



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0519/91

(51) Int.Cl.5

C 12 N 1/20
/(C 12 N 1/20,
C 12 R 1:465)

(22) Indleveringsdag: 22 mar 1991

(24) Løbedag: 03 jun 1985

(41) Alm. tilgængelig: 22 mar 1991

(44) Fremlagt: 30 nov 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 2488/85

(30) Prioritet: 05 jun 1984 US 617649 05 jun 1984 US 617650

(71) Ansøger: *American Cyanamid Company; Wayne; New Jersey, US

(72) Opfinder: Irwin Boyden *Wood; US, John Anthony *Pankavich; US, Guy Thomas *Carter; US, Margaret Jennings *Torrey; US, Michael *Greenstein; US

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Biologisk ren kultur af mikroorganismen *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus* LL-F28249 med deponeringsnummeret NRRL 15773

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

0519-91

Mikroorganismen *Streptomyces cyaneogriseus*, underart non-cyanogenus, betegnet LL-F28249 og med deponeringsnummer NRRL 15773. Ved en reguleret, mikrobiologisk fermentering kan der med denne mikroorganisme produceres antibiotiske forbindelser, der betegnes LL-F28249, - β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ , - η , - θ , - ι , - κ , - λ , - μ , - ν og - ω eller blandinger deraf, eventuelt som pharmaceutisk og farmakologisk acceptable salte deraf.

Med disse aktive stoffer kan man effektivt bekæmpe og forebygge helmintiske, arthropod-ektoparasitiske og acaridale infektioner hos varmblodede dyr, såsom kødproducerende dyr, og fjerkra, ved at indgive dyrene en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mængde af disse stoffer. Stofferne kan også anvendes til bekæmpelse af plantenematodeangreb og som insekticide midler.

Den foreliggende opfindelse angår en biologisk ren kultur af mikroorganismen *Streptomyces cyaneogriseus*, underart noncyanogenus betegnet LL-F28249, deponeret som NRRL nr. 15773.

- 5 Det har overraskende vist sig, at denne kultur er i stand til at producere de nedenfor nærmere beskrevne, antibiotiske forbindelser LL-F28249 α , LL-F28249 β , LL-F28249 γ , LL-F28249 δ , LL-F28249 ϵ , LL-F28249 ζ , LL-F28249 η , LL-F28249 θ , LL-F28249 ι , LL-F28249 κ , LL-F28249 λ , LL-F28249 μ , LL-F28249 ν
10 og LL-F28249 ω i udvindelige mængder ved fermentering i et vandigt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder for carbon, nitrogen og uorganiske anioner og kationer.

- De således producerede antibiotika kan anvendes til forebyggelse, behandling og bekæmpelse af helmintiske, ar-
15 thropod-ektoparasitiske og acaricide infektioner hos varmblo- dede dyr ved indgift af en effektiv mængde af forbindelserne betegnet LL-F28249 α , - β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ , - η , - θ , - ι , - κ , - λ , - μ , - ν og - ω eller blandinger deraf, såsom fermenterings- væsken, hele mæsken eller de pharmaceutisk og farmakologisk
20 acceptable salte deraf. Plantenematoder bekæmpes også effek- tivt ved hjælp af disse antibiotika, blandinger og/eller salte deraf. Endvidere er disse antibiotika også effektive som insekticide midler.

- De ovenfor beskrevne sygdomme afstedkommer ikke blot
25 ødelæggende problemer og tab for landbrugerne, der avler kødproducerende dyr, såsom svin, får, kvæg, geder, kaniner og fjerkræ. Desuden er sådanne sygdomme årsag til stor bekym- ring, når det drejer sig om selskabsdyr, som heste, hunde og katte. Disse sygdomme har været kendt i mange år, og der
30 findes præparater til behandling og/eller forebyggelse af sådanne sygdomme.

- Således omtales i USA patentskrift nr. 3.950.360 visse antibiotiske stoffer, der fås ved dyrkning af en Strep-
tomycesmikroorganisme, idet disse forbindelser er anven-
35 delige som insekticider og acaricider. Men i relation til de karakteristika, der identificerer en sådan mikroorganisme,

er den foreliggende mikroorganisme distinkt. Endvidere angår en hel serie USA patentskrifter visse forbindelser, der fremstilles ved fermentering af *Streptomyces avermitilis*, en organisme, der klart adskiller sig fra den foreliggende
5 (USA patentskrifterne nr. 4.171.314, 4.199.569, 4.206.205, 4.310.519 og 4.333.925). USA patentskrift nr. 4.423.209 angår en fremgangsmåde til omdannelse af nogle af disse mindre ønskelige komponenter til de mere foretrukne.

Det fulde navn af mikroorganismen LL-F28249, nr.
10 15773 med hensyn til slægt, art og underart er *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus*.

Stammen henhører under slægten *Streptomyces* på basis af morfologi og cellekemi (indhold af L-isomeren i diaminopimelinsyre). Stammens morfologi og fysiologiske data
15 placerer den i nærheden af *S. cyanoegriseus*, repræsenteret ved ISP 5534 (ATCC 27426). Derpå foretages sammenligninger mellem dannelsen af grå opløselige luftmyceliumpigmenter på medier (tabel I) og spiralformede kæder af glatte konidier (3-25 sporer pr. kæde). Den foreliggende stamme er negativ
20 over for blå opløseligt pigment, hvor sammenligningsstammen ISR 5534 er positiv. Stammerne har lignende reaktioner ved ISP-carbonhydratudnyttelsesprøverne, der er positive over for arabinose, fructose, glucose, rhamnose og xylose, men er negative over for inositol, mannitol, raffinose og sac-
25 charose (ISP 5534 let positiv). Imidlertid er stammerne forskellige på flere punkter (tabel II) ud af 53 ved Gordonprøverne. Disse forskelle understøtter teorien om dannelsen af en underart *S. cyaneogriseus* for den foreliggende mikroorganismes vedkommende.

30

35

Tabel I

Sammenligning af F 28249 og ISP 5534 på ISP-morfologi-
prøvedier (numrene er fra NBS-ISCC)

Medium	F 28249	ISP 5534
5 Gær-malt A.m. ¹	middelgrå	lys til middelgrå
(ISP 2)	(265)	(264-265)
V.m.	lys brunlig (75)	lysbrunlig-hvid til
	dyb gulbrun	sortagtig blå (188)
S.p.	lysebrun	lysebrun
10 Uorgani- A.m.	lys olivengrå (112)	middelgrå (265)
ske sal-	til middelgrå (265)	
te sti- V.m.	dyb grå til sort	grå-purpuragtig blå
velse	(266-267)	(204)
(ISP 4)	S.p. grålig-gullig-	intet
15	brun	
Glycerol A.m.	263 (hvid) til gul-	263 (hvid) til lyse-
aspara-	lig-grå (93)	grå (264)
gin V.m.	sort (267) til lys	grå-purpuragtig blå
(ISP 5)	olivenbrun (96)	(203-204)
20 S.p.	let brunlig	lys gullig-grå
Havremel A.m.	gulgrå (93)	intet
(ISP 3)	V.m. farveløs	farveløs
	S.p. let gullig	intet
1) A.m. - luftmycelium		
25 V.m. - vegetativt mycelium		
S.p. - opløseligt pigment		

Tabel IISammenligning af Lederle F 28249 med ISP 5534 (Gordonprøver)

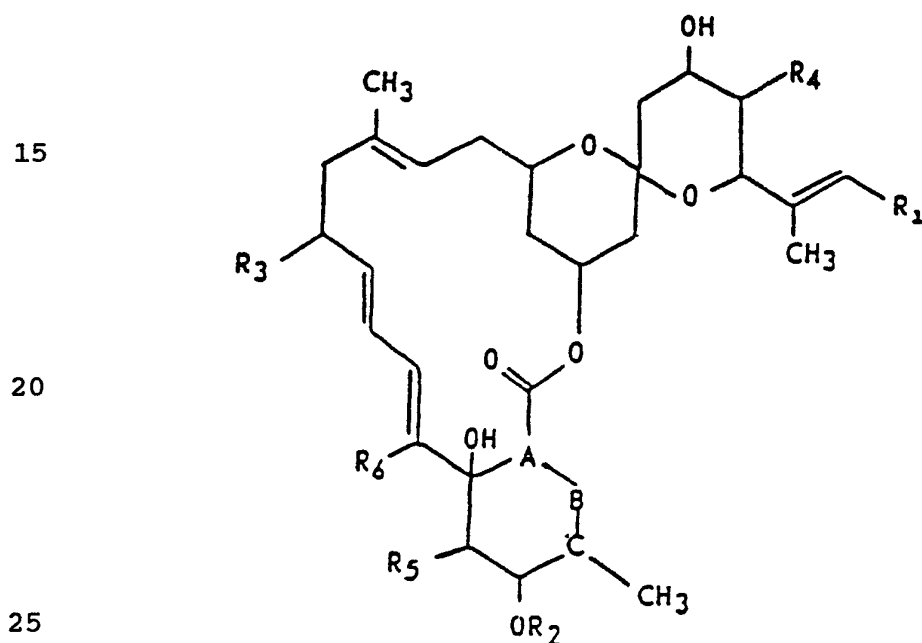
	F 28249	ISP 5534	
5	<u>Dyrket på/ved</u>		
	Salicin	+	-
	10°	-	+
	45°	+	-
	<u>Produktion af</u>		
10	urease	+	-
	<u>Decarboxylering af</u>		
	mucate	-	+
	<u>Syreproduktion</u>		
	raffinose	-	+
15	saccharose	-	+

Begge stammer har følgende reaktioner:

20	<u>Positiv</u>	Hydrolyse af casein, hypoxanthin, xanthin, tyrosin, adrenin, kartoffelstivelse, gelatine og esculin.
		Produktion af phosphatase
		Følsomhed over for lysozym
		Decarboxylering af acetat, citrat, lactat, malat, oxalat og propionat
25		Syreprodukt ud fra arabinose, cellobiose, dekstrin, fructose, galactose, glucose, glycerol, lactose, mannose, α -methyl-D-glucosid, rhamnose, salicin og trehalose.
30	<u>Negativ</u>	Produktion af nitratreduktase
		Decarboxylering af benzoat og tartrat
		Syre ud fra adonitol, dulcitol, erythritol, inositol, mannitol, sorbitol, β -methyl-D-xylosid.
		Vækst på 5% NaCl.

Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus-kulturen (LL-F28249 deponeret under NRRL nr. 15773), som producerer komponenterne LL-F28249 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , ν , θ , ι , κ , λ , μ , υ og ω blev isoleret ud fra eukalyptussand i det sydlige
 5 Australien.

Strukturen og stereokemien af komponenterne i LL-F28249 er ikke fuldt klarlagt, men de foreslåede strukturer vises nedenfor. Komponent LL-F28249 ω er beslægtet med Hondamycin (Albimycin), der er omtalt i The Journal of Antibiotics
 10 22, nr. 11, 521-526 (1969).

LL-F28249 α - μ

Komponent	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₅ +R ₆	A-B	B-C
LL-F28249α	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249β	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249γ	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249δ	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	CH ₂ OH		CH-CH	CH=C
LL-F28249ε	CH(CH ₃) ₂	H	H	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249ζ	CH ₂ CH ₃	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249η	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	C=CH	CH-CH
LL-F28249θ	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₃	CH ₂ CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249ι	CH(CH ₃) ₂	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249κ	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃		CH-CH	CH=C
LL-F28249λ	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃			-O-CH ₂ -	CH-CH	CH=C
LL-F28249μ	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃		CH-CH	CH=C

7

0

5

10

15

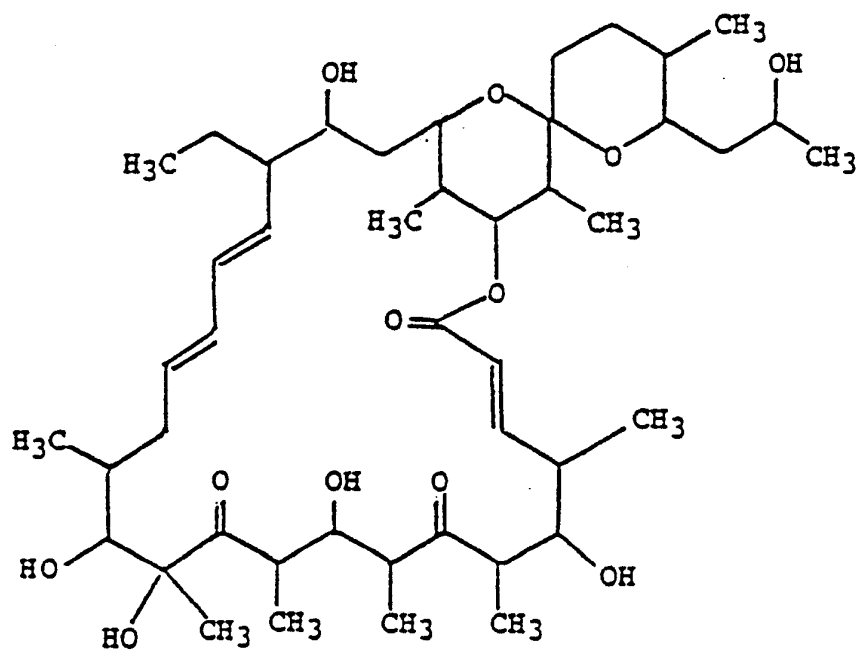
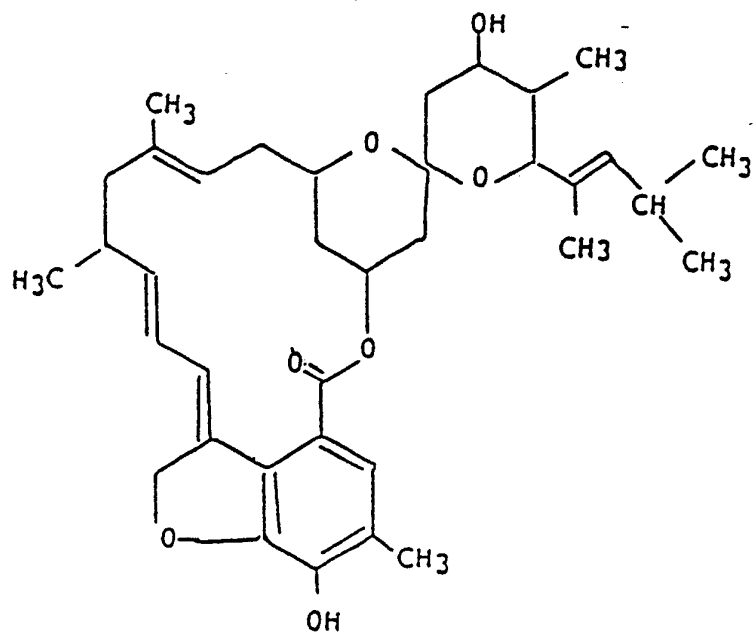
LL-F28249v

20

25

30

35



LL-F28249w

0

På tegningen viser

fig. 1 et karakteristisk ultraviolet absorptionspektrum af forbindelsen betegnet LL-F28249_α, NRRL 15773,

5

fig. 2 et karakteristisk infrarødt absorptionspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_α, NRRL 15773,

fig. 3 et karakteristisk proton-kernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_α, NRRL 15773, i CDCl₃-opløsning,

10

fig. 4 et karakteristisk carbon-13-kernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_α, NRRL 15773, i CDCl₃-opløsning,

fig. 5 et karakteristisk elektronanslagsmassespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_α, NRRL 15773,

15

fig. 6 et karakteristisk ultraviolet absorptionspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_β, NRRL 15773,

fig. 7 et karakteristisk infrarødt absorptionspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_β, NRRL 15773,

20

fig. 8 et karakteristisk protonkernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_β, NRRL 15773, i CDCl₃,

25

fig. 9 et karakteristisk elektronanslagsmassespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_β, NRRL 15773,

fig. 10 et karakteristisk ultraviolet absorptionspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_γ, NRRL 15773,

30

fig. 11 et karakteristisk infrarødt absorptionspektrum for forbindelsen LL-F-28249_γ, NRRL 15773,

fig. 12 et karakteristisk protonkernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen LL-F28249_γ, NRRL 15773, i CDCl₃,

35

0

fig. 13 et karakteristisk carbon-13-kernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_γ, NRRL 15773, i CDCl₃,

5 fig. 14 et karakteristisk elektronanslagsmassespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_γ, NRRL 15773,

fig. 15 et karakteristisk ultraviolet absorptionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ω, NRRL 15773,

10 fig. 16 et karakteristisk infrarødt absorptionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ω, NRRL 15773,

fig. 17 et karakteristisk protonkernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ω, NRRL 15773, i CDCl₃,

15 fig. 18 et karakteristisk kernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ω, NRRL 15773, i CDCl₃,

fig. 19 et karakteristisk elektronanslagsmassespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ω, NRRL 15773,

20 fig. 20 et karakteristisk ultraviolet absorptionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_δ, NRRL 15773,

25 fig. 21 et karakteristisk protonkernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_δ, NRRL 15773, i CDCl₃,

fig. 22 et karakteristisk elektronanslagsmassespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_δ, NRRL 15773,

30 fig. 23 et karakteristisk ultraviolet absorptionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ε, NRRL 15773,

fig. 24 et karakteristisk protonkernemagnetisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F-28249_ε, NRRL 15773, i CDCl₃,

35

0

fig. 25 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ξ,
NRRL 15773,

5

fig. 26 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ζ,
NRRL 15773,

fig. 27 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonnansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_η,
NRRL 15773, i CDCl₃,

10

fig. 28 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_θ,
NRRL 15773,

15

fig. 29 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_η,
NRRL 15773,

fig. 30 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonnansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_η,
NRRL 15773 i CDCl₃,

20

fig. 31 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-28249_η, NRRL
15773,

fig. 32 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_θ,
NRRL 15773,

25

fig. 33 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonnansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_θ,
NRRL 15773, i CDCl₃,

30

fig. 34 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_θ,
NRRL 15773,

fig. 35 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ι,
NRRL 15773,

35

fig. 36 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonnansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_ι,
NRRL 15773, i CDCl₃,

0

fig. 37 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 ζ ,
NRRL 15773,

5

fig. 38 et karakteristisk carbon-13 kernemag-
netisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-
F28249 β , NRRL 15773, i CDCl₃ opløsning,

fig. 39 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 κ ,
NRRL 15773,

10

fig. 40 et karakteristisk infrarødt absorptions-
spektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 κ , NRRL
15773,

15

fig. 41 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 κ , NRRL
15773,

fig. 42 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 κ ,
NRRL 15773,

20

fig. 43 et karakteristisk carbon-13 kernemag-
netisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-
F28249 κ , NRRL 15773,

fig. 44 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 λ ,
NRRL 15773,

25

fig. 45 et karakteristisk infrarødt absorptions-
spektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 λ , NRRL
15773,

fig. 46 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 λ , NRRL
15773,

30

fig. 47 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249 λ ,
NRRL 15773,

35

fig. 48 et karakteristisk carbon-13 kernemagne-
tisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-
F28249 λ , NRRL 15773,

fig. 49 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_u,
NRRL 15773,

fig. 50 et karakteristisk infrarødt absorptions-
5 spektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_u, NRRL
15773,

fig. 51 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_u,
NRRL 15773,

10 fig. 52 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonnansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_u,
NRRL 15773,

fig. 53 et karakteristisk ultraviolet absorp-
tionsspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_u,
15 NRRL 15773,

fig. 54 et karakteristisk infrarødt absorptions-
spektrum for forbindelsen betegnet F28249_u, NRRL 15773,

fig. 55 et karakteristisk elektronanslags-
massespektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_u, NRRL
20 15773,

fig. 56 et karakteristisk protonkernemagnetisk
resonnansspektrum for forbindelsen betegnet LL-F28249_u,
NRRL 15773, og

fig. 57 et karakteristisk carbon-13 kernemagne-
25 tisk resonansspektrum for forbindelsen betegnet LL-
F28249_u, NRRL 15773.

Det har vist sig, at de ovennævnte komponenter LL-
F28249_u samt fermenteringsvæsken og hele mæsken af den
omhandlede mikroorganisme er særlig effektive til bekæmpelse
30 af helminthiske, arthropod-ektoparasitiske og acaricide
infektioner hos kødproducerende dyr, såsom kvæg, får, svin,
kaniner, fjerkræ, såsom kyllinger, kalkuner, ænder, gæs,
vagtler og fasaner samt husdyr.

Man kan bekæmpe eller behandle sådanne infektioner
35 hos varmblodede dyr ved indgift oralt, parenteralt eller

topisk af en profylaktisk, pharmaceutisk eller terapeutisk effektiv mængde fermenteringsvæske eller hel mæsk af mikroorganismen *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenus*, NRRL 15773, eller forbindelserne betegnet LL-F28249 α , LL-F28249 β ,
 5 LL-F28249 γ , LL-F28249 δ , LL-F28249 ϵ , LL-F28249 ζ , LL-F28249 η , LL-F28249 θ , LL-F28249 ι , LL-F28249 κ , LL-F-28249 λ , LL-F-28249 μ , LL-F28249 ν og LL-F28249 ω som identificeret og karakteriseret her i beskrivelsen eller de pharmaceutiske og pharmalogisk acceptable salte deraf (kollektivt omtalt som aktivt stof).

10 Selv om indgift af forbindelsen eller fermenteringsvæske/hel mæsk (herefter væske eller mæsk) i reglen sker mest praktisk i eller med foderet eller i drikkevandet, kan de ovennævnte forbindelser, væske eller mæsk, eller pharmaceutisk og pharmakologisk acceptable salte
 15 deraf også indgives til individuelle værter i form af tabletter, store doser, geler, kapsler eller lignende eller ved injektion i form af en pasta, gel, pellet eller opløsning. Disse sidstnævnte indgiftsmetoder er naturligvis ikke så praktiske til behandling af større
 20 grupper dyr, men de er ganske praktiske til brug i mindre målestok eller på individuel basis.

Når antibiotika LL-F28249 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι , κ , μ , ν eller ω eller fermenteringsvæsken eller hele mæsken af *Streptomyces cyaneogriseus noncyanogenos* NRRL 15773 an-
 25 vendes profylaktiske eller terapeutisk behandling af anthelminthiske, arthropod-ektoparasitisk og acaride infektioner hos dyr og fjerkræ, er i reglen ca. 0,05 til 500,0 ppm og fortrinsvis 0,1 til 300 ppm af midler, væsken eller mæsken som beskrevet ovenfor, indgivet i dyrets foder eller drik-
 30 kevand, effektivt til at forebygge, bekæmpe eller behandle sådanne infektioner hos sådanne dyr.

0

Foder med tilsat medicin fremstilles i reglen ved omhyggelig iblanding af ca. 0,00001 til ca. 0,01 vægt% af midlet (antibiotikaet) eller den ovenfor beskrevne væske eller mæsk med et næringsmæssigt afbalanceret foder som f.eks. det i de nedenstående eksempler beskrevne foder.

Når forbindelserne og/eller væsken eller mæsken anvendes til forebyggelse eller bekæmpelse af helminther, arthropod-ektoparasitter og acarider, fremstilles det aktive middel først som en dyrefoder-forblanding. Forblandingen indeholder i reglen en forholdsvis stor procentdel af det aktive stof og blandes i reglen med dyrets foder umiddelbart før indgift. Om ønsket kan foderforblandingen også anvendes som topdressing på dyrets dagsration.

Foderforblandinger eller -koncentrater kan fremstilles ved iblanding af ca. 0,1 til 5,0 vægt% af de ovenfor identificerede midler, væske eller mæsk eller pharmaceutisk og farmakologisk acceptable salte deraf med ca. 99,9 til 95 vægt% af et passende bærestof eller fortyndingsmiddel.

Bærere, der er egnet til fremstilling af foder-supplerings sammensætninger, omfatter følgende: lucerne-mel, sojabønnemel, bomuldsfrøliemel, hørføroliemel, natriumchlorid, calciumcarbonat, calciumsulfat, majsmel, sukkerrørsmelasse, urinstof, benmel, majscolbemel, ris-skalmel og lignende. Bæreren fremmer en i det væsentlige ensartet fordeling af det aktive stof i det færdige foder, hvori tilskuddet blandes. Det udfører således en vigtig funktion ved at sikre en passende fordeling af det aktive stof, dvs. ca. 0,1 til 100 ppm deraf, i hele foderet. Dette svarer til 0,00001 til 0,01 vægt% aktivt stof i det færdige foder. I praksis tilsættes

35

0

et halvt til flere kg forblanding pr. ton foder for at opnå det ønskede niveau af middel (antibiotikum) eller væske eller mæsk i det færdige foder.

5 Hvis tilskuddet eller forblandingen anvendes som topdressing til foderet, hjælper det ligeledes med til at sikre ensartet fordeling af det aktive stof over den øverste del af det supplerede foder.

10 Eftersom forbindelserne og disses pharmaceutisk og farmakologisk acceptable salte er forholdsvis uopløselige i vand, er det i reglen ønskeligt, når eventuelt en sådan forbindelse indgives i dyrets drikkevand, at opløse det aktive stof i et organisk opløsningsmiddel, såsom methanol, ethanol, acetone, DMSO, oleinsyre, linolsyre, propylenglycol eller lignende og iblande opløsningen en lille smule surfactant og/eller dispergeringsmiddel for at sikre opløsning og/eller dispersion af det aktive middel i dyrets drikkevand.

20 Det er bedst, når behandlingen af et mindre antal af de større kødproducerende dyr er nødvendig for at bekæmpe parasitiske infektioner af disse, at midlerne LL-F28249 α' , β' , γ' , δ' , ϵ' , ζ' , η' , θ' , ι' , κ' , λ' , μ' , ν' og ω' , væske eller mæsk eller pharmaceutisk eller farmakologisk acceptable salte deraf kan indgives oralt på daglig basis til værtsdyret i form af en medicinholdig gel.

25 De aktive stoffer udviser også nematodicid aktivitet over for plantenematoder, hvilket er påvist ved deres effektivitet til bekæmpelse af den frit levende jordbunds-nematode *C. elegans*. Sammensætninger indeholdende disse aktive stoffer til 30 bekæmpelse af plantenematoder kan oparbejdes enten som væsker eller fugtelige pulvere. Flydende sammensætninger omfatter ca. 5-20% vægt/vægt aktivt stof (aktivt middel, fermenteringsvæske, hel mæsk eller salte) med passende mængder af et opløsningsmiddel, såsom methanol, 35 ethanol, acetone, acetonitril og andre og resten vand. Fugtelige pulvere omfatter ca. 5-20% vægt/vægt aktivt

0

middel, ca. 1-10% surfactant og inaktive bærer, såsom lersorter, vermiculit, kønrøg eller lignende. Der påføres ca. 0,1-1,4 kg/ha på planternes løv, den jord, hvori de gror eller i deres stammer.

5

Disse midler er også aktive som topiske insekticider, mavegifte og systemiske insekticider og er særlig effektive til bekæmpelse af insekter af ordenerne Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Diptera og Thysanoptera. Plantemider, acarider bekæmpes yderligere med midlerne,

10

Disse midler påføres i reglen som fortyndede, faste eller flydende sammensætninger på formeringsområderne, føde eller levested for sådanne insekter og/eller acarider. Påføringsmængden på sådanne arealer omfatter ca. 0,01 til ca. 8,0 kg/ha, fortrinsvis ca. 0,05 til ca. 0,5 kg/ha.

15

Surfactanter, der kan anvendes i fugtelige pulvere, omfatter dem, der almindeligvis anvendes til tilberedninger af sådanne fugtelige pulvere, fortrinsvis alkylbenzensulfonatnatriumsalte. Bentonit, ler eller blandinger deraf er foretrukne bærere.

20

Yderligere har de aktive stoffer også vist systemisk insekticid aktivitet mod m. ovinus hos får.

25

I praksis er i reglen ca. 0,02 mg/kg/dag til ca. 3,0 mg/kg/dag effektivt til bekæmpelse af parasitinfektioner hos kvæg, får og svin samt husdyr. Til længere tids brug kan der anvendes mængder helt ned til 0,002 mg/kg legemsvægt/dag.

30

Også i praksis indgives ca. 0,1 mg/kg til 100 mg/kg til dyr inficeret med helminter.

De fysiokemiske karakteristika for α' , β' , γ' , δ' , ϵ' , ζ' , η' , θ' , ι' , κ' , λ' , μ' , ν' og ω -komponenterne af LL-F28249 er beskrevet nedenfor.

35

LL-F28249_α:

- 5 (1) Molekylevægt: 612 (FAB-MS).
 (2) Molekyleformel: $C_{36}H_{52}O_8$:
 (3) Specifik optisk rotation: $[\alpha]_D^{26} = +133 \pm 3^\circ$
 (C 0,3, acetone).
 (4) Ultraviolet absorptionsspektrum: som vist i fig.
 10 1, $UV_{\max}^{CH_3OH} = 244 \text{ nm } (\epsilon 28.000)$.
 (5) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig.
 2 (KBr-skive): 3439, 2960, 2925, 1714, 1454,
 1374, 1338, 1171, 1120, 996 og 967 cm^{-1} .
 (6) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$):
 15 som vist i fig. 3.
 (7) Carbon-13-kernemagnetisk resonansspektrum
 ($CDCl_3$): som vist i fig. 4 og beskrevet i tabel
 III.
 (8) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i
 20 fig. 5 med nøjagtige masse målinger og foreslå-
 ede grundstofsammensætninger som vist i tabel IV.

LL-F28249_β:

- (1) Molekylevægt: 584 (FAB-MS).
 (2) Molekyleformel: $C_{34}H_{48}O_8$.
 25 (3) Specifik optisk rotation: $[\alpha]_D^{26} = +125^\circ$ (C 0,30,
 acetone).
 (4) Ultravioletabsorptionsspektrum: som vist i fig.
 6, $UV_{\max}^{CH_3OH} = 244 \text{ nm } (\epsilon 25.600)$.
 (5) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig. 7
 30 (KBr-skive): 3520, 2910, 1735, 1717, 1450, 1375,
 1335, 1180, 1170, 1119, 993 og 727 cm^{-1} .
 (6) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$):
 som vist i fig. 8.
 (7) Carbon-13 kernemagnetisk resonansspektrum
 35 ($CDCl_3$): som vist i fig. 38 og beskrevet i tabel
 IVA:

0

- (8) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig. 9 med nøjagtige massemålinger og foreslået grundstofsammensætning er vist i tabel V.

LL-F28249_γ:

5

- (1) Molekylevægt: 598 (FAB-MS).

- (2) Molekyleformel: $C_{35}H_{50}O_8$.

- (3) Specifik optisk rotation: $[\alpha]_D^{26} = +150 \pm 4^\circ$
(C 0,3, acetone).

10

- (4) Ultraviolet absorptionsspektrum: som vist i fig. 10, $UV_{\max}^{CH_3OH} = 244 \text{ nm } (\epsilon 27.100)$.

- (5) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig. 11 (KBr-skive): 3510, 2910, 1735, 1715, 1452, 1375, 1338, 1182, 1172, 1119 og 995 cm^{-1} .

- (6) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$): som vist i fig. 12.

15

- (7) Carbon-13-kernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$): som vist i fig. 13 og beskrevet i tabel VI.

- (8) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig. 14 med nøjagtige massemålinger og foreslået grundstofsammensætning er vist i tabel VII.

20

LL-F28249_α:

- (1) Molekylevægt: 806 (FAB-MS).

- (2) Molekyleformel: $C_{45}H_{74}O_{12}$.

25

- (3) Specifik optisk rotation: $[\alpha]_D^{26} = -49 \pm 3^\circ$
(C 0,35, methanol).

- (4) Ultraviolet absorptionsspektrum som vist i fig. 15, $UV_{\max}^{CH_3OH} = 225 \text{ nm } (\epsilon 27.400)$
 $232 \text{ nm } (\epsilon 25.700)$.

30

- (5) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig. 16 (KBr-skive): 3480, 2965, 2935, 2880, 1703, 1647, 1458, 1380, 1292, 1223, 1135, 1098 og 984 cm^{-1} .

- (6) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$): som vist i fig. 17.

35

0

(7) Carbon-13 kernemagnetisk resonnansspektrum
(CDCl₃): som vist i fig. 18 og beskrevet i ta-
bel VIII.

5

(8) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig. .
19 med nøjagtige masse målinger og foreslåede
grundstofsammensætninger vist i tabel IX.

LL-F28249₅:

10

(1) Molekylvægt: 616 (EI-MS).

(2) Molekyleformel: C₃₅H₅₂O₉.

(3) HPLC-retentionsvolumen på 14,0 ml i systemet
vist i tabel X.

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol):
som vist i fig. 20.

15

(5) Protonkernemagnetisk resonnansspektrum (CDCl₃):
som vist i fig. 21.

(6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig. 23.

LL-F28249₆:

20

(1) Molekylvægt: 598 (EI-MS).

(2) Molekyleformel: C₃₅H₅₀O₈.

(3) HPLC-retentionsvolumen på 14,8 ml i systemet
vist i tabel X.

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol):
som vist i fig. 23.

25

(5) Protonkernemagnetisk resonnansspektrum (CDCl₃):
som vist i fig. 24.

(6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i
fig. 25.

LL-F28249₇:

30

(1) Molekylvægt: 598 (EI-MS).

(2) Molekyleformel: C₃₅H₅₀O₈.

(3) HPLC-retentionsvolumen på 16,0 ml i systemet
vist i tabel X.

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol):
som vist i fig. 26.

35

(5) Protonkernemagnetisk resonnansspektrum (CDCl₃):
som vist i fig. 27.

0

(6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig.

23.

LL-F28249_n:

(1) Molekylvægt: 612 (EI-MS).

5

(2) Molekyleformel: $C_{36}H_{52}O_8$.

(3) HPLC-retentionsvolumen på 23,5 ml i systemet
vist i tabel X.

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol): som
vist i fig. 29.

10

(5) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$):
som vist i fig. 30.

(6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i
fig. 31.

LL-F28249_o:

15

(1) Molekylvægt: 626 (EI-MS).

(2) Molekyleformel: $C_{37}H_{54}O_8$.

(3) HPLC-retentionsvolumen på 24,5 ml i systemet
vist i tabel X.

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol):
som vist i fig. 32.

20

(5) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$):
som vist i fig. 33.

(6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i
fig. 34.

25

LL-F28249_l:

(1) Molekylvægt: 626 (EI-MS).

(2) Molekyleformel: $C_{37}H_{54}O_8$.

(3) HPLC-retentionsvolumen på 26,0 ml i systemet
vist i tabel X.

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum (methanol): som
vist i fig. 35.

30

(5) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$):
som vist i fig. 36.

(6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig.

35

37.

0

LL-F28249_K:

- (1) Molekylevægt: 584 (EI-MS).
- (2) Molekyleformel: $C_{35}H_{52}O_7$.
- (3) Specifik optisk rotation: $[\alpha]_D^{26} = +189^\circ$ (C 0,165, acetone).
- (4) Ultraviolet absorptionsspektrum: som vist i fig. 39 $UV_{max}^{CH_3OH} = 241 \text{ nm}$ (E 20.400).
- (5) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig. 40 (KBr-skive).
- (6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig. 41.
- (7) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$): som vist i fig. 42.
- (8) Carbon-13 kernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$): som vist i fig. 43 og beskrevet i tabel XI.

15

LL-F28249_λ:

- (1) Molekylevægt: 626 (FAB-MS).
- (2) Molekyleformel: $C_{37}H_{54}O_8$.
- (3) Specifik optisk rotation: $[\alpha]_D^{26} = +145^\circ$ (C 0,23, acetone).
- (4) Ultraviolet absorptionsspektrum: som vist i fig. 44 $UV_{max}^{CH_3OH} = 244 \text{ nm}$ (E 30.000).
- (5) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig. 45 (KBr-skive).
- (6) Elektronanslagsmassespektrum: som vist i fig. fig. 46.
- (7) Protonkernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$): som vist i fig. 48.
- (8) Carbon-13 kernemagnetisk resonansspektrum ($CDCl_3$): som vist i fig. 48 og beskrevet i tabel XII.

20

25

30

LL-F28249_u:

- (1) Molekylevægt: 612 (EI-MS).
- (2) Molekyleformel: $C_{37}H_{56}O_7$.
- (3) Ultraviolet absorptionsspektrum: som vist i fig. 49 $UV_{max}^{CH_3OH} = 241 \text{ nm}$ (E 16.800).

35

0

(4) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig. 50 (KBr-skive).

(5) Elektronanslægs massespektrum: som vist i fig. 51.

5

(6) Protonkernemagnetisk resonansspektrum (CDCl_3): som vist i fig. 52.

LL-F28249 :

(1) Molekylvægt: 592 (EI-MS).

(2) Molekyleformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_7$.

10

(3) Specifik optisk rotation: $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = +131^{\circ}$ (C 0,325, actone).

(4) Ultraviolet absorptionsspektrum: som vist i fig. 53 $\text{UV}_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}} = 256$ (E 20.500), 358 (E 8.830).

(5) Infrarødt absorptionsspektrum: som vist i fig. 54 (KBr-skive).

15

(6) Elektronanslægs massespektrum: som vist i

(7) Protonkernemagnetisk resonansspektrum (CDCl_3): som vist i fig. 56.

(8) Carbon-13 kernemagnetisk resonansspektrum (CDCl_3): som vist i fig. 57 og beskrevet i tabel X.II.

20

25

30

35

Tabel III

Carbon-13 NMR-data for LL-F28249^a

Carbon	Kemisk skift ¹⁾ ppm	Proton- substituering	Carbon	Kemisk skift ppm	Proton Substituering
1	173,4	q ²	18	67,8	CH
2	142,8	CH	19	67,7	CH
3	139,4	q	20	48,4	CH ₂
4	137,7	q	21	45,7	CH
5	137,3	q	22	41,1	CH ₂
6	137,2	CH	23	40,7	CH ₂
7	130,6	q	24	36,1	CH ₂
8	123,3	CH	25	36,0	CH
9	120,33	CH	26	35,9	CH
10	118,0	CH	27	34,7	CH ₂
11	99,7	q	28	26,8	CH
12	80,2	q	29	22,8 ⁴	CH ₃
13	79,3	CH	30	22,2	CH ₃
14	76,7	CH	31	19,9	CH ₃
15	69,3	CH	32	15,5	CH ₃
16	68,5	CH	33	13,9	CH ₃
17	68,4	CH ₂	34	11,0	CH ₃

1) Længere fremme fra TMS, CDCl₃-opløsning.

2) q = kvaternært carbon

3), 4) to uopløste signaler

0

Tabel IV

Massesamlinger ved stærk opløsning for LL-F28249_a

	<u>m/z</u>	<u>Grundstofsammensætning</u>
5	612,3705	C ₃₆ H ₅₂ O ₈
	594,3543	C ₃₆ H ₅₀ O ₇
	576,3472	C ₃₆ H ₄₈ O ₆
	484,3211	C ₃₀ H ₄₄ O ₅
10	482,2648	C ₂₉ H ₃₈ O ₆
	466,3097	C ₃₀ H ₄₂ O ₄
	448,2987	C ₃₀ H ₄₀ O ₃
	442,2375	C ₂₆ H ₃₄ O ₆
15	425,2327	C ₂₆ H ₃₃ O ₅
	354,2181	C ₂₃ H ₃₀ O ₃
	314,1877	C ₂₀ H ₂₆ O ₃
	278,1144	C ₁₅ H ₁₈ O ₅
20	265,1786	C ₁₆ H ₂₅ O ₃
	248,1405	C ₁₅ H ₂₀ O ₃
	247,1705	C ₁₆ H ₂₃ O ₂
	237,1838	C ₁₅ H ₂₅ O ₂
	219,1740	C ₁₅ H ₂₃ O
25	151,0753	C ₉ H ₁₁ O ₂

30

35

0

Tabel IVA
Carbon-13 NMR-data for LL-F28249_B

	Kemisk skift*		Kemisk skift	
	Carbon	(ppm)	Carbon	(ppm)
5	1	173,3	18	68,3
	2	142,6	19	67,8
	3	139,5	20	67,7
10	4	137,7	21	48,4
	5	137,3	22	45,7
	6	133,9	23	41,0
	7	123,8	24	40,8
15	8	123,4	25	36,1
	9	120,3	26	35, ^a **
	10	120,2	27	34,7
20	11	118,0	28	22,3
	12	99,7	29	19,8
	13	80,2	30	15,5
	14	79,4	31	13,8
25	15	76,7	32	13,1
	16	69,2	33	10,8
	17	68,6		

30

* Længere fremme fra TMS, CDCl₃-opløsning
 ** To uopløste signaler

35

0

Tabel VMassemålinger ved stærk opløsning for LL-F28249_B

	<u>m/z</u>	<u>Grundstofsammensætning</u>
5	584,3388	C ₃₄ H ₄₈ O ₈
	566,3306	C ₃₄ H ₄₆ O ₇
	456,2864	C ₂₈ H ₄₀ O ₅
	442,2391	C ₂₆ H ₃₄ O ₆
10	438,2780	C ₂₈ H ₃₈ O ₄
	425,2331	C ₂₆ H ₃₃ O ₅
	354,2187	C ₂₃ H ₃₀ O ₃
	314,1858	C ₂₀ H ₂₆ O ₃
15	278,1168	C ₁₅ H ₁₈ O ₅
	237,1491	C ₁₄ H ₂₁ O ₃
	219,1380	C ₁₄ H ₁₉ O ₂
	209,1534	C ₁₃ H ₂₁ O ₂
	191,1418	C ₁₃ H ₁₉ O
20	151,0750	C ₉ H ₁₁ O ₂

25

30

35

0

Tabel VI
Carbon-13 NMR-data for LL-F28249_y
 Kemisk skift¹⁾

	Carbon	(ppm)	Carbon	Kemisk skift (ppm)
5	1	173,6	19	68,3
	2	142,4	20	67,9
	3	139,9	21	57,7
	4	137,3	22	48,5
	5	136,0	23	45,8
10	6	134,0	24	41,2
	7	123,8	25	40,8
	8	123,6	26	36,2
	9	120,4	27	36,1
	10	119,6	28	36,0
15	11	118,5	29	34,8
	12	99,8	30	22,3
	13	80,5	31	19,9
	14	77,8	32	15,5
	15	77,0	33	13,8
20	16	76,8	34	13,1
	17	69,3	35	10,8
	18	68,6		

25

1) Længere fremme fra TMS, CDCl₃-opløsning.

30

35

0

Tabel VIIMassemåling ved stærk opløsning for LL-F28249_y

	<u>m/z</u>	<u>Grundstofsammensætning</u>
5	598,3543	C ₃₅ H ₅₀ O ₈
	580,3422	C ₃₅ H ₄₈ O ₇
	562,3292	C ₃₅ H ₄₆ O ₆
	496,2824	C ₃₀ H ₄₀ O ₆
10	484,2440	C ₂₈ H ₃₆ O ₇
	478,2687	C ₃₀ H ₃₈ O ₅
	456,2576	C ₂₇ H ₃₆ O ₆
	438,2772	C ₂₈ H ₃₈ O ₄
	425,2341	C ₂₆ H ₃₃ O ₅
15	420,2651	C ₂₈ H ₃₆ O ₃
	354,2199	C ₂₃ H ₃₀ O ₃
	314,1875	C ₂₀ H ₂₆ O ₃
	292,1307	C ₁₆ H ₂₀ O ₅
20	288,2075	C ₁₉ H ₂₈ O ₂
	248,1397	C ₁₅ H ₂₀ O ₃
	237,1490	C ₁₄ H ₂₁ O ₃
	219,1382	C ₁₄ H ₁₉ O ₂
25	209,1544	C ₁₃ H ₂₁ O ₂
	191,1435	C ₁₃ H ₁₉ O
	151,0759	C ₉ H ₁₁ O ₂

30

35

0

Tabel VIIICarbon-13-NMR-data for LL-F28249

		Kemisk skift ¹			Kemisk skift
		Carbon (ppm)			Carbon (ppm)
5	1	220,7	23	42,2 ²	
	2	219,6	24	40,4	
	3	165,2	25	38,3	
	4	148,7	26	37,6	
	5	133,1	27	36,1	
10	6	132,3	28	34,8	
	7	132,1	29	33,5	
	8	130,2	30	30,1	
	9	122,3	31	26,6	
	10	100,0	32	25,4	
15	11	82,9	33	24,5	
	12	75,9	34	23,0	
	13	73,0	35	21,1	
	14	72,7	36	17,9	
	15	72,6	37	14,3	
20	16	72,1	38	14,2	
	17	69,0	39	12,1	
	18	67,3	40	11,5	
	19	63,6	41	10,9	
	20	51,4	42	8,7	
25	21	46,2	43	8,3	
	22	45,7	44	5,7	

1) Længere fremme fra TMS, CDCl₃-opløsning

2) To uopløste signaler

30

35

0

Tabel IX

Massemåling ved stærk opløsning for LL-F28249 ω

	<u>m/z</u>	<u>Grundstofsammensætning</u>
5	462,3350	C ₂₈ H ₄₆ O ₅
	444,3237	C ₂₈ H ₄₄ O ₄
	425,2534	C ₂₃ H ₃₇ O ₇
	407,2439	C ₂₃ H ₃₅ O ₆
10	406,3046	C ₂₅ H ₄₂ O ₄
	387,2895	C ₂₅ H ₃₉ O ₃
	337,2010	C ₁₉ H ₂₉ O ₅
	297,2031	C ₁₇ H ₂₉ O ₄
	279,1944	C ₁₇ H ₂₇ O ₃
15	261,1851	C ₁₇ H ₂₅ O ₂
	253,1797	C ₁₅ H ₂₅ O ₃
	235,1697	C ₁₅ H ₂₃ O ₂
	224,1754	C ₁₄ H ₂₄ O ₂
20	209,1530	C ₁₃ H ₂₁ O ₂
	207,1744	C ₁₄ H ₂₃ O
	184,1458	C ₁₁ H ₂₀ O ₂
	179,1048	C ₁₁ H ₁₅ O ₂
25	173,1205	C ₉ H ₁₇ O ₃
	167,1051	C ₁₀ H ₁₅ O ₂
	155,1069	C ₉ H ₁₅ O ₂

30

35

0

Tabel X

<u>HPLC-retentionsvoluminer for</u>		
<u>LL-F28249 α, δ, ϵ, ζ, η, θ og ι</u>		
5	<u>Forbindelse</u>	<u>Retentionsvolumen* (ml)</u>
	LL-F28249 α	19,8
	LL-F28249 δ	14,0
	LL-F28249 ϵ	14,8
	LL-F28249 ζ	16,0
10	LL-F28249 η	23,5
	LL-F28249 θ	24,5
	LL-F28249 ι	26,0

15 * Systemet omfatter en kolonne 3,9 mm x 30 cm pak-
ket med C₁₈ omvendt-fase-pakning fremkaldt med
methanol/vand = 80:20 ved 1,0 ml/minut, påvisning
sker ved absorbans ved 254 nm.

20

25

30

35

0

Tabel XI
Carbon-13-NMR-data for LL-F28249_K

Kemisk skift*		Kemisk Skift		
Carbon	(ppm)	Carbon	(ppm)	
5	1	173,9	19	56,7
	2	140,7	20	48,4
	3	138,3	21	47,7
	4	136,6	22	41,1
	5	136,5	23	40,6
10	6	133,8	14	37,1
	7	124,7	25	36,3
	8	124,4	26	36,0
	9	123,8	27	35,9
	10	120,1	28	34,6
15	11	118,5	29	22,0
	12	99,7	30	19,3
	13	77,2	31	16,0
	14	76,6**	32	13,8
	15	76,5	33	13,3
20	16	69,3	34	13,1
	17	68,6	35	10,7
	18	67,3		

25

* Længere fremme fra TMS, CDCl_3 -opløsning.

** Sammenfaldende med CDCl_3 -signaler.

30

35

0

Tabel XII

Carbon-13-NMR-data for LL-F28249₁

	Carbon	Kemisk skift* (ppm)	Carbon	Kemisk Skift (ppm)
5	1	173,6	19	68,3
	2	142,5	20	67,9
	3	139,8	21	57,8
	4	137,4	22	48,6
10	5	137,2	23	45,8
	6	136,0	24	41,2
	7	130,7	25	40,9
15	8	123,6	26	36,1 **
	9	120,3	27	36,0
	10	119,7	28	34,9
	11	118,6	29	26,9
20	12	99,8	30	23,0 **
	13	80,5	31	22,4
	14	77,7	32	20,0
	15	77,6	33	15,7
25	16	76,7	34	14,0
	17	69,3	35	11,1
	18	68,6		

30

* Længere fremme fra TMS, CDCl₃-opløsning.

** To uopløste signaler.

35

0

Tabel XIII
Carbon-13-NMR-data for LL-F28249)

	Kemisk skift*		Kemisk skift	
	Carbon	(ppm)	Carbon	(ppm)
5	1	167,4	18	69,4
	2	150,5	19	68,7
	3	142,9	20	68,3
	4	142,0	21	48,4
10	5	137,2 **	22	41,0 **
	6	132,1	23	35,9
	7	130,7	24	35,6
	8	125,8	25	35,5
15	9	125,5	26	34,4
	10	124,2	27	29,7
	11	123,7	28	26,8
20	12	123,2	29	22,9
	13	121,3	30	22,8
	14	118,0	31	22,1
	15	100,0	32	15,3
25	16	76,7	33	13,9
	17	74,6	34	11,0

30 * Længere fremme fra TMS, CDCl_3 -opløsning.
 ** To uopløste signaler.

35

0

Tabel XIV
Chromatografiske data

	Komponent	TLC*	HPLC**	-retentionstid
		relativ R _f		(minutter)
5	α	1,00		13,8
	β	0,797		9,3
	γ	1,42		12,6
	δ	0,758		10,4
10	ε	1,06		10,9
	ζ	1,12		11,5
	η	1,03		16,2
	θ	1,27		17,3
15	ι	1,27		18,2
	κ	1,83		24,7
	λ	1,56		19,1
20	μ	1,92		38,0
	ν	1,95		42,3
	ω	0,212		7,1

25 * "Analtech Silica Gel GHLE250/u" fremkaldt med ethyl-
acetat/methylenchlorid = 1:3, påvisning ved forkul-
ning med H₂SO₄.

** "Altex Ultrasphere ODS" 5/u 4,6 mm x 25 cm fremkaldt
med 85% methanol i vand ved 1,0 ml/minut, påvist ved
30 absorbans ved 254 nm

0

Denne organisme opbevares i the Culture Collection of Medical Research Division, American Cyanamid Company, Pearl River, New York, som kultur nr. LL-F28249. En levende kultur af denne nye mikroorganisme er blevet
 5 indleveret hos the Patent Culture Collection Laboratory, Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois 61604 og er indgået i dets permanente samling. Den er frit tilgængelig for offentligheden under deponeringsnummer NRRL 15773.

10

Almindelige fermenteringsbetingelser

15

20

25

Dyrkning af *Streptomyces cyaneogriseus noncyaneogenus*, NRRL 15773, kan foregå i en lang række forskellige flydende dyrkningsmedier. Medier, der kan anvendes til fremstilling af midlerne LL-F28249 α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , κ , λ , μ , ν og ω , omfatter en assimilerbar carbonkilde, såsom dekstrin, saccharose, melasse, glycerol etc., en assimilerbar nitrogenkilde, såsom protein, proteinhydrolysat, polypeptider, aminosyrer, majsstøbevæske etc., og uorganiske anioner og kationer, såsom kalium, natrium, ammonium, calcium, sulfat, carbonat, phosphat, chlorid, etc. Sporelementer såsom bor, molybdæn, kobber etc. tilføres som urenheder fra andre bestanddele i medierne. Beluftning i tanke og kolber sker ved at tvangstilføre steril luft gennem eller på overfladen af fermenteringsmediet. Yderligere bevægelse i tankene sker med et mekanisk skovlhjul. Der kan, om nødvendigt, tilsættes et antiskummemiddel, såsom siliconeolie.

30

Opfindelsen vil i det følgende blive nærmere belyst ved hjælp af eksempler.

Eksempel 1

Fremstilling af podestof

35

Et typisk medium, der anvendes til dyrkning af de forskellige stadier podestof, fremstilles efter følgende opskrift:

0	Dekstrose	1,0%
	Dekstrin	2,0%
	Gærekstrakt	0,5%
	NZ-amin	0,5%
	Calciumcarbonat	0,1%
5	Vand op til	100,0%

Mediet steriliseres. En portion på 100 ml af dette sterile medium i en kolbe inokuleres med mycelieafskrab fra en skråtstillet agar af *Streptomyces cyaneogriseus* noncyanogenus NRRL 15773. Mediet rystes derpå kraftigt på en roterende ryster i 48-72 timer ved 28°C, hvilket giver primært podestof. Dette primære podestof anvendes derpå til at pøde en liter af ovennævnte sterile medium, som derpå dyrkes aerobt ved 28°C i 48 timer, hvorved man får sekundært podestof.

Eksempel 2

Fermentering

Der fremstilles et fermenteringsmedium med følgende sammensætning:

20	Dekstrin	1,0%
	Sojapepton	1,0%
	Melasse	2,0%
	Calciumcarbonat	0,1%
	Vand op til	100,0%

25 Dette medium steriliseres, og derpå inokuleres en portion på 30 liter med 1 liter af det sekundære podestof fremstillet som beskrevet i eksempel 1. Fermenteringen sker ved 30°C med en steril luftstrøm på 30 liter/minut, modtryk 1,56 kg/cm² og omrøring med et skovlhjul, der roterer med 500 omdr/min. i 91 timer, på hvilket tidspunkt mæsken høstes.

Eksempel 3

Isolering af LL-F28249_α, _β og _γ

35 I alt 26 liter af hele den høstede mæsk, der er fremstillet som beskrevet i eksempel 2, blandes med 1500 g diatoméjord og filtreres. Myceliekagen vaskes med 5 liter vand, og filtratet og vaskevæske kasseres. Mycelie-

0 kagen blandes med 10 liter methanol i en time, filtreres
derpå og vaskes med 5 liter methanol. Methanolekstrakten
og methanolvaskevæsken kombineres og inddampes til en van-
dig remanens på ca. 1-2 liter. Denne vandige remanens
5 blandes med det dobbelte volumen methylenchlorid og blan-
des i en halv time. Methylenchloridfasen fraskilles og
inddampes derpå til en sirup, hvilket giver 27 g råma-
teriale.

Disse 27 g råmateriale opløses i en blanding af
methylenchlorid og methanol, filtreres gennem vat og vand-
10 fri natriumsulfat og inddampes derpå, hvilket giver 7,0
g af en olie.

En portion på 170 g silicagel opslættes i 12,5%
ethylacetat i methylenchlorid og hældes op til dannelse
af en kolonne på 2,5 x 58 cm. Olien opløses i 12,5% e-
15 thylacetat i methylenchlorid og påføres kolonnen. Kolon-
nen fremkaldes med samme opløsningsmiddelblanding. Den
mobile fase løber med 1,3 ml/minut til at begynde med,
og der opsamles 15 minutters fraktioner. Strømningsha-
stigheden nedsættes til ca. 0,5 ml/min. efter 10 frak-
20 tioner, så at fraktionerne 1-10 er på 20 ml aftagende
ensartet til ca. 10 ml, og fraktionerne 11-98 er på ca.
7 ml. Ved fraktion 99 forøges strømningshastigheden,
så at der fås 25 ml fraktioner på 10 minutter. Der op-
samles ialt 105 fraktioner. Disse fraktioner afprøves
25 med tyndtlagschromatografi i ethylacetat/methylenchlorid
= 1:1.

Fraktionerne 30-54 kombineres og inddampes, hvil-
ket giver 1,08 g olie, der indeholder LL-F28249_γ.

Fraktionerne 55-62 kombineres og inddampes, hvil-
ket giver 150 mg faststof indeholdende LL-F28249_α og β.

De 150 mg faststof indeholdende LL-F28249_α og β
chromatograferes med præparativ HPLC ved hjælp af en om-
vendt-fase-kolonne ("Whatman[®] C8", 2,2 x 50 cm), fremkaldt
med 80% vol/vol methanol i vand. Strømningshastigheden er
35 ca. 10 ml/min., og der indsamles 2 minutters fraktioner.

0 Fraktionerne 58-69 kombineres, methanolen af-
dampes, der tilsættes tert.butanol, og blandingen lyo-
philiseres, hvilket giver 60 mg ren LL-F28249_a.

Fraktionerne 40-43 kombineres, methanolen afdampes, og den tiloversblevne vandige suspension ekstraheres med methylenchlorid, hvilket efter inddampning giver 10 mg ren LL-F28249_B.

De 1,08 g olie, der indeholder LL-F28249_Y, opløses i 10% ethylacetat i methylenchlorid og påføres en kolonne (2,5 x 50 cm) pakket med silicagel. Kolonnen fremkaldes med 10% ethylacetat i methylenchlorid, idet der elueres med en strømningshastighed på 2 ml/min og opsamles 12 minutters fraktioner. Fraktionerne 19-29 kombineres og inddampes til en remanens, som renses ved præparativ omvendt-fase-chromatografi som beskrevet for α - og β -komponenterne. Fraktionerne 55-62 kombineres, methanolen afdampes i vakuum, der tilsættes tert.butanol, og blandingen lyophiliseres, hvilket giver 60 mg ren LL-F28249_Y.

20 Eksempel 4
Fermentering i stor målestok

Et podestof af *Streptomyces cyaneogriseus* non-cyanogenus, NRRL 15773, fremstilles som beskrevet i eksempel 1, idet der anvendes 100 ml primært podestof til fremstilling af 10 liter sekundært podestof.

Der foretages to gange 300 liters fermentering som beskrevet i eksempel 2, idet der anvendes 10 liter af ovennævnte sekundære podestof til hver 300 liter fermenteringsmedium. Efter 118 timer høstes mæskan.

Isolering af LL-F28249, Eksempel 5

I alt 450 liter høstet mæsk fra de to 300 liters fermenteringer, der er beskrevet i eksempel 4, behandles som beskrevet i eksempel 3's første del, hvilket giver et råmateriale som en sirup.

0 Denne sirupsagtige remanens vaskes med hexan for at fjerne ikke-polære materialer, og de tiloversblevne 9 g uopløseligt materialer underkastes "Sephadex[®] LH-20"-adskillelseschromatografi.

5 Den chromatografiske kolonne fremstilles med 9 "Sephadex[®] LH-20", der i forvejen er kvældet i methanol, så at der dannes en kolonne på 10 x 110 cm. Kolonnen bringes i ligevægt ved at der ledes ca. 4800 ml mobil fase (methylenchlorid/hexan/methanol = 10:10:1) igennem den med en strømningshastighed på 5 ml/min.

10 De 9 g uopløseligt materiale kommes på kolonnen i 50 ml mobil fase. Et indledende forløb på 2150 ml fås med en strømningshastighed på 5 ml/min. Strømningshastigheden forøges derpå til 8 ml/min., og der opsamles fraktioner hver 45 minutter. Fraktionerne 9-12 kombineres,

15 og opløsningsmidlerne afdampes i vakuum, hvilket giver en remanens på 4,9 g.

Denne remanens opløses i en 1:1 blanding af cyclohexan og ethylacetat og for lov at inddampe langsomt ved stuetemperatur. Tilsætningen af n-hexan giver

20 et bundfald, der opsamles, hvilket giver 3,1 g faststof.

3,0 g af dette faststof renses yderligere ved fældning ud fra 25 ml methylenchlorid, ved hjælp af 50 ml n-hexan.

25 Det således opnåede bundfald genopløses i 15 ml methylenchlorid og fældes med 25 ml n-hexan, hvilket giver 510 mg ren LL-F28249.

Eksempel 6

Isolering af LL-F28249 δ, ε, ζ, η, θ, og L

30 Fraktionerne 4-7 fra "Sephadex[®] LH-20"-kolonnen, der er beskrevet i eksempel 5, kombineres, og opløsningsmidlerne afdampes i vakuum, hvilket giver en remanens på 1,9 g.

35 Denne remanens chromatograferes på en kolonne af 200 g silicagel (2,5 x 83 cm), idet der anvendes 10% ethylacetat i methylenchlorid som elueringsmiddel.

0 Strømningshastigheden er ca. 2 ml/min., og der opsamles fraktioner hver 12 minutter.

Fraktionerne 65-67 og 73-79 kombineres sammen og opløsningsmidlerne afdampes i vakuum, hvilket giver
5 250 ml remanens.

Disse 250 mg remanens underkastes præparativ omvendt-fase-chromatografi som beskrevet i eksempel 3, men der anvendes 75% methanol i vand som den mobile fase. Strømningshastigheden er ca. 10 ml/min. Den første por-
10 tion på 2000 ml af eluatet kasseres, derpå opsamles 72 fraktioner med 2 minutters mellemrum. Efter at endnu en portion eluat er kasseret (mellem 300 og 400 ml), op-
samles igen fraktioner, men med mellemrum på 2,5 minutter.

Fraktionerne kombineres som anført nedenfor. De kombinerede fraktioner får lov at inddampe i et stink-
15 skab natten over, derpå ekstraheres komponenterne over i methylenchlorid. Efter afdampning af opløsningsmidlet opnås ca. 1 ml af hver ren komponent.

	<u>Komb. fraktioner</u>	<u>Forbindelse</u>
20	7-10	LL-F28249 _δ
	19-22	LL-F28249 _ε
	28-31	LL-F28249 _γ
	81-83	LL-F28249 _η
25	86-88	LL-F28249 _θ
	93-95	LL-F28249 _ι

Eksempel 7

Isolering af LL-F28249_κ, λ, μ og ν

30 Ialt 390 liter fermenteringsmæsk høstet fra fermenteringer foretaget som beskrevet i eksempel 2, oparbejdes hovedsagelig som beskrevet i første afsnit af eksempel 3, hvilket giver 120 ml methylenchloridkoncentrat. Dette koncentrat fortyndes med 200 ml hexan og afkøles natten over ved 4°C. Det fremkomne bundfald
35 fjernes ved filtrering og kasseres. Filtratet fortyndes med 300 ml hexan. Det fremkomne bundfald (A) opsamles ved filtrering og opbevares. Dette filtrat inddam-

0 pes til tørhed, og den olieagtige remanens opløses derpå i 200 ml methylenchlorid og fortyndes med 1700 ml hexan. Det fremkomne bundfald (B) opsamles ved filtrering og opbevares. Dette filtrat koncentrerer til en
5 olieagtig remanens, som derpå atter opløses i 50 ml methylenchlorid, der tilsættes 950 ml methanol, og denne opløsning opbevares ved 4°C i 3 dage. Det fremkomne bundfald fjernes ved filtrering og kasseres. Filtratet inddampes til tørhed, og remanensen (C) kombineres
10 med (A) og (B) og underkastes chromatografi på følgende måde: Kolonnen på 5,0 x 109 cm opslæmningspakkes med "Woelm TSC"-silicagel i ethylacetat/methylenchlorid = 1:9. Kolonnen fremkaldes med samme opløsningsmiddelblanding ved en hastighed på 25 ml/min. De første 2
15 liter afløbsvæske kasseres, derpå opsamles 16 400 ml fraktioner.

Fraktionerne 2 og 3 kombineres og inddampes, hvilket giver 3,9 g olieagtigt materiale (D).

20 Fraktionerne 4-7 kombineres og inddampes, hvilket giver 9,5 g olieagtigt materiale, som opløses i hexan og chromatograferes på en 2,5 x 110 cm kolonne, der er opslæmningspakket med 300 g "Woelm"-silicagel i ethylacetat/hexan = 1:4. Kolonnen fremkaldes med samme opløsningsmiddelsystem med en hastighed på 4 ml/min.,
25 idet der opsamles fraktioner med 7 minutters mellemrum,

Fraktionerne 45-54 kombineres og inddampes, hvilket giver 0,3 g materiale (E).

30 Fraktionerne 63-135 kombineres, inddampes til tørhed, opløses derpå igen i tert.butanol og lyophiliseres, hvilket giver 4,6 g næsten hvidt faststof (F).

LL-F28249 k' og u

35 Materiale (D) og (E) kombineres og chromatograferes på en 2,5 x 110 cm kolonne pakket med 300 g "Woelm"-silicagel, idet der fremkaldes med ethylacetat/hexan = 1:9. Strømningshastigheden holdes på 4 ml/min., og der opsamles fraktioner med 7 minutters mellemrum.

0 Fraktionerne 67-115 kombineres og inddampes til tørhed, hvilket giver 920 mg remanens (G).

Denne remanens (G) chromatograferes ved præparativ HPLC ved hjælp af en omvendt-fase-kolonne ("Whatman[®] C8" (2,2 x 50 cm) og fremkalderes med 85% vol/vol methanol i vand. Strømningshastigheden er ca. 10 ml/min.,
5 og der opsamles fraktioner med 2,5 minutters mellemrum.

Fraktionerne 33-40 kombineres, inddampes for at fjerne methanolen, ekstraheres derpå med methylenchlorid. Remanensen, der fås efter inddampning, opløses i tert.butanol og lyophiliseres derpå, hvilket giver 60 mg LL-F28249_K.

Fraktionerne 52-58 oparbejdes på lignende måde, hvilket giver en lille smule LL-F28249_u.
LL-F28249_λ

15 1 g af materiale (F) chromatograferes ved omvendt-fase-HPLC, som beskrevet ovenfor, med undtagelse af, at der anvendes 80% vol/vol methanol i vand som elueringsmiddel.

Fraktionerne 61-75 kombineres og oparbejdes som ovenfor, hvilket giver 100 mg LL-F28249_λ.
LL-F28249_γ

396 g materiale hovedsagelig det samme som materiale (D) ovenfor opløses i 500 ml methanol og afkøles derpå ved 4°C i flere timer. Det fremkomne bundfald fjernes ved filtrering, vaskes med kold methanol og kasseres. Filtrat og vaskevæske kombineres og inddampes. Residualolien opløses i hexan og fyldes på en 5 x 50 cm tørt pakket silicagelkolonne ("Mallinkrodt[®] SilicAR cc-7"). Kolonnen elueres med ethylacetat/hexan = 1,5: 8,5 med en hastighed på ca. 50 ml/min.
25
30

Der opsamles fire fraktioner:

	Fraktion	Volumen (liter)
	1	1
	2	4
35	3	1
	4	2

Fraktion 3 inddampes, hvilket giver 5,0 g re-
manens, som renses ved præparativ omvendt-fase HPLC
("Waters C₁₈", 5 x 60 cm). Kolonnen fremkaldes først
med 16 liter 80% methanol i vand, vol/vol. Den første
5 liter afløbsvæske kasseres, og derpå opsamles fraktio-
ner på 400 ml.

Fraktionerne 44-47 kombineres og oparbejdes som
beskrevet ovenfor og giver 390 mg LL-F28249, som et
bleggult faststof.
10

Eksempel 8

LL-F28249, NRRL 15773's fermenteringsvæskes antinematodiske virkning

Denne in-vitro-prøve er tænkt benyttet til den frit
15 levende nematode *Caenorhabditis elegans* (C. elegans) for at
påvise fermenteringsvæskers anti-nematodiske virkning mod
mikroorganismer fra jorden. Prøvemethoden består i, at der
pipetteres 50 µliter af hver væske i et af 96 huller på en
mikrodyrkningsplade, hvorpå der tilsættes 10 µliter af en
20 3-4 dage gammel kultur af C.elegans (i alle udviklingssta-
dier) suspenderet i C.briggsae-vedligeholdelsesmedium. Fer-
menteringsvæskernes virkninger iagttages og noteres 48 timer
efter den indledende blanding af væske og nematoder.

LL-F28249, NRRL 15773-væske dræber alle voksne og
25 reducerer udpræget overlevelsen og mobiliteten hos forskel-
lige larvestadier ved både den indledende og en gentagel-
sesprøve.

Eksempel 9

In-vivo anthelmintisk aktivitet hos fermenteringsprodukter 30 fra LL-F28249, NRRL 15773

Dette in-vivo-system skal påvise potentiel anthelmin-
tisk aktivitet hos alle fermenteringsprodukter, der viser
sig at have anti-nematodisk virkning mod C.elegans. Prøver
af LL-F28249, NRRL 15773 blandes i foder med koncentrationer
35 fra 0,0031% til 2,0% (31 ppm til 20.000 ppm). Den medicin-
tilsatte kost, der indeholder de varierende koncentrationer

af fermenteringsprodukter fra LL-F28249, NRRL 15773, gives til Gerbillus-mus inficeret med 400 3. st.-larver af Trichostrongylus colubrifomis. Det medicintilsatte foder gives ad libitum, begyndende når infektionen er 7 dage gammel i

5 1/2 til 4 dage, hvorefter Gerbillus-musene obduces. Indvoldene fjernes og anbringes i vand i en inkubator ved 45°C i 2 timer, så at parasitterne kan udvandre fra vævet. Hver behandlings effektivitet bestemmes ved at opgøre antallet af T. colubrifomis, der er tilbage, sammenlignet med en

10 ubehandlet kontrol. Resultaterne af disse eksperimenter, der er anført i tabel XV nedenfor, viser den anthelmintiske aktivitet hos et fermenteringsprodukt fra LL-F28249, når det indgives i foder, indgives som en enkelt oral portion eller ved subcutan injektion.

Tabel XV

Anthelmintisk aktivitet i aktive stoffer fra LL-F28249, NRRL 15773-kultur mod

Trichostrongylus colubriformis hos Gerbillus-mus

F-28249		Med medicintilsat foder, ad libitum			
Hel mæsk (lyophiliseret)	Konc. (ppm)	500,0	250,0	125,0	62,5
	Effekt. %	100,0	98,0	88,0	40,0
α	Konc. (ppm)	20,0	0,5	0,1	0,05
	Effekt. %	100,0	100,0	97,0	31,0
Med en enkelt oral dosis					
Hel mæsk (lyophiliseret)	Dosis (mg/kg)	200,0	100,0	50,0	25,0
	Effekt. %	100,0	100,0	100,0	88,0
α	Dosis (mg/kg)	10,0	0,5	0,1	0,05
	Effekt. %	100,0	100,0	100,0	99,0
γ	-	-	-	0,1	0,05
ω	-	-	-	78,0	15,0
	-	-	-	0,1	0,025
				30,0	10,0
Med subcutan injektion					
Hel mæsk (lyophiliseret)	Dosis (mg/kg)	200,0	100,0	50,0	25,0
	Effekt. %	100,0	100,0	100,0	70,0
α	Dosis (mg/kg)	1,0	0,2	0,1	0,05
	Effekt. %	100,0	99,5	60,0	10,0

0

Eksempel 10Anthelmintisk aktivitet hos LL-F28249_α mod parasitiske
nematoder hos får

5 Dette forsøg er tænkt til bedømmelse af aktiviteten hos LL-F28249_α mod de økonomisk vigtige parasitter hos får. Fårene inokuleres ved forsøget med smitsomme larver af *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* og *Trichostrongylus colubriformis* for at opbygge infektioner, som LL-F28249_α kan afprøves imod.

10 21 dage efter inokulering bestemmes infektionsniveauer ved en standard tællemetoder til "stoll"-tælling af nematoder for at bestemme antallet af æg af hver art pr. g fæces. Fårene fordeles tilfældigt under tre behandlingsgentagelser og kontrolgrupper baseret på tællinger

15 af nematodeæg. 22 dage efter infektion behandles fårene med LL-F28249_α med de doser og indgiftsveje, der er vist i tabel XVI nedenfor. 78 dage efter behandling aflives fårene, og ormene indsamles ved hjælp af standardmetoder til anthelmintisk bedømmelse. Hver behandlings

20 effektivitet mod hver art bestemmes ved at sammenligne antallet af orme ved de respektive doser med antallet af orm, der findes hos de tre ubehandlede kontroldyr. Resultaterne af disse bedømmelser, der er anført i tabel XVI nedenfor, viser hvor effektivt LL-F28249_α er

25 som anthelmintisk middel.

30

35

0

Tabel XVI

F28249's anthelmintiske effektivitet mod Haemonchus,
Ostertagia og Trichostrongylus hos får

	Dosis	Indgifts-	<u>Effektivitet (%) mod</u>		
5	mg/kg	vej	Hæmonchus	Ostertagia	T.colubriform.
	1,0	oral	100,0	100,0	99,9
	0,2	oral	100,0	100,0	99,9
	0,1	oral	100,0	95,4	99,9
	1,0	IM	100,0	100,0	100,0
10	0,2	IM	100,0	100,0	100,0
			<u>Gennemsnitligt antal fundne orme (omtr.)</u>		
	0,0	-	2683,0	881,0	16.200,0

IM = intramuskulær

15

Eksempel 11

Antibiotisk LL-F28249's effektivitet mod insektpara-
sitten Melophagus ovinus hos får (fåretæge)

Dette forsøg gennemføres løbende på det samme får, der anvendes til bestemmelse af anthelmintisk aktivitet som anført i eksempel 10. Fåret iagttages før behandling med hensyn til naturlige angreb af M. ovinus. Halvdelen af hvert får inspiceres for tegn på anti-ektoparasitisk aktivitet ved obduktion 7 dage efter behandling.

25

Hvert fårs venstre side klippes langsomt med elektrisk saks og inspiceres for levende og døde eksemplarer. Angrebsgraden anslås tilnærmelsesvis ved det antal pupper, der findes i ulden under inspektion og bedømmes fra 0 til +++, dvs. ingen pupper til mange pupper. Antallet af eksemplarer noteres for hvert får uden kendskab til behandlingsniveauer for at opnå en uvildig bedømmelse. Indledningsvis noteres eksemplarer som levende eller døde, men efterhånden som man opnår erfaring, kan nogle eksemplarer noteres som døende på grund af en abnormt langsom adfærd.

35

Selv om der forekommer store variationer i det

0

antal eksemplarer, der findes på fåret, viser de data, der er anført i tabel XVII nedenfor, at LL-F28249_α er effektiv mod *M. ovinus*, og at midlet har systemisk ekto-
toparasitoid aktivitet. Hos behandlede dyr reduceres
5 antallet af levende eksemplarer effektivt, og antallet af døde eksemplarer forøges hos de med intramuskulær injektion behandlede får.

Tabel XVII

10 Midlet F28249_α's effektivitet mod *Melophagus ovinus* hosfår

Dosis mg/kg	Indgifts- vej	Gen.sn. antal eksemplarer ^{a)}		
		Levende	Døde	%
1,0	Intramusk.	1,67	1,67	78,22
15 0,2	Intramusk.	1,00	4,33	86,96
1,0	Oral	7,67	0,0	0,0
0,2	Oral	2,67	3,0	65,0
0,1	Oral	22,0	1,67	0,0
Kontrol	-	7,67	0,67	-

20

a) Tre får pr. dosis

b) Effektivit % =

$$100 \times \frac{\text{Gensn. antal hos kontr.} - \text{gensn. antal hos beh.}}{\text{Gensn. antal hos kontr.}}$$

25

Eksempel 12Insekticid aktivitet hos LL-F28249_α og γ

Den insekticide aktivitet hos LL-F28249_α og γ mod en række forskellige insekter ved forskellige koncen-
trationer af aktivt stof i acetone/vand-opløsninger bestem-
30 mes ved hjælp af følgende insekticide prøveeksempler. Resultaterne af disse prøver findes i tabel XVIII.

(A) *Heliothis virescens*, æg af tobaksknoporm. Et
35 ungt bomuldsblad ca. 7-8 cm langt dyppes og bevæges i en prøvesuspension i 3 sek. Æg samles på osteklæde, som er skåret i kvadrater på 10-20 mm indeholdende ca. 50-100 æg (6-30

0

timer gamle). En kvadrat osteklæde med æg dyppes også i prøvesuspensionen og anbringes på det behandlede blad. Kombinationen anbringes i en "Dixie[®]-skål nr. 2168-ST" (240 ml, 6 cm høj, øverste diameter 9,5 cm, bunddiameter 8 cm) indeholdende 5 cm fugtig dentalvæge. Et klart plastlåg lægges på skålen, og behandlingerne pågår i 3 dage, før der foretages optælling af døde eksemplarer.

5 (B) Aphis fabae, blandede stadier, bedelus. Potter indeholdende en enkelt nasturtium-plante (*Tropaeolum* sp.) ca. 5 cm høj smittes med ca. 100 bladlus en dag før prøven. I et skab sprøjtes hver plante med prøvesuspensionen 2 omdrejninger af en drejeskive ved 4 omdr./min. med en "nr. 154 DeVillbus"-forstøver. Potterne sættes til side på hvide emaljerede bakker og opbevares i 2 dage. Herefter foretages et skøn af antallet af døde bladlus.

15 (C) Empoasca abrupta, voksen kartoffelcikade.

Et Sieva limabønneblad ca. 5 cm langt dyppes og bevæges i prøvesuspensionen i 3 sekunder og anbringes derpå i et skab for at tørre. Bladet anbringes i en 20 100 x 10 mm petriskål indeholdende fugtigt filtrerpapir i bunden af skålen. Der tilføres 10 voksne eksemplarer til hver skål, og behandlingerne foregår i 3 dage, hvorefter der foretages tælling af døde eksemplarer.

(D) Trichoplusia ni, tredje stadium's larver af kålmåler.

25 Blade af en Sieva-limabønneplante udfoldet til 7-8 cm's længde dyppes og bevæges i en prøvesuspension i 3 sekunder og anbringes derpå i et skab for at tørre. Et blad udskæres derpå og anbringes i en 100 x 10 mm petriskål indeholdende fugtigt filtrerpapir i bunden, og der anbringes 10 3.stadium's larver derpå. Skålen opbevares i 3 dage, før der foretages observationer med hensyn til dødelighed og reduceret fødeindtagelse.

30 (E) Spodoptera eridanis, 3.stadium's larver af hærorm.

Bladene fra en Sieva limabønneplante udfoldet 35 til 7-8 cm's længde dyppes og bevæges i prøvesuspensionen i 3 sekunder og anbringes i et skab for at tørre.

0

Derpå udskæres et blad og anbringes i en 100 x 10 mm petriskål indeholdende fugtigt filterpapir i bunden, og der tilføres 10 larver i 3. stadium. Skålen opbevares i 5 dage, før der foretages observationer med hensyn til dødelighed, reduceret fødeindtagelse eller eventuel forstyrrelse af normalt hamskifte.

5

(F) Heliothis virescens, larver i 3. stadium.

Bomuldskimblade dyppes i prøvesuspensionen og anbringes i et skab for at tørre. Kimbladet skæres i 4 dele, og hver del anbringes i et 30 ml plastmedicinsbæger indeholdende et stykke på 5-7 mm fugtig dentalvæge. Der tilsættes en larve i 3. stadium til hvert bæger, og der lægges et paplåg over bageret. Behandlinger opretholdes i 3 dage, før der foretages optælling af døde eksemplarer og skøn af reduceret fødeindtagelse.

15

(G) Musca domestica, husflue.

Den ønskede koncentration af prøveforbindelsen tilsættes til standard CSMA-lucerneklid-larvemedium. Husflueæg, 0-4 timer gamle, tilsættes til det behandlede medium. Det behandlede medium opbevares, og der foretages observationer med hensyn til ægklækning, larvækst og fremkomst af voksne eksemplarer.

20

(H) Tribolium confusum. Melbiller fås

fra laboratoriekolonier opdrættet på en blanding af hvidt og hvidt mel. Til denne prøve behandles hvidt mel med en acetoneopløsning af prøvematerialet, idet der anvendes 1 ml opløsning pr. 5 g mel i en 30 ml krukke med bred åbning. Acetonen afdampes i et skab natten over. Indholdet omrøres med en spatel for at udrøre klumper, der er dannet af prøveopløsningen. Krukken anbringes dernå på en "Vortes-Genie" vibrationsblandemaskine, så at prøvematerialet blandes omhyggeligt i foderet. 10 voksne eksemplarer anbringes i hver krukke, og der lægges løst låg på krukken.

30

Efter 5 dage til æglægning fjernes insekterne, og eventuel dødelighed noteres. 2 og 4 uger efter den ind-

35

0

ledende smitning foretages observationer vedrørende antal og spor frembragt af udviklende larver gennem det behandlede mel. Sådanne iagttagelser viser forsinket vækst, dræbte æg eller larver eller eventuel anden forstyrrelse i det normale vækstmønster. Efter ca. 9 uger ved 27°C kommer de voksne eksemplarer frem, og de sidste observationer foretages ved at lade indholdet af hver krukke passere gennem en 50 mesh sigte. Disse observationer omfatter antallet af voksne, pupper og larver samt undersøgelse af affald, som ikke passerer gennem sigten, for at bestemme, om der findes døde æg eller nyklækkede.

10

(I) Tetranychus urticae (P-resistent stamme)

Sieva-limabønneplanter med primære blade udfoldet til 7-8 cm udvælges og skæres tilbage til en plante pr. potte. Der skæres et lille stykke af et blad taget fra hovedkolonien og anbringes på hvert blad på prøveplanterne. Dette gøres ca. 2 timer før behandling, for at miderne får tid til at flytte over på prøveplanten og lægge æg. Størrelsen af det udskårne stykke varieres, så at der fås ca. 100 mider pr. blad. På behandlingstidspunktet fjernes bladstykket, der blev brugt til at overføre miderne, og kasseres. De med mider smittede planter dvæbes og bevæges i prøvetilberedningen i 3 sekunder og anbringes i et skab for at tørre. Planterne opbevares i 2 dage, før der foretages et skøn over voksne dræbte eksemplarer ved hjælp af det første blad. Det andet blad bliver på planten i endnu 5 dage, før der foretages observationer af dræbte æg og/eller nyligt udviklede nymfer.

20

25

30

(J) Spodoptera eridania, hørorm i 3. stadium, systemisk prøve med nedskåret stilk.

Forbindelsen tilberedes som en emulsion indeholdende 0,1 g prøvemateriale, 0,1 g polyethoxyleret vegetabilsk olie i 0,4 g vand, 10 ml acetone og 90 ml vand. Dette fortyndes ti gange med vand, hvilket gi-

35

0

ver den 100 ppm-emulsion, der skal anvendes til prøven. Sieva-limabønneplanter med netop udfoldede primærblade anvendes til denne prøve. Disse blade skæres af mindst 2,5 cm over jordniveau for at undgå forurening med jordbakterier, der kan få stilken til at rådne under prøven. De afskårne stilke anbringes i prøveemulsionen. Efter 3 dages optagelse afskæres bladet og anbringes i en 100 x 10 mm petriskål indeholdende fugtigt filterpapir i bunden og 10 larver i 3. stadium. Der foretages optælling af døde eksemplarer og skøn af reduceret fødeindtagelse efter 3 dages forløb.

5

10

(K) Thrips palmi

Svært angrebne blade af bomuldsfrøplanter sprøjtes under markbetingelser med de ønskede koncentrationer. Antallet af thrips tælles før og efter sprøjtning. Bekæmpelsen i procent er baseret på disse tællinger.

15

(L) Tetranychus urticae (P-resistent stamme)

Forbindelsen oparbejdes som en emulsion indeholdende 0,1 g prøvemateriale, 0,1 g polyetyleret vegetabilsk olie i 0,4 g vand, 10 ml acetone og 90 ml vand. Dette fortyndes 10 gange med vand, hvilket giver en 100 ppm emulsion til prøven. Sieva-limabønneplanter med lige udfoldede primærblade anvendes til prøven. De afskæres mindst 2,5 cm over jordbundsniveau for at undgå forurening med jordbakterier, som kan få stilken til at rådne under prøven. De afskårne stilke anbringes i prøveemulsionerne. Hvert blad smittes med ca. 100 voksne mider og opbevares i 3 dage, hvorefter dødeligheden optælles.

20

25

30

35

Tabel XVIII

F-28249 's og F-28249 's insecticide og miticide aktivitet i % dødelighed													
Forbin- delse	Konc. ppm	Trich. ni	Spod. erd.	Hel. vir.	Hel. æg	Aphis fabae	Emp. abr.	Trib. conf.			Plantesy- st. ækt.		
								larve og/el.	larver	Thrips	Spod.	erid.	Mider
F-28249 _α	1000	100	100	100	-	-	55*	100	100	93	-	-	-
F-28249 _α	300	100*	-	100	100	-	50	-	100	89	100	-	-
F 28249 _α	100	-	60*	100*	100	100	-	97	-	-	100	60	100
F-28249 _γ	1000	-	40	50*	100	100	20	-	-	-	100	-	-
F-28249 _γ	100	-	0	0	0	100	0	-	-	-	90	-	-

* Fødeafvisende (anti-fødeoptagelsesegenskaber)

P a t e n t k r a v

Biologisk ren kultur af mikroorganismen *Streptomyces*
cyaneogriseus noncyanogenus LL-F28249 med deponeringsnummeret
5 NRRL 15773.

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM
FOR LL-F28249a 10 µg/ml i MeOH

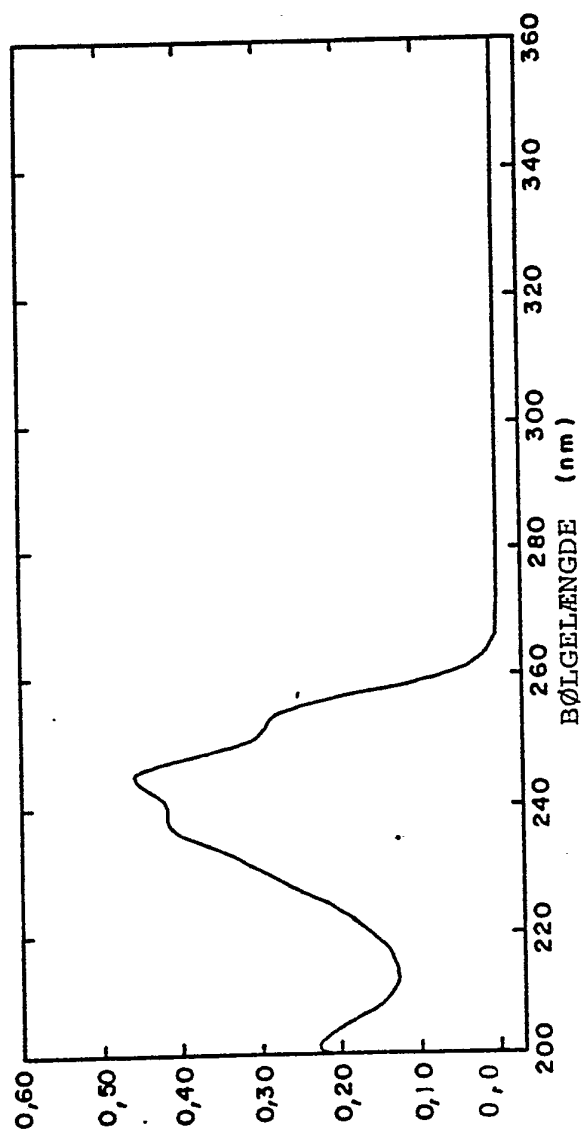


FIG I

INFRARØDT ABSORPTIONSSPEKTRUM
FOR LL-F28249a (KBr-skive)

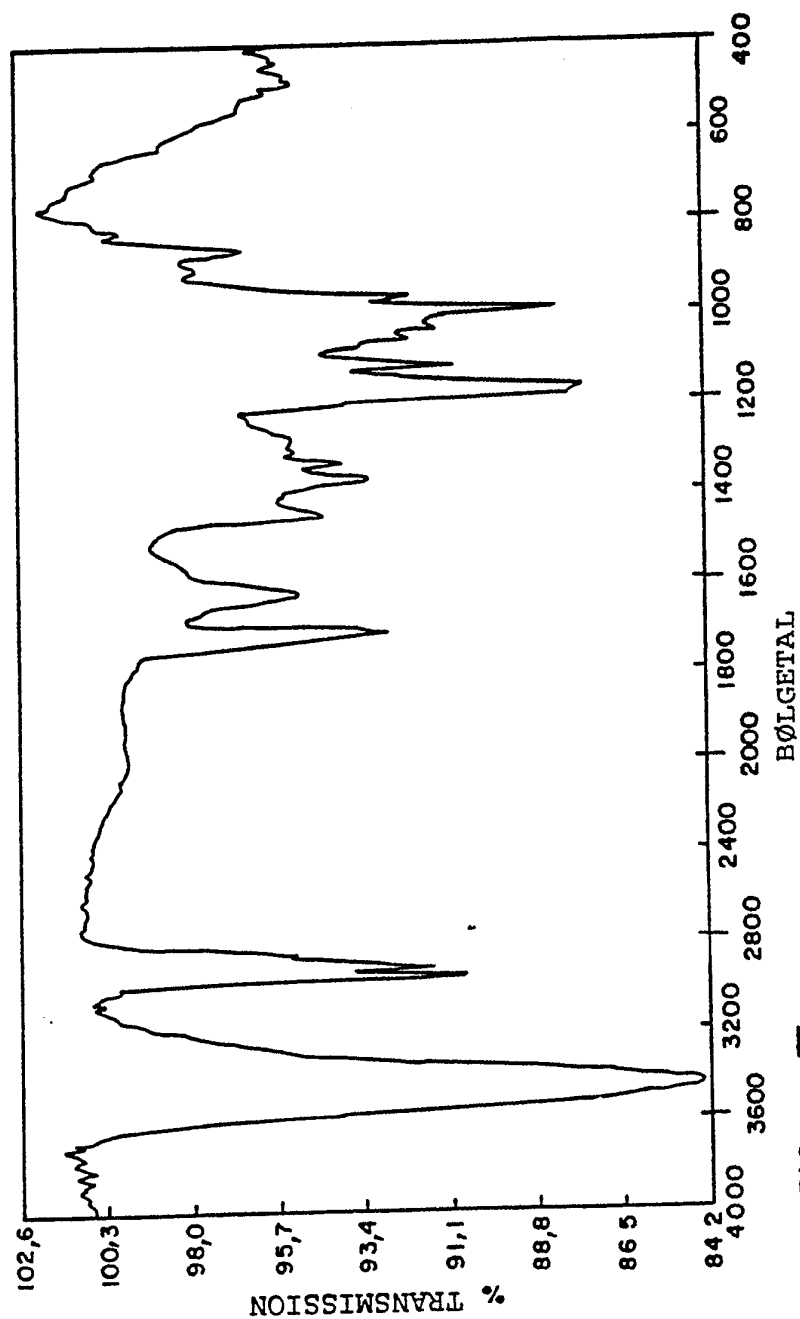


FIG II

PROTONKERNMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM
FOR LL-F28249 α I CDCl₃

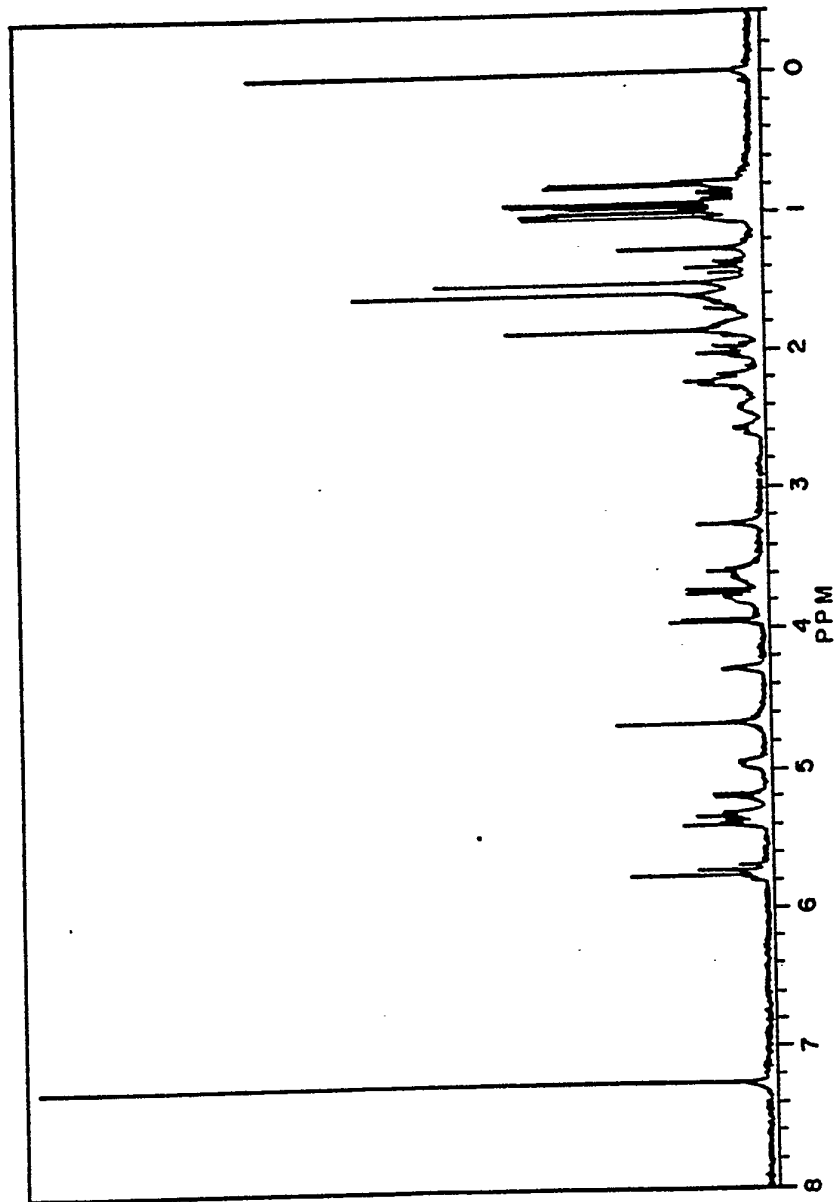


FIG III

CARBON-13-KERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM
FOR LL-F28249a I CDCl_3 -OPLØSNING

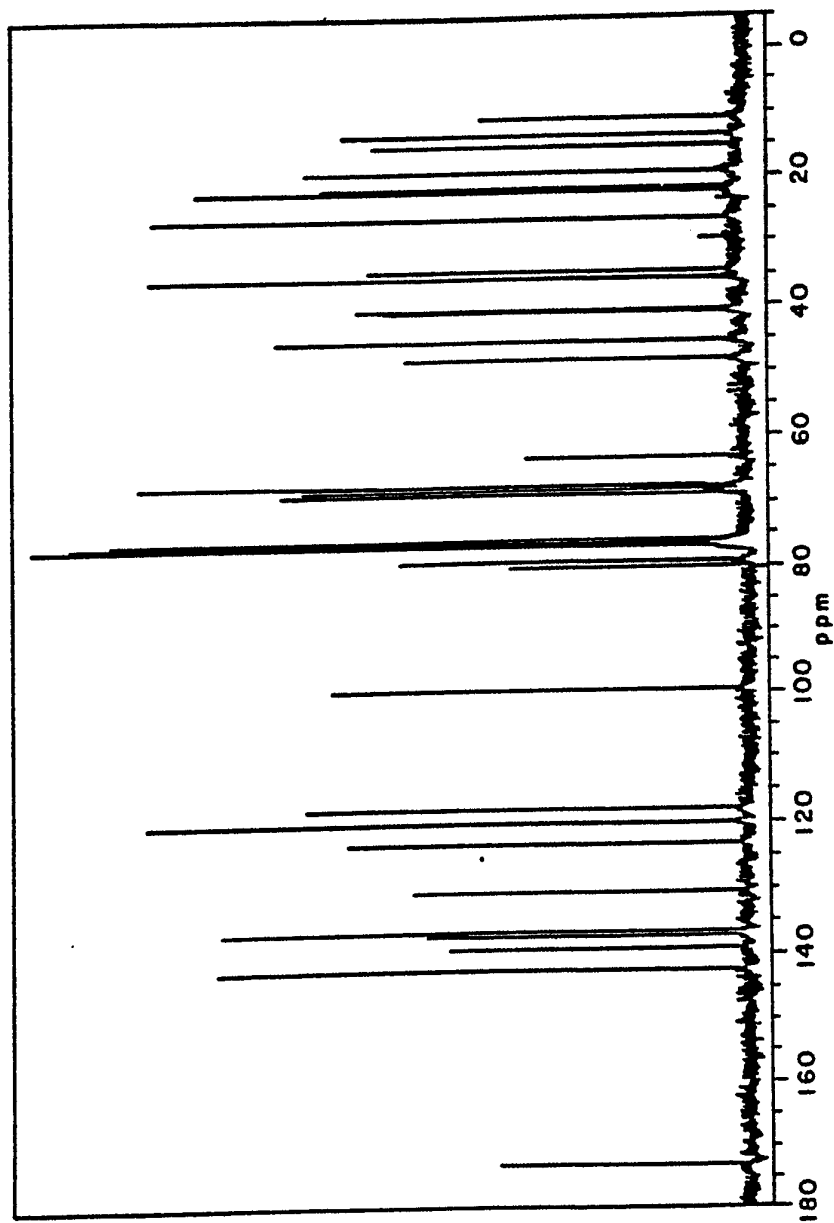


FIG IV

ELEKTRONANLAGSMASSESPEKTRUM
FOR LL-F28249 α

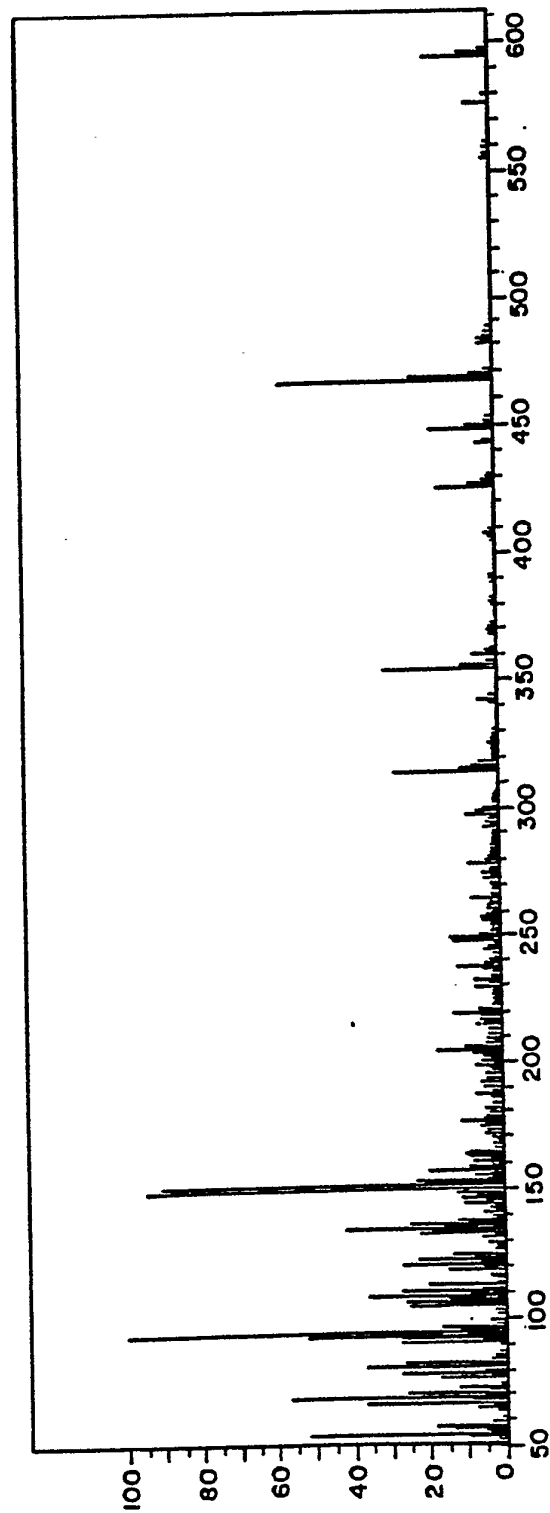
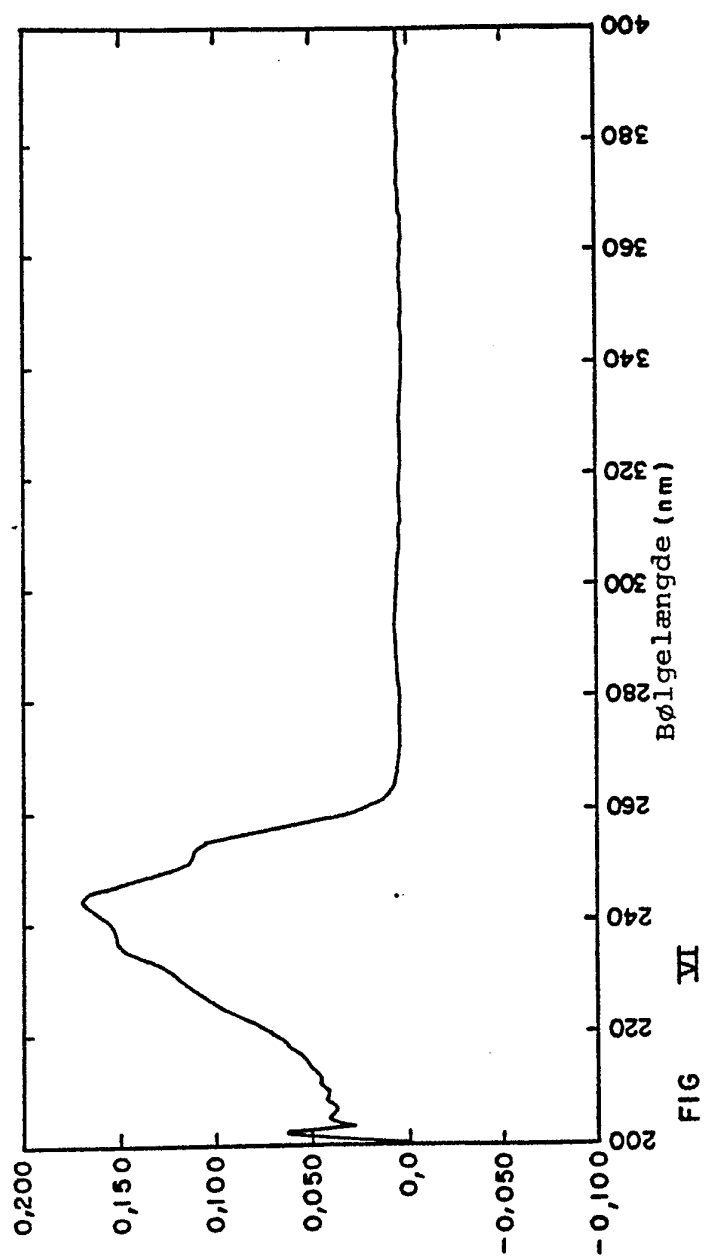


FIG V

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249B
10 µg/ml i MeOH



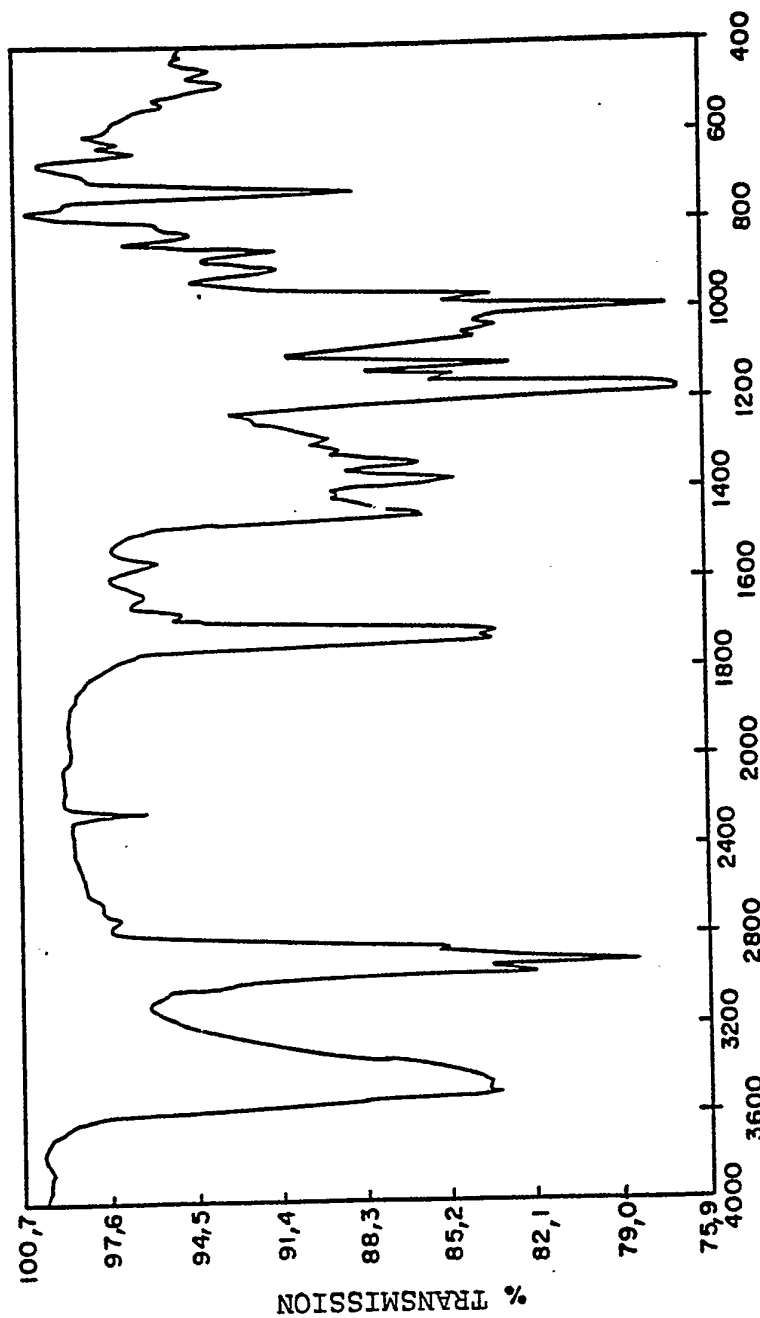
INTRARØDT ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249 β (KBr-SKIVE)

FIG VII BØLGETAL

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F282498 I CDCl_3 -OPLØSNING

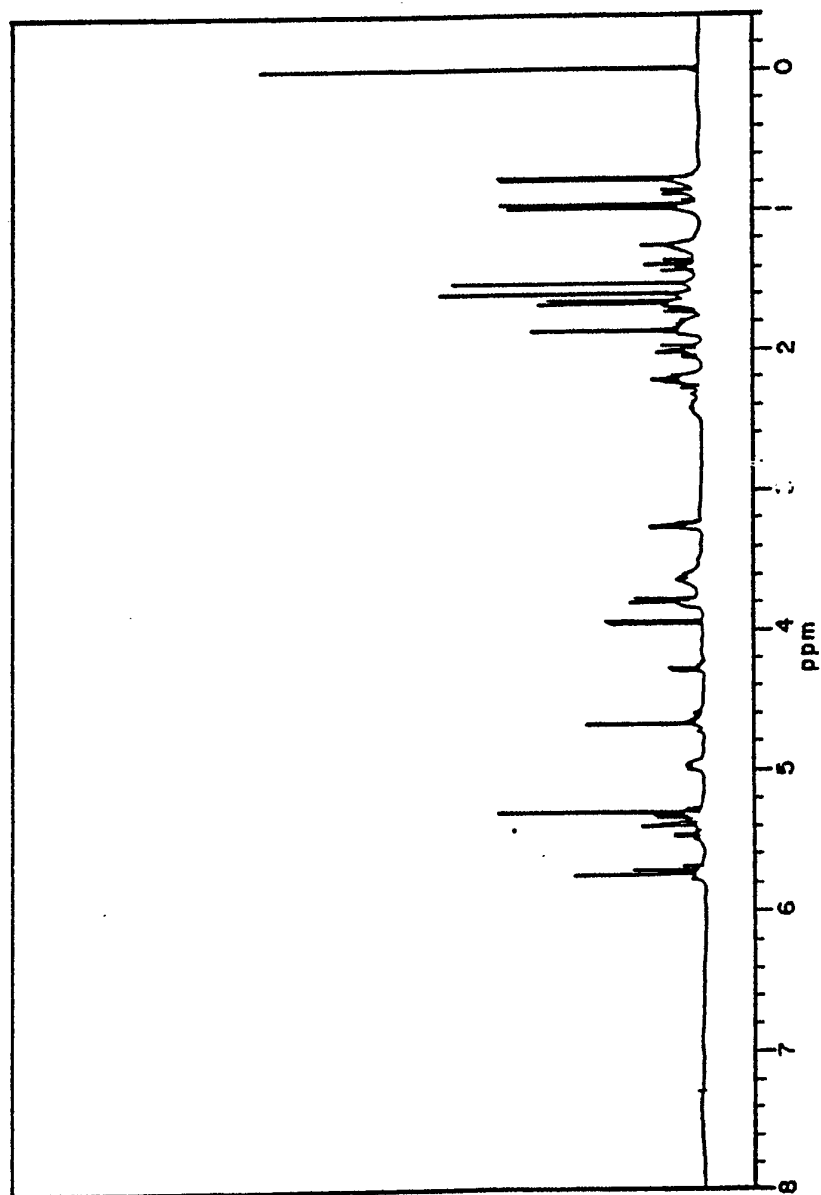


FIG VIII

ELEKTRONANSLAGMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249B

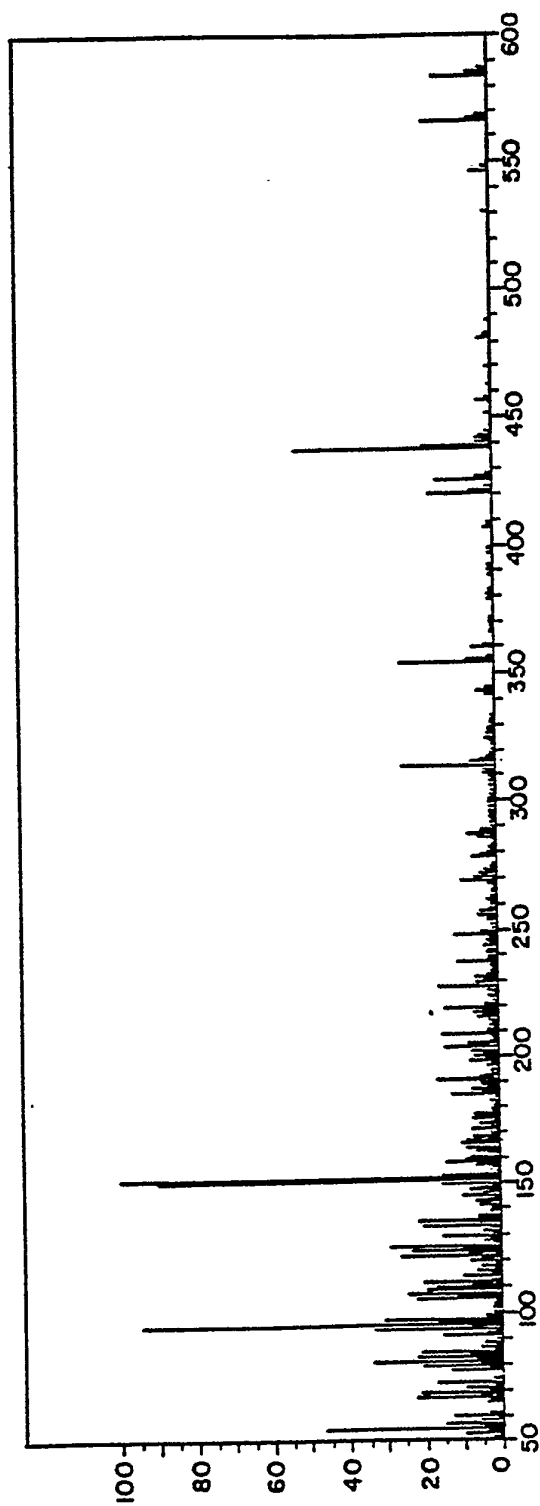


FIG IX

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249Y
10 µg/ml i MeOH

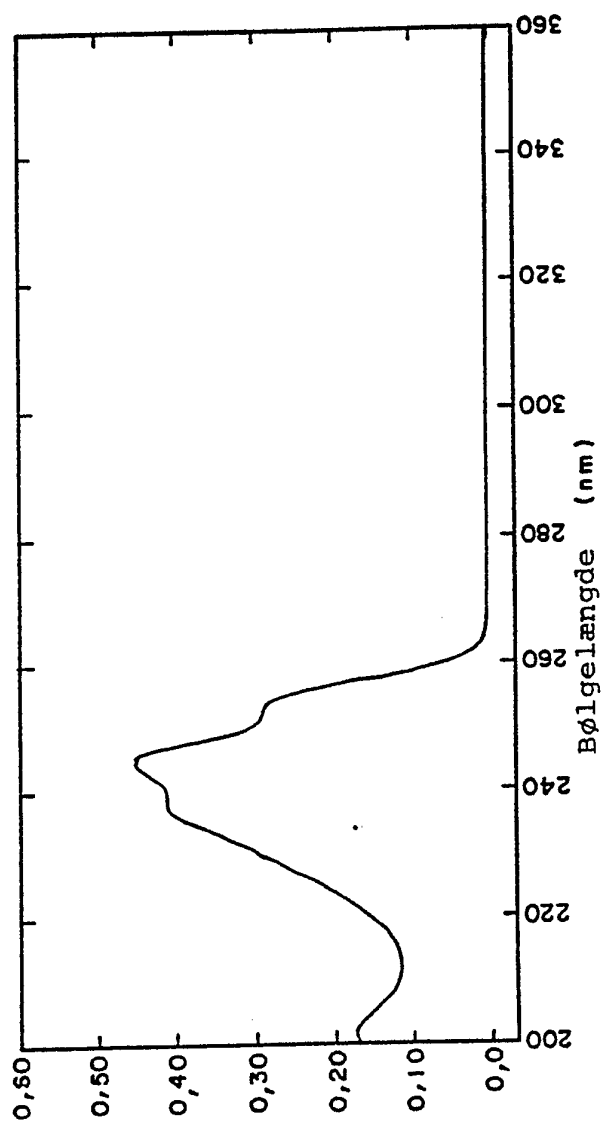


FIG 1

INFRARØDT ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249Y (KBr-SKIVE)

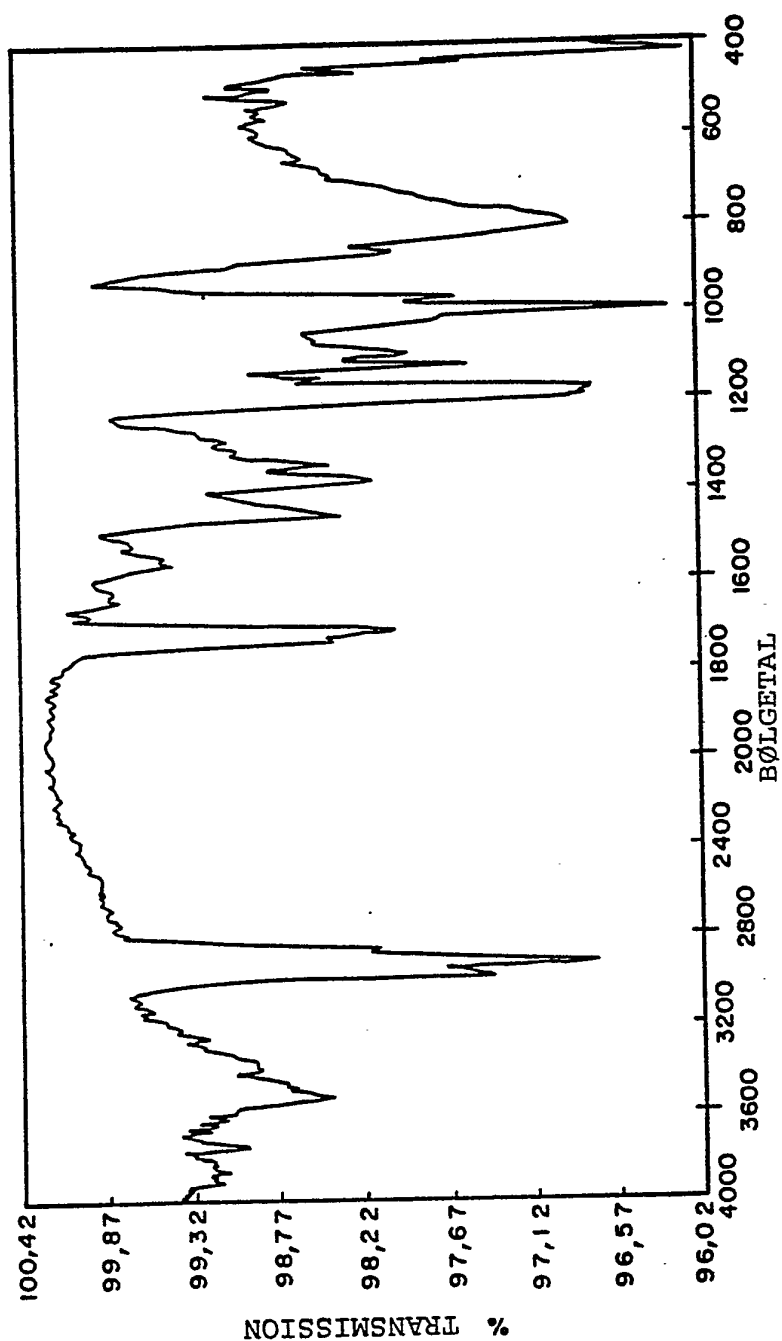


FIG XI

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249Y I
CDCl₃-OPLØSNING

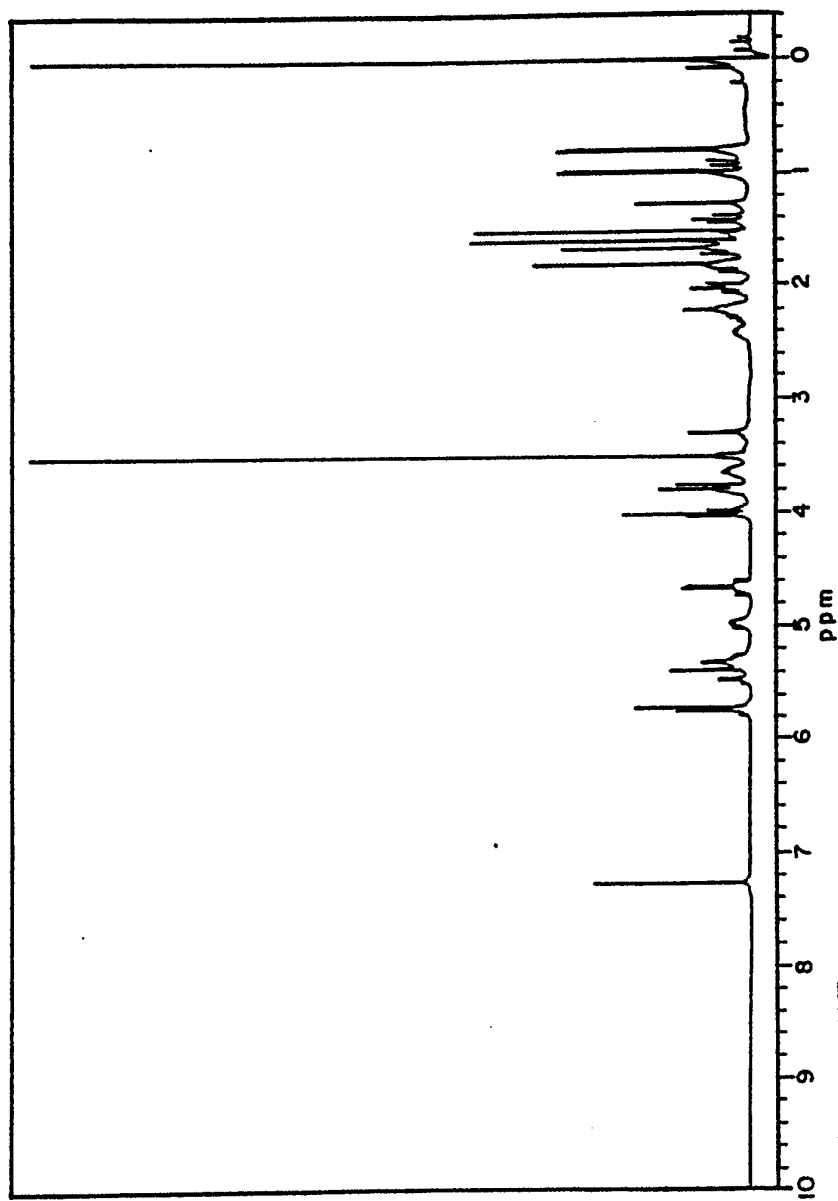


FIG XII

CARBON-13-KERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249Y I
CDCl₃-OPLØSNING

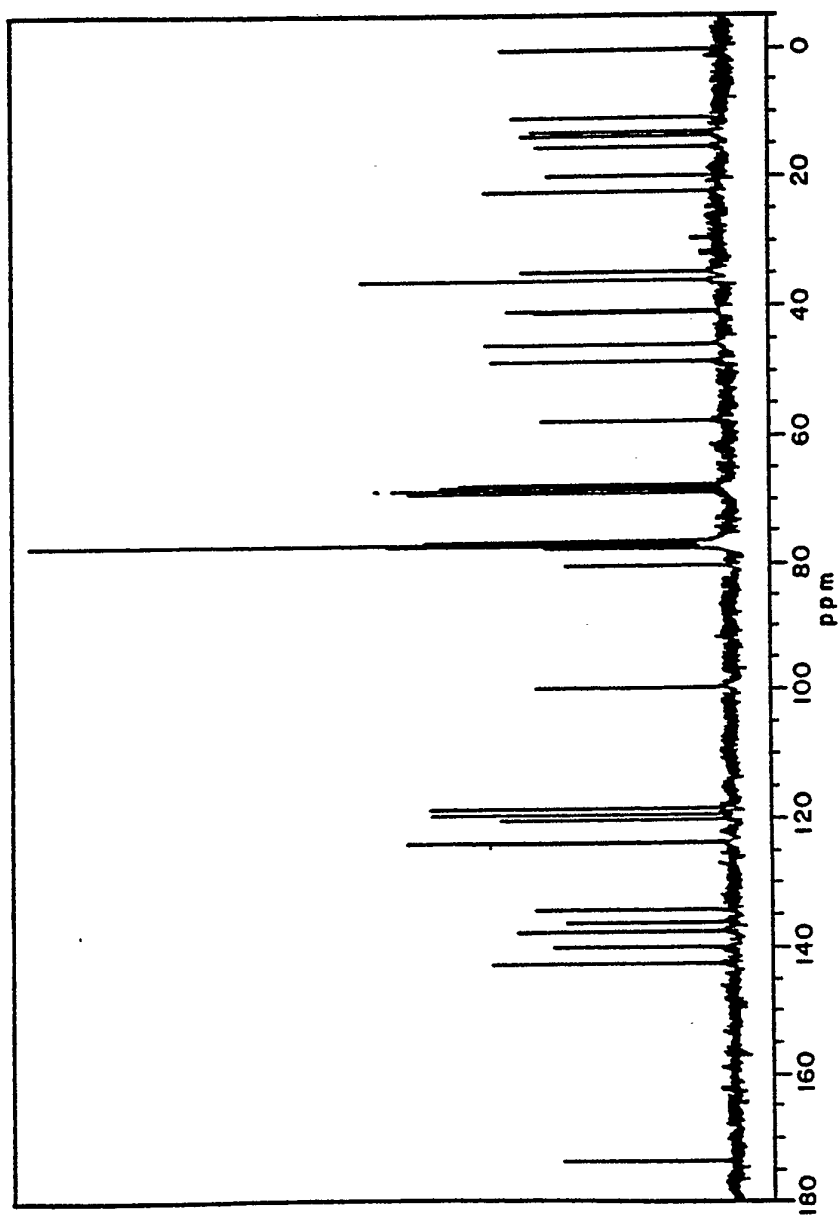


FIG XIII

ELEKTRONANLAGSMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249Y

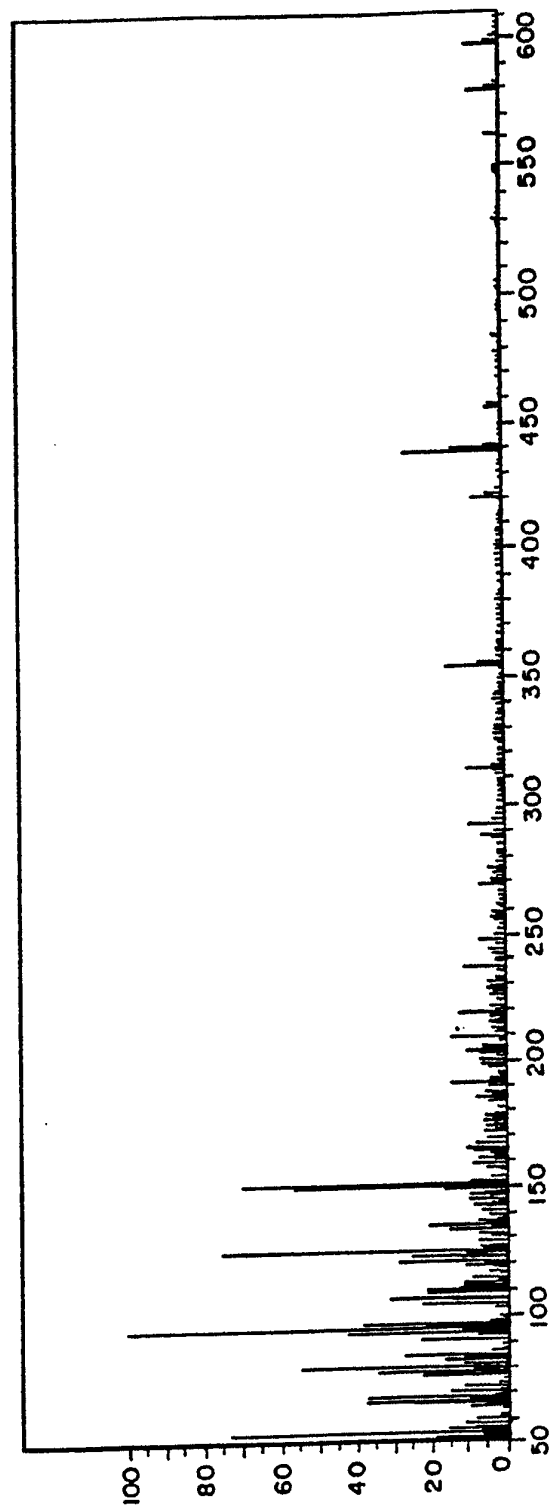


FIG XIV

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249

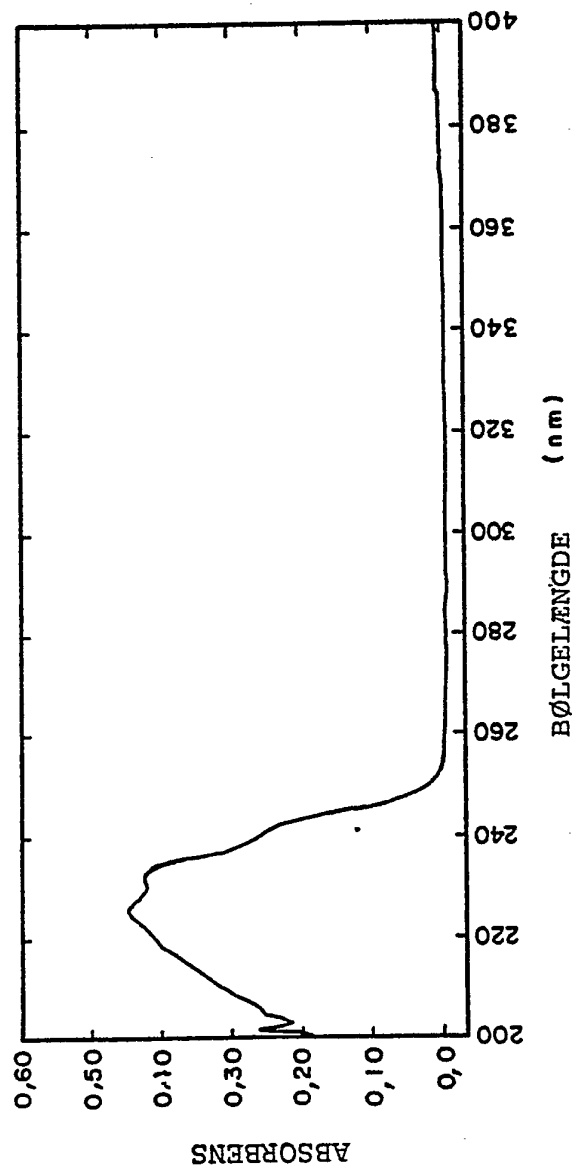


FIG XV

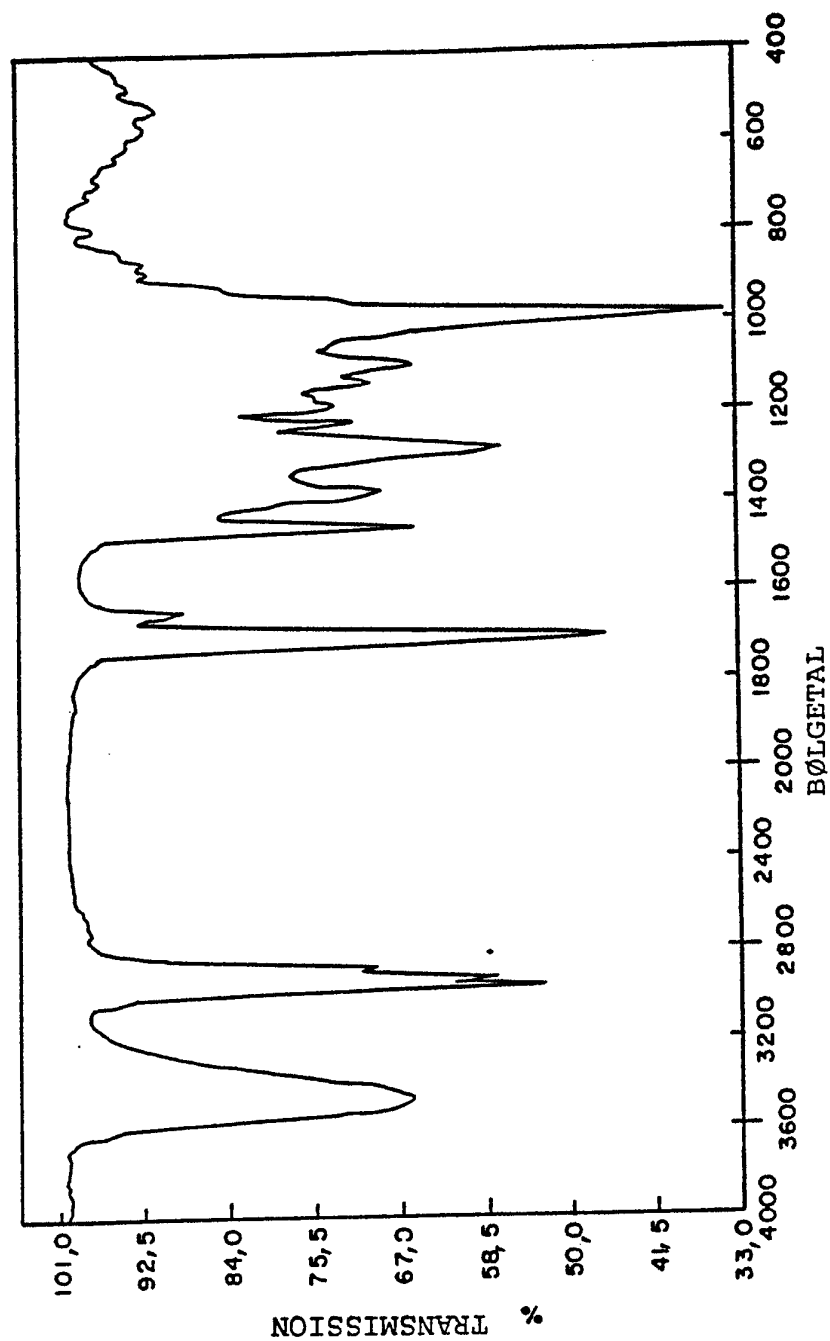
INFRARØDT ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249₀ (KBr-SKIVE)

FIG XVI

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249, I
CDCl₃-OPLØSNING

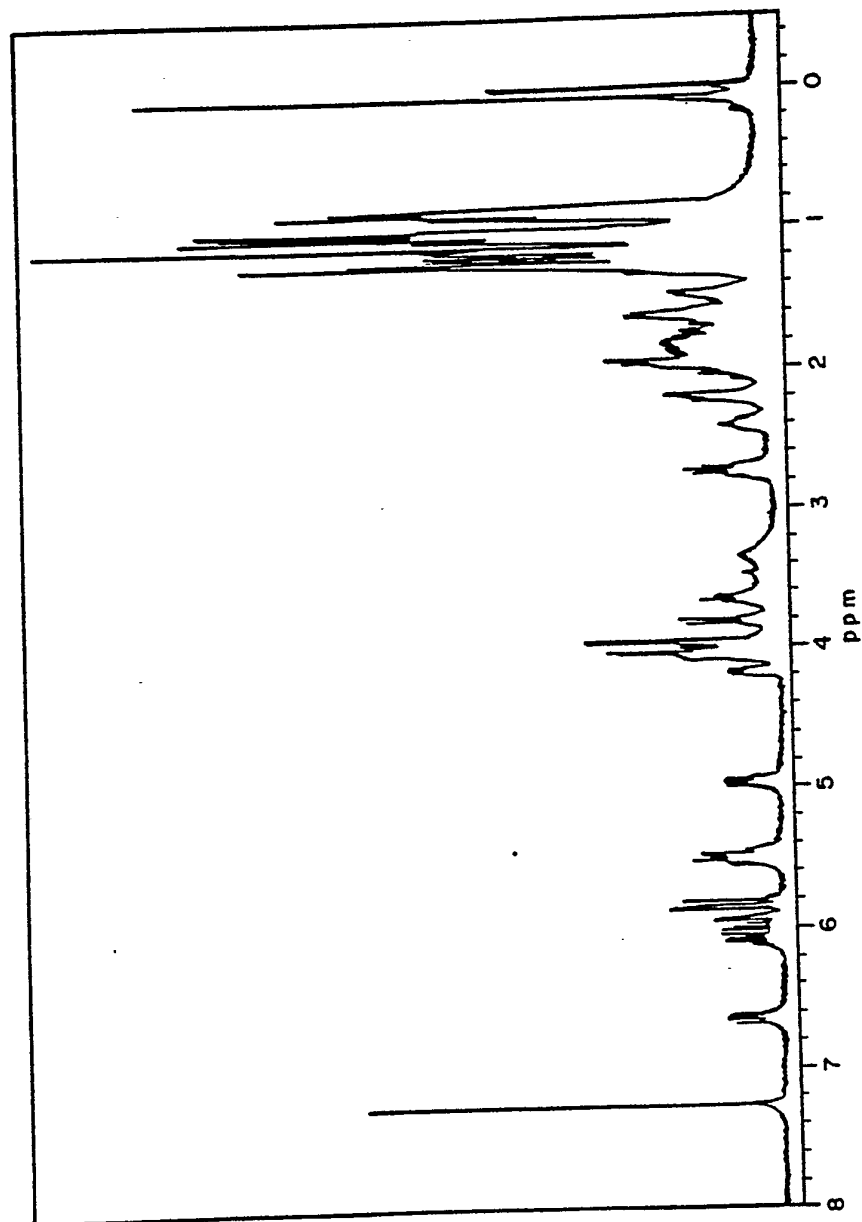


FIG XVII

CARBON-13-KERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249₀ I
CDCl₃-OPLØSNING

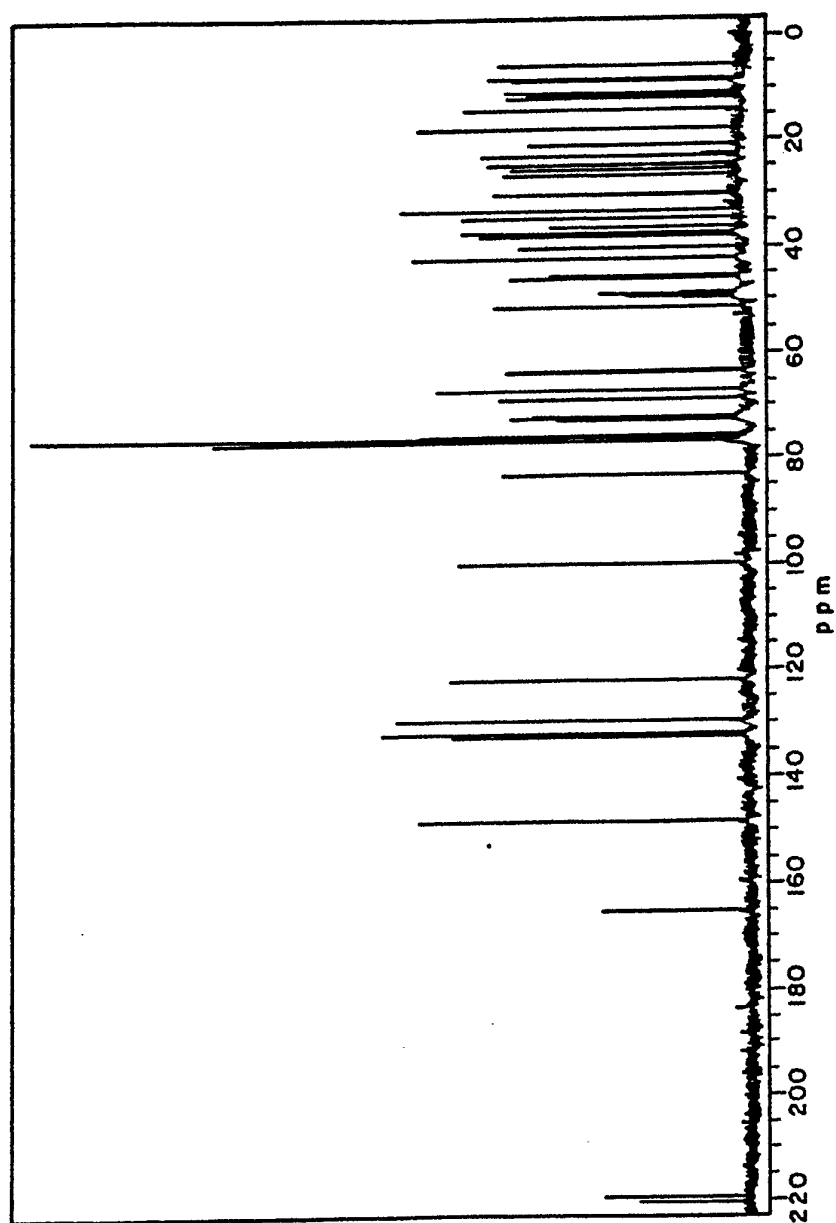


FIG XVIII

ELEKTRONANSLAGMASSESPEKTRUM
AF LL-F28249 ω

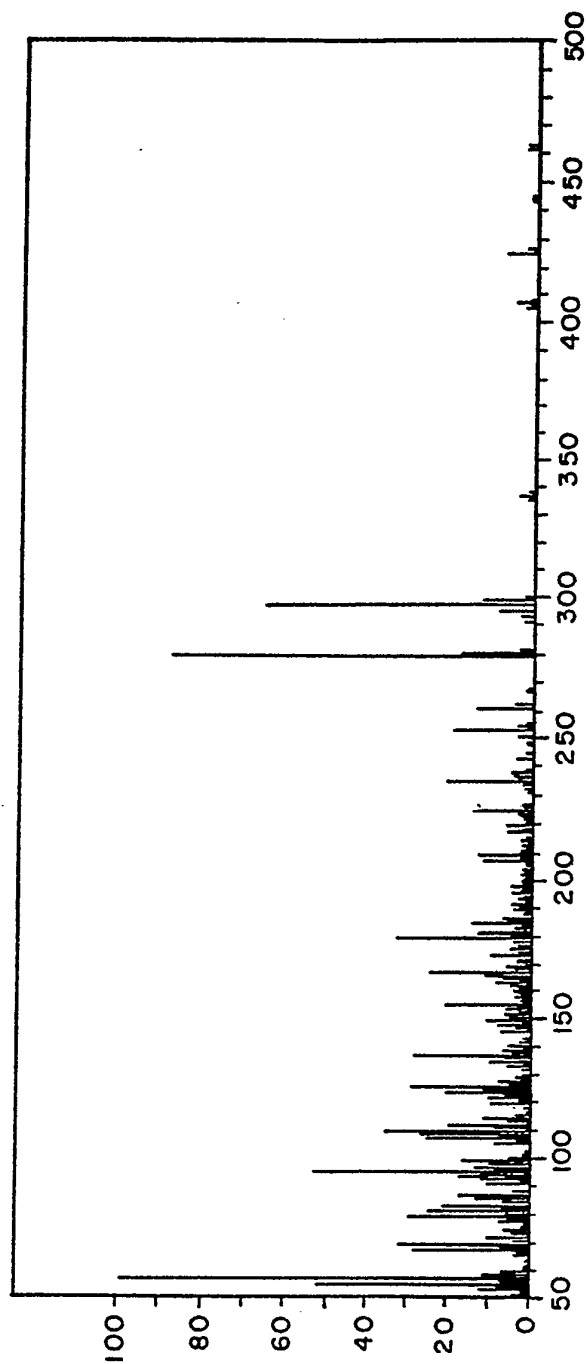
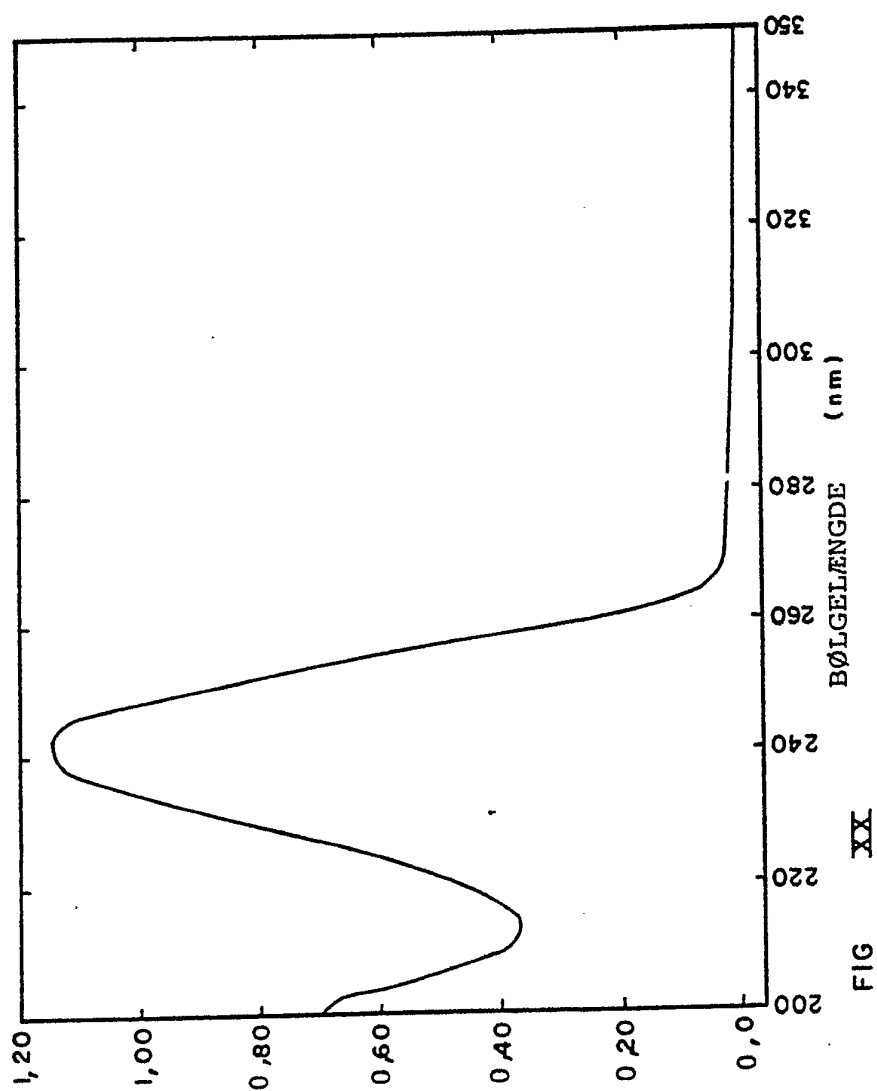


FIG XIX

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSPEKTRUM FOR LL-F282498



PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249, I
CDCl₃-OPLØSNING

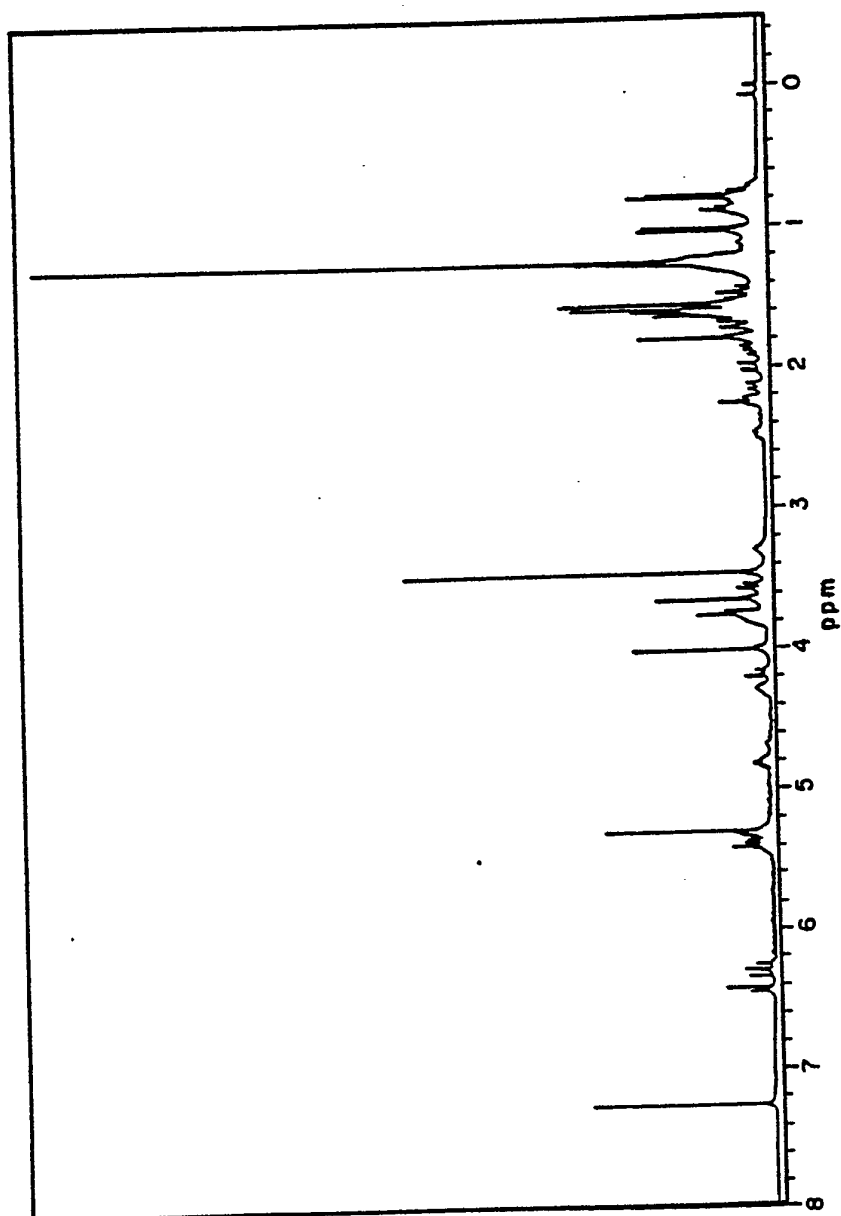


FIG XXI

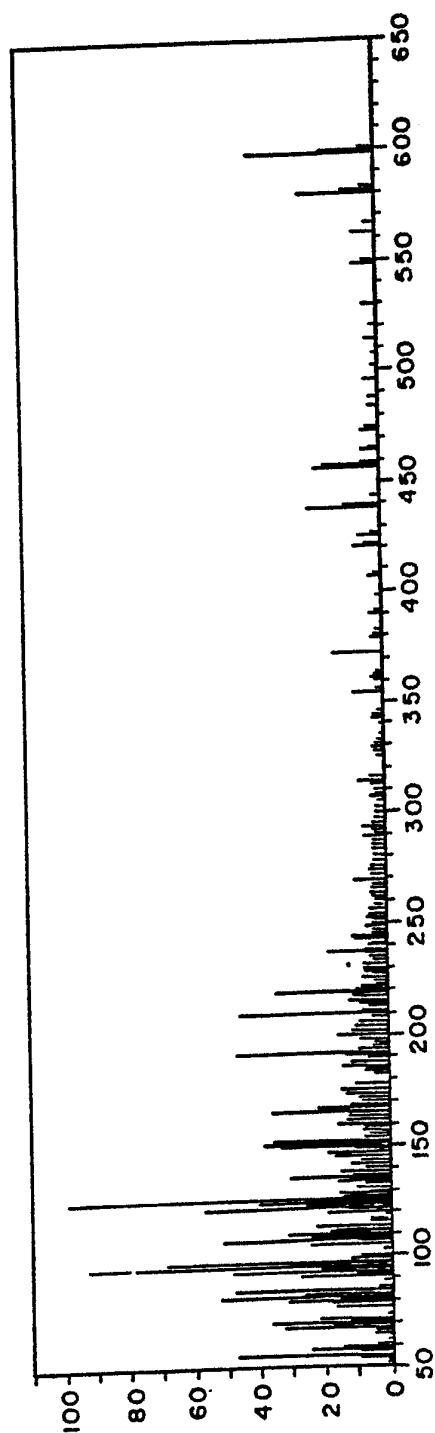
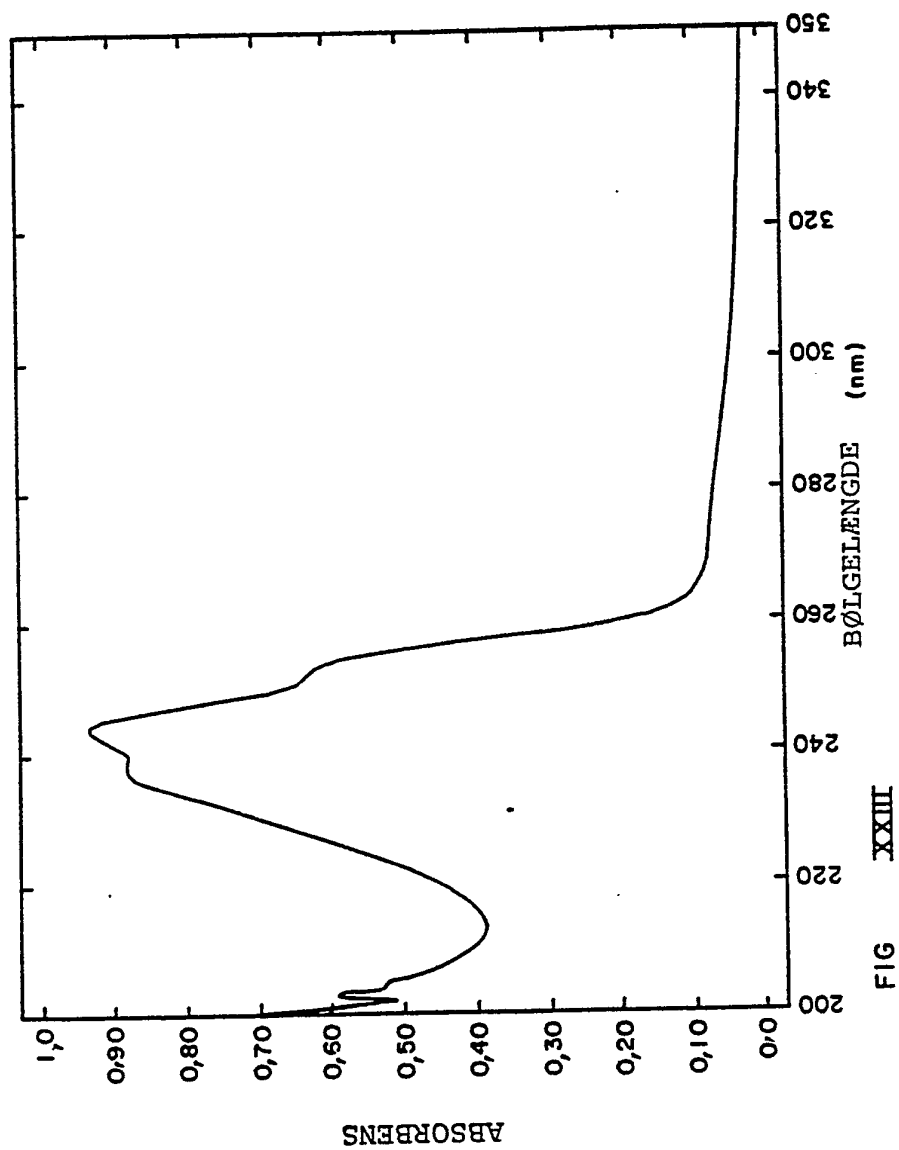
ELEKTRONANSLAGMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249_g

FIG XXII

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSPEKTRUM FOR LL-F28249



PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249 I
CDCl₃-OPLØSNING

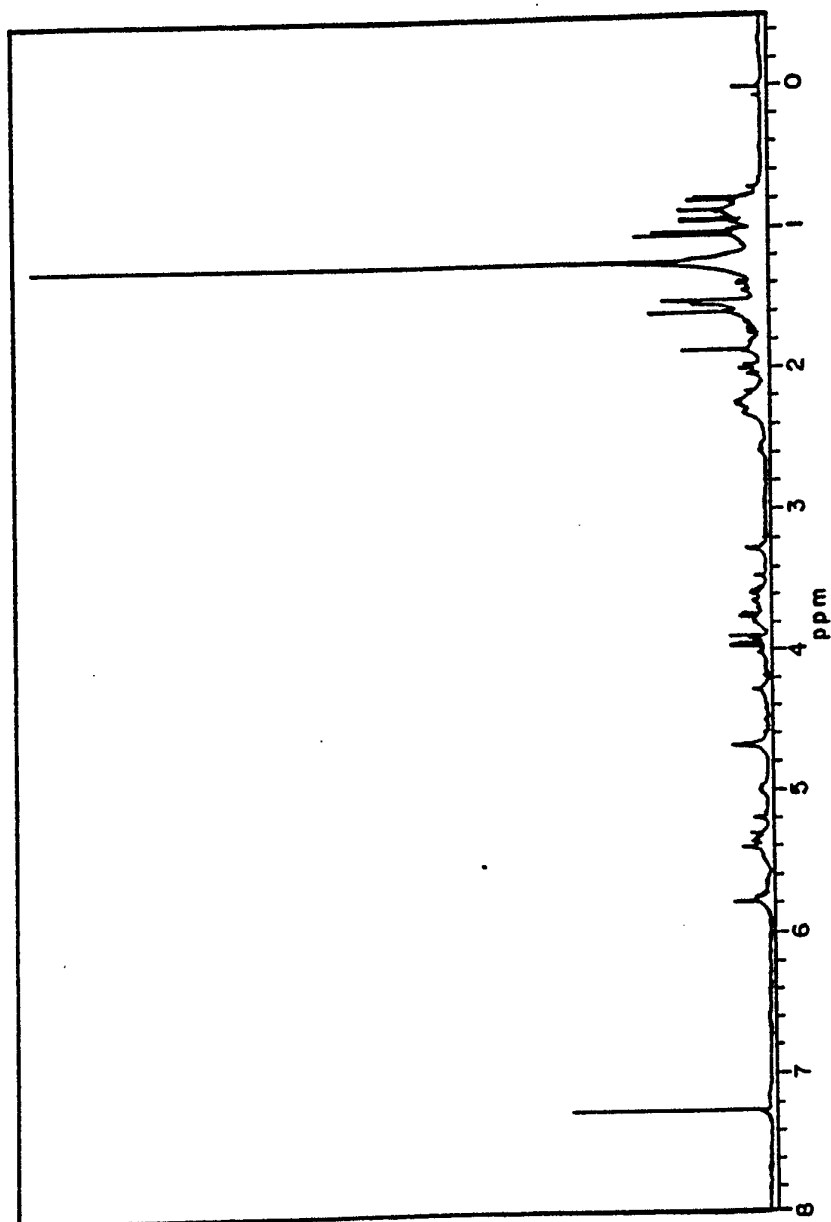


FIG XXIV

ELEKTRONANSLAGMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249Z

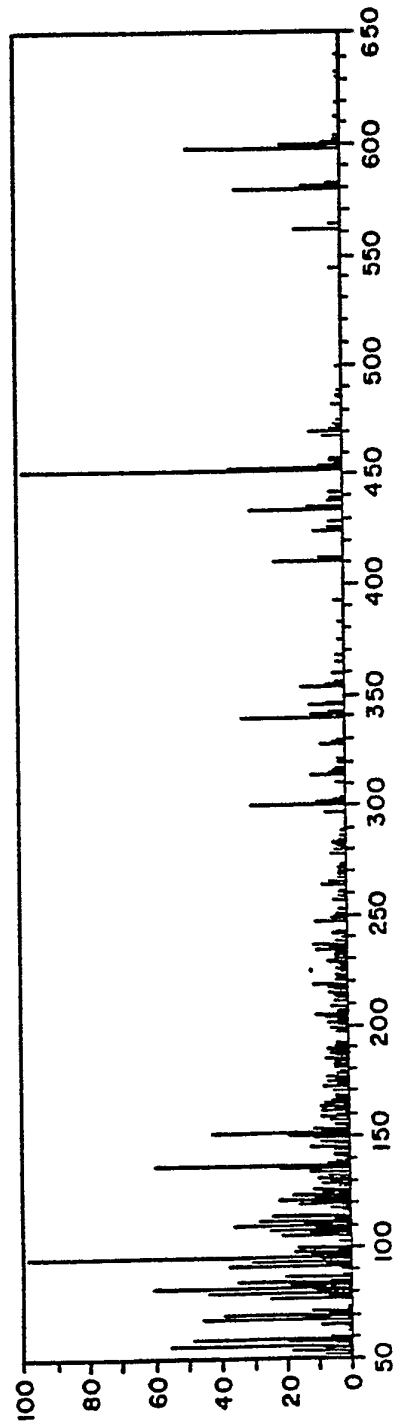
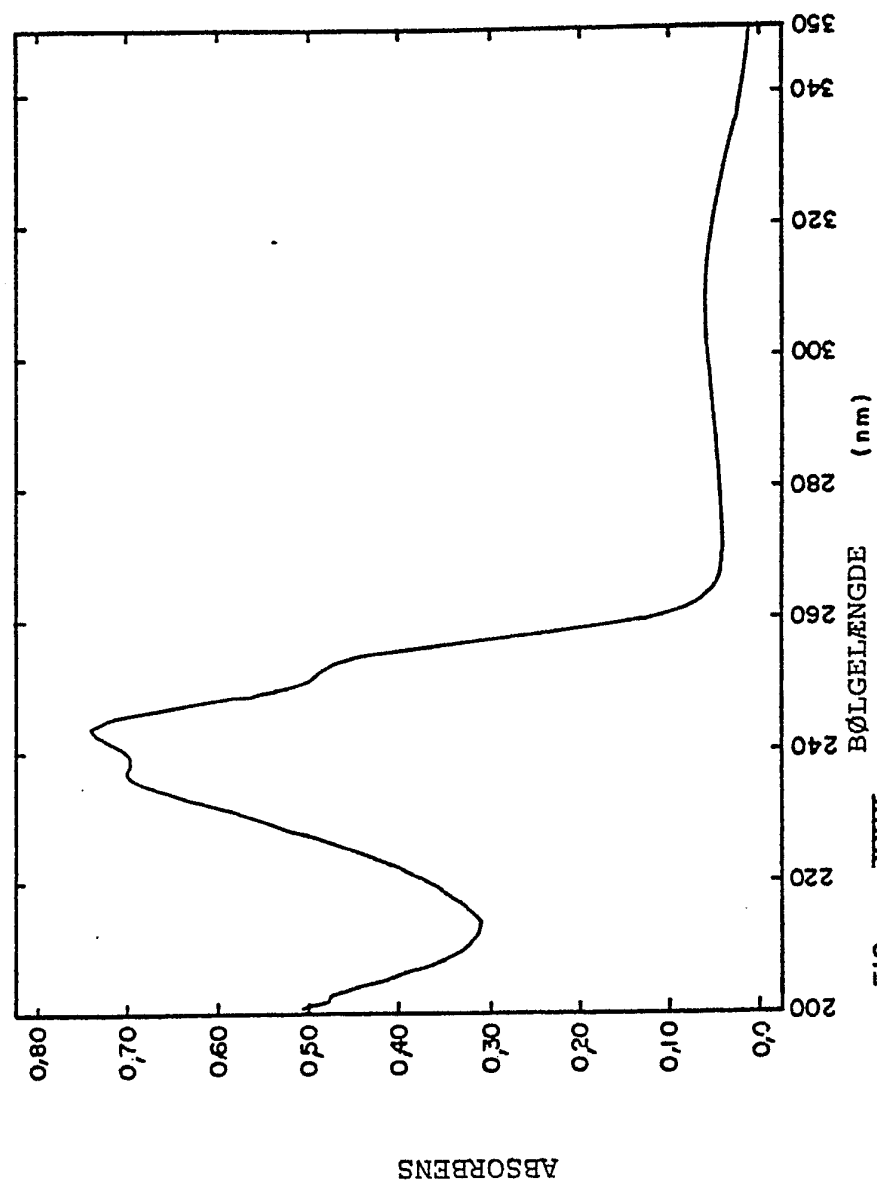


FIG XXV

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249⁵

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249, I
CDCl₃-OPLØSNING

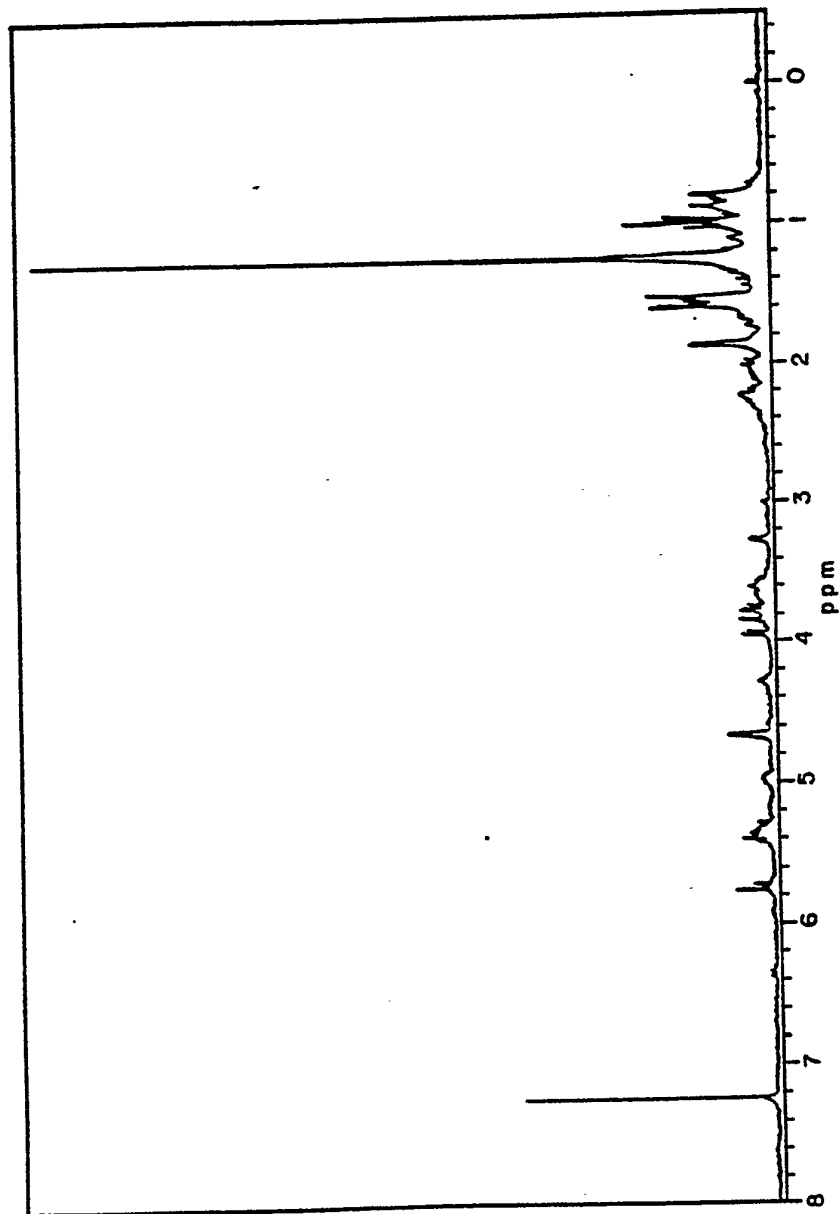


FIG XXVII

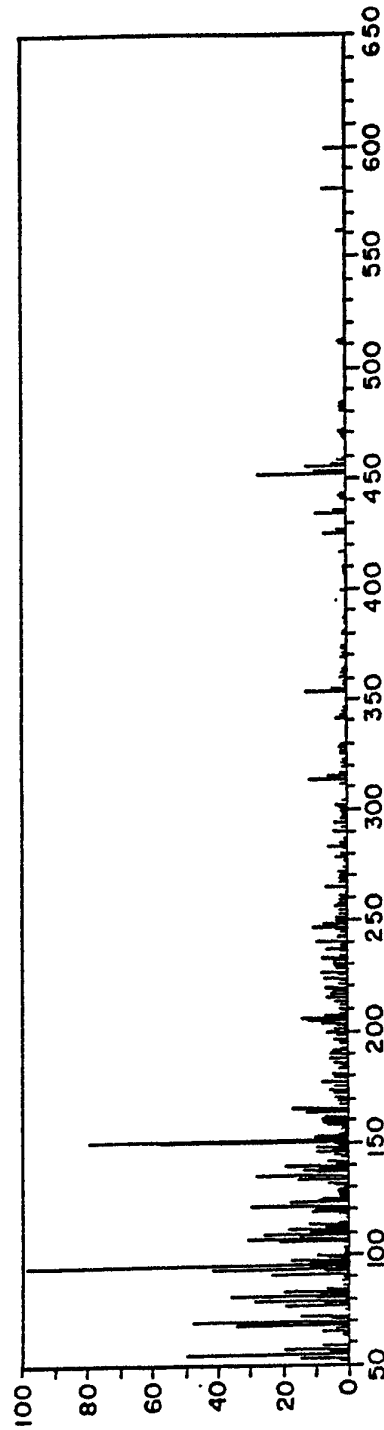
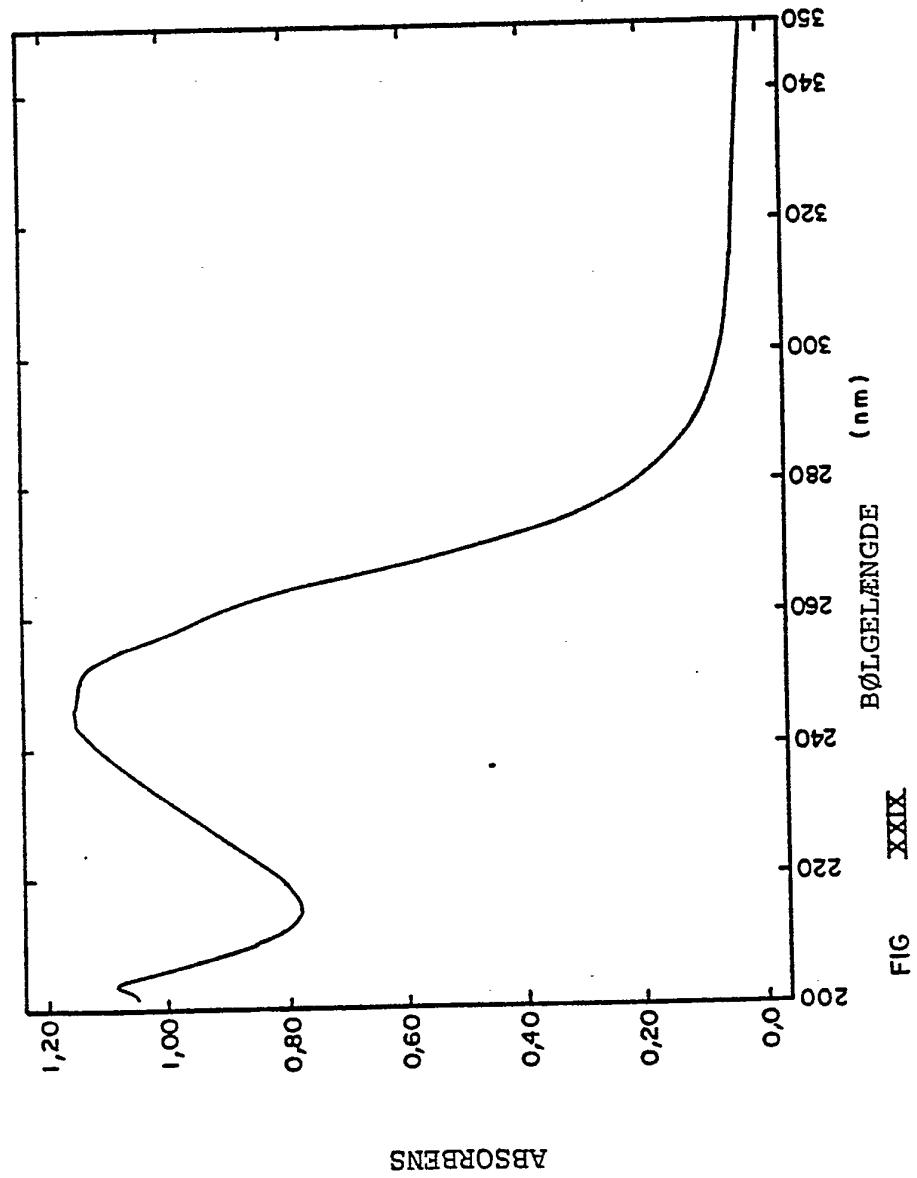
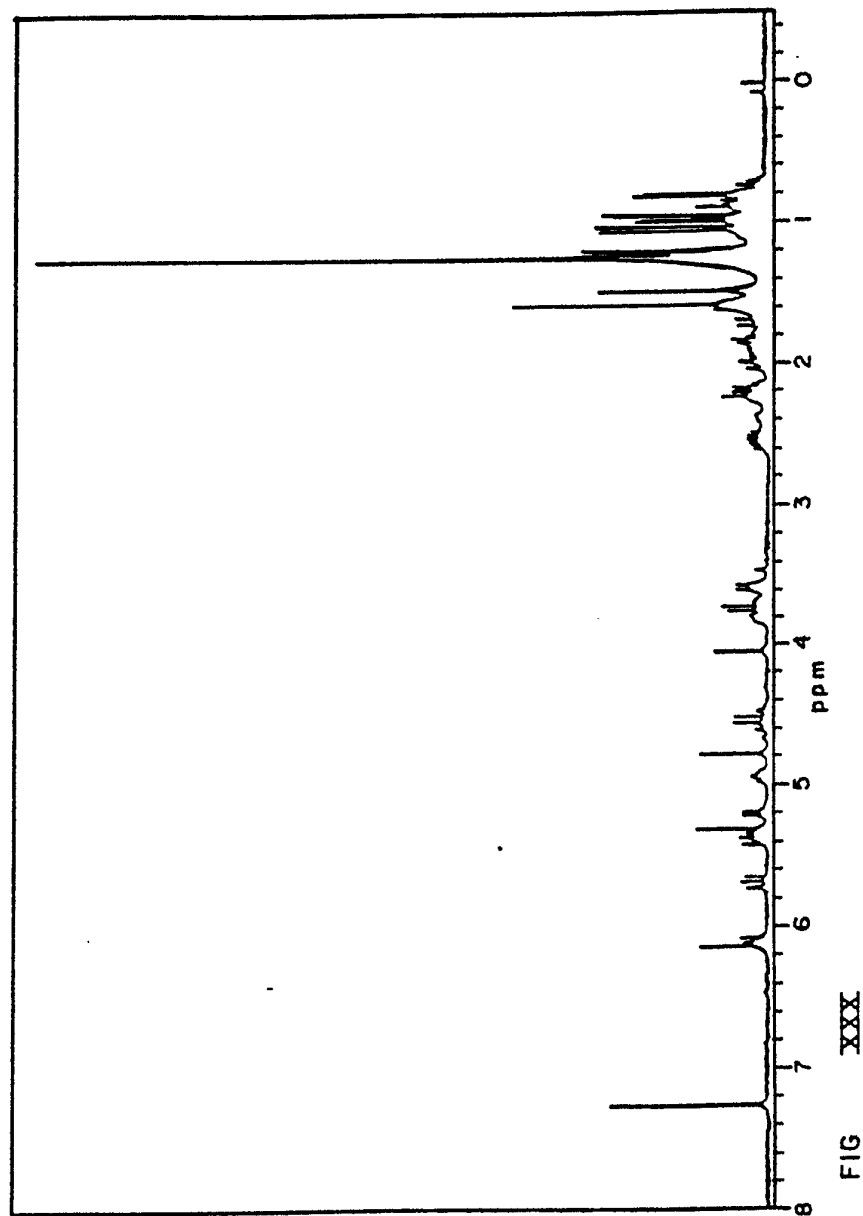
ELEKTRONANSLAGMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249 ζ 

FIG XXVIII

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249 η 

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249₂ I
CDCl₃-OPLØSNING



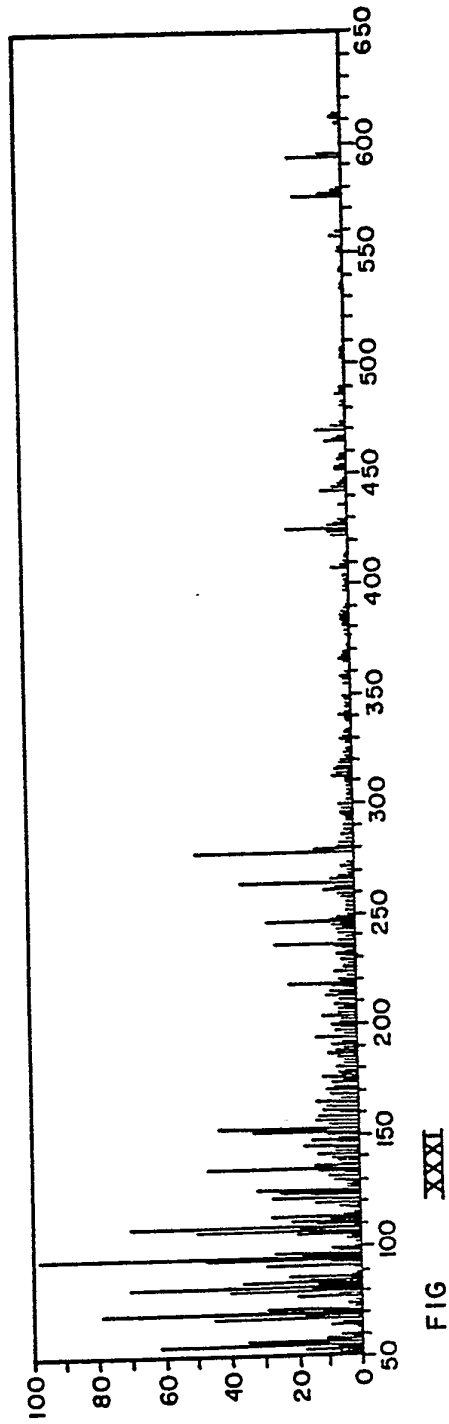
ELEKTRONANSLAGMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249 η 

FIG XXXI

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249_θ

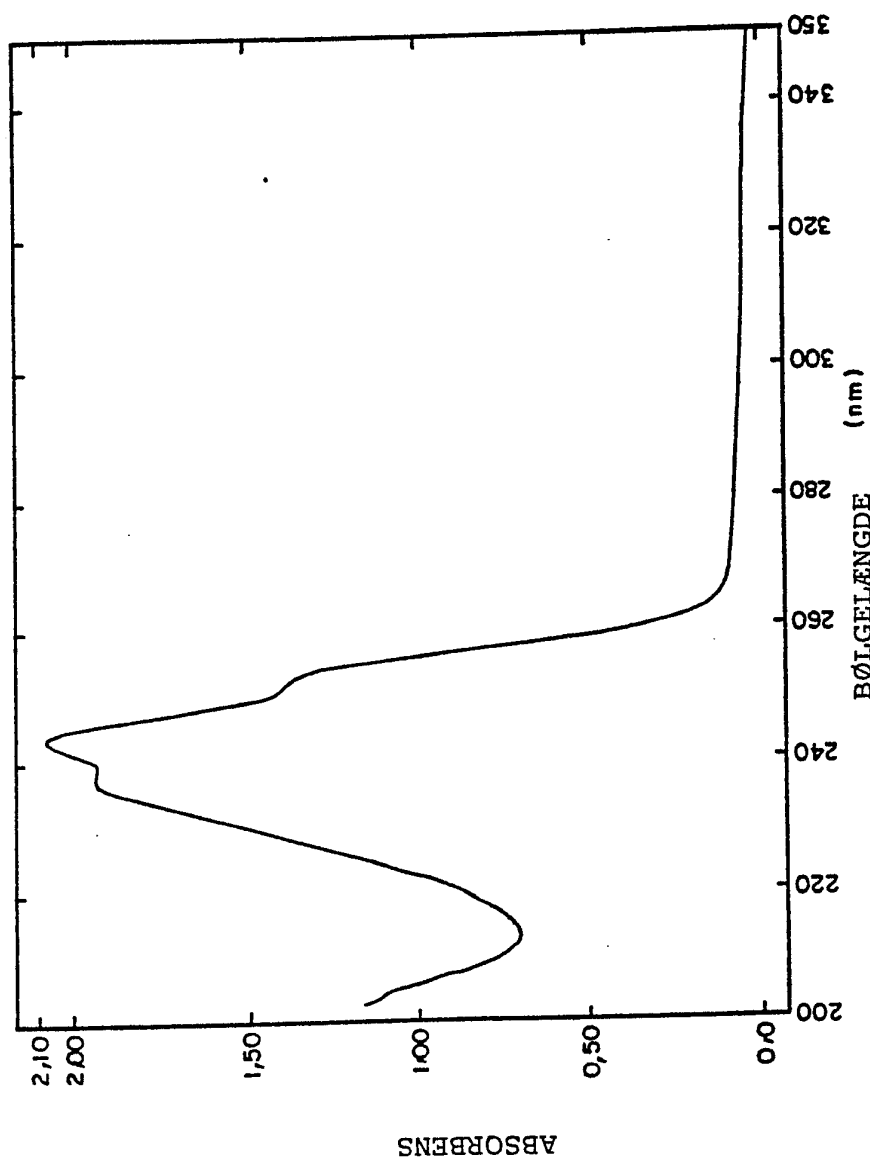
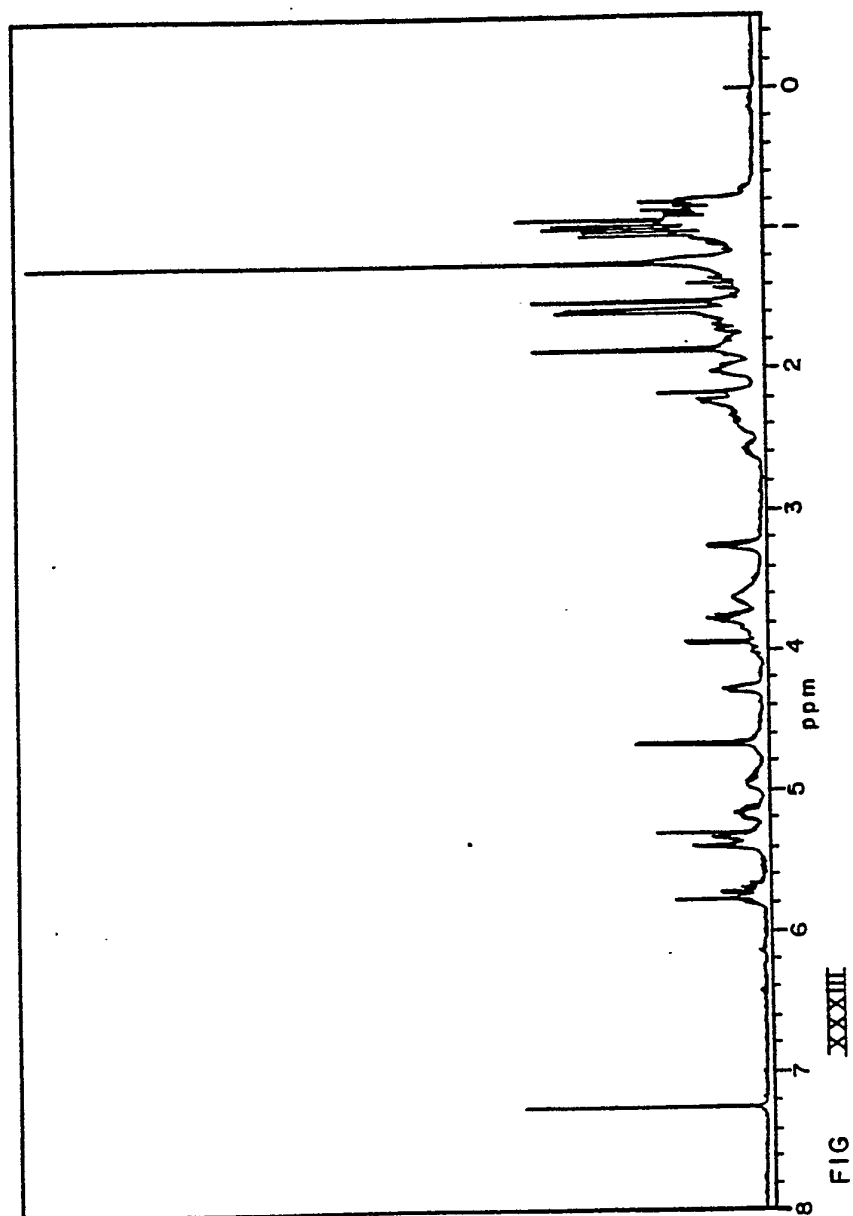


FIG XXXII

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249₉ I
CDCl₃-OPLØSNING



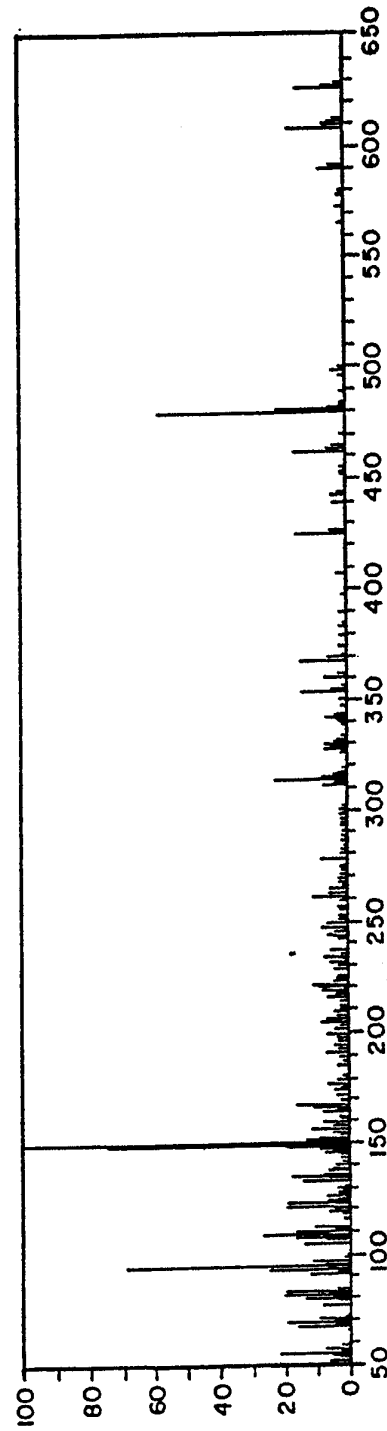
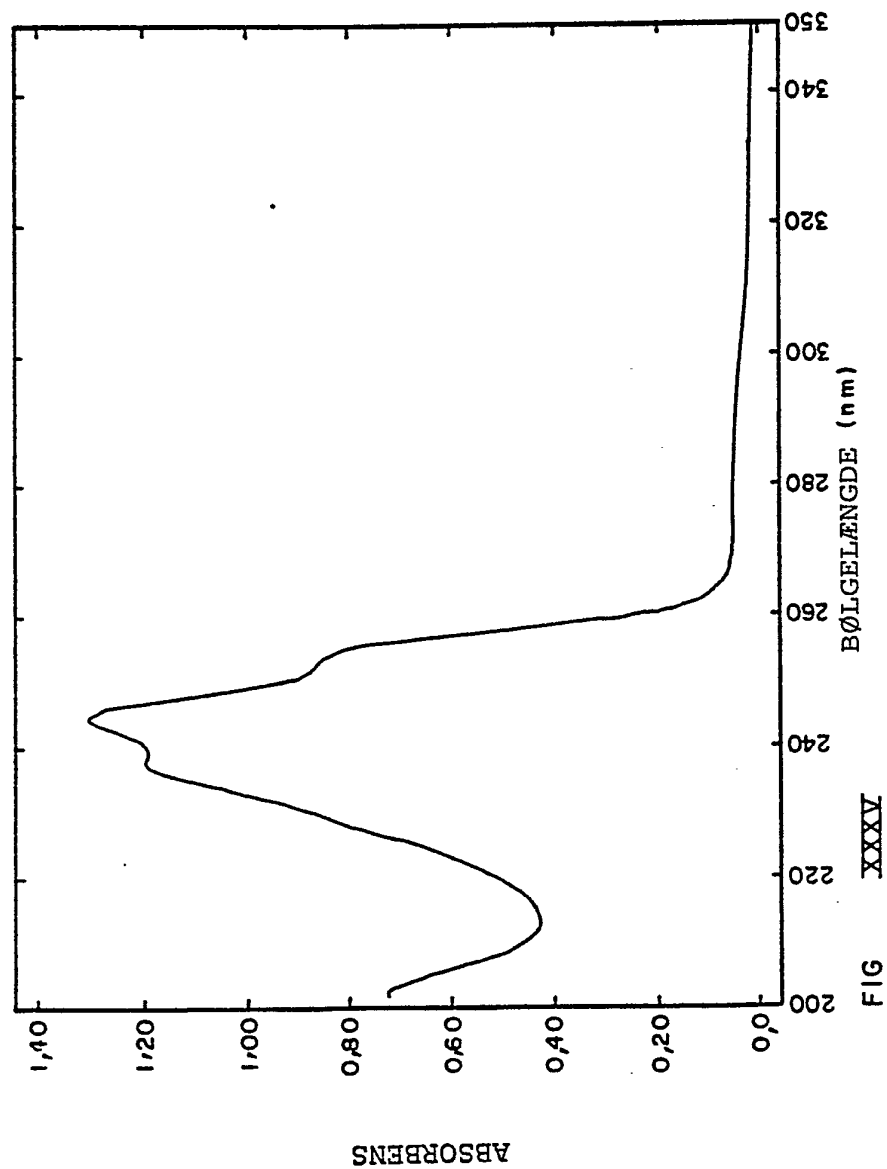
ELEKTRONANSLAGSMASSESPETKTRUM FOR LL-F28249_θ

FIG XXXIV

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249



FIG

XXXV

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249, I
CDCl₃-OPLØSNING

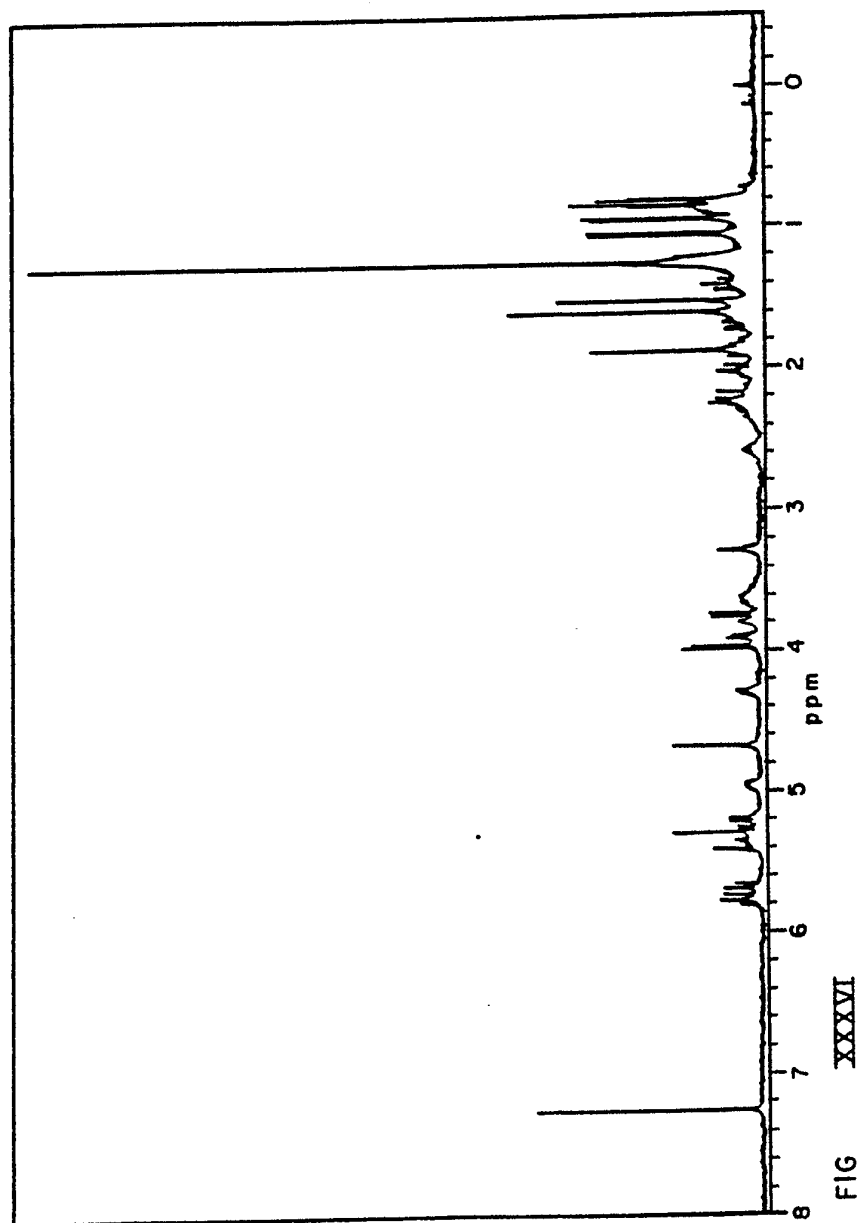


FIG XXXVI

ELEKTRONANLAGSMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249

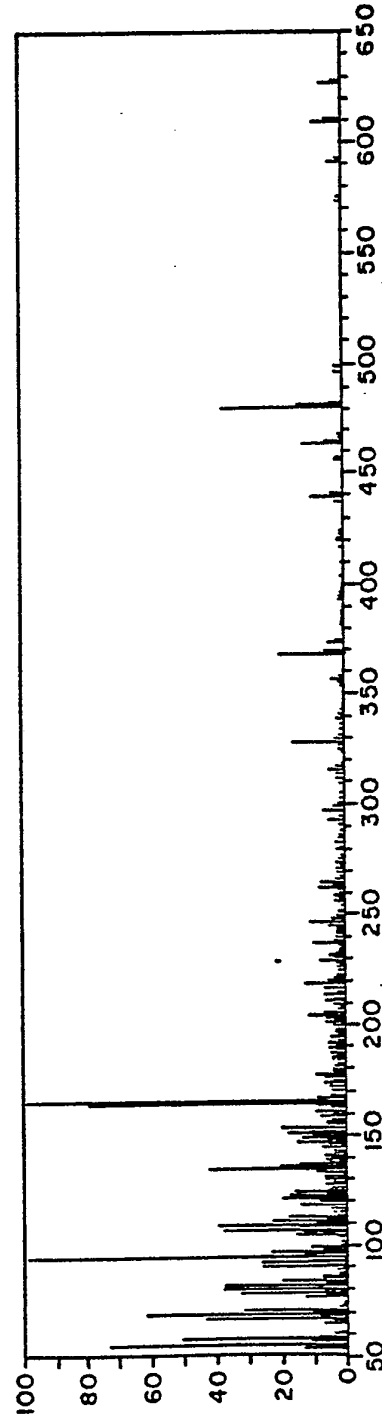


FIG XXXVII

CARBON-13-KERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249_B I
CDCl₃-OPLØSNING

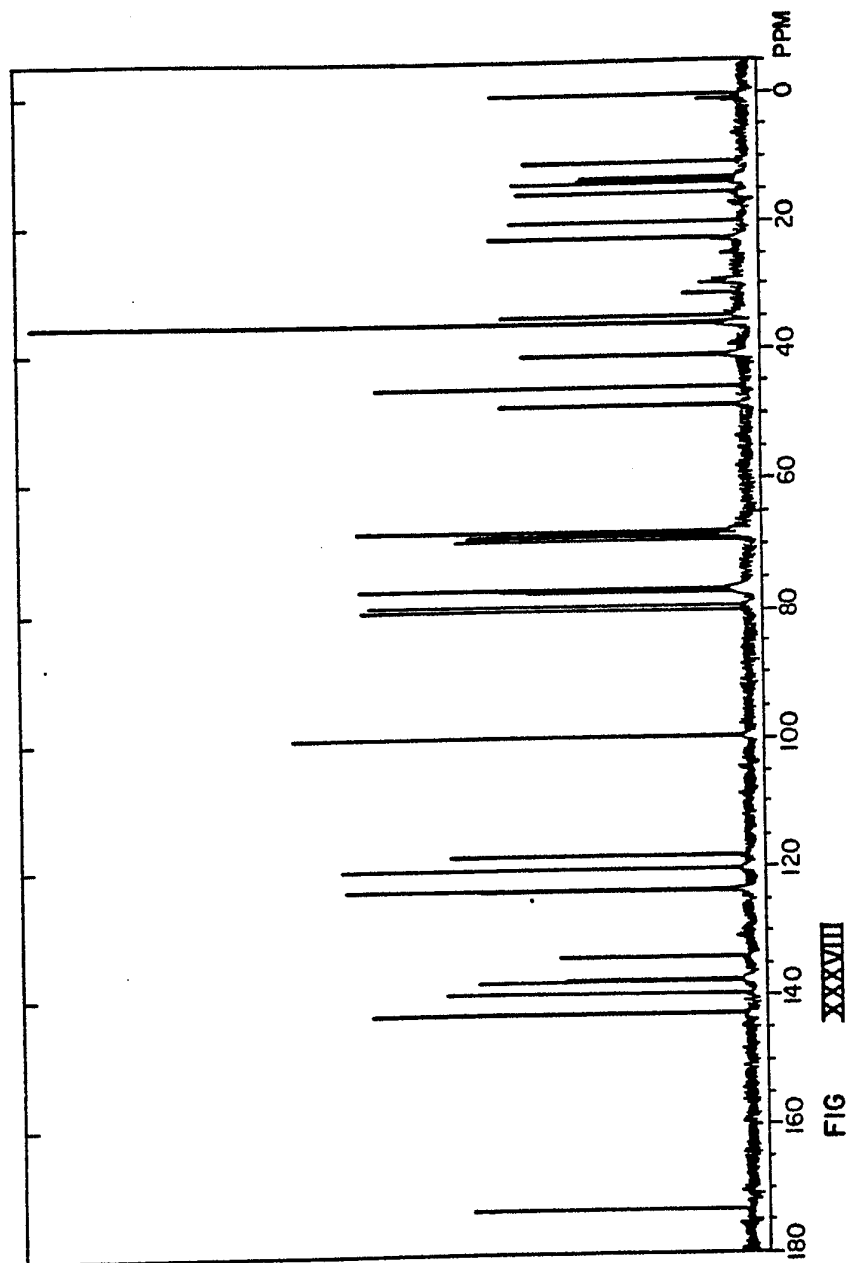


FIG XXXVIII

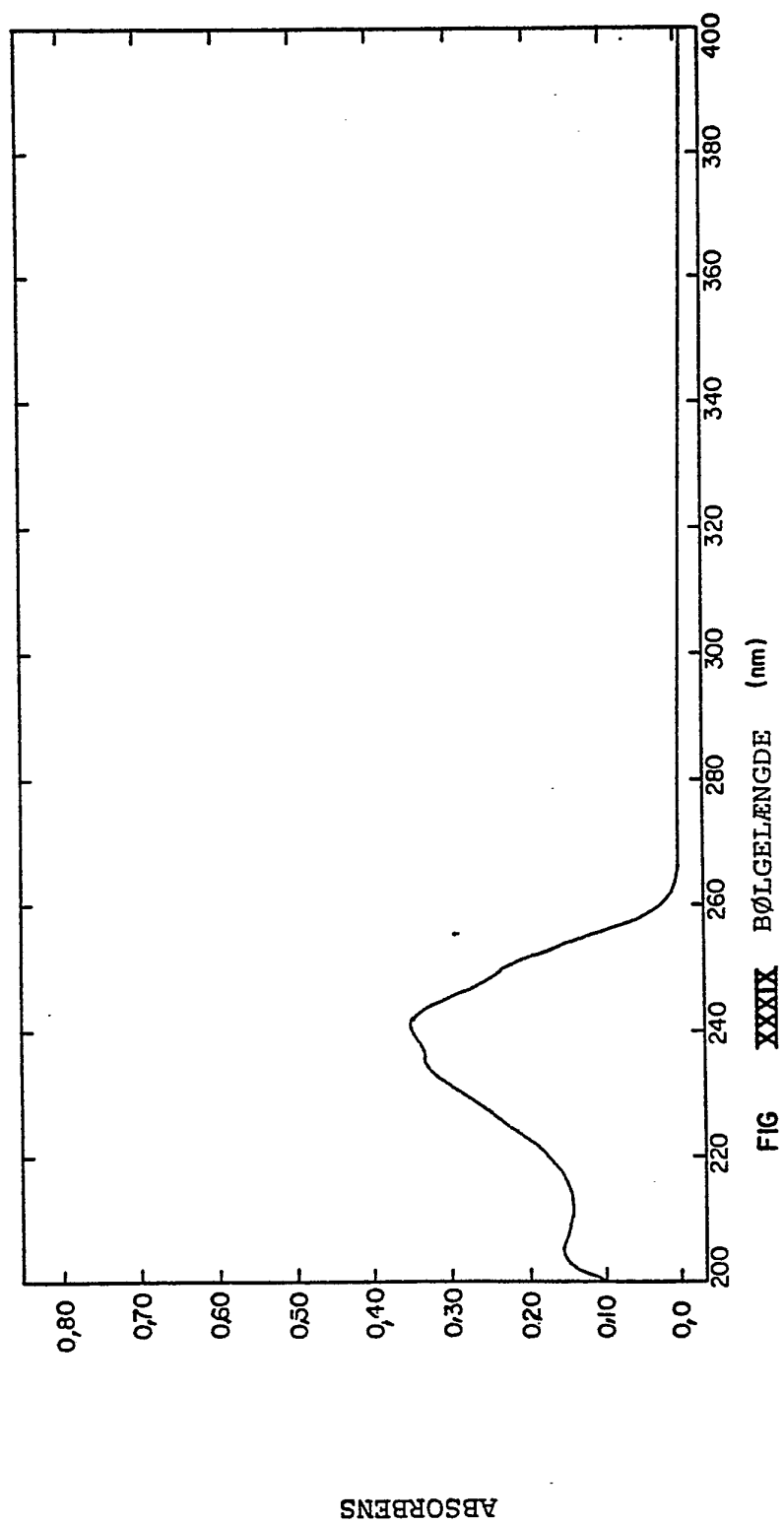
ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249_K I MeOH

FIG XXXIX BØLGELÆNGDE (nm)

INFRARØDT ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249_K (KBr-SKIVE)

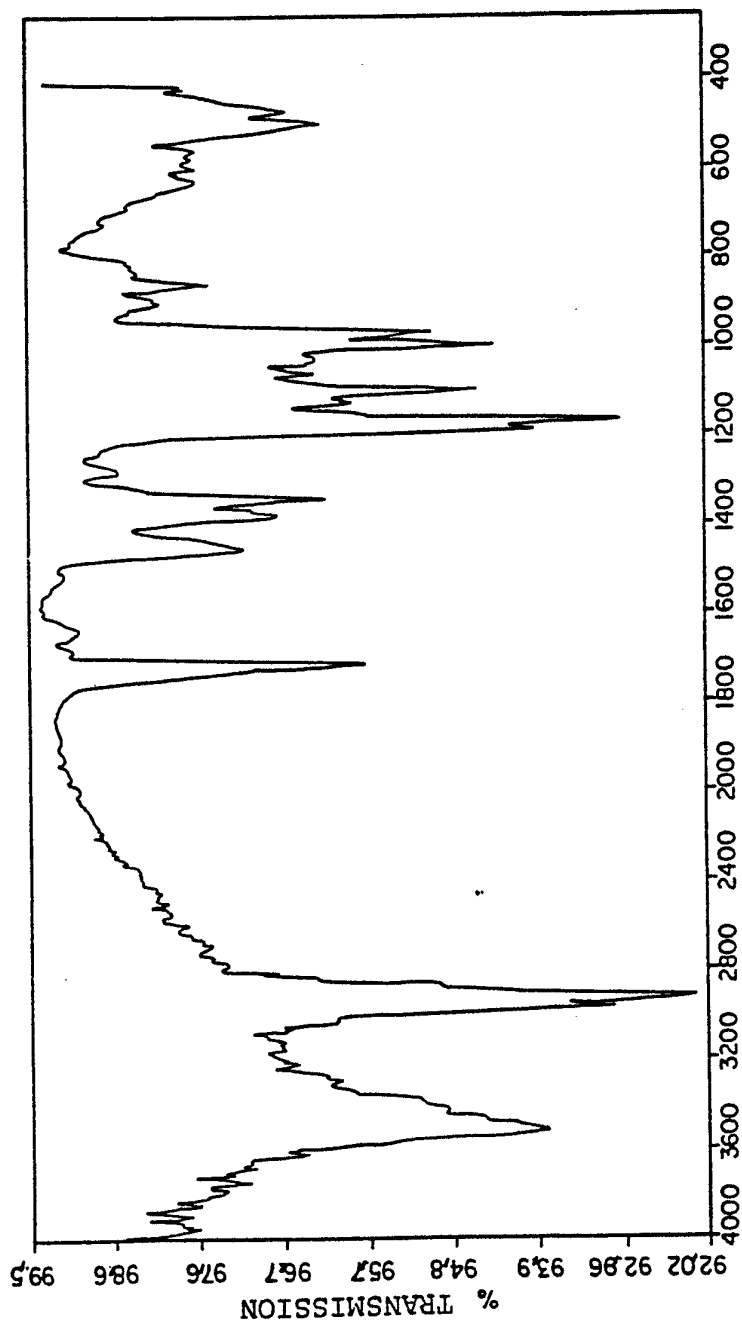


FIG XL BØLGELÆNGDE

ELEKTRONANLAGSMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249K

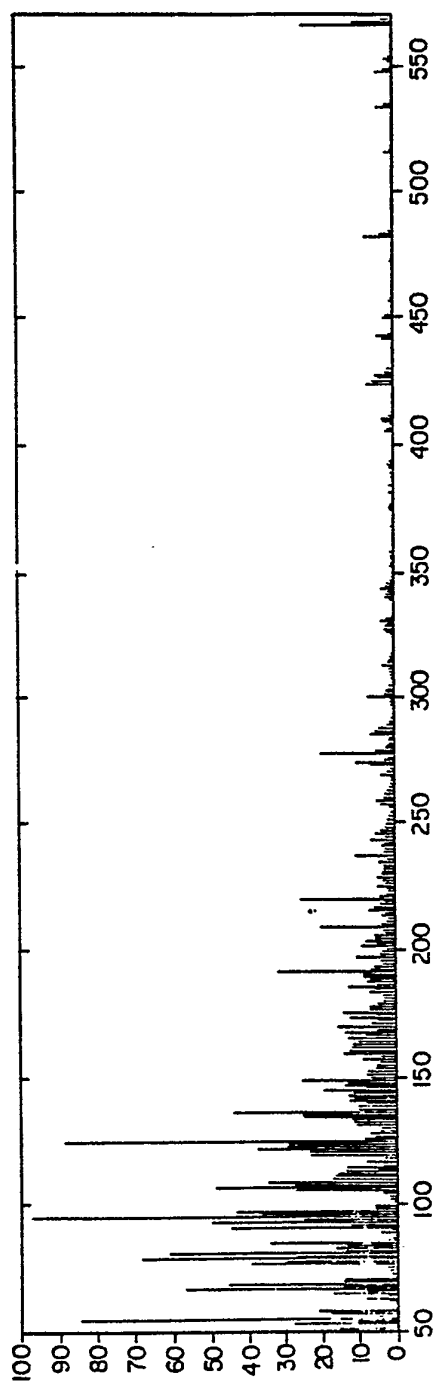
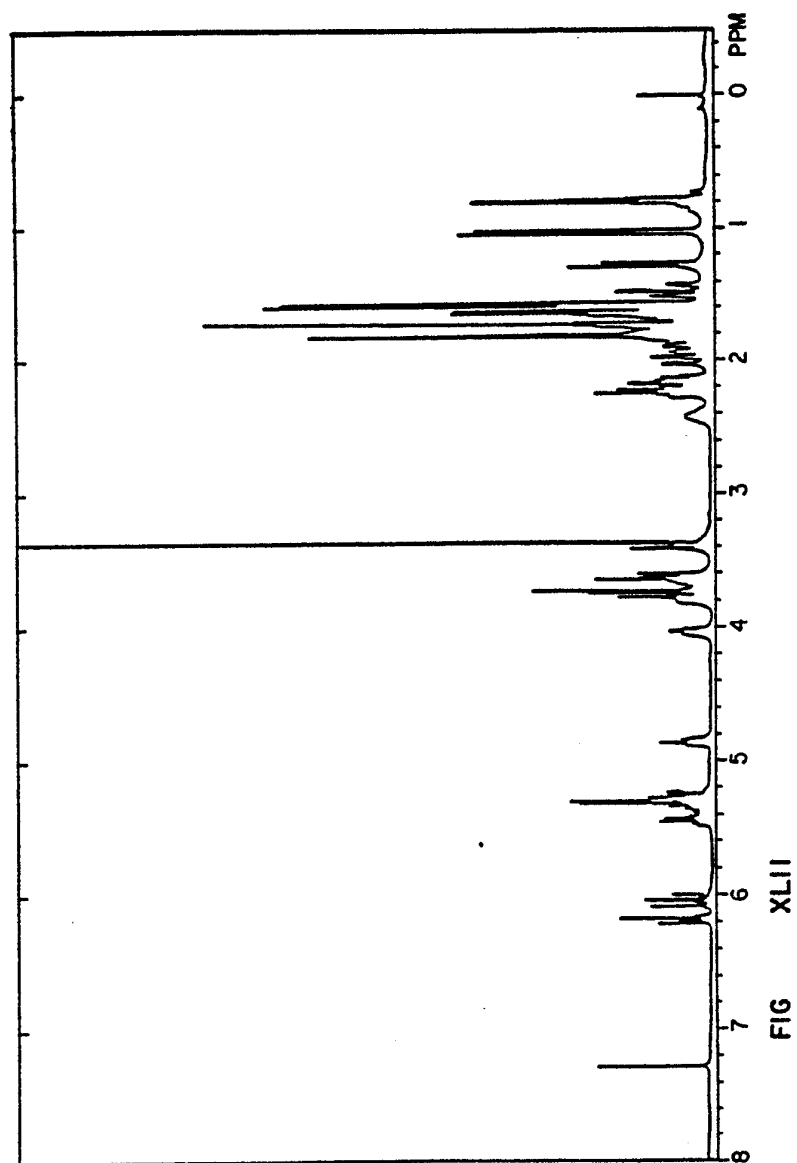
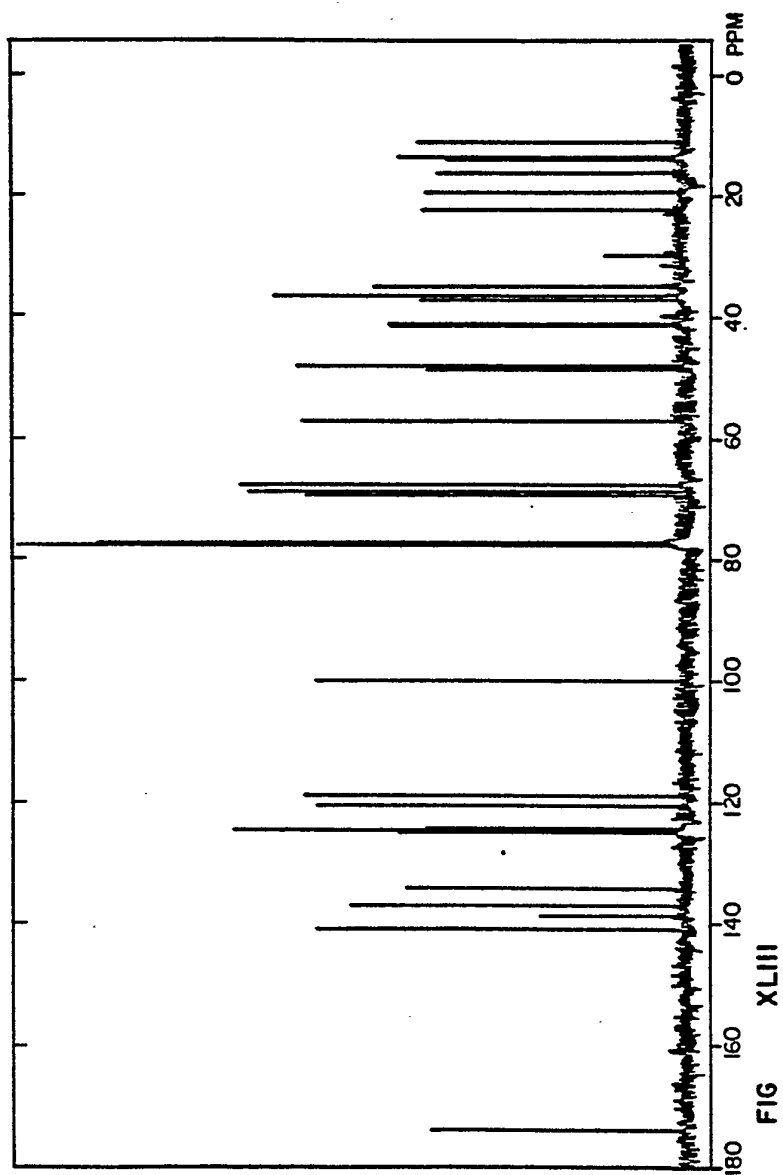


FIG XLI

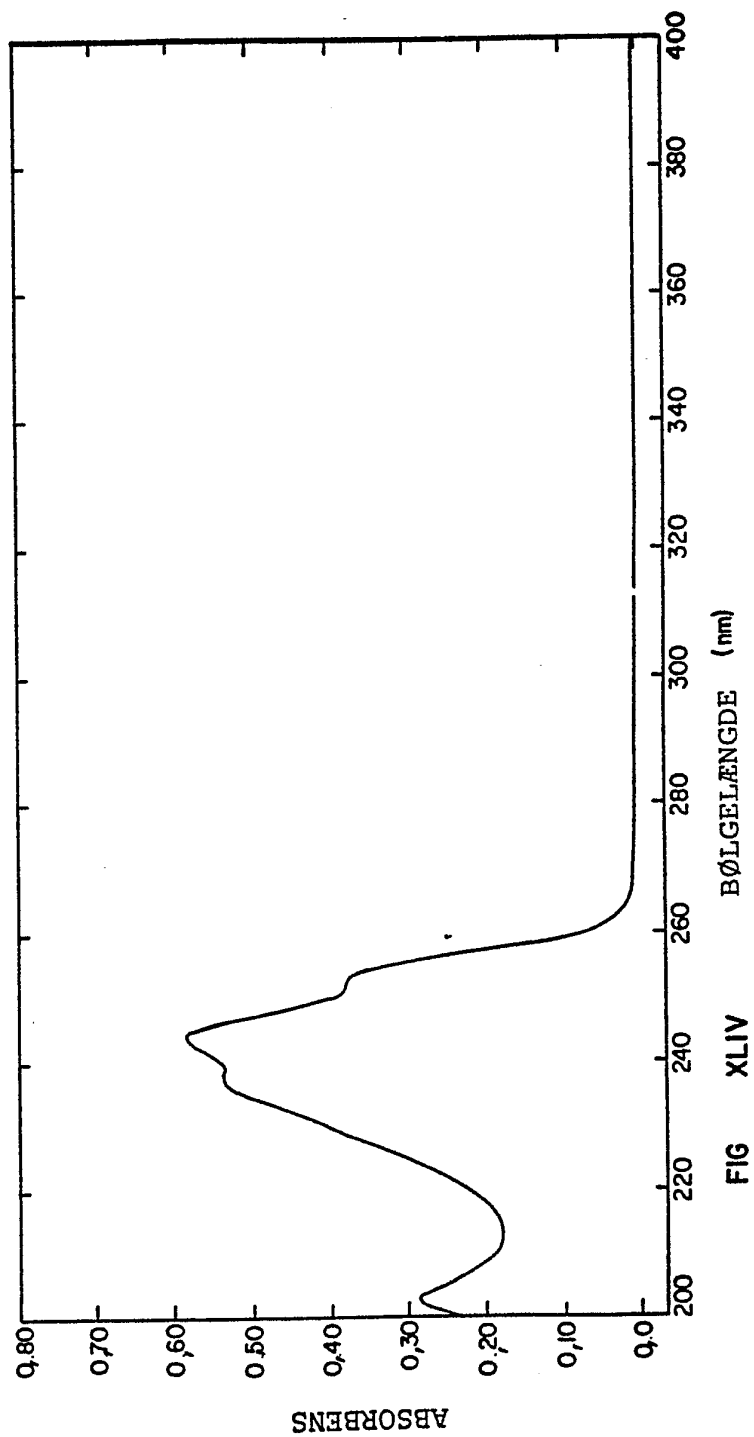
PROTONKERNMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249_K I
CDCl₃-OPLØSNING



CARBON-13-KERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249_K I
CDCl₃-OPLØSNING



ULTRAVIOLET ABSORPTIONSPEKTRUM FOR LL-F28249 λ 10 μ g/ml i MeOH



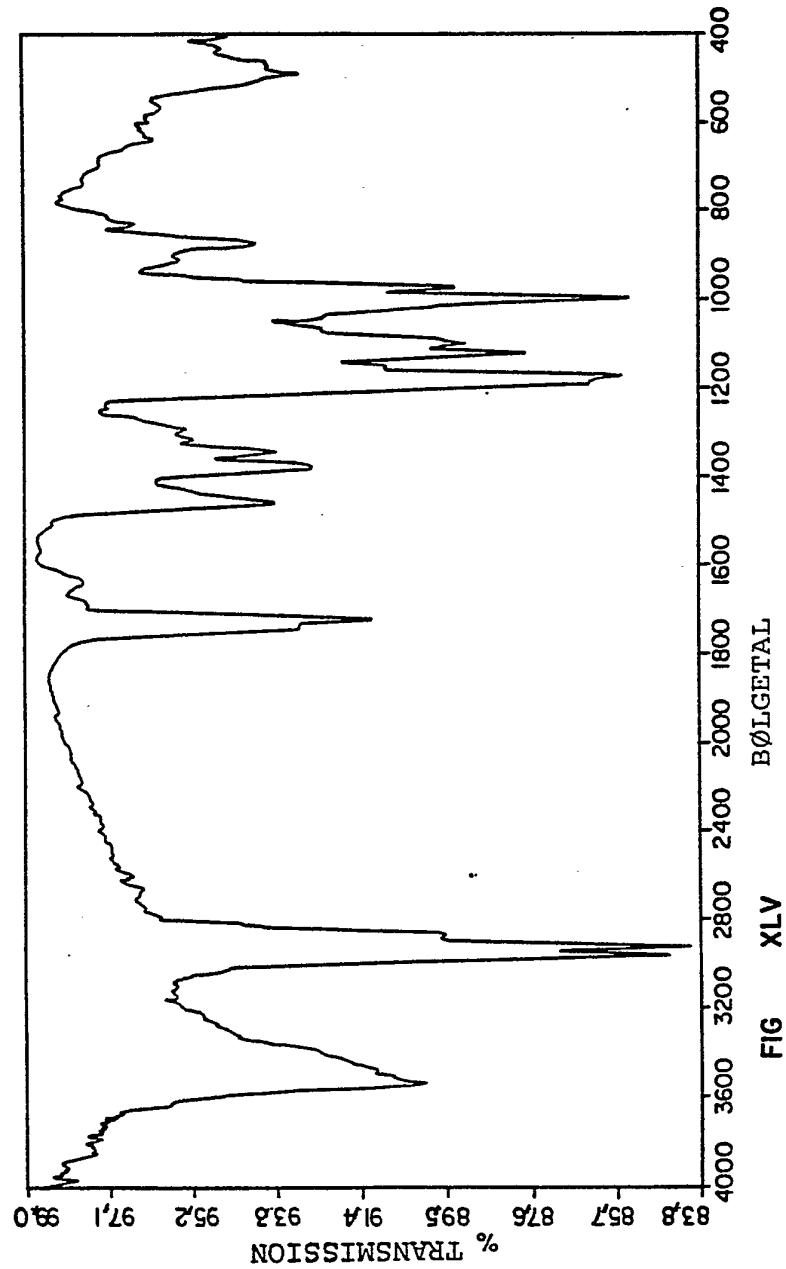
INFRARØDT ANSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249 λ (KBr-SKIVE)

FIG XLV BØLGELÆNGDE

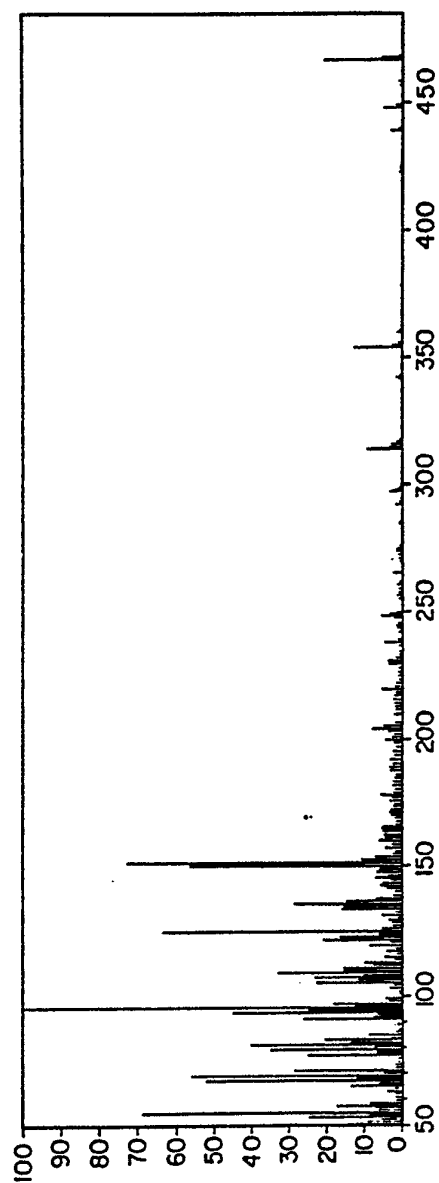
ELEKTRONANSLAGMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249_u

FIG XLVI

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249_λ I
CDCl₃-OPLØSNING

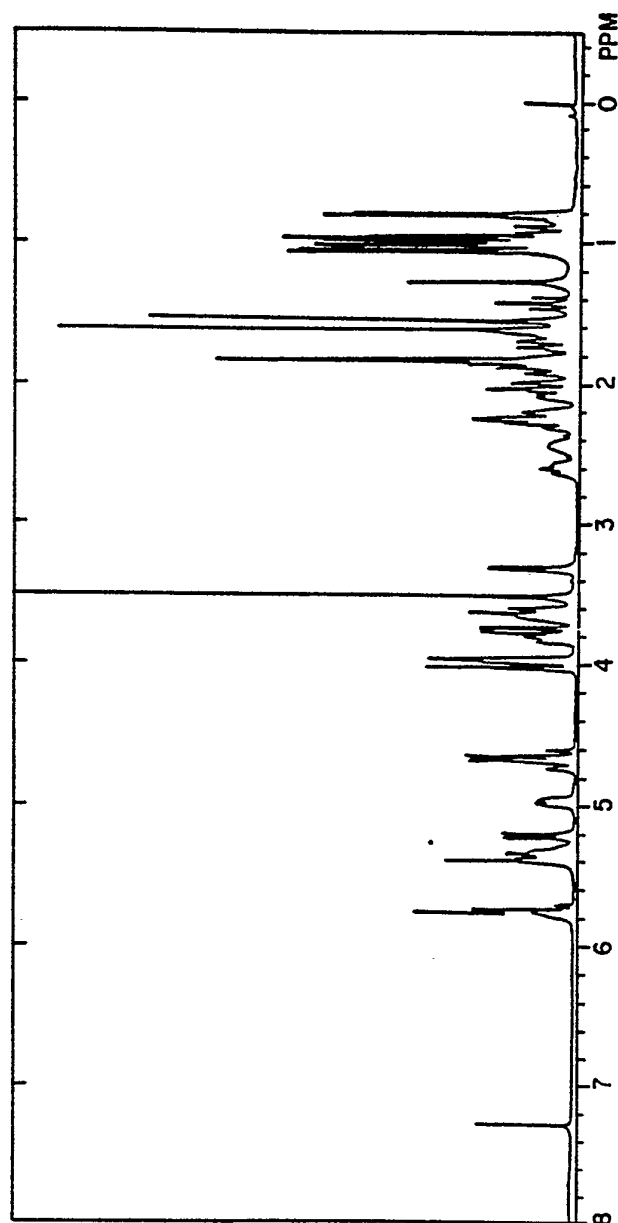


FIG XLVII

CARBON-13-KERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249₁ I
CDCl₃-OPLØSNING

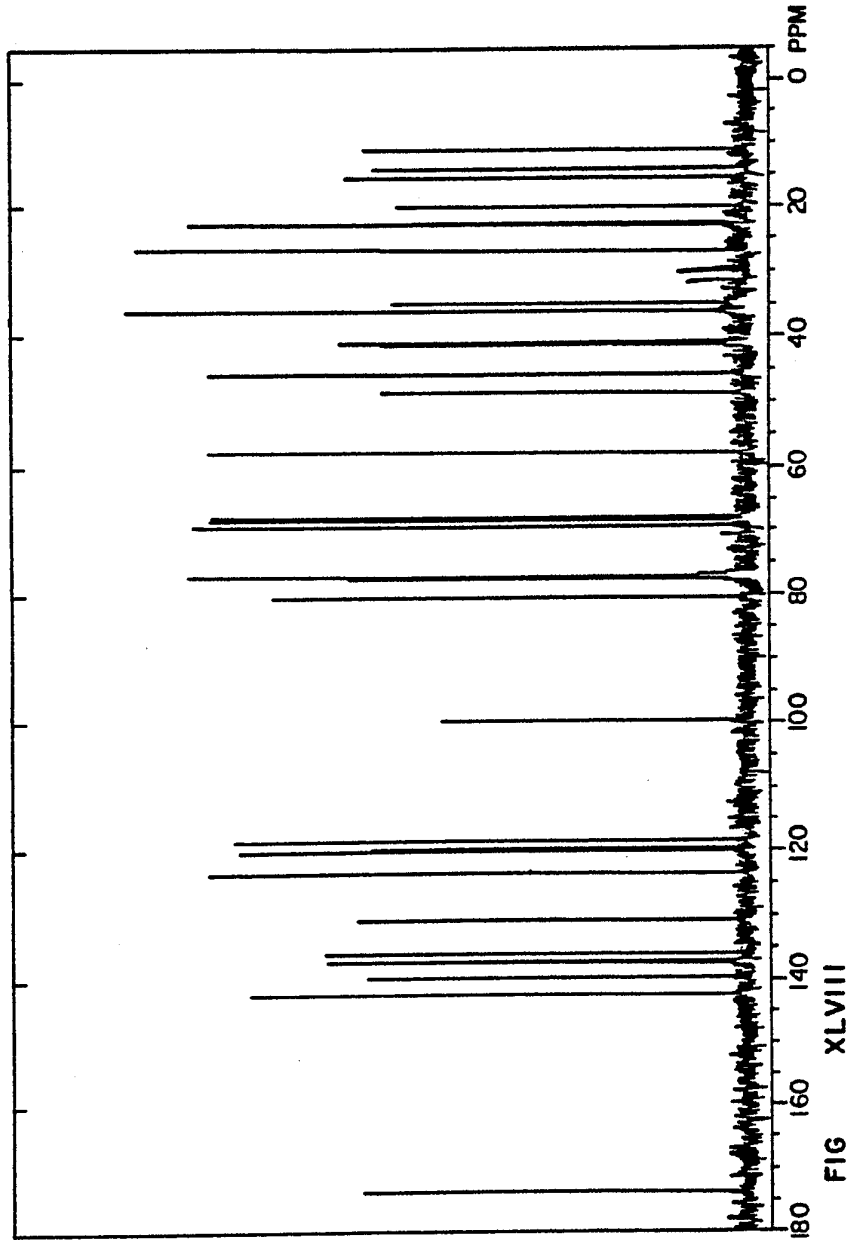


FIG XLVIII

ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249^u
10 µg/ml i MeOH

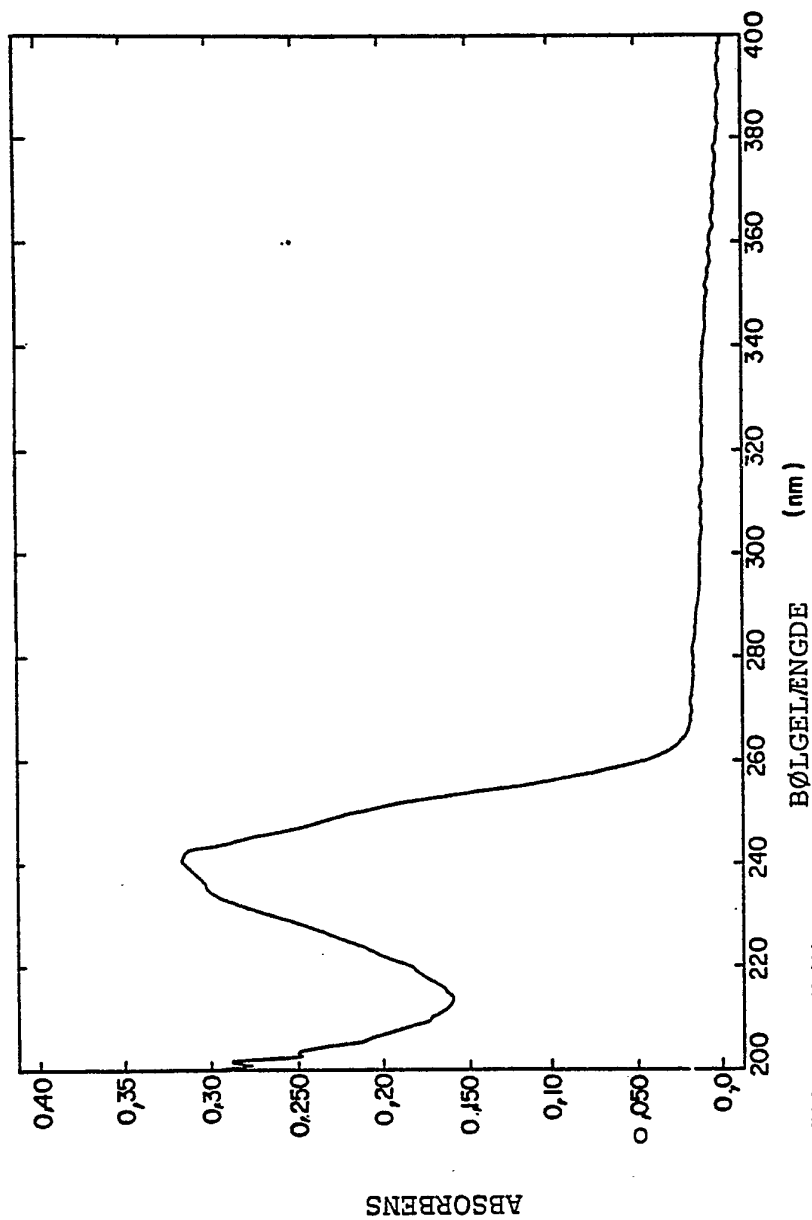
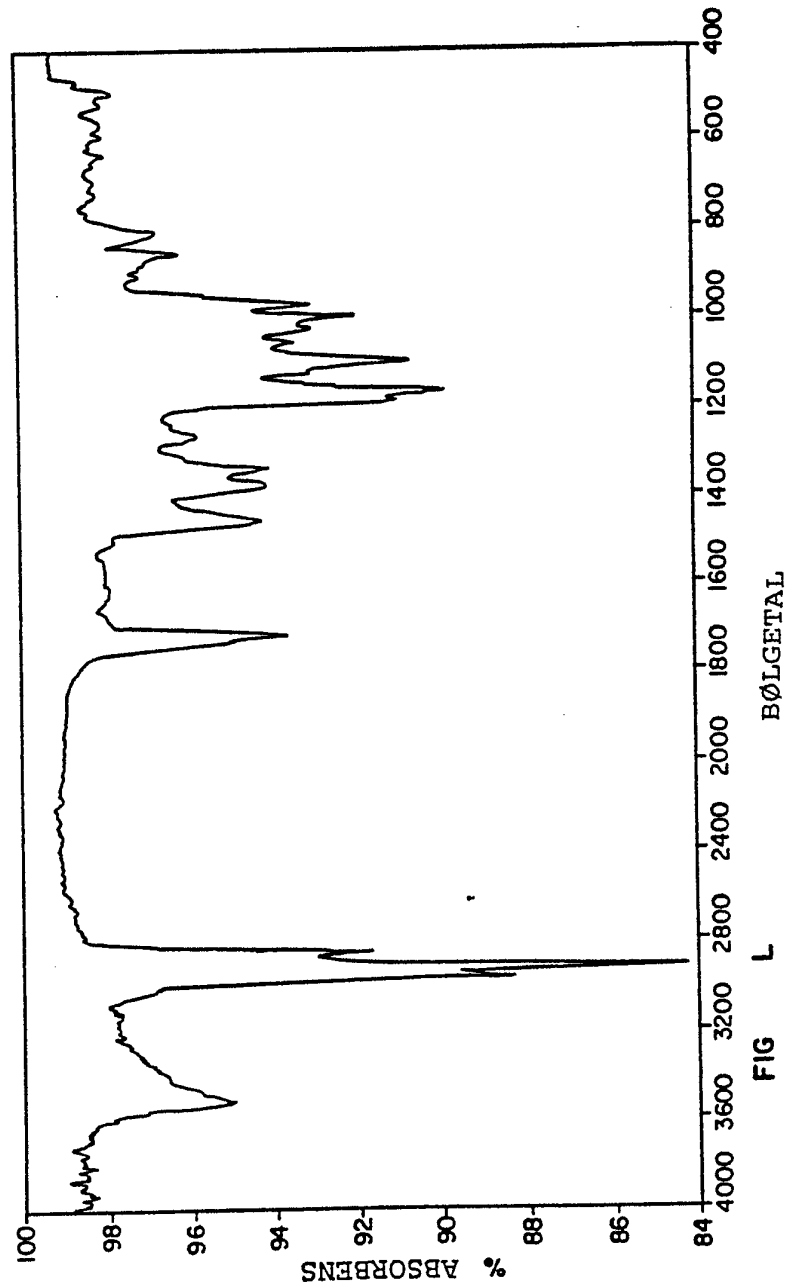


FIG XLIX

INFRARØDT ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249_u (KBr-SKIVE)

ELEKTRONANLAGSMASSESPEKTRUM FOR LL-F28249, u

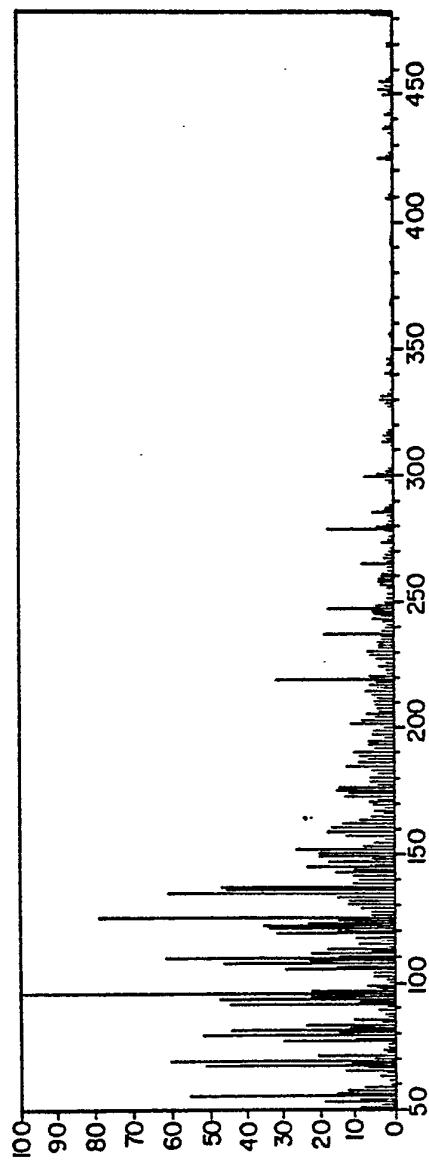
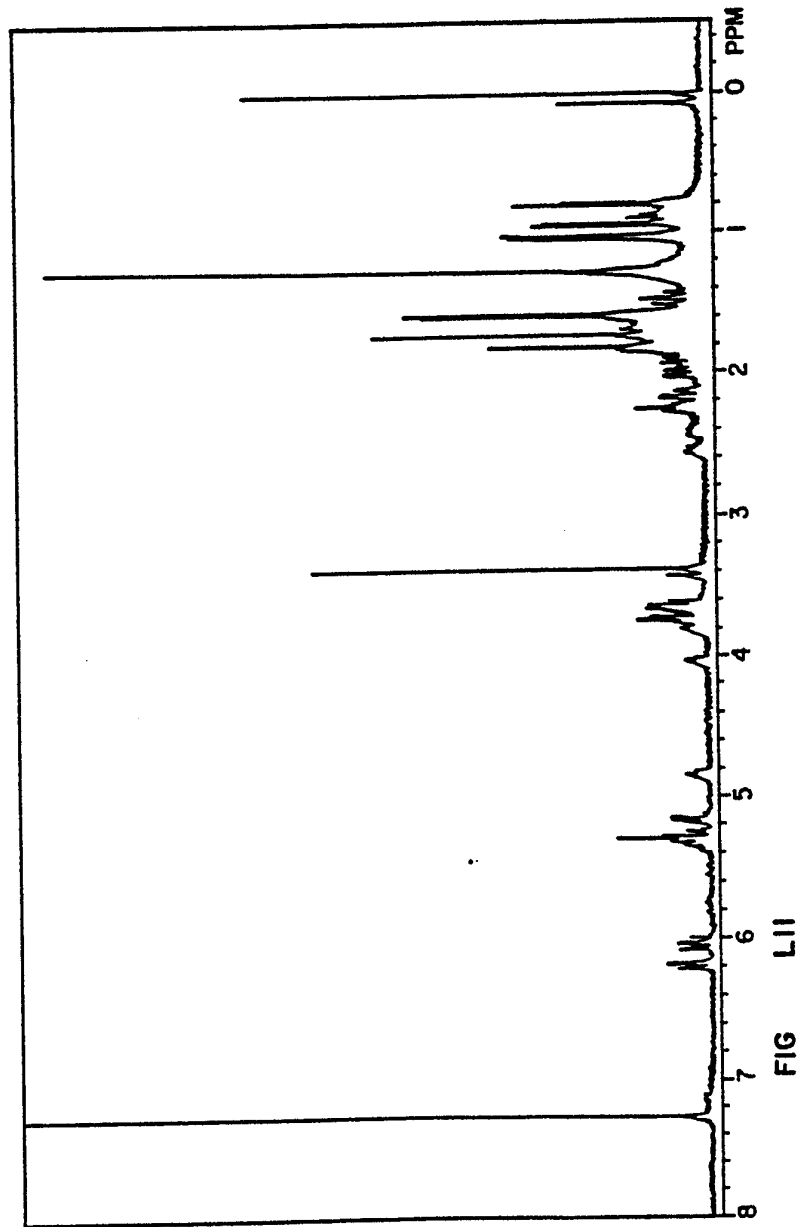
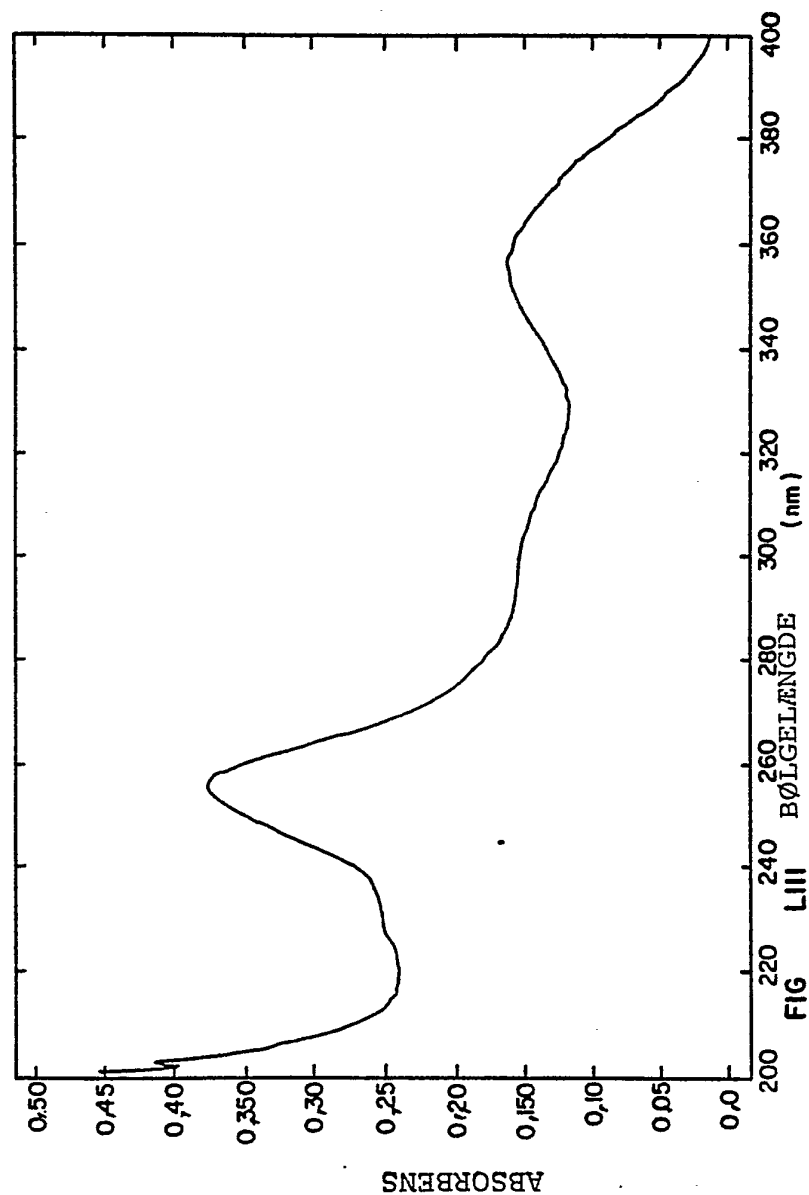


FIG L I

PROTONKERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249, u I
CDCl₃-OPLØSNING



ULTRAVIOLET ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249
10 µg/ml i MeOH



FIG

INFRARØDT ABSORPTIONSSPEKTRUM FOR LL-F28249, (KBr-SKIVE)

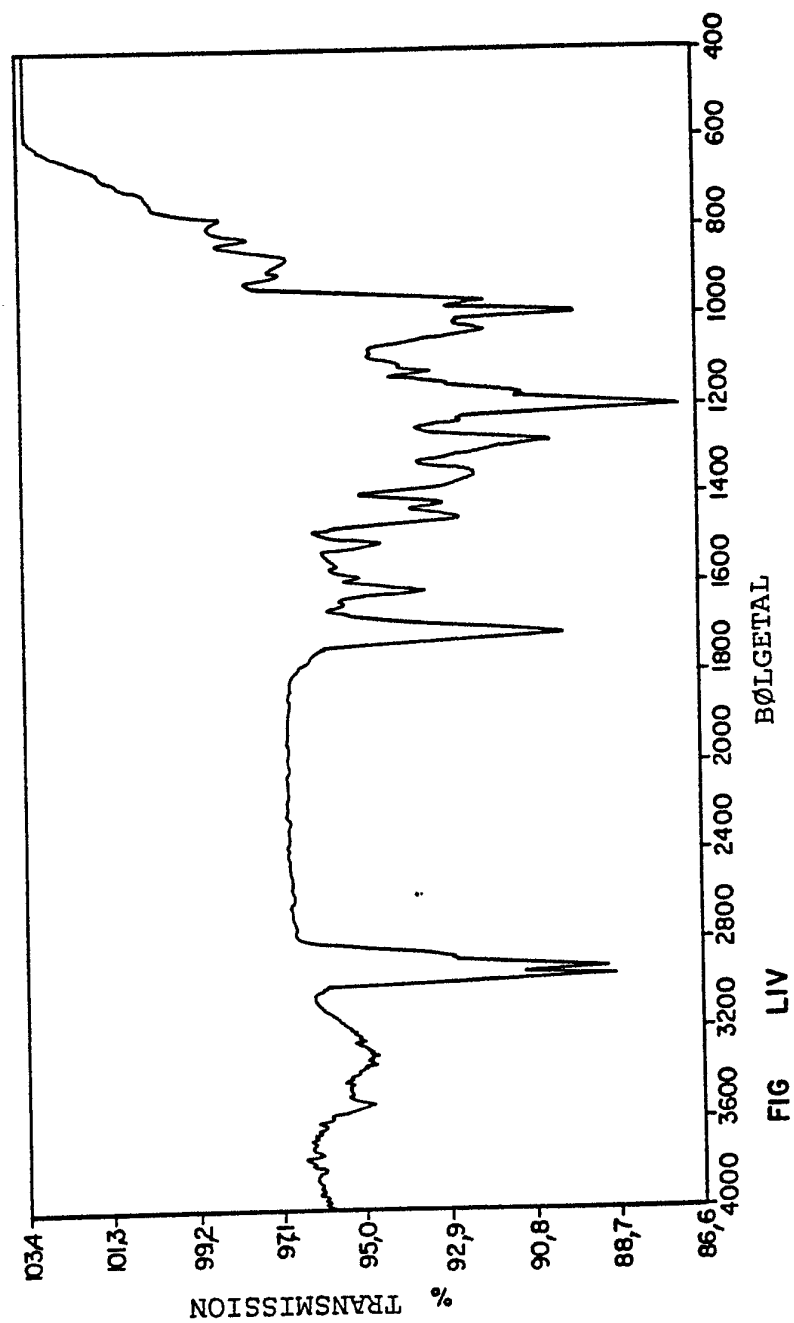


FIG LIV

ELEKTRONANSLAGSMASSESP E KTRUM FOR LL-F28249)

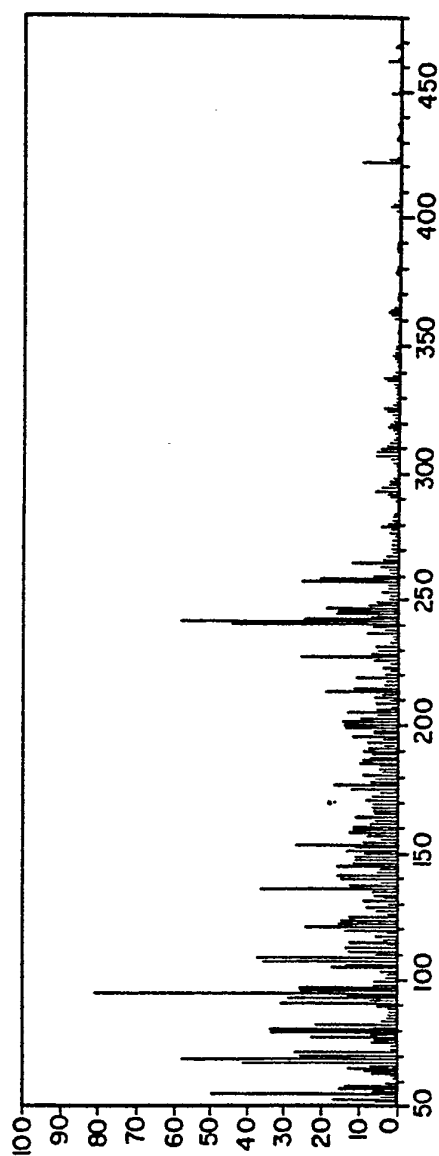
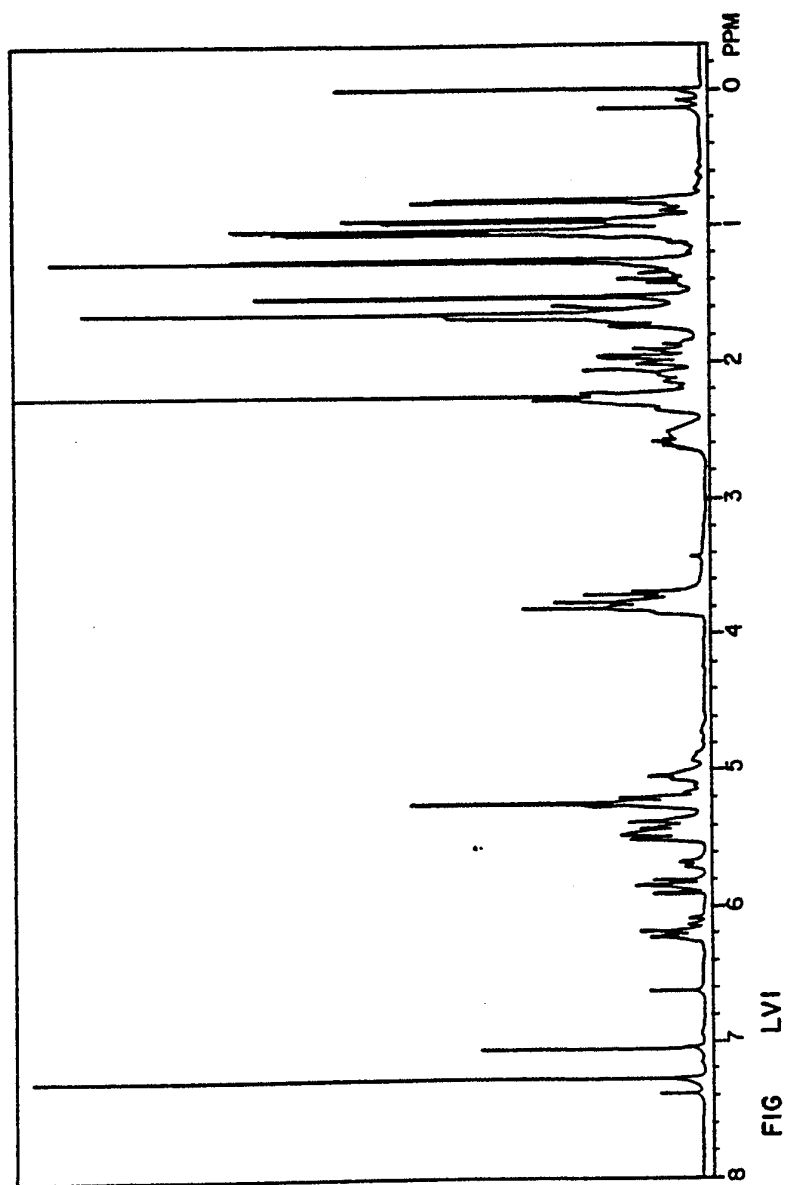


FIG LV

PROTONKERNMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249 I
CDCl₃-OPLØSNING



CARBON-13-KERNEMAGNETISK RESONANSSPEKTRUM FOR LL-F28249 I
CDCl₃-OPLØSNING

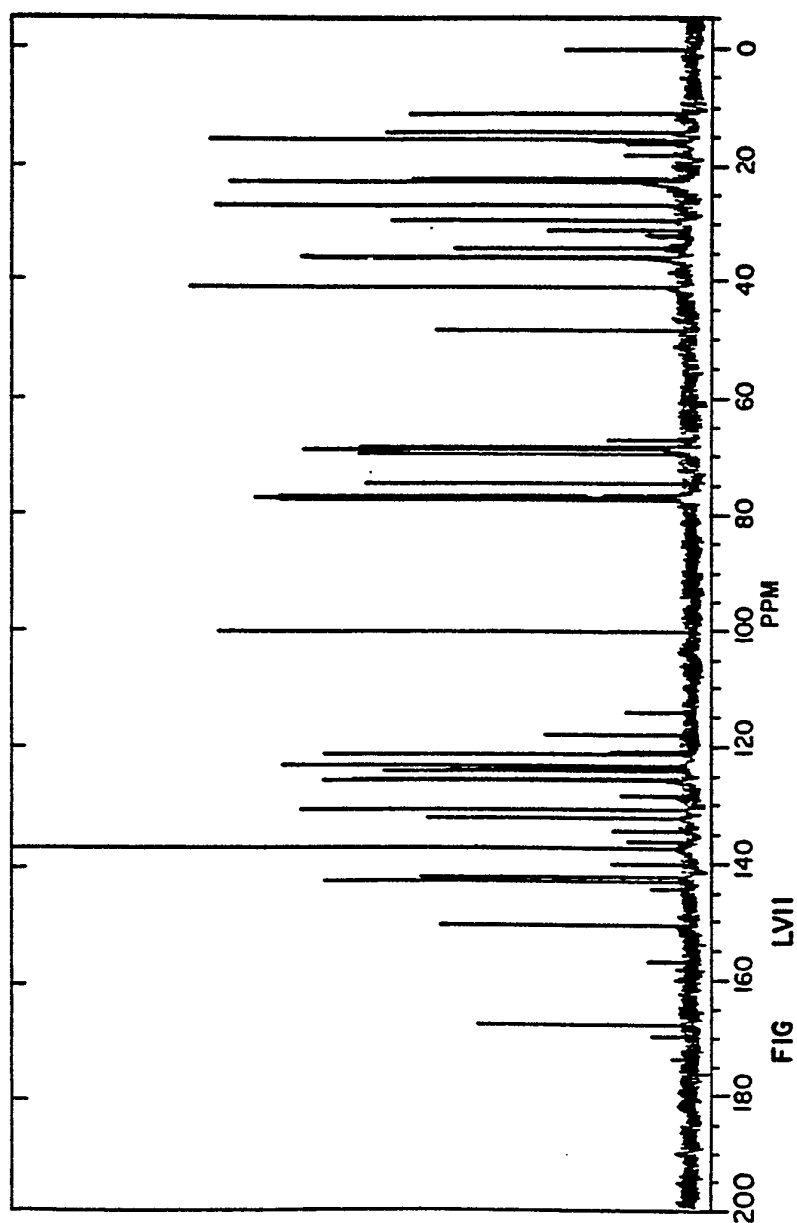


FIG LVII