

УДК 577.24

## ТАРГЕТИРОВАНИЕ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА Bcl-2: ЧТО, ГДЕ, КОГДА?

### Обзор

© 2020 В.В. Сеничкин<sup>1</sup>, Н.В. Первушин<sup>1</sup>, А.П. Зуев<sup>1</sup>,  
Б. Животовский<sup>1,2</sup>, Г.С. Копейна<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия; электронная почта: lirroster@gmail.com

<sup>2</sup> Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, 17177 Стокгольм, Швеция

Поступила в редакцию 15.07.2020

После доработки 15.07.2020

Принята к публикации 08.08.2020

Белки семейства Bcl-2 являются регуляторами апоптоза, одного из наиболее изученных типов программируемой клеточной гибели. Данное семейство белков представлено как про-, так и антиапоптотическими членами. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 нередко используются опухолевыми клетками в качестве механизма устойчивости к гибели, играя важную роль как в процессе возникновения онкологических заболеваний, так и в приобретении злокачественными клетками резистентности к терапевтическим воздействиям. Следовательно, эти белки представляют собой привлекательные мишени для противоопухолевой терапии. Детальное изучение взаимодействий между Bcl-2 белками, лежащих в основе регуляции запуска апоптоза, позволило сделать существенный прорыв в разработке высокоселективных ингибиторов отдельных антиапоптотических представителей семейства. В настоящее время данные вещества активно изучают на доклинических и клинических стадиях, и большим прорывом можно считать одобрение для медицинского применения Венетоклакса, селективного ингибитора белка Bcl-2. Подавление активности антиапоптотических белков Bcl-2 семейства обладает существенным терапевтическим потенциалом, который только предстоит раскрыть. В грядущую эру персонализированной медицины необходимо детальное изучение механизмов, ответственных за чувствительность или резистентность опухолевых клеток к различным терапевтическим агентам, а также подбор наиболее эффективных комбинаций. В обзоре рассмотрены существующие сведения о фундаментальных основах функционирования белков семейства Bcl-2, принципах их ингибирования с помощью малых молекул, успехах такого подхода в противоопухолевой терапии и, наконец, биохимических особенностях, которые могут послужить основой для дальнейшего совершенствования использования ингибиторов антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в терапии опухолевых заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** апоптоз, Bcl-2 семейство, противоопухолевая терапия, ВН3-миметики.

**DOI:** 10.31857/S0320972520100097

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из ключевых задач современной медицины является борьба с опухолевыми заболеваниями. В основе биологии опухолевых клеток лежат принципы отбора в пользу наиболее приспособленных к выживанию клонов. В результате такие клоны характеризуются рядом приобретенных адаптационных преимуществ, в том числе, устойчивостью к программируемой клеточной гибели (ПКГ) [1]. Одним из наиболее изученных типов ПКГ в настоящее время является

апоптоз, представляющий собой, среди прочего, важный онкосупрессорный механизм [1].

Наиболее изученными способами запуска апоптотической гибели на молекулярном уровне являются внутренний (митохондриальный) и внешний (рецептор-зависимый) пути индукции апоптоза. Внешний путь запуска апоптотической программы реализуется, в частности, в результате связывания соответствующих лигандов (например, TNF- $\alpha$ , FAS-L) с «рецепторами смерти» на поверхности клетки, что ведет к активации каспазного каскада и последующей элиминации клетки [2]. В реализации внутреннего пути индукции апоптоза задействованы митохондрии, в межмембранном пространстве которых в норме локализуются различные проапоптотические факторы, выполняющие не связанные с апоптозом функции, — цитохром c, SMAC/DIABLO и другие. Попадание данных

Принятые сокращения: ВН-домен — домен гомологии белков Bcl-2; ММ — множественная миелома; НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; ХЛЛ — хронический лимфоцитарный лейкоз.

\* Адресат для корреспонденции.

факторов в цитоплазму также ведет к запуску каспазного каскада и последующей гибели клеток, потому целостность внешней митохондриальной мембраны находится под строгим контролем белков семейства Bcl-2 [3].

Эти белки, хотя и обладают существенной степенью гомологии друг с другом, подразделяются на две функциональные подгруппы со строго противоположной ролью. Одни представители данного семейства способствуют пермеабиллизации внешней митохондриальной мембраны (ПВММ), проявляя проапоптотические свойства, другие препятствуют функциональной активности проапоптотических Bcl-2 белков, тем самым проявляя антиапоптотическую активность. Регуляция как про-, так и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 может быть нарушена в опухолевых клетках, что может вести к их повышенной устойчивости к апоптотическим стимулам. Особенно часто опухолевые клетки используют повышенную экспрессию антиапоптотических белков семейства Bcl-2 в качестве механизма приобретения устойчивости к апоптозу [3].

Данный факт повышает интерес к этим белкам как к мишеням для терапевтического воздействия. За последние 15 лет был разработан ряд ингибиторов антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Некоторые из них только недавно вступили в фазу клинических испытаний (в частности, ингибиторы Mcl-1) [4]. Ингибирование другой мишени, Bcl-xL, вело к выраженным побочным эффектам [5], что стало большой проблемой для дальнейших клинических испытаний селективных антагонистов данного белка. В то же время имеются и существенные успехи в таргетировании антиапоптотических белков этого семейства, в частности, к таковым относится одобрение Венетоклакса для лечения пациентов с рядом гематологических заболеваний [6].

Тем не менее, следует отметить, что, хотя устойчивость к апоптозу и является широко распространенным явлением для различных типов опухолей, Венетоклакс в настоящее время имеет скорее ограниченное применение, в особенности, в случае монотерапии. То же, вполне вероятно, может ожидать и другие ингибиторы антиапоптотических Bcl-2-белков в случае их одобрения к медицинскому применению. Эта проблема во многом отражает недостаточность наших знаний о том, как наиболее рационально использовать ингибиторы данных белков для элиминирования опухолевых клеток. Наиболее важным представляется расширение наших знаний о механизмах, отвечающих за повышенную чувствительность или, напротив, устойчивость

опухолевых клеток к действию ингибиторов Bcl-2-белков. Также особенно остро стоит вопрос подбора комбинаций, которые могут проявлять существенный синергизм в элиминации опухолевых клеток.

В настоящей работе мы предприняли попытку ответа на три основных вопроса, касающихся ингибирования антиапоптотических Bcl-2-белков. 1) Что? Что из себя представляют антагонисты данных белков и каков их основной механизм действия; 2) Где? В каких опухолях ингибирование тех или иных антиапоптотических белков представляется особенно эффективным, какие механизмы могут лежать в основе описываемых феноменов и как эти знания могут быть использованы для дальнейших исследований; 3) Когда? В каких случаях могут быть использованы те или иные антагонисты антиапоптотических белков Bcl-2, а именно, каковы прогностические факторы чувствительности/устойчивости к этим веществам, каковы наиболее перспективные комбинации данных веществ с другими препаратами и, наконец, какие механизмы лежат в основе этих наблюдений.

#### **ЧТО: БЕЛКИ СЕМЕЙСТВА Bcl-2 КАК МИШЕНИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

**Контроль запуска внутреннего пути апоптоза белками семейства Bcl-2.** Ключевым событием и одновременно точкой невозврата в запуске внутреннего пути апоптоза является выход из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму различных проапоптотических факторов [3]. В основе данного феномена лежит ПВММ за счет образования белковых пор во внешней мембране митохондрий. Этот процесс осуществляется путем олигомеризации порообразующих белков-эффекторов семейства Bcl-2 – Bax и Bak [7]. В норме эти белки находятся в виде мономеров: Bax – на поверхности внешней митохондриальной мембраны, Bax – в цитоплазме [3]. Активация порообразующих белков Bax и Bax ведет к их димеризации, а образующиеся димеры далее олигомеризуются на поверхности внешней мембраны митохондрий, образуя поры.

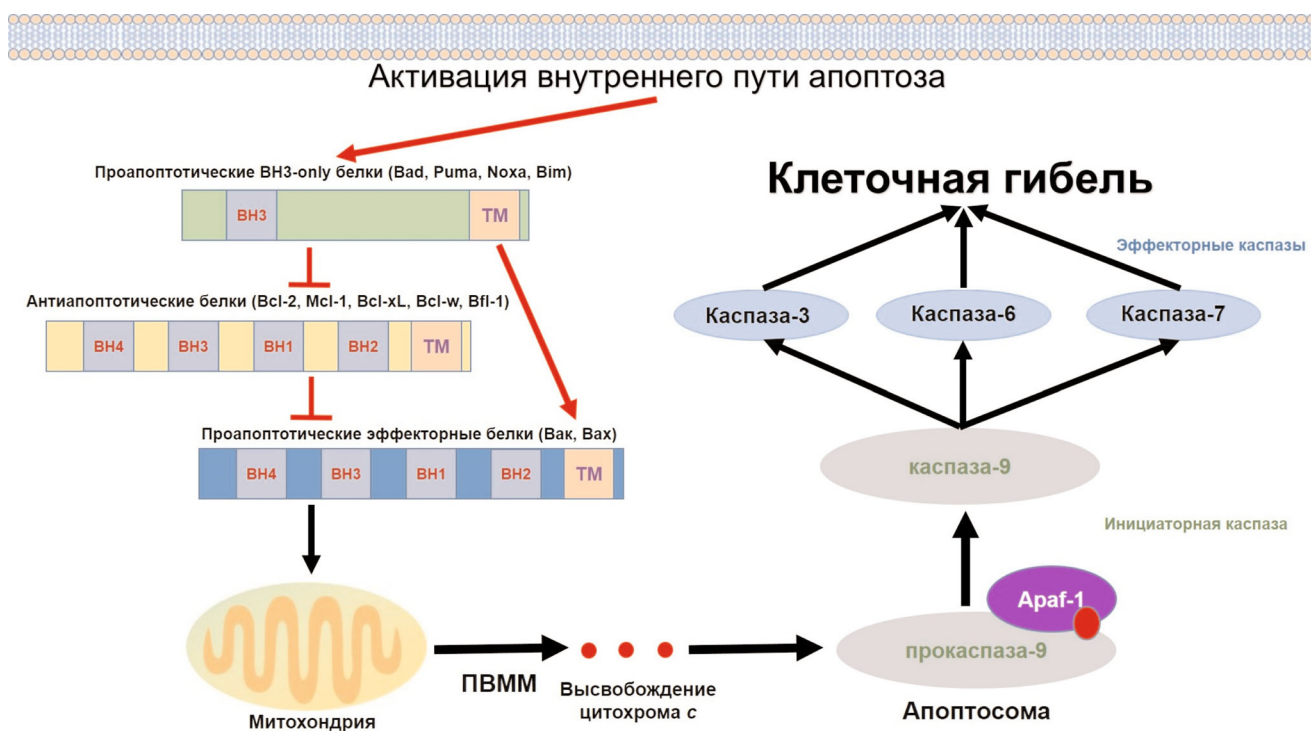
Вторая группа проапоптотических белков семейства Bcl-2 включает BH3-only белки (Bim, Puma, Noxa, Bad и другие), состоящие из одного (BH3) домена гомологии белков Bcl-2 (BH). Некоторые из них, т.н. «BH3-only активаторы», связываясь с порообразующими белками Bcl-2 семейства Bax и Bax, способны вести к их активации [8]. В то же время некоторые из BH3-only белков, т.н. «BH3-only сенситайзеры», напря-

мую не взаимодействуют с порообразующими белками. Проапоптотическая активность этой подгруппы белков осуществляется только за счет взаимодействия с антиапоптотическими белками Bcl-2 семейства и их нейтрализации. Важно отметить, что BH3-only активаторы также ингибируют антиапоптотические Bcl-2-белки [8]. Таким образом, нейтрализация антиапоптотических белков Bcl-2 семейства – общий механизм проапоптотической активности BH3-only белков независимо от их способности напрямую активировать порообразующие белки Bak и Bax.

Наконец, антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-A1) связывают и нейтрализуют проапоптотические белки – как порообразующие, так и BH3-only [3]. Как итог, три функциональные группы белков семейства Bcl-2 образуют трехстороннюю систему контроля над ПВММ: белки-эффекторы непосредственно образуют поры в наружной мембране митохондрий, тогда как BH3-only и антиапоптотические белки регулируют активность порообразующих белков. В основе инги-

бирующих взаимодействий между представителями Bcl-2 семейства лежит способность белков одной функциональной подгруппы связывать белки другой функциональной подгруппы. Таким образом, белки физически нейтрализуют друг друга, образуя гетеродимеры, а их активирующие функции реализуются только взаимодействием BH3-only активаторов с порообразующими Bak и Bax, что способствует димеризации последних [3].

Каковы механизмы взаимодействия белков семейства Bcl-2? Порообразующие и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 имеют в своем строении четыре BH-домена – BH1–BH4, которые участвуют в формировании глобулярной структуры данных белков [3]. В структуре BH3-only белков присутствует только домен BH3, откуда эта подгруппа белков и получила свое название. Именно данный домен наделяет белки проапоптотической активностью [8]. В структуре глобулярных белков, как порообразующих, так и антиапоптотических, домен BH3 совместно с другими BH-доменами принимает участие



**Рис. 1.** Активация внутреннего пути апоптоза и схема строения членов белкового семейства Bcl-2. Различные стимулы (например, повреждения ДНК, депривация ростовых факторов или действие химиотерапевтических препаратов) могут вести к активации внутреннего пути апоптоза. Проапоптотические BH3-only белки приводят к нейтрализации действия антиапоптотических белков и/или прямой активации проапоптотических эффекторных белков. В результате действия белков Bak и Bax наблюдается ПВММ за счет образования белковых пор на поверхности внешней мембраны митохондрий. Высвобождение из межмембранного пространства цитохрома c приводит к образованию в цитоплазме апоптосомы – комплекса активации инициаторной каспазы-9 (при участии цитозольного белка Араф-1 и за счет энергии АТФ). Каспаза-9 ведет к дальнейшей активации каспазного каскада и гибели клеток за счет действия эффекторных каспаз.

в формировании гидрофобного кармана – углубления на поверхности белка, способного связываться с экспонированными ВНЗ-доменами других белков. Отсюда данная структура получила название «ВНЗ-связывающий карман». Проапоптотические Вах и Вак способны экспонировать свой ВНЗ-связывающий домен, сохраняя при этом структуру ВНЗ-связывающего кармана. Подобный конформационный переход может происходить при связывании порообразующими белками ВНЗ-only активаторов [9]. В подобной активированной конфигурации белки Вах и Вак димеризуются за счет взаимодействий ВНЗ-домен – ВНЗ-связывающий карман, что служит подспорьем для дальнейшей олигомеризации и процесса ПВММ. Антиапоптотические белки не экспонируют свои ВНЗ-домены, что является их принципиальным отличием от порообразующих белков. Вместо этого антиапоптотические белки нейтрализуют ВНЗ-only белки или активированные Вак и Вах за счет связывания их экспонированных ВНЗ-доменов (рис.1) [3]. Описанные взаимодействия между ВНЗ-доменами и ВНЗ-связывающими карманами лежат в основе функционирования представителей семейства Bcl-2 и были использованы для создания терапевтических подходов, нацеленных на данные белки [10].

Чем больше уровень антиапоптотических белков в клетке, тем активнее при прочих равных они будут связывать активированные белки Вак и Вах, препятствуя их димеризации и процессу ПВММ. Дополнительно антиапоптотические белки способны снижать и уровень свободных ВНЗ-only активаторов, которые могли бы вызвать димеризацию Вак и Вах. Напротив, при повышении уровня ВНЗ-only белков большее количество антиапоптотических белков будет связываться с ними, освобождая, во-первых, Вак и Вах, во-вторых, ВНЗ-only активаторы, способствуя дополнительной активации Вак и Вах [11]. Помимо изменений концентрации в клетке, активность анти- и проапоптотических белков семейства Bcl-2 регулируется за счет их посттрансляционных модификаций, что может повышать их сродство к партнерам связывания или вести к изменениям внутриклеточной локализации [12]. Таким образом, в описанной системе трехстороннего контроля над ПВММ порообразующие белки являются исполнителями, тогда как ВНЗ-only и антиапоптотические белки регулируют их активность и, следовательно, готовность клетки перейти к точке невозврата в запуске программы апоптоза.

**Роль белков семейства Bcl-2 в канцерогенезе.** Учитывая роль апоптоза в противоопухолевой защите организма, логично предположить, что

опухолевые клетки могут использовать нарушения в функционировании проапоптотических белков и оверэкспрессию антиапоптотических белков для повышения устойчивости к апоптозу. Действительно, ряд имеющихся данных подтверждает подобное предположение. Так, у пациентов с лимфомой Бёркитта наблюдается гиперметилирование промотора гена *BCL2L11* [13], кодирующего ВНЗ-only белок Vim, а у пациентов с мантийноклеточной лимфомой – гомозиготная делеция локуса 2q13 [14], содержащего этот же ген. Мутации, ведущие к сдвигу рамки считывания в гене *VAX*, кодирующем одноименный белок, были обнаружены у пациентов с колоректальным раком с микросателлитной нестабильностью [15]. Многочисленные эксперименты на опухолевых клеточных линиях демонстрируют значимость нарушений функционирования проапоптотических белков для приобретения устойчивости к апоптозу, индуцированному противоопухолевыми агентами [16]. Наконец, была показана корреляция между уровнем проапоптотических белков и прогнозом пациентов при лечении различными препаратами [17].

Одним из наиболее ярких примеров использования опухолевыми клетками антиапоптотических белков является оверэкспрессия Bcl-2 у пациентов с фолликулярной лимфомой. Причиной повышенного уровня Bcl-2 является транслокация t(14;18), в результате которой ген *BCL2* попадает в транскрипционно-активный участок на хромосоме 14, содержащий гены тяжелых цепей иммуноглобулина. Подобная транслокация наблюдается у ~90% пациентов с фолликулярной лимфомой. Помимо этого, при опухолевых заболеваниях могут происходить амплификации генов антиапоптотических белков Bcl-2 семейства, в частности, *BCL2*, *MCL1*, *BCL2L1* (последний кодирует Bcl-xL) [18]. Высокая экспрессия этих белков наблюдается у пациентов с различными онкологическими заболеваниями [19], при этом показана корреляция уровня их экспрессии с отрицательным прогнозом пациентов [20, 21]. Все эти данные подчеркивают значимость апоптоза как противоопухолевого механизма и указывают на перспективность использования белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных терапевтических мишеней.

Следует отметить, что в ряде случаев наблюдаются обратные результаты. Так, согласно мета-анализу, пациенты с позитивным по Bcl-2 немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) имеют более благоприятный прогноз в сравнении с пациентами с негативными по Bcl-2 случаями того же заболевания, хотя разницы между двумя группами не наблюдалось среди пациентов

только с I стадией [22]. У пациентов с раком яичника уровень экспрессии гена *BCL2* прямо коррелирует с благоприятным прогнозом [23]. В то же время уровень Bcl-2 у больных с раком яичника обратно коррелирует со стадией прогрессии опухоли, что может в существенной степени объяснять наблюдаемый феномен [24]. Более того, низкий уровень экспрессии гена одного антиапоптотического белка вовсе не исключает того, что опухоль данного типа может использовать повышенную экспрессию генов других антиапоптотических белков для выживания. Так, для НМРЛ была показана значимость Mcl-1 и его связь с неблагоприятным прогнозом [25], а для рака яичника установлено значение Bcl-xL и Mcl-1 в устойчивости к химиотерапии [26, 27]. Следовательно, тот или иной белок может иметь большую роль в одних типах опухолевых заболеваний и меньшую – в других.

**Таргетирование ВНЗ-миметиками.** Учитывая то, что опухолевые клетки нередко характеризуются нарушениями процессов клеточной гибели, запуск апоптоза представляется перспективным подходом в контексте противоопухолевой терапии. Теоретически воздействовать на регуляцию ПВММ белками семейства Bcl-2 можно по меньшей мере двумя способами. Во-первых, возможно создание молекул, которые напрямую активировали бы Bax и Bak аналогично ВНЗ-only активаторам [10]. Во-вторых, можно ингибировать антиапоптотические белки семейства Bcl-2, что смещало бы равновесие в клетке к активности проапоптотических белков [3]. В настоящее время первый из упомянутых подходов находится лишь на стадии подбора эффективных кандидатов для прямой активации Bax и Bak [28]. Вместе с тем один из главных вопросов, касающийся подобной стратегии, заключается в селективности подхода, т.е. в том, не будут ли прямые активаторы порообразующих белков токсичны за счет массовой индукции апоптоза в клетках нормальных тканей. Дальнейшие исследования должны дать ответ на этот и другие вопросы, касающиеся возможности прямой активации Bax и Bak в качестве терапевтической стратегии.

Второй подход в таргетировании белков семейства Bcl-2 – ингибирование антиапоптотических представителей данного семейства – добился существенного прогресса за последние 15 лет. Главным инструментом в ингибировании анти-апоптотической активности Bcl-2-белков стали вещества, имитирующие действие ВНЗ-доменов проапоптотических белков, откуда они и получили свое название – ВНЗ-миметики [29, 30]. Взаимодействуя с ВНЗ-связывающим карманом антиапоптотических белков, ВНЗ-миметики разрушают их комплексы с проапоптотическими представителями Bcl-2 семейства, напрямую вызывая апоптоз [29]. При этом при ингибировании антиапоптотических белков возможно достичь определенной степени избирательности в отношении опухолевых клеток, что обусловлено, вероятно, их высокой склонностью к апоптозу и зависимостью от отдельных белков семейства Bcl-2 для выживания.

Учитывая принципиальное сходство ВНЗ-связывающих карманов различных антиапоптотических белков, некоторые малые молекулы могут взаимодействовать с несколькими из них. Такие ВНЗ-миметики широкого спектра действия (например, Обатоклак) используются как инструмент индукции апоптоза в экспериментах *in vitro*. Они показали некоторую эффективность в испытаниях *in vivo* и были протестированы в клинических испытаниях, где, впрочем, не продемонстрировали существенной эффективности [31]. С развитием методов дизайна химических веществ появились более селективные ВНЗ-миметики [30, 32, 33]. Существенным преимуществом данных агентов в сравнении с неселективными ВНЗ-миметиками, во-первых, является возможность изучить вклад индивидуальных белков в выживаемость опухолевых и нормальных клеток в различных условиях. Во-вторых, селективные ВНЗ-миметики представляют собой перспективные противоопухолевые препараты, так как позволяют целенаправленно ингибировать необходимый белок, а в случае необходимости заблокировать несколько антиапоптотических представителей Bcl-2 семейства, дозы каждого из селективных ВНЗ-миметиков могут быть подобраны индивидуально в соответствии с тем, от каких белков в наибольшей степени зависит выживаемость опухолевых клеток в конкретном случае.

Среди антиапоптотических белков семейства Bcl-2 наиболее изучены пять членов: Bfl-1, Bcl-w, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-2 [11]. Для каждого из этих белков показана роль в выживании опухолевых клеток, следовательно, все из них являются потенциальными мишенями для действия ВНЗ-миметиков. Вместе с тем в настоящее время прогресс в разработке и применении ингибиторов данных белков существенно различается.

**Таргетирование белка Bcl-2.** Белок Bcl-2 стал не только первым открытым представителем одноименного семейства, но и очевидным лидером среди указанных белков в контексте подбора ингибиторов и их использования в медицинской практике. Существенным прорывом в ингибировании Bcl-2 послужило получение ВНЗ-миметиков АВТ-737 и АВТ-263 (Навитоклак) [34,35]. Указанные соединения, помимо Bcl-2,

также подавляли Vcl-w и Vcl-xL, хотя некоторые исследования указывали на то, что именно Vcl-2 является их основной мишенью в клетках [36]. Обладая, в отличие от АВТ-737, подходящими фармакологическими свойствами (в частности, возможностью перорального применения) [35], Навитоклакс был исследован в ряде клинических испытаний [5,10]. Однако выраженная тромбоцитопения, обусловленная ингибированием Vcl-xL, привела к ограничению максимальной дозы Навитоклакса и лишь умеренной терапевтической эффективности [5].

Дальнейшие попытки разработчиков были сосредоточены на создании ВНЗ-миметика, который селективно подавлял бы Vcl-2. Первым таким соединением стал АВТ-199 (Венетоклакс), обладающий сходной структурой с АВТ-737 и Навитоклаксом [30]. В то же время введение индольного фрагмента в структуру Венетоклакса позволило обеспечить селективность взаимодействия с Vcl-2 за счет образования водородной связи с остатком Asp103. У Vcl-xL в аналогичной позиции находится остаток глутамата (Glu96), что затрудняет его взаимодействие с Венетоклаксом и служит основой высокой селективности данного соединения [30]. Венетоклакс был исследован в ряде клинических испытаний и в связи с выраженной эффективностью получил одобрение для лечения пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) [6, 37, 38]. Также Венетоклакс (в комбинации с Азацитидином, или Децитабином, или низкими дозами Цитарабина) одобрен для лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у пожилых пациентов и пациентов, которым противопоказаны интенсивные режимы химиотерапии. В настоящее время эффективность Венетоклакса активно исследуется для лечения различных опухолевых заболеваний, в особенности гематологических. Необходимо отметить, что описаны и другие селективные антагонисты Vcl-2, например, S55746 [39]. В будущем такие соединения могут пополнить арсенал ВНЗ-миметиков, применяемых в клинической практике, и использоваться, например, в случае возникновения резистентных к Венетоклаксу мутаций в структуре Vcl-2.

**Vcl-xL как мишень в терапии.** В качестве потенциальных ингибиторов Vcl-xL изучалось большое количество соединений, таких как А-385358, S44563, WENI-539, А-1331852, А-1155463, Навитоклакс, различные производные Госсипола и другие. Однако, несмотря на данные, демонстрирующие определенную эффективность ингибиторов Vcl-xL в доклинических исследованиях, было проведено лишь небольшое число клинических испытаний с антагонистами этого белка. Опыт применения Нави-

токлакса наглядно показал ключевые проблемы таргетирования Vcl-xL. Как было сказано выше, основной причиной ограничения использования этого препарата стала выраженная тромбоцитопения, возникающая вследствие ингибирования Vcl-xL в тромбоцитах [40]. Развитие тромбоцитопении также наблюдалось и при использовании в экспериментах на мышах соединения А-1155463, которое обладает пикомолярной аффинностью к Vcl-xL [32]. Именно выраженные побочные эффекты (в частности, тромбоцитопения) и вытекающая из них необходимость ограничения дозы стали наиболее существенными препятствиями в продвижении ингибиторов Vcl-xL в терапевтическую практику [10].

В настоящее время активно исследуются способы решения указанной проблемы [41]. Так, одним из направлений для устранения системных побочных эффектов является таргетная доставка лекарства в опухоль (например, с помощью конъюгации с моноклональным антителом). Конъюгат антитела с лекарственным препаратом АBBV-155, нацеленный на поверхностный маркер В7Н3 и несущий антагонист Vcl-xL, недавно вступил в первую фазу клинических испытаний (NCT03595059). Кроме того, проходит набор пациентов с гормон-чувствительным раком предстательной железы и метастазированием в лимфоузлах для клинических испытаний вакцины Vcl-xl\_42-CAF09b, содержащей Vcl-xl\_42 (пептидный фрагмент белка Vcl-xL) и адъювант CAF09b (NCT03412786). Такие терапевтические подходы могут в будущем стать новой опцией в таргетировании Vcl-xL в опухолевых клетках, что позволит устранить нежелательные побочные эффекты в виде тромбоцитопении.

**Проблемы подавления белка Vcl-w.** Белок Vcl-w участвует в широком спектре как физиологических, так и патологических процессов, в том числе в развитии опухолевых заболеваний [42]. Следовательно, ингибиторы этого белка могли бы расширить арсенал противоопухолевых препаратов. Однако в настоящее время селективные ингибиторы Vcl-w отсутствуют, а сложность их создания может объясняться конформационной «гибкостью» этого белка [43]. ВНЗ-миметики АВТ-737 и Навитоклакс способны ингибировать Vcl-w наряду с Vcl-2 и Vcl-xL. Однако было показано, что АВТ-737 разрушает в клетках комплексы между Vcl-w и проапоптотическими партнерами менее эффективно, чем аналогичные взаимодействия с белками Vcl-2 и Vcl-xL [36]. Эти данные, вероятно, касаются и Навитоклакса, учитывая его схожесть с АВТ-737. Таким образом, вопрос разработки селективных антагонистов Vcl-w остается открытым.

**Перспективы подавления белка Bfl-1.** Bfl-1 (Bcl-2A1) является наименее изученным антиапоптотическим белком семейства Bcl-2. Для Bfl-1 не описано ВНЗ-миметиков, в том числе неселективных. Роль данного белка в процессе канцерогенеза также исследована недостаточно, хотя имеющиеся данные показывают потенциальную роль данного белка в обеспечении устойчивости к действию ВНЗ-миметиков [43]. Было показано, что в строении ВНЗ-связывающего кармана белка Bfl-1 присутствует цистеиновый аминокислотный остаток (C55), что отличает данный белок от остальных антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 [44]. Следовательно, в будущем возможно создание специфичных ковалентных высокоаффинных ингибиторов Bfl-1.

**Таргетирование белка Mcl-1.** Важным структурным отличием Mcl-1 от других антиапоптотических представителей семейства Bcl-2 является конформационная ригидность его ВНЗ-связывающего кармана, что осложняло создание молекул, эффективно взаимодействующих с данным белком [45]. Как итог, до недавнего времени не было представлено селективных антагонистов Mcl-1. Однако за последние годы был сделан существенный прорыв в этом направлении [46] и был описан ряд ВНЗ-миметиков, направленных на Mcl-1 и обладающих высокой селективностью и аффинностью к мишени, таких как S63845 [33], AZD-5991 [47], AMG-176 [48] и другие [46]. Эти соединения или их производные сейчас находятся в I фазе клинических испытаний среди пациентов с различными гематологическими заболеваниями как в качестве индивидуальных агентов, так и в комбинации с Венетоклаксом.

Также стоит отметить, что уникальной особенностью Mcl-1 среди других белков семейства Bcl-2 является его короткий период полужизни. Это обстоятельство позволяет ингибировать Mcl-1 непрямыми способами за счет понижения его содержания в клетке на различных уровнях регуляции – транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном [12].

#### **ГДЕ: В КАКИХ ОПУХОЛЯХ ЭФФЕКТИВНА ТЕРАПИЯ ВНЗ-МИМЕТИКАМИ?**

**«Близость» к гибели как необходимое условие эффективности ВНЗ-миметиков.** Важным фактором для практического применения того или иного агента в качестве противоопухолевой терапии является его избирательность в отношении опухолевых клеток. Следовательно, для потенциального применения ВНЗ-миметиков в

лечении онкологических заболеваний ключевым является вопрос, насколько данные вещества способны вызывать апоптоз в злокачественных клетках, не затрагивая выживание нормальных. Имеющиеся данные указывают на то, что большая часть нормальных клеток не чувствительна к апоптозу, индуцированному ВНЗ-миметиками [11, 49].

Одним из основных объяснений подобного феномена является неодинаковая «близость» к апоптозу различных клеток [49, 50]. Так, нормальные клетки гематологического происхождения находятся в числе наиболее чувствительных к апоптозу, в то время как постмитотические клетки, такие как нейроны и кардиомиоциты, в существенной степени менее склонны к запуску апоптотической программы [51]. Как итог, первые демонстрируют высокую чувствительность к апоптозу, индуцированному ВНЗ-миметиками, тогда как последние относительно устойчивы к данным агентам [49].

Вместе с тем важно понять, какие факторы отвечают за указанную склонность клеток к гибели. Интересным и важным наблюдением в контексте описываемого феномена является более высокая экспрессия белков-регуляторов апоптоза в активно делящихся клетках и снижение уровня данных белков в постмитотических клетках [51]. Первые, при этом, демонстрируют значительно большую чувствительность к апоптотическим стимулам. Отсюда можно сделать предположение, что склонность клетки к апоптозу определяется уровнем экспрессии компонентов, отвечающих за функционирование апоптотической машины [11, 49]. Именно такие клетки и являются наиболее чувствительными к действию различных агентов и стимулов, индуцирующих апоптоз, в том числе ВНЗ-миметиков.

В процессе перерождения злокачественные клетки сталкиваются с большим количеством факторов, которые могут вести к увеличению уровня и активности проапоптотических белков. Так, некоторые онкогены, например *Myc*, ведут к их повышенной экспрессии [51]. Чтобы выжить в подобных условиях, опухолевые клетки могут полагаться на увеличенную экспрессию антиапоптотических белков [52]. При этом отбор происходит в пользу клонов, которые имеют уровень данных белков, достаточный для нейтрализации их контрпартнеров. Проходя через множество «стрессовых испытаний» в процессе своей эволюции, опухолевые клетки, в конечном итоге, приходят к состоянию, в котором большое количество проапоптотических белков компенсируется высоким содержанием антиапоптотических [49, 53]. Верно подобранный

стрессовый стимул может подтолкнуть опухолевую клетку к апоптозу, оказав при этом меньшее влияние на клетки, менее склонные к запуску данной программы гибели. В случае ВНЗ-миметиков их действие приведет к высвобождению большого числа проапоптотических факторов и запуску гибели в тех клетках, которые находятся в состоянии «близости» к апоптозу. Вместе с тем, склонные к апоптозу нормальные клетки, для которых подобный стимул окажется не столько же существенным, также вступят в процесс гибели, что обусловит токсичность терапии [11, 49].

**«Анти-апоптотическая зависимость» клеток.** Указанное условие «близости» опухолевых клеток к гибели является необходимым, но недостаточным для эффективного действия индивидуальных ВНЗ-миметиков. Ключевую роль в определении чувствительности этих клеток к данным препаратам играет их различная зависимость от того или иного белка семейства Bcl-2 для своего выживания [50, 53, 54]. В случае, когда опухолевые клетки преимущественно полагаются на один белок для выживания, ингибирование этого белка может эффективно индуцировать апоптоз [53]. Впрочем, гибели будут подвержены и те нормальные клетки, которые полагаются на тот же белок семейства Bcl-2. В случае же, когда опухолевые клетки полагаются на несколько антиапоптотических белков семейства Bcl-2, необходимо использование комбинации ВНЗ-миметиков, что, однако, будет повышать вероятность возникновения нежелательных эффектов.

Именно зависимость клеток различных опухолей от того или иного белка формирует их чувствительность к ВНЗ-миметикам и определяет потенциал терапии [37, 38, 53]. Зависимость же нормальных клеток от тех же белков, напротив, является фактором, ограничивающим применение ВНЗ-миметиков. Как было отмечено выше, ярким примером побочных реакций, наблюдаемых при действии ВНЗ-миметиков, является возникновение тромбоцитопении при применении Навитоклакса [5, 40].

Вероятно, в основе формирования зависимости от одного белка лежит не столько повышенный уровень его экспрессии, сколько отсутствие компенсаторного воздействия со стороны других представителей семейства Bcl-2. Так, в ряде работ показана значимость Mcl-1 для приобретения устойчивости клеток к действию Навитоклакса и Венетоклакса [29]. Напротив, эффективность ингибирования Mcl-1 обратно коррелирует с уровнем мРНК Bcl-xL [33]. Более того, в клинических испытаниях Венетоклакса соотношение уровней мРНК Bcl-2/Bcl-xL и Bcl-

2/Mcl-1 в большей степени коррелировало с эффективностью, чем уровень только мРНК Bcl-2 [55].

Важным шагом в изучении зависимостей разных типов опухолей от отдельных антиапоптотических белков семейства Bcl-2 послужило использование ВНЗ-профайлинга [50]. Данный метод основан на количественной оценке ПВММ после добавления ВНЗ-пептидов к клеткам опухолевых тканей пациентов с различными онкологическими заболеваниями. Использование ВНЗ-пептидов, селективно взаимодействующих с отдельными белками, позволяет выяснить, насколько тот или иной антиапоптотический представитель отвечает за выживание опухолевых клеток. Так, если добавление ВНЗ-пептида белка Noxa, селективно взаимодействующего с Mcl-1, приведет к существенному выходу цитохрома c из митохондрий, можно сделать вывод о зависимости клеток от Mcl-1 и, следовательно, потенциальной эффективности ингибирования этого белка [49]. Кроме того, ВНЗ-профайлинг позволяет оценить степень «прайминга» опухолевых клеток (т.е. предварительной «готовности») к запуску апоптоза. Состояние «высокого прайминга» означает, что нейтрализация небольшого количества антиапоптотических белков приведет к эффективному высвобождению проапоптотических белков и индукции апоптоза. Напротив, «низкий прайминг» требует ингибирования большого количества антиапоптотических белков для индукции апоптоза. В будущем метод ВНЗ-профайлинга может стать важным инструментом для предсказания ответа пациентов на ВНЗ-миметики и перехода к персонализированной медицине, что позволит подбирать терапию не только для конкретных типов опухолей, но и для отдельных пациентов [49].

**Спектр действия ВНЗ-миметиков.** Хотя высокая чувствительность к ВНЗ-миметикам была показана для клеточных линий ряда карцином [34], опухоли гематологического происхождения демонстрируют существенно более высокий уровень ответа на ВНЗ-миметики. И хотя данных относительно селективных антагонистов Bcl-xL существенно меньше, чтобы можно было сделать вывод об их эффективности на большой выборке клеточных линий, более высокая эффективность ВНЗ-миметиков к Bcl-2 и Mcl-1 в клетках гематологических опухолей не вызывает сомнений [48, 49]. Это отражается в том числе и в выборе направлений клинических исследований данных препаратов. Так, на сегодняшний день III фаза клинических испытаний для Венетоклакса инициирована только для пациентов с опухолями гематологического происхождения.



ВНЗ-миметики к Mcl-1, недавно вступившие в фазу клинических испытаний, также тестируются исключительно среди пациентов с гематологическими опухолями.

Как сказано выше, в основе подобного феномена, вероятно, лежит как большая «близость» клеток гематологических опухолей к апоптозу, так и большая частота их зависимости от одного антиапоптотического белка для выживания [49]. Тем не менее имеющиеся данные показывают, что даже среди гематологических опухолей действие ВНЗ-миметиков имеет ограниченную эффективность [56]. В настоящее время единственным известным исключением является ХЛЛ, для которого показана строгая зависимость от Vcl-2 [53], а также выраженный ответ пациентов с данным заболеванием [37,38]. Неудивительно, что Венетоклакс впервые получил одобрение к медицинскому применению именно для данной болезни [6].

Также Венетоклакс в комбинации с химиотерапевтическими препаратами одобрен для лечения ОМЛ, клетки которого демонстрируют преимущественную, но не абсолютную зависимость от Vcl-2 [54]. Вместе с тем, встречаются случаи зависимости от Mcl-1, а ряд исследований показывает не только значимость Mcl-1 для клеток данного типа опухоли, но и синергизм ингибирования Mcl-1 и Vcl-2 в них [57]. Следовательно, по крайней мере в некоторых случаях клетки ОМЛ полагаются одновременно на Mcl-1 и Vcl-2 для выживания, и подавление одного белка может быть неэффективно. Как итог, требуется комбинация ВНЗ-миметиков. Отметим, клинические испытания комбинации ВНЗ-миметиков к Mcl-1 и Венетоклакса были инициированы именно для пациентов с ОМЛ.

Как и для ОМЛ (и в отличие от ХЛЛ), для ряда других гематологических опухолей не было выявлено строгой зависимости от одного антиапоптотического белка семейства Vcl-2 [49]. Клинические испытания Венетоклакса продемонстрировали его различную эффективность на пациентах с разными формами неходжкинских лимфом. Так, объективный уровень ответа при лечении пациентов с релапсирующими/рефрактерными диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой, фолликулярной лимфомой и мантийноклеточной лимфомой составил 18%, 38% и 75% соответственно [56]. Вместе с тем, комбинация Венетоклакса с Ритуксимабом и Бендамустином не показала существенного преимущества при лечении пациентов с релапсирующей/рефрактерной фолликулярной лимфомой в сравнении с действием только Ритуксимаба и Бендамустина [58]. Венетоклакс в комбинации с Бортезомибом и Декса-

метазоном показал высокий объективный уровень ответа (67%) при лечении пациентов с релапсирующей/рефрактерной множественной миеломой (ММ) [59]. Как итог, были инициированы клинические испытания III фазы для лечения пациентов с некоторыми из указанных заболеваний. Результаты данных исследований могут расширить область применения Венетоклакса.

Результаты клинических испытаний ВНЗ-миметиков к Mcl-1 на сегодняшний день большей частью недоступны. На большой выборке клеточных линий (952 линии) ингибитор Mcl-1 продемонстрировал эффективность преимущественно среди клеток гематологических опухолей, в особенности ММ и ОМЛ [48]. Вместе с тем, ввиду отсутствия строгой зависимости от Mcl-1 клеток ММ и ОМЛ [54,60], как и клеток других гематологических опухолей, маловероятно, что ингибиторы Mcl-1 продемонстрируют исключительную эффективность у пациентов с данными заболеваниями. Имеющиеся промежуточные результаты тестирования ингибитора Mcl-1 AMG-176 среди пациентов с релапсирующей/рефрактерной ММ подтверждают данное предположение: большинство пациентов (22/26) прекращали лечение из-за прогрессии заболевания [61]. Таким образом, на сегодняшний день ВНЗ-миметики имеют ограниченное применение, и огромный потенциал, которым обладает данный класс препаратов, вероятно, остается не раскрытым. Дальнейшие исследования должны привести к решению указанной проблемы.

### **КОГДА: КАК РАСШИРИТЬ ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЗ-МИМЕТИКОВ?**

Строгая зависимость от Vcl-2, которую демонстрируют клетки ХЛЛ, закономерно отражается в высокой эффективности Венетоклакса при лечении пациентов с данным заболеванием. Для других злокачественных опухолей может наблюдаться зависимость от разных белков, отличающихся от пациента к пациенту. В этом случае нацеленное действие на белок, который определяет выживание клеток опухоли, может привести в выраженному ответу. Стало быть, необходимо детальное изучение механизмов, которые лежат в основе формирования зависимости от каждого из этих белков, а также молекулярных маркеров, позволяющих выявить подобные случаи. Следовательно, одним из ключевых направлений в области применения ВНЗ-миметиков является поиск предиктивных биомаркеров, то есть молекулярно-генетических характе-

ристик пациента, которые могут предсказать ответ на терапию. Также важную роль в развитии использования ВНЗ-миметиков играет исследование механизмов, которые лежат в основе формирования резистентности к ВНЗ-миметикам, а также способов ее преодоления. Наконец, важным аспектом является изучение рациональных комбинаций ВНЗ-миметиков друг с другом либо с другими препаратами. Данные комбинации могут вести к преодолению устойчивости к индивидуальным ВНЗ-миметикам, а также продемонстрировать более высокую эффективность в элиминировании опухолевых клеток. Действие комбинаций ВНЗ-миметиков друг с другом может быть особенно эффективно в случае зависимости опухолей одновременно от нескольких антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Изучение указанных аспектов — биомаркеров эффективности, факторов устойчивости и комбинаторных подходов — позволит существенно расширить область применения ВНЗ-миметиков, в том числе, вероятно, на пациентов с солидными опухолями.

**Предиктивные биомаркеры для использования ВНЗ-миметиков.** Как указано выше, одним из потенциальных предикторов эффективности Венетоклакса является оценка зависимости опухолевых клеток от Bcl-2 с помощью метода ВНЗ-профайлинга [50]. Для проведения этого метода необходимо получить материал от пациентов, в котором присутствуют опухолевые клетки, например, аспират костного мозга [62]. Вместе с тем, в подобных образцах процент опухолевых клеток может быть относительно невысоким. Следовательно, необходимо отделять ответ опухолевых клеток от ответа нормальных. С этой целью может быть использован метод проточной цитофлуориметрии с прокраской поверхностных маркеров опухолевых клеток антителами. Далее измеряют эффективность ПВММ, вызванной ВНЗ-пептидами, обладающими различной избирательностью в отношении отдельных антиапоптотических белков [50,54]. В случае, когда ПВММ происходит эффективно в результате нейтрализации Bcl-2, можно ожидать высокий уровень ответа на Венетоклакс. Логично предположить, что метод ВНЗ-профайлинга может быть применим и для предсказания эффективности ВНЗ-миметиков к другим антиапоптотическим белкам семейства Bcl-2.

Метод ВНЗ-профайлинга показывает высокую предиктивную способность в случае анализа ответа клеточных линий [54,60]. Также данный метод показал корреляцию с ответом на Венетоклакс пациентов с ОМЛ [62]. Вместе с тем, пока неизвестно, какова будет эффективность данного метода в условиях реальной клинической

практики для предсказания ответа пациентов на этот препарат и, в будущем, на другие ВНЗ-миметики. Необходимы проспективные клинические исследования, чтобы оценить применимость метода ВНЗ-профайлинга для стратификации пациентов. Более того, определенные сложности могут возникнуть и с техническим применением метода. Так, в упомянутом испытании Венетоклакса для лечения пациентов с ОМЛ только для 12 из 18 пациентов образцы соответствовали установленным в исследовании критериям (более чем 50% выживаемость клеток после разморозки образцов и более чем 5% содержание бластов ОМЛ в образце) [62].

Другим способом определения зависимости опухолевых клеток от антиапоптотических белков семейства Bcl-2 может быть оценка уровня различных представителей данного семейства. Высокий уровень экспрессии мишени и низкий уровень антиапоптотических белков семейства Bcl-2, которые не являются мишенью для того или иного ВНЗ-миметика, вполне закономерно может быть предиктором ответа на данный ВНЗ-миметик. Так, ответ клеточных линий неходжкинских лимфом и мелкоклеточного рака легкого на Венетоклакс коррелирует с уровнем экспрессии Bcl-2 [30,63]. Для клеточных линий ММ ответ на этот препарат определяется соотношением мРНК Bcl-2/Bcl-xL и Bcl-2/Mcl-1 [64]. Аналогичным образом данные соотношения коррелировали и с ответом пациентов с ММ, при этом уровень корреляции снижался в ряду Bcl-2/Bcl-xL -> Bcl-xL -> Bcl-2/Mcl-1 -> Bcl-2 -> Mcl-1 [55]. Для пациентов с ОМЛ показана зависимость ответа на Венетоклакс от процента клеток, экспрессирующих Bcl-2 и не экспрессирующих Bcl-xL [62]. Для ингибитора Mcl-1 S63845 эффективность в клеточных линиях ОМЛ не коррелировала с уровнем мРНК мишени, но демонстрировала обратную зависимость от содержания мРНК Bcl-xL [33]. Аналогичные данные были получены и на широкой выборке клеточных линий для ВНЗ-миметика к Mcl-1 AMG-176 [48]. Также высокая эффективность S63845 показана на клеточных линиях мелкоклеточного рака легкого с высоким содержанием Mcl-1 и низким содержанием Bcl-xL [65].

Содержание проапоптотических белков также может быть биомаркером ответа на ВНЗ-миметики. Например, для ингибиторов Mcl-1 показана роль порообразующего белка Bax в качестве предиктора ответа [48]. Вместе с тем, данные относительно роли проапоптотических белков в предсказании ответа на ВНЗ-миметики скорее остаются спорными. Так, в доклинических исследованиях был показан Vim-зависимый механизм действия Венетоклакса [66], а на кле-

точных линиях диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы белковый уровень Bim (равно как Bcl-2 и Bax) прямо коррелировал с ответом на Венетоклакс [67]. Кроме того, более низкое соотношение белков Bcl-2/Bim отражалось в повышенной чувствительности к этому препарату на клетках фолликулярной лимфомы [68]. Все эти данные свидетельствуют в пользу того, что уровень Bim должен прямо коррелировать с ответом на Венетоклакс. Однако в одном из испытаний на пациентах с ОМЛ, напротив, была показана обратная корреляция уровня мРНК Bim с ответом на данный ВНЗ-миметик [69].

Таким образом, уровень экспрессии (либо соотношение уровней экспрессии) различных членов семейства Bcl-2 может быть полезным биомаркером в предсказании ответа на ВНЗ-миметики. В то же время необходимо определить наилучшие соотношения для каждого конкретного заболевания. Также важно определить и наиболее подходящие методы детекции в каждом конкретном случае, так как определение экспрессии на уровне мРНК, хотя и обладает относительной простотой, может в существенной степени не отражать уровень белка в клетке. В особенности это справедливо для белков, чей уровень сильно зависит от посттрансляционных модификаций, например, для Bim и Mcl-1.

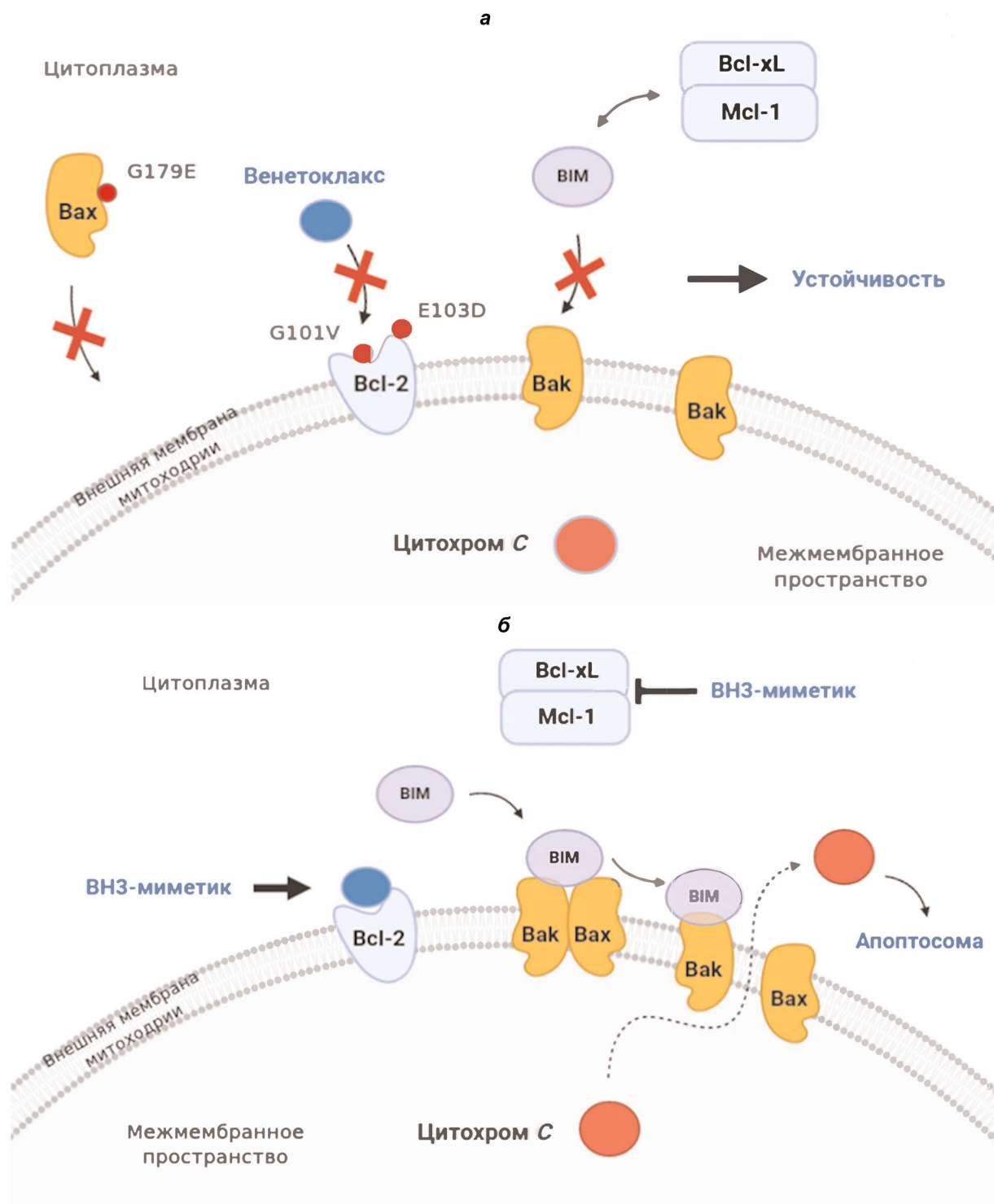
Некоторые генетические aberrации также коррелируют с зависимостью опухолей от индивидуальных белков семейства Bcl-2. Так, ярким примером является транслокация t(11;14) в клетках ММ, которая встречается примерно у 20% пациентов [70]. В *in vitro* эксперименте показано, что Венетоклакс специфически эффективен в отношении клеточных линий с указанной транслокацией, при этом она коррелирует с высоким соотношением мРНК Bcl-2/Mcl-1 [71]. Как итог, при использовании Венетоклакса в качестве монотерапии для лечения пациентов с ММ ответ наблюдается преимущественно в случае наличия транслокации t(11;14) [55]. Другим примером формирования зависимости от Bcl-2 являются мутации в генах изоцитратдегидрогеназ, IDH1 и IDH2, в клетках ОМЛ [72].

**Механизмы возникновения резистентности к ВНЗ-миметикам.** Одной из главных проблем в лечении опухолевых заболеваний является возникновение резистентности к терапии. Очевидно, данная проблема касается и применения ВНЗ-миметиков (рис. 2). Так, описаны случаи возникновения устойчивости к Венетоклаксу у пациентов с ХЛЛ [73].

В основе формирования приобретенной резистентности к ВНЗ-миметикам нередко лежат те же механизмы, которые могут быть ответ-

ственны за исходную устойчивость к ним, а именно, нарушения регуляции анти- и проапоптотических представителей семейства Bcl-2. Так, повышение уровня антиапоптотических белков (не являющихся мишенью используемого препарата) в опухолевых клетках с приобретенной устойчивостью к Венетоклаксу показано в ряде работ *in vitro* [74]. Аналогичные данные имеются и для других ВНЗ-миметиков, например, АВТ-737 [75]. При этом в основе упомянутых механизмов нарушения регуляции белков семейства Bcl-2 может лежать действие различных сигнальных каскадов, часто подверженных активации в опухолевых клетках, таких как MEK/ERK [76] и PI3K/AKT/mTOR [77]. Приобретенная устойчивость к действию ВНЗ-миметиков также может сопровождаться снижением уровня проапоптотических белков, например, Bax и Bim [68, 74]. Снижение функциональной активности проапоптотических белков, например, точечная мутация G179E в Bax, вело к нарушению транслокации данного белка из цитоплазмы к внешней митохондриальной мембране [78]. Изучение механизмов возникновения устойчивости к действию ВНЗ-миметиков имеет большое значение для подбора рациональных терапий. Так, при активации различных внутриклеточных каскадов использование ингибиторов соответствующих сигнальных путей может быть эффективно для преодоления резистентности к ВНЗ-миметикам. Вместе с тем, в случае возникновения мутаций в порообразующих белках опухолевые клетки могут приобретать рефрактерность к апоптозу, что приведет к нерациональности использования этих агентов.

Отдельного упоминания в контексте устойчивости к ВНЗ-миметикам заслуживают «резистентные мутации» – изменения в структуре белка, которые ведут к снижению эффективности препарата, нацеленного на данную мишень. Резистентные мутации известны для большого числа препаратов, например, для ингибиторов рецепторов с тирозинкиназной активностью. Вместе с тем появляются данные о том, что резистентные мутации могут обуславливать устойчивость к действию Венетоклакса. Так, мутация G101V была обнаружена у 7 из 15 пациентов с ХЛЛ, у которых наблюдалась прогрессия на фоне применения этого препарата [79]. Наличие данной аминокислотной замены в белке ведет к снижению аффинности Венетоклакса к Bcl-2 примерно в 180 раз [79]. Недавно были опубликованы обновленные результаты данного исследования на более широкой выборке пациентов. Как итог, мутация G101V была обнаружена еще у 4 пациентов вдобавок к 7 ранее описанным случаям. При этом в 10 из 11 таких случаев в



**Рис. 2.** а – Механизмы возникновения резистентности к ВНЗ-миметикам (на примере Венетоклакса) включают появление точечных мутаций в мишени – белке Bcl-2 (например, G101V и E103D), нарушения в работе проапоптотических белков (например, за счет точечной мутации G179E в Bax), а также повышенную экспрессию антиапоптотических белков Bcl-xL и Mcl-1; б – предполагаемый механизм преодоления резистентности с помощью комбинаций различных ВНЗ-миметиков

белке Bcl-2 были выявлены и другие мутации, а медианное значение мутаций для этих пациентов равнялось трем [73]. Примечательно, одной из обнаруженных аминокислотных замен была

E103D (в описываемом исследовании выявлена у 4 пациентов) [73]. Как отмечено ранее, именно наличие аспартата в позиции 103 обуславливает избирательность Венетоклакса в отноше-

нии Vcl-2 в сравнении с Vcl-xL, у которого в альтернативной позиции (96) находится глутамат [30]. Следовательно, замена E103D закономерно должна вести к снижению эффективности этого ВНЗ-миметика. Что касается замены G101V, она также была описана другой группой исследователей у 3 из 4 пациентов, которые приобрели резистентность к Венетоклаксу [80]. Помимо мутаций, обнаруженных в указанных выше исследованиях [73,79,80], кандидатом на роль резистентной для Венетоклакса мутации является замена F104L [74]. Замены альтернативной аминокислоты в структуре мышинового Vcl-2 (F101C и F101L) ухудшали связывание Vcl-2 с этим препаратом [78].

Важно отметить, что частота встречаемости аллелей с мутациями в структуре Vcl-2 существенно варьировала среди пациентов (так, для аллелей G101V от 0,1 до 68,4%) [73]. Также показано, что различные клоны опухолевых клеток, полученные от одного пациента, либо характеризовались повышенным уровнем Vcl-xL, либо имели мутацию Vcl-2 G101V [79]. Таким образом, резистентность к Венетоклаксу может иметь комплексный характер для отдельных пациентов. В подобных случаях необходимо учитывать все механизмы возникновения устойчивости к ВНЗ-миметикам для каждого индивидуального больного. Что касается возможных способов преодоления устойчивости к Венетоклаксу клеток с резистентными формами белка, в дальнейшем могут быть разработаны новые ВНЗ-миметики к Vcl-2, чье взаимодействие с мишенью не будет нарушаться указанными аминокислотными заменами. Подобный подход был успешно применен для преодоления устойчивости клеток к ингибиторам различных мишеней, например, EGFR и BCR-ABL.

**Перспективные комбинации ВНЗ-миметиков.** Использование комбинаций различных терапий обладает рядом преимуществ в сравнении с действием индивидуальных препаратов. Во-первых, ингибирование одного белка/пути передачи сигнала может быть неэффективно ввиду наличия компенсаторной активности со стороны других белков/сигнальных путей, тогда как действие на оба звена приведет к выраженному ответу. Во-вторых, даже при высокой эффективности монотерапии в популяции опухолевых клеток могут быть отдельные клоны, в которых блокирование одного белка/сигнального пути будет недостаточно для индукции апоптоза. Как итог, подобные клоны могут быть ответственны за возникновение рецидива у пациентов, при этом использованная ранее терапия будет неэффективна для потомков исходно резистентных клонов.

Одним из возможных направлений в поиске рациональных комбинаций ВНЗ-миметиков является комбинирование нескольких препаратов данного класса. Как отмечалось выше, в ряде работ показан выраженный синергизм при использовании двух ВНЗ-миметиков, в то время как использование их по отдельности было существенно менее успешно [57,81–84]. Так, была показана эффективность одновременного ингибирования Vcl-2 и Mcl-1 [57,81], Vcl-2 и Vcl-xL [83], Mcl-1 и Vcl-xL [84]. Очевидно, в указанных случаях клетки демонстрируют зависимость сразу от двух белков семейства Vcl-2. Вместе с тем, важной является возможность практического применения комбинаций различных ВНЗ-миметиков. В случае использования ингибиторов Vcl-2 и Mcl-1 в экспериментах *in vivo* показано, что подобная комбинация обладает умеренной токсичностью, не влияя существенно на гемопоэз [57,81]. В настоящее время комбинации Венетоклакса и различных ВНЗ-миметиков к Mcl-1 оцениваются на первой стадии клинических испытаний для лечения пациентов с ОМЛ. Опыт одновременного ингибирования Vcl-2 и Vcl-xL в существенной степени может быть оценен на примере использования Навитоклакса, в том числе и в ряде клинических испытаний [5,10]. Как отмечено выше, выраженная тромбоцитопения оказалась дозолимитирующим фактором для применения Навитоклакса. В то же время данный побочный эффект связан с ингибированием Vcl-xL, тогда как не было выявлено существенных побочных эффектов, ассоциированных специфически с одновременным подавлением Vcl-2 и Vcl-xL. Следовательно, есть надежда на потенциальное применение комбинации ВНЗ-миметиков к Vcl-2 и Vcl-xL. Что касается одновременного использования ингибиторов Mcl-1 и Vcl-xL, подобная комбинация, вероятно, будет обладать существенной токсичностью. Помимо важной роли Vcl-xL в выживании тромбоцитов, показана значимость Mcl-1 и Vcl-xL для подавления апоптоза в мегакариоцитах – предшественниках тромбоцитов [85]. Следовательно, блокирование данных белков может в существенной степени обострять тромбоцитопению, возникающую при подавлении Vcl-xL.

Также большим потенциалом обладают комбинации ВНЗ-миметиков с различными препаратами нацеленного действия или с химиотерапевтическими агентами. Данные доклинических исследований о синергизме действия ВНЗ-миметиков с такими препаратами, о молекулярных механизмах, лежащих в его основе, а также о клинических испытаниях указанных комбинаций суммированы в таблице.

## Перспективные комбинации ВНЗ-миметиков с другими противоопухолевыми препаратами

Комбинация	Экспериментальная модель	Возможный механизм синергизма	Примеры клинических исследований	Ссылки
<b>ВНЗ-миметики к Vcl-2</b>				
Навитоклак + Ритуксимаб	выраженный эффект комбинации на клеточной линии DoHH2 (В-клеточная лимфома) в экспериментах <i>in vivo</i> (ксенографты)	одним из эффектов Ритуксимаба является ингибирование активности NF-κB, что ведет к уменьшению экспрессии Vcl-xL	фаза II, Ритуксимаб + Навитоклак; пациенты с ХЛЛ (NCT01087151), исследование завершено	[35]
Навитоклак + Эрлотиниб (ингибитор EGFR)	выраженный эффект комбинации на клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)	действие Эрлотиниба приводит к понижению уровня экспрессии Mcl-1, а также к увеличению уровня Vim	фаза I, Эрлотиниб + Навитоклак; пациенты с солидными опухолями (NCT01009073), исследование завершено	[86]
Навитоклак + Доцетаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинации на клеточной линии аденокарциномы яичника SKOV3 <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)	снижение уровня белка Mcl-1 при действии Доцетаксела	фаза I, Доцетаксел + Навитоклак; пациенты с солидными опухолями (NCT00888108), исследование завершено	[86]
Навитоклак + Траметиниб (ингибитор MEK)	повышенная эффективность комбинации на клеточных линиях разных тканей мутантных по гену KRAS в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)	Траметиниб приводит к увеличению уровня Vim	фаза I/II, Траметиниб + Навитоклак; пациенты с солидными опухолями (NCT02079740), исследование активно	[87]
Венетоклак + Селинексор	повышенная эффективность комбинации на клеточной линии ОМЛ THP-1 в экспериментах <i>in vitro</i>	Селинексор ингибирует экспор-тин 1 (XPO1), что приводит к уменьшению уровня Mcl-1	фаза I, Селинексор + Венетоклак; пациенты с рецидивирующими гематологическими заболеваниями (NCT03955783), исследование активно	[88]
Венетоклак + Воруциклиб (ингибитор CDK9)	выраженный эффект комбинации на линиях ОМЛ MV4-11, THP-1 в экспериментах <i>in vitro</i> и клетках MV4-11 <i>in vivo</i> (ксенографты)	действие ингибиторов CDK9 (Воруциклиба или AZD4573) ведет к уменьшению содержания Mcl-1 за счет негативной регуляции на транскрипционном уровне	фаза I, CYC065 (ингибитор CDK 2/9) + Венетоклак; пациенты с ХЛЛ (NCT03739554) и ОМЛ (NCT04017546), исследования активны	[89]
Венетоклак + AZD4573 (ингибитор CDK9)	выраженный эффект комбинации на линиях SU-DHL-4 и OCI-AML3 в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)			[90]
Венетоклак + Дувелисиб (ингибитор PI3K-δ и PI3K-γ)	выраженный эффект комбинации на <i>ex vivo</i> клеточных образцах, взятых у пациентов с ХЛЛ	действие Дувелисиба ведет к увеличению экспрессии белка Vcl-2 и ВНЗ-only белков в клетках ХЛЛ, что может быть опосредовано ингибированием PI3K-δ и PI3K-γ	фаза II, Дувелисиб + Венетоклак; пациенты с ХЛЛ (NCT03534323), исследование активно	[91]
Венетоклак + Дексаметазон/Карфилзомиб (ингибитор протеасом)	повышенная эффективность комбинации Венетоклак + Дексаметазон/Карфилзомиб на линии мантйноклеточной лимфомы KMS18 в экспериментах <i>in vitro</i> . Повышение чувствительности к Венетоклаксу при сочетании с Дексаметазоном в <i>ex vivo</i> образцах пациентов с ММ	Карфилзомиб ведет к подавлению Mcl-1 предположительно за счет увеличения экспрессии ВНЗ-only белка Noxa – негативного регулятора Mcl-1. Действие Дексаметазона ведет к увеличению уровня Vim	фаза II, Дексаметазон/Карфилзомиб + Венетоклак; пациенты с мантйноклеточной лимфомой (NCT02899052), исследование активно	[92]

Продолжение таблицы

Комбинация	Экспериментальная модель	Возможный механизм синергизма	Примеры клинических исследований	Ссылки
Венетоклак + Идарубицин/ Цитарабин	выраженный эффект комбинации на клеточных линиях ОМЛ в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)	высокие дозы Идарубицина снижают уровень экспрессии Mcl-1	фаза I, Идарубицин/ Цитарабин + Венетоклак; пациенты с ОМЛ (NCT03194932), исследование активно	[93]
Венетоклак + Квизартиниб (ингибитор FLT3)	выраженный эффект комбинации на линиях мантийноклеточной лимфомы в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)	действие Квизартиниба приводит к снижению уровня Mcl-1 и Vcl-xL за счет ингибирования рецептора FLT3-ITD	фаза I/II, Квизартиниб + Венетоклак; пациенты с ОМЛ с мутацией FLT3/ITD (NCT03735875), исследование активно	[94]
Венетоклак + Эназидениб (ингибитор мутантной IDH2)	выраженный эффект комбинации на <i>ex vivo</i> клеточных образцах, взятых у пациентов с ОМЛ, а также в экспериментах <i>in vivo</i> (ксенографты)	действие Эназидениба приводит к уменьшению уровня Vcl-2 за счет ингибирования мутантной формы IDH2	фаза I/II, Эназидениб + Венетоклак; пациенты с ОМЛ (NCT04092179), исследование активно	[95]

## ВНЗ-миметики к Mcl-1

AZD-5991 + Бортезомиб (ингибитор протеасом)	выраженный эффект комбинации на клеточной линии MM NCI-H929 в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)	действие Бортезомиба приводило к увеличению уровня Vim, вероятно, за счет блокирования деградации этого белка в протеасомах	—	[47]
AZD-5991 + СНОР режим	выраженный эффект комбинации на моделях Т-клеточных лимфом в экспериментах <i>in vivo</i> (ксенографты)	механизм не изучен	—	[96]
AMG-176 + Траметиниб (ингибитор MEK)	выраженный эффект комбинации на KRAS-мутантных клеточных линиях немелкоклеточного рака легкого <i>in vivo</i> (ксенографты)	действие Траметиниба приводило к повышению экспрессии белка Vim	—	[97]
AMG-176 + Карфилзомиб (ингибитор протеасом)	выраженный эффект комбинации на ортотопической модели MM в экспериментах <i>in vivo</i> (ксенографты)	механизм не изучен (вероятно, аналогичен действию Бортезомиба)	фаза I, AMG-176 + Карфилзомиб + Дексаметазон; пациенты с MM (NCT02675452), испытание активно	[48]
S63845 + Доцетаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинации на клеточную линию рака молочной железы SK-BR-3 в экспериментах <i>in vitro</i> и тройном негативном раке молочной железы в экспериментах <i>in vivo</i> (ксенографты)	механизм не изучен	—	[98]
S63845 + Трастузумаб (моноклональное антитело к HER2) или Лапатиниб (ингибитор рецепторных тирозинкиназ)	выраженный эффект комбинаций на клеточную линию рака молочной железы SK-BR-3 в экспериментах <i>in vitro</i> и на моделях HER 2-позитивного рака молочной железы в экспериментах <i>in vivo</i> (ксенографты)	механизм не изучен для Трастузумаба; Лапатиниб способствует увеличению экспрессии белка Vim, предположительно, за счет уменьшения активации сигнальных каскадов АКТ и ERK, препятствуя тем самым фосфорилированию Vim и его деградации	—	[98]

Комбинация	Экспериментальная модель	Возможный механизм синергизма	Примеры клинических исследований	Ссылки
<b>ВНЗ-миметики к Vcl-xL</b>				
A-1155463 + Доцетаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинаций на различных моделях немелкоклеточного рака легкого, рака яичников, рака молочной железы в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (ксенографты)	механизм не изучен	–	[99]
A-385358 + Паклитаксел (ингибитор разбора микротрубочек)	выраженный эффект комбинации на клеточные линии немелкоклеточного рака легкого A549 и LX-1 в экспериментах <i>in vivo</i> (ксенографты)	механизм не изучен	–	[100]

Отдельно стоит упомянуть и показанную в клинических испытаниях эффективность комбинаций Венетоклакса с другими препаратами. Так, комбинация этого ВНЗ-миметика с гипометилирующими агентами, Азацитидином и Децитабинном, показала высокую эффективность при лечении пожилых пациентов с ОМЛ: объективный уровень ответа 68% и медианное значение выживаемости 17,5 мес., что существенно выше аналогичных показателей для монотерапии гипометилирующими агентами [101]. Синергизм действия данной комбинации может быть связан с тем, что гипометилирующие вещества вызывают транскрипционную индукцию Noxa – ВНЗ-only белка, специфически взаимодействующего с Mcl-1. Примечательно, индукция Noxa была связана с не зависящим от эпигенетической регуляции механизмом действия Азацитидина [102]. В другом исследовании показано, что действие комбинации Азацитидина и Венетоклакса подавляет окислительное фосфорилирование в лейкемических стволовых клетках [103]. Также стоит отметить успех использования комбинации Венетоклакса с ингибитором ВТК Ибрутинибом, который был продемонстрирован при лечении пациентов с плохим прогнозом с ХЛЛ [104] и мантийноклеточной лимфомой [105]. Данная комбинация оценивается в ряде клинических испытаний III фазы для лечения пациентов с указанными заболеваниями. В доклинических исследованиях установлено, что одним из механизмов усиления проапоптотической активности Венетоклакса при действии Ибрутиниба может быть снижение уровня антиапоптотических белков Vcl-xL и Mcl-1 [106]. Детальное изучение механизмов, лежащих в основе синергизма ВНЗ-ми-

метиков с другими препаратами, в особенности в случае эффективности подобных комбинаций для лечения пациентов, может дать ответы на вопрос о расширении области применения ВНЗ-миметиков и снижении вероятности возникновения к ним резистентности.

**Выводы.** Белки семейства Vcl-2 играют важную роль в контроле запуска апоптоза, а потому опухолевые клетки нередко характеризуются нарушениями в их работе. Тщательное изучение механизмов функционирования этих белков привело к созданию ВНЗ-миметиков – ингибиторов антиапоптотических белков указанного семейства. Одобрение для медицинского применения Венетоклакса, селективного ингибитора Vcl-2, стало важным достижением в области изучения ВНЗ-миметиков. Вместе с тем, пока спектр применения этого препарата остается относительно узким, а ВНЗ-миметики к другим мишеням в лучшем случае только вступают в фазу клинических испытаний. Дальнейшие исследования, безусловно, должны привести к существенному расширению области применения ВНЗ-миметиков. Этому должно способствовать изучение предикторов чувствительности к ним, в частности, исследование факторов, отвечающих за формирование зависимости опухолевых клеток от того или иного белка семейства Vcl-2. Не должно остаться в стороне и изучение факторов возникновения устойчивости к ВНЗ-миметикам, а данные о возникновении к ним резистентных мутаций указывают на необходимость разработки новых соединений этого класса. Наконец, пристальное внимание необходимо уделить и поиску наиболее эффективных комбинаций ВНЗ-миметиков как друг с другом, так и с препаратами других классов.



**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (проект 17-75-20102). Работа в лабораториях авторов также поддержана грантами РФФИ (20-015-00500), Шведским (190345) и Стокгольмским (181301) онкологическими фондами.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая работа не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A., and MacFarlane, M. (2012) The “complexities” of life and death: death receptor signalling platforms, *Exp. Cell Res.*, **318**, 1269-1277, doi: 10.1016/j.yexcr.2012.04.005.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J. M. (2013) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 49-63, doi: 10.1038/nrm3722.
- Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2019) Molecular comprehension of Mcl-1: from gene structure to cancer therapy, *Trends Cell Biol.*, **29**, 549-562, doi: 10.1016/j.tcb.2019.03.004.
- Wilson, W. H., O'Connor, O. A., Czuczman, M. S., LaCasce, A. S., Gerecitano, J. F., et al. (2010) Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity, *Lancet Oncol.*, **11**, 1149-1159, doi: 10.1016/S1470-2045(10)70261-8.
- Deeks, E. D. (2016) Venetoclax: first global approval, *Drugs*, **76**, 979-987, doi: 10.1007/s40265-016-0596-x.
- Westphal, D., Kluck, R. M., and Dewson, G. (2014) Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis, *Cell Death Differ.*, **21**, 196-205, doi: 10.1038/cdd.2013.139.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J. E., Bonzon, C., Sullivan, B. A., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2005) BH3 Domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol. Cell*, **17**, 525-535, doi: 10.1016/j.molcel.2005.02.003.
- Czabotar, P. E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., et al. (2013) Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis, *Cell*, **152**, 519-531, doi: 10.1016/j.cell.2012.12.031.
- Cory, S., Roberts, A. W., Colman, P. M., and Adams, J. M. (2016) Targeting BCL-2-like proteins to kill cancer cells, *Trends Cancer*, **2**, 443-460, doi: 10.1016/j.trecan.2016.07.001.
- Singh, R., Letai, A., and Sarosiek, K. (2019) Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 175-193, doi: 10.1038/s41580-018-0089-8.
- Senichkin, V. V., Streletskaia, A. Y., Gorbunova, A. S., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation, *Cell Death Differ.*, **27**, 405-419, doi: 10.1038/s41418-019-0486-3.
- Richter-Larrea, J. A., Robles, E. F., Fresquet, V., Beltran, E., Rullan, A. J., Agirre, X., Calasanz, M. J., Panizo, C., Richter, J. A., Hernandez, J. M., Roman-Gomez, J., Prosper, F., and Martinez-Climent, J. A. (2010) Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma, *Blood*, **116**, 2531-2542, doi: 10.1182/blood-2010-02-268003.
- Tagawa, H., Karnan, S., Suzuki, R., Matsuo, K., Zhang, X., Ota, A., Morishima, Y., Nakamura, S., and Seto, M. (2005) Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene *BIM*, *Oncogene*, **24**, 1348-1358, doi: 10.1038/sj.onc.1208300.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C., and Perucho, M. (1997) Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype, *Science*, **275**, 967-969, doi: 10.1126/science.275.5302.967.
- Yu, J., Yue, W., Wu, B., and Zhang, L. (2006) PUMA sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and irradiation, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2928-2936, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2429.
- Sinicrope, F. A., Rego, R. L., Okumura, K., Foster, N. R., O'Connell, M. J., Sargent, D. J., and Windschitl, H. E. (2008) Prognostic impact of Bim, Puma, and Noxa expression in human colon carcinomas, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 5810-5818, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5202.
- Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., et al. (2010) The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers, *Nature*, **463**, 899-905, doi: 10.1038/nature08822.
- Wesarg, E., Hoffarth, S., Wiewrodt, R., Kröll, M., Biesterfeld, S., Huber, C., and Schuler M. (2007) Targeting BCL-2 family proteins to overcome drug resistance in non-small cell lung cancer, *Int. J. Cancer*, **121**, 2387-2394, doi: 10.1002/ijc.22977.
- Faderl, S., Keating, M. J., Do, K. A., Liang, S. Y., Kantarjian, M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Manshouri T., and Albitar, M. (2002) Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL), *Leukemia*, **16**, 1045-1052, doi: 10.1038/sj.leu.2402540.
- Han, Y., Wu, N., Jiang, M., Chu, Y., Wang, Z., Liu, H., Cao, J., Liu, H., Xu, B., and Xie, X. (2019) Long non-coding RNA MYOSLID functions as a competing endogenous RNA to regulate MCL-1 expression by sponging miR-29c-3p in gastric cancer, *Cell Prolif.*, 12678, doi: 10.1111/cpr.12678.
- Zhang, J., Wang, S., Wang, L., Wang, R., Chen, S., Pan, B., Sun, Y., and Chen, H. (2015) Prognostic value of Bcl-2 expression in patients with non-small-cell lung cancer: a meta-analysis and systemic review, *Oncol. Targets Ther.*, **8**, 3361-3369, doi: 10.2147/OTT.S89275.
- Henriksen, R., Wilander, E., and Löberg, K. (1995) Expression and prognostic significance of Bcl-2 in ovarian tumours, *Br. J. Cancer*, **72**, 1324-1329, doi: 10.1038/bjc.1995.509.
- Chan, W. Y., Cheung, K. K., Schorge, J. O., Huang, L. W., Welch, et al. (2000) Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers, *Am. J. Pathol.*, **156**, 409-417, doi: 10.1016/S0002-9440(10)64744-X.
- Nakano, T., Liu, D., Nakashima, N., Yokomise, H., Nii, K., Go, T., Tarumi, S., Matsuura, N., Chang, S., Fujiwara, A., and Kakehi, Y. (2018) MCL-1 expression of non-small cell

- lung cancer as a prognostic factor and MCL-1 as a promising target for gene therapy, *J. Clin. Oncol.*, **36**, doi: 10.1200/jco.2018.36.15\_suppl.e24236.
26. Wu, X., Luo, Q., Zhao, P., Chang, W., Wang, Y., Shu, T., Ding, F., Li, B., and Liu, Z. (2019) MGMT-activated DUB3 stabilizes MCL1 and drives chemoresistance in ovarian cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 2961-2966, doi: 10.1073/pnas.1814742116.
  27. Williams, J., Lucas, P. C., Griffith, K. A., Choi, M., Fogoros, S., Hu, Y. Y., and Liu, J. R. (2005) Expression of Bcl-xL in ovarian carcinoma is associated with chemoresistance and recurrent disease, *Gynecol. Oncol.*, **96**, 287-295, doi: 10.1016/j.ygyno.2004.10.026.
  28. Reyna, D. E., Garner, T. P., Lopez, A., Kopp, F., Choudhary, G. S., et al. (2017) Direct activation of BAX by B TSA1 overcomes apoptosis resistance in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **32**, 490-505, doi: 10.1016/j.ccell.2017.09.001.
  29. Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P. P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., and Shi, Y. X., et al. (2006) Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia, *Cancer Cell*, **10**, 375-388, doi: 10.1016/j.ccr.2006.10.006.
  30. Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., et al. (2013) ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets, *Nat. Med.*, **19**, 202-208, doi: 10.1038/nm.3048.
  31. Arellano, M. L., Borthakur, G., Berger, M., Luer, J., and Raza, A. (2014) A phase II, multicenter, open-label study of obatocic mesylate in patients with previously untreated myelodysplastic syndromes with anemia or thrombocytopenia, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, **14**, 534-539, doi: 10.1016/j.clml.2014.04.007.
  32. Tao, Z. F., Hasvold, L., Wang, L., Wang, X., Petros, A. M., et al. (2014) Discovery of a potent and selective BCL-X inhibitor with *in vivo* activity, *ACS Med. Chem. Lett.*, **5**, 1088-1093, doi: 10.1021/ml5001867.
  33. Kotschy, A., Szlavik, Z., Murray, J., Davidson, J., Maragno, A. L., et al. (2016) The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models, *Nature*, **538**, 477-482, doi: 10.1038/nature19830.
  34. Oltersdorf, T., Elmore, S. W., Shoemaker, A. R., Armstrong, R. C., Augeri, D. J., et al. (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours, *Nature*, 677-681, doi: 10.1038/nature03579.
  35. Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., et al. (2008) ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor, *Cancer Res.*, **68**, 3421-3428, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836.
  36. Mérimo, D., Khaw, S. L., Glaser, S. P., Anderson, D. J., Belmont, L. D., et al. (2012) Bcl-2, Bcl-x L, and Bcl-w are not equivalent targets of ABT-737 and navitoclax (ABT-263) in lymphoid and leukemic cells, *Blood*, **119**, 5807-5816, doi: 10.1182/blood-2011-12-400929.
  37. Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., et al. (2016) Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **374**, 311-322, doi: 10.1056/NEJMoa1513257.
  38. Seymour, J. F., Kipps, T. J., Eichhorst, B., Hillmen, P., D'Rozario, J., et al. (2018) Venetoclax-Rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia, *N. Engl. J. Med.*, **378**, 1107-1120, doi: 10.1056/NEJMoa1713976.
  39. Casara, P., Davidson, J., Claperon, A., Toumelin-Braizat, G. L. Le, Vogler, M., et al. (2018) S55746 is a novel orally active BCL-2 selective and potent inhibitor that impairs hematological tumor growth, *Oncotarget*, **9**, 20075-20088, doi: 10.18632/oncotarget.24744.
  40. Mason, K. D., Carpinelli, M. R., Fletcher, J. I., Collinge, J. E., Hilton, A. A., et al. (2007) Programmed anuclear cell death delimits platelet life span, *Cell*, **128**, 1173-1186, doi: 10.1016/j.cell.2007.01.037.
  41. Zhang, X., Liu, X., Zhou, D., and Zheng, G. (2020) Targeting anti-apoptotic BCL-2 family proteins for cancer treatment, *Future Med. Chem.*, **12**, 563-565, doi: 10.4155/fmc-2020-0004.
  42. Hartman, M. L., and Czyz, M. (2020) BCL-w: apoptotic and non-apoptotic role in health and disease, *Cell Death Dis.*, doi: 10.1038/s41419-020-2417-0.
  43. Lee, E. F., Dewson, G., Smith, B. J., Evangelista, M., Pettikiriachchi, A., Dogovski, C., Perugini, M. A., Colman, P. M., and Fairlie, W. D. (2011) Crystal structure of a BCL-W domain-swapped dimer: Implications for the function of BCL-2 family proteins, *Structure*, **19**, 1467-1476, doi: 10.1016/j.str.2011.07.015.
  44. Harvey, E. P., Hauseman, Z. J., Cohen, D. T., Rettenmaier, T. J., Lee, S., et al. (2020) Identification of a covalent molecular inhibitor of anti-apoptotic BFL-1 by disulfide tethering, *Cell Chem. Biol.*, **27**, 647-656.e6, doi: 10.1016/j.chembiol.2020.04.004.
  45. Czabotar, P. E., Lee, E. F., van Delft, M. F., Day, C. L., Smith, B. J., Huang, D. C. S., Fairlie, W. D., Hinds, M. G., and Colman, P. M. (2007) Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6217-6222, doi: 10.1073/pnas.0701297104.
  46. Pervushin, N. V., Senichkin, V. V., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. (2020) Mcl-1 as a "barrier" in cancer treatment: can we target it now? *Intern. Rev. Cell Mol. Biol.*, pp. 23-55, doi: 10.1016/bs.ircmb.2020.01.002.
  47. Tron, A. E., Belmonte, M. A., Adam, A., Aquila, B. M., Boise, L. H., et al. (2018) Discovery of Mcl-1-specific inhibitor AZD5991 and preclinical activity in multiple myeloma and acute myeloid leukemia, *Nat. Commun.*, **9**, 5341, doi: 10.1038/s41467-018-07551-w.
  48. Caenepeel, S., Brown, S. P., Belmontes, B., Moody, G., Keegan, K. S., Chui, D., et al. (2018) AMG 176, a selective MCL1 inhibitor, is effective in hematological cancer models alone and in combination with established therapies, *Cancer Discov.*, **8**, 1582-1597, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0387.
  49. Montero, J., and Letai, A. (2018) Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death Differ.*, **25**, 56-64, doi: 10.1038/cdd.2017.183.
  50. Certo, M., Moore, V. D. G., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S. A., and Letai, A. (2006) Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members, *Cancer Cell*, **9**, 351-365, doi: 10.1016/j.ccr.2006.03.027.
  51. Sarosiek, K. A., Fraser, C., Muthalagu, N., Bhola, P. D., Chang, W., et al. (2017) Developmental regulation of mitochondrial apoptosis by c-Myc governs age- and tissue-specific sensitivity to cancer therapeutics, *Cancer Cell*, **31**, 142-156, doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.011.
  52. Xiang, Z., Luo, H., Payton, J. E., Cain, J., Ley, T. J., Opferman, J. T., and Tomasson, M. H. (2010) Mcl1 haploinsufficiency protects mice from Myc-induced acute myeloid leukemia, *J. Clin. Invest.*, **120**, 2109-2118, doi: 10.1172/JCI39964.
  53. Moore, V. D. G., Brown, J. R., Certo, M., Love, T. M., Novina, C. D., and Letai, A. (2007) Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737, *J. Clin. Invest.*, **117**, 112-121, doi: 10.1172/JCI28281.
  54. Pan, R., Hogdal, L. J., Benito, J. M., Bucci, D., Han, L., et al. (2014) Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia, *Cancer*

- Discov.*, **4**, 362-675, doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0609.
55. Kumar, S., Kaufman, J. L., Gasparetto, C., Mikhael, J., Vij, R., et al. (2017) Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma, *Blood*, **130**, 2401-2409, doi: 10.1182/blood-2017-06-788786.
  56. Davids, M. S., Roberts, A. W., Seymour, J. F., Pagel, J. M., Kahl, B. S., et al. (2017) Phase I first-in-human study of venetoclax in patients with relapsed or refractory non-hodgkin lymphoma, *J. Clin. Oncol.*, **35**, 826-833, doi: 10.1200/JCO.2016.70.4320.
  57. Moujalled, D. M., Pomilio, G., Ghiurau, C., Ivey, A., Salmon, J., et al. (2019) Combining BH3-mimetics to target both BCL-2 and MCL1 has potent activity in pre-clinical models of acute myeloid leukemia, *Leukemia*, **33**, 905-917, doi: 10.1038/s41375-018-0261-3.
  58. Zinzani, P. L., Topp, M. S., Yuen, S. L., Rusconi, C., Fleury, I., et al. (2016) Phase 2 study of Venetoclax plus Rituximab or Randomized Ven plus Bendamustine+ Rituximab (BR) Versus BR in patients with Relapsed/Refractory follicular lymphoma: interim data, *Blood*, **128**, 617-617, doi: 10.1182/blood.v128.22.617.617.
  59. Moreau, P., Chanan-Khan, A., Roberts, A. W., Agarwal, A. B., Facon, T., et al. (2017) Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM, *Blood*, **130**, 2392-2400, doi: 10.1182/blood-2017-06-788323.
  60. Touzeau, C., Ryan, J., Guerriero, J., Moreau, P., Chonghaile, T. N., Gouill, S. Le, Richardson, P., Anderson, K., Amiot, M., and Letai, A. (2016) BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics, *Leukemia*, **30**, 761-764, doi: 10.1038/leu.2015.184.
  61. Spencer, A., Rosenberg, A. S., Jakubowiak, A., Raje, N., Chatterjee, M., et al. (2019) A phase 1, first-in-human study of AMG 176, a selective MCL-1 inhibitor, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma, *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.*, **19**, 53-54, doi: 10.1016/j.clml.2019.09.081.
  62. Konopleva, M., Pollyea, D. A., Potluri, J., Chyla, B., Hogdal, L., et al. (2016) Efficacy and biological correlates of response in a phase II study of venetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia, *Cancer Discov.*, **6**, 1106-1117, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0313.
  63. Lochmann, T. L., Floros, K. V., Naseri, M., Powell, K. M., Cook, W., et al. (2018) Venetoclax is effective in small-cell lung cancers with high BCL-2 expression, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 360-369, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1606.
  64. Wong, K. Y., and Chim, C. S. (2020) Venetoclax, bortezomib and S63845, an MCL1 inhibitor, in multiple myeloma, *J. Pharm. Pharmacol.*, **72**, 728-737, doi: 10.1111/jphp.13240.
  65. Yasuda, Y., Ozasa, H., Kim, Y. H., Yamazoe, M., Ajimizu, H., et al. (2020) MCL1 inhibition is effective against a subset of small-cell lung cancer with high MCL1 and low BCL-XL expression, *Cell Death Dis.*, **11**, 1-15, doi: 10.1038/s41419-020-2379-2.
  66. Khaw, S. L., Mérimo, D., Anderson, M. A., Glaser, S. P., Bouillet, P., Roberts, A. W., and Huang, D. C. S. (2014) Both leukaemic and normal peripheral B lymphoid cells are highly sensitive to the selective pharmacological inhibition of prosurvival Bcl-2 with ABT-199, *Leukemia*, **28**, 1207-1215, doi: 10.1038/leu.2014.1.
  67. Pham, L. V., Huang, S., Zhang, H., Zhang, J., Bell, T., et al. (2018) Strategic therapeutic targeting to overcome venetoclax resistance in aggressive B-cell lymphomas, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 3967-3980, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3004.
  68. Bodo, J., Zhao, X., Durkin, L., Souers, A. J., Phillips, D. C., Smith, M. R., and His, E. D. (2016) Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells, *Oncotarget*, **7**, 7000-7010, doi: 10.18632/oncotarget.12132.
  69. Kontro, M., Kumar, A., Majumder, M. M., Eldfors, S., Parsons, A., et al. (2017) HOX gene expression predicts response to BCL-2 inhibition in acute myeloid leukemia, *Leukemia*, **31**, 301-309, doi: 10.1038/leu.2016.222.
  70. Avet-Loiseau, H., Attal, M., Moreau, P., Charbonnel, C., Garban, F., et al. (2007) Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome, *Blood*, **109**, 3489-3495, doi: 10.1182/blood-2006-08-040410.
  71. Touzeau, C., Dousset, C., Gouill, S. Le, Sampath, D., Levenson, J. D., Souers, A. J., Maïga, S., Béné, M. C., Moreau, P., Pellat-Deceunynck, C., and Amiot, M. (2014) The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma, *Leukemia*, **28**, 210-212, doi: 10.1038/leu.2013.216.
  72. Chan, S. M., Thomas, D., Corces-Zimmerman, M. R., Xavy, S., Rastogi, S., Hong, W. J., Zhao, F., Medeiros, B. C., Tyvoll, D. A., and Majeti, R. (2015) Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia, *Nat. Med.*, **21**, 178-184, doi: 10.1038/nm.3788.
  73. Blombery, P., Thompson, E. R., Nguyen, T., Birkinshaw, R. W., Gong, J. N., et al. (2020) Multiple BCL2 mutations cooccurring with Gly101Val emerge in chronic lymphocytic leukemia progression on venetoclax, *Blood*, **135**, 773-777, doi: 10.1182/blood.2019004205.
  74. Tahir, S. K., Smith, M. L., Hessler, P., Rapp, L. R., Idler, K. B., Park, C. H., Levenson, J. D., and Lam, L. T. (2017) Potential mechanisms of resistance to venetoclax and strategies to circumvent it, *BMC Cancer*, **17**, 399, doi: 10.1186/s12885-017-3383-5.
  75. Mazumder, S., Choudhary, G. S., Al-Harbi, S., and Almasan, A. (2012) Mcl-1 phosphorylation defines ABT-737 resistance that can be overcome by increased NOXA expression in leukemic B cells, *Cancer Res.*, **72**, 3069-3079, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4106.
  76. Konopleva, M., Milella, M., Ruvalo, P., Watts, J. C., Ricciardi, M. R., et al. (2012) MEK inhibition enhances ABT-737-induced leukemia cell apoptosis via prevention of ERK-activated MCL-1 induction and modulation of MCL-1/BIM complex, *Leukemia*, **26**, 778-787, doi: 10.1038/leu.2011.287.
  77. Choudhary, G. S., Al-Harbi, S., Mazumder, S., Hill, B. T., Smith, M. R., Bodo, J., His, E. D., and Almasan, A. (2015) MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies, *Cell Death Dis.*, **6**, 1593, doi: 10.1038/cddis.2014.525.
  78. Fresquet, V., Rieger, M., Carolis, C., García-Barchino, M. J., and Martínez-Climent, J. A. (2014) Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma, *Blood*, **123**, 4111-4119, doi: 10.1182/blood-2014-03-560284.
  79. Blombery, P., Anderson, M. A., Gong, J. N., Thijssen, R., Birkinshaw, R. W., et al. (2019) Acquisition of the recurrent Gly101Val mutation in BCL2 confers resistance to venetoclax in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Discov.*, **9**, 342-353, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1119.
  80. Tausch, E., Close, W., Dolnik, A., Bloehdorn, J., Chyla, B., Bullinger, L., Döhner, H., Mertens, D., and Stilgenbauer, S. (2019) Venetoclax resistance and acquired BCL2 muta-

- tions in chronic lymphocytic leukemia, *Haematologica*, **104**, 434-437, doi: 10.3324/haematol.2019.222588.
81. Ramsey, H. E., Fischer, M. A., Lee, T., Gorska, A. E., Arrate, M. P., et al. (2018) A novel MCL1 inhibitor combined with venetoclax rescues venetoclax-resistant acute myelogenous leukemia, *Cancer Discov.*, **8**, 1566-1581, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0140.
  82. Lee, E. F., Harris, T. J., Tran, S., Evangelista, M., Arulananda, S., et al. (2019) BCL-XL and MCL-1 are the key BCL-2 family proteins in melanoma cell survival, *Cell Death Dis.*, **10**, 1-14, doi: 10.1038/s41419-019-1568-3.
  83. Khaw, S. L., Suryani, S., Evans, K., Richmond, J., Robbins, A., et al. (2016) Venetoclax responses of pediatric ALL xenografts reveal sensitivity of MLL-rearranged leukemia, *Blood*, **128**, 1382-1395, doi: 10.1182/blood-2016-03-707414.
  84. Weeden, C. E., Ah-Cann, C., Holik, A. Z., Pasquet, J., Garnier, J. M., Merino, D., Lessene, G., and Asselin-Labat, M. L. (2018) Dual inhibition of BCL-XL and MCL-1 is required to induce tumour regression in lung squamous cell carcinomas sensitive to FGFR inhibition, *Oncogene*, **37**, 4475-4488, doi: 10.1038/s41388-018-0268-2.
  85. Debrincat, M. A., Josefsson, E. C., James, C., Henley, K. J., Ellis, S., et al. (2012) Mcl-1 and Bcl-x L coordinately regulate megakaryocyte survival, *Blood*, **119**, 5850-5858, doi: 10.1182/blood-2011-12-398834.
  86. Chen, J., Jin, S., Abraham, V., Huang, X., Liu, B., Mitten, M. J., et al. (2011) The Bcl-2/Bcl-X L/Bcl-w inhibitor, navitoclax, enhances the activity of chemotherapeutic agents *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Cancer Ther.*, **10**, 2340-2349, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0415.
  87. Corcoran, R. B., Cheng, K. A., Hata, A. N., Faber, A. C., Ebi, H., et al. (2013) Synthetic lethal interaction of combined BCL-XL and MEK inhibition promotes tumor regressions in KRAS mutant cancer models, *Cancer Cell*, **23**, 121-128, doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.007.
  88. Luedtke, D. A., Su, Y., Liu, S., Edwards, H., Wang, Y., Lin, H., Taub, J. W., and Ge, Y. (2018) Inhibition of XPO1 enhances cell death induced by ABT-199 in acute myeloid leukaemia via Mcl-1, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 6099-6111, doi: 10.1111/jcmm.13886.
  89. Luedtke, D. A., Su, Y., Ma, J., Li, X., Buck, S. A., et al. (2020) Inhibition of CDK9 by voruciclib synergistically enhances cell death induced by the Bcl-2 selective inhibitor venetoclax in preclinical models of acute myeloid leukemia, *Signal. Transduct. Target. Ther.*, **5**, 1-11, doi: 10.1038/s41392-020-0112-3.
  90. Cidado, J., Boiko, S., Proia, T., Ferguson, D., Criscione, S. W., et al. (2020) AZD4573 is a highly selective CDK9 inhibitor that suppresses Mcl-1 and induces apoptosis in hematologic cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, **26**, 922-934, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1853.
  91. Patel, V. M., Balakrishnan, K., Douglas, M., Tibbitts, T., Xu, E. Y., et al. (2017) Duvelisib treatment is associated with altered expression of apoptotic regulators that helps in sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to venetoclax (ABT-199), *Leukemia*, **31**, 1872-1881, doi: 10.1038/leu.2016.382.
  92. Matulis, S. M., Gupta, V. A., Nooka, A. K., Hollen, H. V., Kaufman, J. L., Lonial, S., and Boise, L. H. (2016) Dexamethasone treatment promotes Bcl-2 dependence in multiple myeloma resulting in sensitivity to venetoclax, *Leukemia*, **30**, 1086-1093, doi: 10.1038/leu.2015.350.
  93. The, T. C., Nguyen, N. Y., Moujalled, D. M., Segal, D., Pomilio, G., et al. (2018) Enhancing venetoclax activity in acute myeloid leukemia by co-targeting MCL1, *Leukemia*, **32**, 303-312, doi: 10.1038/leu.2017.243.
  94. Mali, R. S., Zhang, Q., DeFilippis, R., Cavazos, A., Kuruvilla, V. M., et al. (2020) Venetoclax combines synergistically with FLT3 inhibition to effectively target leukemic cells in FLT3-ITD<sup>+</sup> acute myeloid leukemia models, *Haematologica*, 244020, doi: 10.3324/haematol.2019.244020.
  95. Cathelin, S., Sharon, D., Subedi, A., Cojocari, D., Phillips, D. C., et al. (2018) Combination of enasidenib and venetoclax shows superior anti-leukemic activity against IDH2 mutated AML in patient-derived xenograft models, *Blood*, **132**, 562-562, doi: 10.1182/blood-2018-99-119688.
  96. Koch, R., Christie, A. L., Crombie, J. L., Palmer, A. C., Plana, D., et al. (2019) Biomarker-driven strategy for MCL1 inhibition in T-cell lymphomas, *Blood*, **133**, 566-575, doi: 10.1182/blood-2018-07-865527.
  97. Nangia, V., Siddiqui, F. M., Caenepeel, S., Timonina, D., Bilton, S. J., et al. (2018) Exploiting MCL1 dependency with combination MEK + MCL1 inhibitors leads to induction of apoptosis and tumor regression in KRAS-Mutant non-small cell lung cancer, *Cancer Discov.*, **8**, 1598-1613, doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0277.
  98. Merino, D., Whittle, J. R., Vaillant, F., Serrano, A., Gong, J. N., et al. (2017) Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer, *Sci. Transl. Med.*, **9**, 401, doi: 10.1126/scitranslmed.aam7049.
  99. Levenson, J. D., Phillips, D. C., Mitten, M. J., Boghaert, E. R., Diaz, D., et al. (2015) Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy, *Sci. Transl. Med.*, **7**, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa4642.
  100. Shoemaker, A. R., Oleksijew, A., Bauch, J., Belli, B. A., Borre, T., et al. (2006) A small-molecule inhibitor of Bcl-XL potentiates the activity of cytotoxic drugs *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res.*, **66**, 8731-8739, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0367.
  101. DiNardo, C. D., Pratz, K., Pullarkat, V., Jonas, B. A., Arellano, M., et al. (2019) Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia, *Blood*, **133**, 7-17, doi: 10.1182/blood-2018-08-868752.
  102. Jin, S., Cojocari, D., Purkal, J. J., Popovic, R., Talaty, N. N., et al. (2020) 5-Azacitidine induces NOXA to prime AML cells for venetoclax-mediated apoptosis, *Clin. Cancer Res.*, doi: 10.1158/1078-0432.ccr-19-1900.
  103. Pollyea, D. A., Stevens, B. M., Jones, C. L., Winters, A., Pei, S., et al. (2018) Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia, *Nat. Med.*, **24**, 1859-1866, doi: 10.1038/s41591-018-0233-1.
  104. Jain, N., Keating, M., Thompson, P., Ferrajoli, A., Burger, J., et al. (2019) Ibrutinib and venetoclax for first-line treatment of CLL, *N. Engl. J. Med.*, **380**, 2095-2103, doi: 10.1056/NEJMoa1900574.
  105. Tam, C. S., Anderson, M. A., Pott, C., Agarwal, R., Handunnetti, S., et al. (2018) Ibrutinib plus venetoclax for the treatment of mantle-cell lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **378**, 1211-1223, doi: 10.1056/NEJMoa1715519.
  106. Cervantes-Gomez, F., Lamothe, B., Woyach, J. A., Wierda, W. G., Keating, M. J., Balakrishnan, K., and Gandhi, V. (2015) Pharmacological and protein profiling suggests venetoclax (ABT-199) as optimal partner with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia, *Clin. Cancer Res.*, **21**, 3705-3715, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2809.

**TARGETING Bcl-2 FAMILY PROTEINS: WHAT, WHERE, WHEN?****Review****V. V. Senichkin<sup>1</sup>, N. V. Pervushin<sup>1</sup>, A. P. Zuev<sup>1</sup>, B. Zhivotovsky<sup>1,2</sup>, and G. S. Kopeina<sup>1\*</sup>**<sup>1</sup> *Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: lirroster@gmail.com*<sup>2</sup> *Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, 17177 Stockholm, Sweden*

Received July 15, 2020

Revised July 15, 2020

Accepted August 8, 2020

Proteins of the Bcl-2 family are known as regulators of apoptosis, one of the most studied forms of programmed cell death. The Bcl-2 protein family is represented by both pro- and antiapoptotic members. Antiapoptotic proteins are often exploited by tumor cells to avoid their death, thus playing an important role in carcinogenesis and in acquisition of resistance to various therapeutic agents. Therefore, antiapoptotic proteins represent attractive targets for cancer therapy. A detailed investigation of interactions between Bcl-2 family proteins resulted in the development of highly selective inhibitors of individual antiapoptotic members. These agents are currently being actively studied at the pre-clinical and clinical stages and represent a promising therapeutic strategy, which is highlighted by approval of venetoclax, a selective inhibitor of Bcl-2, for medical use. Meanwhile, inhibition of antiapoptotic Bcl-2 family proteins has significant therapeutic potential that is yet to be revealed. In the coming era of precision medicine, a detailed study of the mechanisms responsible for the sensitivity or resistance of tumor cells to various therapeutic agents, as well as the search for the most effective combinations, is of great importance. Here, we discuss mechanisms of how the Bcl-2 family proteins function, principles of their inhibition by small molecules, success of this approach in cancer therapy, and, eventually, biochemical features that can be exploited to improve the use of Bcl-2 family inhibitors as anticancer drugs.

*Keywords:* apoptosis, Bcl-2 family, cancer therapy, BH3-mimetics