

## Digitalisforschung in Berlin-Buch – Rückblick und Ausblick\*\*

Kurt R. H. Repke\*, Rudolf Megges, Jürgen Weiland und Rudolf Schön

Der Arzt William Withering führte 1785 mit seinem Buch „An Account of the Foxglove and some of its Medical Uses“ Präparate aus Digitalisblättern in die Therapie der Wassersucht (des Herzversagens) ein und erklärte: „The following remarks consist partially of matter of fact, and partially of opinion. The former will be permanent; the latter must vary with the detection of error, or the improvement of knowledge. I hazard them with diffidence, and hope they will be examined with candour.“ Diese Bemerkungen sind hier vom Seniorautor angeführt, da er die Schwierigkeit sieht, einen ausgewogenen Bericht über sein

lebenslanges Forschungsprojekt zur Digitalis-Weiterentwicklung zu bieten. Seine Entscheidung, sich der Digitalisforschung zu widmen, entstand am Krankenbett, an dem er als Arzt die furchtbaren Endstadien des Herzversagens erlebte, in denen für die Kranken keine wirkliche Hilfe mehr möglich ist. Unglücklicherweise paßte dieses Vorhaben nicht in das vom Wissenschaftsministerium der DDR dekretierte Forschungsprogramm, so daß er das Digitalisprojekt zugunsten von Biomembran-Untersuchungen einstellen sollte. Glücklicherweise entging er dem Verdikt durch Etikettierung der digitalisartig

wirkenden Steroide als chemische Sonden für die Zellmembran-lokalierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -transportierende ATPase, die er gerade als den Digitalisrezeptor erkannt hatte. Über die Arbeit der Autoren wird hier erstmals im Zusammenhang berichtet. Ziel des Überblicks ist, die Forschung für die Lösung einer großen Aufgabe zu fördern: die Entwicklung von Steroidwirkstoffen zur Verhinderung und Heilung der Herzinsuffizienz.

**Stichworte:** Arzneimittel · Digitalis · Medizinische Chemie · Steroide · Wirkstoffdesign

### 1. Einleitung: die Herausforderung an die Digitalisforschung

Die Herausforderung an die Digitalisforschung leitet sich vom Bedarf an neuen Arzneimitteln zur Vermeidung der Herzinsuffizienz und für die erfolgreiche Behandlung des versagenden Herzens ab. Diese Notwendigkeit gründet sich speziell auf die weite Verbreitung von und die hohe Sterblichkeit bei Herzinsuffizienz in den entwickelten Ländern, auf die Tatsache, daß die dafür verfügbaren Arzneimittel inadäquat sind, die Gesundheit herzustellen oder auch nur Beschwerden und Leistungseinbußen zu minimieren, und auf den Umstand, daß die bisherigen Forschungsanstrengungen zur Bereitstellung von Arzneimitteln, die den benannten Erfordernissen entsprechen sollten, weitgehend gescheitert erscheinen. Einige Aspekte der

letzteren Bemühungen wurden von den Autoren dieser Übersicht schon früher zusammenfassend dargestellt<sup>[1, 2]</sup>.

#### 1.1. Die zugrundeliegende ärztliche Forderung

Die Häufigkeit und die Verbreitung der Herzinsuffizienz ist in den letzten Jahren angestiegen<sup>[3]</sup>, und mit der Erhöhung des Durchschnittsalters der Bevölkerung werden sie erwartungsgemäß weiter zunehmen. Die Prognose nach der Erstdiagnose ist tristlos; weniger als die Hälfte der Patienten überleben fünf Jahre<sup>[4]</sup>. Die Überlebenschance hängt von mehreren Variablen ab, die im wesentlichen in Abbildung 1 definiert sind.

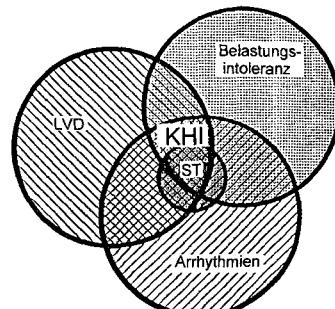


Abb. 1. Klinische Manifestationen von Herzmuskelversagen. Das Schema zeigt das mögliche Zusammentreffen von linksventrikulärer Dysfunktion (LVD), Belastungsintoleranz und ventrikulären Arrhythmien als häufigste Manifestationen des Herzinsuffizienz-Syndroms. Die klinische Herzinsuffizienz (KHI) entspricht der Koexistenz von LVD und Belastungsintoleranz. Der Sekundenherztod (ST) tritt bei Patienten mit Arrhythmien und vorwiegend bei solchen mit LVD und KHI auf (aus Lit. [5]).

[\*] Prof. Dr. K. R. H. Repke, Dr. R. Megges, Dr. J. Weiland, Dr. R. Schön  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
Robert-Rössle-Straße 10, D-13125 Berlin-Buch  
Telefax: Int. + 30/949-4161

[\*\*] Definitionen und Abkürzungen: Digitalis: Gattungsbezeichnung für alle Steroide, die cardiotonisch durch Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase über Besetzung von deren Digitalis-Erkennungsmatrix und -Bindungsschlucht wirksam werden;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase: das  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -transportierende, Adenosintriphosphat-hydrolysierende Fermentsystem der äußeren Membran von Säugerzellen, das skalare Phosphorylenergie von ATP in vektorielle elektrochemische Energie umwandelt. Zum molekularen Mechanismus siehe K. R. H. Repke, R. Schön, *Biol. Rev.* **1992**, 67, 31–78; *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1154, 1–16.

Der therapeutische Wert von Präparaten aus Digitalispflanzen wurde vor mehr als 200 Jahren von Withering entdeckt<sup>[6]</sup>. Digitoxin **1** und Digoxin **2** (Abb. 2), die dominierenden aktiven Wirkstoffe, gehören noch heute zu den am meisten für die Behandlung der Herzinsuffizienz verschriebenen Arzneimitteln<sup>[3, 8]</sup>.

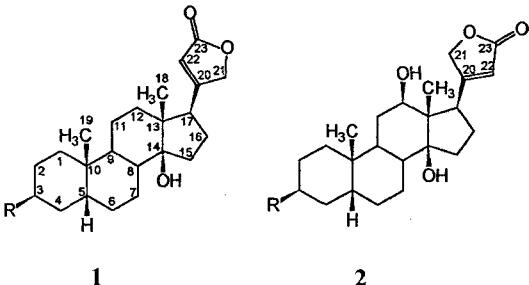


Abb. 2. Strukturformeln von Digitoxin **1** und Digoxin **2** ( $R = \text{Tridigitoxosyloxy}$ ). **1** ist in 14/22-Konformation und **2** in 14/21-Konformation dargestellt, wobei das C22-Proton bzw. die C21-Protonen in Nachbarschaft zu C14 $\beta$ -OH lokalisiert sind. Eine hohe Wirksamkeit bleibt bei semirigiden Cardenolidderivaten erhalten, bei denen die C21-Butenolid-Protonen durch voluminöse Substituenten am C22-Atom (vgl. Abb. 9) in einem Potentialenergietale nahe C14 $\beta$ -OH zu verharren gezwungen sind. Daher scheint das 14/21-Konformer das Rezeptor-gebundene Konformer zu sein [7]. Die gezeigte *cis*-Verknüpfung der Ringe C und D des Steroidgerüsts wird bei Mensch und Tier (mit Ausnahme einiger Kröten) biosynthetisch nicht realisiert (vgl. Abschnitte 2.5 und 2.6).

1930 faßte der berühmte Herzspezialist Wenckebach<sup>[9]</sup> sein Urteil zusammen: „Digitalis treatment is one of the most important and serious duties of the general physician; it demands a great deal of skill, power of observation, keen interest, and experience. A long life is too short to learn enough about this wonderful drug.“ In neuerer Zeit hat sich aber eine große Kontroverse über die Rolle und den Wert von Digitalis bei der Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz entwickelt<sup>[13]</sup>. Am schwerwiegendsten ist gegenwärtig die Tatsache, daß man kein begründetes Urteil über die Digitaliswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit hat<sup>[10]</sup>. Die Ärzteschaft wartet daher auf weitere erstklassige Mittel, die relativ sicher wirken und als Monotherapeutica angewendet werden können, um die Lebensqualität zu verbessern, das Fortschreiten der Krankheit zu hemmen und den Sekundenherztod zu verhindern<sup>[4, 11]</sup>. Man kann

erwarten, daß in den kommenden Jahren jede Anstrengung gemacht werden muß und wird, neue Verbindungen bereitzustellen, die nicht nur die hämodynamischen und funktionellen Beeinträchtigungen der Patienten mit Herzinsuffizienz günstig beeinflussen, sondern auch dazu beitragen, ein besonders erstrebenswertes Ziel zu erreichen, nämlich die Verhinderung der klinischen Manifestation der Herzinsuffizienz<sup>[4, 11]</sup>.

## 1.2. Das vertagte Paradies

In den letzten zehn Jahren wurden viele neue Arzneimittel entwickelt und bei Patienten mit Herzinsuffizienz getestet, monatlich etwa ein neues Mittel. Einen Überblick über die interessanteren Mittel und ihre vermutlichen Hauptmechanismen hat G. Grupp<sup>[12]</sup> vorbildlich ausgewogen geboten. Die Phosphodiesterase-Hemmstoffe wie Miltinon und Amrinon schienen zunächst vielversprechend, lieferten jedoch schließlich enttäuschende Resultate. Im Gegensatz zu den Digitalisverbindungen verlieren solche cardiotonischen Mittel ihre Wirksamkeit, wenn sie am meisten benötigt werden, und zwar bei schwerer Herzinsuffizienz<sup>[13]</sup>. Darüber hinaus haben Berichte über die vermehrte Sterblichkeit<sup>[14–16]</sup> den anfänglichen Enthusiasmus für die Anwendung der Phosphodiesterase-Hemmstoffe ausgelöscht: „paradise postponed“<sup>[17]</sup>. Die riesige Investition von Geld, Zeit, Arbeitskraft und Forschungspotential für die Entwicklung eines oral anwendbaren, inotropen (die Kontraktionsfähigkeit des Herzmusels beeinflussenden) Wirkstoffes zur Ergänzung oder zum Ersatz der Digitalisverbindungen war allgemein enttäuschend. Das hatte eine niederschmetternde Wirkung auf die weitere Entwicklung dieser Klasse von inotropen Nichtdigitalis-Wirkstoffen<sup>[18]</sup>.

Nur Digitalis, Diuretica und Hemmstoffe des Angiotensinaktivierenden Enzyms erfüllen, jedes für sich, einige der Kriterien eines erstklassigen Medikaments zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz. Keines dieser Arzneimittel genügt allen erforderlichen Charakteristika, und keines vermag den Herzinsuffizienz-Zustand allein zu beherrschen<sup>[19]</sup>. Die Hemmstoffe des Angiotensin-aktivierenden Enzyms und die Diuretica tendieren zur Störung der Nierenfunktion, die Digitalisverbindungen dagegen zur Verbesserung der Nierenfunktion. Die Di-



*Kurt R. H. Repke, geboren 1919, promovierte 1945 zum Doktor der Medizin. Von 1945 bis 1950 wurde er in mehreren medizinischen Fachgebieten an Kliniken in Hamburg und Potsdam sowie an der Universitätsklinik Greifswald bei Prof. G. Katsch ausgebildet. Um sich ein profundes Wissen der pharmakologischen und biochemischen Grundlagen der medikamentösen Behandlung von Krankheiten anzueignen, arbeitete und habilitierte er sich bei P. Wels am Institut für Pharmakologie der Universität Greifswald (1950–1955), anschließend bis 1963 am Institut für Biochemie der Akademie der Wissenschaften unter Prof. K. Lohmann. Nach diesem wurde er Direktor dieses Instituts (1964–1971) und stand anschließend der Sektion Biomembranen des neugegründeten Zentralinstituts für Molekularbiologie der Akademie bis 1984 vor. Seit seiner Emeritierung konzentriert er seine ganze Kraft auf seine Forschungsziele, zu denen neben der Digitalisforschung die Aufklärung des komplexen Mechanismus der Umwandlung der skalaren Phosphorylenergie von ATP in vektorielle Energie von Kationengradienten durch Biomembranen zählen. Repke ist Mitglied der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina und ein Ehrenmitglied der Cardiac Muscle Society.*

gitalisintoxikation ist eine der meistverbreiteten, nachteiligen Wirkstoffreaktionen geblieben, die in der klinischen Praxis infolge des kleinen Spielraums zwischen therapeutischen und toxischen Dosen sowie beträchtlichen Unterschieden in der individuellen Empfindlichkeit auftreten<sup>[20]</sup>. Dennoch hat in den letzten fünf Jahren die Verordnung von Digitalis kaum abgenommen, was anzeigt, daß die erwähnten neueren Mittel für die Behandlung der Herzinsuffizienz die breite Anwendung von Digitalis nicht ersetzt haben<sup>[4]</sup>.

### 1.3. Die offenen Ursachen für den bisher fehlenden Erfolg

Die Suche nach cardiotonischen Steroiden mit vergrößerter therapeutischer Breite durch die Modifizierung der Strukturen bekannter Digitalisverbindungen erschien über mehrere Dekaden erfolglos. Das wurde dahingehend interpretiert, daß bei den therapeutisch genutzten Naturstoffen pflanzlicher Herkunft schon ein unübertreffbar hoher Grad an Optimierung vorliegt<sup>[21]</sup>. Der fehlende Fortschritt könnte jedoch auch aus konzeptionellen Beschränkungen und experimentellen Schwächen resultiert haben.

Die synthetischen Modifikationen gingen von der Gleichsetzung der natürlichen Verbindungen mit Leitstrukturen aus. So wurden die Abwandlungen auf die Seitenkette an C17 in **1** und **2** konzentriert, die irrtümlich als pharmakophore Leitstruktur angesehen wurde<sup>[22–25]</sup>. Die Wirksamkeit der Derivate wurde hauptsächlich an tierischen Modellsystemen bestimmt. Diese lassen zwar inotrope und toxische Effekte messen, aber ermöglichen nicht zwischen den verschiedenartigen molekularen Mechanismen zu unterscheiden, die den beobachteten Effekten zugrundeliegen (vgl. Abschnitt 2.4). Solche Beobachtungen schließen die Ableitung von in sich geschlossenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen aus, wie die entsprechenden Übersichten zeigen<sup>[24–26]</sup>. Daher glich die anfänglich ungezielte Strategie bei der chemischen Modifizierung notwendigerweise einem molekularen Roulette. Deshalb wird für einen rationalen Vorstoß in der Entwicklung von Arzneimitteln ein Verstehen der wirkungsauslösenden Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Rezeptor auf molekularer Ebene benötigt, wie Ariëns 1976 betonte<sup>[27]</sup>. Er urteilte, daß die grundlegende Erforschung physiologischer und biochemischer Prozesse in naher Zukunft der Eckstein für die Entwicklung neuer Arzneimittel sein wird.

### 1.4. Die frühe Illusion und die gegenwärtigen Gegebenheiten

Wie Parascandola dargelegt hat<sup>[28]</sup>, wurden sehr früh Versuche gemacht, die pharmakologische Wirkung organischer Verbindungen mit ihrer Struktur in Relation zu bringen, obgleich die organische Chemie in bezug auf die Strukturaufklärung noch in den Anfängen steckte. Dennoch begannen Brown und Fraser 1869 ihre vielversprechende Zusammenarbeit mit folgendem Glaubensbekenntnis: „There can be no reasonable doubt that a relation exists between the physiological action of a substance and its chemical composition and constitution...“ 1877 spekulierte Brunton sogar, daß die Ärzte bald fähig sein würden, die pharmakologische Wirkung jeder Verbindung aus ihrer

Konstitution vorauszusagen. Diese frühe Erwartung erwies sich als eine noch heute bestehende Illusion. So stellte 1992 Kuntz<sup>[29]</sup> fest, daß wir Wirkstoffe mit einem spezifischen Wirkungsmodus und annehmbaren biologischen Eigenschaften nicht nach elementaren Prinzipien konstruieren können. Was wir zuversichtlich erwarten könnten, sei, kompetitive Enzymhemmstoffe zu konzipieren und den langen Prozeß der Arzneientwicklung von solch einem rationalen Ausgangspunkt zu starten<sup>[29]</sup>.

Als Eckpfeiler einer rationalen Strategie für das Design von neuartigen Wirkstoffen hat sich in den letzten Jahren die genaue Kenntnis der dreidimensionalen Struktur von möglichen Zielproteinen herausgestellt, die mit einer großen Vielfalt von Liganden (Hemmstoffen) in ihrem Erkennungs- und Wirkungsort komplexiert sind<sup>[29–33]</sup>. So erklärten 1991 die Mitarbeiter einer spezialisierten Wirkstoffdesign-Firma<sup>[32]</sup>, daß – kennt man die dreidimensionale Struktur von pharmakologisch signifikanten Rezeptor-Ligand-Komplexen mit der durch eine Röntgenstrukturanalyse erreichten Auflösung – die Entdeckung und Entwicklung von Leitverbindungen tiefgreifend beeinflußt und beschleunigt werden kann. Da die Desolvatisierung von Ligand und Protein beim Übergang von der freien zur gebundenen Form in dieses Verfahren nicht eingeht, war es unter Berücksichtigung der evidenten unpolaren und elektrostatischen Voraussetzungen der Ligandenbindung durch das katalytische Zentrum leichter, neuartige Leitverbindungen zu entdecken, als diese Leitstrukturen mit einer kleinen Zahl von Schritten in hochwirksame Hemmstoffe abzuwandeln<sup>[32]</sup>. Die Überlegenheit der skizzierten „direkten“ Strategie für die Entdeckung von Wirkstoffen über die bisherigen Methoden bleibt noch zu klären<sup>[32]</sup>.

Trotz der eindrucksvollen Fortschritte in der Röntgenstrukturanalyse von Makromolekülen bleibt die Verfügbarkeit von Kristallen hoher Qualität der hauptsächlich limitierende Faktor bei Nutzung dieser Technik. Eine andere Möglichkeit, das Modellieren auf der Basis homologer Proteine, wird gegenwärtig allgemein dahingehend beurteilt, keine genügend gesicherte Grundlage für ein rationales Wirkstoffdesign zu bieten<sup>[33]</sup>. Für die Mehrheit von Proteinsequenzen mit geringer signifikanter Homologie zu bekannten Strukturen wird das Problem der Voraussage von Sekundär- und Tertiärstruktur<sup>[34]</sup> mit ausreichender Genauigkeit für das Wirkstoffdesign als noch unlösbar beurteilt<sup>[33]</sup>.

Da die direkte Strategie im Wirkstoffdesign zumeist nicht anwendbar ist, werden normalerweise die indirekten Wege beschritten, die auf der Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen basieren. Diese Wege waren auch in der Digitalisforschung zu gehen (vgl. Lit.<sup>[1, 2, 35–71]</sup>). So lange weder der Ort noch der Mechanismus der Digitaliswirkung bekannt war, hatten wir über eine ungezielte Strategie das Zielenzym (den Rezeptor) zu entdecken, um so den Weg zur gezielten Strategie zu eröffnen (siehe Abschnitte 2.1 und 2.2). Die darauf folgende, viele Stadien (vgl. Lit.<sup>[72]</sup>) umfassende Entfaltung der Digitalisforschung in Berlin-Buch führte zur gezielten Strategie. Folgende Stadien wurden dabei durchschritten: die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wurde als der Digitalisrezeptor identifiziert und dessen Rolle bei der Kontrolle der Herzkontraktilität abgeleitet (Abschnitt 2.2); der „mikroskopische“ Digitalismechanismus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Hemmung wurde geklärt (Abschnitt 2.3); die Leistungsmöglichkeiten und Grenzen der biologischen und mo-

lekularen Suchtestsysteme wurden bewertet (Abschnitt 2.4); im Verlauf einer ausgedehnten „chemischen Jagd“ wurden die Leitstrukturen für eine digitalisartige Wirkung entdeckt<sup>[1, 2, 35–71]</sup> (Abschnitte 2.5 und 3); das Rätsel, das die chemische Identität des vermuteten endogenen Digitalis umgibt, wurde der fehlenden Spezifität der angewendeten Analyseverfahren zugeschrieben (Abschnitt 2.6). Auf der Grundlage der erreichten Erkenntnisse wird in Abschnitt 3 das jüngste Forschungsstadium umrissen.

## 2. Die Stadien der Digitalisforschung

Mehr als dreißig Jahre wurde die Digitalisforschung durch wechselseitige Ergänzung und Kritik der Forschungsgruppen in Sydney und Berlin-Buch stimuliert. Obgleich beide Gruppen das Digitalisproblem untersuchten, unterschieden sich ihre Forschungsanstrengungen doch in vieler Hinsicht aufgrund abweichender Erfahrungen und Prioritäten sowie verschiedenartiger methodischer und konzeptioneller Ansätze. Die Arbeiten in Sydney umfaßten die Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen sowie vor allem die Synthese von Digitalis-Analoga. So ersetzten sie beispielsweise die Lactongruppe an C17 durch offene Seitenketten oder/und die Zuckerkomponente an C3 durch Estergruppen. Darüber hinaus bestimmten sie die inotrope Wirksamkeit der Verbindungen an überlebenden Präparaten aus dem Herzmuskel von Meerschweinchen. Die umfangreichen Resultate der australischen Gruppen sind umfassend von Wright (1960<sup>[73]</sup>), Thorp und Cobbin (1967<sup>[74]</sup>), Thomas, Boutagy und Gelbart (1974<sup>[75]</sup>), Thomas, Gray und Andrews (1990<sup>[24]</sup>) sowie Thomas (1992<sup>[25]</sup>) publiziert worden. Daher werden ihre hervorragenden Beiträge, auch aus Gründen der Kürze, hier nicht referiert.

### 2.1. Die Rolle der Biotransformation

Die Umwandlung der Digitalisglycoside im Stoffwechsel (Übersichten<sup>[76, 77]</sup>) kann manchmal die Dateninterpretation der biologischen Wirkung in Begriffen der Beziehung zwischen Struktur und Wirkung schwierig machen. Das geht aus folgenden Beispielen hervor. Nach der oralen Anwendung wird aus dem in der Pflanze vorliegenden Primärglycosid Lanatosid C Glucose und Essigsäure durch Mikroorganismen im Darmtrakt abgespalten, bevor es in Form von Digoxin **2** resorbiert wird<sup>[78–80]</sup>. Somit ist Lanatosid C ein Prodrug. Pentaacetylgitoxin muß zu 16-Acetylgitoxin durch mikrobielle und tierische Hydrolasen desacytyliert werden, bevor es wirksam wird; es bietet somit ein Beispiel für Drug-Latentiation<sup>[81–83]</sup>.

Wie Abbildung 3 illustriert, werden Digitoxin **1** und Digoxin **2** durch Spaltung der Tridigitoxosid-Kette langsam und schrittweise zu den Aglyconen abgebaut, die schnell durch Epimerisierung und Konjugation der freigesetzten Hydroxygruppe an C3 inaktiviert werden<sup>[84–90]</sup>. Berücksichtigt man den Ort und die Geschwindigkeit der Biotransformation einerseits und die biologischen Aktivitäten andererseits (Abb. 3), so können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden: Die letztlich wirksamen Verbindungen werden in der Regel nicht durch Biotransformationen, die gewöhnlich viel mehr Entgiftungsreak-

tionen<sup>[76, 77]</sup> sind, gebildet. Aufgrund ihrer langsamen Entfernung verlängert die Zucker-Seitenkette die Halbwertszeit der aktiven Moleküle im Körper<sup>[84, 85, 93]</sup>. Jedoch können die großen Unterschiede in der akuten Wirksamkeit, die Digitalisglycoside unterschiedlicher Konstitution und Konfiguration kennzeichnen, nicht durch Differenzen in der Biotransformation erklärt werden<sup>[76, 77, 93–96]</sup>.

Die 12 $\beta$ -Hydroxylierung von Digitoxin **1** unter Bildung von Digoxin **2** ist keine Voraussetzung für die cardiotonische Wirkung<sup>[97]</sup>; sie führt vielmehr zu einem geringen Wirksamkeitsverlust, wie in Abbildung 3 gezeigt ist. Die Doppelbindung in der Butenolid-Seitenkette kann durch Mikroorganismen im Darmtrakt reduziert werden<sup>[76, 77, 79]</sup>. Da dies in Tiergeweben irreversibel zu sein scheint, kann der Lactonrest nicht als Wasserstoff-Überträger im intermediären Stoffwechsel fungieren<sup>[76]</sup>, wie das einmal vorgeschlagen wurde. Die Doppelbindung orientiert die H-bindenden Acceptorauerstoffatome des Butenolids in Richtung der H-liefernden Aminosäurereste der Erkennungsmatrix, die an der Anziehung großer Reichweite und der H-Brückenbindung hoher Wirksamkeit beteiligt sind<sup>[2]</sup> (vgl. Abb. 9). Darüber hinaus ist die Doppelbindung wichtig für die Stabilisierung der Lacton-Seitenkette gegenüber der Hydrolyse bei physiologischem pH-Wert, die von einem Wirkungsverlust begleitet ist<sup>[98]</sup>.

### 2.2. Das Zielenzym und seine Rolle bei der Kontrolle der Kontraktilität

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen über das Schicksal von Digitalisverbindungen im Stoffwechsel führen uns zu der herausfordernden Schlußfolgerung, daß die Frage des biochemischen Mechanismus der Digitaliswirkung nicht mit der Biotransformation der Verbindungen pflanzlicher Herkunft im Tierkörper verknüpft ist, sondern diese Frage mit derjenigen nach Natur und Funktion des Digitalisrezeptors zusammenfällt<sup>[76]</sup>. Diese Konzeption erschien 1961 ziemlich kühn, wie aus dem Blick zurück auf ein Symposium über Enzyme und Arzneimittelwirkung hervorgeht, das zu jener Zeit abgehalten wurde<sup>[99]</sup>. R. J. P. Williams, der um einen Kommentar zu Rezeptormodellen gebeten wurde, antwortete, daß er das Wort Rezeptor als Synonym für fehlendes Wissen versteht<sup>[99]</sup>. Chain ergänzte, nicht zu glauben, daß der Enzymansatz der richtige Weg ist, neue Arzneimittel zu entdecken – oder im allgemeineren Sinne – den Wirkungsmodus von Arzneimitteln zu verstehen<sup>[99]</sup>.

Trotzdem wollte unsere Gruppe prüfen, ob die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die gerade als hemmbar durch das Digitalisglycosid Ouabain erkannt war<sup>[100]</sup>, die Charakteristik aufweist, als Digitalis-Zielenzym (Rezeptor) fungieren zu können. Dazu verglichen wir umfassend die vielen Bedingungen, unter denen Digitalisverbindungen auf die Kontraktilität, den Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Transport und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität wirken. Auf jeder dieser Ebenen wurden Korrelationen bei allen zwanzig geprüften Charakteristika der Digitaliswirkung nachgewiesen, beispielsweise dem Ort der Wirkung, der Speziesdifferenzen der Digitalisempfindlichkeit, der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, dem Ionen-Antagonismus und -Synergismus, den Kationenbedingungen der Wirkung, dem zeitlichen Verlauf der Wirkungs-

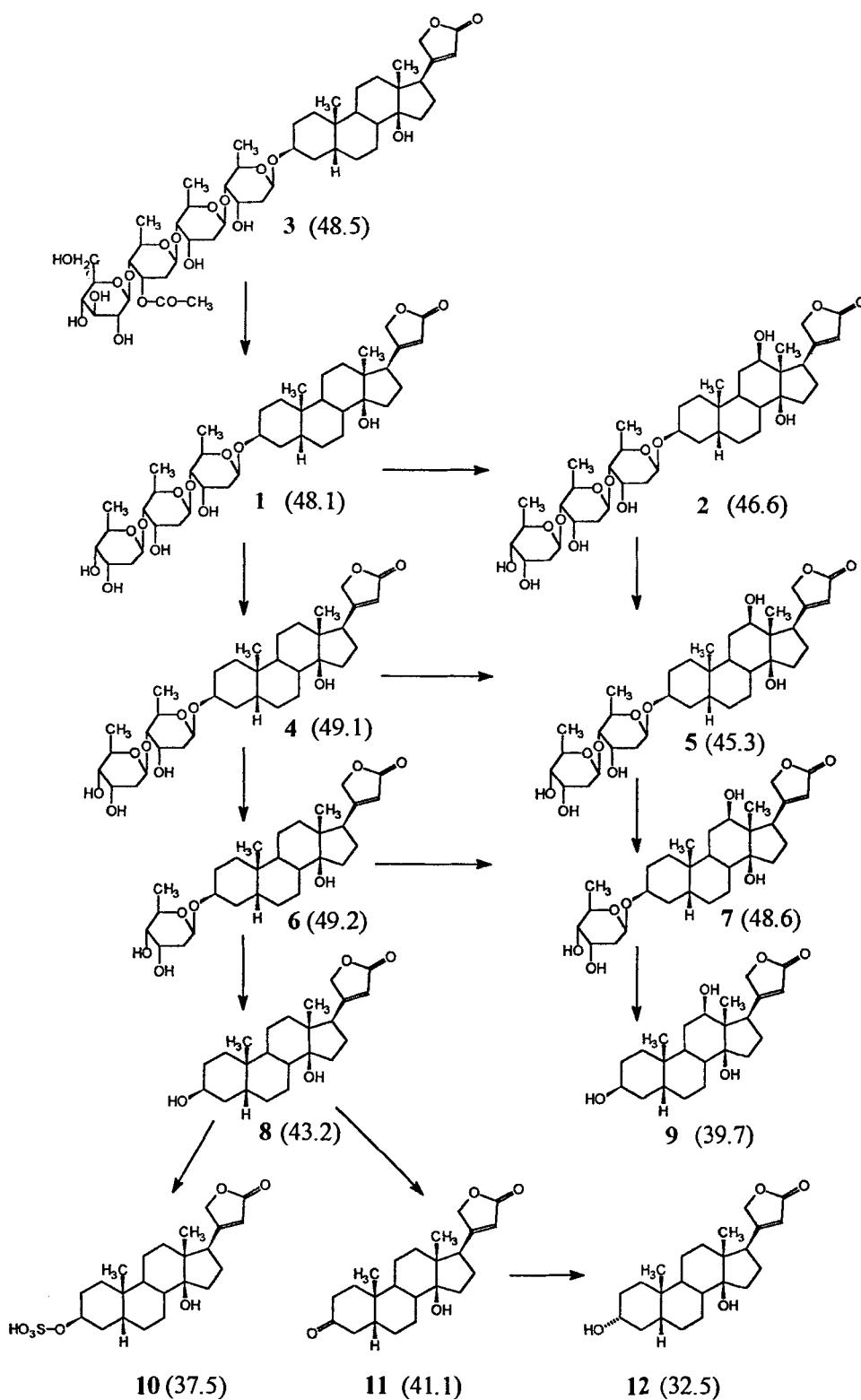


Abb. 3. Biotransformation von Lanatosid A 3 im Tierkörper. Die Desacetylierung und De-glycosylierung ( $3 \rightarrow 1$ ) werden von mikrobiellen Enzymen im Darmtrakt besorgt, wonach die Resorption von 1 möglich ist [78–80]. Danach bewirken Leberenzyme die C12 $\beta$ -Hydroxylierung ( $1 \rightarrow 2$ ) die schrittweise Abspaltung der drei Digitoxosereste ( $1 \rightarrow 8$ ;  $2 \rightarrow 9$ ), die Konjugation mit Schwefelsäure ( $8 \rightarrow 10$ ) oder die Epimerisierung von C3 $\beta$ -OH ( $8 \rightarrow 11$ ) [84–90]. Die letztergenannten zwei Reaktionen sind die entscheidenden Entgiftungs-schritte, wie der Abfall der Gibbs-Energie bei der Wechselwirkung mit dem Rezeptorenzym (eingeklammerte Zahlen, ausgedrückt in  $-k\text{J mol}^{-1}$ ) angezeigt. Aus den  $\Delta G^\circ$ -Werten kann man schließen, daß die Zucker-Seiten-kette größtenteils außerhalb der Digitalis-Er-kennungsmatrix und -Bindungsschlucht des Rezeptors bleibt sowie nur der dem Steroi-dkern nächste Zuckerrest an der Bindung be-teiligt ist und an der Mündung der Rezeptor-schlucht liegt. Dann ist die Lactonfunktion am Boden der Schlucht lokalisiert, d. h. deren Länge beträgt etwa 1.88 nm [91, 92].

entwicklung, der Abhängigkeit von speziellen Funktionszuständen und dem Bereich der wirksamen Digitaliskonzentrationen<sup>[76, 101–104]</sup>. Seit den frühen sechziger Jahren wurden unsere Beobachtungen und Schlußfolgerungen durch mehrere Forschergruppen in unterschiedlicher Weise bestätigt und erweitert<sup>[105–113]</sup>. Endlich, nach Jahrzehntelangen Kontroversen, ist der Konsens erreicht, daß die inotropen Wirkungen von Digitalisverbindungen aus der Bindung an die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

mit resultierender Hemmung des Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Transports hervor-gehen, wie T. W. Smith 1988 konstatierte<sup>[120]</sup>. In Übereinstim-mung mit der Rezeptorfunktion berichteten Okita et al. 1990, daß Digoxin 2 bei therapeutischer Anwendung in der Klinik die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpe im Herzmuskel des Menschen hemmt<sup>[114]</sup>.

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ist die biochemische „Maschinerie“ in der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpe, die in Herzmuskel- und anderen erregba-ren Zellen die normalerweise hohe intrazelluläre Konzentration

von  $K^+$ -Ionen und die niedrige intrazelluläre Konzentration von  $Na^+$ -Ionen aufrechterhält. Wie Repke 1964 erschlossen hat<sup>[115]</sup>, reguliert die aktuelle  $Na^+$ -Konzentration indirekt die  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zellinnern, die als finaler Regler der Herzkontraktilität bekannt war. Die integrierende Beurteilung der damals verfügbaren experimentellen Daten zur Beziehung zwischen der Kontraktilität der Herzmuskelzelle und den Flüssen von  $K^+$ -,  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen durch die Zellmembran führte ihn<sup>[115, 116]</sup> zu der Hypothese, daß eine kurzzeitige Erhöhung der intrazellulären  $Na^+$ -Konzentration, die aus der Digitalis-erzeugten Verminderung der  $Na^+/K^+$ -Pumpkapazität durch Hemmung eines Teils der  $Na^+/K^+$ -ATPase-Moleküle resultiert, die Initialrolle bei der Kontrolle der Herzkraft spielt. Der dargelegte Zusammenhang ist oft in Frage gestellt worden, wurde aber 1985 mit  $Na^+$ -selektiven Mikroelektroden endgültig bestätigt. Lee<sup>[117]</sup> hat die essentielle Bedeutung der Erhöhung der intrazellulären  $Na^+$ -Aktivität für die Wirkung von niedrigen und hohen Digitaliskonzentrationen bewiesen. Speziell hat er gezeigt, daß Digitalis parallel eine Steigerung der  $Na^+$ -Aktivität und der Kontraktionskraft bewirkt und diese Parameter während der positiv-inotropen Digitaliswirkung eng korreliert bleiben. Wie zusammenfassend bereits beschrieben<sup>[11]</sup>, führt eine Erhöhung der chemischen Aktivität von  $Na^+$ -Ionen über den  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher zu einer Erhöhung der chemischen Aktivität von  $Ca^{2+}$ -Ionen infolge vermehrten  $Ca^{2+}$ -Einstroms in die Herzmuskelzelle und verminderten  $Ca^{2+}$ -Ausstroms aus derselben.

### 2.3. Der „mikroskopische“ Mechanismus der $Na^+/K^+$ -ATPase-Hemmung

Wilbrandt et al.<sup>[118]</sup> erklärten die starke Abhängigkeit der Herzwirkung der Digitalisverbindungen von der Kontraktionsfrequenz mit der Hypothese, daß diese Steroidagentien mit den transmembranen Kationenflüssen interferieren, die während der Erregung und der Rückkehr in den Ruhezustand ablaufen. Dieser Vorstellung lag das Wissen zugrunde, daß andere Steroide, insbesondere Corticosteroide, möglicherweise als Kationenträger eine wichtige Rolle beim Kationentransport spielen (Abb. 4). Diese Hypothese unterstützend, berichtete Wilbrandt<sup>[120]</sup>, daß Corticosteroide die Hemmwirkung cardiotonischer Steroide auf den zellulären  $Na^+/K^+$ -Transport antagonieren. Er<sup>[121]</sup> erwog dementsprechend die Möglichkeit, daß der Digitaliseffekt auf einen Corticosteroid-Trägerbestandteil der  $Na^+/K^+$ -ATPase statt auf das Enzymprotein selbst gerichtet ist.

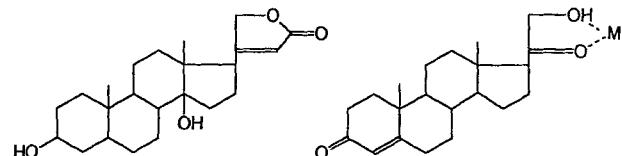


Abb. 4. Angenommene Struktur analogie zwischen dem starken Hemmstoff Digitaloxin des  $Na^+/K^+$ -Transports (links) und einem postulierten Chelat zwischen 11-Desoxycorticosteron und einem Alkalimetall-Kation M (rechts). Auf dieser Grundlage wurde von Wilbrandt [119] vorgeschlagen, daß die Wirkung der Digitalisverbindungen auf einem kompetitiven Antagonismus gegenüber Kationen-beladenen Corticosteroiden beruht; er stellte sich diese mit der  $Na^+/K^+$ -transportierenden ATPase komplexiert vor, um als Carrier für Kationen durch die Zellmembran zu fungieren (aus Lit. [119]).

Unsere Gruppe<sup>[122]</sup> zeigte jedoch, daß Corticosteroide eine Digitalis-induzierte  $Na^+/K^+$ -ATPase-Hemmung nicht abschwächen. Ihre Beobachtungen schienen eine direkte, funktionell antagonistische Konkurrenz zwischen Corticosteroiden und cardiotonischen Steroiden um die Bindung an einer gemeinsamen Bindungsstelle an diesem Enzym auszuschließen. Die antagonistische Wirkung von Corticosteroiden und cardiotonischen Steroiden, die Wilbrandt und Weiss<sup>[123]</sup> bei intakten Zellen gefunden haben, scheint auf die Induktion einer biosynthetischen Erhöhung der Zahl an  $Na^+/K^+$ -ATPase-Molekülen zu beruhen<sup>[124]</sup>, die den Anteil an Digitalis-gehemmten Enzymmolekülen ausgleicht.

Nach allem geht der hemmende Effekt von Digitalisverbindungen auf die  $Na^+/K^+$ -ATPase-Aktivität zurück, auf ihre Wechselwirkung mit dem Erkennungsbereich und wirkungsauslösenden Bindungsstelle am Enzymprotein, den wir mit folgenden Beobachtungen näher charakterisiert haben. Ein großer Überschuß an ATP gegenüber Digitalis hinsichtlich der Konzentration antagonisiert nicht die Digitalisbindung an das Enzym<sup>[125]</sup>. Unter gewissen Bedingungen gibt es einen kompetitiven  $K^+$ -Effekt auf die Digitalisbindung; jedoch haben wir gezeigt<sup>[125]</sup>, daß dessen molekulare Basis nicht auf der Konkurrenz um eine gemeinsame Bindungsstelle am Enzym beruht, sondern auf der um die ATP- oder Digitalis-bindende Enzymkonformation. Nach den von Monod et al.<sup>[126]</sup> eingeführten Definitionen sind somit die Digitalisverbindungen nicht-kompetitive, heterotrop-wirkende allosterische Hemmstoffe, die die Umwandlung eines aktiven in einen inaktiven Konformationszustand des Enzymproteins bewirken. Noch spezifischer gefaßt wurde von unserer Gruppe<sup>[127]</sup> gezeigt, daß ein gemeinsamer Nenner der Hemmwirkung von Digitalisverbindungen eine große Entropiezunahme im Enzymprotein ist, die mit Verlust der hohen Affinität des katalytischen Zentrums zu ATP verknüpft ist.

Die Suche nach der genaueren Lage der Digitalis-erkennenden und -bindenden Proteinmatrix wurde von mehreren Forschergruppen über die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen den Unterschieden in der Digitalisaffinität (mit Quabain als Prototyp) und denen in der Primärstruktur der  $Na^+/K^+$ -ATPase intensiv angegangen (Abb. 5). Alle bisher abgeleiteten Vorstellungen (siehe Übersicht in Lit. [2]) haben sich jedoch mit zunehmender Kenntnis als unhaltbar erwiesen. Wie wir in Kürze an anderer Stelle zeigen werden, befindet sich die Digitalis-Bindungsschlucht zwischen zwei katalytischen Untereinheiten und wird so von zwei Membran-durchquerenden Peptidsequenzen (H1 in Abb. 5) gebildet. Deren Assoziation stellt die Wechselwirkung dieser Untereinheiten im diprotomeren Holoenzym ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub> her, so daß durch Interkalation eines Digitalis-moleküls der katalytische Cyclus unterbrochen wird.

### 2.4. Der Vergleich von biologischen mit molekularen Suchtest-Systemen

Die geeignete Methode für die quantitative Bestimmung der positiv-inotropen (cardiotonen) Wirkung einer herzwirksamen Verbindung ist die Einschätzung ihres Einflusses auf die isometrische Kontraktionskurve, die an isolierten Herzmuskel-Präparaten von bestimmten Tierspezies vermessen wird. Verlässliche

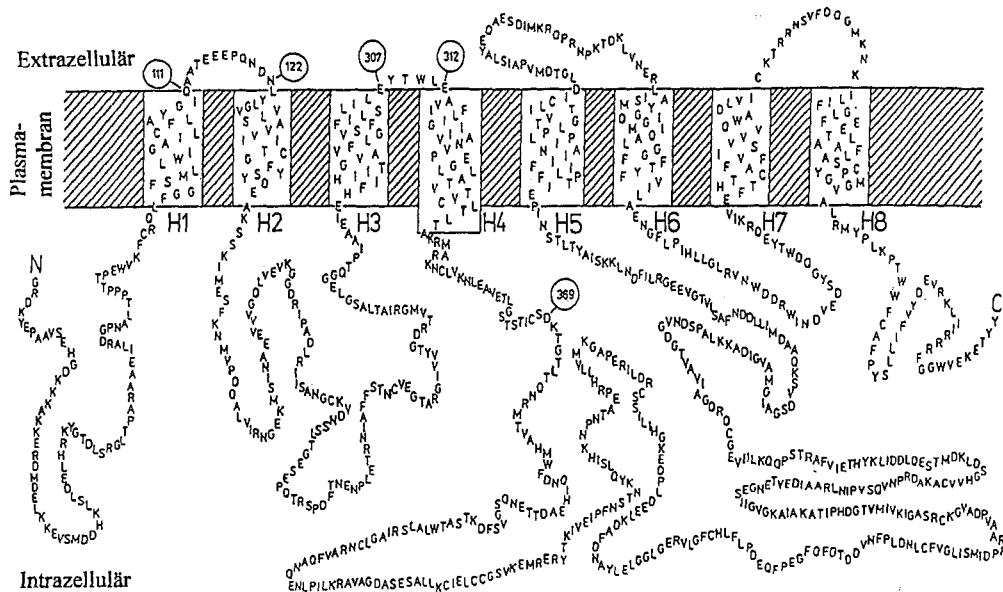


Abb. 5. Schematische Darstellung der Primärstruktur und der räumlichen Organisation der katalytischen Untereinheit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Die Aminosäurekette penetriert die Zellmembran achtmal. Die membran durchquerenden Sequenzen H1–H4 tragen die extrazellulär disponierte H1-H2-Verknüpfung (Q111–N122) und H3-H4-Verknüpfung (E307–E312), die bei der Bildung der Digitalis-Erkennungsmaatrix und -Bindungsschlucht zusammenwirken angenommen wurden [2]. Die H4-Sequenz vermittelt die Kommunikation der postulierten Matrix mit dem phosphorylierbaren Aspartylrest D369 im katalytischen Zentrum des Enzyms. Gezeigt ist hier eine Kombination der in Lit. [128, 129] gegebenen Darstellungen.

Daten für den Vergleich der inotropen Wirksamkeit von herzwirksamen Verbindungen können nur dann erhalten werden, wenn die Versuche unter identischen Bedingungen durchgeführt werden<sup>[131]</sup>. Wegen der Vielfalt der genutzten Testbedingungen ist es nicht leicht oder gar unmöglich, die in der Literatur berichteten Zahlenwerte für die Urteilsbildung über die Beziehung zwischen Struktur und Wirkung zu kombinieren<sup>[132, 133]</sup>. Eine umfassende Übersicht über diese Beziehungen, die mit Herzpräparaten von Meerschweinchen unter identischen Bedingungen ermittelt worden waren, wurde kürzlich von R. Thomas et al. vorgelegt<sup>[24]</sup>.

Bedeutsam für den Nachvollzug eines wesentlichen Ziels dieser Übersicht ist die Einsicht, daß es zwei elementare Möglichkeiten der Fehlinterpretation von Beobachtungen mit Tiersmodell-Systemen gibt. Zum einen erzeugen alle Hemmstoffe des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Transportsystems, unabhängig von ihrem mikroskopischen Hemm-Mechanismus, positiv-inotrope Effekte, wenn sie nicht zusätzlich noch andere biochemische Systeme affizieren, die die Manifestation der inotropen Wirkung ausschließen<sup>[110]</sup>. Zum anderen können einige Hemmstoffe des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Transports, auch wenn sie durch Besetzung der Digitalis-Bindungsschlucht wirken, eine positiv-inotrope Wirkung vermissen lassen, falls sie zusätzlich biochemische Systeme affizieren, die eine Manifestation ihres inotropen Vermögens nicht zulassen. Bedeutsame Beispiele für beide Fälle wurden durch aufeinanderfolgenden Einsatz der nachstehend charakterisierten „makroskopischen“ und „mikroskopischen“ Testsysteme diagnostiziert<sup>[2]</sup>.

Das makroskopische Suchen (screening) mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erwies sich als ein nur initial brauchbarer Test. Er beschränkt sich auf die Bestimmung der apparenten Gibbs-Energieänderung ( $\Delta G^0'$ ) bei der Bildung des Gleichgewichtskomplexes aus einem Hemmstoff und dem Enzym unter standardisierten Bedingungen; experimentelle Details wurden von uns anderswo publiziert<sup>[92, 134, 135]</sup>. Die Verfügbarkeit der  $\Delta G^0'$ -Werte ermöglichte es uns, den extrathermodynamischen Ansatz zur quantitativen Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehungen anzuwenden<sup>[92, 134, 135]</sup>. Dieses Verfahren erfordert

selbstverständlich, daß ein gleichartiger makroskopischer und mikroskopischer Mechanismus der beobachteten Hemmwirkung zugrundeliegt. Ob diese Voraussetzung erfüllt ist, kann allerdings nicht aus Untersuchungen der Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (oder des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Transports) abgeleitet werden: Daher wird die Untersuchung als makroskopischer Suchtest bezeichnet. Speziell ausgedrückt können viele hemmwirksame Liganden von beliebiger Struktur (vgl. Lit.<sup>[136]</sup>) den katalytischen Cyclus der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch ihre Bindung an völlig andere Bindungsstellen als die der Digitalisverbindungen unterbrechen (Abb. 6). Daher werden Wirkstoffe, die das Enzymsy-

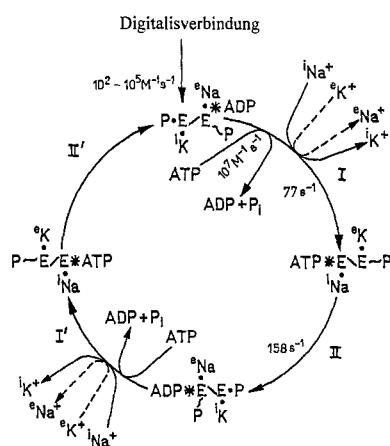


Abb. 6. Reaktions- und Funktionsschema der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Besonders beachtenswert sind die großen Unterschiede in den Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Bildung des Hemmstoffkomplexes zwischen Digitalisverbindungen und dem phosphorylierten Enzymintermediat einerseits und für die Bildung des produktiven Komplexes zwischen ATP und dem gleichen Enzymintermediat andererseits während der maximalen Aktivität des Enzyms. Die Buchstaben E symbolisieren die beiden katalytischen Untereinheiten, und die hochgestellten Buchstaben zeigen die Lokalisierung der  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{K}^+$ -Ionen auf der intrazellulären (i) oder extrazellulären (e) Seite des Enzyms oder der Zelle an. Verglichen mit der Diffusionsgeschwindigkeitskonstante von langsam diffundierenden Reaktanten (nahe  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) werden die Geschwindigkeitskonstanten der Digitalisassoziation 4–7 Größenordnungen kleiner gefunden [127], aber ähnlich klein wie die Isomerisierungsrate, die bekanntlich die Protein-Konformationsänderung bei Enzym-Substrat-Wechselwirkungen charakterisiert und im Bereich von  $10^2$ – $10^4 \text{ s}^{-1}$  liegt. Die Dauer des Halbzyklus bei  $37^\circ\text{C}$  beträgt 6–7 ms (aus Lit. [137]).

stem durch einen Digitalis-ungleichen mikroskopischen Mechanismus hemmen, unvermeidlich zu einer Nullhypothese über Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung führen.

Das mikroskopische Prüfen basiert auf unserer Erfahrung<sup>[66, 130]</sup>, daß die adäquate Besetzung der Digitalis-Bindungsschlucht durch einen Hemmstoff der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, gleich welcher Struktur, und dessen Eigenschaft als mechanistisch digitalisartige Verbindung durch seine Fähigkeit bewiesen ist, die Synthese des energiereichen Carboxyphosphat-Phosphoenzyms aus Orthophosphat in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zu fördern. Das mikroskopische Prüfen hat sich daher als finaler Test erwiesen, um Verbindungen zur Auffindung der pharmakophoren Leitstruktur bei bimolekularen Erkennungsuntersuchungen auszuwählen oder auszuschließen<sup>[66, 130]</sup>.

Bekanntlich ist der Mensch in vieler Hinsicht eine besondere Spezies. So gibt es in den Rezeptor-Effektor-Parametern beträchtliche Unterschiede zwischen den Isoformen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase beim Menschen und anderen Spezies<sup>[104, 127, 134, 138]</sup>. Glücklicherweise können aus menschlichen Geweben leicht  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Präparate gewonnen werden, die sich für den Einsatz in den obigen molekularen Testsystemen eignen<sup>[92, 134]</sup>. Die Zeiten sind vorbei, in denen ein überlebendes Herz, das aus einem geköpften Menschen herausgeschnitten worden war, verwendet werden mußte, um die Wirkung von Digitoxin auf den Herzmuskel des Menschen zu studieren<sup>[139]</sup>.

## 2.5. Die chemische Jagd zur Entdeckung von Leitstrukturen und zur funktionellen Klassifizierung der Strukturkomponenten bei digitalisartig wirkenden Hemmstoffen

Die Leitstruktur in komplexen, biologisch-aktiven Verbindungen ist als die Strukturkomponente definiert, die die minimalen spezifischen Erkennungserfordernisse zeigt, wobei ihre Wirksamkeit schwach sein kann<sup>[140, 141]</sup>. Die Entdeckung der Leitstruktur wird als wesentlicher Schritt zur Einschränkung des Glücksspiels beim Wirkstoffdesign betrachtet<sup>[142]</sup>. So kann die Entwicklung eines neuen Arzneimittels die Synthese von 10 000–20 000 neuen Verbindungen erfordern und über 200 Millionen DM kosten<sup>[143]</sup>. Auch im Falle der Herzglycoside, wie Digitoxin **1** oder Digoxin **2** (siehe Abb. 2), erwies sich die Aufdeckung ihrer Leitstruktur als schwierig. Digitalisverbindungen sind, wie in Abschnitt 2.3 abgeleitet, heterotrop wirkende, allosterische Hemmstoffe der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Das bedeutet, daß sie keine Ähnlichkeit mit dem Substrat ATP aufweisen und somit keinen rationalen Ausgangspunkt bei der Suche nach der Leitstruktur bieten. Dies scheint zu erklären, warum unsere Gruppe erst 1985 die wahre Leitkomponente in Herzglycosiden entdeckte<sup>[91, 92]</sup>. Unser systemisches Durchsieben von etwa 700 im wesentlichen kongeneren Digitalisderivaten wurde ermöglicht durch das Überlassen zahlreicher seltener Verbindungen von vielen bedeutenden Chemikern wie K. Meyer, G. R. Pettit, T. Reichstein, D. Satoh, F. Sondheimer, C. Tamm, R. Tschesche, K. Wiesner und W. W. Zorbach, um nur einige wenige zu nennen. Der gegebene reiche Fundus wurde in unserem Laboratorium durch gezielte Partialsynthese von Steroidderivaten ergänzt, die aus pflanzlichen Quellen nicht verfügbar waren<sup>[35–68]</sup>. Die Struktur der Verbindungen und die zugehörigen Testdaten wurden in Lit.<sup>[1, 2]</sup> vorgestellt.

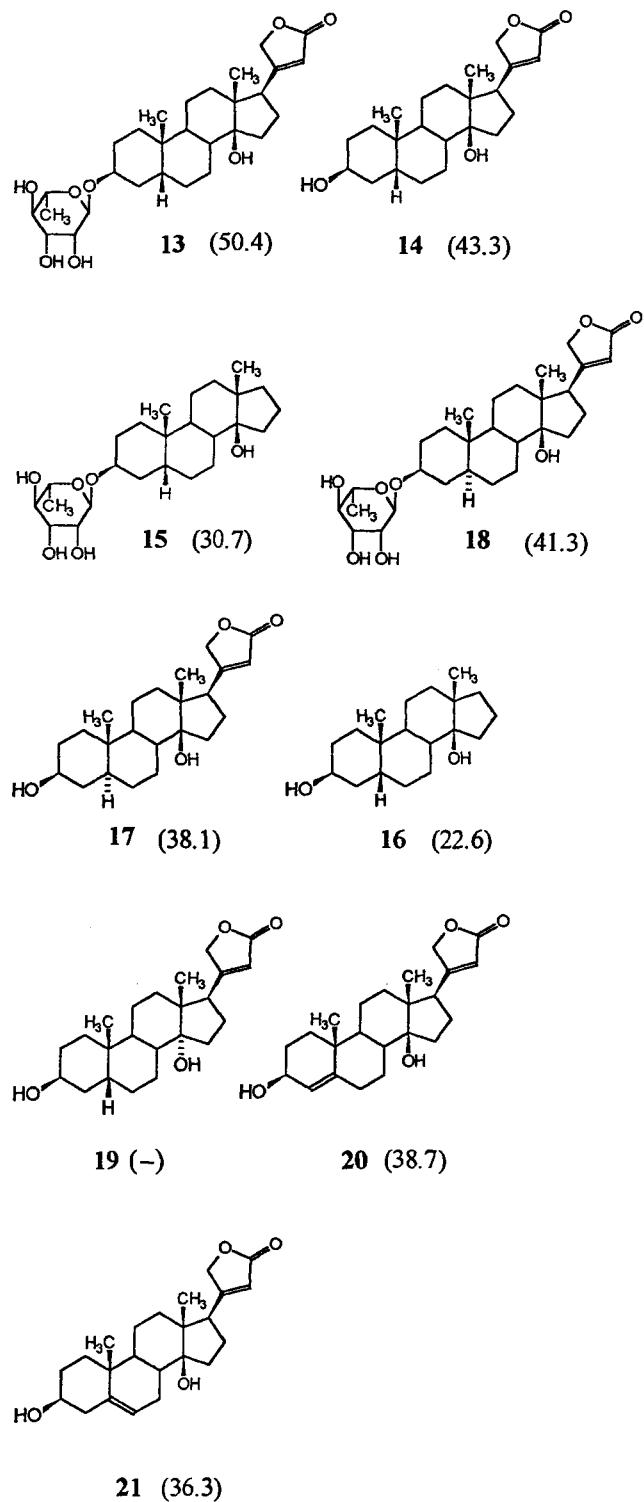


Abb. 7. Der Einfluß des Entfernens der Seitenketten von  $3\beta$ -O-( $\alpha$ -L-Rhamnosyl)digitoxygenin **13** (**13** → **14**, **13** → **15**, **13** → **16**) offenbart deren unterschiedliche Beiträge zur integralen Gibbs-Energie der Wechselwirkung mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aus dem Herzmuskel des Menschen [91, 92]. Während der Zucker- und der Lactonrest selbst ohne Hemmwirkung sind, entfaltet der Steroidkern **16** eine intrinsische Wirksamkeit von eins mit totalem Hemmefekt bei der Besetzung der Digitalis-Bindungsschlucht eines Enzymmoleküls [130] und fungiert somit als eine für sich vollwirksame Leitstruktur in Digitalisglycosiden [91, 92, 130]. Wird die A/B-cis- in die A/B-trans-Ringverknüpfung umgewandelt (**14** → **17**), vermindert sich die Wirkung des Aglycons und schwächt auch die Wirkungssteigerung durch Glycosidierung (vgl. **14** → **13** mit **17** → **18**). Die Umwandlung der C/D-cis- in die C/D-trans-Ringverknüpfung (**14** → **19**) hingegen annuliert die Wirksamkeit. Ein Vergleich zwischen den Gibbs-Wechselwirkungsenergien der Aglycone **14**, **17**, **20** und **21** zeigt, daß **14** mit einer stark gekrümmten, weitgehend inflexiblen Struktur am besten in die Digitalis-Bindungsschlucht paßt. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die  $\Delta G^\circ$ -Werte in  $-\text{kJ mol}^{-1}$  an; **19** ist inaktiv.

So haben wir eine lange Distanz auf dem Wege zurückgelegt, der uns zur funktionellen Zuordnung der drei Strukturkomponenten von regulären Digitalisverbindungen geführt hat. Wie knapp in Abbildung 7 untermauert, ist das Steroidgerüst  $5\beta,14\beta$ -Androstan- $3\beta,14$ -diol **16** die inhärente wirksame Leitstruktur von natürlichen Herzglycosiden. Das Entfernen der Hydroxygruppe an  $C3\beta$  schwächt die Wirksamkeit nur unwesentlich, das Ersetzen von  $C14\beta$ -OH durch  $C14\beta$ -NH<sub>2</sub> kann sogar die Hemmaktivität beträchtlich erhöhen<sup>[2]</sup>. Daher ist  $5\beta,14\beta$ -Androstan die Grundleitstruktur (vgl. Abb. 7 und 10). Die  $C3\beta$ -O- und  $C17\beta$ -Seitenketten sind, wenn man sie vom Steroidgerüst abtrennt, selbst ohne intrinsische Hemmwirkung. Nach dem Verknüpfen mit dem Steroidgerüst tragen sie jedoch deutlich zur Gesamt-Wechselwirkungsenergie bei, was nachfolgend beschrieben ist.

Die Tridigitoxosid-Kette von Digitoxin **1** und Digoxin **2** kann mehr als isoenergetisch durch Monoside ersetzt werden; Abbildung 8 bietet einige Beispiele. Der Butenolidrest von **1** und **2**

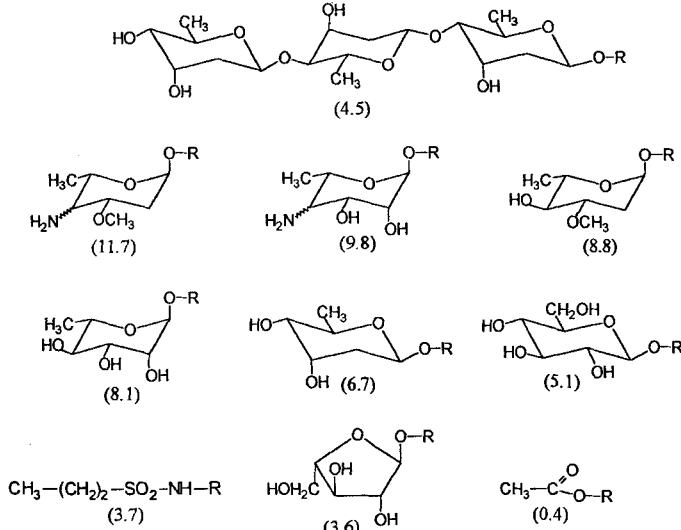


Abb. 8. Unterschiede in der Vergrößerung der Gibbs-Energie der Wechselwirkung zwischen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aus dem Herzmuskel des Menschen und Digitoxigenin **14**, die aus der Einführung unterschiedlicher Substituenten an  $C3\beta$ -OH resultieren [2]. Die konformative Flexibilität der Zuckerreste, die aus den beiden Graden von Rotationsfreiheit um die Glycosidbindungen entsteht, kann helfen zu erklären, warum sowohl  $\beta$ -D- als auch  $\alpha$ -L-Zucker mit C1- bzw. 1C-Konformation die Wechselwirkungsenergie vergrößern. Außerdem können die Aminosäuresequenzen, die an der Bildung der Zucker-Bindungsstelle beteiligt sind, eine entsprechende konformativ Anpassungsfähigkeit aufweisen. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die  $\Delta\Delta G^{\circ'}$ -Werte in  $-\text{kJ mol}^{-1}$  an.

kann isoenergetisch und auch mehr als isoenergetisch durch einige in Abbildung 9 dargestellte Heterocyclen substituiert werden. Die Gesamtheit unserer Ergebnisse wurde für die Ableitung der Chemotopographie der Digitalis-Erkennungsmatrix und -Bindungsschlucht im  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Protein als Schritt zum rationalen Design neuer inotroper Steroide ausgewertet<sup>[2]</sup>.

Wie in Abbildung 7 gezeigt, verliert der starke Hemmstoff Digitoxigenin **14** seine Wirksamkeit schon durch Umwandlung der C/D-cis-Ringverknüpfung in die C/D-trans-Verknüpfung (**14 → 19**). Das letztere Strukturmerkmal ist den endogenen Hormonsteroiden gemeinsam. Aufgrund dieser früh gemachten Erfahrung hatten wir C/D-trans-Steroide als belanglos in bezug

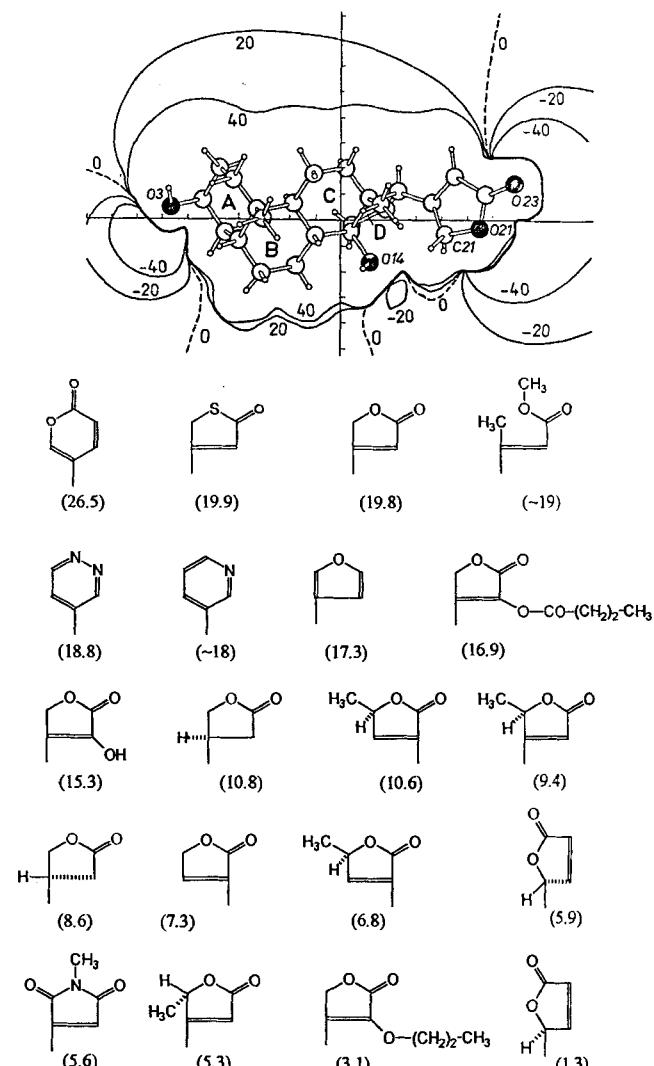


Abb. 9. Die kinetische Bedeutung und der energetische Beitrag von Substituenten an  $C17\beta$  von  $5\beta,14\beta$ -Androstan- $3\beta,14$ -diol bei der Wechselwirkung der Hemmstoffe mit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aus dem Herzmuskel des Menschen. Die grob dipolare Verteilung des molekularen, elektrostatischen Potentialfeldes im Außenraum von Digitoxigenin **14**, die im oberen Teil der Abbildung gezeigt ist (aus Lit. [91]), scheint den größeren und mittleren Attraktionsbereich des Moleküls bei der Bildung des Diffusionskomplexes zu kontrollieren und die Anziehung des Aglycons, mit dem Lactonring voran, durch die Rezeptor-Bindungsschlucht zu befördern [91, 92]. Die Bildung des hemmenden Komplexes scheint Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den elektronenreichen Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoff-Atomen in den Seitenketten einerseits und H-liefernden Aminosäureseitenresten in der entsprechenden Rezeptor-Bindungsstelle andererseits zu erfordern. Eine Durchsicht der sehr unterschiedlichen Wechselwirkungsenergie-Beiträge der  $17\beta$ -Substituenten zeigt, daß die gemessenen integralen Größen aus einer unentwirrbaren Überlagerung von anziehenden und abstoßenden, elektronischen und sterischen Komponenten der Teilstrukturen resultieren [1, 2]. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die  $\Delta\Delta G^{\circ'}$ -Werte in  $-\text{kJ mol}^{-1}$  an.

auf den Zusammenhang zwischen Struktur und Hemmwirkung angesehen, obgleich wir einige Verbindungen ohne Lactonsubstituenten an  $C17\beta$  als aktiv oder sogar aktiver als ihre C/D-cis-Verwandten gefunden hatten<sup>[92]</sup> (vgl. die  $\Delta G^{\circ'}$ -Werte für **16** und **23** in den Abbildungen 7 und 10).

Wie Marshall und Cramer<sup>[144]</sup> betont haben, hatten Versuche zur Korrelation der biologischen Wirksamkeit mit der Struktur der Verbindungen dann oft nur begrenzten Erfolg, wenn die Analyse sich nicht auf eine kongenere Serie beschränkte. Allerdings verspricht die Einbeziehung strukturell verschiedenenarti-

ger, aber am gleichen Rezeptorort angreifenden Verbindungen grundlegendere Lösungen des Problems der Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die zur Entwicklung neuartiger therapeutischer Agentien führen können<sup>[144]</sup>. Daher haben wir unsere Untersuchungen mit C/D-*trans*-Steroiden des Hormontyps wieder aufgenommen und systematisch erweitert.

Entscheidend für diese Unternehmung war unsere Entdeckung, daß sich in den makroskopischen und mikroskopischen Suchtests (vgl. Abschnitt 2.4) einige Progestine wie Megestrolacetat **25** und Chlormadinolacetat **26** als Hemmstoffe der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase erwiesen (Abb. 10), die über einen digitalisartigen mikroskopischen Mechanismus, d.h. über die Besetzung der Digitalis-Bindungsschlucht, wirksam werden<sup>[66]</sup>. Die Verknüpfung von C3β-OH mit einem Monosaccharid vermindert (**26** → **27**) oder verstärkt (**28** → **29**) die Hemmwirksamkeit. Dies ist in etwa in Einklang mit dem Verhalten einiger C/D-*cis*-Steroide (vgl. **17** → **18** mit **14** → **13** in Abb. 7). Der dargelegte Einfluß der Glycosidierung widerspiegelt die sperrige oder mehr oder minder paßfähige räumliche Orientierung der Zucker-Seitenkette zur Zucker-Bindungsstelle in der Digitalis-Bindungsschlucht, die von der Anordnung der A/B-Ringverknüpfung abhängt<sup>[65]</sup>.

Höchst bemerkenswert ist, daß die Glycosidierung von Chlormadinolacetat **26** → **27** dessen negativ-inotrope Wirkung<sup>[146]</sup> in eine überraschend dauerhafte positiv-inotrope Wirkung umwandelt<sup>[64]</sup>. Die Wirkungen von **27** auf die Kontraktilität des Herzens und andere Herz-Kreislauf-Parameter sind bei Katzen günstiger als die von Digitoxin **1**. Die Möglichkeit, daß dieser funktionelle Unterschied mit der C/D-*trans*- oder C/D-*cis*-Ringverknüpfung bei den beiden Cardiotonica korreliert, ist noch zu prüfen. Der Weg zur Lösung dieser Frage wird im Abschnitt 3 angesprochen. Hier ist die höchst wichtige Schlußfolgerung aus unseren Untersuchungen mit **27** herauszustellen, daß die C/D-*cis*-Ringverknüpfung, die bekanntlich nur in Steroiden aus bestimmten Pflanzen und Kröten vorkommt, im Gegensatz zur gegenwärtigen Lehrmeinung keine notwendige Voraussetzung cardiotonischer Wirkung ist; somit können also die im tierischen Organismus vorliegenden Hormonsterioide mit C/D-*trans*-Ringverknüpfung gleichfalls das Vermögen haben, digitalisartige, positiv-inotrope Wirkungen auszulösen<sup>[64]</sup>. Als Voraussetzung für die Nutzung dieses Potentials wurde von uns die Eliminierung der hormonalen Potenz durch Steroidglycosidierung erkannt, die die Wechselwirkung mit den intrazellulär lokalisierten Hormonrezeptoren verhindert<sup>[64]</sup>. Ein weiteres Beispiel für diese mögliche Beziehung wird im Abschnitt 3 erörtert.

## 2.6. Das Rätsel um endogenes Digitalis

Unser Interesse an der Erforschung der C/D-*trans*-Hormonsterioide im Hinblick auf mögliche digitalisartige Wirkungen wurde auch durch ihre potentielle Beziehung zum endogenen Digitalis stimuliert. Die systematische Suche nach dessen Natur wurde von Szent-Györgyi begründet<sup>[147]</sup>, der 1953 berichtete, daß normales Blutserum Substanzen enthält, die eine digitalisartige Wirkung entfalten. Unter 22 geprüften Steroiden wurden Desoxycorticosteron und Progesteron als diejenigen ermittelt, die mit Serum und Herzglycosiden die Wirkung auf die Kontraktilität des Herzens teilen. Ihre Wirksamkeit war jedoch

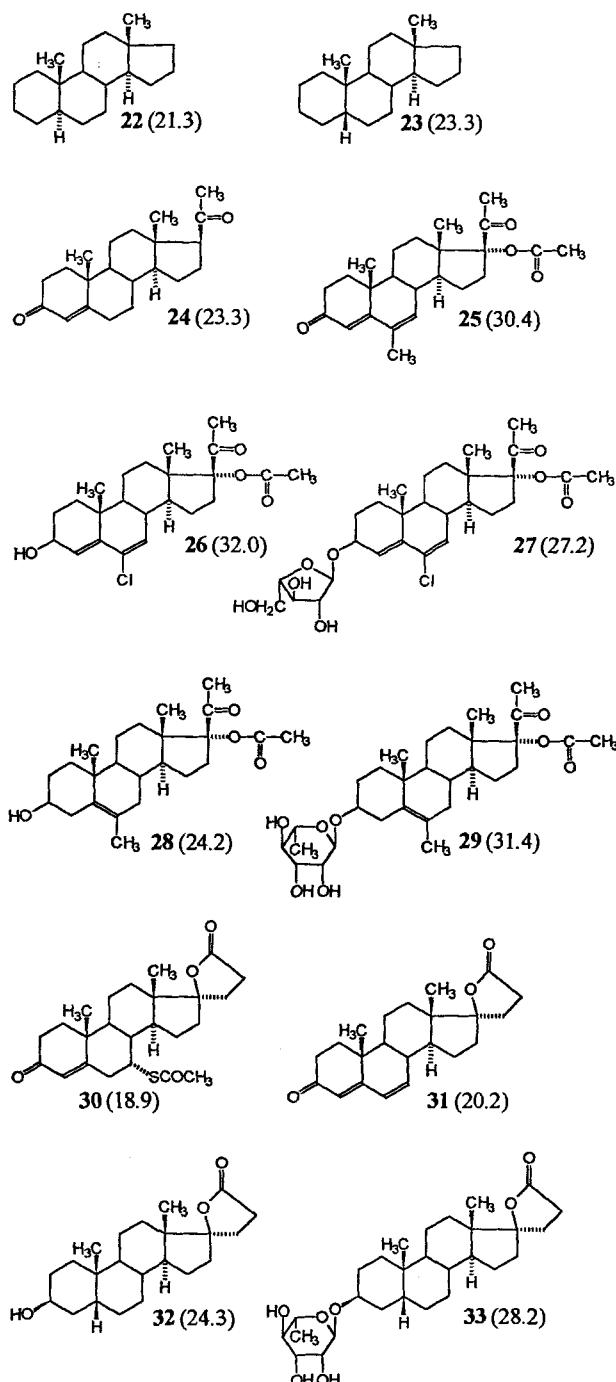


Abb. 10. Die Gibbs-Energien der Wechselwirkung zwischen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aus dem Herzmuskel des Menschen und digitalisartig wirkenden C/D-*trans*-Steroiden des Hormontyps: der Einfluß von Konfigurations- und Substitutionsveränderungen [2, 64–66, 145]. Bei Anlegung der in Abschnitt 2.5 zitierten Definition [141, 142] ist die Leitstruktur in diesen Steroiden 5β-Androstan bei der Besetzung der Digitalis-Bindungsschlucht. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die ΔG<sup>0°</sup>-Werte in – kJ mol<sup>–1</sup> an.

zu niedrig, um die Serumwirksamkeit zu erklären. Im obigen Kontext erwog Szent-Györgyi: „The digitalis glycosides are no drugs at all: they are substitutes for a missing screw in our machinery, which had a cardinal role in one of the most basic physiological regulations.“

Die Suche nach endogenem Digitalis wurde in neuerer Zeit durch die Entdeckung der Endorphine, den endogenen Liganden des Opiatrezeptors, stimuliert. So lag die Schlußfolgerung

nahe, daß eine parallele Situation für ein endogenes Digitalis-Analogon zutreffen könnte. Diese Konzeption scheint durch die Tatsache gestützt, daß eine spezifische Digitalis-Bindungsstelle bei den  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen aller Tierspezies existiert.

Aus theoretischen und praktischen Gründen ist die Suche nach endogenem Digitalis eine Herausforderung für viele in der medizinischen und der Grundlagenforschung sowie in der pharmazeutischen Industrie geworden. Nach den Übersichten von Goto et al.<sup>[148]</sup> und von Hamlyn und Manunta<sup>[149]</sup> haben zahlreiche Berichte Indizien- und substantielle Beweise für das Vorkommen von endogenen Hemmstoffen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase geliefert, aber die chemische Identität hat sich bisher der Klärung entzogen. Auf der Basis von neun Kriterien wurden viele Kandidaten für einen endogenen digitalisartigen Faktor vorgeschlagen<sup>[148]</sup>. Alle den Kriterien zugrundeliegenden Bestimmungsverfahren sagen wenig oder nichts über die genaue Bindungsstelle der Verbindungen und den mikroskopischen Mechanismus der beobachteten Effekte aus. Das geeignete Kriterium für die Klassifizierung einer Substanz oder eines Isoforms als digitalisartig wirksam ist der Beweis der Besetzung der Digitalis-Bindungsschlucht<sup>[66, 130]</sup> durch das mikroskopische Testverfahren (vgl. Abschnitt 2.4). Das ist jedoch bisher nur bei einer einzigen Untersuchung angewendet worden<sup>[150]</sup>. Darin hat der gut charakterisierte hypothalamische Hemmstoff der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, anders als Digitalis, einen negativen Ausfall im mikroskopischen Bestimmungsverfahren gezeigt. Offensichtlich existieren im Tierkörper einige physiologische Hemmstoffe der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, die nicht notwendigerweise eine Strukturbeziehung zu Digitalisverbindungen haben<sup>[151]</sup>.

Die Berichte von Hamlyn et al.<sup>[152]</sup> und Goto et al.<sup>[153]</sup>, daß bestimmte, aus unterschiedlichen Quellen isolierte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Hemmstoffe mit Ouabain oder Digoxin identisch wären, sind tatsächlich höchst eindrucksvoll. Das gravierende Problem im Hinblick auf die Akzeptanz dieser Identität ist, daß ein Biosyntheseweg für solche C/D-*cis*-Steroide, wie er bei seltenen Pflanzen und Kröten vorkommt, bei Säugern unbekannt ist. Unser Zweifeln an der Identität eines endogenen Hemmstoffs der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit Ouabain hat sich jüngst als richtig erwiesen<sup>[154]</sup>. In diesem Kontext sind wir versucht zu spekulieren, daß bestimmte C/D-*trans*-Hormonsteroide, wie die im Abschnitt 2.5 besprochenen Progestine, als Modelle für die chemische Natur des endogenen Digitalis dienen könnten<sup>[66]</sup>.

### 3. Jüngstes Entwicklungsstadium: Daten-orientierte Optimierung des Leitsteroids

Der hauptsächlich begrenzende Faktor für die maximale Digitalisdosis, die bei der Behandlung der Herzinsuffizienz verordnet werden kann, ist die Entwicklung von ventrikulären Arrhythmien. Ein wesentliches Element, das zum Entstehen der arrhythmogenen Wirkung der Herzglycoside beiträgt, ist die Erregung oder Lähmung cerebraler Nervensysteme<sup>[155]</sup>. Die Bedeutung neuraler Digitaliswirkungen folgt aus den unterschiedlichen Funktionen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in neuralen Geweben<sup>[156]</sup>. So spielt die Hemmung neuraler  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen durch Digitalisverbindungen eine ursächliche Rolle bei der Auslösung von therapeutisch nützlichen und schädlichen, initial

neuralen Digitaliswirkungen<sup>[157]</sup>. Daher scheint uns ein aussichtsreicher Weg zur Vergrößerung des Verhältnisses zwischen den Dosen für die therapeutischen und toxischen Digitaliswirkungen das Design von Digitalisverbindungen mit ungewöhnlich unterschiedlichen Affinitäten für die Isoformen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in Herzmuskel- und Hirnzellen zu sein<sup>[1, 2]</sup>.

Ein erster Vergleich zwischen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Präparaten aus dem Herzmuskel und der Hirnrinde des Menschen in bezug auf ihre Affinität zu 76 C/D-*cis*-Steroiden ergab eine durchschnittlich 1.5fach niedrigere Affinität zum Hirnzym-Präparat<sup>[134]</sup>. Die C/D-*trans*-Verbindung 27 zeigte eine 3.2fach niedrigere Affinität zum gleichen Enzympräparat<sup>[64]</sup>. Dies erklärt möglicherweise, daß 27 nicht wie 2 bei Katzen Arrhythmien hervorruft<sup>[64]</sup>. Allerdings bestanden beide Enzympräparate offenbar aus einer Mischung von drei  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Isoformen<sup>[158]</sup> unbekannter individueller Affinitäten. Die klare Entscheidung über die relativen Affinitäten von C/D-*cis*- und C/D-*trans*-Steroiden zu bestimmten Isoenzymen aus Herzmuskel- und Nervenzellen erfordert Untersuchungen an den isolierten Isoformen, die aber noch nicht verfügbar sind. Im Lichte der Kenntnis, daß das Steroidgerüst die pharmakophore Leitstruktur nicht nur für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen aus Geweben des Menschen, sondern auch für die von Tieren ganz unterschiedlicher Digitalisaffinität ist<sup>[2, 104, 134]</sup>, darf man es wohl als so gut wie sicher annehmen, daß ein Anteil von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Isoformen in kontraktilen und neuralen Zellen des Menschen in der Chemotopographie des Steriodorts in der Digitalis-Bindungsschlucht differiert.

Unser Bemühen, die mögliche Eignung von C/D-*trans*-Hormonsteroiden als Ausgangsstrukturen für das Design von neuartigen Herzmitteln zu klären, hat sich jüngst auf die Aldosteron-Antagonisten Spironolacton 30 und Canrenon 31 konzentriert (siehe Abb. 10). Unser Interesse an diesen Spirosteroiden wurde durch Berichte von Klinikern und praktischen Ärzten geweckt, daß diese C/D-*trans*-Steroide eine direkte positiv-inotrope Wirkung bei der Behandlung von Patienten mit schwerer Stauungs-Herzinsuffizienz entfalten<sup>[159–164]</sup>. Allerdings waren die Spirosteroide nur in Kombinationstherapie mit einem Diureticum, mit einem Hemmstoff des Angiotensin-aktivierenden Enzyms oder/und mit Digoxin, voll wirksam. Daher ist der Mechanismus der bemerkenswert günstigen Herzwirkung der Aldosteron-Antagonisten noch unverstanden<sup>[163, 164]</sup>. Aus diesem Grunde wurde der unerwartete cardiotone Aspekt ihrer Wirkung von uns näher untersucht; er stellte sich als einer der seltenen Fälle von klinischer Rückkopplung heraus.

Unsere Analyse der Wechselwirkung von 30 und 31 mit  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen des Menschen im makroskopischen und mikroskopischen Testsystem (vgl. Abschnitt 2.4) enthüllte, daß beide Spirosteroide digitalisartig wirkende Hemmstoffe des Rezeptorenzyms sind. Ihre geringe Hemmwirksamkeit (vgl. ihre in Abb. 10 angeführten  $\Delta G^\circ$ -Werte mit den in Abb. 3 gegebenen Werten von Digitoxin 1 oder Digoxin 2) erklärt die Notwendigkeit der bezeichneten Kombinationstherapie. Abgeleitet von unserer Erfahrung über den Einfluß der Glycosidierung auf die Wirksamkeit von Progesteronderivaten<sup>[64, 65]</sup> gelang es uns, die Wirksamkeit von 31 durch Glycosidierung 31 → 33 zwanzigfach zu erhöhen<sup>[145]</sup>. Die Wirksamkeit von 33 ist sogar etwas höher als die von 27, von dem wir eine günstige positiv-inotrope Wirkung bei Katzen nachgewiesen haben<sup>[64]</sup>. Selbstverständlich

müssen weitere Untersuchungen mit 33 und Verbindungen dieses Typs durchgeführt werden, um deren pharmakologisches Profil zu bestimmen und die Derivate mit großtem therapeutischen Dosierungsspielraum, nicht die mit der Spaltenwirksamkeit, zu selektionieren. Die Erfahrung mit dem pharmakologischen Profil von 27<sup>[64]</sup> begründet die Erwartung, daß die nachteiligen Hormonwirkungen der Aldosteron-Antagonisten<sup>[165–167]</sup> durch eine Glycosidierung reduziert oder eliminiert werden können, wenn damit ihre Wechselwirkung mit den Hormonrezeptoren verhindert wird. Die Prüfung der allgemeinen Anwendbarkeit der postulierten Zusammenhänge sowie die weitere strukturelle und funktionelle Optimierung der Aldosteron-Antagonisten kann durch Nutzung des innovativen Potentials erforscht werden, das in der umfassenderen, aus unseren Arbeiten mit C/D-cis-Steroiden ableitbaren Einsicht in diese Probleme investiert ist<sup>[1, 2]</sup> (vgl. Abb. 7–9).

#### 4. Zusammenfassung und Ausblick

Der Aufsatz geht von der Tatsache aus, daß cardiotonische Steroide eine Jahrzehnte andauernde und noch bestehende Herausforderung an die Forschung stellen und beginnt mit dem Bekenntnis der Motivation des Seniorautors für sein Engagement auf diesem anspruchsvollen Gebiet seit drei Jahrzehnten. Dem folgt eine detaillierte Schilderung der Stadien und Ebenen der Digitalisforschung, in denen die Autoren experimentell und theoretisch engagiert waren, und eine Übersicht über das jüngste Entwicklungsstadium, das durch ihre Entdeckungen eröffnet wurde. Der Aufsatz offenbart, daß sogar die elementaren Stadien der Arzneimittelforschung, wie sie hier behandelt wurden, ein facettenreiches und verschlungenes Aufgabengebiet bilden, das letztlich pharmakologische und klinische Rückkopplungen einschließen soll, um die Grenzen der chemischen und biochemischen Denkmuster zu testen, die durch die initiiierenden Arbeiten der Autoren umrissen sind. Jede bedeutende Entwicklung, wie sie hier anvisiert wurde, erfordert notwendigerweise das Durchschreiten eines langen Weges und den umfassenden Einsatz von Mitteln bei der Weiterverfolgung der aufgezeigten Konzeption, deren therapeutischer Wert erst am Ende des Weges beurteilt werden kann (vgl. Lit.<sup>[168]</sup>).

*Unsere jüngsten Arbeiten wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Re 878/1–4) und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.*

Eingegangen am 15. September 1993 [A 25]

- [1] K. R. H. Repke, W. Schönfeld, J. Weiland, R. Megges, A. Hache in *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs* (Hrsg.: M. Sandler, H. J. Smith), Oxford University Press, Oxford, 1989, S. 435–502.
- [2] K. R. H. Repke, J. Weiland, R. Megges, R. Schön, *Prog. Med. Chem.* 1993, 30, 135–202.
- [3] S. Yusuf, R. Garg, P. Held, R. Gorlin, *Am. J. Cardiol.* 1992, 69, 64G–70G.
- [4] W. M. Smith, *Am. J. Cardiol.* 1985, 55, 3A–8A.
- [5] J. N. Cohn, *Circulation* 1988, 78, 1099–1107.
- [6] W. Withering, *An Account of the Foxglove, and some of its Medical Uses; with Practical Remarks on Dropsey, and other Diseases*, Robinson, London, 1785.
- [7] R. Hintsche, R. Megges, D. Pfeiffer, H. J. Portius, W. Schönfeld, K. R. H. Repke, *Eur. J. Med. Chem.* 1985, 20, 9–15.
- [8] E. Erdmann in *Cardiac Glycosides 1785–1985* (Hrsg.: E. Erdmann, K. Greeff, J. C. Skou), Steinkopff, Darmstadt, 1986, S. V.
- [9] K. F. Wenckebach, *Br. Med. J. (Suppl. Epitome)* 1930, 1, 181.
- [10] K. Swedberg, *Circulation* 1993, 87 (Suppl. IV), IV-126–IV-129.
- [11] J. J. Kellermann, *Am. Heart J.* 1990, 120, 1529–1531.
- [12] G. Grupp, *Mol. Cell. Biochem.* 1987, 76, 97–112.
- [13] E. Erdmann, M. Böhm in *Inotropic Stimulation and Myocardial Energetics* (Hrsg.: H. Just, C. Holubarsch, H. Scholz), Steinkopff, Darmstadt, 1989, S. 125–133.
- [14] R. DiBianco, R. Shabetai, W. Kostuk, J. Moran, R.-C. Schlant, R. Wright, *N. Engl. J. Med.* 1989, 320, 677–683.
- [15] B. F. Uretsky, M. Jessup, M. A. Konstam, G. W. Dec, C. V. Leier, J. Benotti, S. Murali, H. C. Herrmann, J. A. Sandberg, *Circulation* 1990, 82, 774–780.
- [16] A. D. Goldberg, J. Nicklas, S. Goldstein, *Am. J. Cardiol.* 1991, 68, 631–636.
- [17] J. N. Cohn, *N. Engl. J. Med.* 1989, 320, 729–731.
- [18] C. V. Leier, *Am. J. Cardiol.* 1992, 69, 120G–129G.
- [19] M. Packer, *Circulation* 1989, 79, 198–204.
- [20] T. W. Smith, *N. Engl. J. Med.* 1988, 318, 358–365.
- [21] V. Austel, E. Kutter in *Arzneimittelforschung: Grundlagen – Strategien – Perspektiven* (Hrsg.: E. Kutter), Thieme, Stuttgart, 1978, S. 113–139.
- [22] H. J. Portius, K. R. H. Repke, *Arzneim. Forsch.* 1964, 14, 1073–1077.
- [23] D. S. Fullerton, K. Ahmed, A. H. L. From, R. H. McParland, D. C. Rohrer, J. F. Griffin in *Molecular Graphics and Drug Design* (Hrsg.: A. S. V. Burgen, G. C. K. Roberts, M. S. Tute), Elsevier, Amsterdam, 1986, S. 257–284.
- [24] R. Thomas, P. Gray, J. Andrews, *Adv. Drug Res.* 1990, 19, 313–562.
- [25] R. E. Thomas in *Molecular Structure and Biological Activity of Steroids* (Hrsg.: M. Bohl, W. L. Duax), CRC, Boca Raton, FL, 1992, S. 399–464.
- [26] T. W. Güntert, H. H. A. Linde, *Cardiac Glycosides, Part I: Experimental Pharmacology* (Hrsg.: K. Greeff) (*Handb. Exp. Pharmacol.* 1981, 56/I, 13–24).
- [27] E. J. Ariëns, *Med. Chem. Proc. Int. Symp. 5th 1976* 1977, 409–412.
- [28] J. Parascandola, *Pharm. Hist.* 1971, 13, 3–10.
- [29] I. D. Kuntz, *Science* 1992, 257, 1078–1082.
- [30] W. G. J. Hol, *Angew. Chem.* 1986, 98, 765–777; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1986, 25, 767–778.
- [31] N. C. Cohen, J. M. Blaney, C. Humblet, P. Gund, D. C. Barry, *J. Med. Chem.* 1990, 33, 883–894.
- [32] K. Appelt, R. J. Bacquet, C. A. Bartlett, C. L. J. Booth, S. T. Freer, M. A. M. Fuhr, M. R. Gehring, S. M. Herrmann, E. F. Howland, C. A. Janson, T. R. Jones, C.-C. Kan, V. Katharadkar, K. K. Lewis, G. P. Marzoni, D. A. Matthews, C. Mohr, E. W. Moomaw, C. A. Morse, S. J. Oatley, R. C. Ogden, M. R. Reddy, S. H. Reich, W. S. Schoettlin, W. W. Smith, M. D. Varney, J. E. Villafranca, R. W. Ward, S. Webber, S. E. Webber, K. M. Welsh, J. White, *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1925–1934.
- [33] J. Hodgson, *Bio/Technology* 1991, 9, 19–21.
- [34] R. Y. Yada, R. L. Jackman, S. Nakai, *Int. J. Pept. Protein Res.* 1988, 31, 98–108.
- [35] R. Megges, R. Franke, B. Streckenbach, K. Repke, H.-J. Schmidt (VEB Arzneimittelwerk Dresden), DE-A 1939173, 1970 [*Chem. Abstr.* 1970, 73, 131223e].
- [36] R. Megges, K. Repke, B. Streckenbach, R. Franke, G. Kamann (VEB Arzneimittelwerk Dresden), DE-A 2019967, 1970 [*Chem. Abstr.* 1971, 74, 31915j].
- [37] F. Dittrich, R. Megges, H. J. Portius, K. Repke (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 94616, 1972 [*Chem. Abstr.* 1973, 79, 42775t].
- [38] R. Megges, H. Timm, F. Dittrich, H. J. Portius, K. Repke (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 109869, 1974 [*Chem. Abstr.* 1975, 83, 179414b].
- [39] R. Megges, H. Timm, P. Thiemann, F. Dittrich, P. Franke, H. J. Portius, K. Repke (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 109622, 1974 [*Chem. Abstr.* 1975, 83, 59166a].
- [40] C. Lindig, P. Franke, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* 1975, 317, 17–28.
- [41] P. Franke, C. Lindig, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* 1975, 317, 86–98.
- [42] R. Megges, H. J. Portius, K. R. H. Repke, *Pharmazie* 1979, 34, 328–329.
- [43] R. Megges, H. Kreißl, H. J. Portius, K. Repke (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 144060, 1980 [*Chem. Abstr.* 1981, 95, 62608z].
- [44] C. Lindig, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* 1980, 322, 991–1002.
- [45] F. Theil, C. Lindig, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* 1980, 322, 1003–1011.
- [46] F. Theil, C. Lindig, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* 1980, 322, 1012–1020.
- [47] R. Megges, H. Timm, P. Franke (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 148222, 1981 [*Chem. Abstr.* 1982, 96, 35645y].
- [48] A. Messerschmidt, R. Megges, H. Schrauber, *Cryst. Struct. Commun.* 1981, 10, 1041–1051.
- [49] E. Höhne, A. Messerschmidt, R. Megges, *Cryst. Struct. Commun.* 1981, 10, 407–414.
- [50] A. Messerschmidt, E. Höhne, R. Megges, *Cryst. Struct. Commun.* 1981, 10, 399–406.
- [51] R. Megges, I. Eschholz, R. Hintsche, R. Schwensow (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 154899, 1982 [*Chem. Abstr.* 1983, 98, 54299w].
- [52] B. Streckenbach, P. Franke, R. Hintsche, H. J. Portius, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* 1983, 325, 599–606.
- [53] C. Lindig, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* 1983, 325, 574–586.
- [54] C. Lindig, *J. Prakt. Chem.* 1983, 325, 587–598.

- [55] J. Wicha, M. Masnyk, W. Schönfeld, K. R. H. Repke, *Heterocycles* **1983**, *20*, 231–234.
- [56] R. Megges, H. Timm, P. Franke, R. Hintsche (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 216242, **1984** [*Chem. Abstr.* **1985**, *103*, 142275n].
- [57] J. Weiland, R. Schwensow, R. Megges, W. Schönfeld, M. M. Kabat, A. Kurek, J. Wicha (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 237170, **1986** [*Chem. Abstr.* **1988**, *108*, 75780m].
- [58] C. Lindig, *J. Prakt. Chem.* **1986**, *328*, 682–694.
- [59] C. Lindig, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* **1986**, *328*, 695–704.
- [60] R. Megges, H. Timm, W. Rollka, P. Franke, J. Weiland, K. R. H. Repke (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 233570, **1986** [*Chem. Abstr.* **1987**, *106*, 50557q].
- [61] K. Schwabe, J. Weiland, D. Hübler, K. R. H. Repke (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 249273, **1987** [*Chem. Abstr.* **1988**, *109*, 211390j].
- [62] C. Lindig, K. R. H. Repke, *J. Prakt. Chem.* **1987**, *329*, 841–858.
- [63] J. Weiland, D. Pfeiffer, M. Wunderwald, R. Schwensow, R. Megges (Akademie der Wissenschaften der DDR), DD-P 245879, **1987** [*Chem. Abstr.* **1988**, *109*, 6891g].
- [64] J. Weiland, K. Schwabe, D. Hübler, W. Schönfeld, K. R. H. Repke, *J. Enzyme Inhib.* **1987**, *2*, 31–36.
- [65] J. Weiland, W. Schönfeld, K.-H. Menke, K. R. H. Repke, *Pharmacol. Res.* **1991**, *23*, 27–32.
- [66] K. R. H. Repke, J. Weiland, K.-H. Menke, *J. Enzyme Inhib.* **1991**, *5*, 25–32.
- [67] J. Weiland, P. Franke, D. Tresselt, M. Nitz, W. Schönfeld (Akademie der Wissenschaften, Berlin), DD-P 290891, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 280473z].
- [68] J. Weiland, D. Tresselt, M. Nitz, R. Megges, W. Schönfeld (Akademie der Wissenschaften, Berlin), DD-P 290892, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 256559m].
- [69] K. R. H. Repke, W. Schönfeld, *Trends Pharmacol. Sci.* **1984**, *5*, 393–397.
- [70] W. Schönfeld, J. Weiland, K. R. H. Repke in *Cardiac Glycosides 1785–1985* (Hrsg.: E. Erdmann, K. Greeff, J. C. Skou), Steinkopff, Darmstadt, **1986**, S. 127–134.
- [71] K. R. H. Repke, J. Weiland, *Pharmacol. Res. Commun.* **1988**, *20*, 425–450.
- [72] T. A. Kreintsky, G. B. Elion in *Strategy in Drug Research* (Hrsg.: J. A. K. Buisman), Elsevier, Amsterdam, **1982**, S. 65–87.
- [73] S. E. Wright, *The Metabolism of Cardiac Glycosides*, Thomas, Springfield, IL, **1960**.
- [74] R. H. Thorp, L. B. Cobbin, *Cardiac Stimulant Substances*, Academic Press, New York, **1967**.
- [75] R. Thomas, J. Boutagy, A. Gelbart, *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 1649–1683.
- [76] K. R. H. Repke, *New Aspects of Cardiac Glycosides* (Hrsg.: W. Wilbrandt, P. Lindgren) (*Proc. Int. Pharmacol. Meet. 1st 1961* **1963**, *3*, 47–73).
- [77] K. R. H. Repke, *OAZ Oesterr. Apoth. Ztg.* **1970**, *24*, 515–522.
- [78] F. Lauterbach, K. R. H. Repke, D. Nitz, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1960**, *240*, 45–71.
- [79] I. Herrmann, K. R. H. Repke, *Symposium über biochemische Aspekte der Steroidforschung* (Hrsg.: K. Schubert) (Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med. **1968**(2)), Akademie-Verlag, Berlin, **1969**, S. 115–119.
- [80] I. Herrmann, K. R. H. Repke, *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **1975**, *22*, 481–485.
- [81] K. R. H. Repke, R. Megges, *Dtsch. Gesundheitswes.* **1963**, *18*, 1325–1333.
- [82] K. R. H. Repke, R. Megges, *Therapiewoche* **1973**, *23*, 2314–2318.
- [83] K.-O. Haustein, C. Pachaly, D. Murawski, *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* **1978**, *16*, 285–289.
- [84] K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1958**, *233*, 271–283.
- [85] K. R. H. Repke, L. Roth, S. Klesczewski, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1959**, *237*, 155–170.
- [86] F. Lauterbach, K. R. H. Repke, D. Nitz, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1960**, *239*, 196–218.
- [87] I. Herrmann, K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1964**, *248*, 351–369.
- [88] I. Herrmann, K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1964**, *248*, 370–386.
- [89] K. R. H. Repke, L. T. Samuels, *Biochemistry* **1964**, *3*, 685–689.
- [90] K. R. H. Repke, L. T. Samuels, *Biochemistry* **1964**, *3*, 689–695.
- [91] K. R. H. Repke, *Trends Pharmacol. Sci.* **1985**, *6*, 275–278.
- [92] W. Schönfeld, J. Weiland, C. Lindig, M. Masnyk, M. M. Kabat, A. Kurek, J. Wicha, K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1985**, *329*, 414–426.
- [93] K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1959**, *236*, 242–245.
- [94] I. Herrmann, H. J. Portius, K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1964**, *247*, 1–18.
- [95] I. Herrmann, K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1964**, *247*, 19–34.
- [96] I. Herrmann, K. R. H. Repke, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1964**, *247*, 35–48.
- [97] K. R. H. Repke, S. Klesczewski, L. Roth, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1959**, *237*, 34–48.
- [98] C. Lindig, K. R. H. Repke, *Acta Biol. Med. Ger.* **1971**, *26*, 501–512.
- [99] *Ciba Foundation Symposium: Enzymes and Drug Action, Panel Discussion*, Churchill, London, **1962**, S. 396, 429.
- [100] R. L. Post, C. R. Merritt, C. R. Kinsolving, C. D. Albright, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1796–1802.
- [101] K. R. H. Repke, H. J. Portius, *Experientia* **1963**, *19*, 452–458.
- [102] K. R. H. Repke, H. J. Portius, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1963**, *245*, 59–61.
- [103] K. R. H. Repke, H. J. Portius, *Folia Haematol. (Leipzig)* **1965**, *83*, 28–38.
- [104] K. R. H. Repke, M. Est, H. J. Portius, *Biochem. Pharmacol.* **1965**, *14*, 1785–1802.
- [105] A. Schwartz, J. C. Allen, W. B. van Winkle, R. Munson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1974**, *191*, 119–127.
- [106] A. Schwartz, G. E. Lindenmayer, J. C. Allen, *Pharmacol. Rev.* **1975**, *27*, 3–134.
- [107] A. Schwartz, K. Whitmer, G. Grupp, I. Grupp, R. J. Adams, S.-W. Lee, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1982**, *402*, 253–271.
- [108] H. Flasch, N. Heinz, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **1978**, *304*, 37–44.
- [109] L. H. Michael, A. Schwartz, E. T. Wallick, *Mol. Pharmacol.* **1979**, *16*, 135–146.
- [110] T. Akera, *Cardiac Glycosides, Part I: Experimental Pharmacology* (Hrsg.: K. Greeff) (*Handb. Exp. Pharmacol.* **1981**, *56/I*, 287–336).
- [111] E. Erdmann, *Cardiac Glycosides, Part I: Experimental Pharmacology* (Hrsg.: K. Greeff) (*Handb. Exp. Pharmacol.* **1981**, *56/I*, 337–380).
- [112] L. Brown, E. Erdmann, R. Thomas, *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 2767–2774.
- [113] T. W. Smith, E. M. Antman, P. L. Friedman, C. M. Blatt, J. D. Marsh, *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1984**, *26*, 495–523.
- [114] H. H. Rasmussen, G. T. Okita, R. S. Hartz, R. E. ten Eick, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1990**, *252*, 60–64.
- [115] K. R. H. Repke, *Klin. Wochenschr.* **1964**, *42*, 157–165.
- [116] K. R. H. Repke, *Drugs and Enzymes* (Hrsg.: B. B. Brodie, J. R. Gillette, R. Capek) (*Proc. Int. Pharmacol. Meet. 2nd 1963* **1965**, 65–87).
- [117] C. O. Lee, *Am. J. Physiol.* **1985**, *249*, C367–C378.
- [118] W. Wilbrandt, K. Brawand, P. N. Witt, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* **1953**, *219*, 397–407.
- [119] W. Wilbrandt, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* **1958**, *16*, 31–43.
- [120] W. Wilbrandt, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1957**, *82*, 1153–1158.
- [121] W. Wilbrandt, *New Aspects of Cardiac Glycosides* (Hrsg.: W. Wilbrandt, P. Lindgren) (*Proc. Int. Pharmacol. Meet. 1st 1961* **1963**, *3*, 3–9).
- [122] H. J. Portius, K. R. H. Repke, *Symposium über biochemische Aspekte der Steroidforschung* (Hrsg.: K. Schubert) (Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin Kl. Med. **1968**(2)), Akademie-Verlag, Berlin, **1969**, S. 180–183.
- [123] W. Wilbrandt, E. M. Weiss, *Arzneim. Forsch.* **1960**, *10*, 409–412.
- [124] B. C. Rossier, L. G. Palmer in *The Kidney. Physiology and Pathophysiology*, 2. Aufl. (Hrsg.: D. W. Seldin, G. Giebisch), Raven, New York, **1992**, S. 1373–1409.
- [125] W. Schönfeld, R. Schön, K.-H. Menke, K. R. H. Repke, *Acta Biol. Med. Ger.* **1972**, *28*, 935–956.
- [126] J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88–118.
- [127] J. Beer, R. Kunze, I. Herrmann, H. J. Portius, N. M. Mirsalichova, N. K. Abubakirov, K. R. H. Repke, *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *937*, 335–346.
- [128] Y. A. Ovchinnikov, N. M. Arzamazova, E. A. Arystarkhova, N. M. Gevondyan, N. A. Aldanova, N. N. Modyanov, *FEBS Lett.* **1987**, *217*, 269–274.
- [129] J. M. Capasso, S. Hoving, D. M. Tal, R. Goldshleger, S. J. D. Karlish, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1150–1158.
- [130] W. Schönfeld, K.-H. Menke, R. Schönfeld, K. R. H. Repke, *J. Enzyme Inhib.* **1987**, *2*, 37–45.
- [131] M. Reiter, *Cardiac Glycosides, Part I: Experimental Pharmacology* (Hrsg.: K. Greeff) (*Handb. Exp. Pharmacol.* **1981**, *56/I*, 153–159).
- [132] L. Brown, R. Thomas, *Arzneim. Forsch.* **1983**, *33*, 814–817.
- [133] L. Brown, R. Thomas, *Arzneim. Forsch.* **1984**, *34*, 572–574.
- [134] W. Schönfeld, R. Schönfeld, K.-H. Menke, J. Weiland, K. R. H. Repke, *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35*, 3221–3231.
- [135] W. Schönfeld, K. R. H. Repke, *Quant. Struct. Act. Relat.* **1988**, *7*, 160–165.
- [136] H. H. Shlevin, *Drug Dev. Res.* **1984**, *4*, 275–284.
- [137] K. R. H. Repke, F. Dittrich, *Trends Pharmacol. Sci.* **1980**, *1*, 398–402.
- [138] K. R. H. Repke, W. Schönfeld, R. Schönfeld, K.-H. Menke, *Pharmazie* **1990**, *45*, 237–239.
- [139] T. Deneke, H. Adam, *Z. Exp. Pathol. Ther.* **1906**, *2*, 491.
- [140] G. R. Marshall, C. D. Barry, H. E. Bosshard, R. A. Dammkoehler, D. A. Dunn, *Computer-Assisted Drug Design* (Hrsg.: E. C. Olson, R. E. Christoffersen) (*ACS Symp. Ser.* **1979**, *112*, 205–226).
- [141] A. J. Stuper, W. E. Brügger, P. C. Jurs, *Computer Assisted Studies of Chemical Structure and Biological Function*, Wiley, New York, **1979**, S. 1.
- [142] K. R. H. Wooldridge, *Med. Chem. Proc. Int. Symp. 5th 1976* **1977**, 427–432.
- [143] M. Bohl in *Molecular Structure and Biological Activity of Steroids* (Hrsg.: M. Bohl, W. L. Duax), CRC, Boca Raton, FL, **1992**, S. 91–155.
- [144] G. R. Marshall, R. D. Cramer III, *Trends Pharmacol. Sci.* **1988**, *9*, 285–289.

- [145] K. R. H. Repke, J. Weiland, R. Megges, R. Schön, M. Nitz (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin), DE-OS 4221960, 1994.
- [146] F. S. LaBella, I. Bihler, J. Templeton, R.-S. Kim, M. Hnatovich, D. Rohrer, *Fed. Proc.* **1985**, *44*, 2806-2811.
- [147] A. Szent-Györgyi, *Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle*, Academic Press, New York, 1953, S. 79-88.
- [148] A. Goto, K. Yamada, N. Yagi, M. Yoshioka, T. Sugimoto, *Pharmacol. Rev.* **1992**, *44*, 377-399.
- [149] J. M. Hamlyn, P. Manunta, *J. Hypertens.* **1992**, *10* (Suppl. 7), S99-S111.
- [150] C. T. Carilli, M. Berne, L. C. Cantley, G. T. Haupert, Jr., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 1027-1031.
- [151] G. T. Haupert, Jr. in *The  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  Pump., Part B: Cellular Aspects* (Hrsg.: J. C. Skou, J. G. Norby, A. B. Maunsbach, M. Esmann), Liss, New York, 1988, S. 297-320.
- [152] J. M. Hamlyn, M. P. Blaustein, S. Bova, D. W. DuCharme, D. W. Harris, F. Mandel, W. R. Mathews, J. H. Ludens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6259-6263.
- [153] A. Goto, T. Ishiguro, K. Yamada, M. Ishii, M. Yoshioka, C. Eguchi, M. Shimura, T. Sugimoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *173*, 1093-1101.
- [154] A. A. Tymak, J. A. Norman, M. Bolgar, G. C. DiDonato, H. Lee, W. L. Parker, L.-C. Lo, N. Berova, K. Nakanishi, E. Haber, G. T. Haupert, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8189-8193.
- [155] D. G. Pace, R. A. Gillis, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1982**, *255*, 103-116.
- [156] W. L. Stahl, *Neurochem. Int.* **1986**, *8*, 449-476.
- [157] R. A. Gillis, J. A. Quest in *Cardiac Glycosides 1785-1985* (Hrsg.: E. Erdmann, K. Greeff, J. C. Skou), Steinkopff, Darmstadt, 1986, S. 347-356.
- [158] R. M. Young, J. B. Lingrel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *145*, 52-58.
- [159] R. Schröder, B. Ramdohr, U. Hüttmann, K. P. Schüren, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1972**, *97*, 1535-1538.
- [160] U. Ehrlich, H. Klepzig, *Med. Klin. (Munich)* **1976**, *71*, 1546-1554.
- [161] U. Lindner in *Therapie mit Aldosteron-Antagonisten* (Hrsg.: E. Mutschler), Urban & Schwarzenberg, München, 1988, S. 71-82.
- [162] A. A. van Vliet, A. J. M. Donker, J. J. P. Nauta, F. W. A. Verheugt, *Am. J. Cardiol.* **1993**, *71*, 21A-28A.
- [163] U. Dahlström, E. Karlsson, *Am. J. Cardiol.* **1993**, *71*, 29A-33A.
- [164] F. Zannad, *Am. J. Cardiol.* **1993**, *71*, 34A-39A.
- [165] D. J. Greenblatt, J. Koch-Weser, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1973**, *225*, 40-43.
- [166] H. R. Ochs, D. J. Greenblatt, G. Boden, T. W. Smith, *Am. Heart J.* **1978**, *96*, 389-400.
- [167] Y. Nishino, H. Schröder, M. F. El Etreby, *Arzneim. Forsch.* **1988**, *38*, 1800-1805.
- [168] M. Weatherall, *Nature (London)* **1982**, *296*, 387-390.

Shabarova, Z. A. /Bogdanov, A. A.

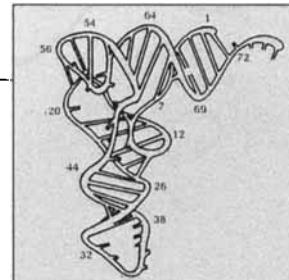
## Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids

1994. XV, 588 pages with 141 figures and 36 tables. Hardcover. DM 248.-/ÖS 1934.-/sFr 230.-. ISBN 3-527-29021-4 (VCH, Weinheim)

*Sequencing, cloning, transcription -* these are but a few key techniques behind the current breathtaking advances in molecular biology and biochemistry. As these methods continuously diversify, biochemists need a sound chemical understanding to keep the pace. Chemists beginning working in the molecular biology lab need an introduction to this field from their point of view. This book serves both: it describes most of the known chemical

reactions of nucleosides, nucleotides, and nucleic acids in sufficient detail to provide the desired background, and additionally, the fundamental relations between sequence, structure and functionality of nucleic acids are presented.

The first edition of this book, which was published in Russian, has immediately become a recognized standard reference. This second, thoroughly revised and updated edition, now published in English, is likely to achieve a similar position in the international scientific community.



To order please contact your local bookseller or:

VCH, P.O. Box 10 11 61,  
D-69451 Weinheim,  
Fax 0 62 01 - 60 61 84

VCH, Hardstrasse 10, P.O. Box,  
CH-4020 Basel

VCH, 8 Wellington Court,  
Cambridge CB1 1HZ, UK

VCH, 220 East 23rd Street,  
New York, NY 10010-4606, USA

VCH, Eikow Building,  
10-9 Hongo 1-chome, Bunkyo-Ku,  
Tokyo 113, Japan

