

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
6. Februar 2003 (06.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/010155 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07D 313/00**,
C07H 17/08, C12P 19/62

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/07572

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juli 2002 (08.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 35 550.5 20. Juli 2001 (20.07.2001) DE

GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii) für die folgenden Bestimmungsstaaten AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BAYER AKTIENGESellschaft** [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **JESCHKE, Peter** [DE/DE]; Kalmüntener Str. 44 a, 51467 Bergisch Gladbach (DE). **EBERZ, Günther** [DE/DE]; Heiderhof 15, 51519 Odenthal (DE). **FRÖDE, Rita** [US/US]; 1017 Main Campus Drive, Raleigh, NC 27606 (US). **MÖHRLE, Volker** [DE/DE]; Merheimer Str. 312 c, 50733 Köln (DE). **VELTEN, Robert** [DE/DE]; Hahnenweg 2, 51061 Köln (DE).

(74) **Gemeinsamer Vertreter:** **BAYER CROPSCIENCE AG**; Legal and Patents, Patents and Licensing, 51373 Leverkusen (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(81) **Bestimmungsstaaten** (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,

(54) **Title:** METHOD FOR PRODUCING NOVEL SPINOSYN DERIVATIVES

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM HERSTELLEN VON NEUEN SPINOSYN-DERIVATEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for producing novel spinosyn derivatives, which are substituted in the C-21 position by a 1-hydroxy-ethyl radical, to novel spinosyn derivatives of this type per se and to their use for producing novel spinosyns.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Herstellen von neuen Spinosyn-Derivaten, die in C-21-Position mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest substituiert sind, sowie solche neue Spinosyn-Derivate per se und deren Verwendung zum Herstellen neuer Spinosyne.



WO 03/010155 A1

Verfahren zum Herstellen von neuen Spinosyn-Derivaten

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Herstellen von neuen Spinosyn-Derivaten, die in C-21-Position mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest substituiert sind, sowie solche neue Spinosyn-Derivate per se und deren Verwendung zum Herstellen neuer Spinosyne.

Bei den Spinosynen handelt es sich um bekannte Verbindungen. Spinosyne sind Fermentationsprodukte, die von Kulturen des Actinomyceten *Saccharopolyspora spinosa* hergestellt werden. Natürliche Spinosyne bestehen aus einem tetracyclischen Polyketidgrundgerüst (Aglykon) mit einem 12-gliedrigen Makrolidring und einem 5,6,5-cis-anti-trans-Tricyclus, sowie einem D-Forosamin- und einem 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose-Zuckeranteil (Kirst et al., 1991, Tetrahedron Letters, 32:4839). Mehr als 20 verschiedene natürliche Spinosyne, der sogenannte A83543 Komplex, sind bisher beschrieben worden (vgl. WO 97/00265, WO 94/20518 und WO 93/09126). Beispielsweise sind in EP-A 375316 die Spinosyne A, B, C, D, E, F, G, H und J beschrieben. Aus WO 93/09126 sind die Spinosyne L, M, N, Q, R, S und T bekannt. In WO 94/20518 werden die Spinosyne K, O, P, U, V, W und Y sowie deren Derivate erwähnt. Diese Verbindungen variieren in der Substitution von einer oder einigen Methylgruppen am tetracyclischen Grundgerüst, am D-Forosamin- oder am 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose-Zuckeranteil. Ein 17-Pseudoaglykon, dem der D-Forosamin-Zuckeranteil fehlt, ist ebenfalls aus Kulturbrühen von *S. spinosa* isoliert worden.

Die Hauptkomponenten des von *S. spinosa* gebildeten A83543 Komplexes stellen die Varianten Spinosyn A und Spinosyn D dar, die die wesentlichen Bestandteile des Produktes Spinosad sind (vgl. Pesticide Manual, British Crop Protection Council, 11th Ed., 1997, Seite 1272 und Dow Elanco Trade Magazine Down to Earth, Vol. 52, NO. 1, 1997 und die darin zitierte Literatur).

Wenn der Amino-Zucker in C-17-Position nicht vorhanden ist, werden die Verbindungen als Spinosyn A, D, etc.-17-Pseudoaglykon bezeichnet; wenn der neutrale Zucker in C-9-Position nicht vorhanden ist, werden die Verbindungen als Spinosyn A, D, etc.-9-Pseudoaglykon bezeichnet. Spinosyne ohne die beiden Zucker-
5 Reste in den Positionen C-9 und C-17 werden als Spinosyn-Aglykon bezeichnet.

Spinosyne sind geeignet zur Bekämpfung von Arachniden, Nematoden, Ektoparasiten (vgl. WO 01/11962, WO 01/11963, WO 01/11964) und Insekten, insbesondere von Lepidopteren und Dipteren-Spezies. Darüber hinaus ist die technische Anwen-
10 dung der Spinosyne umweltfreundlich und zudem besitzt diese Substanzklasse ein attraktives toxikologisches Profil.

Man kann jedoch erwarten, dass tierische Schädlinge, insbesondere Ektoparasiten oder Pflanzenschädlinge, die zur Zeit mit Spinosynen bekämpft werden, eine
15 Resistenz gegen diese auf dem Markt befindlichen Wirkstoffe entwickeln können. Daher ist es wichtig, neue biologisch aktive Derivate von Spinosynen herzustellen, welche die derzeit zur Bekämpfung von Schädlingen verwendete Spinosyne ersetzen können.

Bestimmte natürliche Aglykon-Derivate von Spinosyn, die eine Hydroxylgruppe in C-8-Position des Makrolidgrundgerüsts besitzen, wurden kürzlich mittels Saccharopolyspora sp. (LW107129) erzeugt und sind als insektizid wirksame Ver-
20 bindungen bekannt geworden (vgl. WO 01/19840). Während zahlreiche Modifizierungen an Spinosynen durchgeführt wurden (vgl. WO 97/00265) fanden Derivatisierungen an der Methyl- und Ethylgruppe in C-21-Position des Makrolidgrundgerüsts
25 nur wenig Beachtung. Obwohl die Funktionalisierung des Alkylrestes in C-21-Position u. a. für Derivatisierungsreaktionen vorteilhaft wäre, sind nur wenige Spinosyn-Derivate, deren Substituenten in C-21 eine Hydroxylgruppe aufweisen, bekannt. Beispielsweise wurden erst kürzlich Spinosyn-Derivate beschrieben, die mit
30 einem 3-Hydroxy-1-butenyl-Rest in C-21 substituiert sind, gegebenenfalls zusätzlich

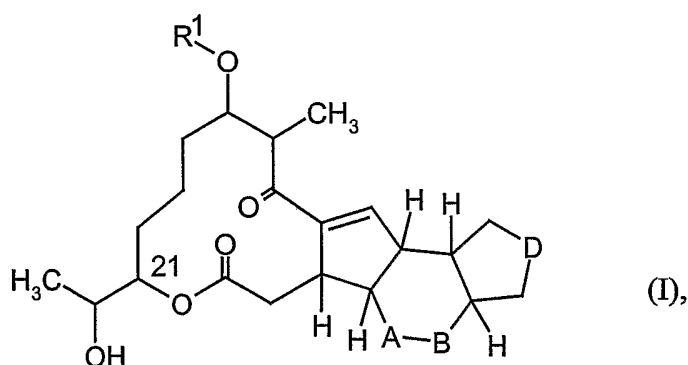
eine Hydroxylgruppe in der oben genannten C-8-Position tragen können, und eine insektizide Wirksamkeit besitzen (vgl. WO 01/19840).

5 Während chemisch synthetische Verfahren zur Herstellung von Spinosyn-Derivaten beschrieben sind (vgl. Martynow, J. G. und Kirst, H. A., 1994, J. Org. Chem., 59: 1548), ist über die chemische Synthese der oben genannten Spinosyn-Derivate mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest in C-21-Position bisher nichts bekannt geworden.

10 Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, geeignete Verfahren bereitzustellen, welche für die selektive und/oder stereospezifische Herstellung von neuen Spinosyn-Derivaten mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest in C-21-Position verwendbar sind.

Die Aufgabe wurde gelöst durch die Bereitstellung von Verfahren zum Herstellen von Verbindungen der allgemeinen Formel (I),

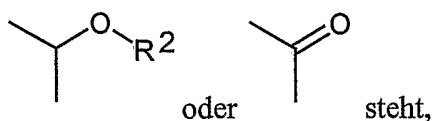
15



in welcher

20 A-B für eine der folgenden Gruppen steht: -HC=CH- , $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$, $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$ oder $\text{-H}_2\text{C-CH(CH}_3\text{)-}$,

D für die Gruppe

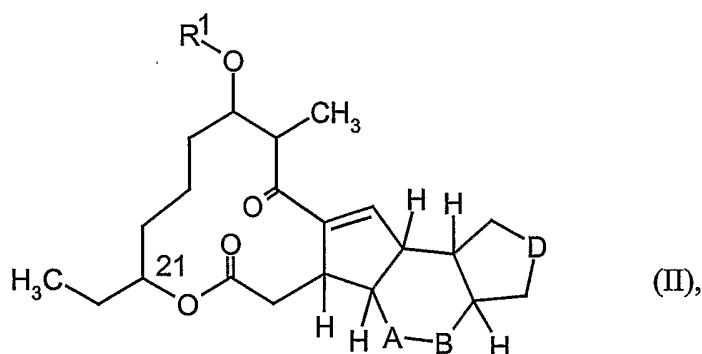


R¹ für Wasserstoff oder für einen Amino-Zucker steht, und

R² für Wasserstoff oder für einen Zucker steht,

5

wobei man Verbindungen der allgemeinen Formel (II),



in welcher

10

A-B, D und R¹ die oben genannten Bedeutungen haben,

mit einem Mikroorganismus in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben Bedingungen oder mit einem daraus hergestellten Enzymextrakt oder mit einem oder mehreren daraus isolierten Enzymen in Kontakt bringt.

15

Die Ausgangsverbindungen werden somit selektiv und/oder stereospezifisch durch Biotransformation unter Verwendung von Mikroorganismen oder deren Enzyme in Spinosyn-Derivate, die in C-21-Position mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest substituiert sind, überführt.

20

Der Ausdruck "Spinosyn-Derivate", wie er hierin verwendet wird, umfasst auch Spinosyn-Aglykon-Verbindungen, d.h. Verbindungen, die das Makrolidgrundgerüst der Spinosyne, jedoch keine Zucker-Reste besitzen.

25

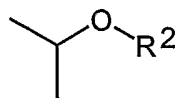
Bevorzugt werden als Ausgangsverbindungen solche Verbindungen der allgemeinen Formel (II) eingesetzt,

in welcher in dem Fall (1), dass

5

A-B für eine der folgenden Gruppen steht: $-\text{HC}=\text{CH}-$, $-\text{HC}=\text{C}(\text{CH}_3)-$, $-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-$ oder $-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-$, und

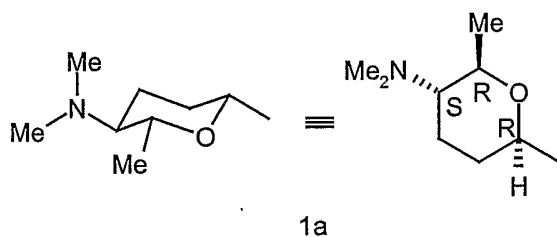
D für die Gruppe



10

steht,

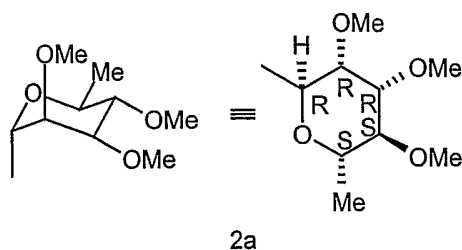
R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht,



15

und

R^2 für einen Zucker der Formel 2a steht,



20

oder in welcher in dem Fall (2), dass

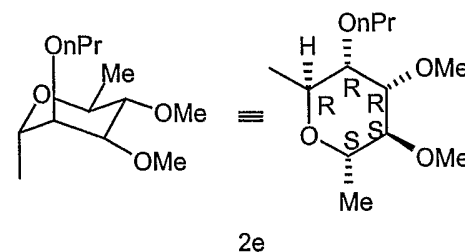
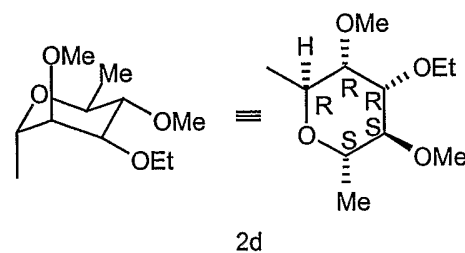
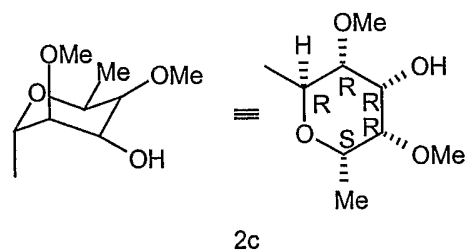
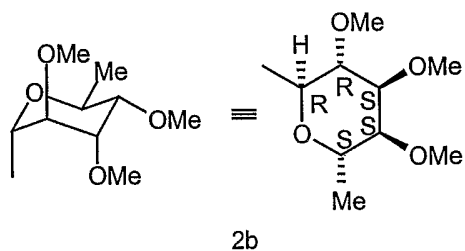
A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -H₂C-CH₂- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

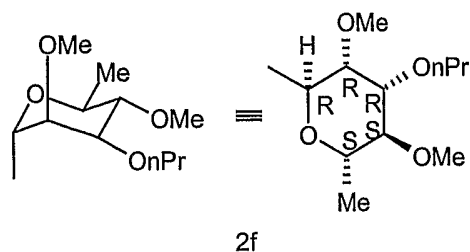
5 R¹ für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

R² für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2b, 2c, 2d, 2e oder 2f steht,

10



- 7 -

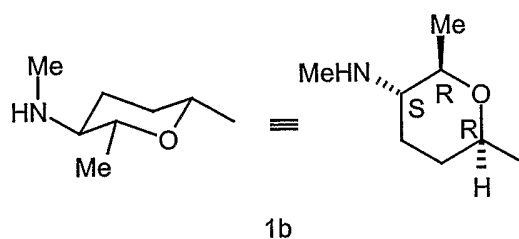


oder in welcher in dem Fall (3), dass

- 5 A-B für eine der folgenden Gruppen steht: -HC=CH- , $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$ oder $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

- 10 R^1 für Wasserstoff oder für einen Amino-Zucker der Formel 1b steht,



und

- 15 R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der oben genannten Formel 2a steht,

oder in welcher in dem Fall (4), dass

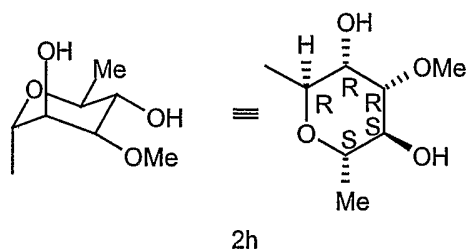
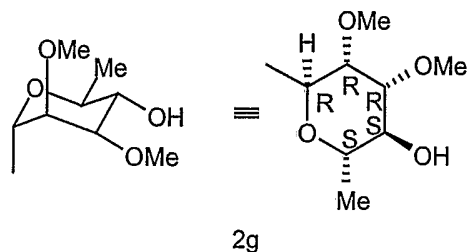
A-B für die Gruppe -HC=CH- oder $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$ steht, und

20

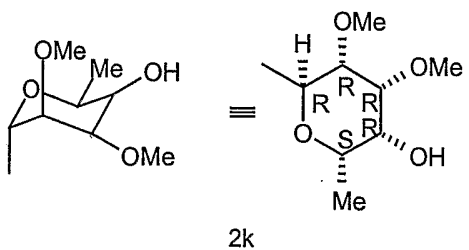
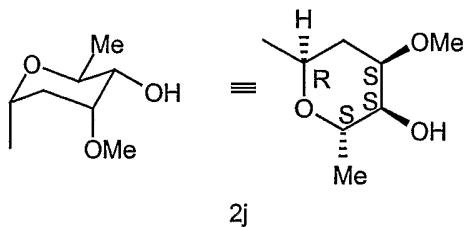
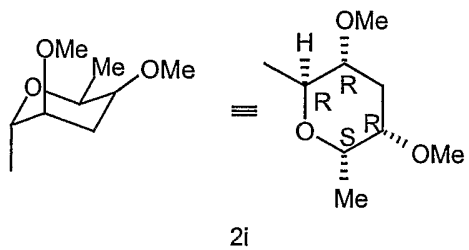
D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

R^2 für einen Zucker der Formel 2g, 2h, 2i, 2j oder 2k steht,



5



10 oder in welcher in dem Fall (5), dass

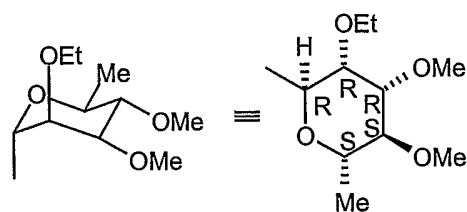
A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-H_2C-CH_2-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

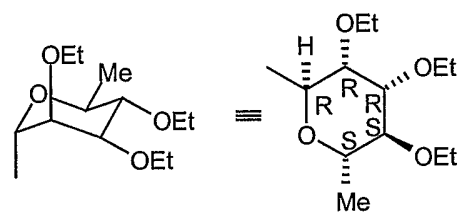
R¹ für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

5

R² für einen Zucker der Formel 2l oder 2m steht,



2l



2m

10

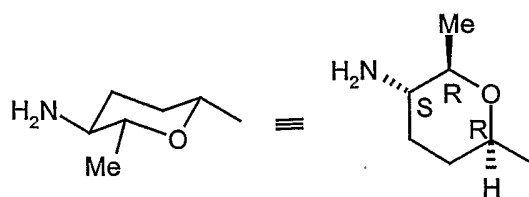
oder in welcher in dem Fall (6), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

15

D die oben genannte Bedeutung hat,

R¹ für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1b oder für einen Aminozucker der Formel 1c steht,

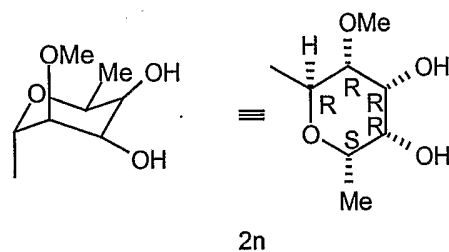


1c

20

und

- 5 R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2b, 2c, 2g oder 2h, oder für einen Zucker der Formel 2n steht,



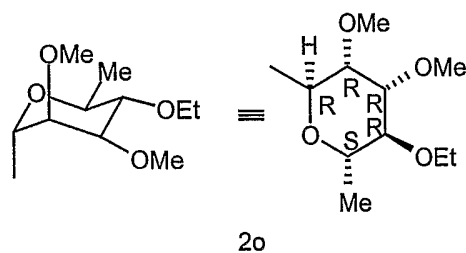
oder in welcher in dem Fall (7), dass

- 10 A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

- 15 R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

R^2 für einen Zucker der Formel 2o steht,



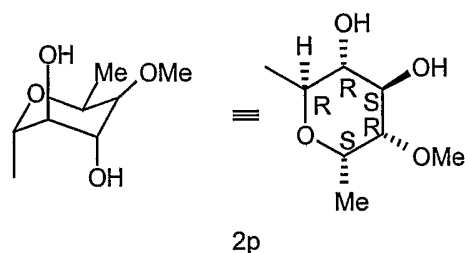
- 20 oder in welcher in dem Fall (8), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1b steht, und

5 R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2d, 2i oder 2j,
oder für einen Zucker der Formel 2p steht,



10 oder in welcher in dem Fall (9), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

15

R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1c steht, und

R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2i oder 2p steht,

20

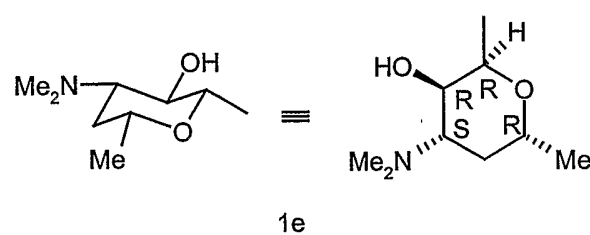
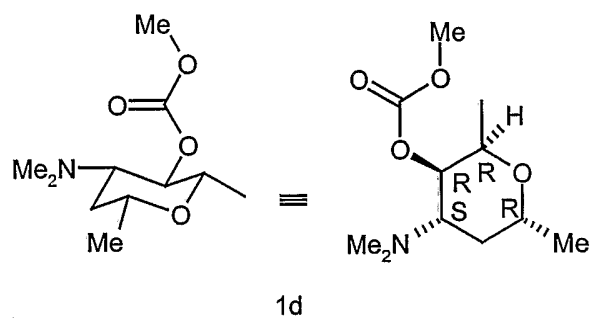
oder in welcher in dem Fall (10), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

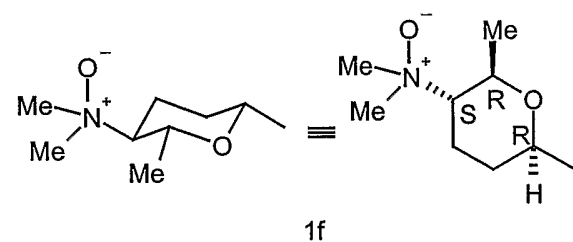
25 D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der Formel 1d, 1e oder 1f steht,

- 12 -



5



und

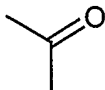
R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2a steht,

10

oder in welcher in dem Fall (11), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

15

D für die Gruppe  steht,

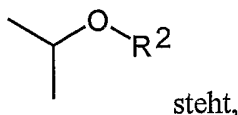
R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht.

Besonders bevorzugt werden als Ausgangsverbindungen solche Verbindungen der
5 allgemeinen Formel (II) eingesetzt,

in welcher in dem Fall (12), dass

10 A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

D für die Gruppe



15 R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

R^2 für einen Zucker der Formel 2a, 2g oder 2h steht,

oder in welcher in dem Fall (13), dass

20 A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

25 R^1 für einen Aminozucker der Formel 1a steht, und

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2d, 2e, 2l, 2m oder 2o steht,

oder in welcher in dem Fall (14), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

5 R¹ für Wasserstoff oder für einen Amino-Zucker der Formel 1b steht, und

R² für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2a steht,

oder in welcher A-B, D und R¹ wie im Fall (11) definiert sind.

10

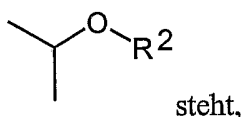
Ganz besonders bevorzugt werden als Ausgangsverbindungen Verbindungen der allgemeinen Formel (II) eingesetzt,

in welcher in dem Fall (15), dass

15

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

D für die Gruppe



20

R¹ für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

R² für einen Zucker der Formel 2a steht,

25 oder in welcher in dem Fall (16), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

30

R^1 für einen Aminozucker der Formel 1a steht, und

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2d, 2l oder 2m steht,

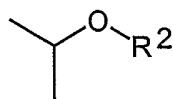
5 oder in welcher A-B, D und R^1 wie im Fall (11) definiert sind.

Am meisten bevorzugt werden als Ausgangsverbindungen Verbindungen der allgemeinen Formel (II) eingesetzt,

10 in welcher in dem Fall (17), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-HC=C(CH_3)-$ steht, und

D für die Gruppe



15 steht,

R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

R^2 für einen Zucker der Formel 2a steht,

20

oder in welcher in dem Fall (18), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

25 D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für Wasserstoff steht, und

R^2 für Wasserstoff steht.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Verbindungen der allgemeinen Formel (I), worin A-B, D und R¹ die oben genannten Bedeutungen haben.

5 Die hierin verwendete Abkürzung "Me" steht für Methyl; die Abkürzung "Et" steht für Ethyl.

10 Durch das erfindungsgemäße Verfahren können sowohl die optisch aktiven, stereoisomeren Formen, aber auch diastereomere Formen der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gebildet werden.

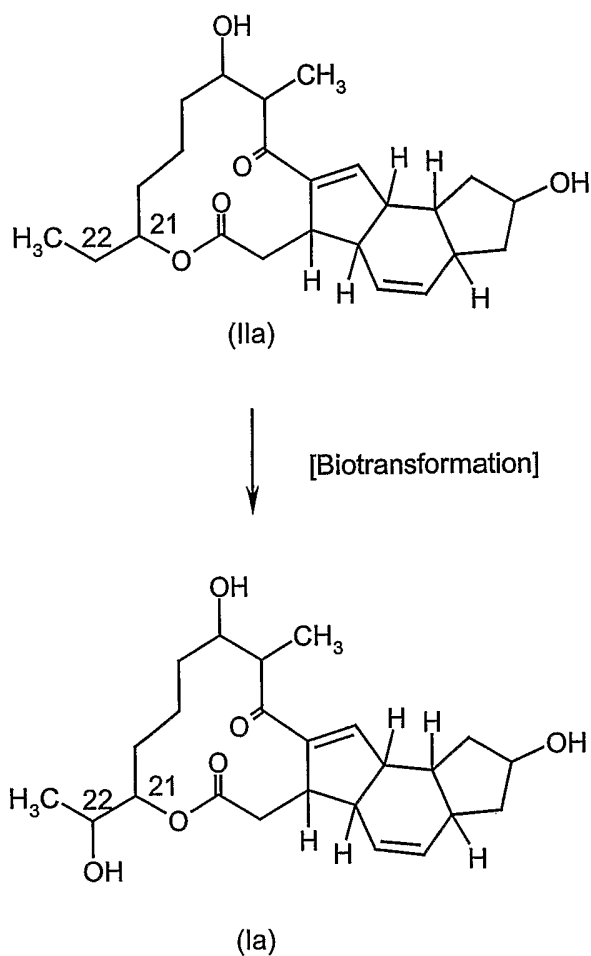
15 Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) können in stereoisomeren Formen, die sich entweder wie Bild und Spiegelbild (Enantiomere), oder die sich nicht wie Bild und Spiegelbild (Diastereomere) verhalten, existieren. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind sowohl die Enantiomeren als auch die Diastereomeren und deren jeweilige Mischungen. Die Racemformen lassen sich ebenso wie die Diastereomeren in bekannter Weise in die stereoisomer einheitlichen Bestandteile trennen. Gegebenenfalls lassen sich die Isomere durch an sich bekannte Verfahren ineinander überführen.

20 Die erfindungsgemäßen Verbindungen, in welcher R¹ für einen Aminozucker der Formeln 1a - 1e steht, können Salze bilden. Salze werden gemäß den Standardverfahren zur Salzherstellung gebildet. Beispielsweise werden die erfindungsgemäßen Verbindungen mit entsprechenden Säuren neutralisiert um Säureadditionssalze auszubilden. Repräsentativ verwendbare Säureadditionssalze sind Salze, die sich beispielsweise durch eine Reaktion mit anderen anorganischen Säuren, wie
25 beispielsweise Schwefelsäure, Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäure oder organischen Carbonsäuren wie Essigsäure, Trifluoressigsäure, Zitronensäure, Bernsteinsäure, Milchsäure, Ameisensäure, Maleinsäure, Camphersäure, Phthalsäure, Glycolsäure, Glutarsäure, Stearinsäure, Salicylsäure, Sorbinsäure, Zimtsäure,
30 Pikrinsäure, Benzoesäure oder organischen Sulfonsäuren wie Methansulfonsäure und

para-Toluolsulfonsäure oder mit basischen Aminosäuren wie Asparaginsäure, Glutaminsäure, Arginin oder Ähnliches bilden.

Die als Ausgangsverbindungen für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbaren
5 Verbindungen der allgemeinen Formel (II) sind bekannt (vgl. Creemer L. C. et al.,
1998, J. Antibiotics 51 (8): 795-800; Sparks T. C. et al., 1998, J. Econ. Entomol. 91
(6): 1277-1283; Sparks T. C. et al., 2000, Pestic. Biochem. Physiol. 67 (3): 187-197;
Paquette L. A. et al., 1998, J. Am. Chem. Soc. 120 (11): 2553-2563; Evans D. A. et
al., 1993, J. Am. Chem. Soc. 115 (11): 4497-4513; Crouse G. D. et al., 2001, Pest.
10 Manag. Sci. 57 (2): 177-185; Creemer L. C. et al., 2000, J. Antibiotics 53 (2):
171-178; Sparks T. C. et al., 2000, Proc.-Beltwide Cotton Conf. Vol. 2: 1225-1229)
bzw. können nach dem in WO 01/16303 beschriebenen Verfahren hergestellt werden.
In analoger Weise können die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbaren
Ausgangsverbindungen ausgehend von den entsprechenden natürlichen Spinosynen
15 erhalten werden.

Setzt man beispielsweise das Spinosyn A-Aglykon der Formel (IIa) ein, so läßt sich
das erfindungsgemäße Verfahren durch das Reaktionsschema 1 wiedergeben:

Reaktionsschema 1

- 5 Selektive und/oder stereospezifische Hydroxylierungen natürlicher Produkte und synthetischer Verbindungen durch Biokonversion unter Verwendung von Mikroorganismen oder deren Enzyme sind in der Literatur beschrieben. Insbesondere wurden Zellen und/oder Enzyme von Gram-positiven Bakterien, wie Streptomyceten, oder Gram-negative Bakterien, wie Pseudomonas, oder Pilzen, wie Fusarium, verwendet. Beispiele für Mikroorganismen, die entsprechende Enzym-Klassen, wie
- 10 beispielsweise P-450-Monooxygenasen enthalten, sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Organismus/Enzym	Klasse der chemischen Verbindung	Referenz
<i>Streptomyces halstedii</i>	Hydroxylierung von Galbonoliden A and B	US 5972994
<i>Streptomyces</i> sp. MA 7065	Hydroxylierung von Taxol und Cephalomanninen	US 5756536
<i>Streptomyces roseochromogenes</i> (Waksman collection 3689), <i>Streptomyces</i> sp. (ATCC 11009), and <i>Streptomyces roseochromogenes</i> (ATCC 3347)	Hydroxylierung von 11-Oxo- oder 11 β -Hydroxy-6 α -methylprogesteron zum 16 α -Hydroxy-Derivat, welches dann acetyliert wird	US 2864837
<i>Nocardioides luteus</i>	6-Hydroxy-7-desoxytaxane	US 6162622
<i>Fusarium moniliforme</i>	Herstellung von 7 α -Hydroxyl-Derivaten von Dehydroepiandrosteron und Pregnenolon	FR-A 2771105
<i>Beauveria bassiana</i>	2-Phenoxypropionsäure	WO 95/29249
<i>Cunninghamella blakesleena</i> (ATCC 8688a)	Hydroxylierung von Avermectin	US 4666937 EP-A 194125
<i>Pseudomonas testosteroni</i> ATCC 31492	m-Hydroxybenzoat wird transformiert zu 2,3-Dihydroxybenzoat	US 4217416
<i>Mortierella maculata</i>	Herstellung von Pravastatin ausgehend von Compactin	WO 00/46175
Pflanzliche NADPH Cytochrom-P450-Reduktase	Hydroxylierung von verschiedenen Substraten	WO 93/21326
<i>Bacterium</i> NRRL-B-18737	Herstellung von Bisphenol-alkyl-alkoholen ausgehend von Bisphenol-alkanen	US 5132228

Organismus/Enzym	Klasse der chemischen Verbindung	Referenz
Pseudomonas mendocina kr-1 Monooxygenase-Gene	Biokonversion einer Phenyl- verbindung zu einer phenolischen Verbindung	WO 89/09828
Mikroorganismen oder Enzyme	Herstellung optisch aktiver 3- Hydroxy-pyrrolidine	WO 00/29606
Rekombinante Yarrowia lipolytica, die heterologe Cytochrom-P450- Systeme exprimieren	Biokonversion von Progesteron zu 17 α - Hydroxyprogesteron	WO 00/03008
Geranylgeraniol-18-hydroxylase, gereinigt aus Croton sublyratus	Biokonversion von Geranylgeraniol zu Plaunotol	US 5879916

Erfindungsgemäß und entsprechend dem oben genannten Reaktionsschema 1 kann man Verbindungen der allgemeinen Formel (II), worin A-B, D und R¹ die oben angegebenen Bedeutungen haben, mit einem geeigneten Mikroorganismus in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben Bedingungen in Kontakt bringen und danach die gewünschten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) isolieren.

Anstelle der Mikroorganismen können auch Enzymextrakte und aufgereinigte Enzyme, gegebenenfalls nach Zugabe oder unter Regenerierung der benötigten Cofaktoren, verwendet werden, die nach üblichen Verfahren ausgehend von diesen Mikroorganismen erhältlich sind.

In besonderer Weise können Gene, die die Biosynthese solcher Enzyme determinieren auch kloniert und in fremden Wirten, wie z.B. Escherichia coli exprimiert werden. Solche rekombinanten Bakterien können unmittelbar zur Biotransformation eingesetzt werden. Darüber hinaus kann auch ein Enzymextrakt einer solchen rekombinanten Zelle oder ein aufgereinigtes Protein, gegebenenfalls nach Zugabe oder unter Regenerierung der benötigten Cofaktoren, zur Biotransformation verwendet werden.

Vorzugsweise wird für das erfindungsgemäße Verfahren ein Mikroorganismus aus der Gruppe der Actinomyceten, insbesondere aus der Gattung *Streptomyces* verwendet.

5

Besonders bevorzugt wird für das erfindungsgemäße Verfahren ein Stamm aus der Art *Streptomyces djakartensis*, *Streptomyces griseofuscus*, *Streptomyces caelestis*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces griseus* oder *Streptomyces aureofaciens* eingesetzt.

10

Ganz besonders bevorzugt wird für das erfindungsgemäße Verfahren ein Stamm mit den kennzeichnenden Merkmalen der folgenden Stämme verwendet:

Name	Hinterlegungs-Nr.
<i>Streptomyces djakartensis</i>	NRRL B-12103
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	DSM 40191
<i>Streptomyces caelestis</i>	DSM 40084
<i>Streptomyces antibioticus</i>	ATCC 11891
<i>Streptomyces griseus</i>	DSM 40937
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	DSM 46447

15

Die in der Tabelle genannten Stämme sind nochmals bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt worden:

Name	Hinterlegungs-Nr.
<i>Streptomyces djakartensis</i>	DSM 14327
<i>Streptomyces griseofuscus</i>	DSM 14330
<i>Streptomyces caelestis</i>	DSM 14328
<i>Streptomyces antibioticus</i>	DSM 14329
<i>Streptomyces griseus</i>	DSM 14331
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	DSM 14332

Die Stämme sind in Beispiel 16 näher beschrieben. Es können nicht nur die hinterlegten Stämme als solche, sondern auch Mutanten davon verwendet werden, solange diese Mutanten die kennzeichnenden Merkmalen der hinterlegten Stämme besitzen. Dies bedeutet, dass die Mutanten noch die Fähigkeit besitzen müssen, die erfindungsgemäße Biokonversion durchführen zu können.

Vorzugsweise enthält das wässrige Nährmedium eine assimilierbare Kohlenstoffquelle und eine assimilierbare Stickstoffquelle.

Die Verbindungen der Formel (I) werden beispielsweise produziert, wenn ein Stamm aus den Arten *Streptomyces djakartensis*, *S. griseofuscus*, *S. caelestis*, *S. antibioticus*, *S. griseus* oder *S. aureofaciens* in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben Bedingungen in der Gegenwart von Verbindungen der Formel (II) fermentiert werden. Typischerweise werden die Mikroorganismen in einem Nährmedium, welches eine Kohlenstoffquelle und gegebenenfalls ein proteinartiges Material enthält, fermentiert. Bevorzugte Kohlenstoffquellen umfassen Glucose, braunen Zucker, Saccharose, Glycerin, Stärke, Maisstärke, Lactose, Dextrin, Melasse etc. Bevorzugte Stickstoffquellen umfassen Baumwollsaatmehl, Hefe, autolytierte Bäckerhefe, feste Milchbestandteile, Sojabohnenmehl, Maismehl, pankreatische oder papainisch verdaute Spaltprodukte von Kasein, feste Destillationsbestandteile, Brühen aus tierischem Pepton, Fleisch- und Knochenstücke etc. Vorzugsweise werden Kombinationen dieser Kohlenstoff- und Stickstoffquellen verwendet.

Spurenelemente, wie beispielsweise Zink, Magnesium, Mangan, Kobalt, Eisen etc. müssen dem Kultivierungsmedium nicht zugefügt werden, solange Leitungswasser und nicht-gereinigte Bestandteile als Mediumkomponenten verwendet werden.

- 5 Die Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) kann bei jeder Temperatur induziert werden, die ein ausreichendes Wachstum der Mikroorganismen gewährleistet. Vorzugsweise beträgt die Temperatur zwischen 21°C und 32°C, besonders bevorzugt ungefähr 28°C. Im allgemeinen wird eine optimale Produktion der Verbindungen der Formel (I) innerhalb von 2 bis 4 Tagen nach Zugabe der Verbindungen der Formel (II) zu der Kultur erhalten. Die Produktion der erfindungsgemäßen Verbindungen kann sowohl in Schüttelflaschen als auch in Rühr-Fermentern stattfinden.

- 15 Bevorzugte Anzuchtbedingungen und Medien für Anzuchten im Schüttelkolben sind in den Beispielen 2 bis 9 beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen als Biotransformationsprodukt können aus dem Kultivierungsmedium durch übliche Verfahren isoliert werden.

- 20 Verschiedene Verfahren können angewendet werden, um die erfindungsgemäßen Verbindungen aus der Fermentationsbrühe zu isolieren und zu reinigen, wie z.B. präparative Gelchromatographie, präparative Chromatographie an Reversed Phase oder präparative Absorptionschromatographie. Die Detektion kann dabei z.B. durch UV-Absorption oder Massenspektrometrie erfolgen.

- 25 Die erfindungsgemäßen Verbindungen können zur Herstellung von biologisch aktiven, insbesondere insektiziden und akariziden, Spinosynen verwendet werden. Die biologische Wirksamkeit bestimmter natürlicher Aglykon-Derivate von Spinosyn, die eine Hydroxylgruppe in C-8-Position des Makrolidgerüsts besitzen, ist kürzlich bekannt geworden (vgl. WO 01/19840). Als weitere Beispiele sind die
30 ebenso kürzlich vorbeschriebenen Spinosyn-Derivate mit einem 3-Hydroxy-1-

butenyl-Rest in C-21-Position zu nennen. Gegebenenfalls können diese Spinosyn-Derivate auch zusätzlich eine Hydroxylgruppe in einer der oben genannten C-8-Position tragen und ebenfalls eine insektizide Wirksamkeit besitzen (vgl. WO 01/19840).

5

Bei der Herstellung weiterer Spinosyn-Derivate aus den erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I), in welcher R^1 für Wasserstoff und D für die Gruppe $C=O$ oder $C-O-R^2$ steht, worin R^2 Wasserstoff bedeutet, ist von Vorteil, geeignete Schutzgruppen (SG) zu verwenden. Beispielsweise sind als Schutzgruppen (SG) für Hydroxylgruppen, substituierte Methylether und Ether, substituierte Ethylether, substituierte Benzylether, Silylether, Ester, Carbonate oder Sulfonate bekannt (vgl. Greene T. W., Wuts P. G. W. in Protective Groups in Organic Synthesis; John Wiley & Sohns, Inc. 1999, Protection for the hydroxyl group, including 1,2- and 1,3-diols).

15

Als Schutzgruppen (SG) vom substituierten Methylether-Typ sind beispielsweise zu nennen: Methoxymethylether (MOM), Methylthiomethylether (MTM), (Phenyl-dimethylsilyl)methoxymethylether (SMOM-OR), Benzyloxymethylether (BOM-OR), para-Methoxybenzyloxymethylether (PMBM-OR), para-Nitrobenzyloxymethylether, ortho-Nitrobenzyloxymethylether (NBOM-OR), (4-Methoxyphenoxy)-methylether (p-AOM-OR), Guaiacolmethylether (GUM-OR), tert.-Butoxymethylether, 4-Pentenyl-oxymethylether (POM-OR), Silyloxymethylether, 2-Methoxyethoxy-methylether (MEM-OR), 2,2,2-Trichlorethoxymethylether, Bis(2-chlorethoxy)-methylether, 2-(Trimethylsilyl)ethoxymethylether (SEM-OR), Methoxymethylether (MM-OR).

25

Als Schutzgruppen (SG) vom substituierten Ethylether-Typ sind beispielsweise zu nennen: 1-Ethoxyethylether (EE-OR), 1-(2-Chlorethoxy)ethylether (Cee-OR), 1-[2-(Trimethylsilyl)ethoxy]ethylether (SEE-OR), 1-Methyl-1-methoxyethylether (MIP-OR), 1-Methyl-1-benzyloxyethylether (MBE-OR), 1-Methyl-1-benzyloxy-2-fluorethylether, 1-Methyl-1-phenoxy-ethylether, 2,2,2-Trichlorethylether, 1,1-Dianisyl-

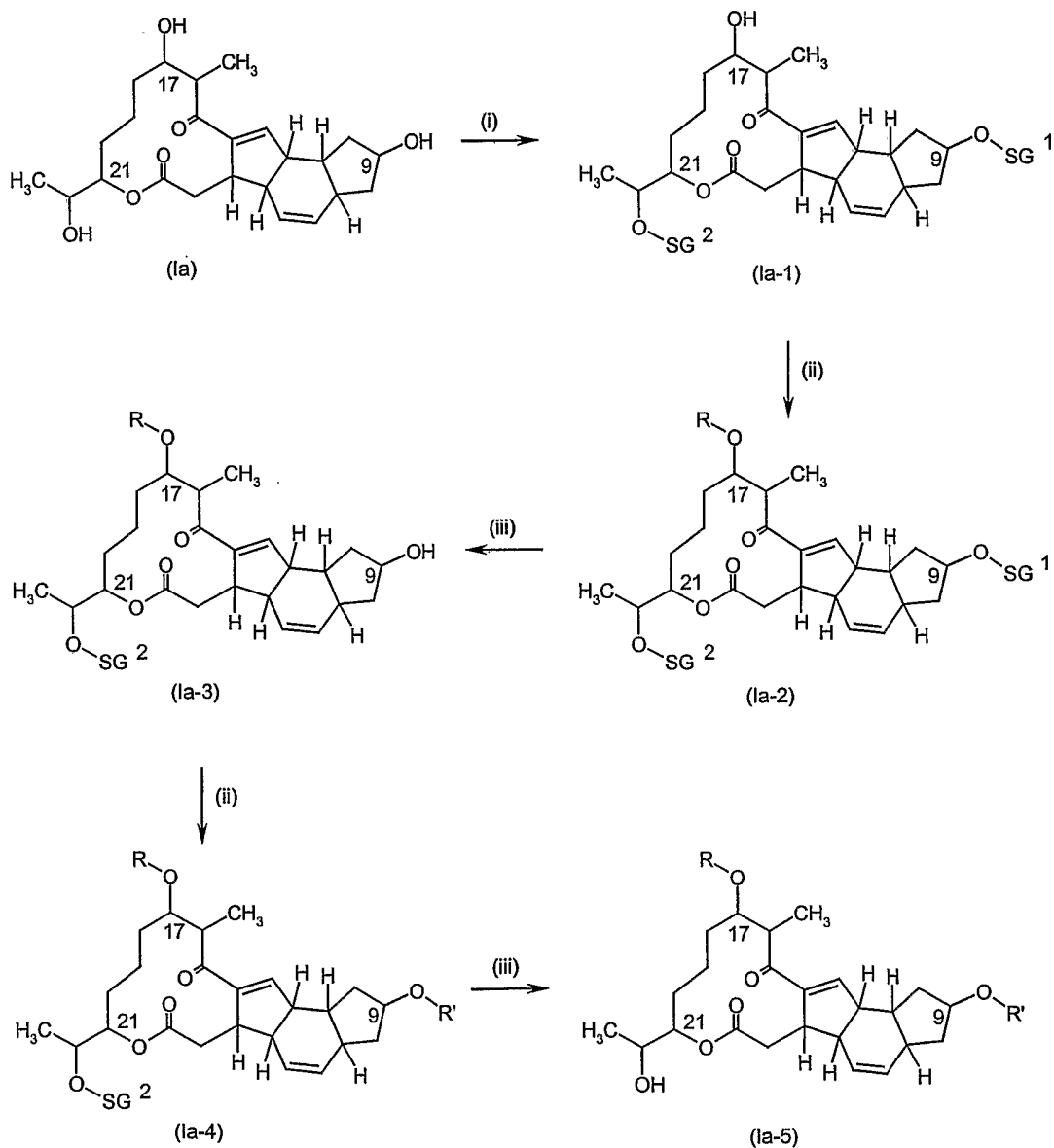
30

2,2,2-trichlorethylether (DATE-OR), 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-phenyliso-propyl-ether (HIP-OR), 2-Trimethylsilylethylether, 2-(Benzylthio)ethylether, 2-(Phenyl-selenyl)-ethylether. Als weitere Schutzgruppen (SG) vom Ether-Typ sind beispielsweise zu nennen: Tetrahydropyranylether (THP-OR), 3-Brom-tetrahydropyranylether (3-BrTHP-OR), Tetrahydrothiopyranylether, 1-Methoxy-cyclohexylether, 2- und 4-Picolylether, 3-Methyl-2-picolyl-N-oxido-ether, 2-Quinolinylmethylether (Qm-OR), 1-Pyrenylmethylether, Dipenylmethylether (DPM-OR), para,para'-Dinitrobenzhydylether (RO-DNB), 5-Dibenzosuberylether, Triphenylmethylether (Tr-OR), α -Naphthylidiphenylmethylether, para-Methoxy-phenyldiphenylmethylether (MMTr-OR), Di(para-methoxy-phenyl)phenylmethylether (DMTr-OR), Tri(para-methoxy-phenyl)methylether (TMTr-OR), 4-(4'-Brom-phenacyloxy) phenyldiphenylmethylether, 4,4',4''-Tris(4,5-dichlorphthalimido-phenyl)methylether (CPTTr-OR), 4,4',4''-Tris(levulinoyloxy-phenyl)methylether (TLTr-OR), 4,4',4''-Tris(benzoyloxyphenyl)methylether (TBTr-OR), 4,4'-Dimethoxy-3''-[N-(imidazolylmethyl)]-tritylether (IDTr-OR), 4,4'-dimethoxy-3''-[N-(imidazolyl-ethyl)carbamoyl]tritylether (IETTr-OR), 1,1-Bis(4-methoxy-phenyl)-1'-pyrenylmethylether (Bmpm-OR), 9-Anthrylether, 9-(9-Phenyl)xanthenylether (pixyl-OR), 9-(9-Phenyl-10-oxo)anthryl (Tritylon-Ether). 4-Methoxy-tetrahydropyranylether (MTHP-OR), 4-Methoxy-tetrahydrothiopyranylether, 4-Methoxy-tetrahydrothio-pyranylether-S,S-dioxid, 1-[(2-Chlor-4-methyl)phenyl]-4-methoxypiperidin-4-yl-ether (CTMP-OR), 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-piperidin-4-yl-ether (Fpmp-OR), 1,4-Dioxan-2-yl-ether, Tetrahydrofuranyl-ether, Tetrahydrothiofuranylether, 2,3,3a,4,5,6, 7,7a-Octahydro-7,8,8-trimethyl-4,7-methanbenzofuran-2-yl-ether (RO-MBF), tert.-Butylether, Allylether, Propargylether, para-Chlophenylether, para-Methoxyphenylether, para-Nitrophenylether, 2,4-Dinitro-phenylether (RO-DNP), 2,3,5,6-Tetrafluor-4-(trifluormethyl)-phenylether, Benzyl-ether (Bn-OR). Als Schutzgruppen vom substituierten Benzylether-Typ sind beispielsweise zu nennen: para-Methoxybenzylether (MPM-OR), 3,4-Dimethoxy-benzylether (DMPM-OR), ortho-Nitrobenzylether, para-Nitrobenzylether, para-Halobenzylether, 2,6-Dichlor-benzylether, para-Cyanobenzylether, para-Phenyl-benzylether, 2,6-Difluorbenzylether, para-Aminoacylbenzylether (PAB-OR), para-Azidobenzylether (Azb-OR), 4-Azido-3-chlorbenzylether, 2-Trifluormethyl-

benzyl-ether, para-(Methylsulfinyl)benzylether (Msib-OR). Als Schutzgruppen (SG) vom Silyl-Ether-Typ sind beispielsweise zu nennen: Trimethylsilylether (TMS-OR), Triethylsilylether (TES-OR), Triisopropylsilylether (TIPS-OR), Dimethylisopropylsilylether (IPDMS-OR), Diethylisopropylsilylether (DEIPS-OR), Dimethylhexylsilyl-ether (TDS-OR), tert.-Butyldimethylsilylether (TBDMS-OR), tert.-Butyldiphenylsilylether (TBDPS-OR), Tribenzylsilylether, Tri-para-xylylsilylether, Triphenylsilylether (TPS-OR), Diphenylmethylsilylether (DPMS-OR), Di-tert.-butylmethylsilylether (DTBMS-OR), Tris(trimethylsilyl)silylether (Sisylether), (2-Hydroxystyryl)-dimethylsilylether (HSDMS-OR), (2-Hydroxystyryl)diisopropylsilylether (HSDIS-OR), tert.-Butylmethoxyphenylsilylether (TBMPS-OR), tert.-Butoxydiphenylsilylether (DPTBOS-OR). Als Schutzgruppen (SG) vom Ester-Typ sind beispielsweise zu nennen: Formiatester, Benzoylformiatester, Acetatester (RO-Ac), Chloracetatester, Dichloracetatester, Trichloracetatester, Trifluoracetatester (RO-TFA), Methoxy-acetatester, Triphenylmethoxyacetatester, Phenoxyacetatester, para-Chlorphenoxy-acetatester, Phenylacetatester, Diphenylacetatester (DPA-OR), Nicotinatester, 3-Phenylpropionatester, 4-Pentenoatester, 4-Oxopentanoatester (Levulinate) (Lev-OR), 4,4-(Ethylendithio)-pentanoatester (RO-LevS), 5-[3-Bis(4-methoxyphenyl)hydroxy-methylphenoxy]-levulinatester, Pivaloatester (Pv-OR), 1-Adamantanoatester, Crotonatester, 4-Methoxy-crotonatester, Benzoatester (Bz-OR), para-Phenyl-benzoatester, 2,4,6-Trimethylbenzoatester (Mesitoate), 4-(Methylthiomethoxy)-butyratester (MTMB-OR), 2-(Methylthiomethoxymethyl)benzoatester (MTMT-OR). Als Schutzgruppen (SG) vom Ester-Typ sind beispielsweise zu nennen: Methylcarbonat, Methoxymethylcarbonat, 9-Fluorenylmethylcarbonat (Fmoc-OR), Ethylcarbonat, 2,2,2-Trichlorethylcarbonat (Troc-OR), 1,1-Dimethyl-2,2,2-trichlor-ethylcarbonat (TCBOC-OR), 2-(Trimethylsilyl)ethylcarbonate (TMSEC-OR), 2-(Phenylsulfonyl)-ethylcarbonate (Psec-OR), 2-(Triphenylphosphonio)-ethylcarbonate (Peoc-OR), tert.-Butylcarbonat (Boc-OR), Isobutylcarbonat, Vinylcarbonat, Allylcarbonat (Alloc-OR), p-Nitrophenylcarbonat, Benzylcarbonat (Z-OR), para-Methoxybenzylcarbonat, 3,4-Dimethoxybenzylcarbonat, ortho-Nitrobenzylcarbonat, para-Nitrobenzylcarbonat, 2-Dansylethylcarbonat (Dnsec-OR), 2-(4-Nitrophenyl)-ethylcarbonat (Npeoc-OR), 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethyl-

carbonat (Dnpeoc-OR). Als Schutzgruppen (SG) vom Sulfonat-Typ sind beispielsweise zu nennen: Allylsulfonat (Als-OR), Methansulfonate (Ms-OR), Benzylsulfonate, Tosylate (Ts-OR), 2-[(4-Nitrophenyl)ethyl]sulfonate (Npes-OR).

- 5 Bei der Herstellung weiterer Spinosyn-Derivate aus den oben genannten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) kann es durchaus vorteilhaft sein, dass zunächst der 1-Hydroxy-ethyl-Rest in C-21-Position und gegebenenfalls die Hydroxylgruppe in C-9-Position (im Falle $R^2 = H$) mit geeigneten, beispielsweise mit einer der oben
- 10 unterschiedlichen Schutzgruppen (SG), blockiert wird. Dabei ist die Verwendung von zwei unterschiedlichen Schutzgruppen (SG^1 bzw. SG^2) empfehlenswert, wobei diese entsprechend kompatibel sein sollten, d. h. sich selektiv und unabhängig von einander abspalten lassen. Anschließend kann eine Derivatisierung, beispielsweise eine Glycosidierung mittels chemischer Synthese oder durch mikrobielle Biokonversion
- 15 (vgl. auch US 5539089; Einführung der Reste R oder R') zu den Spinosyn-Derivaten (Ia-2 oder Ib-2), an der Hydroxylgruppe in der C-17-Position erfolgen (vgl. Schema 2 und 3).

Schema 2 - Schutzgruppenstrategie (D: C-OH)

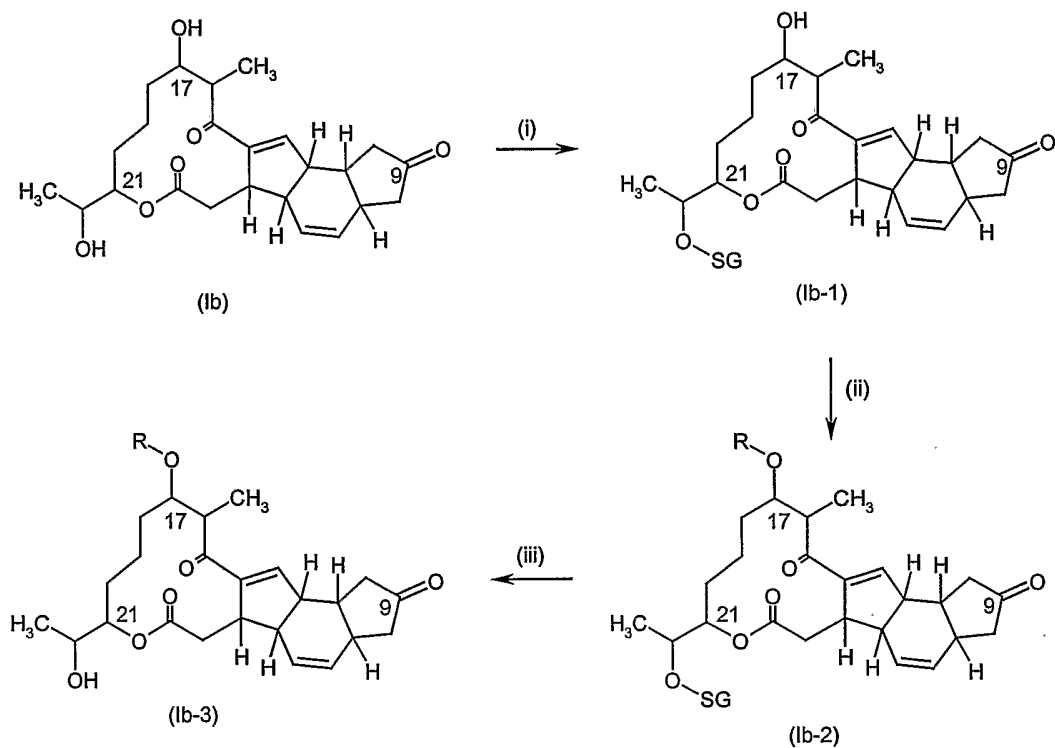
5

10

(i) Einführung - Schutzgruppe (SG¹, SG²)

(ii) Derivatisierung - z. B. Glycosidierung (R bzw. R')

(iii) Deblockierung - Schutzgruppe (SG) / oder selektive Deblockierung - Schutzgruppe (z. B. SG¹)

Schema 3 - Schutzgruppenstrategie (ID: C=O)

- 5 (i) Einführung - Schutzgruppe (SG)
 (ii) Derivatisierung - z. B. Glycosidierung (R)
 (iii) Deblockierung - Schutzgruppe (SG)

10 Nach erfolgreicher Derivatisierung in den Positionen C-9 bzw. C-17 (vgl. Ia-4) oder C-17 (vgl. Ib-2) kann die noch vorhandene Schutzgruppe (SG) abgespalten und das Spinosyn-Derivat der allgemeinen Formel (I) erhalten werden.

Beispiele**Beispiel 1****Verwendete Stämme**

5

Tabelle: Stämme, die zur Biotransformation der Verbindung (IIa) zu dem entsprechenden Derivat mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest in C-21 Position (Verbindung (Ia)) befähigt sind:

Name	Interne Bezeichnung	Hinterlegungs-Nr.
Streptomyces djakartensis	NRRL B-12103	DSM 14327
Streptomyces griseofuscus	DSM 40191	DSM 14330
Streptomyces caelestis	DSM40084	DSM 14328
Streptomyces antibioticus	ATCC 11891	DSM 14329
Streptomyces griseus	DSM 40937	DSM 14331
Streptomyces aureofaciens	DSM 46447	DSM 14332

10

ATCC= American Type Culture Collection, Manassas, VA, U.S.A.

DSM= Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland.

NRRL= Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, IL, U.S.A.

15

Beispiel 2**Biotransformation mit *S. djakartensis* NRRL B-12103**

Beispielhaftes Protokoll der Biotransformation für die Herstellung der Verbindung (Ia) aus der Verbindung (IIa).

20

Zur Herstellung der Produktionskulturen wurden 20 ml R5A-Medium (R5A-Medium pro Liter: 103 g Sucrose; 0,25 g K₂SO₄; 10,12 g MgCl₂; 10 g Glucose; 5 g

- Hefeextrakt; 0,1 g Casamino-säuren, 21 g MOPS-Puffer pH 6,8 (KOH), 2 ml Spurenelementlösung; Spurenelementlösung: (pro Liter) 40 mg ZnCl_2 , 200 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 10 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, 10mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$; (Fernandez et al., 1998, J. Bacteriol. 180: 4929; Hopwood et al., 1985, Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England) in 100ml-Erlenmeyerkolben mit je 50 μl Sporensuspension von *S. djakartensis* NRRL B-12103 inokuliert. Vor dem Beimpfen wurde das Medium bei 121°C und 1,1 bar Überdruck für 20 Minuten sterilisiert. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Nach 24 Stunden sowie nach 72 Stunden Inkubation wurden je 1mg der Verbindung (IIa) (100 μl einer Stammlösung von 10 mg/ml in Methanol) zugegeben. Die Biotransformation wurde nach 120 Stunden abgebrochen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (10 Minuten, 4000 Upm) und der Überstand mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt.

15 **Beispiel 3**

Biotransformationen mit *Streptomyces griseofuscus*

Beispielhaftes Protokoll einer Biotransformation für die Herstellung der Verbindung (Ia) aus der Verbindung (IIa).

20

Zur Herstellung der Produktionskulturen wurde das Verfahren von Beispiel 2 unter Verwendung von 50 μl Sporensuspension des Stammes *Streptomyces griseofuscus* anstelle des Stammes *S. djakartensis* NRRL B-12103 angewendet.

Beispiel 4**Biotransformationen mit *Streptomyces caelestis***

5 Beispielhaftes Protokoll einer Biotransformation für die Herstellung der Verbindung (Ia) aus der Verbindung (IIa).

10 Zur Herstellung der Produktionskulturen wurde das Verfahren von Beispiel 2 unter Verwendung von 50 µl Sporensuspension des Stammes *Streptomyces caelestis* anstelle des Stammes *S. djakartensis* NRRL B-12103 angewendet.

Beispiel 5**Biotransformationen mit *Streptomyces antibioticus***

15 Beispielhaftes Protokoll einer Biotransformation für die Herstellung der Verbindung (Ia) aus der Verbindung (IIa).

20 Zur Herstellung der Produktionskulturen wurde das Verfahren von Beispiel 2 unter Verwendung von 50 µl Sporensuspension des Stammes *Streptomyces antibioticus* anstelle des Stammes *S. djakartensis* NRRL B-12103 angewendet.

Beispiel 6**Biotransformationen mit *Streptomyces griseus***

25 Beispielhaftes Protokoll einer Biotransformation für die Herstellung der Verbindung (Ia) aus der Verbindung (IIa).

30 Zur Herstellung der Produktionskulturen wurde das Verfahren von Beispiel 2 unter Verwendung von 50 µl Sporensuspension des Stammes *Streptomyces griseus* anstelle des Stammes *S. djakartensis* NRRL B-12103 angewendet.

Beispiel 7**Biotransformationen mit *Streptomyces aureofaciens***

5 Beispielhaftes Protokoll einer Biotransformation für die Herstellung der Verbindung (Ia) aus der Verbindung (IIa).

Zur Herstellung der Produktionskulturen wurde das Verfahren von Beispiel 2 unter Verwendung von 50 µl Sporensuspension des Stammes *Streptomyces aureofaciens* anstelle des Stammes *S. djakartensis* NRRL B-12103 angewendet.

10

Beispiel 8**Biotransformationen mit *Streptomyces djakartensis***

15 Beispielhaftes Protokoll einer Biotransformation für die Herstellung von Spinosyn A mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest in C-21-Position [Verbindung der allgemeinen Formel (I), worin R¹ für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, A-B für die Gruppe -HC=CH- und D für die Gruppe -CO-R² steht, worin R² für einen Zucker der Formel 2a steht].

20 Zur Herstellung der Produktionskulturen wurden 20 ml R5A-Medium (R5A-Medium: siehe Beispiel 2) in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit je 50 µl Sporensuspension von *S. djakartensis* NRRL B-12103 inokuliert. Vor dem Beimpfen wurde das Medium bei 121°C und 1,1 bar Überdruck für 20 Minuten sterilisiert. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation

25 wurden 2mg Spinosyn A (100 µl einer Stammlösung von 10 mg/ml in Methanol) zugegeben. Die Biotransformation wurde nach 96 Stunden abgebrochen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (10 Minuten, 4000 Upm) und der Überstand mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt.

Beispiel 9**Biotransformationen mit *Streptomyces djakartensis***

- Beispielhaftes Protokoll einer Biotransformation für die Herstellung von 17-Pseudo-spinosyn-Aglykon A mit einem 1-Hydroxy-ethyl-Rest in C-21-Position [Verbindung der allgemeinen Formel (I), worin R^1 für Wasserstoff steht, A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- und D für die Gruppe -CO-R² steht, worin R² für einen Zucker der Formel 2a steht].
- Zur Herstellung der Produktionskulturen wurden 20ml R5A-Medium (R5A-Medium: siehe Beispiel 2) in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit je 50 µl Sporensuspension von *S. djakartensis* NRRL B-12103 inokuliert. Vor dem Beimpfen wurde das Medium bei 121°C und 1,1 bar Überdruck für 20 Minuten sterilisiert. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden 2mg 17-Pseudo-spinosyn Aglykon A oder D (100 µl einer Stammlösung von 10mg/ml in Methanol) zugegeben. Die Biotransformation wurde nach 96 Stunden abgebrochen. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (10 Minuten, 4000 Upm) und der Überstand mit dem gleichen Volumen Methanol versetzt.

Beispiel 10**Isolierung der Verbindung (Ia) aus der Biotransformation mit *S. djakartensis* NRRL B-12103**

- Beispielhaftes Protokoll für die Aufarbeitung des Kulturüberstände und Anreicherung der Verbindung (Ia).

- 35 ml des mit Methanol versetzten Kulturüberstandes aus Beispiel 2 wurden auf etwa 20ml eingengt und mit 10 ml Wasser versetzt. Es wurde zweimal mit je 10 ml Essigsäureethylester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen zur Trockenen eingengt und der Rückstand in 400 µl Methanol aufgenommen. Ein Aliquot dieser Lösung wurde per HPLC/MS (Beispiel 11) analysiert.

Beispiel 11**Analytische HPLC/UV/MS**

- 5 Beispielhaftes Protokoll für die Analyse der aufgearbeiteten Kulturüberstände mittels HPLC/UV/MS

Ein Aliquot des aufgearbeiteten Kulturüberstands der Biotransformation mit *S. djakartensis* (Beispiel 2) wurden an einer Reversed-Phase-HPLC-Säule (2,1 x
10 250 mm) mit einem Gradienten aus Wasser, versetzt mit Ammoniumacetat (25 mmol/l), und Methanol, versetzt mit Ammoniumacetat (25mmol/l), mit einer Fließrate von 250 µl/Minute chromatographiert. Detektion erfolgt mit UV (245 nm) und Elektrospray (Positiv) Massenspektrometrie an einem Quadrupol-Massenspektrometer.

- 15 Verbindung (Ia) hat ein Molekulargewicht von 418 Dalton und wird unter diesen Bedingungen als $[M+NH_4]^+$ Ion bei $m/z = 436$ detektiert. Die Retentionszeit ist mit ca. 32,5 Minuten kürzer als die der Verbindung (IIa) mit ca. 37,5 Minuten.

20 **Beispiel 12**

Extraktion und präparative Reindarstellung der Verbindung (Ia) aus Schüttelkulturen der Biotransformation mit *S. djakartensis* NRRL B-12103

- Fünfzehn 20ml-Kulturen des Stammes (*S. djakartensis*) in 100 ml Erlenmeyerkolben
25 wurden nach dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren angezogen und die Kulturüberstände zur Aufarbeitung von Verbindung (Ia) vereinigt. Die Aufarbeitung der vereinigten Kulturüberstände erfolgte analog Beispiel 11. Der Rückstand wurde in etwa 3 ml Methanol aufgenommen. Die Isolierung der Verbindung (Ia) erfolgte über Chromatographie an einer analytischen Reversed-Phase-HPLC-Säule (4,6 x
30 250 mm) mit einem Gradienten von 25 mmol/l Ammoniumacetat in Wasser und 25mmol/l Ammoniumacetat in Methanol. Pro Lauf wurde ein Aliquot von 100 µl

injiziert. UV-Detektion erfolgte bei 245 nm. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt, vereinigt und zur Trockenen eingedampft. Die Ausbeute betrug etwa 1mg.

Beispiel 13

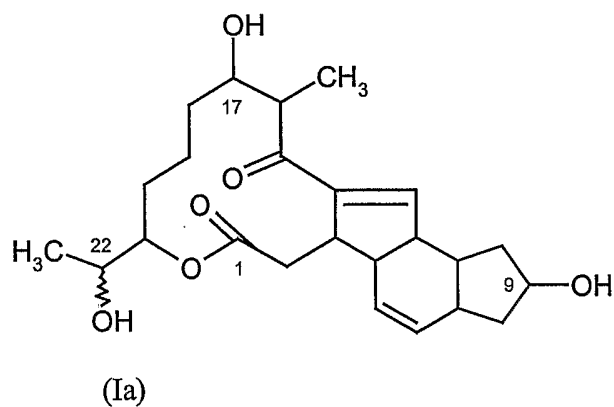
5 Strukturaufklärung der Verbindung (Ia)

Die präparativ isolierte Verbindung (Ia) wurde in CD₃OD aufgenommen und mit Kernresonanzspektroskopie (NMR) untersucht. Es wurden ein ¹H-NMR-, COSY-, TOCSY-, HSQC- und HMBC-Spektrum aufgenommen. Die Ergebnisse sind in der
 10 folgenden Tabelle zusammengefasst.

NMR-Daten von Verbindung (Ia) in CD₃OD (500 MHz)

Position	δ _C [ppm]	δ _H [ppm]	Mult.	J [Hz]	Int.
1	174	-		-	-
2	35	2.48	dd	14/3	1H
		3.12	dd	14/5	1H
3	49	2.93	ddd	10/5/2	1H
4	43	3.49	m		1H
5	129	5.84	ddd	10/3/3	1H
6	131	5.91	d br.	10	1H
7	42	2.23	m		1H
8	41	1.46	m		1H
		1.83	dd	13/7	1H
9	73	4.34	m		1H
10	40	1.24	m		1H
		2.34	m		1H
11	47	0.94	m		1H
12	51	2.85	m		1H
13	150	7.00	s br.		1H

Position	δ_C [ppm]	δ_H [ppm]	Mult.	J [Hz]	Int.
14	146	-			-
15	206	-			-
16	50	3.22	m		1H
17	73	3.49	m		1H
18	36	1.43	m		1H
		1.48	m		1H
19	23	1.28	m		1H
		1.71	m		1H
20	27	1.48	m		1H
		1.63	m		1H
21	79	4.70	ddd	10/5/2	1H
22	70	3.65	m		1H
23	18	1.04	d	7	3H
24	16	1.15	d	7	3H



5 Beispiele 14

Analytischer Nachweis des gebildeten hydroxylierten Spinosyn A

20ml des mit Methanol versetzten Kulturüberstandes der Biotransformation aus Beispiel 8 wurden mit 0,01 N NaOH-Lösung auf pH 5 eingestellt und auf ca. 5ml

wässrigen Rückstand eingeeengt. Dieser wurde zweimal mit je 5ml Essigsäure-ethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden im N₂-Strom zur Trockene eingeeengt und mit 200µl Methanol aufgenommen. Ein Aliquot dieses Extraktes wurde mittels LC/MS und LC/MS/MS an einem Tandem-Massenspektrometer mit Elektrospray Positiv-Ionisation untersucht.

Im LC/MS-Chromatogramm des Extraktes erscheint ein Peak bei 40,0 Minuten mit $[M+H]^+$ $m/z = 748,5$ in geringer Konzentration. Das Tochterionenspektrum dieses Ions weist ein Fragment mit $m/z = 142$ auf, das charakteristisch für die Abspaltung einer Forosamin-Einheit ist.

Beispiele 15

Analytischer Nachweis des gebildeten hydroxylierten 17-Pseudo-spinosyn-Aglykon

20ml des mit Methanol versetzten Kulturüberstandes der Biotransformation aus Beispiel 9 wurden mit 0,01 N NaOH-Lösung auf pH 5 eingestellt und auf ca. 5ml wässrigen Rückstand eingeeengt. Dieser wurde zweimal mit je 5ml Essigsäure-ethylester extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden im N₂-Strom zur Trockene eingeeengt und mit 200µl Methanol aufgenommen. Ein Aliquot dieses Extraktes wurde mittels LC/MS und LC/MS/MS an einem Tandem-Massenspektrometer mit Elektrospray Positiv-Ionisation untersucht.

Im LC/MS-Chromatogramm des Extraktes erscheint bei 38,8 Minuten ein Peaks mit $[M+NH_4]^+$ $m/z = 624,4$ in geringer Konzentration. Dies entspricht einem hydroxylierten Produkt aus 17-Pseudo-spinosyn A-Aglykon. Das Tochterionenspektrum dieses Ions weist ein Fragment mit $m/z = 189$ auf, das charakteristisch für die Abspaltung einer Trimethylrhamnose-Einheit ist.

Beispiel 16**Charakterisierung der verwendeten Stämme****a) *Streptomyces djakartensis* NRRL B-12103:**

5 Dieser Stamm wurde als Niddamycin-Produzent von der Agricultural
Research Service Culture Collection (1815 N. University Street, Illinois
61604, U.S.A.) unter der Zugangsnummer NRRL B-12103 bezogen. Die
Stammbeschreibung kann der US 3646194 entnommen werden. Die Kultur
10 wurde nochmals am 06.06.2001 unter der Hinterlegungsnummer DSM 14327
bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
(DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, in
Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages
hinterlegt.

b) *Streptomyces griseofuscus* DSM 40191:

15 Dieser Stamm wurde als Bundlin A, B, Moldicidin A und Pentamycin-
Produzent von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zell-
kulturen (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland) unter
der Zugangsnummer 40191 bezogen. Die Kultur wurde nochmals am
20 06.06.2001 unter der Hinterlegungsnummer DSM 14330 bei der Deutschen
Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ),
Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, in Überein-
stimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt.

c) *Streptomyces caelestis* DSM 40084:

25 Dieser Stamm wurde als Caelestitin-Produzent von der Deutschen
Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Mascheroder Weg 1b,
D-38124 Braunschweig, Deutschland) unter der Zugangsnummer 40084
bezogen. Die Kultur wurde nochmals am 06.06.2001 unter der Hinter-
30 legungsnummer 14328 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen
und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124

Braunschweig, Deutschland, in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt.

d) Streptomyces antibioticus ATCC 11891:

5 Dieser Stamm wurde als Caelestin-Produzent von der American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA) unter der Zugangsnummer ATCC 11891 bezogen. Die Kultur wurde nochmals am 06.06.2001 unter der Hinterlegungsnummer DSM 14329 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, in
10 Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt.

e) Streptomyces griseus DSM 40937:

15 Dieser Stamm wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland) unter der Zugangsnummer 40937 bezogen. Die Kultur wurde nochmals am 06.06.2001 unter der Hinterlegungsnummer DSM 14331 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland, in
20 Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt.

f) Streptomyces aureofaciens DSM 46447:

25 Dieser Stamm wurde als Tetracyclin-Produzent von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland) unter der Zugangsnummer 40084 bezogen. Die Kultur wurde nochmals am 06.06.2001 unter der Hinterlegungsnummer DSM 14332 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland,
30

in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des Budapester Vertrages hinterlegt.

Beispiel 17

5 Herstellung der Ausgangsverbindungen

Spinosyn A-Aglykon (IIa)

10 Das Spinosyn A-Aglykon (IIa) [Verbindung der allgemeinen Formel (II), worin R¹ für Wasserstoff, A-B für die Gruppe -HC=CH- und D für die Gruppe C-OH steht] wurde wie in WO 01/16303 beschrieben aus Tracer[®] hergestellt.

9-Keto-spinosyn A-Aglykon (IIb)

15 Das 9-Keto-spinosyn A-Aglykon (IIb) [Verbindung der allgemeinen Formel (II), worin R¹ für Wasserstoff, A-B für die Gruppe -HC=CH- und D für die Gruppe C=O steht] wurde mittels Pyridiniumdichromat-Oxidation aus der Verbindung (IIa) hergestellt:

20 46,55 g (115,6mmol) des Spinosyn A-Aglykons (IIa) wurden unter Inertgas in 1100ml abs. Dichlormethan gelöst und mit 43,51 g (115,6mmol) Pyridiniumdichromat versetzt. Nach 4 Stunden Rühren bei 25°C und Zugabe von 900 ml Diethylether wurden die ausgefallenen Chromsalze abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Säulenchromatographie an Kieselgel (Eluent: Cyclohexan/
25 Essigsäureethylester 1:1, dann 100 % Essigsäureethylester) lieferte 3,68g 9,17-Diketospinosyn-Aglykon und 23,40g einer ca. 9:1-Mischung des Spinosyn A-Aglykons (IIa) und 17-Keto-spinosyn-Aglykon (IIb) neben 11,74 g zurückgewonnenem Spinosyn A-Aglykon (IIa). Durch Umkristallisation der Mischung in Cyclohexan/Essigsäureethylester wird das 9-Keto-spinosyn A-Aglykon (IIb) auf
30 > 98 % angereichert. Man erhält 20,78g 9-Keto-spinosyn A-Aglykon (IIb) als farblose Kristalle.

DC: R_f (SiO₂, Essigsäureethylester) = 0,44 – ¹H-NMR: CDCl₃, δ = 6,77 (s, 13-H); 5,97 (d, 6-H); 5,88 (m, 5-H); 4,72 (m, 21-H); 3,69 (m, 17-H) u. a. – LC/ESI-MS: m/z = 401 (25 %) [M]⁺, 289 (100 %).

5

Diketospinosyn-Aglykon: DC: R_f (SiO₂, Essigsäureethylester) = 0,64. – ¹H-NMR: CDCl₃, δ = 6,92 (s, 13-H); 5,97 (d, 6-H); 5,87 (m, 5-H); 4,85 (m, 21-H); 4,25 (q, 16-H) u. a. – LC/ESI-MS: m/z = 399 (100 %) [M+H]⁺.

10 Spinosyn A

Zur Darstellung von Spinosyn A wurde zunächst wie in WO 01/16303 beschrieben verfahren. Das dabei anfallende Spinosyn A/D-Gemisch wurde durch Chromatographie an einer präparativen Reversed-Phase-Säule (250 x 8 mm) aufgetrennt. Als Eluenten wurden Wasser mit 25mmol/L Ammoniumacetat (A) und Methanol mit 25mmol/L Ammoniumacetat (B) verwendet. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 60 % B auf 100 % B in 35 Minuten. Die Fließrate lag bei 3 ml/Minute. Die getrennten Substanzen wurden mit einem UV-Detektor bei 242 nm detektiert und automatisch fraktioniert. Spinosyn A eluierte bei ca. 31 Minuten und Spinosyn D bei ca. 33 Minuten. Die vereinigten Fraktionen von Spinosyn A aus mehreren Injektionen wurden an einem Rotationsverdampfer im Vakuum bis auf den wässrigen Rest eingedampft. Diese wässrige Lösung wurde einer Gefriertrocknung unterzogen und Spinosyn A als weißer Feststoff erhalten.

20 17-Pseudo-spinosyn A/D-Aglykon

Das 17-Pseudo-spinosyn A/D-Aglykon wurde wie in WO 01/16303 beschrieben, hergestellt.

INTERNATIONALES FORMBLATT

BAYER AG
PH-R LSC-NP
Pharma Research Center
PO Box 10 17 09
42096 Wuppertal

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS

Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:

NRRL B-12103

Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE
zugeteilte EINGANGSNUMMER:

DSM 14327

II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG

Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde

- () eine wissenschaftliche Beschreibung
(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung

eingereicht.
(Zutreffendes ankreuzen).

III. EINGANG UND ANNAHME

Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-05-31 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.

IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG

Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).

V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE

Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

Anschrift: Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig

Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle
befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:

V. Weis

Datum: 2001-06-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

BAYER AG
PH-R LSC-NP
Pharma Research Center
PO Box 10 17 09
42096 Wuppertal

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS

Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen:

DSM 40084

Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE
zugeteilte EINGANGSNUMMER:

DSM 14328

II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG

Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde

- () eine wissenschaftliche Beschreibung
(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung

eingereicht.
(Zutreffendes ankreuzen).

III. EINGANG UND ANNAHME

Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-05-31 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.

IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG

Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).

V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE

Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

Anschrift: Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig

Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle
befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:

U. Weibo

Datum: 2001-06-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

45
BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

BAYER AG
PH-R LSC-NP
Pharma Research Center
PO Box 10 17 09
42096 Wuppertal

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: ATCC 11891	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14329
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde () eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-05-31 (Datum der Ersthinterlegung)¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-06-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

BAYER AG
PH-R LSC-NP
Pharma Research Center
PO Box 10 17 09
42096 Wuppertal

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSM 40191	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14330
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde () eine wissenschaftliche Beschreibung (X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-05-31 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-06-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

BAYER AG
PH-R LSC-NP
Pharma Research Center
PO Box 10 17 09
42096 Wuppertal

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSM 40937	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14331
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde ☐ eine wissenschaftliche Beschreibung ☒ eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-05-31 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-06-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

BUDAPESTER VERTRAG ~~48~~ ⁴⁹ ÜBER DIE INTERNATIONALE
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

INTERNATIONALES FORMBLATT

BAYER AG
PH-R LSC-NP
Pharma Research Center
PO Box 10 17 09
42096 Wuppertal

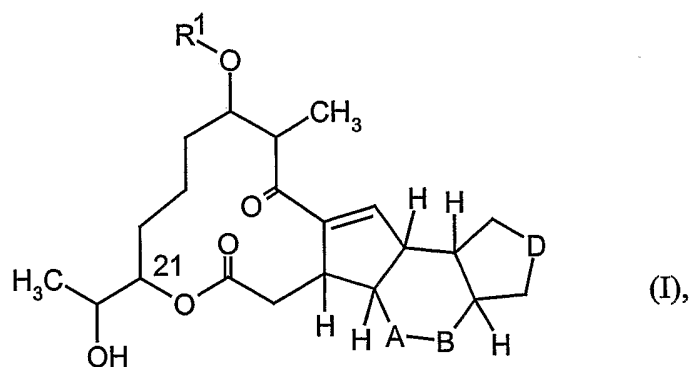
EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: DSM 46497	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 14332
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde ☐ eine wissenschaftliche Beschreibung ☒ eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-05-31 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-06-06

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

Patentansprüche:

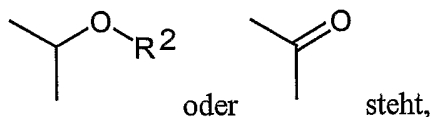
1. Verfahren zum Herstellen von Verbindungen der allgemeinen Formel (I),



in welcher

A-B für eine der folgenden Gruppen steht: -HC=CH- , $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$,
 $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$ oder $\text{-H}_2\text{C-CH(CH}_3\text{)-}$,

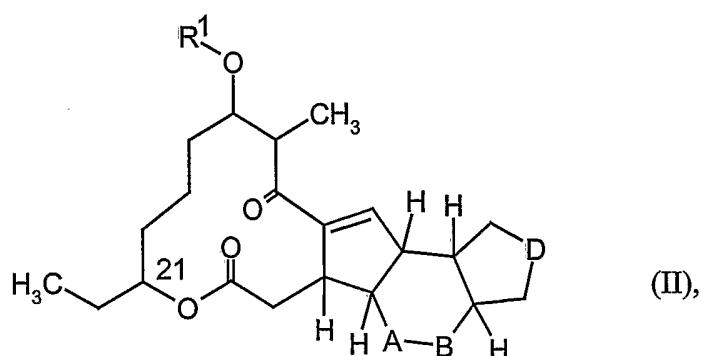
D für die Gruppe



R^1 für Wasserstoff oder einen Amino-Zucker steht, und

R^2 für Wasserstoff oder einen Zucker steht,

dadurch gekennzeichnet, dass man Verbindungen der allgemeinen Formel
 (II),



in welcher

A-B, D und R^1 die oben genannten Bedeutungen haben,

5

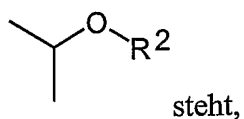
mit einem Mikroorganismus in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben Bedingungen oder mit einem daraus hergestellten Enzymextrakt oder mit einem oder mehreren daraus isolierten Enzymen in Kontakt bringt.

- 10 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Verbindungen der allgemeinen Formel (II) eingesetzt werden,

in welcher in dem Fall (1), dass

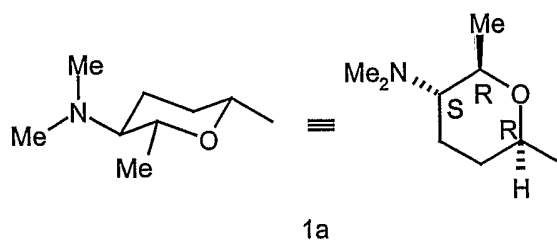
- 15 A-B für eine der folgenden Gruppen steht: $-HC=CH-$, $-HC=C(CH_3)-$, $-H_2C-CH_2-$ oder $-H_2C-CH(CH_3)-$, und

D für die Gruppe



20

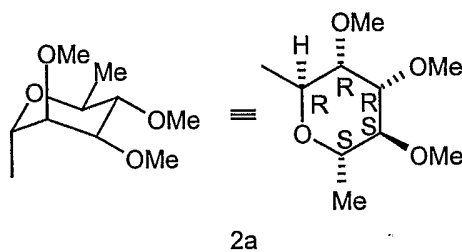
R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht,



und

R^2 für einen Zucker der Formel 2a steht,

5



oder in welcher in dem Fall (2), dass

10

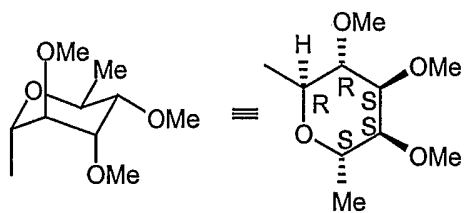
A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-H_2C-CH_2-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

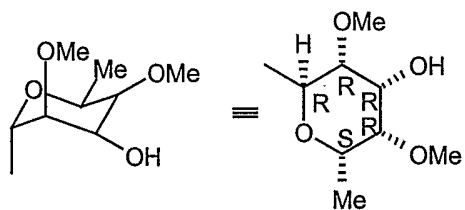
R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

15

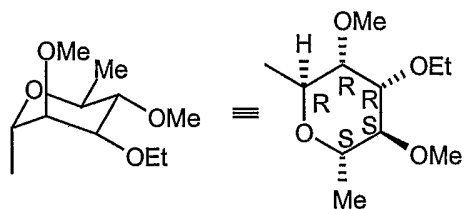
R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2b, 2c, 2d, 2e oder 2f steht,



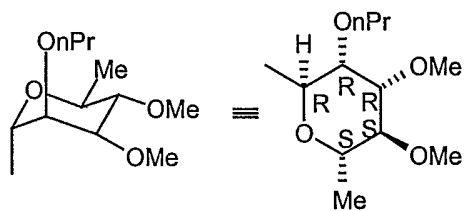
2b



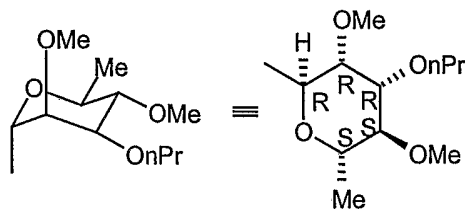
2c



2d



2e



2f

5

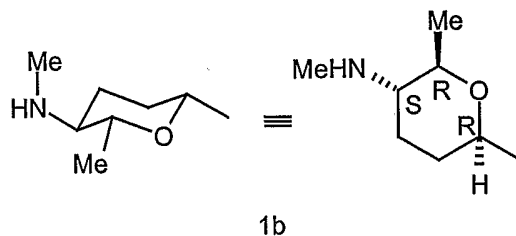
oder in welcher in dem Fall (3), dass

A-B für eine der folgenden Gruppen steht: -HC=CH- , $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$ oder $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$, und

10

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für Wasserstoff oder für einen Amino-Zucker der Formel 1b steht,



5 und

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der oben genannten Formel 2a steht,

10 oder in welcher in dem Fall (4), dass

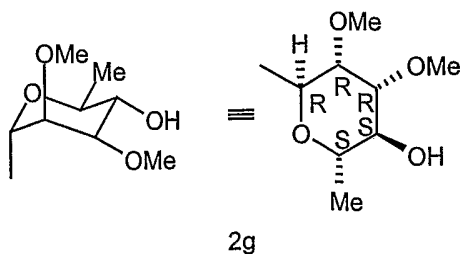
A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-HC=C(CH_3)-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

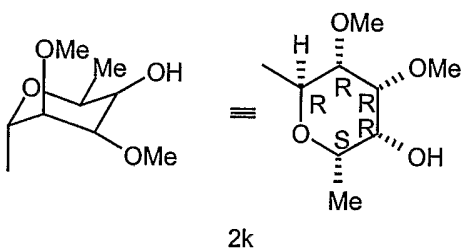
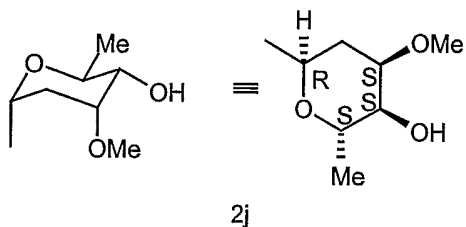
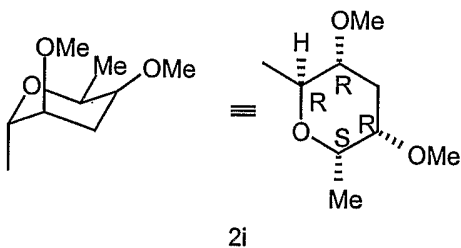
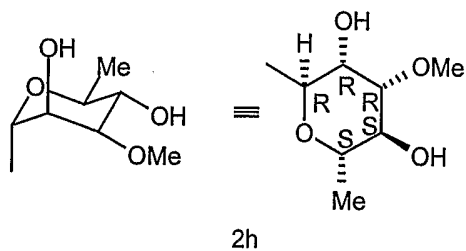
15

R^1 für einen Aminosucker der oben genannten Formel 1a steht, und

R^2 für einen Zucker der Formel 2g, 2h, 2i, 2j oder 2k steht,



20



5

oder in welcher in dem Fall (5), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$ steht, und

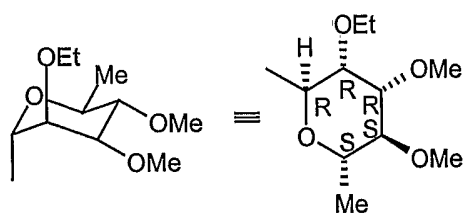
10

D die oben genannte Bedeutung hat,

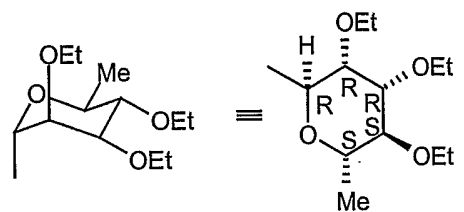
R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

15

R^2 für einen Zucker der Formel 2l oder 2m steht,



2l



2m

oder in welcher in dem Fall (6), dass

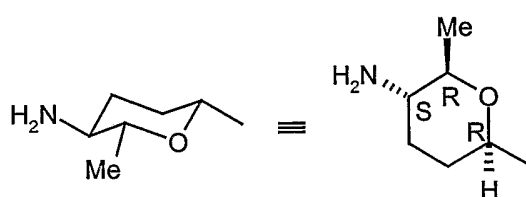
5

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

10

R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1b oder für einen Aminozucker der Formel 1c steht,

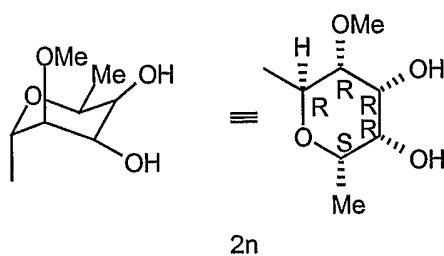


1c

15

und

R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2b, 2c, 2g oder 2h, oder für einen Zucker der Formel 2n steht,



oder in welcher in dem Fall (7), dass

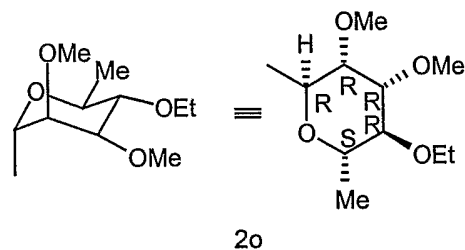
5 A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R¹ für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

10

R² für einen Zucker der Formel 2o steht,



15 oder in welcher in dem Fall (8), dass

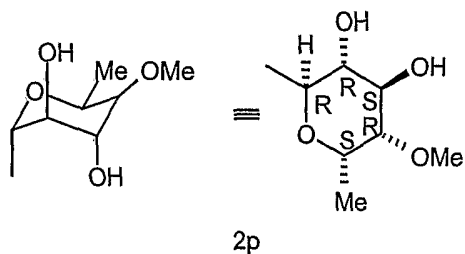
A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

20

R¹ für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1b steht, und

R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2d, 2i oder 2j,
oder für einen Zucker der Formel 2p steht,



5

oder in welcher in dem Fall (9), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

10

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten
Formel 1c steht, und

15

R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2i oder 2p steht,

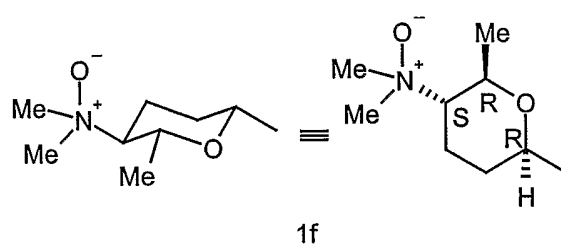
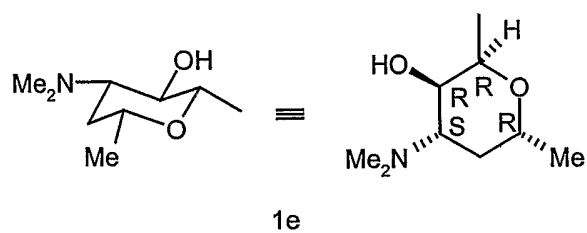
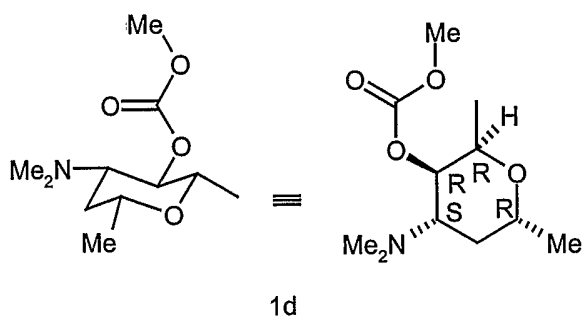
oder in welcher in dem Fall (10), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

20

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der Formel 1d, 1e oder 1f steht,



5

und

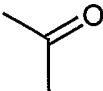
R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2a steht,

10

oder in welcher in dem Fall (11), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

15

D für die Gruppe  steht,

R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht.

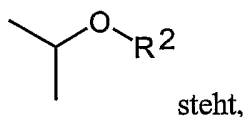
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass Verbindungen der allgemeinen Formel (II) eingesetzt werden,

in welcher in dem Fall (12), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-HC=C(CH_3)-$ steht, und

10

D für die Gruppe



R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

15

R^2 für einen Zucker der Formel 2a, 2g oder 2h steht,

oder in welcher in dem Fall (13), dass

20

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der Formel 1a steht, und

25

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2d, 2e, 2l, 2m oder 2o steht,

oder in welcher in dem Fall (14), dass

30

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

5 R¹ für Wasserstoff oder für einen Amino-Zucker der Formel 1b steht, und

R² für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2a steht,

oder in welcher A-B, D und R¹ wie im Fall (11) definiert sind.

10

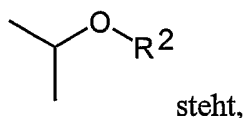
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass Verbindungen der allgemeinen Formel (II) eingesetzt werden,

in welcher in dem Fall (15), dass

15

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

D für die Gruppe



20

R¹ für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

R² für einen Zucker der Formel 2a steht,

25

oder in welcher in dem Fall (16), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

30

R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2d, 2l oder 2m steht,

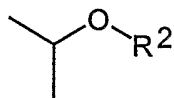
5 oder in welcher A-B, D und R^1 wie im Fall (11) definiert sind.

5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass Verbindungen der allgemeinen Formel (II) eingesetzt werden,

10 in welcher in dem Fall (17), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

D für die Gruppe



15 steht,

R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

R^2 für einen Zucker der Formel 2a steht,

20

oder in welcher in dem Fall (18), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

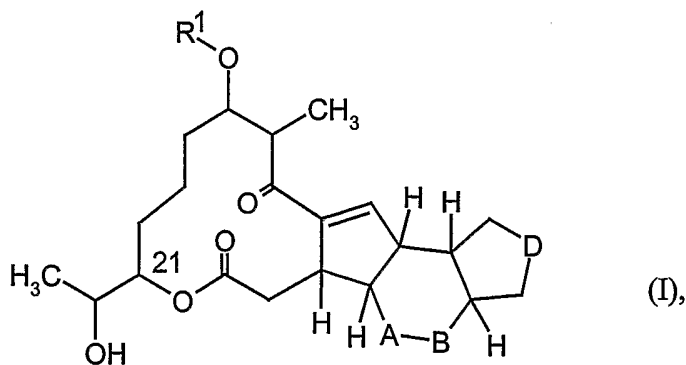
25 D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für Wasserstoff steht, und

R^2 für Wasserstoff steht.

30

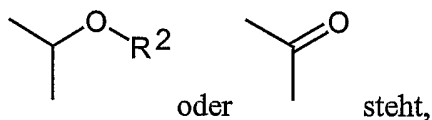
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus einen Mikroorganismus aus der Gruppe der Actinomyceten einsetzt.
- 5 7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus aus der Gruppe der Actinomyceten einen Mikroorganismus aus der Gattung Streptomyces einsetzt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Mikroorganismus aus der Gattung Streptomyces einen Stamm aus der Art Streptomyces djakartensis, Streptomyces griseofuscus, Streptomyces caelestis, Streptomyces antibioticus, Streptomyces griseus oder Streptomyces aureofaciens einsetzt.
- 10 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Stamm die kennzeichnenden Merkmale der Stämme Streptomyces djakartensis DSM 14327, Streptomyces griseofuscus DSM 14330, Streptomyces caelestis DSM 14328, Streptomyces antibioticus DSM 14329, Streptomyces griseus DSM 14331 oder Streptomyces aureofaciens DSM 14332 aufweist.
- 15 10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) isoliert.
- 20 11. Verbindungen der allgemeinen Formel (I),



in welcher

5 A-B für eine der folgenden Gruppen steht: -HC=CH- , $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$,
 $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$ oder $\text{-H}_2\text{C-CH(CH}_3\text{)-}$,

D für die Gruppe



10 R^1 für einen Amino-Zucker steht, und

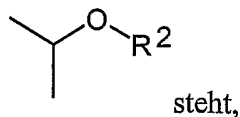
R^2 für einen Zucker steht.

12. Verbindungen gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass
15 in dem Fall (1), dass

A-B für eine der folgenden Gruppen steht: -HC=CH- , $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$,
 $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$ oder $\text{-H}_2\text{C-CH(CH}_3\text{)-}$, und

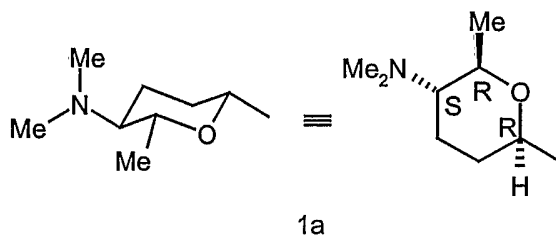
20

D für die Gruppe



R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht,

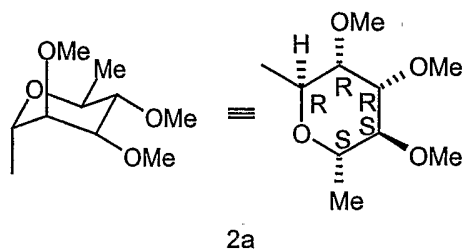
25



und

R^2 für einen Zucker der Formel 2a steht,

5



oder in dem Fall (2), dass

10

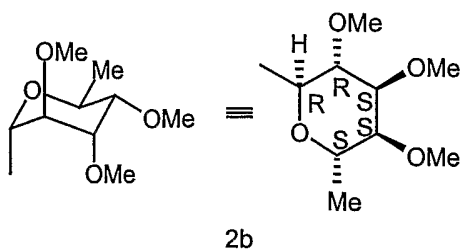
A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-H_2C-CH_2-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

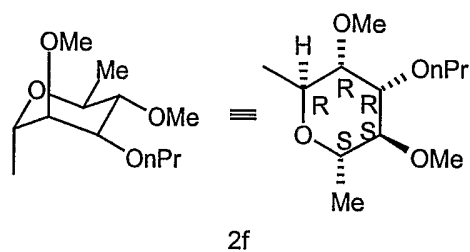
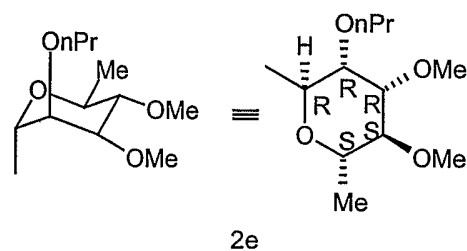
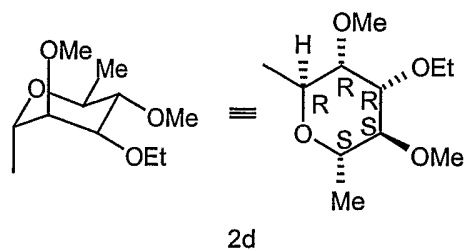
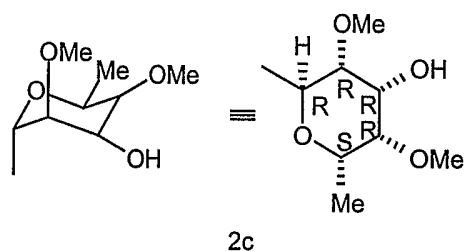
R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

15

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2b, 2c, 2d, 2e oder 2f steht,



20

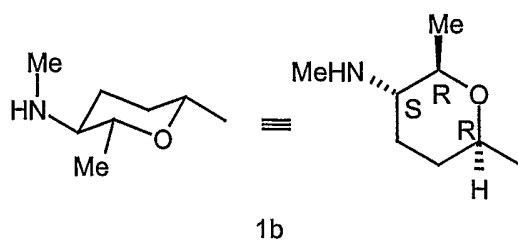


oder in dem Fall (3), dass

A-B für eine der folgenden Gruppen steht: -HC=CH- , $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$ oder $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für Wasserstoff oder für einen Amino-Zucker der Formel 1b steht,



und

5 R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der oben genannten Formel 2a steht,

oder in dem Fall (4), dass

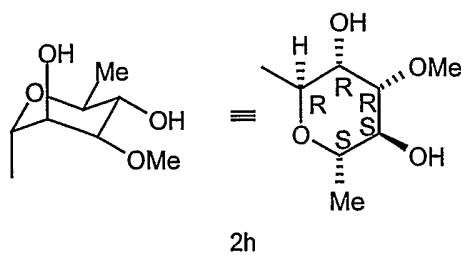
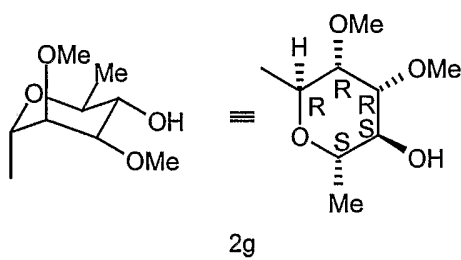
10 $A-B$ für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-HC=C(CH_3)-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

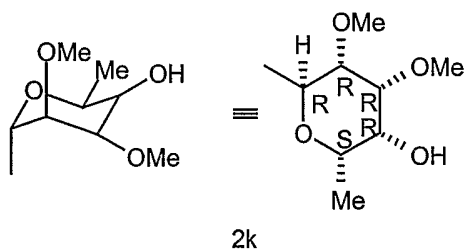
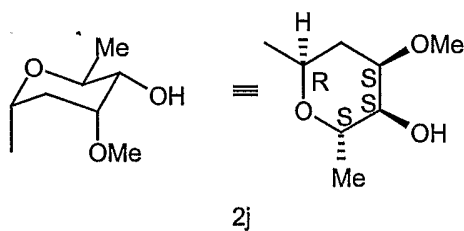
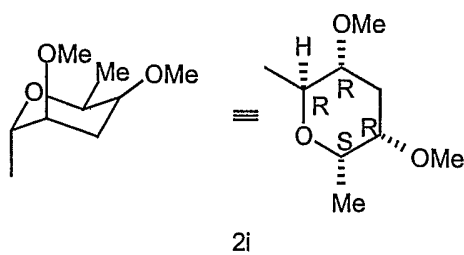
R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

15

R^2 für einen Zucker der Formel 2g, 2h, 2i, 2j oder 2k steht,



20



oder in dem Fall (5), dass

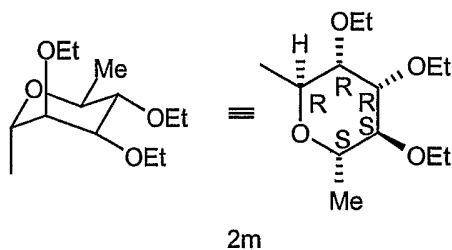
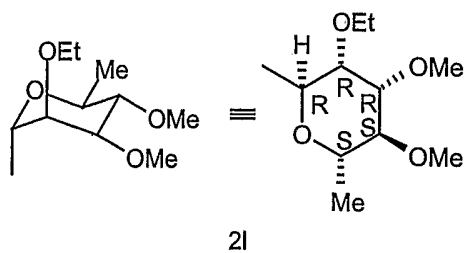
10 A-B für die Gruppe -HC=CH- oder $\text{-H}_2\text{C-CH}_2\text{-}$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

15

R^2 für einen Zucker der Formel 2l oder 2m steht,



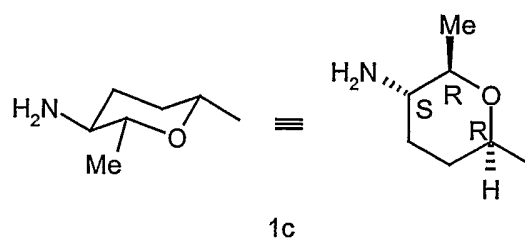
5 oder in dem Fall (6), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder $\text{-HC=C(CH}_3\text{)-}$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

10

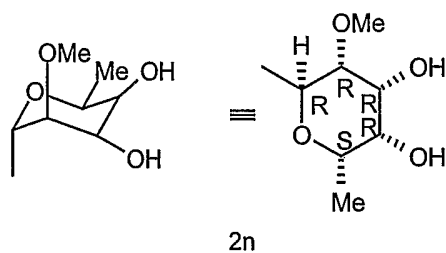
R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1b oder für einen Aminozucker der Formel 1c steht,



15

und

R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2b, 2c, 2g oder 2h, oder für einen Zucker der Formel 2n steht,



oder in dem Fall (7), dass

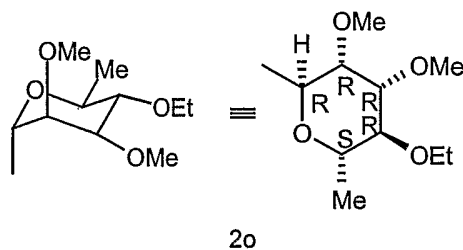
5 A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R¹ für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht, und

10

R² für einen Zucker der Formel 2o steht,



15 oder in dem Fall (8), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

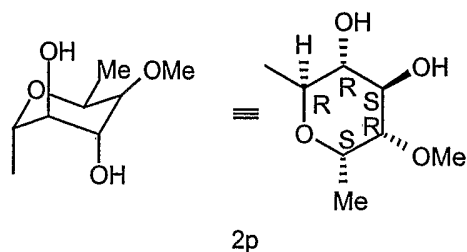
D die oben genannte Bedeutung hat,

20

R¹ für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1b steht, und

R² für einen Zucker der oben genannten Formel 2d, 2i oder 2j,

oder für einen Zucker der Formel 2p steht,



5 oder in dem Fall (9), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

10

R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1c steht, und

R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2i oder 2p steht,

15

oder in dem Fall (10), dass

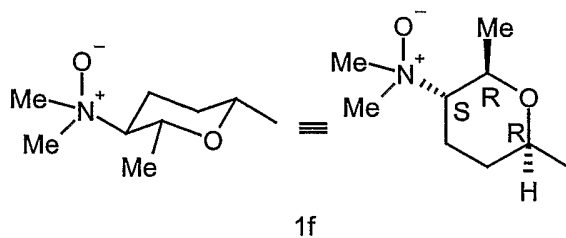
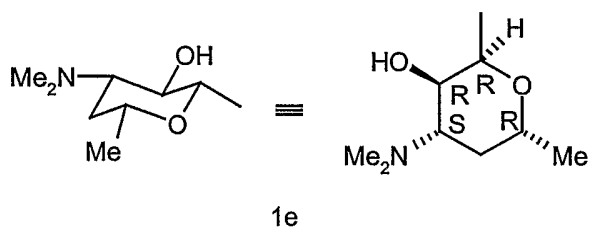
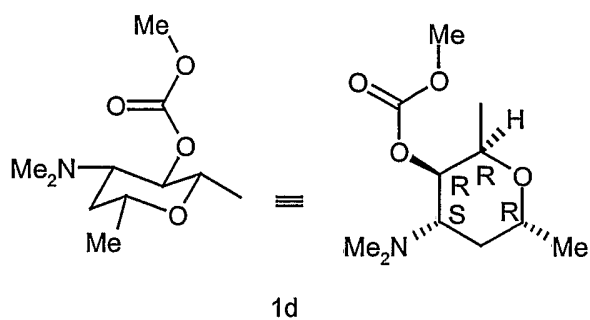
A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

20

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1d, 1e oder für einen Aminozucker der Formel 1f steht,

71.



5

und

R^2 für einen Zucker der oben genannten Formel 2a steht,

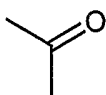
10

oder in dem Fall (11), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

15

D für die Gruppe



steht,

R^1 für Wasserstoff oder für einen Aminozucker der oben genannten Formel 1a steht.

13. Verbindungen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass

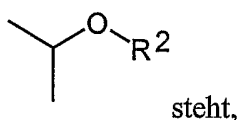
5

in dem Fall (12), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-HC=C(CH_3)-$ steht, und

10

D für die Gruppe



R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

15

R^2 für einen Zucker der Formel 2a, 2g oder 2h steht,

oder in dem Fall (13), dass

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ steht, und

20

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Aminozucker der Formel 1a steht, und

25

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2d, 2e, 2l, 2m oder 2o steht,

oder in dem Fall (14), dass

30

A-B für die Gruppe $-HC=CH-$ oder $-HC=C(CH_3)-$ steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für Wasserstoff oder für einen Amino-Zucker der Formel 1b steht, und

5

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2a steht,

oder A-B, D und R^1 wie im Fall (11) definiert sind.

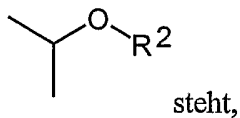
10 14. Verbindungen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass

in dem Fall (15), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

15

D für die Gruppe



R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

20

R^2 für einen Zucker der Formel 2a steht,

oder in dem Fall (16), dass

25 A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

30

R^2 für Wasserstoff oder für einen Zucker der Formel 2d, 2l oder 2m steht,

oder A-B, D und R^1 wie im Fall (11) definiert sind.

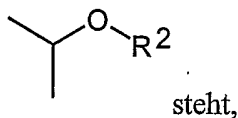
5 15. Verbindungen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass

in dem Fall (17), dass

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht, und

10

D für die Gruppe



R^1 für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

15

R^2 für einen Zucker der Formel 2a steht,

oder in dem Fall (18), dass

20 A-B für die Gruppe -HC=CH- steht, und

D die oben genannte Bedeutung hat,

R^1 für Wasserstoff steht, und

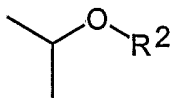
25

R^2 für Wasserstoff steht.

16. Verbindungen gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass

30 A-B für die Gruppe -HC=CH- steht,

D für die Gruppe



steht,

5 R¹ für einen Amino-Zucker der Formel 1a steht, und

R² für einen Zucker der Formel 2a steht,

oder in welcher

10

A-B für die Gruppe -HC=CH- oder -HC=C(CH₃)- steht,

D die oben genannte Bedeutung hat,

15 R¹ für Wasserstoff steht, und

R² für einen Zucker der Formel 2a steht,

oder in welcher

20

A-B für eine Gruppe -HC=CH- steht,

D die oben genannte Bedeutung hat,

25 R¹ für Wasserstoff steht, und

R² für Wasserstoff steht.

17. Verwendung von Verbindungen gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16 zum
30 Herstellen von neuen Spinosyn-Derivaten.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No
PCT/EP 02/07572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D313/00 C07H17/08 C12P19/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D C07H C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 00265 A (DOWELANCO) 3 January 1997 (1997-01-03) cited in the application claims -----	1, 11, 17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2002

Date of mailing of the international search report

18/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Francois, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

PCT/EP 02/07572

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9700265	A	03-01-1997	
		AU 711185 B2	07-10-1999
		AU 6177196 A	15-01-1997
		BR 9608380 A	05-01-1999
		CN 1191541 A	26-08-1998
		DE 69622564 D1	29-08-2002
		EP 0837870 A1	29-04-1998
		JP 11506117 T	02-06-1999
		WO 9700265 A1	03-01-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/07572

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 C07D313/00 C07H17/08 C12P19/62

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07D C07H C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, PAJ, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 00265 A (DOWELANCO) 3. Januar 1997 (1997-01-03) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche -----	1,11,17

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. November 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/11/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Francois, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
 Angaben zu Veröffentlichung | die zur selben Patentfamilie gehören

In | nales Aktenzeichen
PCT/EP 02/07572

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9700265	A	03-01-1997	AU 711185 B2 07-10-1999
			AU 6177196 A 15-01-1997
			BR 9608380 A 05-01-1999
			CN 1191541 A 26-08-1998
			DE 69622564 D1 29-08-2002
			EP 0837870 A1 29-04-1998
			JP 11506117 T 02-06-1999
			WO 9700265 A1 03-01-1997