

Der Purin-Weg zur Chemotherapie (Nobel-Vortrag)**

Von Gertrude B. Elion*

Einleitung

Als ich 1944 in die Wellcome Research Laboratories eintrat, herrschte gerade der zweite Weltkrieg. Da die Arbeit, die ich hier diskutieren möchte, etwa einen Zeitraum von 40 Jahren einnimmt, erscheint es mir zweckmäßig, zunächst den Stand der Wissenschaft zu jener Zeit zu beschreiben.

Unsere UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Bausch-und-Lomb-Spektrographen gemessen, der mit einem Kohlenbogen als Lichtquelle und Photoplatten zur Bestimmung der bei jeder Wellenlänge absorbierten Lichtmenge ausgestattet war. Es gab keine Papier- oder Ionenaustauschchromatographie; die Purine wurden als Kupfer- und Silbersalze oder Pikrate durch fraktionierende Kristallisation rein erhalten. Tritium und ^{32}P standen zwar zur Verfügung, aber kein ^{14}C und ^{35}S . Zur Radioaktivitätsmessung wurden Geiger-Zähler eingesetzt, Szintillationszähler wurden erst viel später entwickelt. Einige schwere Isotope, z. B. ^{15}N und ^{13}C waren zwar verfügbar, setzten aber die Möglichkeit zum Gebrauch eines Massenspektrometers voraus, die nur in wenigen Labors bestand.

Das Wissen über Nucleinsäuren war ziemlich lückenhaft. Wir wußten, daß sie Purine und Pyrimidine enthielten, aber die Sequenzen waren nicht bekannt. Die vorherrschende Theorie besagte, daß zwei Purin- und zwei Pyrimidinmoleküle in jedem Tetranucleotid enthalten waren und daß diese Tetranucleotide in irgendeiner Weise miteinander verbunden waren. Die Art dieser Verknüpfung war jedoch nicht bekannt, und auch die helikale Struktur der DNA war noch nicht vorgeschlagen worden.

Im Jahre 1940 hatten Woods und Fildes^[1, 2] die Antimetaboliten-Theorie veröffentlicht, die die Wirkung von Sulfonamiden auf Bakterien zu erklären versuchte. Sie schlugen vor, daß die Sulfonamide bei der Verwertung eines wichtigen Nährstoffes, der *para*-Aminobenzoessäure, stören. Hitchings vermutete, daß – da alle Zellen Nucleinsäuren benötigen – es möglich sein müßte, das Wachstum von sich schnell teilenden Zellen (z. B. Bakterien, Tumoren, Protozoen) mit Nucleinbasen-Antagonisten zu unterbinden. Es bestand die Hoffnung, man könnte sich die – verglichen mit normalen Säugetierzellen – schnellere Multiplikationsrate dieser Zellen zunutze machen und die biochemischen Unterschiede der einzelnen Zelltypen über ihre Reaktion auf diese Antimetaboliten erforschen^[3, 4]. Ich sollte dabei über Purine, Pteridine und einige andere kondensierte Pyrimidinsysteme arbeiten.

Natürlich brauchte man ein biologisches System, um die potentiellen Aktivitäten der neuen Verbindungen zu bestimmen. Man wußte damals praktisch nichts über die anaboli-

schen Wege, die zur Verwertung der Purine für die Nucleinsäuresynthese führen. Eine Reihe von katabolischen Enzymen dagegen war bekannt: Nucleasen, Nucleotidasen, Nucleosidasen, Desaminasen (für Guanin, Adenin, Adenosin und Adenylsäure), die Xanthin-Oxidase und die Uricase. 1947 beschrieb Kalckar die Reversibilität der Nucleosid-Phosphorylase-Reaktion^[5].

In unserem Labor waren die Enzyme Guanase und Xanthin-Oxidase sehr nützlich, um die Purine als Substrate oder Inhibitoren zu untersuchen^[6, 7]. Hauptsächlich arbeiteten wir jedoch mit dem Mikroorganismus *Lactobacillus casei*. Er konnte auf Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin wachsen, sobald auch das Pyrimidin Thymin zugesetzt wurde. Er konnte auch Purine und Thymin synthetisieren, wenn Leberpulver als Folsäure-Quelle zugegeben wurde. (Die Struktur von Folsäure wurde erst 1946 von der Gruppe um Lederle aufgeklärt^[8]). Hitchings und Falco hatten einen Test entwickelt, mit dem man bestimmen konnte, ob eine Verbindung Thymin^[9] oder ein natürliches Purin^[4, 10] ersetzen oder dessen Einbau inhibieren konnte; man konnte auch feststellen, ob es sich bei einer Verbindung um einen Folsäure-Antagonisten handelte^[11, 12].

Zu jener Zeit waren nur wenige Chemiker an der Synthese von Purinen interessiert, und ich verließ mich hauptsächlich auf die Methoden aus der alten deutschen Literatur. Die Umwandlungsreaktionen wurden zum größten Teil nach den Methoden von Emil Fischer durchgeführt und die Synthesen aus Pyrimidinzwischenprodukten nach den Methoden von Traube. Der direkte Ersatz von Sauerstoff durch Schwefel nach der Methode von Carrington^[13] erwies sich auch als sehr nützlich für die Synthese von Mercaptopurinen^[14, 15].

1950 publizierten wir, daß 2,6-Diaminopurin (DAP) das Wachstum von *L. casei* stark inhibierte und daß diese Inhibition spezifisch durch Adenin, nicht aber durch die anderen natürlichen Purine aufgehoben werden konnte^[4, 16]. Bei niedrigen Konzentrationen von DAP konnte jedoch auch durch Folsäure die Inhibition aufgehoben werden, ein Befund, der auch für andere Diaminopyrimidine und kondensierte Diaminopyrimidin-Systeme gilt^[10].

Einige Arbeiten mit einem DAP-resistenten Stamm von *L. casei* zeigten, daß dieser nur sehr langsam auf Adenin als Purin-Quelle wuchs. Wir schlossen daraus, daß Adenin und DAP vom gleichen Enzym anabolisiert werden und daß das Produkt des DAP-Anabolismus bei der Purin-Interkonversion stört^[17]. Kornberg et al. berichteten 1955, daß dieses Enzym die Adenylat-Pyrophosphorylase (Adenin-Phosphoribosyl-Transferase) sei^[18].

Bei Mäuse-Tumoren und den AK4-Mäuse-Leukämie^[19] und -Tumorzellen in Kultur^[20] erwies sich 2,6-Diaminopurin als stark inhibierend. Es bewirkte bei klinischen Tests an Erwachsenen mit chronischer granulozytärer Leukämie in zwei Fällen eine deutliche Besserung, löste aber bei zwei weiteren Patienten starke Übelkeit und Brechreiz sowie schwere Schädigungen des Knochenmarks aus^[21]. Interessanterweise war DAP auch gegen das Vaccinia-Virus, ein DNA-Virus, in vitro aktiv^[22], aber die Toxizität in Tieren ließ uns auf seine Verwendung verzichten.

[*] Prof. G. B. Elion
Wellcome Research Laboratories
Burroughs Wellcome Co.
3030 Cornwallis Road
Research Triangle Park, NC 27709 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1989. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Leukämie-Mittel

Bis 1951 hatten wir über 100 Purine synthetisiert und an *L. casei* geprüft^[23] und dabei entdeckt, daß der Ersatz von Sauerstoff durch Schwefel an der Position 6 von Guanin und Hypoxanthin gute Inhibitoren der Purin-Verwertung liefert. Am Sloan-Kettering-Institut, mit dem eine Zusammenarbeit bestand, wurden 6-Mercaptopurin (6-MP) und 6-Thioguanin (TG) getestet, und es stellte sich heraus, daß beide Substanzen bei einem weiten Spektrum von Tumoren und Leukämien von Nagetieren wirksam waren. Besonders interessant waren die Befunde von Clarke et al.^[24], daß mit 6-MP behandelte Tumoren, obwohl in der Wirtsmouse noch nicht vollständig zurückgebildet, nicht auf andere Mäuse transplantiert werden konnten.

Nach einigen Toxizitätsuntersuchungen an Tieren durch Philips et al.^[25] gingen Burchenal et al. sehr schnell zu klinischen Versuchsreihen mit 6-MP an Kindern mit akuter Leukämie über^[26]. Zu dieser Zeit waren Methotrexat und Steroide die einzigen zur Behandlung dieser todkranken Kinder verfügbaren Medikamente, und die mittlere Überlebenszeit betrug drei bis vier Monate; nur 30 % der Kinder lebte noch nach einem Jahr. Die Tatsache, daß 6-MP vollständige Remissionen bei Kindern mit akuter Leukämie bewirkte (auch wenn die meisten von ihnen später Rückfälle erlitten), veranlaßte die Food and Drug Administration, diese Substanz im Jahre 1953 zur Behandlung der Krankheit zuzulassen, nur etwas mehr als zwei Jahre nach ihrer Synthese und mikrobiologischen Prüfung. 1954 wurde ein Symposium über 6-MP an der New York Academy of Sciences veranstaltet^[27]. Durch 6-MP konnte die mittlere Überlebenszeit an akuter Leukämie erkrankter Kinder auf 12 Monate erhöht werden, und einige hatten jahrelange Remissionen bei Anwendung von 6-MP und Steroiden. Das überzeugte uns und viele andere Krebsforscher davon, daß Antimetaboliten von Nucleinsäuren als Medikamente sehr vielversprechend waren.

Heute ist 6-MP eines von mehr als einem Dutzend Mittel gegen akute Leukämie. Durch die kombinierte Chemotherapie mit drei oder vier Medikamenten für eine konsolidierte Remission sowie mehrere Jahre Therapie mit 6-MP und Methotrexat können heute etwa 80 % aller Kinder mit akuter Leukämie geheilt werden.

Obwohl wir uns 1952 auf dem richtigen Weg glaubten, gab es noch viele unbeantwortete Fragen: Wie wirkt 6-MP? Worin liegt der Grund für die andersartige Wirkung auf neoplastische Zellen? Wie kann diese Wirkung verbessert werden?

Austauschuntersuchungen mit 6-MP in *L. casei* wiesen für kein einziges Purin auf einen Antagonismus hin. Die Inhibition wurde durch Hypoxanthin, Adenin, Guanin und Xanthin aufgehoben^[28]. Untersuchungen mit einem 6-MP-resistenten Stamm von *L. casei* zeigten jedoch, daß 6-MP kein Hypoxanthin für das Wachstum verwerten konnte^[29]. Wie bei den früheren Untersuchungen mit 2,6-Diaminopurin schlossen wir, daß ein Enzym beide Verbindungen anabolisiert und daß die Purin-Interkonversion auf der Nucleotid-ebene gestört wird^[30]. 1955 (zwei Jahre nach der Einführung von 6-MP für den klinischen Gebrauch) wurde das Enzym, das Hypoxanthin und 6-MP in ihre jeweiligen Nucleotide überführt, als Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) identifiziert^[18].

In der Mitte der fünfziger Jahre deckten die bahnbrechenden Arbeiten von Greenberg et al.^[31] und Buchanan et al.^[32, 33] die Biosynthesewege von Purinen und die Bedeutung des Hypoxanthin-Ribonucleotids (Inosinsäure, IMP) als dem ersten aller auf diesem Wege gebildeten Purinnucleotide auf. Viele Forscher und etliche Jahre waren nötig, um alle Wege aufzuklären, an denen die Nucleotide von 6-MP und Thioinosinsäure (TIMP) sowie von TIMP abgeleitete Nucleotide als Substrate oder Inhibitoren beteiligt sind^[34]. Diese Wege sind in Abbildung 1 zusammengefaßt.

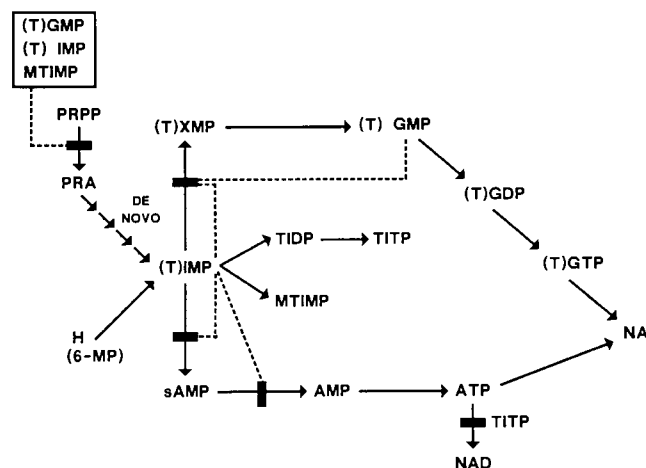


Abb. 1. Anabolische Wege von 6-MP und Wirkorte der von 6-MP abstammenden Nucleotide. Zusätzlich wird TGDP in dTGDP und dTGTP umgewandelt, bevor es in DNA eingebaut werden kann. MP = Mono-, DP = Di-, TP = Triphosphat, T = Thio, M = Methyl, G = Guanosin, X = Xanthosin, PRPP = 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, PRA = Phosphoribosylamin, sAMP = Adenylosuccinat.

Auf der Basis unseres gegenwärtigen Wissens über die Enzyminhibitorkonstanten und die Konzentrationen der verschiedenen Nucleotide, die durch therapeutische Anwendungen erreicht werden, vermuten wir, daß die wichtigsten Wirkungsmechanismen eine Rückkopplungsinhibition der de-novo-Purin-Synthese (besonders durch Methylthioinosinsäure), eine Inhibition der Inosinat-Dehydrogenase und eine Inkorporation in DNA in Form von TG sind^[35]. Die Selektivität für neoplastische Zellen ist wahrscheinlich auf eine Abhängigkeit von den Konzentrationen der einzelnen anabolischen und katabolischen Enzyme zurückzuführen. Katabolische Enzyme sind in Tumorzellen gewöhnlich niedriger konzentriert als in normalen Zellen. Zusätzlich können die Mitoserate, der Transport des Medikaments und der Umfang des Metabolitenpools für die selektive Toxizität verantwortlich sein.

Parallel zu diesen biochemischen Arbeiten untersuchten wir das metabolische Schicksal von 6-MP zuerst in Mäusen^[36] und dann im Menschen^[37]. Pharmakokinetische und metabolische Untersuchungen steckten noch in den Kinderschuhen, vielleicht weil die Verfahren zur Trennung von Metaboliten und das Zählen radioaktiver Proben als dünne Schichten in einem Durchfluß-Geiger-Zähler sehr mühsam und zeitaufwendig waren.

Nichtsdestotrotz untersuchten wir mit Dowex-1- und Dowex-50-Ionenaustauschersäulen und durch Papierchroma-

tographie das Schicksal von 6-MP in vivo und versuchten herauszufinden, ob dieser Metabolismus modifizierbar und dadurch die Wirksamkeit von 6-MP verbesserbar war. Wir synthetisierten weiterhin Derivate von 6-MP und TG und untersuchten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen^[38–40]. TG, das wir schon vor 6-MP synthetisiert hatten, war aktiver, aber auch toxischer^[25]. Außerdem war seine Synthese schwieriger, und, da sein Wirkungsmechanismus dem von 6-MP ähnlich schien, wurde sein metabolisches Schicksal erst später untersucht^[41–43]. Thioguanin wurde später hauptsächlich bei der Behandlung akuter myelozytärer Leukämie von Erwachsenen in Kombination mit Cytosin-arabinosid eingesetzt.

Untersuchungen der Harnmetaboliten von 6-MP ergaben extensive metabolische Umwandlungen^[36, 37, 44–46]. Das am häufigsten vorkommende Produkt war 6-Thioharnsäure, die durch die Xanthin-Oxidase aus 6-MP entsteht. Zusätzlich wurden mehrere Substanzen mit methyliertem Schwefel gefunden, die zudem am Schwefel oder am Purinring oxidiert worden waren. Ein erheblicher Teil des Schwefels war durch Oxidation in anorganisches Sulfat umgewandelt worden, das auch als Sulfatester auftauchte. Sehr wenig 6-MP wurde unverändert ausgeschieden.

Im Bemühen, den Metabolismus von 6-MP zu modifizieren, führten wir Substituenten an den Positionen 2 und/oder 8 des Purinrings und an den Ringstickstoffatomen ein. Dies führte zum Verlust der Antitumoraktivität mit der Ausnahme des 2-Amino-6-mercapto-Derivates TG, von dem wir schon wußten, daß es eine starke antimetabolische Aktivität aufweist.

Wir versuchten dann, den Schwefel vor der Oxidation und Hydrolyse durch Blockierungsgruppen zu schützen, die – so hofften wir – durch ein Tumor-spezifisches Enzym intrazellulär abgespalten würden, so daß 6-MP frei würde. Den größten Erfolg hatten wir mit dem *S*-(1-Methyl-4-nitroimidazol-5-yl)-Derivat, heute bekannt als Azathioprin (Imuran®), das wegen der Nähe der *ortho*-Nitrogruppe leicht von Hydrogensulfid und anderen Nucleophilen angegriffen wird^[45–49] (Abb. 2). Besonders das in den roten Blutzellen

wort basierend auf der Überlegung, daß immunoblastische Lymphocyten, die während einer Immunantwort gebildet werden, den leukämischen Lymphocyten sehr ähnlich sind. Schwartz et al. zeigten, daß Hasen, denen ab dem Zeitpunkt der Injektion eines fremden Antigens (z. B. von Rinderse-rumalbumin) über mehrere Tage 6-MP gegeben wurde, keine Antikörperreaktion auf das Antigen zeigten^[52]. Sie wiesen auch nach, daß die 6-MP-Dosis und der Zeitpunkt ihrer Gabe richtig gewählt sein mußten, und fanden heraus, daß 6-MP am wirksamsten war, wenn die Behandlung zum Zeitpunkt der Antigengabe begann^[52, 53]. Des weiteren konnten sie zeigen, daß Tiere gegen ein bestimmtes Antigen tolerant gemacht werden und dennoch immunologische Reaktivität gegen andere Antigene beibehalten können^[54].

Auf die Anregung von Schwartz hin entwickelten wir einen immunologischen Test, mit dem die Antikörperantwort von Mäusen auf rote Blutzellen des Schafes gemessen werden konnte^[55, 56]. Dadurch waren wir in der Lage, neue, aktive Agentien und synergistische Kombinationen von ihnen zu identifizieren, und konnten zeigen, daß die Immunsuppression größer war, wenn höhere Antigen- und Drogen-dosen gegeben wurden.

Roy Calne, ein junger britischer Chirurg, der von den Veröffentlichungen von Schwartz et al. angeregt worden war, untersuchte die Wirkung von 6-MP auf die Abstoßung von Nierentransplantaten in Hunden. Er erreichte eine 44tägige Funktionsfähigkeit der Niere, die ein Hund von einem nicht verwandten Spender empfangen hatte, indem er diesem täglich 6-MP verabreichte^[57]. Das war erheblich länger als die erwarteten 9 bis 10 Tage Funktionieren der Transplantate in Kontrolltieren.

Als Calne uns nach Testverbindungen fragte, die mit 6-MP verwandt seien, schlugen wir Azathioprin vor. Seine Untersuchungen damit ergaben, daß es die Abstoßung von Hundenieren-Homotransplantaten besser unterdrückt als 6-MP^[58, 59]. Bei Menschen wurden erstmals erfolgreiche Nierentransplantationen auf nicht verwandte Empfänger im Jahre 1962 durchgeführt, wobei zur Immunsuppression Azathioprin und Prednison verwendet wurden^[60].

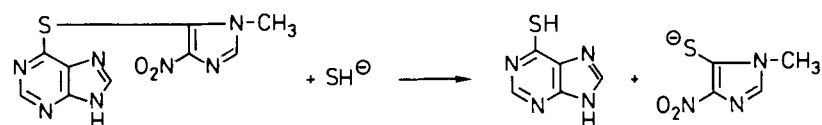


Abb. 2. Die Reaktion von Hydrogensulfid mit Azathioprin setzt 6-MP frei (aus [46]).

vorkommende Glutathion reagiert mit Azathioprin unter Freisetzung von 6-MP ins Plasma^[47]. Diese Verbindung hatte einen besseren therapeutischen Index bei Mäusen mit Adenocarcinoma 755, da sie genauso aktiv wie 6-MP, aber weniger toxisch als dieses war^[50]. Bei Patienten mit Leukämie waren die chemotherapeutischen Indices von 6-MP und Azathioprin jedoch etwa gleich^[51].

Immunsuppression und Transplantation

Im Jahre 1958 tauchte plötzlich ein neuer Horizont auf. Robert Schwartz, der mit William Dameshek in Boston arbeitete, untersuchte die Wirkung von 6-MP auf die Immunant-

Bis 1977 waren dem Kidney Registry für die Jahre 1965 bis 1972 etwa 25 000 Nierentransplantationen gemeldet worden^[61]; ihre Zahl hat seitdem jährlich weiter zugenommen^[62, 63]. Die Nierentransplantation wird heute nicht mehr als Experiment, sondern als Therapie betrachtet, wobei die Bedeutung der Histokompatibilität erkannt wurde^[63]. Auch andere Organtransplantationen, z. B. der Leber, des Herzens und der Lunge, wurden möglich. In den letzten Jahren wurden dabei andere Immunsuppressiva, z. B. Cyclosporin, gebräuchlich; Azathioprin jedoch blieb das wichtigste Mittel bei Nierenverpflanzungen.

Die immunsuppressive Wirkung von Azathioprin wurde in einer Vielzahl von immunologischen Systemen getestet. Die frühen Arbeiten sind in^[64] und die neueren Untersu-

chungen in^[65] zusammengefaßt. Immunsuppressiva haben sich auch bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten bewährt. Remissionen mit 6-MP, Thioguanin TG und Azathioprin wurden bei hämolytischer Anämie, systemischem Lupus und chronischer aktiver Hepatitis berichtet^[65]. Azathioprin ist heute für die Behandlung von schwerer rheumatoider Arthritis zugelassen^[66].

Gicht und Hyperurikämie

Es war jetzt an der Zeit, einen neuen Weg zur Steigerung der Aktivität von 6-MP zu suchen. Wir wußten aus Metabolismus-Studien, daß 6-Thioharnsäure (TU) eines der Hauptprodukte des 6-MP-Katabolismus ist, und es erschien uns möglich, durch eine Inhibition des für die Oxidation verantwortlichen Enzyms, der Xanthin-Oxidase, diese Oxidation zu beeinflussen. Zu Beginn unserer Suche nach Antimetaboliten für die natürlichen Purine war die Xanthin-Oxidase eines unserer Testenzyme. *Doris Lorz* hatte viele Substrate und Inhibitoren dieses Enzyms gefunden^[7], die dann auch an *L. casei* und an Tiertumoren getestet worden waren.

Um die Hemmung der Xanthin-Oxidase *in vivo* zu prüfen, wählten wir eine Verbindung, die keine hemmende Wirkung auf Bakterien oder Tumoren hatte und nicht toxisch war, aber als potenter Inhibitor der Xanthin-Oxidase galt. Es handelte sich um 4-Hydroxypyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin (Allopurinol), ein Hypoxanthin-Analogon. Wurde Allopurinol zusammen mit 6-MP Mäusen gegeben, so inhibierte es in der Tat die Oxidation von 6-MP und erhöhte dessen Antitumor- und immunsuppressiven Eigenschaften um das Drei- bis Vierfache^[45, 67, 68]. Die Toxizität von 6-MP für Mäuse schien jedoch nur verdoppelt, so daß der chemotherapeutische Index von 6-MP erhöht worden war.

Würde dieser Befund auch beim Menschen auftreten? Zusammen mit *Wayne Rundles* testeten wir dies an Patienten mit chronischer granulozytärer Leukämie, an denen die Wirksamkeit und der Metabolismus von 6-MP untersucht werden konnten. Wie bei den Mäusen wurden auch hier die Oxidation von 6-MP zu TU in dosisabhängiger Weise inhibiert und die antileukämische Aktivität von 6-MP proportional erhöht^[45, 69–71]. Abbildung 3 zeigt die Reduktion des

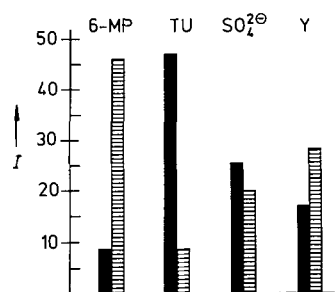


Abb. 3. Radioaktive Metaboliten im Urin eines Patienten nach Gabe von 110 mg [³⁵S]-6-MP mit (▨) und ohne (■) 300 mg Allopurinol. Y = andere Metaboliten, I = prozentualer Anteil an der Urin-Radioaktivität (aus [71]).

TU- und die Zunahme des 6-MP-Anteils, wenn statt 110 mg 6-MP gleichzeitig 300 mg Allopurinol und 110 mg 6-MP gegeben werden. In späteren Untersuchungen wurde allerdings gezeigt^[72], daß die erhöhte Aktivität von 6-MP mit einer proportional erhöhten Toxizität einherging, so daß der the-

rapeutische Index von 6-MP für Leukämie unverändert blieb.

Die Xanthin-Oxidase ist nicht nur für die Oxidation von 6-MP, sondern auch für die Bildung von Harnsäure aus Hypoxanthin und Xanthin verantwortlich (Abb. 4). Dement-

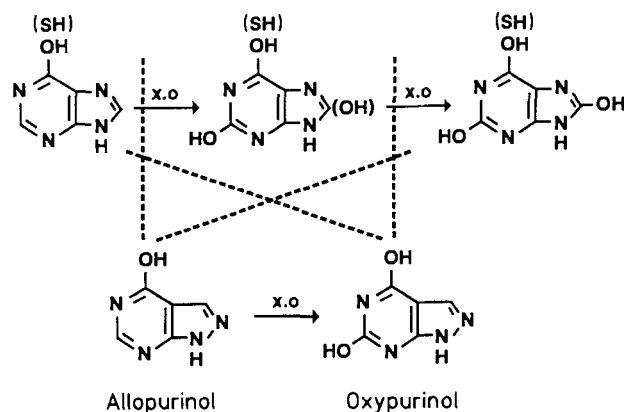


Abb. 4. Wege bei der Oxidation von Hypoxanthin und 6-MP durch die Xanthin-Oxidase (x.o.), die von Allopurinol und Oxypurinol inhibiert werden. Das Zwischenprodukt bei 6-MP ist 8-Hydroxy-6-MP, das bei Hypoxanthin 2,6-Dihydroxypurin (Xanthin).

sprechend führt eine Behandlung mit Allopurinol zu einer starken Senkung der Harnsäurewerte im Harn und im Blut^[69, 71, 73, 74]. Dadurch eröffnete sich die Möglichkeit einer gemeinsamen Therapie für Gicht und andere Formen der Hyperurikämie.

Man erkannte schon früh, daß die Hemmung eines Enzyms wie der Xanthin-Oxidase *in vivo* schwierig sein würde. Zunächst war da die Frage, ob die Halbwertszeit des Inhibitors im Körper ausreichen würde, um eine anhaltende Senkung der Harnsäureproduktion zu bewirken. Weiterhin bestand die Möglichkeit, daß die Hemmung zu einer unannehmbaren Akkumulation der Zwischenprodukte Hypoxanthin und Xanthin führen würde, von denen Xanthin ungefähr so unlöslich ist wie Harnsäure. Darüber hinaus war nicht auszuschließen, daß – ausgelöst durch die hohen Konzentrationen der Zwischenprodukte – die Produktion von mehr Enzym induziert würde, was immer höhere Dosen an Inhibitor erfordern würde. Schließlich mußten die Langzeitwirkungen dieses Inhibitors sorgfältig untersucht werden, da Gichtpatienten wahrscheinlich ein Leben lang dieses Medikament einnehmen würden. Alle diese Möglichkeiten wurden zuerst an Tieren und dann am Menschen sorgfältig geprüft.

Allopurinol ist nicht nur ein starker kompetitiver Inhibitor der Xanthin-Oxidase, sondern auch ein Substrat^[75], das zum Xanthin-Analogon Oxypurinol (in früheren Arbeiten Alloxanthin, Oxoallopurinol oder Oxipurinol genannt) oxidiert wird, welches auch ein Inhibitor der Xanthin-Oxidase ist (Abb. 4). Oxypurinol bindet außerdem sehr stark an die reduzierte Form des Enzyms und inaktiviert es dadurch^[75, 76]. Die Enzymaktivität kann durch Oxidation an Luft langsam wiederhergestellt werden^[76, 77].

Während Allopurinol eine kurze Halbwertszeit im Plasma aufweist (etwa 90 bis 120 Minuten), hat Oxypurinol eine lange Halbwertszeit von 18 bis 30 Stunden^[75, 78, 79]. Das liegt daran, daß Oxypurinol im proximalen Nierentubulus reabsorbiert wird^[80]. So können also konstante Konzentratio-

nen von Oxypurinol in wenigen Tagen erreicht werden und Harnsäurekonzentrationen durch geeignete Dosierung auf dem gewünschten Niveau gehalten werden^[80]. Da Allopurinol – im Gegensatz zu Oxypurinol – oral vollständig aufgenommen wird, bleibt Allopurinol die ideale Prä-Droge für Oxypurinol.

Das Schicksal der Oxypurin-Zwischenprodukte Hypoxanthin und Xanthin erwies sich als faszinierend. Diese Oxypurine akkumulieren nicht im Serum. Tatsächlich steigen ihre Serumkonzentrationen nur sehr wenig während einer Behandlung mit Allopurinol^[79, 81]. Dafür gibt es zwei Gründe: Erstens können Hypoxanthin und Xanthin für die Nucleinsäuresynthese durch das Enzym HGPRT wiederverwendet werden^[82, 83]; die gebildeten Nucleotide IMP und XMP sind die normalen Zwischenprodukte für die Synthese der Adenin- und Guanin-Nucleotide (AMP, GMP). Zweitens können IMP, AMP und GMP in einer Rückkopplungsinhibition die de-novo-Synthese von Purinen durch Inhibition der PRPP-Amidotransferase reduzieren^[84]. So wird durch Wiederverwertung von Hypoxanthin und Xanthin die Purin-Biosynthese reguliert, d. h. bei erhöhter Purin-Konzentration reduziert. Werden die Oxypurine nicht wiederverwertet, dann werden sie von der Niere durch glomeruläre Filtration ausgeschieden, da praktisch keine Reabsorption im Nierentubulus stattfindet^[85, 86].

Langzeituntersuchungen mit Allopurinol an Mensch und Tier haben gezeigt, daß die Neubildung von Enzym nicht induziert wird und daß Allopurinol ein sicheres und wirksames Medikament für Langzeitbehandlungen ist^[87]. Ein geringer Prozentsatz der Patienten bekam nach Einnahme von Allopurinol einen Ausschlag. Patienten mit schlechter Nierenfunktion benötigen wegen der pharmakologischen Eigenschaften und der langen Halbwertszeit von Oxypurinol eine geringere Allopurinol-Dosis^[88].

Durch Allopurinol können einige klinische Probleme der Gicht gelindert werden. Die Hyperurikämie der Gicht führt entweder zur Ablagerung von kleinen Harnsäurekristallen in den Gelenken, die starke Schmerzen hervorruft, oder es entstehen große Ablagerungen, sogenannte Tophi arthritici, die eine gichtige Arthritis und eingeschränkte Beweglichkeit der Gelenke zur Folge haben. Bei Patienten, die übermäßig viel Harnsäure über den Urin ausscheiden, bilden sich oft Harnsäuresteine in der Niere. Mit Allopurinol konnten die Bildung von Tophi reduziert und die von Harnsäuresteinen verhindert werden^[74, 81, 87, 89, 90]. Des gleichen kann die sekundäre Hyperurikämie, die bei der Therapie maligner Tumoren vorkommt, mit Allopurinol reduziert werden^[91].

Antiprotozoen-Wirkung von Allopurinol

Ich möchte an dieser Stelle etwas abschweifen, um eine andere Anwendung von Allopurinol, die etwa 10 Jahre später bekannt wurde, zu beschreiben, denn sie ist bezeichnend für die chemotherapeutische Selektivität, die mit Purin-Analoga aufgrund der Unterschiede in den Spezifitäten von Wirt- und Parasiten-Enzymen erreicht werden kann.

Der Befund von Joseph Marr et al.^[92], daß Allopurinol die Replikation von *Leishmania donovani* inhibiert, führte zu einer engen Zusammenarbeit, in deren Verlauf die biochemischen Grundlagen für diese unerwartete Wirkung entdeckt wurden^[93–101]. Leishmanien und Trypanosomen können,

wie viele andere einzellige Parasiten, Purine nicht de novo synthetisieren. Sie verfügen jedoch über eine Reihe von Enzymen, die sie in die Lage versetzen, vorgeformte Purine und Nucleoside aus dem Blut des Wirtes zu verwerten. Leishmanien und Trypanosomen enthalten große Mengen des Enzyms HGPRT, das Allopurinol als Substrat viel besser verwerten kann als das entsprechende Enzym des Menschen^[97]. Zusätzlich hat das Enzym Adenylsuccinat-Synthetase, das die Umwandlung von IMP in sAMP – ein Zwischenprodukt für AMP – katalysiert, eine viel breitere Substratspezifität als das entsprechende Enzym von Säugetieren^[96, 101].

Die Protozoen-Enzyme wandeln also das Allopurinol-Ribonucleotid in das Adenylat-Analogon 4-Aminopyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Ribonucleotid um, das dann als Di- und Triphosphat in die RNA eingebaut wird^[93, 94, 98, 100]. Im Säugetierwirt findet diese Aminierung nicht statt, und Allopurinol wird nicht in Nucleinsäuren eingebaut^[102]. Abbildung 5 zeigt die Unterschiede im Metabolismus von Allopurinol in Säugetierwirten (rechts) und in Trypanosomen (links).

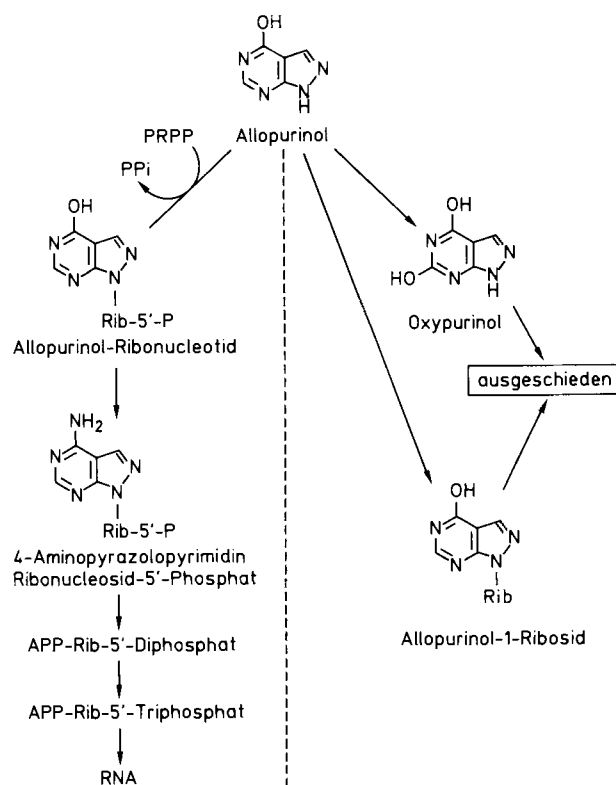


Abb. 5. Metabolische Wege von Allopurinol in Trypanosomen (links) und im Menschen (rechts).

Allopurinol hat sich für die Behandlung von Leishmaniasis^[103] und der Chagas-Krankheit, die durch *Trypanosoma cruzi* ausgelöst wird^[104], als geeignet erwiesen. Allopurinol-Ribosid, ein im menschlichen Harn in geringen Mengen vorkommender Metabolit von Allopurinol, kann von Leishmanien analog umgewandelt werden^[94], während es im Menschen nicht weiter metabolisiert wird.

Antivirale Mittel

Im Jahre 1968 beschlossen wir, einen Weg wieder aufzunehmen, der uns schon seit 1948 interessierte: den Weg zu

antiviralen Substanzen. Die antivirale Aktivität von 2,6-Diaminopurin DAP war vielversprechend gewesen^[122], seine Toxizität allerdings entmutigend. Inzwischen hatte die Arbeit mit 6-MP, TG, Azathioprin und Allopurinol 20 Jahre verschlungen. Als entdeckt wurde, daß Adenin-Arabinosid (ara-A) das Wachstum von DNA- und RNA-Viren inhibiert^[105], bekamen die Gedanken eine neue Richtung. Würde das Arabinosid von DAP gleichermaßen aktiv sein? Immerhin hatte DAP Adenin bei vielen Reaktionen nachgeahmt und konnte durch Adenin-metabolisierende Enzyme in die entsprechenden Nucleoside und Nucleotide umgewandelt werden. Zusätzlich war DAP ein schlechteres Substrat für die Adenosin-Deaminase als Adenosin. Es schien daher möglich, daß das Arabinosid ara-DAP länger als ara-A (eine Verbindung, die in vivo schnell desaminiert wird) existieren würde.

ara-DAP wurde von *Janet Rideout* synthetisiert, und wir schickten, da wir zu jener Zeit kein Virus-Labor am Ort hatten, die Verbindung an unseren Kollegen *John Bauer* von den Wellcome Research Laboratories in Großbritannien, der sie auf antivirale Aktivität testen sollte. Nach wenigen Wochen ließ er uns wissen, daß diese Verbindung gegen das Herpes-simplex- und das Vaccinia-Virus hochaktiv war. Zudem war die Verbindung weniger toxisch für Säugetierzellen als ara-A. So begann unsere antivirale Odyssee. Über mehrere Jahre hinweg arbeitete meine Gruppe an Purin-Arabinosiden, untersuchte Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, suchte bessere Synthesewege und führte Metabolismus-Untersuchungen an Mäusen durch^[106]. *Bauer* und *Collins* untersuchten die Aktivität der Verbindungen in Kaninchen und Mäusen^[106]. Wir fanden, daß ara-DAP zum Guanin-Arabinosid (ara-G) desaminiert wurde und daß dieses genauso aktiv gegen Viren war wie ara-DAP. Dies war ein Vorteil von ara-G gegenüber dem Desaminierungsprodukt von ara-A, dem Hypoxanthin-Arabinosid, das nur eine sehr geringe antivirale Aktivität zeigt. Wir waren aber nicht sicher, ob dieser Vorteil groß genug war, um die umfassende Entwicklung von ara-DAP zu rechtfertigen.

Im Jahre 1970 siedelten unsere Laboratorien nach North-Carolina über, und *Howard Schaeffer* kam als Leiter der Abteilung für Organische Chemie zu uns. Er hatte zuvor Adenosin-Analoga als Substrate und Inhibitoren des Enzyms Adenosin-Desaminase untersucht und dabei mit einer Reihe von acyclischen Seitenketten an der Position 9 von Adenin getestet, welche Veränderungen des Substrates vom Enzym noch toleriert werden^[107]. Er fand, daß 9-{(2-Hydroxyethoxy)methyl}adenin immer noch als Substrat von der Adenosin-Desaminase akzeptiert wurde. Das ließ vermuten, daß auch andere Enzyme solche Seitenketten als Pentose erkennen würden und daß derartige Nucleosid-Analoga als Antimetaboliten dienen könnten.

Beim antiviralen Test in vitro war das acyclische Adenosin-Analogon bei doppelt so hoher Konzentration wie ara-A gegen das Herpes-Virus aktiv. Unsere Forschung konzentrierte sich jetzt auf die acyclischen Nucleosid-Analoga; die Synthesen wurden von *Schaeffer* und *Beauchamp* und die antiviralen Tests von *Bauer* und *Collins* durchgeführt, der Wirkungsmechanismus, die Enzymologie und der in-vivo-Metabolismus wurde von meiner Gruppe untersucht^[108, 109]. Wie im Fall der Purin-Arabinoside war auch hier das 2,6-Diaminopurin-Analogon in vivo und in vitro hochaktiv gegen das Herpes-simplex-Virus. Überraschen-

derweise war jedoch das Guanin-Analogon, Acyclovir (ACV, Acycloguanosin), noch einhundertmal aktiver als die Diamino-Verbindung^[109]. Acyclovir ist ein metabolisches Produkt des DAP-Derivates; es wird von der Adenosin-Desaminase gebildet und ist unzweifelhaft Ursache der in vivo beobachteten antiviralen Aktivität der Diamino-Verbindung^[110–112].

Acyclovir

Der interessanteste Aspekt der antiviralen Aktivität von ACV ist neben der hohen Aktivität die ungewöhnliche Selektivität (Abb. 6)^[108, 109, 113–115]. ACV ist hochaktiv gegen

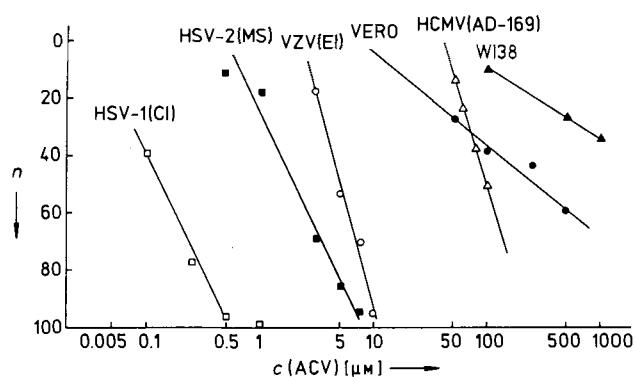


Abb. 6. Dosis-Wirkungs-Kurven von ACV für mehrere Viren und Zellen (aus [108]). n = prozentuale Inhibition, c = Konzentration.

die Herpes-simplex-Viren HSV-1 und HSV-2 sowie gegen das Varicella (Windpocken)-Virus. Auch gegen einige andere Viren vom Herpes-Typ, z. B. das Epstein-Barr-(EBV)- und das Pseudo-Lyssa-Virus, ist es aktiv, zeigt aber nur schwache Aktivität gegen das Zytomegalie-Virus des Menschen (HCMV). Es ist nicht cytotoxisch für Säugetierzellen, in denen diese Viren gezüchtet werden, selbst in Konzentrationen, die mehrere hundert Mal höher sind als die für die antivirale Aktivität nötigen. Außerdem ist die Verbindung gegen andere DNA-Viren wie das Vaccinia-Virus und gegen RNA-Viren inaktiv^[109].

Wir beschlossen, den Grund für diese ungewöhnliche Selektivität herauszufinden, um damit wichtige Informationen über die Herpes-Viren zu erhalten. Um diese Untersuchungen effektiv durchführen zu können, richteten wir ein hausinternes Virus-Labor ein, dessen Leiter *Phillip Furman* wurde.

Dann wurde radioaktives ACV, das in der Position 8 des Guaninteils mit ^{14}C oder in der Seitenkette mit ^3H markiert war, synthetisiert, und nicht infizierte sowie mit HSV-1 infizierte Zellen wurden mit beiden Acyclovir-Typen für 7 Stunden inkubiert. Extrakte dieser Zellen wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie untersucht. Die Extrakte der nicht infizierten Zellen enthielten nur unverändertes ACV. In den HSV-infizierten Zellen hatten sich drei neue radioaktive Verbindungen gebildet^[108], die durch enzymatische Methoden als Mono-, Di- und Triphosphat von ACV (ACV-MP, ACV-DP, ACV-TP) identifiziert werden konnten. Später konnte dieses Ergebnis durch Vergleich mit authentischen synthetischen Proben bestätigt werden.

Das Enzym, das ACV in sein Monophosphat umwandelt, wurde mit viel Mühe von *James Fyfe* isoliert, gereinigt und als eine vom Herpes-Virus spezifizierte Thymidin-Kinase identifiziert^[108, 116]. Während bekannt war, daß dieses Enzym in Herpes-infizierten Zellen gebildet werden soll, überraschte doch sehr, daß ein acyclisches Guanin-Nucleosid als Substrat dienen konnte. Das war aber tatsächlich der Fall. Ein ähnliches Enzym wird vom Varicella-Virus spezifiziert. Ist einmal die erste Phosphat-Gruppe angefügt, wird die zweite durch die zelluläre Guanylat-Kinase addiert^[117], und die dritte kann dann von verschiedenen zellulären Kinasen angefügt werden^[118]. Da die zelluläre Thymidin-Kinase ACV nicht als Substrat erkennt, wird sehr wenig ACV-TP in nicht infizierten Zellen gebildet^[108, 119]. Die wenige Phosphorylierung, die auch in normalen Zellen stattfindet, wird von einer 5'-Nucleotidase katalysiert^[120]. Die Bildung von ACV-TP ist in Abbildung 7 skizziert.

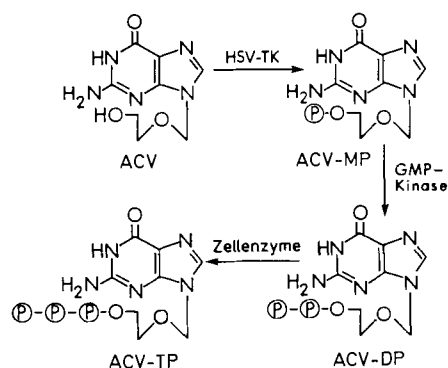


Abb. 7. Wege zu ACV-Mono-, -Di- und -Triphosphat (aus [108]).

Als klar war, daß die tatsächlich antiviral aktive Verbindung ACV-TP war, wurde die Wechselwirkung dieser Substanz mit viralen und zellulären DNA-Polymerasen untersucht. Es zeigte sich, daß ACV-TP die DNA-Polymerase des Herpes-Virus stärker inhibiert als die zelluläre DNA-Polymerase- α ^[121, 122]. Abbildung 8 gibt die quantitativen

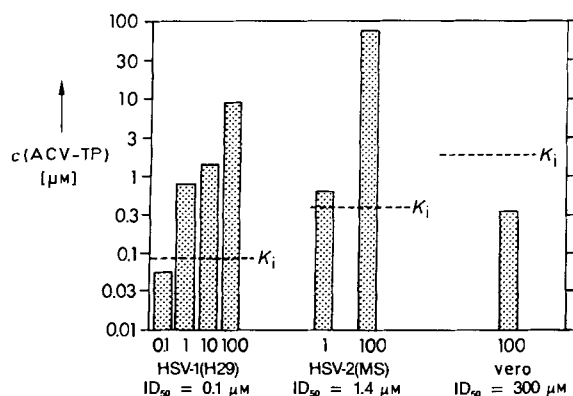


Abb. 8. Die Mengen von ACV-TP, die in nicht infizierten, HSV-1- und HSV-2-infizierten Vero-Zellen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von ACV gebildet werden. Die unterbrochenen Linien bezeichnen die K_i -Werte der einzelnen DNA-Polymerasen. Die ID_{50} -Werte entsprechen den Konzentrationen, bei denen eine 50proz. Hemmung der Plaque-Bildung erreicht wird (aus [123]).

Aspekte dieser Unterschiede hinsichtlich der ACV-TP-Bildung und der DNA-Polymerase-Hemmung (K_i -Wert) durch ACV-TP in Virus-infizierten und nicht infizierten Zellen wie-

der^[123]. Des weiteren dient ACV-TP als Substrat für die DNA-Polymerase des Herpes-Virus; sein Einbau führt jedoch zur Kettentermination, da die 3'-Hydroxygruppe, die für die Kettenverlängerung notwendig ist, nicht existiert^[113]. So werden nur sehr kurze Fragmente der viralen DNA gebildet^[124]. Zudem inhibiert ACV-TP die virale DNA-Polymerase nicht nur, sondern inaktiviert sie auch nach der Bildung des Enzym-Templat-Acylovirmonophosphat-Komplexes^[125]. Diese Inaktivierung tritt bei zellulären DNA-Polymerasen nicht auf.

Die hohe Selektivität von ACV für jene Herpes-Viren, die eine Herpes-spezifizierte Thymidin-Kinase induzieren, kann also erklärt werden. Dieses Enzym hat sich als überaus brauchbares Werkzeug bei der Bestimmung der strukturellen Anforderungen an andere potentielle Substrate erwiesen^[126]. Sein Fehlen oder Veränderungen an ihm erklären auch die Resistenz einiger Herpes-Viren-Isolate gegen Acyclovir^[127-129]. Entsprechend werden durch Transfektion von Zellen mit dem Teil des Herpes-Virus-Genoms, der das HSV-Thymidin-Kinase-Gen enthält, normalerweise resistente Zellen in ACV-sensitive Zellen transformiert^[130]. Auch durch Mutationen der viralen DNA-Polymerase kann Resistenz gegen ACV entstehen^[127-129].

Durch eine Infektion mit dem EB- oder dem HCM-Virus wird keine spezifische Kinase induziert, die Acyclovir phosphorylieren kann. Die EBV-DNA-Polymerase reagiert jedoch ausgesprochen empfindlich auf die kleinen Mengen von ACV-TP, die in EBV-infizierten Zellen gebildet werden^[131]. Obwohl ACV von HCMV-infizierten Zellen nicht phosphoryliert wird, geschieht dies bei dem nahe verwandten ACV-Derivat Ganciclovir (früher auch BW B759U, DHPG und 2'NDG genannt), das eine zusätzliche Hydroxymethylgruppe an der Seitenkette trägt. Dementsprechend hat sich Ganciclovir als wesentlich stärkerer Inhibitor der HCMV-Replikation erwiesen^[132-134].

Untersuchungen der Pharmakokinetik und des Metabolismus von ACV in mehreren Tierespezies und beim Menschen zeigten, daß es sich um eine bemerkenswert stabile Verbindung handelt. Nur zwei Metaboliten wurden gefunden: 9-[(2-Carboxymethoxy)methyl]guanin (CMMG) und 8-Hydroxy-acyclovir^[135]. Im Menschen betrug die Menge des Carboxy-Derivates CMMG etwa 9-14% der intravenösen Acyclovir-Dosis, während praktisch kein 8-Hydroxy-Metabolit im Urin auftauchte^[136, 137]. In anderen Spezies wurden etwas höhere Konzentrationen beider Metabolite gefunden^[135, 137, 138].

Acyclovir hat im Plasma eine Halbwertszeit von ungefähr drei Stunden^[139], so daß eine intravenöse Infusion etwa alle acht Stunden gegeben wird. Da Acyclovir mit etwa doppelter glomerulärer Filtrationsrate ausgeschieden wird und nur begrenzt in Wasser löslich ist ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ bei 37°C), wird es als einstündige intravenöse Infusion und nicht als Einzelinjektion gegeben. Die Verbindung ist auch lokal und oral angewendet wirksam. Obwohl die orale Bioverfügbarkeit begrenzt ist, sind die durch orale Einnahme von Acyclovir erreichbaren Blutkonzentrationen ausreichend für eine therapeutische Wirksamkeit gegen Herpes-simplex- und Varicella-Viren^[140].

Die Verbindung wird in allen Körpergeweben gefunden und überwindet die Blut-Hirn-Schranke^[109, 135, 141]. Toxikologische Untersuchungen an Mäusen, Ratten und Hunden ergaben, daß ACV selbst in einer Dosis, die weit über der

therapeutisch notwendigen liegt, nicht toxisch ist^[142]. Acyclovir wird jetzt über acht Jahre klinisch eingesetzt, und es scheint mir angemessen, einige Bereiche zu nennen, in denen es Leiden lindern und Leben retten konnte.

Die ersten Symptome von Herpes-genitalis-Infektionen sind Schmerzen, andauernde Virusausscheidung und langsame Wundheilung. Oral oder intravenös angewendetes ACV lindert die Symptome außerordentlich und verkürzt die Zeit der Virusausscheidung und die Erkrankungsdauer (Tabelle 1)^[143]. Rezidiv-Eruptionen von Herpes genitalis sind

Tabelle 1. Wirkung von ACV auf das erste Auftreten von Herpes genitalis.

Applikationsweg	mittlere Dauer in Tagen (ACV/Placebo)			Lit.
	Virusaus-scheidung	Schmerzen	Heilung	
i.v.	2/13	3/7	9/21	[144]
p.o.	1/13	4/8	6/11	[145]
p.o. [a]	3.9/13.4	2.8/3.4	9.5/13.7	[146]

[a] Nur Frauen; mittlere Dauer.

meistens kürzer und nicht so schwer wie die erste Attacke. Der durch eine Behandlung mit ACV erreichbare Vorteil scheint hier also nicht so groß zu sein. Eine Untersuchung, bei der Patienten mit einer oralen Therapie begonnen hatten, zeigte jedoch einen signifikanten Unterschied bei der Bildung neuer Läsionen: 23% nach Gabe von Placebo und 6.5% nach Gabe von ACV^[147]. Bei Patienten mit regelmäßigen Rezidiven, z. B. einmal monatlich über mehrere Jahre, war es möglich, die Häufigkeit dieser Rezidive auf im Mittel 1.8 im ersten und 1.4 im zweiten Jahr der oralen Prophylaxe mit ACV zu senken^[148]. Der Anteil an Patienten ohne Rezidiv innerhalb eines Jahres bei oraler Prophylaxe betrug 45–50%^[149].

Herpes zoster, auch Gürtelrose genannt, wird durch Reaktivierung von latenten Varicella-Viren hervorgerufen. Die Krankheit verursacht starke Schmerzen während des akuten zwei oder drei Wochen dauernden Anfalls, und etwa 10% aller Patienten leiden noch Monate später an einer post-herpetischen Neuralgie. ACV verkürzt die akute Phase deutlich, hat aber kaum Einfluß auf die post-herpetische Neuralgie^[150]. Bei immungeschwächten Personen kann Herpes zoster schwerwiegende Folgen wie progressive Hautdissemination und viszerale Erkrankung haben. Letztere kann bei einem kleinen Teil der Patienten tödlich verlaufen. Intravenöse Behandlung mit ACV konnte diese Disseminationen wirksam verhindern^[151].

Herpes-simplex-Infektionen bei immunsupprimierten Personen sind ein großes medizinisches Problem. Über lange Zeit werden Viren ausgeschieden, und die Heilung verläuft nur langsam. In zwei Untersuchungen, an denen 97 immungeschwächte Patienten^[152] mit einer Reihe von Erkrankungen und 34 Empfänger von Knochenmarkstransplantaten^[153] teilnahmen, konnte gezeigt werden, daß sich die intravenöse Behandlung mit ACV sehr deutlich auf die Virusausscheidung, die Schmerzen und die Erkrankungsdauer auswirkt (Tabelle 2). Bei Patienten mit Knochenmarkstransplantationen und bei Leukämiepatienten konnte eine Prophylaxe mit Acyclovir die Reaktivierung von latentem Virus während der Therapie verhindern, so daß die Patienten während der Zeit der größten Immunsuppression frei von herpetischen Anfällen blieben^[154, 155]. Die Behandlung

Tabelle 2. Wirkung von intravenös appliziertem ACV bei HSV-Infektionen in immungeschwächten Patienten.

Patienten	mittlere Dauer in Tagen (ACV/Placebo)		Heilung
	Virusaus-scheidung	Schmerzen	
alle 97	2.8/16.8	8.9/13.1	13.7/20.1
34 mit Knochenmarkstransplantation	3/17	10/16	14/28

von Herpes encephalitis, einer häufig tödlich verlaufenden Krankheit, mit intravenös appliziertem ACV war bei einem großen Teil der Patienten erfolgreich, wenn damit vor dem Einsetzen des Komas begonnen wurde^[156, 157].

ACV hat nicht nur eine enorme klinische Bedeutung, sondern es hat sich auch für die weitere antivirale Forschung als sehr wertvoll erwiesen. Die intensive Untersuchung seines Wirkungsmechanismus hat zu einem besseren Verständnis der enzymatischen Unterschiede zwischen normalen und Virus-infizierten Zellen geführt. Das hat der Suche nach anderen Virus-spezifischen und therapeutisch bedeutsamen Enzymen starke Impulse gegeben.

Schlußbemerkung

In meinem Versuch, 40 Jahre der Forschung über Purine und Purin-Analoga zu beschreiben, konnte ich nur einen kurzen Einblick in das Gebiet geben. Ich hoffe trotzdem, ich konnte unsere Einstellung vermitteln, daß chemotherapeutische Agentien nicht nur Ziele an sich sind, sondern auch als Schlüssel zu den Geheimnissen der Natur dienen können. Dieser Ansatz hat uns gute Dienste geleistet und viele neue Bereiche der medizinischen Forschung eröffnet. Unser Ziel bleibt die Selektivität, und ihr Verständnis wird uns neue Wege weisen.

Eingegangen am 27. Januar 1989 [A 722]
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Bonn

[1] D. D. Woods, *Br. J. Exp. Pathol.* 21 (1940) 74.
[2] P. Fildes, *Lancet* 1940 I, 955.
[3] G. H. Hitchings, G. B. Elion, E. A. Falco, P. B. Russell, M. B. Sherwood, H. VanderWerff, *J. Biol. Chem.* 183 (1950) 1.
[4] G. H. Hitchings, G. B. Elion, E. A. Falco, P. B. Russell, H. VanderWerff, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 52 (1950) 1318.
[5] H. M. Kalkar, *J. Biol. Chem.* 167 (1947) 461.
[6] G. H. Hitchings, E. A. Falco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30 (1944) 294.
[7] D. C. Lorz, G. H. Hitchings, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9 (1950) 197.
[8] R. B. Angier, J. H. Boothe, B. L. Hutchings, J. H. Mowat, J. Semb, E. L. R. Stokstad, Y. Subbarow, C. W. Waller, D. B. Cosulich, M. J. Fahrenbach, M. E. Hultquist, E. Kuh, E. H. Northey, D. R. Seeger, J. P. Stickels, J. M. Smith, *Science (Washington)* 103 (1946) 667.
[9] G. H. Hitchings, E. A. Falco, M. B. Sherwood, *Science (Washington)* 102 (1945) 251.
[10] G. B. Elion, G. H. Hitchings, *J. Biol. Chem.* 185 (1950) 651.
[11] G. H. Hitchings, G. B. Elion, H. VanderWerff, E. A. Falco, *J. Biol. Chem.* 174 (1948) 765.
[12] G. H. Hitchings, G. B. Elion, H. VanderWerff, *J. Biol. Chem.* 174 (1948) 1037.
[13] H. C. Carrington, *J. Chem. Soc.* 1944, 124.
[14] G. B. Elion, E. Burgi, G. H. Hitchings, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 411.
[15] G. B. Elion, G. H. Hitchings, *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 1676.
[16] G. B. Elion, G. H. Hitchings, *J. Biol. Chem.* 187 (1950) 511.
[17] G. B. Elion, H. VanderWerff, G. H. Hitchings, M. E. Balis, D. H. Levin, J. B. Brown, *J. Biol. Chem.* 200 (1953) 7.
[18] A. Kornberg, I. Lieberman, E. S. Simms, *J. Biol. Chem.* 215 (1955) 417.
[19] J. H. Burchenal, A. Bendich, J. B. Brown, G. B. Elion, G. H. Hitchings, C. P. Rhoads, C. C. Stock, *Cancer (Philadelphia)* 2 (1949) 119.

- [20] J. J. Bieseke, R. E. Berger, A. Y. Wilson, G. H. Hitchings, G. B. Elion, *Cancer (Philadelphia)* 4 (1951) 186.
- [21] J. H. Burchenal, D. A. Karnofsky, E. M. Kingsley-Pillers, C. M. Southam, W. P. L. Myers, G. C. Escher, L. F. Craver, H. W. Dargeon, C. P. Rhoads, *Cancer (Philadelphia)* 4 (1951) 549.
- [22] a) R. L. Thompson, M. L. Wilkin, G. H. Hitchings, G. B. Elion, E. A. Falco, P. B. Russell, *Science (Washington)* 110 (1949) 454; b) R. L. Thompson, M. L. Price, S. A. Menton, Jr., G. B. Elion, G. H. Hitchings, *J. Immunol.* 65 (1950) 529.
- [23] G. B. Elion, G. H. Hitchings, H. VanderWerff, *J. Biol. Chem.* 192 (1951) 505.
- [24] D. A. Clarke, F. S. Phillips, S. S. Sternberg, C. C. Stock, G. B. Elion, G. H. Hitchings, *Cancer Res.* 13 (1953) 593.
- [25] F. S. Phillips, S. S. Sternberg, L. Hamilton, D. A. Clarke, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60 (1954) 283.
- [26] J. H. Burchenal, M. L. Murphy, R. R. Ellison, M. P. Sykes, C. T. C. Tan, L. A. Leone, D. A. Karnofsky, L. F. Craver, H. W. Dargeon, C. P. Rhoads, *Blood* 8 (1953) 965.
- [27] C. P. Rhoads (Hrsg.): 6-Mercaptopurine (*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60 (1954) 183).
- [28] G. B. Elion, S. Singer, G. H. Hitchings, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60 (1954) 200.
- [29] G. B. Elion, S. Singer, G. H. Hitchings, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 35.
- [30] M. E. Balis, D. H. Levin, G. B. Brown, G. B. Elion, H. C. Nathan, G. H. Hitchings, *Arch. Biochem. Biophys.* 71 (1957) 358.
- [31] a) G. E. W. Wolstenholme, C. M. O'Connor (Hrsg.): *The Chemistry and Biology of Purines*, Churchill, London 1957; b) G. R. Greenberg, L. Jaenicke in [31a], S. 204–232.
- [32] J. M. Buchanan, J. G. Flaks, S. C. Hartman, B. Levenberg, L. N. Lukens, L. Warren in [31a], S. 233–252.
- [33] J. B. Buchanan, S. C. Hartman, *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* 21 (1959) 199.
- [34] G. H. Hitchings, G. B. Elion in I. Brodsky, S. B. Kahn, J. H. Moyer (Hrsg.): *Cancer Chemotherapy II, Twenty-Second Hahnemann Symposium*, Grune & Stratton, New York 1972, S. 23–32.
- [35] G. B. Elion in: *Pharmacological Basis of Cancer Chemotherapy*, Williams & Wilkins, Baltimore 1975, S. 547–564.
- [36] G. B. Elion, S. Bieber, G. H. Hitchings, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60 (1954) 297.
- [37] L. Hamilton, G. B. Elion, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 60 (1954) 304.
- [38] G. B. Elion, *Proc. R. Soc. Med.* 50 (1957) 7.
- [39] D. A. Clarke, G. B. Elion, G. H. Hitchings, C. C. Stock, *Cancer Res.* 18 (1958) 445.
- [40] G. B. Elion, I. Goodman, W. Lange, G. H. Hitchings, *J. Am. Chem. Soc.* 81 (1959) 1898.
- [41] G. B. Elion, S. Bieber, G. H. Hitchings, *Cancer Chemother. Rep.* 8 (1960) 36.
- [42] G. B. Elion, S. W. Callahan, G. H. Hitchings, R. W. Rundles, *Cancer Chemother. Rep.* 8 (1960) 47.
- [43] G. B. Elion, S. W. Callahan, G. H. Hitchings, R. W. Rundles, *Proc. Int. Congr. Hematol.* 8th 1960 (1962) 642–645.
- [44] G. B. Elion, S. Mueller, G. H. Hitchings, *J. Am. Chem. Soc.* 81 (1959) 3042.
- [45] G. B. Elion, S. Callahan, R. W. Rundles, G. H. Hitchings, *Cancer Res.* 23 (1963) 1207.
- [46] G. B. Elion, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26 (1967) 898.
- [47] P. deMiranda, L. M. Beacham III, T. H. Creagh, G. B. Elion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187 (1973) 588.
- [48] G. B. Elion, G. H. Hitchings, *Handb. Exp. Pharmacol.* 38 (1975) 404–425.
- [49] P. deMiranda, L. M. Beacham III, T. H. Creagh, G. B. Elion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195 (1975) 50.
- [50] G. B. Elion, S. Callahan, S. Bieber, R. W. Rundles, *Cancer Chemother. Rep.* 14 (1961) 93.
- [51] R. W. Rundles, J. Laszlo, T. Itoga, G. B. Hobson, F. E. Garrison, Jr., *Cancer Chemother. Rep.* 14 (1961) 99.
- [52] R. Schwartz, J. Stack, W. Dameshek, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99 (1958) 164.
- [53] D. Chanmougan, R. S. Schwartz, *J. Exp. Med.* 124 (1966) 363.
- [54] R. Schwartz, W. Dameshek, *Nature (London)* 183 (1959) 1682.
- [55] H. C. Nathan, S. Bieber, G. B. Elion, G. H. Hitchings, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107 (1961) 796.
- [56] S. Bieber, G. B. Elion, G. H. Hitchings, D. C. Hooper, H. C. Nathan, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111 (1962) 334.
- [57] R. Y. Calne, *Lancet* 1960 I, 417.
- [58] R. Y. Calne, *Transplant. Bull.* 28 (1961) 65.
- [59] R. Y. Calne, G. P. J. Alexandre, J. E. Murray, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 99 (1962) 743.
- [60] J. E. Murray, J. P. Merrill, J. H. Harrison, R. E. Wilson, G. J. Dammin, *N. Engl. J. Med.* 268 (1963) 1315.
- [61] Advisory Committee to the Renal Transplant Registry: *The Twelfth Report of the Human Renal Transplant Registry (JAMA J. Am. Med. Assoc.* 233 (1975) 787).
- [62] S. T. Perdue, P. I. Terasaki, S. Cats, M. R. Mickey, *Transplantation* 36 (1983) 658.
- [63] H. Takiff, D. J. Cook, N. S. Himaya, M. R. Mickey, P. I. Terasaki, *Transplantation* 45 (1988) 410.
- [64] G. H. Hitchings, G. B. Elion, *Pharmacol. Rev.* 15 (1963) 365.
- [65] G. Wolberg, *Handb. Exp. Pharmacol.* 85 (1988) 517–533.
- [66] T. Hunter, M. B. Urowitz, D. A. Gordon, H. A. Smythe, M. A. Ogryzlo, *Arthritis Rheum.* 18 (1975) 15.
- [67] G. B. Elion, S. W. Callahan, G. H. Hitchings, R. W. Rundles, J. Laszlo, *Cancer Chemother. Rep.* 16 (1962) 197.
- [68] G. B. Elion, S. Callahan, H. Nathan, S. Bieber, R. W. Rundles, G. H. Hitchings, *Biochem. Pharmacol.* 12 (1963) 85.
- [69] R. W. Rundles, J. B. Wyngaarden, G. H. Hitchings, G. B. Elion, H. R. Silberman, *Trans. Assoc. Am. Physicians* 76 (1963) 126.
- [70] R. W. Rundles, *Ann. Rheum. Dis.* 25 (1966) 615.
- [71] G. H. Hitchings, G. B. Elion, *Cancer Res.* 45 (1985) 2415.
- [72] W. R. Vogler, J. A. Bain, C. M. Huguley, Jr., H. G. Palmer, Jr., M. E. Lowrey, *Am. J. Med.* 40 (1966) 548.
- [73] G. H. Hitchings, *Ann. Rheum. Dis.* 25 (1966) 601.
- [74] J. T. Scott (Hrsg.): *Symposium on Allopurinol (Ann. Rheum. Dis.* 25 (1966) 599).
- [75] G. B. Elion, *Ann. Rheum. Dis.* 25 (1966) 608.
- [76] V. Massey, H. Komai, G. Palmer, G. B. Elion, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 2837.
- [77] V. Massey, H. Komai, G. Palmer, G. B. Elion, *Vitam. Horm. (N.Y.)* 28 (1970) 505.
- [78] G. B. Elion, A. Kovensky, G. H. Hitchings, E. Metz, R. W. Rundles, *Biochem. Pharmacol.* 15 (1966) 863.
- [79] G. B. Elion, *Handb. Exp. Pharmacol.* 51 (1978) 485–514.
- [80] G. B. Elion, T.-F. Yü, A. B. Gutman, G. H. Hitchings, *Am. J. Med.* 45 (1968) 69.
- [81] T.-F. Yü, A. B. Gutman, *Am. J. Med.* 37 (1964) 885.
- [82] R. Pomales, S. Bieber, R. Friedman, G. H. Hitchings, *Biochim. Biophys. Acta* 72 (1963) 119.
- [83] R. Pomales, G. B. Elion, G. H. Hitchings, *Biochim. Biophys. Acta* 95 (1965) 505.
- [84] J. B. Wyngaarden, D. M. Ashton, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1492.
- [85] S. Goldfinger, J. R. Klinenberg, J. E. Seegmiller, *J. Clin. Invest.* 44 (1965) 623.
- [86] J. R. Klinenberg, S. E. Goldfinger, J. E. Seegmiller, *Ann. Intern. Med.* 62 (1965) 639.
- [87] R. W. Rundles, *Arch. Intern. Med.* 145 (1985) 1492.
- [88] a) A. Rapado, R. W. E. Watts, C. H. M. M. DeBruyn (Hrsg.): *Purine Metabolism in Man III*, Plenum, New York 1980; b) G. B. Elion, F. M. Benet, T. D. Beardmore, W. N. Kelley in [88a], Teil A, S. 263–267.
- [89] R. W. Rundles, E. Metz, H. R. Silberman, *Ann. Intern. Med.* 64 (1966) 229.
- [90] A. deVries, M. Frank, U. A. Liberman, O. Sperling, *Ann. Rheum. Dis.* 25 (1966) 691.
- [91] I. H. Krakoff, *Arthritis Rheum.* 8 (1965) 896.
- [92] M. A. Pfaller, J. J. Marr, *Antimicrob. Agents Chemother.* 5 (1974) 469.
- [93] D. J. Nelson, C. J. I. Bugge, G. B. Elion, R. L. Berens, J. J. Marr, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 3959.
- [94] D. J. Nelson, S. W. LaFon, J. V. Tuttle, W. H. Miller, R. L. Miller, T. A. Krenitsky, G. B. Elion, R. L. Berens, J. J. Marr, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 11544.
- [95] J. Marr, R. Berens, D. Nelson, *Science (Washington)* 201 (1978) 1018.
- [96] T. Spector, T. E. Jones, G. B. Elion, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 8422.
- [97] T. A. Krenitsky, G. W. Koszalka, J. V. Tuttle, D. L. Adamczyk, G. B. Elion, J. J. Marr in [88a], Teil B, S. 271–276.
- [98] R. L. Berens, J. J. Marr, D. J. Nelson, S. W. LaFon, *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 2397.
- [99] S. W. LaFon, D. J. Nelson, R. L. Berens, J. J. Marr, *Biochem. Pharmacol.* 31 (1982) 231.
- [100] R. L. Behrens, J. J. Marr, F. Steele De Cruz, D. J. Nelson, *Antimicrob. Agents Chemother.* 22 (1982) 657.
- [101] T. Spector, R. L. Berens, J. J. Marr, *Biochem. Pharmacol.* 31 (1982) 225.
- [102] D. J. Nelson, G. B. Elion, *Biochem. Pharmacol.* 24 (1975) 1235.
- [103] P. A. Kager, P. H. Rees, B. T. Welde, W. T. Hockmeyer, W. H. Lyerly, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75 (1981) 556.
- [104] C. I. Meirovich, H. L. Montrull, R. H. Gallerano, R. R. Sosa, *Arq. Bras. Cardiol.* 45 (1985) 217.
- [105] F. M. Schabel, Jr., *Chemotherapy (Basel)* 13 (1968) 321.
- [106] G. B. Elion, J. L. Rideout, P. deMiranda, P. Collins, D. J. Bauer, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 255 (1975) 468.
- [107] H. J. Schaeffer, S. Gurwara, R. Vince, S. Bittner, *J. Med. Chem.* 14 (1971) 367.
- [108] G. B. Elion, P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. deMiranda, L. Beauchamp, H. J. Schaeffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5716.
- [109] H. J. Schaeffer, L. Beauchamp, P. deMiranda, G. B. Elion, D. J. Bauer, P. Collins, *Nature (London)* 272 (1978) 583.
- [110] S. S. Good, P. deMiranda, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 41 (1982) 1733.
- [111] H. C. Krasny, S. H. T. Liao, S. S. Good, B. Petty, P. S. Lietman, *Clin. Pharmacol. Ther. (St. Louis)* 33 (1983) 256.
- [112] T. Spector, T. E. Jones, L. M. Beacham III, *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983) 2505.

- [113] G. B. Elion, *Am. J. Med.* 73 (1982) 7.
- [114] P. Collins, *J. Antimicrob. Chemother.* 12 Suppl. B (1983) 19.
- [115] G. B. Elion, *J. Antimicrob. Chemother.* 12 Suppl. B (1983) 9.
- [116] J. A. Fyfe, P. M. Keller, P. A. Furman, R. L. Miller, G. B. Elion, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 8721.
- [117] W. H. Miller, R. L. Miller, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 7204.
- [118] W. H. Miller, R. L. Miller, *Biochem. Pharmacol.* 31 (1982) 3879.
- [119] P. A. Furman, P. deMiranda, M. H. St. Clair, G. B. Elion, *Antimicrob. Agents Chemother.* 20 (1981) 518.
- [120] P. M. Keller, S. A. McKee, J. A. Fyfe, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8664.
- [121] P. A. Furman, M. H. St. Clair, J. A. Fyfe, J. L. Rideout, P. M. Keller, G. B. Elion, *J. Virol.* 32 (1979) 72.
- [122] M. H. St. Clair, P. A. Furman, C. M. Lubbers, G. B. Elion, *Antimicrob. Agents Chemother.* 18 (1980) 741.
- [123] G. B. Elion in J. Mills, L. Corey (Hrsg.): *Antiviral Chemotherapy: New Directions for Clinical Application and Research*, Elsevier, New York 1986, S. 118–137.
- [124] P. V. McGuirt, J. E. Shaw, G. B. Elion, P. A. Furman, *Antimicrob. Agents Chemother.* 25 (1984) 507.
- [125] P. A. Furman, M. H. St. Clair, T. Spector, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 9575.
- [126] P. M. Keller, J. A. Fyfe, L. Beauchamp, C. M. Lubbers, P. A. Furman, H. J. Schaeffer, G. B. Elion, *Biochem. Pharmacol.* 30 (1981) 3071.
- [127] L. E. Schnipper, C. S. Crumpacker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 2270.
- [128] P. A. Furman, D. M. Coen, M. H. St. Clair, P. A. Schaeffer, *J. Virol.* 40 (1981) 936.
- [129] K. K. Biron, J. A. Fyfe, J. E. Noblin, G. B. Elion, *Am. J. Med.* 73 (1982) 383.
- [130] P. A. Furman, P. V. McGuirt, P. M. Keller, J. A. Fyfe, G. B. Elion, *Virology* 102 (1980) 420.
- [131] J. S. Pagano, J. W. Sixbey, J.-C. Lin, *J. Antimicrob. Chemother.* 12 Suppl. B (1983) 113.
- [132] W. T. Ashton, J. D. Karkas, A. K. Field, R. L. Tolman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1982) 1716.
- [133] Y. C. Cheng, S. P. Grill, G. E. Dutschman, K. Narayama, K. F. Bastow, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 12460.
- [134] K. K. Biron, S. C. Stanat, J. B. Sorrell, J. A. Fyfe, P. M. Keller, C. U. Lambe, D. J. Nelson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 2473.
- [135] P. deMiranda, H. C. Krasny, D. A. Page, G. B. Elion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219 (1981) 309.
- [136] P. deMiranda, S. S. Good, O. L. Laskin, H. C. Krasny, J. D. Connor, P. S. Lietman, *Clin. Pharmacol. Ther. (St. Louis)* 30 (1981) 662.
- [137] P. deMiranda, S. S. Good, H. C. Krasny, J. D. Connor, O. L. Laskin, P. S. Lietman, *Am. J. Med.* 73 (1982) 215.
- [138] S. S. Good, P. deMiranda, *Am. J. Med.* 73 (1982) 91.
- [139] P. deMiranda, R. J. Whitley, M. R. Blum, R. E. Keeney, N. Barton, D. M. Cocchetto, S. Good, G. P. Hemstreet, L. E. Kirk, D. A. Page, G. B. Elion, *Clin. Pharmacol. Ther. (St. Louis)* 26 (1979) 718.
- [140] P. deMiranda, M. R. Blum, *J. Antimicrob. Chemother.* 12 Suppl. B (1983) 29.
- [141] M. R. Blum, S. H. T. Liao, P. deMiranda, *Am. J. Med.* 73 (1982) 186.
- [142] W. E. Tucker, *Am. J. Med.* 73 (1982) 27.
- [143] G. B. Elion, *Cancer Res.* 45 (1985) 2943.
- [144] L. Corey, J. Benedetti, C. Critchlow, G. Mertz, J. Douglas, K. Fife, A. Fahnlander, M. L. Remington, C. Winter, J. Dragavon, *J. Antimicrob. Chemother.* 12 Suppl. B (1983) 79.
- [145] A. E. Nilsen, T. Aasen, A. M. Halsos, B. R. Kinge, E. A. L. Tjøtta, K. Wikström, A. P. Fiddian, *Lancet* 1982 II, 571.
- [146] Y. J. Bryson, M. Dillon, M. Lovett, G. Acuna, S. Taylor, J. D. Cherry, B. L. Johnson, E. Wiesmeier, T. Creagh-Kirk, R. Keeney, *N. Engl. J. Med.* 308 (1983) 916.
- [147] R. C. Reichman, G. J. Badger, D. C. Mertz, L. Corey, D. D. Richman, J. D. Connor, D. Redfield, M. C. Savoia, M. N. Oxman, Y. Bryson, D. Tyrrell, J. Portnoy, T. Creagh-Kirk, R. E. Keeney, T. Ashikaga, R. Dolin, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 251 (1984) 2103.
- [148] D. C. Mertz, L. Eron, R. Kaufman, L. Goldberg, B. Raab, M. Conant, J. Mills, T. Kurtz, L. G. Davis, *Am. J. Med.* 85 (1988) 14.
- [149] H. R. Mattison, R. C. Reichman, J. Benedetti, D. Bolgiano, L. G. Davis, A. Bailey-Farchione, M. Remington, C. Winter, L. Corey, *Am. J. Med.* 85 (1988) 20.
- [150] B. Bean, C. Braun, *Lancet* 1982 II, 118.
- [151] H. H. Balfour, K. A. McMonigal, B. Bean, *J. Antimicrob. Chemother.* 12 Suppl. B (1983) 169.
- [152] J. D. Meyers, J. C. Wade, C. D. Mitchell, R. Saral, P. S. Lietman, D. T. Durack, M. J. Levin, A. C. Segreti, H. H. Balfour, *Am. J. Med.* 73 (1982) 229.
- [153] J. C. Wade, B. Newton, C. McLaren, N. Fluornoy, R. E. Keeney, J. D. Meyers, *Ann. Intern. Med.* 96 (1982) 265.
- [154] R. Saral, W. H. Burns, O. L. Laskin, G. W. Santos, P. S. Lietman, *N. Engl. J. Med.* 305 (1981) 63.
- [155] R. Saral, R. F. Ambinder, W. H. Burns, C. M. Angelopoulos, D. E. Griffin, P. J. Burke, P. S. Lietman, *Ann. Intern. Med.* 99 (1983) 773.
- [156] B. Sköldenberg, M. Forsgren, K. Alestig, T. Bergström, L. Burman, E. Dahlqvist, A. Forkman, A. Fryden, K. Lovgren, K. Norlin, R. Norrby, E. Ölding-Stenkvist, J. Stiernstedt, I. Uhnöo, K. DeVahl, *Lancet* 1984 II, 707.
- [157] R. J. Whitley, C. A. Alford, M. S. Hirsch, R. T. Schooley, J. P. Luby, F. Y. Aoki, D. Hanley, A. J. Nahmias, S. J. Soong, *N. Engl. J. Med.* 314 (1986) 144.