



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 655 109 A5

⑤① Int. Cl.⁴: C 07 D 309/36
C 12 P 17/06
A 61 K 31/35

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// (C 12 P 17/06, C 12 R 1:465)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳① Gesuchsnummer: 1882/83

⑳② Anmeldungsdatum: 07.04.1983

⑳③ Priorität(en): 07.04.1982 JP 57-57790
18.06.1982 JP 57-104899
31.08.1982 JP 57-151496

⑳④ Patent erteilt: 27.03.1986

⑳⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 27.03.1986

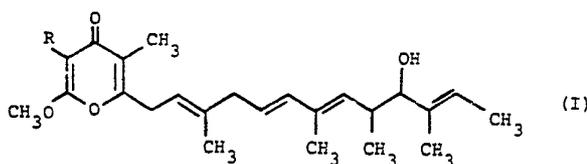
⑳⑦ Inhaber:
SS-Pharmaceutical Co., Ltd., Chuo-ku/Tokyo
(JP)

⑳⑦② Erfinder:
Oono, Junji, Narita-shi/Chiba-ken (JP)
Yano, Kenichi, Chiba-shi/Chiba-ken (JP)
Sato, Junichi, Narashino-shi/Chiba-ken (JP)
Kouda, Tadayuki, Narita-shi/Chiba-ken (JP)
Ogawa, Yoichiro, Chiba-shi/Chiba-ken (JP)
Yokoi, Kouichi, Kashiwa-shi/Chiba-ken (JP)
Nakashima, Toshiaki, Inba-gun/Chiba-ken (JP)

⑳⑦④ Vertreter:
Bovard AG, Bern 25

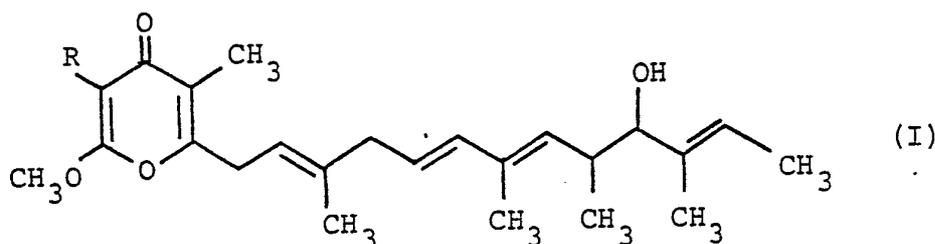
⑵④ Physiologisch aktive Substanzen SS 12538, Verfahren zu deren Herstellung und neuer, diese Substanzen produzierender Mikroorganismus.

⑵⑦ Die neue, physiologisch aktive Substanz SS 12538 entspricht der Formel I, worin R Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet. Die Herstellung dieser Substanz erfolgt durch Impfen eines Nährstoffe enthaltenden Mediums mit dem neuen, zum Genus Streptomyces gehörenden Stamm FERM BP-265 des zur Produktion der Substanz SS 12538 befähigten Mikroorganismus und Züchtung der erhaltenen Kulturbrühe, vorzugsweise unter aerobischen Bedingungen. Die Substanz SS 12538 zeigt hervorragende gefässerweiternde Wirkung und antibiotische Wirkung gegen bestimmte gram-positive Bakterien und Dermatophyten.



PATENTANSPRÜCHE

1. Physiologisch aktive Substanz SS 12538 der Formel



worin R Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet.

2. Physiologisch aktive Substanz nach Anspruch 1 der Formel I, worin R Methyl bedeutet, die als SS 12538 A bezeichnet ist und die nachstehenden physikalisch/chemischen Eigenschaften aufweist:

- (a) Färbung und Art der Substanz: Farbloses Öl;
 (b) Molekulargewicht 400, bestimmt durch Massenspektrum des Acetats von SS 12538 A;
 (c) Dünnschicht-Chromatographie, Träger Silicagelplatte F₂₅₄ von Merck Inc.

Entwicklungs-Lösungsmittelsysteme		Rf-Werte
Chloroform/Methanol	(100 : 1)	0,42
Benzol/Ethylacetat	(1 : 1)	0,33
Benzol/Aceton	(10 : 3)	0,31

(d) Farbreaktionen: Gelbfärbung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens und Dunkelpurpurfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure, mit Eisen(III)-chlorid-Reagens keine charakteristische Färbung;

(e) Löslichkeiten in Lösungsmitteln: Löslich in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethylether, Ethanol, Methanol, Pyridin, Benzol und Dimethylsulfoxid, jedoch in Wasser gering löslich.

(f) UV-Absorptionsspektrum

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} \quad 239 \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} \quad 845$$

gemäss Fig. 1.

(g) IR-Absorptionsspektrum, Flüssigfilmmethode, gemäss Fig. 2.

(h) ¹H-NMR-Spektrum, 60 MHz, gemessen in einer Lösung in Deuteriochloroform unter Verwendung von TMS als Bezugssubstanz, Resultate gemäss Fig. 3;

(i) ¹³C-NMR-Spektrum, gemessen in einer Lösung in Deuteriochloroform unter Verwendung von TMS als Bezugssubstanz:

(ppm)	181,0,	162,1,	156,8,	138,0,	136,5,
	135,9,	135,1,	134,0,	125,0,	122,9,
	117,9,	117,8,	99,3,	82,6,	55,1,
	42,8,	36,8,	29,9,	17,4,	16,5,
	13,0,	13,0,	10,6,	9,8,	6,8;

(k) Summenformel nach NMR- und Massenspektalanalyse: C₂₅H₃₆O₄.

3. Physiologisch aktive Substanz nach Anspruch 1 der Formel I, worin R Wasserstoff bedeutet, die als SS 12538 B bezeichnet ist und die nachstehenden physikalisch/chemischen Eigenschaften aufweist:

- (a) Farbe und Art der Substanz: Farbloses Öl;
 (b) Molekulargewicht 386 nach Massenspektrum des Acetats von SS 12538 B;

(c) Dünnschicht-Chromatographie, Träger Silicagelplatte F₂₅₄ von Merck Inc.

Entwicklungs-Lösungsmittelsysteme		Rf-Werte
Ethylacetat		0,29
Benzol/Ethylacetat	(1 : 1)	0,11
Benzol/Aceton	(1 : 1)	0,13

(d) Farbreaktionen: Gelbfärbung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens und Dunkelpurpurfärbung mit Anisaldehyd/Schwefelsäure, mit Eisen(III)-chlorid-Reagens keine charakteristische Färbung;

(e) Löslichkeiten in Lösungsmitteln: Löslich in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethylether, Ethanol, Methanol, Pyridin, Benzol und Dimethylsulfoxid, jedoch in Wasser gering löslich;

(f) UV-Absorptionsspektrum

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}} \quad 239\text{nm} \quad E_{1\text{cm}}^{1\%} \quad 1010$$

gemäss Fig. 4.

(g) IR-Absorptionsspektrum, Flüssigfilmmethode gemäss Fig. 5.

(h) ¹H-NMR-Spektrum, 90 MHz, gemessen in einer Lösung in Deuteriochloroform unter Verwendung von TMS als Bezugssubstanz, Resultate gemäss Fig. 6.

(i) ¹³C-NMR-Spektrum, gemessen in einer Lösung in Deuteriochloroform unter Verwendung von TMS als Bezugssubstanz:

(ppm)	181,5,	167,2,	159,1,	138,1,
	136,4,	135,9,	135,2,	133,9,
	125,2,	122,9,	118,4,	117,8,
	88,4,	82,6,	55,8,	42,9,
	36,8,	30,2,	17,4,	16,5,
	13,1,	13,1,	10,6,	9,4;

(k) Summenformel nach NMR- und Massenspektalanalyse: C₂₄H₃₄O₄.

4. Physiologisch aktive Substanz nach Anspruch 1 der Formel I, worin R Ethyl bedeutet, die als SS 12538 C bezeichnet ist und die nachstehenden physikalisch/chemischen Eigenschaften aufweist:

(a) Färbung und Art der Substanz: Farbloses Öl
 (b) Molekulargewicht 414, bestimmt durch Massenspektrum des Acetats von SS 12538 C.

(c) Dünnschicht-Chromatographie, Träger Silicagelplatte F₂₅₄ von Merck Inc.

Entwicklungs-Lösungsmittelsysteme		Rf-Werte
Ethylacetat		0,77
Benzol/Ethylacetat	(1 : 1)	0,57
Benzol/Aceton	(1 : 1)	0,44

(d) Farbreaktionen: Gelbfärbung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens und Dunkelpurpurfärbung mit Anisaldehyd/-Schwefelsäure, mit Eisen(III)-chlorid-Reagens keine charakteristische Färbung;

(e) Löslichkeiten in Lösungsmitteln: Löslich in Chloroform, Ethylacetat, Aceton, Ethylether, Ethanol, Methanol, Pyridin, Benzol und Dimethylsulfoxid, jedoch in Wasser gering löslich;

(f) UV-Absorptionsspektrum

λ_{max}	MeOH	239	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	840
------------------------	------	-----	------------------------	-----

gemäss Fig. 7.

(g) IR-Absorptionsspektrum, Flüssigfilmmethode, gemäss Fig. 8.

(h) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, 90 MHz, gemessen in einer Lösung in Deuteriochloroform unter Verwendung von TMS als Bezugssubstanz, Resultate gemäss Fig. 9.

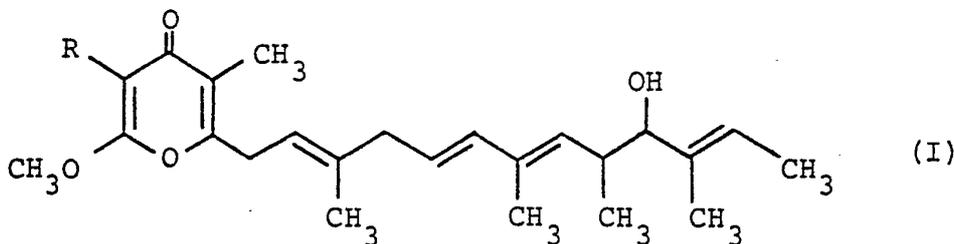
(i) $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum, gemessen in einer Lösung in

Deuteriochloroform unter Verwendung von TMS als Bezugssubstanz:

δ (ppm)	180,4,	162,2,	156,9,	
	138,0,	136,5,	135,8,	
5	135,3,	134,0,	125,3,	
	123,1,	118,4,	118,0,	
	105,3,	82,7,	55,2,	42,9,
	36,8,	30,1,	17,5,	16,5,
10	15,3,	13,1,	13,1,	12,9,
	10,6,	9,8,		

(k) Summenformel nach NMR- und Massenspektalanalyse: $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$.

5. Verfahren zur Herstellung einer physiologisch aktiven Substanz SS 12538 nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine zum Genuss *Streptomyces* gehörende, eine physiologisch aktive Substanz SS 12538 produzierende Kultur züchtet und aus der Kulturbrühe eine Verbindung der Formel I gewinnt.



6. Mikroorganismus vom Genus *Streptomyces* zur Ausführung des Verfahrens nach Anspruch 5, deponiert als *Streptomyces pactum* S 12538 unter der Nr. FERM BP-265.

Aus natürlichen Böden wurde eine grosse Anzahl Mikroorganismen isoliert und deren Produkte ausgedehnten Studien unterzogen. Es wurde dabei gefunden, dass ein Stamm S 12538, der aus einer Bodenprobe aus der Gegend von Satsukigaoka, Chiba Prefecture, Japan isoliert wurde, einen neuen Mikroorganismus darstellt, der dazu befähigt ist, neue, physiologisch aktive Substanzen SS 12538 der Formel I nach Anspruch 1, worin R Wasserstoff, Methyl oder Ethyl bedeutet, zu produzieren.

Es wurde gefunden, dass die erfindungsgemässen Substanzen hervorragende gefässerweiternde Wirkung und antibiotische Wirkung gegen bestimmte grampositive Bakterien und Dermatophyten aufweisen.

Die vorliegende Erfindung basiert auf den vorstehend angeführten Erkenntnissen.

Im nachstehenden werden Ausführungsformen der Erfindung unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beispielsweise erläutert. In den Zeichnungen zeigen:

Fig. 1 ein UV-Absorptionsspektrum, Lösungsmittel Methanol der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 A;

Fig. 2 ein IR-Absorptionsspektrum nach der Flüssigfilmmethode der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 A;

Fig. 3 ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, Lösungsmittel Deuteriochloroform, der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 A;

Fig. 4 ein UV-Absorptionsspektrum, Lösungsmittel Methanol der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 B;

Fig. 5 ein IR-Absorptionsspektrum nach der Flüssigfilmmethode der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 B;

Fig. 6 ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, Lösungsmittel Deuteriochloroform, der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 B;

Fig. 7 ein UV-Absorptionsspektrum, Lösungsmittel Methanol, der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 C;

Fig. 8 ein IR-Absorptionsspektrum nach der Flüssigfilmmethode der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 C;

Fig. 9 ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, Lösungsmittel Deuteriochloroform, der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 C;

Fig. 10 eine elektronenmikroskopische Photographie in 14'000-facher Vergrösserung des erfindungsgemässen Mikroorganismus *Streptomyces pactum* S 12538.

Ein zur Produktion der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanzen SS 12538 befähigter Mikroorganismus zeigt die nachstehenden Merkmale:

1. Morphologie

Sporenbildende Myzele verzweigen einfach aus Luftmyzellen ihrem Spitzenteil in Spiralforn. Es sind keine Wirbel feststellbar. Zehn oder mehr ausgereifte Konidien verbinden sich mit Sporen einer kurzen, zylindrisch/elliptischen Form und einer Grösse von $0,5-0,8 \times 0,8-1,5 \mu\text{m}$. Die Sporen haben eine haarige Oberfläche. Es werden weder sporangische, flagellatische noch sklerotische Sporen gefunden. Fragmentierung von Substratmyzel ist nicht feststellbar.

2. Wachstumseigenschaften auf verschiedenen Medien, gezüchtet bei 27° C während 14 d

Medium	Wachstum	Luftmyzel Bildung	Farbe	Farbe des Umkehr- Substratmyzels	Lösliches Pigment
Sucrose/ Nitratagar	schwach	dünn, gering	hellbräunlichgrau	farblos	keines
Glucose/ Asparaginagar	gut	dünn, gering	weiss-hellgrau	hellgelb	keines
Glycerin/ Asparaginagar	gut	dünn, gering	weiss- hellbläulichgrau	trübes gelblich- orange	keines
Stärke/anorganisches Salzagar	gut	gut	mittelgrau	trübes gelblich- orange	schwach gelblich- braun
Tyrosinagar	gut	gut	weiss-hellgrau	bräunlich-oliv	keines
Nähragar	gut	keine	–	hellgelb	keines
Hefeextrakt/ Malzextraktagar	gut	ziemlich gut	weiss hellbläulichgrau	hellgelblich- braun	keines
Hafermehlagar	gut	gut	mittelgrau	hellgelb	keines
Glycerin/ Nitratagar	gut	dünn, gering	gelblich-weiss	hellgelb	keines
Calciummalat- agar	schwach	dünn, gering	hellbräunlichgrau	farblos	keines

Anmerkung: Die angegebenen Farbbezeichnungen wurden nach: «Concise Manual of Color Names» der «Japan Color Investigation K.K. 1981» bestimmt.

3. Physiologische Eigenschaften

- (1) Wachstums-Temperaturbereich:
Mögliche Wachstumstemperatur 16–39° C
Optimale Wachstumstemperatur 26–35° C
- (2) Verflüssigung von Gelatine positiv
- (3) Hydrolyse von Stärke positiv
- (4) Coagulation von Magermilch positiv
- (5) Peptonisierung von Magermilch positiv
- (6) Bildung von Melanoidpigment negativ
- (7) Reduktion von Nitrat positiv
- (8) Zersetzung von Cellulose negativ
- (9) Verbrauch von Kohlenstoffquellen

D-Glucose	+
L-Arabinose	–
Sucrose	–
D-Xylose	–
L-Inosit	–
D-Mannit	–
D-Fructose	–
Rhamnose	–
Raffinose	+
Cellulose	–
Galactose	+
Salicin	–
Lactose	+
D-Sorbit	+
D-Mannose	+
Inulin	–

Anmerkung:
+ = gebraucht
– = nicht gebraucht

Im Hinblick auf die vorstehenden Kennmerkmale und die Anwesenheit von L-Diaminopimelinsäure als Komponente der Zellwand ist es offensichtlich, dass der Stamm S 12538 zum Genus *Streptomyces* gehört. Bei Bezug der mykologischen Eigenschaften des Stammes auf «The Actinomyce-tes», Bd. 2 (1961) von Waxman, ISP-Bericht «International Journal of Systematic bacteriology», Bd. 18, S. 69 und 279 (1968), von Shirling und Gotlieb, den ISP-Bericht, Bd. 19, S. 391 (1969) und Bd. 22, S. 265 (1972), und «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology» 8. Ausg. (1974), umfassen

Stämme vom Typ, bei denen Luftmyzele grau gefärbte Reihen aufweisen, die Sporenketten spiralförmig und die Sporenoberfläche haarig ist, kein Melanoidpigment produziert wird und der Bereich der verbrauchten Kohlenstoffquellen eng ist, wie beim vorliegenden Stamm S 12538, *Streptomyces karnatakensis* und *Streptomyces pactum*. Die Resultate des Vergleichs dieser beiden letzteren Stämme mit dem erfindungsgemässen Stamm S 12538 sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

	S 12538	<i>Streptomyces pactum</i> ISP 5530	<i>Streptomyces karnatakensis</i> ISP 5345
Form der Luftmyzele	spiralig	spiralig	spiralig
Sporenoberfläche	haarig	haarig	haarig
Farbe der Luftmyzele	weiss-hellbläulich-grau-hellgrau-mittelgrau	weiss-hellbläulichgrau-hellgrau	weiss-hellbläulichgrau-bläulichgrau
Farbe des Umkehr-Substratmyzels	farblos-hellgelb-hellgelblichbraun	farblos-hellgelblichbraun-gräulichbraun	farblos-hellgelb-hellgelblichbraun
Lösliches	kaum vorhanden	gelblichbraun	gelblichbraun
Pigment		angeschmutzt	angeschmutzt
Melanoidpigment			
Trypton/Hefebrühe	—	—	—
Pepton/Hefe/Eisen-Agar	—	—	—
Tyrosinagar	—	—	—
Hydrolyse von Stärke	+	+	+
Coagulation von Magermilch	+	+	+
Peptisierung von Magermilch	+	+	+
Verflüssigung von Gelatine	+	+	+
Reduktion von Nitrat	+	—	—
Verbrauch von Kohlenstoffquellen			
D-Glucose	+	+	+
L-Arabinose	—	—	—
Sucrose	—	—	—
D-Xylose	—	—	—
L-Inosit	—	—	—
D-Mannit	—	—	—
D-Fructose	—	—	—
Rhamnose	—	—	—
Raffinose	+	—	—
Cellulose	—	—	—
Galactose	+	+	+
Salicin	—	—	—

Aus der vorstehenden Tabelle geht hervor, dass der erfindungsgemäße Stamm S 12538 stark unterschiedlich ist von *Streptomyces karnatakensis* ISP 5345 hinsichtlich der Farbe der Luftmyzele, der Reduktion von Nitrat und des Verbrauchs von Raffinose. Andererseits unterscheidet sich der erfindungsgemäße Stamm von *Streptomyces pactum* ISP 5530 hinsichtlich der Reduktion von Nitrat und des Verbrauchs von Raffinose, ist jedoch hinsichtlich der mykologischen Eigenschaften sehr ähnlich. Demzufolge wurde der Stamm S 12538 als ein Stamm von *Streptomyces pactum* identifiziert.

Um den erfindungsgemäßen Stamm S 12538 vom bekannten Stamm zu unterscheiden, wurde er als *Streptomyces pactum* S 12538 bezeichnet und am 10. März 1983 bei der Samelstelle «Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, 1-3, Higashi 1 chome Yatabe-machi Tsubuka-gun, Ibaraki-ken, 305, Japan» als internationale Deponierung unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-265 deponiert.

Die erfindungsgemäßen, physiologisch aktiven Substanzen SS 12538 können hergestellt werden durch Impfen eines Nährstoffe enthaltenden Mediums mit dem vorstehend genannten Stamm und aerobische Züchtung.

Es ist zu beachten, dass für die Herstellung der Substanzen SS 12538 nicht nur der vorstehend genannte Stamm,

sondern auch künstliche und natürliche Mutanten und Varianten dieses Stammes verwendet werden können.

Für die Züchtung können synthetische, semisynthetische und natürliche Medien unter der Voraussetzung verwendet werden, dass sie Nährstoffe enthalten, welche die Bakterien verbrauchen können.

Unter Nährstoffen in Medien geeignete Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Glycerin, Dextrin, Stärke, Weizen, Melasse, Soyabohnenöl oder Mischungen dieser Substanzen.

Stickstoffquellen sind beispielsweise Soyabohnenmehl, Weizenkeim, Fleischextrakt, Pepton, Trockenhefe, Baumwollsaamenmehl, Fischmehl, Mais-Brühflüssigkeit, Ammoniumsulfat, Natriumnitrat und Mischungen dieser Substanzen.

Nötigenfalls können anorganische Salze, wie Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Phosphate und dergleichen zugesetzt werden, um das Bakterienwachstum anzuregen und die Produktion von Substanzen SS 12538 zu erleichtern. Es können auch organische und anorganische Hilfsmittel und gewöhnliche Schaumverhinderer, wie Silikonöle oder «Adecanol» zugesetzt werden.

Die Züchtung kann in Flüssigkultur und insbesondere in Tiefkultur, wie bei der Herstellung von gewöhnlichem Antibiotika ausgeführt werden. Die Züchtung erfolgt im allge-

meinen unter aerobischen Bedingungen und in einem zweckmässigen Temperaturbereich von 23–30 °C und wird in den meisten Fällen in der Umgebung von 27 °C ausgeführt. Bei Produktion entweder durch Schüttel- oder Tiefkultur wird die maximale Produktionsmenge physiologisch aktiver Substanzen SS 12538 in 2–7 d erreicht.

Das resultierende Produkt der Züchtung ist ein Gemisch von physiologisch aktiver Substanz SS 12538 A der Formel I, worin R Methyl bedeutet, SS 12538 B der Formel I, worin R Wasserstoff bedeutet und SS 12538 C der Formel I, worin R Ethyl bedeutet. Um diese Substanzen voneinander zu trennen, können verschiedene Methoden angewendet werden unter Beachtung der physikalisch/chemischen Eigenschaften der genannten drei verschiedenen Substanzen, die im nachstehenden beschrieben sind.

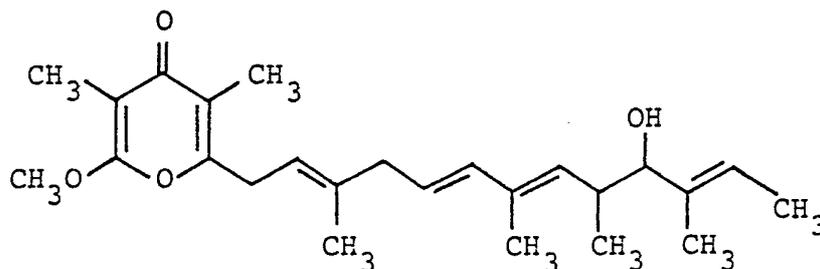
Diese physiologisch aktiven Substanzen sind üblicherweise in Myzelen und in einem Kulturfiltrat vorhanden.

Demzufolge werden die Myzelen durch Zentrifugation oder Filtration aus der Kulturbrühe abgetrennt. Die Myzele und das Kulturfiltrat können gewöhnlichen Trennmethode unterzogen werden, wie Lösungsmittelextraktion, Ausfällung, Behandlung mit Ionenaustauscherharz, Gelfiltration, Adsorptions- oder Verteilungschromatographie, Dialyse, wobei die physiologisch aktiven Substanzen SS 12538 isoliert und gereinigt werden.

Im nachstehenden wird eine bevorzugte Methode zur Isolation und Reinigung beispielsweise beschrieben:

Eine Zuchtbrühe wird durch Zentrifugation oder dgl. in Myzele und überstehende Brühe getrennt. Dann werden der Masse Myzelkuchen und die überstehende Brühe je extrahiert beispielsweise mit Methanol, Ethylacetat oder dgl. Die beiden erhaltenen Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel wird abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wird in wenig Wasser gelöst und mehrfach mit Ethylacetat extrahiert und danach unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, wobei eine dunkelbraune, ölige Substanz anfällt. Die erhaltene ölige Substanz wird einer Adsorptionschromatographie unter Verwendung von Silicagel unterzogen. In der Chromatographie auf Silicagel eluiert zuerst eine SS 12538 A, dann eine SS 12538 B und zuletzt SS 12538 C enthaltende Fraktion in dieser angegebenen Reihenfolge. Diese erhaltenen aktiven Fraktionen werden einzeln gesammelt und unter vermindertem Druck konzentriert, wobei SS 12538 A, SS 12538 B bzw. SS 12538 C in Form von farblosen Ölen isoliert werden.

Die physikalisch/chemischen Eigenschaften der erfindungsgemässen physiologisch aktiven Substanz SS 12538 A sind im Patentanspruch 2 definiert. Auf Basis dieser Eigenschaften wurde die nachstehende Strukturformel der Substanz SS 12538 A bestimmt,



Die biologischen Eigenschaften der erfindungsgemässen Substanz SS 12538 A wurden folgendermassen ermittelt:

(1) Gefässerweiternde Wirkung

Als Versuchstiere wurden vier männliche Bastardhunde von 15–25 kg Lebendgewicht intravenös mit Natrium-pentobarbital in einer Dosierung von 30 mg/kg anästhetisiert. Danach wurde die linke Koronararterie unter künstlicher Beatmung freigelegt und ein elektromagnetischer Durchflussmesser angebracht. Eine Polyethylenkanüle wurde in die linke Femoralarterie eingeführt.

Die jeweils zu prüfende Verbindung wurde in wenig Di-

methylsulfoxid gelöst und mit einer sterilisierten physiologischen Salzlösung für Injektion verdünnt und dann dosiert in die Vene eingespritzt.

Koronarblut wurde mittels de- elektromagnetischen Durchflussmessers gemessen und der Blutdruck wurde aus der Polyäthylenkanüle durch einen Druckübertrager bestimmt. Auch der Puls wurde aus RR Intervallen EKG mittels eines Instant-Pulsmessers gemessen. Jeder Parameter wurde polygraphisch aufgezeichnet und die Veränderungen dieser Parameter vor und nach der Verabreichung der Testverbindung beobachtet. Die erhaltenen Resultate sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1

Testverbindung	Dosierung µg/kg	Koronar-Blutdurchfluss		Blutdruck		Pulsverminde- rung %
		Zunahme %	Dauer min	Verminde- rung %	Dauer min	
erfindungsgemäss	3	17,1	10	4,9	7	2,3
SS 12538 A	10	168,6	20	12,6	10	2,9
	30	441,3	40	28,7	30	1,8
Vergleich Dipyridamol	300	135,7	20	13,2	16	0

(2) Antibakterielle Wirkung

Die minimale inhibierende Konzentration (MIK) der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538

65

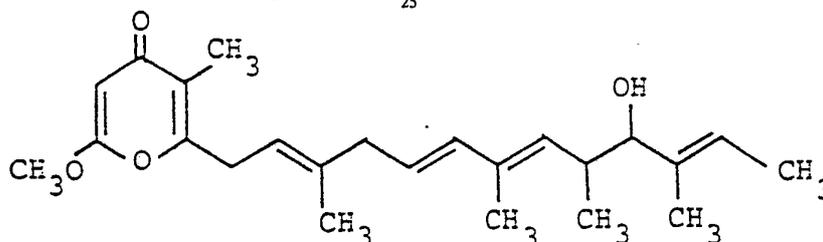
A gegen verschiedene Mikroorganismen ist in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Mikroorganismus	Minimale inhibierende Konzentration, MIK µg/ml
Bacillus subtilis ATCC 6633	> 100
Bacillus cereus IID 871	12,5
Micrococcus lysodeikticus IFO 3333	25
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P	> 100
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	< 6,25
Escherichia coli 0-1	> 100
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	> 100
Pseudomonas aeruginosa IFO 13736	> 100
Candida albicans ATCC 10231	> 100
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763	> 100
Aspergillus niger ATCC 9642	> 100
Trichophyton mentagrophytes QM 248	> 100
Microsporium gypseum IFO 8231	< 6,25

Die physikalisch/chemischen Eigenschaften der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 B sind im Patentanspruch 3 definiert. Aus diesen Eigenschaften

ten wurde die folgende Strukturformel der Substanz SS 12538 B bestimmt:



Die biologischen Eigenschaften der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538 B wurden folgendermassen ermittelt:

(1) Gefässerweiternde Wirkung

Die gefässerweiternde Wirkung wurde bestimmt, wie im vorstehenden in bezug auf die Substanz SS 12538 A beschrieben. Die Resultate sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3

Testverbindung	Dosierung µg/kg	Koronar-Blutdurchfluss Zunahme %	Dauer min	Blutdruck Verminderung %	Dauer min	Pulsverminderung %
erfindungsgemäss	3,0	103,3	10	7,5	6	2,3
SS 12538 B	10,0	143,8	15	27,7	20	13,0
Vergleich	300,0	135,7	20	13,2	16	0
Dipyridamol						

(2) Antibakterielle Wirkung

Die minimale inhibierende Konzentration (MIK) der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538B gegen verschiedene Mikroorganismen ist in Tabelle 4 angegeben.

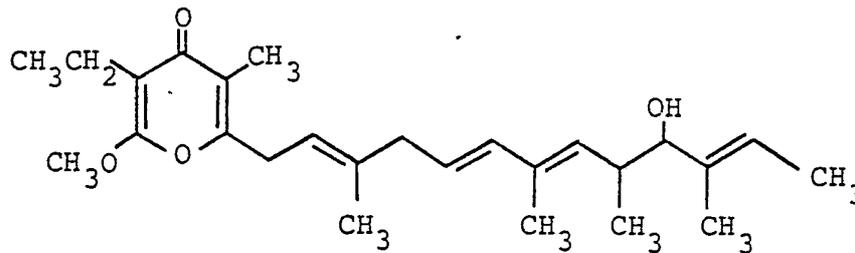
Tabelle 4

Mikroorganismus	Minimale inhibierende Konzentration, MIK µg/ml
Bacillus subtilis ATCC 6633	50
Bacillus cereus IID 871	50
Micrococcus lysodeikticus IFO 3333	25
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P	25
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	25
Escherichia coli 0-1	> 100
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	> 100

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Mikroorganismus	Minimale inhibierende Konzentration, MIK µg/ml
Pseudomonas aeruginosa IFO 13736	> 100
Candida albicans ATCC 10231	> 100
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763	> 100
Aspergillus niger ATCC 9642	> 100
Trichophyton mentagrophytes QM 248	25
Microsporium gypseum IFO 8231	100

Die physikalisch/chemischen Eigenschaften der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538C sind im Patentanspruch 4 definiert. Aus diesen Eigenschaften wurde die nachstehende Strukturformel der Substanz SS 12538C bestimmt:



Die biologischen Eigenschaften der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538C wurden folgendermassen ermittelt:

(1) Gefässerweiternde Wirkung

Die gefässerweiternde Wirkung wurde bestimmt, wie im vorstehenden in bezug auf die Substanz SS 12538A beschrieben. Die Resultate sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5

Testverbindung	Dosierung µg/kg	Koronar-Blutdurchfluss		Blutdruck		Pulsverminderung %
		Zunahme %	Dauer min	Verminderung %	Dauer min	
erfindungsgemäss	10,0	30,0	5	0	0	0
SS 12538 C	30,0	60,0	10	2,9	10	0
	100,0	130,0	15	8,5	15	10,1
Vergleich Dipyridamol	300,0	135,7	20	13,2	16	0

(2) Antibakterielle Wirkung

Die minimale inhibierende Konzentration (MIK) der erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanz SS 12538C gegen verschiedene Mikroorganismen ist in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6

Mikroorganismus	Minimale inhibierende Konzentration, MIK µg/ml
Bacillus subtilis ATCC 6633	> 100
Bacillus cereus IID 871	25
Micrococcus lysodeikticus IFO 3333	12,5
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P	100
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	25
Escherichia coli 0-1	> 100
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	> 100
Pseudomonas aeruginosa IFO 13736	> 100
Candida albicans ATCC 10231	> 100
Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763	> 100
Aspergillus niger ATCC 9642	> 100
Trichophyton mentagrophytes QM 248	50
Microsporium gypseum IFO 8231	> 100

Obwohl im vorstehenden die Eigenschaften der erfindungsgemässen Verbindungen im Vergleich zu denjenigen von bekannten, physiologisch aktiven Verbindungen beschrieben sind, entsprechen die erfindungsgemässen Verbindungen nicht den bekannten Verbindungen und werden somit als neue physiologisch aktive Substanzen erachtet.

Alle erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanzen SS 12538 zeigen nicht nur blutdrucksenkende Wirkung, sondern auch die Wirkung die Durchflussrate von Blut in Koronararterien in bemerkenswertem Ausmass zu erhöhen. Zusätzlich zeigen die erfindungsgemässen Substanzen SS

12538A und SS 12538B gegenüber der üblicherweise verwendeten Vergleichsverbindung Dipyridamol einen um das etwa 30-fache höheren Titer und selbst bei der erfindungsgemässen Substanz SS 12538C ist deren Titer etwa 3-fach höher als derjenige von Dipyridamol. Demzufolge werden die erfindungsgemässen Substanzen als nützliche Heilmittel gegen ischämische Herzkrankheiten oder als blutdrucksenkende Beruhigungsmittel erachtet. Die erfindungsgemässen, physiologisch aktiven Substanzen SS 12538 zeigen antimikrobielle Wirkung gegen bestimmte gram-positive Bakterien und bestimmte Dermatophyten und sind somit nützlich als antimikrobielle Mittel.

In den nachstehenden Beispielen wird die Erfindung detailliert erläutert.

Beispiel 1

Test auf Isolierung von reinen Mikroorganismen und Reproduzierbarkeit:

(1) Eine gesammelte Bodenprobe wurde mit sterilisiertem Wasser im Massstab 1:1000 aufgeschlämmt und 1 ml der erhaltenen Aufschlämmung wurde in einer sterilisierten Petri-Schale mit 9 ml eines Isolations-Agarmediums (I) der nachstehenden Zusammensetzung bei 37°C während mehreren Tagen inkubiert.

Isolations-Agarmedium (I)

Hafermehl	20 g
Die 20 g Hafermehl wurden in 1000 ml dest. Wasser während 20 min zum Sieden erhitzt und dann durch ein Käseereituch filtriert, wobei verdampftes Wasser durch Zugabe von frischem dest. Wasser ersetzt wurde.	
Hefeextrakt	4 g
Glukose	2 g
Spurensalzlösung	1 ml, enthaltend
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
dest. Wasser	100 ml
Agar	20 g
pH-Wert 7,2	

Durch die beschriebene Züchtung erhaltene Kolonien wurden mittels einer Platindrahtöse auf ein Agar-Schräglkulturmedium (II) übertragen und bei 27 °C während 14 d kultiviert.

Agar-Schräglkulturmedium (II)

Hafermehl	20 g
(Das Hafermehl wurde mit 1000 ml dest. Wasser aufgekocht und filtriert, wie vorstehend beschrieben).	
Spurensalzlösung	1 ml, enthaltend
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
dest. Wasser	100 ml
Agar	18 g

pH-Wert 7,2

Eine Platindrahtöse voll der wie vorstehend beschrieben erhaltenen Kultur wurde mit einer verdünnten physiologischen Salzlösung im Massstab 1:10 000 verdünnt. 1 ml der erhaltenen Verdünnung wurde in einer sterilisierten Petri-Schale mit 9 ml des vorstehend beschriebenen Isolations-Agarmediums (I) vermischt und bei 27 °C während 14 d inkubiert.

Visuell und mikroskopisch wurde festgestellt, dass die Anzahl der erhaltenen Kolonien untereinander keine Unterschiede aufwies.

Mit 10 der erhaltenen Kolonien wurden separat Agar-Schräglkulturmedien (II) geimpft und diese bei 27 °C während 14 d kultiviert. Die auf den 10 Schräglkulturmedien (II) gebildeten Kulturen wurden visuell und mikroskopisch untersucht und erwiesen sich als gleich. Zusätzlich erwiesen sich Art und physiologische Eigenschaften jeder der 10 Kulturen als gleich. Die Art und physiologischen Eigenschaften sind gleich wie die vorstehend beschrieben.

Die Testresultate zeigen eindeutig, dass alle Kulturen auf den 10 Kulturmedien gleich der aus dem natürlichen Boden isolierten Kultur sind.

(2) Der durch die Reinkultur auf dem Agar-Schräglkulturmedium (II) erhaltenen Kultur wurde zur Herstellung einer Sporensuspension auf dem Agar-Schräglkulturmedium (II) als Schutzmittel eine 10 Gew.% Magermilch und 1 Gew.% Natriumglutamat enthaltende wässrige Lösung zugesetzt. Gleiche Teile von etwa 0,5 ml der erhaltenen Sporensuspension wurden in separate Gefrier-trocknungsampullen gefüllt und gefriergetrocknet, indem die Ampullen in Trockeneis/Aceton schnellgefroren, in einen Gefrier-trockner eingesetzt und dieser einem Vakuum unterhalb 0,04 mbar ausgesetzt wurde. Nach Verschluss der Ampullen im Vakuum mittels eines Gasbrenners, wurde die gefriergetrockneten Kulturen bei 4 °C gelagert. Die so erhaltenen gefriergetrockneten Kulturmuster wurden während 3 Monaten aufbewahrt, wonach die Ampullen geöffnet und die Kulturen mittels eines sterilisierten Minispatels in sterilisierte Reagenzgläser überführt wurden. Jedem Reagenzglas wurde zur Renaturierung sterilisiertes Wasser zugesetzt. Dann wurden die Reagenzgläser während 1 h stehengelassen und dann die Art und physiologischen Eigenschaften der Kultur auf verschiedenen Medien unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen bestimmt. Die erhaltenen Resultate bestätigen, dass die gefriergetrockneten Kulturmuster gegenüber denjenigen vor der Lyophilisierung keine Unterschiede aufwies.

Beispiel 2

(i) Mit *Streptomyces pactum* S 12538, FERM BP-265, d. h. einer die Substanz SS 12538 produzierenden Kultur,

wurde ein Medium, enthaltend 2,0 Gew.% Glycerin, 2,0 Gew.% Dextrin, 1,0 Gew.% Sojabohnenmehl, 0,3 Gew.% Hefeextrakt, 0,2 Gew.% Ammoniumsulfat und 0,2 Gew.% Kalziumcarbonat in Leitungswasser, pH-Wert 7,0, geimpft und zur Bildung einer Saatkultur bei 27 °C während 48 h geschüttelt. In einen 30 l Topff fermenter wurden 16 l eines Kulturmediums der vorstehend beschriebenen Zusammensetzung gefüllt und mit 300 ml der erhaltenen Saatkultur geimpft, wonach die Züchtung unter aeroben Bedingungen bei einer Belüftungsrate von 16 l/min, einer Tourenzahl von 400/min und einer Temperatur von 27 °C ausgeführt wurde. Nach 96 h Fermentierung wurde die Kulturbrühe zentrifugiert und die überstehende Brühe dreimal mit gleichen Anteilen Ethylacetat extrahiert. Andererseits wurden dem nassen Mycelkuchen 5 l zugesetzt und danach wurde geschüttelt und filtriert. Dieses Vorgehen wurde zweimal wiederholt. Dann wurde das Methanol unter vermindertem Druck aus dem Extrakt abdestilliert und die wässrige Lösung des Rückstandes wurde dreimal mit je 1 l Ethylacetat extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit dem Extrakt der überstehenden Brühe vereinigt, wonach das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert wurde, wobei ein Gemisch der rohen Substanzen SS 12538A, SS 12538B und SS 12538C erhalten wurde.

(ii) Das wie vorstehend gemäss (i) erhaltene Gemisch wurde in wenig Chloroform gelöst und in einer Säule von 3 × 30 cm unter Verwendung von Chloroform als Eluierungsmittel über Silikagel «Kiesel Gel» 60 von Merck Inc. säulenchromatographiert. Als erste Fraktion wurde rohe Substanz SS 12538 C, danach rohe Substanz SS 12538A und als letzte Fraktion rohe Substanz SS 12538B in dieser angegebenen Reihenfolge eluiert.

(iii) Die die rohe Substanz SS 12538C enthaltende Fraktion wurde gesammelt und das Lösungsmittel abdestilliert, wobei etwa 0,6 g der roh gereinigten Substanz SS 12538C in Form eines hellgelben Öls erhalten wurde, das in wenig eines 4:1 Gemischs von Benzol/Ethylacetat gelöst und auf einer Säule von 2 × 30 cm unter Verwendung des gleichen Lösungsmittels und Silikagels, wie vorstehend beschrieben, säulenchromatographiert wurde. Die eluierte Fraktion der Substanz SS 12538C wurde gesammelt und das Lösungsmittel abdestilliert, wobei etwa 0,15 g der reinen Substanz SS 12538C in Form eines farblosen Öls erhalten wurde.

(iv) Die wie vorstehend beschrieben gemäss (ii) erhaltene, die Substanz SS 12538A enthaltende Fraktion wurde gesammelt und das Lösungsmittel abdestilliert, wobei etwa 4 g der roh gereinigten Substanz SS 12538A in Form eines hellgelb gefärbten, öligen Produkts erhalten wurden, die in wenig eines 3:1 Gemischs von Benzol/Ethylacetat gelöst und säulenchromatographiert wurden, wie vorstehend unter (iii) beschrieben. Die eluierte Fraktion wurde gesammelt und das Lösungsmittel abdestilliert, wobei etwa 2 g der reinen Substanz SS 12538A in Form eines farblosen Öls erhalten wurden.

(v) Die wie vorstehend beschrieben gemäss (ii) erhaltene, rohe Substanz SS 12538B enthaltende Fraktion wurde gesammelt und das Lösungsmittel abdestilliert, wobei etwa 0,5 g roh gereinigte Substanz SS 12538B in Form eines hellgelben Öls erhalten wurde, das in wenig eines 1:1 Gemischs von Benzol/Ethylacetat gelöst und gleich säulenchromatographiert wurde, wie vorstehend unter (iii) und (iv) beschrieben. Die eluierte Fraktion wurde gesammelt und das Lösungsmittel abdestilliert, wobei etwa 0,12 g der reinen Substanz SS 12538B in Form eines farblosen Öls erhalten wurde.

FIG. 1

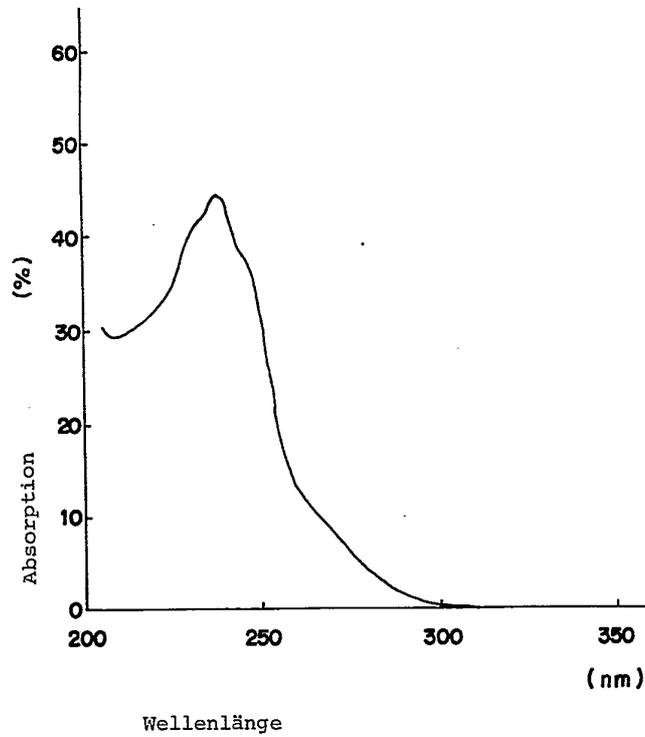


FIG. 2

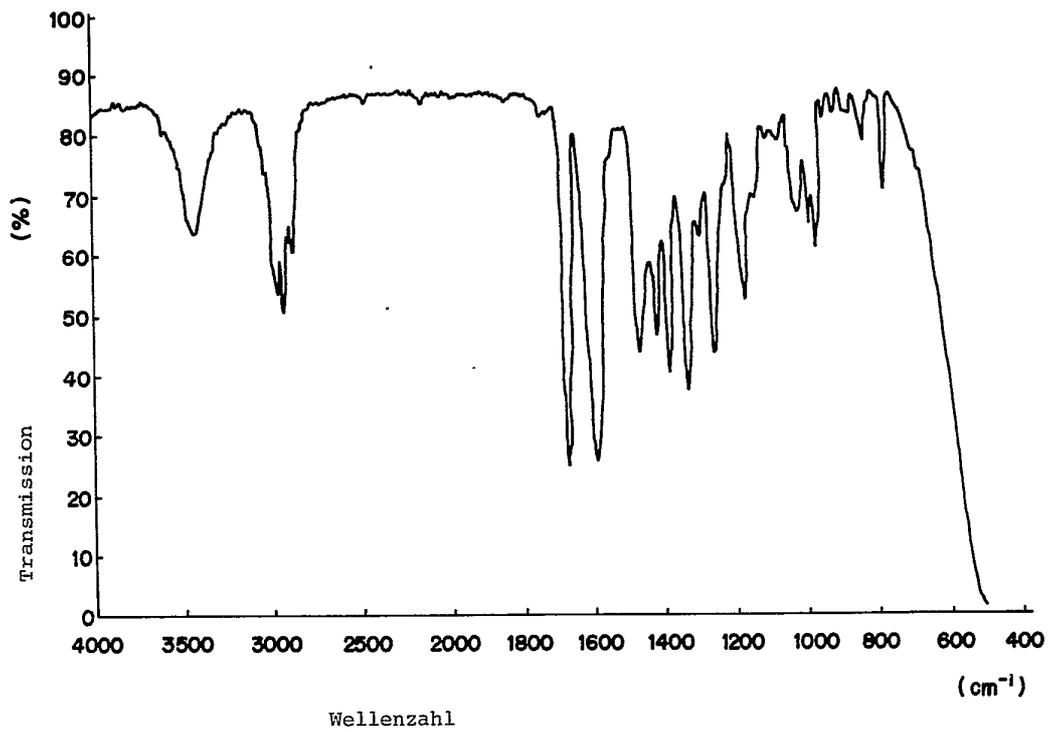


FIG. 3

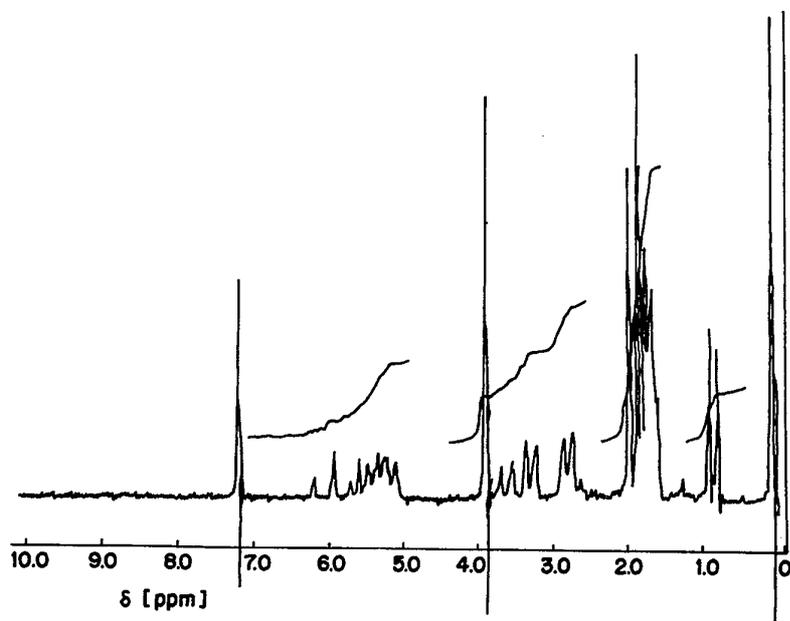


FIG. 4

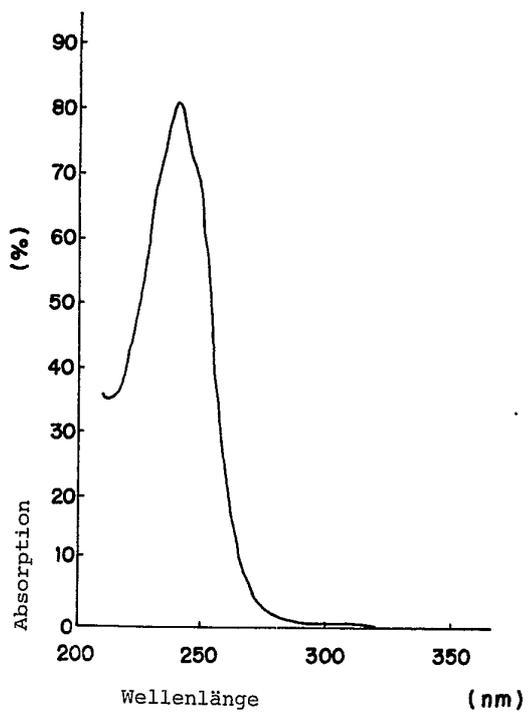


FIG. 5

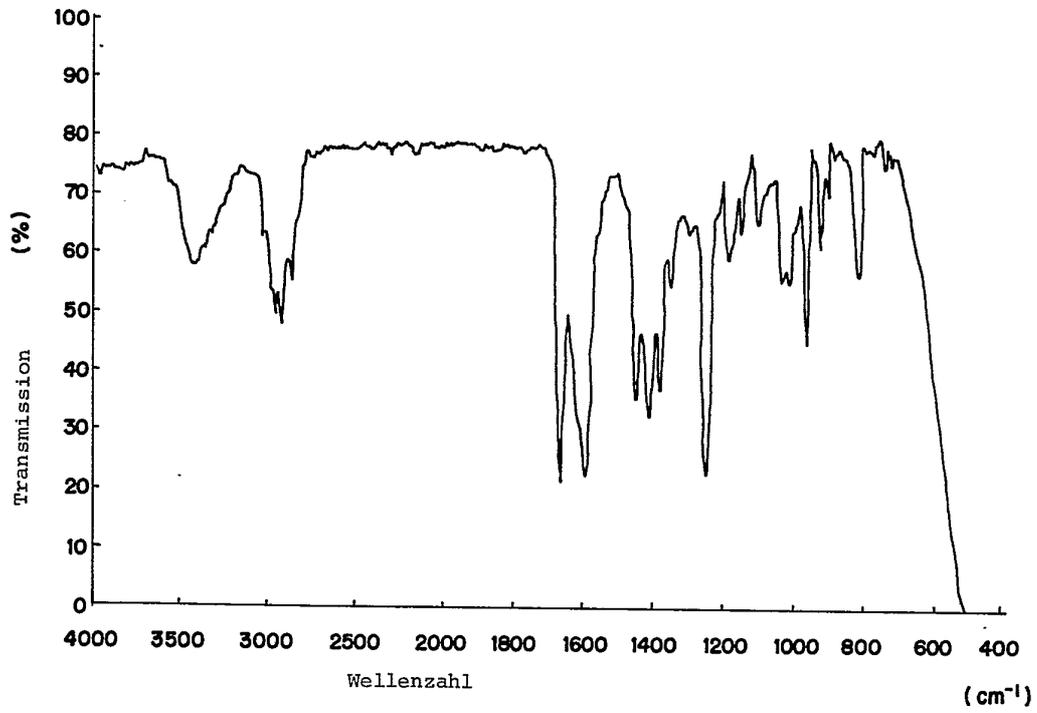


FIG. 6

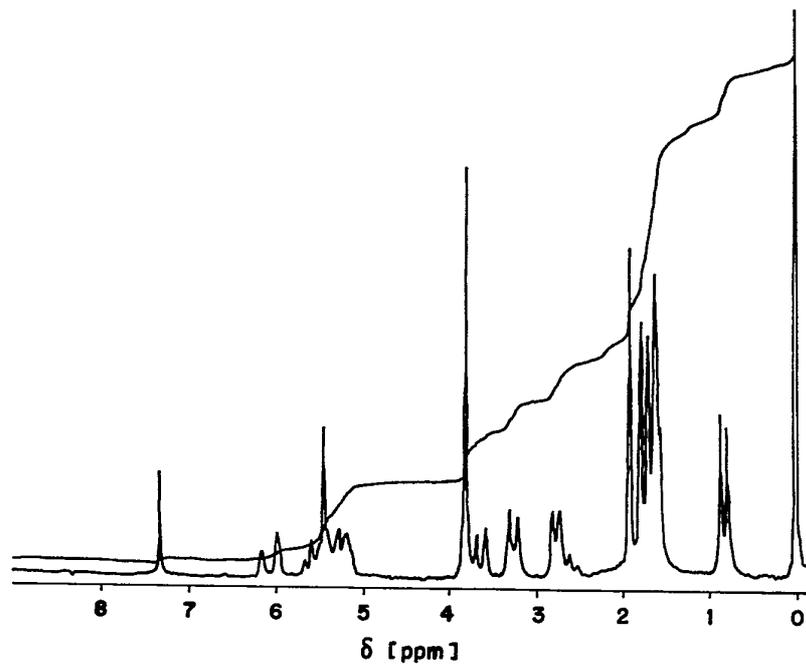


FIG. 7

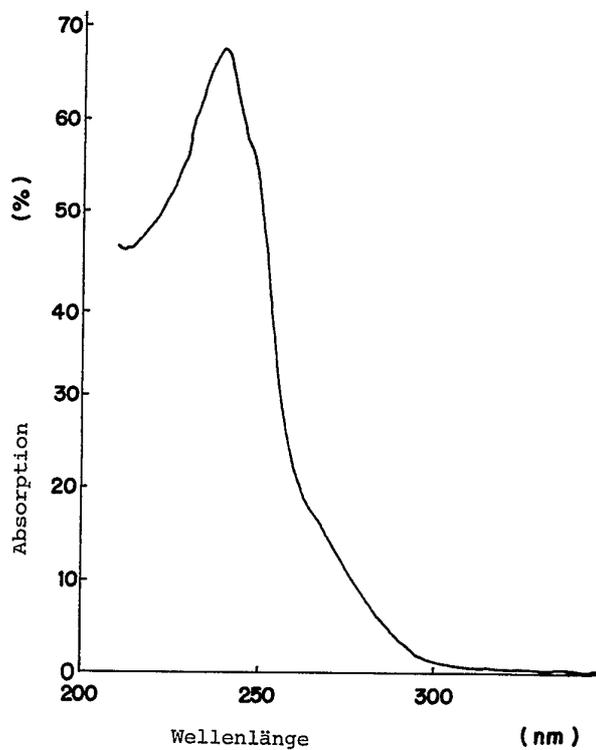


FIG. 8

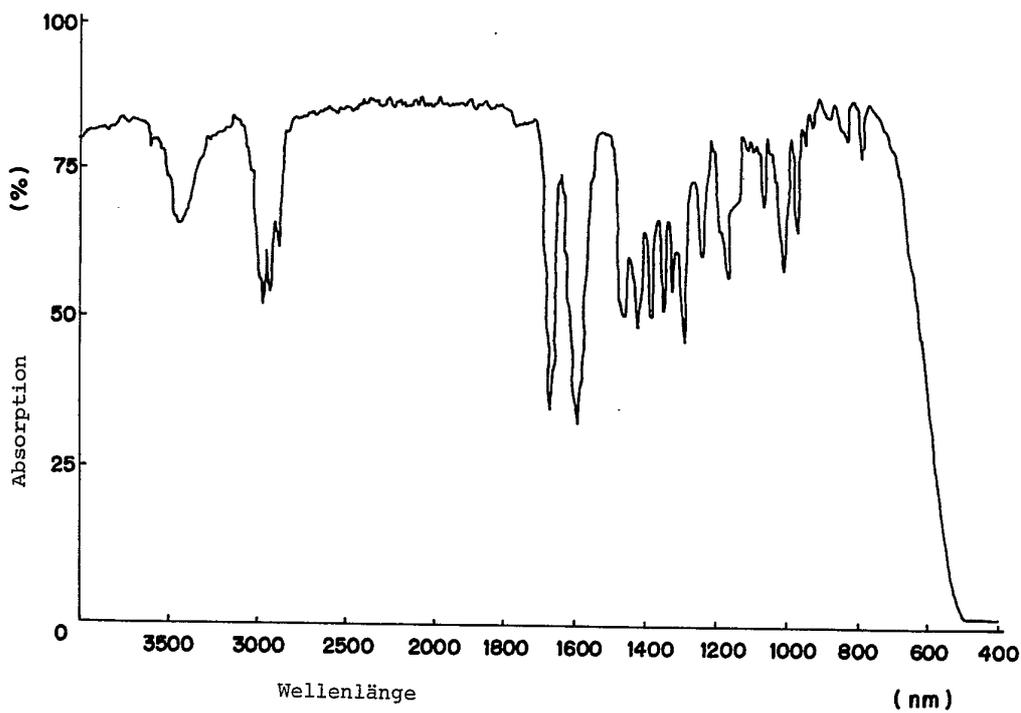


FIG. 9

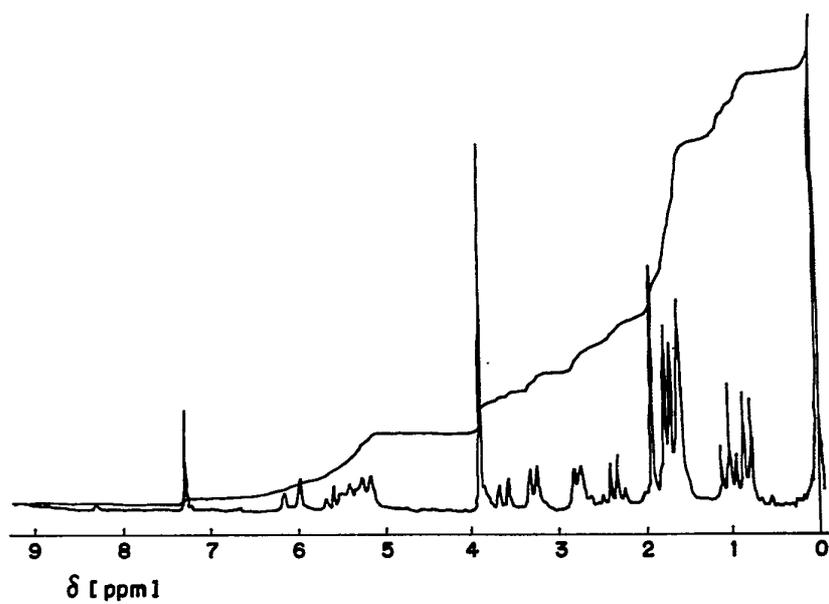
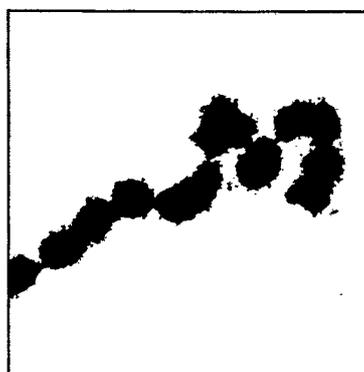


FIG. 10



(X 14000)