

revealed no significant differences. Microscopically, synovitis, pannus formation, bone destruction, new bone formation and periarthritis were identified in 11 of the 12 animals given tetracycline. In the Rubidomycin-treated animals the reaction at the site of injection was almost unchanged but the synovitis, cellulitis, periarthritis and bone destruction in the non-injected paws were greatly reduced in extent and intensity (Table).

Discussion. Rats injected with Freund's complete adjuvant intradermally develop a severe, delayed polyarthritides²⁵. The polyarthritis is greatly diminished when the rats are given Rubidomycin from day 4 to day 9 after the injection but is not influenced by tetracycline.

These results are comparable with those obtained with antilymphocytic serum and with anti-inflammatory and immuno-suppressive drugs. Rubidomycin cuts short the anaemia and prevents the leucocytosis normally associated with adjuvant disease²⁶: after concluding treatment there is no evidence of the 'escape' characteristic of steroid

administration¹³. The normality of uric acid levels suggests that white blood cell destruction does not persist after treatment stops. The absence of qualitative differences in serum proteins of treated animals does not exclude the possibility that quantitative differences may be present²⁷.

Résumé. Un nouveau composé anthracyclique à propriétés antibiotiques et cytotoxiques, la Rubidomycine (Daunomycine), a été administré à des rats peu après injection intra-dermique d'adjuvant complet de Freund. Par comparaison avec un groupe témoin qui a été traité avec un autre antibiotique, la tétracycline, non réputé cytotoxique, on a constaté une réduction marquée des lésions systémiques et de l'arthrite de la maladie provoquée par l'adjuvant.

F. QUAGLIATA²⁸, PHILIPPA M. SANDERS²⁹,
and D. L. GARDNER

Division of Experimental Pathology,
Kennedy Institute, London W6 (England),
13 May 1968.

Histological assessment on 5-point scale of response of joints of right and left feet to Rubidomycin and to tetracycline

	Left foot			Right foot		
	Cellulitis	Synovitis	Bone destruction	Cellulitis	Synovitis	Bone destruction
Tetracycline	4.00	3.70	3.33	3.08	2.73	2.20
Rubidomycin	3.75	3.01	2.90	0.75	0.67	0.16

²⁶ E. M. GLENN, J. GRAY and W. KOOVERS, Am. J. vet. Res. 26, 1195 (1965).

²⁷ We are grateful to May and Baker Ltd. for supplies of Rubidomycin.

²⁸ Work conducted during the tenure of a Nuffield Research Fellowship.

²⁹ Junior Fellow, Medical Research Council.

Über die Hemmung des Wachstums von *Lactobacillus casei* durch einige Antiphlogistica¹

Wir stellten fest, dass Verbindungen einer neuen, von uns beschriebenen Klasse von Antiphlogistica der 1,2-Malonyl-4-phenyl-1,2-dihydrocinnolin-Reihe² eine Hemmwirkung auf das Wachstum des *Lactobacillus casei* ausüben. Die Resultate des Vergleiches mit bekannten Antiphlogistica zeigt Tabelle I.

Die Substanzkonzentration, welche das Wachstum um 50% hemmt (ID_{50}) bestimmen wir im allgemeinen im Riboflavin Assay Medium «Difco», mit Zusatz von 0,03 µg Riboflavin/ml. Für die Hemmungsversuche mit den Antimetaboliten 5-Bromuracil, 6-Chlorpurin, 6-Mercaptopurin, 2,6-Diaminopurinsulfat, 8-Azaguanozin und 6-Thioguanin (Tabelle II) verwenden wir das halbsynthetische Medium nach LANDY und DICKEN³ unter Hinzufügen der entsprechenden Wuchsstoffe und Metaboliten. Bebrütung: 24 h bei 37°C. Trübungsmessung: im Lumetron mit Filter 530 nm gegen unbeimpftes Medium als Leerwert.

Für die Herstellung der Hemmstofflösungen werden 50 mg Substanz in 1 ml Wasser bzw. 1 N NaOH (5 ml 1 N NaOH für Scha 306) gelöst und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Die 10fache Verdünnung mit Nährösung ergibt die Ausgangskonzentration von 100 µg/ml.

Unser *L.-casei*-Stamm ATCC 7469 zeigt unbeeinflusstes Wachstum bis zu einem pH von 7,1. Nur bei einem Gehalt von über 50 µg Scha 306/ml werden die Versuche durch die Alkalität der Lösung beeinträchtigt, nicht aber im Bereich niedrigerer Konzentrationen. Bei den restlichen

Verbindungen ist auch in den höchsten geprüften Konzentrationen keine Hemmung des Wachstums durch Alkali zu befürchten, wie Kontrollversuche mit pH-Bestimmung gezeigt haben.

Aus Tabelle I ist zunächst ersichtlich, dass Salicylsäure, Phenylbutazon, Indometacin und Azapropazon (Mi 85)³ praktisch unwirksam, Mefenaminsäure sehr wenig sowie Meclofenaminsäure und Flufenaminsäure mittelmäßig wachstumshemmend sind. In der Reihe der 1,2-Malonyl-4-phenyl-1,2-dihydrocinnoline (Scha-Nummern) finden wir von R' = Propyl bis Hexyl stetig ansteigend eine Hemmwirkung des Wachstums von *L. casei*. Am

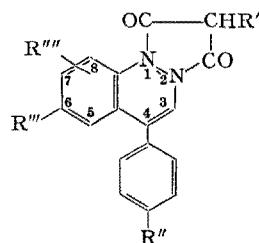
¹ Alexander von Muralt zum 65. Geburtstag gewidmet.

² US-Patent Nr. 3222366 der Siegfried AG vom 7. Dez. 1965 (Erfinder: TH. WAGNER-JAUREGG, F. SCHATZ und U. JAHN). Schweizer Priorität vom 26. Feb. 1963.

³ US-Patent Nr. 3349088 vom 24. Okt. 1967 (Erfinder: I. MOLNAR, TH. WAGNER-JAUREGG, U. JAHN und G. MIXICH). Schweizer Priorität vom 22. Okt. 1963. – U. JAHN und R. ADRIAN, Arzneimittel-Forsch., im Druck. – G. MIXICH, Helv. chim. Acta 51, 532 (1968).

⁴ TH. WAGNER-JAUREGG, U. JAHN und O. BÜCH, Arzneimittel-Forsch. 12, 1160 (1962); Helv. physiol. pharmac. Acta 21, 65 (1963).

⁵ M. LANDY und D. M. DICKEN, J. Lab. clin. Med. 27, 1086 (1942).

Tabelle I. Hemmung des Wachstums von *L. casei* (ATCC 7469) durch bekannte Antiphlogistika und die Substanzen der Strukturformel

Name bzw. Zeichen	R'	R''	R'''	R''''	ID ₅₀ µg/ml	Antiphlogistischer Effekt ^a
Prednisolon					> 100	+
Salicylsäure					> 100	(+)
Phenylbutazon					> 100	+
Indometacin					> 100	+
Azapropazon (Mi 85) ³					> 100	+
Scha 508	i-C ₃ H ₇	H	CH ₃	H	ca. 100	(+)
Mefenaminsäure ^b					86	+
Scha 469	C ₃ H ₇	H	CH ₃	8-CH ₃	58	+
Scha 139	C ₃ H ₇	H	CH ₃	H	28	+
Meclofenaminsäure ^b					25	+
Scha 764	C ₃ H ₇	H	CH ₃	H	21	+
Flufenaminsäure ^b					19	+
Scha 745	C ₃ H ₇	H	CH ₃	7-CH ₃	17	(+)
Scha 87	C ₄ H ₉	H	CH ₃	H	12	+
Scha 443	C ₄ H ₉	H	CH ₃	H	8	(+)
Scha 306 (Na-Salz)					8	+
Scha 791	C ₆ H ₁₁	H	CH ₃	H	8	-
Scha 555	i-C ₆ H ₁₁	H	H	H	7	-
Scha 306 (Cinnopentazon)	C ₆ H ₁₁	H	H	H	6	+
Scha 395	C ₆ H ₁₃	H	H	H	4	-
Scha 541	C ₆ H ₉	H	Cl	8-CH ₃	4	+
Scha 486	C ₆ H ₉	Cl	CH ₃	H	4	(+)
Scha 330	C ₆ H ₉	H	Cl	H	3	+
Scha 392	C ₆ H ₁₁	CH ₃	Cl	H	2	-

^a Ermittelt am Kaolin-, Aerosil- oder Carrageenan-Rattenpfotenödem²⁻⁴. + gut wirksam, (+) mässig wirksam, - unwirksam.^b Wir verdanken diese Präparate der Freundlichkeit von Dr. H. O. J. COLLIER, Parke, Davis & Co., Hounslow, Middlesex (England).

aktivsten erwiesen sich 4 chlorhaltige Verbindungen, mit R' = Butyl oder Pentyl⁶.

Gemäss der erwähnten Reihenfolge könnte man vermuten, dass der bakteriostatische Effekt etwas mit der Lipoidlöslichkeit der Substanzen zu tun hat. Eine direkte Parallelität zur Intensität der Entzündungshemmung im Kaolin-, Aerosil- oder Carrageenan-Rattenpfoten-Ödемtest besteht nicht, wie die letzte Spalte der Tabelle I zeigt.

Zur weiteren Orientierung sind in Tabelle II bekannte, nicht speziell antiphlogistisch wirkende Substanzen aufgeführt, deren Hemmungskonzentrationen etwa im gleichen Bereich wie die der Verbindungen der Tabelle I liegen; aber auch einige stark bakteriostatische Antagonisten des Purin-Metabolismus und Inhibitoren der Proteinsynthese sind darin zum Vergleich enthalten.

Aus Tabelle II ist ersichtlich, dass die Fenaminsäuren und die Scha-Substanzen das Wachstum des *L. casei* relativ schwach hemmen, nämlich höchstens so stark wie die beiden Riboflavin-Antagonisten oder das 2-Hydroxymethyl-5,6-dichlor-benzimidazol¹⁰. Dagegen liegt die Hemmungskonzentration der spezifischen Antagonisten der Purinsynthese wie 6-Mercaptopurin, 2,6-Diaminopurin oder 6-Thioguanin sowie des Inhibitors der Proteinsynthese 8-Azaguanin 6-10 000fach niedriger als z.B. von Scha 306.

Von den 14 geprüften Scha-Substanzen hemmt nur eine die Vermehrung von *L. casei* schwächer als Mefenamin-

säure, 4 stehen zwischen den Fenaminsäuren, und die restlichen 9 Scha-Substanzen sind zum Teil deutlich stärker wachstumsemmend¹¹ (Tabelle I). Es zeichnet sich in den Versuchen mit *L. casei* eine Gruppenähnlichkeit ab, wie wir sie auch bei der Antib Bradykinin-Wirkung am Broncho-

⁶ Die 4 chlorhaltigen Scha-Substanzen zeigen übrigens auch eine gewisse Hemmwirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* hämolys. und *Streptococcus faecalis*, wobei die Bakteriostase im Plättentest in einer Verdünnung 1:10³ an die Hemmungsstärke des Hexachlorophen herankommt. Die übrigen, den *L. casei* hemmenden Scha-Substanzen sind aber im Plättentest 1:10³ verdünnt, nicht nur gegen die eben genannten Kokken, sondern auch gegenüber *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas pyocyan.*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* und *Trichophyton mentagri*. wirkungslos.

⁷ Vgl. dazu H. RAUEN, Arzneimittel-Forsch. 15, 1318 (1965).

⁸ J. P. LAMBOOY, Biblthca 'Nutr. Dieta' 8, 143 (1966) bezeichnet diesen klassischen Riboflavin-Antagonisten als nicht hemmend gegenüber *L. casei*. Vielleicht gibt es Bazillenstämme, die dagegen resistent sind.

⁹ E. E. HALEY and J. P. LAMBOOY, J. Am. chem. Soc. 76, 5093 (1954).

¹⁰ TH. WAGNER-JAUREGG, O. BÜCH und I. MOLNAR (unter Mitwirkung von F. KNÜSEL), Chemotherapy 2, 96, 116 (1961).

¹¹ Als Hemmstoffe von *L. plantarum* ATCC 1012 und *S. faecalis* ATCC 8043 sind Scha 306 und Mefenaminsäure gleich, Flu- und Meclofenaminsäure aber deutlich stärker wirksam (Röhrchentest).

spasmus des Meerschweinchens fanden¹². In diesem COLLIER-Test¹³ erwiesen sich Scha 306, Meclofaminsäure und Scha 87 als die bisher wirksamsten Antiphlogistica. Eine Gruppenähnlichkeit der Fenaminsäuren mit den 1, 2-Malonyl-4-phenyl-1, 2-dihydrocinnolinen (Scha-Substanzen) besteht auch im MIZUSHIMA-Test¹⁴ hinsichtlich Beschleunigung der beim Erwärmen von Serum- α -globulin(Fraktion IV)-Präparaten auftretenden Trübung. Auch hier fanden wir¹⁵ unter den antiphlogistischen Substanzen die eben genannten beiden Gruppen am wirksamsten.

Es erhebt sich die Frage, ob nicht diesen 3 verschiedenen Modellen verwandte Mechanismen zugrunde liegen, nämlich die reversible Blockierung oder Denaturierung bestimmter Proteine bzw. spezifischer Wirkungsorte.

Wir konnten die durch Scha 306 hervorgerufene Wachstumshemmung des *L. casei* weder mit Riboflavin oder seinem Phosphat noch durch Ribonucleinsäure oder Desoxyribonucleinsäure aufheben. Nach orientierenden Versuchen von Dr. R. W. ADRIAN¹⁶ mit Milchsäuredehydrogenase aus Kaninchenmuskel scheinen Scha 306 und seine Verwandten auf dieses Enzym hemmend zu wirken. Gegen diese Beobachtung spricht nicht unbedingt, dass bekannte Inhibitoren der Milchsäuredehydrogenase, wie die Natriumsalze der Brenztraubensäure, Oxalsäure und Malonsäure das Wachstum von *L. casei* nicht beeinflussen; möglicherweise dringen diese Salze starker Säuren nicht in die lebende Zelle ein, wohl aber das schwach saure Scha 306.

Zytostatische Wirkungen der Antiphlogistica sind mehrfach beschrieben, vor allem die Hemmung der Granulombildung, aber z.B. auch die Wachstumshemmung von EHRLICH-Aszitestumorzellen oder von Mäusefibroblasten in Einzelschichtkulturen. Für die Versuche mit Aszites-

tumorzellen wurden folgende molaren Hemmungswerte gefunden¹⁷ (Tabelle III). Zum Vergleich sind auch unsere molaren ID₅₀-Werte für *L. casei* angegeben.

L. casei ist gegen Phenylbutazon, Indomethacin und Mefenaminsäure deutlich weniger empfindlich als EHRLICH-Aszitestumorzellen. Von den in beiden Modellen verwendeten Substanzen ist die Flufenaminsäure annähernd gleich stark hemmend bei *L. casei* und den Aszitestumorzellen.

Die Entwicklung von Fibroblastenkulturen (beurteilt auf Grund des Proteingehaltes der Zellen) wird von Indomethacin deutlich stärker beeinträchtigt als durch Phenylbutazon, Mefenaminsäure oder Flufenaminsäure¹⁷. Das zeigt, dass der relative zytostatische Effekt verschiedener Antiphlogistica stark von der betreffenden Zellart abhängt. Es lässt sich daher aus zytostatischen Modellversuchen nicht ohne weiteres auf eine besondere «Zellschädlichkeit» einer therapeutisch anzuwendenden Substanz schliessen, besonders wenn die Hemmung nicht an normalen Säugetierzellen untersucht wurde.

Man weiss auch noch nicht, ob und welche ursächliche Zusammenhänge zwischen der Reizwirkung der Antiphlogistica auf die Magen- und Darmschleimhaut und ihrer antiinflammatorischen Wirkung bestehen. Daher sollten die von uns hier mitgeteilten Hemmungsversuche mit *L. casei* zunächst lediglich als ein weiteres Modell zur Klassifizierung der Antiphlogistica angesehen werden.

Tabelle III. Vergleich der bakteriostatischen und zytostatischen Wirkung von Antiphlogistica

	<i>L. casei</i> ID ₅₀ (mM)	EHRLICH- Aszitestumorzellen ID ₅₀ (mM)
Azapropazon	> 0,3	ca. 0,6
Phenylbutazon	> 0,3	0,18
Indomethacin	> 0,3	0,20
Mefenaminsäure	0,36	0,14
Scha 764	0,08	ca. 0,03
Flufenaminsäure	0,06	0,05
Scha 306	0,018	ca. 0,08
Scha 330	0,008	ca. 0,04

Tabelle II. Hemmung des Wachstums von *L. casei* durch verschiedene Substanzen

Name bzw. Zeichen	ID ₅₀ in $\mu\text{g}/\text{ml}$
Primaquin-Diphosphat	> 100
Pyridin-2-aldoxim	> 100
5-Bromuracil	90
Undecylensäure	78
3, 4, 5-Trimethoxybenzhydroxamsäure	74
6-Chlor-purin	39,5
o-Phenanthrolin	34,5
Segontin®-Lactat ⁷	22
Scha 764	21
Flufenaminsäure	19
<i>p</i> -Butoxybenzhydroxamsäure	16,5
Atebrin®-Hydrochlorid	15,5
Largactil® ⁸	15
o-Hydroxychinolin	14,5
Scha 306	6,4
6, 7-Dichlor-riboflavin ^{b8}	4,6
6-Methyl-7-chlor-riboflavin ^{b9}	2,4
Scha 392	2
2-Hydroxymethyl-5, 6-dichlor-benzimidazol ¹⁰	1,5
6-Mercaptopurin	1
2, 6-Diaminopurin-Sulfat	0,065
Tetracyclin	0,025
8-Azaguanin	0,0008
6-Thioguanin	0,0006

^a Ampullenlösung, mit H₂O verdünnt. ^b Wir verdanken diese Präparate der Freundlichkeit von Prof. Dr. J. P. LAMBOOY, Omaha, Nebraska, USA.

Summary. A new method for the classification of antiphlogistics is described using the growth inhibition of *Lactobacillus casei*. In this test the fenamic acids and particularly the new class of the Cinnopentazon-antiphlogistics (Scha 306, Scha 764 etc.) exhibit bacteriostatic properties of a medium intensity.

TH. WAGNER-JAUREGG und JOHANNA FISCHER

Forschungsabteilung der Siegfried AG, 4800 Zofingen (Schweiz), 31. Mai 1968.

¹² U. JAHN und TH. WAGNER-JAUREGG, Arzneimittel-Forsch. 18, 120 (1968).

¹³ H. O. J. COLLIER und P. G. SHORLEY, Br. J. Pharmac. 15, 601 (1960). – H. O. J. COLLIER, Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 290 (1963).

¹⁴ Y. MIZUSHIMA, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 149, 1 (1964); 157, 115 (1965); Rheumatism 16 (1966).

¹⁵ TH. WAGNER-JAUREGG, W. BÜRLIMANN und J. FISCHER, Arzneimittel-Forsch., in Vorbereitung.

¹⁶ Orientierende Versuche von Dr. R. W. ADRIAN.

¹⁷ K. KARZEL, Archs int. Pharmacodyn. Thér. 169, 70 (1967) und unveröffentlichte Werke von Dr. KARZEL.