

Received: 2011.12.09
Accepted: 2012.01.19
Published: 2012.02.03

Mimetyki BH3 jako terapia wspomagająca konwencjonalne leki przeciwnowotworowe*

BH3 mimetics as a strategy to complement anticancer therapies

Mariusz Ł. Hartman, Małgorzata Czyż

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Poznanie mechanizmów regulujących proces apoptozy umożliwiło rozwój nowych terapii przeciwnowotworowych. Zaburzenia ekspresji lub aktywności regulatorów mitochondrialnego szlaku apoptozy leżą u podstaw rozwoju nowotworów i przekładają się na niewystarczającą odpowiedź chorych na leczenie ze względu na udział tego szlaku w odpowiedzi na czynniki stresowe, m.in. leki przeciwnowotworowe. Białka BH3-only, reprezentujące podrodzinę białek Bcl-2, pełnią dwojaką funkcję w inicjacji mitochondrialnego szlaku apoptozy: mogą bezpośrednio aktywować proapoptotyczne białka typu Bax albo neutralizować działanie antyapoptotycznych białek podrodziny Bcl-2. Z tego względu związki naśladujące działanie białek BH3-only, tzw. mimetyki BH3, stanowią obiecującą strategię terapeutyczną. Dotychczas zidentyfikowane mimetyki BH3 wykazały dużą skuteczność przeciwnowotworową w badaniach *in vitro* i *in vivo*, a niektóre z nich znajdują się w I/II fazie badań klinicznych, często z innymi związkami lub lekami. Ocena proapoptotycznego potencjału mimetyków BH3 jest możliwa dzięki metodzie, tzw. BH3 profiling, pozwalającej nie tylko na określenie profilu ekspresji białek antyapoptotycznych w danym typie komórek nowotworowych, ale również stopnia wrażliwości tych komórek na dany mimetyk BH3. W pracy omówiono mechanizmy działania białek BH3-only oraz ich mimetyków będących przedmiotem badań przedklinicznych i klinicznych.

Słowa kluczowe:

apoptoza • terapia przeciwnowotworowa • białka Bcl-2 • białka BH3-only • mimetyki BH3

Summary

The basis for targeting specific components of the apoptotic machinery for anticancer therapy is the detailed knowledge on molecular mechanisms that regulate this complex cell death pathway. As the mitochondrial pathway of apoptosis is the major route to respond to stress stimuli including anticancer drugs, and that pathway is largely impaired in cancer cells, leading to tumor formation and treatment resistance, a variety of approaches have been developed to restore the function of the mitochondrial pathway in cancer cells. BH3-only proteins, being important inducers of the mitochondrial pathway, either directly stimulate proapoptotic Bax-like proteins or interfere with antiapoptotic Bcl-2 proteins. Therefore, the development of molecules able to mimic the function of BH3-only proteins is considered a promising strategy to improve cancer cell response to treatment. Several BH3 mimetics have been designed and studied in various tumors, in both *in vitro* and *in vivo* settings. Some of them are currently being evaluated in clinical trials either alone or in combination with conventional anticancer drugs. BH3 profiling of cancer cells was

* Artykuł opracowano w ramach projektu nr N N401 554940 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

introduced to better predict the responsiveness of tumor cells to BH3 mimetics combined with conventional therapies. In this review, we summarize the current knowledge on BH3-*only* proteins and describe the spectrum of strategies employing BH3 mimetics in preclinical and clinical studies that aim at tumor targeting.

Key words: apoptosis • anticancer therapy • Bcl-2 proteins • BH3-*only* proteins • BH3 mimetics

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=979916>

Word count: 3122

Tables: –

Figures: 4

References: 100

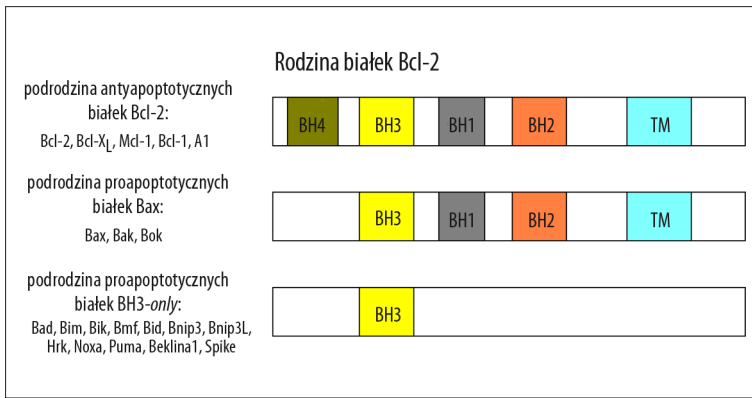
Adres autora: mgr Mariusz Ł. Hartman, Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8; 92-215 Łódź; e-mail: mariuszhartman@gmail.com

Wykaz skrótów: **A1** – białko o charakterze antyapoptotycznym (Bcl-2 related gene A1); **AML** – ostra białaczka szpikowa (acute myeloid leukemia); **ALL** – ostra białaczka limfocytowa (acute lymphocytic leukemia); **Bad** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (Bcl-2 antagonist of cell death); **Bak** – białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (Bcl-2 antagonist killer 1); **Bax** – białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (Bcl-2-associated protein X); **Bcl-2** – rodzina białek pro- i antyapoptotycznych oraz białko antyapoptotyczne (B-cell leukemia-2); **Bcl-w** – inhibitorowe białko apoptozy (Bcl-2 like 2); **Bcl-X_L** – inhibitorowe białko apoptozy (B-cell lymphoma-extra large); **Beklina 1** – białko podrodziny BH3-*only* zaangażowane w autofagię; **BH3Is** – inhibitory BH3 (BH3 inhibitors); **Bid** – aktywatorowe białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (BH3 interacting domain death antagonist); **Bik** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (Bcl-2 interacting killer like); **Bim** – aktywatorowe białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (Bcl-2 interacting mediator of cell death); **Bmf** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (Bcl-2 modifying factor); **Bnip3** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3); **Bok** – białko proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 (Bcl-2-related ovarian killer); **B-Raf^{V600E}** – kinaza serynowo-treoninowa będąca produktem ekspresji zmutowanego genu *BRAF*; **CLL** – przewlekła białaczka limfocytowa (chronic lymphocytic leukemia); **Hrk** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (harakiri); **ICAM-1** – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (inter-cellular adhesion molecule 1); **IGF-1** – insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (insulin-like growth factor 1); **IL-3/6** – interleukina 3/6; **Mcl-1** – antyapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2 (myeloid cell leukemia 1); **MEFs** – mysie fibroblasty embrionalne (mouse embryonal fibroblasts); **NF-κB** – jądrowy czynnik transkrypcyjny κB (nuclear factor κB); **NGF** – czynnik wzrostu neuronów (neuronal growth factor); **NM23** – supresor przerzutowania (non-metastatic 23); **Noxa** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (od łacińskiego słowa ‘*noxae*’ – uszkodzenie); **NSCLC** – niedrobnokomórkowy rak płuc (non-small cell lung cancer); **p53** – czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za ekspresję m.in. Puma i Noxa; **Puma** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (p53 upregulated modulator of apoptosis); **RFT** – reaktywne formy tlenu; **SCLC** – drobnokomórkowy rak płuc (small cell lung cancer); **Smac/Diablo** – czynnik proapoptotyczny uwalniany z mitochondrium (second mitochondria-derived activator of caspase); **Spike** – białko proapoptotyczne z podrodziny BH3-*only* (small protein with inherent killing effect); **TM** – domena transbłonowa występująca w strukturze niektórych białek rodziny Bcl-2 (transmembrane domain); **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworu α (tumor necrosis factor α); **TRAIL** – ligand związany z czynnikiem martwicy nowotworu indukujący apoptozę (TNF-related apoptosis-inducing ligand).

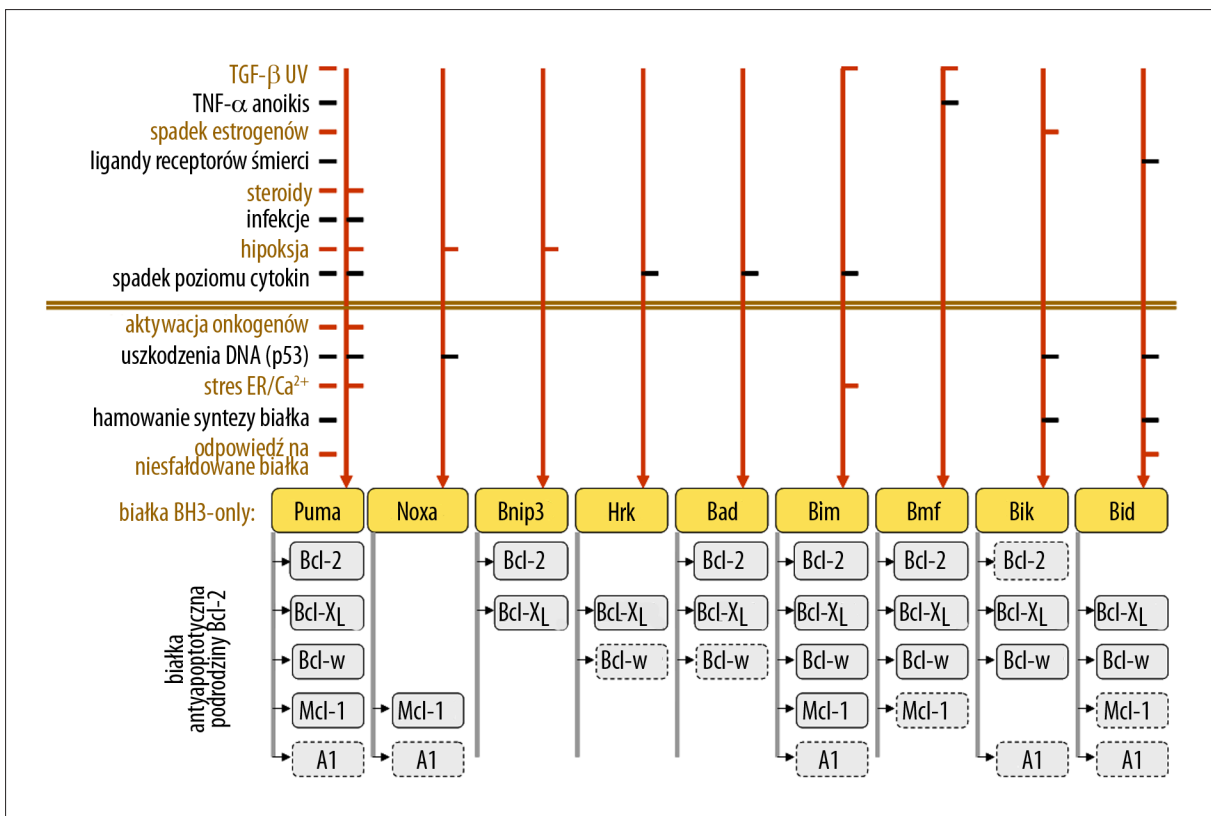
WSTĘP

Apoptoza jest procesem stanowiącym naturalną barierę dla rozwoju nowotworu [1]. Badania ostatnich dziesięcioleci dostarczyły wielu przykładów zaburzeń procesu apoptozy

prowadzących do rozwoju nowotworu i oporności komórek nowotworowych na stosowane leki. Zdolność unikania śmierci jest jedną z dziesięciu podstawowych cech charakteryzujących komórki nowotworowe [31]. Spośród dwóch programów apoptotycznych, zewnętrznego uruchamianego



Ryc. 1. Podział białek rodziny Bcl-2 na trzy podrodziny opiera się na występowaniu w ich strukturze domen homologii Bcl-2 oraz na właściwościach funkcjonalnych tych białek. Podrodzina Bcl-2 reprezentowana jest przez antyapoptotyczne białka, które mają domeny BH 1-4 i domenę transbłonową (TM). Do wyjątków należy Mcl-1, które nie ma domeny BH4 oraz białko A1 niemające domen BH3, BH4 i TM. Proapoptotyczne białka typu Bax, tworzące kanały w błonie mitochondrialnej, mają w swojej strukturze domeny BH1-3 oraz TM. Niektóre z białek podrodziny BH3-only, tj. Bik, Bim, Hrk, Bnip3 i Bnip3L, również zawierają domenę TM



Ryc. 2. Poszczególne białka BH3-only ulegają ekspresji/aktywacji na skutek pojawienia się swoistych bodźców zewnątrzkomórkowych (górny panel) lub wewnątrzkomórkowych (dolny panel). Powinowactwo tych białek do antyapoptotycznych członków podrodziny Bcl-2 wynika z różnic strukturalnych, zarówno w obrębie domeny BH3, jak i miejsca jej wiązania w białkach typu Bcl-2. Puma i Bim oddziałują ze wszystkimi białkami antyapoptotycznymi, podczas gdy pozostałe białka BH3-only wykazują określoną swoistość wiązania. Liniami przerywanymi oznaczono oddziaływania, dla których uzyskano sprzeczne wyniki w badaniach, na podstawie których przygotowano schemat [8,76]

w odpowiedzi na sygnały receptorowe oraz wewnętrzne, nazywanego również programem mitochondrialnym, ten drugi jest szerzej wykorzystywany przez komórki jako bariera przeciwnowotworowa, a zatem nieprawidłowości w jego funkcjonowaniu mogą wspomagać rozwój nowotworu. Droga mitochondrialna jest ściśle regulowana przez pro- i antyapoptotyczne białka rodziny Bcl-2. U ssaków zidentyfikowano ponad 20 białek należących do tej rodziny [1].

W oparciu o strukturę i funkcję poszczególnych białek wyodrębniono trzy podrodziny. Podrodzina Bcl-2 to białka

antyapoptotyczne, których archetypem jest białko Bcl-2 zawierające cztery domeny BH (Bcl-2 homology) (ryc. 1). Należą tu następujące białka: Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1), Bcl-X_L (B-cell leukemia/lymphoma-extra large), Bcl-w (Bcl-2 like 2) i A1 (Bcl-2 related gene A1). Podstawową funkcją białek podrodziny Bcl-2 jest zachowanie integralności błony mitochondrialnej przez wiązanie proapoptotycznych białek podrodziny Bax, zwanych również białkami efektorowymi apoptozy: Bak (Bcl-2 antagonist killer 1), Bax (Bcl-2 associated protein X) i Bok (Bcl-2-related ovarian killer). Uwolnione

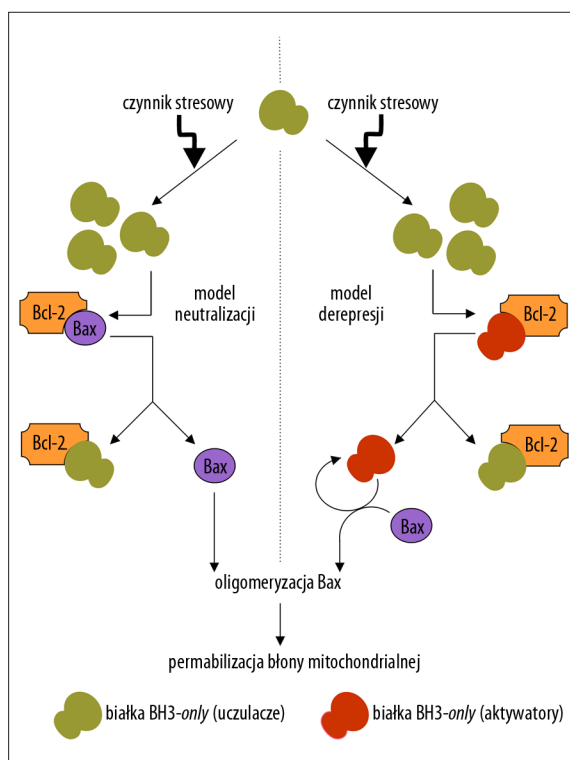
z kompleksów z białkami Bcl-2, białka podrodziny Bax indukują zmiany w błonie mitochondrialnej prowadzące do uwolnienia białek proapoptotycznych, w tym cytochromu c i białka Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase). To z kolei powoduje aktywację proteolitycznej aktywności kaspaz i prowadzi do śmierci komórki. Białka Bax i Bak zawierają domeny BH1, BH2 i BH3 (ryc. 1), z których ta ostatnia jest wykorzystywana w interakcjach z antyapoptotycznymi białkami podrodziny Bcl-2. Białka należące do trzeciej podrodziny zawierają wyłącznie domenę BH3 (ryc. 1), co zostało uwzględnione w nazwie podrodziny „białka BH3-only”. Do podrodziny BH3-only należą: Bad (Bcl-2 antagonist of cell death), Bid (BH3 interacting domain death antagonist), Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death), Bik (Bcl-2 interacting killer like), Bmf (Bcl-2 modifying factor), Bnip3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3), Hrk (harakiri), Noxa (od łacińskiego słowa *noxae*), Puma (p53 upregulated modulator of apoptosis), Spike (small protein with inherent killing effect) i beklina 1.

Zaburzenia drogi mitochondrialnej obserwowane w komórkach nowotworowych mogą wynikać z braku lub obniżonej aktywności jednego z białek BH3-only, białek efektorowych Bax lub Bak, a także ze zwiększonej ekspresji/aktywności antyapoptotycznych białek podrodziny Bcl-2 [13].

ROLA BIAŁEK BH3-ONLY W INDUKCJI APOPTOZY

Podstawową funkcją białek BH3-only jest indukcja apoptozy w odpowiedzi na stres komórkowy. Stres komórkowy, np. hipoksja, infekcje, wzrost stężenia białek onkogennych, niewystarczający poziom cytokin, np. IL-3 w przypadku limfocytów, wzrost aktywności białka p53 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, indukuje syntezę lub aktywację tych białek (ryc. 2). Niektóre z nich są aktywowane tylko w określonych typach komórek. Na przykład Hrk jest aktywowany w komórkach układu nerwowego w odpowiedzi na zaburzenia w poziomie czynnika wzrostu neuronów (NGF) [30], Puma jest odpowiedzialna za apoptozę mioblastów [33], a Bid hepatocytów [5]. Ekspresja i aktywacja białek BH3-only jest regulowana na poziomie transkrypcji, a także w wyniku modyfikacji potranskrypcyjnych i potranslacyjnych. Ekspresja białek Bik, beklina 1, Hrk, Puma i Noxa jest regulowana głównie na poziomie transkrypcji [12]. Białko Puma jest aktywowane przez fosforylację Ser¹⁰ [24], natomiast beklina 1 przez fosforylację Thr¹¹⁹ [100]. W aktywację białek BH3-only zaangażowane są również procesy, takie jak proteoliza katalizowana m.in. przez kaspazy, a także mirystylacja [49].

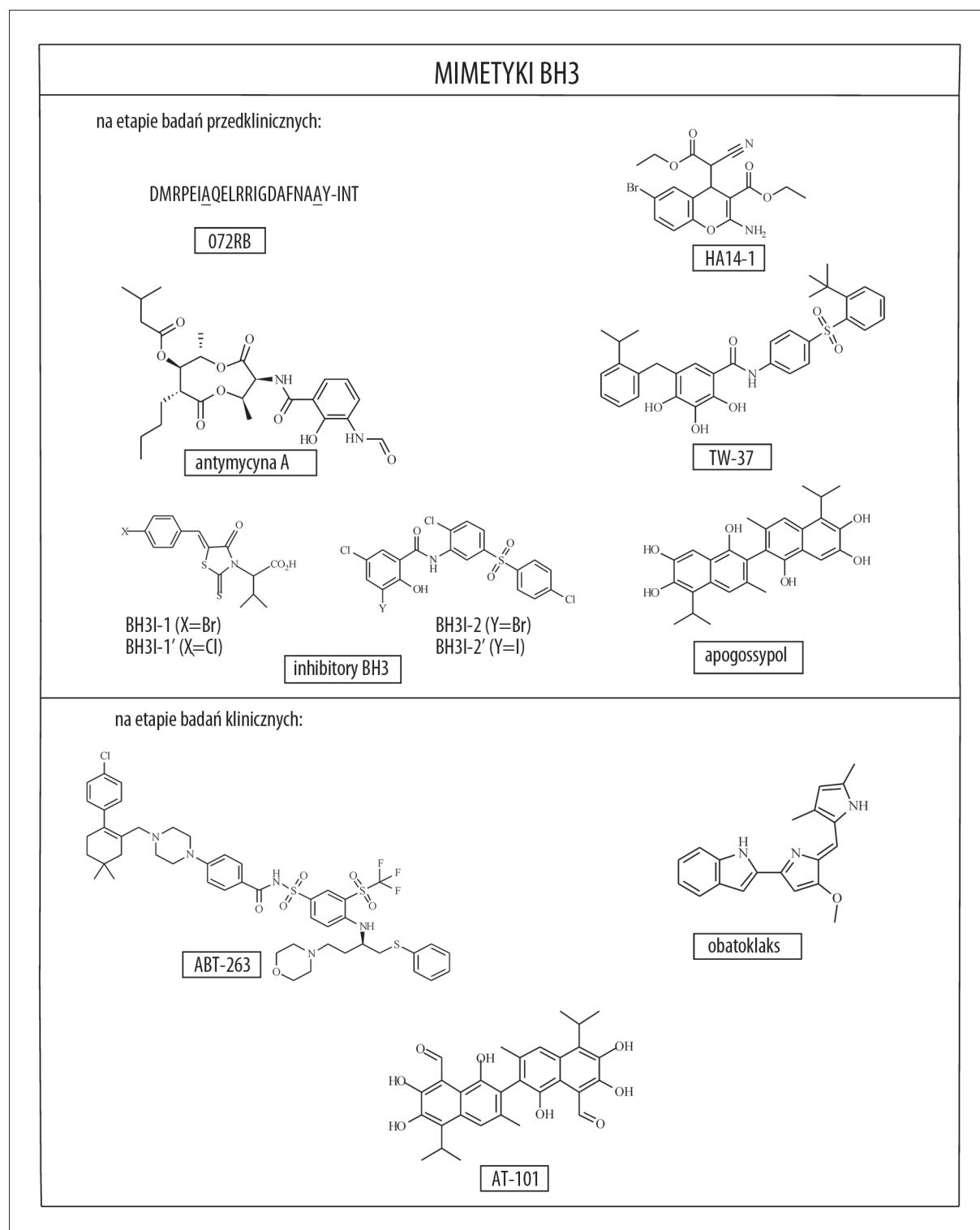
Funkcja białek BH3-only jest realizowana przez bezpośrednią indukcję aktywności proapoptotycznych białek podrodziny Bax (białka Bax i Bak) lub pośrednio przez oddziaływanie z antyapoptotycznymi białkami podrodziny Bcl-2 (rys. 2). Biorąc pod uwagę strukturę przestrzenną białek rodziny Bcl-2, możliwe jest oddziaływanie białek BH3-only zarówno z antyapoptotycznymi białkami podrodziny Bcl-2 jak i proapoptotycznymi Bax i Bak [13,26,49]. Wśród białek BH3-only wiążących białka efektorowe wymienia się białko Bim, które wydajniej wiąże się z białkiem Bax oraz białko tBid o dużym powinowactwie do białka Bak [49]. Nie stwierdzono natomiast obecności białek BH3-only w oligomerach formowanych przez aktywowane białka



Ryc. 3. Modele aktywacji Bax i Bak przez białka BH3-only. Zgodnie z modelem neutralizacji, proapoptotyczne białka efektorowe Bax i Bak są związane z białkami antyapoptotycznymi typu Bcl-2. Stres komórkowy indukuje ekspresję/aktywację określonych białek BH3-only, które następnie wypierają proapoptotyczne białka typu Bax z kompleksów z białkami antyapoptotycznymi. Według tego modelu, uwolnienie cząsteczek Bax jest wystarczające do tworzenia przez nie homooligomerów, co prowadzi do permabilizacji błony mitochondrialnej. U podstaw modelu derepresji leży podział funkcjonalny białek BH3-only na tzw. uczulacze i aktywatory. Czynniki stresowe promuje syntezę bądź aktywację uczulaczy. Białka te uwalniają aktywatory z kompleksów z białkami antyapoptotycznymi typu Bcl-2. Uwolnione aktywatory wiążą się z proapoptotycznymi białkami efektorowymi Bax, uczestnicząc jedynie na wczesnych etapach ich oligomeryzacji. Na schemacie pominięto model „osadzone razem” [76]

Bax lub Bak [43], co doprowadziło do powstania modelu „hit and run” [21,43]. Według tej koncepcji, białko BH3-only wiąże się z bruzdą hydrofobową białka Bax zajęta w stanie nieaktywnym przez domenę transbłonową (TM). Powoduje to oddziaływanie TM z błoną mitochondrialną, co z kolei prowadzi do homooligomeryzacji białek Bax lub Bak i permabilizacji zewnętrznej błony mitochondrialnej. Białka BH3-only są uwalniane na początku tego procesu (faza „run”). Białko Bak, na stałe związane z błoną mitochondrialną, nie wymaga pierwszego etapu aktywacji.

Proapoptotyczna funkcja białek BH3-only może być również realizowana przez oddziaływanie z antyapoptotycznymi białkami podrodziny Bcl-2 [21,95]. Interakcje te opisywane są w różny sposób. Najprostszy model (zwany modelem neutralizacji) zakłada, że białko BH3-only, aktywowane przez odpowiedni sygnał proapoptotyczny, uwalnia efektorowe białka Bax lub Bak z kompleksu z białkiem antyapoptotycznym (ryc. 3).



Ryc. 4. Struktura chemiczna mimetyków BH3 znajdujących się na etapie badań przedklinicznych i klinicznych. W przypadku peptydowego mimetyku 072RB użyto jednoliterowych skrótów aminokwasów, A oznaczono alaninę podstawioną kwasem α -aminomasłowym, zaś sygnał internalizacji, stanowiący zmutowaną α 3-helisę białka homeotycznego Antennapedia, zaznaczono jako „-int”

Bak jest zwykle związany z A1 lub Bcl-X_L, natomiast Bax z Bcl-X_L, Bcl-2, Mcl-1 lub A1 [47]. W oparciu o profile funkcjonalne białek BH3-only zaproponowano również inny model nazywany w literaturze modelem derepresji [22] lub modelem bezpośrednim [76]. W modelu tym przyjęto

podział białek BH3-only na tzw. „uczulacze” (białka typu Bad: Bad, Noxa, Bmf, Bik i Hrk), których rolą jest kontrola aktywności białek antyapoptotycznych oraz aktywatory (białka typu Bid: Bid i Bim), których funkcją jest wiązanie i aktywacja białek Bax/Bak [12]. Sprzeczne wyniki

uzyskano dla białka Puma, które według Kima i wsp. jest przede wszystkim partnerem białka Bax [43], natomiast w innych badaniach wykazano, że białko to może pełnić rolę wyłącznie uczulacza [8]. Dokładny mechanizm działania białek *BH3-only* jest ciągle przedmiotem badań. W wymienionych wcześniej schematach działania białek *BH3-only*, selektywność interakcji białko-białko jest osiągnięta przez różnice w powinowactwie do białek antyapoptotycznych Bcl-2 (ryc. 2). W modelu „osadzone razem” („embedded together”) podkreśla się rolę błony mitochondrialnej w zmianach konformacyjnych białek prowadzących do ich aktywacji [76].

Apoptoza nie jest jedynym procesem, w którym białka *BH3-only* biorą aktywny udział. Niektóre spośród białek *BH3-only*, np. Bnip3 i beklina 1 mogą indukować również autofagię i nekrozę [12,80].

MIMETYKI BIAŁEK *BH3-ONLY*

W komórkach nowotworowych obserwowane są zmiany poziomu i/lub aktywności białek *BH3-only*, co jest istotnym elementem oporności tych komórek na stosowane terapie. W nowotworach układu nerwowego występuje obniżenie ekspresji *HRK* wskutek hipermetylacji regionu promotowego genu [64]. Mniejszą ekspresję *BAD* obserwowano w nowotworze żołądka, jelita grubego oraz w szpiczaku mnogim. W glejakach zahamowaniu ulega synteza białka Puma, w raku piersi i płuc stwierdza się delecję *BMF*, a w nowotworze nerek utratę *BIK* [52]. Zmiany ekspresji/aktywności białek *BH3-only* leżą także u podłoża wielu nowotworów układu krwiotwórczego [47]. Ponadto zaburzenia te mogą mieć charakter pośredni i wynikać z nieprawidłowej ekspresji lub aktywności czynników regulujących syntezę/aktywację białek proapoptotycznych, np. p53, główny czynnik transkrypcyjny genów *PUMA* i *HRK*, funkcjonuje nieprawidłowo w prawie połowie przypadków chorób nowotworowych [40], zaś w komórkach czerniaka B-Raf^{V600E} promuje fosforylację Bim prowadzącą do degradacji tego białka proapoptotycznego [29]. Zastosowanie związków naśladujących aktywność białek *BH3-only* i uzupełniających ich niedobór w komórkach nowotworowych jest stosunkowo nowym podejściem w terapii przeciwnowotworowej. Mimetyki *BH3* mogą mieć charakter peptydów analogicznych do domeny *BH3* białek proapoptotycznych lub być związkami niepeptydowymi, zarówno syntetycznymi, jak i pochodzenia naturalnego (ryc. 4). Związki te oddziałując z bruzdą hydrofobową białek antyapoptotycznych indukują apoptozę. Część z nich znajduje się na etapie badań klinicznych.

MIMETYKI *BH3* W BADANIACH PRZEDKLINICZNYCH

Nieustannie prowadzone są badania mające na celu zidentyfikowanie związków o wysokim powinowactwie do bruzdy hydrofobowej białek antyapoptotycznych. Synteza peptydów o długości kilkunastu aminokwasów i sekwencji odpowiadającej domenom *BH3* oraz doświadczenia potwierdzające proapoptotyczną aktywność tych cząsteczek zapoczątkowały badania nad tzw. peptydomimetykami [49]. Zastosowanie peptydowych mimetyków *BH3* w układach *in vivo* wymaga jednak wprowadzenia modyfikacji mających na celu zapewnienie właściwej przenikalności przez błony komórkowe, odpowiedniego okresu

półtrwania oraz ochrony przed proteolizą [91]. W tym celu wykorzystuje się metodę stabilizacji α -helisy poprzez wytworzenie wiązania „spinającego” tę strukturę (hydrocarbon stapling) [91], zastępowanie niektórych α -aminokwasów ich formami β [47], tworzenie mostków laktamowych [97] lub dołączanie dodatkowych fragmentów w postaci oktameru argininy [28], zmutowanej α 3-helisy białka homeotycznego *Antennapedia* [72], cząsteczki transaktywatora ekspresji genów (TAT) wirusa HIV lub liganda receptora 4 chemokiny CXC (DV3) [51]. Tak zaprojektowane peptydomimetyki wykazywały zdolność indukowania mitochondrialnego szlaku apoptozy w opornych na leczenie komórkach nerwiaka zarodkowego [28] i białaczki [91] oraz hamowały rozrost guza w mysim modelu raka jelita grubego [51]. Mimetyk 072RB (ryc. 4), zmodyfikowany *BH3* peptyd białka Bim, poprzez oddziaływanie z Bcl-X_L, uruchamiał mitochondrialny szlak apoptozy w komórkach ostrej białaczki szpikowej (AML), podczas gdy prawidłowe komórki krwi i szpiku kostnego pozostawały niewrażliwe na jego działanie [72].

Inne podejście reprezentują związki niepeptydowe, które wchodzą w podobne oddziaływania z białkami antyapoptotycznymi. Pierwszym syntetycznym związkiem, dla którego określono molekularny mechanizm działania był HA14-1 (ryc. 4). Potwierdzono, że mimetyk ten indukuje śmierć zależną od Bax [10] oraz wykazuje powinowactwo do białek Bcl-2 i Bcl-X_L [75]. Związek ten uwrażliwiał komórki chłoniaka pęcherzykowego na działanie dokсорubicyny i deksametazonu [78], komórki białaczkowe na TRAIL (ligand związany z czynnikiem martwicy nowotworu indukujący apoptozę) [32] oraz komórki raka piersi na cisplatynę [2]. Stosowanie HA14-1 z innymi związkami przeciwnowotworowymi było bardzo skuteczne, co zaobserwowano w komórkach nerwiaka zarodkowego w wyniku połączenia HA14-1 z genisteiną [60] lub w komórkach białaczkowych w kombinacji z TNF- α (czynnikiem martwicy nowotworu α) [62]. Potencjalne zastosowanie HA14-1 w terapii przeciwnowotworowej jest ograniczone ze względu na jego szybki metabolizm, jednak stabilny analog HA14-1 (SHA14-1) został już zsyntetyzowany [82].

Zaobserwowano, że antymycyna A (ryc. 4), wytwarzana przez *Streptomyces kitazawensis*, indukuje śmierć apoptotyczną komórek HL-60 poprzez neutralizację białek Bcl-2 i Bcl-X_L [44,54]. Mimo to antymycyna A, jako inhibitor kompleksu III łańcucha oddechowego, nie może być stosowana w leczeniu. Półsyntetyczna pochodna tego związku, 2-metoksyantymycyna A, wykazuje natomiast podobną aktywność proapoptotyczną i nie upośledza łańcucha transportu elektronów [54].

Wykorzystując narzędzia bioinformatyczne uzyskano wiele związków o aktywności białek *BH3-only*. Związek TW-37, syntetyczny antagonistą białek Bcl-2, Mcl-1 i Bcl-X_L (ryc. 4), wykazał synergistyczne działanie z inhibitorem kinazy MEK, U0126, indukując niezależną od kaspaz apoptozę w komórkach czerniaka opornych na leczenie. Właściwości te potwierdzono również w mysim modelu tego nowotworu, jednocześnie nie obserwując cytotoksycznego działania tego związku na prawidłowe melanocyty [87]. W połączeniu z cisplatyną, TW-37 nie tylko zatrzymywał cykl komórkowy w fazie S w przypadku komórek nowotworu głowy i szyi, ale również hamował proces

angiogenezy *in vivo* [3]. Wyniki badań z wykorzystaniem komórek raka trzustki dowiodły, że TW-37 hamuje szlak sygnałowy Notch-1. Dzięki temu interesujące wydają się badania prowadzone w kierunku oceny cytotoksyczności tego mimetyku w nowotworowych komórkach macierzystych [93].

Inhibitory BH3 (BH3Is, *BH3 inhibitors*) stanowią grupę mimetyków, w której największy potencjał proapoptotyczny potwierdzono dla czterech związków: BH3I-1, BH3I-1', BH3I-2 i BH3I-2' [17]. BH3I-2' uruchamiało apoptozę w komórkach białaczkowych opornych na chemioterapię [32] i uwrażliwiało komórki raka gruczołu krokowego na TRAIL [74]. Zaobserwowano współdziałanie BH3I-1 oraz BH3I-2' z doksorubicyną i bortezomibem w indukcji śmierci apoptotycznej w komórkach raka tarczycy [58]. Pomimo udokumentowania pożądanych właściwości inhibitorów BH3, stężenie niezbędne do osiągnięcia tej aktywności jest zbyt wysokie. Z tego względu zsyntetyzowano dimeryczne analogi BH3I-1 wykazujące wyższe powinowactwo do białek antyapoptotycznych [92].

MIMETYKI BH3 W BADANIACH KLINICZNYCH

ABT-737 i ABT-263

ABT-263 (Navitoclax) (ryc. 4) jest mimetykiem BH3 drugiej generacji, zsyntetyzowanym w oparciu o strukturę innego związku, ABT-737 [84]. ABT-737 został pierwotnie zidentyfikowany jako związek wiążący się z hydrofobową bruzdą Bcl-X_L [69]. Kolejne eksperymenty dowiodły dużego powinowactwa ABT-737 do Bcl-2 oraz Bcl-w. ABT-737 i ABT-263 określa się mimetykami białka Bad [35,86].

Liczne badania przedkliniczne, przeprowadzone z udziałem ABT-737 *in vitro* i *in vivo*, dowiodły dużej skuteczności tego związku jako induktora apoptozy w komórkach nowotworowych. ABT-737 wykazał synergistyczne działanie z karboplatiną w komórkach raka jajnika i drobno-komórkowego raka płuc (SCLC) [81,96], dakarbazyną i fotemustyną oraz inhibitorami p38 i MEK w czerniaku [15,42,94], docetakselem w raku piersi [66] oraz entinostatem w chłoniakach ziarniczych [38]. W komórkach przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL), ABT-737 indukował apoptozę niezależnie od występowania niekorzystnych markerów prognostycznych [18]. Warunki niedotlenienia (hipoksji), charakterystyczne dla guzów litych, wydają się wzmacniać skuteczność działania ABT-737, co zaobserwowano w komórkach SCLC i raka jelita grubego [34]. Modele mysie różnych nowotworów potwierdziły dużą skuteczność ABT-737 w skojarzeniu z GDC-0941, inhibitorem 3-kinazy fosfatydyloinozytolu, w nowotworze piersi [100], karboplatiną w raku jajnika [96] i VXL (winkrystyna, deksametazon, L-asparaginaza) w ALL (ostrej białaczce limfocytowej), w przypadku której obserwowano znaczne wydłużenie czasu wolnego od choroby [41]. W badaniach *in vivo*, po zastosowaniu ABT-737, zaobserwowano niewielką utratę masy ciała oraz niewrażliwość na ten związek jednojądrzastych komórek krwi oraz komórek szpiku kostnego [41,66,96].

Ograniczenia związane z niewielką biodostępnością ABT-737, jego słabą rozpuszczalnością oraz krótkim okresem półtrwania zostały znacznie zredukowane w wyniku

wprowadzenia kilku ważnych modyfikacji w jego strukturze. Zsyntetyzowany w ten sposób ABT-263 wykazał podobne powinowactwo do tych samych białek antyapoptotycznych co ABT-737 oraz zbliżone mechanizmy działania [84].

Badania przedkliniczne pozwoliły wskazać prawdopodobne mechanizmy oporności komórek nowotworowych na ABT-737 i ABT-263. Uważa się, że ABT-263 będzie bardzo skuteczny w nowotworach cechujących się nadekspresją Bcl-2 i/lub Bcl-X_L. Z kolei uwzględniając niewielkie powinowactwo tych mimetyków do Mcl-1 i A1, podwyższone stężenie tych białek antyapoptotycznych może warunkować słabą wrażliwość komórek nowotworowych na te związki. W wielu pracach oryginalnych wykazano jednak bardzo dobrą skuteczność ABT-737 ze związkami (lub strategiami) obniżających bezpośrednio lub pośrednio aktywność białka Mcl-1, tj. wyłączenie (*knockout*) lub wyciszenie (*knockdown*) *MCL-1* [11,35,42,98], regulację jego ekspresji poprzez hamowanie transkrypcji przez R-roskowitynę [11] i flawopirydol [97] lub ochronę przed degradacją białek proapoptotycznych, np. Noxa poprzez stosowanie inhibitorów proteasomu (np. MG-132) [57]. A zatem, o ile zastosowanie ABT-263 w monoterapii może nie być wystarczające, w terapii skojarzonej związek ten może korzystnie wpłynąć na wynik leczenia. Z kolei A1 rzadko ulega zwiększonej ekspresji w chorobach nowotworowych. Mimo to zaobserwowano, że oporność na ABT-737 w komórkach CLL uwarunkowana jest nadekspresją tego białka i, co ciekawe, Bcl-X_L [88]. Początkowe badania na mysim modelu SCLC nie potwierdziły udziału glikoproteiny P w warunkowaniu oporności na ABT-263 [77], jednak wyniki ostatnich doświadczeń wykazały, że ekspresja tego błonowego transportera z rodziny ABC w sposób istotny wpływała na efektywność działania ABT-263 i ABT-737 w komórkach białaczkowych wywodzących się z limfocytów T [89]. Ponadto oba mimetyki, a zwłaszcza ABT-263, są wiązane przez albuminę, co znacząco wpływa na ich dostępność dla komórek docelowych [90].

ABT-263 znajduje się obecnie w fazie I/II badań klinicznych prowadzonych u pacjentów z SCLC i różnymi rodzajami białaczek oraz chłoniaków (do stosowania w monoterapii), a także z nowotworami litymi, w skojarzeniu z paklitakselem, erlotinibem, docetakselem, etopozydem lub cisplatiną [14].

Obatoklaks

Obatoklaks (ryc. 4) jest związkiem syntetycznym wiążącym się w hydrofobowej bruzdzie antyapoptotycznych białek Bcl-2, Bcl-X_L i Mcl-1 [67]. W badaniach przedklinicznych obatoklaks wykazał synergistyczne działanie z bortezomibem w komórkach czerniaka [65] i szpiczaka mnogiego [83], gefitinibem i cisplatiną w komórkach niedrobno-komórkowego raka płuc (NSCLC) [50], cisplatiną i etopozydem w komórkach SCLC [16], ABT-737 i cytarabiną w komórkach ALL [46] oraz entinostatem w chłoniakach ziarniczych [39]. Badania dowiodły, że obatoklaks skutecznie indukuje apoptozę w komórkach, w których Bax i Bak ulegają ekspresji, a działanie to było zmniejszone w mysich embrjonalnych fibroblastach (MEFs) pozbawionych Bax i Bak [63]. W komórkach traktowanych obatoklaksem nie stwierdzono zmian ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych [63,70].

Wykazano natomiast, że związek ten indukuje fosforylację Bim, wzmacniając potencjał proapoptyczny tego białka [50]. Zaobserwowano również zdolność obatoklaksu do indukcji zmian konformacyjnych Bax, co przypomina mechanizm działania białek typu Bid (aktywatorów) [79]. Obatoklaks indukował również śmierć w komórkach chłoniaka z komórek płaszczki dodatkowo stymulowanych insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 (IGF-1) i IL-6 [83]. Ponadto stwierdzono wrażliwość komórek progenitorowych AML na obatoklaks oraz jego słabe właściwości antyproliferacyjne [46]. W komórkach pozabawionych Bax i Bak obatoklaks indukował autofagię zależną od bekliny 1 [70] lub białka związanego z autofagią (Atg7) [55].

Efektywność przeciwnowotworowa obatoklaksu jest obecnie oceniana w badaniach klinicznych fazy III pod kątem jego zastosowania w leczeniu chorych z nowotworami układu krwiotwórczego (z dekstrazoksanem, doksorubicyną i winkrystyną; bortezomibem; bendamustyną i rituksimabem oraz fludarabiną i rituksimabem), SCLC (w połączeniu z topotekaniem lub etopozydem i cisplatyną) oraz NSCLC (z docetakselem) [14]. W badaniach I fazy z udziałem wcześniej leczonych chorych z CLL potwierdzono działanie neurotoksyczne tego związku [67].

Gossypol i AT-101

Gossypol jest polifenolowym związkiem wyizolowanym z nasion bawełny z rodzaju *Gossypium sp.* [68]. Początkowo wykazano jego duże powinowactwo do Bcl-2, Bcl-X_L [68] oraz Mcl-1 [23], a niedawno potwierdzono na poziomie molekularnym miejsce wiązania tego mimetyku w hydrofobowej bruzdzie Bcl-X_L [73]. Gossypol, badany pod kątem właściwości antykoncepcyjnych, okazał się również związkiem przeciwnowotworowym. Prowadzone od lat 80 ub. w. badania wykazały możliwość wykorzystania gossypolu w leczeniu czerniaka, raka jelita grubego [85], raka piersi [27], chłoniaków nieziarniczych [59], przewlekłej białaczki szpikowej (CML) [56], NSCLC [9], nowotworu pęcherza moczowego [53], CLL [4], szpiczaka mnogiego [71] oraz raka gruczołu krokowego [36]. W różnych typach komórek nowotworowych gossypol indukował mitochondrialny [68] bądź zewnętrzny szlak apoptozy [9]. W komórkach raka pęcherza moczowego związek ten indukował zmiany stężenia białek rodziny Bcl-2: spadek ekspresji Mcl-1 i Bcl-X_L, a wzrost Bim i Puma [53].

Gossypol jest mimetykiem BH3 wykazującym różnorodne mechanizmy działania. W badaniach *in vitro* gossypol skutecznie inicjował śmierć komórek białaczkowych niezależnie od rekonstrukcji warunków mikrośrodowiska [4]. Wykazano, że związek ten może indukować utratę potencjału błonowego oraz wpływ cytochromu c z międzybłonowej przestrzeni mitochondrialnej w komórkach, w których Bax i Bak nie ulegają ekspresji. Przypisuje się mu również zdolność modulowania właściwości białka Bcl-2, prowadzącą do uruchamiania nietypowej aktywności tego białka antyapoptycznego, związanej z formowaniem kanałów w błonie mitochondrialnej [23]. Hamowanie

ekspresji czynnika transkrypcyjnego NF-κB prowadzącej do obniżenia syntezy cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ICAM-1) [61] oraz wzrost ekspresji genu *NM23* [36] sugerują, że gossypol może działać jako supresor tworzenia przerzutów. Udokumentowano właściwości antyproliferacyjne gossypolu wynikające ze zdolności blokowania cyklu komórkowego w fazie S [9] i G0/G1 [56], indukcję stresu oksydacyjnego poprzez stymulację syntezy reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach traktowanych tym związkiem [38] oraz uruchamianie autofagii [25]. W komórkach HL-60 gossypol hamował fosforylację Ser⁷⁰ białka Bcl-2 i w ten sposób blokował jego antyapoptyczne właściwości [37].

AT-101 jest lewoskrętnym enancjomerem gossypolu (ryc. 4). AT-101 znajduje się obecnie w III fazie badań klinicznych i jest stosowany zarówno samodzielnie jak i w skojarzeniu w terapiach nowotworów przełyku, gruczołu krokowego, ośrodkowego układu nerwowego, CLL (z lenalidomidem), SCLC (z temozolomidem) oraz NSCLC (z erlotinibem) [14].

Ze względu na hepatotoksyczne działanie gossypolu [20] oraz obecność wysoce reaktywnych grup karbonylowych, próby modyfikacji jego struktury doprowadziły do syntezy apogossypolu. Związek ten wiąże się z Bcl-2 i Bcl-X_L [6], wykazuje podobną aktywność proapoptyczną, ale jest mniej reaktywny, co wiąże się ze zmniejszoną toksycznością systemową tego związku [45]. Apogossypol pozostaje na etapie badań przedklinicznych.

PODSUMOWANIE

Zaburzenia apoptozy, charakterystyczne dla komórek nowotworowych, prowadzą do zachwiania równowagi między komórkami powstającymi w wyniku podziałów a tymi, które są usuwane z organizmu. Kierowanie szybko namnażających się komórek nowotworowych na szlak programowanej śmierci jest ważnym celem współczesnych terapii przeciwnowotworowych. Próby wykorzystania mimetyków BH3 są stosunkowo nowym podejściem, jednak w wielu doświadczeniach wykazano ich potencjalną aktywność przeciwnowotworową. Chociaż w komórkach nowotworowych dochodzi do aktywacji proapoptycznych białek BH3-*only*, to ulegające nadekspresji białka antyapoptyczne skutecznie neutralizują tę aktywność. Mimetyki BH3 mogą dostarczać niezbędnego sygnału inicjującego apoptozę w komórkach, które są *de facto* „przygotowane do śmierci” (*prime to die*) [8]. Hipoteza ta jest poparta obserwacjami wskazującymi na zdolność wielu mimetyków BH3 do uwalnianie cytochromu c z mitochondriów komórek nowotworowych, w odróżnieniu od komórek prawidłowych, co uzasadnia mniejszą wrażliwość tych ostatnich na BH3 mimetyki [7]. Ponadto ocena skuteczności działania poszczególnych związków jest możliwa dzięki nowej metodzie (tzw. BH3 profiling) pozwalającej ustalić profil ekspresji białek antyapoptycznych w komórkach nowotworowych oraz określić wrażliwość tych komórek na konkretny mimetyk BH3 [19].

PIŚMIENICTWO

- [1] Adams J.M., Cory S.: The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 2007; 26: 1324–1337
- [2] Arisan E.D., Kutuk O., Tezil T., Bodur C., Telci D., Basaga H.: Small inhibitor of Bcl-2, HA14-1, selectively enhanced the apoptotic effect of cisplatin by modulating Bcl-2 family members in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2010; 119: 271–281
- [3] Ashimori N., Zeitlin B.D., Zhang Z., Warner K., Turkienicz I.M., Spalding A.C., Teknos T.N., Wang S., Nör J.E.: TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis. *Mol. Cancer Ther.*, 2009; 8: 893–903
- [4] Balakrishnan K., Burger J.A., Wierda W.G., Gandhi V.: AT-101 induces apoptosis in CLL B cells and overcomes stromal cell-mediated Mcl-1 induction and drug resistance. *Blood*, 2009; 113: 149–153
- [5] Baskin-Bey E.S., Gores G.J.: Death by association: BH3 domain-*only* proteins and liver injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2005; 289: G987–G990
- [6] Becattini B., Kitada S., Leone M., Monosov E., Chandler S., Zhai D., Kipps T.J., Reed J.C., Pellicchia M.: Rational design and real time, in-cell detection of the proapoptotic activity of a novel compound targeting Bcl-X_L. *Chem. Biol.*, 2004; 11: 389–395
- [7] Buron N., Porceddu M., Brabant M., Desgué D., Racœur C., Lassalle M., Péchoux C., Rustin P., Jacotot E., Borgne-Sanchez A.: Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization. *PLoS One*, 2010; 5: e9924
- [8] Certo M., del Gaizo Moore V., Nishino M., Wei G., Korsmeyer S., Armstrong S.A., Letai A.: Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*, 2006; 9: 351–365
- [9] Chang J.S., Hsu Y.L., Kuo P.L., Chiang L.C., Lin C.C.: Upregulation of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis by gossypol in an immortalized human alveolar lung cancer cell line. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2004; 31: 716–722
- [10] Chen J., Freeman A., Liu J., Dai Q., Lee R.M.: The apoptotic effect of HA14-1, a Bcl-2-interacting small molecular compound, requires Bax translocation and is enhanced by PK11195. *Mol. Cancer Ther.*, 2002; 1: 961–967
- [11] Chen S., Dai Y., Harada H., Dent P., Grant S.: Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res.*, 2007; 67: 782–791
- [12] Chipuk J.E., Moldoveanu T., Llambi F., Parsons M.J., Green D.R.: The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell*, 2010; 37: 299–310
- [13] Chonghaile T.N., Letai A.: Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene*, 2008; 27(Suppl.1): S149–S157
- [14] Clinical trials. <http://clinicaltrials.gov/ct2/home> (29.11.2011)
- [15] Cragg M.S., Jansen E.S., Cook M., Harris C., Strasser A., Scott C.L.: Treatment of B-RAF mutant human tumor cells with a MEK inhibitor requires Bim and is enhanced by a BH3 mimetic. *J. Clin. Invest.*, 2008; 118: 3651–3659
- [16] Dean E.J., Cummings J., Roulston A., Berger M., Ranson M., Blackhall F., Dive C.: Optimization of circulating biomarkers of obatoxolax-induced cell death in patients with small cell lung cancer. *Neoplasia*, 2011; 13: 339–347
- [17] Degtarev A., Lugovskoy A., Cardone M., Mulley B., Wagner G., Mitchison T., Yuan J.: Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-X_L. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 173–182
- [18] Del Gaizo Moore V., Brown J.R., Certo M., Love T.M., Novina C.D., Letai A.: Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.*, 2007; 117: 112–121
- [19] Del Gaizo Moore V., Letai A.: BH3 profiling – measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Lett.*, 2012 (w druku)
- [20] Deoras D.P., Young-Curtis P., Dalvi R.R., Tippett F.E.: Effect of gossypol on hepatic and serum γ -glutamyltransferase activity in rats. *Vet. Res. Commun.*, 1997; 21: 317–323
- [21] Dewson G., Kluck R.M.: Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J. Cell Sci.*, 2009; 122: 2801–2808
- [22] Elkholi R., Floros K.V., Chipuk J.E.: The role of BH3-*only* proteins in tumor cell development, signaling and treatment. *Genes Cancer*, 2011; 2: 523–537
- [23] Etxebarria A., Landeta O., Antonsson B., Basañez G.: Regulation of antiapoptotic MCL-1 function by gossypol: mechanistic insights from *in vitro* reconstituted systems. *Biochem. Pharmacol.*, 2008; 76: 1563–1576
- [24] Fricker M., O'Prey J., Tolkovsky A.M., Ryan K.M.: Phosphorylation of Puma modulates its apoptotic function by regulating protein stability. *Cell Death Dis.*, 2010; 1: e59
- [25] Gao P., Bauvy C., Souquère S., Tonelli G., Liu L., Zhu Y., Qiao Z., Bakula D., Proikas-Cezanne T., Pierron G., Codogno P., Chen Q., Mehrpour M.: The Bcl-2 homology domain 3 mimetic gossypol induces both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent cytoprotective autophagy in cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 25570–25581
- [26] Gavathiotis E., Suzuki M., Davis M.L., Pitter K., Bird G.H., Katz S.G., Tu H.C., Kim H., Cheng E.H., Tjandra N., Walensky L.D.: BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*, 2008; 455: 1076–1081
- [27] Gilbert N.E., O'Reilly J.E., Chang C.J., Lin Y.C., Brueggemeier R.W.: Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells. *Life Sci.*, 1995; 57: 61–67
- [28] Goldsmith K.C., Liu X., Dam V., Morgan B.T., Shabbout M., Cnaan A., Letai A., Korsmeyer S.J., Hogarty M.D.: BH3 peptidomimetics potently activate apoptosis and demonstrate single agent efficacy in neuroblastoma. *Oncogene*, 2006; 25: 4525–4533
- [29] Goldstein N.B., Johannes W.U., Gadeliya A.V., Green M.R., Fujita M., Norris D.A., Shellman Y.G.: Active N-Ras and B-Raf inhibit anoikis by downregulating Bim expression in melanocytic cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2009; 129: 432–437
- [30] Ham J., Towers E., Gilley J., Terzano S., Randall R.: BH3-*only* proteins: key regulators of neuronal apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2005; 12: 1015–1020
- [31] Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011; 144: 646–674
- [32] Hao J.H., Yu M., Liu F.T., Newland A.C., Jia L.: Bcl-2 inhibitors sensitize tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by uncoupling of mitochondrial respiration in human leukemic CEM cells. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3607–3616
- [33] Harford T.J., Shaltouki A., Weyman C.M.: Increased expression of the pro-apoptotic Bcl2 family member PUMA and apoptosis by the muscle regulatory transcription factor MyoD in response to a variety of stimuli. *Apoptosis*, 2010; 15: 71–82
- [34] Harrison L.R., Micha D., Brandenburg M., Simpson K.L., Morrow C.J., Denny O., Hodgkinson C., Yunus Z., Dempsey C., Roberts D., Blackhall F., Makin G., Dive C.: Hypoxic human cancer cells are sensitized to BH-3 mimetic-induced apoptosis via downregulation of the Bcl-2 protein Mcl-1. *J. Clin. Invest.*, 2011; 121: 1075–1087
- [35] Huang L.H., Hu J.Q., Tao W.Q., Li Y.H., Li G.M., Xie P.Y., Liu X.S., Jiang J.: Gossypol inhibits phosphorylation of Bcl-2 in human leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2010; 645: 9–13
- [36] Huang S., Sinicrope F.A.: BH3 mimetic ABT-737 potentiates TRAIL-mediated apoptotic signaling by unsequestering Bim and Bak in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.*, 2008; 68: 2944–2951
- [37] Huang Y.W., Wang L.S., Dowd M.K., Wan P.J., Lin Y.C.: (–)-Gossypol reduces invasiveness in metastatic prostate cancer cells. *Anticancer Res.*, 2009; 29: 2179–2188
- [38] Hutchinson R.W., Ing N.H., Burghardt R.C.: Induction of c-fos, and cytochrome c oxidase subunits I and II by gossypol acetic acid in rat liver cells. *Cell Biol. Toxicol.*, 1998; 14: 391–399
- [39] Jóna A., Khaskhely N., Buglio D., Shafer J.A., Derenzini E., Bolland C.M., Medeiros L.J., Illés A., Ji Y., Younes A.: The histone deacetylase inhibitor entinostat (SNDX-275) induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cells and synergizes with Bcl-2 family inhibitors. *Exp. Hematol.*, 2011; 39: 1007–1017.e1
- [40] Juntilla M.R., Evan G.I.: p53 – a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 821–829
- [41] Kang M.H., Kang Y.H., Szymanska B., Wilczynska-Kalak U., Sheard M.A., Harned T.M., Lock R.B., Reynolds C.P.: Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2007; 110: 2057–2066
- [42] Keuling A.M., Andrew S.E., Tron V.A.: Inhibition of p38 MAPK enhances ABT-737-induced cell death in melanoma cell lines: novel regulation of PUMA. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 2010; 23: 430–440

- [43] Kim H., Tu H.C., Ren D., Takeuchi O., Jeffers J.R., Zambetti G.P., Hsieh J.J., Cheng E.H.: Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell*, 2009; 36: 487–499
- [44] King M.A.: Antimycin A-induced killing of HL-60 cells: apoptosis initiated from within mitochondria does not necessarily proceed via caspase 9. *Cytometry A*, 2005; 63: 69–76
- [45] Kitada S., Kress C.L., Krajewska M., Jia L., Pellicchia M., Reed J.C.: Bcl-2 antagonist agosypol (NSC736630) displays single-agent activity in Bcl-2-transgenic mice and has superior efficacy with less toxicity compared with gossypol (NSC19048). *Blood*, 2008; 111: 3211–3219
- [46] Konopleva M., Watt J., Contractor R., Tsao T., Harris D., Estrov Z., Bornmann W., Kantarjian H., Viallet J., Samudio I., Andreeff M.: Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (Obatoclax). *Cancer Res.*, 2008; 68: 3413–3420
- [47] Kuroda J., Taniwaki M.: Involvement of BH3-*only* proteins in hematologic malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2009; 71: 89–101
- [48] Lee E.F., Smith B.J., Horne W.S., Mayer K.N., Evangelista M., Colman P.M., Gellman S.H., Fairlie W.D.: Structural basis of Bcl-X_L recognition by a BH3-mimetic α/β -peptide generated by sequence-based design. *ChemBiochem*, 2011; 12: 2025–2032
- [49] Letai A., Bassik M.C., Walensky L.D., Sorcinelli M.D., Weiler S., Korsmeyer S.J.: Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2002; 2: 183–192
- [50] Li J., Viallet J., Haura E.B.: A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008; 61: 525–534
- [51] Liu Y., Li Y., Wang H., Yu J., Lin H., Xu D., Wang Y., Liang A., Liang X., Zhang X., Fu M., Qian H., Lin C.: BH3-based fusion artificial peptide induces apoptosis and targets human colon cancer. *Mol. Ther.*, 2009; 17: 1509–1516
- [52] Lomonosova E., Chinnadurai G.: BH3-*only* proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 2008; 27(Suppl.1): S2–S19
- [53] Macoska J.A., Adsule S., Tantivejkul K., Wang S., Pienta K.J., Lee C.T.: $(-)$ -Gossypol promotes the apoptosis of bladder cancer cells *in vitro*. *Pharmacol. Res.*, 2008; 58: 323–331
- [54] Manion M.K., O'Neill J.W., Giedt C.D., Kim K.M., Zhang K.Y., Hockenbery D.M.: Bcl-X_L mutations suppress cellular sensitivity to antimycin A. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 2159–2165
- [55] McCoy F., Hurwitz J., McTavish N., Paul I., Barnes C., O'Hagan B., Odrzywol K., Murray J., Longley D., McKerr G., Fennell D.A.: Obatoclax induces Atg7-dependent autophagy independent of beclin-1 and BAX/BAK. *Cell Death Dis.*, 2010; 1: e108
- [56] Meng Y., Li Y., Li J., Li H., Fu J., Liu Y., Liu H., Chen X.: $(-)$ -Gossypol and its combination with imatinib induce apoptosis in human chronic myeloid leukemic cells. *Leuk. Lymphoma*, 2007; 48: 2204–2212
- [57] Miller L.A., Goldstein N.B., Johannes W.U., Walton C.H., Fujita M., Norris D.A., Shellman Y.G.: BH3 mimetic ABT-737 and a proteasome inhibitor synergistically kill melanomas through Noxa-dependent apoptosis. *J. Invest. Dermatol.*, 2009; 129: 964–971
- [58] Mitsiades C.S., Hayden P., Kotoula V., McMillin D.W., McMullan C., Negri J., Delmore J.E., Poulaki V., Mitsiades N.: Bcl-2 overexpression in thyroid carcinoma cells increases sensitivity to Bcl-2 homology 3 domain inhibition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007; 92: 4845–4852
- [59] Mohammad R.M., Wang S., Aboukameel A., Chen B., Wu X., Chen J., Al-Katib A.: Preclinical studies of a nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-X_L [$(-)$ -gossypol] against diffuse large cell lymphoma. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 13–21
- [60] Mohan N., Karmakar S., Choudhury S.R., Banik N.L., Ray S.K.: Bcl-2 inhibitor HA14-1 and genistein together adeptly down regulated survival factors and activated cysteine proteases for apoptosis in human malignant neuroblastoma SK-N-BE2 and SH-SY5Y cells. *Brain Res.*, 2009; 1283: 155–166
- [61] Moon D.O., Choi Y.H., Moon S.K., Kim W.J., Kim G.Y.: Gossypol decreases tumor necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression via suppression of NF- κ B activity. *Food Chem. Toxicol.*, 2011; 49: 999–1005
- [62] Moon D.O., Kim M.O., Kang S.H., Choi Y.H., Park S.Y., Kim G.Y.: HA14-1 sensitizes TNF- α -induced apoptosis via inhibition of the NF- κ B signaling pathway: involvement of reactive oxygen species and JNK. *Cancer Lett.*, 2010; 292: 111–118
- [63] Mott J.L., Bronk S.F., Mesa R.A., Kaufmann S.H., Gores G.J.: BH3-*only* protein mimetic obatoclax sensitizes cholangiocarcinoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.*, 2008; 7: 2339–2347
- [64] Nakamura M., Ishida E., Shimada K., Nakase H., Sakaki T., Konishi N.: Frequent HRK inactivation associated with low apoptotic index in secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol.*, 2005; 110: 402–410
- [65] Nguyen M., Marcellus R.C., Roulston A., Watson M., Serfass L., Murthy Madiraju S.R., Goulet D., Viallet J., Bélec L., Billot X., Acoca S., Purisima E., Wiegmanns A., Cluse L., Johnstone R.W., Beauparlant P., Shore G.C.: Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 19512–19517
- [66] Oakes S.R., Vaillant F., Lim E., Lee L., Breslin K., Feleppa F., Deb S., Ritchie M.E., Takano E., Ward T., Fox S.B., Generali D., Smyth G.K., Strasser A., Huang D.C., Visvader J.E., Lindeman G.J.: Sensitization of BCL-2-expressing breast tumors to chemotherapy by the BH3 mimetic ABT-737. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (w druku)
- [67] O'Brien S.M., Claxton D.F., Crump M., Faderl S., Kipps T., Keating M.J., Viallet J., Cheson B.D.: Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009; 113: 299–305
- [68] Oliver C.L., Miranda M.B., Shangary S., Land S., Wang S., Johnson D.E.: $(-)$ -Gossypol acts directly on the mitochondria to overcome Bcl-2- and Bcl-X_L-mediated apoptosis resistance. *Mol. Cancer Ther.*, 2005; 4: 23–31
- [69] Oltersdorf T., Elmore S.W., Shoemaker A.R., Armstrong R.C., Augeri D.J., Belli B.A., Brunccon M., Deckwerth T.L., Dinges J., Hajduk P.J., Joseph M.K., Kitada S., Korsmeyer S.J., Kunzer A., Letai A., Li C., Mitten M.J., Nettesheim D.G., Ng S., Nimmer P.M., O'Connor J.M., Oleksijew A., Petros A.M., Reed J.C., Shen W., Tahir S.K., Thompson C.B., Tomaselli K.J., Wang B., Wendt M.D., Zhang H., Fesik S.W., Rosenberg S.H.: An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 2005; 435: 677–681
- [70] Pan J., Cheng C., Verstovsek S., Chen Q., Jin Y., Cao Q.: The BH3-mimetic GX15-070 induces autophagy, potentiates the cytotoxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in esophageal carcinoma cells. *Cancer Lett.*, 2010; 293: 167–174
- [71] Paoluzzi L., Gonen M., Gardner J.R., Mastrella J., Yang D., Holmlund J., Sorensen M., Leopold L., Manova K., Marcucci G., Heaney M.L., O'Connor O.A.: Targeting Bcl-2 family members with the BH3 mimetic AT-101 markedly enhances the therapeutic effects of chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo* models of B-cell lymphoma. *Blood*, 2008; 111: 5350–5358
- [72] Ponassi R., Biasotti B., Tomati V., Bruno S., Poggi A., Malacarne D., Cimoli G., Salis A., Pozzi S., Miglio M., Damonte G., Cozzini P., Spyraki F., Campanini B., Bagnasco L., Castagnino N., Tortolina L., Mumot A., Frassoni F., Daga A., Cilli M., Piccardi F., Monfardini I., Perugini M., Zoppoli G., D'Arrigo C., Pesenti R., Parodi S.: A novel Bim-BH3-derived Bcl-X_L inhibitor: biochemical characterization, *in vitro*, *in vivo* and *ex-vivo* anti-leukemic activity. *Cell Cycle*, 2008; 7: 3211–3224
- [73] Priyadarshi A., Roy A., Kim K.S., Kim E.E., Hwang K.Y.: Structural insights into mouse anti-apoptotic Bcl-X_L reveal affinity for Beclin 1 and gossypol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010; 394: 515–521
- [74] Ray S., Bucur O., Almasan A.: Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis*, 2005; 10: 1411–1418
- [75] Reiners J.J. Jr., Kassel D.: Susceptibility of myelomonocytic leukemia U937 cells to the induction of apoptosis by the non-peptidic Bcl-2 ligand HA14-1 is cell cycle phase-dependent. *Cancer Lett.*, 2005; 221: 153–163
- [76] Shamas-Din A., Brahmabhatt H., Leber B., Andrews D.W.: BH3-*only* proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1813: 508–520
- [77] Shoemaker A.R., Mitten M.J., Adickes J., Ackler S., Refici M., Ferguson D., Oleksijew A., O'Connor J.M., Wang B., Frost D.J., Bauch J., Marsh K., Tahir S.K., Yang X., Tse C., Fesik S.W., Rosenberg S.H., Elmore S.W.: Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 3268–3277
- [78] Skommer J., Wlodkowic D., Mättö M., Eray M., Pelkonen J.: HA14-1, a small molecule Bcl-2 antagonist, induces apoptosis and modulates action of selected anticancer drugs in follicular lymphoma B cells. *Leuk. Res.*, 2006; 30: 322–331

- [79] Smoot R.L., Blechacz B.R., Werneburg N.W., Bronk S.F., Sinicrope F.A., Sirica A.E., Gores G.J.: A Bax-mediated mechanism for oba-toclax-induced apoptosis of cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res.*, 2010; 70: 1960–1969
- [80] Swoboda E., Strzagała L.: BNIP3 jako nietypowy przedstawiciel rodziny Bcl-2. Część 1: BNIP3 – regulator nieapoptycznej programowanej śmierci komórek. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 409–417
- [81] Tahir S.K., Yang X., Anderson M.G., Morgan-Lappe S.E., Sarthy A.V., Chen J., Warner R.B., Ng S.C., Fesik S.W., Elmore S.W., Rosenberg S.H., Tse C.: Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737. *Cancer Res.*, 2007; 67: 1176–1183
- [82] Tian D., Das S.G., Doshi J.M., Peng J., Lin J., Xing C.: sHA 14-1, a stable and ROS-free antagonist against anti-apoptotic Bcl-2 proteins, bypasses drug resistances and synergizes cancer therapies in human leukemia cell. *Cancer Lett.*, 2008; 259: 198–208
- [83] Trudel S., Li Z.H., Rauw J., Tiedemann R.E., Wen X.Y., Stewart A.K.: Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood*, 2007; 109: 5430–5438
- [84] Tse C., Shoemaker A.R., Adickes J., Anderson M.G., Chen J., Jin S., Johnson E.F., Marsh K.C., Mitten M.J., Nimmer P., Roberts L., Tahir S.K., Xiao Y., Yang X., Zhang H., Fesik S., Rosenberg S.H., Elmore S.W.: ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.*, 2008; 68: 3421–3428
- [85] Tuszyński G.P., Cossu G.: Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. *Cancer Res.*, 1984; 44: 768–771
- [86] van Delft M.F., Wei A.H., Mason K.D., Vandenberg C.J., Chen L., Czabotar P.E., Willis S.N., Scott C.L., Day C.L., Cory S., Adams J.M., Roberts A.W., Huang D.C.: The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*, 2006; 10: 389–399
- [87] Verhaegen M., Bauer J.A., Martin de la Vega C., Wang G., Wolter K.G., Brenner J.C., Nikolovska-Coleska Z., Bengtson A., Nair R., Elder J.T., Van Brocklin M., Carey T.E., Bradford C.R., Wang S., Soengas M.S.: A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res.*, 2006; 66: 11348–11359
- [88] Vogler M., Butterworth M., Majid A., Walewska R.J., Sun X.M., Dyer M.J., Cohen G.M.: Concurrent up-regulation of BCL-X_L and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009; 113: 4403–4413
- [89] Vogler M., Dickens D., Dyer M.J., Owen A., Pirmohamed M., Cohen G.M.: The B-cell lymphoma 2 (BCL2)-inhibitors, ABT-737 and ABT-263, are substrates for P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011; 408: 344–349
- [90] Vogler M., Furdas S.D., Jung M., Kuwana T., Dyer M.J., Cohen G.M.: Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 4217–4225
- [91] Walensky L.D., Kung A.L., Escher I., Malia T.J., Barbuto S., Wright R.D., Wagner G., Verdine G.L., Korsmeyer S.J.: Activation of apoptosis *in vivo* by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*, 2004; 305: 1466–1470
- [92] Wang L., Kong F., Kokoski C.L., Andrews D.W., Xing C.: Development of dimeric modulators for anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008; 18: 236–240
- [93] Wang Z., Azmi A.S., Ahmad A., Banerjee S., Wang S., Sarkar F.H., Mohammad R.M.: TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, inhibits cell growth and induces apoptosis in pancreatic cancer: involvement of Notch-1 signaling pathway. *Cancer Res.*, 2009; 69: 2757–2765
- [94] Weber A., Kirejczyk Z., Potthoff S., Ploner C., Häcker G.: Endogenous Noxa determines the strong proapoptotic synergism of the BH3-mimetic ABT-737 with chemotherapeutic agents in human melanoma cells. *Transl. Oncol.*, 2009; 2: 73–83
- [95] Willis S.N., Chen L., Dewson G., Wei A., Naik E., Fletcher J.I., Adams J.M., Huang D.C.: Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-X_L, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev.*, 2005; 19: 1294–1305
- [96] Witham J., Valenti M.R., De-Haven-Brandon A.K., Vidot S., Eccles S.A., Kaye S.B., Richardson A.: The Bcl-2/Bcl-X_L family inhibitor ABT-737 sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 7191–7198
- [97] Yang B., Liu D., Huang Z.: Synthesis and helical structure of lactam bridged BH3 peptides derived from pro-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004; 14: 1403–1406
- [98] Yecies D., Carlson N.E., Deng J., Letai A.: Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood*, 2010; 115: 3304–3313
- [99] Zalckvar E., Berissi H., Mizrachy L., Idelchuk Y., Koren I., Eisenstein M., Sabanay H., Pinkas-Kramarski R., Kimchi A.: DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-X_L and induction of autophagy. *EMBO Rep.*, 2009; 10: 285–292
- [100] Zheng L., Yang W., Zhang C., Ding W.J., Zhu H., Lin N.M., Wu H.H., He Q.J., Yang B.: GDC-0941 sensitizes breast cancer to ABT-737 *in vitro* and *in vivo* through promoting the degradation of Mcl-1. *Cancer Lett.*, 2011; 309: 27–36

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.