

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 $m\mu$ 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 $m\mu$, 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 C_4 hydrogen is found 40 c/s downfield from that of substance II. That the C_4 proton shifts downfield upon epimerization of the C_4 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 C_4 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 C_4 -protons of 5a,6-anhydrotetracycline (IV) and its C_4 -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).

Tabelle I. Die Unterdrückung des letalen anaphylaktischen Schocks der Maus durch Endoxan

Tier- gruppe	Zahl der Mäuse	Endoxan- applikation ^a	Zahl der überlebenden Tiere am Tage + 16	Zahl der Tiere mit Schocksymptomen	Zahl der Tiere mit tödlichem anaphylaktischem Schock
			Zahl der Versuchstiere	Zahl der Tiere mit i. v. Erfolgsinjektion	Zahl der Tiere mit i. v. Er- folgsinjektion
Ia	20	—	20/20 = 100%	0/20 = 0%	0/20 = 0%
IIa	20	—	20/20 = 100%	19/20 = 95%	16/20 = 80%
IIIa	20	je 1 mg Endoxan ^b i. p. an den Tagen - 1, 0, + 1, + 2	17/20 = 85%	0/17 = 0%	0/17 = 0%
IVa	20	je 1 mg Endoxan i. m. an den Tagen - 1, 0, + 1, + 2	18/20 = 90%	0/18 = 0%	0/18 = 0%
Va	20	je 1 mg Endoxan ^c i. p. an den Tagen + 1, + 2, + 3, + 4	18/20 = 90%	0/18 = 0%	0/18 = 0%
VIa	20	4 mg Endoxan i. p. am Tage - 1	16/20 = 80%	0/16 = 0%	0/16 = 0%
VIIa	20	4 mg Endoxan i. m. am Tage + 4	18/20 = 90%	0/18 = 0%	0/18 = 0%
VIIIa	20	4 mg Endoxan i. p. am Tage + 11	20/20 = 100%	6/20 = 30%	2/20 = 10%
IXa	20	4 mg Endoxan i. p. am Tage + 13	20/20 = 100%	9/20 = 45%	5/20 = 25%

^a Das Endoxan wurde unmittelbar vor der Injektion in Aqua bidest. gelöst und in einem konstanten Flüssigkeitsvolumen von 0,25 cm³ injiziert. ^b Die intraperitoneale Injektion von Endoxan am Tage 0 erfolgte 2 h vor der Antigeninjektion. ^c Die intraperitoneale Injektion von Endoxan am Tage + 3 erfolgte 2 h vor der Antigeninjektion.

Tabelle II. Die Depression der humoralen Antikörperbildung bei der Maus durch Endoxan

Tier- gruppe	Zahl der Mäuse	Endoxanapplikation ^a	Zahl der überlebenden Tiere am Tage + 16	Durchschnittlicher Antikörpertiter ^b
			Zahl der Versuchstiere	
Ib	20	—	20/20 = 100%	< 25
IIb	20	—	20/20 = 100%	420
IIIb	20	je 1 mg Endoxan ^c i. p. an den Tagen - 1, 0, + 1, + 2	15/20 = 75%	< 25
IVb	20	je 1 mg Endoxan i. m. an den Tagen - 1, 0, + 1, + 2	17/20 = 85%	< 25
Vb	20	je 1 mg Endoxan ^d i. p. an den Tagen + 1, + 2, + 3, + 4	17/20 = 85%	< 25
VIb	20	4 mg Endoxan i. p. am Tage - 1	19/20 = 95%	< 25
VIIb	20	4 mg Endoxan i. m. am Tage + 4	18/20 = 90%	< 25
VIIIb	20	4 mg Endoxan i. p. am Tage + 11	17/20 = 85%	50
IXb	20	4 mg Endoxan i. p. am Tage + 13	20/20 = 100%	50

^a Das Endoxan wurde unmittelbar vor der Injektion in Aqua bidest. gelöst und in einem konstanten Flüssigkeitsvolumen von 0,25 cm³ injiziert. ^b Die angegebenen Titer stellen die reziproken Werte der Blutverdünnungen dar. ^c Die intraperitoneale Injektion von Endoxan am Tage 0 erfolgte 2 h vor der Antigeninjektion. ^d Die intraperitoneale Injektion von Endoxan am Tage + 3 erfolgte 2 h vor der Antigeninjektion.

Behringwerke) verwendet. Jedes Tier der Gruppen II bis IX wurde initial mit einer simultanen intraperitonealen Injektion von 6 mg Rinderserumalbumin, gelöst in 0,25 cm³ physiologischer Kochsalzlösung, und 0,5 cm³ einer inaktivierten Pertussis-Keimsuspension ($2 \cdot 10^9$ Bakterien/cm³ der Op. Nr. 36)¹⁴ sensibilisiert. 72 h später erfolgte die nochmalige simultane intraperitoneale Injektion der gleichen Menge von Proteinantigen und Pertussisorganismen. Die Tiere der als negative Kontrolle fungierenden Gruppe I hatten keine Pertussisorganismen erhalten. Ein tödlicher anaphylaktischer Schock wurde nur dann als Todesursache angenommen, wenn der Exitus nach vorausgegangenem Schocksyndrom bis zu 60 min nach der intravenösen Erfolgsinjektion eingetreten war.

Endoxan wurde i. p. oder i. m. zu unterschiedlicher Zeit verabfolgt, bezogen auf den Tag der ersten sensibilisierenden Injektion, der mit Tag «0» bezeichnet wird. Die vorausgehenden Tage werden mit dem Vorzeichen – (minus), die der ersten sensibilisierenden Injektion folgenden Tage mit dem Vorzeichen + (plus) versehen.

Ergebnisse. Unsere Befunde sind tabellarisch in den Tabellen I und II zusammengefasst. Aus Tabelle I ist klar ersichtlich, dass die intramuskuläre oder intraperitoneale Injektion von 4 mg Endoxan den tödlichen anaphylaktischen Schock der Maus verhindert. Dabei ist es gleichgültig, ob das Endoxan einen Tag vor der ersten sensibilisierenden Injektion in Form einer einzigen Dosis von 4 mg oder aber in 4 sukzessiv verabfolgten Einzeldosen von je 1 mg injiziert wird. Zu einer kompletten Unterdrückung des tödlichen anaphylaktischen Schocks kam es auch dann noch, wenn am vierten Tag nach der ersten sensibilisierenden Injektion eine einmalige Dosis von 4 mg appliziert worden war. Es ist weiterhin aus der Tabelle I ersichtlich, dass die am Tage +11 (Gruppe VIIa) bzw. am Tage +13 (Gruppe IXa) injizierte Endoxandosis von 4 mg nicht mehr in der Lage ist, den anaphylaktischen Schock der Maus komplett zu unterdrücken. Wie Tabelle II zeigt, sind bei den letztgenannten Tiergruppen (Gruppe VIIb und IXb) auch humorale Antikörper nachweisbar, während das bei den Gruppen IIIb bis VIIb nicht der Fall ist. Die Ergebnisse lassen also den Schluss zu, dass sich die Wirkung von Endoxan auf die Immunitätsreaktionen des Organismus von der des Cortisons und dem durch Röntgenstrahlen erzielbaren

Depressionseffekt deutlich unterscheidet, und zwar dadurch, dass der Depressionseffekt auch dann zur Ausbildung kommt, wenn das Endoxan erst nach der Sensibilisierung appliziert wird. Dabei macht der Verlauf in den Gruppen VIII und IX deutlich, dass die volle Depressionswirkung durch Endoxan erst nach einem Mindestzeitraum von 6–7 Tagen erreicht wird. In unserem Material verstarben auch die während der Versuchsdauer verlorenen Tiere 5–8 Tage nach der ersten Endoxaninjektion. Aus dem Befund, dass sich nach intravenöser Erfolgsinjektion Schocksymptome nur dann auslösen liessen, wenn in den korrespondierenden Versuchsserien humorale Antikörper nachgewiesen werden konnten, darf nicht ohne weiteres geschlossen werden, dass der anaphylaktische Schock der Maus allein vom spezifischen humoralen Antikörper abhängig ist. Vielmehr erhebt sich die Frage nach der Bedeutung gewebsgebundener Antikörper für den anaphylaktischen Schock von Ratte und Maus, zumal durch histologische und elektronenoptische Untersuchungen gezeigt worden ist, dass die Injektion hoher Endoxandosen zu einer beträchtlichen Schädigung des lymphoretikulären Gewebes führt^{15,16}.

Summary. The effect was investigated of 'Endoxan' (cyclophosphamide) on anaphylactic shock in mice, induced with the aid of pertussis organisms. A complete inhibition by a dose of 4 mg/mouse can be proved. The formation of antibodies in the Endoxan-treated mice is depressed.

H. FINGER

Hygiene-Institut und Medizinaluntersuchungsamt,
Justus-Liebig-Universität, Giessen (Deutschland),
29. Oktober 1964.

¹⁴ Für die Überlassung der Pertussis-Keimsuspension sind wir den Behringwerken, Marburg, zu Dank verpflichtet.

¹⁵ H. ST. STENDER, D. RINGLEB, D. STRAUCH und H. WINTER, Sdbd. Strahlentherapie 43, 392 (1959).

¹⁶ H. ST. STENDER, D. STRAUCH, H. WINTER und W. TEXTOR, Arzneimittelforsch. 13, 1031 (1963).

Tumorgewebe kombiniert mit Milz-, Lymphknoten- oder Thymusgewebe von Ratten in Diffusionskammern

In früheren Versuchen wurde das Überleben von Rattentumorgewebe¹, Rattenlungen- und -lebergewebe², Rattenmilz-, -lymphknoten- und -thymusgewebe³ in Diffusionskammern nach i. p. Implantation in Ratten gesichert und bei Kombination von Walker-Carcinom(WCA)- oder Jensen-Sarkom(JSA)-Gewebe mit normalem Rattenleber- und -lungengewebe ein Überleben der Tumorzellen unter gleichzeitigem Zugrundegehen der Normalgewebe festgestellt. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass das Wachstum von Tumorzellen in Diffusionskammern durch das Eindringen einer kleinen Anzahl immunologisch kompetenter Wirtszellen tumorresistenter oder normaler Ratten nicht sichtbar beeinflusst wird. Hingegen wurden

bei Verwendung grossporiger Membranfilter, die das Eindringen dieser Wirtszellen in grösserem Umfang gestatten, Tumorzellen in Diffusionskammern, die resistent gemachten Ratten implantiert wurden, auf Grund immunologischer Prozesse vernichtet. In grösseren Mengen eingedrungene Lymphzellen normaler Ratten hatten im gleichen Zeitraum nicht diese Wirkung aufzuweisen⁴. Es ergab sich die Frage nach dem Verhalten von WCA und JSA kombiniert mit Milz-, Lymphknoten- und Thymusgewebe normaler Ratten in Diffusionskammern.

¹ B. TEICHMANN und G. WITTIG, Z. Naturforsch. 19b, 54, 58 (1964).

² B. TEICHMANN und G. WITTIG, Naturwissenschaften 50, 673 (1963).

³ B. TEICHMANN, unveröffentlicht.

⁴ B. TEICHMANN, Exper. 20, 327 (1964).