



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 07 D 305/12
C 12 P 13/20
A 61 K 37/64

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

638 194

⑳ Gesuchsnummer: 1356/78

⑦③ Inhaber:
Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai,
Shinagawa-ku/Tokyo (JP)

㉒ Anmeldungsdatum: 07.02.1978

③⑩ Priorität(en): 08.02.1977 JP 52-12119

⑦② Erfinder:
Hamao Umezawa, Nerima-ku/Tokyo (JP)
Takaaki Aoyagi, Fujisawa-shi/Kanagawa-ken (JP)
Tomio Takeuchi, Shinagawa-ku/Tokyo (JP)
Masa Hamada, Hoya-shi/Tokyo (JP)
Masaaki Ishizuka, Ohta-ku/Tokyo (JP)

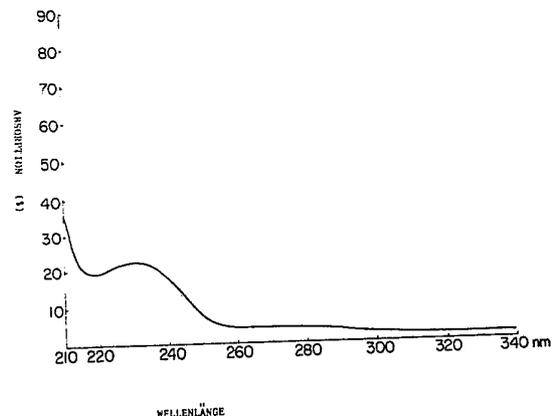
㉔ Patent erteilt: 15.09.1983

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.09.1983

⑦④ Vertreter:
Patentanwaltsbureau Isler & Schmid, Zürich

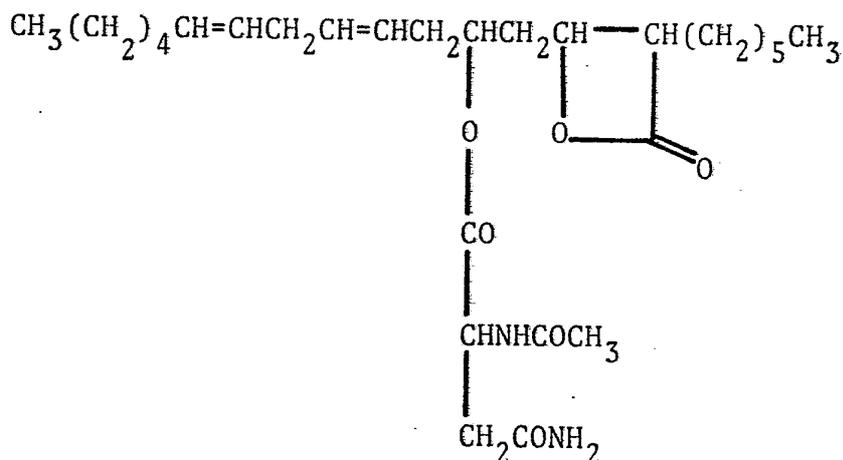
⑤④ Esterastin, eine neue physiologisch wirksame Substanz und deren Herstellung.

⑤⑦ Eine neue physiologisch wirksame Substanz, genannt Esterastin, wird beschaffen, welche die Wirksamkeit von Esterase hemmt und nützlich ist als immunosuppressives Arzneimittel. Esterastin kann erzeugt werden durch Züchtung eines Mikroorganismus Streptomyces MD4-C1, identifiziert als FERM-P 3723 oder ATCC 31336, in einem Kulturmedium unter aeroben Bedingungen und Gewinnung aus der erhaltenen Kultur.



PATENTANSPRÜCHE

1. Verbindung, bezeichnet als Esterastin, welche der folgenden Formel entspricht:



2. Verfahren zur Herstellung von Esterastin, dadurch gekennzeichnet, dass ein Esterastin erzeugender Stamm der Gattung Streptomyces unter aeroben Bedingungen in einem dafür geeigneten Kulturmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, während genügender Zeit gezüchtet wird, um Esterastin im Kulturmedium zu erzeugen und anzureichern, und das Esterastin aus der Kultur gewonnen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Esterastin erzeugende Stamm der Stamm Streptomyces MD4-CI ist, welcher als FERM-P 3723 oder ATCC 31336 identifiziert ist.

4. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Stamm Streptomyces MD4-CI bei einer

Temperatur von 27 bis 37°C und vorzugsweise von 25 bis 35°C unter aeroben Bedingungen gezüchtet wird.

5. Verfahren nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Stamm Streptomyces MD4-CI bei einer Temperatur von 25 bis 35°C während 2 bis 4 Tagen unter aeroben Bedingungen gezüchtet wird.

6. Immunsuppressives Arzneimittel zur Herabsetzung der Immunitätsreaktion, dadurch gekennzeichnet, dass es eine wirksame Menge Esterastin als aktiven Bestandteil zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger für den aktiven Bestandteil enthält.

7. Immunsuppressives Arzneimittel nach Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Gewichtsverhältnis von Esterastin zum Träger 1:1 bis 1:100 beträgt.

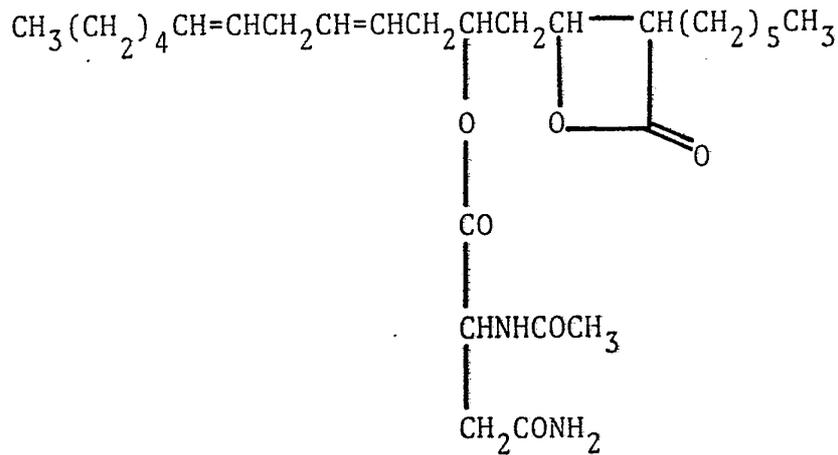
Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine neue physiologisch wirksame Substanz, nämlich Esterastin, welche wirksam ist zur Hemmung der enzymatischen Aktivität von Esterase. Die Erfindung bezieht sich ferner auf ein Verfahren zur Erzeugung von Esterastin, insbesondere auf ein Verfahren zur Herstellung von Esterastin durch Züchten eines Mikroorganismus, nämlich einer Art der Gattung Streptomyces, in einem Kulturmedium, um Esterastin zu erzeugen und anzureichern, und anschließende Gewinnung von Esterastin aus der Kultur. Die Erfindung bezieht sich ferner auf ein immunsuppressives Arzneimittel, welches Esterastin als aktiven Bestandteil enthält.

Es wurde gefunden, dass eine Substanz, welche gegen Esterase wirksam ist, in der Kultur vorhanden ist, welche durch Züchtung eines Mikroorganismus erhalten wird, welcher aus einer Erdprobe isoliert wurde, welche im Boden von Biseibutsu Kagaku Kenkyuo-sho in Shinagawa-ku, Tokyo, Japan, gesammelt wurde, und welcher Mikroorganismus als Streptomyces MD4-CI bezeichnet wurde. Es gelang, diese Substanz aus der Kultur zu isolieren. Als Resultat der Untersuchungen wurde gefunden, dass diese Substanz eine neue Substanz ist, welche nunmehr als Esterastin bezeichnet wird. Esterastin erwies sich als nützliches Heilmittel, welches wirksam ist zur Herabsetzung der Anzahl Zellen, welche tumorale Antikörper bilden, sowie zur Unterdrückung der cellula- ren Immunität. Da Esterastin eine Substanz mit viel geringe-

rer Toxizität ist, ist sie eine physiologisch wirksame Verbindung, welche ohne Gefährdung als Arzneimittel verwendet werden kann, um zahlreiche lebensgefährliche Erkrankungen zu behandeln, welche durch Immunitätsreaktionen (immune reactions) hervorgerufen werden, wie z. B. kontaktallergische Dermatitis, systemischer Lupus, erythrematosus, autoimmune hämatolytische Anämie, Periarteritis nodosa, Myasthenia gravis, Arthritis, Rheumatismus und Multiple Sclerose, und welche als immunsuppressives Arzneimittel bei der Transplantation von inneren Organen, wie Herz, Niere und Muskeln, verwendet werden kann. Es wird ferner erwartet, dass Esterastin als entzündungswidriges Mittel nützlich ist, weil es die Aktivierung des Komplementsystems infolge der Esterase hemmenden Wirkung von Esterastin hemmt.

Bei der systematischen Forschung nach einer physiologisch aktiven Substanz, welche die Zersetzung von p-Nitrophenylacetat durch Esterase hemmt, wurde Esterastin in der Fermentationsbrühe des oben erwähnten Mikroorganismus gefunden. Die weitere Untersuchung von Esterastin ergab, dass diese Substanz die weiter unten angeführte chemische Struktur aufweist.

Gemäss der vorliegenden Erfindung wird daher eine neue Verbindung beschafft, nämlich Esterastin der folgenden Formel:



Esterastin ist eine farblose pulverförmige Substanz, welche von neutraler Natur ist und eine Wirksamkeit aufweist, um die Wirkung von Esterase zu hemmen, und welche folgende physico-chemische Eigenschaften aufweist:

(a) Es hat einen Schmelzpunkt von 90 bis 95 °C und eine spezifische optische Drehung $[\alpha]^{20}_D$ von + 11° (c 1, Chloroform).

(b) Esterastin ist löslich in Pyridin, Dimethylsulfoxid, Methanol, Äthanol, Aceton, Äthylacetat, Butylacetat, Chloroform und Benzol, jedoch nur spärlich in Wasser, Petroläther und Hexan.

(c) Das Molekulargewicht beträgt 506, gemessen mittels Massenspektrometrie.

(d) Elementaranalyse: C 67,04%, H 9,21%, N 5,56% und O 17,90%.

(e) Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum in 95% Methanol ergibt eine Adsorptionsspitze λ_{max} bei 230 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 22,5).

(f) Das Infrarot-Absorptionsspektrum von Esterastin tablettiert in Kaliumbromid zeigt charakteristische Absorptionsbanden bei 3470, 3350, 2950, 1840, 1730, 1645, 1610, 1545, 1415, 1375, 1325, 1260, 1225, 1185, 1115, 1040, 1020, 975, 920, 900, 880, 840, 810 und 690 cm^{-1} .

(g) Esterastin weist das in Fig. 3 der beiliegenden Zeichnungen dargestellte NMR-Absorptionsspektrum auf.

Gemäss der vorliegenden Erfindung wird ferner ein Verfahren für die Herstellung von Esterastin geschaffen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Esterastin erzeugender Stamm der Gattung *Streptomyces* unter aeroben Bedingungen in einem geeigneten Kulturmedium, welches assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, während genügender Zeit gezüchtet wird, um Esterastin im Kulturmedium zu erzeugen und anzureichern, und das Esterastin sodann aus der Kultur gewonnen wird.

Der Esterastin erzeugende Stamm von *Streptomyces* kann zum Beispiel *Streptomyces* MD4-C1 sein, wie oben erwähnt. Dieser Stamm MD4-C1 wurde am 25. September 1976 in einer anerkannten japanischen Sammelstelle, dem «Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology», Inage, Chiba-City, Japan, unter der Nummer FERM-P 3723 hinterlegt. Dieser Stamm MD4-C1 wurde ferner am 20. September 1977 in der «American Type Culture Collection», Maryland, USA, unter der ATCC-Nummer 31336 hinterlegt.

Die Kultur- und taxonomischen Eigenschaften des Stammes MD4-C1 sind im folgenden beschrieben.

1. Mikroskopische Morphologie

Der Stamm MD4-C1 weist verzweigte Substrat-Mycelien auf, von welchen sich Luft-Hyphen in Form offener Spiralen entwickeln. Es wurde keine wirbelförmige Verzweigung

beobachtet. Reife Sporenketten tragen üblicherweise mehr als zehn konische Sporen. Die Sporen weisen im allgemeinen eine Grösse von etwa 0,6 bis 0,8 × 0,8 bis 1,2 Mikron auf und haben eine glatte Oberfläche.

2. Wachstumscharakteristiken auf verschiedenen Kulturmedien

Die Bezeichnung der Farben in Klammern [], welche im folgenden angeführt sind, entspricht dem Farbstandard in «Color Harmony Manual», herausgegeben von Container Corporation of America.

(1) Auf Saccharose-Nitrat-Agar (inkubiert bei 27 °C): farblozes Wachstum trägt Luft-Hyphen von grünlich-roter Farbe [6 ge, Rose Gray] bis rötlich-grauer Farbe [5 ge, Rosewood]. Kein lösliches Pigment wurde beobachtet.

(2) Auf Glucose-Asparagin-Agar (inkubiert bei 27 °C): farblozes Wachstum trägt Luft-Hyphen von leicht rötlich-brauner Farbe [5 ec, Dusty Peach] bis leuchtend braun-grauer Farbe [3 fe, Silver Gray]. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(3) Auf Glycerin-Asparagin-Agar (ISP No. 5 Medium, inkubiert bei 27 °C): farblozes bis hellgelbes Wachstum trägt Luft-Hyphen von weisser bis rosa-weisser Farbe nach etwa 14 Tagen Inkubation. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(4) Auf Stärke-anorganische Salze-Agar (ISP No. 4, Medium, inkubiert bei 27 °C): farblozes Wachstum trägt Luft-Hyphen von leuchtend braun-grauer Farbe [3 fe, Silver Gray] bis rosa-grauer Farbe. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(5) Auf Tyrosin-Agar (ISP No. 7 Medium, inkubiert bei 27 °C): hellgelbes Wachstum trägt Luft-Hyphen von rosa-weisser Farbe bis rötlich-grauer Farbe [5 ge, Rosewood]. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(6) Auf Nähr-Agar (inkubiert bei 27 °C): hellgelbes Wachstum. Es wurden weder Luft-Hyphen gebildet noch lösliches Pigment beobachtet.

(7) Auf Hefeextrakt-Malzextrakt-Agar (ISP No. 2, Medium, inkubiert bei 27 °C): hellgelblich-braunes bis gelblich-braunes Wachstum trägt Luft-Hyphen von leuchtend braun-grauer Farbe bis rötlich-grauer Farbe [7 ig, Rose Taupe]. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(8) Auf Hafergrütze-Agar (ISP No. 3, Medium, inkubiert bei 27 °C): farblozes bis hellgelbes oder dunkelgelbes Wachstum trägt Luft-Hyphen von grünlich-roter Farbe [6 ge, Rose Gray] bis rötlich-grauer Farbe [5 ge, Rosewood bis 5 ig, Rose Taupe]. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(9) Auf Glycerin-Nitrat-Agar (inkubiert bei 27 °C): hellgelbes bis hellgelblich-braunes [3 ie, Camel bis 4 ie, Cork Tan] Wachstum trägt Luft-Hyphen von weisser bis bräunlich-weisser Farbe.

(10) Auf Stärke-Agar (inkubiert bei 27 °C): farbloses Wachstum trägt Luft-Hyphen von bräunlich-weisser Farbe bis hellbräunlich-grauer Farbe [5 dc, Pussywillow Gray]. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(11) Auf Calciummalat-Agar (inkubiert bei 27 °C): farbloses Wachstum trägt Luft-Hyphen von weisser Farbe bis schwach rötlich-brauner Farbe [5 ec, Dusty Peach] bis rötlich-grauer Farbe [5 ge, Rosewood]. Es wurde kein lösliches Pigment beobachtet.

(12) Auf Cellulose (inkubiert bei 27 °C): das Wachstum ist farblos. Weder werden Luft-Hyphen gebildet, noch wurde ein lösliches Pigment beobachtet.

(13) Auf Gelatineeinstich: auf leerem Gelatine-Medium (inkubiert bei 20 °C) ist das Wachstum farblos und entwickelt Luft-Hyphen von weisser Farbe und erzeugt ein lösliches Pigment von brauner Farbe. Auf Glucose-Pepton-Gelatine-Medium (inkubiert bei 27 °C) entsteht ein hellgelbes bis hellgelblich-braunes Wachstum mit sich schwach entwickelnden Luft-Hyphen von weisser Farbe und unter Erzeugung eines löslichen Pigmentes von dunkelbrauner Farbe.

(14) Auf Magermilch (inkubiert bei 37 °C): farbloses bis hellgelbes Wachstum trägt wenig Luft-Hyphen von weisser Farbe. Das lösliche Pigment ist sehr schwach braungetönt vom neunzehnten Tag der Inkubation an.

3. Physiologische Eigenschaften

(1) Temperatur für Wachstum:

Das Wachstum auf Stärke-Hefe-Agar (enthaltend 1,0% lösliche Stärke, 0,2% Hefeextrakt und 3,0% Agar, pH 7,0 bis 7,2) wurde bei 20 °C, 24 °C, 27 °C, 30 °C, 37 °C und 50 °C untersucht. Der Stamm MD4-CI wuchs bei allen untersuchten Temperaturen ausser bei 50 °C. Die optimale Temperatur für ein gutes Wachstum wurde in der Nähe von 27 bis 37 °C festgestellt.

(2) Verflüssigung von Gelatine:

Leeres Gelatinemedium (15%) wurde nicht verflüssigt, wenn es bei 20 °C inkubiert wurde. Die Gelatine (15%) in Glucose-Pepton-Gelatine-Medium begann sich vom fünften Tag der Inkubation an zu verflüssigen, wenn es bei 27 °C inkubiert wurde, und der Grad der Verflüssigung war mittel bis schwach.

(3) Hydrolyse von Stärke:

Die Stärke in einem anorganischen Salze-Stärke-Agar-Medium und in Stärke-Agar-Medium wurde etwa vom fünften Tag der Inkubation an hydrolysiert, wenn die Inkubation bei 27 °C stattfand, und der Grad der Hydrolyse war mittel.

(4) Koagulation und Peptonisierung von Magermilch:

Die Koagulation von Magermilch begann nicht, aber die Peptisierung begann von etwa dem zwölften Tag der Inkubation an, wenn bei 37 °C inkubiert wurde. Der Grad der Peptonisierung war mittel.

(5) Bildung von Melanoidpigmenten:

Die Bildung von Melanoidpigmenten wurde auf Trypton-Hefeextrakt-Brühe (ISP No. 1 Medium) und auf Pepton-Hefeextrakt-Eisenagar (ISP No. 6 Medium) beobachtet, wenn bei 27 °C inkubiert wurde. Keine Pigmentierung wurde beobachtet auf Tyrosin-Agar (ISP No. 7 Medium).

(6) Verwendung von Kohlenstoffquellen für Wachstum:

Die Verwendung der unten erwähnten Kohlehydrate wurde in Pridham-Gottlieb-Agar-Medium (ISP No. 9 Medium) geprüft, wenn bei 27 °C inkubiert wurde.

Glucose wurde für das Wachstum verwertet, aber L-Arabinose, D-Xylose, D-Fructose, Saccharose, Inositol, L-Rhamnose, Raffinose und D-Mannitol wurden nicht verwertet.

(7) Verflüssigung von Calciummalat:

Calciummalat in Calciummalat-Agar-Medium wurde um das Wachstum herum etwa vom zehnten Tag der Inkubation an verflüssigt, wenn bei 27 °C inkubiert wurde. Der Grad an Verflüssigung war mittel bis stark.

(8) Reduktion von Nitrat:

Die Reduktion von Nitrat wurde in wässriger Peptonlösung, welche 1,0% Kaliumnitrat enthielt (ISP No. 8 Medium), nicht beobachtet, wenn bei 27 °C inkubiert wurde.

Unter Zusammenfassung der oben erwähnten Eigenschaften des Stammes MD4-CI wird festgestellt, dass dieser Stamm zur Gattung *Streptomyces* gehört und dass die Luft-Hyphen Spiralen bilden, aber keine Wirbel entwickeln. Die Oberfläche der Sporen ist glatt bei mikroskopischer Beobachtung. Auf verschiedenen Medien weist das Wachstum eine Farbe von farblos bis hellgelb oder hellgelblich-braun auf, unter Bildung von Luft-Hyphen von rötlich-grauer Farbe bis rose-grauer Farbe bis leuchtend braun-grauer Farbe, jedoch ohne Bildung von löslichem Pigment. Die Bildung von Melanoid-Pigmenten ist positiv auf Trypton-Hefeextrakt-Brühe und auf Pepton-Hefeextrakt-Eisenagar-Medium, jedoch negativ auf Tyrosin-Agar-Medium. Die Proteolyse und die Stärkehydrolyse sind von mittlerem Grad.

Unter Berücksichtigung der oben erwähnten Eigenschaften wird der Stamm MD4-CI mit bekannten analogen Arten von *Streptomyces* verglichen unter Bezugnahme auf die Beschreibungen der International Streptomyces Project (ISP). Es wurde gefunden, dass der Stamm MD4-CI am ähnlichsten dem *Streptomyces lavendulae* ist (siehe «Journal of Systematic Bacteriology», Band 18, Seite 138 (1968), im folgenden als Literatur No. 1 bezeichnet; und Waksman «The Actinomycetes», Band 2, Seite 234, im folgenden als Literatur No. 2 bezeichnet) sowie dem *Streptomyces avidinii* (siehe «Journal of Systematic Bacteriology», Band 22, Seite 276 (1972), im weiteren als Literatur No. 3 bezeichnet, und «Antimicrob. Ag. Chemother.», Seite 20 (1963), im folgenden als Literatur No. 4 bezeichnet). Diese beiden bekannten Arten wurden erhalten und direkt mit dem Stamm MD4-CI verglichen. Eine Zusammenstellung der Resultate dieses Vergleiches ist in der folgenden Tabelle enthalten.

Wie aus der obigen Tabelle I ersichtlich ist, ist der Stamm MD4-CI sehr ähnlich dem *Streptomyces lavendulae* ISP 5069 und dem *Streptomyces avidinii* ISP 5526. Unter den Stämmen, welche das Antibiotikum MSD-235 erzeugen, unterscheidet sich *Streptomyces avidinii* von *Streptomyces lavendulae* dadurch, dass das erstere Luft-Hyphen bildet, welche eine Grautönung aufweisen. Soweit die Resultate der obigen Vergleiche und die Beschreibungen der Literaturen No. 1 und 3 betroffen sind, ist der Unterschied der Farbe der Luft-Hyphen nicht von Bedeutung zur Unterscheidung von *Streptomyces avidinii* von *Streptomyces lavendulae*. Grössere Unterschiede zwischen diesen beiden Arten bestehen nur darin, ob die Bildung von Melanoid-Pigment und die Koagulation von Milch beobachtet wird oder nicht. Diese beiden Arten gelten jedoch als sehr nahe miteinander verwandt, da die oben erwähnten Unterschiede nicht den entscheidenden Faktor zur Unterscheidung von einer Art der Gattung *Streptomyces* von einer anderen Art bilden.

Es wurde gefunden, dass der Stamm MD4-CI ein bekanntes Antibiotikum, nämlich Streptothricin, bildet, und der Stamm MD4-CI stimmt mit *Streptomyces lavendulae* gut überein mit Ausnahme der Tatsache, dass sie bezüglich

Tabelle I

Eigenschaften	MD4-Cl	Streptomyces lavendulae ISP 5069	Streptomyces avidinii ISP 552
Form der Luft-Hyphen	Spiralen*	Rectiflexible oder Spiralen (Literatur Nr. 1: Retinaculiaperti)	Spiralen* (Literatur Nr. 3: Retinaculiaperti)
Sporenoberfläche	glatt	glatt (teilweise unvoll- ständig warzig)	glatt
Farbe der Luft-Hyphen	rötlich-grau bis rosa-grau bis leuchtend braun-grau	rosa-grau bis leuchtend braun-grau	rötlich-grau bis rosa-grau bis bräunlich-grau
Farbe des Wachstums	farblos bis hellgelb bis hellgelblich-braun	farblos bis hellgelblich- braun (teilweise hellolive bis gräulich-olive getönt)	-----
Lösliches Pigment	-----	-----	-----
Bildung von Melanoidpigment auf ISP Nr. 1 Medium	+ (schwach)	+ (schwach)	+ (schwach)
auf ISP Nr. 6 Medium	+	+	+
auf ISP Nr. 7 Medium	-	+	-
Hydrolyse von Stärke	+	+	+
Koagulierung von Milch	-	-	+
Peptonisierung von Milch	+	+	+
Verflüssigung von Gelatine in leerem Gelatinemedium	-	-	-
in Glucose-Pepton-Gelatine- Medium	+	+	+
Reduktion von Nitrat	-	-	-
Verwertung von Kunststoff- quelle			
Glucose	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
D-Fructose	-	-	± (Literatur Nr. 3: +)
Saccharose	-	-	-
Inositol	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-
Raffinose	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-
Erzeugte Antibiotica	Streptothricin	Streptothricin, MSD-235	MSD-235

Anmerkungen: «±» bedeutet mögliche Nicht-Verwertung.

* es wurde keine Bildung von Spiralen in ISP Nr. 5 Medium beobachtet.

der Bildung von Melanoid-Pigment voneinander verschieden sind. Andererseits stimmt der Stamm MD4-Cl mit Streptomyces avidinii in jeder Beziehung überein, mit Ausnahme der Tatsache, dass der Erstgenannte keine Koagulation von Milch hervorruft.

In Anbetracht des oben Genannten wird festgestellt, dass der Stamm MD4-Cl zu einer Gruppe von Streptomyces lavendulae gehört, und der Stamm MD4-Cl wird nunmehr als Streptomyces lavendulae MD4-Cl bezeichnet.

Eine Mutation von Actinomyceten tritt oft entweder unter künstlichen oder unter spontanen Bedingungen ein. Der erfindungsgemäss verwendete Streptomyces lavendulae MD4-Cl umfasst daher alle möglichen Mutanten. Ferner erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung aller Stämme der Art Streptomyces, welche Esterastin erzeugt.

Esterastin kann durch aerobe Züchtung von Sporen oder Mycelien eines Esterastin erzeugenden Stammes der Gattung Streptomyces, wie z. B. dem Stamm Streptomyces MD4-Cl (identifiziert als FERM-P 3723 oder ATCC No. 31336) erzeugt werden. Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens wird eine Menge an Sporen oder Mycelien eines Esterastin erzeugenden Stammes in ein geeignetes Kulturmedium geimpft, welches assimilierbare Kohlenstoff- und

Stickstoffquellen enthält, und anschliessend unter aeroben Bedingungen, vorzugsweise unter submersen aeroben Bedingungen, inkubiert, so dass Esterastin in der Kulturbrühe erzeugt und angesammelt wird. Im allgemeinen können Nährstoffbestandteile von Kulturmedien, welche üblicherweise für die Züchtung von gewöhnlichen Actinomycetes eingesetzt werden, für die Zwecke der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Beispielsweise können handelsübliches Glycerin, Glucose, Lactose, Saccharose, Stärke, Maltose, Melassen und andere Kohlehydrate sowie Fett und Öl als Kohlenstoffquellen verwendet werden. Im Handel erhältliches Pepton, Fleischextrakt, Baumwollsaamenmehl (z. B. Pharma-Media), Erdnussmehl, Soyabohnenmehl, Hefeextrakt, N-Z-Amin, Casein, L-Asparagin, Natriumnitrat, Ammoniumnitrat, Ammoniumsulfat und dergleichen können als Stickstoffquellen nützlich sein. Ausserdem können Natriumchlorid, Phosphat, Calciumcarbonat, Magnesiumsulfat und andere anorganische Salze als Salzzusatz im Kulturmedium verwendet werden. Andere Metallsalze und verschiedene Schwermetallsalze können ebenfalls in Spuren zugesetzt werden, falls erforderlich, sofern sie durch den Esterastin erzeugenden Stamm verwertet werden und die Erzeugung von Esterastin nicht beeinträchtigen. Alle Nährmittel, welche für die Züchtung von Actinomyceten bekannt

sind, können im erfindungsgemässen Verfahren verwendet werden, sofern sie durch den Esterastin erzeugenden Stamm für die Erzeugung von Esterastin assimilierbar sind.

Insbesondere wird Glycerin als Kohlenstoffquelle und Baumwollsamemehl, L-Asparagin und dergleichen als Stickstoffquelle bevorzugt. Ein Kulturmedium, welches 1,5% Glycerin, 1,5% Baumwollsamemehl, 0,2% L-Asparagin und 0,3% Natriumchlorid enthält, wird bevorzugt.

Für die Erzeugung von Esterastin in grossem Massstab wird die Flüssig-Kultur bevorzugt. Jede Temperatur, bei welcher der Esterastin erzeugende Stamm befähigt ist, zu wachsen und Esterastin zu erzeugen, kann für die Züchtung verwendet werden, doch liegt eine besonders bevorzugte Inkubationstemperatur im Bereich von 25 bis 35 °C. Die Kultivierung wird während genügend langer Zeit fortgesetzt, um eine genügende Menge an Esterastin im Kulturmedium oder der Kulturbrühe zu erzeugen und anzusammeln. Beispielsweise erreicht die Produktion und Anreicherung von Esterastin ein Maximum am Ende der Inkubation während 2 bis 4 Tagen, wenn ein Kulturmedium, welches 1,5% Glycerin, 1,5% Baumwollsamemehl, 0,2% L-Asparagin und 0,3% Natriumchlorid (pH 7,4) enthält, zubereitet und sterilisiert wurde, gefolgt von der Impfung mit Sporen und Mycelien, welche aus einer Schrägkultur des Stammes MD4-CI erhalten worden waren, und durch Züchtung unter Schütteln bei 27 °C unter aeroben Bedingungen.

Die Bestimmung der Esterastin-Menge kann durchgeführt werden, indem man die Fähigkeit von Esterastin, Esterase zu inhibieren, bestimmt gemäss einer Modifikation der Methode von Yasunori Kobayashi, beschrieben in «Seikagaku», Band 36, Seite 335 (1964). So wird ein im Handel erhältliches rohes Lipase-Präparat, welches aus Schweinepancreas erhalten wurde, in einer Konzentration von 0,5 Gewichtsprozent in einer 0,05M mit Phosphat gepufferten Lösung (pH 7,0), welche 0,2% «Triton X-100» (Markenbezeichnung für ein Emulgiermittel, welches aus Polyäthylenglykolalkylphenyläther besteht und ein Produkt von Rohm & Haas Co., USA ist) aufgelöst, 0,03 ml dieser Lipase-Lösung, 2,92 ml 0,05M Phosphatpufferlösung (pH 7,0) und 0,025 ml einer Lösung, welche eine zu bestimmende Esterastin-Probe enthält, werden zusammen vermischt und das erhaltene Gemisch (2,975 ml) wird während 3 Minuten auf 20 °C erwärmt und anschliessend mit 0,025 ml einer Lösung vermischt, welche 10 mg/ml p-Nitrophenylacetat in Methanol enthält, um die Reaktion von p-Nitrophenylacetat mit Lipase in Gang zu bringen. Nachdem die Reaktion während 30 Minuten bei 20 °C stattgefunden hat, wird die Absorption (a) bei 400 nm der erhaltenen Reaktionslösung gemessen. Andererseits wird die Absorption (b) bei 400 nm einer Kontrollreaktionslösung bestimmt, welche in einem Kontrollversuch unter denselben Bedingungen wie oben unter Verwendung einer 0,05M Phosphatpufferlösung, welche kein Esterastin enthielt, erhalten wurde. Der Grad (Prozent) an Inhibition gegenüber Esterase wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(b-a)}{b} \times 100$$

Gemäss dieser Untersuchungsmethode wies das farblose Esterastinpulver (das Produkt des nachfolgenden Beispiels 7) eine derartige Wirksamkeit auf, dass seine ID_{50} , d. h. die Dosis, welche 50%ige Inhibition gegenüber Esterase erzielte, 0,0002 mcg/ml betrug.

Esterastin kann sowohl durch eine Tankkultivierungsmethode, wie durch ein Schüttelkultivierungsmethode erzeugt werden. So können z. B. 250 bis 300 Liter eines flüssigen

Kulturmediums, welches 1,5% Pharma-Media, 15% Glycerin, 0,3% Natriumchlorid und 0,2% L-Asparagin enthält, in einen Fermentiertank von 570 Liter Fassungsvermögen eingefüllt und anschliessend sterilisiert werden, worauf das Medium mit einer Schrägkultur des Stammes MD4-CI auf ein Inoculummass von 10% beimpft wurde, während sterile Luft mit einer Geschwindigkeit von 250 bis 300 Liter/Minute in das Medium eingeführt wurde, das seinerseits durch einen mit 200 Touren pro Minute rotierenden Rührer in Bewegung gehalten wurde. Die Inkubationstemperatur betrug 27 °C. In diesem Versuch erreichte die Bildung von Esterastin ein Maximum am Ende von 48 bis 72 Stunden Inkubation.

Das erzeugte Esterastin ist in der Fermentationsbrühe und in den Mycelien des Stammes MD4-CI vorhanden. Zur Gewinnung des Esterastin aus der Kultur des Stammes MD4-CI kann die Fermentationsbrühe filtriert werden, und der Filterkuchen, welcher das esterastinhaltige Mycelium enthält, kann mit einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Methanol, Äthanol und Aceton, extrahiert werden. Um das Esterastin aus den Mycelien zu gewinnen, kann der Mycelienkuchen zweimal mit einem 5- bis 20fachen Volumen an Methanol extrahiert werden, so dass das Esterastin aus den Mycelien in die Methanolphase übergeführt werden kann. Der erhaltene methanolische Extrakt kann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft werden, und der Rückstand kann mit einem organischen Lösungsmittel, welches ein hohes Lösungsvermögen für Esterastin aufweist, z. B. Chloroform, Aceton, Benzol, Butylacetat und Äthylacetat extrahiert werden. Wenn ein grosses Volumen an Myceliumkuchen behandelt wird, ist es zweckmässig, den Myceliumkuchen mit Methanol zu extrahieren, den methanolischen Extrakt unter vermindertem Druck zur Trockene einzudampfen, den erhaltenen Rückstand mit Chloroform oder einem anderen organischen Lösungsmittel zu extrahieren, den erhaltenen Extrakt unter vermindertem Druck zur Trockene zu verdampfen und das erhaltene rohe Esterastinpulver mit Butylacetat und Wasser nach einer bekannten Lösungsmittelverteilungsmethode zu behandeln, so dass Esterastin von hoher Reinheit in die Butylacetatphase übergeht.

Um Esterastin aus der Fermentationsbrühe zu gewinnen, wird die Fermentationsbrühe, welche die Mycelien enthält, als solche unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, und der feste Rückstand wird sodann mit einem organischen Lösungsmittel, welches ein hohes Lösungsvermögen für Esterastin aufweist, wie z. B. Methanol, Äthanol, Dimethylsulfoxid, Aceton, Butylacetat und Chloroform, extrahiert, so dass das Esterastin in das organische Lösungsmittel übergeht. Wenn Esterastin aus einem grossen Volumen an Fermentationsbrühefiltrat gewonnen werden soll, ist es zweckmässig, das Filtrat mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel, welches ein hohes Lösungsvermögen für Esterastin aufweist, z. B. Butylacetat, zu extrahieren, und dadurch das Esterastin in die organische Lösungsmittelphase, z. B. Butylacetatphase, überzuführen. Wenn die Fermentationsbrühe zweimal mit etwa einem halben Volumen an Butylacetat extrahiert wird, ist es üblich, dass praktisch die ganze im Fermentationsbrühefiltrat vorhandene Menge an Esterastin in die Butylacetatphase übergeführt und aufgelöst werden kann. Die Extraktion und Reinigung von Esterastin kann auch nach einem bekannten Gegenstromverteilungsverfahren unter Verwendung von zwei Lösungsmitteln, welche Esterastin auflösen, aber miteinander nicht mischbar sind, erfolgen. Wenn der derart erhaltene Extrakt von Esterastin in Butylacetat unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft wird, entsteht ein rohes Pulver, welches Esterastin enthält.

Es ist ferner möglich, das Esterastin in günstiger Ausbeute aus einer Lösung zu gewinnen, welche Esterastin darin gelöst enthält, indem diese Lösung mit einem Adsorbierungsmittel behandelt wird, um die Adsorption von Esterastin zu bewirken, und dann das Adsorbierungsmittel entsprechend behandelt wird, um das Esterastin daraus zu desorbieren. Als geeignetes Adsorbens für diese Zwecke kann ein organisches Adsorbierungsmittel, wie «Amberlite XAD» (ein nicht-ionogenes, hochporöses Harz, von Rohm & Haas Co., USA) und ein anorganisches Adsorbierungsmittel, wie Aktivkohle, Aluminiumoxid, Siliciumoxid und Magnesiumsilicat («Frorigil») verwendet werden. Beispielsweise kann Esterastin an Silicagel adsorbiert und daraus unter Verwendung von Chloroform-Methanol (Volumverhältnis 80:1) eluiert werden. Wenn ein rohes Pulver von Esterastin, welches durch Extraktion der Mycelien des Stammes MD4-CI mit Methanol, Eindampfen des methanolischen Extraktes zur Trockene, Extraktion des Rückstandes mit Butylacetat und Eindampfen des Butylacetatextraktes zur Trockene erhalten wurde, an Silicagel chromatographiert wird und anschliessend mit Chloroform-Methanol (80:1) eluiert wird, kann Esterastin in einer Ausbeute von 90% oder mehr gewonnen werden.

Für die Reinigung des Esterastins ist es wirksam, ein rohes Esterastinpulver der Chromatographie an Silicagel zu unterwerfen. Beispielsweise kann praktisch reines Esterastin erhalten werden durch Behandlung eines rohen Esterastinpulvers mittels Chromatographie an trockenem Silicagel und Eluierung mit Äthylacetat als Entwickler. Derart erhaltenes praktisch reines Esterastin kann weiter gereinigt werden durch Umfällung aus einem geeigneten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch, wie Chloroform-Petroläther, so dass reines Esterastin in Form eines farblosen Pulvers isoliert werden kann. Für die Reinigung von Esterastin ist es auch zweckmässig, die Chromatographie mit Hilfe von «Sephadex LH-20» (ein Gel-Filtriermittel der Pharmacia Co., Schweden) durchzuführen.

Die physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften des erfindungsgemässen Esterastins werden im folgenden näher beschrieben.

Esterastin in Form eines farblosen Pulvers weist einen Schmelzpunkt von 90 bis 95 °C und eine spezifische optische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ von + 11° (C=1, Chloroform) auf. Die Elementaranalyse ergibt: C 67,04%, H 9,12%, N 5,56% und O 17,90%. Das UV-Absorptionsspektrum von Esterastin in einer Lösung von 0,1 mg/ml Esterastin in Methanol ist in Fig. 1 dargestellt und zeigt eine Absorptionsspitze bei 230 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 22,5$).

Das IR-Absorptionsspektrum von Esterastin, in Kaliumbromid tablettiert, ist in Fig. 2 dargestellt und zeigt charakteristische Absorptionsbanden bei den folgenden Wellenzahlen (cm^{-1}): 3470, 3350, 2950, 1840, 1730, 1645, 1610, 1545, 1415, 1375, 1325, 1260, 1225, 1185, 1115, 1040, 1020, 975, 920, 900, 880, 840, 810 und 690.

Das NMR-Spektrum von Esterastin in Deutero-Chloroform, gemessen bei 100 M Hz unter Bezugnahme auf Tetramethylsilan als internen Standard ist in Fig. 3 dargestellt.

Die Massenspektrometrie von Esterastin zeigt eine Molekularionenspitze bei m/e 506. Aus der Molekularionenspitze und den Werten der Elementaranalyse ergibt sich die wahrscheinliche empirische Formel von $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6$ für Esterastin. Diese Formel wurde durch Massenspektrometrie mit hoher Auflösung bestätigt (gefunden: m/e 506, 3364, berechnetes Molekulargewicht für $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6$: 506, 3354).

In den beiliegenden Zeichnungen zeigt:

Fig. 1 das UV-Absorptionsspektrum von Esterastin in Methanollösung,

Fig. 2 das IR-Absorptionsspektrum von Esterastin tablettiert in Kaliumbromid,

Fig. 3 das NMR-Absorptionsspektrum von Esterastin in Deutero-Chloroform bei 100 M Hz.

Esterastin wurde in 6N Salzsäure bei 100 °C während 18 Stunden hydrolysiert, und das erhaltene Hydrolysat wurde einer Aminosäureanalyse unterworfen, wobei Aspartinsäure festgestellt wurde. Esterastin ist leicht löslich in Pyridin, Dimethylsulfoxid, Methanol, Äthanol, Aceton, Äthylacetat, Butylacetat, Chloroform und Benzol, aber praktisch unlöslich in Wasser, Petroläther und Hexan. Esterastin reagiert positiv auf die Rydon-Smith-Reaktion, die Dragendorff-Reaktion und die Joddampf-Reaktion, jedoch negativ auf die Ehrlich-Reaktion, die Ninhydrin-Reaktion und Sakaguchi-Reaktion.

In einem Dünnschichtsilicagel-Chromatogramm auf silica Gel G» ergibt Esterastin einen Rf-Wert von 0,6, wenn das Chromatogramm mit Chloroform-Methanol-Wasser (10:1:0,05 entwickelt wird, und einen Rf-Wert von 0,2, wenn mit Äthylacetat entwickelt wird. Esterastin bewegt sich nicht in einer Hochspannungs-Papierlektrophorese (3500 Volt, 15 Minuten unter Verwendung von Ameisensäure-Essigsäure-Wasser (25:75:900).

Das erfindungsgemässe Esterastin weist eine ausserordentlich geringe Toxizität auf, wie aus der Tatsache ersichtlich ist, dass keinerlei Toxizität beobachtet wurde, wenn eine Dosis von 250 mg/kg durch intraperitoneale Injektion an Mäuse verabreicht wurde zwecks Bestimmung der akuten Toxizität. Wie oben beschrieben, weist Esterastin in einer Konzentration von 0,0002 mcg/ml eine 50%ige Inhibition (ID_{50}) gegenüber Esterase aus Schweinepancreas auf. Als bekannte Substanzen, welche Esterase hemmen, können Paradoxon und Diisopropylfluorophosphat usw. genannt werden, welche hochtoxische Verbindungen sind. Demgegenüber ist Esterastin nicht toxisch und hemmt die Wirksamkeit von Esterase in einem solchen Mass, dass Esterastin in einer so niederen Menge wie $4,1 \times 10^{-11}\text{M}$ eine 50%ige Inhibition der Esterase ergibt, bestimmt unter Verwendung von p-Nitrophenylacetat als Substrat. Auch in dieser Beziehung kann bestätigt werden, dass Esterastin eine neue Substanz darstellt.

Aus weiteren Untersuchungen wurde gefunden, dass Esterastin eine Wirkung auf die Immunoempfindlichkeit beim lebenden Tier ausübt.

Die Wirkung von Esterastin auf die Immunoempfindlichkeit wurde wie folgt untersucht:

(1) Wirkung auf die Bildung von humoralem Antikörper. Gruppen von dd/Y-Mäusen (5 weibliche Mäuse pro Gruppe, 6 bis 8 Wochen alt) wurden mit 10^8 roten Blutzellen von Schafen als Antigen (in Form einer Suspension in physiologischer Kochsalzlösung) immunisiert durch intravenöse Injektion zwecks Entwicklung der Immunität. Gleichzeitig wurde 1 mg bzw. 250 mcg, 62,5 mcg oder 15,6 mcg Esterastin (in Form einer Suspension in 1%iger DMSO-Kochsalzlösung) pro Maus intraperitoneal an die einzelnen Mäusegruppen verabreicht. An den 4 Tagen nach der Immunisierung wurden die behandelten Mäuse getötet, die Milz isoliert und die Anzahl der Antikörper bildenden Zellen in jeder Mausmilz nach der Methode von Jerne (siehe N. K. Jerne, A. A. Nordin und C. Henry: «The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. Cell-bound Antibodies.» Ed. B. Amos und H. Koprowski, Seiten 109 bis 122, Wister Institute Press, Philadelphia, 1963) bestimmt. Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II
Wirkung von Esterastin auf die Bildung von Antikörpern

Antigen	Dosis Esterastin pro Maus	Anzahl Antikörper bildender Zellen pro Milz (\pm S.E. **)
10 ⁸ SRBC*	0	170,000 \pm 10,400
10 ⁸ SRBC*	1 mg	45,300 \pm 3,300
10 ⁸ SRBC*	250 mcg	52,000 \pm 2,300
10 ⁸ SRBC*	62,5 mcg	55,000 \pm 5,700
10 ⁸ SRBC*	15,6 mcg	173,000 \pm 19,600

* SRBC bedeutet rote Blutzellen von Schafen.

** S.E. bedeutet übliche Abweichung (Standard Error).

Aus den Resultaten der obigen Tabelle ist ersichtlich, dass die Verabreichung von 1 mg bis 62,5 mcg Esterastin an Mäuse die Anzahl Antikörper bildenden Zellen merklich herabsetzt.

(2) Wirkung auf durch Zellen vermittelte Immunität (cell-mediated immunity).

Die Wirkung von Esterastin auf die cellulare Immunität wurde nach der bekannten «delayed Type Hypersensitivity» Methode (D.T.H.) untersucht (siehe P.H. Lagrange, G.B. Mackaness und T.E. Mille: «J. Exp. Med.», 139, 1529 bis 1539 (1974)) unter Verwendung von Mäusen, welche mit roten Blutzellen von Schafen als Antigen immunisiert worden war.

So wurden 10⁸ rote Blutzellen von Schafen, suspendiert in 0,05 ml physiologischer Kochsalzlösung, durch subcutane Injektion in die eine Seite eines hinteren Fussballens von dd/Y-Mäusen (5 Mäuse pro Gruppe, weiblich, 6 Wochen alt) immunisiert, um eine verzögerte Hypersensitivität zu erzielen. Gleichzeitig mit dieser Immunisierung wurde 1 mg/Maus bzw. 250 mcg/Maus, 62,5 mcg/Maus oder 15,6 mcg/Maus Esterastin intraperitoneal jedem Testtier injiziert. 4 Tage später wurden 10⁸ rote Blutzellen von Schafen subcutan in die andere Seite des Fussballens von jeder Testmaus injiziert, um die D.T.H.-Reaktion (D.T.H. response) hervorzurufen. 24 Stunden nach dieser Injektion wurde die Dicke des Fussballens in Millimetern gemessen, um den Grad des Anschwellens des Fussballens, welcher die auslösende Injektion von roten Schafblutzellen erhielt, zu bestimmen. Das Ausmass der Schwellung des Fussballens dient als Mass für die Einschätzung der cellularen Immunität. Die erhaltenen Testresultate sind in der untenstehenden Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III
Wirkung von Esterastin auf das Auftreten von D.T.H. gegenüber SRBC bei Mäusen

Immunisierung	Dosis an Esterastin	Auslösende Injektion Immunisierung	Zunahme der Fussballendicke (\times 0,1 mm)
10 ⁸ SRBC	(Kontrolle)	10 ⁸ SRBC	8,0
10 ⁸ SRBC	1 mg	10 ⁸ SRBC	3,8
10 ⁸ SRBC	250 mcg	10 ⁸ SRBC	3,0
10 ⁸ SRBC	62,5 mcg	10 ⁸ SRBC	6,2

Anmerkung: SRBC bedeutet rote Blutzellen von Schafen.

Aus den Resultaten der obigen Tabelle ist ersichtlich, dass die Verabreichung von 1 mg bis 250 mcg Esterastin bei Mäusen die Entwicklung von D.T.H. merklich herabsetzt und dass daher Esterastin auch eine suppressive Wirkung auf die cellulare Immunität ausübt.

Aus weiteren Untersuchungen wurde gefunden, dass Esterastin in keiner Konzentration von 10 mcg/ml keine Zelltoxizität auf gezüchtete Zellen aufweist. Wie oben erwähnt, ergibt eine Dosierung von 250 mg/kg Esterastin keinerlei Symptom der Toxizität bei der Untersuchung der akuten Toxizität in Mäusen.

Diese und die zuvor erwähnten Resultate zeigen, dass Esterastin als immunosuppressives Arzneimittel nützlich ist, welches mit hoher Sicherheit verwendet werden kann aufgrund der Tatsache, dass Esterastin in einer völlig anderen Weise als die bisher bekannten immunosuppressiven Arzneimittel, wie z. B. 6-Mercaptopurin, Azathiopurin, Cyclophosphamid und Corticosteroide, funktioniert, von welchen die Zelltoxizität hoch ist und zu ihrer Wirkung als Unterdrücker der Immunität bei Tieren beiträgt. Aus diesen Gründen kann Esterastin als Heilmittel für die Behandlung zahlreicher schwerer Erkrankungen verwendet werden, wie z. B. Kontaktallergiedermatitis, systematischer Lupus erythematosus, autoimmune hämolytische Anämie, Periarteritis nodosa, Myasthenia gravis, Arthritis, Rheumatismus und Multiple Sclerose. Esterastin kann ferner als Mittel verwendet werden, um das Symptom des Abstossens bei Transplantationen innerer Organe, wie Herz und Niere, zu unterdrücken.

Gemäss der vorliegenden Erfindung wird daher ein immunosuppressives Arzneimittel geliefert für die Herabsetzung der Immunreaktion bei Tieren, einschliesslich Mensch, welches eine wirksame Menge Esterastin als aktiven Bestandteil zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger für den aktiven Bestandteil enthält.

Das erfindungsgemässe immunosuppressive Arzneimittel kann zu einer üblichen, oral verabreichbaren Form verarbeitet werden, wie Tabletten, Kapseln, Pulver, Lösungen und Suspensionen, entweder durch Vermischen einer Menge Esterastin mit einem üblichen pharmazeutisch annehmbaren festen Träger, wie Stärke, Saccharose, Talk und Calciumcarbonat, oder durch Auflösen oder Suspendieren einer Menge Esterastin in einem pharmazeutisch annehmbaren flüssigen Träger, wie Äthanol und Wasser. Das Mengenverhältnis von Esterastin zum festen oder flüssigen Träger kann je nach der Form der hergestellten oral zu verabreichenden Formulierung gewählt werden, und das Gewichtsverhältnis beträgt im allgemeinen von 1:1 bis 1:100.

Das erfindungsgemässe immunosuppressive Arzneimittel kann auch zu injizierbaren Lösungen oder Suspensionen verarbeitet werden durch Auflösen oder Suspendieren von Esterastin in einer geeigneten Menge von 0,1 bis 10 Gewichtsprozent in einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem anderen üblichen pharmazeutisch annehmbaren flüssigen Träger, wie Ringer-Lösung, mit oder ohne Zusatz eines geeigneten Dispergiermittels. Die derart erhaltene injizierbare Lösung oder Suspension kann z. B. intravenös, intramuskulär oder intraperitoneal injiziert werden.

Es ist zu beachten, dass die jeweils bevorzugte Dosierung an Esterastin je nach der Zusammensetzung des Mittels, der Art der Verabreichung und der zu behandelnden Krankheit variiert. Zahlreiche Faktoren, welche die Wirkung des erfindungsgemässen Arzneimittels beeinflussen, müssen vom Fachmann in Betracht gezogen werden, wie z. B. Alter, Körpergewicht, Geschlecht, Diät, Zeitpunkt der Verabreichung, Verabreichungsweg, Ausscheidungsgeschwindigkeit, Arzneimittelkombinationen, Reaktionsempfindlichkeiten und Grad der Erkrankung. Im allgemeinen können etwa 0,5 mg/kg bis etwa 100 mg/kg Esterastin einer erwachsenen Person täglich verabreicht werden. Optimale Dosierungen für einen gegebenen Zustand eines Patienten können vom Fachmann mittels üblicher Dosierungsbestimmungsuntersuchungen unter Berücksichtigung der obigen Richtlinien und unter Be-

rücksichtigung früherer Erfahrungen, wie sie bei der Bestimmung geeigneter Dosierungen für die bereits bekannten immunosuppressiven Arzneimittel, wie «Immuran» (6-Mercaptopurin) gewonnen wurden, festgestellt werden.

Beispiel 1

Eine Oese voll einer Schrägkultur des Stammes *Streptomyces MD4-Cl* (identifiziert als FERM-P 3723 oder ATCC No. 32336) als Esterastin erzeugendem Stamm wurde in 15 Liter eines Kulturmediums geimpft, welches 1,5% Glycerin, 1,5% Baumwollsaamenmehl, 0,2% L-Asparagin und 0,3% Natriumchlorid enthielt und in 100-cm³-Portionen in Drehkolben von 500 cm³ Fassungsvermögen eingefüllt und durch Erhitzen auf 120 °C während 10 Minuten sterilisiert worden war. Die Inkubation wurde während 10 aufeinanderfolgenden Tagen bei 27 °C und mit einer Drehgeschwindigkeit von 180 Touren pro Minute durchgeführt, wobei Proben des inkubierten Mediums in gewissen Zeitabschnitten entnommen wurden und jede Probe auf die Wirksamkeit des Esterastins untersucht wurde, um zu beobachten, wie die Erzeugung des Esterastins während der Inkubationszeit fortschritt. Am zweiten Tag der Inkubation erreicht die Erzeugung von Esterastin ein Maximum, und die Menge an Esterastase hemmender Substanz im Inkubationsmedium wurde auf derselben Höhe bis zum fünften Tag der Inkubation gehalten. Anschliessend fiel der Esterastin-Spiegel langsam ab. Der pH-Wert des inkubierten Mediums veränderte sich von 6,8 am ersten Tag auf 7,2 am zweiten Tag, auf 7,3 am dritten Tag, auf 7,5 am vierten Tag und auf 6,4 am fünften Tag der Inkubation und schwankte anschliessend im Bereich von 8,0 bis 9,0 nach dem sechsten Tag der Inkubation.

Am dritten Tag der Inkubation wurde der grössere Teil des inkubierten Mediums mit Hilfe einer Filterhilfe (Diatomeenerde, im Handel erhältlich unter der Marke «Hyflo-Supercel») filtriert, wobei ein klares Brühenfiltrat (12600 ml) erhalten wurde. Dieses Filtrat wurde untersucht, und es wurde gefunden, dass es die esterastehemmende Substanz in derartiger Menge enthielt, dass 0,0017 ml des Filtrates per Milliliter eine 50%ige Inhibition (ID₅₀) von Esterase ergab. Dieses Brühenfiltrat wurde mit 500 ml Butylacetat vermischt, um die esterastehemmende Substanz daraus zu extrahieren. Die verbleibende wässrige Phase wurde wiederum mit 250 ml Butylacetat extrahiert. Die vereinten Butylacetat-extrakte wurden unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft und ergab 200 mg eines braun gefärbten Pulvers. Die ID₅₀ dieses Pulvers betrug 0,03 mcg/ml, die nach der oben beschriebenen Methode bestimmt wurde. Der Wirkungsgrad der Extraktion der aktiven Substanz aus dem Brühenfiltrat mit Hilfe von Butylacetat betrug etwa 80%.

Beispiel 2

Der Stamm *Streptomyces MD4-Cl* wurde während 3 Tagen inkubiert unter Verwendung des Kulturmediums und der Kulturbedingungen, wie in Beispiel 1 beschrieben. Die erhaltene Fermentationsbrühe wurde filtriert, um den Myceliumkuchen zu entfernen. Der Myceliumkuchen (280 g) wurde zweimal mit Methanol extrahiert, d. h. zuerst mit 1500 ml Methanol und anschliessend mit 500 ml Methanol. Die vereinten methanolischen Extrakte wurden unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft. Der erhaltene feste Rückstand wurde in 500 ml Wasser gelöst und die wässrige Lösung sodann zuerst mit 500 ml und anschliessend mit 200 ml Butylacetat extrahiert, wobei etwa 90% oder mehr des ursprünglich im festen Rückstand vorhandenen Esterastins in Lösung in die Butylacetatphase übergeführt wurde. Die Butylacetat-Extrakte wurden vereint und unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, wobei 3 g eines braunen Pulvers erhalten wurden. Dieses Pulver wies eine solche

Wirksamkeit auf, dass seine ID₅₀ gegenüber Esterase 0,07 mcg/ml betrug.

Beispiel 3

Der Stamm *Streptomyces MD4-Cl* wurde während 3 Tagen unter Verwendung desselben Kulturmediums und derselben Inkubationsbedingungen wie in Beispiel 1 gezüchtet, und das erhaltene Fermentationsbrühenfiltrat (10 Liter) durch eine Säule aus 1 Liter «Amberlite XAD-4» (ein adsorbierendes Harz der Rohm & Haas Co., USA) geleitet, um Esterastin an das Harz zu adsorbieren. Die aus der Harzsäule auslaufende Flüssigkeit wies keinerlei Aktivität zur Hemmung von Esterase auf. Das adsorbierte Esterastin wurde vom Harz zurückgewonnen durch Eluierung mit 2 Liter Methanol. Das methanolische Eluat wurde in 20-g-Fractionen gesammelt, und die aktiven Fractionen wurden vereint und unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, wobei 160 mg eines rohen Esterastin-Pulvers (ID₅₀ = 0,03 mcg/ml) erhalten wurden. Ausbeute: über 90%.

Beispiel 4

Eine Impfkultur, welche durch Inkubieren des Stammes *Streptomyces MD4-Cl* während 3 Tagen im selben Kulturmedium und unter denselben Inkubationsbedingungen wie in Beispiel 1 erhalten worden war, wurde in 400-ml-Portionen in zwei Fermentierkessel von 30 Liter Fassungsvermögen geimpft, von denen jeder 15 Liter eines Kulturmediums enthielt, welches 1,5% Glycerin, 1,5% Baumwollsaamenmehl, 0,2% L-Asparagin und 0,3% Natriumchlorid enthielt und sterilisiert worden war. Die Züchtung im Kessel wurde sodann während 3 Tagen bei 27 °C mit einer Belüftungsgeschwindigkeit von 15 Liter/Minute und mit einer Rührergeschwindigkeit von 250 Touren pro Minute durchgeführt. Auf diese Weise wurde eine Kulturbrühe von solcher Stärke erhalten, dass die ID₅₀ gegenüber Esterase 0,0017 ml/ml betrug. Die beiden Fermentierkessel ergaben im ganzen 30 Liter Kulturbrühe. Die Filtrierung dieser Kulturbrühe ergab 780 g Myceliumkuchen, welcher sodann zweimal mit je 4 Liter Methanol extrahiert wurde. Die vereinten methanolischen Extrakte (total 8 Liter) wurden unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft und ergaben 17,5 g eines rohen Esterastin-Pulvers. Dieses rohe Pulver wurde zweimal der Flüssigkeitsverteilung unterworfen unter Verwendung von 1 Liter Wasser und 1 Liter Butylacetat für jeden Ansatz. Die erhaltenen Butylacetat-Extrakte wurden vereint (total 2 Liter) und unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, wobei 6,5 g eines rohen Esterastin-Pulvers (ID₅₀ = 0,1 mcg/ml) erhalten wurden.

Beispiel 5

Das in Beispiel 4 erhaltene rohe Pulver (6,5 g, ID₅₀ = 0,1 mcg/ml) wurde zuerst mit 200 ml und dann mit 100 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformextrakte wurden vereint und unter vermindertem Druck auf ein Volumen von 100 ml konzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde mit 10 g Silicagel (im Handel erhältlich unter der Marke «Wakogel C-100», ein Produkt der Vako Chemicals Co., Japan) versetzt und das Gemisch unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, so dass das Esterastin durch das Silicagel adsorbiert wurde. Das Esterastin adsorbiert enthaltende Silicagel wurde zuoberst auf eine Chromatographiesäule aus 300 ml Silicagel, welches zuvor mit Chloroform gewaschen worden war, verbracht. Nachdem die ganze Säule mit 3 Liter Chloroform gewaschen worden war, erfolgte die Eluierung unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Chloroform-Methanol (80:1 Volumverhältnis). Das Eluat wurde in 20-g-Fractionen gesammelt, und die Spitzen der esterastehemmenden Wirksamkeit traten in der Nähe der Fractionen

No. 60 bis 160 auf. Diese aktiven Fraktionen wurden unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, um 150 mg eines hellrot gefärbten Pulvers zu ergeben. Dieses Pulver wies eine derartige Wirksamkeit auf, dass die ID_{50} gegenüber Esterase 0,0024 mcg/ml betrug.

Beispiel 6

Das hellrot gefärbte Esterastin-Pulver (150 mg) aus Beispiel 5 wurde in 2 ml Methanol gelöst und anschliessend über eine Säule aus 400 ml «Sephadex LH-20», welche mit Methanol gequollen worden war, chromatographiert. Die Eluierung erfolgte unter Verwendung von Methanol als Eluierungsmittel, und das Eluat wurde in 5-g-Fractionen gesammelt. Die Spitzen der esteraseshemmenden Aktivität erschienen im Bereich der Fraktionen No. 54 bis 66. Diese aktiven Fraktionen wurden unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, um 30 mg eines gelbgefärbten Pulvers zu ergeben. Dieses Pulver wies eine derartige Stärke auf, dass seine ID_{50} gegenüber Esterase 0,0007 mcg/ml betrug.

Beispiel 7

Das gelbe Pulver (30 mg) aus Beispiel 6 wurde in 1 ml Äthylacetat gelöst und die erhaltene Lösung mit 500 mg Silicagel («Wako-gel C-200») versetzt. Das Gemisch wurde unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, so dass das Esterastin durch die Silicagel-Masse adsorbiert wurde. Diese Silicagel-Masse wurde sodann zuoberst auf eine Chromatographiersäule (1,3 cm Durchmesser, 20 cm Höhe) aus trockenem Silicagel verbracht, und die Eluierung wurde mit Äthylacetat als Eluierungsmittel durchgeführt. Das Eluat wurde in 10-g-Fractionen gesammelt, und das Esterastin erschien nur im Bereich der Fraktionen No. 10 bis 17. Diese aktiven Fraktionen No. 10 bis 17 wurden unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, um 7 mg eines farblosen Esterastin-Pulvers vom Schmelzpunkt 90 bis 95 °C zu ergeben. Dieses Pulver wies eine derartige Stärke auf, dass seine ID_{50} gegenüber Esterase 0,002 mcg/ml betrug.

Beispiel 8

Ein Kulturmedium (300 Liter), welches 1,5% Glycerin, 1,5% Baumwollsaamenmehl, 0,3% Natriumchlorid, 0,2% L-Asparagin und 0,005% Antischaummittel (Polyoxyalkylen, im Handel erhältlich unter der Marke «Adecanol» der Asahi Denka Co., Japan) wurde in einen Tank aus rostfreiem Stahl von 570 Liter Fassungsvermögen eingefüllt und anschliessend durch Erhitzen auf 120 °C während 20 Minuten sterilisiert. Dieses sterilisierte Kulturmedium wurde mit 30 Liter einer Impfkultur geimpft, welche durch Inkubieren des Stammes *Streptomyces MD4-C1* (FERM-P 3723) während 2

Tagen bei 27 °C unter Belüftung und Rühren erhalten worden war. Das geimpfte Kulturmedium wurde während 48 Stunden bei 27 °C mit einer Belüftungsgeschwindigkeit von 300 Liter/Minute und einer Rührergeschwindigkeit von 200 Touren pro Minute inkubiert. Die derart erhaltene Fermentationsbrühe wurde filtriert, wobei 34,2 kg Filterkuchen, welcher das Mycelium enthielt, erhalten wurde. Dieser Filterkuchen wurde zweimal mit je 100 Liter Äthanol extrahiert, und die vereinten äthanolischen Extrakte wurden unter vermindertem Druck auf ein Volumen von 6 Liter eingeeengt. Die konzentrierte Lösung wurde zweimal mit je 6 Liter Butylacetat extrahiert. Die Butylacetat-Extrakte wurden vereint und unter vermindertem Druck eingeeengt, wobei 128,2 g eines rohen Esterastin-Pulvers erhalten wurden, welches eine solche Stärke aufwies, dass seine ID_{50} 0,08 mcg/ml betrug.

Beispiel 9

Das in Beispiel 8 erhaltene rohe Esterastin-Pulver wurde auf folgende Weise gereinigt. Das rohe Pulver (128,2 g) wurde in 500 ml Chloroform gelöst, und die erhaltene Lösung wurde durch eine Säule von 1,5 kg Silicagel («Wako-gel C-100») zur Adsorption des Esterastins geleitet. Die Silicagelsäule wurde mit 10 Liter Chloroform gewaschen und anschliessend mit 10 Liter Chloroform-Methanol (Volumverhältnis 100:1) und anschliessend mit Chloroform-Methanol (Volumverhältnis 80:1) eluiert. Die aktiven Fraktionen (2500 ml) des Eluates wurden vereint und unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, wobei 4,83 g eines braungefärbten rohen Pulvers erhalten wurden, welches eine Stärke entsprechend einer ID_{50} von 0,002 mcg/ml aufwies. Dieses rohe Pulver wurde in 20 ml Methanol aufgenommen, und die erhaltene Lösung wurde über eine Säule aus 2 Liter «Sephadex LH-20» geleitet, welche zuvor mit Methanol gequollen worden war. Diese Säule wurde sodann mit 4 Litern Methanol eluiert. Die aktiven Fraktionen des Eluates wurden vereint und unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, wobei 656 mg eines hellgelb gefärbten Pulvers ($ID_{50} = 0,0004$ mcg/ml) erhalten wurden. Dieses Pulver wurde in 5 ml Äthylacetat aufgenommen, und die Lösung wurde durch eine Säule von 250 g Silicagel («Wako-gel C-300») zur Adsorption des Esterastins geleitet. Diese Silicagel-Säule wurde sodann mit Äthylacetat entwickelt, und die aktiven Fraktionen des Eluates wurden vereint (1000 ml) und unter vermindertem Druck zur Trockene verdampft, wobei 351 mg eines farblosen Esterastin-Pulvers erhalten wurden, welches eine Stärke entsprechend einem ID_{50} -Wert (gegenüber Esterase) von 0,0002 mcg/ml aufwies.

FIG. 1

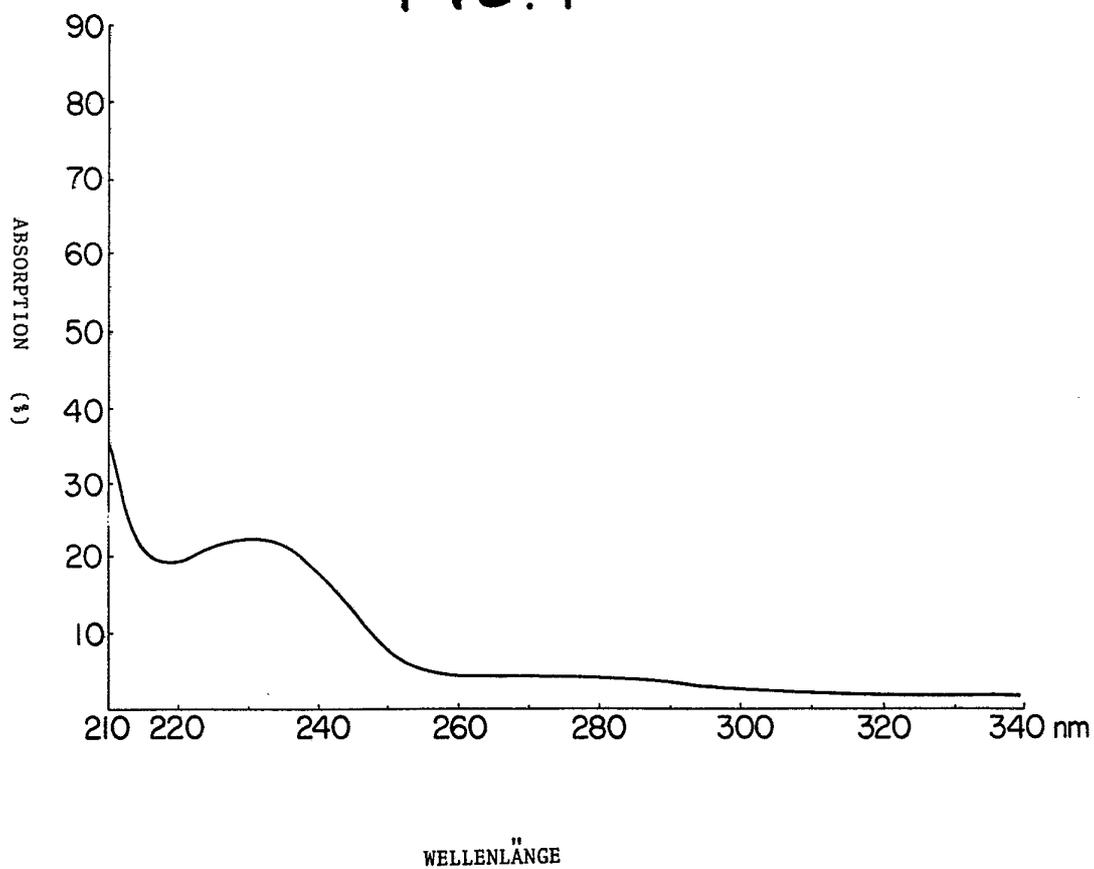
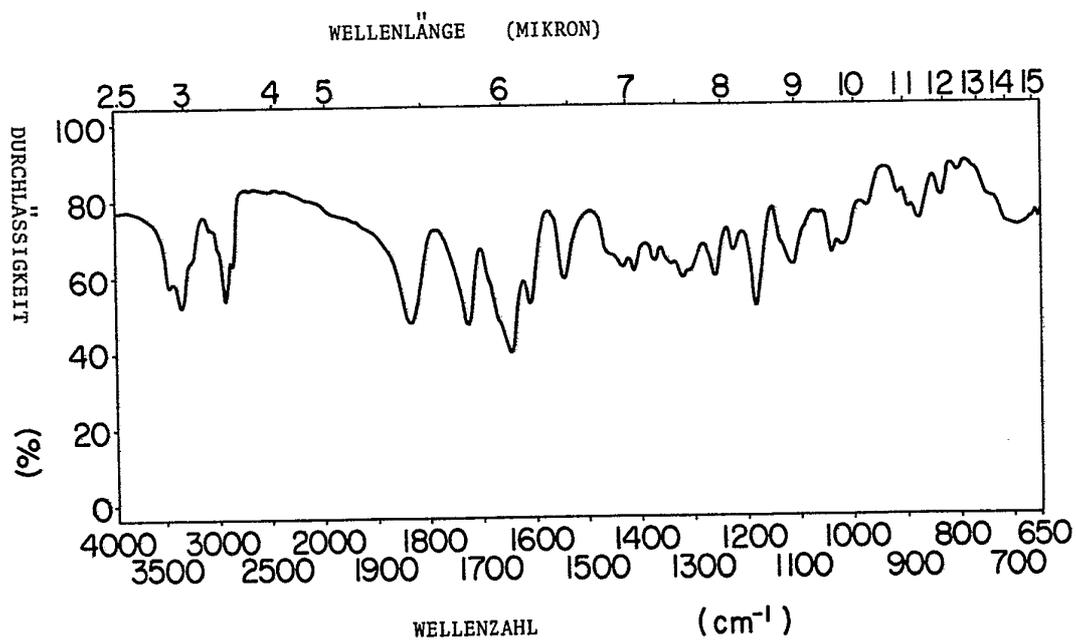
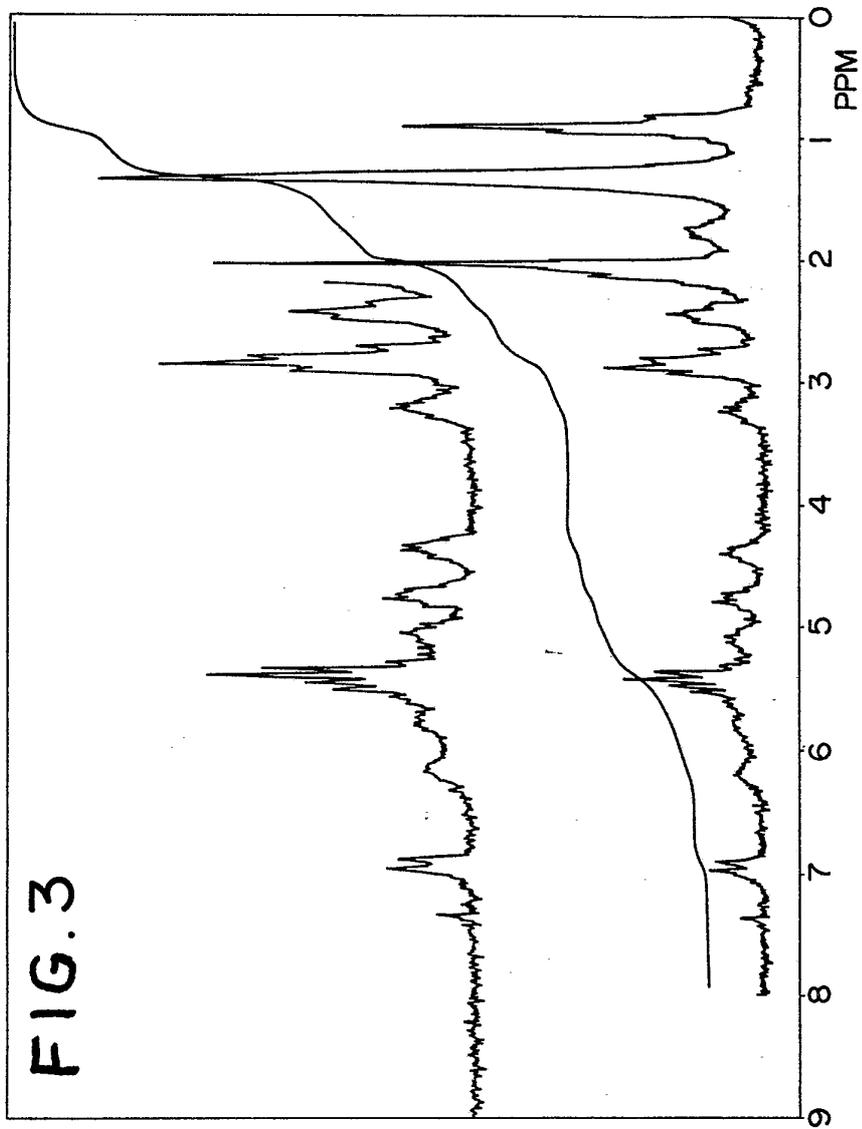


FIG. 2





ABSORPTIONSINTENSITÄT