



Patentdirektoratet

TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6270/88

(51) Int.Cl.6

C 07 H 17/08

(22) Indleveringsdag: 10 nov 1988

C 12 P 19/62

(41) Alm. tilgængelig: 22 jun 1989

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 07 aug 1995

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 nov 1987 GB 8726730

(73) Patenthaver: *Pfizer Limited; Ramsgate Road; Sandwich; Kent CT13 9NJ, GB

(72) Opfinder: Christopher James *Dutton; GB, Stephen Paul *Gibson; GB, Shin-Jen Edward *Lee; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser beslægtet med avermectiner

(56) Fremdragne publikationer

EP offl.g.skrift nr. 2615, 170006, 235085

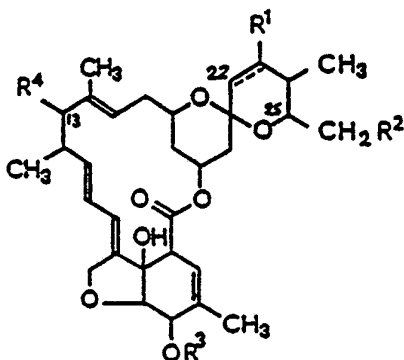
FR offl.g.skrift nr. 2387231

GB pat. nr. 1390336, 1573955

(57) Sammendrag:

6270-88

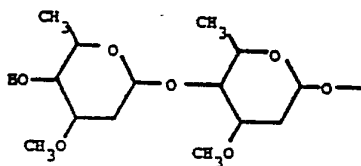
Forbindelser beslægtet med avermectiner og milbemyciner
med den almene formel:



hvor den punkterede linie i 22-23-stillingen repræsenterer en mulig dobbeltbinding, og enten R¹ er H eller

6270-88

OH, og dobbeltbindingen er fraværende, eller dobbeltbindingen er tilstede, og R^1 er fraværende, R_2 er H eller eventuelt substitueret alkyl, alkenyl, alkynyl, alkoxyalkyl, alkylthioalkyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, en 3- til 6-leddet mættet eller umættet, oxygen- eller svovlholdig heterocyclisk ring eller SR_5 , hvor R_5 er alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, cycloalkenyl, phenyl, substitueret phenyl eller en 3- til 6-leddet, mættet eller umættet oxygen- eller svovlholdig heterocyclisk ring, R_3 er hydrogen eller methyl, og R_4 er H eller 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -L-oleandrosyloxy med formlen:



er bredspektrede antiparasitiske midler med anvendelighed som anthelmintica, ectoparasiticider, insekticider og acaricider.

Denne opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte forbindelser beslægtet med avermectiner, men med en hidtil ukendt substituentgruppe ved 25-stillingen. Disse forbindelser er antiparasitiske midler.

5

Avermectinerne er en gruppe af bredspektrede antiparasitiske midler, hidtil omtalt som C-076-forbindelserne. De produceres ved gæring af mikroorganismen *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267, 31271 eller 31272 under aerobe betingelser i et vandigt næringssubstrat indeholdende uorganiske salte og tilgængelige carbon- og nitrogenkilder. De morfologiske og dyrkningsmæssige egenskaber ved stammerne ATCC 31267, 31271 og 31272 er beskrevet i detaljer i GB patentskrift nr. 1 573 955, der også beskriver isoleringen og den kemiske struktur af de otte forbindelser, som udgør C-076-komplekset.

10

15

I EP patentansøgning nr. 0 214 731 angives, at det ved at tilsætte visse specifikke carboxylsyrer eller derivater deraf til fermenteringen af en avermectinproducerende organisme er muligt at opnå hidtil ukendte forbindelser, som er beslægtet med avermectinerne, men har en unaturlig substituentgruppe ved 25-stillingen i stedet for den isopropyl- eller sekundær butylgruppe, som normalt er til stede.

20

25

De således fremstillede forbindelser er karakteriseret ved, at substituentgruppen ved 25-stillingen er α -forgrenet, dvs. at carbonatomet, der er knyttet til C-25-ringstillingen, er et sekundært carbonatom knyttet til yderligere to carbonatomer.

30

I EP patentansøgning nr. 0 284 176 beskrives nye mutantstammer af mikroorganismen *Streptomyces avermitilis*, som mangler forgrenet-kæde-2-oxosyre-dehydrogenase-aktivitet. Disse stammer er deponeret i The American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, under betegnelserne

35

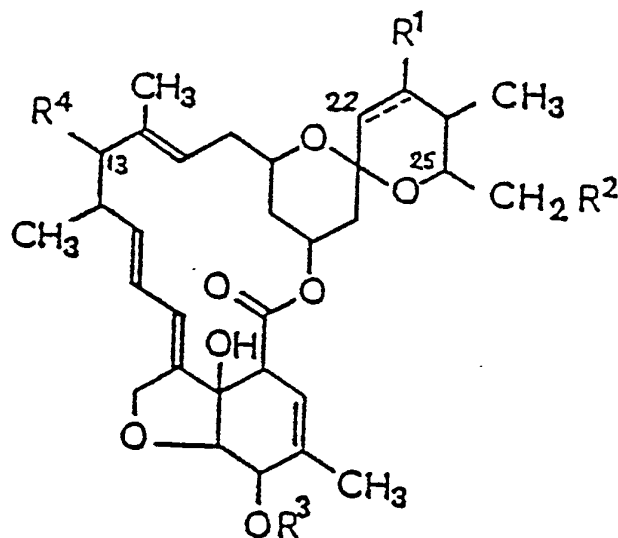
Streptomyces avermitilis ATCC 53567 og ATCC 53568, i overensstemmelse med Budapest-traktatens bestemmelser.

Vi har nu fundet, at det ved anvendelse af disse nye
 5 mutantstammer af Streptomyces avermitilis er muligt at opnå en yderligere række af hidtil ukendte avermectinderivater, som ikke tidligere har været opnåelige, hvori C-25-substituenten er forbundet via et uforgrenet (primært) carbonatom. De omhandlede forbindelser er højaktive anti-
 10 parasitiske midler, der har særlig anvendelighed som anthelmintika, ectoparasiticider, insekticider og acaricider. Forbindelserne kan underkastes kendte kemiske omdannelsesprocesser til opnåelse af yderligere hidtil ukendte halvsyntetiske derivater.

15

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer således en fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser med form-
 len (I):

20



25

30

35 hvori den punkterede linie i 22-23-stillingen repræsenterer en fakultativ binding, og hvori enten R^1 er OH, og den fakultative binding er fraværende, eller den fakulta-

tive binding er til stede, og R^1 er fraværende,

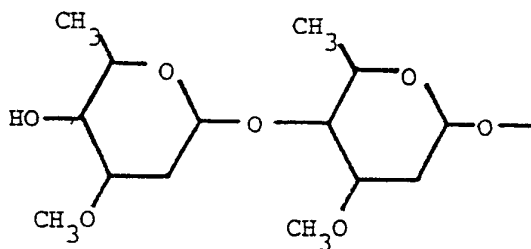
R^2 er H, (C_1-C_8) alkyl, halogen- (C_1-C_8) alkyl, (C_3-C_8) cycloalkyl, (C_5-C_8) cycloalkenyl eller (C_1-C_8) alkylthio,

5

R^3 er hydrogen eller methyl, og

R^4 er en 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -L-oleandrosyloxy-gruppe med formelen:

10



15

hvilken fremgangsmåde er særegen ved, at man dyrker *Streptomyces avermitilis* ATCC 53568 under tilstedeværelse af en carboxylsyre med formelen $R^2CH_2CO_2H$, hvori R^2 er som defineret ovenfor, eller et salt, en ester eller et amid deraf, og isolerer en eller flere forbindelser med formelen (I),

20

hvorpå, om ønsket, en dannet forbindelse med formelen (I), hvori R^1 er OH, og den fakultative binding er fraværende, omdannes til den tilsvarende forbindelse med formelen (I), hvori den fakultative binding er til stede, og R^1 er fraværende, ved en dehydratiseringsreaktion under beskyttelse af hydroxygrupperne i 5- og 4"-stillingerne, efterfulgt af fjernelse af beskyttelsesgrupperne,

30

og, om ønsket, en dannet forbindelse med formelen (I), hvori R^3 er CH_3 , omdannes til den tilsvarende forbindelse med formelen (I), hvori R^3 er H, ved en demetyleringsreaktion.

35

C-076 komplekset består af otte adskilte men tæt beslægtede forbindelser beskrevet som C-076 A1a, A1b, A2a, A2b,

B1a, B1b, B2a og B2b. "a"-serien af forbindelser henviser til det naturlige avermectin, hvori 25-substituenten er (S)-sec-butyl og "b"-serien til den, hvori 25-substituenten er isopropyl. Betegnelserne "A" og "B" henviser til
5 avermectiner, hvori 5-substituenten er henholdsvis methoxy eller hydroxy, og tallet "1" henviser til avermectiner, der har en dobbeltbinding i 22-23-stillingen, og tallet "2" til avermectiner, der er mættede i 22-23-stillingen og har et hydrogenatom ved 22-stillingen og en
10 hydroxygruppe ved 23-stillingen.

I denne beskrivelse er symbolerne "a" og "b" udeladt. Symbolerne A1, A2, B1 og B2 er bevaret for at henvide til
15 ikke-naturlige avermectiner, der har strukturegenskaber svarende til de naturlige avermectiner, som anført ovenfor.

Foretrukne forbindelser med formlen (I) er de, hvori R^2 er methylthio eller ethylthio.

20

I en anden gruppe af foretrukne forbindelser er R^2 methyl, isopropyl eller sekundær-butyl.

I en yderligere gruppe af foretrukne forbindelser er R^2
25 forgrenede C_3 - C_8 alkylgrupper substitueret med et eller flere halogenatomer, specielt 1-(trifluormethyl)ethyl.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan syren sættes til dyrkningen enten på podningstidspunktet eller med
30 intervaller under dyrkningen. Produktionen af forbindelserne med formlen (I) kan følges ved at udtage prøver fra dyrkningen, ekstrahere med et organisk opløsningsmiddel og følge forekomsten af forbindelser med formlen (I) ved chromatografi, f.eks. ved at anvende højtryksvæskechromatografi.
35 Dyrkningen fortsættes, indtil udbyttet af forbindelsen med formlen (I) er maksimeret, i almindelighed i en periode på fra 12 til 16 dage.

Et foretrukket niveau af hver tilsætning af carboxylsyren eller derivatet deraf er mellem 0,05 og 4,0 g pr. liter. De bedste udbytter af forbindelser med formlen (I) opnås ved gradvis tilsætning af syren til dyrkningen, f.eks. ved daglige tilsætninger af syren eller derivatet deraf over en periode på flere dage. Syren kan tilsættes som et salt, såsom natrium- eller ammoniumsaltet, eller som en ester, såsom methyl- eller ethylesteren, eller som et amid, men tilsættes fortrinsvis som den frie syre. Substraterne, der anvendes til dyrkningen, kan være konventionelle kompleksmedier indeholdende assimilerbare kilder til carbon, nitrogen og andre sporelementer.

Efter dyrkning i en periode på adskillige dage ved en temperatur fortrinsvis i området fra 24 til 33 °C, centrifugeres eller filtreres dyrkningssubstratet, og myceliekagen ekstraheres med acetone eller methanol. Ekstrakten koncentrerer, og det ønskede produkt ekstraheres derpå i organiske opløsningsmidler, der ikke er blandbare med vand, såsom methylenchlorid, ethylacetat, chloroform, butanol eller methylisobutylketon. Ekstrakten inddampes, og det rå produkt indeholdende forbindelser med formlen (I) renses om nødvendigt yderligere ved chromatografi, f.eks. ved anvendelse af præparativ reversfase højtryksvæskechromatografi.

Produktet opnås i almindelighed som en blanding af forbindelserne med formlen (I), men mængdeforholdene kan variere afhængigt af den bestemte anvendte carboxylsyre og de betingelser, der er anvendt under dyrkningen.

Vi har fundet, at en række carboxylsyrer med formlen $R^2CH_2CO_2H$ kan sættes til dyrkningen og producere avermectiner med en ny substituentgruppe i 25-stillingen. Eksempler på bestemte syrer, som kan anvendes, inkluderer følgende:

methylthioeddikesyre
ethylthioeddikesyre
3-methylbutansyre
3-trifluormethylbutansyre
5 3-methylpentansyre
n-butansyre
cyclopentaneddikesyre
og propansyre.

10 I en særlig og foretrukken udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres dyrkningen under tilstedeværelse af methylthioeddikesyre, hvilket overvejende resulterer i forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er SCH_3 , R^3 er CH_3 ,
15 og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -4-oleandrosyloxy, i det følgende betegnet som 25-methylthiomethyl-avermectin A2.

I en anden foretrukken udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres dyrkningen under tilstedeværelse af propansyre, hvilket overvejende resulterer i forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er CH_3 , R^3 er CH_3 , og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -4-oleandrosyloxy, i det følgende betegnet som 25-ethyl-avermectin A2.

25 I en yderligere foretrukken udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres dyrkningen under tilstedeværelse af 3-methylbutansyre, hvilket overvejende resulterer i forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er fraværende, den fakultative binding er til stede, R^2 er isopropyl, R^3 er H, og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -4-oleandrosyloxy, i det følgende betegnet som 25-isobutyl-avermectin B1.

35 I en yderligere foretrukken udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres dyrkningen under tilstedeværelse af 3-trifluormethylsmørsyre, hvilket overvejende

resulterer i forbindelser med formlen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er 1-(trifluormethyl)ethyl, R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -4-oleandrosyloxy, og R^3 er CH_3 eller H, i det følgende betegnet som henholdsvis 25-(2-trifluormethylpropyl)-avermectin A2 og B2.

Forbindelserne med formlen (I), hvori den fakultative binding er til stede, og R^1 er fraværende, kan alternativt fremstilles ud fra de tilsvarende forbindelser med formlen (I), hvori R^1 er OH, og den fakultative binding er fraværende ved en dehydratiseringsreaktion. Reaktionen udføres ved først selektivt at beskytte hydroxygrupperne i 5- og 4"-stillingerne, f.eks. som t-butyldimethylsilyloxyacetylderivater, derpå omsætte med et substitueret thiocarbonylhalogenid, såsom (4-methylphenoxy)thiocarbonylchlorid, efterfulgt af opvarmning i et højtkogende opløsningsmiddel, f.eks. trichlorbenzen, for at opnå dehydratisering. Beskyttelsen fjernes derpå for at opnå det umættede produkt. Disse trin samt passende reagenser og reaktionsbetingelser er beskrevet i US patentskrift nr. 4 328 335.

Forbindelserne med formlen (I), hvori R^3 er H, kan også fremstilles ud fra de tilsvarende forbindelser, hvori R^3 er CH_3 , ved demetylering. Denne reaktion opnås ved at behandle 5-methoxyforbindelsen eller et passende beskyttet derivat deraf med mercuriacetat og hydrolysere den resulterende 3-acetoxynoether med fortyndet syre for at opnå den tilsvarende 5-ketonforbindelse. Denne reduceres derpå, f.eks. ved anvendelse af natriumborhydrid, for at opnå 5-hydroxyderivatet. Egnede reagenser og reaktionsbetingelser for disse trin er beskrevet i US patentskrift nr. 4 423 209.

De omhandlede forbindelser er højaktive antiparasitiske midler, der har særlig anvendelighed som anthelmintica,

ectoparasitocider, insektocider og acarocider.

Forbindelserne er således effektive ved behandling af en række sygdomstilstande forårsaget af endoparasitter omfattende i særdeleshed helminthiasis, der oftest fremkaldes af en gruppe af parasitiske orme beskrevet som nematoder, og som kan forårsage alvorlige økonomiske tab hos svin, får, heste og kvæg, ligesom de kan påvirke husdyr og fjerkræ. Forbindelserne er også effektive mod andre nematoder, som angriber forskellige arter af dyr, f.eks. *Dirofilaria* i hunde og forskellige parasitter, der kan inficere mennesker inklusive gastrointestinale parasitter, såsom *Ancylostoma*, *Necator*, *Ascaris*, *Strongyloides*, *Trichinella*, *Capillaria*, *Trichuris*, *Enterobius* og parasitter, som findes i blod og andre væv og organer, såsom trådorme og de ekstraintestinale stadier af *Strongyloides* og *Trichinella*.

Forbindelserne er også værdifulde ved behandling af ectoparasitiske infektioner, herunder især arthropod-ectoparasitter hos dyr og fugle, såsom blodmider, mider, lus, lopper, spyfluer, bidende insekter og vandrende larver af tovingede insekter, der kan angribe kvæg og heste.

Forbindelserne er tillige insektocider, der er virksomme mod husholdningsskadedyr såsom kakkelakker, møl, museumsklaner og husfluer, ligesom de er anvendelige mod insektskadedyr i oplagret korn og på landbrugsplanter, såsom spindemider, bladlus og sommerfuglelarver, og mod vandrende insekter såsom græshopper.

Forbindelserne med formlen (I) administreres som en sammensætning passende til den specielle tilsigtede anvendelse og til den bestemte art af værtsdyr, der behandles, og den parasit eller det insekt der er involveret. Til anvendelse som anthelminticum kan forbindelserne administreres peroralt i form af en kapsel, bolus, tablet eller

fortrinsvis et indhældningspræparat, eller alternativt kan de administreres ved injektion eller ved implantering. Sådanne sammensætninger fremstilles på konventionel måde i overensstemmelse med veterinær standardpraksis.

5 Kapsler, piller eller tabletter kan fremstilles ved blanding af den aktive forbindelse med et passende findelt fortyndingsmiddel eller bærestof, endvidere indeholdende et henfaldsmiddel og/eller bindemiddel såsom stivelse, lactose, talkum, magnesiumstearat etc. Et indhældnings-
10 præparat kan fremstilles ved at opslæmme det aktive stof i en vandig opløsning sammen med et dispergerings- eller befugtningsmiddel etc., og injektionspræparater kan fremstilles i form af sterile opløsninger, der kan indeholde andre stoffer, f.eks. tilstrækkeligt salte eller glucose
15 til at gøre opløsningen isotonisk med blod. Disse sammensætninger vil variere med hensyn til vægtmængden af den aktive forbindelse afhængigt af arten af værtsdyr, der skal behandles, infektionens sværhed og art og værtsdyrets kropsvægt. I almindelighed vil til peroral administration en dosis fra ca. 0,001 til 10 mg pr. kg kropsvægt givet som en enkeltdosis eller i opdelte doser i en periode på fra 1 til 5 dage være tilfredsstillende, men naturligvis kan der være tilfælde, hvor højere eller lavere doseringsområder er indikeret.

25

Som et alternativ kan forbindelserne administreres med dyrenes foder, og til dette formål kan der fremstilles et koncentreret foderadditiv eller en præmix til blanding med det normale dyrefoder.

30

Til anvendelse som insekticid og til behandling af landbrugsskadedyr anvendes forbindelserne som spray, pulver, emulsioner og lignende i overensstemmelse med standardlandbrugspraksis.

35

Til human brug administreres forbindelserne som et farmaceutisk acceptabelt præparat i overensstemmelse med nor-

mal medicinsk praksis.

5 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses af de følgende eksempler, hvor eksempel 1 til 13 er eksempler på fremstilling af forbindelserne med formlen (I), eksempel 14 er et eksempel på et indholdningspræparat, og eksemplerne 15 og 16 belyser den antiparasitiske og insekticide virkning af forbindelserne.

10 EKSEMPEL 1

25-ethyl-ivermectin A2

15 En frossen podemængde (2 ml) af en kultur af Streptomyces avermitilis ATCC 53568 blev podet i 50 ml af et substrat indeholdende stivelse (1 g), "Pharmamedia"[®] (0,75 g), "Ardamin pH" (0,25 g) og calciumcarbonat (0,1 g) i en 300 ml kolbe og inkuberet ved 28 °C i 2 dage. Denne podemængde (50 ml) blev overført til en anden podekolbe (1 liter)

20 indeholdende stivelse (20 g), "Pharmamedia"[®] (15 g), "Ardamin pH" (5 g) og calciumcarbonat (2 g) og inkuberet ved 28 °C i yderligere 2 dage. Denne podemængde blev anvendt til podning af 60 liter af et substrat indeholdende stivelse (6 kg), magnesiumsulfat (60 g), "Pharmamedia"[®]

25 (300 g), dinatriumhydrogenphosphat (60 g), jernsulfat (0,6 g), calciumcarbonat (420 g), glutaminsyre (36 g), zinksulfat (0,06 g) og mangansulfat (0,06 g) indeholdt i en 60 liter gæringsbeholder. Gæringsblandingen blev inkuberet ved 29 °C under omrystning med 350 omdrejninger pr.

30 minut og beluftning med 60 liter pr. minut. Natriumpropionat (140 g) tilsattes efter 96 timer og igen efter 192 timer (54 g). Efter 288 timer blev myceliet fjernet ved filtrering og ekstraheret med acetone (2 x 50 liter) efterfulgt af ethylacetat (50 liter). Acetoneekstrakten

35 blev inddampet til ca. 10 liter og ekstraheret med den ovenfor nævnte ethylacetatekstrakt i tre portioner. De resulterende ethylacetatlag blev kombineret og inddampet,

hvilket gav en brun olie (112 g).

Den ovennævnte olie blev opløst i 160 ml af en blanding af methanol og vand (95:5) og ekstraheret med n-hexan (2 x 300 ml), hexanekstrakterne blev smidt væk, og methanol-
5 laget blev indampet, hvilket gav en brun olie (87 g). Den sidstnævnte blev opløst i methylenchlorid (250 ml) og omrørt med silicagel (80 g) og aktivt kul (30 g) i 1 time. Silicagel og aktivt kul blev fjernet ved filtrering
10 gennem "Arbacel", og filtratet blev indampet, hvilket gav en gul olie (53 g). Den sidstnævnte blev opløst i methylenchlorid (2,2 liter) og omrørt med aluminiumoxid (190 g) i 2 timer. Aluminiumoxidet blev fjernet ved filtrering, og filtratet omrørt med yderligere aluminiumoxid
15 (64 g) i yderligere 1 time. Aluminiumoxidet blev fjernet ved filtrering, og de kombinerede filterkager fra begge filtreringer blev omrørt med chloroform (1,3 liter) i 45 minutter, hvorefter aluminiumoxidet blev fjernet ved filtrering. Filtratet blev indampet, hvilket gav en bleggul
20 olie (12,5 g), der blev opløst i diethylether og sat på en søjle af silicagel (400 g). Søjlen blev elueret med diethylether, og der blev opsamlet fraktioner på 100 ml. Fraktionerne 21-28 blev kombineret, og opløsningsmidlet afdampet, hvilket gav et delvis rensset stof (150 mg).
25 Produktet blev opløst i methanol (0,5 ml) og chromatograferet på en C18 "Zorbax ODS" (handelsnavn, Dupont®) søjle (21 mm x 25 cm), idet der blev elueret med en blanding af methanol og vand (77:23) ved en hastighed på 9 ml pr. minut. De relevante fraktioner blev kombineret, og opløsningsmidlet afdampet, hvilket gav forbindelsen med form-
30 len (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 og R^3 begge er CH_3 , og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, med smp. 146-153 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtig
35 atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid.

(M+Na)⁺ observeret ved m/e 899 (teoretisk 899).

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e værdierne for de overvejende fragmenter var:

570, 295, 277, 275, 183, 165, 145, 127, 113, 95 og 87.

EKSEMPEL 2

10

25-methylthiomethyl-avermectin A2

En frossen podemængde (2 ml) af en kultur af Streptomyces avermitilis mutantorganisme ATCC 53568 blev podet i 50 ml af et substrat indeholdende stivelse (1 g), "Pharmamedia" (0,75 g), "Ardamin pH" (0,25 g) og calciumcarbonat (0,1 g) i en 300 ml kolbe og inkuberet i 2 dage ved 28 °C på et rystebord ved 180 omdrejninger pr. minut. En podemængde fra denne kolbe (25 ml) blev overført til en 3 liter kolbe indeholdende 600 ml af det ovennævnte substrat (alle ingredienser i samme forhold) og blev inkuberet i 2 dage ved 28 °C med omrystning på et rystebord ved 180 omdrejninger pr. minut. Væsken fra denne kolbe (40 ml) blev anvendt til at pøde en 3 liter gæringsbeholder indeholdende 2,5 liter af et substrat bestående af stivelse (250 g), magnesiumsulfat (2,5 g), "Pharmamedia" (12,5 g), dinatriumhydrogenphosphat (2,5 g), jernsulfat (0,025 g), calciumcarbonat (1,75 g), glutaminsyre (1,5 g), zinksulfat (0,0025 g) og mangansulfat (1,5 g). Denne gæringsblanding blev inkuberet ved 28 °C med omrystning ved 1000 omdrejninger pr. minut. Methylthioeddikesyre (1 g) tilsattes efter 96 timer, og dyrkningen fortsattes i yderligere 11 dage. Derefter blev myceliet fjernet ved filtrering og ekstraheret med acetone (2 x 2 liter) efterfulgt af ethylacetat (2 liter). Acetoneekstrakten blev inddampet til ca. 400 ml og ekstraheret med ethylacetatekstrakten i tre portioner. De resulterende ethylace-

tatlag blev kombineret og inddampet, hvilket gav en brun olie (4 g), der blev opløst i diethylether og overført til en søjle af silicagel (100 g). Søjlen blev elueret med diethylether, og der blev opsamlet fraktioner på 50 ml. Fraktionerne 11-18 blev kombineret og inddampet, hvilket gav et delvis rensede materiale, der blev yderligere rensede ved chromatografi på en C18 "Zorbax ODS" (handelsnavn, Dupont®) søjle (21 mm x 25 cm), idet der blev elueret med en blanding af methanol og vand (77:23) ved en hastighed af 9 ml pr. minut. De relevante fraktioner blev kombineret og inddampet, hvilket gav forbindelsen med formelen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er SCH_3 , R_3 er CH_3 , og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, med smp. 105-112 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. $(M+Na)^+$ observeret ved m/e 931 (teoretisk 931).

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e værdierne for de overvejende fragmenter var:

327, 309, 243, 225, 215, 145, 127, 113, 95 og 87.

EKSEMPEL 3

25-(2-trifluormethyl)propyl-avermectiner A2 og B2

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af 3-trifluormethylbutansyre som substrat i stedet for natriumpropionat. De relevante kombinerede fraktioner fra silicagelchromatografi indeholdende det rå A2-derivat blev chromatograferet på en C18 "Zorbax ODS" (handelsnavn, Dupont®) søjle (21 mm x 25 cm), idet der blev elu-

eret med en blanding af methanol og vand (75:25) ved en hastighed på 9 ml pr. minut. Fraktionerne 167-179 blev kombineret og inddampet, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er 1-(trifluormethyl)ethyl, R^3 er CH_3 , og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandroxyloxy, som et hvidt pulver, smp. 130-136 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. $(M+Na)^+$ observeret ved m/e 981 (teoretisk 981).

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e værdierne for de overvejende fragmenter var:

652, 377, 359, 293, 275, 265, 257, 247, 223, 179, 145, 127, 113, 111 og 87.

De relevante fraktioner fra silicagelchromatografi indeholdende det rå B2 derivat blev kombineret og chromatograferet på en C-18 "Dynamax" (handelsnavn, Rainin®) søjle (41,4 mm x 25 cm), idet der blev elueret med en blanding af methanol og vand (73:27) ved en hastighed på 60 ml pr. minut. De relevante fraktioner blev kombineret, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er 1-(trifluormethyl)ethyl, R^3 er H, og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandroxyloxy, som et hvidt pulver, smp. 158-160 °C. Produktet blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. $(M+Na)^+$ observeret ved m/e 967 (teoretisk 967).

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e værdierne for de overvejende fragmenter var:

5 638, 377, 359, 293, 275, 265, 261, 257, 247, 223, 145, 127, 113, 111, 95 og 87.

EKSEMPEL 4

10 25-ethylthiomethyl-avermectin A2

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af ethylthioeddikesyre som substrat i stedet for natriumpropionat. Efter chromatografi på en "Zorbax ODS" (handelsnavn, Dupont®) søjle blev fraktionerne 24-72 kombineret, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R¹ er OH, den fakultative binding er fraværende, R² er ethylthio, R³ er CH₃, og R⁴ er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 265-270 °C (dekomponerer). Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. (M+Na)⁺ observeret ved m/e 945 (teoretisk 945).

25

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e værdierne for de overvejende fragmenter var:

30 616, 473, 341, 323, 257, 239, 229, 211, 187, 179, 145, 113 og 87.

35

EKSEMPEL 525-isobutyl-avermectin B1

5 Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af 3-methylbutansyre som substrat i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagel-chromatografi blev kombineret og chromatograferet på en C18 "Zorbax OD" (handelsnavn, Dupont®) søjle (21 mm x 25 cm),
10 idet der blev elueret med en blanding af methanol og vand (81:19) med en hastighed på 9 ml/minut. Fraktionerne 93-98 blev kombineret og inddampet, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R¹ er fraværende, den fakultative binding er til stede, R² er isopropyl, R³ er H, og R⁴ er
15 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 120-123 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. (M+Na)⁺ observeret ved m/e 895 (teoretisk 895).
20

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:

25

565, 319, 305, 221, 193, 169, 145, 127, 113 og 87.

EKSEMPEL 630 25-(2-methylbutyl)-avermectiner A2 og B1

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af 3-methylpentansyre som substrat i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagel-chromatografi indeholdende det rå A2-derivat blev kombineret og chromatograferet på en C-18 "Zorbax ODS" (handelsnavn, Dupont®) søjle (21 mm x 25 cm), idet der blev elueret med
35

en blanding af methanol og vand (80:20) ved en hastighed på 9 ml/minut. Relevante fraktioner blev kombineret, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er sekundær butyl, R^3 er methyl, og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 120-125 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. $(M+Na)^+$ observeret ved m/e 941 (teoretisk 941).

Eletronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:

337, 319, 253, 235, 225, 207, 179, 145, 113 og 87.

De relevante fraktioner fra silicagelchromatografi indeholdende det rå B1-derivat blev kombineret og chromatograferet på en C-18 "Ultrasphere" (handelsnavn, Beckman®) søjle (10 mm x 25 cm), idet der blev elueret med en blanding af methanol og vand (85:15) ved en hastighed på 4 ml/minut. Relevante fraktioner blev kombineret, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er H, den fakultative binding er til stede, R^2 er sekundært butyl, R^3 er H, og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 158-164 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af et prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. $(M+Na)^+$ observeret ved m/e 909 (teoretisk 909).

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:

319, 235, 207, 183, 145, 113, 95 og 87.

EKSEMPEL 7

5 25-n-propyl-avermectin A2

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af n-butansyre som substrat i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagelchromatografi blev kombineret og chromatograferet på en C-18 "Dynamax" (handelsnavn, Rainin®) søjle (41,4 mm x 25 cm), idet der blev elueret med en gradient af methanol og vand fra (75:25) til (100:0) i løbet af 170 minutter ved en hastighed på 40 ml/minut. Fraktioner blev opsamlet med 15 minuts mellemrum, og fraktionerne 36 og 37 blev kombineret, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori er OH, den fakultative binding er fraværende, R² er ethyl, R³ er methyl, og R⁴ er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 150-155 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardementsmassespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. (M+Na)⁺ observeret ved m/e 913 (teoretisk 913).

25

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmentet var:

30

584, 309, 291, 225, 207, 197, 179, 145, 113 og 87.

EKSEMPEL 8

25-cyclopentylmethyl-avermectiner B1 og B2

35

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af cyclopentaneddikesyre i stedet for natriumpropio-

nat. De relevante fraktioner fra silicagelchromatografi indeholdende det rå B1-derivat blev kombineret og chromatograferet på en C-18 "Dynamax" (handelsnavn, Rainin®) søjle (41,4 mm x 25 cm), idet der blev elueret med en
5 blanding af methanol og vand (84:16) ved en hastighed på 60 ml/minut. Relevante fraktioner blev kombineret, hvilket gav en forbindelse med formlen (I), hvori R¹ er fraværende, den fakultative binding er til stede, R² er cyclopentyl, R³ er H, og R⁴ er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 140-146 °C. Pro-
10 duktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. (M+Na)⁺ ob-
15 serveret ved m/e 921 (teoretisk 921).

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:

20 592, 331, 295, 257, 247, 218, 195, 145, 127, 113, 111, 95 og 87.

De relevante fraktioner fra silicagel-chromatografi indeholdende det rå B2-derivat blev kombineret og chromatograferet på en C-18 "Ultrasphere" (handelsnavn, Beckman®) søjle (10 mm x 25 cm), idet der blev elueret med en blanding af methanol og vand (80:20) ved en hastighed på 4 ml/minut. Relevante fraktioner blev kombineret, hvilket
25 gav forbindelsen med formlen (I), hvori R¹ er OH, den fakultative binding er fraværende, R² er cyclopentyl, R³ er H, og R⁴ er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 155-165 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri
30 udført på et "VG Model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. (M+Na)⁺ observeret ved m/e 939 (teoretisk
35

939).

Elektronstrålemassespektrometri blev udført under anvendelse af et "VG Model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:

349, 335, 331, 289, 265, 261, 257, 247, 237, 219, 195, 179, 145, 127, 113, 111, 95 og 87.

10 EKSEMPEL 9

25-(2-methylbutyl)-avermectin B1

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af 3-methylpentansyre som substrat i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagelchromatografi blev kombineret og chromatograferet på en "Ultrasphere ODS"-søjle (Beckman®) (10 x 250 mm) under eluering med en blanding af methanol og vand (85:15) med en strømningshastighed på 4 ml/min. Fraktioner blev taget hvert halve minut, og fraktionerne 20-24 blev kombineret, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R¹ er fraværende, den fakultative binding er til stede, R² er s-butyl, R³ er H, og R⁴ er 4'-(α-L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 158-164 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri gennemført på et "VG model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. (M+Na)⁺ blev iagttaget ved m/e 909 (teoretisk 909).

Elektronbombardements-massespektrometri blev gennemført under anvendelse af et "VG model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:

35 319, 235, 207, 183, 145, 113 og 87.

EKSEMPEL 1025-(2-trifluormethyl)-propylavermectin B2

5 Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af trifluormethylsmørsyre som substrat i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagel-chromatografi blev chromatograferet på et "Prep LC/System 500" (Waters®) under eluering med en blanding af methanol og vand (75:25) med en strømningshastighed på 100 ml/min. Efter et 8 minutters forløb blev der taget fraktioner hvert halvandet minut. Fraktionerne 15-26 blev kombineret, hvilket gav delvis rensset produkt. Dette blev chromatograferet på en "C-18 Dynamax"-søjle (Rainih) (41,4 mm
10 x 25 cm) under eluering med en blanding af methanol og vand (73:27) med en strømningshastighed på 60 ml/min. Fraktioner blev taget hvert minut, og fraktionerne 7 og 8 blev kombineret, hvilket gav delvis rensset produkt. Dette blev chromatograferet på en "Ultrasphere ODS"-søjle
15 (Beckman®) (10 x 250 mm) under eluering med en blanding af methanol og vand (73:27) med en strømningshastighed på 4 ml/min. Fraktionerne 49-78 blev kombineret, hvilket gav forbindelsen med formlen (I), hvori R^1 er OH, den fakultative binding er fraværende, R^2 er 1-(trifluormethyl)-ethyl, R^3 er H, og R^4 er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 158-160 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri gennemført på et "VG model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. $(M+Na)^+$ blev iagttaget ved m/e 967 (teoretisk 967).

Elektronbombardements-massespektrometri blev gennemført under anvendelse af et "VG model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:
35

638, 377, 359, 293, 275, 265, 247, 179, 223, 111, 261, 257, 145, 127, 113, 95 og 87.

EKSEMPEL 11

5

25-cyclopentylmethyl-avermectin B1

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af cyclopentaneddikesyre i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagel-chromatografi blev kombineret og chromatograferet på en "Ultrasphere ODS"-søjle (Beckman®) (10 x 250 mm) under eluering med en blanding af methanol og vand (80:20) ved en strømningshastighed på 4 ml/min. Efter et 18 minutters forløb blev der opsamlet fraktioner hvert halve minut, og fraktionerne 5-22 blev kombineret, hvilket gav forbindelsen med formelen (I), hvori R¹ er fraværende, den fakultative binding er til stede, R² er cyclopentyl, R³ er H, og R⁴ er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy, som et hvidt pulver, smp. 155-165 °C. Produktets struktur blev bekræftet ved hurtigt atombombardements-massespektrometri gennemført på et "VG model 7070E" massespektrometer under anvendelse af en prøvematrix af triethylenglycol med fast natriumchlorid. (M+Na)⁺ blev iagttaget ved m/e 939 (teoretisk 939).

25

Elektronbombardements-massespektrometri blev gennemført under anvendelse af et "VG model 7070F" massespektrometer. m/e-værdierne for de overvejende fragmenter var:

30

349, 335, 331, 289, 265, 261, 257, 247, 237, 219, 195, 179, 145, 127, 113, 111, 95 og 87.

35

EKSEMPEL 1225-(2-cyclopenten-1-methyl)-avermectin B2

5 Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af 2-cyclopenten-1-eddikesyre i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagel-chromatografi blev kombineret, og det rå produkt karakteriseret ved revers-fase højydelses-væskechromatografi (HPLC)/massespektrometri.

10

HPLC blev gennemført under anvendelse af en C-18 "Ultrasphere"-søjle (Beckman®) (25 cm x 4,6 mm) under eluering med en blanding af methanol og vand (88:12) indeholdende 0,1 M ammoniumacetat ved en strømningshastighed på 1 ml/min. Massespektrometri blev gennemført på et "VG Trio 3" instrument.

15

Produktet var en forbindelse med formlen (I), hvori R¹ er OH, den fakultative binding er fraværende, R² er 2-cyclopentenyl, R³ er H, og R⁴ er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy.

20

Produktet havde en HPLC-tilbageholdelsestid på 8,8 minutter og gav en (M+H)⁺ ved m/e 915 (teoretisk 915) og en (M+Na)⁺ ved m/e 937 (teoretisk 937).

25

EKSEMPEL 13

30 25-(2-cyclopenten-1-methyl)-avermectin B1

Proceduren fra eksempel 1 blev fulgt, men under anvendelse af 2-cyclopenten-1-eddikesyre i stedet for natriumpropionat. De relevante fraktioner fra silicagel-chromatografi blev kombineret, og det rå produkt karakteriseret ved revers-fase højydelses-væskechromatografi (HPLC)/massespektrometri.

35

HPLC blev gennemført under anvendelse af en C-18 "Ultrasphere"-søjle (Beckman®) (25 cm x 4,6 mm) under eluering med en blanding af methanol og vand (88:12) indeholdende 0,1 M ammoniumacetat, ved en strømningshastighed på 1 ml/min. Massespektrometri blev gennemført på et "VG Trio 3" instrument.

Produktet var en forbindelse med formlen (I), hvori R¹ er H, den fakultative binding er fraværende, R² er 2-cyclopentenyl, R³ er H, og R⁴ er 4'-(α -L-oleandrosyl)-L-oleandrosyloxy.

Produktet havde en HPLC-tilbageholdelsestid på 17,5 min og gav en (M+Na)⁺ ved m/e 919 (teoretisk 919).

15

EKSEMPEL 14

Indhældningspræparat

Produktet fra et vilkårligt af de forudgående eksempler blev opløst i polyethylenglycol (gennemsnitsmolekylvægt 300) for at opnå en opløsning indeholdende 400 μ g/ml til brug som et indhældningspræparat.

25 EKSEMPEL 15

Anthelmintisk virkning

Den anthelmintiske virkning blev bedømt mod *Caenorhabditis elegans* under anvendelse af den in vitro screenings-test, der er beskrevet af K.G. Simpkin og G.L. Coles i *Parasitology*, 1979, 79, 19. Produkterne fra eksemplerne 1 til 8 dræbte alle 100% af ormene ved en brønd-koncentration på 0,1 μ g/ml.

35

EKSEMPEL 16Insekticid virkning

5 Aktiviteten mod larvestadiet af spyfluen *Lucilia cuprina*
(Q-stamme) påvises ved anvendelse af en standardprocedu-
re, hvor første-stadiums-larver holdes i kontakt med fil-
trerpapir behandlet med prøveforbindelsen. Prøveforbin-
delsen påføres papiret som en acetoneopløsning. De be-
10 handlede filterpapirer anbringes derpå i reagensglas
indeholdende 1 ml serum fra nyfødt kalv, og første-sta-
diums-larverne tilsættes. Produkterne fra eksemplerne 1
til 8 dræbte 100% af larverne, når de blev påført fil-
trerpapiret i et niveau på 1 mg/m^2 .

15

20

25

30

35

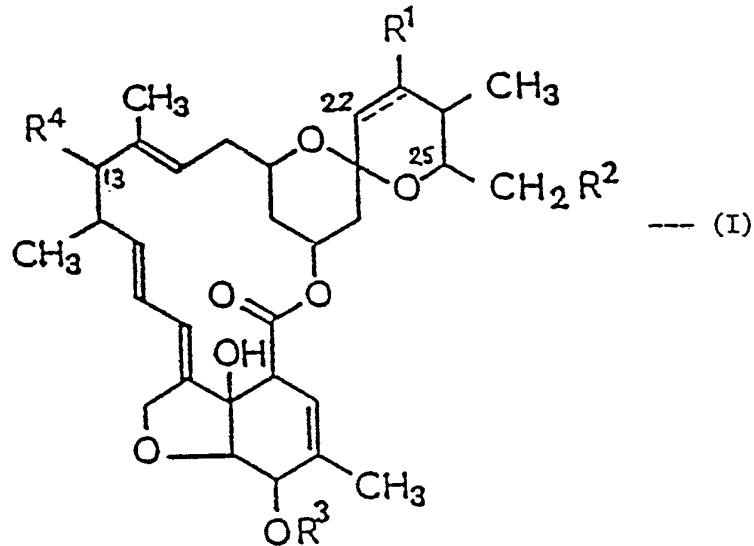
PATENTKRAV:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser beslægtet med avermectiner og med den almene formel:

5

10

15



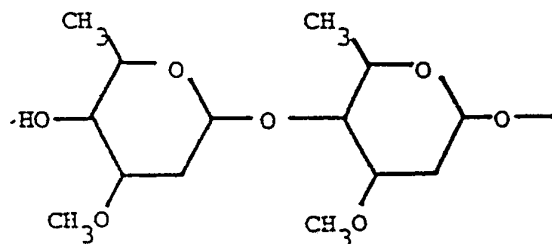
hvor den punkterede linie i 22-23-stillingen repræsenterer en fakultativ binding, og hvori enten R^1 er OH, og den fakultative binding er fraværende, eller den fakultative binding er til stede, og R^1 er fraværende.

R^2 er H, (C_1-C_8) alkyl, halogen- (C_1-C_8) alkyl, (C_3-C_8) cycloalkyl, (C_5-C_8) cycloalkenyl eller (C_1-C_8) alkylthio,

R^3 er hydrogen eller methyl, og

R^4 er en 4'-(α -L-oleandrosyl)- α -L-oleandrosyloxygruppe med formelen:

35



kendetegnet ved, at man dyrker *Streptomyces*

5 avermitilis ATCC 53568 under tilstedeværelse af en carboxylsyre med formlen $R^2CH_2CO_2H$, hvori R^2 er som defineret ovenfor, eller et salt, en ester eller et amid deraf, og isolerer en eller flere forbindelser med formlen (I),

10 hvorpå, om ønsket, en dannet forbindelse med formlen (I), hvori R^1 er OH, og den fakultative binding er fraværende, omdannes til den tilsvarende forbindelse med formlen (I), hvori den fakultative binding er til stede, og R^1 er fraværende, ved en dehydratiseringsreaktion under beskyttelse af hydroxygrupperne i 5- og 4"-stillingerne, efterfulgt af fjernelse af beskyttelsesgrupperne,

15 og, om ønsket, en dannet forbindelse med formlen (I), hvori R^3 er CH_3 , omdannes til den tilsvarende forbindelse med formlen (I), hvori R^3 er H, ved en demetyleringsreaktion.

20 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendet tegnet ved, at R^2 er methylthio eller ethylthio.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendet tegnet ved, at R^2 er methyl, isopropyl eller sekundær butyl.

25

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendet tegnet ved, at R^2 er 1-(trifluormethyl)ethyl.

30

35