



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(9) **SU** (11) **1560059** **A3**

(51) 5 C 12 P 17/08 // (C 12 P 17/08,
C 12 R 1:465)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

1
(21) 4027887/30-13
(22) 25.07.86
(31) 8518999; 8520069; 8610063;
8610862
(32) 27.07.85; 09.08.85; 24.04.86;
02.05.86
(33) GB
(46) 23.04.90. Бюл. № 15
(71) Пфайзер Корпорейшн (РА)
(72) Стив Пол Гибсон, Келвин Скотт
Холдом, Александр Кроссан Гоуди
и Джон Десмонд Бу Лок (GB)
(53) 615.779.93 (088.8)
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО
АВЕРМЕКТИНА
(57) Изобретение относится к микро-
биологической промышленности, в част-
ности к производству антибиотиков.
Штамм *Streptomyces avermitilis* NCIB
12121 культивируют в питательной сре-
де в присутствии карбоновой кислоты
 R_1CO_2H или ее натриевой соли, или ее
метилового эфира, где R_2 - альфа-
разветвленный C_3-C_8 -алкил, при усло-
вии, что не изопропиловый или вторич-

2
но-бутиловый, алкенил, алкинил, ал-
коксиалкил или алкилтиоалкиловый
группа, или C_5-C_8 -циклоалкилалкило-
вая группа, в которой алкиловый груп-
па представляет альфа-разветвленную
алкильную группу C_2-C_5 , или C_3-C_8 -
циклоалкил, или циклоалкилиловый
группа C_5-C_8 , при этом любой из них
может замещаться метилом или одной
или более алкиловыми группами C_1-C_4 ,
или галоатомами, или тиенилгруппа, в
условиях аэрации и перемешивания.
После ферментации выделяют целевой
продукт, где R_1 - OH и отсутствует
двойная связь в положении 22-23, или
есть двойная связь и отсутствует R_1 ,
и при необходимости последнее соеди-
нение восстанавливают до получения
целевого продукта, где R_1 - H и от-
сутствует двойная связь, R_3 - H или
 CH_3 , R_4 - 4'-(альфа-2-олеандрозил)-
альфа-2-олеандрозилэпокси-группа. Полу-
ченные соединения обладают противона-
звитарной активностью широкого спек-
тра действия, 5 з.п.ф.

Изобретение относится к микробио-
логической промышленности, в частнос-
ти производству антибиотиков.

Для осуществления способа исполь-
зуют штамм *Streptomyces avermitilis*
NCIB 12121, который характеризуется
следующими свойствами.

Культурально-морфологические при-
знаки.

Спиральные цепи спор на среде ISP4.

Серая пигментация воздушного ми-
целия на среде ISP 4.

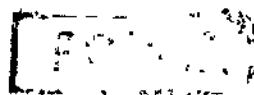
Отсутствие четкой пигментации суб-
страта мицелия на среде ISP 4. Отсут-
ствие способного диффундировать пиг-
мента на среде ISP 5.

Образование меланина на ISP 6: пеп-
тон-дрожжи-железный агар.

Биохимические свойства.

Ферментативная активность:

(9) **SU** (11) **1560059** **A3**



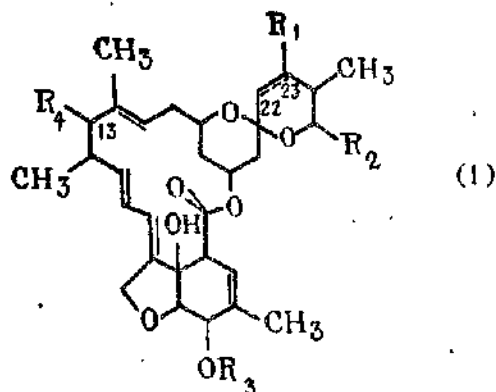
Восстановление нитрата	-	
Образование H_2S	+	
Гидролиз гиппурата	-	
Продукты деградации:		
Гуанин	-	5
Мочевина	+	
Аллантоин	+	
Температура выращивания:		
45°C	-	10
Рост в присутствии:		
7%-ного хлористого натрия	+	
0,1%-ного фенола	+	
0,0001%-ного теллурита		
калия	+	15
Рост на единичном источнике азота		
(0,1 мас./об.%)		
L-Цистеин	+	
L-Валин	+	
L-Фенилаланин	+	20
L-Гистидин	+	
L-Гидроксипролин	-	
Нитрат калия	-	
Рост на единичном источнике угле-		
рода (1 мас./об.%)		25
L-Арабиноза	+	
Сахароза	+	
D-Ксилоза	+	
мезо-Инозит	+	
Маннит	+	30
D-Фруктоза	+	
L-Рамноза	+	
Раффиноза	+	
D-Лактоза	+	35
Салицин	-	
D-Мелибиоза	+	
Ацетат натрия		
(0,1 мас./об.%)	+	
Пропионат натрия		
(0,1 мас./об.%)	+	40
Пируват натрия		
(0,1 мас./об.%)	+	

(ISP - среды согласно международному проекту по стрептомицину (ISP)).

Пример 1. Получение 25-циклопентил-авермектин А2.

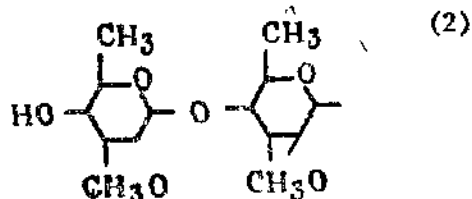
Суспензию культуры на скошенном агаре *S. avermitilis* NC1B 12121 инокулируют в 600 мл среды, содержащей лактозу (12,0 г), барду (8,0 г) и дрожжевой экстракт (3,0 г), в трехлитровой колбе, и инкубируют при 28°C в течение 3 дней. Этот инокулом используют для инокулирования 16 л среды, содержащей растворимый крахмал (640 г), сульфат аммония (32 г), вторичный кислый фосфат калия (16 г), хлористый натрий (16 г), сульфат магния $7H_2O$ (16 г), карбонат кальция

(32 г), растворимый дрожжевой экстракт (6,4 г), сульфат железа (II) $\times 7H_2O$ (0,016 г), сульфат цинка $7H_2O$ (0,016 г) и хлорид марганца $4H_2O$ (0,016 г), в двадцатилитровом ферментере. Ферментируемую массу инкубируют при 28°C при перемешивании со скоростью 250 об./мин и подают воздух со скоростью 15 л/мин. Натриевую соль циклопентакарбоновой кислоты (1,6 г) добавляют через 24 ч, и снова через 28 и 72 ч инкубирования, а ферментацию продолжают 120 ч. После этого времени мицелий удаляют фильтрованием и экстрагируют смесью ацетон:1н. соляная кислота (100:1, 3×7 л). Полученный экстракт концентрируют до приблизительно 2 л при пониженном давлении и экстрагируют метиленхлоридом (2×5 л). Метиленхлоридный экстракт концентрируют досуха до получения неочищенного продукта в виде подвижного масла, которое растворяют в диэтиловом эфире и вводят в колонку с силикагелем (1 кг). Колонку элюируют диэтиловым эфиром, собирая фракции по 100 мл. Фракции 20-40 объединяют, и растворитель выпаривают, получая практически очищенный материал. Продукт растворяют в смеси метанола и воды (4:1) и хроматографируют на C18 Micro-Bondapak колонке (50 мм \times 50 см) в высокоэффективном жидкостном хроматографе, используя тот же растворитель со скоростью потока 100 мл/мин. Фракции 35-50, содержащие целевой продукт, объединяют и повторно хроматографируют на C18 Zorbax ODS колонке (21 мм \times 15 см), элюируя смесью метанола и воды (4:1) со скоростью потока 9 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют и растворитель выпаривают до получения соединения формул



где R_1 - OH, двойной связи нет; R_2 - циклопентил; R_3 - CH_3 ; R_4 - 4'-амфа-

Z-олеандросил)-альфа-Z-олеандросилоксен,



в виде белого порошка с т.пл. 150,5-151°C. Строение продукта подтверждено данным масс-спектрометрии и ЯМР ^{13}C .

Масс-спектрометрия с бомбардировкой быстрыми атомами проведена на масс-спектрометре VG модель 7070E с использованием матрицы образца триэтиленгликоля с твердым хлористым натрием, $(\text{M}+\text{Na})^+$ наблюдается при m/e 939 (теоретически 939). Масс-спектрометрии электронного удара проводят на масс-спектрометре VG Модель 7070F. Значение m/e для основных фрагментов следующие: 335, 317, 275, 251, 205, 181, 179, 145, 127, 113, 111, 96 и 87.

Данные ЯМР ^{13}C получены на спектрометре Брукер Модель M-250 для образца концентрации 20 мг/мл в дейтерохлороформе. Химические сдвиги в м.д. по отношению к тетраметилсилану: 14,1; 15,3; 17,8; 18,5; 19,9; 20,3; 24,6; 25,9; 26,2; 29,3; 34,4 (2C); 34,7; 36,7; 37,8; 39,8; 40,5; 41,0; 41,3; 45,8; 56,4; 56,6; 57,8; 67,4; 68,0; 68,7; 69,9; 70,5; 76,0; 77,6 (2C); 78,3; 79,5; 80,7 (2C); 81,8; 94,9; 98,7; 99,8; 117,7; 118,5; 119,8; 125,0; 135,8; 136,3; 137,8; 160,1 173,8.

Пример 2. Суспензию культуры на скошенном агаре *S. avermitilis* ATCC 31271 инокулируют в 50 мл среды, содержащей лактозу (1,0 г), барду (0,75 г) и дрожжевой экстракт (0,25 г), в колбе объемом 350 мл и инкубируют при 28°C в течение 3 дней. Этот инокулом (4 мл) используют для инкубирования каждой из 50 колб, содержащих кукурузный крахмал (2,0 г), соевую муку (0,35 г) и дрожжевой экстракт (0,25 г), объемом 350 мл, которые инкубируют при 28°C.

Через 24 ч в каждую колбу добавляют натриевую соль цикlopентакрбонвой кислоты (5 мг) и инкубирование продолжают в течение следующих 5 дней. После этого содержимое колб извлекают и мицелий выделяют центрифугирова-

нием. Полученный мицелий экстрагируют смесью ацетон:1н. соляная кислота (100:1), и ацетоновый экстракт концентрируют досуха. Экстракт анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и показывают, что он содержит продукт, идентичный продукту примера 1.

Пример 3. Получают инокулом по примеру 1 и используют его для инокулирования 50 мл среды как в примере 1, заключенной в колбу емкостью 350 мл. После инкубирования в течение 24 ч добавляют 2-амино-циклопентилуксусную кислоту (циклопентилглицин) (5 мг) и ферментацию продолжают еще 5 дней. Полученный продукт выделяют, экстрагируя мицелий ацетоном и метилхлоридом. Экстракт анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, данные которой указывают на то, что продукт содержит соединение, идентичное продукту примера 1.

Пример 4. Воспроизводят условия примера 3, за исключением того, что в качестве субстрата используют цикlopентилметанол с аналогичными результатами.

Пример 5. Воспроизводят условия примера 3, за исключением того, что в качестве субстрата используют сложный метиловый эфир цикlopентакрбонвой кислоты с аналогичными результатами.

Пример 6. Воспроизводят условия примера 3, за исключением того, что в качестве субстрата используют цикlopентанкарбоную кислоту, растворенную в метаноле, с аналогичными результатами.

Пример 7. Получение 25-(тиен-3-ил)-авермектин.

Суспензию культуры на скошенном агаре *S. avermitilis* NCIB 12121 инокулируют в 600 мл среды, содержащей лактозу (12,0 г), барду (8,0 г) и дрожжевой экстракт (3,0 г), в трехлитровой колбе и инкубируют при 28°C в течение 3 дней. Этот инокулом используют для инокулирования 16 л среды, содержащей растворимый крахмал (640 г), сульфат аммония (32 г), вторичный кислый фосфат калия (16 г), натрийхлорид (16 г), сульфат магния $7\text{H}_2\text{O}$ (16 г), карбонат кальция (32 г), растворимый дрожжевой экстракт (6,4 г), сульфат железа (II) $7\text{H}_2\text{O}$ (0,016 г),

сульфат цинка $7H_2O$ (0,016 г) и хлорид марганца $4H_2O$ (0,016 г), находящейся в двадцатилитровом ферментере. Ферментируемую массу инкубируют при $28^\circ C$ при перемешивании со скоростью 250 об/мин и подают воздух со скоростью 15 л/мин. Спустя 24 ч добавляют натриевую соль тиофен-3-карбоновой кислоты (1,6 г), такое добавление повторяют через 48 и 72 ч, а ферментацию продолжают в течение 120 ч. Далее мицелий удаляют фильтрованием и экстрагируют смесью ацетон:1н. соляная кислота (100:1,3×7 л). Полученный экстракт концентрируют до приблизительно 2 л при пониженном давлении и экстрагируют метиленхлоридом (2 × 5 л). Метиленхлоридный экстракт концентрируют досуха до получения неочищенного продукта в виде подвижного масла, которое растворяют в диэтиловом эфире и вводят в колонну с силикагелем (1 кг). Эту колонну элюируют диэтиловым эфиром, собирая фракции по 200 мл. Фракции 32-45 объединяют и растворитель выпаривают до получения частично очищенного материала. Полученный продукт растворяют в смеси метанола и воды (3:1) и хроматографируют на колонне C18 Micro Bondapak (50 мм×50 см) в высокоэффективном жидкостном хроматографе, используя тот же растворитель со скоростью потока 100 мл/мин. Фракции 27-36, содержащие целевой продукт, объединяют и повторно хроматографируют на C18 Zorbax ODS колонне (21 мм×25 см), элюируя смесью метанола и воды (3:1) со скоростью потока 9 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют и растворитель выпаривают до получения соединения формулы (1), где R_1 - OH, двойной связи нет, R_2 - тиенил-3-ил, R_3 - CH_3 , а R_4 - 4'-(альфа-Z-олеандросил)-альфа-Z-олеандросилокси (2) в виде белого порошка с т.пл. $167^\circ C$. Строение продукта подтверждено данными масс-спектрометрии следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами проводят на масс-спектрометре VG модель 7070F, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом. $(M+Na)^+$ наблюдается при m/e 953 (теор. 953).

Масс-спектрометрию электронного удара проводят на масс-спектрометре

VG модель 7070F. Значение m/e для основных фрагментов следующие: 349, 331, 275, 265, 257, 247, 237, 219, 195, 145, 127, 113, 95 и 87.

Пример 8. Вегетативную клеточную суспензию *S. avermitilis* NCIB 12121, хранившуюся при $-60^\circ C$ в 10% объем/объем водном (2 мл) глицерине, инокулируют в 50 мл среды, содержащей лактозу (1,0 г), барду (0,75 г) и дрожжевой экстракт (0,25 г), находящуюся в конической колбе объемом 300 мл, и инкубируют при $28^\circ C$ в течение 24 ч при встряхивании. Затем инокулом добавляют к 600 мл указанной среды, содержащейся в трехлитровой колбе, и полученную смесь инкубируют при $28^\circ C$ в течение 24 ч при встряхивании. Полученный продукт используют для инокулирования 10 л указанной среды, находящейся в 16-литровом ферментере, и инкубируют в течение 24 ч при $28^\circ C$ и скорости перемешивания 350 об/мин при аэрации со скоростью 10 л/мин. Эту ферментируемую массу (600 мл) используют для инокулирования 16 л среды, содержащей частично гидролизированный крахмал (640 г), сульфат аммония (32 г), вторичный кислый фосфат калия (16 г), натрийхлорид (16 г), сульфат магния $7H_2O$ (16 г), карбонат кальция (16 г), растворимый дрожжевой экстракт (6,4 г), сульфат железа (II) $7H_2O$ (0,016 г), сульфат цинка $7H_2O$ (0,016 г) и хлорид марганца $4H_2O$ (0,016 г), находящейся в 20-литровом ферментере. Ферментируемую массу инкубируют при $28^\circ C$ при перемешивании со скоростью 350 об/мин и аэрируют со скоростью 15 л/мин. Через 24 ч добавляют натриевую соль циклобутанкарбоновой кислоты (1,6 г) и такое добавление повторяют через 48 и 72 ч инкубирования, и ферментацию продолжают в течение 120 ч. После этого промежутка времени мицелий удаляют фильтрованием и экстрагируют ацетоном (3×7 л). Этот экстракт концентрируют до приблизительно 2 л при пониженном давлении и экстрагируют метиленхлоридом (2×5 л). Метиленхлорид конденсируют досуха до получения неочищенного продукта в виде подвижного масла. Его помещают в изооктан (150 мл), и раствор экстрагируют смесью метанола (95 мл) и воды (5 мл). После выпаривания метанольного экстракта получают частично очищенный ма-

териал, который разделяют на индивидуальные компоненты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии следующим образом.

Полученный остаток растворяют в небольшом количестве метанола и хроматографируют на колонке C18 Micro-Bondapak (50 мм×50 см) на высокоэффективном жидкостном хроматографе, используя смесь метанол/вода (4:1) со скоростью потока 100 мл/мин. Фракции 1-4 объединяют и используют в примере 9, фракции 5-9 объединяют и используют в примере 10, фракции 10-19 объединяют и используют в примере 11, а фракции 20-35 объединяют и используют в примере 12.

Пример 9. Получение 25-циклобутил-авермектин В2 ($R_1 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$).

Объединенные фракции 1-4 из примера 8 выпаривают досуха и остаток повторно хроматографируют на колонке C18 Zorbax ODS (21 мм×25 см), элюируя смесью метанола и воды (3:1) со скоростью потока 9 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют, растворитель выпаривают и полученный продукт подвергают окончательной очистке на колонке (10,5 мм×25 см), элюируя смесью метилхлорида и метанола (98:2) со скоростью потока 4 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют и растворитель выпаривают до получения соединения формулы (1), где $R_1 = \text{OH}$, двойной связи нет, $R_2 = \text{циклобутил}$, $R_3 = \text{H}$, а $R_4 = 4'-(\alpha\text{-Z-олеандросил})-\alpha\text{-Z-олеандросилокси}$ (2) в виде белого порошка с т.пл. 110-112°C.

Строение полученного продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами проводят на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом ($\text{M} + \text{Na}$)⁺ наблюдают при m/e 911 (теоретически 911).

Масс-спектрометрию с электронным ударом осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070F. Значения m/e для основных фрагментов: 321, 303, 261, 257, 237, 219, 209, 191, 179, 167, 145, 127, 113, 111, 95 и 87.

Пример 10. Получение 25-циклобутил-авермектин А2 ($R_1 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CH}_3$).

Объединенные фракции 5-9 из примера 8 выпаривают досуха, а остаток

хроматографируют дважды на колонке C18 Zorbax ODS (21 мм×25 см), элюируя смесью метанола и воды (77:23) со скоростью потока 9 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют и выпаривают до получения соединения формулы (1), где $R_1 = \text{OH}$, двойной связи нет, $R_2 = \text{циклобутил}$, $R_3 = \text{CH}_3$, а $R_4 = 4'-(\alpha\text{-Z-олеандросил})-\alpha\text{-Z-олеандросилокси}$ (2) в виде белого порошка с т.пл. 135-140°C.

Строение продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом ($\text{M} + \text{Na}$)⁺ наблюдают при m/e 925 (теоретически 925).

Масс-спектрометрию электронного удара осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070F. Значения m/e для основных фрагментов следующие: 596, 454, 321, 303, 275, 237, 219, 191, 179, 167, 145, 127, 113, 111, 95 и 87.

Пример 11. Получение 25-циклобутил-авермектин В1 (имеется 22,23 двойная связь, $R_3 = \text{H}$).

Объединенные фракции 10-19 из примера 8 выпаривают досуха, а остаток растворяют в метаноле и хроматографируют на колонке C18 Zorbax ODS, элюируя смесью метанола и воды (4:1) со скоростью потока 9 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют, а растворитель выпаривают до получения продукта, который повторно хроматографируют на колонке Silica Zorbax STZ (21 мм×25 см), элюируя смесью дихлорметана и метанола (98,5:1,5) со скоростью потока 9 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют и растворитель выпаривают до получения соединения формулы (1), где R_1 отсутствует, двойная связь имеется, $R_2 = \text{циклобутил}$, $R_3 = \text{H}$, а $R_4 = 4'-(\alpha\text{-Z-олеандросил})-\alpha\text{-Z-олеандросилокси}$, в виде белого порошка с т.пл. 135-138°C. Строение полученного продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца три-

этиленгликоля и твердым натрийхлоридом $(M+Na)^+$ наблюдается при m/e 898 (теоретически 893).

Масс-спектрометрию электронного удара осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E. Значения m/e для основных фрагментов следующие: 303, 261, 257, 219, 191, 167, 127, 113, 111, 95 и 87.

Пример 12. Получение 25-циклобутил-авермектин A1 (имеется двойная связь $22,23 R_3 = CH_3$).

Объединенные фракции 20-35 из примера 8 выпаривают досуха и остаток хроматографируют на колонке C18 Zorbax ODS (21 мм×25 см) со скоростью потока 9 мл/мин. Соответствующие фракции объединяют, растворитель выпаривают и полученный продукт повторно хроматографируют на колонке Silica Spherisorb 5 мкм (10,5 мм×25 см), элюируя смесью дихлорметана и метанола (98,5:1,5) со скоростью потока 4 мл/мин.

В результате объединения соответствующих фракций с последующим выпариванием получают соединение формулы (I), где R_1 отсутствует, двойная связь имеется, R_2 - циклобутил, R_3 - CH_3 , а R_4 - 4'-(альфа-Z-олеандросил)-альфа-Z-олеандросилокси, в виде белого порошка с т.пл. 120-124°C. Строение полученного продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом. $(M+Na)^+$ наблюдают при m/e 907 (теоретически 907).

Масс-спектрометрию электронного удара осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070F. Значения m/e для основных фрагментов: 578, 303, 275, 257, 219, 191, 167, 145, 127, 113, 111, 95 и 87.

Пример 13. Получение 25-(циклогекс-3-енил)авермектин A2.

Воспроизводят среду и условия примера 1 за исключением того, что в качестве субстрата используют натриевую соль 3-циклогексановой кислоты до получения соединения формулы (I), где R_1 - OH, двойной связи нет, R_2 - циклогекс-3-енил, R_3 - CH_3 , а R_4 - 4'-(альфа-Z-олеандросил)-альфа-Z-оле-

андросилокси, в виде белого порошка с т.пл. 131-135°C.

Строение полученного продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом. $(M+Na)^+$ наблюдают при m/e 951 (теоретически 951).

Масс-спектрометрию электронного удара осуществляют, используя масс-спектрометр VG модель 7070F. Значения m/e для основных фрагментов: 624, 480, 347, 329, 375, 263, 245, 235, 217, 205, 193, 179, 145, 127, 113, 111, 95 и 87.

Пример 14. Получение 25-циклогексил авермектин A2.

Воспроизводят среду и условия примера 1 за исключением того, что в качестве субстрата используют натриевую соль циклогексанкарбоновой кислоты до получения соединения формулы (I), где R_1 - OH, R_2 - циклогексил, R_3 - CH_3 , а R_4 - 4'-(альфа-олеандросил)-альфа-Z-олеандросилокси, в виде белого порошка с т.пл. 112-117°C.

Строение полученного продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом. $(M+Na)^+$ наблюдают при m/e 953 (теоретически 953).

Масс-спектрометрию электронного удара осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070F. Значения m/e для основных фрагментов: 624, 482, 349, 331, 275, 265, 247, 237, 219, 207, 195, 179, 145, 127, 113, 111, 96 и 87.

Пример 15. Получение 25-(1-метилтиозтил)авермектин A2.

Воспроизводят среду и условия примера 1 за исключением того, что в качестве субстрата используют натриевую соль 2-метилтиопропионовой кислоты до получения соединения формулы (I), где R_1 - OH, R_2 - 1-метилтиозтилом, R_3 - CH_3 , а R_4 - 4'-(альфа-Z-олеандросил)-альфа-Z-олеандросилокси в виде белого порошка с т.пл. 134-138°C.

Строение полученного продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом. $(M+Na)^+$ наблюдают при m/e 945 (теоретически 945).

Масс-спектрометрию электронного удара осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070F. Значение m/e для основных фрагментов: 341, 323, 275, 257, 239, 211, 179, 187, 145, 127, 113, 111, 95 и 87.

Пример 16. Получение 26-(2-метилциклопропил)авермектина A2.

Воспроизводят среду и условия примера 1 за исключением того, что в качестве субстрата используют натриевую соль 2-метилциклопропанкарбоновой кислоты до получения соединения формулы (1), где R_1 - OH, R_2 - 2-метилциклопропил, R_3 - CH_3 , R_4 - 4'-(альфа-Z-олеандросил)-альфа-Z-олеандроксикси, в виде белого порошка с т.пл. 147-150°C.

Строение полученного продукта подтверждено масс-спектрометрически следующим образом.

Масс-спектрометрию с бомбардировкой быстрыми электронами осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070E, используя матрицу образца триэтиленгликоля с твердым натрийхлоридом, $(M+Na)^+$ наблюдают при m/e 925 (теоретически 925).

Масс-спектрометрию электронного удара осуществляют на масс-спектрометре VG модель 7070F. Значение m/e для основных фрагментов: 596, 454, 303, 275, 237, 219, 209, 191, 179, 167, 145, 127, 113, 111, 96 и 87.

Пример 17. Воспроизводят способ по примеру 1 за исключением того, что в качестве субстрата вместе с цикlopentакрбоновой кислоты используют натриевые соли следующих карбоновых кислот, до получения соответствующих 25-замещенных авермектинов формулы (1), где R_1 - OH, двойной связи нет, или где имеется двойная связь, а R_1 отсутствует, R_3 - H или OH, а R_4 - 4'-(альфа-Z-олеандросил)-альфа-Z-олеандроксикси: 2-метилвалериановая, 2,3-диметилмасляная, 2-метилгексановая, 2-метилпент-4-ено-

вая, 2-метилпентановая, 2-циклопропилпропионовая, циклогексанкарбоновая, 4,4-дифторциклогексанкарбоновая, 4-метилциклогексанкарбоновая, 3-метилциклогексанкарбоновая, циклопентен-1-карбоновая, 1-циклогексенкарбоновая, тетрагидропиран-4-карбоновая, тиофен-2-карбоновая, 3-фенилуксусная и 2-хлор-тиофен-4-карбоновая.

Пример 18. Получение 25-циклобутил-22,23-дигидроавермектина B1.

Продукт примера 11 в бензоле гидрируют в присутствии трис(трифенилфосфин)родий хлорида по способу EPA-A-0001689 до получения соответствующего соединения формулы (1), где является H, а двойной связи нет.

Пример 20. Жидкая композиция.

Продукт, полученный по способу любого из предшествующих примеров, растворяют в полиэтиленгликоле (средний молекулярный вес 300) до получения раствора, содержащего 400 мкг/мл, для применения в качестве жидкой композиции.

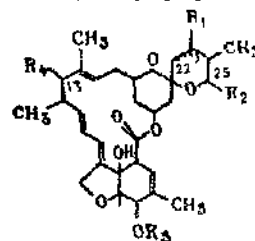
Пример 21. Противогельминтную активность оценивают против *Caenorhabditis elegans*, используя *in vitro* тест скринирования. Продукты примеров 1, 7, 9-16 убивают 100% червей в концентрации 0,1 мкг/мл.

Пример 22. Инсектицидная активность.

Активность против взрослой домашней мухи *Musca domestica* демонстрируют, используя стандартную тестовую методику, в которой мух анестезируют двуокисью углерода и 0,1 мкл ацетона, содержащего тестовое соединение, помещают на торакс самок мух. Продукты примеров 1, 7 и 9-16 все убивают 100% обработанных мух в дозах 0,01 мкг на муху.

Использование способа позволяет получать препараты, обладающие противопаразитическим действием широкого спектра.

Формула изобретения
1. Способ получения производного авермектина общей формулы I



где пунктирная линия в положении 22-23 представляет возможную двойную связь;

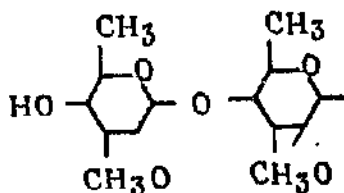
R_1 - Н или ОН и отсутствует двойная связь в положении 22-23 или двойная связь присутствует и отсутствует R_1 ;

R_2 - альфа разветвленный C_3-C_8 -алкил при условии, что не изопропиловый или вторично-бутиловый, алкенил, алкинил, алкоксиалкил, или алкилтио-алкиловая группа, или C_5-C_8 -циклоалкилалкиловая группа, в которой алкиловая группа представляет альфа разветвленную C_2-C_5 -алкиловую группу, или C_3-C_8 -циклоалкил, или C_5-C_8 -циклоалкиниловая группа, при этом любой из них может замещаться метиленом или одной или более C_1-C_4 -алкиловыми группами, или галоатомами, или тиенил-группа;

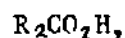
R_3 - Н или CH_3 ;

R_4 - 4'-(α -Z-олеандрозил)- α -Z-олеандрозилокси

группой формулы



закрывающийся в том, что штамм *Streptomyces avermitilis* NCIB 12121 культивируют в питательной среде в присутствии карбоновой кислоты общей формулы



или ее натриевой соли, или ее метилового эфира, и выделяют целевой продукт общей формулы I, где R_1 - ОН и отсутствует двойная связь в положении 22-23 или есть двойная связь и отсутствует R_1 , и при необходимости последнее соединение восстанавливают до получения целевого продукта, где R_1 - Н и отсутствует двойная связь.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что R_2 означает C_5 -, или C_6 -циклоалкил- или циклоалкенил-группу, которая при необходимости может быть замещена одной и более C_1-C_4 -алкильными группами.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что R_2 - циклопентил или циклогексил.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что R_2 - циклобутил.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что R_2 - 3-тиенил.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что R_1 - 1-метилтио-этил.

Приоритет по пунктам:

27.07.85 - по пп. 2 и 3;

02.05.86 - по п.4;

09.08.85 - по п.5;

24.04.86 - по п.6.

Составитель Г.Смирнова

Редактор С.Патрушева

Техред М.Ходанич

Корректор Н.Король

Заказ 844

Тираж 475

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101