

dabei vor allem an Einwirkungen auf Tube und Cervix, wie wir sie auch bei Hypoestrogenismus antreffen.

Jedenfalls scheint es uns richtiger, wenn wir in Zukunft wie LAX¹⁶ nicht mehr von peroralen Ovulationshemmern, sondern ganz einfach von hormonalen Antikonzeptiva sprechen.

Summary. In two cases, a fresh corpus luteum was found during treatment with hormonal anticonceptiva (Lyndiol 2.5®). The decreased excretion of all oestrogen fractions can be explained by the lack of proliferation of the theca interna. The striking proliferation of the follicle epithelium after the completed ovulation is as yet an

unexplained phenomenon. The possible endocrine actions of such steroid combinations upon the pituitary are discussed. Further investigations are in progress.

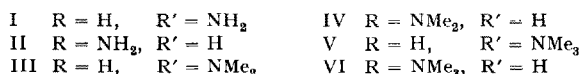
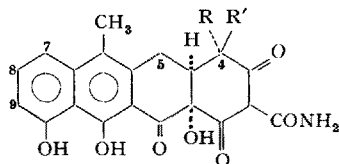
H. ERB und K. S. LUDWIG

*Geburtshilflich-gynäkologische Abteilung des Kantons-
spitals Liestal und Anatomisches Institut der Universität
Basel (Schweiz), 4. Dezember 1964.*

¹⁶ H. LAX, *Das Interview* (Ciba, Basel 1964).

4-Dedimethylamino- 4-epiamino-5a,6-anhydrotetracycline

We recently reported the isolation of a number of C and N demethylated anhydrotetracyclines which had accumulated in fermentations of tetracycline producing strains of *Streptomyces aureofaciens* and *S. rimosus* when normal antibiotic synthesis was disrupted through interference with biological methylation reactions¹. During the course of this work a number of minor components were detected by paper chromatography and we would like to report some experiences with one of these, 4-dedimethylamino-4-epiamino-5a,6-anhydrotetracycline (I)².



Substance I proved to be very difficult to separate from 4-dedimethylamino-4-amino-5a,6-anhydrotetracycline (II) which it often contaminated to the extent of 10–30%. Resolution was ultimately accomplished by careful partition chromatography on cellulose powder columns using a system composed of carbon tetrachloride-chloroform-*p*-dioxane-5% trifluoroacetic acid solution (1:1:1:1). Analytical purity was obtained by subsequent countercurrent

distribution with chloroform-*n*-butanol-methanol-0.1 *N* hydrochloric acid solution (1:1:1:1). The pure compound, $[\alpha]_D^{25} -475^\circ$ (*c*, 0.485 in methanol-0.1 *N* HCl (3:1)), is isomeric with 'amino' compound II based upon microanalyses (Found: C, 53.87; H, 5.08; N, 5.48; Cl, 8.06; (C) CH₃, 2.49; (N) CH₃, 0.00; C₂₀H₁₉N₂O₇Cl · 3/4 H₂O requires C, 53.57; H, 4.62; N, 6.24; Cl, 7.93; (C) CH₃, 3.34) and possesses a typical anhydrotetracycline UV and visible absorption spectrum³ ($\lambda_{\text{MeOH}}^{\text{max}}$ 424, infl. 324, inf. 308, 269 and 224 m μ with log ϵ 3.88, 3.34, 3.65, 4.67, and 4.39 resp.). Treatment with strong sodium hydroxide solution liberated ammonia as the only volatile base⁴ and reaction with methyl iodide in tetrahydrofuran led within 10 min at reflux to quaternary methiodides V and VI in substantially the same proportions as is obtained by reacting 4-*epi*-5a,6-anhydrotetracycline⁵ (V) under the same conditions. It is interesting to note that the normal epimer (II)

¹ P. A. MILLER, A. SATURNELLI, J. H. MARTIN, L. A. MITSCHER, and N. BOHONOS, *Biochem. biophys. Res. Comm.* **16**, 285 (1964).

² R. K. BLACKWOOD and C. R. STEPHENS, *J. Am. chem. Soc.* **86**, 2736 (1964).

³ C. R. STEPHENS, L. H. CONOVER, R. PASTERNAK, F. A. HOCHSTEIN, W. T. MORELAND, P. P. REGNA, T. J. PILGRIM, K. J. BRUNINGS, and R. B. WOODWARD, *J. Am. chem. Soc.* **76**, 3568 (1954).

⁴ R. PASTERNAK, A. BAVLEY, R. L. WAGNER, F. A. HOCHSTEIN, P. P. REGNA, and K. J. BRUNINGS, *J. Am. chem. Soc.* **74**, 1926 (1952).

⁵ J. R. D. MCCORMICK, S. M. FOX, L. L. SMITH, B. A. BITLER, J. REICHENTHAL, V. E. ORIGONI, W. H. MULLER, R. WINTERBOTTOM, and A. P. DOERSCHUK, *J. Am. chem. Soc.* **79**, 2849 (1957).

Substance^a

60 mc proton absorptions (cps) in dimethyl sulfoxide

	C ₄	C ₅	C _{7,8}	C ₉	CONH ₂	N-CH ₃	C-CH ₃
I	285	205	447	413	575	none	142
II	245	205	450	415	550	none	147
4- <i>epi</i> -5a,6-anhydrotetracycline (III)	300	210	452	417	575	188	142
5a,6-anhydrotetracycline (IV)	275	210	446	418	—	185	142
III-methochloride (V)	315	—	447	415	545	218	140
IV-methochloride (VI)	290	—	445	415	575	218	135

^a All derivatives were examined as their hydrochloride salts.

is not quaternized to any significant extent under these conditions even after 3 h reflux. Unfortunately direct interconversion of epimers I and II was very slow under conditions that rapidly epimerize 5a,6-anhydrotetracycline (IV)⁵. Only partial equilibration was attained after two weeks' standing and by this time degradation reactions had vastly complicated the picture.

Additional evidence for the epimeric relationship of the two substances could be adduced on spectral grounds. The molecular rotational change for the conversion of 5a,6-anhydrotetracycline (IV) to its 4-epimer (III) is -820° , and the corresponding figure derived from the rotations of I and II is -887° . Furthermore it is known that in alkaline solutions the 250–300 m μ maximum in the UV is of lower intensity for various 4-epitetracycline derivatives while the longer wavelength peaks are relatively insensitive to this treatment⁶. At a concentration of 10 γ /ml, II has absorbancies of 0.28, 0.11, and 0.98 at 420, 335, and 270 m μ , while I has absorbancies of 0.27, 0.11 and 0.84 at the same wavelengths. Finally the nuclear magnetic resonance spectrum is very revealing (Table).

All of the peaks observed are consistent with structure I for the new substance and in particular the proton peak assigned to the C₄ hydrogen is found 40 c/s downfield from that of substance II. That the C₄ proton shifts downfield upon epimerization of the C₄ hydrogen in anhydrotetracyclines is confirmed by the appropriate peaks in the other isomer pairs in the Table (III–IV⁶ and V–VI).

Thus the chemical and spectral data strongly support structure I for the minor component and at the same time

confirm the C₄ stereochemistry previously assigned to the major component II¹. The occurrence of such pairs is common among tetracycline antibiotics and often is accompanied by considerable alterations in biological activity. In this context it is interesting to note that whereas II is efficiently utilized in tetracycline biosynthesis by cell free preparations of *S. aureofaciens*¹, I gives no recognizable products under the same conditions.

Zusammenfassung. Die Isolierung sowie die chemischen, biologischen und physikalischen Eigenschaften von 4-Dedimethylamino-4-epiamino-5a,6-anhydrotetracyclin werden beschrieben. Die Beziehungen zu anderen Anhydrotetracyclinen werden diskutiert.

F. BARBATSCHI, M. DANN, J. H. MARTIN,
P. MILLER, L. A. MITSCHER,
and N. BOHONOS

Biochemical Research Section, Lederle Laboratories
Division, American Cyanamid Company, Pearl River
(New York USA), November 2, 1964.

⁶ We are indebted to Dr. N. RIGLER of the Chemical Process Improvement Section, Lederle Laboratories, for pointing out to us the respective chemical shifts of the C₄-protons of 5a,6-anhydrotetracycline (IV) and its C₄-epimer (III).

Die Unterdrückung des letalen anaphylaktischen Schocks bei der Maus

Neben der Ratte gilt die Maus als das Tier, bei dem sich nur schwer ein tödlicher anaphylaktischer Schock erzeugen lässt. Bekanntlich gelingt die prompte Auslösung nur dann, wenn simultan mit dem sensibilisierenden Antigen bzw. bis zu 4 Tage danach Pertussisorganismen injiziert werden, oder aber das Antigen in Form einer mit komplettem Freundschens Adjuvans hergestellten Wasser-in-Öl-Emulsion appliziert wird^{1–6}. Die Fähigkeit von Pertussisorganismen^{7–11} und Freundschem Adjuvans¹², eine erhebliche Steigerung der Serumantikörperbildung gegenüber einem Antigen zu induzieren, ist hinreichend bekannt. Dennoch blieb bisher völlig unklar, ob Pertussisorganismen und Ölphase im Hinblick auf die Induzierung der Schockbereitschaft bei Mäusen überhaupt als immunologische Adjuvantien wirksam werden, da es bislang nicht gelungen ist, eine Korrelation zwischen der Höhe des humoralen Antikörpertiters und der Schockbereitschaft der Tiere nachzuweisen. Somit war es naheliegend, die Frage zu prüfen, ob sich der mit Hilfe von Pertussisorganismen erzeugbare letale anaphylaktische Schock der Maus durch Applikation von Substanzen, die die Antikörperbildung hemmen, verhindern lässt. Im folgenden wird gezeigt, dass dies mittels Gaben von N,N-Bis-(2-chloräthyl)-N',O-propylenphosphorsäureester-diamid (Endoxan, Cyclophosphamid) gelingt.

Methodik. Es wurden weibliche und männliche Mäuse (Stamm NMRI) im Gewicht von 17–21 g verwendet. Jede der Tiergruppen bestand aus 2 Serien, wobei die Mäuse

der jeweiligen Serie a 16 Tage nach der ersten immunisierenden Injektion eine intravenöse Erfolgsinjektion von 1 mg Rinderserumalbumin («reinst», Behringwerke Marburg), gelöst in 0,25 cm³ physiologischer NaCl, erhalten hatten, während die Tiere der korrespondierenden Serien b zum gleichen Zeitpunkt geblutet wurden. Die Bestimmung der Antikörpertiter erfolgte nach der Boyden-Technik in der Modifikation von STAVITSKY¹³, wobei nach dem Verfahren von MUNOZ⁸ mit einer Mäuseblutmenge von 0,1 cm³ gearbeitet wurde. Als sensibilisierendes Antigen wurde ausschliesslich Rinderserumalbumin («reinst»,

¹ S. MALKIEL und B. J. HARGIS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80, 122 (1952).

² S. MALKIEL, B. J. HARGIS und S. M. FEINBERG, J. Immunol. 71, 311 (1953).

³ S. MALKIEL und B. J. HARGIS, J. Allergy 30, 387 (1959).

⁴ L. S. KIND, J. Immunol. 79, 238 (1957).

⁵ J. MUNOZ, L. F. SCHUCHARDT und W. F. VERWEY, Fed. Proc. 13, 507 (1954).

⁶ J. MUNOZ, J. Immunol. 90, 132 (1963).

⁷ D. S. FLEMING, L. GREENBERG und E. M. BEITH, Canad. Med. Ass. J. 59, 101 (1948).

⁸ L. GREENBERG und D. S. FLEMING, Canad. Publ. Health J. 38, 279 (1947).

⁹ L. GREENBERG und D. S. FLEMING, Canad. Publ. Health J. 39, 131 (1948).

¹⁰ M. PITTMAN, Fed. Proc. 16, 867 (1957).

¹¹ H. FINGER, Dtsch. Med. Wschr., im Druck.

¹² H. FINGER, Das Freundsches Adjuvans (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1964).

¹³ A. B. STAVITSKY, J. Immunol. 72, 360 (1954).