

Modulatorji apoptoze kot nova zdravila

Modulators of Apoptosis in drug development

Iztok Vidic, Dušan Šuput, Irina Milisav

Povzetek: Vzrok mnogih bolezni, za katere še ne obstajajo učinkoviti načini zdravljenja, so napake v regulaciji programirane celične smrti (apoptoze). Mnoge raziskave razvoja zdravil za te bolezni so zato osredotočene na možnosti uravnavanja aktivnosti beljakovin, ki so udeležene v apoptozi, npr. kaspaz, proteinskih kinaz, inhibitorjev apoptotskih beljakovin IAP, beljakovin družine Bcl-2 in drugih. Spodaj so navedeni nekateri primeri uporabe modulatorjev apoptotskih beljakovin kot zdravila. V 2. fazi kliničnih preizkusov je uporaba široko spektralnega inhibitorja kaspaz za zdravljenje kroničnega hepatitisa C. V fazi predkliničnih raziskav je inhibitor kaspaze-3, ki je potencialno uporaben za zdravljenje Huntingtonove bolezni. Od leta 2001 je v uporabi inhibitor tirozinske kinaze, ki ga uporabljajo za zdravljenje levkemije in nekaterih gastrointestinalnih tumorjev. Vse pomembnejša v sodobnem pristopu k razvoju zdravil postaja tudi tehnika uporabe nasprotnosmiselnih oligonukleotidov (ang. *antisense*). Med najuspešnejšimi pristopi je utišanje gena za protein BCL-2, ki je v zaključnih fazah kliničnih preizkusov in ga že vrednotijo na Evropski agenciji za zdravila. Poznavanje funkcij beljakovin v apoptozi in njihovih modulatorjev je ključno za razvoj novih zdravil s katerimi lahko prožimo ali zavremo potek apoptoze v skladu z etiologijo bolezni.

ključne besede: apoptoza, razvoj zdravil, Bcl-2, IAP, proteinske kinaze

Abstract: Defects in regulation of apoptosis result in a number of human diseases for which there are no adequate medical or pharmacological treatments. Many drug discovery studies have focused on small molecular modulators of apoptosis-relevant proteins, like caspases, protein kinases, inhibitors of apoptotic proteins (IAP), Bcl-2 family proteins and others. For example, preclinical studies of reversible caspase-3 inhibitor have shown its potential neuroprotective role in animal models of Huntington disease. An irreversible broad spectrum caspase inhibitor for chronic hepatitis C virus infection is in the phase II clinical trials. An inhibitor of tyrosine kinase involved in the regulation of cell proliferation is being used for the treatment of chronic myeloid leukaemia and some gastrointestinal tumours since 2001. Modern drug development strategies involve also the use of antisense mRNA in cancer treatment. Among the most successful is the antisense targeting of BCL-2, which is currently being reviewed for the approval by the European Medicines Agency. The knowledge about the functions of proteins involved in apoptosis and of their modulators is therefore crucial for designing new drugs, which promote or suppress apoptosis according to the aetiology of disease.

key words: apoptosis, drug development, Bcl-2, IAP, protein kinase

1 Uvod

Apoptoza je pomemben proces med organogenezo, saj iz tkiva odstrani odvečne, nepotrebne in okvarjene celice, ključna pa je tudi v preostalem obdobju življenja s fiziološkim pomenom v samoobnavljajočih se tkivih, kot so koža, črevesna sluznica in kostni mozeg (1).

Motnje in okvare apoptoze zato vodijo v številna patološka stanja in se odražajo v mnogih pomembnih boleznih. Po nekaterih ocenah naj bi bilo premalo ali preveč apoptoze vpleteno v več kot polovico vseh bolezni, za katere še ne obstajajo učinkoviti načini zdravljenja (2). Tako je izguba telesnih celic zaradi prekomernih apoptotskih procesov povezana s kapjo, oslavitvijo in zastojem delovanja srca, nevrolskimi motnjami, nevrodegeneracijo ter s sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS). Nezmožnost odstranitve

okvarjenih in mutiranih celic zaradi napak v (ne)poteku apoptotskih procesov pa je značilnost avtoimunih ter malignih obolenj (1). Pri tem je spoznavanje biokemičnih mehanizmov in molekularnih osnov uravnavanja apoptoze podlaga za izdelavo novih načinov zdravljenja teh bolezni.

2 Razvoj zdravil

Eksperimentalno dokazane nepravilnosti v uravnavanju apoptoze so vpletene v nastanek in razvoj bolezni, kot so AIDS, Alzheimerjeva, Huntingtonova in Parkinsonova bolezen, avtoimunske bolezni (sistemski lupus eritematosus, diabetes melitus tipa I in II, revmatoidni artritis, rakasta obolenja ter možganska kap in ishemična bolezen srca (povzeto v 1)). Veliko zanimanje strokovne javnosti je zato usmerjeno v raziskave novih terapevtskih strategij preko obetajočih možnosti farmakološkega uravnavanja apoptotskih mehanizmov.

2.1 Kaspaze

Apoptotsko značilne morfološke in biokemične spremembe so posledica aktivacije predstavnikov proteinske družine cisteinskih proteaz, ki cepijo za aspartatom. Ti encimi se imenujejo kaspaze (ang. *caspases* = *aspartate-specific cysteine proteases*) (povzeto v 2). Obstajata dva pomembna načina njihove aktivacije. Pri prvem (t. i. ekstrinzična pot) kaspaze aktivirajo izvencelični signali, ki se prenesejo v celico preko receptorjev za ligande Fas, TNF ali TRAIL. Ti receptorji so transmembranski proteini, ki imajo receptorsko domeno za vezavo liganda izpostavljeno na površini celice. Vezava liganda na receptor povzroči vezavo nekaterih proteinov na citosolno stran receptorja. Med temi proteini je tudi prokaspaza-8 (povzeto v 1). Mitochondriji so vključeni v drug tip aktivacije kaspaz (t. i. intrinzična pot), pri katerem se ob signalu za sproženje apoptoze iz medmembranskega prostora mitohondrijev v citosol sprosti citokrom c. Vezava citokroma c na citosolni protein Apaf-1 (ang. apoptotic protease activating factor-1) v odvisnosti od ATP povzroči oligomerizacijo Apaf-1 in nastanek multimerne kompleksa med Apaf-1, citokromom c in prokaspazo-9 (povzeto v 1). Ta kompleks se imenuje apoptosom, aktivira prokaspazo-9, kaspaza-9 pa lahko nato aktivira kaspazi -3 ter -7. Ker kaspazi -8 in -9 delujeta na začetku proženja kaspazne kaskade, sta zanimivi tarči za razvoj novih zdravil, ki bi delovala na ekstrinzično ali na intrinzično pot v najzgodnejših stopnjah proteaznih kaskad.

2.1.1 Majhni molekularni inhibitorji

Kaspaze prepoznavajo specifična tetrapeptidna zaporedja proteinov in cepijo peptidno vez na C-terminalni strani aspartatnega ostanka znotraj tetrapeptidnih zaporedij. Pri tem ima velik pomen za specifičnost proteolize aminokislinski ostanek na prvem mestu v tetrapeptidnem zaporedju (4). Odkrite tridimenzionalne strukture aktivnih mest nekaterih kaspaz in njihove tetrapeptidne specifičnosti omogočajo razvoj majhnih molekularnih inhibitorjev, ki bi jih lahko uporabili za zdravljenje nekaterih bolezni. Tako je podjetje IDUN Pharmaceuticals (ZDA) v 2. fazi kliničnih preizkusov uporabe široko spektralnega ireverzibilnega inhibitorja kaspaz IDN-6556 pri zdravljenju kroničnega hepatitisa C (5), potekajo pa tudi predklinične raziskave tega zdravila za zdravljenja akutne odpovedi jeter pri transplantacijah le teh (6). Družba Merck & Co. (ZDA) pa je v fazi predkliničnih raziskav uporabe inhibitorja M826 za kaspazo-3, ki je potencialno uporaben za zdravljenje Huntingtonove bolezni (7).

2.1.2 Utišanje kaspaznih genov

Učinkovito orodje za zmanjšanje ekspresije genov v sesalskih celicah predstavlja tehnika utišanja genov s siRNA (ang. small interfering RNA). Zender in sodelavci so proučevali *in vivo* utišanje gena za kaspazo-8 s siRNA pri akutnem virusnem hepatitisu (8). siRNA proti kaspazi-8 inhibira ekspresijo te kaspaze, kar zaščiti celice pred apoptozo, posredovano z vezavo adenovirusnega liganda (AdFasL) na receptorje Fas (8). Ta predklinična raziskava odpira upanje v uspešno uporabo tehnike utišanja genov s siRNA pri mnogih boleznih, katerih vzrok je pretirano proženje apoptoze zaradi povečane ekspresije in aktivacije različnih iniciacijskih kaspaz.

2.1.3 Kaspaze in virus HIV

Glavno oviro pri zdravljenju AIDS-a predstavljajo rezervoarji virusa

HIV v latentno okuženih pomagalnih limfocitih T ter drugih potencialnih rezervoarjih, npr. v makrofagih in dendritskih celicah (9). Virus HIV povzroča citopatološke učinke preko mnogih mehanizmov, med katere sodi tudi apoptoza. Za adenovirusni protein E1B 19K so ugotovili, da inhibira apoptozo limfocitov T, inducirano z virusom HIV (10). Pri tem pa se je pokazalo, da inhibicija apoptoze limfocitov T z E1B 19K ne zmanjša replikacije virusa HIV in ne omogoči dovzetnosti inficiranih celic za učinkovit imunski odziv. Takšna terapija proti virusu HIV se je zato izkazala za neučinkovito (3).

Alterativno pot k zdravljenju infekcije s HIV predstavlja popolno izkoreninjenje z virusom okuženih celic. Vocerco-Akbani in sodelavci so predlagali način za doseg tega s konstruiranjem prokaspazi-3 analognega proteina (11). Ta je sestavljen iz kaspaze-3, združene s sekvenco TAT, ki nadomešča prodromo kaspaze-3 in hkrati omogoči prehod proteinov iz zunajceličnega prostora preko plazmaleme v citosol. V fuzijskem proteinu TAT-kaspaza-3 so med domeno TAT in domeno za kaspazo-3 vstavljena specifična aminokislinska zaporedja, ki jih prepoznajo in cepijo proteaze virusa HIV. S proteolitično cepitvijo na teh mestih pride do aktivacije kaspaze-3, ki nato povzroči apoptozo z virusom HIV inficiranih celic (11). Rešitev je zelo domiselna, vendar so v dostopni literaturi zaenkrat objavljene raziskave le na celičnih kulturah.

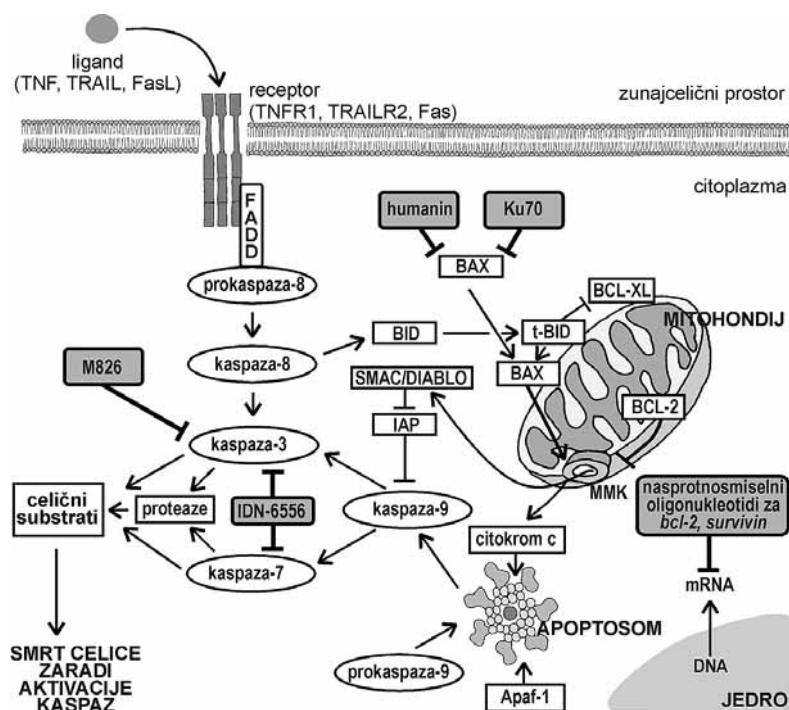
2.2 Inhibitorji apoptoznih proteinov

Inhibitorji apoptoznih proteinov IAP (ang. inhibitors of apoptotic proteins) imajo mnoge funkcije, najpomembnejša pa je njihova vezava na aktivirane kaspaze (ponavadi sta to efektorski kaspazi-3 in -7 ter iniciacijska kaspaza-9), s čimer jih inaktivirajo. Proteini IAP so vpleteni tudi v bolezni – npr. ekspresija proteina survivina je lahko povečana v rakastih celicah (12). Utišanje gena za survivin z nasprotnosmiselno mRNA je trenutno v 1. fazi kliničnih preizkusov (Isis Pharmaceuticals Inc., ZDA) (13, 14), potekajo pa tudi predklinične raziskave zdravljenja raka z inhibicijo proteinov IAP z uporabo majhnih molekularnih antagonistov (15, 16).

Ker delovanje proteinov IAP inhibira protein Smac/DIABLO, ki se med apoptozo tako kot citokrom c sprosti iz mitohondrijev (17, 18), so predvideli možnost razvoja novih zdravil na osnovi mehanizma vezave med proteini IAP in Smac/DIABLO. Chai in sodelavci (2002) so ugotovili, da je N-terminalni del proteina SMAC zadosten za inhibicijo proteinov IAP, kar povzroči njihovo ločitev od aktiviranih kaspaz (19). To spoznanje odpira možnost razvoja zdravil za nekatere bolezni, katerih vzrok je zmanjšano proženje kaspaz, s konstruiranjem majhnih peptidnih inhibitorjev za proteine IAP na osnovi aminokislinskega zaporedja proteina Smac/DIABLO, vendar tovrstne raziskave na kliničnem nivoju zaenkrat niso objavljene v dostopni literaturi.

2.3 Družina proteinov Bcl-2

Družina proteinov Bcl-2 združuje tako pro- kot tudi antiapoptotske proteine, ki imajo v sekvenčnem zaporedju do štiri konzervativne Bcl-2 homologne domene (BH₁, BH₂, BH₃ in BH₄). Domene BH kodirajo α -vijačnice in na osnovi njihovega števila ter funkcije proteinov Bcl-2 lahko slednje razdelimo v 3 razrede: (i) antiapoptotski proteini, ki imajo ohranjene vse štiri domene BH (npr. BCL-2, BCL-xL, BCL-w); (ii) proapoptotski proteini, ki vsebujejo tri domene BH₁-BH₃ (npr. BAK, BAX) in (iii) proapoptotski proteini Bcl-2 z eno domeno BH, ki so



Slika 1 Modulatorji apoptoze – potencialna zdravila

Dve osnovni poti proženja apoptoze: s celične površine z aktivacijo kaspaze-8 in prek mitohondrija z aktivacijo kaspaze -9. Modulatorji apoptoze – potencialna zdravila – so na temno sivem ozadju, ob proteinu, katerega inhibirajo. MMK: mitohondrijski mega kanal.

(POTENCIALNE) UČINKOVINE	MESTO IN NAČIN DELOVANJA	BOLEZEN	STADIJ RAZISKAV
IDN-6556	inhibitor kaspaz -3 in -7	kronični hepatitis C	Faza II kliničnih preizkusov (IDUN Pharmaceuticals - ZDA)
M826	inhibitor kaspaze-3	Huntingtonova bolezen	predklinična (Merck & Co. - ZDA)
siRNA za kaspazo-8	utišanje mRNA za kaspazo-8	nevrodegenerativne bolezni, avtoimuna obolenja	predklinična (Medical School Hannover - Nemčija)
fuzijski protein TAT-kaspaza 3	sprožitev apoptoze po razcepu s proteazami virusa HIV	AIDS	predklinična (Howard Hughes Medical Institute – ZDA)
nasprotnosmiselna RNA za survivin	utišanje mRNA za survivin	različni malignomi	faza II kliničnih preizkusov (Isis Pharmaceuticals Inc. - ZDA)
peptidi Ku70	inhibicija proteina BAX	nevrodegenerativne bolezni	predklinična (The Blood Center of South Eastern Wisconsin - ZDA)
nasprotnosmiselna RNA za <i>bcl-2</i>	utišanje mRNA za protein BCL-2	levkemija, maligni melanom, multipli mielom	faza III kliničnih preizkusov (Genta Inc.- ZDA)
Glivec®	inhibitor tirozinske kinaze	levkemija, gastrointestinalni tumorji	odobreno leta 2001 pri FDA (Novartis Pharma GmbH - Nemčija)
Iressa	inhibitor kinaze FGF-R	pljučni rak	faza III kliničnih preizkusov (AstraZeneca – Velika Britanija)
Tarceva™	inhibitor kinaze FGF-R	pljučni rak	faza III kliničnih preiskusov (OSI Pharmaceuticals Inc. - ZDA)
flavopiridol	inhibitor od ciklina odvisnih kinaz (Cdks)	kronična limfocitna levkemija	faza III kliničnih preiskusov (Chronic Lymphocytic Leukemia Research Consortium - ZDA)

Tabela 1: Preizkušanje modulatorjev apoptoze za zdravljenje bolezni, katerih vzrok ali posledica so napake v regulaciji apoptoze

homologni ostalim predstavnikom le v domeni BH₃ (npr. BAD, BID, BIM) (20). Pri ljudeh so našli 23 predstavnikov te družine proteinov, kar bi lahko omogočilo tkivno-specifično selekcijo tarčnih mest za razvoj zdravil (1).

Odkrivanje sekundarne in terciarne strukture proteina BCL-2 je razkrilo, da je domena BH₄ ključna za heterodimerizacijo proteinov BCL-2 in BAX, kar prepreči sprostitve citokroma c in proteina Smac/DIABLO iz mitohondrijev v citosol, s tem pa je preprečena tudi intrinzična pot proženja apoptoze. Zato obstaja možnost zdravljenja malignomov s preprečevanjem delovanja proteina BCL-2 s pomočjo agensov, ki bi se vezali z njegovo domeno BH₄ (21).

Znižanje nivoja ekspresije proteina BCL-xL, kakor tudi drugih negativnih regulatorjev (supresorjev) v procesu apoptoze zmanjša sposobnost preživetja celic. Novi načini zdravljenja raka na osnovi zniževanja intracelularnih koncentracij antiapoptotskih dejavnikov danes vedno bolj vznikajo z biotehnoško uporabnostjo DNA, ki kodira nasprotnosmiselne oligonukleotide za utišanje mRNA supresorjev apoptoze (22).

Protein BAX najdemo v normalnih celicah v neaktivni obliki v citoplazmi, kjer je v kompleksu s proteini (npr. Ku70, 14-3-3 in peptid humanin), ki preprečujejo njegovo translokacijo v mitohondrije (23). Hidrofobna C-terminalna transmembranska domena proteina BAX, s katero se ta protein vsidra v zunanjo mitohondrijsko membrano, je v neaktivni citosolni konformaciji ujeta v hidrofoben žep proteina (24), ki ga sestavljajo domene BH₁, BH₂ in BH₃ (25). Aktivacija proapoptotskih proteinov Bcl-2, ki so homologni ostalim predstavnikom le v domeni BH₃, sprosti protein BAX iz proteinskega kompleksa (24) in povzroči njegovo translokacijo iz citosola do mitohondrijev (23). Pri tem se C-terminalna transmembranska domena sprosti iz hidrofobnega žepa, kar omogoči vezavo proteina BAX v zunanjo mitohondrijsko membrano, kjer homo-oligomerizira in s sodelovanjem še nekaterih drugih proteinov tvori perforacije (mitohondrijske mega kanale) v mitohondrijskih membranah (24). C-terminalna transmembranska regija proteina BAX je zato obetajoča tarča za razvoj terapevtikov, ki bi vplivali na mitohondrijsko posredovano proženje apoptoze. Terapevtiki, ki bi izzvali sprostitve C-terminalne regije iz hidrofobnega žepa proteina BAX, bi s tem sprožili apoptozo in bi zato lahko bili potencialno uporabni za zdravljenje rakastih obolenj. Po drugi strani pa bi lahko terapevtike, ki bi ovirali sprostitve C-terminalne regije iz hidrofobnega žepa in s tem inhibirali translokacijo proteina BAX iz citosola v zunanjo membrano mitohondrijev, uporabili za zdravljenje nevrodegenerativnih in drugih bolezni, ki so povezane z izgubo telesnih celic zaradi prekomernih apoptotskih procesov (25). Taki terapevtiki za nevrodegenerativne bolezni bi lahko bili 5-aminokislinski peptidi BIP (ang. BAX-inhibiting peptides), ki so jih izdelali na osnovi homologije vezavnega mesta proteina Ku70 za protein BAX (23). Predklinične raziskave uporabe peptidov Ku70 potekajo na Centru za raziskave krvi v Wisconsinu (ZDA) (26).

Tzung in sodelavci so odkrili, da majhni peptidi, ki oponašajo domeno BH₃, inducirajo apoptozo preko inhibicije antiapoptotskih proteinov Bcl-2 (27). Tako oblikovane peptide bi zato lahko uporabili kot obetavno antitumorsko terapijo, saj je povečana ekspresija antiapoptotskih proteinov BCL-2 in BCL-xL povezana z rezistenco rakastih celic na mnoga zdravila (27), npr. cisplatin, bleomicin idr.

Podjetje Genta Inc. (ZDA) pa uspešno zaključuje 3. fazo kliničnih preizkusov zdravljenja nekaterih oblik raka (levkemija, maligni melanom in multipli mielom) z utišanjem gena za protein BCL-2 s pomočjo nasprotnosmiselnega oligonukleotida, ki se veže na prvih 6 kodonov sekvence mRNA za človeški *bcl-2* in s tem povzroči njegovo degradacijo (28, 29).

2.4 Proteinske kinaze

Proteinske kinaze so v procesu apoptoze vpletene v prenos apoptotskih ali antiapoptotskih signalov, kot tudi izvršitev samouničevalnega procesa, zato so tako proteinske kinaze kot tudi njihovi inhibitorji zanimiva tarčna mesta za razvoj novih zdravil pri zdravljenju raka. Najobetavnejši pristop k razvoju tovrstnih terapij predstavlja konstruiranje specifičnih ATP-kompetitivnih inhibitorjev, ki bi se vezali v žepe za vezavo ATP ob kinaznih aktivnih centrih (30). Od leta 2001 je v uporabi Glivec® (Novartis Pharma GmbH, Nemčija), inhibitor v kontrolo proliferacije vpletene tirozinske kinaze, ki ga uporabljajo za zdravljenje levkemije in nekaterih gastrointestinalnih tumorjev (31). V 3. fazi kliničnih preizkusov zdravljenja pljučnega raka pa sta dva inhibitorja tirozinskih kinaz povezanih z receptorjem epidermalnega ravnega faktorja: Iressa/ZD1839 (AstraZeneca, Velika Britanija) (30, 32) in Tarceva™/OSI-774 – zaključena 3. faza (OSI Pharmaceuticals, Inc., ZDA) (33). V začetnih fazah kliničnih poskusov za zdravljenje različnih malignomov je flavopiridol – inhibitor od ciklina odvisnih kinaz (Cdks, 34). V kliničnih preizkusih so še mnogi drugi inhibitorji proteinskih kinaz in po številu teh raziskav predstavljajo proteinske kinaze drugo najpomembnejšo skupino celičnih proteinov kot tarčnih mest za razvoj novih zdravil, takoj za receptorji, ki so sklopljeni z G-proteini (35).

3 Sklepi

Napake v izražanju ali funkciji proteinov povezanih s proapoptotskimi ali antiapoptotskimi učinki negativno vplivajo na potek ali pa so vzrok za razvoj mnogih bolezni. Ideje za razvoj zdravil in terapevtski pristopi za te bolezni šele vznikajo z novimi spoznanji o poteku procesa apoptoze. Pri tem so osnova odkrivanja novih zdravil raziskave vseh v apoptozo vključenih proteinov, vključno z njihovimi biokemijskimi in molekularno-biološkimi mehanizmi delovanja ter tridimenzionalno zgradbo. Šele razjasnitev teh odnosov s pomočjo obstoječih in tudi modernih raziskovalnih tehnik s področja biomedicine bo postopno privedlo do odkritja vse večjih farmakoloških pristopov k zdravljenju teh bolezni. Predklinične raziskave regulacije apoptoze potekajo v smereh zdravljenja nevrodegenerativnih bolezni, nekaterih virusnih okužb (tudi HIV) in različnih tumorskih obolenj. Najdlje v fazah kliničnih preizkusov sta trenutno zdravili za kronični hepatitis C (široko spektralni inhibitor kaspaz IDN-6556 – IDUN Pharmaceuticals) in različne oblike rakastih obolenj (utišanje gena za protein BCL-2 – Genta Inc.). Od leta 2001 dalje je v uporabi inhibitor tirozinske kinaze Glivec® (Novartis Pharma GmbH, Nemčija), ki ga uporabljajo za zdravljenje levkemije in nekaterih gastrointestinalnih tumorjev. Zanimanje za nova, učinkovita zdravila za bolezni, ki so danes težko ali celo neozdravljive in katerih vzrok so nepravilnosti v poteku apoptoze, je zelo veliko, zato lahko z optimizmom upamo, da bodo mnoge predklinične raziskave v nekaj letih prešle v klinične, če bodo uspešne, pa tudi v splošno klinično prakso.

Zahvala

Zahvaljujemo se Vanji Marvin za pomoč pri izdelavi slike 1.

Literatura

- 1 Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 2001;7:314-319.
- 2 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-1462.
- 3 Phenix BN, Badley AD. Influence of mitochondrial control of apoptosis on the pathogenesis, complications and treatment of HIV infection. *Biochimie*. 2002;84:251-264.
- 4 Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:17907-17911.
- 5 <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00088140?order=1>
- 6 Natori S, Higuchi H, Contreras P et al. The caspase inhibitor IDN-6556 prevents caspase activation and apoptosis in sinusoidal endothelial cells during liver preservation injury. *Liver Transpl*. 2003;9:278-284.
- 7 Toulmond S, Tang K, Bureau Y et al. Neuroprotective effects of M826, a reversible caspase-3 inhibitor, in the rat malonate model of Huntington's disease. *Br J Pharmacol*. 2004;141:689-97.
- 8 Zender L, Hutker S, Liedtke C et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7797-7802.
- 9 Chun TW, Fauci AS. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10958-10961.
- 10 Antoni BA, Sabbatini P, Rabson AB et al. Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection. *J Virol*. 1995;69:2384-2392.
- 11 Vocero-Akbani AM, Heyden NV et al. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med*. 1999;5:29-33.
- 12 Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:239-252.
- 13 Holmlund JT. Applying antisense technology: Affinitak and other antisense oligonucleotides in clinical development. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1002:244-251.
- 14 Isis Pharmaceuticals. http://www.isispharm.com/product_pipeline.html. Accessed January 2006.
- 15 Wu TY, Wagner KW, Bursulaya B et al. Development and characterization of nonpeptidic small molecule inhibitors of the XIAP/caspase-3 interaction. *Chem Biol*. 2003;10:759-767.
- 16 Oost TK, Sun C, Armstrong RC et al. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. *J Med Chem*. 2004;47:4417-4426.
- 17 Du C, Fang M, Li Y et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
- 18 Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
- 19 Chai J, Du C, Wu JW et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;406:855-862.
- 20 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:1899-1911.
- 21 Hirotani M, Zhang Y, Fujita N et al. NH2-terminal BH4 domain of Bcl-2 is functional for heterodimerization with Bax and inhibition of apoptosis. *Biol Chem*. 1999;274:20415-20420.
- 22 Lebedeva I, Rando R, Ojwang J et al. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res*. 2000;60:6052-6060.
- 23 Qin Q, Patil K, Sharma SC. The role of Bax-inhibiting peptide in retinal ganglion cell apoptosis after optic nerve transection. *Neurosci Lett*. 2004;372:17-21.
- 24 Kaufmann T, Schinzel A, Borner C. Bcl-w(adding) with mitochondria. *Trends Cell Biol*. 2004;14:8-12.
- 25 Schinzel A, Kaufmann T, Schuler M et al. Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168. *J Cell Biol*. 2004;164:1021-1032.
- 26 Sawada M, Sun W, Hayes P et al. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol*. 2003;5:320-329.
- 27 Tzung SP, Kim KM, Basanez G et al. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol*. 2001;3:183-191.
- 28 Genta Technology Platforms: Antisense. http://www.genta.com/Genta/InvestorRelation/2005/press_20060103.html. Accessed January 2006.
- 29 Genta: Ongoing Clinical Programs. <http://www.genta.com/genta/ClinicalProgram/programs1.html>, Accessed January 2006.
- 30 Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E et al. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther*. 2002;93:79-98.
- 31 http://www.glivec.com/content/about_glivec/index.jsp
- 32 Iressa <http://www.iressa-us.com/prof.asp>. Accessed: January 2006.
- 33 (Osi)Pharmaceuticals: Tarceva. <http://www.osip.com/OSI/products.asp?id=171>, Accessed: January 2006.
- 34 <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00098371?order=1>
- 35 Cohen P. Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1:309-15.