



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

51 Int. Cl.³: C 07 D 501/22
C 07 D 501/26
C 07 D 501/38
C 07 D 501/04



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

12 PATENTSCHRIFT A5

11

621 124

<p>21 Gesuchsnummer: 743/76</p> <p>22 Anmeldungsdatum: 21.01.1976</p> <p>30 Priorität(en): 22.01.1975 JP 50-8636 09.07.1975 JP 50-83574 09.07.1975 JP 50-83575</p> <p>24 Patent erteilt: 15.01.1981</p> <p>45 Patentschrift veröffentlicht: 15.01.1981</p>	<p>73 Inhaber: Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha, Osaka (JP)</p> <p>72 Erfinder: Nobuyuki Suzuki, Hyuga-shi (JP) Tsuneo Sowa, Nobeoka-shi (JP) Masahiro Murakami, Nobeoka-shi (JP)</p> <p>74 Vertreter: Bovard & Cie., Bern</p>
--	--

54 Verfahren zur Herstellung von Cephalosporansäurederivaten.

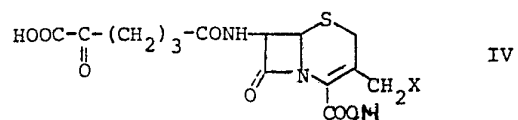
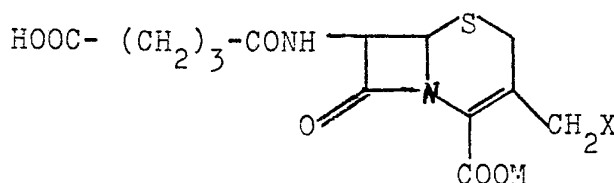
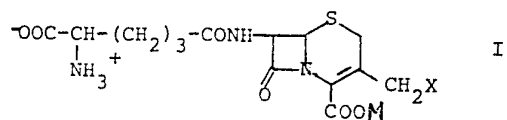
57 Durch Umsetzung von Cephalosporin C oder eines Derivats desselben der Formel I oder dessen Salz, worin X und M die im Patentanspruch I angegebenen Bedeutungen haben, mit einem α -Ketoderivat der Formel



oder dessen Salz, worin R₁ Carboxyl, Aroyl oder Carbamoyl ist, falls R₂ Wasserstoff ist bzw. R₁ Carboxyl ist, falls R₂ Alkyl oder Aryl ist, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oder mit anschliessender Behandlung mit Wasserstoffperoxid, wird die als Zwischenprodukt erhaltene N-(α -Ketoaldehyd)-7-aminocephalosporansäure der Formel IV in das 7-Aminocephalosporansäurederivat der Formel

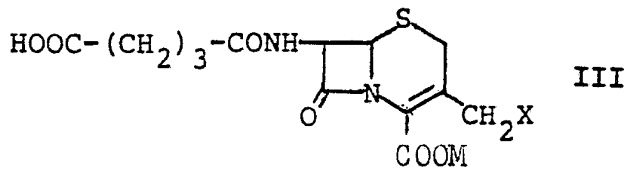
umgewandelt.

Das Verfahren ist einfach durchführbar und daher kommerziell verwertbar und liefert die gewünschten Produkte in guter Ausbeute. Die Verbindungen der Formel III und Ausgangsprodukte zur Synthese von Antibiotika des Typs der Cephalosporine mit niedriger Toxizität und breitem pharmakologischem Anwendungsbereich.

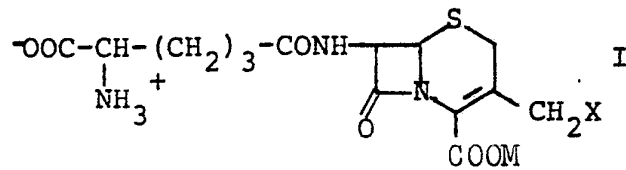


PATENTANSPRÜCHE

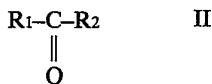
1. Verfahren zur Herstellung eines 7-Aminocephalosporansäurederivates der Formel



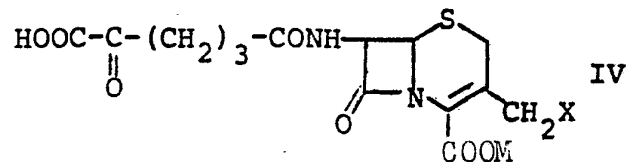
worin X Wasserstoff, Hydroxyl oder Acetoxy und M Wasserstoff oder X Pyridino und M eine negative Ladung \ominus bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man Cephalosporin C oder ein Derivat desselben der Formel



oder ein Salz davon umgesetzt mit einem α -Ketoderivat der Formel



worin R₁ Carboxyl, Aroyl oder Carbamoyl ist, falls R₂ Wasserstoff ist bzw. R₁ Carboxyl ist, falls R₂ Alkyl oder Aryl ist, oder mit einem Salz davon, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oder mit nachträglicher Behandlung mit Wasserstoffperoxid, wobei die als Zwischenprodukt entstandene N-(α -Ketoamidoyl)-7-aminocephalosporansäure der Formel IV



in die Verbindung der Formel III umgewandelt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Reaktionsgemisch zur Zersetzung von überschüssigem Wasserstoffperoxid mit einem Thiosulfat behandelt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im α -Ketoderivat der Formel II R₂ Wasserstoff und R₁ Carboxyl, Aroyl, insbesondere Benzoyl oder Carbamoyl ist und dass Formel II insbesondere Glyoxylsäure, Brenztraubensäure, Phenylglyoxal, α -Ketophenylelessigsäure, Glyoxylsäureamid oder α -Keto-n-butancarbonsäure bedeutet.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass im α -Ketoderivat der Formel II R₁ Carboxyl und R₂ Phenyl ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das α -Ketoderivat der Formel II oder dessen Salz in 1- bis 50fach molarem Anteil des Cephalosporins C oder dessen Derivates der Formel I oder dessen Salzes verwendet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung bei einem pH-Wert von 3,0 bis 8,0 durchführt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Umsetzung in Gegenwart eines zwei- oder dreiwertigen Metallions, insbesondere von Kupfer, Mangan, Kal-

zium, Aluminium, Eisen, Nickel oder Kobalt, durchführt, wobei der molare Anteil an Metallion zweckmässig $\frac{1}{10}$ bis 20 Mal dem molaren Anteil an Cephalosporin C oder dessen Derivats der Formel I oder dessen Salz entspricht.

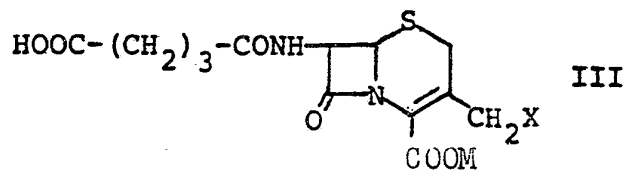
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Umsetzung in Gegenwart einer organischen Base, insbesondere eines tertiären cyclischenamins, eines sekundären cyclischenamins oder eines aliphatischenamins durchgeführt wird, wobei der molare Anteil der Base zweckmässig dem 1- bis 30fachen molaren Anteil an Cephalosporin C oder dessen Derivat der Formel I oder dessen Salz entspricht.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei einer Temperatur von 0 bis 50°C durchgeführt wird.

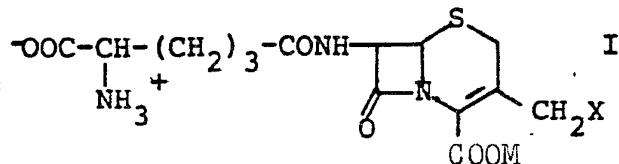
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion während einer Dauer von 5 Minuten bis 24 Stunden durchgeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der molare Anteil an Wasserstoffperoxid dem 1- bis 30fachen molaren Anteil an Cephalosporin C, oder dessen Derivat der Formel I oder dessen Salz entspricht, sowie dass die Reaktion bei einem pH von 2,0 bis 6,0, bei einer Temperatur von 0 bis 50°C und während einer Dauer von 10 Minuten bis 5 Stunden durchgeführt wird.

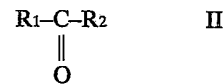
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines 7-Aminocephalosporansäurederivates der Formel



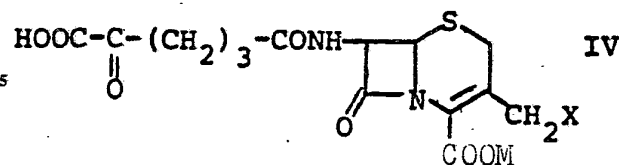
worin X Wasserstoff, Hydroxyl oder Acetoxy und M Wasserstoff oder X Pyridinio und M eine negative Ladung \ominus bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man Cephalosporin C oder ein Derivat desselben der Formel



oder ein Salz davon umgesetzt mit einem α -Ketoderivat der Formel



worin R₁ Carboxyl, Aroyl oder Carbamoyl ist, falls R₂ Wasserstoff ist, bzw. R₁ Carboxyl ist, falls R₂ Alkyl oder Aryl ist, oder mit einem Salz davon, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid oder mit nachträglicher Behandlung mit Wasserstoffperoxid, wobei die als Zwischenprodukt entstandene N-(α -Ketoamidoyl)-7-aminocephalosporansäure der Formel IV



in ein 7-Aminocephalosporansäurederivat durch Behandlung mit Säure oder durch Verlängerung der Reaktionszeit. Indessen verschwindet das α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivat nicht vollständig aus der Reaktionsflüssigkeit und seine Abtrennung ist recht schwierig. Wenn demzufolge das 7-Aminocephalosporansäurederivat hergestellt werden soll, wird das α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivat in der Reaktionslösung erfindungsgemäss umgesetzt mit Wasserstoffperoxid.

Zur Einbringung des Wasserstoffperoxids in die Reaktionsmischung kann es bzw. seine wässrige Lösung zugesetzt werden oder es kann eine Verbindung verwendet werden, die Wasserstoffperoxid im Reaktionssystem bildet, wie z. B. Natriumperborat.

Die erforderliche Menge an Wasserstoffperoxid hängt von den Reaktionsbedingungen ab, z. B. vom pH-Wert des Reaktionsgemisches, der Reaktionstemperatur sowie von Art und Konzentration der Cephalosporinverbindung, die als Ausgangsmaterial verwendet wurde, liegt jedoch vorzugsweise im Bereich von 1 bis 30 Mal dem molaren Anteil an der verwendeten Cephalosporinverbindung. Die als Ausgangsmaterial verwendete Cephalosporinverbindung und das erhaltene 7-Aminocephalosporansäurederivat werden leicht oxidiert, unter Zersetzung ihres Cephemrings. Demzufolge ist die Verwendung eines unnötig grossen Überschusses an Wasserstoffperoxid unerwünscht. Die Reaktion zur Herstellung des 7-Aminocephalosporansäurederivates durch Umsetzung des N-(α -Ketoadipoyl)-7-ACA-Derivates mit Wasserstoffperoxid verläuft am besten bei saurem pH im Bereich von 2,0 bis 6,0, vorzugsweise von 3,0 bis 5,5. Es ist sehr vorteilhaft, dass der optimale pH-Bereich dieser Reaktion im wesentlichen der gleiche ist, wie derjenige der Reaktion zur Herstellung des α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivates aus der Cephalosporinverbindung. Es ist weiterhin von Vorteil, dass das Metallsalz oder die organische Base, wie sie gewünschtenfalls verwendet wird bei der Herstellung des 7-Aminocephalosporansäurederivates aus Cephalosporinverbindung, keine schädliche Wirkung auf die Reaktion zur Herstellung des 7-Aminocephalosporansäurederivates durch Behandlung des α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivates mit Wasserstoffperoxid ausübt. Bei alkalischem pH-Wert vermindert sich die Reaktionsgeschwindigkeit des α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivates mit Wasserstoffperoxid und das Wasserstoffperoxid zersetzt sich im Reaktionsgemisch. Andererseits ist bei einem sauren pH-Wert unterhalb 2,0 das α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivat instabil, mit dem Ergebnis, dass die Ausbeute am erwünschten 7-Aminocephalosporansäurederivat in starkem Ausmass vermindert wird.

Die Verwendung des Wasserstoffperoxids kann derart erfolgen, dass es nach der Bildung des N-(α -Ketoadipoyl)-7-ACA-Derivates aus der Cephalosporinverbindung zugesetzt wird, oder es kann auch gleich zu Beginn der Reaktion der Cephalosporinverbindung mit dem α -Ketoderivat zugegen sein, so dass das erhaltene α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivat übergeführt wird in das 7-Aminocephalosporansäurederivat. Da das α -Ketoadipoyl-7-ACA-Derivat, wie es als Zwischenprodukt erhalten wird, chemisch instabil ist, ist es nicht immer erwünscht, Wasserstoffperoxid mit diesem Derivat nach der Reinigung zur Reaktion zu bringen.

Die Reaktion wird abgebrochen durch Erniedrigung des pH-Wertes der Reaktionsflüssigkeit unterhalb den Wert von 2,0. Im Falle der Verwendung von Wasserstoffperoxid reagiert dieses mit dem 7-Aminocephalosporansäurederivat unter Ausbildung von Nebenreaktionen. Demzufolge ist es erwünscht, das überschüssige Wasserstoffperoxid vorgängig durch Reduktion zu entfernen. Indessen bewirkt die Zugabe der gewöhnlichen Reduktionsagenzien Umsetzungen mit der als Ausgangsprodukt verwendeten Cephalosporinverbindung, sowie mit dem erhaltenen 7-Aminocephalosporansäurederivat unter Veränderung des Cephemrings. Es hat sich erwiesen, dass

für diesen Zweck die Verwendung von Thioschwefelsäure oder deren Salze vorteilhaft ist.

Nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung wird die Cephalosporinverbindung I behandelt mit einem α -Ketoderivat in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und danach isoliert in Gegenwart eines Thiosulfats, wobei das erwünschte 7-Aminocephalosporansäurederivat III selektiv und mit ausserordentlich hohen Ausbeuten erhalten werden kann.

Die am meisten bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist die Umsetzung einer wässrigen Lösung, enthaltend die Cephalosporinverbindung, mit einem α -Ketoderivat in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, worauf umgesetzt wird mit einem Thiosulfat, zwecks Herstellung des 7-Aminocephalosporansäurederivates. Gemäss dieser Ausführungsform kann das 7-Aminocephalosporansäurederivat selektiv erhalten werden durch Auflösen von Wasserstoffperoxid in einer wässrigen Lösung, welche die Cephalosporinverbindung enthält, Zugabe eines α -Ketoderivates zu dieser Lösung, Umsetzung des erhaltenen Gemisches während einer bestimmten Zeit und danach Zugabe von Thioschwefelsäure oder einem Salz davon zur Reaktionsflüssigkeit.

Charakteristisch für diese Ausführungsform ist, dass die Cephalosporinverbindung umgesetzt wird mit einem α -Ketoderivat in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, worauf die Umsetzung mit dem Thiosulfat erfolgt. Dabei erhält man selektiv das 7-Aminocephalosporansäurederivat ohne Nebenprodukte.

Bei dieser Ausführungsform hängt der Anteil des Thiosulfats, wie er dem Reaktionsgemisch beigegeben wird, in gewissem Ausmass ab von den übrigen Reaktionsbedingungen, z. B. der verwendeten Menge Wasserstoffperoxid in der Reaktionslösung, dem pH-Wert, der Reaktionstemperatur sowie von Art und Konzentration der als Ausgangsmaterial verwendeten Cephalosporinverbindung. Indessen ist er in der Regel mindestens äquimolar der verwendeten Menge H_2O_2 .

Das erfindungsgemäss erhaltene 7-Aminocephalosporansäurederivat lässt sich nach üblichen Verfahren reinigen, z.B. durch Extraktion aus der Reaktionslösung unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels, wie Äthylacetat, Butylacetat oder n-Butanol.

Ein weiteres Charakteristikum des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass die Reaktion ausgeführt werden kann in einer wässrigen Lösung. Demzufolge kann das 7-Aminocephalosporansäurederivat direkt erhalten werden, z. B. aus einer Kulturflüssigkeit der Cephalosporinverbindung, ohne deren vorgängige Isolierung und Reinigung. Vom Standpunkt einer kommerziellen Durchführbarkeit ist dies extrem vorteilhaft.

Die so erhaltenen 7-Aminocephalosporansäurederivate können überführt werden, z. B. durch Anwendung der Iminoäthermethode, in 3-substituierte Methyl-7 β -Aminocephalosporansäuren, wie sie sich unter anderem als Ausgangsmaterialien zur Herstellung von Pharmaceutica eignen.

Beispiel 1

Herstellung des Zwischenproduktes IV

3 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2%, entsprechend 2,2 g Reinsubstanz, wurden gelöst in 100 ml Wasser. Die erhaltene Lösung wurde hinzugefügt unter Rühren zu 200 ml einer wässrigen Lösung, die 4,7 g Glyoxylsäure, 0,3 g Kupferacetat und 41 ml Pyridin enthielt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur eine Stunde lang gerührt und hernach der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Salzsäure unter Eiskühlung auf 2,0 vermindert, zwecks Beendigung der Reaktion. Nun wurde die Reaktionslösung fünfmal mit ungefähr 200 ml kaltem Äthylacetat extrahiert und die Extrakte vereinigt. Sie wurden unter ver-

mindertem Druck unterhalb 40°C auf ein Volumen von ungefähr 200 ml eingengt und hernach über Nacht bei 5°C unter Verwendung von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Anschliessend wurde die Lösung filtriert und der Rückstand gewaschen mit einer geringen Menge Äthylacetat. Filtrat und Waschlösungen wurden vereinigt und die erhaltene Lösung unter vermindertem Druck unterhalb -40°C auf ein Volumen von 20 ml rasch eingengt. Anschliessend wurde sie eintropfen gelassen in 120 ml Petroläther und unter kräftigem Rühren. Die Flüssigkeit wurde gekühlt und zentrifugiert, worauf die überstehende Lösung abdekantiert wurde. Darauf wurde die Fällung erneut suspendiert in Petroläther und die erhaltene Suspension wiederum unter Kühlen zentrifugiert. Nach Abgiessen der überstehenden Lösung wurde die Fällung über Tonerde im Vakuum rasch getrocknet und ergab 2,5 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7β-(5-carboxy-5-oxopentanamido)-3-cephem-4-carbonsäure (Reinheit 52%). TLC: Rf = 0,30; PPC: Rf = 0,52.

Beispiel 2

4 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 3,3 g Kupferacetat wurden aufgelöst in 120 ml Wasser. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 3,9. Diesem Gemisch wurde tropfenweise im Verlauf von einer Stunde unter Rühren bei Zimmertemperatur eine wässrige Lösung hinzugefügt, welche 6,24 g Glyoxylsäure und 5,5 ml Pyridin enthielt. Nach Vollendung der Zugabe betrug der pH-Wert der Lösung 4,6. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1-n Schwefelsäure auf 3,0 eingestellt, wonach 60 ml 15%ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung im Verlauf von einer Stunde in die Flüssigkeit eingetropft wurden. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 10 Minuten lang gerührt und hernach durch Zugabe von Schwefelsäure zwecks Beendigung der Reaktion sein pH-Wert auf 1,5 eingestellt. In diesem Stadium wurde das Reaktionsgemisch analysiert und ergab eine Rohausbeute an 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure von 92%. 3-Acetoxyethyl-7β-(5-carboxy-5-oxopentanamido)-3-cephem-4-carbonsäure konnte darin nicht entdeckt werden.

Die Reaktionslösung wurde dreimal mit 500 ml Äthylacetat extrahiert und die Extrakte wurden vereinigt. Sie wurden unter vermindertem Druck und unterhalb 40°C auf ein Volumen von 200 ml eingengt und hernach über Nacht mit Natriumsulfat getrocknet. Die Flüssigkeit wurde anschliessend filtriert und der Rückstand gewaschen mit einer geringen Menge Äthylacetat. Filtrat und damit vereinigte Waschlösung wurden unter vermindertem Druck bei einer Temperatur von unter 40°C auf ein Volumen von 10 ml eingengt. Dieses Konzentrat wurde eintropfen gelassen in 200 ml Petroläther unter kräftigem Rühren. Die erhaltene Mischung wurde zentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Hernach wurde das ausgefallene Produkt suspendiert in Petroläther und die erhaltene Suspension erneut zentrifugiert. Nach Abtrennen der überstehenden Lösung wurde die Fällung rasch über Tonerde im Vakuum getrocknet und ergab 2,38 g hellgelbe Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 96,9%.

Beispiel 3

1,5 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 406 mg Kupfersulfat wurden aufgelöst in 100 ml Wasser. Der pH-Wert der Lösung betrug 3,9. Zu dieser Flüssigkeit wurden 100 ml einer wässrigen Lösung mit 2,3 g Glyoxylsäure und 1,5 ml Triäthylamin in Portionen von je 20 ml alle 30 Minuten hinzugefügt. 10 Minuten nach jeder solchen Zugabe wurden je 3 ml einer 20%igen wässrigen Wasserstoffperoxidlösung hinzugegeben und die Flüssigkeit unter Rühren 30 Minuten reagieren gelassen. Nach

Vollendung der Zugabe betrug der pH-Wert der Lösung 3,5. Nachdem weitere 30 Minuten lang gerührt worden war, wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von Schwefelsäure auf 1,5 eingestellt, um die Reaktion abzubrechen. Die Lösung wurde analysiert und enthielt 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure in einem Anteil von 87,8%.

Die Reaktionsflüssigkeit wurde analog Beispiel 2 behandelt und es ergaben sich daraus 0,86 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 95,1%.

Beispiel 4

Aus einer Fermentationslösung von Cephalosporium acremonium wurden die Zellen abfiltriert, worauf die Lösung auf pH 2,8 eingestellt wurde zwecks Zersetzung des darin enthaltenen Penicillins N. Anschliessend wurde die Lösung filtriert und der Rückstand gewaschen. Filtrat und Waschlösungen wurden vereinigt und ergaben 4,6 Liter einer Flüssigkeit, welche 3223 µg/ml Cephalosporin C enthielt. Diese Lösung wurde aufgegeben auf eine Aktivkohlesäule, welche nachher mit Wasser gewaschen und schliesslich mit 7 Litern 3%igem Butanol, enthaltend 700 ml 0,3-n Natriumhydroxid, eluiert wurde, um die erwünschte Fraktion zu erhalten. Diese Fraktion wurde auf pH 6,0 eingestellt und hernach unter vermindertem Druck bei einer Temperatur unter 40°C eingengt. Auf diese Weise wurden 275 ml einer hellgelben Lösung erhalten, die 40 mg/ml Cephalosporin C enthielt. In 100 ml der Lösung wurde der pH-Wert auf 6,5 eingestellt durch Zugabe von Natriumhydroxid, wonach 2,1 g Zinkacetat eingetragen wurden. Dann wurden in die Lösung 500 ml einer wässrigen Lösung von 4,6 g Glyoxylsäure und 9,6 ml γ-Picolin eingetropft im Verlauf von 1½ Stunden unter Rühren bei Zimmertemperatur. Während der Reaktion wurde Natriumhydroxid zugegeben, so dass der pH-Wert der Flüssigkeit 5,0 betrug. In diesem Stadium wurde ein Teil der Reaktionslösung abgezogen und der Papierchromatographie unterworfen, wobei sich zeigte, dass sie 3-Acetoxyethyl-7β-(5-carboxy-5-oxopentanamido)-3-cephem-4-carbonsäure und 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure in Rohausbeuten von 61% bzw. 18% enthielt.

Nachher wurde die Reaktionsflüssigkeit weitere 30 Minuten lang gerührt und anschliessend der pH-Wert darin auf 3,0 durch Zugabe von Schwefelsäure eingestellt. Nun wurden 60 ml 35%iges wässriges Wasserstoffperoxid in die Lösung eingetropft. Nachdem weitere 15 Minuten lang gerührt worden war, wurde in der Lösung ein pH-Wert von 1,5 eingestellt durch Zugabe von Schwefelsäure zwecks Beendigung der Reaktion. Die Analyse ergab eine Rohausbeute von 76,1% an 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. 3-Acetoxyethyl-7β-(5-carboxy-5-oxopentanamido)-3-cephem-4-carbonsäure konnte in der Lösung nicht gefunden werden.

Die Reaktionsflüssigkeit wurde in gleicher Weise behandelt wie in Beispiel 2 und ergab 3,38 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 78,8%.

Beispiel 5

Eine Fermentationslösung von Cephalosporium acremonium wurde von den darin enthaltenen Zellen durch Filtrieren befreit und anschliessend der pH-Wert darin auf 2,8 eingestellt zwecks Zersetzung des Penicillins N. Anschliessend wurde filtriert und der Rückstand gewaschen. Filtrat und Waschlösungen wurden vereinigt und ergaben 3 Liter einer Lösung, enthaltend 4762 µg/ml Cephalosporin C. In 200 ml dieser Lösung wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt durch Zugabe von Natriumhydroxid, wonach 350 mg Kobaltsulfat und

194 mg Piperazin darin gelöst und die Lösung auf 37°C erwärmt wurde. Nun wurde in die Flüssigkeit eine Menge von 3,4 g Phenylglyoxal im Verlauf von einer Stunde unter Rühren eingetropft. Anschliessend wurde durch Natriumhydroxid-Schwefelsäure der pH-Wert auf 5,0 eingestellt. Die Lösung wurde weiter bei 37°C während 30 Minuten gerührt und hierauf mittels Schwefelsäure der pH auf 3,0 eingestellt. In diese Flüssigkeit wurden 43,9 ml einer gesättigten wässrigen Natriumperboratlösung eingetropft. Nachdem weitere 10 Minuten lang gerührt worden war, wurde die Flüssigkeit durch Zugabe von Schwefelsäure zwecks Vollendung der Reaktion auf einem pH-Wert von 1,5 eingestellt. Analyse ergab eine Rohausbeute an 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure von 70,1%.

Diese Reaktionslösung wurde aufgearbeitet gemäss Beispiel 2 und ergab 790 mg hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 72,2%.

Beispiel 6

1,25 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 791 mg Nickelsulfat wurden aufgelöst in 100 ml Wasser. Zu dieser Flüssigkeit wurden 2,16 g Glyoxylsäure und 204 mg Imidazol unter Rühren bei 5°C hinzugefügt. Mittels Zugabe von wässriger Natriumhydroxidlösung wurde der pH-Wert in der Lösung auf 5,0 eingestellt. Nachdem die Lösung zwei Stunden lang gerührt worden war, wurden 53,0 ml einer gesättigten wässrigen Kaliumperboratlösung eingetropft. Nachher wurde die Lösung weitere 30 Minuten lang gerührt und anschliessend der pH-Wert auf 1,5 eingestellt, mittels Zugabe von Salzsäure zwecks Beendigung der Reaktion. Analyse ergab eine Rohausbeute von 81,4% an 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure.

Das Reaktionsgemenge wurde aufgearbeitet gemäss Beispiel 2 und ergab 822 mg hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 80,3%.

In genau gleicher Weise wie vorstehend beschrieben, wurde die Reaktion durchgeführt, wobei jedoch anstelle von Nickelsulfat die in der nachstehenden Tabelle angegebenen Metallsalze zugefügt wurden. In der Tabelle sind die Salzmenge und die damit erhaltenen Rohausbeuten angegeben.

Metallsalz		Rohausbeute
Art	Menge (mg)	(mg)
FeCl ₃ · 2H ₂ O	436	838
AlCl ₃ · 6H ₂ O	725	838
CaCl ₂ · 2H ₂ O	442	811
FeSO ₄ · 7H ₂ O	836	834
MnSO ₄ · H ₂ O	509	831

Beispiel 7

2,3 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% wurden aufgelöst in 300 ml eines 2-m Phosphatpuffers vom pH-Wert 4,6. In diese Flüssigkeit wurden 300 ml der gleichen Pufferlösung eingetragen, welche 4,7 g Natriumglyoxalat enthielt. Die Zugabe erfolgte tropfenweise im Verlauf von 30 Minuten unter Rühren bei 5°C. Die Lösung wurde zwei Stunden lang gerührt und reagieren gelassen, wobei kontinuierlich insgesamt 33 ml einer 15%igen wässrigen Wasserstoffperoxidlösung eingetragen wurden. Anschliessend wurde weitere 15 Minuten lang gerührt und dann der pH-Wert durch Zugabe von Schwefelsäure zwecks Abbruch der Reaktion auf 1,5 eingestellt. In diesem Stadium ergab Analyse der Lösung eine Rohausbeute von 76,4% an 3-

Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure.

Das Reaktionsgemenge wurde gemäss Beispiel 2 aufgearbeitet und ergab 1,65 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 68,7%.

Beispiel 8

375 mg Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 237 mg Nickelsulfat wurden aufgelöst in 45 ml Wasser. Zu dieser Lösung wurden 620 mg Brenztraubensäure und 61,2 mg Imidazol unter Rühren bei Zimmertemperatur hinzugefügt. Durch geeignete Zugabe einer wässrigen Natriumhydroxidlösung wurde der pH-Wert auf 5,0 eingestellt. Nachdem die Flüssigkeit zwei Stunden lang gerührt worden war, wurden 15,9 ml einer gesättigten wässrigen Kaliumperboratlösung tropfenweise eingetragen. Die Flüssigkeit wurde weitere 30 Minuten lang gerührt und hernach ihr pH-Wert auf 1,5 durch Zugabe von Schwefelsäure eingestellt zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium betrug die Rohausbeute an 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure 77,6%.

Das Reaktionsgemisch wurde gemäss Beispiel 2 aufgearbeitet und ergab 238 mg hellgelbe Kristalle an 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 79,6%.

Beispiel 9

Beispiel 2 wurde nachgearbeitet, mit dem Unterschied, dass 3 g Kristalle des Natriumsalzes von Deacetyl-Cephalosporin C mit einer Reinheit von 56,3% anstelle des Natriumsalzes von Cephalosporin C verwendet wurden. Aus der Reaktionslösung wurde 3-Hydroxymethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure in einer Rohausbeute von 90% erhalten. Aufarbeiten ergab 1,2 g hellgelber Kristalle von 3-Hydroxymethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure mit einer Reinheit von 92,5%.

Beispiel 10

Beispiel 2 wurde nachgearbeitet, mit dem Unterschied, dass 5 g Kristalle des Natriumsalzes von Deacetoxy-Cephalosporin C mit einer Reinheit von 83% verwendet wurden anstelle des Natriumsalzes von Cephalosporin C. Die Reaktion führte zu 3-Methyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure in einer Rohausbeute von 95,2%. Nach dem Aufarbeiten wurden 3,0 g hellgelbe Kristalle von 3-Methyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure erhalten mit einer Reinheit von 96,7%.

Beispiel 11

Beispiel 2 wurde nachgearbeitet, mit dem Unterschied, dass 3 g Kristalle von N-[7-D-(5-Aminoädpinamido)-3-cephem-3-ylmethyl]-pyridinium-4-carbonsäure mit einer Reinheit von 83,9% verwendet wurden anstelle des Natriumsalzes von Cephalosporin C. Die Reaktion führte zu N-[7-(4-Carboxybutanamido)-3-cephem-3-ylmethyl]-pyridinium-4-carbonsäure in einer Rohausbeute von 82,0%. Aufarbeiten des Reaktionsgemisches ergab 2,1 g hellgelber Kristalle von N-[7-(4-Carboxybutanamido)-3-cephem-3-ylmethyl]-pyridinium-4-carbonsäure mit einer Reinheit von 86,0%.

Beispiel 12

Beispiel 7 wurde nachgearbeitet, mit dem Unterschied, dass 4,6 g Glyoxylsäureamid verwendet wurden anstelle von Natriumglyoxalat. Die Reaktion führte zur 3-Acetoxyethyl-7β-(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure in einer Rohausbeute von 75,9%. Beim Aufarbeiten wurden 1,65 g hellgel-

ber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure erhalten mit einer Reinheit von 67,9%.

Beispiel 13

1,3 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% wurden aufgelöst in 250 ml Wasser. Zu dieser Lösung wurden 441 mg Kupfersulfat zugegeben und der pH-Wert auf 5,0 eingestellt. Anschliessend wurden 506 mg Glyoxylsäure unter Rühren bei Zimmertemperatur zugegeben. Nachdem zwei Stunden lang gerührt worden war, wurde der pH-Wert der Lösung mittels 1-n Schwefelsäure auf 3,0 gebracht, worauf 1,9 ml einer 15%igen wässrigen Wasserstoffperoxidlösung eingetragen wurden. Es wurde weitere 10 Minuten lang gerührt und anschliessend der pH-Wert durch Zugabe von Schwefelsäure auf 1,5 gebracht, zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium enthielt die Lösung eine Rohausbeute von 77,3% an 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure.

Aufarbeiten gemäss Beispiel 2 ergab 892 mg hellgelbe Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 68,8%.

Beispiel 14

1,9 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit 74,2% wurden aufgelöst in 350 ml Wasser. Zu dieser Lösung wurden 2 ml Pyridin zugegeben und der pH-Wert darin auf 4,6 gebracht. Nun wurden 736 mg Glyoxylsäure unter Rühren bei Zimmertemperatur zugegeben. Nachdem zwei Stunden lang gerührt worden war, wurde der pH-Wert der Lösung mittels 1-n Schwefelsäure auf 3,0 gebracht, worauf 2,5 ml einer 25%igen wässrigen Wasserstoffperoxidlösung eingetragen wurden. Die Lösung wurde weitere 10 Minuten lang gerührt und hernach wurde der pH-Wert darin mittels Schwefelsäure auf 1,5 eingestellt, zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium enthielt die Reaktionsflüssigkeit eine Rohausbeute von 77,1% an 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure.

Aufarbeiten gemäss Beispiel 2 ergab 1,3 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 68,3%.

Beispiel 15

Eine Fermentationslösung von Cephalosporium acremonium wurde von den darin enthaltenen Zellen mittels Filtration befreit, nachher wurde der pH-Wert darin mit Säure auf 2,8 gebracht, zwecks Zersetzung des in der Lösung enthaltenen Penicillins N. Anschliessend wurde filtriert und der Rückstand gewaschen. Das Filtrat wurde mit den Waschlösungen vereinigt und ergab 3 Liter einer Lösung, welche 4762 μ g/ml Cephalosporin C enthielt. In 100 ml dieser Lösung wurde der pH-Wert durch Zugabe von Natriumhydroxid auf 7,0 gebracht. Dann wurde 175 mg Kobaltsulfat und 97 mg Piperazin darin gelöst und die Lösung auf 37°C erwärmt. Nun wurden 1,9 g α -Ketophenyllessigsäure im Verlauf von einer Stunde unter Rühren und Aufrechterhaltung eines pH-Wertes von 5,0 in die Lösung eingetragen. Es wurde weitere 30 Minuten bei 37°C gerührt und dann der pH-Wert auf 3,0 eingestellt. Nachher wurden 22 ml einer gesättigten wässrigen Natriumperboratlösung eingetropt. Nachdem weitere 10 Minuten lang gerührt worden war, wurde der pH-Wert der Lösung auf 1,5 gebracht durch Zugabe von Schwefelsäure zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium enthielt die Reaktionsflüssigkeit eine Rohausbeute von 60,3% an 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure.

Aufarbeiten der Reaktionslösung gemäss Beispiel 2 ergab 355 mg hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-

carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 68,7%.

Beispiel 16

5 6,7 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 51,3% und 1,6 g Kupferacetat wurden aufgelöst in 600 ml eines 2-n Phosphatpuffers vom pH 4,6. In diese Flüssigkeit wurden 600 ml des gleichen Phosphatpuffers, enthaltend 8,4 g Natrium- α -keto-n-butanat allmählich im Verlauf von 30 Minuten unter Rühren bei 5°C eingetropt. Die Lösung wurde gerührt und reagieren gelassen, während 30 Minuten, wobei allmählich 30 ml einer 35%igen wässrigen Wasserstoffperoxidlösung eingetragen wurden. Hernach wurde weitere 10 Minuten lang gerührt und anschliessend der pH-Wert auf 1,5 vermindert durch Zugabe von Schwefelsäure zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium ergab die Analyse eine Rohausbeute von 63,2% an 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure im Reaktionsgemisch.

20 Aufarbeiten des Gemisches gemäss Beispiel 2 ergab 1,92 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 66,3%.

Beispiel 17

25 4 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 3,3 g Kupferacetat wurden aufgelöst in 120 ml Wasser. Der pH-Wert der Lösung betrug 3,9. Es wurden 120 ml einer wässrigen Lösung aus 6,2 g Glyoxylsäure und 5,5 ml Pyridin tropfenweise im Verlauf von einer Stunde unter Rühren bei Zimmertemperatur darin eingetragen. Nach Vollendung der Zugabe betrug der pH-Wert 4,6. Nun wurde der pH-Wert auf 3,0 eingestellt durch Zugabe von 1-n Schwefelsäure, wonach 60 ml 15%ige wässrige Wasserstoffperoxidlösung im Verlauf von einer Stunde eingetropt wurde. Nachher wurde die Lösung noch 10 Minuten lang gerührt, versetzt mit 21,9 g Natriumthiosulfat, weitere 10 Minuten lang gerührt und schliesslich der pH-Wert auf 1,5 mit Schwefelsäure eingestellt zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium enthielt die Reaktionsflüssigkeit eine Rohausbeute von 92% an 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. 3-Acetoxyethyl-7 β -(5-carboxy-5-oxo-pentanamido)-3-cephem-4-carbonsäure konnte in der Lösung nicht gefunden werden.

Die Reaktionslösung wurde dreimal mit 500 ml Äthylacetat extrahiert und die Extrakte wurden vereinigt. Sie wurden unter vermindertem Druck und unterhalb 40°C konzentriert auf ein Volumen von ungefähr 200 ml. Anschliessend wurde über Nacht getrocknet mit wasserfreiem Natriumsulfat. Die Lösung wurde filtriert und der Rückstand gewaschen mit einem geringen Anteil Äthylacetat. Das Filtrat und die Waschlösungen wurden vereinigt, wonach unter vermindertem Druck unterhalb 40°C auf ein Volumen von 10 ml eingeengt wurde. Diese Lösung wurde eingetropt in 200 ml Petroläther unter kräftigem Rühren. Die Fällung wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Anschliessend wurde die Fällung erneut in Petroläther suspendiert und die erhaltene Suspension wiederum zentrifugiert. Nach Abdekantieren der überstehenden Lösung wurde die Fällung rasch getrocknet über Tonerde im Vakuum und ergab 2,4 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxyethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 98,9%.

Beispiel 18

1,5 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 406 mg Kupfersulfat wurden aufgelöst in 100 ml Wasser. Der pH-Wert der Lösung betrug 3,9. Zu dieser Flüssigkeit wurden 100 ml einer wässrigen Lösung aus 2,3 g Glyoxylsäure und 1,5 ml Triäthylamin unter

Rühren bei Zimmertemperatur in Portionen von je 20 ml alle 30 Minuten hinzugegeben. 10 Minuten nach jeder dieser Zugabe wurden 3 ml 20%iges wässriges Wasserstoffperoxid zugesetzt und die Flüssigkeit unter Rühren 30 Minuten lang reagieren gelassen. Nach Vollendung der Zugabe betrug der pH-Wert 3,5. Nachdem weitere 30 Minuten lang gerührt worden war, wurde die Flüssigkeit versetzt mit 6,29 g Natriumthiosulfat, worauf weitere 10 Minuten lang gerührt wurde. Anschliessend wurde der pH-Wert auf 1,5 eingestellt mittels Schwefelsäure zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium enthielt die Reaktionslösung eine Rohausbeute von 87,8 g an 3-Acetoxymethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure.

Aufarbeiten gemäss Beispiel 17 ergab 0,88 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxymethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 97,1%.

Beispiel 19

4 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 3,3 g Kupferacetat wurden aufgelöst in 120 ml Wasser. Der pH-Wert der Lösung betrug 3,9. In diese Lösung wurden 120 ml einer wässrigen Lösung aus 6,24 g Glyoxylsäure und 5,5 ml Pyridin tropfenweise im Verlauf von einer Stunde unter Rühren bei Zimmertemperatur eingetragen. Nach Vollendung der Zugabe betrug der pH-Wert 4,6. Er wurde mittels 1-n Schwefelsäure auf 3,0 eingestellt, worauf 60 ml einer 15%igen wässrigen Wasserstoffperoxidlösung im Verlauf von einer Stunde eingetroppt wurden. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 10 Minuten lang gerührt, wonach 21,9 g Natriumthiosulfat-pentahydrat darin eingetragen wurden. Anschliessend wurde weitere 10 Minuten lang gerührt und hernach der pH-Wert mit Schwefelsäure auf 1,5 gebracht zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium enthielt die Reaktionsmischung eine Rohausbeute von 92% an 3-Acetoxymethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. 3-Acetoxymethyl-7 β -(5-carboxy-5-oxopentanamido)-3-cephem-4-carbonsäure konnte darin nicht gefunden werden.

Das Reaktionsgemisch wurde dreimal extrahiert mit Äthylacetat und die Extrakte wurden vereinigt. Sie wurden unter

vermindertem Druck und unterhalb 40°C auf ein Volumen von ungefähr 200 ml eingeengt und hernach über Nacht getrocknet über wasserfreiem Natriumsulfat. Anschliessend wurde filtriert und der Rückstand mit einem geringen Anteil Äthylacetat gewaschen. Filtrat und Rückstand wurden vereinigt und eingeengt unter vermindertem Druck bei einer Temperatur unter 40°C auf ein Volumen von 10 ml. Diese Lösung wurde eingetroppt in 200 ml Petroläther unter kräftigem Rühren. Anschliessend wurde die Fällung abzentrifugiert und die überstehende Lösung abdekantiert. Hernach wurde die Fällung erneut suspendiert in Petroläther und die erhaltene Suspension wiederum zentrifugiert. Nach Abtrennung der überstehenden Lösung wurde die Fällung rasch getrocknet über Tonerde im Vakuum und ergab 2,43 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxymethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 98,9%.

Beispiel 20

1,5 g Kristalle des Natriumsalzes von Cephalosporin C mit einer Reinheit von 74,2% und 406 mg Kupfersulfat wurden aufgelöst in 100 ml Wasser. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 3,9. Zu ihr wurden 100 ml einer wässrigen Lösung aus 2,3 g Glyoxylsäure und 1,5 ml Triäthylamin in Portionen von je 20 ml alle 30 Minuten unter Rühren bei Zimmertemperatur hinzugesetzt. 10 Minuten nach jeder dieser Zugabe wurden je 3 ml einer 20%igen Wasserstoffperoxidlösung zugesetzt und die Flüssigkeit während 30 Minuten unter Rühren reagieren gelassen. Nach Vollendung der Zugabe betrug der pH-Wert 3,5. Nachdem weitere 30 Minuten lang gerührt worden war, wurde das Reaktionsgemenge versetzt mit 6,29 g Natriumthiosulfat-pentahydrat. Anschliessend wurde weitere 10 Minuten lang gerührt. Hernach wurde der pH-Wert mit Schwefelsäure auf 1,5 gebracht zwecks Abbruch der Reaktion. In diesem Stadium enthielt die Reaktionsflüssigkeit eine Rohausbeute von 87,8% an 3-Acetoxymethyl-7 β -(4-Carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure.

Das Reaktionsgemisch wurde aufgearbeitet gemäss Beispiel 19 und ergab 0,88 g hellgelber Kristalle von 3-Acetoxymethyl-7 β -(4-carboxybutanamido)-3-cephem-4-carbonsäure. Reinheit 97,1%.