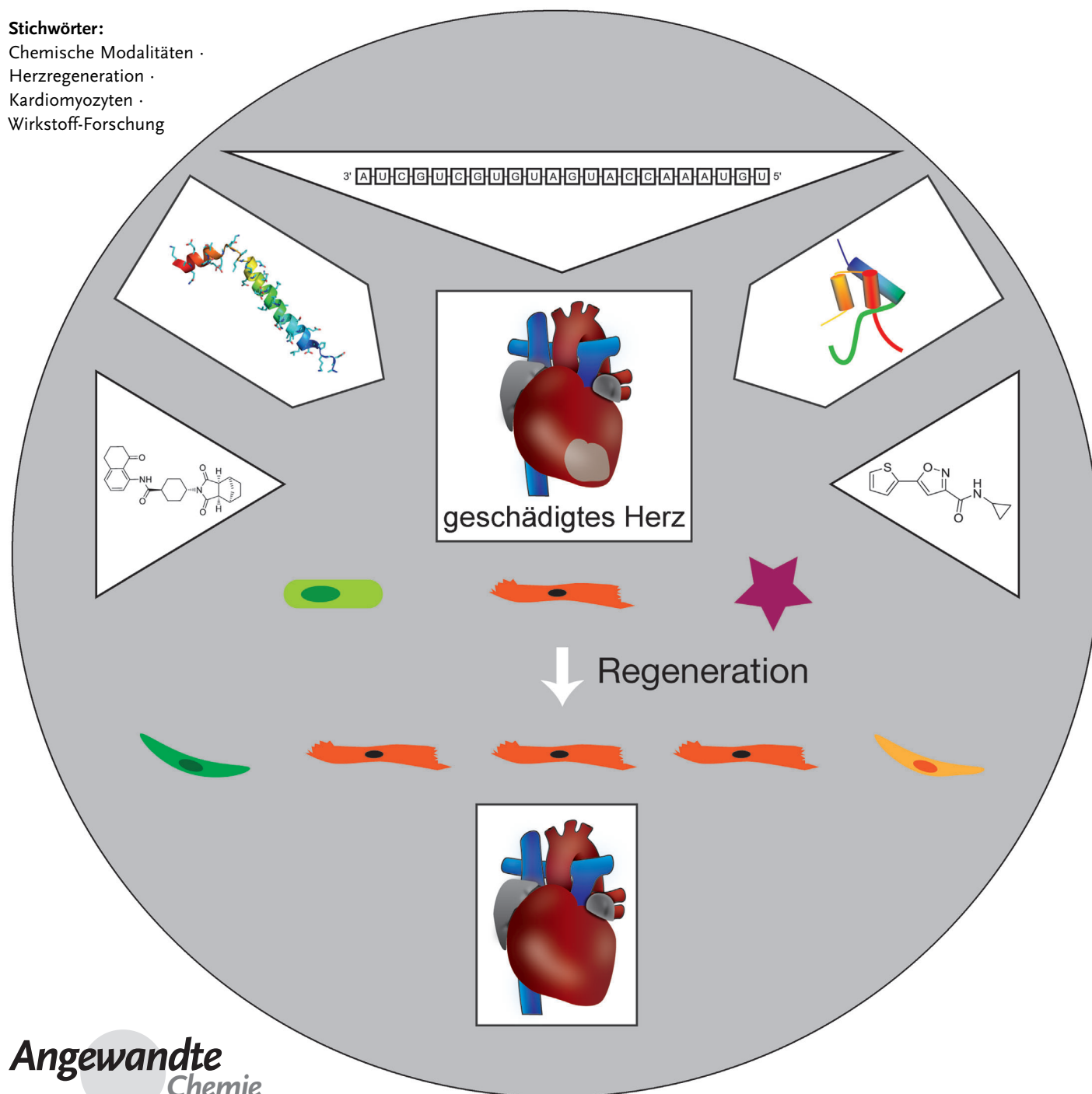


Herzregeneration: Chancen und Aufgaben für die Wirkstoff-Forschung mit neuartigen chemischen und therapeutischen Methoden oder Agentien

Alleyn T. Plowright,* Ola Engkvist, Adrian Gill, Laurent Knerr und Qing-Dong Wang

Stichwörter:

Chemische Modalitäten ·
Herzregeneration ·
Kardiomyozyten ·
Wirkstoff-Forschung



Infolge eines Herzinfarkts kann mehr als eine Milliarde Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) abgetötet werden, was zu Herzinsuffizienz und plötzlichem Tod führt. Heute konzentriert sich die Forschung in diesem Zusammenhang verstärkt auf die Regeneration von Herzgewebe durch die Differenzierung von Stammzellen, die Proliferation vorhandener Kardiomyozyten und Herzprogenitorzellen sowie die Umprogrammierung von Fibroblasten zu Kardiomyozyten. Hierfür gibt es eine Reihe möglicher Lösungsansätze, vom Einsatz niedermolekularer Verbindungen und RNA (einschließlich Mikro-RNA und Anti-Mikro-RNA) bis hin zur Verwendung modifizierter Peptide und Proteine. Wir stellen in diesem Aufsatz aktuelle Entwicklungen in diesem Bereich vor und beschreiben dabei sowohl die jeweilige Methode und ihre Fortschritte, einschließlich neuartiger Screening-Strategien zur Identifizierung von Treffern, als auch ihre Perspektiven für die Weiterentwicklung dieser Treffer hin zu Medikamenten, wobei die Chemie eine Schlüsselrolle spielt.

1. Einleitung

Herzerkrankungen führen häufig zum Absterben von Kardiomyozyten und pathologischen Veränderungen des Herzens; die Folgen können Herzinsuffizienz und ein plötzlicher Tod sein. Damit sind Herzerkrankungen eine der häufigsten Todesursachen beim Menschen weltweit.^[1] Anders als die Herzen niederer Wirbeltiere ist das adulte Säugetierherz, einschließlich des menschlichen, nur sehr eingeschränkt regenerationsfähig. Nach einem Myokardinfarkt (MI) durchläuft das verletzte Herz eine fibrotische Reparatur, bei der geschädigtes Gewebe durch Fibroblasten und extrazelluläre Matrix ersetzt wird. Dadurch bildet sich eine robuste Narbe, die zwar erhöhten Fülldrücken standhalten kann, aber nicht leitfähig ist oder sich aktiv kontrahieren kann. Die Umprogrammierung des herzeigenen Fibrosereparaturprogramms in der Weise, dass neues kontrahierbares Muskel anstelle von Narbengewebe aufgebaut wird, ist eines der wichtigsten Ziele der regenerativen Medizin. Die einzige derzeit verfügbare, kurative Behandlung der Herzinsuffizienz im Endstadium ist die Herztransplantation; wesentliche klinische Einschränkungen sind hierbei jedoch die begrenzte Verfügbarkeit von Spenderorganen und die Immunabstoßung nach der Transplantation. Stammzellenbasierte Ansätze für regenerative Therapien sind auf mehrere große Hindernisse gestoßen, wie die geringe Effizienz der Ansiedelung und Retention eingebrachter Zellen, die mögliche Immunabstoßung durch den Empfänger, das Teratomrisiko sowie die Tatsache, dass sich präklinische Tiermodelle zur Beurteilung des Anwachsens der Zellen nicht unbedingt auf den Menschen übertragen lassen.^[2]

Angesichts der Erkenntnis, dass das adulte Säugetierherz kein fertig differenziertes Organ ist,^[3] sondern dass vielmehr während des gesamten Lebens in messbaren Raten neue Kardiomyozyten erzeugt werden, könnte die Regeneration des Herzgewebes *in situ* ohne exogene Zellen eine Thera-

pielösung bieten.^[4] Zum Erzeugen neuer Kardiomyozyten gibt es unterschiedliche Forschungsansätze, darunter die Einleitung der Mitose in bereits vorhandenen Kardiomyozyten,^[5] die Proliferation entdifferenzierter Kardiomyozyten,^[6] die Proliferation und Differenzierung von Herzstamm- und -Herzprogenitorzellen^[7] und die Umprogrammierung von Herzfibroblasten in Kardiomyozyten (Abbildung 1).^[8,9] Die Forschung in diesen Bereichen folgt unterschiedlichen Strategien, einschließlich der Nutzung eines breiten Spektrums chemischer Modalitäten (der Begriff „chemische Modalitäten“ wird in diesem Aufsatz im Sinne von „chemische Methoden oder Agentien“ verwendet). Diese Strategien könnten Mutationen und Immunabstoßungen vermeiden oder wenigstens minimieren, und außerdem könnten so ethische Fragen im Zusammenhang mit stammzellenbasierten Therapien umgangen werden. Zusätzlich können durch ein besseres Verständnis der unzähligen Signale, die die Replikation und Differenzierung verschiedener Herzzellen regulieren, Mechanismen aufgedeckt werden, die es dem adulten Herzen ermöglichen, nach einer Verletzung Muskelzellen zu ersetzen; letzten Endes könnten damit Strategien zur Entdeckung regenerativer Therapien gefunden werden.^[10] Eine Vielzahl chemischer Modalitäten – von RNA-basierten Lösungsansätzen wie Anti-Mikro-RNA (antimiR)-Oligonukleotiden bis

Aus dem Inhalt

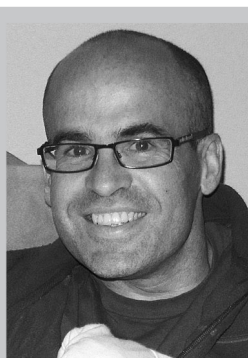
1. Einleitung	4139
2. Möglichkeiten beim Einsatz unterschiedlicher Modalitäten	4141
3. Hürden in der Wirkstoff-Forschung	4154
4. Schlussfolgerungen und Ausblick	4156

[*] Dr. A. T. Plowright, Dr. A. Gill, Dr. L. Knerr
Department of Medicinal Chemistry, Cardiovascular and Metabolic Diseases Innovative Medicines
AstraZeneca, Pepparedsleden 1, Mölndal, 43183 (Schweden)
E-Mail: alleyn.plowright@astrazeneca.com
Dr. O. Engkvist
Computational Chemistry, Discovery Sciences
AstraZeneca, Mölndal (Schweden)
Dr. Q.-D. Wang
Department of Bioscience, Cardiovascular and Metabolic Diseases Innovative Medicines
AstraZeneca, Mölndal (Schweden)

hin zu Peptiden, Proteinen und niedermolekularen Verbindungen – ist im Prinzip verwendbar. Dieses neue Wissensschaftsgebiet hält allerdings noch viele Hürden für die Wirkstoff-Forschung und -Entwicklung bereit, die überwunden werden müssen; hierfür sind neue Innovationen erforderlich.

Die Rolle der Chemie bei der Synthese, Modifizierung und Optimierung vielfältiger therapeutischer Modalitäten (d. h. therapeutischer Methoden oder Agentien) wurde in den letzten Jahren immer mehr erweitert, indem neue chemische Methoden entwickelt wurden, um auch schwierige und neue Zielklassen angehen zu können. Die medizinische Chemie ist bei der Identifizierung niedermolekularer Verbindungen für die Behandlung von Erkrankungen beim Menschen fest etabliert, und die Verwendung von niedermolekularen Verbindungen in der regenerativen Medizin hat in den letzten Jahren großes Interesse geweckt.^[11] Auch größere Moleküle, wie Peptide, anti-miRs und Proteine, werden derzeit für die Be-

handlung degenerativer Erkrankungen und Organschäden (einschließlich Herzregeneration) untersucht.^[12] Jede Modalität hat ihre Stärken und Schwächen und wird auf einzigartige Herausforderungen stoßen. Es werden allerdings neuartige Möglichkeiten geschaffen werden, um chemische Methoden in unterschiedlichsten Zusammenhängen über die herkömmlichen Grenzen zwischen nieder- und makromolekularen Verbindungen hinweg nutzen zu können. Die Chemie spielt heute eine Schlüsselrolle bei der Modifizierung größerer Moleküle; sie liefert Verbindungen mit optimalen Absorptions-, Distributions-, Stoffwechsel- und Ausscheidungseigenschaften (absorption, distribution, metabolism, and excretion; ADME) sowie Wirksamkeits- und -sicherheitsprofilen, um den Anforderungen neuartiger Behandlungsmethoden gerecht zu werden. Ebenso hilft sie bei der Aufklärung von Wirkmechanismen. Nicht zu vernachlässigen ist auch die Rolle der Chemie im Rahmen der Biotechnologie bei der



Alleyn Plowright promovierte 1999 in organischer Chemie bei Prof. G. Pattenden an der University of Nottingham und absolvierte danach ein Postdoktorat bei Prof. A. Myers an der Harvard University. 2002 ging er als Medizinalchemiker zu AstraZeneca nach Großbritannien. 2006 wechselte er zu AstraZeneca, Schweden, und wurde dort 2012 Senior Principal Scientist für medizinische Chemie im Bereich Cardiovascular und Metabolic Diseases Innovative Medicines. Sein Forschungsinteresse gilt der Entwicklung von Wirkstoffen für kardiovaskuläre und Stoffwechselerkrankungen.



Laurent Knerr promovierte 1998 in organischer Chemie in der Gruppe von Prof. G. Ourisson unter der Anleitung von Dr. B. Luu an der University Louis Pasteur in Straßburg. Nach seinem Postdoktorat bei Prof. R. R. Schmidt an der Universität Konstanz ging er 2000 zu UCB Pharma in Braine l'Alleud (Belgien) als Abteilungsleiter in der Parallelsynthese- und Automatisierungsgruppe. 2004 wechselte er zur Abteilung für Medizinische Chemie von AstraZeneca (Schweden), wo er nun Principal Scientist im Bereich Cardiovascular und Metabolic Diseases Innovative Medicines ist.



Ola Engkvist promovierte 1997 in computer-gestützter Chemie an der University of Lund und war anschließend Postdoktorand an der University of Cambridge und der Czech Academy of Sciences. Zwischen 2000 und 2004 arbeitete er bei zwei Biotechnologieunternehmen, bevor er gegen Ende 2004 zu AstraZeneca nach Schweden ging. Er ist derzeit Abteilungsleiter in der Computerchemie innerhalb des Bereichs Discovery Sciences am Chemistry Innovation Centre. Sein Forschungsinteresse gilt der Chemieinformatik, dem Molecular Modeling, dem Phänotyp-Screening, der Dekonvolution von Strukturen und der offenen Innovation.



Qing-Dong Wang studierte Medizin und begann seine wissenschaftliche Laufbahn in der Kardiologie an der Shandong Medical University. Er promovierte 1996 in Kardiologie bei Prof. J. Pernow am Karolinska Institut. 1997 ging er als kardiovaskulärer Pharmakologe zu AstraZeneca nach Schweden. Sein Forschungsinteresse gilt der Pharmakologie sowie der Stammzell- und Wirkstoff-Forschung. Er initiierte das Herzregenerationsprogramm bei AstraZeneca und leitet derzeit das Team für Bioscience Regenerative Medicine Innovation, das nach neuartigen Molekülen für die Therapie der Herzinsuffizienz forscht.



Adrian Gill promovierte 1997 in organischer Chemie bei Prof. P. J. Parsons an der University of Sussex. Er arbeitete für einige Biotechnologie- und Pharmaunternehmen als Medizinalchemiker, darunter bei Roche Discovery UK als Abteilungsleiter, bei Astex Pharmaceuticals als Associate Director und aktuell bei AstraZeneca in Schweden, wo er Leiter der Abteilung Medizinische Chemie im Bereich Cardiovascular und Metabolic Diseases Innovative Medicines ist.

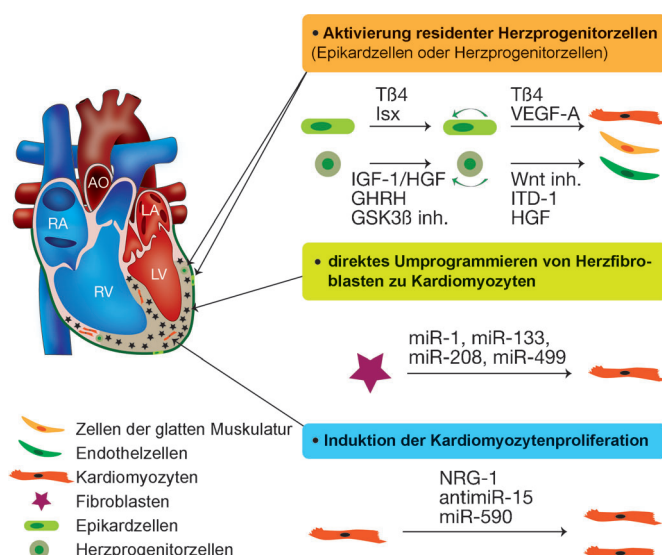


Abbildung 1. Forschungsschwerpunkte für die Erzeugung neuer Kardiomyozyten. AO = Aorta, inh. = Inhibitor, LA = linker Vorhof, LV = linker Ventrikel, RA = rechter Vorhof, RV = rechter Ventrikel.

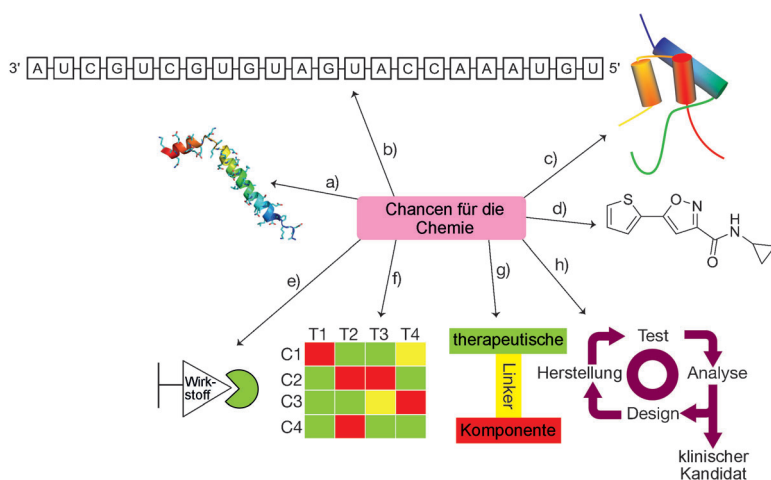


Abbildung 2. Chemische Ansätze für die Herzregeneration. Bandbreite der therapeutischen Modalitäten: a) Peptide, b) anti-miRs, c) Proteine, d) niedermolekulare Verbindungen).^[13] Erforderliche Techniken: e) Dekonvolution von Zielstrukturen, f) Polypharmakologie, g) Linker- und Konjugatchemie (wobei „Komponente“ ein therapeutischer, zielgerichteter oder stabilisierender Wirkstoff sein kann), h) Entwicklung von Treffern hin zu klinisch anwendbaren Medikamenten.

zukünftigen Anwendung von Geräten und Methoden, um eine bestimmte Verbindung in ihr Zielorgan einzubringen.

Dieser Aufsatz behandelt aktuelle Entwicklungen, die eine Vielfalt therapeutischer Modalitäten umfassen, und beschreibt jüngste Fortschritte aus der Perspektive der Wirkstoff-Forschung, einschließlich neuartiger Screening-Strategien für die Identifizierung von Treffern, ebenso wie zukünftige Herausforderungen bei der Entwicklung dieser Treffer hin zu Medikamenten für die Herzregeneration (Abbildung 2).

2. Möglichkeiten beim Einsatz unterschiedlicher Modalitäten

2.1. Niedermolekulare Verbindungen

Die Krankheitsintervention mithilfe niedermolekularer Verbindungen ist bereits seit vielen Jahren von zentraler Bedeutung in der Medizin. Die Möglichkeit, mithilfe der medizinischen Chemie eine Trefferstruktur so zu modifizieren, dass all ihre Eigenschaften verbessert werden (z.B. Wirksamkeit gegen das gewünschte Ziel, geeignete Dosierung und Verabreichbarkeit, Verringerung von Nebenwirkungen, Verbesserung von In-vivo-Sicherheitsprofilen sowie hoher Wirkungsgrad), hat Medikamente für vielfältige Indikationen hervorgebracht.^[14] Die Entwicklung niedermolekularer Therapeutika für die Regeneration oder Reparatur beschädigten Herzwesens befindet sich in einem vergleichsweise frühen Stadium.^[15] Bis jetzt wurde nur von einigen wenigen chemischen Mediatoren der Kardiogenese berichtet, und die Möglichkeiten zur Manipulation der entscheidenden Signalübertragungsmechanismen, die mit niedermolekularen Verbindungen zusammenhängen, dürften stark variieren (Abbildung 3).^[16]

Niedermolekulare Verbindungen ermöglichen es, die einer Krankheit zugrundeliegenden biologischen Vorgänge unter Verwendung fortgeschrittener Hilfsverbindungen zu erforschen und Therapien zu entwickeln.^[17] Sie haben den Vorteil, biologische Systeme durch spezifische oder multiple Wirkungen auf eine Zelle zeitlich zu modulieren, was eine flexible Regulierung komplexer Signalnetzwerke ermöglicht; darüber hinaus kann ihre Konzentration je nach Art der Verabreichung (z.B. orale Verabreichung) variiert werden, um eine optimale Wirkung zu erzielen. Dem Arzt ist es so z.B. möglich, die Dosierung zu kontrollieren, um eine gute Balance zwischen Wirksamkeit und Sicherheitsbedenken einzustellen. Zusätzlich sind niedermolekulare Verbindungen häufig relativ einfach und preiswert zu synthetisieren und zu lagern.

Es ist sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, Hilfsverbindungen mit absoluter Selektivität zu entwickeln, und verschriebene Medikamente zeigen nur selten absolute Selektivität.^[18] Um große Veränderungen in biologischen Systemen zu bewirken, z.B. die Induktion der Zelldifferenzierung oder die Umprogrammierung von Zellen, kann es von Vorteil sein, weniger selektiv zu sein und mehrere Ziele zu adressieren, um verschiedene Signalwege gleichzeitig zu modulieren. Dementsprechend erfordert die Entwicklung einer Therapie möglicherweise weniger Selektivität für die verschiedenen Ziele, die für die Wirksamkeit erforderlich sind.^[19] Allerdings kann ein Mangel an Selektivität die Verwendung einer Verbindung als Hilfsmittel zur Erforschung der biologischen Grundlagen behindern, da man in diesem Fall nur schwer Rückschlüsse bezüglich der Auswirkungen auf einen spezifischen Signalweg ziehen kann.^[17]

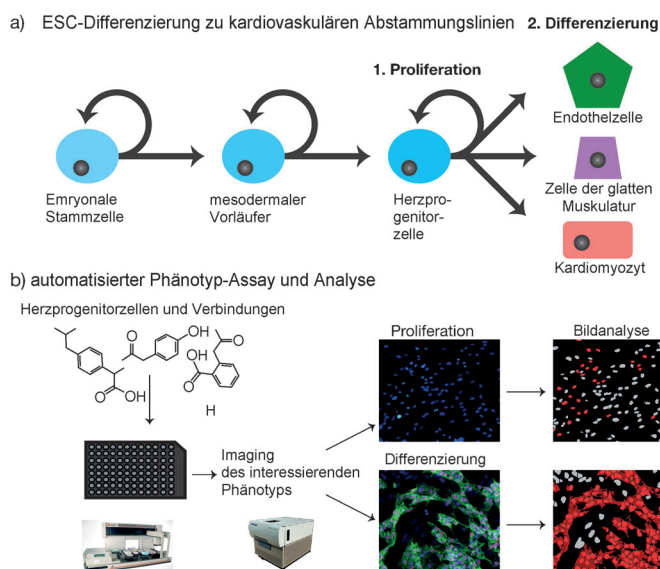


Abbildung 3. a) Selbsterneuerung und Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESCs) in Kardiomyozyten, Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur über intermediäre mesodermale Vorläufer- und Progenitorzellen. b) High-Content-Screening-Assay: Zellen sind vor dem Hinzufügen der Verbindung im 384- oder 96-Loch-Format ausplattiert. Die Immunzytochemie für interessierende Marker wird mit Automatisierung und nachfolgender Bildgebung durchgeführt, und die Analyse erfolgt auf plattenbasierten Bildgebungssystemen. Auf den gezeigten Bildern sind Proliferation (Ki67-Färbung) und Kardiomyozyten-differenzierung (Troponin-T-Färbung) von Herzprogenitorzellen zu sehen.

Es gibt mehrere Ansätze, niedermolekulare Verbindungen für die Modulation komplexer biologischer Systeme im Zusammenhang mit der Herzregeneration zu nutzen; sie reichen von der Untersuchung eines bereits gut etablierten Ziels bis hin zu einem Diversitäts-Screening zur Identifizierung völlig neuer Moleküle und/oder Ziele. Dazu gehören:

- 1) Nutzung bekannter Zielstrukturen. Die wesentlichen Ziele sind hier das bessere Verständnis der Zielstruktur im gegebenen Zusammenhang unter Einsatz von Hilfsverbindungen oder der Beginn einer Zielstruktur-basierten Wirkstoff-Forschungskampagne zur Identifizierung neuer Modulatoren. Wenn ein komplexer biologischer Assay verwendet wird, ist es unabdingbar, das Selektivitätsprofil der Verbindung zu kennen. Es gibt Fälle, in denen angenommen wurde, dass bestimmte Verbindungen selektiv seien, die dann aber in der Praxis tatsächlich mehr als eine Zielstruktur modulierten. Ein Beispiel dafür ist Telmisartan, das nicht nur ein Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonist ist, sondern auch PPAR γ moduliert.^[20]
- 2) Nutzung eines bekannten Signalweges. Das Hauptziel kann entweder die Identifizierung neuartiger Verbindungen sein, um die relevanten biologischen Abläufe zu erforschen, ohne dabei die spezifische Zielstruktur aufzuklären, oder aber die Dekonvolution der Zielstruktur selbst, die für die biologische Wirkung verantwortlich ist.^[21] Diese Vorgehensweise unterscheidet sich vom häufigeren Phänotyp-Screening darin, dass die Daten aus dem Assay an den Signalweg gekoppelt sind, was den Vorteil

hat, dass ein Assay mit höherem Durchsatz entwickelt werden kann.

- 3) Durchführen eines unverfälschten Phänotyp-Screenings.^[22] Das Screening kann mit einem Satz Hilfsverbindungen mit bekannten Zielstrukturen oder mit einem Diversity-Set durchgeführt werden. Es können Assays verwendet werden, die die biologischen Vorgaben exakt imitieren und eine Vielzahl relevanter Endpunkte bieten (Abbildung 3b).^[23] Das Screening von Hilfsverbindungen bietet eine kostengünstige Methode zur Identifizierung von Zielstrukturen, da weniger Verbindungen durchmustert werden müssen. Hochwertige Hilfsverbindungen gibt es – abhängig von den aufgestellten Kriterien, z.B. Medikament auf dem Markt – nur für einige hundert Zielstrukturen.^[24] Da die potenziellen Zielstrukturen zumindest teilweise bekannt sind, können die Ergebnisse durch Validierung der Zielstrukturen mithilfe von beispielsweise siRNA-Knockdown nachverfolgt werden. Der Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass sich die Chancen für eine Entdeckung neuartiger Zielstrukturen verringern. Zur Erhöhung der Chancen kann ein Diversitäts-Screening mit nachfolgender medizinisch-chemischer Optimierung und Dekonvolution der Zielstrukturen durchgeführt werden. Ein Diversitäts-Screening sollte umfangreich sein, um einen sinnvollen Teil des chemischen Raums abzudecken. Die Trefferverbindungen sollten anschließend optimiert werden, um eine bestimmte erwünschte Wirkung im phänotypischen Assay zu erreichen. Es stehen keine Strukturinformationen als Leitfaden für das Design zur Verfügung, und die Auswirkungen auf den Phänotyp können durch die Modulation mehrerer Zielstrukturen verursacht sein. Daher sind die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs) möglicherweise schwieriger zu interpretieren, und die Optimierung kann anspruchsvoll sein. Die optimierte Verbindung könnte im Anschluss direkt verwendet werden, oder es könnte eine Strategie zur Dekonvolution der Zielstruktur verfolgt werden. Es gibt mehrere Methoden zur Dekonvolution einer Zielstruktur, darunter chemische Proteomik, siRNA und In-vitro-Panel-Screenings, und diese wurden in jüngster Zeit sorgfältig getestet.^[25] Jedes Verfahren hat seine Vor- und Nachteile. So war beispielsweise die chemische Proteomik bei der Identifizierung löslicher Enzyme deutlich erfolgreicher als membrangebundene Rezeptoren.

Dieser Abschnitt enthält einen Überblick über die neuesten Publikationen zum Screening niedermolekularer Verbindungen.

Der kanonische Wnt-Signalweg ist ein Schlüsselregulator der Kardiomyozytendifferenzierung und -proliferation (Abbildung 4).^[26] Eine Reihe von Studien nutzte niedermolekulare Modulatoren des Wnt-Signalwegs^[27] zur Steuerung der Kardiomyozytendifferenzierung ausgehend von embryonalen Stammzellen (ESCs). Dabei war der Zeitpunkt der Behandlung mit der Verbindung äußerst wichtig, um die gewünschte Wirkung zu erzielen.^[28] Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs ist in den frühen Stadien der Differenzierung sowohl menschlicher ESCs (hESCs) als auch menschlicher induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) zu frühen

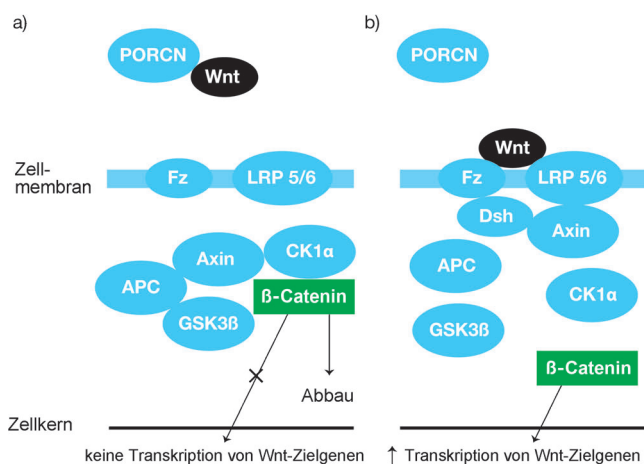


Abbildung 4. Vereinfachter Überblick über den kanonischen Wnt-Signalweg. a) In Abwesenheit des Wnt-Liganden interagiert β -Catenin im Zytoplasma mit einem Komplex aus APC- und Axin-Gerüstproteinen sowie den Kinasen CK1 und GSK3 β , was zur Phosphorylierung und zum Abbau von β -Catenin führt. b) Die Bindung des Wnt-Liganden an einen Frizzled-Rezeptor und einen LRP-5/6-Corezeptor hemmt den APC/Axin/CK1/GSK3 β -Komplex, und β -Catenin tritt in den Zellkern ein und reguliert die Zielgene.

Mesodermzellen erforderlich, wogegen in den späteren Stadien der Differenzierung zu Kardiomyozyten eine Unterdrückung des Signalwegs nötig ist.^[28,29] Zwar ist es unwahrscheinlich, dass diese Verbindungen bei der Regeneration des geschädigten menschlichen Herzens helfen, da sie auf die frühen Phasen der Differenzierung zielen, aber sie sind sehr hilfreich dabei, Kardiomyozyten zu generieren, die zugrundeliegenden biologischen Abläufe zu verstehen und den Eingriff in den Signalweg zeitlich abzustimmen. Wichtige aktuelle Studien sind in den folgenden Absätzen zusammengefasst.

Willems et al. entwickelten ein High-Content-Screening (HCS) unter Verwendung von hESCs mit einem herzspezifischen α -Myosin-Heavy-Chain(MYH6)-mCherry-Reporter, bei dem Treffer, die eine Bildung von Kardiomyozyten fördern, die Produktion von rot fluoreszierendem Protein auslösen.^[30] Das Verfahren wurde auf eine Bibliothek von 244 Kinaseinhibitoren und 305 Signalwegsmodulatoren angewendet, und ein wirksamer Treffer, IWR-1 (**1**; Abbildung 5), ein Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs durch Stabilisierung des Axin-Komplexes infolge der direkten Interaktion mit Axin, wurde identifiziert.^[31] IWR-1 produzierte maximale kardiogene Induktion an Tag 4–5 mit einem EC₅₀-Wert im niedrigen mikromolaren Bereich. Die flusszytometrische Analyse zeigte, dass IWR-1 bis zu 30% Kardiomyozyten ergibt und die Bildung anderer mesodermaler Zelllinien nicht erhöht (Abbildung 3 a). Die Auswirkungen unterschiedlicher Inhibitionsarten auf den Wnt-Signalweg wurden mithilfe von drei unterschiedlichen Wnt-Inhibitoren untersucht: dem wirksameren IWR-Derivat 53AH (**2**),^[30] dem Porcupine-(PORCN)-Inhibitor IWP-3 (**3**)^[31a] sowie dem Tankyrase-(TNKS)-1- und TNKS-2-Inhibitor XAV939 (**4**).^[32] Alle drei förderten die Kardiomyozyteninduktion, wobei 53AH einen EC₅₀-Wert im submikromolaren Bereich aufwies. Es wurde eine SAR-Studie durchgeführt, bei der die drei Hauptregio-

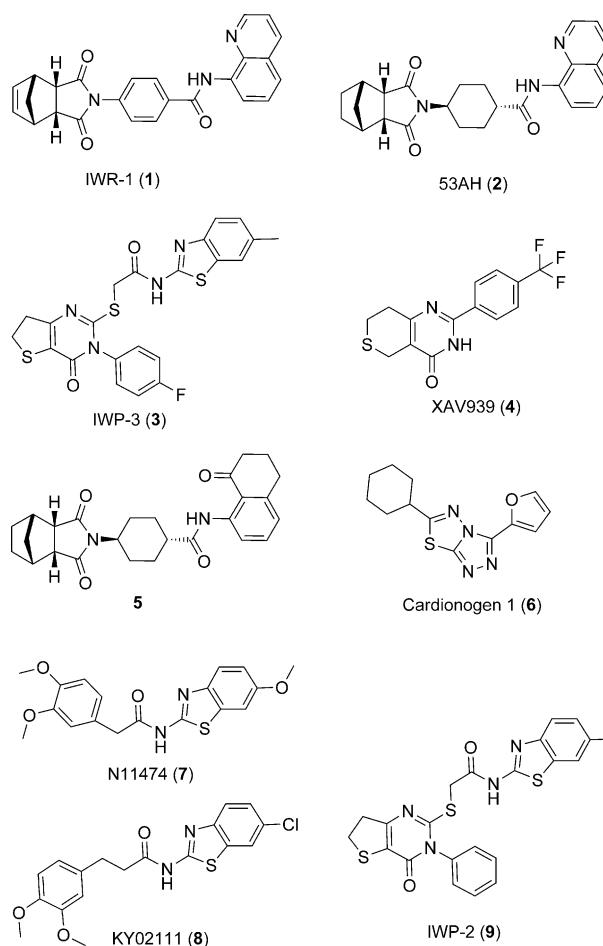


Abbildung 5. Inhibitoren des kanonischen Wnt-Signalwegs.

nen von IWR-1 modifiziert wurden; so wurde **5** erhalten, das 30-mal wirksamer war und eine größere Kardiomyozyteninduktion aufwies als IWR-1.^[33]

Für die Suche nach Induktoren der Kardiomyozytendifferenzierung entwickelten Ni et al. ein In-vivo-Phänotyp-Screening basierend auf der Verwendung transgener Zebrafischembryonen.^[34] Der Screening-Endpunkt war die Expression von enhanced GFP (EGFP; GFP = grün fluoreszierendes Protein), das vom Kardiomyozytendifferenzierungsmarker des Spätstadiums kontrolliert wird, dem „cardiac myosin light chain 2“ (cmlc2)-Promotor. Verbindungen wurden dosiert verabreicht (5 μ M), und Herzgröße, -morphologie und -kontraktilität wurden überwacht; zugleich wurden die Organe auf Anzeichen von Verbindungsselektivität und -toxizität geprüft. Es wurde ein Satz von 4000 Verbindungen durchmustert, von denen 17 Verbindungen identifiziert wurden, die eine Herzvergrößerung induzierten. Davon wurden Cardionogen 1 (**6**), **2** und **3**, die ein [1,2,4]Triazolo[3,4-*b*][1,3,4]thiadiazol-Gerüst aufweisen, weiter charakterisiert. **6** zeigte ein biphasisches Aktivitätsmuster: Es hemmte die Kardiomyozytenbildung, wenn die Behandlung vor der Gastrulation stattfand, und induzierte die Bildung bei Verabreichung während oder nach der Gastrulation. Es wurde nachgewiesen, dass Cardionogene Herzhyperplasie nicht durch Kardiomyozytenproliferation, sondern

durch Vergrößerung der Progenitorzellpopulation induzieren. Die Ergebnisse konnten auch auf Maus-ESCs übertragen werden, wo die ESC-Differenzierung zu Kardiomyozyten gefördert wurde. Auch wenn das genaue Ziel nicht identifiziert wurde, haben mechanistische Studien doch gezeigt, dass Cardionogen 1 als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalwegs wirkt. Interessanterweise wurde aufgezeigt, dass IWR-1 antagonistische Wirkung auf das Wnt-Signal in verschiedenen Zelllinien (ESC und HEK) hat, während Cardionogen 1 sich als für ESCs selektiv herausgestellt hat. Dieser Befund lässt auf die Möglichkeit einer zelltyp-/gewebespezifischen Inhibition durch Cardionogen 1 schließen.

Jüngst entwickelten Minami et al. ein HCS unter Verwendung von Affen-ESCs, bei dem EGFP unter der Kontrolle des Promotors für menschliches MYH6 exprimiert wurde.^[35] Die Behandlung mit einer Bibliothek von 9600 Verbindungen (1–5 μM) über 8 Tage (Tage 6–14) identifizierte das Molekül N11474 (**7**), das zu einer kardialen Differenzierung führte. Wie zuvor bereits beobachtet war der Zeitpunkt für die Verabreichung von N11474 wichtig; optimale Ergebnisse wurden bei Behandlung an den Tagen 4–8 erhalten. Eine Synthesekampagne führte zu KY02111 (**8**) mit einem 6-Chlorsubstituenten am Benzothiazolring und einem Ethylen-Linker in der Acylseitenkette. KY02111 förderte die kardiale Differenzierung ca. 7-mal wirksamer als N11474. Eine umfassende Charakterisierung ließ darauf schließen, dass die Mehrzahl der Kardiomyozyten aus funktionell vollentwickelten, ventrikulären Kardiomyozyten bestand, deren Expression von Herzmarkern und Ionenkanälen der des vollentwickelten Herzwes ähnlich ist. Studien zum Wirkungsmechanismus von KY02111 mithilfe von Genexpressions-Profilen zeigten Profile ähnlich denen der bekannten Inhibitoren XAV939 und IWP-2 (**9**).^[31a] Weitere Studien ergaben, dass KY02111 anders als IWP-2 und XAV939 agiert (wahrscheinlich APC und Glycogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β) nachgeordnet) und wirksamer ist.

In einem Bericht von 2011 konzentrierten sich Wang et al. auf den TNKS-1- und TNKS-2-Inhibitor, XAV939, und entwickelten ein robustes Verfahren zur kardialen Differenzierung von Maus-ESCs.^[32] Die zeitliche Abstimmung der XAV939-Behandlung ab Tag 3–5 der Differenzierung führte zu mehr als 95 % Embryonenkörpern mit spontanem Herzschlag an Tag 10. Maus-ESCs, die das nukleäre, rot fluoreszierende Protein unter der Kontrolle des α -Myosin-Heavy-Chain(MHC)-Promotors exprimierten, wurden XAV939 ausgesetzt und zeigten eine 30-fache Erhöhung der relativen Häufigkeit von Kardiomyozyten sowie signifikant gesenkte mRNA-Expressionswerte diverser Mesoderm-abgeleiteter hämatopoetischer, endothelialer und glatter Muskelzellenmarker auf. Zudem hatte XAV939 keine Auswirkungen auf Ektoderm- und Endodermzellmarker. Diese Befunde zeigten, dass XAV939 die kardiale Differenzierung auf Kosten von Zellen anderer mesodermaler Zelllinien induziert.

Wie oben erwähnt, ist statt einer Inhibition eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in den frühen Stadien der Differenzierung menschlicher ESCs (hESCs) wie auch menschlicher induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) zu frühen Mesodermzellen erforderlich.^[28,29,36] Dies wurde beispielsweise unter Verwendung von CHIR99021 (**10**;

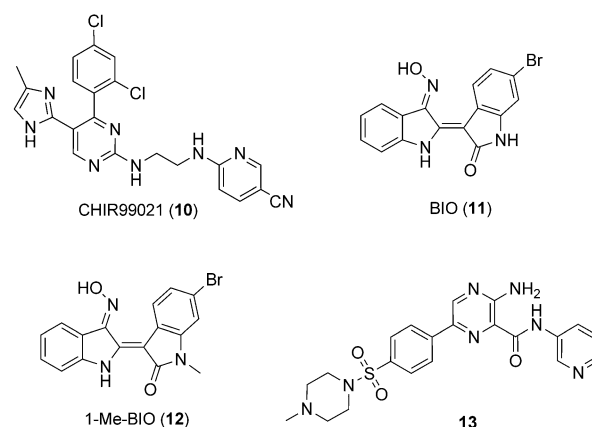


Abbildung 6. GSK3 β -Inhibitoren und das inaktive Analogon 1-Me-BIO.

Abbildung 6) erreicht,^[36b] das GSK3 β hemmt, was zu einer Ansammlung von β -Catenin im Zellkern und zur Aktivierung der Gentranskription führt. Tseng et al. demonstrierten, dass 6-Bromindirubin-3-oxim (BIO, **11**), ein weiterer Inhibitor von GSK3 β , ebenfalls die Proliferation von Kardiomyozyten in neugeborenen und adulten Ratten stimuliert.^[37] Exposition von Kardiomyozyten von Neugeborenen gegenüber BIO (5 μM) über 48 h verstärkte den Einbau von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), einem Uridinanalogen, das in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird, um das Zehnfache. BIO war bei 1 μM , nicht aber bei 0.1 μM aktiv. Ein enges Analogon, 1-Me-BIO (**12**), das inaktiv bezüglich GSK3 β ist, konnte den BrdU-Einbau nicht fördern, was auf eine Rolle für die GSK3 β -Inhibition beim Eintritt von Kardiomyozyten von Neugeborenen in den Zellzyklus schließen lässt. Folgestudien ergaben, dass eine BIO-Behandlung die Spiegel positiver Zellzyklusregulatoren (Cyclin D1, Cyclin A) erhöht und den Spiegel eines negativen Effektors (CDK-Inhibitor p27) senkt, ein Hinweis darauf, dass Zellen in die Mitose eintreten und eine Zytokinese durchlaufen. Die Fähigkeit von BIO, die Zellzyklusprogression in adulten Kardiomyozyten einzuleiten, wurde im Anschluss durch den Einbau von BrdU und die Tatsache, dass Zellen in die Mitose eintraten, bestätigt. Unter Verwendung von hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten haben wir jüngst aufgezeigt, dass BIO und ein weiterer GSK3 β -Inhibitor (**13**; Abbildung 6)^[38] den Einbau von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU), einem weiteren Marker der DNA-Synthese (Abbildung 7), verstärkte, was darauf schließen lässt, dass GSK3 β -Inhibition ebenfalls den Zellzykluseintritt in menschlichen Kardiomyozyten fördert (unveröffentlichte Arbeit).

Wie erwähnt ist der kanonische Wnt-Signalweg ein Schlüsselregulator der Kardiomyozytendifferenzierung und -proliferation, wobei bisher Verbindungen entdeckt worden sind, die entweder antagonistisch auf den Signalweg wirken oder ihn stimulieren (Abbildung 8). Andere Signalwege spielen jedoch ebenfalls eine wichtige Rolle. Willems et al. verwendeten ein Maus-ESC-HCS, um Verbindungen zu identifizieren, die dazu in der Lage waren, nicht ausdifferenziertes Mesoderm in Kardiomyozyten umzuwandeln.^[39] Das Screening einer Substanzbibliothek hoher Diversität mit 17000 Einträgen zwischen den Tagen 2 und 6 der Differen-

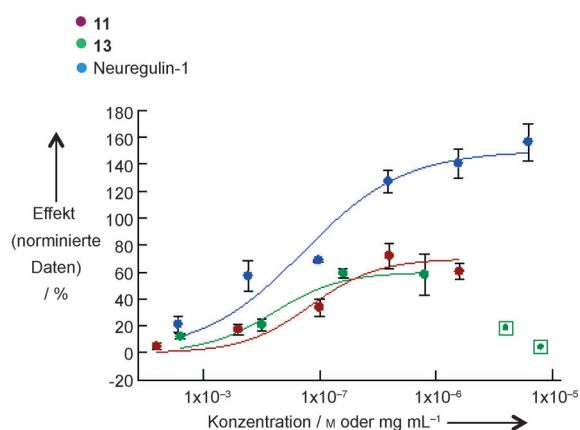


Abbildung 7. Auswirkung der GSK3 β -Inhibitoren BIO (11) und 13 und von Neuregulin-1 auf die Proliferation menschlicher, von induzierten pluripotenten Stammzellen abgeleiteter Kardiomyozyten. Die Einheit der Konzentration ist M für 11 und 13 und mg mL⁻¹ für Neuregulin-1. Die y-Achse repräsentiert die Wirkung in % relativ zum positiven Kontrollmedium. Bei den zwei höchsten Konzentrationen zeigt 13 Toxizität.

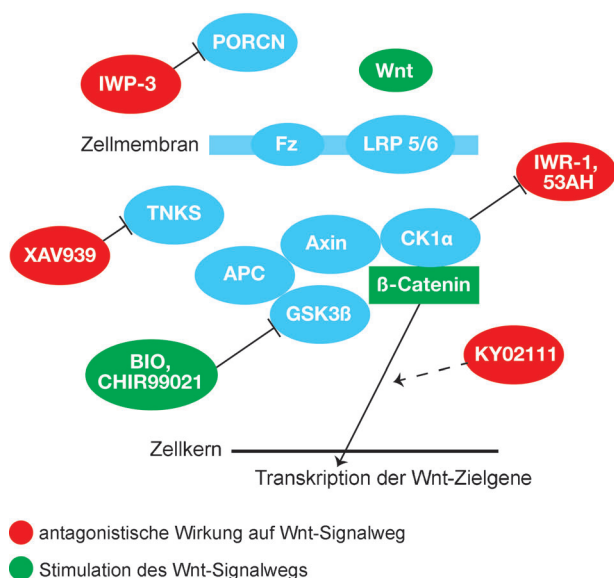


Abbildung 8. Modulation des kanonischen Wnt-Signalweges durch niedermolekulare Verbindungen.

zierung identifizierte als Treffer das 1,4-Dihydropyridinderivat ITD-1 (14; Abbildung 9). Verabreichen von ITD-1 förderte die Kardiogenese ab den Tagen 3–5, hob sie dagegen bei früherer Gabe völlig auf. Die Untersuchung des Wirkungsmechanismus von ITD-1 nutzte mehrere Tyrosinkinase-Inhibitoren und zeigte auf, dass ein Blockieren der Transformationswachstumsfaktor- β (TGF- β)-Signalgebung die Kardiogenese signifikant hochregulierte. Zusätzlich war die Inhibitionsaktivität von ITD-1 unabhängig von Toxizität, Blockierung des Calciumkanals und anderen entwicklungsphysiologischen Signalwegen wie Wnt und BMP. Die Synthese von 200 Analoga von ITD-1 ermöglichte die Identifizierung von Verbindungen aus derselben Serie mit höherer

Selektivität.^[40] Umfassende Studien zur Art der Wirkung von ITD-1 auf den TGF- β -Weg zeigten, dass ein Proteasom-vermittelter Abbau des TGF- β -Typ-II-Rezeptors auf der Zelloberfläche über einen Ubiquitin-unabhängigen Mechanismus induziert wurde. Diese Studie hob eine interessante und unerwartete Doppelrolle des TGF- β -Signalwegs bei der kardialen Differenzierung hervor, der zuerst die Mesodermbildung fördert und danach die Kardiomyozytenbildung inhibiert.

Choi et al. beschrieben die Verwendung eines transgenen Systems zur Visualisierung der Kardiomyozytenproliferation in Zebrafischembryonen.^[41] Das auf einem fluoreszierenden, Ubiquitinierungs-basierten Zellzyklusindikator (FUCCI) beruhende System wurde angepasst, indem ein fluoreszierendes Protein (Venus) verwendet wurde, das mit einem Regulator des Zellzyklus (hGeminin) verknüpft war, der nach dem cmlc2-Promotor exprimiert wurde.^[42] Dieses System ermöglichte die empfindliche Identifizierung von Kardiomyozyten in verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Die transgenen Embryonen wurden gegen einen Satz von Modulatoren entwicklungsphysiologischer Signalwege drei Tage nach der Fertilisation durchmustert, da kardiales Wachstum in diesem Stadium über Kardiomyozytenproliferation stattfindet. Eine Überprüfung der Embryonen am vierten Tag nach der Fertilisation ergab, dass Verbindungen, die auf die Hedgehog(Hh)-, Insulinartiger-Wachstumsfaktor(IGF)- und TGF- β -Signalwege abzielen, sich alle auf die Kardiomyozytenproliferation auswirkten. Ein Einfluss des Hh-Signalwegs wurde mit dem Smoothened-Agonisten (SAG, 15; 5 μ M) nachgewiesen,^[43] der einen 60-prozentigen Anstieg der Zahl proliferierender Kardiomyozyten bewirkte. Die Behandlung mit dem IGF-Agonisten NBI-31772 (16; 2.5 μ M) verstärkte die Proliferation um 41%.^[44] Der TGF- β -Signalweg wurde mit dem TGF- β -Rezeptorantagonisten SB-431542 (17; 5 μ M) untersucht, einem Inhibitor des TGF- β /Activin-Signalweges,^[45] der die Kardiomyozytenproliferation verringerte (30%). Um die Auswirkungen auf die regenerative Kapazität des Herzens nach einer Ventrikelresektion oder nach genetischer Ablation von Kardiomyozyten beurteilen zu können, wurden adulte Zebrafische sechs Tage nach Verletzung mit SAG (2.5 μ M) und NBI-31772 (10 μ M) behandelt. Diese Behandlung stimulierte die Kardiomyozytenproliferation (65%), was darauf schließen lässt, dass eine antagonistische Wirkung auf die Hh- und IGF-Signalwege die Kardiomyozytenproliferation beim verletzten adulten Herzen fördern könnte. Diese Befunde verdeutlichen, dass das beschriebene chemische Screening von Embryonen nützlich für die Entdeckung von Induktoren der Kardiomyozytenproliferation bei verletzten adulten Zebrafischen war.

Eine neuartige Reihe von β -Turn-Peptidmimetika mit kardiogenen Eigenschaften wurde von Oh et al. identifiziert.^[46] Dabei wurde ein Reporter-Gen-Assay in Maus-ESCs basierend auf der Expression von EGFP-1 unter der Kontrolle der Promotorregion von α -MHC verwendet. Es wurden 200 Verbindungen (10 μ M) über fünf Tage durchmustert, und acht ergaben eine mehr als doppelte Erhöhung der Zahl fluoreszierender Zellen. Im Anschluss wurden in Dosis-Wirkungs-Experimenten drei aktive Verbindungen bestätigt. CW209E (18), ein 6,6-bicyclisches β -Turn-Mimetikum, ist ein

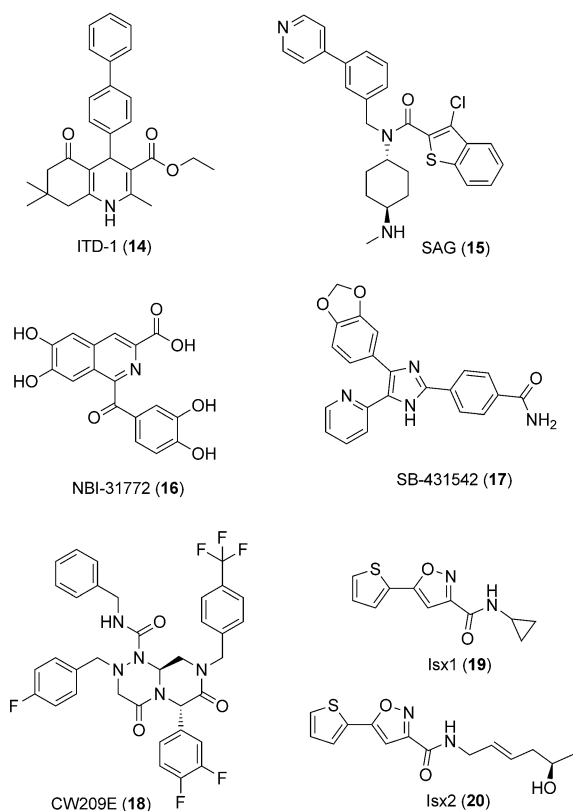


Abbildung 9. Niedermolekulare Verbindungen, die sich auf die Differenzierung und Proliferation von Kardiomyozyten auswirken.

eigenständiger Typ von Kardiomyogenese-induzierendem Molekül. Das Screening strukturell nah verwandter Verbindungen bestätigte, dass dieses Gerüst die Basis einer Trefferserie bildete, und die Aktivität von CW209E ließ sich auch auf menschliche Zelllinien übertragen. In dieser Studie wurde ein originärer Chemotyp für die Induktion der Kardiomyogenese entdeckt, der an der Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein könnte.

In einem frühen Bericht erstellten Sadek et al. einen Hochdurchsatz-Screening (HTS)-Assay unter Verwendung eines Reporter-Luciferase-Gens, das in den Nkx2.5-Lokus gentechnisch hergestellter P19CL6-PSCs eingefügt wurde.^[47] Die Wahl von Nkx2.5 als Marker steht im Gegensatz zu häufig verwendeten Differenzierungsmarkern späterer Stadien (z.B. α -MHC) und stellt eine alternative Screening-Strategie dar. Es wurde eine Bibliothek mit 147000 Substanzen durchmustert, was zur Entdeckung einer Reihe interessanter Serien von Verbindungen führte, einschließlich einer Serie von 3,5-disubstituierten Isoxazolen (Isx).^[13d]

Isx1 (19), ein Cyclopropylamidderivat, wurde für eine In-vivo-Charakterisierung ausgewählt und unter Verwendung von Nkx2.5-luc-BAC-transgenen Reportermäusen beurteilt, tierischen Gegenstücken zu den im Original-HTS verwendeten Zellen. Eine tägliche Verabreichung (Einmaldosis von 16 mg kg⁻¹ intraperitoneal (i.p.)) über eine Woche führte zu einer erhöhten Luciferase-Aktivität im stationären Zustand in zwei Nkx2.5-exprimierenden Geweben, Herz und Magen. Anhand von vermehrter DNA-Synthese, die durch BrdU-

Einbau und Mitoseaktivität unter Verwendung von Phosphohiston H3 als Marker bestimmt wurde, ließ sich im Herzen (und besonders in der Kardiomyozytenpopulation) eine signifikant erhöhte Zellzyklusaktivität nachweisen. Isx1 änderte zudem das Genexpressionsprofil von Notch-aktivierten Epikardzellen (NECs), einer herztypischen Progenitorzellpopulation, erheblich zugunsten Kardiomyozyten-ähnlicher Vorstufen. Isx1 wurde nachfolgend direkt nach der Induktion eines Myokardinfarkts (MI) verabreicht, aber die Auswirkungen auf die Herzmuskulatur wurden durch die MI-ausgelöste Aktivierung von Fibrozyten außer Kraft gesetzt. Die Verabreichung von Isx1 drei Tage nach dem MI führte zu einer signifikanten Verbesserung der Herzventrikelfunktion. Allerdings dauerte diese positive Auswirkung nicht an und verschwand 21 Tage nach dem MI völlig. Zudem hatte die Isx1-Behandlung keine Auswirkungen auf die frühe Narbenhistologie. Auch wenn Isx1 In-vivo-Wirksamkeit fehlte, lieferte diese Studie doch ein ermutigendes Beispiel für die Induktion der Proliferation und Differenzierung herztypischer Progenitorzellen hin zu Kardiomyozyten mithilfe in vitro entdeckter niedermolekularer Verbindungen.

Anschließend wurden die Wirkungsweise und die Zielstruktur von Isx1 identifiziert.^[48] Es wurden circa 100 Analoga der Isx-Startpunkte synthetisiert, was die Entdeckung stärker wirksamer Analoga wie Isx2 (20) möglich machte. Die Autoren wiesen nach, dass Isx an der Regulierung des intrazellulären Ca²⁺-Flusses in NECs beteiligt ist, was auf eine Modulierung der G(q)PCR-Signalgebung schließen lässt. Ein GPCR-Panel-Screening (GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor) führte zu einem Treffer – GPR68 –, einem extrazellulären protonen-/pH-empfindlichen GPCR, von dem zuvor nicht bekannt gewesen war, dass es im Herzen eine Funktion ausübt, gegen die Isx als direkter Agonist wirkt. Nachfolgend wurde aufgezeigt, dass GPR68 in MI-freien Kardiomyozyten in Mäusen hochreguliert wird und GPR68-exprimierende Zellen eine protonenempfindliche Pufferzone um die Infarktzone herum bilden. Isx1 zielte in vivo auf diese Pufferzone ab. Diese Studie bot ein gutes Beispiel für die Anwendung von in vitro generierten Verbindungen zur Entdeckung und Validierung eines neuen Ziels für die Herzregeneration.

Wie in diesem Abschnitt gezeigt führten niedermolekulare Verbindungen zu Erfolgen bei der Erklärung der zugrundeliegenden biologischen Abläufe der Herzregeneration, einschließlich der Rolle des Wnt-Weges. Bei den Untersuchungen kamen einzelne Hilfsverbindungen, das Screening kleiner Verbindungssätze ebenso wie HTS mit über 100000 Verbindungen zum Einsatz (Tabelle 1). Treffer wurden identifiziert, und die Wirksamkeit kann durch medizinisch-chemische Optimierung verbessert werden. Viele dieser Verbindungen mögen zwar gute Hilfsmittel für die Verwendung in vitro sein, sie haben jedoch in vielen Fällen schlechte physikalisch-chemische und ADMET-Eigenschaften, was sie für eine In-vivo-Charakterisierung ungeeignet macht. Eine zentrale Aufgabe wird die Weiterentwicklung eines Treffers hin zu einer Verbindung mit In-vivo-Wirkung sein; dies erfordert ein Andocken und eine Aktivität des Wirkstoffs an der Zielstruktur ebenso wie geeignete Verbindungseigenschaften, um eine ausreichende Exposition im richtigen

Tabelle 1: Beispiele für niedermolekulare Verbindungen, die Screening-Strategie und die Dekonvolution einer Zielstruktur.

strategisches Ziel	Bibliotheksgröße	Assay-Typ	identif. Treffer	Schlüssel-moleküle	Dekonvolution	chemische Nachverfolgung	Lit.
Kardio-Myogenese	550 Hilfsverb.	Zellen-Reporter-gen	ja	IWR-1, 5	Mechanismus bekannt	ja	[30, 33]
Kardiomyozytendifferenzierung	4000, Diversity Set	Zebrafisch	ja	Cardionogen 1	Signalwegebene	nein	[34]
Kardiomyozytendifferenzierung	9600, Diversitäts-orientierte Bibliothek	Zellen-Reporter-gen	ja	N11474, KY02111	Signalwegebene	ja	[35]
Kardiomyozytendifferenzierung	1 Verbindung	Maus-ESCs	n.a.	XAV939	Mechanismus bekannt	nein	[32]
Kardio-Myogenese	17 000, Diversitäts-orientierte Bibliothek	Zellen-Reporter-gen	ja	ITD-1	Signalwegebene	ja	[39]
Kardio-Myogenese	200, Diversity Set	Zellen-Reporter-gen	ja	CW209E	nicht erfolgreich	Screening enger Nachbarn	[46]
Kardio-Myogenese	147 000, Diversitäts-orientierte Bibliothek	Zellen-Reporter-gen	ja	Isx1, Isx2	ja, GPCR-Panel-Screening	ja	[13d, 47, 48]
Kardiomyozytenproliferation	Hilfsverb.	Zebrafisch	ja	SAG, NBI-31772	Signalwegebene	nein	[41]
Kardiomyozytenproliferation	Hilfsverb.	Säugetier-Kardiomyozyten	ja	BIO	Mechanismus bekannt	nein	[37]

Gewebe über eine genügend lange Zeitspanne zu gewährleisten.^[49] So können z. B. geringe Löslichkeit, Permeabilität und Verbindungsstabilität im Blut, die häufig auf hohes Molekulargewicht und Lipophilie zurückzuführen sind, sowie metabolisch empfindliche Stellen im Molekül zu geringen Konzentrationen der Verbindung nach der In-vivo-Dosierung führen und die Chancen auf Wirksamkeit minimieren.^[50] Die Optimierung mehrerer Verbindungsparameter für die Weiterentwicklung von Treffermolekülen hin zu In-vivo-Hilfsmitteln und letztlich zu klinischen Kandidaten ist ein wichtiger Aspekt bei der Ausarbeitung von Therapien auf Basis niedermolekularer Verbindungen.^[51]

Ein Beispiel wurde jüngst von Shultz et al. für die Optimierung von XAV939 vorgestellt,^[52] einem potenten Inhibitor von TNKS 1 und 2 mit guter Ligand-Lipophilie-Effizienz (LLE = $\text{pIC}_{50} - \log D$).^[53] Allerdings weist XAV939 eine Reihe von Risiken auf, wie geringe Löslichkeit und niedrige Stabilität in Rattenlebermikrosomen, was seinen Nutzen für In-vivo-Studien beeinträchtigt. Die ursprüngliche Optimierungsstrategie konzentrierte sich auf Moleküle, die zwar weniger wirksam waren, aber eine höhere LLE aufwiesen. Diese Vorgehensweise führte zu Verbindungen mit sowohl verbesserter Stabilität und Löslichkeit als auch erhöhter Wirksamkeit und geringerer Lipophilie und führte letztlich zu guter Exposition und In-vivo-Aktivität im Tumor-Mausmodell.

Auch wenn es gelingt herzuleiten, welcher Signalweg an der biologischen Wirkung von niedermolekularen Verbindungen beteiligt ist, ist es doch oft schwierig, die genaue Zielstruktur zu dekonvolvieren. Die einzige literaturbekannte erfolgreiche Dekonvolution einer Zielstruktur im Zusammenhang mit der Herzregeneration wurde durch ein Panel-Screening eines Satzes von GPCRs erreicht. Dies verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Dekonvolution von Zielstrukturen; in diesem Bereich werden in Zukunft signifikante Investitionen erforderlich sein.

Diese jüngsten Forschungsarbeiten haben uns Techniken zur Entdeckung und Nutzung niedermolekularer Verbindungen für die Erzeugung von Kardiomyozyten in die Hand

gegeben, und die Artikelserie von Schneider et al. ist ein schönes Beispiel für die Schritte von einem HTS hin zu einer neuen Zielstruktur und In-vivo-Effekten.^[13d, 47, 48] Es ist noch viel Arbeit erforderlich, um aufbauend auf diesen Studien Verbindungen – und letztlich klinische Kandidaten – zu identifizieren, die spätere Stadien der Kardiomyozytendifferenzierung adressieren und zu therapeutisch relevanten Kardiomyozytenpopulationen sowie letzten Endes zu einer verbesserten Herzfunktion führen.^[54]

2.2. Mikro-RNAs und Anti-Mikro-RNA-Oligonukleotide

Mikro-RNAs (miRs) sind kurze (ca. 22 Nukleotide lange) nichtkodierende Einzelstrang-RNAs, die die Genexpression durch Adressieren komplementärer Oligonukleotidsequenzen regulieren, die sich üblicherweise in der 3'-untranslatierten Region in Messenger-RNAs (mRNAs) befinden. Diese Wechselwirkungen führen zur Inhibition der mRNA-Translation und so zur Suppression der Proteinexpression oder zum Abbau der mRNA. Einzelne miRs können an viele mRNA-Ziele binden und kodieren häufig für mehrere Komponenten komplexer intrazellulärer Netzwerke. Daher kann mit einer Manipulation der miR-Expression oder -Funktion eine signifikante Wirkung auf zelluläre Phänotypen erzielt werden.

Es stehen Methoden zur effektiven Hochregulierung der miR-Expression oder zur Inhibition ihrer Aktivität zur Verfügung. Es können synthetische miRs zur Verbesserung der Funktion oder als Ersatz von miRs verabreicht werden, die bei einer Erkrankung verloren gingen oder herunterreguliert wurden.^[55] Dies ist eine schwierige Aufgabe, und man kann eine effektivere Funktionsverbesserung unter Verwendung von Adeno-assoziierten Viren (AAVs) erreichen, was zu einer robusten Expression der interessierenden miR führt.^[56] Im Gegensatz dazu können antimiR-Oligonukleotid-Moleküle **21** synthetisiert werden, die über komplementäre Basenpaarung an die Ziel-miRs binden, was zur Inhibition der miR und so zu erhöhter Verfügbarkeit von mRNA für die

Translation führt (Abbildung 10).^[57] Die Anwendung von Antisense-Technik auf anti-miRs hat die schnelle Entdeckung von Verbindungen ermöglicht, die sich mit hoher Spezifität und Affinität an die zu untersuchende miR binden, zellgängig und stabil sind und eine lange Halbwertszeit in vivo aufweisen.^[58] Meist werden Phosphorothioatgruppen (**22**) in das anti-miR-Kettengerüst eingeführt, um die Nukleaseresistenz zu erhöhen und die Plasmaproteinbindung zu verstärken und so die anti-miR-Clearance durch Urinausscheidung zu reduzieren. Zudem hat der Ersatz der Hydroxygruppe in der 2'-Position der Ribose-Einheiten stärkere Interaktionen und stabilere Doppelhelices mit der miR-Zielstruktur ermöglicht. Diese 2'-Zuckermodifikationen umfassen 2'-*O*-Methoxyethyl (2'-MOE; **23**), 2'-Fluor (2'-F; **24**) und bicyclische Systeme wie fixierte Nukleinsäure (LNA; **25**) und starres Ethyl (*R*- und *S*-cEt; **26**), wobei das 2'-Sauerstoffatom über einen Methylene-Linker mit der 4'-Position verbunden ist und so einen starren Bicyclus bildet, der in einer C3'-*endo*-Zuckerkonformation fixiert ist.^[59] Insbesondere die Oligonukleotide, die bicyclisch modifizierte Nukleotide enthalten, haben eine äußerst hohe Bindungsaffinität, wie anhand thermischer Denaturierung gezeigt wurde,^[59b,60] und zeigen daher eine effiziente Inhibition der miR mit erheblich kürzerer anti-miR. So wurde z. B.

mit einer kleinen LNA aus acht Nukleotiden auf die Seed-Region (Nukleotide 2–8 am 5'-Ende) der miR-15-Familie abgezielt und damit die Wirkung mehrerer Mitglieder der miR-15-Familie gehemmt.^[61] Die Nukleaseresistenz kann ebenfalls erhöht werden, indem die Ribose durch einen Morpholinring (**27**) ersetzt wird.^[62] Die Eigenschaften von anti-miRs können mit anti-miR-Molekülen (so genannten Antagomiren) weiter modifiziert werden. Hier werden die beiden 2'-Hydroxygruppen durch Methoxygruppen ersetzt (**28**), einige der Phosphodiesterbindungen werden zu Phosphorothioaten geändert, und ein Cholesterolmolekül wird an das 3'-Ende der anti-miR konjugiert, was zu verbesserter Aufnahme in die Zelle und In-vivo-Stabilität führt sowie die hepatische Aufnahme der anti-miR verbessert, während zugleich die Abgabe an andere Gewebetypen reduziert wird.^[63]

Da miRs mit mehreren mRNAs agieren, ist es wahrscheinlich, dass miRs oder miR-Inhibitoren mehrere Zielgene in moderater Weise regulieren. Diese Tatsache macht die Bestimmung der funktionellen Relevanz einer miR und die Dekonvolution der wesentlichen Zielstrukturen anspruchsvoll. Wenn wir allerdings die Proteine und Signalwege verstehen, die von diesen miRs beeinflusst werden und zum gewünschten Phänotyp führen, könnten wir vielleicht interes-

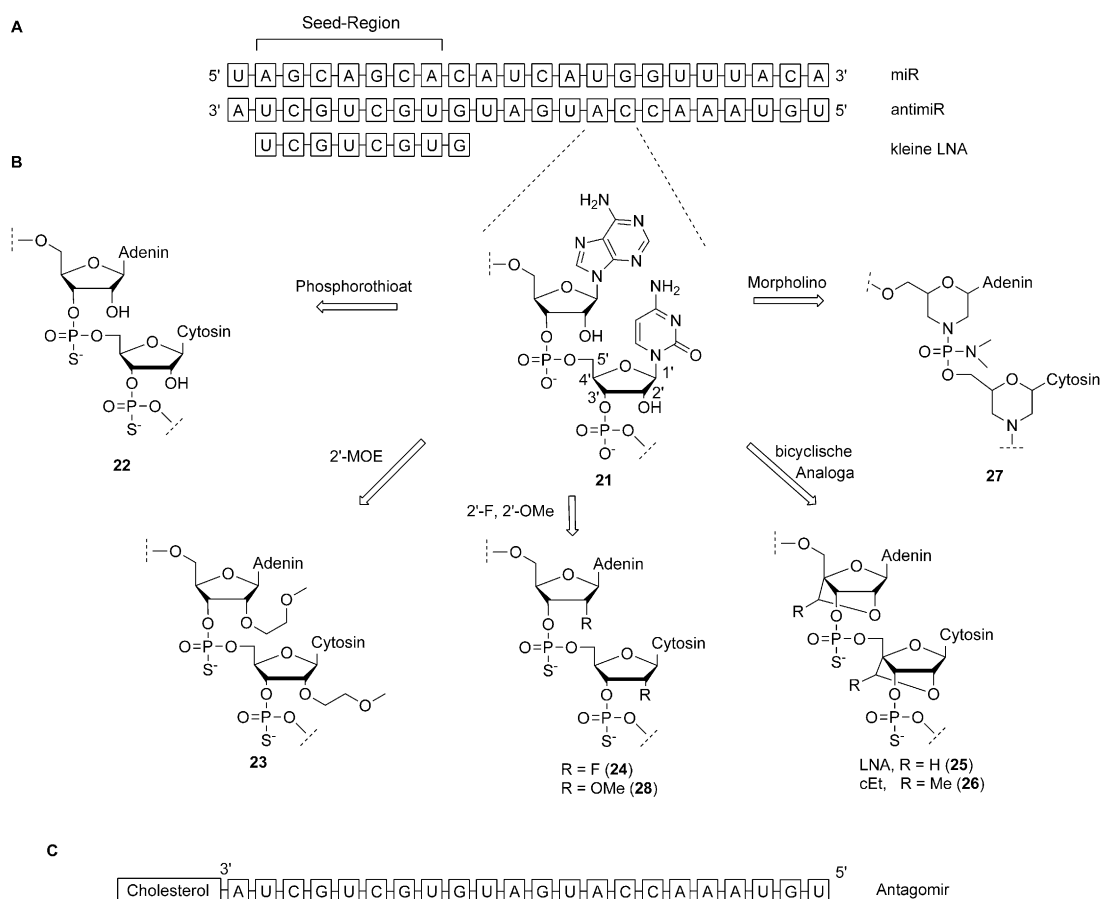


Abbildung 10. Mikro-RNA(miR)- und anti-miR-Oligonukleotide und chemische Modifikationen. A) Illustration einer miR, der entsprechenden anti-miR und einer kleinen, fixierten Nukleinsäure (LNA), die auf die Seed-Region der miR abzielt. B) Häufigere chemische 2'-Hydroxy- und Ribose-Gerüstmodifikationen an den Adenin-Cytosin-Resten. Eine anti-miR kann einzelne oder gemischte Modifikationen enthalten. C) Antagomirstruktur, bei der die 2'-Hydroxy- durch Methoxygruppen ersetzt, einige der Phosphodiesterbindungen in Phosphorothioate geändert und ein Cholesterolmolekül mit dem 3'-Ende konjugiert sind.

sante biologische Zielstrukturen für eine Intervention mit alternativen chemischen Modalitäten identifizieren. Wegen der häufig schwer interpretierbaren biologischen Messwerte sowie für das Verständnis der ADME-Eigenschaften der anti-miR ist es erforderlich, die Verbindungen in Tiermodellen, die für die jeweilige Erkrankung relevant sind, schnell zu testen. anti-miRs werden wegen ihrer hohen elektrischen Ladung und ihres hohen Molekulargewichts schlecht im Darm resorbiert und sind daher für eine orale Verabreichung ungeeignet; sie müssen dementsprechend über intravenöse oder subkutane Injektionen oder Infusionen verabreicht werden. Wenn eine anti-miR einmal in Zellen aufgenommen wurde, ist ihre Clearance erheblich verringert, wodurch die anti-miR eine Halbwertszeit von einigen Wochen aufweisen kann, was zu langanhaltender biologischer Wirkung führt. Zudem ist es schwierig, die Pharmakodynamik (PD) der Wirkstoff-Behandlung vollständig zu verstehen, da mehrere Gene und Signalwege moduliert werden können und der richtige Beobachtungszeitpunkt variieren kann. Eine wichtige Aufgabe der Wirkstoff-Entwicklung ist daher das Verständnis der Beziehungen zwischen Pharmakokinetik (PK) und PD sowie der Therapieschemata zur Verabreichung der erforderlichen therapeutischen Konzentrationen in das menschliche Zielgewebe. Es ist wichtig, nicht nur die positiven Auswirkungen der Modulation der Genexpression durch die anti-miRs, sondern auch die möglichen unerwünschten Wirkungen infolge einer Modulation von Genen und Signalwegen zu überwachen. Das Vermeiden der körpereigenen Immunreaktion war und ist eine der schwierigsten Aufgaben für Oligonukleotid-basierte Therapeutika. Allerdings haben chemische Modifikationen von Oligonukleotiden, besonders in 2'-Position der Ribose, bereits zu signifikanten Verbesserungen geführt.^[59,64]

Jüngst wurde von einer Reihe von miRs zur Regulation der Herzfunktion und -regeneration berichtet; dabei wurden Beispiele für die Verbesserung ebenso wie für die Inhibierung der Funktion mithilfe von miR und anti-miR gegeben.^[12a,65] Eulalio et al. führten ein Fluoreszenzmikroskopie-basiertes HCS in Kardiomyozyten neugeborener Ratten durch, wobei sie eine miR-Bibliothek des gesamten Humangenoms aus 875 miR-Mimetika verwendeten.^[5c] Das Screening identifizierte 204 miRs, die die Proliferation ventrikulärer Kardiomyozyten in neugeborenen Ratten um mehr als das Doppelte erhöhten, wie anhand dreier Marker (sarkomerisches α -Actinin, Ki-67 und EdU) nachgewiesen wurde. Vierzig der miRs verstärkten auch den EdU-Einbau und den Ki-67-Marker in Mauskardiomyozyten, und zwei miRs, miR-590-3p und miR-199a-3p, induzierten den Wiedereintritt postnataler Rattenkardiomyozyten in den Zellzyklus, wodurch die Zahl der Kardiomyozyten erheblich stieg. Interessanterweise erhöhte keine der miRs die Proliferation von Herzfibroblasten von Ratten. Die synthetischen miR-590-3p und miR-199a-3p wurden nachfolgend in vivo getestet und entweder direkt in das Herz neugeborener Ratten injiziert, oder es wurden AAV9-Vektoren, die eine der beiden miRs exprimierten, intraperitoneal in neugeborene Mäuse oder intrakardial in adulte Mäuse injiziert. In allen Fällen wurde eine Zunahme der Kardiomyozytenproliferation beobachtet. Schließlich wurden adulte Mäuse nach einem MI mit AAV-Vektoren

behandelt, die die beiden miRs exprimierten. Nach 60 Tagen war die Größe der Infarkte erheblich reduziert, und es wurden positive Wirkungen auf die Herzfunktion beobachtet.

In einer weiteren aktuellen Studie verglichen Boon et al. miR-Expressionsprofile von Herzen junger oder älterer Mäuse und identifizierten eine Reihe von miRs, die eine Rolle bei der Herzpathophysiologie spielten, einschließlich der miR-34-Familie, die in älteren Herzen hochreguliert ist.^[66] MiR-34a ist das dominierende Mitglied dieser Familie im Herzen und weist höhere Werte in den Kardiomyozyten als in Nichtkardiomyozyten auf. Da zuvor gezeigt worden war, dass miR-34a Apoptose induziert,^[67] wurden 18 Monate alte Mäuse mit einem anti-miR-34a-Antagomirmolekül, Ant34a, behandelt. Nach einer Woche ergab Ant34a eine verringerte Zahl toter Zellen gegenüber den Kontrollen. Die Wirkung von miR-34a nach einem akuten MI wurde durch Injektion von Antagomiren oder LNA-basierten anti-miRs von miR-34a in Mäuse nach dem MI beurteilt. Zwei Wochen später war die Kontraktilität des Herzens erheblich verbessert, und die Menge toter Zellen (von Kardiomyozyten wie auch Nichtkardiomyozyten) war gesunken. Folgeuntersuchungen zeigten weitere positive Auswirkungen auf andere Herzzelltypen, wie Endothelzellen.

Porrello et al. haben durch einen Vergleich der miR-Expressionsprofile in Herzventrikeln von Mäusen an den Tagen 1 und 10 nach der Geburt aufgezeigt, dass Mitglieder der miR-15-Familie im Mausherz kurz nach der Geburt hochreguliert werden und dass diese miRs zur Unterdrückung der Zellzyklusgene, einschließlich Checkpoint-Kinase 1, und zum postnatalen Zellzyklusarrest beitragen.^[68] LNA-modifizierte anti-miRs der miR-15-Familie wurden nachfolgend durch subkutane Injektion postnatal an Mäuse verabreicht, um die Expression der miR-15-Familie bis ins Erwachsenenalter zu inhibieren.^[69] Nach 21 Tagen wurde ein MI induziert, und die Behandlungsgruppe zeigte eine Zunahme der Kardiomyozytenproliferation und im Laufe der Zeit eine Verbesserung in der linksventrikulären systolischen Funktion. Diese Studien deckten auch die Induktion der Proliferation anderer Zellen als nur der von Kardiomyozyten auf; die Bedeutung dieses Befunds muss noch weiter erforscht werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine postnatale Inhibition der miR-15-Familie mit den entsprechenden chemisch modifizierten anti-miRs die Myokardregeneration fördert.

Ein vielversprechender Ansatz für die Regeneration eines verletzten Herzens ist die Umprogrammierung von Herzfibroblasten zu Kardiomyozyten.^[70] Nach einer aktuellen Studie von Jayawardena et al. ist die Verwendung von mehr als einer miR vielversprechend, um das Schicksal von Zellen in eine andere Richtung zu lenken.^[8] In dieser Untersuchung wurden sechs miRs basierend auf ihren Rollen bei der Herzmuskelentwicklung und -differenzierung ausgewählt, und synthetische Mimetika dieser miRs wurden in Mausherzfibroblasten sowohl einzeln als auch in allen möglichen Doppel- und Dreifachkombinationen transfiziert. miR-1 und verschiedene Kombinationen veränderten die Expression von Fibroblast- zu Kardiomyozytengenen. Um das Konzept am adulten Herzen zu testen, wurde ein miR-1-kodierender Lentivirus oder eine Kombination aus Lentiviren, die für die

miR-1, -133, -208 und -499 kodieren, direkt nach der Induktion einer Myokardverletzung intramyokardial injiziert. Nach vier Wochen wurden neue, Kardiomyozyt-typische Zellen beobachtet. Die Befunde lassen darauf schließen, dass miR-1 alleine für die Induktion der Expression von Herzmarkern in Fibroblasten ausreicht – allerdings konnte die Kombination aus miR-1, -133, -208 und -499 die Reifung der konvertierten Fibroblasten zu Zellen mit den funktionellen Eigenschaften von Kardiomyozyten verbessern. Interessanterweise erhöhte das Hinzufügen des niedermolekularen JAK-Inhibitors 1 (**29**),^[71] eines Inhibitors von JAK1, 2 und 3 (Abbildung 11), die Wirksamkeit erheblich, indem der

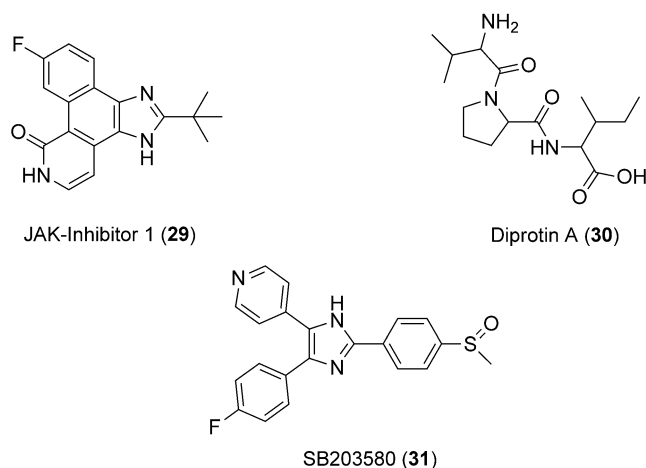


Abbildung 11. Chemische Strukturen von JAK-Inhibitor 1, Diprotin A und SB203580 – niedermolekularen Verbindungen, die in Kombination mit zusätzlichen Modalitäten eingesetzt werden, um die Wirkung auf die Herzregeneration zu erhöhen.

Herzmarker α -MHC und die Expression von Ionenkanälen im Herzen weiter erhöht wurden. Zwar ist der Mechanismus der erhöhten Wirksamkeit, die mit JAK-Inhibitor 1 erreicht wird, nicht bekannt, jedoch hält dieser Befund faszinierende zukünftige Möglichkeiten für die Kombination von miRs und niedermolekularen Verbindungen bereit.

Die vorgestellten Beispiele liefern hochinteressante Daten, die letztlich sowohl zu Herzregenerationstherapien als auch zur Entwicklung von Wirkstoffen führen könnten, die einige der Proteine adressieren, deren Expression von diesen miRs beeinflusst wird. Zusätzlich wurde jüngst aufgezeigt, dass ein LNA-modifiziertes anti-miR-122-Molekül, Miravirsin, bei Menschen mit Hepatitis C wirksam und gut verträglich ist, was diese Verbindungsklasse sehr vielversprechend macht.^[72] Der Einsatz niedermolekularer Inhibitoren für miRs ist zwar noch ein sehr junges Gebiet, aber erste Beispiele entsprechender Verbindungen kommen mittlerweile auf, und es wird interessant sein, die Entwicklungen in diesem Bereich zu beobachten.^[73]

2.3. Peptide und Proteine

Peptid- und Proteinwirkstoffe werden immer leichter verfügbar und wichtiger für den Einsatz als Therapeutika.^[74]

Dank biotechnologischer Fortschritte verbessern sich die Verfügbarkeit, die Möglichkeiten zur Verabreichung und die Vielseitigkeit dieser therapeutischen Modalitäten. Zudem ermöglichen wissenschaftliche Durchbrüche Modifikationen, um frühere Probleme zu umgehen, darunter die Immunogenität von Proteinen und der schnelle Abbau im Plasma, der zu kurzen Halbwertszeiten in vivo führt. Zu den häufig verwendeten chemischen Modifikationen zählen die Kupplung von Glycanen oder Poly(ethylenglycol)(PEG)-Ketten an Proteine, häufig über eine kovalente Bindung chemisch aktivierter Glycane bzw. aktivierter PEG-Derivate (z.B. PEG-Benzotriazolcarbonat) an einen Lysinrest oder eine N-terminale Aminogruppe.^[75] Es wurde nachgewiesen, dass Glycosylierung oder PEGylierung die Stabilität von Proteinen durch Senken ihrer Clearance-Rate erhöht und so zu längeren Halbwertszeiten führt.^[76] Allerdings ist wegen der vielen reaktiven Stellen in Proteinen meist kaum eine Steuerung der Positionierung dieser PEG- oder Glycanaddition möglich, weshalb manchmal eine verringerte biologische Aktivität beobachtet wird. Weitere Entwicklungen chemischer Methoden ermöglichen nun die positionsspezifische post-translationale Modifizierung von Proteinen.^[77] Vor kurzem beschrieben Dumas et al. die Anwendung der Suzuki-Miyaura-Reaktion für die selektive Kupplung von PEG-Ketten an Proteine mit halogenierten Aminosäuren. Dabei wurde mit PEG-Borsäurederivaten in Gegenwart von wasserlöslichem Pd^{II}-Salz und ohne externe Liganden ein Umsatz in PEGyliertes Protein von bis zu 70 % erreicht.^[77a]

Wirkstoffe auf Basis natürlicher Proteine oder Peptide haben den Vorteil, fundamentale Signale zu modulieren, und das Potenzial für eine hohe Wirksamkeit und Selektivität bezüglich ihrer Zielstrukturen. Allerdings sind die jeweiligen Signalwege auch in vielen anderen Organen und nicht nur im Herzen vorhanden, weshalb häufig eine Herzspezifität erforderlich ist, um Nebenwirkungen zu vermeiden. Die Modulation von Signalwegen kann sich auf viele biologische Prozesse auswirken, und zur Aufstellung wirksamer und sicherer Dosierungspläne sind ein grundlegendes Verständnis der biologischen Mechanismen und PK-PD-Profile sowie die Identifizierung geeigneter Biomarker erforderlich. Zudem sind trotz der Fortschritte bei Herstellung und Verabreichungsmethoden der Aufwand und die Kosten für die Produktion dieser Verbindungen allgemein höher als bei niedermolekularen Verbindungen, und die Verbindungen müssen häufig über einen nichtoralen Weg verabreicht werden.

Peptide, von synthetischen Peptiden mit einer Länge von ca. 30 Aminosäuren bis hin zu therapeutischen Volllängensproteinen, werden als Hilfsmittel für die Aufklärung biologischer Mechanismen sowie als mögliche Therapeutika für die Herzregeneration untersucht.^[78,79] Die Einblicke in Signalwege ermöglichten die Identifizierung einer Reihe von Wachstumsfaktoren, die an der Entwicklung, dem Wachstum und der Differenzierung des Herzens beteiligt sind.^[12b] Diese Wachstumsfaktoren können eine Reihe von kardiovaskulären Wirkungen haben, z.B. können sie Angiogenese induzieren, Apoptose verringern und die Rekrutierung und Proliferation von Stammzellen im Myokard erhöhen. Sie binden an ihre Rezeptoren, zu denen Proteintyrosinkinasen, Cytokinrezeptoren

toren und GPCRs zählen, oder wirken parakrin (d.h., sie werden von der Zelle, in der sie gebildet wurden, freigesetzt und binden an ihren Rezeptor in Nachbarzellen), wodurch sie eine Reihe biologischer Prozesse auslösen. Die modulierten Signalwege sind hochkomplex, und ihre Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Es gibt zwar eine Reihe von Wachstumsfaktoren mit kardioprotektiver Wirkung, aber dieser Aufsatz konzentriert sich auf solche, die nachweislich die Regeneration durch Rekrutierung und Proliferation von Progenitorzellen, Kardiomyozytenproliferation oder Umprogrammierung eines anderen Zelltyps zu Kardiomyozyten induzieren. Es stehen weitere hervorragende Übersichtsartikel mit genauen Beschreibungen von Wachstumsfaktoren mit alternativen kardioprotektiven Wirkungen zur Verfügung.^[80]

Ein Wachstumsfaktor, der nachgewiesenermaßen das Überleben und die Proliferation von Herzstamm- und Herzprogenitorzellen erhöht, ist IGF-1.^[81] IGF-1 ist ein 72-kDa-Polypeptid aus 70 Aminosäuren, das an seinen Tyrosinkinaserzeptor IGF-1R bindet und die beiden Signalwege PI3K-Akt und MEK1/2-Erk1/2 aktiviert.^[82] IGF-1 ist ein Schlüsselprotein, das an der Muskelentwicklung beteiligt ist,^[83] und signifikante Veränderungen des IGF-1-Systems wurden bei Patienten nach einem akuten MI beobachtet. Niedrige Plasmaspiegel von IGF-1 sind in diesen Fällen mit schlechteren Prognosen, d.h., höherer Mortalität und Entwicklung von schwerer kongestiver Herzinsuffizienz assoziiert.^[84] Ein zweiter Wachstumsfaktor, der an der Rekrutierung und Differenzierung von Herzstammzellen beteiligt ist, ist der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF). HGF, ein heterodimeres Molekül aus einer α -Kette (69-kDa) und einer β -Kette (34 kDa), die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind, wurde ursprünglich als Wachstumsfaktor für Hepatozyten entdeckt. Später wurde gezeigt, dass das Molekül bei verschiedenen Zelltypen sowohl anti-apoptotische als auch chemotaktische Eigenschaften hat.^[85] HGF wirkt signalgebend über seinen Tyrosinkinaserzeptor, c-Met, und verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine HGF-Gabe an Mäuse entweder intravenös oder intramyokardial zu verbesserter Herzfunktion nach einem MI führt.^[86] Offensichtlich übt HGF seine Wirkung über verschiedene Mechanismen aus, z.B. über Progenitorzellrekrutierung, Verringerung von Apoptose oder Angiogenese.

Wegen der Beiträge unterschiedlicher Mechanismen bei IGF-1 und HGF und wegen des Vorhandenseins beider Signalwege in Herzstammzellen haben Ellison et al. Schweinen nach einem akuten MI eine Kombination aus IGF-1 und HGF als eine Einzeldosis mit einer Intrakoronarinjektion verabreicht.^[87] Dies führte dosisabhängig zu einer signifikanten Aktivierung und nachfolgenden Proliferation und Differenzierung endogener Herzstammzellen zu Kardiomyozyten unter Regeneration der Mikrozirkulation. Die Herzfunktion war zwei Monate nach der Dosisgabe verbessert, und die positiven Auswirkungen auf Überleben und Wachstum waren noch messbar. Den Autoren zufolge ist es unwahrscheinlich, dass die so erzeugten Kardiomyozyten voll ausgereift sind, weshalb sie auch nicht die volle Leistung reifer Kardiomyozyten erbringen können. Die weitere Erforschung von Faktoren, die die Kardiomyozytenreifung antreiben, ist daher notwendig.

Ein weiteres Protein, das an der Rekrutierung von Progenitorzellen (in diesem Fall von endothelialen Progenitorzellen) beteiligt ist, ist das Chemokin „stromal cell-derived factor-1“ (SDF-1). SDF-1 ist ein Protein aus 68 Aminosäuren, das an den CXCR4-Rezeptor bindet und als ein chemotaktisches Agens für endotheliale Progenitorzellen wirkt und so zur Regeneration der Blutgefäße beiträgt.^[88] SDF-1 wird nach einem MI hochreguliert, aber es wird auch schnell von Di-peptidylpeptidase-4 (DPP-IV) und Matrix-Metalloproteinasen wie MMP2 abgebaut.^[89] Die Verwendung von rekombinantem SDF-1 wird durch seine kurze Halbwertszeit und geringe Konzentration in den verletzten Bereichen des Herzens begrenzt.

Es wurden allerdings elegante Strategien entworfen, um diese Probleme zu umgehen. Segers et al. entwickelten eine Protease-resistente Variante von SDF-1 (S-SDF-1(S4V)), bei der ein Valinrest an Position 4 durch ein Serin ersetzt wurde, um gegen eine Spaltung durch MMP2 zu schützen; die Zahl der DPP-IV-Spaltungen wurde durch Hinzufügen eines zweiten Serinrests am N-Terminus verringert, was zu höherer Stabilität führte.^[90] S-SDF-1(S4V) wurde in einem Ratten-MI-Modell mit selbstorganisierten Peptidnanofasern verabreicht, um die Konzentration im Herzen zu erhöhen, und ergab eine verbesserte Herzfunktion und Dichte von Blutgefäßen. Außerdem erhöhte auch die Behandlung von Mäusen mit dem DPP-IV-Inhibitor Diprotin A (**30**; Abbildung 11) nach einem MI die Konzentration von SDF-1 im Herzen, was zu einer verstärkten Progenitorzellrekrutierung führte.^[91]

Unabhängig davon konstruierten Ziegler et al. das bispezifische Molekül SDF1-GPVI aus SDF-1 und einer rekombinanten Form des löslichen thrombozytären Kollagenrezeptors Glycoprotein VI (GPVI).^[92] GPVI bindet an Kollagen an exponierten Stellen der extrazellulären Matrix und somit vorzugsweise an Läsionen mit beschädigten Blutgefäßen, und es bringt SDF-1 an den Wirkort. Das SDF-1-GPVI-Fusionsprotein transportierte höhere Konzentrationen von SDF-1 zu den verletzten Bereichen des Herzens und erhöhte die Akkumulation rekrutierter Zellen; es wurden Hinweise erhalten, dass dabei die Angiogenese gefördert und das Überleben der Zellen aufrechterhalten wird. SDF1-GPVI reduziert dann die Infarktgröße signifikant und erhält die Myokardfunktion in Mäusen nach einem MI aufrecht.^[92] Dies ist ein eleganter Ansatz zum gezielten Transport des erforderlichen Moleküls an den Wirkort und zur Verringerung systemischer Effekte.

Ein weiterer Lösungsansatz hatte eine kontrollierte Freisetzung von SDF-1 direkt an der Infarktstelle im Herzen mit einem „Patch“ zum Ziel. Dies wurde durch die kovalente Bindung von rekombinantem Maus-SDF-1 α an Fibrinogen über einen PEG-Linker untersucht.^[93] Fibrinogen wurde mit einem Benzotriazolcarbonatderivat von PEG (BTC-PEG-BTC) PEGyliert, und anschließend wurden Maus-SDF-1 α und danach Thrombin hinzugefügt, um ein Fibrinnetz zu bilden. Durch Aufbringen des Gelpatches direkt auf den Infarktbereich verbesserte sich die Herzfunktion, und der Narbenbereich dehnte sich nicht aus.

Der mögliche, aussichtsreiche Einsatz von SDF-1 hat in jüngster Zeit durch die Veröffentlichung der Befunde einer

klinischen Phase-I-Studie mit einem nichtviralen DNA-Plasmid, das für menschliches SDF-1 (JVS-100) kodiert, weitere Unterstützung erhalten.^[94] JVS-100 wurde Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie mit einer endomyokardialen Injektion verabreicht, und nach vier Monaten wurden Verbesserungen bei den klinischen Endpunkten beobachtet.

Neuregulin-1 (NRG-1), ein Mitglied der Proteinfamilie der epidermalen Wachstumsfaktoren, wird breit exprimiert – auch im Herzen.^[95] NRG-1 bindet an den ErbB4-Rezeptor, was zu seiner Dimerisierung mit dem Corezeptor ErbB2 und zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden führt, einschließlich der MAPK- (MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und der PI3K/Akt-Signalwege. Eine Beteiligung von NRG-1 an Herzinsuffizienz wurde zuerst infolge von Berichten über klinische Kardiotoxizität des ErbB2-Antikörpers Trastuzumab, der bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird, vermutet.^[96] Zudem wird die Expression von NRG-1 in den späteren Stadien der Herzinsuffizienz reduziert.^[97]

Die Verabreichung eines rekombinanten menschlichen NRG-1 (rhNRG-1) aus 61 Aminosäuren verbesserte die Herzfunktion und die Überlebensrate in Modellen chronischer Herzinsuffizienz.^[98] Verschiedene Mechanismen wurden mit der Wirkung in Zusammenhang gebracht, einschließlich verstärkter Zellzyklusaktivitäten und Proliferation von Kardiomyozyten durch ErbB4-Signalgebung^[5b] sowohl in ventrikulären Myozyten adulter Ratten als auch bei adulten Mäusen. Unseren eigenen neuesten Daten zufolge erhöht NRG-1 den Einbau von EdU in hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten (Abbildung 7), was die Annahme stützt, dass eine NRG-1-Behandlung bei menschlichen Kardiomyozyten auch den Eintritt in den Zellzyklus fördert (unveröffentlichte Arbeit). Es werden derzeit klinische Testreihen mit rhNRG-1 bei Patienten mit stabiler chronischer Herzinsuffizienz durchgeführt, und es wurden ermutigende Resultate aus zwei Studien veröffentlicht.^[99] Bei der ersten Studie wurde rhNRG-1 in täglichen intravenösen Infusionen über einen Zeitraum von zehn Tagen verabreicht und zeigte eine statistisch zwar nicht signifikante, aber doch stattfindende Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion sowie eine Minderung des endsystolischen und enddiastolischen Volumens nach 90 Tagen, was darauf schließen lässt, dass rhNRG-1 dabei hilft, schädliche strukturelle Veränderungen des Herzens langfristig umzukehren.^[99a]

Studien mit Mitgliedern der Fibroblast-Wachstumsfaktor- (FGF)-Proteinfamilie haben deren kardioprotektive Wirkung aufgezeigt.^[100] Zudem induziert p38 MAPK (p38) den Austritt vieler Zelltypen aus dem Zellzyklus. Engel et al. zeigten, dass der p38-Inhibitor SB203580 (**31**; Abbildung 11)^[101] die Expression von Genen reguliert, die für die Mitose in Kardiomyozyten wichtig sind.^[102] Eine Kombination aus FGF-1 und SB203580 bewirkte eine signifikant höhere Proliferation von ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten als FGF-1 oder SB203580 allein. Die p38-Inhibition, speziell die Inhibition von p38 α , ist also für eine FGF-vermittelte Induktion des Zellzyklus und die Verbesserung der Proliferationskapazität von Kardiomyozyten erforderlich. Die Behandlung von Ratten nach einem akuten MI mit dieser Kombination führte zu weniger Narbenbildung und verbesserter Herzfunktion,

während die p38-Inhibition allein die Herzfunktion nicht retten konnte und die ausschließliche Verabreichung von FGF-1 die Angiogenese verbesserte.^[103] Diese Studien haben ein weiteres Beispiel für mögliche Synergien bei der Behandlung mit Kombinationen von Substanzen aus verschiedenen Modalitäten aufgezeigt.

Thymosin β 4 (T β 4) ist ein endogenes Peptid aus 43 Aminosäuren.^[78] Die Verabreichung von T β 4 (entweder in das Herz oder intraperitoneal) in einem Mausmodell nach einem MI stellte die Herzfunktion im Lauf von vier Wochen hervorragend wieder her. Es wurde eine Reihe von Wirkungsweisen für T β 4 vorgeschlagen, einschließlich der Aktivierung von Integrin-gebundener Kinase und Akt^[104] sowie der Anregung von Neovaskularisierung durch Induktion der Bildung von Endothelzellen sowie Zellen der glatten Muskulatur.^[105] Jüngst berichteten Smart et al., dass eine Vorbehandlung von Mäusen mit T β 4 vor der Induktion eines MI eine Population von Herzprogenitorzellen aktivierte, die als Epikardzellen (EPDCs) bekannt sind, und die Zahl von EPDCs erhöhte, die positiv für den Herzprogenitormarker Wilms Tumor-Gen 1 (Wt1 +) sind.^[106] Das Wachstum der EPDC-Population trug in der Folge zur Bildung neuer Kardiomyozyten und zur Neovaskularisierung bei, was letztlich Funktionsparameter wie die Ejektionsfraktion verbesserte und das Narbenvolumen verringerte.

J1-38, ein synthetischer, aus 29 Aminosäuren aufgebauter Peptidagonist von Somatoliberein (growth-hormone-releasing hormone, GHRH), wurde bei der Suche nach Derivaten entdeckt, die wirksamer und stabiler als das verkürzte Fragment „menschliches GHRH-(1–29)-NH₂“ von menschlichem GHRH sein sollten.^[107] Der Ersatz einer Reihe von Aminosäureresten, um so den enzymatischen Abbau zu verringern, führte zu J1-38, einem wirksameren Agonisten mit längerer Wirkung als der von nativem GHRH. Vor kurzem führte eine J1-38-Behandlung nach einem MI bei Ratten zu besserer Herzfunktion sowie geringerer Infarktgröße und Herzfibrose als bei Gabe von rekombinantem Ratten-Wachstumshormon (rrGH).^[79] Die Proliferationsrate endogener kardialer c-kit⁺-Progenitorzellen war ebenfalls erhöht. Interessanterweise schien die Wirkung von J1-38 nicht die GH/IGF-1-Achse zu betreffen, da die Blutspiegel dieser Hormone nach der Behandlung, anders als bei Behandlung mit rrGH, nicht erhöht waren. Der für diesen Unterschied verantwortliche Mechanismus ist nicht geklärt.

Die Zukunft birgt interessante Möglichkeiten für diese Peptide und Proteine. Erste Daten sowohl bei Tieren als auch in frühen klinischen Studien sind ermutigend und belegen das Potenzial zur Herzregeneration nach einer Verletzung (Tabelle 2). Allerdings muss eine längere Gabe von Wachstumsfaktoren sorgfältig auf unerwünschte Wirkungen wie die Entstehung oder das Fortschreiten von Krebs kontrolliert werden. Erforderlich sind auch eine detailliertere Aufklärung der Mechanismen der kardioprotektiven Wirkungen dieser Verbindungen (z. B. NRG-1) sowie ein besseres Verständnis von PK-PD-Eigenschaften und Biomarkern.

Eine alternative, elegante Strategie, um Proteine zu dosieren und ihre In-vivo-Exposition zu verstärken, ist das Verabreichen modifizierter mRNA (modRNA), die für das gewünschte Protein kodiert.^[108] Die mRNA kann anschlie-

Tabelle 2: Herzreparatur und -regeneration mit miRNAs, niedermolekularen Verbindungen, Peptiden oder Proteinen in Myokardinfarktmodellen.

strategischer Ansatz	Zielzelltyp ^[a]	Spezies	Wirkmechanismus	Funktions- verbesserung	Nachbeob- achtung	Lit.
Kardiomyozytenproliferation:						
Inhibitoren der miR-15-Familie ^[b]	CM	Maus	Proliferation	ja	21 Tage	[68]
miR-590/199a-Mimetika ^[c]	CM	Maus	Proliferation	ja	60 Tage	[5c]
Neuregulin-1	CM	Maus	Proliferation	ja	14 Wochen	[5b]
Epikardzellen:						
Thymosin β 4	EPDC	Maus	Ausbreitung und Differenzierung zu ECs und CMs	ja	28 Tage	[106]
Isx-1 und 2	EPDC	Maus	kardiomyogene Differenzierung	ja	7 Tage	[13d]
c-kit⁺-Herzprogenitorzellen:						
IGF-1/HGF ^[d]	CPC	Maus, Schwein	Proliferation und myogene Differenzierung	ja	21 Tage	[87]
Jl-38	CPC	Ratte	Proliferation	ja	28 Tage	[79]
In-vivo-Umprogrammierung somatischer Herzzellen:						
miR1/133/208/499 ^[e]	CF	Maus	Konvertierung in CMs	nicht feststellbar	28 Tage	[8]
Knochenmark-abgeleitete Progenitorzellen:						
SDF-1 ^[f]	BMC	Ratte	Rekrutierung	ja	28 Tage	[90]

[a] BMC: Knochenmark-abgeleitete Progenitorzelle, CF: Herzfibroblast, CM: Kardiomyozyt, CPC: Herzprogenitorzelle, EC: Endothelzelle, EPDC: Epikardzelle. [b] Subkutane Injektion von LNA-modifizierten antimiRs. [c] Intramyokardiale Injektion von AAV9-Vektoren, die die miR exprimieren. [d] Intrakoronare Injektion von zwei Proteinen. [e] Intramyokardiale Injektion von Lentiviren-kodierenden miRs. [f] Intramyokardiale Injektion von Nanofasern.

End translattiert werden, um das Protein in situ mithilfe des zelleigenen Proteinsyntheseapparats zu produzieren. In einer bahnbrechenden Arbeit haben Karikó et al. gezeigt, dass ein Ersatz von Uridin-5'-triphosphat durch Pseudouridin-5'-triphosphat während einer In-vitro-Transkriptionsreaktion modRNA erzeugt, wobei jedes Uridin (**32**) durch Pseudouridin (**33**), ein natürlich auftretendes modifiziertes Nukleotid (Abbildung 12), ersetzt wird.^[109] Diese modRNA unterdrückt die RNA-vermittelte Immunaktivierung und verbessert zudem die Translationskapazität der mRNA.^[109]

Weitere Arbeiten von Warren et al. zur Umprogrammierung menschlicher Zellen auf Pluripotenz und zur gerichteten Differenzierung haben gezeigt, dass ein vollständiger Ersatz von Uridin durch Pseudouridin und der Ersatz von Cytidin (**34**) durch 5-Methylcytidin (**35**) die Immunreaktion weiter verminderte und die Proteinexpression erhöhte.^[110] Kormann et al. haben zudem demonstriert, dass der Ersatz von 25 % des Uridins und Cytidins durch 2-Thiouridin (**36**) bzw. 5-Methylcytidin die mRNA-Bindung an den Toll-Like-Rezeptor (TLR) 3, TLR7, TLR8 und den RNA-empfindlichen Immunsensor „Retinsäure-induzierbares Protein I“ (RIG-I) reduzierte; außerdem wurde die angeborene Immunantwort deutlich weniger stark aktiviert und zugleich die Stabilität der mRNA erhöht, was eine längere Proteinexpression ermöglichte.^[111]

Zangi et al. verwendeten erst vor kurzem modRNA, die den humanen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A) kodiert, einen angiogenen Faktor, der signalgebend über seinen Rezeptor KDR wirkt.^[112] Eine intramyokardiale Injektion von VEGF-A-modRNA in Mäuse führte zu besseren Behandlungsergebnissen im Myokard nach

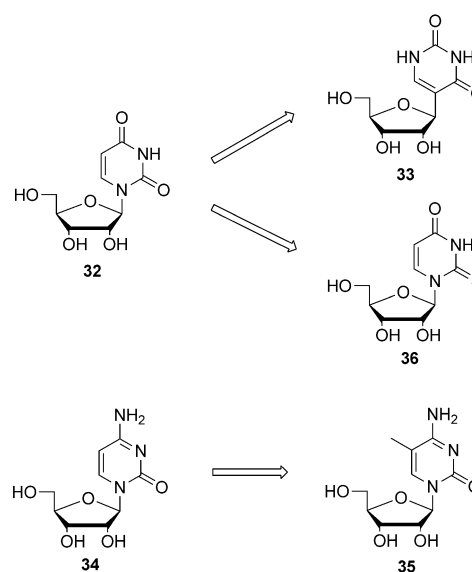


Abbildung 12. Die modifizierte RNA wird in einer In-vitro-Transkriptionsreaktion mit einer T7-Polymerase synthetisiert.^[110] In dieser Reaktion können die Pyrimidinbasen Uridin und Cytidin ersetzt werden.

einem MI, was teilweise auf die verbesserte Bildung funktioneller Gefäße im verletzten Herzen zurückzuführen war. Interessanterweise wurde der Herzprogenitormarker Wt1 von der VEGF-A-modRNA erheblich hochreguliert, was belegt, dass der Pool von Wt1 + EPDCs vergrößert und die Differenzierung dieser Progenitorzellen zu Endothelzellen

verbessert wurde. Es wurde auch eine geringfügige Verstärkung der Kardiomyozytendifferenzierung beobachtet, es ist allerdings unwahrscheinlich, dass dieser Effekt therapierelevant werden kann. Diese Studie illustriert modRNA als faszinierende neue Modalität für die transiente Expression von Proteinen *in vivo*; eine weitere Erhöhung der mRNA-Stabilität, wodurch die Proteinexpression sowie der Wirkstoff-Transport zum gewünschten Gewebe – oder gar Zelltyp – noch effizienter werden würden, könnte die Perspektiven dieser Methode noch verbessern.

3. Hürden in der Wirkstoff-Forschung

Wegen der komplexen Struktur des Herzens sind bei jeder Modalität viele Hürden zu überwinden, bevor wirksame und sichere Arzneimittel entwickelt werden können. Trotz der Fortschritte bei der Klärung der Wirkmechanismen zahlreicher Substanzen ist bei weitem noch nicht geklärt, wie unterschiedliche Substanzen ihre jeweiligen biologischen Wirkungen hervorrufen. So zeigt beispielsweise eine Reihe von Wachstumsfaktoren mehrfache Wirkungen, und von Natur aus wirken die miRs oder anti-miRs auf viele Gene und potenziell auf Signalwege. Zudem ist die Physiologie adulter Stammzellen immer noch wenig verstanden, was unser Wissen darüber, wo eine bestimmte adulte Stammzellenpopulation im Herzen vorkommt, wie sie aktiviert und/oder mobilisiert wird, wie sie amplifiziert wird und sich differenziert, weiter einschränkt. Daher ist noch viel Forschungsaufwand erforderlich, um die beteiligten molekularen Mechanismen zu verstehen und so letztlich neue Zielstrukturen und Signalwege für die Wirkstoff-Forschung aufzudecken. Wie die Wirkung einer Reihe von Kombinationstherapien bereits angedeutet hat, könnten weitere, phänotypische oder polypharmakologische Lösungsansätze größere Chancen bieten.

3.1. Übertragung vom Modell auf den Menschen

Um eine Leitverbindung erfolgreich durch den Prozess der Wirkstoff-Forschung und -Entwicklung zu führen, muss man ausgehend von biochemischen *In-vitro*-Studien und Zellassays über Wirksamkeitsstudien in präklinischen Modellen und Sicherheitsstudien an Tieren letztlich die Wirkung der Verbindung auf menschliche Patienten übertragen. Die Überführung von *In-vitro*-Aktivität in therapeutisch nützliche *In-vivo*-Wirkung ist eine der größten Hürden. Will man Erfolge auf diesem Gebiet erzielen, müssen neue Methoden und Techniken entwickelt werden, einschließlich neuer Bildgebungs- und diagnostischer Verfahren sowie Biomarker, mit denen sich Wirksamkeit und Sicherheit zuverlässig vorhergesagen lassen. Zu beachten ist, dass Therapien, die in Krankheitsmodellen mit Nagetieren routinemäßig funktionieren, nicht unbedingt dieselbe Wirkung beim Menschen zeigen. Tierexperimente haben jedoch erhebliche Beiträge zum Verständnis von Krankheiten beim Menschen geleistet, und es sind ermutigende Daten für einige der beschriebenen therapeutischen Modalitäten verfügbar. Sie müssen allerdings fortlaufend verbessert werden, um die Wirksamkeit von Be-

handlungsstrategien in klinischen Studien besser vorhersagen zu können.^[113] Für die Herzregeneration werden mehrere Tierarten als Modelle verwendet. Nicht-Nagetierspezies bieten Vorteile wie größere Körpergröße, Ähnlichkeit mit der menschlichen Physiologie und Pathologie und höhere Lebenserwartung. So gleichen beispielsweise Größe und Anatomie eines Schweineherzens stark denen des menschlichen Herzens, und der Krankheitsstatus kann genauer nachvollzogen werden.

Die Übertragung der Wirkung einer Verbindung von Tieren auf Menschen erfordert ein tiefgreifendes Verständnis der biologischen Signalwege über die Grenzen von Spezies und speziesspezifischen Eigenschaften hinweg. Unterschiede bei der Manipulation von Signalkaskaden können entgegengesetzte Wirkungen hervorrufen, die dieses Verständnis erschweren können. Bemerkenswerterweise reguliert p38MAPK die Erzeugung von hESC-abgeleiteten Kardiomyozyten negativ, fördert aber die Bildung von Kardiomyozyten aus Maus-ESCs.^[114]

3.2. Wahl des Behandlungszeitpunkts nach einem MI

Schlagende Herzzellen können bereits *in vitro* generiert werden (auch wenn sie möglicherweise nicht voll entwickelt sind), aber das Verständnis der Faktoren, die die Reparatur von Kardiomyozyten-Progenitorzellen und des Herzens während der Entwicklung oder nach einer Verletzung steuern, entwickelt sich noch immer weiter. Dieses Wissen ist nötig, um die Regeneration des Herzens zeitgenau und effizient stimulieren zu können. Für eine maximale Wirksamkeit ist die genaue Aufklärung der PK-PD-Beziehungen des Wirkstoffs entscheidend, um einen passenden Dosierungsplan aufstellen und so die benötigte Wirkstoff-Konzentration im Herzen erzielen zu können. Niedermolekulare Verbindungen können präzise an das Herz abgegeben werden; zudem sind ihre PK-PD-Beziehungen gut verstanden, was in einer dynamischen klinischen Situation von Vorteil ist.

Wir müssen uns bewusst sein, dass fehlende Wirksamkeit und sogar Sicherheitsbedenken auch eine Frage des richtigen Timings sein können. So kann die Verabreichung eines Therapeutikums unmittelbar nach einem MI die Herzmuskelregeneration verbessern und die fibrotische Reaktion einschränken. Allerdings muss die Herzwand ausreichend stark sein, um dem Druck eines schlagenden Herzens standhalten zu können, weshalb ein gewisses Maß an fibrotischer Reparatur erforderlich sein kann. Eulalio et al. haben gezeigt, dass das Timing der miR-Expression entscheidend ist: Eine gute Wirkung wurde erzielt, wenn die miRs unmittelbar nach dem MI, nicht aber, wenn sie mehrere Tage später injiziert wurden.^[5c] Zusätzlich zum richtigen Zeitpunkt ist auch die Behandlungsdauer wichtig. Eine Dosierung von rhNRG-1 über 10 Tage verbessert die Funktion für mindestens 90 Tage.^[99a] Allerdings wirken einige Behandlungen wahrscheinlich akut, während andere eine größere Wirkung auf den längerfristigen Umbau des Herzgewebes haben mögen, und vielleicht ist sogar eine längere kontinuierliche Therapie nötig, um eine günstige Wirkung auf die Herzstruktur und -funktion sowie die Überlebensrate zu zeigen.^[9]

3.3. Sicherheitsaspekte

Da viele Modalitäten auf grundlegende entwicklungsphysiologische Signalwege abzielen, wurden verständlicherweise Bedenken im Hinblick auf die Sicherheit regenerativer Therapien geäußert, z. B. was die Möglichkeit für genetische Instabilität angeht, die beispielsweise zu Proliferationsstörungen, einschließlich Tumorbildung und -wachstum, führen kann. Die Dosierung jeder Verbindung muss verstanden und kontrolliert und sorgfältig bezüglich ihrer Auswirkungen auf andere Gewebe überwacht werden. Die Entwicklung von Verfahren zur Identifizierung möglicher Sicherheitsrisiken – wie quantitative präklinische und klinische Bildgebungstechniken – wird entscheidend dafür sein, die Sicherheitsaspekte der Stimulation einer Reparatur beschädigten Gewebes ausgehend von endogenen Stammzellenquellen genauer aufzuklären. Zudem sind ein detailliertes Genexpressions-Profil und eine bioinformatische Analyse wichtig, um Genexpressionsmuster zu verfolgen; dieses Wissen kann auch dazu verwendet werden, Wirkstoff-Kandidaten mit wünschenswerten Eigenschaften zu finden, während zugleich Nebenwirkungen eliminiert oder minimiert werden.

Es sind auch unerwünschte epigenetische Veränderungen möglich, die tiefgehende Auswirkungen auf Zellen haben könnten, da die Biologie normaler adulter Stammzellen durch epigenetische Programmierung reguliert wird.^[115] Daher ist es wichtig, die mit der Behandlung assoziierten globalen epigenetischen Veränderungen zu studieren. Die Charakterisierung der Beziehungen zwischen dem Epigenom, der Pluripotenz und der Tumorgenität dürfte für die Entwicklung sicherer regenerativer Medikamente nützlich sein.^[116]

Eine Strategie zur Verringerung nachteiliger Effekte in Nicht-Herzgewebe besteht darin, im Anschluss an einen MI gezielt das Herz, möglicherweise sogar das Infarkt-Randgebiet zu adressieren (Abbildung 13).^[117] Es können mehrere Techniken zur Anwendung kommen, einschließlich der direkten intramyokardialen Injektion während eines Eingriffs am offenen Herzen und katheterbasierter Verfahren.^[2b] Allerdings ist für eine längere Therapie eine weniger invasive Behandlung erforderlich. Nach einem MI setzt das verletzte Herz häufig spezifische Proteine frei, die es vom umgebenden, gesunden Gewebe unterscheiden und einen Angriffspunkt bieten, um die interessierende Zielstruktur zu adressieren. Das SDF1-GPVI-Fusionsprotein, bei dem das GPVI-Protein das lenkende Molekül ist, ist ein Beispiel.^[92] Ein weiteres Beispiel ist das Thrombozyten(P)-Selectin, ein Rezeptor auf Endothelzellen, der das Wandern von Zellen vermittelt und im ischämischen Myokard hochreguliert wird. Scott et al. injizierten systemisch einen P-Selectin-Antikörper, der mit VEGF-tragenden Immunliposomen konjugiert war, und wiesen Verbesserungen der Herzfunktion nach, die mit unspezifischem VEGF nicht beobachtet wurden.^[118] Die genannten Beispiele verdeutlichen das Potenzial einer gezielten Heranführung verschiedener therapeutischer Modalitäten an ein verletztes Herz nach systemischer Injektion.

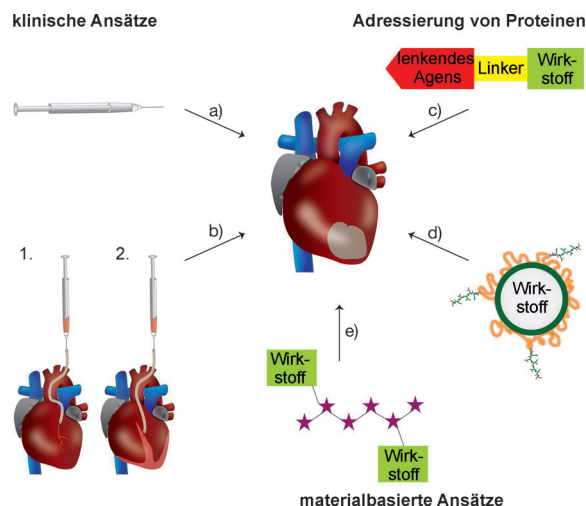


Abbildung 13. Strategien für gezielte kardioregenerative Therapien: a) intramyokardiale Injektion beim Eingriff am offenen Herzen; b) katheterbasierte Vorgehensweisen wie 1. intrakoronare Injektion und 2. intramyokardiale Injektion; c) bispezifische Konjugate mit einer auf das verletzte Herz gerichteten Komponente, die über einen geeigneten Linker mit dem Wirkstoff verbunden ist; d) Liposomen, die Wirkstoff-Moleküle enthalten, über einen Linker mit Antikörpern oder Peptiden beschichtet, um Proteine oder Rezeptoren in einem verletzten Herzen zu adressieren; e) Biopolymere zum Lokalisieren von Wirkstoffen in den verletzten Regionen.

3.4. Eine breite interdisziplinäre Zusammenarbeit ist nötig

Die beschriebenen Hürden und Chancen erfordern eine interdisziplinäre Zusammenarbeit, und Forscher müssen bereit sein, sich in neue Bereiche zu begeben (Abbildung 14). So wird es wohl Möglichkeiten für Kombinationstherapien unter Verwendung verschiedener therapeutischer Modalitäten geben, wofür man wahrscheinlich neue Verabreichungstechniken entwickeln muss. Das Wissen über Stammzellen und Entwicklungsbiologie muss stark vertieft werden, damit alle chemischen, DMPK- und Sicherheitsaspekte (DMPK = drug metabolism and pharmacokinetics) über die Grenzen zwischen Makromolekülen und niedermolekularen Verbindungen hinweg berücksichtigt sind. Es ist eine enge Zusammenarbeit sowohl mit Experten in Verabreichungstechniken und Gerätetechnologie als auch mit



Abbildung 14. Interdisziplinäre Forschung ist nötig.

Ärzten, die Erfahrung in der kardiovaskulären Medizin haben, erforderlich. Viele dieser Fortschritte werden von einer sehr produktiven Zusammenarbeit zwischen Wissenschaftlern in Hochschulen und der Industrie vorangetrieben werden und dürften noch zu wichtigen Durchbrüchen für die Bewältigung dieser bedeutenden Aufgaben führen.

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Nur wenige therapeutische Bereiche sind so stark gewachsen wie in jüngster Zeit das Gebiet der Herzregenerationsmedizin. Dennoch bleibt deren langfristiges therapeutisches Potenzial auch weiterhin unsicher. Studien mit unterschiedlichen chemischen und therapeutischen Modalitäten helfen bei der Aufklärung und Beeinflussung der zugrundeliegenden, komplexen biologischen Abläufe; Beispiele haben positive Wirkungen auf die Kardiomyozytenbildung, die Verkleinerung des beschädigten Bereichs nach einem MI und die Herzfunktion gezeigt. Einige Wirkstoffe, z.B. NRG-1, zeigten günstige Effekte in klinischen Versuchen und weisen den Weg hin zur Entdeckung neuer Therapien. Der Einsatz niedermolekularer Verbindungen ist weniger weit fortgeschritten, es finden sich aber auch hier mittlerweile Beispiele. Außerdem wurde vor einigen Jahren das erste regenerative, in situ auf gewebetypische Progenitorzellen wirkende niedermolekulare Medikament, Eltrombopag, für Patienten mit Thrombozytopenie zugelassen.^[119]

Neuartige Screening-Methoden, einschließlich phänotypischer Ansätze, sowie die Verfügbarkeit relevanter menschlicher Zellen und Krankheitsmodelle ermöglichen die Entdeckung neuer Wirkstoffe. Während es möglich war, eine Reihe von Signalwegen und endogenen Signalen zu ermitteln, die mit den gewünschten biologischen Wirkungen zusammenhängen, bleibt jedoch eine der Schwierigkeiten die Dekonvolution der tatsächlichen molekularen Zielstruktur(en). Hier gibt es zwar Fortschritte, teilweise dank moderner, leistungstarker Massenspektrometrietechniken,^[120] klar aber ist, dass zur Zieldekonvolution neue Techniken erforderlich sein werden. Diese Entwicklungen auf dem Gebiet der Herzregeneration, einschließlich der Anwendung auf viele der hier vorgestellten Beispiele, könnten interessante biologische Zielstrukturen für eine Intervention mithilfe alternativer chemischer Modalitäten aufdecken.

Ein genaues Verständnis der modulierten Signalwege ist sowohl für eine gute Wirksamkeit als für eine ausreichende Sicherheit der Therapie erforderlich. Dazu gehört die Übertragung der Wirkungen aus Tiermodellen auf den Menschen, wobei man auch die Unterschiede zwischen den jeweiligen Spezies identifizieren muss, da diese sich auf das Ergebnis der Therapie auswirken können. Außerdem ist der Zeitpunkt der Behandlung wichtig; daher sind das Verständnis der PK-PD-Profile sowie die Identifizierung geeigneter Biomarker erforderlich, um wirksame und sichere Dosierungspläne aufstellen zu können. Fortschritte bei chemischen Methoden und bei Anwendungen in der Biotechnologie ermöglichen die Synthese, Modifizierung und Optimierung verschiedener therapeutischer Modalitäten, um Moleküle mit variablen

ADME- und Wirksamkeitseigenschaften zu erhalten und so zu optimalen PK-PD-Eigenschaften zu gelangen.

Die Auswirkungen einer regenerativen Behandlung auf andere Gewebe müssen sorgfältig überwacht werden, um Nebenwirkungen zu minimieren. Hierfür wird es vorteilhaft sein, quantitative Bildgebungstechniken, detailliertes Genexpressions-Profilings und leistungsstarke bioinformatische Analysemethoden zur Verfolgung von Genexpressionsmustern zu entwickeln. Eine Strategie zur Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen in Nicht-Herzgewebe ist die zielgerichtete, nichtinvasive Adressierung des Herzens. Es gibt in diesem Bereich mittlerweile einige interessante Beispiele wie bispezifische Konjugate und Immunliposomen, und neue Techniken – und deren Anwendung auf z.B. Biopolymere – dürften interessante Möglichkeiten für eine solche Adressierung nach systemischer Verabreichung bieten. Viele der genannten Entwicklungen werden durch eine hochproduktive Zusammenarbeit zwischen Wissenschaftlern an Hochschulen und in der Industrie vorangetrieben werden.

Wie wir in diesem Aufsatz verdeutlichen wollten, gibt es immer mehr Anhaltspunkte dafür, dass die endogene Modulation adulter Stammzellen, die Induktion der Kardiomyozytenproliferation sowie die Umprogrammierung spezifischer Zelllinien (z.B. Herzfibroblasten) zur Generierung funktionstüchtiger Kardiomyozyten mithilfe von niedermolekularen Verbindungen und Makromolekülen erreichbare Ziele sind. Man wird neue Möglichkeiten schaffen, um chemische Methoden in unterschiedlichsten Zusammenhängen über die traditionellen Grenzen zwischen nieder- und makromolekularen Verbindungen hinweg nutzen zu können. Wenngleich es auch weiterhin beachtliche technische Hürden gibt, könnte es irgendwann doch möglich sein, mithilfe der hier vorgestellten regenerativen therapeutischen Strategien das Problem des Mangels an Herzspendern und humanen Kardiomyozyten zu überwinden und damit letztlich die Art, wie wir Herzinsuffizienz behandeln, grundlegend zu verändern.

Wir danken Mei Ding und Henrik Andersson für die Sammlung der Daten zur Kardiomyozytenproliferation, Lauren Drowley, Tony Johansson, Lennart Lindfors und Yafeng Xue für ihre Beiträge zu den Abbildungen sowie Åsa Lindelöf und Nidhal Selmi für Literaturbeiträge.

Eingegangen am 9. August 2013

Online veröffentlicht am 27. Januar 2014

- [1] D. Lloyd-Jones, R. J. Adams, T. M. Brown, M. Carnethon, S. Dai, G. D. Simone, B. Ferguson, E. Ford, K. Furie, C. Gillespie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, P. M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, M. Mussolino, G. Nichol, V. L. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, R. Stafford, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. D. Wong, J. Wylie-Rosett, *Circulation* **2009**, *119*, 480–486.
- [2] a) J. Tongers, D. W. Losordo, U. Landmesser, *Eur. Heart J.* **2011**, *32*, 1197–1206; b) L. M. Ptaszek, M. Mansour, J. N. Ruskin, K. Chien, *Lancet* **2012**, *379*, 933–942.
- [3] P. Anversa, B. Nadal-Ginard, *Nature* **2002**, *415*, 240–243.

- [4] O. Bergmann, R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabé-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. A. Buchholz, H. Druid, S. Jovine, J. Frisén, *Science* **2009**, *324*, 98–102.
- [5] a) J. Kajstura, K. Urbanek, S. Perl, T. Hosoda, H. Zheng, B. Ogórek, J. Ferreira-Martins, P. Goichberg, C. Rondon-Clavo, F. Sanada, D. D'Amario, M. Rota, F. Del Monte, D. Orlic, J. Tisdale, A. Leri, P. Anversa, *Circ. Res.* **2010**, *107*, 305–315; b) K. Bersell, S. Arab, B. Haring, B. Kuhn, *Cell* **2009**, *138*, 257–270; c) A. Eulalio, M. Mano, M. Dal Ferro, L. Zentillin, G. Sinagra, S. Zacchigna, M. Giacca, *Nature* **2012**, *492*, 376–381.
- [6] a) C. Jopling, E. Sleep, M. Rava, M. Marti, A. Rava, J. C. I. Belmonte, *Nature* **2010**, *464*, 606–609; b) K. Kikuchi, J. E. Holdway, A. A. Werdich, R. M. Anderson, Y. Fang, G. F. Egnaczyk, T. Evans, C. A. Macrae, D. Y. Stainier, K. D. Poss, *Nature* **2010**, *464*, 601–605.
- [7] a) P. C. H. Hsieh, V. F. M. Segers, M. E. Davis, C. MacGillivray, J. Gannon, J. D. Molkentin, J. Robbins, R. T. Lee, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 970–974; b) P. Anversa, J. Kajstura, M. Rota, A. Leri, *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 62–70.
- [8] T. M. Jayawardena, B. Egemnazarov, E. A. Finch, L. Zhang, J. A. Payne, K. Pandya, Z. Zhang, P. Rosenberg, M. Mirosou, V. J. Dzau, *Circ. Res.* **2013**, *110*, 1465–1473.
- [9] A. Aguirre, I. Sancho-Martinez, J. C. I. Belmonte, *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 275–284.
- [10] A. Sturzu, S. M. Wu, *Circ. Res.* **2011**, *108*, 353–364.
- [11] a) C. A. Lyssiotis, L. L. Lairson, A. E. Boitano, H. Wurdak, S. Zhu, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 210–256; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 200–242; b) W. Li, K. Jiang, W. Wei, Y. Shi, S. Ding, *Cell Res.* **2013**, *23*, 81–91; c) L. L. Lairson, C. A. Lyssiotis, S. Zhu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 107–125.
- [12] a) E. R. Porrello, *Clin. Sci.* **2013**, *125*, 151–166; b) V. F. Segers, R. T. Lee, *J. Cardiovasc. Trans. Res.* **2010**, *3*, 469–477; c) E. M. Green, R. T. Lee, *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 311–325.
- [13] a) NMR-Struktur von Thymosin β 9, einem Mitglied der Thymosin- β 4-Familie, ist dargestellt; R. Stoll, W. Voelter, T. A. Holak, *Biopolymers* **1997**, *41*, 623–634; b) Oligonukleotidsequenz von anti-miR-15b; c) Röntgenstruktur des insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF)-1 ist dargestellt (PDB-Code: 1gzr); d) chemische Struktur von Isx1; J. L. Russell, S. C. Goetsch, H. R. Aguilar, D. E. Frantz, J. W. Schneider, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1067–1076.
- [14] X. Huang, R. G. Aslanian, *Case Studies in Modern Drug Discovery and Development* (Hrsg.: X. Huang, R. G. Aslanian), Wiley, Hoboken, **2012**, S. 472.
- [15] A. J. Russell, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 365–368.
- [16] E. Willems, M. Lanier, E. Forte, F. Lo, J. Cashman, M. Mercola, *J. Cardiovasc. Trans. Res.* **2011**, *4*, 340–350.
- [17] M. E. Bunnage, E. L. Chekler, L. H. Jones, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 195–199.
- [18] A. F. Fliri, W. T. Loging, P. F. Thadeio, R. A. Volkmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 261–266.
- [19] A. Bornot, U. Bauer, A. Brown, M. Firth, C. Hellawell, O. Engkvist, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1197–1210.
- [20] S. C. Benson, H. A. Pershad Singh, C. I. Ho, A. Chittiboyina, P. Desai, M. Pravenec, N. Qi, J. Wang, M. A. Avery, T. W. Kurtz, *Hypertension* **2004**, *43*, 993–1002.
- [21] Beispiel: S. M. Huang, Y. M. Mishina, S. Liu, A. Cheung, F. Stegmeier, G. A. Michaud, O. Charlat, E. Willellette, Y. Zhang, S. Wiessner, M. Hild, X. Shi, C. J. Wilson, C. Mickanin, V. Myer, A. Fazal, R. Tomlinson, F. Serluca, W. Shao, H. Cheng, M. Shultz, C. Rau, M. Schirle, J. Schlegl, S. Ghidelli, S. Fawell, C. Lu, D. Curtis, M. W. Kirschner, C. Lengauer, P. M. Finan, J. A. Tallarico, T. Bouwmeester, J. A. Porter, A. Bauer, F. Cong, *Nature* **2009**, *461*, 614–620.
- [22] U. S. Eggert, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 206–209.
- [23] M. K. B. Jonsson, Q.-D. Wang, B. Becker, *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, *9*, 589–599.
- [24] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 993–996.
- [25] S. Ziegler, V. Pries, C. Hedberg, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2808–2859; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2744–2792.
- [26] Y. Tian, E. D. Cohen, E. E. Morrissey, *Pediatr. Cardiol.* **2010**, *31*, 342–348.
- [27] A. Voronkov, S. Krauss, *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 634–664.
- [28] X. Lian, C. Hsiao, G. Wilson, K. Zhu, L. B. Hazeltine, S. M. Azarin, K. K. Raval, J. Zhang, T. J. Kamp, S. P. Palecek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E1848–E1857.
- [29] K. C. Davidson, A. M. Adams, J. M. Goodson, C. E. McDonald, J. C. Potter, J. D. Berndt, T. L. Biechele, R. J. Taylor, R. T. Moon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4485–4490.
- [30] E. Willems, S. Davidovics, M. Lanier, Z. Xia, M. Dawson, J. Cashman, M. Mercola, *Circ. Res.* **2011**, *109*, 360–364.
- [31] a) B. Chen, M. E. Dodge, W. Tang, J. Lu, Z. Ma, C.-W. Fan, S. Wei, W. Hao, J. Kilgore, N. S. Williams, M. G. Roth, J. F. Amatruda, C. Chen, L. Lum, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 100–107; b) J. Lu, Z. Ma, J.-C. Hsieh, C.-W. Fan, B. Chen, J. C. Longgood, N. S. Williams, J. F. Amatruda, L. Lum, C. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3825–3827.
- [32] H. Wang, J. Hao, C. C. Hong, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 192–197.
- [33] M. Lanier, D. Schade, E. Willems, M. Tsuda, S. Spiering, J. Kalisiak, M. Mercola, J. R. Cashman, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 697–708.
- [34] T. T. Ni, E. J. Rellinger, A. Mukherjee, S. Xie, L. Stephens, C. A. Thorne, K. Kim, J. Hu, E. Lee, L. Marnett, A. K. Hatzopoulos, T. P. Zhong, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1658–1668.
- [35] I. Minami, K. Yamada, T. G. Otsuji, T. Yamamoto, Y. Shen, S. Otsuka, S. Kadota, N. Morone, M. Barve, Y. Asai, T. Tenkova-Heuser, J. E. Heuser, M. Uesugi, K. Aiba, N. Nakatsuji, *Cell Reports* **2012**, *2*, 1448–1460.
- [36] a) R. Gonzalez, J. W. Lee, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11377–11381; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11181–11185; b) D. B. Ring, K. W. Johnson, E. J. Henriksen, J. M. Nuss, D. Goff, T. R. Kinnick, S. T. Ma, J. W. Reeder, I. Samuels, T. Slabiak, A. S. Wagman, M. E. Hammond, S. D. Harrison, *Diabetes* **2003**, *52*, 588–595.
- [37] a) A.-S. Tseng, F. B. Engel, M. T. Keating, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 957–963; b) L. Meijer, A. L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl, P. Greengard, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1255–1266.
- [38] S. Berg, M. Bergh, S. Hellberg, K. Högdin, Y. Lo-Alfredsson, P. Söderman, S. von Berg, T. Weigelt, M. Örmö, Y. Xue, J. Tucker, J. Neelissen, E. Jerning, Y. Nilsson, R. Bhat, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9107–9119.
- [39] E. Willems, J. Cabral-Teixeira, D. Schade, W. Cai, P. Reeves, P. J. Bushway, M. Lanier, C. Walsh, T. Kirchhausen, J. C. Izpisua, J. Cashman, M. Mercola, *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 242–252.
- [40] D. Schade, M. Lanier, E. Willems, K. Okolotowicz, P. Bushway, C. Wahlquist, C. Gilley, M. Mercola, J. Cashman, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9946–9957.
- [41] W.-Y. Choi, M. Gemberling, J. Wang, J. E. Holdway, M.-C. Shen, R. O. Karlstrom, K. D. Poss, *Development* **2013**, *140*, 660–666.
- [42] A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, M. Ogawa, H. Masai, A. Miyawaki, *Cell* **2008**, *132*, 487–498.

- [43] M. Frank-Kamenetsky, X. M. Zhang, S. Bottega, O. Guicherit, H. Wichterle, H. Dudek, D. Bumcrot, F. Y. Wang, S. Jones, J. Shulok, L. L. Rubin, J. A. Porter, *J. Biol.* **2002**, *1*, 10.
- [44] X. J. Liu, Q. Xie, Y. F. Zhu, C. Chen, N. Ling, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32419–32422.
- [45] G. J. Inman, F. J. Nicolás, J. F. Callahan, J. D. Harling, L. M. Gaster, A. D. Reith, N. J. Laping, C. S. Hill, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 65–74.
- [46] S. W. Oh, J. B. Lee, B. Kim, S. Jeon, M.-K. Kim, K.-H. Nam, J.-R. Ha, M. Bhatia, G. T. Oh, D. Y. Kim, *Arch. Pharmacol. Res.* **2012**, *35*, 1979–1988.
- [47] H. Sadek, B. Hannack, E. Choe, J. Wang, S. Latif, M. G. Garry, D. J. Garry, J. Longgood, D. E. Frantz, E. N. Olson, J. Hsieh, J. W. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6063–6068.
- [48] J. L. Russell, S. C. Goetsch, H. R. Aguilar, H. Coe, X. Luo, N. Liu, E. van Rooij, D. E. Frantz, J. W. Schneider, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1077–1083.
- [49] D. A. Smith, L. Di, E. H. Kerns, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 929–939.
- [50] M. J. Waring, *Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, *5*, 235–248.
- [51] A. T. Plowright, C. Johnstone, J. Kihlberg, J. Pettersson, G. Robb, R. A. Thompson, *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 56–62.
- [52] M. D. Shultz, A. K. Cheung, C. A. Kirby, B. Firestone, J. Fan, C. H.-T. Chen, Z. Chen, D. N. Chin, L. DiPietro, A. Fazal, Y. Feng, P. D. Fortin, T. Gould, B. Lagu, H. Lei, F. Lenoir, D. Majumdar, E. Ochala, M. G. Palermo, L. Pham, M. Pu, T. Smith, T. Stams, R. C. Tomlinson, B. B. Touré, M. Visser, R. M. Wang, N. J. Waters, W. Shao, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6495–6511.
- [53] P. D. Leeson, B. Springthorpe, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 881–890.
- [54] D.-W. Jung, D. R. Williams, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1773–1790.
- [55] P. Trang, J. F. Wiggins, C. L. Daige, C. Cho, M. Omotola, D. Brown, J. B. Weidhaas, A. G. Bader, F. J. Slack, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 1116–1122.
- [56] L. T. Bish, K. Morine, M. M. Sleeper, J. Sanmiguel, D. Wu, G. Gao, J. M. Wilson, H. L. Sweeney, *Hum. Gene Ther.* **2008**, *19*, 1359–1368.
- [57] a) J. Stenvang, A. Petri, M. Lindow, S. Obad, S. Kauppinen, *Silence* **2012**, *3*, 1–17; b) E. van Rooij, *Circ. Res.* **2011**, *108*, 219–234.
- [58] a) G. F. Deleavey, M. J. Damha, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 937–954; b) T. P. Prakash, *Chem. Biodiversity* **2011**, *8*, 1616–1641.
- [59] a) S. Davis, B. Lollo, S. Freier, C. Esau, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2294–2304; b) P. P. Seth, G. Vasquez, C. A. Allerson, A. Berdeja, H. Gaus, G. A. Kinberger, T. P. Prakash, M. T. Migawa, B. Bhat, E. E. Swayze, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1569–1581.
- [60] M. Petersen, J. Wengel, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 74–81.
- [61] T. G. Hullinger, R. L. Montgomery, A. G. Seto, B. A. Dickinson, H. M. Semus, J. M. Lynch, C. M. Dalby, K. Robinson, C. Stack, P. A. Latimer, J. M. Hare, E. N. Olson, E. van Rooij, *Circ. Res.* **2012**, *110*, 71–81.
- [62] a) J. Summerton, D. Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187–195; b) W. P. Kloosterman, A. K. Lagendijk, R. F. Ketting, J. D. Moulton, R. H. Plasterk, *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e203.
- [63] a) J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, R. Braich, K. G. Rajeev, J. Pena, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2885–2892; b) J. Krutzfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685–689.
- [64] S. Henry, K. Stecker, D. Brooks, D. Monteith, B. Conklin, C. F. Bennett, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 468–479.
- [65] E. van Rooij, E. N. Olson, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 860–872.
- [66] R. A. Boon, K. Iekushi, S. Lechner, T. Seeger, A. Fischer, S. Heydt, D. Kaluza, K. Tréguer, G. Carmona, A. Bonauer, A. J. G. Horrevoets, N. Didier, Z. Girmatsion, P. Biliczki, J. R. Ehrlich, H. A. Katus, O. J. Müller, M. Potente, A. M. Zeiher, H. Hermeking, S. Dimmeler, *Nature* **2013**, *495*, 107–111.
- [67] H. Hermeking, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 613–626.
- [68] E. R. Porrello, A. I. Mahmoud, E. Simpson, B. A. Johnson, D. Grinsfelder, D. Canseco, P. P. Mammen, B. A. Roethermel, E. N. Olson, H. A. Sadek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 187–192.
- [69] E. R. Porrello, B. A. Johnson, A. B. Aurora, E. Simpson, Y.-J. Nam, S. J. Matkovich, G. W. Dorn II, E. van Rooij, E. N. Olson, *Circ. Res.* **2011**, *109*, 670–679.
- [70] a) K. Song, Y.-J. Nam, X. Luo, X. Qi, W. Tan, G. N. Huang, A. Acharya, C. L. Smith, M. D. Tallquist, E. G. Neilson, J. A. Hill, R. Bassel-Duby, E. N. Olson, *Nature* **2012**, *485*, 599–604; b) L. Qian, Y. Huang, C. I. Spencer, S. J. Conway, J.-D. Fu, D. Srivastava, *Nature* **2012**, *485*, 593–598.
- [71] J. E. Thompson, R. M. Cubbon, R. T. Cummings, L. S. Wicker, R. Frankshun, B. R. Cunningham, P. M. Cameron, P. T. Meinke, N. Liverton, Y. Weng, J. A. DeMartino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1219–1223.
- [72] a) J. Elmén, M. Lindow, S. Schütz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjärn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup, S. Kauppinen, *Nature* **2008**, *452*, 896–899; b) H. L. Janssen, H. W. Reesink, S. Zeuzem, E. Lawitz, M. Rodriguez-Torres, A. Chen, C. Davis, B. King, A. A. Levin, M. R. Hodges, *Hepatology* **2011**, *54*, 1430A.
- [73] D. D. Young, C. M. Connelly, C. Grohmann, A. Deiters, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7976–7981.
- [74] a) D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136–147; b) B. Leader, Q. J. Baca, D. E. Golan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 21–39.
- [75] D. S. Pisal, M. P. Kosloski, S. V. Balu-Iyer, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 2557–2575.
- [76] a) D. W. Scott, A. S. De Groot, *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, i72–i76; b) R. J. Solá, K. Griebenow, *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 1223–1245; c) J. S. Kang, P. P. DeLuca, K. C. Lee, *Expert Opin. Emerging Drugs* **2009**, *14*, 363–380.
- [77] a) A. Dumas, C. D. Spicer, Z. Gao, T. Takehana, Y. A. Lin, T. Yasukohchi, B. G. Davis, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4008–4013; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3916–3921; b) R. Serwa, P. Majkut, B. Horstmann, J.-M. Swiechicki, M. Gerrits, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 596–602.
- [78] A. Rossdeutsch, N. Smart, P. R. Riley, *J. Mol. Med.* **2008**, *86*, 29–35.
- [79] R. M. Kanashiro-Takeuchi, K. Tziomalosa, L. M. Takeuchia, A. V. Treuera, G. Lamiraulta, R. Dulcea, M. Hurtadoa, Y. Songa, N. L. Block, F. Rick, A. Klukovits, Q. Hua, J. L. Varga, A. V. Schally, J. M. Hare, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2604–2609.
- [80] D. J. Hausenloy, D. M. Yellon, *Cardiovasc. Res.* **2009**, *83*, 179–194.
- [81] M. E. Padin-Iruegas, Y. Misao, M. E. Davis, V. F. M. Segers, G. Esposito, T. Tokunou, K. Urbanek, T. Hosoda, M. Rota, P. Anversa, A. Leri, R. T. Lee, J. Kajstura, *Circulation* **2009**, *120*, 876–887.
- [82] M. S. Suleiman, R. J. R. Singh, C. E. H. Stewart, *Pharmacol. Ther.* **2007**, *114*, 278–294.
- [83] F. Mourkioti, N. Rosenthal, *Trends Immunol.* **2005**, *26*, 535–542.
- [84] W. L. Lee, J. W. Chen, C. T. Ting, S. J. Lin, P. H. Wang, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 1575–1581.
- [85] P. Boros, C. M. Miller, *Lancet* **1995**, *345*, 293–295.

- [86] a) K. Urbanek, M. Rota, S. Cascapera, C. Bearzi, A. Nascimbene, A. De Angelis, T. Hosoda, S. Chimenti, M. Baker, F. Limana, D. Nurzynska, D. Torella, F. Rotatori, R. Rastaldo, E. Musso, F. Quaini, A. Leri, J. Kajstura, P. Anversa, *Circ. Res.* **2005**, 97, 663–673; b) Y. Wang, N. Ahmad, M. A. Wani, M. Ashraf, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2004**, 37, 1041–1052.
- [87] G. M. Ellison, D. Torella, S. Dellegrottaglie, C. Perez-Martinez, A. Perez de Prado, C. Vicinanza, S. Purushothaman, V. Galuppo, C. Iaconetti, C. D. Waring, A. Smith, M. Torella, C. C. Ramon, J. M. Gonzalo-Orden, V. Agosti, C. Indolfi, M. Galinanes, F. Fernandez-Vazquez, B. Nadal-Ginard, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, 58, 977–986.
- [88] J.-I. Yamaguchi, K. F. Kusano, O. Masuo, A. Kawamoto, M. Silver, S. Murasawa, M. Bosch-Marce, H. Masuda, D. W. Losordo, J. M. Isner, T. Asahara, *Circulation* **2003**, 107, 1322–1328.
- [89] G. A. McQuibban, G. S. Butler, J.-H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis, C. M. Overall, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 43503–43508.
- [90] V. F. M. Segers, T. Tokunou, L. J. Higgins, C. MacGillivray, J. Gannon, R. T. Lee, *Circulation* **2007**, 116, 1683–1692.
- [91] M.-M. Zaruba, H. D. Theiss, M. Vallaster, U. Mehl, S. Brunner, R. David, R. Fischer, L. Krieg, E. Hirsch, B. Huber, P. Nathan, L. Israel, A. Imhof, N. Herbach, G. Assmann, R. Wanke, J. Mueller-Hoecker, G. Steinbeck, W.-M. Franz, *Cell Stem Cell* **2009**, 4, 313–323.
- [92] M. Ziegler, M. Elvers, Y. Baumer, C. Leder, C. Ochmann, T. Schönberger, T. Jürgens, T. Geisler, B. Schlosshauer, O. Lunov, S. Engelhardt, T. Simmet, M. Gawaz, *Circulation* **2012**, 125, 685–696.
- [93] G. Zhang, Y. Nakamura, X. Wang, Q. Hu, L. J. Suggs, J. Zhang, *Tissue Eng.* **2007**, 13, 2063–2071.
- [94] M. S. Penn, F. O. Mendelsohn, G. L. Schaer, W. Sherman, M. J. Farr, J. Pastore, D. Rouy, R. Clemens, R. Aras, D. W. Losordo, *Circ. Res.* **2013**, 112, 816–825.
- [95] P. Mendes-Ferreira, G. W. De Keulenaer, A. F. Leite-Moreira, C. Brás-Silva, *Drug Discovery Today* **2013**, 18, 836–842.
- [96] V. Guarneri, D. J. Lenihan, V. Valero, J.-B. Durand, K. Broglio, K. R. Hess, L. B. Michaud, A. M. Gonzalez-Angulo, G. N. Hortobagyi, F. J. Esteva, *J. Clin. Oncol.* **2006**, 24, 4107–4115.
- [97] K. Lemmens, V. F. Segers, M. Demolder, G. W. De Keulenaer, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 19469–19477.
- [98] X. Liu, X. Gu, Z. Li, X. Li, H. Li, J. Chang, P. Chen, J. Jin, B. Xi, D. Chen, D. Lai, R. M. Graham, M. Zhou, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2006**, 48, 1438–1447.
- [99] a) R. Gao, J. Zhang, L. Cheng, X. Wu, W. Dong, X. Yang, T. Li, X. Liu, Y. Xu, X. Li, M. D. Zhou, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2010**, 55, 1907–1914; b) A. Jabbour, C. S. Hayward, A. M. Keogh, E. Kotlyar, J. A. McCrohon, J. F. England, R. Amor, X. Liu, X. Y. Li, M. D. Zhou, R. M. Graham, P. S. Macdonald, *Eur. J. Heart Failure* **2011**, 13, 83–92.
- [100] K. B. Pasumarthi, L. J. Field, *Circ. Res.* **2002**, 90, 1044–1054.
- [101] A. Cuenda, J. Rouse, Y. N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T. F. Gallagher, P. R. Young, J. C. Lee, *FEBS Lett.* **1995**, 364, 229–233.
- [102] F. B. Engel, M. Schebesta, M. T. Duong, G. Lu, S. Ren, J. B. Madwed, H. Jiang, Y. Wang, M. T. Keating, *Genes Dev.* **2005**, 19, 1175–1187.
- [103] F. B. Engel, P. C. H. Hsieh, R. T. Lee, M. T. Keating, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 15546–15551.
- [104] I. Bock-Marquette, A. Saxena, M. D. White, J. M. Dimaio, D. Srivastava, *Nature* **2004**, 432, 466–472.
- [105] N. Smart, C. A. Risebro, A. A. D. Melville, K. Moses, R. J. Schwartz, K. R. Chien, P. R. Riley, *Nature* **2007**, 445, 177–182.
- [106] N. Smart, S. Bollini, K. N. Dubé, J. M. Vieira, B. Zhou, S. Davidson, D. Yellon, J. Riegler, A. N. Price, M. F. Lythgoe, W. T. Pu, P. R. Riley, *Nature* **2011**, 474, 640–644.
- [107] J. Izdebski, J. Pinski, J. E. Horvath, G. Halmos, K. Groot, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 4872–4876.
- [108] K. Karikó, M. Buckstein, H. Ni, D. Weissman, *Immunity* **2005**, 23, 165–175.
- [109] K. Karikó, H. Muramatsu, F. A. Welsh, J. Ludwig, H. Kato, S. Akira, D. Weissman, *Mol. Ther.* **2008**, 16, 1833–1840.
- [110] L. Warren, P. D. Manos, T. Ahfeldt, Y. H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P. K. Mandel, Z. D. Smith, A. Meissner, G. Q. Daley, A. S. Brack, J. J. Collins, C. Cowan, T. M. Schlaeger, D. J. Rossi, *Cell Stem Cell* **2010**, 7, 618–630.
- [111] M. S. D. Kormann, G. Hasenpusch, M. K. Aneja, G. Nica, A. W. Flemmer, S. Herber-Jonat, M. Huppmann, L. E. Mays, M. Ilényi, A. Schams, M. Griesse, I. Bittmann, R. Handgretinger, D. Hartl, J. Rosenecker, C. Rudolph, *Nat. Biotechnol.* **2011**, 29, 154–157.
- [112] L. Zangi, K. O. Lui, A. von Gise, Q. Ma, W. Ebina, L. M. Ptaszek, D. Später, H. Xu, M. Tabebordbar, R. Gorbato, B. Sena, M. Nahrendorf, D. M. Briscoe, R. A. Li, A. J. Wagers, D. J. Rossi, W. T. Pu, K. R. Chien, *Nat. Biotechnol.* DOI: 10.1038/nbt.2682.
- [113] A. Wendler, M. Wehling, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, 10, 601–606.
- [114] a) J. Graichen, X. Xu, S. R. Braam, T. Balakrishnan, S. Norfiza, S. Sieh, S. Y. Soo, S. C. Tham, C. Mummery, A. Colman, R. Zweigerdt, B. P. Davidson, *Differentiation* **2008**, 76, 357–370; b) J. Wu, J. Kubota, J. Hirayama, Y. Nagai, S. Nishina, T. Yokoi, Y. Asaoka, J. Seo, N. Shimizu, H. Kajiho, T. Watanabe, N. Azuma, T. Katada, H. Nishina, *Stem Cells Dev.* **2010**, 19, 1723–1734.
- [115] B. E. Bernstein, T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber, E. S. Lander, *Cell* **2006**, 125, 315–326.
- [116] P. S. Knoepfler, *Stem Cells* **2009**, 27, 1050–1056.
- [117] R. C. Scott, J. M. Rosano, Z. Ivanov, B. Wang, P. Lee-Gau Chong, A. C. Issekutz, D. L. Crabbe, M. F. Kiani, *Expert Opin. Drug Delivery* **2008**, 5, 459–470.
- [118] R. C. Scott, J. M. Rosano, Z. Ivanov, B. Wang, P. Lee-Gau Chong, A. C. Issekutz, D. L. Crabbe, M. F. Kiani, *FASEB J.* **2009**, 23, 3361–3367.
- [119] C. L. Erickson-Miller, E. DeLome, S. S. Tian, C. B. Hopson, K. Stark, L. Giampa, E. I. Valoret, K. J. Duffy, J. L. Luengo, J. Rosen, S. G. Miller, S. B. Dillon, P. Lamb, *Exp. Hematol.* **2005**, 33, 85–93.
- [120] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 1367–1372.