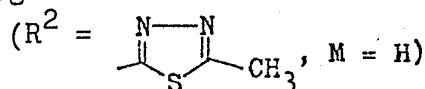


Tilsætningsforbindelse:

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



De fysiske og kemiske egenskaber af den ovennævnte forbindelse III med formlen Aa



er som følger:

- (1) lyst gulligt hvidt pulver;
- (2) viser intet distinkt smeltepunkt og giver brun misfarvning og dekomponering ved omkring 170°C ;
- (3) let opløselig i vand, tungt opløselig i methanol, men uopløselig i andre organiske opløsningsmidler;
- (4) amphotert materiale, som viser positiv ninhydrin-reaktion;
- (5) giver det i fig. 5 viste ultraviolette adsorptionsspektrum, målt i en 1/100 M phosphatpuffer-opløsning med en pH værdi på 6,4, og har absorptionsmaksimum ved 272 nm;
- (6) giver det i fig. 6 viste infrarøde adsorptionsspektrum, målt som kaliumbromid-tablet, og viser absorptioner ved 3420 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} , 1765 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} og 1385 cm^{-1} .
- (7) Det magnetiske kerneresonansspektrum, målt under anvendelse af TMS som ydre standard i tungt vand, giver de følgende signaler:

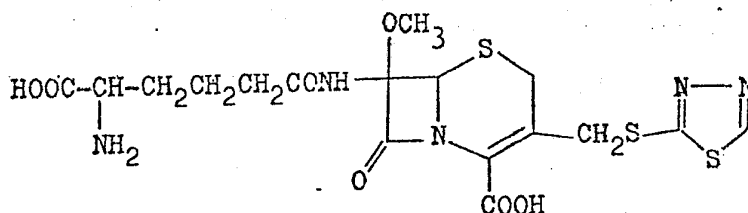
 δ værdi (ppm):
 2,34 (4H, multiplet), 2,95 (2H, multiplet),
 3,19 (3H, singlet), 3,72-4,31 (2H, kvartet, $J = 18\text{ Hz}$),
 3,99 (3H, singlet), 4,26 (1H, multiplet), 4,40-4,95
 (2H, kvartet, $J = 14\text{ Hz}$), 5,63 (1H, singlet);
- (8) forbindelsen fremstillet i den hidtil reneste tilstand viser de følgende elementanalytiske værdier:

 C: 37,82%, H: 4,01%, N: 12,90%, S: 14,97%;
- (9) giver α -aminoadipinsyre, når den hydrolyseres med 6 N saltsyre, og giver 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol, når den

hydrolyseres i methanol med "Dowex ^(R) 50 W" (H type).

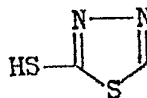
I betragtning af alle de ovennævnte resultater er det klart, at forbindelsen er en 7-methoxycephalosporin-forbindelse, da den giver absorptionen ved 1765 cm^{-1} (cyklisk lactam) i det infrarøde absorptionsspektrum, signalerne ved 3,99 ppm (3H, singlet, 7-OCH₃), 5,63 ppm (1H, singlet, 6-CH), 3,72-4,31 ppm (2H, kvartet, $J = 18\text{ Hz}$, 2-CH₂), 4,40-4,95 (2H, kvartet, $J = 14\text{ Hz}$, 3-sidekæde CH₂) i det magnetiske kerneresonansspektrum og giver α -aminoadipinsyre ved sur hydrolyse, og da den endvidere viser absorptionen ved 3,19 ppm (3H, singlet, thiadiazol C-CH₃) i det magnetiske kerneresonansspektrum og giver 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol ved mild hydrolyse, er forbindelsen blevet bestemt til at have den ovennævnte struktur, hvori der er indført den heterocykliske thiol.

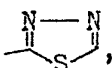
IV. 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre



Tilsætningsforbindelse:

2-mercapto-1,3,4-thiadiazol



De fysiske og kemiske egenskaber af den ovennævnte forbindelse IV med formlen Aa ($R^2 =$ , $M = H$) er som følger:

- (1) lyst gulligt hvidt pulver;
- (2) viser intet distinkt smeltepunkt, men giver brun misfarvning og dekomponering ved omkring $175-180^{\circ}\text{C}$;

- (3) let opløselig i vand, tungt opløselig i methanol, men uopløselig i organiske opløsningsmidler;
- (4) amphotert materiale, som viser positiv ninhydrin reaktion;
- (5) giver det i fig. 7 viste ultraviolette absorptionsspektrum, målt i en 1/100 M phosphatpuffer-opløsning med en pH på 6,4, og har maksimal absorption ved 274 nm;
- (6) giver det i fig. 8 viste infrarøde absorptionsspektrum, målt som kaliumbromid-tablet, og viser absorptioner ved 3400 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} , 1765 cm^{-1} , 1610 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} og 1365 cm^{-1} ;
- (7) det magnetiske kerneresonansspektrum, målt under anvendelse af TMS som ydre standard i tungt vand, giver de følgende signaler:
- δ værdi (ppm):
2,30 (4H, multiplet), 2,93 (2H, multiplet), 3,69-4,29 (2H, kvartet, $J = 18\text{ Hz}$), 3,97 (3H, singlet), 4,26 (1H, multiplet), 4,45-4,99 (2H, kvartet, $J = 14\text{ Hz}$), 5,56 (1H, singlet), 9,85 (1H, singlet);
- (8) det ovennævnte materiale, opnået i den hidtil reneste tilstand, viser de følgende elementanalytiske værdier:
- C: 37,53%, H: 4,36%, N: 12,77%, S: 16,42%;
- (9) giver α -aminoacidpainsyre, når den hydrolyseres med 6 N saltsyre, og giver 2-mercapto-1,3,4-thiadiazol, når den hydrolyseres i methanol med "Dowex [®] 50 W" (H type).

I betragtning af alle de ovennævnte resultater er det klart, at forbindelsen er en 7-methoxycephalosporin-forbindelse, da den giver absorptionen ved 1765 cm^{-1} i det infrarøde absorptionspektrum, giver signalerne ved 3,97 ppm (3H, singlet, 7-OCH₃), 5,56 ppm (1H, singlet, 6-CH), 3,69-4,29 ppm (2H, kvartet, $J = 18\text{ Hz}$, 2-CH₂), 4,45-4,99 (2H, kvartet, $J = 14\text{ Hz}$, 3-sidekæde-CH₂) i det magnetiske kerneresonansspektrum og giver α -aminoacidpainsyre ved sur hydrolyse, og da den endvidere viser absorptionen ved 9,85

ppm (1H, singlet, thiadiazol-CH) i det magnetiske kerneresonansspektrum og giver 2-mercapto-1,3,4-thiadiazol ved mild hydrolyse, er forbindelsen blevet bestemt til at have den ovennævnte struktur, hvori der er indført den heterocykliske thiol.

Resultaterne af de forskellige chromatografiske og papirelektrophoretiske analyser af de ovennævnte forbindelser I, II, III og IV, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er anført nedenfor.

Rf-værdierne for disse forbindelser ved tyndtlagschromatografi under anvendelse af mikrokrySTALLINSK cellulose ("Avicel SF", handelsnavn) er anført i den følgende tabel.

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

Udviklingssystem/(volumenforhold):

1. Isopropanol : n-butanol : eddikesyre : vand (21 : 3 : 7 : 9).
2. n-butanol : eddikesyre : vand (4 : 1 : 2).
3. n-butanol : eddikesyre : vand (6 : 1,5 : 2,5).

Kontrolprøven, cephamycin C, er 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-carbamoyloxymethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

Kontrolprøverne Y-G19Z-D3 og Y-G19Z-D2, er de 7-methoxycephalosporin-forbindelser, som tidligere er udskilt fra dyrkningsvæsken af *Streptomyces oganensis* af de samme opfindere (se de japanske tilgængelige patentansøgninger nr. 109 753/74 og 146 593/75).

Rf-værdierne, opnået ved papiradskillelseschromatografi under anvendelse af Wattman nr. 1 filterpapir og også et udviklingssystem bestående af n-butanol : eddikesyre : vand (volumenforhold 4 : 1 : 2), er som følger:

	Rf-værdi
Forbindelse I	0,40
Forbindelse II	0,39
Cephalosporin C	0,36
7-methoxy-cephalosporin C	0,40
Cephameycin C	0,35
Y-G19Z-D3	0,24
Y-G19Z-D2	0,25

Derpå blev forbindelserne analyseret under anvendelse af et "Hitachi 635 High Speed Liquid Chromatography Apparatus", og resultaterne er som følger:

Søjle: 3 x 500 mm rustfast stålkolonne
 Harpiks: "Hitachi 2610" (kationbytterharpiks, handelsnavn)
 Udviklingssystem: 0,2 M citratpufferopløsning (pH 3,6)
 Strømningshastighed: 0,6 ml/min.
 Korthastighed: 1,0 cm/min.

	Tilbageholdelsestid
Forbindelse I	5 min. 33 sek.
Forbindelse II	6 min. 00 sek.
Forbindelse III	9 min. 35 sek.
Cephalosporin C	5 min. 18 sek.
7-methoxy-cephalosporin C	5 min. 09 sek.
Cephameycin C	5 min. 18 sek.
Y-G19Z-D3	3 min. 42 sek.
Y-G19Z-D2	3 min. 42 sek.

Endvidere er resultaterne, opnået ved analyse under anvendelse af det ovennævnte apparat under de følgende betingelser, anført i den følgende tabel.

Søjle: "/u Bondapak C₁₈" (fremstillet af Waters Ltd.) på 4 x

300 mm.

Udviklingssystem: acetonitril : 0,1% eddikesyreopløsning (pH 3,3)/
(volumenforhold 1 : 9)

Strømningshastighed: 0,8 ml/min.

Korthastighed: 1,0 cm/min.

	Tilbageholdelsestid
Forbindelse I	3 min. 14 sek.
Forbindelse II	1 min. 52 sek.
Forbindelse III	2 min. 55 sek.
Forbindelse IV	1 min. 56 sek.

Resultaterne opnået ved højspændings-papirelektrophorese er som følger:

Filterpapir: Wattman Nr. 1.

Udviklingsmiddel: 10% eddikesyre (pH 2,2).

Spænding: 42 V/cm.

Løbetid: 1 time.

	Vandringsafstand
Forbindelse I	- 3,6 cm
Forbindelse II	- 3,3 cm
Forbindelse III	- 3,6 cm
Forbindelse IV	- 3,9 cm
Cephalosporin C	- 3,5 cm
7-methoxy-cephalosporin C	- 3,4 cm
Cephameycin C	- 3,5 cm
Y-G19Z-D3	- 6,1 cm
Y-G19Z-D2	- 6,1 cm
Cysteinsyre	- 7,5 cm
Glutathion	- 1,2 cm

Herefter er den antibakterielle aktivitet af de ovennævnte forbindelser I, II, III og IV, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, anført i den følgende tabel sammen med værdierne for

cephalosporin C til sammenligning.

Der anvendtes hjerteinfusionsagar-skive-metoden (500 μ g/ml opløsning).

Talværdierne i den nedenstående tabel angiver diameteren (mm) af inhiberingszonen.

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

(Note): I: Forbindelsen I (opfindelsen).

II: Forbindelsen II "

III: Forbindelsen III "

IV: Forbindelsen IV "

C: Cephalosporin C (sammenligning)

Hver af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser I, II, III og IV kan indgives i forskellige former alene eller i kombination med andre lægemidler. Således kan forbindelserne indgives oralt, ved intramuskulær injektion, ved intravenøs injektion osv. i form af kapsler, tabletter, pulvere, granulater, opløsninger og suspensioner. Forskellige bærere tilsættes præparaterne, f.eks. mannitol, saccharose, glucose, steriliseret destilleret vand, saltopløsning og en vegetabilsk olie, såsom jordnøddeolie eller sesamolie. Endvidere kan der tilsættes andre ingredienser, såsom stabilisatorer, bindemidler, antioxidant, konserveringsmidler, glittemidler til fremstilling af tabletter, suspensionsmidler, viskositetsforøgende midler, parfumer osv.

Som salte af de ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser anvendes saltene af uorganiske eller organiske baser, som er farmaceutisk acceptable eller nyttige. Doserne af lægemidlerne afhænger hovedsageligt af patientens tilstand og vægt og også af indgivningsmåden, dvs. oral eller parenteral indgivning. I almindelighed indgives 50 mg/kg på en gang eller nogle få gange om dagen.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelser viser udmærkede antimikrobielle aktiviteter og er nyttige til prophylaxe og behandling af sygdomme hos mennesker og dyr og kan endvidere anvendes som mellemprodukter til fremstilling af andre effektive 7-methoxycephalosporin-derivater. I alle tilfælde foretrækkes det, at forbindelsen isoleres som det rene produkt eller som et højkoncentreret råprodukt.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved de efterfølgende eksempler.

EKSEMPEL 1

Fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre I.

Et dyrkningsmedium indeholdende 1% stivelse, 1% glucose, 1,5% sojabønneemel, 0,5% gærekstrakt, 0,1% dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% magnesiumphosphat og 0,3% natriumchlorid blev anbragt i 500 ml Sakaguchi-kolber med 100 ml i hver og steriliseret ved 120°C i 20 min. Hvert medium blev podet med *Streptomyces oganensis* stamme Y-G19Z og dyrket i 48 timer ved 30°C.

Et dyrkningsmedium med den ovennævnte sammensætning blev anbragt i 2000 ml Sakaguchi-kolber med 400 ml i hver, steriliseret ved 120°C i 20 min. og podet med det ovenfor fremstillede podemateriale i en koncentration på 2-3% efterfulgt af dyrkning i 24 timer ved 30°C til frembringelse af en podekultur.

Derefter blev 60 l af et dyrkningsmedium indeholdende 7% stivelse, 2% glutenmel, 2% sojabønneemel, 0,8% glycerol, 0,1% "Casamino"-syre, 0,01% jern(III)-sulfat og 55 g natriumhydroxid fordelt i to 100

liters fermentorer sammen med 10 ml af et skumdæpende middel bestående af en stabil højmolekylær polyoxyalkylenforbindelse forhandlet under navnet "Adecanol", og efter sterilisering i 30 min. ved 120 °C blev hvert medium podet med 800 ml af podekulturen og dyrket i 24 timer ved 30 °C. I en vandig natriumhydroxidopløsning opløstes 2-carboxymethylthio-5-mercapto-1,3,4-thiadiazol, og den således dannede opløsning blev steriliseret ved højt tryk og sat til hver fermentor op til 0,05% af podematerialet, hvorpå der blev dyrket i yderligere 90 timer.

Efter at dyrkningen var fuldført blev dyrkningsvæsken indstillet til pH 2,0 og derpå blandet med et filtreringshjælpemiddel bestående af finpulveriseret diatomejord forhandlet under navnet "Radiolite". Blandingen blev filtreret ved hjælp af en filterpresse, og filtraterne blev kombineret til opnåelse af omkring 100 l filtrat. Filtratet blev indstillet til pH 3,0 med en vandig natriumhydroxidopløsning, sendt igennem en 12 liters søjle af ionbytterharpiks "Amberlite® XAD-2", og søjlen blev vasket med 30 l vand og derpå elueret med 30 l 50% vandig acetone. Det opsamlende eluat blev koncentreret til 5,5 l, og efter fjernelse af dannede urenheder sættes vand til remanensen til frembringelse af 10 l opløsning. Den således fremstillede opløsning blev indstillet til pH 3,5 med fortyndet saltsyre og derpå sendt igennem en 3 liters søjle af ionbytterharpiks "Amberlite® IRA-68". Efter vaskning af søjlen med 6 l vand udførtes eluering ved hjælp af en vandig opløsning (pH 7,2) indeholdende 1 M natriumnitrat og 0,1 M natriumacetat til opnåelse af omkring 5 l opløsning indeholdende antimikrobielt aktivt materiale. Opløsningen blev indstillet til pH 3,0, sendt igennem en 1 liters "Amberlite® XAD-2" søjle, og efter vaskning af søjlen med vand blev den elueret med 50% vandig acetone til opnåelse af omkring 400 ml vandig opløsning indeholdende antimikrobielt aktivt materiale. Ved lyophilisering af opløsningen blev der opnået omkring 18 g råt pulver af den ønskede forbindelse I.

De 18 g råt pulver blev underkastet søjlechromatografi under anvendelse af omkring 800 ml tværbunden dextran substitueret med diethylaminoethylgrupper forhandlet under navnet "DEAE-Sephadex® A-25" (eddikesyre-type) fyldt med en lille mængde 0,5 M ammoniumbromid/eddikesyre-pufferopløsning og fraktioneret i effektive komponenter. De opnåede antimikrobielt aktive fraktioner blev op-

samlet, sendt igennem en 500 ml "Amberlite[®] XAD-2"søjle, og efter vaskning med vand blev søjlen elueret med 25% vandig acetone, og eluatet blev indampet til tørhed.

Derpå blev den opnåede produktremanens underkastet søjlechromatografi under anvendelse af mikrokrySTALLINSK cellulose ("Avicel"), præpareret med en opløsningsmiddelblanding af isopropanol og vand i volumenforholdet 7:3, og under anvendelse af den samme opløsningsmiddelblanding. Den opnåede antimikrobielt aktive fraktion blev anbragt som en plet på en tyndtlagsplade af "Avicel SF", udviklet med en blanding af isopropanol: n-butanol: eddikesyre: vand (volumenforhold 21:3:7:9), og derpå blev der sprøjtet en 0,25% opløsning af ninhydrin i pyridin på pladen efterfulgt af opvarmning til frembringelse af farvning. De fraktioner, som udviste en Rf-værdi på 0,39, blev opsamlet. Fraktionen blev vacuumindampet til tørhed ved 45-50°C og derpå underkastet søjlechromatografi på mikrokrySTALLINSK cellulose ("Avicel"), præpareret med en opløsningsmiddelblanding af isopropanol/n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 21:3:7:9). Den således opnåede antimikrobielle fraktion blev underkastet tyndtlagschromatografi på "Avicel SF" med den ovennævnte opløsningsmiddelblanding, og ved at følge den samme procedure som ovenfor blev de fraktioner, som udviste en Rf-værdi på 0,39 opsamlet og vacuumindampet til tørhed.

Produktremanensen blev yderligere rensed ved en søjlechromatografi på mikrokrySTALLINSK cellulose under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 6:1,5:2,5). Den rensede aktive fraktion blev indampet til tørhed og derpå opløst i en lille mængde destilleret vand. Opløsningen blev udviklet på en søjle af tværbundet dextrangel forhandlet under navnet "Sephadex[®] G-10" under anvendelse af destilleret vand. De fraktioner, som udviste antimikrobiel aktivitet, blev opsamlet og underkastet tyndtlagschromatografi som angivet ovenfor under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 6:1,5:2,5). De fraktioner, som udviste Rf 0,32 blev opsamlet, koncentreret og derpå underkastet lyophilisering, hvorved der blev opnået omkring 80 mg hvid 7-(5-amino-5-carboxy-valeramido)-3-(5-carboxymethyl-1,3,4-thiadiaz-

zol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

EKSEMPEL 2

Fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre II.

Et dyrkningsmedium indeholdende 1% stivelse, 1% glucose, 1,5% sojebønnemel, 0,5% gærekstrakt, 0,1% dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% magnesiumsulfat og 0,3% natriumchlorid blev anbragt i 500 ml Sakaguchi-kolber med 100 ml i hver og steriliseret i 20 min. ved 120°C. Derpå blev hvert medium podet med *Streptomyces oganoniensis* stamme Y-G19Z efterfulgt af dyrkning i 48 timer ved 30°C. Et yderligere dyrkningsmedium med den ovennævnte sammensætning blev anbragt i 2 liters Sakaguchi-kolber med 400 ml i hver, og efter sterilisering i 20 min. ved 120°C blev hvert medium podet med op til 2-3% af den ovenfor fremstillede dyrkningsvæske og dyrket i yderligere 24 timer ved 30°C til opnåelse af et podemateriale.

Derefter blev 60 l af et dyrkningsmedium indeholdende 7% stivelse, 2% glutenmel, 2% sojabønnemel, 0,8% glycerol, 0,1% "Casamino"-syre, 0,01% jern(III)-sulfat og 55 g natriumhydroxid anbragt i 2 100 liters fermentorer, hver portion sammen med 10 ml af det skumdæmpende middel "Adecanol", og efter sterilisering i 30 min. ved 120 °C, blev hvert medium podet med 800 ml af det ovenfor fremstillede podemateriale efterfulgt af dyrkning i 24 timer ved 30 °C. Derpå opløstes 1-methyl-5-mercapto-1H-tetrazol i en vandig natriumhydroxidopløsning, og opløsningen blev steriliseret ved højt tryk og tilsat dyrkningsvæsken i en koncentration på 0,05%, hvorefter blandingen blev dyrket i yderligere 90 timer.

Efter at dyrkningen var fuldført, blev den således dannede dyrkningsvæske indstillet til pH 2,0 og derpå blandet med filtreringshjælpmidlet "Radiolite" under omrøring. Blandingen blev filtreret under anvendelse af en filterpresse, og de opnåede filtrater blev kombineret til opnåelse af omkring 100 l filtrat.

Filtratet blev indstillet til pH 3,0 med en vandig natriumhydroxidopløsning, sendt igennem en 12 liters "Amberlite XAD-2"søjle, og efter vaskning af søjlen med 30 l vand blev den elueret med 30 l 50% vandig acetone. Eluatet blev koncentreret til 5,5 l, og

koncentratet indstillet til pH 3,5 med fortyndet saltsyre og sendt igennem en 3 liters "Amberlite[®] IRA-68" (Cl-type) søjle. Søjlen blev vasket med 6 l vand og fraktioneret med en vandig opløsning (pH 7,2) indeholdende 1 M natriumnitrat og 0,1 M natriumacetat til opnåelse af omkring 5 l af en opløsning indeholdende et antimikrobielt aktivt materiale. Opløsningen blev indstillet til pH 3,0, sendt igennem en 1 liters "Amberlite[®] XAD-2" søjle, vasket med vand og elueret med 50% vandig acetone til opnåelse af omkring 400 ml af en vandig opløsning indeholdende det antimikrobielt aktive materiale. Ved lyophilisering af opløsningen blev der opnået omkring 54 g rått pulver af den ønskede forbindelse II. Det rå pulver blev underkastet søjlechromatografi med omkring 800 ml "Sephadex[®] A-25" (eddikesyre-type) fyldt med en lille mængde 0,5 M ammoniumbromid/eddikesyre-pufferopløsning til fraktionering af aktive komponenter. De antimikrobielt aktive fraktioner blev opsamlet, sendt igennem en 500 ml "Amberlite[®] XAD-2" søjle, og søjlen blev vasket med vand og elueret med en vandig 25% acetoneopløsning. De antimikrobielt aktive fraktioner blev opsamlet og vacuuminddampet til tørhed.

Den dannede remanens blev underkastet søjlechromatografi under anvendelse af mikrokrySTALLinsk cellulose ("Avicel") fyldt med en blanding af isopropanol og vand (volumenforhold 7:3), under anvendelse af den samme opløsningsmiddelblanding. Den opnåede antimikrobielt aktive fraktion blev opsamlet, anbragt som plet på en tyndtlagsplade af "Avicel SF", udviklet med en blanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 6:1,5:2,5) og derpå sprøjtet med en opløsning af 0,25% ninhydrin i pyridin, efterfulgt af opvarmning til frembringelse af farvning. De fraktioner, som udviste Rf 0,31 blev opsamlet. Fraktionerne blev koncentreret under formindsket tryk og tørret, og derefter blev den dannede remanens underkastet søjlechromatografi på mikrokrySTALLinsk cellulose ("Avicel"), præpareret med en opløsningsmiddelblanding af isopropanol/n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 21:3:7:9). De opnåede antimikrobielt aktive fraktioner blev underkastet tyndtlagschromatografi på "Avicel SF" med en opløsningsmiddelblanding med samme sammensætning som ovenfor, og ved at følge den samme procedure som ovenfor blev de fraktioner, som udviste Rf 0,39, opsamlet og vacuuminddampet til tørhed.

Den således dannede remanens blev yderligere underkastet en søjlechromatografi på mikrokrySTALLINSK cellulose under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 6:1,5:2,5) til rensning af den effektive komponent. Den således rensede aktive fraktion blev vacuumindampet til tørhed, opløst i en lille mængde destilleret vand og udviklet på en søjle af den tværbundne dextrangel "Sephadex® G-10" under anvendelse af destilleret vand. Fraktionerne med antimikrobiel aktivitet blev opsamlet og underkastet tyndtlagschromatografi under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 6:1,5:2,5) som angivet ovenfor. Derpå blev fraktionerne med Rf 0,31 opsamlet, koncentreret og derpå lyophiliseret, hvorved der blev opnået 60 mg hvid 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

EKSEMPEL 3

Fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre III.

Et dyrkningsmedium indeholdende 1% stivelse, 1% glucose, 1,5% sojabønneemel, 0,5% gærekstrakt, 0,1% dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% magnesiumsulfat og 0,3% natriumchlorid blev anbragt i 500 ml Sakaguchi-kolber med 100 ml i hver og steriliseret i 20 min. ved 120°C. Hvert medium blev derpå podet med Streptomyces oganensis stamme Y-G19Z og dyrket i 48 timer ved 30°C. Yderligere dyrkningsmedium med den ovenfor beskrevne sammensætning blev anbragt i 2 liters Sakaguchi-kolber med 400 ml i hver og steriliseret i 20 min. ved 120°C. Hvert medium blev podet med den ovenfor fremstillede dyrkningsvæske i en koncentration på 2-3% og derpå dyrket i 24 timer ved 30°C til dannelse af en podekultur.

For sig blev 60 l af et dyrkningsmedium indeholdende 7% stivelse, 2% glutenmel, 2% sojabønneemel, 0,8% glycerol, 0,1% "Casamino"-syre, 0,01 % jern(III)-sulfat og 55 g natriumhydroxid anbragt i 2 100 liters fermentorer sammen med i hver portion 10 ml af det skumdæmpende middel "Adecanol", steriliseret i 30 min. ved 120 °C og podet med 800 ml podekultur efterfulgt af dyrkning i 24 timer

ved 30 °C. Derpå blev 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol opløst i vandig natriumhydroxidopløsning, steriliseret ved højt tryk og tilsat dyrkningsvæsken i en koncentration på 0,05%, efterfulgt af yderligere dyrkning i 90 timer.

Efter at dyrkningen var fuldført, blev dyrkningsvæsken indstillet til pH 2,0 og blandet med filtreringshjælpemidlet "Radiolite" under omrøring. Blandingen blev filtreret under anvendelse af en filterpresse, og filtraterne blev kombineret til opnåelse af omkring 1 l filtrat.

Filtratet blev indstillet til pH 3,0 ved tilsætning af vandig natriumhydroxidopløsning, sendt igennem en 12 liters "Amberlite"® XAD-2"søjle, og søjlen blev vasket med 30 l og elueret med 30 l vandig 50% acetoneopløsning. Eluatet blev koncentreret til 5,5 l, og koncentratet blev indstillet til pH 3,5 med fortyndet saltsyre og sendt igennem en 3 liters "Amberlite"® IRA-68"søjle. Søjlen blev vasket med 6 l vand og elueret med en vandig opløsning (pH 7,2) indeholdende 1 M natriumnitrat og 0,1 M natriumacetat til opnåelse af en opløsning indeholdende omkring 5 l antimikrobielt aktivt materiale. Opløsningen blev indstillet til pH 3,0, sendt igennem en 1 liters "Amberlite"® XAD-2"søjle, og efter vaskning af søjlen med vand blev den elueret med en vandig 50% acetoneopløsning til opnåelse af omkring 400 ml af en vandig opløsning indeholdende det antimikrobielt aktive materiale. Produktet blev lyophiliseret.

Under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 4:1:2) blev remanensen underkastet søjlechromatografi på mikrokrySTALLINSK cellulose ("Avicel") fyldt med den samme opløsningsmiddelblanding som ovenfor. De opnåede antimikrobielt aktive fraktioner bliver kombineret og anbragt som plet på en tyndtlagsplade af "Avicel SF", udviklet med en opløsningsmiddelblanding af isopropanol/n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 21:3:7:9) og derpå påsprøjtet en 0,25% opløsning af ninhydrin i chloridin til frembringelse af farvning ved opvarmning. Således blev de fraktioner, der udviste Rf 0,43 opsamlet, vacuuminddampet til tørhed ved 45-50°C og derpå underkastet søjlechromatografi på mikrokrySTALLINSK cellulose ("Avicel"), præpareret med en opløsningsmiddelblanding af acetonitril/vand

(volumenforhold 7:3). Den opnåede antimikrobielt aktive fraktion blev underkastet tyndtlagschromatografi på "Avicel SF" som ved den ovenstående procedure, og derpå blev de fraktioner, der udviste R_f 0,43, opsamlet og inddampet til tørhed, hvorved der blev opnået 0,78 g råt pulver.

Pulveret blev opløst i en lille mængde destilleret vand og udviklet på en søjle af den tværbundne dextrangel "Sephadex[®] G 10" under anvendelse af destilleret vand. De antimikrobielt aktive fraktioner blev kombineret og underkastet tyndtlagschromatografi under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 4:1:2) som angivet ovenfor, og fraktionerne med R_f 0,43 blev opsamlet, koncentreret og lyophiliseret, hvorved der blev opnået 82 g hvid 7-(5-amino-5-carboxylvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

EKSEMPEL 4

Ved den samme procedure som i eksempel 1, men under anvendelse af en opløsning af bis-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)disulfid, fremstillet ved opløsning af disulfidet i vandholdigt methanol og sterilisering ved filtrering under anvendelse af Millipore-filter, i stedet for opløsningen af 5-mercapto-1,3,4-thiadiazol-2-thioeddikesyre i vand, fremstillet under anvendelse af vandig natriumhydroxidopløsning og sterilisering ved højt tryk, blev der opnået 23 g råt pulver af den ønskede forbindelse I, og rensning af produktet som i eksempel 1 gav 45 mg 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre (forbindelse I).

EKSEMPEL 5

Ved den samme procedure som i eksempel 2, men under anvendelse af en opløsning af bis-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)disulfid, fremstillet ved opløsning af disulfidet i vand indeholdende methanol og sterilisering ved filtrering under anvendelse af Millipore-filter, i stedet for opløsningen af 1-methyl-5-mercapto-1H-tetrazol i vand, fremstillet under anvendelse af en vandig natriumhydroxidopløsning og sterilisering ved højt tryk, blev der opnået omkring 26 g råt pulver af den ønskede forbindelse II, og rens-

ning af produktet som i eksempel 2 gav 37 mg 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre (forbindelse II).

EKSEMPEL 6

Ved den samme procedure som i eksempel 3, men under anvendelse af en opløsning af bis-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)disulfid, fremstillet ved opløsning af disulfidet i vandholdigt methanol og sterilisering ved filtrering under anvendelse af Millipore-filter, i stedet for opløsningen af 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol i vand, fremstillet under anvendelse af en vandig natriumhydroxid-opløsning og sterilisering ved højt tryk, blev der opnået omkring 19 g råt pulver af den ønskede forbindelse III, og rensning af produktet som i eksempel 3 gav 50 mg 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre (forbindelse III).

EKSEMPEL 7

Fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre IV.

Et dyrkningsmedium indeholdende 1% stivelse, 1% glucose, 1,5% sojabønneemel, 0,5% gærekstrakt, 0,1% dikaliumhydrogenphosphat, 0,05% magnesiumsulfat og 0,3% natriumchlorid blev anbragt i 500 ml Sakaguchi-kolber med 100 ml i hver, steriliseret i 20 min. ved 120°C og podet med Streptomyces oganensis stamme Y-G19Z efterfulgt af dyrkning i 48 timer ved 30 °C. Yderligere dyrkningsmedium med den ovennævnte sammensætning blev anbragt i 2 l liters Sakaguchi-kolber med 400 ml i hver, steriliseret i 20 min. ved 120°C og derpå podet med 2-3% af den ovenfor fremstillede dyrkningsvæske efterfulgt af yderligere dyrkning i 24 timer ved 30°C til dannelse af en podekultur.

Separat blev 60 l af et dyrkningsmedium indeholdende 7% stivelse, 2% glutenmel, 2% sojabønneemel, 0,8% glycerol, 0,1% "Casamino"-syre, 0,01% jern(III)-sulfat og 55 mg natriumhydroxid anbragt i 2 l liters fermentorer sammen med i hver portion 10 ml af det skumdæmpende middel "Adecanol", steriliseret i 30 minutter ved 120 °C

og podet med 800 ml af podekulturen efterfulgt af dyrkning i 24 timer ved 30 °C. Derefter sættes en opløsning af 2-mercapto-1,3,4-thiadiazol, fremstillet ved opløsning af thiediazolen i vand under anvendelse af en vandig natriumhydroxidopløsning og sterilisering ved højt tryk, til dyrkningsvæsken, således at koncentrationen af thiadiazolen blev 0,05%, og derefter blev systemet dyrket i yderligere 90 timer.

Efter at dyrkningen var fuldført blev dyrkningsvæsken indstillet til pH 2,0 og blandet med filtreringshjælpemidlet "Radiolite" under omrøring. Blandingen blev filteret under anvendelse af en filterpresse, og filtraterne blev kombineret til omkring 100 l filtrat.

Filtratet blev indstillet til pH 3,0, sendt igennem en 12 liters "Amberlite® XAD-2" søjle, og søjlen blev vasket med 30 l vand og elueret med 30 l vandig 50% acetoneopløsning. Eluatet blev koncentreret til 5,5 l, og koncentratet blev indstillet til pH 3,5, sendt igennem en 3 liters "Amberlite® IRA-68" (Cl-type) søjle. Søjlen blev vasket med 6 l vand og elueret med en vandig opløsning (pH 7,2) indeholdende 1 M natriumnitrat og 0,1 M natriumacetat til opnåelse af omkring 5 l opløsning indeholdende et antimikrobielt aktivt materiale. Opløsningen blev indstillet til pH 3,0, sendt igennem en 1 liters "Amberlite® XAD-2" søjle, vasket med vand og elueret med en vandig 50% acetoneopløsning til opnåelse af omkring 400 ml af en vandig opløsning indeholdende det antimikrobielt aktive materiale. Opløsningen blev lyophiliseret.

Under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 4:1:2) blev den dannede remanens underkastet søjlechromatografi på mikrokrySTALLINSK cellulose ("Avicel") fyldt med den samme opløsningsmiddelblanding som ovenfor. De antimikrobielt aktive fraktioner blev kombineret og anbragt som plet på en tyndtlagsplade af "Avicel", udviklet under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af isopropanol/n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 21:3:7:9) og derefter sprøjtet med en 0,25% opløsning af ninhydrin i pyridin til frembringelse af farvning under opvarmning. Fraktionerne, som udviste R_f 0,39, blev opsamlet og vacuuminddampet til tørhed ved 45-50°C. Produkt-

remanensen blev underkastet søjlechromatografi på mikrokrySTALLINSK cellulose ("Avicel") fyldt med en opløsningsmiddelblanding af acetonitril/vand (volumenforhold 7:3). De antimikrobielt aktive fraktioner blev også underkastet tyndtlagschromatografi på "Avicel SF" som ved den ovenstående procedure, og derpå blev fraktionerne med Rf 0,39 opsamlet og vacuuminddampet til tørhed, hvorved der blev opnået 0,92 g råt pulver.

Det rå pulver blev opløst i en lille mængde destilleret vand og underkastet søjlechromatografi under anvendelse af "Amberlite [®] CG-50" (H-type)søjle med destilleret vand, og de antimikrobielt aktive fraktioner blev opsamlet, koncentreret og lyophiliseret. Remanensen blev opløst i en lille mængde destilleret vand og udviklet på en søjle af den tværbundne dextrangel "Sephadex [®] C 10" under anvendelse af destilleret vand. Den antimikrobielle aktivitet af hver fraktion blev undersøgt, og de effektive fraktioner blev underkastet tyndtlagschromatografi under anvendelse af en opløsningsmiddelblanding af n-butanol/eddikesyre/vand (volumenforhold 4:1:2) som beskrevet ovenfor. Fraktionerne med Rf 0,38 blev opsamlet, koncentreret og lyophiliseret, hvorved der blev opnået 75 mg hvid 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

EKSEMPEL 8

Et dyrkningsmedium, som indeholdt 1,0% glucose, 1,0% stivelse, 1,5% sojabønneemel, 0,5% gærekstrakt, 0,1% dikaliumhydrogenphosphat og 0,05% magnesiumsulfat (7 H₂O), blev fordelt i 500 ml Sakaguchi-kolber med 100 ml i hver og steriliseret. Medierne blev podet med *Streptomyces clavuligerus* IFO 13307 og dyrket på en rystemaskine i 3 dage ved 27° C.

Separat blev der i hver af 100 Erlenmeyer-kolber med et volumen på 500 ml fyldt 50 ml af et dyrkningsmedium, som indeholdt 3,0% kartoffelstivelse, 1,5% sojabønneemel, 1,5% bomuldsfrøemel, 0,45% natriumcitrat, 0,06% mangansulfat, 0,06% magnesiumsulfat (7 H₂O) og 0,05% jern(III)-sulfat, og kolberne blev steriliseret og afkølet på sædvanlig måde.

Medierne blev podet med stamkulturen i kimfri tilstand og dyrket ved 27° C på et roterende rysteapparat (220 omdr./min.). Efter 24 timers dyrkning blev dyrkningsvæsken tilsat en vandig opløsning af 5-mercapto-1-methyl-1H-tetrazol, som var fremstillet ved hjælp af en vandig opløsning af natriumhydroxid, i en mængde på 0,06%, beregnet på den samlede mængde dyrkningsvæske.

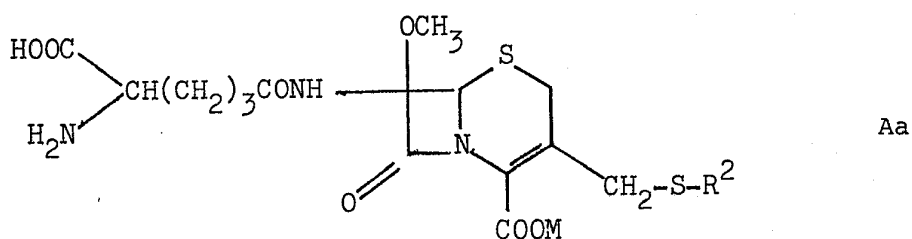
Efter 160 timers dyrkning blev dyrkningsvæsken filtreret fra fast stof, hvorved der blev udvundet 2,5 liter filtrat. Filtratet pH-værdi blev indstillet 2,0, og det blev vasket med en lige så stor mængde ethylacetat, hvorefter den vandige fase blev skilt fra. Den vandige fase blev adsorberet på en 50 ml søjle af ionbytterharpiks "Dowex® 50W", og søjlen blev efter vaskning med vand elueret med 125 ml 0,2 M natriumphosphatopløsning (pH 4,60). Eluatet blev inddampet, og den således opnåede koncentrerede opløsning blev underkastet søjlechromatografi på filtereringshjælpemidlet "Avicel" med en opløsningsmiddelblanding af n-propanol, methanol og vand i volumenforholdet 7:0,5:2,5. De således opnåede virksomme komponenter blev underkastet en yderligere søjlechromatografi på "Avicel" ved hjælp af en opløsningsmiddelblanding af n-propanol, eddikesyre og vand i volumenforholdet 4:1:2.

Den antimikrobielle aktivitet blev iagttaget i fraktionerne nr. 24 - 33. Disse fraktioner blev inddampet, nedfrosset og tørret i vacuum, hvorved der blev opnået 29,5 mg af det rå produkt. Produktet blev ved hjælp af en højhastigheds-væskechromatograf opdelt i fire dele. Delen II blev skilt fra, hvorved der blev opnået ca. 4,9 mg af et rent, hvidt produkt, som på grundlag af NMR-, UV- og IR-absorptionsspektre blev fastslået at være 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7 α -methoxy-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre.

Når denne procedure blev gentaget under anvendelse af henholdsvis *Strep. rochei* IFO 12908, *Strep. lipmanii* IFO 13306 og *Strep. viridochromogenes* IFO 13347 i stedet for *Strep. clavuligerus* IFO 13307, blev der opnået henholdsvis 28 mg, 23 mg og 25 mg af det rå produkt og henholdsvis 3 mg, 7 mg og 5 mg af de rensede produkter.

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxycephalosporin-derivater med den almene formel



hvor R^2 betyder en 5-leddet heterocyclisk gruppe, som indeholder 2 - 4 nitrogenatomer og yderligere kan indeholde et svovlatom, og som kan være substitueret med en lavere-alkylgruppe eller en carboxy-lavere-alkylthiogruppe og M betyder hydrogen eller en saltdannende kation udvalgt blandt alkalimetaller, jordalkalimetaller, tungmetaller og baser, der danner kvaternære salte eller aminosalte, kendetegnet ved, at en af mikroorganismerne

Streptomyces rochei IFO 12908,

Streptomyces lipmanii IFO 13306,

Streptomyces viridochromogenes IFO 13347,

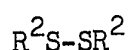
Streptomyces clavuligerus IFO 13307, og

Streptomyces oganensis ATCC 31167

dyrkes i et næringsmedium med tilsætning af en heterocyclisk thiol med formlen



eller et salt deraf eller en forbindelse med formlen



hvor R^2 har den ovennævnte betydning, hvorpå det dannede cephalosporinderivat isoleres.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den 7-methoxycephalosporinantibioticum-producerende mikroorganisme er *Streptomyces oganonensis* ATCC 31167.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2 til fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-(5-carboxymethylthio-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre, k e n d e t e g n e t ved, at der som tilsætning anvendes 2-carboxymethylthio-5-mercapto-1,3,4-thiadiazol eller det tilsvarende disulfid.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2 til fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-3-(1-methyl-1H-tetrazol-5-yl)thiomethyl-7-methoxy- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre, k e n d e t e g n e t ved, at der som tilsætning anvendes 1-methyl-5-mercapto-1H-tetrazol eller det tilsvarende disulfid.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2 til fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre, k e n d e t e g n e t ved, at der som tilsætning anvendes 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazol eller det tilsvarende disulfid.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2 til fremstilling af 7-(5-amino-5-carboxyvaleramido)-7-methoxy-3-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)thiomethyl- Δ^3 -cephem-4-carboxylsyre, k e n d e t e g n e t ved, at der som tilsætning anvendes 2-mercapto-1,3,4-thiadiazol eller det tilsvarende disulfid.

Fremdragne publikationer:

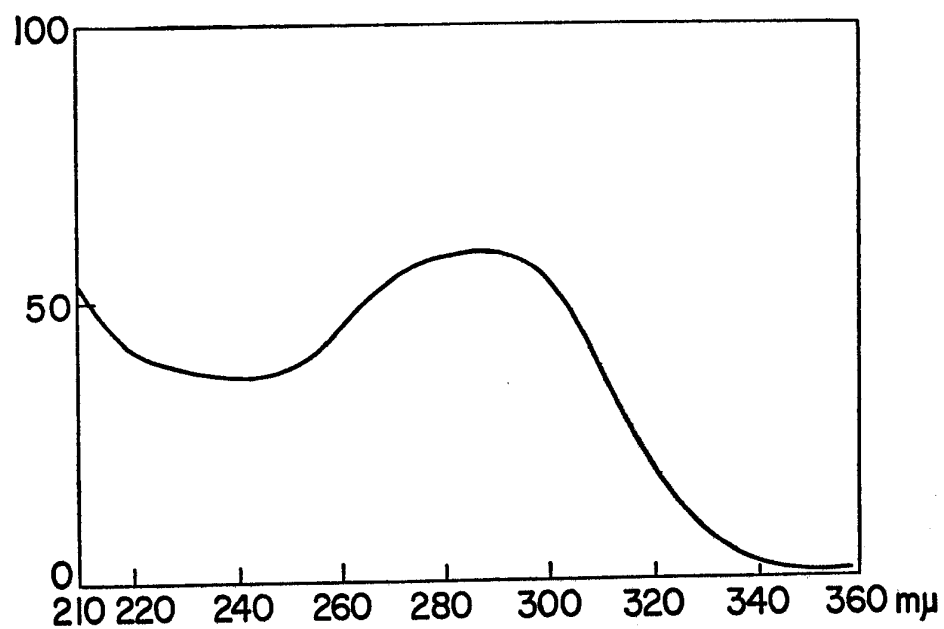
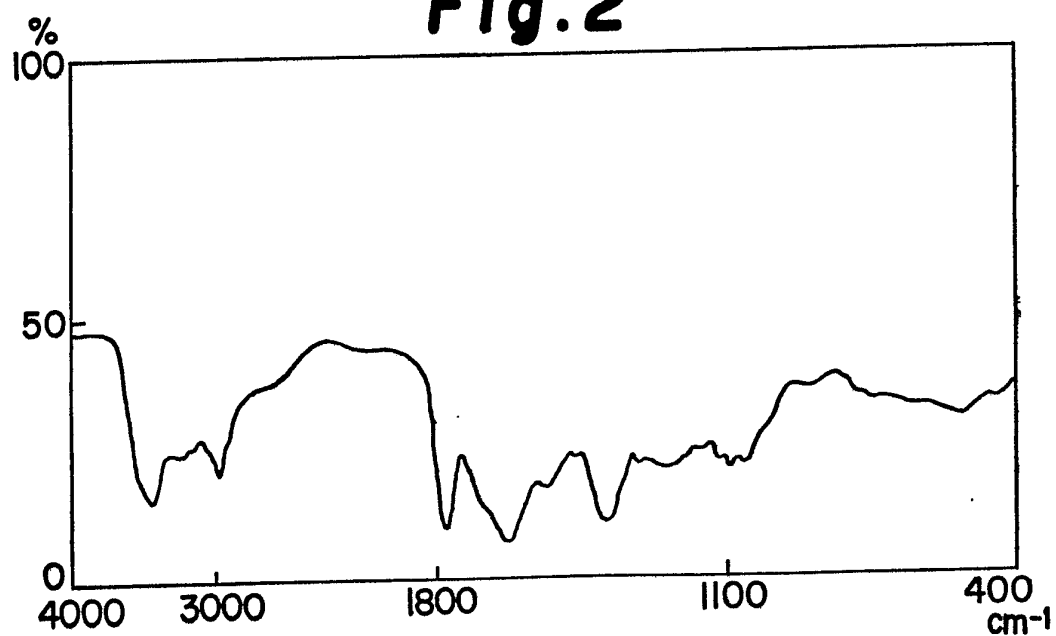
Fig. 1**Fig. 2**

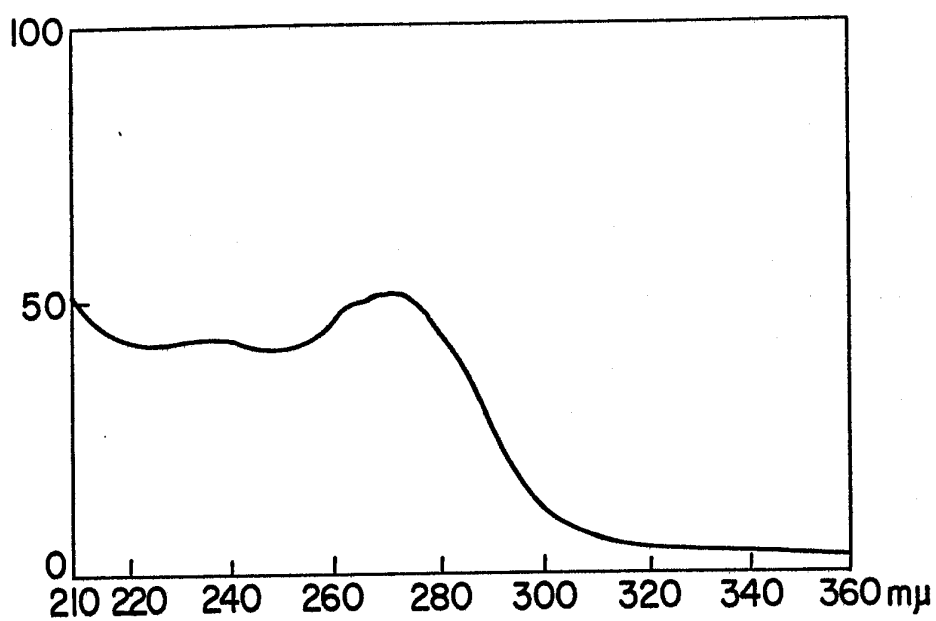
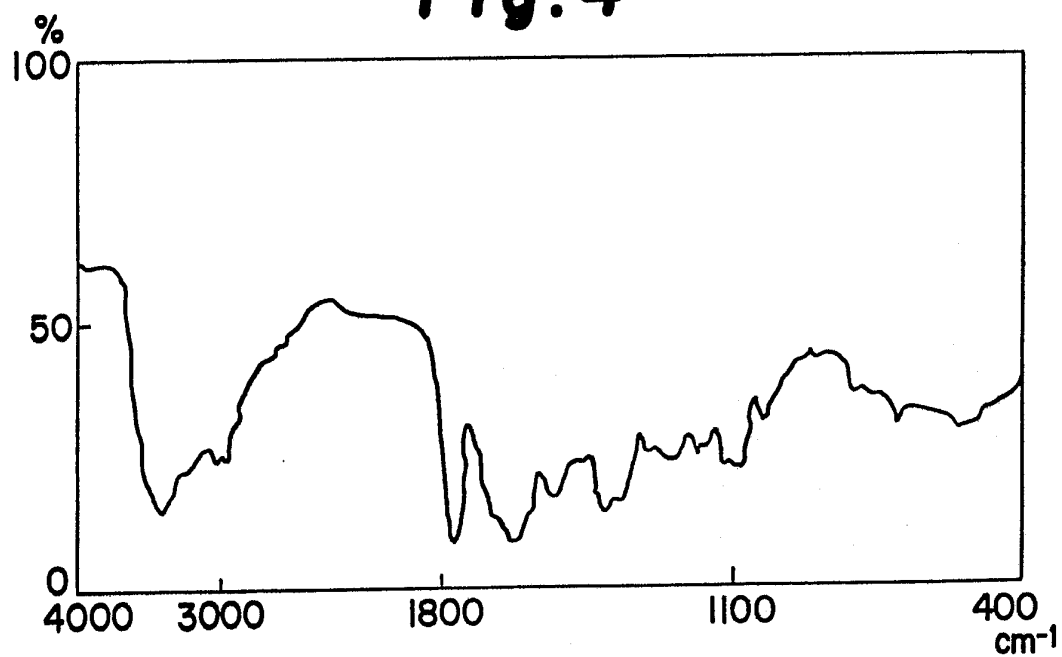
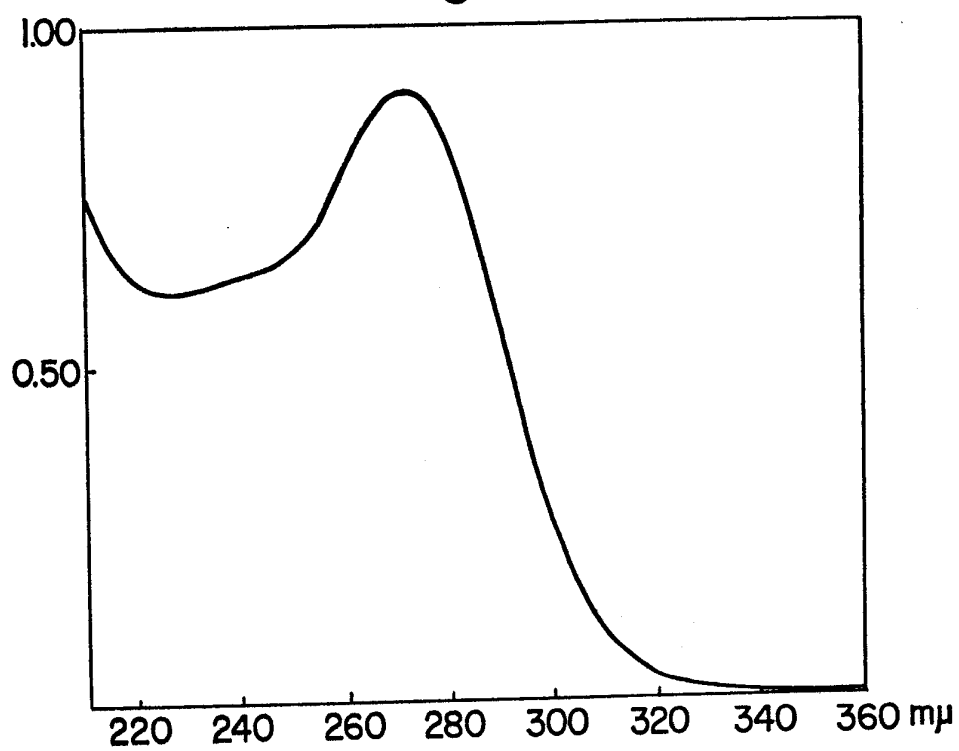
Fig.3**Fig.4**

Fig.5

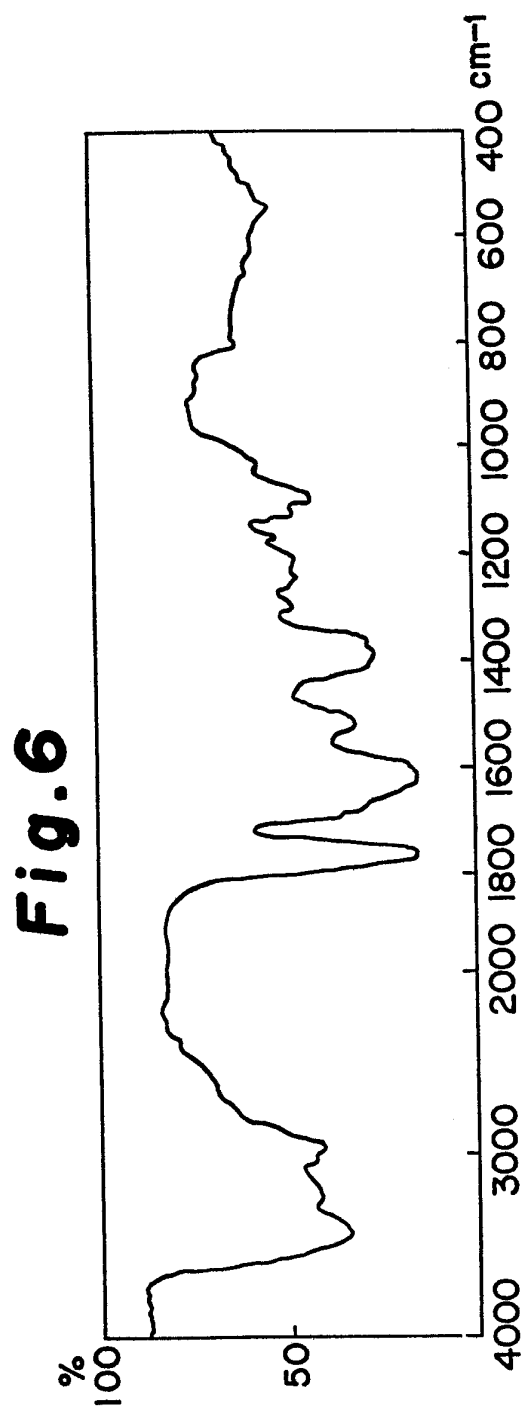


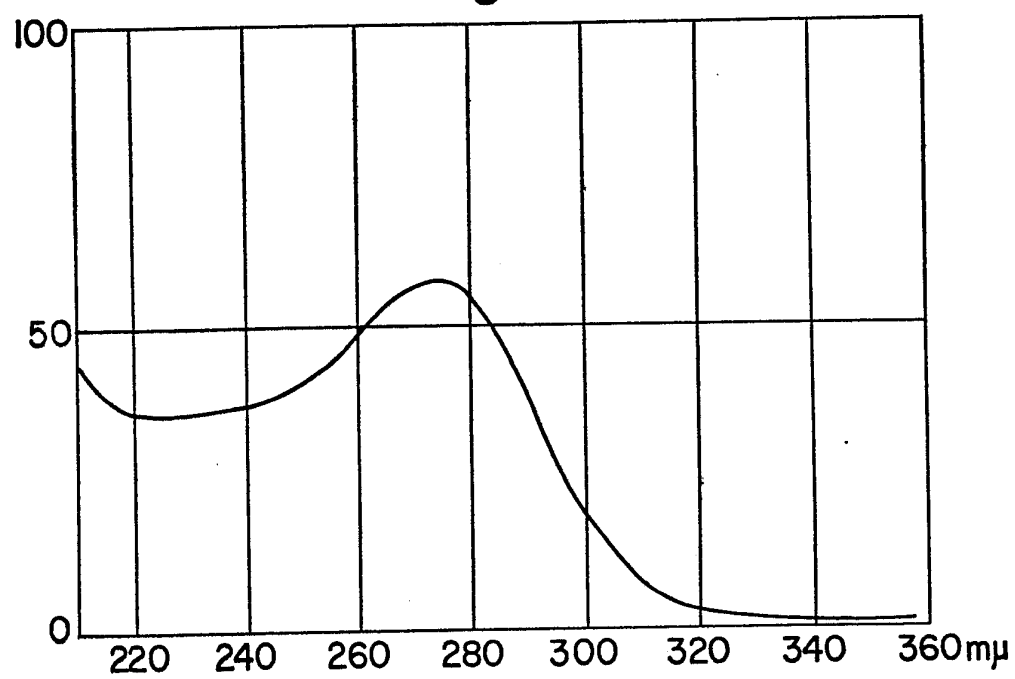
Fig.7

Fig. 8

