

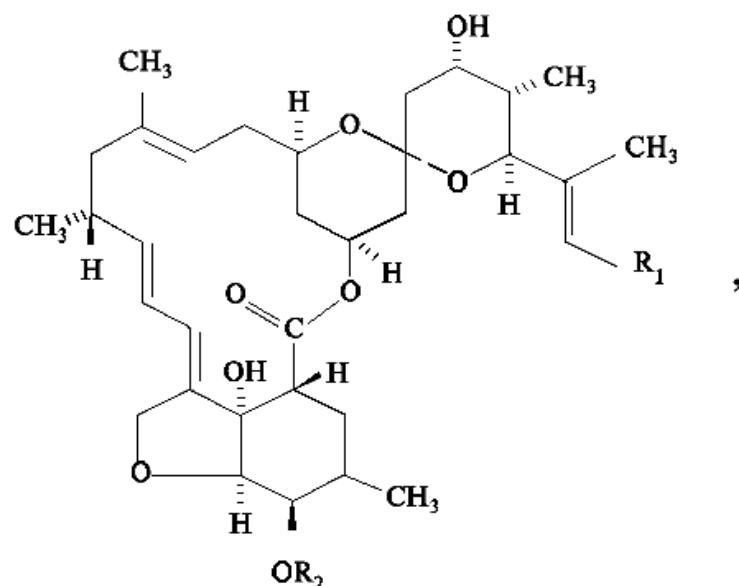
(19) **KG** (11) **151** (13) **C2**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

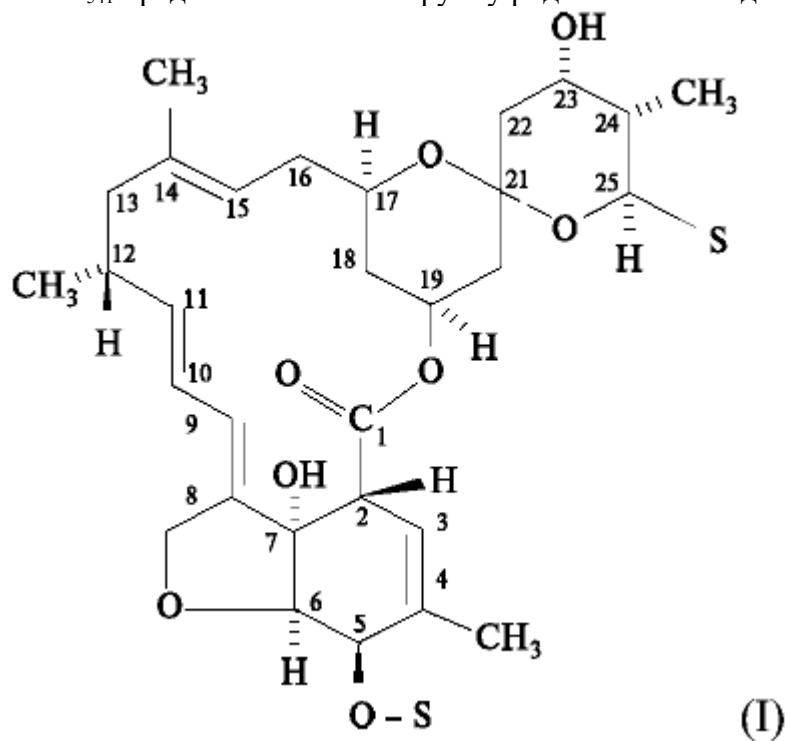
- (10) 1738090
(21) 3957807/SU
(22) 13.09.1985
(31) 8423278; 8432519
(32) 14.09.1984; 21.12.1984
(33) GB
(46) 01.10.1996, Бюл. №2, 1997
(71) Глэксо Груп Лимитед, GB
(72) Джон Варри Уорд, Хейзл Мэри Ноубл, Нейл Портер, Ричард Аллан Флеттон, Дэвид Ноубл, GB
(73) Америкэн Цианамид Компани, US
(54) **Способ получения антибиотика S₅₄₁, штаммы стрептомицетов - продуценты антибиотика S₅₄₁**
(57) Изобретение относится к новым соединениям - антибиотикам и к способам их получения, более конкретно изобретение относится к соединениям-антибиотикам, которые могут быть получены посредством ферментации актиномицетов *Streptomyces thermoarchaensis* штамм NC1B12015, или NC1B12111, или NC1B12112, или NC1B12113, или NC1B12114 на среде, содержащей источник углерода, азота и минеральные соли, при 28-34°C, pH 5.4-7.2 в течение 5 - 10 сут с последующим выделением целевого продукта - антибиотика S₅₄₁ формулы



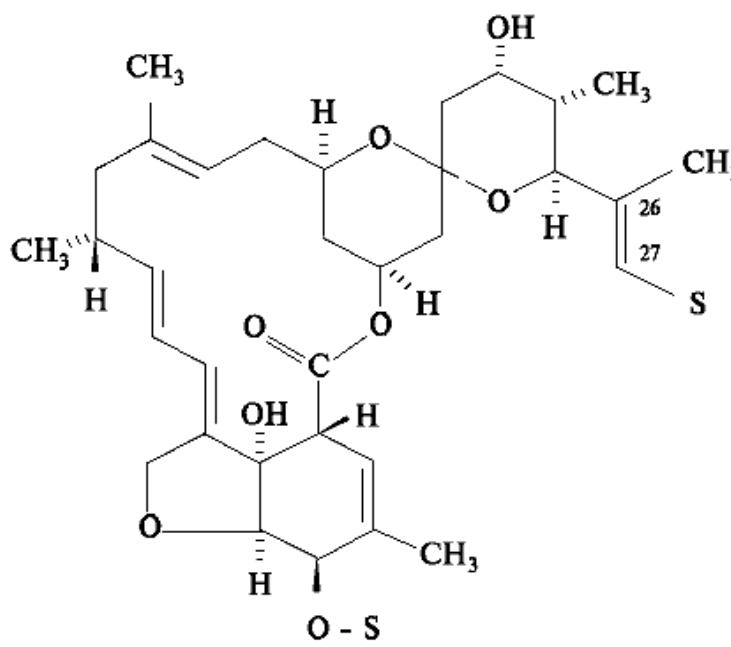
где R_1 - метил, этил или изопропил, R_2 - водород или метил. 2 с. и 4 з.п. ф-лы, 3 табл.

Изобретение относится к новым соединениям-антибиотикам и способам их получения, более конкретно изобретение относится к соединениям-антибиотикам, которые могут быть получены посредством ферментации организмов *Streptomyces*.

Антибиотики S_{541} представляют собой группу родственных соединений формулы I

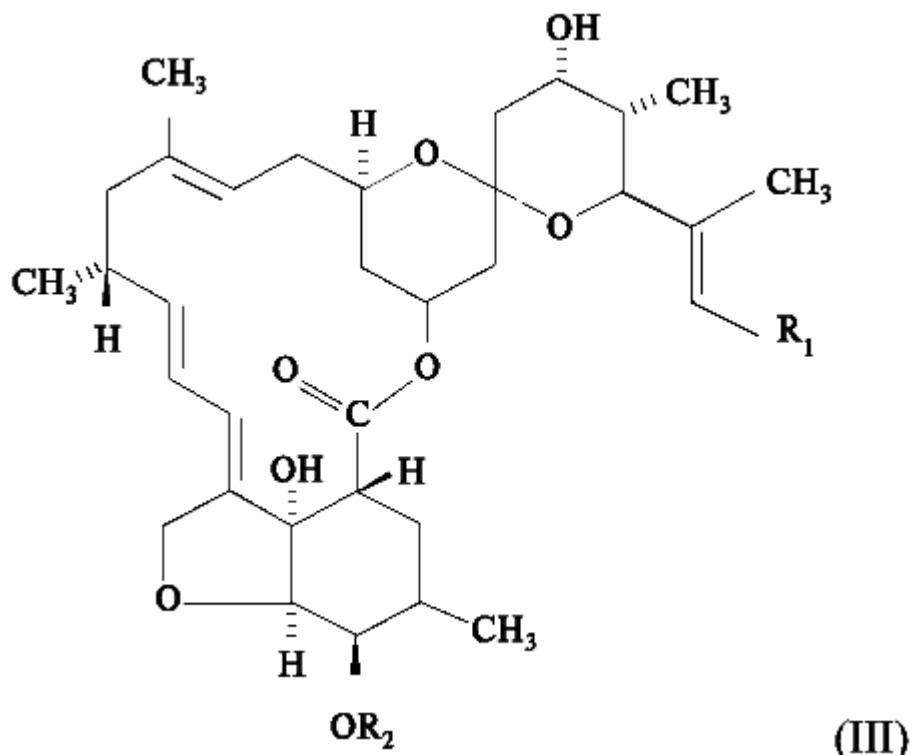


более конкретно формулы II



Изобретение распространяется на соединения, имеющие указанные выше формулы, как индивидуальные, так и их сочетания. Для определенных областей использования, например в земледелии, в садоводстве или в ветеринарной медицине, более удобным может быть применение Антибиотиков S_{541} без разделения на индивидуальные компоненты, однако для других областей использования, например в гуманитарной медицине, может быть предпочтительным использование индивидуальных соединений.

Первоначально выделенные антибиотики S_{541} легко разделяются посредством хроматографии на силикагеле на два компонента, которые обладают, например, противогельминтной активностью и тушат ультрафиолетовую флуоресценцию при 254 нм. Компонент I характеризуется значением R_f 0.7 - 0.75, а компонент II - 0.39 - 0.46, что было определено методом тонкослойной хроматографии на пластинах фирмы Мерк 5735 из силикагеля 60, элюируемых смесью 3:1 хлороформа и этилацетата. Компоненты I и II, где R_2 является соответственно группой $-CH_3$ и $-H$, антибиотиков S_{541} могут быть дополнительно очищены с образованием шести веществ формулы I, обладающих активностью антибиотика, например противогельминтной, имеющих общую формулу III



где R_1 - металльная, этильная или изопропильная группа;
 R_2 - водород или металльная группа.

Эти шесть веществ формулы III обозначим как фактор А (R_1 - изопропил, R_2 -водород), фактор В (R_1 - метил, R_2 - метил), фактор С (R_1 - метил, R_2 - водород), фактор D (R_1 - этил, R_2 - водород), фактор Е (R_1 - этил, R_2 - метил) и фактор F (R_1 -изопропил, R_2 -метил). Факторы А и С являются особенно предпочтительными.

Факторы В, Е и F получают из компонента I, а факторы А, С и D-из компонента II.

Вещества по изобретению обладают активностью антибиотиков, например противогельминтной, в частности, против нематод, и в особенности активностью против внутренних и внешних паразитов.

В частности обнаружено, что такие вещества являются активными против паразитирующих нематод, например *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcineta*, *Trichostrongylus colubiformis*. *Dictyocaulus viviparis*, *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi*, *Nippostrongylus loraziliensis*, и паразитирующих клещиков, таких как *Sarcoptes* sp., *Psoroptes* sp. Следовательно, эти вещества могут быть использованы при лечении животных и людей, пораженных внутренними и/или внешними паразитами.

Кроме того, было обнаружено, что такие вещества обладают противофунгицидной активностью, например против штаммов *Candida* sp., таких как *Candida albicans*, *Candida glabrata* и против дрожжей, таких как *Saccharomyces carlsbergensis*.

Эти вещества также активны против свободно живущих нематод *Caenorhabditis elegans*.

Кроме того, было найдено, что вещества, полученные по предлагаемому способу, являются эффективными при борьбе с насекомыми, клещевидными и нематодными вредителями в продуктах земледелия, садоводства, лесоводства, в хранящихся продуктах и для общего здравоохранения. Вредители почвы и растительных плодов, включая злаки (например, пшеница, ячмень, кукуруза и рис, овощи (например, соя), фрукты (например, яблоки, виноград и цитрусовые), а также корнеплоды (например, сахарная свекла, картофель) могут быть эффективно уничтожены.

В частности, обнаружено, что предлагаемые вещества являются активными, например, против фруктовых клещиков и тлей, таких как *Aphis Fabae*, *Aulacorthum cururnflexum*, *Myzus persicae* et all, и представителей рода *Trialeurodes*, нематод, таких как представителя рода *Aphelenoides*, *Globodera Heterodera* et all., чешуекрылых, таких как

Heliothis, Plutella, Spodoptera, каландрин, таких как *Anthonomus grandis, Sitophilus granarius*, мучных хрущаков, таких как *Tribolium castaneum*, мух, таких как *Musca domestica*, муравьев Рихтера, узкокрылых молей-минеров *Pear psylla, Thrips tabaci*, тараканов, таких как *Blatella germanica, Periplaneta americana*, и комаров, таких как *Aedes aegypti*.

Вообще эти вещества могут применяться как в отношении хозяина (животного или человека, или растения, или другой растительности), так и в отношении самих вредителей или их очага. Особенно предпочтительными являются факторы А, В, С, D, Е и F, которые указаны выше. Вещества, полученные по предлагаемому способу, могут быть использованы в виде различных лекарственных форм для введения любым удобным способом в ветеринарии или медицине.

Композиции, в состав которых входят предлагаемые вещества, могут быть использованы для парентерального (включая внутригрудное), орального, ректального, местного или имплантного введения. При составлении композиции, которая должна быть стерильной, например инъекция, глазные капли и мази, активный компонент сам может быть приготовлен антисептическим или стерильным, например, после обработки гамма-излучением или окисью этилена.

При использовании в садоводстве или земледелии, вещества, полученные по предлагаемому способу, могут быть включены в рецептуры сухого или жидкого типов, например дусты, включающие основы дуста, или концентраты, порошки, включающие растворимые или увлажненные порошки, грануляты, включающие микрогранулы, или гранулы, способные диспергироваться, таблетки, текучие жидкости, эмульсии, такие как разбавленные эмульсии или концентраты, способные эмульгироваться, жидкости для погружения, такие как погружные жидкости для корней или для семян, оболочки семян, семенные таблетки, масляные концентраты, масляные растворы, инъекции, например инъекции в стебель, аэрозоли, дымы и туманы.

Обычно такие рецептуры включают соединение в сочетании с подходящим носителем или разбавителем. Такие носители могут быть жидкими или твердыми и предназначаются для облегчения применения вещества или посредством диспергирования там, где оно должно быть нанесено, или для обеспечения рецептуры, которая может быть составлена потребителем в виде препарата, способного к диспергированию. Такие рецептуры хорошо известны и могут быть получены традиционными методами, такими как, например, смешивание и/или размалывание активного компонента(тов) вместе с носителем или разбавителем, например твердым носителем, растворителем или поверхностно-активным веществом.

Твердые носители, подходящие для использования в рецептурах, таких как дусты, грануляты и порошки, могут быть выбраны, например, из природных минеральных наполнителей, таких как диатомит, тальк, каолин, монтмориллонит, пирофиллит или аттапульгит. Сильно диспергированная кремневая кислота или сильно диспергированные поглощающие полимеры могут быть включены в композицию. Используемые гранулированные адсорбирующие носители могут быть пористыми (такими как пемза, размолотый кирпич, сепиолит или бентонит) или непористыми (такими как кальцит или песок). Могут быть использованы подходящие предварительно гранулированные материалы, которые могут быть органическими или неорганическими, и включают доломит и размолотые растительные остатки.

Используемые в качестве носителей или разбавителей растворители представляют собой ароматические углеводороды, алифатические углеводороды, спирты и гликоли или их простые эфиры, сложные эфиры, кетоны, амиды кислот, сильно полярные растворители, необязательно эпоксидированные растительные масла и воду.

Также могут быть использованы традиционные неионогенные, катионогенные или анионные поверхностно-активные вещества, например этоксилированные алкилфенолы и спирты, соли щелочных или щелочноземельных металлов алкилбензолсульфокислот,

лигносульфокислоты или сульфонаты полимерных фенолов, которые обладают хорошими эмульгирующими, диспергирующими и/или увлажняющими свойствами, или индивидуально или в сочетании в композициях.

Кроме того, в композициях могут быть использованы стабилизаторы, противоследующие добавки, регуляторы вязкости, связующие и липкие добавки, фотостабилизаторы, а также удобрения, стимуляторы питания или другие активные вещества, вещества, полученные по предлагаемому способу, могут быть использованы в смеси с другими инсектицидами, акарицидами и нематоцидами.

В этих рецептурах концентрация активного материала обычно составляет 0.01 -99 % и более, предпочтительно 0.01 - 40 вес. %.

Промышленные продукты обычно поставляются в виде концентрированных композиций, которые для использования могут быть разбавлены до соответствующей концентрации активного материала, например от 0.001 до 0.0001 вес. %.

В земледелии, садоводстве и в ветеринарии может быть желательным использование цельного ферментационного бульона (без разделения его на компоненты или факторы) в качестве источника активных веществ. Может быть удобным использование высущенного бульона, содержащего мицелий, или лизированного мицелия, живого или неживого мицелия, выделенного из бульона с использованием методик разделения жидкость - твердое тело или методик выпаривания, или с использованием ферментационного бульона, остающегося после выделения мицелия.

По желанию мицелий может быть пастеризован или, ибо более предпочтительно, высушен, например, методами распылительной сушки или сушки на роликах. Мицелий или бульон могут входить в состав композиций, включающие традиционные инертные носители, среды для лекарств или разбавители, которые описаны выше.

На основе таксономических исследований, конкретным микроорганизмом, способным продуцировать указанные выше вещества, является новый вид рода *Streptomyces*, который был назван *Streptomyces Thermoarchaensis*. Образец этого микроорганизма, выделенного из почвы, депонирован в постоянную коллекцию культур Национальных Коллекций промышленных и морских бактерий (Исследовательская станция Торри, г. Абердин, Великобритания) и ему присвоен номер NC1B 12015.

Изобретение также распространяется на любые вещества, которые способны продуцироваться посредством ферментации *S. thermoarchaensis* NC1B 12015 и которые являются оптическими изомерами веществ формулы I.

Организм рода *Streptomyces* предпочтительно представляет собой *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12015 или его мутант.

Мутанты *S. Thermoarchaensis* NC1B 12015 могут возникать самопроизвольно или продуцироваться множеством способов. Такие способы включают ионизирующее излучение, химические методы, например обработку N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином (НТГ), термообработку, генетические методики, такие как рекомбинация, трансдукция, трансформация, лизогенизация и лизогенное превращение, и селективные методики для самопроизвольных мутантов.

Так, например, получены четыре мутантных штамма *S. thermoarchaensis* NC1B 12015, причем каждый штамм депонирован в коллекции культур Национальных Коллекций промышленных и морских бактерий (Исследовательская станция Торри, г. Абердин, Великобритания) и им присвоены номера NC1B 12111, NC1B 12112, NC1B 12113 и NC1B 12114: *S. thermoarchaensis* NC1B 12111, 12112, 12113 и 12114.

Мутантные штаммы NC1B 12111, 12112 и 12113 выведены путем обработки спор *S. thermoarchaensis* NC1B 12015 N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином и затем охарактеризованы одностадийным способом Холлидэя.

Мутантный штамм NC1B 12114 возник при самопроизвольной мутации *S. thermoarchaensis* NC1B 12015 и был идентифицирован как стойкий к стрептомицину, так как оставался жизнеспособным после воздействия сульфата стрептомицина (100 мгк/мл)

при 28°C в течение 5 сут.

Таксономические исследования показывают, что *S. thermoarchaensis* NC1B 12015 представляет собой микроорганизм нового вида, характеристики которого описаны ниже.

На предпочтительных споруляционных средах - агаре овсяной муки, солодово-дрожжевом агаре и крахмальном агаре с неорганическими солями - *S. thermoarchaensis* NC1B 12015 обильно растет, продуцируя стабильный субстратный мицелий и воздушный мицелий, порождающий споры в открытых спиральных цепочках в виде боковых ответвлений от основных гиф. На этих средах обратная пигментация желто-коричневая, а спорофоры серые. При стократном увеличении видно, что спорофоры содержат 2-5 витков в цепочке с 5-10 спорами внутри каждого витка спирали. В среднем спорофоры содержат 20-50 спор. При увеличении в 12 000 в сканирующем электронном микроскопе видно, что споры имеют гладкие стенки и эллипсоидную форму 0.7 x 1.4 мкм в наиболее широкой части эллипсоида.

S. thermoarchaensis NC1B 12015 является грамположительным организмом и способен расти и образовывать споры при 20-50°C.

Сравнение приведенных выше данных с опубликованными описаниями в Бергеевском справочнике определительной бактериологии показывает, что организм *S. thermoarchaensis* NC1B 12015 принадлежит в роду *Streptomyces*.

Идентификацию *S. thermoarchaensis* NC1B 12015 на уровне вида-группы проводят, используя компьютеризированную матриц³ идентификации.

Ниже приведены результаты 41 таксономического испытания для *S. thermoarchaensis* NC1B 12015:

Признак	Результат
Цепочка спор мутовчатая	-
Цепочка спор жестко связанныя	-
Цепочка спор прямоизвитая	+
Цепочка спор спиральная	+
Фрагментация мицелия	-
Поверхность спор гладкая	+
Поверхность спор морщинистая	-
Цвет спор серый	+
Цвет спор красный	-
Цвет спор зеленый	-
Обратный желтокоричневый	+
Обратный красно-оранжевый	-
Производство меланина	-
Использование адонитола	-
Использование целлобиозы	+
Использование D-фруктозы	+
Использование мезоинозитола	-
Использование инулина	+
Использование маннитола	-
Использование раффинозы	+
Использование рамнозы	+
Использование D-ксилозы	+
Использование DL-альфа-аминомасляной кислоты	-
Использование L-гистидина	+
Использование L-гидроксипролина	-
Расщепление аллантоина	+
Расщепление арбутина	+

Расщепление ксантина	+
Расщепление пектина	+
Расщепление лецитина	+
Восстановление нитрата	+
Производство сероводорода	+
Устойчивость к азиду натрия (0.01 % вес/об)	-
Устойчивость к хлориду натрия (7 % вес/об)	-
Устойчивость к (фенолу (0.1% вес/об)	+
Рост при 45°C	+
Стойкость к неомицину (50 мкг/мл)	-
Стойкость к рифампицину (50 мкг/мл)	+
Антибиоз к <i>Aspergillus niger</i> LIV 131	+
Антибиоз к <i>Bacillus subillis</i> NC1B 3610	-
Антибиоз к <i>Streptomyces murinisis</i> I8 SP 5091	+

Мутантные штаммы NC1B 12111, 12112, 12113 и 12114 все имеют практически аналогичные *S. thermoarchaensis* существенные признаки. Однако NC1B 12111 для роста требуется аденин, NC1B 12112 - серии, NC1B 12113 - гистидин, а NC1B 12114 стоек к стрептомицину.

Микроорганизмы, способные продуцировать антибиотики S₅₄₁ легко могут быть обнаружены с помощью удобного мелкомасштабного теста с применением нематод *Caenorhabditis elegans*, например, путем добавления испытуемого образца к суспензии нематод и определения последующего воздействия на жизнеспособность последних.

Получение антибиотиков S₅₄₁ путем ферментации подходящего организма *Streptomyces* может быть осуществлено традиционными способами, например путем культивирования организма *Streptomyces* в присутствии источника усваиваемого углерода и минеральных солей.

Источники усваиваемого углерода, азота и минеральных солей могут быть предоставлены простыми либо сложными питательными веществами. Источники углерода обычно могут включать глюкозу, мальтозу, крахмал, глицерин, кормовую патоку, декстрин, лактозу, сахарозу, фруктозу, карбоновые кислоты, аминокислоты, глицериды, спирты, алканы и растительные масла. Вообще источники углерода могут составлять 0.5 - 10 % от веса ферментационной среды.

Источники азота могут включать муку соевых бобов, жидкости замочки зерна, растворимые продукты перегонки, экстракты дрожжей, муку семян хлопчатника, пептоны, размолотую ореховую муку, солодовый экстракт, кормовую патоку, казеин, смеси аминокислот, аммиак (газ или раствор), аммонийные соли или нитраты. Также могут применяться мочевина и другие амиды. Источники азота могут составлять 0.1 - 10 % от веса ферментационной среды.

Питательные минеральные соли, которые могут быть введены в культуральную среду, включают соли, способные выделять ионы натрия, калия, аммония, железа, магния, цинка, никеля, кобальта, марганца, ванадия, хрома, кальция, меди молибдена, бора, фосфора, сульфата, хлора и карбоната.

Для регулирования избыточного вспенивания может присутствовать противопенная добавка, которую добавляют периодически по мере надобности.

Культивирование организма *Streptomyces* обычно осуществляют при 20-50°C, предпочтительно 25-40°C, особенно около 34°C, причем желательно, чтобы культивирование протекало при аэрировании и перемешивании, например, посредством встряхивания и перемешивания. Среда может быть первоначально инокулирована небольшим количеством суспензии микроорганизма, производящего споры. Причем, чтобы избежать задержки роста, можно приготовить вегетативный инокулят организма путем инокулирования небольшого количества культуральной среды спорообразующим

организмом, полученный вегетативный инокулят может быть перенесен в ферментационную среду или, что более предпочтительно, на одну или несколько затравочных стадий, где происходит дальнейший рост до переноса в основную ферментационную среду. В основном ферментация осуществляется при pH 5.5-8.5, предпочтительно 5.5-7.5.

Ферментация может проводиться в течение 2-10 сут, например, около 5 сут.

Разделение материала, содержащего антибиотики S₅₄₁ и любые их компоненты или факторы, или введение любых их компонентов или факторов осуществляют с помощью традиционных методик выделения и разделения. Антибиотики S₅₄₁ преимущественно содержатся в мицелии клеток, но также могут быть найдены в ферментационном бульоне. Выделение может быть проведено до или после осветления ферментационного бульона, выбор методики выделения может широко варьироваться. Антибиотики S₅₄₁ могут быть выделены и разделены с помощью множества методик фракционирования, например с помощью адсорбции-элюирования, осаждения, дробной кристаллизации и экстракции растворителем, которые могут сочетаться различным образом.

Найдено, что экстракция растворителем, хроматография и дробная кристаллизация являются наиболее пригодными для выделения и разделения веществ, получаемого по предлагаемому способу.

После ферментации мицелий может быть собран с использованием традиционных методик, например фильтрации или центрифугирования. После этого материал может быть экстрагирован из мицелия подходящим органическим растворителем, таким как кетон, ацетон, метилэтилкетон или метилизобутилкетон, углеводород, например, гексан, галоидированный углеводород, например хлороформ, четыреххlorистый углерод или хlorистый метилен, спирт, например метанол или этанол, или диол, например пропандиол-1,2, или сложный эфир, например метилацетат или этилацетат. Если мицелии содержат значительное количество воды, то предпочтительно использование водорастворимого растворителя.

Для достижения оптимального выделения необходима более чем одна экстракция. Предпочтительно первую экстракцию проводят с использованием смешивающегося с водой растворителя, такого как метанол или ацетон. Антибиотики могут быть выделены в виде сырого экстракта посредством удаления растворителя. Экстракти растворителя могут быть сами экстрагированы после уменьшения объема растворителя, например, посредством выпаривания. На этой стадии предпочтительно использовать не смешивающийся с водой растворитель, такой как гексан, хлороформ, хlorистый метилен или этилацетат или их смесь, причем для достижения удовлетворительного распределения соединений-антибиотиков добавляют достаточно количество воды. При удалении не смешивающейся с водой фазы получают материал, содержащий антибиотики S₅₄₁. Фактор В может быть выделен посредством кристаллизации из подходящего растворителя, например изопропанола.

Очистка и/или разделение активных компонентов и/или факторов могут быть осуществлены традиционными способами, такими как, например, хроматография (включая жидкостную хроматографию высокого разрешения) на подходящем носителе, таком как силикагель, нефункциональная макросетчатая адсорбционная смола, например, сшитые полистирольные смолы, такие как амберлит XAD-2, XAD-4 или XAD-1180 (фирма "Роом и Хаас, Лтд."), или смола S 112 (фирма "Касталл. Лтд."), или совместно с органическим растворителем сшитый декстроза, такой как сефадекс LH 20 (фирма "Фармация Ю-Кей. Лтд."), или в случае жидкостной хроматографии высокого разрешения - обратимо-фазные носители, такие как привитой углеводородный силикагель, например C₁₈ привитой силикагель. Этот носитель может находиться в виде слоя или, что более предпочтительно, набит в колонку. В случае нефункциональных макросетчатых смол, таких как XAD-1180 или S112, для элюирования могут быть использованы смеси органических растворителей, например ацетонирил с водой.

Обычно раствор веществ в подходящем растворителе запускается в колонки с силикагелем или сефадексом после первого уменьшения объема растворителя. Колонка необязательно может быть промыта и затем элюирована растворителем подходящей полярности. В случае сефадекса и силикагеля в качестве растворителей могут быть использованы спирты, такие как метанол, углеводороды, такие как хлороформ или хлористый метилен, или сложные эфиры, такие как этилацетат. Кроме того, могут применяться сочетания таких растворителей или без воды, или с водой.

За ходом элюирования и разделения//очистки веществ можно следить, используя традиционные методики, такие как хроматография, например тонкослойная хроматография и жидкостная хроматография высокого разрешения.

При хроматографировании на силикагеле, предпочтительно с использованием элюента, такого как смесь хлороформ: этилацетат, антибиотики S₅₄₁ легко разделяются на компоненты I и II, причем компонент I элюируется первым. Затем легко могут быть получены из компонента I факторы B, E и F с использованием, например, жидкостной хроматографии высокого разрешения. Аналогично, факторы A, C и D легко могут быть выделены из компонента II. Альтернативно фактор B может быть разделен с факторами E и F путем кристаллизации из спирта, такого как метанол или изопропанол. По желанию, маточные растворы, содержащие факторы E и F, могут быть подвергнуты дальнейшей очистке, например хроматографической на силикагеле, причем факторы E и F выделяют с использованием жидкостной хроматографии высокого разрешения.

После того как эти факторы получены, они могут быть очищены дополнительно посредством кристаллизации, например, из метанола, изопропанола или смеси метанол/вода, и это распространяется на вещества, находящиеся в кристаллическом состоянии.

С помощью подходящего сочетания указанных выше методик вещества, полученные согласно предлагаемому способу, выделяют в твердом состоянии. Причем порядок, в котором проводятся указанные выше стадии очистки, и выбор этих стадий для применения могут широко варьироваться.

Так, фактор B был получен как кристаллическое твердое вещество, имеющее степень чистоты выше 90 %. Аналогично факторы A, C, D, E и F имеют степень чистоты выше 90 %. Однако эти факторы используются со степенью чистоты, соответствующей их предполагаемому использованию: для применения в медицине желательна степень чистоты по меньшей мере 90 %, предпочтительно выше, чем 95 % для использования в ветеринарии, земледелии или садоводстве достаточны степени чистоты, например, 50 % или ниже.

Изобретение иллюстрируется примерами, где приняты следующие сокращения: ТСХ - тонкослойная хроматография (с использованием пластинок фирмы Мерк 5735 с силикагелем 60, проявленных смесью (3:1) хлороформ:этилацетат); ХК - хроматография на колонке фирмы Мерк 7734 с силикагелем 60 (колонка длиной 200 и диаметром 4 см), элюируемой смесью (3:1) хлороформ; этил-ацетат; ЖХВР - жидкостная хроматография высокого разрешения; ПЭ - петролейный эфир (т.кип. 60-80°C).

Среды А, В и С, которые упоминаются в примерах, имеют следующий состав.

Среда А, г/л:

D-Глюкоза	15.0
Глицерин	15.0
Соевый пептон	15.0
Хлористый натрий	3.0
Углекислый кальций	1.0
Дистиллированная вода	до 1 л

pH доводят до значения 7.0 водным раствором едкого натра до выдерживания в автоклаве.

Среда В, г/л:

В-Глюкоза	2.5
Солодовый декстрин М 30Е (фирма "Рокуэтт, Лтд." Великобритания)	25.0
Арказой 50 (фирма "Бритиш Аркади Ко., Лтд.")	12.5
Кормовая патока	1.5
K ₂ HPO ₄	0.125
Карбонат кальция	1.25
MOP S [3-(N-морфолино)- пропансульфокислота]	21.0
Дистиллированная вода	до 1 л

pH доводят до значения 6.5 водным 5н. раствором едкого натра до выдерживания в автоклаве.

Среда С, г/л:

D-Глюкоза	2.5
Солодовый декстрин МД 30Е (фирма "Рокуэтт, Лтд." Великобритания)	25.0
Арказой 50	12.5
Свекольная патока	1.5
K ₂ HPO ₄	0.125
Углекислый кальций	1.25
Силикон 1520 (фирма "Доу Корнинг")	0.625
Дистиллированная вода	до 1 л

pH доводят до 6.5 до стерилизации.

Пример 1. Споры *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12015 инокулируют на скоженный агар, состоящий из следующих компонентов, г/л:

Дрожжевой экстракт (фирма "Оксайд L21")	0.5
Солодовый экстракт (фирма "Оксайд L39")	30.0
Микологический пептон (фирма "Оксайд L40")	5.0
Агар №3 (фирма "Оксайд L13")	15.0

значение pH около 5.4, и культивируют при 28°C в течение 10 сут. Затем созревший скоженный агар покрывают 10 %-ным раствором глицерина (6 мл) и соскабливают стерильным инструментом для того, чтобы разрыхлить споры и мицелий. Аликвоты (0.4 мл) полученной суспензии спор переносят в стерильные полипропиленовые соломки, которые затем термически запаивают и хранят в парах жидкого азота до употребления.

Содержимое отдельной соломки используют для инокулирования 10 мл среды А, которую затем культивируют при 28°C в течение 3 сут на качалке, вращающейся со скоростью 250 об/мин с диаметром орбитального движения 50 мм. Эта культивируемая среда используется для инокулирования (в количестве 2 %) 15 пробирок и двух колб Эrlenmeyera (емкостью 250 мл), содержащих соответственно 10 мл и 50 мл среды В.

Пробирки и колбы культивируют при 28°C в течение 5 сут, а затем культуры раздельно фильтруют под вакуумом и клетки встрихивают в течение 30 мин с метанолом, взятым в количестве, равном объему фильтрата культуры.

Активность против *Caenorhabditis elegans* определяют в экстрактах клеток, выращенных в пробирках и колбах. Мицелиальные экстракти объединяют, выпаривают досуха и повторно экстрагируют метанолом до концентрата (6 мл), который подают в колонку, заполненную сефадексом H20 (110 x 2.5 см) и элюированную метанолом. Собирают фракции по 10 мл.

Фракции 21-28 сгруппировывают и выпаривают с образованием маслянистого остатка (156 кг), который экстрагируют смесью (3:1) хлороформ: этилацетат. Получают 3 мл экстракта, который подвергают ХК (колонка 55 к x 2.5 см), собирают фракции по 10 мл и анализируют методом ТСХ, используя пластины, содержащие флуоресцентный индикатор. Фракции 20-23 и 36-44 вызывают две главные области, которые тушат флуоресценцию, их идентифицируют как компонент I (КГ 0.70) и компонент II (Rf 0.43).

При выпаривании фракций 20-23 получают компонент I в твердом виде (9 мг). В максимумах поглощения при 238, 245 и 254 нм величины Е равны соответственно 340, 350 и 200.

При выпаривании фракций 36-44 получают компонент II в твердом виде (11 мг). В максимумах при 238, 245 и 254 нм величины Е составляют соответственно 440, 460 и 280.

Пример 2. Каждую из двух колб Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащую по 50 мл среды А, инокулируют 0.2 мл суспензии спор *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12015, взятой из соломки, приготовленной, как описано в примере 1. Колбы культивируют при 28°C в течение 3 сут на качалке, вращающейся со скоростью 250 об/мин с диаметром орбитального движения 50 мм. Затем содержимое обеих колб используют для инокулирования сосуда-ферментера емкостью 20 мл, содержащего 12 л среды В. Через 5 сут роста производят сбор клеток культуры, которые обрабатывают, как описано в примере 3.

Пример 3. Через 5 сут культивирования при 28°C ферментационного бульона (12 л), полученного, как описано в примере 2, производят сбор клеток, которые центрифугируют со скоростью 4200 об/мин при 10°C в течение 15 мин. Лепешку из клеток смешивают с 5 л метанола и выдерживают при 4°C в течение 20 ч. Мицелиальный экстракт фильтруют, выпаривают при 40°C и подвергают азеотропной перегонке после добавления 100 мл бутанола-1. Затем экстракт обрабатывают метанолом (5 раз по 200 мл), объединенные экстракты выпаривают до объема 100 мл и подают на колонку с сефадексом LH20 (112 x 5 см). Колонку элюируют метанолом и после пробного прохождения 200 мл собирают фракции по 50 мл. Фракции 40-90 группируют и выпаривают, получая 3.85 г маслянистого остатка. Этот остаток экстрагируют 77 мл смеси (3:1) хлороформ: этилацетат, фильтруют и затем подвергают разделению на ХК, причем после пробного прохождения 200 мл собирают фракции объемом около 15 мл.

Фракции 124-142, содержащие компонент I, группируют и выпаривают, получая 253 мг твердого вещества, из которых 216 мг очищают методом ЖХВР (колонка с фазой Зорбакс ODS, 25 x 2.1 см, элюент 80 % ацето-нитрила/вода). Фракции 250-320, содержащие компонент II, группируют и выпаривают, получая 602 мг твердого вещества, из которых 540 мг очищают методом ЖХВР (как для фракций 124-142) и собирают фракции из нескольких опытов.

Элюируемый из колонки ЖХВР материал просматривают методом УФ-спектроскопии при 243 нм. Вещества, имеющие пики поглощения при этой длине волны, высушивают и испытывают на активность против *Carnorhabditis elegans*, а также анализируют методом ТСХ. Четыре вещества, которые обладали активностью против *Carnorhabditis elegans*, также имеют значение Rf 0.39-0.46 или 0.70-0.75.

Компонент I дает один пик со значением Rf от 0.7 до 0.75, этот пик был приписан фактору В. Компонент II дает три пика со значениями КГ 0.39 - 0.46, эти три пика были приписаны факторам А, С и D.

Фактор А, элюированный из колонки ЖХВР между 260 и 340 мл после введения образца, имеет значение Rf 0.44, найденное методом ТСХ. Фактор В элюируют из колонки ЖХВР между 270 и 310 мл после введения образца, причем он имеет значение Rf 0.62, найденное методом ТСХ. Фактор С элюируют из колонки ЖХВР между 160 и 180 мл, после введения образца, причем он имеет значение Rf 0.4, найденное методом ТСХ. Дополнительные характеристики факторов А, В, С и D описаны ниже.

Пример 4. Используют 0.4 мл суспензии спор организма *Streptomyces*

thermoarchaensis NC1B 12015, взятой из соломки, приготовленной как описано в примере 1, для инокулирования 50 мл среды А, содержащейся в колбе Эрленмейера емкостью 250 мл. Колбу культивируют при 28°C в течение 4 сут на качалке, вращающейся со скоростью 250 об/мин с диаметром орбитального движения 50 мм. Затем используют порции по 8 мл для того, чтобы инокулировать каждую из двух плоскодонных колб, содержащих 400 мл той же среды, и затем культивируют в тех же самых условиях в течение 3 сут.

Содержимое обеих колб затем используют для инокулирования сосуда-ферментера емкостью 70 л, содержащего 40 л среды В, дополненной силиконом 525 (фирма "Доу-Горнинг", 0.0625 об/об %). Ферментацию проводят с перемешиванием и аэрированием, которое обеспечивает поддержание концентрации растворенного кислорода на уровне более 20 % от насыщения, причем при необходимости добавляют силиконовый антивспениватель. Через 10 сут проводят сбор ферментационных клеток, причем бульон (40 л) осветляют центрифугированием (1500 об/мин). Жидкость над осадком заменяют на воду (5 л) и выделенные клетки (1.4 кг) замораживают при -20°C.

Через неделю замороженные клетки оттаивают, суспендируют в 15 л метанола и осторожно перемешивают 15 ч. Затем суспензию фильтруют и твердый остаток повторно экстрагируют метанолом (10 л). Объединенные фильтры (25 л) разбавляют водой (12 л) и экстрагируют петролейным эфиром (25 л); Через 30 мин фазы разделяют центрифугированием.

Нижнюю метанольную фазу снова экстрагируют петролейным эфиром (3 раза: 25, 15 и 15 л). Объединенные фазы петролейного эфира (80 л) концентрируют, пропуская три раза через тонкопленочный испаритель пфаудлер 8.8-12V-27 (давление паров 0.1 бар, температура паров 20°C, температура водяного пара 127°C), и концентрат (8 л) сушат сульфатом натрия (1 кг) и дополнительно концентрируют при пониженном давлении и 40°C в роторном пленочном испарителе. Маслянистый остаток (15 мл) растворяют в смеси хлороформа и этилацетата (70 мл, 3:1 об/об.) и подвергают разделению на ХК, собирая фракции объемом около 40 мл после пробного прохождения 1400 мл.

Фракции 45-65 объединяют и выпаривают, получая фактор В (940 мг, как указано в примере 3), который дважды перекристаллизовывают из метанола и окончательно из нитрометана. Кристаллы подвергают рентгеновскому дифракционному анализу моноокристаллов, из которого следует, что кристаллы представляют собой орторомбические прозрачные призмы с параметрами: $a=10.171/3$, $b=13.317/5$, $c=25.032-7/\text{\AA}$, объем ячейки 3391 \AA^3 , $Z=4$, пространственная группа $P2_1L2_1L$, $D = 1.18. \text{ г}/\text{см}^3$, $R = 0.053$ для 2169 независимо наблюдаемых отражений (ϕ меньше 58°), измеренных дифрактометром с Cu-Ка-излучением (длина волны 1.54178 Å).

Пример 5. Инокулят *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12015 готовят, как описано в примере 4, причем период роста составлял 2 сут, и используют его для инокулирования сосуда-ферментера (70 л), содержащего 40 л среды В, дополненной полипропиленом 2000 (0.065 об/об. %) вместо силикона 525. Полипропилен 2000 добавляют по мере необходимости на протяжении ферментации для того, чтобы уменьшить вспенивание. Ферментацию проводят при 28°C с перемешиванием и аэрированием, которое обеспечивает поддержание концентрации растворенного кислорода на уровне более 30 % от насыщения. Через 24 ч ферментации порцию бульона (1 л) переносят в ферментер (700 л), содержащий 450 л среды, имеющей следующий состав, г/л:

D-Глюкоза	2.8
Солодовый декстрин (М 30Е)	27.8
Арказой 50	13.9
Кормовая патока	1.7
K_2HPO_4	0.14
CaCO_3	1.39

Силикон 525 (Доу
Корнинг) 0.06 %
(об/об.)

До стерилизации доводят pH до 6.5.

Ферментацию проводят при 28°C с перемешиванием и аэрированием, обеспечивающим поддержание концентрации растворенного кислорода на уровне более 20 % от насыщения. Через 2 сут доводят pH до 7.2 добавлением серной кислоты. Через 5 сут ферментации проводят сбор клеток культуры.

Бульон (450 л) осветляют путем центрифугирования и жидкость над осадком заменяют водой (20 л). Выделенные клетки (25.5 кг) перемешивают в течение 1 ч в таком количестве метанола, чтобы общий объем смеси составлял 75 л. Суспензию фильтруют, твердый остаток повторно экстрагируют 35 л метанола и фильтруют. Объединенный фильтрат (87 л) разбавляют водой (40 л) и экстрагируют петролейным эфиром. Через 30 мин фазы разделяют центрифугированием, и нижнюю метанольную фазу повторно экстрагируют петролейным эфиром (30 л) после добавления 40 л воды. После разделения нижнюю фазу снова экстрагируют 30 л ПЭ. Объединенные фазы петролейного эфира (85 л) концентрируют, пропуская 3 раза через тонкопленочный испаритель пфаудлер 8.8-12V-27 (давление паров 0.1 бар, температура паров 20°C, температура водяного пара 127°C). Концентрат (9 л) сушат сульфатом натрия (2 кг) и дополнительно концентрируют при пониженном давлении при 40°C в роторном пленочном испарителе. Маслянистый остаток (130 г) растворяют в хлороформе, получая 190 мл смеси, которую подвергают разделению на XK (набивная колонка, промытая 500 мл хлороформа), собирают фракции объемом около 40 мл после пробного прохождения 1400 мл.

Фракции 32-46 объединяют и выпаривают, получая 21.2 г масла. Фракции 47-93 объединяют и выпаривают, получая 20.1 г масла, которое растворяют в смеси (3:1) хлороформ: ЭА до объема 50 мл. Раствор разделяют на XK, собирая фракции объемом около 40 мл после пробного прохождения 1400 мл. Фракции 22-23 объединяют и выпаривают, получая 3.1 г масла, которое добавляют к маслу, полученному из фракции 32-46 на первой колонке. Объединенные масла растворяют в кипящем метаноле (4 мл) и затем этот раствор добавляют к 20 мл горячего пропанола-2, получая при выдерживании кристаллический фактор В (2.57 г).

Маточный раствор после кристаллизации фактора В выпаривают, получая масло, которое растворяют в равном объеме хлористого метилена, и раствор подают на колонку (30 x 2.2 см) с фазой мерк кизельгель 60 (70-230 меш, ASTM^x №7734), заполненной в хлористом метилене. Слой промывают CH₂Cl₂ (вдвое больше объема слоя) и элюируют смесью (3:1) хлороформ: этилацетат (2 объема слоя). При выпаривании элюата получают масло, которое растворяют в метаноле и подвергают препаративному разделению методом ЖХВР на сферисорбе S50 DS-2 (250 x 20 мм, фирма "Фэцз Сеп. Лтд"). Образец объемом 5 мл прокачивают через колонку в течение 1 мин и колонку элюируют смесью (7:3) ацетонитрил: вода при следующих условиях:

Время, мин	Поток, мл/мин
0.00	0.00 (Время)
1.00	0.00 ввода
1.10	30.00 пробы)
39.90	30.00
40.00	35.00
75.00	35.00

Элюируемый из колонки ЖХВР материал анализируют методом УФ-спектроскопии при 238 нм. При выпаривании объединенных фракций, имеющих пик, элюируемый на 26.3 минуте, получают фактор Е в твердом виде. При выпаривании объединенных фракций, имеющих пик, элюируемый на 36.4 минуте, получают фактор F в твердом виде.

Пример 6. Ферментационный бульон (аналогичный примеру 2) с урожаем клеток культуры через 117 ч обрабатывают в автоклаве (121°C, 1 ч), охлаждают до комнатной температуры и перемешивают на магнитной мешалке, получая гомогенную суспензию клеток. Две порции суспензии (2 мл) центрифугируют (ускорение 12 000 g, 2 мин, комнатная температура), декантируют жидкость над осадком, и осажденные клетки суспензируют в 2 мл воды, тщательно смешивают и снова подвергают центрифугированию (12 000 g, 2 мин, комнатная температура). После декантации жидкости над осадком клетки дважды промывают дистиллированной водой (порции по 2 мл). Затем промытые клетки тщательно смешивают с водой (2 мл) или с метанолом (2 мл) и выдерживают при комнатной температуре при периодическом встряхивании в течение 1.5 ч. Суспензию снова центрифугируют (12000 g, 2 мин, комнатная температура) и надосадочные жидкости последовательно разбавляют в воде. Клетки из водных суспензий повторно суспензируют в воде и немедленно последовательно разбавляют водой. Порции (10 мкл) каждого из разбавлений добавляют к суспензии (200 мкл) нематод *Carnorhabditis elegans* в буферном растворе, содержащим, г/л: гидрофосфат натрия 6; гидрофосфат калия 3; хлорид натрия 5; семиводный сульфат магния 0.25 - и имеющем pH 7.0. Через 4 ч суспензию нематод исследуют, чтобы установить, какие разбавления испытуемой смеси вызывают полное ингибиование подвижности более, чем 98 % нематод в анализируемой суспензии. Было найдено, что разбавления метанольного экстракта 1:5, 1:25, 1:250 и 1:500, разбавления клеточной суспензии 1:5, 1:25, 1:250, 1:500 и 1:1000 и разбавления водного экстракта 1:2, 1:4 и 1:8 вызывают такое ингибиование нематод, когда 10 мкл добавляют к 200 мкл суспензий нематод.

Пример 7. 50 мл среды А или среды В в колбе Эрлемейера емкостью 250 мл инокулируют 0.4 мл суспензии спор *S. thermoarchaensis*, NC1B 12015, взятой из соломки, приготовленной, как описано в примере 1. Колбы, содержащие среду А или В, культивируют при 28°C в течение 2 сут на роторной качалке, работающей в режиме 250 об/мин с диаметром хода 50 мм. Затем из каждой среды берут порции (8 мл) для инокулирования плоскодонных колб емкостью 2 л, содержащих 400 мл той же самой среды (А или В соответственно). Эти колбы культивируют в течение 2 сут при тех же условиях.

Два ферментера емкостью 70 л каждый инокулируют двумя колбами среды А и один 70-литровый ферментер инокулируют двумя колбами среды В. Каждый ферментер содержит 40 л среды С.

Ферментацию проводят при 34°C перемешиванием и аэрированием, достаточным для поддержания концентрации растворенного кислорода свыше 30 % от насыщения. Приблизительно через 24 ч ферментации значение pH смеси доводят до 7.2 добавлением водного раствора серной кислоты. При необходимости добавляют антивспениватель - полипропиленгликоль 2000. Через 5 сут проводят сбор клеток, которые объединяют.

70-литровый ферментер, который также инокулируют двумя колбами, содержащими среду В, содержит среду В с добавлением 0.06 % силикона 1520. Ферментацию проводят при 28°C с перемешиванием и аэрированием, достаточными для поддержания концентрации растворенного кислорода на уровне свыше 30 % от насыщения. При необходимости для уменьшения вспенивания добавляют полипропиленгликоль 2000. Через 24 ч порцию 9 л переносят в ферментер емкостью 700 л, содержащий 450 л среды С.

Ферментацию проводят при 34°C с перемешиванием и аэрированием, достаточными для поддержания концентрации растворенного кислорода на уровне свыше 30 % от насыщения. Вспенивание регулируют добавлением полипропиленгликоля 2000 и приблизительно через 24 ч pH среды доводят до 7.2 добавлением водного раствора серной кислоты. Через 4 сут ферментации собирают клетки культуры, которые объединяют с тремя описанными выше продуктами ферментации.

Объединенные бульоны с клетками центрифугируют на центрифуге "Шарплес

"AS16РУ" со скоростью около 120 л/ч. Остаточную жидкость над осадком в центрифугируемых сосудах заменяют на воду.

Выделенные клетки (11.65 кг) суспендируют в 33 л метанола с помощью смесителя Силверсона. Через 60 мин суспензию фильтруют через киперную ткань и остаток еще раз суспендируют в 34 л метанола. Через 40 мин суспензию снова фильтруют. Фильтраты от двух метанольных экстракций объединяют.

Объединенные экстракты (53.5 л) смешивают с 27 л воды и 27 л петролейного эфира. После перемешивания в течение 20 мин две фазы разделяют на центрифуге "Вестфалия МЕМ 1256". Нижнюю водно-метанольную фазу (70 л) смешивают с водой (37 л) и петролейным эфиром (27 л), перемешивают и разделяют, как и раньше. Межфазную эмульсию в фазе петролейного эфира разбивают ацетоном (4 л). Нижнюю водно-метанольную фазу (108 л) затем смешивают с водой (40 л) и петролейным эфиром (27 л) в третий раз, перемешивают и разделяют, как и раньше, причем для разбиения межфазной эмульсии используют 4 л ацетона. Затем три гексановых экстракта объединяют.

Объединенные экстракты петролейного эфира (85 л) концентрируют на тонкопленочном испарителе (давление паров 0.15 бар, температура паров 26°C). Концентрат (3 л) сушат сульфатом натрия (2 кг) и затем дополнительно выпаривают при пониженном давлении и 40°C. Полученное масло (639 г) растворяют в 300 мл смеси хлороформа и этил-ацетата (3:1, об/об.), фильтруют и промывные жидкости (1060 мл) разделяют на ХК (1500 мм, диаметр 100 мм), элюируя со скоростью потока 6 л/ч.

Фракции, элюируемые между 8.8 и 13.1 л, объединяют и выпаривают при низком давлении, получая 56.3 г масла; фракции, элюируемые между 13.1 и 24.6 л, упариваются аналогично, получая светло-желтое твердое вещество (153.4 г). Первые фракции в основном содержат фактор В, тогда как последние фракции содержат смесь факторов А, В, С и D. Фактор В в этой последней фракции последовательно удаляют при повторении разделения на ХК, как описано выше, дважды (последний раз на свежем силикагеле) при аналогичных условиях за исключением того, что скорость потока была снижена до 3 л/ч.

Пики веществ, содержащих факторы А, С и D, из второй из указанных колонок элюируют между 8.8 и 17.6 л, остаточный фактор В, который она содержит, разделяют на третьей колонке, из которой факторы А, С и D элюируются между 14 и 28 л. Этот окончательный объединенный элюят упаривают при пониженном давлении, получая 114 г твердого вещества. Пики веществ, содержащих фактор В, из двух колонок (7.5-8.8 л и 10.3-13.4 л соответственно) выпаривают до масла (соответственно 10.7 и 10 г) и объединяют с маслом, полученным на первой из этих трех колонок.

Масла, содержащие фактор В, растворяют в кипящем метаноле (25 мл) и смешивают с кипящим пропанолом-2 (100 мл). При охлаждении до 4°C фактор В кристаллизуется. Кристаллы отфильтровывают, промывают метанолом (200 мл), охлаждают до -20°C и сушат в вакууме, получая 25.3 г фактора В.

Твердое вещество из третьей силикагелевой колонки, в котором содержатся факторы А, С и D, сушат в вакууме до постоянного веса (87 г). Образцы (20 г) этого твердого вещества растворяют в 190 мл метанола и доводят до объема 230 мл смесью (7:3 по объему) ацетонитрила и воды. Затем порции (5 мл) этого раствора разделяют на хроматографической колонке (250 мм, диаметр 21.2 мм) со сферисорбом ODS-2 (частицы диаметром 5 мкм), используя в качестве элюирующего растворителя смесь (7:3) ацетонитрила и воды. Скорость потока элюента поддерживают равной 20 мл/мин приблизительно в течение 10 с, затем ее постоянно увеличивают до 34 мл/мин в течение 22-минутного периода и эту скорость поддерживают еще в течение 3 мин. Элюируемые факторы детектируют при длине волны 238 нм. Фактор С элюируют между 11.0- и 13.4-й минутами. Фактор D - между 13.4- и 17.4-минутами и фактор А между 17.4- и 23.0-й минутами.

Содержащие фактор С фракции из каждого хроматографического разделения объединяют и выпаривают при низком давлении до твердого вещества. Фракции,

содержащие фактор А, аналогично выпаривают до твердого вещества. Фракции, содержащие фактор D, также объединяют и выпаривают, получая неочищенное твердое вещество (7 г). Последнее вещество снова растворяют в метаноле (65 мл), смешивают с водным ацетонитрилом (30 об. % воды) и повторно разделяют хроматографически на колонке со сферисорбом ODS-2, как описано выше, с тем исключением, что при разделении поддерживают постоянным поток элюента 20 мл/мин. Теперь фактор D элюируют между 16- и 20-й минутой, и эти фракции из каждого хроматографического разделения объединяют. Объединенные элюаты выпаривают до твердого вещества. Три твердых вещества, содержащие факторы А, С и D, высушивают над P_2O_5 в вакууме до постоянного веса (55; 7.0 и 1.21 г соответственно).

Показано, что каждое из четырех твердых веществ, выделенных в этом способе, аналогично образцам факторов А, В, С и D.

Пример 8. 50 мл среды В, содержащейся в колбах Эrlenmeyera емкостью 250 мл, инокулируют суспензией спор организмов *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12111, 12112, 12113 и 12114 (по 0.5 мл), взятой из соломок, подготовленных, как описано в примере 1.

Колбы, содержащие *S.thermoarchaensis* NC1B 12111, NC1B 13112 и NC1B 12113, культивируют при 31°C на роторной качалке. Колбу, содержащую *S. thermoarchaensis* 12114, культивируют при 28°C в течение 2 сут и затем 1 мл бульона переносят в другую колбу Эrlenmeyера, содержащую 50 мл среды В. Эту колбу культивируют при 31°C на роторной качалке. Все колбы встряхивают со скоростью 250 об/мин при диаметре хода 50 мм.

Через 4 сут культивирования центрифугируют 10 мл образца каждого бульона при ускорении 1250 g в течение 45 мин и обрабатывают, как указано ниже. Жидкость над осадком сливают и таблетку осадка повторно суспендируют в 10 мл метанола. Суспензию тщательно встряхивают и выдерживают 1 ч при периодическом перемешивании. Затем суспензию центрифугируют при 10 000 g в течение 5 мин и жидкость над осадком анализируют методом ЖХВР (колонка S5 ODS - 2, 10 см, диаметр 4.6 мм, элюент 70 % - ный ацетонитрил//0.1 M раствор дигидрофосфата аммония). Пики веществ анализировали при 246 нм.

В каждом случае анализ ЖХВР показал наличие факторов А, В, С и D.

Пример 9. Установлено, что факторы А, В, С, D, Е и F содержат только углерод, водород и кислород.

Методом масс-спектроскопии электронного удара (МСЭУ) были получены результаты для факторов А, В, С, D, Е и F (приведенные в табл. 1).

Фактор	Молекулярный ион	Соответствующая молекулярная формула
A	612.37	$C_{36}H_{52}O_8$
B	598.35	$C_{35}H_{50}O_8$
C	584.34	$C_{34}H_{48}O_8$
D	598.35	$C_{35}H_{50}O_8$
E	612.3638	$C_{36}H_{52}O_8$
F	626.3807	$C_{37}H_{54}O_8$

Методом масс-спектроскопии с бомбардировкой быстрыми атомами (МС-ББА) были получены результаты, приведенные в табл. 2.

Фактор	+е ББА	-е ББА	Мол. вес
A	$M/Z635(M+Na)^+$ $M/Z613(M+H)^+$	$M/Z611(M-H)-$	612

B	M/Z691(M+H+ глицерин) ⁺ M/Z599(M+H) ⁺ M/Z581(MH-H ₂ O) ⁺ M/Z563(MH-H ₂ O) ⁺		598
C	M/Z607(M+Na) ⁺	M/Z583(M-H) ⁻	584
D	M/Z621(M+Na) ⁺	M/Z597(M-H) ⁻	598

Методом масс-спектроскопии полевой десорбции для фактора Е были получены следующие результаты: M/Z 612M⁺, а для фактора F-M/Z 626M⁺.

В спектре МСЭУ фактора А при точном измерении масс отмечены ионы: при 612.37 - C₃₆H₅₂O₈; 466.31 - C₃₀H₄₂O₄; 448.30 - C₃₀H₄₀O₃; 425.23 - C₂₆H₃₃O₅; 354.22 - C₂₃H₃₀O₃; 297.22 - C₂₁H₂₉O; 32 278.11 - C₁₅H₁₈O₅; 247.17 - C₁₆H₂₃O₂; 219.18 - C₁₅H₂₃O; 95.05 - C₆H₇O).

В спектре МСЭУ фактора В при точном определении масс отмечены ионы: при 598.35 - C₃₅H₅₀O₈; 438.28 - C₂₈H₃₈O₄; 420.26 - 314.19 - C₂₀H₂₆O₃; 248.14-C₁₅H₂₀O₃; 151.08-C₉H₁₁O₂.

В спектре МСЭУ фактора С при точном определении масс отмечены ионы: при 584.34 - C₃₄H₄₈O₈; 566.33-C₃₄H₄₆O₇; 438.28 - C₂₈H₃₈O₄.

В спектре МСЭУ фактора D при точном определении масс отмечены ионы: при 598.35- C₃₅H₅₀O₈; 452.29-C₂₉H₄₀O₄; 434.28 -C₂₉H₃₈O₃.

В спектре МСЭУ фактора Е при точном определении масс отмечены ионы: при 452.2908 - C₂₉H₄₀O₄, и для фактора F ионы при 466.3067 - C₃₀H₂₄O₄.

Факторы А, В, С, Д, Е и F имеют следующие характерные пики в ИК-спектре (в бромоформе).

Для (Фактора А - около 3510 (OH), 1712 (сложный эфир) и 998 см⁻¹ (C-O).

Для фактора В около 3510 (OH); 1710 (сложный эфир) и 996 см⁻¹ (C-O);

Для фактора С около 3510 (OH); 1712 (сложный эфир) и 996 см⁻¹ (C-O);

Для фактора D около 3508 (OH); 1711 (сложный эфир) и 996 см⁻¹ (C-O);

Для фактора Е около 3500 (OH); 1708 (сложный эфир) и 994 см⁻¹ (C-O);

Для фактора F около 3100 (OH); 1708 (сложный эфир) и 997 см⁻¹ (C-O).

Факторы А, В, С, Д, Е и F имеют УФ-спектры в растворе метанола (0.002 %), где П - перегиб и М - максимум (см. табл. 3).

Фактор	Длина волны, нм	E ₁ ¹
1	2	3
A	252 П 244.5 М 239 П	318 468 430
B	252 П 244.5 М 239 П	302 426 394
C	252 П 244.5 М 239 П	316 470 432

1	2	3
D	252 П 244.5 М 239 П	263 393 362
E*	252 П 244 М 238 П	266 402 373

F*	252 244.5 239	П М М	285 421 389
----	---------------------	-------------	-------------------

*Концентрация в метаноле С=0.001 %

Приведенные выше значения $\lambda_{\text{МАКС}}$ представляют собой характеристику каждого фактора, значения E_1^1 отражают чистоту материала в полученном виде (отношения величины E_1^1 являются характеристичными для вещества).

Спектры протонного магнитного резонанса (ПМР) при 200 МГц каждого фактора в растворе дейтерохлороформа включают следующие сигналы (значения с мультиплетностью, константами сочетания (Гц) и интегральными величинами в скобках).

Фактор А: 4.1-4.4 (м, 2H); 4.61 (шир. с, 1H); 4.6-4.75 (м, 2H); 4.81 (д, 9, 1H); 5.05 (м, 1H); 5.34 (с, 2H); 5.69 (д, 5, 1H); 6.06 (д, 5, 1H); 6.17 (м, 1H); 6.26 (д, 11, 1H); 6.37 (м, 1H); 6.46 (д, 10, 1H); 6.74 (к, 2, 1H); 7.42 (м, 1H); 7.7-7.9 (м, 5H); 8.14 (с, 3H); 8.40 (с, 3H); 8.47 (с, 3H); 8.61 (т, 11, 1H); 8.96 (д, 7, 3H); 9.06 (д, 7, 3H); 9.02 (д, 7, H); 9.13 (к, 11, 1H); 9.21 (д, 7, 3H).

Фактор В: 4.2-4.4 (м, 2H); 4.55 (к, 7, 1H); 4.65 (шир. с, 1H); 4.6-4.8 (м, 2H); 5.06 (м, 1H); 5.3-5.5 (м, 2H); 6.01 (д, 5, 1H); 6.07 (д, 5, 1H); 6.12 (с, 1H); 6.24 (д, 11, 1H); 6.24 (м, 1H); 6.3-6.5 (м, 2H); 6.53 (с, 3H); 6.73 (к, 2, 1H); 7.62 (м, 1H); 7.6-8.0 (м, 4H); 8.22 (с, 3H); 8.35 (д, 7, 3H); 8.41 (с, 3H); 8.49 (с, 3H); 8.62 (т, 11, 1H); 9.03 (д, 6, 3H); 9.12 (к, 11, 1H); 9.22 (д, 3H).

Фактор С: 4.29 (д, 11, т, 2, 1H); 4.4-4.6 (м, 3H); 4.56 (шир. с, 1H); 5.14 (дд, 15, 10, 1H); 5.23 (м, 1H); 5.65 (шир. с, 2H); 5.72 (д, 6, 1H); 5.95 (д, 10, 1H); 5.99 (д, 6, 1H); 6.08 (шир. с, 1H); 6.1-6.4 (м, 3H); 6.62 (к, 3, 1H); 7.7-8.1 (м, около 1H); 7.18 (с, 3H); 8.33 (с, 3H); 8.48 (д, 7, 3H); 8.64 (с, 3H); 8.68 (т, 11, 1H); 9.00 (д, 7); 9.08 (д, 7, 3H); 9.12 (к, 12, 1H).

Фактор D: 4.18-4.14 (м, 2H); 4.47-4.82 (м, 4H); 5.04 (м, 1H); 5.35 (с, 2H); 5.72 (д, 7, 1H); 6.07 (д, 7, 1H); 6.15-6.45 (м, 4H); 6.74 (к, 4, 1H); 7.45-8.1 (м, 8H); 8.16 (с, 3H); 8.41 (с, 3H); 8.49 (с, 3H); 8.62 (т, 11, 1H); 8.92-9.05 (м, 6H); 9.21 (д, 7, 3H).

Фактор Е: 4.1-4.3 (м, 2H); 4.5-4.8 (м, 4Н всего); 5.04 (м, 1H); 5.2-5.5 (м, 2H); 6.01 (д, 5, 1H); 6.05 (д, 5, 1H); 6.11 (с, 1H); 6.1-6.4 (м, 3H); 6.45 (д, 1H); 6.51 (с, 3H); 6.70 (к, 2, 1H); 7.60 (м, 1H); 8.20 (с, 3H); 8.41 (с, 3H); 8.47 (с, 3H); 8.60 (т, 11, 1H); 9.00 (т, 7, 3H); 9.02 (д, 6, 3H); 9.11 (к, 11, 1H); 9.20 (д, 7, 3H).

Фактор F: 4.2-4.4 (м, 2H); 4.62 (с, 1H); около 4.70 (м, 2H); 4.80 (д, 9, 1H); 5.04 (м, 1H); 5.2-5.5 (м, 2H); 5.99 (д, 5, 1H); 6.05 (д, 5, 1H); 6.11 (с, 1H); 6.1-6.3 (м, 2H); около 6.36 (м, 1H); 6.45 (д, 10, 1H); 6.51 (с, 3H); 6.70 (к, 2, 1H); 7.42 (м, 1H); 7.58 (м, 1H); 8.19 (с, 3H); 8.40 (с, 3H); 8.47 (с, 3H); 8.60 (т, 11, 1H); 8.95 (д, 3H); 9.05 (д, 7, 3H); 9.01 (д, 7, 3H); 9.10 (к, 11, 1H); 9.21 (д, 6, 3H).

Отфильтрованный от шума спектр ЯМР-С¹³ при 25.05 МГц раствора каждого фактора в дейтерохлороформе включает пики (в скобках даны величины 8 с мультиплетностью сигналов внerezонансного спектра).

Фактор А при 173.2 (с); 142.6 (д); 139.2 (с); 137.6 (с); 137.1 (с); 137.0 (д); 130.4 (с); 123.1 (д); 120.1 (д); 171.8 (д); 99.5 (с); 80.0 (с); 79.0 (д); 76.5 (д); 69.0 (д); 68.3*; 67.4 (д); 48.2 (т); 45.4 (д); 40.9 (т); 40.5 (т); 35.8*; 34.5 (т); 22.1 (к); 34.5 (т); 26.6 (д); 22.6 (к); 22.0 (к); 19.7 (к); 15.3 (к); 13.7 (к); 10.8 (к).

Фактор В при 173.4 (с); 142.1 (д); 139.5 (с); 137.1 (с); 136.7 (с); 133.7 (с); 123.6 (д); 123.3 (д); 120.0 (д); 119.3 (д); 118.2 (д); 99.5 (с); 80.1 (с); 77.3 (д); 76.6 (д); 76.4 (д); 69.0 (д); 68.3 (д); 67.9*; 67.6*; 57.5 (к); 48.2 (т); 45.4 (д); 40.7 (т); 40.5 (т); 35.8*; 34.5 (т); 22.1 (к); 19.6 (к); 15.3 (к); 13.6 (к); 12.9 (к); 10.5 (к).

Фактор С при 173.3 (с); 142.2 (д); 140.3 (с); 138.5 (с); 137 (с); 134.9 (с); 123.9 (д); 121.1 (д); 120.6 (д); 118.1 (д); 100.2 (с); 80.6 (с); 80.1 (д); 77.4 (д); 69.2 (д); 69.0 (д); 68.3*; 68.0 (д); 67.9 (д); 48.6 (т); 46.3 (д); 41.4 (т); 36.5*; 36.3*; 36.1 (д); 35.0 (т); 22.6 (к); 20.0 (к); 15.4 (к); 14.3 (к); 13.1 (к); 10.8 (к).

Фактор Д при 173.2 (с); 142.5 (д); 139.1 (с); 137.5 (с); 137.1 (с); 132.1 (с); 131.4 (д);

123.1 (д); 120.1 (д); 117.8 (д); 99.5 (с); 79.9 (с); 79.2 (д); 76.5 (д); 69.0 (д); 68.3*; 68.1*; 67.6*; 67.4*; 48.2 (т); 45.5 (д); 40.8 (т); 40.5 (т); 35.7*; 34.5 (т); 22.0 (к); 20.6 (т); 19.6 (к); 15.3 (к); 13.7 (к); 13.6 (к); 10.7 (к).

Кривые кругового дихронизма для факторов А, В, С и D (концентрация растворов в метаноле около 0.1 %) плохо разрешены в области 230-260 нм, связанной поглощением диенового хромофора. Это указывает на то, что во всех четырех факторах абсолютные конфигурации при атомах углерода C₂, C₇, C₁₇ и C₁₉ являются одинаковыми.

Ниже следуют примеры рецептур согласно изобретению (активный компонент - вещество, полученное по предлагаемому способу, которое может представлять собой один из факторов А, В, С, D, Е или F. Парентеральная многодозная инъекция (интервал 1-5 вес./об %):

Активный компонент	4.0
Бензиловый спирт	2.0
Триацетат глицерина	30.0
Пропиленгликоль	до 100.0

Активный компонент растворяют в бензиловом спирте и триацетате глицерина. Добавляют пропиленгликоль и доводят до объема. Раствор фильтруют, чтобы удалить любые твердые примеси. Продукт асептично заполняют в ампулы для инъекций и закрывают резиновыми уплотнениями или поршнями, удерживаемыми на месте алюминиевыми колпачками. Окончательно стерилизуют продукт путем нагревания в автоклаве.

Аэрозольный распылитель (интервал 0.01-0.50 вес. %)	вес. /вес. %:
Активный компонент	0.1
Трихлорэтан	29.9
Трихлорформетан	35.0
Дихлорфторметан	35.0

Смешивают активный компонент с трихлорэтаном и заполняют в аэрозольный контейнер. Продувают пространство головки газообразным распылителем и обжимают клапан на месте. Под давлением вводят необходимое количество жидкого распылителя через клапан. Устанавливают пускатель и внутреннюю крышку.

Таблетки. Способ получения – влажная грануляция.

	Вес. %	МГ
Активный компонент		250.0
Стеарат магния	1	5
Кукурузный крахмал	5	22.5
Натрий-гликолят крахмала	2	9.0
Лаурилсульфат натрия	1	4.5

Микрокристаллическая целлюлоза - для оболочки таблетки весом 450 мг.

К активному компоненту добавляют достаточное количество 10 %-ной крахмальной пасты для получения удобной для гранулирования влажной массы. Формируют гранулы и сушат, используя сушильный поднос или сушилку в охоженном слое. Просеивают через сито, добавляют оставшиеся компоненты и прессуют в таблетки.

В случае необходимости поверхность таблетки покрывают пленкой, используя оксиметилцеллюлозу или другой подобный пленкообразующий материал, применяя водную или неводную систему растворителей. В состав покрывающей пленки могут быть включены пластификатор и поддающая краска.

Ветеринарная таблетка для мелких домашних животных. Способ получения - сухая грануляция. Состав, мг:

Активный компонент	50.0
Стеарат магния	7.5
Микрокристаллическая	

целлюлоза для оболочки	
таблетки	75.0

Смешивают активный компонент со стеаратом магния и микрокристаллической целлюлозой. Формуют из смеси червячки. Разбивают червячки, пропуская их через роторный гранулятор, получают свободнотекучие таблетки. Прессуют в таблетки. Оболочки таблеток затем могут быть покрыты пленкой.

Ветеринарная внутригрудная инъекция:

Активный компонент, мг	150
Полисорбат 60, вес. %	до 3.0
Белый пчелиный воск, вес. %	6.0
Арахисовое масло, вес. %	91

Нагревают арахисовое масло, белый пчелиный воск и полисорбат 60 до 160°C при перемешивании. Выдерживают 2 ч при этой температуре и затем охлаждают до комнатной температуры при перемешивании.

Асептично добавляют активный компонент в носитель и диспергируют, используя высокоскоростной смеситель. Очищают путем пропускания через коллоидную мельницу. Асептично заполняют продукт в стерильные пластиковые шприцы.

Ветеринарный пероральный мягчитель, вес/об. %:

Активный компонент	0.35
"Полисорбат 85"	5.0
Бензиловый спирт	3.0
Пропиленгликоль	30.0
Фосфатный буфер до pH	6.0-6.5
Вода	до 100.0

Растворяют активный компонент в полисорбате 85, бензиловом спирте и пропиленгликоле. Добавляют часть воды и доводят pH до 6.0-6.5 фосфатным буфером (в случае необходимости). Добавляют остальное количество воды. Заполняют продукт в емкость мягчителя.

Ветеринарная пероральная паста, вес. %:

Активный компонент	7.5
Сахарин	25.0
Полисорбат 85	3.0
Дистеарат алюминия	5.0
Фракционированное масло кокосового ореха	до 100.0

Диспергируют дистеарат алюминия во фракционированном кокосовом масле и полисорбате 85 путем нагревания. Охлаждают до комнатной температуры и диспергируют сахарин в масляном носителе. Распределяют активный компонент в основе. Заполняют в пластиковые шприцы.

Гранулы для ветеринарного назначения в пишу, вес. %:

Активный компонент	2.5
Известковая мука	до 100.0

Смешивают активный компонент с известковой мукой. Формуют гранулы, используя способ влажной грануляции. Сушат, применяя сушильный поднос или сушилку в ожигенном слое. Заполняют в подходящие контейнеры.

Эмульгируемый концентрат

Активный компонент, г	50
Анионный эмульгатор (например, фенилсульфонат CALX), г	40
Неионогенный эмульгатор (например, "Сипероник NP 13"), г	60
Ароматический растворитель	

(например, "Сольвессо 100"), л до 1
Смешивают все компоненты и перемешивают до растворения.

Гранулы, г:

а) Активный компонент	50
Древесная смола	40
Гипсовые гранулы, 20-60 меш (например, "Агкорб 100 А")	до 1000
б) Активный компонент	50
Сипероник NP13	40
Гипсовые гранулы (20-60 меш)	до 1000

Растворяют все компоненты в летучем растворителе, например хлористом метилене, добавляют к гранулам, обрабатывают в барабане-смесителе. Сушат, чтобы удалить растворитель.

Активность факторов A, B, C, D, E и F определяют, используя множество вредителей и их хозяев, включая следующие: *Tetranyc husurticae* (обыкновенная фасоль и Мирабель В), *Myzis persicae* (капуста китайская и редька), *Heliotlus virescens* (хлопок), *Chiloportellus* (фасоль Рейпа), *Meloidogine incognita* (золотистая фасоль), *Panonchus ulmi* (мирабель В), *Phorodon humuli* (хмель), *Aulacorthus circumflexum* (цикламен).

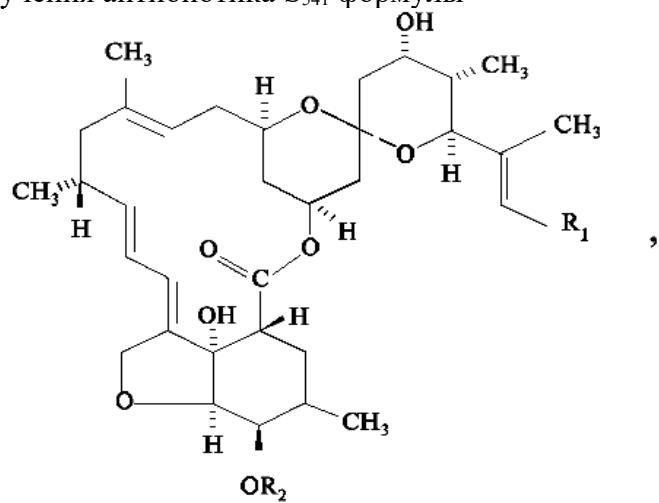
Продукт используют в виде жидкого препарата (например, раствора в ацетоне). Затем эти растворы разбавляют водой, содержащей 0.1 или 0.01 вес. % увлажняющего агента, до тех пор пока жидкие препараты не будут содержать требуемую концентрацию продукта.

Методика испытания, принятая с учетом каждого вредителя, включает помещение нескольких вредителей в среду, которой обычно является растение-хозяин, и эту среду обрабатывают препаратом (остаточное испытание). В случае *Tetranus urticae* препаратом обрабатывают как вредителей, так и среду (контактное испытание).

Используя эту методику, находят, что факторы A-F являются эффективными при концентрациях (по весу продукта) до 500 ч. на млн или менее.

Формула изобретения

1. Способ получения антибиотика S₅₄₁ формулы



где R₁ - изопропил или иметил, или этил; R₂ - водород или метил, заключающийся в анаэробном культивировании штаммов *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12015, или NC1B 12111, или NC1B 12112, или NC1B 12113, или NC1B 12114 на жидкой питательной среде, содержащей источники углерода, азота и минеральные соли при 28 -34°C при pH 5.4 - 7.2 в течение 5-10 сут с последующим выделением целевого соединения путем экстракции водорастворимым растворителем.

2. Штамм стрептомицета *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12112 - продуцент антибиотика S₅₄₁.

3. Штамм стрептомицета *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12015 - продуцент антибиотика S₅₄₁.

4. Штамм стрептомицета *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12111 - продуцент антибиотика S₅₄₁.

5. Штамм стрептомицета *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12113 - продуцент антибиотика S₅₄₁.

6. Штамм стрептомицета *Streptomyces thermoarchaensis* NC1B 12114 - продуцент антибиотика S₅₄₁.

Приоритет по пунктам и признакам: 14.09.84 по п. 1 антибиотик S₅₄₁, штамм 12015, имеет признаки, характеризующие условия способа;

21.12.84 по п. 3;

13.09.84 по пп. 1, 2, 4-6.

Ответственный за выпуск

Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03