

ПОЛУЧЕНИЕ АВЕРМЕКТИНОВ: БИОТЕХНОЛОГИИ И ОРГАНИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ*

(обзор)

М.Х. ДЖАФАРОВ, Ф.И. ВАСИЛЕВИЧ, М.Н. МИРЗАЕВ

В предлагаемом обзоре проанализированы результаты исследований по различным аспектам совершенствования технологии получения авермектинов — 16-членных макроциклических лактонов, обладающих широким спектром противопаразитарного действия при высоком терапевтическом индексе и безвредности для млекопитающих (W.C. Campbell, 2012). Согласно опубликованным данным, уникальная способность авермектинов подавлять развитие насекомых, нематод и клещей связана с возможностью блокировать передачу нервного импульса в нервно-мышечном синапсе. Сущность этого механизма действия, приводящего к параличу и гибели паразитов, заключается в стимуляции выброса ионов хлора, деполаризации мембраны клеток и патологическом нарушении ее функций (A.J. Wolstenholme с соавт., 2016). Из известных 8 компонентов (A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a и B2b) авермектинового комплекса, продуцируемого микроорганизмом *Streptomyces avermitilis*, наиболее активны против возбудителей паразитозов авермектины группы B1 (S. Omura, 2002; W.C. Campbell, 2012). Поэтому основные работы по авермектинам связаны с селекцией высокопродуктивных штаммов, образующих преимущественно авермектины B1 (S.S. Ki с соавт., 2005; H. Gao с соавт., 2010; W. Liu с соавт., 2015; L. Meng с соавт., 2016), и получением полусинтетических аналогов авермектинов B1 с улучшенными физико-химическими и фармакологическими свойствами (J. Verguysse с соавт., 2001; A. Awasthi с соавт., 2012). Попытки разработать технологию полного химического синтеза авермектинов пока не дали существенных результатов из-за низкого выхода целевого продукта и сложности схемы синтеза (S. Yamashita с соавт., 2016). Значительное внимание в обзоре уделено биохимическим аспектам разнообразия 16-членных макроциклических лактонов и их продуцентов, а также полусинтетическим аналогам, определены перспективы поиска новых высокоэффективных и экологически безопасных полусинтетических аналогов авермектина B1. Обсуждены направления исследований по генетике, биохимии и физиологии продуцента авермектинов, способы регулируемого культивирования штаммов *S. avermitilis* и биосинтеза преимущественно требуемых компонентов авермектинового комплекса (S. Kitani с соавт., 2009; J. Guo с соавт., 2018). Проанализированы данные о развитии резистентности у некоторых видов паразитов к давно применяющимся авермектинсодержащим препаратам и показано, что она имеет мультифакторную природу, которая обусловлена мутациями генов, детерминирующих субъединицы GluCl, повышенной экспрессией Р-гликопротеина (J.H. Gill с соавт., 1998; R.K. Prichard, 2007; F.D. Guerrero с соавт., 2012; P.C. Pohl с соавт., 2014; P. Godoy с соавт., 2016). Для успешной борьбы с нематодами, насекомыми и клещами, имеющими сельскохозяйственное, санитарно-гигиеническое и медицинское значение, представляется целесообразным создание препаратов на основе натуральных авермектинов и их новых полусинтетических производных, например 5-О-сукцинилавермектина B1 и соединения C2017.

Ключевые слова: авермектины, мильбемицины, немадектины, дорамектин, абамектин, ивермектин, моксидектин, оксим мильбемицина, 5-О-сукцинилавермектин B1, соединение C2017, оксимы авермектинов, *Streptomyces avermitilis*, органический синтез, антипаразитарные препараты, нематоциды, инсектоакарициды.

Авермектины (16-членные макролиды, продуцируемые *Streptomyces avermitilis*) (1, 2) обладают широким спектром нематоцидного и инсектоакарицидного действия и уже более 35 лет успешно применяются в терапии и профилактике паразитарных болезней человека, животных, в защите растений (3-7). Ежегодный объем продаж авермектиновых субстанций превышает 850 млн USD (8, 9). Интегральное антипаразитарное действие субстанций этого класса определяется их способностью взаимодействовать с глутаматзависимыми (основная мишень) Cl⁻-ионными каналами, специфичными для беспозвоночных животных (10), и ГАМК_A (γ-аминомасляная кислота)-зависимыми рецепторами (11). Кроме того, авермектины имеют

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (Соглашение № 15-16-00019).

аффинность к разным ионным каналам и рецепторам из Cys-loop-суперсемейства, P2X4 и фармезоидным рецепторам, G-белок-связанным калиевым каналам внутреннего выпрямления (G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels, GIRK receptors) и другим, что имеет фармакотерапевтические перспективы (12, 13). У представителя авермектинов ивермектина выявлена способность блокировать PAK1-зависимый рост клеток доброкачественных и злокачественных новообразований (14, 15). Противоопухолевое действие имеют и другие представители 16-членных антипаразитарных макролидов (16-19). Недавно обнаружено ингибирование репликации вируса желтой лихорадки (20) и спорогонии у *Plasmodium falciparum* в *Anopheles gambiae* (21) ивермектином, антитуберкулезное действие авермектинов (22), снижение авермектинами поглощения этанола клетками (23), лечебное действие ивермектина при экспериментальных патологических состояниях, например ремиелинизация при аутоиммунном энцефалите в результате аллостерической активации и восстановления нарушенных функций АТФ-зависимых (пуринэргических) ионофорных рецепторов P2X4Rs (24-27).

В представляемом обзоре основное внимание уделено способам получения природных авермектинов и их полусинтетических производных.

Технологии получения авермектинов традиционно (2) предполагают получение высокопродуктивных штаммов, синтезирующих предпочтительно авермектины В1, оптимизацию питательных сред для культивирования продуцента и производство полусинтетических аналогов авермектинов В1 с улучшенными физико-химическими и фармакологическими свойствами (28-30). В последние годы развивается еще одно направление — синтез желаемых продуктов (например, ивермектина, мильбемицинов) методами синтетической биологии (31-34). В 1980-1990-х годах выполнялись исследования по полному химическому синтезу некоторых авермектинов — В1а и А1а (35), однако предложенные схемы включали много стадий при низком выходе целевого продукта (не более 0,08 %), что свидетельствует о преимуществе микробиологического способа получения субстанций этого класса. В настоящее время ведутся исследования по разработке эффективных методик полного химического синтеза авермектинов (36-39).

Селекция продуцентов, микробиологический синтез, биотехнологии. Основное направление модернизации продуцента авермектинов *Streptomyces avermitilis* (ex Burg et al. 1979) Kim and Goodfellow, 2002 (40) — получение высокопроизводительных штаммов, образующих авермектиновый комплекс или какой-либо его компонент, в основном В1, с подавленным синтезом олигомицинов, отрицательно влияющих на рост и развитие продуцента. Современные промышленные штаммы генеалогически происходят от образцов дикого типа *S. avermitilis* MA-4680 (штамм NRRL 8165; NCIMB 12804; <http://gcm.wfcc.info>), японского изолята из почвы, обладающего антигельминтным действием. Этот штамм депонирован под разными номерами в коллекциях микроорганизмов некоторых стран (АТСС 31267, ВКМ Ас-1301 и др.) (41). Прародителем российских продуцентов авермектинов служит штамм ВКМ Ас-1301 из Всероссийской коллекции микроорганизмов (<http://www.vkm.ru/contact.htm>) (42, 43). В дальнейшем проводили отбор спонтанных и индуцированных физическими (УФ-, рентгеновское излучения и др.) и химическими (азотистый иприт, метилметанолсульфонат и др.) агентами мутантов, а также усовершенствование продуцента методами генной инженерии (44, 45). Один из таких штаммов — производный *S. avermitilis* MA-4848, продуцирующий восемь известных авермектинов, получен в США посредством УФ-мутагенеза с

использованием лиофилизированной суспензии родительского штамма МА-4680 (АТСС 31267) и оптимизации состава питательной среды и условий культивирования. В результате выход авермектинового комплекса увеличился с 9 до 500 мкг/мл с относительным содержанием В1 около 35 %. Эта композиция, получившая название С-076, обладает нематоцидным, акарицидным и инсектицидным действием. Штамм МА-4848 в лиофилизированной и замороженной формах депонирован под названиями соответственно АТСС 31271 и АТСС 31272 (патент US 4285963; 1981), в дальнейшем его производительность была повышена до > 9000 мкг/мл при содержании авермектина В1 до 95 % и более (33, 46, 47). В России также получены штаммы *S. avermitilis*, производящие полный 8-компонентный авермектиновый комплекс (А1а, А1б, А2а, А2б, В1а, В1б, В2а и В2б) с высокой биоцидной активностью (48, 49). Продуктивность штамма *S. avermitilis* ВНИИСХМ 56 по авермектиновому комплексу в среднем 500 мкг/мл, на долю группы В (В1 + В2) приходится до 50-70 % (патенты РФ № 2087535, № 2125609). Полученные при селекции продуценты не синтезировали токсичный олигомицин, который содержался в значительном количестве в экстракте мицелия исходного штамма ВКМ Ас-1301. Первый отечественный препарат Аверсект-1 (МПП «Бифидум» при НПО «Биотехнология», г. Москва), зарегистрированный Главным управлением ветеринарии МСХ РФ (1992 год), включал авермектины штаммов *S. avermitilis* 198 (ВНИИСХМ 50) и ВНИИСХМ 51, отобранных при ступенчатой селекцией из *S. avermitilis* ВКМ Ас 1301 (патент РФ № 2087535). Из этих штаммов при отборе получили ВНИИСХМ 54 (патент РФ № 2054483) и ВНИИСХМ 56 (патент РФ № 2087535) с производительностью 400-500 мкг/мл. Упомянутые штаммы составили основу для отбора более активных продуцентов и продолжают использоваться. В частности, при направленной селекции штамма *S. avermitilis* ВНИИСХМ 54 через ряд промежуточных вариантов получен *S. avermitilis* ССМ 4697 (выход авермектинов до 2300 мкг/мл, относительное содержание компонента В1 около 50 %; патент РФ № 2156301). У штамма НИЦБ 132 (патент РФ № 2147320) биосинтез авермектинов не менее 3500 мкг/мл, в том числе В1 — 1500 мкг/мл с содержанием В1а около 80 %. Учеными из Украины и Белоруссии выделены продуценты авермектинов *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 и *S. avermitilis* X-1 (50, 51). Сообщалось о *S. avermitilis* — продуцентах натуральных (обычно так называют авермектины из состава С-076) и ненатуральных авермектинов на основе рекомбинантных штаммов (патент РФ № 2096462). Как было обнаружено, биосинтез авермектинов у *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 резко усиливается в присутствии пирувата, L-треонина или L-метионина, при этом в культуральной жидкости накапливаются также аминокислоты, липиды, фитогормоны (52), что согласуется с ранее полученными данными (53) и может быть использовано при создании безотходной технологии биосинтеза авермектинов.

При селекции высокоактивных продуцентов применялось мутагенное воздействие на споры стрептомицетов короткоимпульсным рентгеновским излучением с энергией квантов 80-160 КэВ (патент РФ № 2074256), УФ-облучение, азотистую кислоту, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, этилметансульфонат, другие традиционные и новые мутагены (54, 55).

В промышленном производстве препаратов на основе авермектинов в настоящее время используются штаммы *S. avermitilis* — G8-17, SA-01, AV-LP, A-144, A-178, NA-108 (Китай), продуцирующие абамектин, ВКПМ S-1440, ВНИИСХМ 56 (Россия), синтезирующие известный авермектиновый комплекс, и др. Таким образом, при весьма интенсивной селекционной работе с продуцентами авермектинов практическое применение нашли

лишь единичные штаммы.

Результатом разработок российской технологии биосинтеза авермектинов стало создание и применение препарата Аверсект-1 (ТУ 10.07090-92. Аверсект-1) на основе авермектинового комплекса (штамм *S. avermitilis* ВНИИСХМ 51, патент РФ № 2048520). Отличительная особенность биосинтеза авермектинов — их накопление в биомассе стрептомицетов, а не выделение в среду. Если не контролировать процесс, особенно на стадии, когда начинается лизис мицелия, возможны потери целевого продукта (56).

Типичная технология получения авермектинового комплекса, разработанная для отечественных штаммов *S. avermitilis* ВНИИСХМ 50, ВНИИСХМ 51 и ВНИИСХМ 56, предусматривает культивирование в качалочных колбах (250 и 750 мл), а также в ферментерах (250 л) (56). Традиционную технологию усовершенствуют, направленно изменяя геном штаммов (45-47) или внося в среду компоненты, влияющие на метаболизм продуцента (52, 57-59). Так, в присутствии антиметаболита синефунгина, ингибирующего превращение авермектинов В в авермектины А, доля авермектинов В, продуцируемых культурой *S. avermitilis* NRRL 8165, от их общего количества достигала 77 % (60, 61). Регуляторная роль аминокислот в биосинтезе авермектинов и изменении соотношения компонентов В и А в авермектиновом комплексе показана при культивировании ряда штаммов *S. avermitilis* (62, 63). Биосинтез, выделение и очистка авермектинов описаны в ряде работ: концентрат продукта экстрагируют органическим растворителем, не смешивающимся с водой (например, этилацетатом), или смесью растворителей, состоящей из воды и низко- (этанол или пропанол) и высококипящих (например, ПЭГ-200) растворителей, смешивающихся с водой без ограничений (64, 65). Основные принципы биосинтеза авермектинов установлены с помощью изотопных методов и мутагенеза (64).

Проведено клонирование генов авермектинового комплекса и секвенирование генома *S. avermitilis*, что позволило, в частности, предсказать (с последующим экспериментальным подтверждением) биосинтез других вторичных метаболитов (например, полиенового макролида филипина III) (66). Размер генома *S. avermitilis* — 9025608 п.н., он содержит не менее 7582 потенциальных открытых рамок считывания и 38 кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов (67). Биосинтез авермектинов детерминирован 17 генами. Четыре из них (*aveA1-aveA4*) кодируют мультифункциональные белковые субъединицы (AveA1-AveA4), состоящие соответственно из 3973, 6239, 5532 и 4681 аминокислотного остатка и образующие авермектиновый поликетидсинтазный комплекс (48). AveA — это поликетидсинтаза I типа, состоящая из 12 модулей (48). Ферменты AveVI-AveBVIII (соответственно гликозилтрансфераза, тимидилитрансфераза, ТДФ-4-кето-6-дезоксид-гексоз-3-кеторедуктаза, ТДФ-4-кетогексулоз-редуктаза, ТДФ-ТДФ-4-кето-6-дезоксиглюкоз-3-эпимераза, ТДФ-4-кето-6-дезоксид-глюкоз-2,3-дегидратаза, ТДФ-6-дезоксид-гексоз-3-О-метилтрансфераза, ТДФ-4-кето-6-дезоксид-гексоз-3-кеторедуктаза) (33) осуществляют синтез дисахарида L-олеандрозы из D-глюкозо-6-фосфата и присоединение к агликону, AveE и AveF — формирование фуранового цикла, остальные участвуют в образовании спирокетального фрагмента (AveC), 5-О-метилировании (AveD); AveR — фактор положительной регуляции биосинтеза (64, 67).

При образовании авермектинов происходит биосинтез мономерных структурных единиц, используемых в поликетидном синтезе авермектинов, сборка предшественника пентациклического структурного каркаса авермектинов — тридекакетида по поликетидному механизму и постполикетидные превращения (1). Последние включают превращение тридекакетида в ин-

термедиат авермектина с 16-членным лактонным кольцом — 6,8а-секо-6,8а-дезоксидеокси-5-оксоавермектин; преобразование 6,8а-секо-6,8а-дезоксидеокси-5-оксоавермектина в авермектиновый агликон (при окислительной циклизации, восстановлении и/или метилировании); синтез модифицированной L-олеандрозы; гликозилирование агликона дезокситимидин-дифосфат-L-олеандрозой (dTDP-L-Ole) с образованием авермектина (64).

На стадии инициации вначале происходят биохимические события по настройке (зарядка/перезарядка стартовой единицей) модуля загрузки (модуль 0) для поликетидного синтеза: субстратный центр с ацилтрансферазной активностью (домен АТ₀) полифункциональной синтазы захватывает доступный в ферментационной среде остаток монокарбоновой кислоты из пула ацил-S-CoA посредством ацилирования тиольной группы цистеина этого домена фермента (68-72). Захваченный АТ₀ ацильный (2-метилбутирильный или изобутирильный) остаток переносится на тиольную группу (замещение водорода в -SH) фосфопантетеинильного фрагмента (P_{rant}), связанного с остатком серина указанного домена, обладающего свойствами ацилпереносящих белков (АПБ, acyl carrier protein АСР₀) и выполняющего функцию P_{rant} «рукава», или АПБ-манипулятора. Так стартовая единица подготавливается для приема модулем 1, в котором аналогичным образом при участии АТ₁ для конденсации активируется дикарбоновая метилмалоновая кислота (метилмалонил-S-P_{rant}-АСР). При конденсации β-кетосинтазный домен (KS₁) модуля 1 катализирует образования C-C-связи между ацильными остатками из модуля 0 и 1 по принципу «голова к хвосту» (механизм Клайзена) (1). При этом сопряженно происходит декарбосилирование остатка дикарбоновой кислоты (73) с образованием дикетида (68, 70), закоренного у домена АСР₁ модуля 1. Этот дикетид восстанавливается кеторедуктазным доменом (KR₁) до β-гидрокси-дикетида, готового для дальнейшей конденсации в модуле 2. Структурное разнообразие продуктов конденсации определяется набором каталитически активных доменов в каждом модуле (74, 75). Удлинение поликетидной цепи происходит шаг за шагом в 12 модулях (одна конденсация в одном модуле) в 12 последовательных сложноэфирных реакциях конденсации 7 единиц малоновой и 5 единиц метилмалоновой кислот, активированных в форме ацил-S-CoA, в результате чего образуется тридекакетидный предшественник авермектинового агликона (1). В каждом цикле конденсации метилмалонильный или малонильный остатки из соответственно метилмалонил-CoA и малонил-CoA переносятся на фосфопантетеинильную группу ацилпереносящего белка (АСР) под стереохимическим контролем ацилтрансферазы (АТ) следующего модуля (68, 76). В конце последнего цикла роста цепи (12-й модуль, стадия терминации синтеза поликетидной цепи) происходят биохимические реакции (их последовательность до конца не выяснена), приводящие к отделению ациклического агликона от АСР₁₂ и образованию 16-членного лактона — 6,8а-секо-6,8а-деокси-5-оксоавермектина и агликона. Показано (77, 78), что спирокетализация происходит после замыкания циклогексенового и 16-членного макролидного циклов, но до образования гексагидробензофуранового фрагмента. Затем после ряда превращений образуются компоненты А и В авермектинового комплекса (64).

Есть значительное сходство в сборке линейных тридекакетидных предшественников авермектинов и близких к ним по структуре и антипаразитарным свойствам мильбемицинов (79). Однако для ацилтрансферазы модуля загрузки мильбемицинсинтазы (MilA, также состоит из 12 модулей) актиномицета *S. hygroscopicus* ssp. *aureolacrimosus*, ssp. *noncyanogenus*, в отличие от AveA, характерна специфичность к ацетил-S-CoA, пропионил-S-CoA и

изобутирил-S-CoA (73). Кроме того, есть некоторые различия в наборе каталитических активностей авермектинсинтазы и мильбемицинсинтазы: во 2-м и 7-м модулях AveA, в отличие от MilA, отсутствует домен еноилредуктазы (ER), а имеющийся домен дегидратазы (DH) неактивен, что определяет некоторые структурные различия агликонов авермектинов и мильбемицинов. Мильбемицины отличаются наличием раскрытого 5-членного тетрагидрофуранового цикла) в положениях C22, C23 и C25 (1, 80) (рис. 1, см. приложение на сайте <http://www.agrobiology.ru>).

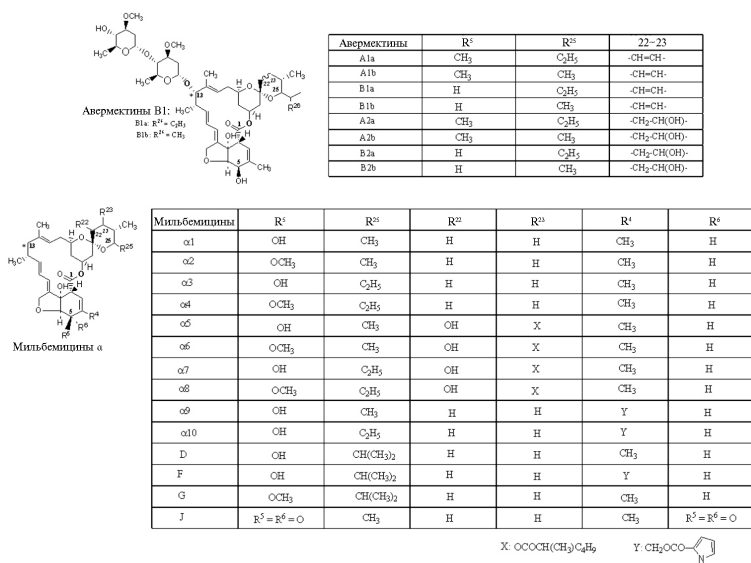


Рис. 1. Разнообразие молекулярных структур авермектинов и мильбемицинов α (мильбемицины β с раскрытым 5-членным циклом не приведены).

Регуляция образования авермектинов в целом происходит в соответствии с общими закономерностями биосинтеза поликетидов (69) у стрептомицетов (81, 82). Факторы регуляции биосинтеза авермектинов делятся на общие и специфические (83-87). В кластере генов синтеза этого класса макроциклических лактонов *aveR*, детерминирующий образование специфического регуляторного белка AveR, выполняет функцию специфического положительного регулятора и контролирует экспрессию как генов поликетидной конденсации, так и генов постполикетидной модификации (85): мутант с делецией в *aveR* не синтезирует авермектины, но продуцирует олигомицины, причем в больших количествах, чем дикий штамм. Полагают, что *aveR* кодирует специфический активатор, необходимый для биосинтеза авермектинов (86). Ген *aveI* идентифицирован как негативный регулятор биосинтеза этого класса макролидов, так как его инактивация приводит к увеличению продукции авермектина B1a у *S. avermitilis* NRRL 8165 примерно в 16 раз (33). Также установлено, что повышенная экспрессия генов *aveT* и *sav_4189*, кодирующих соответственно регуляторные факторы — SAV3619 (AveT) из семейства репрессорных белков TetR (Tet Repressor Protein) и SAV4189, гомологичный белкам-регуляторам семейства MarR (multiple antibiotic resistance regulator), увеличивает выход авермектинов (87, 88). Среди общих регуляторов биосинтеза поликетидов, найденных также у других представителей актиномицетов рода *Streptomyces* (например, у *S. coelicolor* M145, синтезирующего актинородин), факторы SAV3818 и AvaR3 — положительные регуляторы, а AvaR1 — отрицательный регулятор биосинтеза авермектинов (33).

Группу описанных авермектиноподобных природных субстанций пополнили вещества, обладающие, как и все такие соединения, нематоцидной и инсектоакарицидной активностью — мелингмицин, продуцируемый *S. nanchangensis* (по структуре близок к мильбемицину $\alpha 11$) (89), тетрациклическое мильбемициноподобное соединение у *S. microflavus* peau3 Y-3 (90), гомолога авермектинов B1 у горгониевого коралла *Anthogorgia caerulea* (бухта Веibu, Китай) (91).

Разнообразие продуцентов авермектиноподобных соединений (авермектинов, мильбемицинов, других аналогичных субстанций) свидетельствует о распространенности в природе комбинаторного синтеза по поликетидному механизму (89-91). В основе структур агликонов этих природных лактонов лежит один тот же тридекакетид. Многообразие природных авермектиноподобных соединений образуется благодаря вовлечению в биосинтез разных исходных единиц наращивания углеродной цепи (2-R-производные малоновой кислоты (73) и набору каталитически активных доменов поликетидсинтазы у разных стрептомицетов (92, 93).

Использование методов синтетической биологии (32, 34, 73) и органического синтеза (93, 94) — важный тренд в расширение номенклатуры и усовершенствование производства авермектиноподобных субстанций (32). Как известно, большинство коммерческих субстанций этого класса — это полусинтетические производные нативного абамектина (1, 2). Основным подходом при усовершенствовании производства абамектина и других авермектинов служит оптимизация условий культивирования и направленный биосинтез у отобранных высокопроизводительных штаммов (32). Так, при замене участка ДНК *aveDH2-KR2* в кластере генов биосинтеза авермектинов у промышленного штамма *S. avermitilis* NA-108 фрагментом *milDH2-ER2-KR2* из кластера биосинтеза мильбемицинов у штамма *S. bingchengensis* создан высокопроизводительный штамм *S. avermitilis* AVE-T27 с выходом биосинтетического ивермектина 3450 ± 65 мкг/мл (95). Известный полусинтетический ивермектин получают реакцией гидрирования 22,23-двойной связи абамектина в присутствии катализатора Уилкинсона $[(\text{PH}_3\text{P})_3\text{RCI}]$ (1, 2). При замене *aveLAT-ACP* и *aveDH2-KR2* соответственно на *milLAT-ACP* и *milDH2-ER2-KR2* сконструирован штамм *S. avermitilis* AVE-H39, который синтезирует два новых ивермектиноподобных метаболита, содержащих метильный (выход 2093 ± 61 мкг/мл) и этильный (выход 951 ± 46 мкг/мл) радикалы в положении C25. Их биоцидная активность против *Caenorhabditis elegans* в 2,5 раза выше, чем у мильбемицина (95). Высокопроизводительный мутантный мильбемицинсинтезирующий штамм *S. avermitilis* SAMA1M7 получили в результате замены генов *aveA1* и *aveA3* (7-й модуль AveA3) у высокопроизводительного промышленного штамма *S. avermitilis* SA-01 темплатами для генов *milA1* и *milA3* (7-й модуль MilA3) из продуцента мильбемицинов *S. hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus* NRRL 5739 (79). Штамм *S. avermitilis* SAMA1M7 производил мильбемицины $\alpha 3$, $\alpha 4$, D (в небольших количествах) и их 5-O-метил-производные (около 292 мкг/мл) (79). Последующей инактивацией 5-O-метилтрансферазы (AveD) у *S. avermitilis* SAMA1M7 и введением стоп-кодона *aveD* с плазмидой $\text{p}\Delta\text{AveD}$ получили штамм *S. avermitilis* SAMA1M7 Δ D, синтезирующий мильбемицины $\alpha 3$ и $\alpha 4$ (основные компоненты коммерческого продукта — мильбемицина) с выходом 377 мкг/мл (79). Успешно осуществлена гетерологичная экспрессия кластера генов биосинтеза авермектинов *ave* у стрептомицета *S. lividans* 1326, при этом получены A2a, B1a и A1a (96). Стрептомицет *S. avermitilis* или его мутант, лишенный фермента дегидрогеназы α -кетокислот с разветвленной углеродной цепью (*bkdF*) из-за инак-

тивации гена *bdkF*, способны синтезировать авермектиноподобные соединения, различавшиеся строением радикала в положении С25, при включении в питательную среду карбоновых кислот — предшественников стартовых единиц для модуля загрузки синтазы. В присутствии циклогексанкарбонной кислоты (ЦГК) продуцент синтезирует аналог авермектина В1 (отличается от него наличием циклогексильного радикала в положении С25), известный как субстанция дорамектин (1, 96, 97). Мутантный штамм *S. avermitilis* TG2002 сконструирован посредством замены модуля загрузки авермектинсинтазы (*aveATL-ACPL*) штамма *S. avermitilis* M1 на ЦГК-синтезирующий модуль (*pnATL-ACPL*) фослактомиинсинтазы (Pn) из *S. platanensis* SAM-0654 с использованием плазмиды pTG2002 (99). У рекомбинантного *S. avermitilis* TG2002 выход дорамектина (58 ± 2 мкг/мл) в 6 раз превышал таковой при ферментации родительского штамма *S. avermitilis* M1 (9 ± 1 мкг/мл), а соотношение дорамектина и авермектина было 300-кратным (99).

Структура авермектинов, механизмы действия и развитие резистентности. Все известные авермектины и близкие к ним мильбемицины, а также обнаруженные недавно мелингмицин (89), 28-гомоавермектин В1а и 28-изопропил-авермектин В1а (91) обладают высокой антипаразитарной активностью при чрезвычайно низкой концентрации (порядка 1 нмоль/л) (100). Тем не менее эти соединения не идентичны, а вариация заместителей в разных участках пентациклического ядра (С4, С5, С13, С22-С23, С25) модулирует их биологическую активность лишь в той или иной степени. В ряду авермектинов удаление одного (дальнего) остатка олеандрозы снижает антинематодную активность в некоторой степени, дисахаридного остатка (агликоны авермектинов с 13-ОН-группой) — значительно, причем инсектоакарицидное действие в этом случае сохраняется. При замене 13-ОН-группы на водород (подобное имеет место у мильбемицина) антипаразитарная активность вновь восстанавливается (76), а производное мильбемицина — лепимектин, имеющий полярный структурный фрагмент в положении С13, — эффективный паразитицид. В целом авермектины и мильбемицины с липофильными группами в положении С13 более активны, а полярные заместители снижают активность. Аналогичную зависимость между структурой и активностью против насекомых и клещей наблюдают у авермектина В1: замена 4"-ОН-группы на 4"-эпиметиламиногруппу заметно усиливает действие на различных чешуекрылых, но снижает — на клещей (101, 102).

Мишени действия авермектинов и других 16-членных макроциклических лактонов — глутамат-зависимые каналы для хлорид-ионов (GluCl-каналы), широко распространенные у беспозвоночных (нематод, членистоногих — насекомых, клещей) в отличие от позвоночных животных. Эти каналы активируются наномолярными концентрациями лактонов. Необратимая активация GluCl-каналов приводит к гиперполяризации мембран, несовместимой с нервной проводимостью в нейромышечных синапсах, и вызывает сильный и стойкий паралич мышц глоточной системы, кожно-мышечного мешка и органов кладки яиц (103, 104). У беспозвоночных широко распространены родственные, хотя и эволюционно удаленные от GluCl-каналообразующих белков протеины GABA-рецепторов (подвид А) (*g*-butyric acid; ГАМК_А) (ГАМК_А-зависимые Cl⁻-каналы), которые также служат мишенями авермектинов (ГАМК — важнейший тормозный нейромедиатор в центральной нервной системе млекопитающих, включая человека). Однако авермектины безопасны для млекопитающих, так как не могут преодолеть гематоэнцефалический барьер и достичь ГАМК_А-чув-

ствительные С1-каналы в центральной нервной системе (105). Как известно, GluCl-каналы и GABA_A-рецепторы входят в семейство Cys-петлевых рецепторов, включающее также глициновые, никотиновые и серотониновые (5-HT₃) ионотропные рецепторы (101, 106, 107), с которыми авермектины и мильбемицины также взаимодействуют, проявляя, однако, меньшую аффинность. Обнаружено также взаимодействие ивермектина с рецептором P2X₄ (108).

Анализ чувствительности и устойчивости к ивермектину показал, что у паразитов резистентность к ивермектину связана с мутацией генов, детерминирующих синтез субъединиц GluCl (*glc-1*, *avr-14* и *avr-15*), и повышенной экспрессии генов Р-гликопротеина (109). Особая чувствительность собак породы колли к ивермектину и моксидоктину обусловлена мутацией гена *MDR1*, отвечающего за образование Р-гликопротеина — обязательного компонента гематоэнцефалического барьера, играющего важную роль в сохранении его целостности и предотвращении проникновения препарата в головной мозг. Мутация в гене этого белка приводит к проникновению лактонов через гематоэнцефалический барьер млекопитающих (110).

В ряду 16-членных макроциклических лактонов имеется определенная специфичность в формировании резистентности в зависимости от структуры соединения. Например, возможна перекрестная резистентность к ивермектину и дорамектину, но во многих случаях дорамектин проявляет высокую активность при резистентности к авермектинам (101). Обнаружено интересное явление (111): увеличение концентрации нейромедиатора ГАМК при кормлении паутиного клеща *Tetranychus cinnabarinus* экзогенным ГАМК или подавлении экспрессии гена ГАМК-трансаминазы (GABA-T) определяет резистентность подопытных особей вредителя к абамаектину. Другой интересный феномен, описанный совсем недавно, — факт прямого взаимодействия авермектинов с эпидермальным фактором роста (EGFR, epidermal growth factor receptor). Этот фактор активирует EGFR/АКТ/ERK-пути и индуцирует сверхэкспериссию Р-гликопротеина в утолщенных хитиновых слоях у личинок *Drosophila melanogaster* в резистентной популяции (112).

Полусинтетические авермектины. Часто вторичные метаболиты применяют в качестве действующего вещества после химической модификации с целью повышения биодоступности, качества, придания необходимых физико-химических свойств, снижения побочных эффектов и т.д. Так создаются наиболее эффективные аналоги природного родоначалника, в том числе 16-членные авермектины (2, 113-115).

С химической точки зрения авермектины можно представить как производных соответствующих компонентов мильбемицинового комплекса, полученных наращиванием последних 4- α -L-олеандрозил-L-олеандрозилокси-группой в положении С13 лактонного ядра. Рассмотрим примеры создания практически важных фармацевтических субстанций, а также перспективные направления, например получение 5-О-производных, разрабатываемое авторами настоящей работы с середины 1990-х годов.

Стратегия химической модификации определяется сведениями о биологической активности компонентов авермектинового и в какой-то мере мильбемицинового комплексов, обладающих противопаразитарной активностью. Примером могут служить данные о контактном действии производных авермектина В1 против половозрелых самок паутиного клеща (116). Так, смертность через 96 ч (при концентрации действующего вещества 0,05 ppm) составила для авермектина В1 (абамаектина), 8,9-эпоксидавермектина В1, 10,11-дигидроавермектина В1 и 10-фторо-10,11-дигид-

ровермектина В1 100 %, для 22,23-дигидроавермектина В1 (ивермектина) 92 %, 10-гидрокси-10,11-дигидроавермектина В1 — 72 %, 3,4-циклопропилавермектина В1 и 8,9-эпоксидмильбемицина (25-втор-бутила) — 20 %, 3,4,8,9,10,11,22,23-октагидроавермектина В1 — 18 %, 8,9-циклопропилавермектина В1 — 15 % и для 3,4,10,11,22,23-гексагидроавермектина В1 — 11 % (116). Получение производных авермектинов и мильбемицинов, имеющих практическое значение благодаря эффективности, антипаразитарному спектру и экологической безопасности, включают этапы микробиологического синтеза и химической модификации (1) (рис. 2, см. приложение на сайте <http://www.agrobiology.ru>). Нами ведутся исследования по оценке пригодности 5-О- и 5-С-производных авермектина В1, ивермектина и других авермектинов и мильбемицинов в качестве антипаразитарных субстанций (некоторые уже запатентованы) (117):

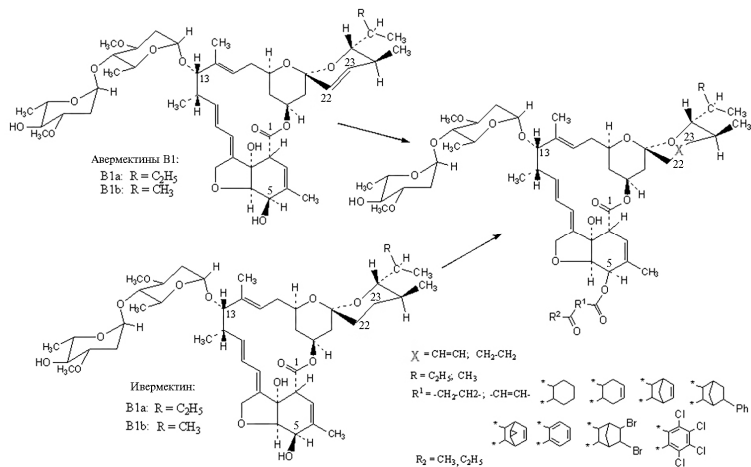


Рис. 2. Схема получения 5-О-производных авермектина В1 (22 и 23 — соответственно структурные единицы -CH₂- или =CH- в случае одинарной или двойной связи для X).

Также нами получена серия 5-О-, 5-О,4"-О- и 4"-О-ацилпроизводных и их эфиров, метилкарбаматов, натриевой соли 5-О-сульфата и ряда других (118-122). Установлено, что среди этих производных 5-О-сукциноилавермектин В1 (сумектин) и соединение под рабочим названием С2017 обладают выраженным антипаразитарным действием, и на их основе разработаны жидкие и твердые формы лекарственных препаратов для кожного и перорального применения (патенты РФ № 2629600, 2661615). Учеными других стран также предпринимаются попытки получить аналогичные соединения, в частности 5-оксимпроизводные и производное хитозана (123, 124). При сравнении антипаразитарных свойств сумектина, С2017 и абамектина на лабораторных мышах, зараженных нематодой *Aspicularis tetraptera*, мы показали, что при пероральном введении в дозе 0,25 мг/кг все субстанции обладают 100 % антигельминтной активностью, кроме того, С2017 (в отличие от абамектина и сумектина) проявляет также репеллентное действие (неопубликованные данные). Также установлено, что соединение С2017 превосходит абамектин по влиянию на связывание радиолиганда [G-³H]SR 95531 с мембранами, содержащими ГАМК_А-рецепторы коры мозга у крыс, повышая максимальное ингибирование специфического связывания I_{max} на 86 % (собственные неопубликованные данные).

Суммируя, можно констатировать, что натуральные и полусинтетические авермектины нашли широкое применение для лечения и профилактики нематодозов и арахноэнтомозов животных, человека и растений.

Наиболее часто применяются абамектин, ивермектин (1), дорамектин (2, 3), селамектин (2), бензоат авермектина В1 (4), эприномектин (1), а также близкие к ним мильбементин (смесь мильбемицинов $\alpha 3$ и $\alpha 4$) (1). На основе этих субстанций выпускаются многочисленные лекарственные ветеринарные и медицинские препараты под разными торговыми названиями для лечения онхоцеркоза, дерматитов и др. В последние годы в России активно патентуются кремы для лечения розацеи на основе ивермектина (125), мазей и жидких форм для лечения и профилактики арахноэнтомозов, на основе гемисукцината авермектина В1 и др., включая российские препараты для перорального применения (126-129), а также гранулы «ВЭИС приманки для тараканов» (для борьбы с синантропными насекомыми, Свидетельство № RU.77.99.88.002. E007964.09.14).

Итак, продуцируемые микроорганизмом *Streptomyces avermitilis* 16-членные макролиды (авермектины) и другие близкие к ним макроциклические лактоны обладают высокой нематоцидной и инсектоакарицидной активностью вследствие взаимодействия с глутаматзависимыми каналами для Ca^{2+} -ионов у беспозвоночных, а также в некоторой степени с GABA-зависимыми рецепторами из семейства цис-петлевых рецепторов. Исследования, ориентированные на разработку технологии полного химического синтеза авермектинов пока не дали существенных результатов из-за низкого выхода целевого продукта и сложности схемы синтеза. Благодаря химической модификации природных макролидов — авермектина В1 (продуцент *S. avermitilis*), мильбемицинов $\alpha 3/\alpha 4$ (*S. hygrosopicus* ssp. *aureolacrimosus*), немадектина (*S. hygrosopicus* ssp. *noncyanogenus*), других биосинтетических аналогов (например, дорамектина, продуцируемого мутантным штаммом *S. avermitilis* с дефектным геном дегидрогеназы разветвленных α -кетокислот) получены субстанции-аналоги для преимущественного применения в ветеринарии (ивермектин, эприномектин, селамектин, моксидектин), медицине (ивермектин), защите растений и урожай (абамектин, бензоат эмамектин, оксим мильбемина $\alpha 3/\alpha 4$), как перспективные рассматриваются соединения 5-О-сукциноилавермектин В1 и С2017.

ФГБОУ ВО Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии—
МВА им. К.И. Скрябина,
109472 Россия, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
e-mail: mxdl23@mail.ru ✉, niacid@yandex.ru, rector@mgavm.ru

Поступила в редакцию
22 ноября 2018 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2019, V. 54, № 2, pp. 199-215

PRODUCTION OF AVERMECTINS: BIOTECHNOLOGIES AND ORGANIC SYNTHESIS (review)

M.Kh. Dzhabfarov, F.I. Vasilevich, M.N. Mirzaev

Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, ul. Akademika K.I. Skryabina, Moscow, 109472 Russia, e-mail mxdl23@mail.ru (✉corresponding author), niacid@yandex.ru; rector@mgavm.ru

ORCID:

Dzhabfarov M.Kh. orcid.org/0000-0001-6170-4165

Mirzaev M.N. orcid.org/0000-0002-7093-1711

Vasilevich F.I. orcid.org/0000-0003-0786-5317

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation (Agreement No. 15-16-00019)

Received November 22, 2018

doi: 10.15389/agrobiol.2019.2.199eng

Abstract

The proposed review analyzes the results of research on various aspects of improving the technology of obtaining avermectins, the 16-membered macrocyclic lactones which have a wide

spectrum of antiparasitic action with a high therapeutic index and harmlessness for mammals (W.C. Campbell, 2012). According to published data, the unique ability of avermectins to suppress the development of insects, nematodes and ticks is associated with the ability to block the transmission of nerve impulses in the neuromuscular synapse. The essence of this mechanism of action, leading to paralysis and death of parasites, is to stimulate the release of chlorine ions, depolarization of the cell membrane and pathological disorders of its functions (A.J. Wolstenholme et al., 2016). Of the known 8 components (A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a and B2b) of the avermectin complex produced by the microorganism *Streptomyces avermitilis*, the avermectin B1 is the most active against parasite pathogens (S. Omura, 2002; W.C. Campbell, 2012). Therefore, the main studies on the production of avermectins are associated with the selection of highly productive strains which predominantly synthesize avermectins B1 (S.S. Ki et al., 2005; H. Gao et al., 2010; W. Liu et al., 2015; L. Meng et al., 2016), and the preparation of semi-synthetic analogs of avermectins B1 with improved physicochemical and pharmacological properties (J. Vercruyse et al., 2001; A. Awasthi et al., 2012). Attempts to develop a technology for the complete chemical synthesis of avermectins have not yet yielded significant results due to the low yield of the target product and the complexity of the synthesis scheme (S. Yamashita et al., 2016). Considerable attention has been paid to the biochemical aspects of the diversity of 16-membered macrocyclic lactones and their producers, as well as to semisynthetic analogues, and prospects for searching for new highly efficient and environmentally friendly semisynthetic analogues of avermectin B1 have been defined. Main streams of researches on genetics, biochemistry and physiology of the producer of avermectins, ways of regulated culture of *S. avermitilis* strains and biosynthesis of required components of avermectin complex are discussed (S. Kitani et al., 2009; J. Guo et al., 2018). The data on the problem of emerging resistance in some species of parasites to long-used avermectin-containing drugs are analyzed. This phenomenon is shown to have a multifactor nature, including mutation of genes determining GluCl subunits and increased P-glycoprotein expression (J.H. Gill et al, 1998; R.K.Prichard, 2007; F.D. Guerrero et al., 2012; P.C. Pohl et al., 2014; P. Godoy et al, 2016). For the successful control of nematodes, insects and mites of agricultural, sanitary and medical importance, it seems appropriate to create drugs based on natural avermectins and their new semi-synthetic derivatives, for example, 5-O-succinylavermectin B1 and C2017 compounds.

Keywords: avermectins, milbemycins, nemadectins, doramectin, abamectin, moxidectin, ivermectin, moxidectin, milbemycin oxime, 5-O-succinylavermectin B1, compound C2017, avermectin oximes, *Streptomyces avermitilis*, organic synthesis, antiparasitic drugs, nematocides, insectoacaricides.

REFERENCES

1. *Macrolide antibiotics. Chemistry, biology and practice*. 2nd ed. S. Omura (ed.). Elsevier Science, NY, 2002.
2. Campbell W.C. History of avermectin and ivermectin, with notes on the history of other macrocyclic lactone antiparasitic agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2012, 13(6): 853-865 (doi: 10.2174/138920112800399095).
3. Omura S. Ivermectin: 25 years and still going strong. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2008, 31(2): 91-98 (doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.08.023).
4. Crump A., Omura S. Ivermectin, 'Wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 2011, 87(2): 13-28 (doi: 10.2183/pjab.87.13).
5. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 13th ed. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, B.C. Knollman (eds.). McGraw Hill Medical, NY, 2018.
6. Safiullin R.T. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*, 2006, 2: 6-8 (in Russ.).
7. Dolzhenko T.V. *Agrokhimiya*, 2017, 4: 34-40 (in Russ.).
8. Kitani S., Miyamoto K.T., Takamatsu S., Herawati E., Iguchi H., Nishitomi K., Uchida M., Nagamitsu T., Omura S., Ikeda H., Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108: 16410-16415 (doi: 10.1073/pnas.1113908108).
9. Corey E.J., Czako B., Kurti L. *Molecules and medicine*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2007.
10. *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*. J. Vercruyse, R.S. Rew (eds.). Wallingford, CABI Publishing, NY, 2002.
11. Lynagh T., Lynch J.W. Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. *Front. Mol. Neurosci.*, 2012, 5: 60 (doi: 10.3389/fnmol.2012.00060).
12. Chen I.S., Kubo Y. Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. *J. Physiol.*, 2018, 596(10): 1833-1845 (doi: 10.1113/JP275236).
13. Chen I.S., Tateyama M., Fukata Y., Uesugi M., Kubo Y. Ivermectin activates GIRK channels in a PIP2-dependent, G β -independent manner and an amino acid residue at the slide helix governs the activation. *J. Physiol.*, 2017, 595(17): 5895-5912 (doi: 10.1113/JP274871).
14. Hashimoto H., Messerli S.M., Sudo T., Maruta H. Ivermectin inactivates the kinase PAK1 and

- blocks the PAK1-dependent growth of human ovarian cancer and NF2 tumor cell lines. *Drug Discov. Ther.*, 2009, 3(6): 243-246.
15. Gallardo F., Mariamé B., Gence R., Tilkin-Mariamé A.F. Macrocyclic lactones inhibit nasopharyngeal carcinoma cells proliferation through PAK1 inhibition and reduce in vivo tumor growth. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2018, 12: 2805-2814 (doi: 10.2147/DDDT.S172538).
 16. Melotti A., Mas C., Kuciak M., Lorente-Trigos A., Borges I., Altaba A.R. The river blindness drug Ivermectin and related macrocyclic lactones inhibit WNT-TCF pathway responses in human cancer. *EMBO Molecular Medicine*, 2014, 6(10): 1263-1278 (doi: 10.15252/emmm.201404084).
 17. Drinyayev V.A., Mosin V.A., Kruglyak E.B., Novik T.S., Sterlina T.S., Ermakova N.V., Kublik L.N., Levitman M.Kh., Shaposhnikova V.V., Korystov Y.N. Antitumor effect of avermectins. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004, 501(1-3): 19-23 (doi: 10.1016/j.ejphar.2004.08.009).
 18. Kwon Y.J., Petrie K., Leibovitch B.A., Zeng L., Mezei M., Howell L., Gil V., Christova R., Bansal N., Yang S., Sharma R., Ariztia E.V., Frankum J., Brough R., Sbirkov Y., Ashworth A., Lord C.J., Zelent A., Farias E., Zhou M.M., Waxman S. Selective inhibition of SIN3 corepressor with avermectins as a novel therapeutic strategy in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2015, 14(8): 1824-1836 (doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0980-T).
 19. Juarez M., Schcolnik-Cabrera A., Duecas-Gonzalez A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. *Am. J. Cancer. Res.*, 2018, 8(2): 317-331 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29511601>).
 20. Mastrangelo E., Pezzullo M., De Burghgraeve T., Kaptein S., Pastorino B., Dallmeier K., de Lamballerie X., Neyts J., Hanson A. M., Frick D.N., Bolognesi M., Milani M. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, 67(8): 1884-1894 (doi: 10.1093/jac/dks147).
 21. Kobylinski K.C., Foy B.D., Richardson J.H. Ivermectin inhibits the sporogony of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 2012, 11: 381 (doi: 10.1186/1475-2875-11-381).
 22. Lim L.E., Vilchère C., Ng C., Jacobs W.R. Jr., Ramyn-García S., Thompson C.J. Anthelmintic avermectins kill *M. tuberculosis*, including multidrug resistant clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, 57(2): 1040-1046 (doi: 10.1128/AAC.01696-12).
 23. Khoja S., Huynh N., Warnecke A.M.P., Asatryan L., Jakowec M.W., Davies D.L. Preclinical evaluation of avermectins as novel therapeutic agents for alcohol use disorders. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2018, 235(6): 1697-1709 (doi: 10.1007/s00213-018-4869-9).
 24. Zabala A., Vazquez-Villoldo N., Rissiek B., Gejo J., Martin A., Palomino A., Perez-Samartín A., Pulagam K.R., Lukowiak M., Capetillo-Zarate E., Llop J., Magnus T., Koch-Nolte F., Ras-sendren F., Matute C., Domercq M. P2X4 receptor controls microglia activation and favors remyelination in autoimmune encephalitis. *EMBO Mol. Med.*, 2018, 10(8): e8743 (doi: 10.15252/emmm.201708743).
 25. Di Virgilio F., Sarti A.C. Microglia P2X4 receptors as pharmacological targets for demyelinating diseases. *EMBO Mol. Med.*, 2018, 10(8): e9369 (doi: 10.15252/emmm.201809369).
 26. Davies D.L., Bortolato M., Finn D.A., Ramaker M.J., Barak S., Ron D., Liang J., Olsen R.W. Recent advances in the discovery and preclinical testing of novel compounds for the prevention and/or treatment of alcohol use disorders. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2013, 37(1): 8-15 (doi: 10.1111/j.1530-0277.2012.01846.x).
 27. Pasqualetto G., Brancale A., Young M.T. The Molecular determinants of small-molecule ligand binding at P2X receptors. *Front. Pharmacol.*, 2018, 9: 58 (doi: 10.3389/fphar.2018.00058).
 28. Van Voorhis W.C. Profile of William C. Campbell, Satoshi Omura, and Youyou Tu, 2015 Nobel Laureates in Physiology or Medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112(52): 15773-15776 (doi: 10.1073/pnas.1520952112).
 29. Wang S.-Y., Bo Y.-H., Zhou X., Chen J.H., Li W.J., Liang J.P., Xiao G.Q., Wang Y.C., Liu J., Hu W., Jiang B.L. Significance of heavy-ion beam irradiation-induced avermectin B1a production by engineered *Streptomyces avermitilis*. *BioMed. Research. Int.*, 2017, 2017: 5373262 (doi: 10.1155/2017/5373262).
 30. Awasthi A., Razzak M., Al-Kassas R., Harvey J., Garg S. An overview on chemical derivatization and stability aspects of selected avermectin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.*, 2012, 60(8): 931-944 (doi: 10.1248/cpb.c12-00258).
 31. Cummings M., Breittling R., Takano E. Steps towards the synthetic biology of polyketide biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2014, 351: 116-125 (doi: 10.1111/1574-6968.12365).
 32. Zhuo Y., Zhang T., Wang Q., Cruz-Morales P., Zhang B., Liu M., Barona-Gymez F., Zhang L. Synthetic biology of avermectin for production improvement and structure diversification. *Biotechnol. J.*, 2014, 9(3): 316-325 (doi: 10.1002/biot.201200383).
 33. Thuan N.H., Pandey R.P., Sohng J.K. Recent advances in biochemistry and biotechnological synthesis of avermectins and their derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(18): 7747-7759 (doi: 10.1007/s00253-014-5926-x).
 34. Alper H.S., Avalos J.L. Metabolic pathway engineering. *Synth. Syst. Biotechnol.*, 2018, 3(1): 1-2 (doi: 10.1016/j.synbio.2018.01.002).
 35. Brady P.B., Oda S., Yamamoto H. Stereodivergent approach to the avermectins based on "Super

- Silyl" directed aldol reactions. *Org. Lett.*, 2014, 16(15): 3864-3867 (doi: 10.1021/ol501327g).
36. Hiram M. Total synthesis and related studies of large, strained, and bioactive natural products. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, 2016, 92(8): 290-329 (doi: 10.2183/pjab.92.290).
 37. Yamashita S., Hayashi D., Nakano A., Hayashi Y., Hiram M. Total synthesis of avermectin B1a revisited. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2016, 69(1): 31-50 (doi: 10.1038/ja.2015.47).
 38. Pitterna T., Cassayre J. Hüter O.F., Jung P.M., Maiefisch P., Kessabi F.M., Quaranta L., Töbler H. New ventures in the chemistry of avermectins. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17(12): 4085-4095 (doi: 10.1016/j.bmc.2008.12.069).
 39. Bennett C.S., Galan M.C. Methods for 2-deoxyglycoside synthesis. *Chem. Rev.*, 2018, 118(17): 7931-7985 (doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00731).
 40. Kim S.B., Goodfellow M. *Streptomyces avermitilis* sp. nov., nom. rev., a taxonomic home for the avermectin-producing streptomycetes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2002, 52(Pt 6): 2011-2014 (doi: 10.1099/00207713-52-6-2011).
 41. Wu L., Sun Q., Sugawara H., Yang S., Zhou Y., McCluskey K., Vasilenko A., Suzuki K., Ohkuma M., Lee Y., Robert V., Ingriswang S., Guissart F., Philippe D., Ma J. Global catalogue of microorganisms (gcm): a comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources. *BMC Genomics*, 2013, 14: 933 (doi: 10.1186/1471-2164-14-933).
 42. Chermenskii D.N., Adanin V.A., Drinyaev V.A., Kovalev V.N., Golovleva L.A. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1991, 6: 838-844 (in Russ.).
 43. Drinyaev V.A., Sterlina T.S., Berezkina N.E., Mosin V.A., Kruglyak E.B., Espipov S.E., Kobrin M.B., Yurkiv V.A. *Biotechnologiya*, 1993, 11-12: 21-25 (in Russ.).
 44. Ki S.S., Jeong Y.-S., Kim P.-H., Chun G.-T. Effects of dissolved oxygen level on avermectin B1a production by *Streptomyces avermitilis* in computer-controlled bioreactor cultures. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, 16(11): 1690-1698.
 45. Gao H., Liu M., Zhou X., Liu J., Zhuo Y., Gou Z., Xu B., Zhang W., Liu X., Luo A., Zheng C., Chen X., Zhang L. Identification of avermectin-high-producing strains by high throughput screening methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 85(4): 219-225 (doi: 10.1007/s00253-009-2345-5).
 46. Chen J., Liu M., Liu X., Miao J., Fu C., Gao H., Müller R., Zhang Q., Zhang L. Interrogation of *Streptomyces avermitilis* for efficient production of avermectins. *Synth. Syst. Biotechnol.*, 2016, 1(1): 7-16 (doi: 10.1016/j.synbio.2016.03.002).
 47. Meng L., Xiong Z., Chu J., Wang Y. Enhanced production of avermectin by deletion of type III polyketide synthases biosynthetic cluster rpp in *Streptomyces avermitilis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2016, 63(5): 384-390 (doi: 10.1111/lam.12635).
 48. Drinyaev V.A., Sterlina T.S., Berezkina N.E., Mosin V.A., Kruglyak E.B., Zinov'ev O.A., Yurkiv V.A. *Biokhimiya*, 1994, 12: 16-18 (in Russ.).
 49. Drinyaev V.A., Sterlina T.e., Berezkina N.E., Mosin V.A., Kruglyak E.B., Zinov'ev O.A., Yurkiv V.A. *Biokhimiya*, 1994, 4: 17-20 (in Russ.).
 50. Belyavskaya L.A., Kozyritskaya V.E., Valagurova E.V., Iutinskaya G.A. *Mikrobiologicheskii zhurnal*, 2012, 74(3): 10-15 (in Russ.).
 51. Adamovich O.T., Kolomiets E.I. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Perspektivy i problemy razvitiya biotekhnologii v ramkakh edinogo ekonomicheskogo prostranstva stran sodruzhestva, 25-28 maya 2005 g. Minsk—Naroch»* [Proc. Int. Conf. «Prospects and challenges of biotechnologies within common economic space of Commonwealth countries, May 25-28, 2005 Minsk-Naroch»]. Minsk, 2005: 6-7 (in Russ.).
 52. Biliavska L., Kozyrits'ka V., Valaghurova H., Iutynska G. Effect of pyruvate and valine on avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* UCM As-2179. *Mikrobiologicheskii zhurnal*, 2007, 69(4): 10-17 (in Russ.).
 53. Mirzaev M.N., Sherstnev V.V., Buyantogtokh Ch. *Biokhimiya*, 2004, 3: 75-77 (in Russ.).
 54. Kodym A., Afza R. Physical and chemical mutagenesis. *Methods Mol. Biol.*, 2003, 236: 189-204 (doi: 10.1385/1-59259-413-1:189).
 55. Wang L.Y., Huang Z.L., Li G., Zhao H.X., Xing X.H., Sun W.T., Li H.P., Gou Z.X., Bao C.Y. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma. *J. Appl. Microbiol.*, 2010, 108(3): 851-858 (doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04483.x).
 56. Savchenkov S.N., Mirzaev M.N., Devrshov D.A. *Biokhimiya*, 1997, 3: 35-38 (in Russ.).
 57. Ikeda H., Kotaki H., Tanaka H., Omura S. Involvement of glucose catabolism in avermectin production by *Streptomyces avermitilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, 32(2): 282-284.
 58. Cao P., Hu D., Zhang J., Zhang B., Gao Q. Enhanced avermectin production by rational feeding strategies based on comparative metabolomics. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2017, 57(2): 281-292.
 59. Tian P., Cao P., Hu D., Wang D., Zhang J., Wang L., Zhu Y., Gao Q. Comparative metabolomics reveals the mechanism of avermectin production enhancement by S-adenosylmethionine. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, 44(4-5): 595-604 (doi: 10.1007/s10295-016-1883-y).
 60. Schulman M.D., Valentino D., Streicher S., Ruby C. *Streptomyces avermitilis* mutants defective in

- methylation of avermectins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, 31(5): 744-749 (doi: 10.1128/AAC.31.5.744).
61. Yin P., Li Y.Y., Zhou J., Wang Y.H., Zhang S.L., Ye B.C., Ge W.F., Xia Y.L. Direct proteomic mapping of *Streptomyces avermitilis* wild and industrial strain and insights into avermectin production. *J. Proteomics*, 2013, 79: 1-12 (doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.012).
 62. Mironov V.A., Sergeeva A.B., Voronkova V.V., Danilenko V.N. *Antibiotiki i khimioterapiya*, 1997, 42(3): 31-36 (in Russ.).
 63. Mironov V.A., Sergeeva A.V., Gavrilina A.V., Danilenko V.N. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2003, 2: 208-212 (in Russ.).
 64. Yoon Y.J., Kim E.-S., Hwang Y.-S., Choi C.-Y. Avermectin biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, 63(6): 626-634 (doi: 10.1007/s00253-003-1491-4).
 65. Davydova E.M., Drinyaev V.A., Kruglyak E.B., Kantere V.M. *Biokhimiya*, 2000, 6: 66-74 (in Russ.).
 66. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21(5): 526-531 (doi: 10.1038/nbt820).
 67. Ikeda H., Kazuo S.Y., Omura S. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 41(2): 233-250 (doi: 10.1007/s10295-013-1327-x).
 68. Fischbach M.A., Walsh C.T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.*, 2006, 106(8): 3468-3496 (doi: 10.1021/cr0503097).
 69. Dutta S., Whicher J.R., Hansen D.A., Hale W.A., Chemler J.A., Congdon G.R., Narayan A.R., Hekansson K., Sherman D.H., Smith J.L., Skiniotis G. Structure of a modular polyketide synthase. *Nature*, 2014, 510(7506): 512-517 (doi: 10.1038/nature13423).
 70. Kwan D.H., Schulz F. The stereochemistry of complex polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases. *Molecules*, 2011, 16(7): 6092-6115 (doi: 10.3390/molecules16076092).
 71. Bayly C.L., Yadav V.G. Towards precision engineering of canonical polyketide synthase domains: recent advances and future prospects. *Molecules*, 2017, 22(2): 235 (doi: 10.3390/molecules22020235).
 72. Zhang W., Liu J. Recent advances in understanding and engineering polyketide synthesis. *F1000Research*, 2016, 5(F1000 Faculty Rev): 208 (doi: 10.12688/f1000research.7326.1).
 73. Yuzawa S., Backman T.W.H., Keasling J.D., Katz L. Synthetic biology of polyketide synthases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, 45(7): 621-633 (doi: 10.1007/s10295-018-2021-9).
 74. Smith J.L., Skiniotis G., Sherman D.H. Architecture of the polyketide synthase module: surprises from electron cryo-microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2015, (31): 9-19 (doi: 10.1016/j.sbi.2015.02.014).
 75. Klaus M., Grininger M. Engineering strategies for rational polyketide synthase design. *Nat. Prod. Rep.*, 2018, 35(10): 1070-1081 (doi: 10.1039/c8np00030a).
 76. Wang F., Wang Y., Ji J., Zhou Z., Yu J., Zhu H., Su Z., Zhang L., Zheng J. Structural and functional analysis of the loading acyltransferase from avermectin modular polyketide synthase. *ACS Chem. Biol.*, 2015, 10(4): 1017-1025 (doi: 10.1021/cb500873k).
 77. Sun P., Zhao Q., Yu F., Zhang H., Wu Z., Wang Y., Wang Y., Zhang Q., Liu W. Spiroketal formation and modification in avermectin biosynthesis involves a dual activity of AveC. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135(4): 1540-1548 (doi: 10.1021/ja311339u).
 78. Tang M.C., Zou Y., Watanabe K., Walsh C.T., Tang Y. Oxidative cyclization in natural product biosynthesis. *Chem. Rev.*, 2017, 117(8): 5226-5333 (doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00478).
 79. Kim M.S., Cho W.J., Song M.C., Park S.W., Kim K., Kim E., Lee N., Nam S.J., Oh K.H., Yoon Y.J. Engineered biosynthesis of milbemycins in the avermectin high-producing strain *Streptomyces avermitilis*. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16: 9 (doi: 10.1186/s12934-017-0626-8).
 80. Nonaka K., Tsukiyama T., Okamoto Y., Sato K., Kumasaka C., Yamamoto T., Maruyama F., Yoshikawa H. New milbemycins from *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*: fermentation, isolation and structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2000, 53(7): 694-704.
 81. He H., Ye L., Li C., Wang H., Guo X., Wang X., Zhang Y., Xiang W. SbbR/SbbA, an important ArpA/AfsA-like system, regulates milbemycin production in *Streptomyces bingchenggensis*. *Front. Microbiol.*, 2018, 9: 1064 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01064 2018).
 82. van Wezel G.P., McDowall K.J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28(7): 1311-1333 (doi: 10.1039/c1np00003a).
 83. Sun D., Wang Q., Chen Z., Li J., Wen Y. An Alternative Factor, σ_8 , controls avermectin production and multiple stress responses in *Streptomyces avermitilis*. *Front. Microbiol.*, 2017, 8: 736 (doi: 10.3389/fmicb.2017.00736).
 84. McCormick J.R., Flårdh K. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012, 36(1): 206-231 (doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00317.x)

85. Kitani S., Ikeda H., Sakamoto T., Noguchi S., Nihira T. Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 82(6): 1089–1096 (doi: 10.1007/s00253-008-1850-2).
86. Guo J., Zhao J., Li L., Chen Z., Wen Y., Li J. The pathway-specific regulator AveR from *Streptomyces avermitilis* positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis. *Mol. Genet. Genomics*, 2010, 283(2): 123–133 (doi: 10.1007/s00438-009-0502-2).
87. Liu W., Zhang Q., Guo J., Chen Z., Li J., Wen Y. Increasing avermectin production in *Streptomyces avermitilis* by manipulating the expression of a novel TetR-family regulator and its target gene product. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015, 81(15): 5157–5173 (doi: 10.1128/AEM.00868-15).
88. Guo J., Zhang X., Lu X., Liu W., Chen Z., Li J., Deng L., Wen Y. SAV4189, a MarR-family regulator in *Streptomyces avermitilis*, activates avermectin biosynthesis. *Front. Microbiol.*, 2018, 9: 1358 (doi: 10.3389/fmicb.2018.01358).
89. Sun Y., Zhou X., Liu J., Bao K., Zhang G., Tu G., Kieser T., Deng Z. *Streptomyces nanchangensis*, a producer of the insecticidal polyether antibiotic nanchangmycin and the antiparasitic macrocyclic meilingmycin, contains multiple polyketide gene clusters. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 2): 361–371 (doi: 10.1099/00221287-148-2-361).
90. Yang L.Y., Wang J.D., Zhang J., Xue C.Y., Zhang H., Wang X.J., Xiang W.S. New nemadectin congeners with acaricidal and nematocidal activity from *Streptomyces microflavus* neu3 Y-3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, 23(20): 5710–5713 (doi: 10.1016/j.bmcl.2013.08.002).
91. Gao C., Wang Y., Chen Y., He B., Zhang R., Xu M., Huang R. Two new avermectin derivatives from the Beibu Gulf gorgonian *Anthogorgia caerulea*. *Chem. Biodivers.*, 2014, 11(5): 812–818 (doi: 10.1002/cbdv.201300265).
92. Wong F.T., Khosla C. Combinatorial biosynthesis of polyketides – a perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2012, 16(1–2): 117–123 (doi: 10.1016/j.cbpa.2012.01.018).
93. Cane D.E. Nature as organic chemist. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 2016, 69(7): 473–485 (doi: 10.1038/ja.2016.55).
94. Blakemore D.C., Castro L., Churcher I., Rees D.C., Thomas A.W., Wilson D.M., Wood A. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nat. Chem.*, 2018, 10(4): 383–394 (doi: 10.1038/s41557-018-0021-z).
95. Zhang J., Yan Y.J., An J., Huang S.X., Wang X.J., Xiang W.S. Designed biosynthesis of 25-methyl and 25-ethyl ivermectin with enhanced insecticidal activity by domain swap of avermectin polyketide synthase. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 152 (doi: 10.1186/s12934-015-0337-y).
96. Zhao X., Wang Y., Wang S., Chen Z., Wen Y., Song Y. Construction of a doramectin producer mutant from an avermectin-overproducing industrial strain of *Streptomyces avermitilis*. *Can. J. Microbiol.*, 2009, 55(12): 1355–1363 (doi: 10.1139/W09-098).
97. Deng Q., Zhou L., Luo M., Deng Z., Zhao C. Heterologous expression of avermectins biosynthetic gene cluster by construction of a bacterial artificial chromosome library of the producers. *Synth. Syst. Biotechnol.*, 2017, 2(1): 59–64 (doi: 10.1016/j.synbio.2017.03.001).
98. Wang X.J., Zhang J., Wang J.D., Huang S.X., Chen Y.H., Liu C.X., Xiang W.S. Four new doramectin congeners with acaricidal and insecticidal activity from *Streptomyces avermitilis* NEAU1069. *Chem. Biodivers.*, 2011, 8(11): 2117–2125 (doi: 10.1002/cbdv.201000295).
99. Wang J.B., Pan H.X., Tang G.L. Production of doramectin by rational engineering of the avermectin biosynthetic pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, 21(11): 3320–3323 (doi: 10.1016/j.bmcl.2011.04.008).
100. Wolstenholme A.J., Maclean M.J., Coates R., McCoy C.J., Reaves B.J. How do the macrocyclic lactones kill filarial nematode larvae? *Invert. Neurosci.*, 2016, 16(3): 7 (doi: 10.1007/s10158-016-0190-7).
101. Prichard R., Ménez C., Lespine A. Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, 2012, 2: 134–153 (doi: 10.1016/j.ijpddr.2012.04.001).
102. Mounsey K.E., Walton S.F., Innes A., Cash-Deans S., McCarthy J. In vitro efficacy of moxidectin versus ivermectin against *Sarcoptes scabiei*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, 61(8): e00381-17 (doi: 10.1128/AAC.00381-17).
103. Raymond V., Sattelle D.B. Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2002, 1(6): 427–436 (doi: 10.1038/nrd821).
104. Wolstenholme A.J., Rogers A.T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 2005, 131 Suppl: S85–95 (doi:10.1074/jbc.R112.406280).
105. Estrada-Mondragon A., Lynch J.W. Functional characterization of ivermectin binding sites in $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA(A) receptors. *Front. Mol. Neurosci.*, 2015, 8: 55 (doi: 10.3389/fnfmol.2015.00055).
106. Wolstenholme A.J. Glutamate-gated chloride channels. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287(48): 40232–40238 (doi: 10.1074/jbc.R112.406280).
107. Degani-Katzav N., Gortler R., Weissman M., Paas Y. Mutational analysis at intersubunit interfaces of an anionic glutamate receptor reveals a key interaction important for channel gating by ivermectin. *Front. Mol. Neurosci.*, 2017, 10: 92 (doi: 10.3389/fnfmol.2017.00092).
108. Stokes L., Layhadi J.A., Bibic L., Dhuna K., Fountain S.J. P2X4 receptor function in the nervous

- system and current breakthroughs in pharmacology. *Front. Pharmacol.*, 2017, 8: Article 291 (doi: 10.3389/fphar.2017.00291).
109. Godoy P., Che H., Beech R.N., Prichard R.K. Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*, 2016, 9: 52 (doi: 10.1186/s13071-016-1317-8).
 110. Mealey K.L., Bentjen S.A., Gay J.M., Cantor G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, 2001, 11(8): 727-733 (doi: 10.1097/00008571-200111000-00012).
 111. Xin-Jun Z., Wen-Cai L., Ya-Ning F., Lin H. High γ -aminobutyric acid content, a novel component associated with resistance to abamectin in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *J. Insect. Physiol.*, 2010, 56(12): 1895-1900 (doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.08.011).
 112. Chen L.-P., Wang P., Sun Y.-J., Wu Y.-J. Direct interaction of avermectin with epidermal growth factor receptor mediates the penetration resistance in *Drosophila larvae*. *Open Biol.*, 2016, 6(4): 150231 (doi: 10.1098/rsob.150231).
 113. Driggers E.M., Hale S.P., Lee J., Terrett N.K. The exploration of macrocycles for drug discovery — an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, 7(7): 608-624 (doi: 10.1038/nrd2590).
 114. Wessjohann L.A., Ruijter E., Garcia-Rivera D., Brandt W. What can a chemist learn from nature's macrocycles? — A brief conceptual view. *Mol. Divers.*, 2005, 9(1-3): 171-186 (doi: 10.1007/s11030-005-1314-x).
 115. Yudin A.K. Macrocycles: lessons from the distant past, recent developments, and future directions. *Chem. Sci.*, 2015, 6(1): 30-49 (doi: 10.1039/c4sc03089c).
 116. Fisher M.H. Recent advances in avermectin research. *Pure App. Chem.*, 1990, 62(7): 1231-1240 (doi: 10.1351/pac199062071231).
 117. Dzhafarov M.Kh. Evolution in chemotherapy of human and animal helminthiases (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2013, 4: 26-44 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.4.26eng).
 118. Chernoburova E.I., Danchenko K.V., Shchetinina M.A., Zharov A.A., Kolobov A.V., Dzhafarov M.Kh., Vasilevich F.I., Zavarzin I.V. Synthesis of 5,4-di-O-succinoylivermectin B1. *Russ. Chem. Bull.*, 2016, 65(12): 2952-2955 (doi: 10.1007/s11172-016-1684-5).
 119. Chernoburova E.I., Polyukhova E.S., Shchetinina M.A., Kolobov A.V., Dzhafarov M.Kh., Vasilevich F.I., Zavarzin I.V. Synthesis of esters of bile acids and avermectin B. *Russ. Chem. Bull.*, 2016, 65(12): 2956-2964 (doi: 10.1007/s11172-016-1685-4).
 120. Chernoburova E.I., Lishchuk V.A., Ovchinnikov K.L., Kolobov A.V., Dzhafarov M.Kh., Vasilevich F.I., Zavarzin I.V. Reaction of 5-O-succinoylivermectin B1 with alkylating agents. *Russ. Chem. Bull.*, 2016, 65(12): 2965-2969 (doi: 10.1007/s11172-016-1686-3).
 121. Blinnikov A.N., Chernoburova E.I., Kolotyrkina N.G., Shchetinina M.A., Lishchuk V.A., Ovchinnikov K.L., Kolobov A.V., Dzhafarov M.Kh., Vasilevich F.I., Zavarzin I.V. Synthesis of ivermectin-4",5-diy[bis(N-methylcarbamate)]. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, 67(5): 833-835 (doi: 10.1007/s11172-018-2145-0).
 122. Shchetinina M.A., Chernoburova E.I., Kolotyrkina N.G., Dzhafarov M.Kh., Vasilevich F.I., Zavarzin I.V. Synthesis of sodium 5-sulfate-ivermectin and disodium 4,5-disulfate-ivermectin. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, 67(5): 836-839 (doi: 10.1007/s11172-018-2146-z).
 123. Zeng X., Tian X., Hong X., Yu Y., Deng Z., Zhao C. *Patent CN 103833811 A. Abamectin derivative and preparation method thereof*. Appl. 2014. Publ. 2014.
 124. Li Y., Qin Y., Liu S., Xing R., Yu H., Li K., Li P. Preparation, characterization, and insecticidal activity of avermectin-grafted-carboxymethyl chitosan. *Biomed. Res. Int.*, 2016, 2016: 9805675 (doi: 10.1155/2016/9805675).
 125. Del Rosso D. *Vestnik dermatologii i venerologii*, 2016, 2: 21-31 (doi: 10.25208/0042-4609-2016-0-2-21-31) (in Russ.).
 126. Dzhafarov M.Kh., Shemyakova S.A., Mirzaev M.N., Esaulova N.V., Vasilevich F.I. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*, 2017, 3: 25-28 (in Russ.).
 127. Dzhafarov M.Kh., Mirzaeva K.M., Vasilevich F.I., Mirzaev M.N., Mel'nitskaya T.I. *Metodicheskie polozheniya po primeneniyu preparata Gemaks (Sumektin) pri strongilyatozakh zheludochno-kishechnogo trakta ovets* [Guidelines for the use of drug Gemax (Sumectin) to control strongylosis of the gastrointestinal tract of sheep]. Moscow, 2018 (in Russ.).
 128. Mirzaeva K.M., Zemtsova L.K., Mirzaev M.N., Dzhafarov M.Kh., Mel'nitskaya T.I., Yusufov Yu.A. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya*, 2017, 2: 16-21 (in Russ.).
 129. Zemtsova L.K., Mirzaev M.N., Dzhafarov M.Kh., Mirzaeva K.M. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya*, 2017, 3: 73-78 (in Russ.).