



Läkemedel mot Bcl-2 överuttryckande resistent Prostatatumörer

Shahla Abed

Examensarbete i farmaci 15 Hp
Apotekarprogrammet 300 Hp
Rapporten godkänd: VT 2015
Handledare: Gerhard Gröbner
Examinator: Erik Chorell

Sammanfattning

Introduktion Prostatacancer är en malign sjukdom som i Sverige utgör drygt 16 procent av det totala antalet cancerfall hos män. Denna maligna sjukdom orsakar förstoring av prostatakörteln, vilket i sin tur leder till tryck på urinröret och medför problem med vattenkastning. Det största problemet, vilket är huvudpoängen i denna litteraturstudie, är behandlingsresistenta prostatatumörer som uppstår efter kastrering, dvs. efter att man tidigare har haft prostatacancer och opererat bort testiklarna. Bcl-2 protein familjen som möts vid det yttre mitokondriemembranet (MOM) är orsaken till detta problem, eftersom den huvudsakliga regleringen av apoptos sker genom de pro- och anti-apoptotiska egenskaperna hos Bcl-2 proteinfamiljen. För att återställa effektiviteten av kemoterapi-behandlingen görs det därför studier i syfte att undersöka hämmandet av Bcl-2 överuttryckning i tumörcellerna. För att undkomma detta problem finns det några läkemedel och flera strategier som används. De strategier som presenteras i denna studie är baserade på användandet av Docetaxel, ABT-737 och Pim-kinasinhämmare i olika kombinationer för att hämma Bcl-2 familjens överuttryckande proteiner. I studierna har det använts kombinationsbehandlingar som har bra effekt men även monoterapier som också har hjälpt till med att hämma Bcl-2 familjen. Syftet med detta examensarbete är att hitta och se vilka läkemedel eller strategier som finns för att bekämpa behandlingsresistenta prostatatumörer med höga halter av Bcl-2.

Metod I detta examensarbete finns det sex vetenskapliga artiklar som hittades via PubMed, och användes till både resultat och diskussions del. Förutom dessa artiklar har andra relevanta internetsidor hittats via sökmotorn Google och använts i inledningen och diskussionen, men även några artiklar som skickats av handledaren har använts i inledningen.

Resultat Resultatet av de tre studierna som kombinerade Docetaxel med ABT-737, ABT-263 och Sabutoclox, var för sig, visade att Sabutoclox gav en minskad tumörstorlek, men även kombinationsbehandlingen med *Pim* hämmare SMI-4a och ABT-737 visade en minskad tumörtillväxt *in vivo*. Resultatet av kombinationsbehandlingen med Docetaxel och ABT-263 minskade uttrycket av Bcl-2 proteinet.

Diskussion Det övergripande resultatet av de valda studierna visar att kombinationsbehandlingen med de presenterade strategierna hämmar de Bcl-2 överuttryckande tumörer. Dock är detta arbete för litet för att kunna dra en sådan slutsats, därför anser jag att det behövs ett utökat underlag, men även mer tid, för att kunna säga att dessa kombinationsbehandlingar är effektiva.

Nyckelord behandlingsresistenta prostatacancer, Bcl-2 hämning, Docetaxel, ABT-737.

Innehållsförteckning

1. Introduktion.....	1
1.1 Bakgrund.....	1
1.2 Vad vet man idag?.....	1
2. Teori.....	2
2.1 Apoptos.....	2
2.2 Bcl-2-uppdelning i tre funktionella klasser.....	2
2.3 PC3, LNCaP, DU145.....	4
2.4 P53.....	4
2.5 PSA (prostata-specifik antigen).....	4
2.6 Bax och Bak.....	4
2.7 BH3 och BH3-only proteiner.....	4
2.8 Kaspaser.....	5
3 Syfte.....	5
4 Metod.....	5
5 Studier.....	7
5.1 Studie 1.....	8
5.1.1 Metod.....	8
5.1.2 Resultat.....	9
5.2 Studie 2.....	9
5.2.1 Metod.....	10
5.2.2 Resultat.....	10
5.3 Studie 3.....	10
5.3.1 Metod.....	11
5.3.2 Resultat.....	11
5.4 Studie 4.....	12
5.4.1 Metod.....	12
5.4.2 Resultat.....	13
5.5 Studie 5.....	14
5.5.1 Resultat.....	14
5.6 Studie 6.....	15
5.6.1 Metod.....	15
5.6.2 Resultat.....	15
6 Sammanfattning.....	16
7. Diskussion	17
8. Slutsats.....	21
9. Tack.....	21
10. Referenser.....	22

Förkortningar

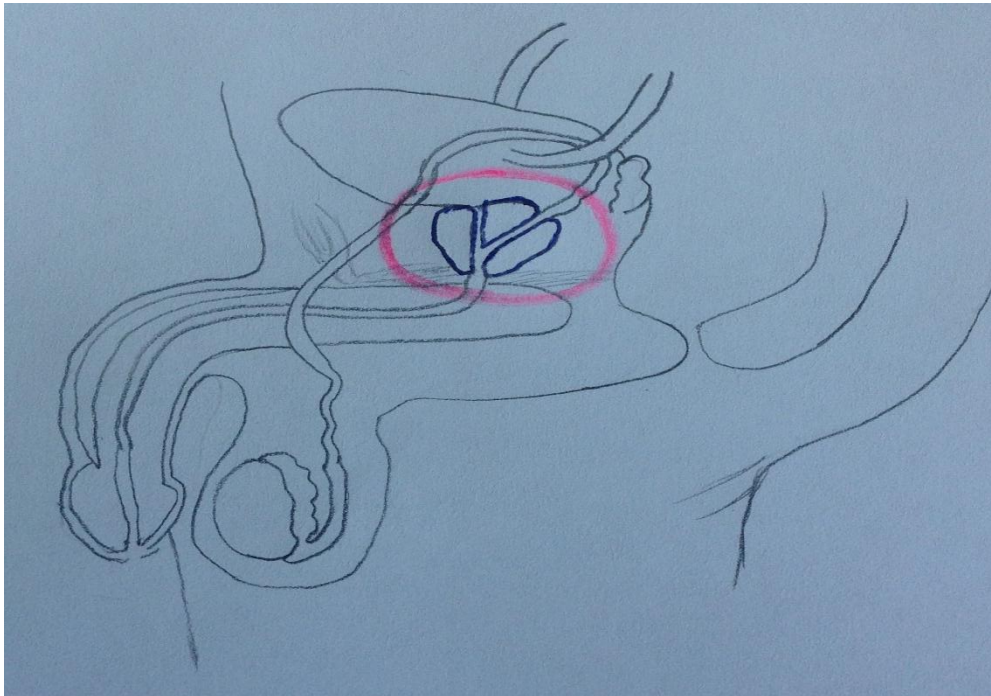
Bcl-2	B cell CLL/lymphoma 2
Bcl-XL	B cell lymphoma-extra large
Bcl-w	(BCL2L2) Bcl-2-like protein 2
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BIK	Bcl-2 interacting killer
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2-modifying factor
Mcl-1	myeloid cell leukemia sequence 1
MOM	Mitochondrial Outer Membrane
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis
BH	Bcl-2 homology
Bad	Bcl-2 associated agonist of cell death
Bak	Bcl-2 antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BBC3	Bcl-2 binding component 3
HRK	Harakiri
Gadd45	growth arrest and DNA damage-inducible gene
TRIAL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Tgfr2	transforming growth factor β receptor type II
PMAIP1 (NOXA)	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
MOMP	mitokondrietyttermembran permeabilisering
UPR	unfolded protein response
APAF1	apoptotic protease activating factor 1
HGF	hepatocyte growth factor

1. Introduktion

1.1 Bakgrund

Den vanligaste cancertypen hos män i Sverige är prostatacancer [3]. Den utgör drygt 16 procent av det totala antalet cancer [4].

Prostatan ligger under urinblåsan och runt om urinrörets övre del (fig.1), dess funktion är att bilda transportvätska innehållande ämnen som underlättar spermernas väg genom slemmet i livmoderhalsen och livmodern till ägget. Tillväxten och funktionen av prostatan är beroende av det manliga könshormonet testosteron (bildas i första hand i testiklarna). Prostatakörteln förstoras hos de flesta äldre män och är en del av det normala åldrandet, orsakerna till detta är än idag okänd. Förstoringen av prostatakörteln är inte alltid godartad vilket innebär att det ibland rör det sig om en cancertumör. Förstoringen av prostatakörteln kan orsaka tryck på urinröret och medföra problem med vattenkastning [1]. Orsakerna till prostatacancer är okända men det man vet är att testosteron, det manliga könshormonet, är utgångspunkten för uppkomsten av prostatacancer [4]



Figur 1. Figuren visar var prostatan är placerad och hur den omfamnar urinröret. Omarbetad från [24]

1.2 Vad vet man idag?

Från en klinisk synvinkel, har den ursprungliga observationen att Bcl-2 är inblandat i de första stadierna av utvecklingen av en hematologisk malignitet vidgats ut i två viktiga riktningar. Det första är att Bcl-2 visat sig uppreglas via transkription av andra mekanismer där kromosomal translokation inte är involverad och detta leder till en lång utökning av effekterna som ursprungligen observerats, utöver de hematologiska maligna kommer det att inkludera många typer av cancer. Den andra riktningen visade att inhiberingen av apoptos genom Bcl-2 inte bara var involverad i utvecklingen av cancer, utan även utvecklingen av resistens mot cancerterapi som inkluderar kemoterapi och radioterapi. Läkemedel som stör Bcl-2 visade sig vara ett viktigt sätt för att förbättra konventionell cancerbehandling genom att öppna en angrepps-väg med hjälp av läkemedel. Denna idé har nyligen utvidgats då cancerceller är beroende av Bcl-2 proteinernas närvaro även vid

frånvaron av exponering vid kemoterapi. Det nya konceptet bygger på idén om att utvecklingen av själva canceren leder till att cellen genererar apoptotiska signaler som måste neutraliseras, därför skulle reduktionen/borttagningen av Bcl-2 anti-apoptotiska signaleringen göra en syntetisk dödlighet som dödar övervägande cancerceller istället för normala celler, som inte engagerar apoptotiska signaler automatiskt. Dessa fynd har motiverat utbredda försök att hitta läkemedel som hämmar Bcl-2 proteiner [5].

2. Teori

2.1 Apoptos

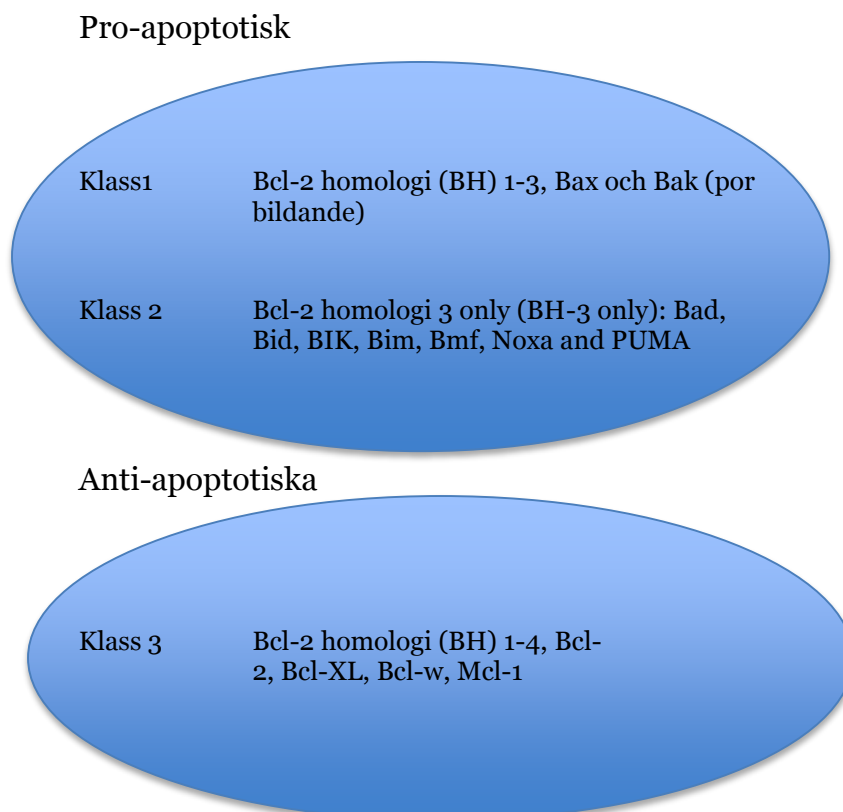
Cancertumörer uppstår vid en cellskada, då cellen inte klarar av att reparera den skada som uppstått i sin arvs massa. Cellen kan därför tappa sin förmåga att kontrollera delning och tillväxt samtidigt som "gamla" celler inte dör när deras tid är ute. I vanliga fall dör "gamla" celler genom apoptos (programmerad celldöd) för att det ska bli jämvikt i cellmängden [1]. Det centrala i celldöd är mitokondrier som svarar på intern stress signaler. Regleringen av detta sker huvudsakligen genom pro- och anti-apoptotiska B-cells CCL/lymfom-2 (Bcl-2) en proteinfamilj som möts vid MOM. Där görs ett beslut om liv eller död. Det sker en membran permeabilisering och det frisläpps apoptotiska faktorer som cytokrom c vid en signal om död [2]. Vid misslyckandet av denna reglering utlöses allvarliga patologiska störningar som leder till onormal utveckling och därmed cancer bildning. Det finns förutom den yttre vägen, en inre väg (mitokondrie vägen) där en aktiv involvering i att initiera celldöd av mitokondrier sker vid igenkänning av intracellulär stress. Frisättning av cytokrom c och andra apoptotiska faktorer i cytosolen sker då MOM måste genomgå en permeabilisering under denna process. Processen av denna permeabilisering regleras hårt av Bcl-2 proteinfamiljen, dessutom meddelas en signal om liv eller död (genom permeabiliseringen) av pro- och anti apoptotiska medlemmar av denna familj som möts på MOM [2].

För att förstå apoptos är det viktigt att veta att det styrs av två olika nätverk, där det första nätverket är den temporala sekvensen för apoptos som delas in i tre faser. Den första fasen är den inledande fasen där signalmolekyler binder till dödsreceptorer på ytan av celler med intracellulär stress (den yttre vägen). Den andra fasen är den reglerande fasen då summan av alla dessa signaler är integrerade för att avgöra om det har uppstått tillräckligt med skador för att motivera att cellen genomgår apoptos. I den tredje fasen, besluts fasen, görs ett beslut om apoptos där aktivering av proteaser som kallas kaspaser sker och då klyvs specifika substrat i cellen, vilket resulterar i slut fenotypen av apoptotiska celler som uppslukas med sina grannar [5].

2.2 Bcl-2 uppdelningen i tre funktionella klasser

Som det har nämnts ovan är det första nätverket den temporala sekvensen för apoptos, det andra nätverket däremot består av tre separata klasser av Bcl-2 familjemedlemmar. Den första klassen består av de pro-apoptotiska familjemedlemmarna som är indelade i två ytterligare klasser, Bax (Bcl-2-associerat X protein) och Bak (Bcl-2-antagonist) som i sin tur innehåller BH regionerna 1-3 och en annan klass som betecknas som BH-bara proteiner (eng: BH-3 only proteins, kommer i fortsättningen att skrivas som den engelska benämningen) som i sin tur innehåller Bad, Bid, BIK, Bmf, Noxa och Puma (figur 2). Bax och Bak familjemedlemmarna har en avgörande betydelse i regleringsfasen då de vid aktivering förändras från att vara monomerer till oligomerer som stör integriteten av den så kallade mitokondrieyttre membran permeabilisering (MOMP) processen. Från mitokondriens inter membranutrymme in i cytoplasman orsakar MOMP processen läckage av komponenter som cytokrom c, vid utsläppet integrerar den med adapter protein APAF1. APAF1 bildar ett komplex som binder till och därigenom aktiverar kaspas proteaser som i genomförandefasen bryter intracellulär substrat. Det huvudsakliga i apoptos regleringen och de strukturella förändringarna som inträffar i dessa proteiner medieras av MOMP genom aktiveringen av Bax och Bak [5].

De faktorer som känner igen cellskador och som direkt eller indirekt aktiverar Bak/Bax och får de att oligomeriseras är BH₃-only proteiner. Det finns flera olika BH₃-only familjemedlemmar (se fig.2) som måste igenkännas och som motsvarar olika typer av cellulär stress. Hos de normala cellerna som inte genomgår stress leder dessa BH₃-only familjemedlemmar proteinerna till att antingen vara frånvarande varvid de måste transkription uppregleras, såsom PUMA och Noxa (PMAIP1), eller vara i ett inaktivt tillstånd och då måste aktiveras av olika post-translation mekanismer inklusive fosforylering (ex. BAD), klyvning (ex. BID) eller re-lokalisering inom cellerna (ex. Bim, BCL2L11) och BMF. Därför är BH₃-only proteinerna delaktiga i både igenkännings fasen av apoptos och i inledandet av regleringsfasen. Den först upptäckta klassen av Bcl-2-proteiner är den tredje klassen vilka innehåller BH regionerna 1-4, se fig. 2. Bcl-2 proteinerna i den tredje klassen hämmar effekterna av BH₃-only proteiner efter att apoptos initierats det vill säga oligomeriseringen av de aktiverade Bax och Bak [5].



Figur 2. Figuren visar de tre olika klasserna av Bcl-2 familj proteinet, BH₃ only proteinerna (Bid, Bad, BIK, Bim, Bmf, Noxa och PUMA) som samarbetar med de antiapoptotiska Bcl-2 familj proteinerna (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1) för att minska hämningen av Bax och Bak (klass 1) och aktivera dem. Aktivering av Bax och Bak medför oligomerisering vilket leder till mitokondriell yttre membran permeabilisering (MOMP).

En procentandel av cellerna uppvisar motstånd mot strålning, vilket innebär att cellerna är resistenta mot strålning. Apoptos uppstår vid strålning som inducerar oxidativ stress och det uppstår DNA-skador. Det har visats att över-uttryckningen av Bcl-2 är inblandad i strålningsresistensen och att Bcl-2 efter bestrålning inducerar lymfoceller ett starkt klonogen överlevnad [6].

Att angripa mitokondrie-medierad apoptos skulle kunna underlätta kemoterapi och strålbehandlingens cytotoxiska effekter. De tumörer som är resistenta mot apoptos av strålbehandling/kemoterapi kan överleva och leda till ytterligare genetisk instabilitet pga.

onormalt över-uttryck av Bcl-2 gruppens proteiner. Det finns därför flera strategier för att angripa antiapoptotiska Bcl-2 proteiner [6].

2.3 PC3, LNCaP och DU145

Prostatacancer har studerats i många publicerade artiklar med hjälp av olika modeller med etablerade cellinjer som kommer från metastatiska humana donatorer och ¹graft modeller men även från genetiskt modifierade musmodeller för prostatacancer. Cellinjer har bland dessa modeller länge varit de mest använda modellerna. De två vanligaste cellinjerna som används vid studier är LNCaP och PC3-celler som härstammar från både lymfkörteln och benmetastaser. Det har, genom studier, väl bevisats att LNCaP celler uttrycker AR (androgenreceptor) och PSA (prostata-specifik antigen) som är androgenberoende (beroende av manlig könshormon) med relativt trögt biologiskt beteende. Däremot uttrycker inte PC3 celler AR och PSA, och är inte androgenberoende, istället visar den ett mycket aggressivt beteende. Dessa två cellinjer har under många år använts av forskare för att representera olika spektrum av prostatacancer med PC3 som den aggressiva formen och LNCaP som den tröga formen av prostatacancer [8].

En annan human prostatacancer cell är DU145 (härstammar från metastaser i hjärnan) som också är en klassisk och allmänt använd prostatacancer cellinje. DU145 är tillskillnad från PC3 inte hormonkänslig och uttrycker inte detekterbara nivåer av prostata-specifikt antigen (PSA) [9].

2.4 P53

P53 är en viktig tumörsuppressorgen som inaktiveras av human cancer. Denna tumörsuppressorgen fungerar som en kontroll av cellcykeln genom en direkt aktivering av generna WAF1 och GADD45. Mottagningen av apoptotiska signaler av celler ökar om p53 binder till Bax promotorn och sätter igång dess uttryck, ökningen av Bax uttrycket inhiberar i sin tur uttrycket av Bcl-2, som sätts igång av P53 [13].

2.5 PSA (prostata-specifik antigen)

Det är ett enzym, äggviteämne som finns naturligt i kroppen och produceras i prostatans så kallade körtelceller, och återfinns speciellt mycket i sädesvätskan. Halten av PSA mäts med ett vanligt blodprov (som tas i armvecket), då en del av det PSA som tillverkas kommer ut i blodet. PSA finns även i friska mäns blod och brukar betraktas som normalt om mängden är under tre mikrogram/liter [4].

2.6 Bax och Bak

Bax och Bak är pro-apoptotiska Bcl-2 proteiner som förmedlar permeabilisering av det mitokondriella yttre membranet under apoptos. Bax och Bak bildar enligt de nuvarande modeller porer vid MOM som har ansvaret att frisläppa cytokrom c och andra större mitokondriella apoptotiska faktorer [15].

2.7 BH3 och BH3-only proteiner

BH3 - only medlemmar hör till Bcl-2 intracellulära protein familjen och består av Bim, Bmf, Bik, Bad, Bud, Puma och Noxa, vilka förmedlar både inducerade och utvecklings programmerade cytotoxiska signaler. Dödssignalerna engagerar pro-överlevande Bcl-2 liknande proteiner att inaktivera deras funktion vid aktivering. Pro- överlevande proteiner binds av Bim och Puma, medan de andra såsom Noxa och Bad uppvisar dödande genom att engagera distinkta undergrupper [16].

¹ I denna modell transplanteras humana tumörceller in i möss, antingen i huden eller i det organ där tumören har sitt ursprung, mössen är immunsupprimerade.

2.8 Kaspaser

Kaspaser är en grupp intracellulära proteaser som ansvarar för en medveten isärtagning av cellen i apoptotiska kroppar under apoptos. Kaspaserna finns inaktiva som pro-enzym och aktiveras genom en proteolytisk klyvning. De Kaspaser som finns belägna vid den centrala korsningen i apoptosreaktionsvägar är kaspas 3, 8 och 9. Kaspas 8:s funktion är att initiera demonteringen som svar på de extracellulära apoptosframkallande liganderna men även att aktiveras i ett komplex som är associerat med cytoplasmas dödsdomän bland många cellytereceptorer för ligander. Som svar på ämnen och stress, som orsakas av utsöndringen av cytokrom c från mitokondrien, aktiveras demonteringen av kaspas 9. Kaspas 9 aktiveras vid komplex apoptotiska proteas aktiverande faktor 1 och vid extra mitokondriell cytokrom c. Kaspas 8 och 9 initieringssignaler tros förstärkas av kaspas 3. Kaspas 3 i sin tur aktiveras av kaspas 8 och 9 genom en proteolytisk klyvning som därefter klyver kaspas 3 vitala cellulära proteiner eller andra kaspaser [19].

3. Syfte

Återinsjuknandet i prostatacancer, efter kastrering, orsakar behandlingsresistens mot kemoterapi och andra anti-cancer medel, till exempel Docetaxel. Detta problem orsakas av över-uttryckningen av Bcl-2 familjproteiner i prostatatumörer varför det anses att detta kan övervinnas genom att hämma över-uttryckningen av dessa Bcl-2 familjproteiner.

Syftet med denna litteraturstudie är att hitta läkemedel eller strategier för att bekämpa behandlingsresistenta prostatatumörer med höga Bcl-2 halter och se effektiviteten av deras funktion.

4. Metod

Detta arbete är en litteraturstudie där information söktes via databasen PubMed för att hitta studier valda för att presenteras i detta examensarbete. Arbetet är baserat på 6 artiklar varav 2 originalartiklar. Artiklarna söktes under perioden 150203- 150225. De avgränsningar som gjordes i PubMed är *Free fulltext, human, 5 years* se tabell 1. Avgränsningen *Free fulltext* gjordes för att tillgängliggöra hela studien, då detta inte var lätt innan avgränsningen. Avgränsningen *last 5 years* gjordes för att få fram de senast undersökta studierna, och tanken med *human* avgränsningen var att få fram läkemedel testade på människor, dock fanns det inte många studier gjorda på människor som på humana cellinjer och djur. De artiklar som valdes bort i den här litteraturstudien handlade om andra typer av cancer som t.ex. bröstcancer eller lungcancer.

Tabell 1. Tabellen visar sökorden och begränsningarna som gjorde vid sökning av studier i PubMed.

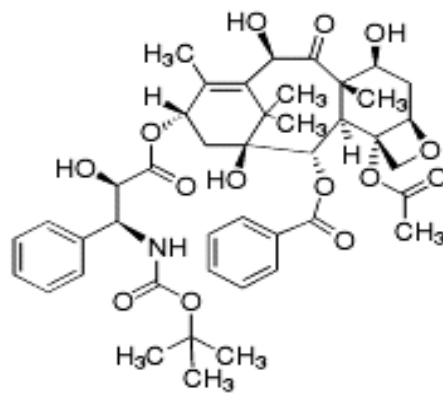
Sökord	Begränsningar	Antal (träff) artiklar	Använda artiklar	Referens
Bcl-2 prostate		1644	-	-
Docetaxel prostate		2064	-	-
Bcl-2 family inhibition prostate cancer	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	62	1	[7]
Docetaxel Bcl-2	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	32	2	[10] [11]
gossypol prostata	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	14	1	[21]
pim kinase inhibitor with abt-737	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	1	1	[12]
Abt-737	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	25	-	-
Abt-737 inhibitor	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	9	-	-
Bcl-2 inhibitor abt 737	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	200	-	-
ABT-737 targets selective Bcl-2	Free fulltext+ Published in the last 5 years + humans	7	1	[14]

5. Studier

De sex valda studierna nedan presenterar två strategier med olika kombinationer för att minska antalet Bcl-2 överuttryckande proteiner. Studierna inleds först med en kortfattad information om vardera strategin.

Docetaxel

Docetaxel (DTX) är ett godkänt läkemedel i Sverige sedan 2012 [22] och det godkända indikationen i FASS är riktat mot bröstcancer [23]. DTX är även ett användbart kemoterapeutisk läkemedel för behandling av återkommande prostatacancer, och är dessutom känd som mikrotunulus stabilisator och är förstahands medel för prostatacancer behandling [10]. Det har dock haft ett terapeutiskt hinder då maligna celler ofta förvärvar DTX motstånd. Man söker därför effektiva metoder för att övervinna detta motstånd [7].



Figur 3. Figuren visar den kemiska bilden av docetaxel [23].

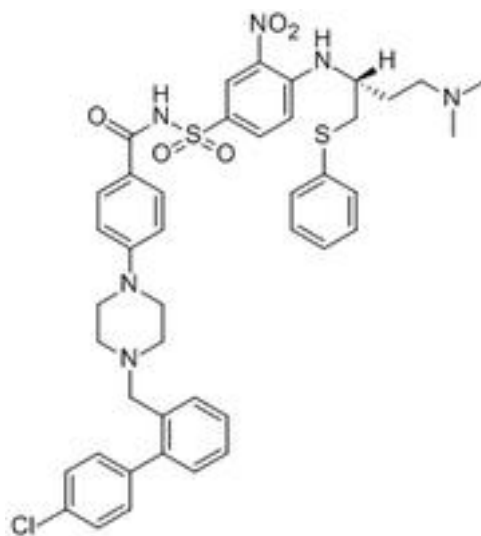
Pim kinase inhibitor och ABT-737

Pim kinaser tillhör familjen av serin treonin-proteinkinaser och är enzymer som är överuttryckta i human prostatacancer. De spelar en kritisk roll i tillväxten och utvecklingen av human prostatacancer, och orsakar även terapeutiskt motstånd. ²Perineural återfall av prostatakörteln är associerad med förhöjda nivåer av kärn Pim-2 i tumörceller som ger en högre risk för prostata-specifikt antigen (PSA). Det har tidigare rapporterats att uttrycket av Pim-1 i prostatacancer ger en tillväxtfördel för tumörcellerna. Detta ger en betydligt större risk för patienter med höga nivåer av Pim-1 uttryckning i prostata att utveckla metastatisk cancer. Undersökningen hos djur med överuttryckt av ³c-Myc-protein i prostata leder till neoplasi och är förknippad med ökningen av Pim proteinkinasnivåer. Genom studier har man kunnat se att Pim proteinkinaser kan vara målet för hämning av tillväxten av prostatacancer [12].

ABT-737 är potenta, nya Bcl-2 familjeprotein hämmare som är kritiska för cellöverlevnad. De har en hög affinitet mot Bcl-xl, Bcl-2 och Bcl-w men har ingen affinitet mot BCL-B, Mcl-1 och A1 som är mindre homologa proteiner [17].

² Perineural återfall innebär att cancerceller är omgivna eller spårade längs en nervfiber i prostatan vilket innebär en större chans för spridning av cancer utanför prostatan finns. I vissa fall kan perineural återfall påverka effekten av cancerbehandlingen.

³ c-Myc är en förmodad transkriptionell modulator av NOXA mRNA.



Figur 4. Figuren visar den kemiska strukturen för ABT-737.

5.1 Studie 1

“Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to Docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition” [7]

Det induceras apoptos i cancerceller främst genom två stora vägar, de yttre och de inre vägarna i cellerna. Det ges en dödssignal genom den frisläppta cytokrom c via den mitokondriell apoptotiska vägen, genom relaterande apoptos inducerande ligand (TRAIL), fast-ligand (FasL) och tumörnekrosfaktor (TNF), vilket leder till aktiveringen av kaspas-8 i cancercellerna. Cytostatika och hög dos strålning däremot skadar DNA och mitokondrier och resulterar i aktiveringen av ”inneboende” kaspas-9-medierad apoptotiska vägen.

Såsom det har nämnts tidigare i texten, spelar Bcl-2 familjen en avgörande roll i det mitokondrier-medierade apoptosen. Dessa anti-apoptotiska proteiner inkluderar Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w och Mcl-1 och hämmar celledöd både genom att binda de anti-apoptotiska proteinerna Bax och Bak och förhindra deras oligomerisering. Eftersom över-uttryckandet av Bcl-2 proteiner skyddar cancerceller från apoptos och medför terapiresistens är inhiberingen av Bcl-2/Bcl-Xl en hypotes om att ha en potentierad effekt av kemoterapi, därför har många Bcl-2 familj hämmare utvecklats. ABT-373 är ett exempel på en lågmolekylär hämmare av Bcl-2, Bcl-Xl och Bcl-w. ABT-263 (Navitoclax) är klinisk tillgänglig med samma specificitet som ABT-737 och är en oralt bio-tillgänglig hämmare. ABT-199 är däremot en ny oral biotillgänglig hämmare som hämmar både Bcl-2 och Bcl-w, men inte Bcl-Xl [7].

5.1.1 Metod

I denna studie har man undersökt effekten av kombinationen mellan DTX och Bcl-2 familj hämmare i tre humana prostatacancer cellinjer som PC3, LNCap och DU145 celler. Dessa tre cancer cellinjer bevarades i RMI 1640 medium (Sigma- Aldrich, st Louis, MO, USA) som kompletterades med 10 % fetalt bovint serum (Sigma- Aldrich) dessutom 20 µg/mL gentamicin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) och lades i en fuktig atmosfär som innehåller 5 % CO₂ vid 37 °C. Det användes även prostata epitel cellinjer, ABT-263, ABT-737

och ABT-199 som späddes i etanol och sedan i PBS med 5 % etanol [7].

Försöksmössen (BALB nu/nu) bevarades under patogenfria förhållanden och det gjordes alla ansträngningar för att minimera lidandet. Mössen delades upp i fyra grupper och de PC3 bärande mössen behandlades med DTX och/eller ABT-737 eller ABT-263 [7]

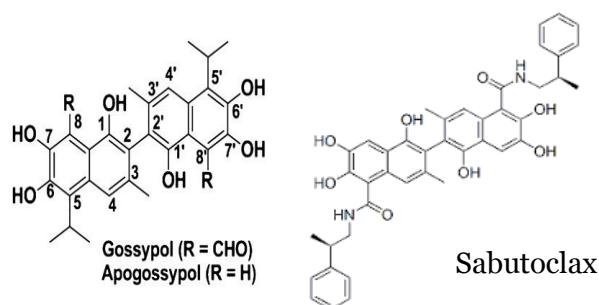
5.1.2 Resultat

Införandet av ABT-263 i kombination med DTX (Bcl-2 familjeinhibitor) i PC3-celler minskade Bcl-2 och Bcl-xl uttrycket. Selektiv knockdown av Bcl-2 har en tendens att minska cellens livskraft, men PC3-cellers livskraft minskades signifikant av Bcl-xl knockdown i närvaro av låg dos DTX. Resultaten av de som behandlats med låg dos DTX tyder på att den förstärkta anti-tumöreffekten som induceras av ABT-263 i PC3-celler främst beror på hämningen av Bcl-XL. DTX kombinationen med ABT-199 gav inte lika bra effekt som med ABT-263. Kombinationen av ABT-737 med DTX minskade synergiskt PC3 cellernas livskraft, i samma utsträckning som med ABT-263. Senare efter flera doseringsförsök gav DTX och ABT-737 kombinationsbehandlingen en signifikant minskning av tumörtillväxt, jämfört med de andra grupper som behandlades med endast ett av läkemedlen [7].

5.2 Studie 2

”Sabutoclax, a Mcl-1 Antagonist, Inhibits Tumorigenesis in Transgenic Mouse and Human Xenograft Models of Prostate Cancer ” [10]

Den här studien beskriver utvecklingen av den nyligen beskrivna prostata adenokarcinom (samlingsnamn för cancer i körtelvävnad) modellen som har ett knockout av Tgfbr2 i stromala fibroblastiska celler⁴. Överuttryckande Mcl-1 är ofta associerat med avancerad human prostatacancer. Nyckelmekanismen som leder till undvikandet av mitokondriellberoende apoptos av cancerceller är det förhöjda överuttryckandet av Bcl-2 protein familjen. Enligt denna studie har tidigare studier visat att Gossypol, den naturliga produkten, är en potent hämmare av Bcl-2, Bcl-XL och Mcl-1. Den här naturliga produkten fungerar som BH3 härmare. Det förväntades att Gossypol skulle vara giftig pga. av de två reaktiva aldehydgrupperna och därmed elimineras och leda till substansen apogossypol. Det gjordes ytterligare modifieringar på apogossypol substansen för potensökningen *in vitro* mot Bcl-2 protein familjen. Sabutoclax SBX (även känd som BI-97C1) användes för att inhibera prostatatumörprogressionen. Dessutom användes det flera olika cellinjer för att specifikt undersöka ett senare skede av sjukdomen som kan leda till kastrationsresistens Docetaxel-motstånd och benmetastaser [10].



Figur 5: visar strukturformen för sabutoclax, gossypol och apogossypol.

⁴ Stromala fibroblaster är cellulära komponenter i mikrotumörer som stöder tumörepitelets tillväxt och ger terapeutiskt motstånd.

5.2.1 Metod

Det genomfördes en *in vivo* effektstudie för Sabutoclastax och Docetaxel var för sig och i kombination. Dessa injicerades subkutant i den bakre flanken av manliga atymiska möss av implantera PC3-celler, med användning av 100 µl av en 50:50 lösning av Matrigel och RPMI-1640 medier. Mössen övervakades tills medeltumörvolymen nådde 150-200 mm³ och fördelades i grupper om sex djur i varje grupp. Det doserades 2,5 eller 10 mg/kg Sabutoclastax intravenöst tre gånger per vecka. Docetaxel däremot administrerades vid 12,5 mg/kg en gång per vecka. Därefter mättes tumörvolymen i två dimensioner. Det har använts flera modeller i denna studie för att testa Sabutoclastax i sena stadier av prostatacancer [10].

Här användes Chou-Talalay metoden för synergianalys för att utvärdera möjligheterna av pan-aktiva Bcl-2 hämmaren sabutoclastax att samverka med docetaxel för behandling av prostatacancer. Modellen kan ta hänsyn till olikformiga dos-responskurvor. Det användes dos-responskurva för att identifiera ED₅₀ och ED₉₀-värden för varje läkemedel för sig och i kombination [10].

5.2.2 Resultat

Denna studie visade en signifikant skillnad i tumörstorlek som observerades mellan docetaxel och sabutoclastax var för sig och i kombination av dessa läkemedel, docetaxel och sabutoclastax ($p < 0,0001$). Kombinationsbehandlingen sabutoclastax och docetaxel (observerade *in vivo* och *in vitro*) etablerade sabutoclastax som ett effektivt läkemedel i kombination med docetaxel [10].

5.3 Studie 3

”Randomized phase II trial of Docetaxel plus Prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer” [11]

Denna studie är en randomiserad, dubbelblind och placebokontrollerad fas II studie av Docetaxel och Prednisone i kombination med placebo eller AT-101 (AT-101 är en liten molekyl som hämmar Bcl-2 protein familjen) och behandlings effekten av deras kombination utvärderades. I metastaserad kastreringsresistent prostatacancer (mCRPC) är denna molekyl aktiv både ensam och i kombination med docetaxel (taxotere) och prednison. Studien jämförde Docetaxel och Prednisone i kombination med antingen AT-101 eller placebo på kemoterapinaiva mCRPC. Förstahands kemoterapi för metastaserad kastreringsresistent prostatacancer (mCRPC) är docetaxel och prednison var 3:e vecka, men medianöverlevnaden förlängdes till knappt 19 månader och 18,6 % uppnådde tre års livsförlängning. Den kemoterapeutiska plattformen som används är Docetaxel för att utveckla kombinationsbehandlingar med nya biologiska läkemedel, vilket är målet för många studier. Apoptos dysreglering och uppreglering av det så kallade *prosurvival* (pro-överlevande) av Bcl-2 familjen tycks i allmänhet vara viktiga i patogenesen av hormonresistent prostatacancer (CRPC). Utvidgningen av de anti-apoptotiska molekylerna Bcl-2, Bcl-W, Bcl-XL och Mcl-1 tycks vara förknippade med androgen-oberoende och deras hämning av uttryck kan sensibilisera till kemoterapi. Gossypols vänsterdrivande enantiomer kallas At-101 (R(-) – gossypol ättiksyra) som är en BH₃ mimetika med submicromolar affinitet som har visats inhibera⁵ heterodimerise av Bcl-2 eller Bcl-XL med återföljande kaspas- beroende apoptos till pro-apoptotiska BH₃ familjemedlemmar (Bak och Bax). AT-101 har i nyare studier indikerat inducering av pro-apoptotiska Noxa och Puma oberoende av p53 men kan även hämma angiogenes och har då en additiv aktivitet med kemoterapi och docetaxel mot prostatacancer.

⁵ Inom biokemi, innebär det en makromolekylärt komplex som bildas genom två makromolekyler såsom nukleinsyror eller proteiner. Det är en kvartär struktur hos proteiner.

Preliminära bevis för aktiviteten av AT-101 har visats av fas-II studier vid administrering en gång dagligen under 21-28 dagars schema, då det har visats att 2 av 23 patienter med mCRPC uppvisade en $\geq 50\%$ minskad nivå av prostataspecifik antigen (PSA) [11].

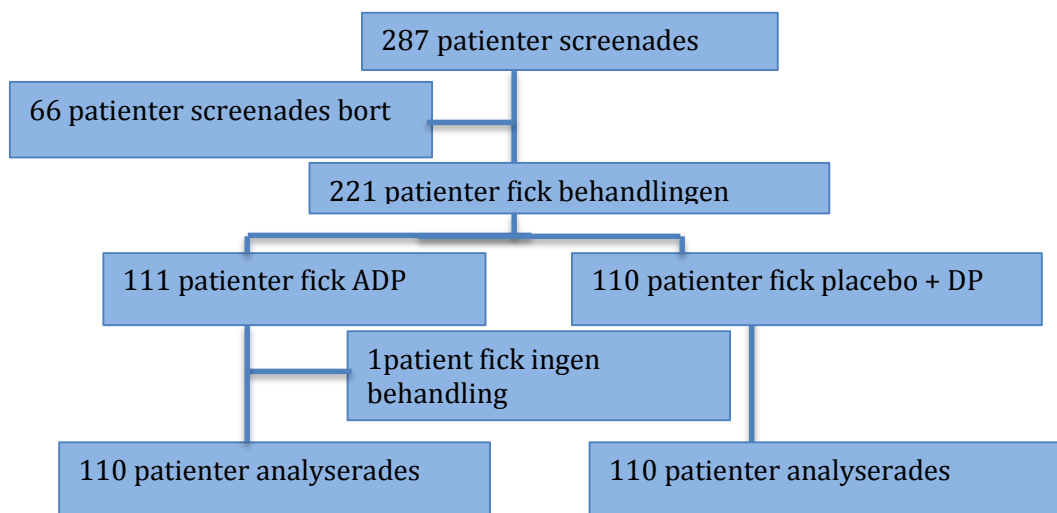
5.3.1 Metod

De som inkluderades i studien var män med metastaserade adenokarcinom i prostata med utveckling av sjukdomen (trots kvalificerad tillbakadragande av androgendeprivation och antiandrogen). Patienter som inkluderades i studien var de med progressiv sjukdom med RECIST, skelettscintigrafi (man ska ha fått ≥ 2 nya skador) eller ha stigande PSA (man ska ha ökande halter två på varandra följande bedömningar under en eller flera veckors mellanrum) med PSA ≥ 2 ng/ml vid sista provtagningen. Det krävdes även serum testosteron nivå ≤ 50 ng/dl och mer än eller lika med två Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performans status (PS) för att få delta i studien [11].

I samband de olika administreringssätt, tillsattes en cykel av 75 mg/m^2 ⁶(kroppsyta = vikt x 0.425 x längd x 0.725 x 0.007184) intravenös docetaxel (Taxotere) i över en timme första dagen tillsammans med 5 mg oralt prednison två gånger dagligen med antingen AT-101 40 mg eller placebo oralt två gånger dagligen de tre första dagarna, var 21:a dag. AT-101 gavs i 10-mg tablettform (med omedelbar frisättning) varje dag vid samma tidpunkt på fastande mage. Det tilläts ett års terapi med maximal 17 cykler såvida inte oacceptabel toxicitet eller sjukdomsprogression förekom. Det gjordes dosförändringar och förseningar, efter behov, av Docetaxel och AT-101/placebo beroende på behandlingsrelaterande toxicitet. För att tillåta upplösningen av toxicitet fördröjdes behandlingen med AT-101/placebo och Docetaxel upp till två veckor. Dosnivåerna 1 och 2 av AT-101 var 20 respektive 30 mg två gånger dagligen på de tre första cykeldagarna. Det var tillåtet med dosreduktion av Docetaxel med 15 mg/m^2 för vardera två nivåer [11].

5.3.2 Resultat

Av 287 män, totalt 221 följdes upp från november 2007 till april 2009 varav 110 patienter valdes i varje grupp, en av patienterna togs ut från studien då han inte hade följt upp sin behandling (se figur 6). I början av studien screenades 66 patienter bort eftersom de inte uppfyllde inkluderingskriterierna [11], som har nämnts under *Metod* rubriken ovan.



Figur 6. Consort diagrammet visar hur många patienter som ingick i varje gren av diagrammet. Omarbetad från [11].

⁶ Längd i cm, vikt i kg, kroppsyta i m^2 .

Källa: Du Bois D, Du Bois EF. Arch Intern Med 1916;17:863.

De som överlevde i den första slutpunkten (vänster grenen i consort diagrammet) var inte statistiskt olika för AT-101 plus Docetaxel–Prednisone (ADP). Medianen hos de totalt överlevda (OS, övergripande överlevnadsgrad eng. overall survival OS) är 18,1 kontra 17,8 månader och HR (hazard ratio) 1,07, 95 % konfidensintervall (CI) 0,73 - 1,55, P= 0,63). PFS (progression-free survival) medianen var också likadan i båda grenarna (11,0 jämfört med 10,3, HR 0,88, 95 % CI 0,63 - 1,22, P = 0,53). Hos 66% av de ADP-behandlade patienterna sågs en PSA minskning på $\geq 30\%$ jämfört med 54% av kontrollerna (p = 0,099) och en bekräftad PSA minskning på $\geq 50\%$ märktes hos 54% av ADP patienterna i jämförelse med 46% hos kontrollpatienter (P = 0,28). Slutsatsen är att ADP i den första slutpunkten gynnade, numeriskt, medianen av de totalt överlevda (OS), men även för andra slutpunkter (höger grenen i consort diagrammet) [11].

Biverkningar av $\frac{3}{4}$ graden som inträffades med högre incidens i ADP grenen jämfört med placebo var lymfopeni (lågt antal lymfocyter i blodet) (23% mot 16%), neutropeni (brist på neutrofila granulocyter i blodet) (47% mot 40%), ileus (tarmvred: obstruktionsileus eller mekaniskt i. tarmvred orsakat av förhindrad tarmpassage) (2% mot 0%) och lungemboli (6% mot 2%) [11].

5.4 Studie 4

”Pim kinase inhibitors sensitize prostate cancer cells to apoptosis triggered by Bcl-2 family inhibitor ABT-737” [12]

I denna studie har man undersökt kooperativa effekter av Pim kinasinhibitor med ABT-737, som är en liten antagonistisk molekyl mot Bcl-2 familjemedlemmar. Det upptäcktes att ABT-737 tillägg till PIM-hämmare gav en kraftig apoptos av prostatacancer celler *in vitro* och *in vivo*. Bcl-2 familjemedlemmen, Mcl-1, nivåer minskades av Pim inhibitorer både genom blockering av 75'-cap beroende translation och minskning av protein halveringstiden. Få RNA-medierad knockdown av Pim kinaser i LNCaP-celler ökade nivåerna av BH3 proteinet Noxa genom aktiveringen av ⁸UPR (eng. unfolded protein response). De återstående nivåerna av Mcl-1 proteinaktiviteten inaktiverades då Noxa nivåerna ökades. Eftersom ABT-737 inte hämmade Mcl-1 proteinaktiviteten och övertryck av Mcl-1 blockerade den apoptotiska aktiviteten av ABT-737. Resultatet av denna studie tyder därför på att det kan utvecklas en potentiell behandling för human prostatacancer med denna kombinationsbehandling [12].

5.4.1 Metod

Prostatatumör i xenografter gavs i flankerna av de manliga mössen genom injektion av LNCaP-celler. En vecka efter då tumören hade växt till minst 100 mm³, mössen delades in slumpvis i fyra olika behandlingsgrupper. Sex möss i grupp 1 med endast en vehikel (30% propylenglykol, 5% Tween-80, 65% av 5% dextros i vatten, pH 4-5). Grupp två med 12 möss, 60 mg/kg SMI-4A två gånger varje dag. Sex möss i grupp 3 som gavs 50 mg/kg ABT-737 en gång om dagen och i grupp 4 (två möss) gavs en kombinationsbehandling med SMI-4a (BID) och ABT-737 (QD). Mössen fick SMI-4a genom muntlig gavage (tvångsmatning med hjälp av en slang in i magsäcken genom munnen) och/eller intraperitoneal injektion av ABT-737. Behandlingen började efter åtta dagar och administrerades 5 dagar i veckan under tre veckor. Mätningar av de subkutana tumörerna mättes två gånger varje vecka. SMI-4a molekylen som användes är en Pim kinashämmare [12].

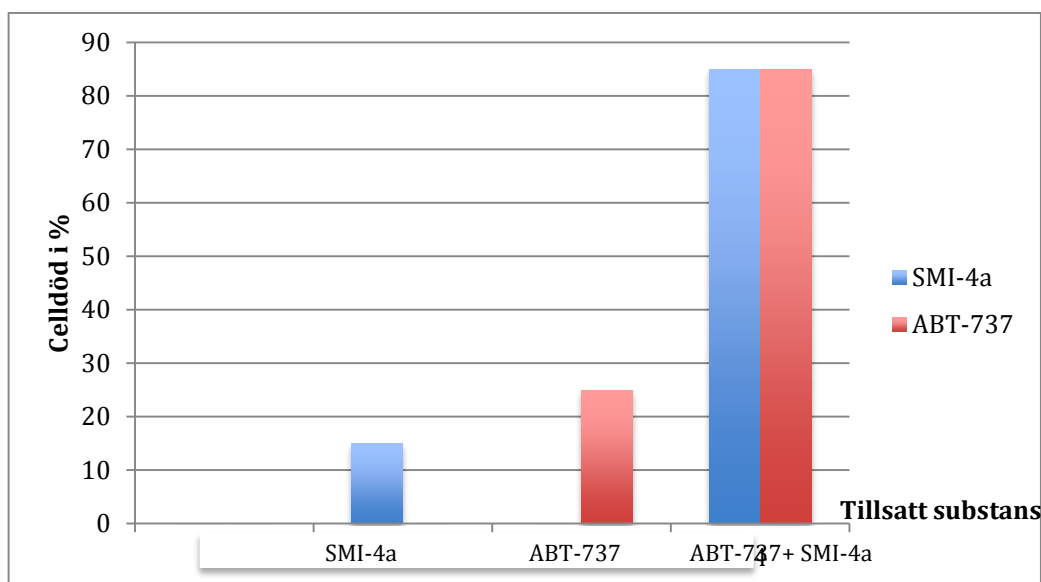
⁷ 5'-cap translation sker när speciealla proteiner binder till 5'end av mRNA-sekvensen för initieringen av translationen i ribosom.

⁸ UPR är en adaptiv signalerings väg. Den sekretoriska vägen säkerställer biogenesen av proteiner som utsöndras eller är membranbundna i den extracellulära miljön och kan styra sin egen homeosats genom UPR.

5.4.2 Resultat

ABT-737 och Pim hämmare, SMI-4a, hämmar tumörtillväxten *in vivo*.

Prostatacancer behandlingen undersöktes med Pim-hämmare SMI-4a, ABT-737 eller kombination av dessa, gjordes *in vivo* genom en tumör xenograftmodell i möss bärande LNCaP prostatatumör. Resultatet visade att kombinationsbehandlingen gav en signifikant undertryckning av tumörtillväxten och det verkade även öka de klyvda kaspas-3 nivåerna, medan pim-hämmare och ABT-737 ensamt inte visade någon skillnad (fig.7). Behandlingen ensamt med SMI-4a visade markant ned-reglering av Mcl-1 expression, genom immunohistokemisk (att med hjälp av antikroppar påvisa förekomst av viss molekyl eller visst protein) färgning av tumörvävnader. Däremot visades det en ökning av Mcl-1 expression vid behandling med endast ABT-737. ⁹Western blot analys visade i tumörprover att kombinationsbehandlingen med ABT-737 och SMI-4a minskade Mcl-1 och ökade Noxa och detta förknippades med ökade nivåer av apoptos markörer. Resultaten av dessa *in vivo* studier stöder tanken att en Pim-hämmare kan säkert synergiskt kombineras med ABT-737 [12].



Figur 7. Figuren visar behandlingen med SMI-4a och ABT-737 ensamt och i kombination i LNCaP. Omarbetad från [12].

Apoptos inducering genom hämning av Bcl-2 proteiner med kombinationsbehandlingen ABT-737 och SMI-4a

Kombinationsbehandlingen har granskats med en liten BH3 mimetisk molekyl, ABT-737, och en Pim-hämmare, SMI-4a, för att förhoppningsvis förbättra den apoptotiska responsen, då Bcl-2 över-uttrycket är associerat med prostatacancer resistens i standard kemoterapi och en högre återkommande frekvens av Bcl-2 i tumörer efter kastrering. Apoptos induceras genom att ABT-737 binder och aktiviteten av Bcl-2, Bcl-xl och Bcl-w hämmas, dock binder denna förening inte till Bcl-2 som proteinet Mcl-1, och uttrycket av detta protein är tillräcklig för att inhibera aktiviteten av ABT-737 [12].

Behandlingen med ABT-737 ensamt orsakade en liten klyvning av PARP-1 (en apoptos markör), men vid kombination med SMI-4a (Pim kinasinhibitor) sågs den markerade klyvningen av detta protein tydligare. Med en annan Pim inhibitor PIMI-14j, som är strukturellt annorlunda, erhöles ett liknande synergisk resultat där Pim aktiviteten

⁹ Överföringen av separerande elektrofore proteiner från gel-matrisen till ett membran med efterföljande antikroppsbaseade detektering på membranets yta.

blockerades *in vitro*. Kombinationsbehandlingen med ABT-737 och Pim kinasinhibitor visade en kraftig ökning av celldöd i PC3-celinje. En annan Pim kinasinhibitor som också visade sig vara synergisk med ABT-737 är Koo135, men även vinna resistensen mot celldöd i de överuttryckande Bcl-2 celler [12].

5.5 Studie 5

“The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized” [14]

Den här artikeln visar att känsligheten för ABT-737 hos resistent celler kan ökas genom nedreglering, destabilisering eller inaktivering av Mcl-1. Studierna som har gjorts och är presenterade i denna artikel har som mål att ge en rationell grund för utformning av kliniska prövningar med detta medel. Att minska över-uttryckningen av Bcl-2 proteiner har blivit en attraktiv cancerterapi, då deras överaktivitet gynnar tumörbildning och begränsar ofta cytostatiska respons [14].

För att fastställa huruvida de förmodade BH3 mimetika dödar cancercellerna via Bcl-2-reglerande vägen, har man undersökt om deras cytotoxiska verkan kräver Bax och Bak. Det visade sig att sex av sju förmodade BH3 mimetika som testades, dödade celler som saknar Bak och Bax, med undantaget ABT-737. ABT-737 binder till viss grad till de pro-överlevande proteinerna som mest liknar Bcl-2. BH3-only proteinerna har visats vara dåliga hämmare eftersom de inte kan binda divergenta Bcl-2 homologer till Mcl-1. Mcl-1 visades i nya studier ha en kritisk och distinkt roll i kontrollen av apoptos, och orsakar en kraftig begränsning av ABT-737 cytotoxiska effekt. I denna artikel visar följaktligen flera strategier för nedregleringen av Mcl-1 och hög Bcl-2 uttryck vilket gör olika celler mycket känsliga för ABT-737. Det finns noterbara konsekvenser av dessa upptäckter för behandling av patienter med resistent cancer [14].

5.5.1 Resultat

Överuttrycket av Bcl-2 motverkas effektivt av ABT-737

Vid användning av ABT-737 ensamt noterades att Mcl-1 är en viktig faktor för cell respons för apoptos. Det andra pro-överlevande proteinet, efter Bak, som läkemedlet misslyckades binda med är A1, proteinet uttrycks inte i de flesta tumörcellerna. En variant av Noxa BH3 har utnyttjats för att testa om ABT-737:s direkta motverkande av Bcl-2 över-uttryckningen försämrats. Denna Noxa variant har upptäckts vara mycket mer selektiva för Mcl-1 än A1 och andra pro-överlevande proteiner. Den här Noxa varianten kallas för mus Noxa BH3 B (mNoxaB), samt dess mutanter E74F av de som binder både Mcl-1 och A1. Noxa utnyttjades genom insättning av BH3 sekvenser i en inert BIM ryggrad som fördes in via retrovirus i MEF (mus embryofibroblaster) för att överuttrycka A1. Mcl-1 selektiva ligand (mNoxaB) som behandlades med ABT-737 var mindre effektiva vid blockering av kolonitillväxt än E74F föräldrarna, A1 kan därför också minska känsligheten för ABT-737. Bcl-2 och Bcl-Xl:s effekter testades eftersom tumörer ofta överuttrycker Bcl-2. Det visade sig att Bcl-Xl uttryck uppvisar en begränsad resistens trots inaktiveringen av Mcl-1 (genom att uttrycka Noxa), men överraskande hindrade Bcl-2 uttrycket inte ABT-737 inducerad död. Slutsatsen av detta försök är att Bcl-2 uttrycket inte minskar den cytotoxiska aktiviteten av ABT-737 även när Mcl-1 inaktiveras, vilket betyder att kombinationen av ABT-737 (trots att Bcl-2 övertrycket är högt) med strategier för att inaktivera Mcl-1 har terapeutisk potential [14].

5.6 Studie 6

”Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-XL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B ” [18]

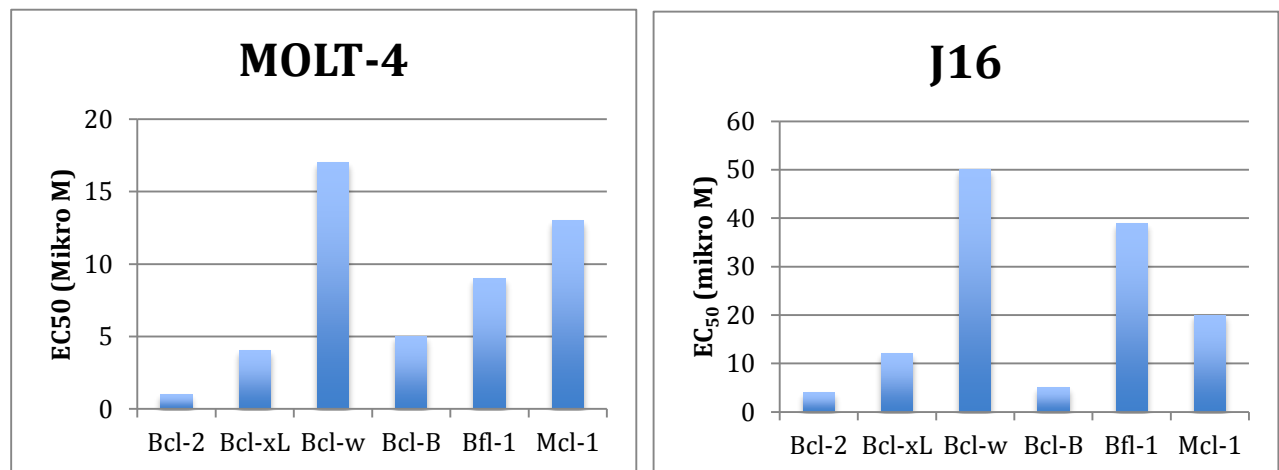
Anti-cancer läkemedlet ABT-737 är en BH3-mimetika som framkallar apoptos genom att hämma av pro-överlevande Bcl-2 proteiner. Det etablerades att Bcl-2 angräps selektivt av ABT-737 före Bcl-x och Bcl-w. ABT-737 binder till Bcl-2 och Bcl-w *in vitro* med hög affinitet. Den höga bindnings affinitet mellan ABT-737 och Bcl-2 samt Bcl-w innebär att ABT-737 kan hämma både Bcl-2 och Bcl-w. I denna studie har P53-vildtyp eller P53-mutant humana T leukemiceller beskrivits. ABT-737:s förmåga att förskjuta BH3-only proteiner och Bax avslöjade att ABT-737 skiljer sig i sin förmåga att störa komplexen mellan Bcl-2, Bcl-XL eller Bcl-w proteinerna [18].

5.6.1 Metod

Det användes två väl karakteriserade T-akut lymfatisk (T-ALL) cellinjer, J16 och MOLT-4 med vild-typ och P53 status. Med retrovirus uttrycktes det stabilt av var och en av de sex pro överlevande Bcl-2 proteiner, i dessa cellinjer. Genom Western blot bekräftades de överuttryckande Bcl-2 proteinerna och för bestämning av deras känslighet för ABT-737 odlades cellinjerna under 48 timmar med ett dos- intervall av läkemedlet eller med dess icke verksamma enantiomer, och genom PI (propidiumjodid, eng. propidium iodid) upptag lästes celldöden av. Celldöd är klassificerad som apoptos genom nukleär fragmentering och fullständig hämning genom pan-kaspas hämmaren z-VAD-fmk [18].

5.6.2 Resultat

Cellinjerna MOLT-4 och J16 dog, som svar på ABT-737 behandling (dos-beroende), EC₅₀ värden för respektive på ungefär 0,1 och 8 μ M. De överuttryckande cellerna, MOLT-4 och J16, dog väldigt effektivt som svar på ABT-737, vilket betyder att ABT-737 angriper Bcl-2 effektivt. Dock så var ABT-737 inte lika effektiv trots att den har liknande affinitet för både Bcl-XL och Bcl-w *in vitro* [18].



Figur 8. Figuren visar effekten av ABT-737 på Bcl-2 familjehämmare i cellinjerna MOLT-4 och J16. Omarbetad från [18].

6. Sammanfattning av studieresultaten

Resultatet av de valda studierna visade sammanfattningsvis att kombinationsbehandlingen överlag gav bättre effekt än monoterapi. Nedan följer en sammanfattning, i punktform, av vad de olika studierna kom fram till:

- Studie ett visade att docetaxel och ABT-737 minskade uttrycket av Bcl-2 proteinerna. Studien visade även att kombinationen docetaxel och ABT-263 minskade uttrycket av Bcl-2 proteinerna.
- Studie två visade att docetaxel och sabutoclax minskade tumörstorleken.
- Studie tre visade att en större andel patienter överlevda vid användning av AT-101 med docetaxel och prednison jämfört med kontrollpatienter, dock inte statistiskt olika.
- Studie fyra visade att Pim-hämmare (SMI-4a) och ABT737 gav en minskad tumörstorlek.
- Studie fem visade att ABT-737 med inaktivering av Mcl-1 har terapeutisk potential.
- Studie sex visade att cellinjerna MOLT-4 och J16 dog som svar på ABT-737, vilket tyder på att ABT-737 angriper Bcl-2 effektivt.

7. Diskussion

Syftet med denna litteraturstudie var att hitta läkemedel eller strategier för att bekämpa behandlingsresistenta prostatatumörer som har höga halter av Bcl-2. Eftersom det i Bcl-2 antiapoptotiska proteiner inkluderas Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w och Mcl-1 så har det gjorts studier för att hämma var och en av dessa antiapoptotiska proteiner med monoterapier samt med kombinationsterapier. Därför bestämde jag och min handledare (Gröbner G) att lägga fokus på två strategier, nämligen docetaxel och Pim kinasinhibitorer med ABT-737. Dock var det svårt att hitta artiklar som just använde dessa strategier utan de har nästan alltid i artiklarna inkluderat andra ämnen för kombinationsterapi för att inducera apoptos i de resistenta prostatatumörceller som överuttrycker Bcl-2 proteiner. Det visade sig senare att kombinationsbehandlingen nästan alltid är det mest effektiva för att reducera Bcl-2 i resistenta prostatacancer celler. Docetaxel är ett godkänt läkemedel i Sverige sedan 2012 [22], men problemet är behandlingsresistensen som kan återfinnas hos de som tidigare genomgått kastrering.

För att utvärdera effektiviteten av dessa strategier valdes sex vetenskapliga artiklar för att hitta den effektivaste terapin för behandlingsresistenta prostatatumörer, både mono- och kombinationsterapi. Artiklarna söktes fram genom databasen PubMed. De första tre av de sex använda artiklarna undersöker docetaxel i kombination med ABT-263 och ABT-737, docetaxel i kombination med sabutoclastax samt docetaxel i kombination med At-101 och prednison. I de andra tre artiklarna undersöktes Pim kinasinhibitorer i kombination med ABT-737 och ABT-737 som hämmar Bcl-2 och Mcl-1 proteiner på olika sätt. De två sista artiklarna valdes för att se hur ABT själv fungerar och om det själv kan försumma Bcl-2 familjemedlemmar och därigenom apoptos inducering.

Avgränsningarna som gjordes vid studiesökningen i databasen PubMed var för att få fram de mest intressanta studierna som passade ihop med arbetets syfte. Dock kan detta ha orsakat saknandet av andra intressanta studier som också passar ihop med syftet. Tanken med *Free fulltext* avgränsningen var att få fram läsbara artiklar i fulltext och inte bara sammanfattningen av studien, som fallet var innan avgränsningen. Avgränsningen *Human* gjordes för att endast få fram studier gjorda på människor, men eftersom de undersökta läkemedlen var så pass nya så dök det endast upp studier gjorda på humana cellinjer, men även djur. Denna avgränsning kan också ha orsakat avsaknaden av andra vettiga studier.

I studie 1 undersöktes den terapeutiska effekten av att kombinera DTX och Bcl-2 familjehämmare i humana prostatacancer celler. Resultatet av denna studie visade att närvaron av ABT-263 och ABT-737 har förmågan att öka känsligheten hos den delvis okänsliga DTX i PC3 prostatacancer cellinjen, men även att inhiberingen av Bcl-xl beror på denna effekt. I de tre humana prostatacancer cellinjerna som undersöktes fann man att PC3-celler var mindre känsliga för DTX jämfört med LNCaP och DU145-celler, och en förbättrad känslighet för DTX uppvisades vid behandling med ABT-263, dock inte med ABT-199. Genom RNA-interferens experiment visade det sig att hämningen av Bcl-xl med ABT-263 var huvudsakligt ansvarig för minskning av cytotoxicitet i PC3-celler. Resultatet av denna RNA-interferens experiment var rimligt då cytotoxiska anti-cancer läkemedel inducerar mitokondrier-medierade och kaspas-9-beroende apoptos, och eftersom över-uttrycket av Bcl-XL är en viktig orsak till kemo-resistens i många typer av epitel-cancer celler [7].

Genom de ”yttre” eller ”inre” kaspas beroende celldödsvägar utlöses apoptos, både kaspas 8 och 9 spelar en viktig roll i dessa vägar. Dessutom sker omvandlingen av bud till tBid genom aktiveringen av kaspas 8 vilket gynnar det mitokondrie-medierade kaspas 9 beroende apoptos. Därför sker förändringar i pro-apoptotiska eller anti-apoptotiska molekyler, när cancer celler exponeras för anti-cancer läkemedel, vid mitokondriemembranet vilket leder till aktiveringen av kaspas 9. Detta innebär att om mindre doser av DTX inte aktiverar några kaspaser så aktiverar ABT-263 ensamt kaspas 3, 8, och 2 i PC3-celler. DTX och ABT-263 kombinationen ökade aktiveringen av kaspas 3 och 9 ytterligare, och detta betyder att en förbättrad apoptotisk effekt uppnås genom kombinationen av DTX och ABT-263 som

huvudsakligen beror på aktiveringen av kaspas 9. Paradoxalt ökas oväntat apoptos av ABT-263 behandlade PC3-celler genom tillsats av en kaspas 9-hämmare, trots att ABT-263 orsakade kaspas 9 aktiveringen. Det noterades även att minskningen av apoptos hämmades av pan-kaspas hämmare z-VAD, vilket tyder på att apoptos förbättringen var kaspas-beroende [7].

Den terapeutiska effekten av kombinationsbehandlingen av DTX och Bcl-2 familjehämmaren ABT-737 (som har samma specificitet av hämning som ABT-263) som undersöktes *in vivo* fann man att ett signifikant tryck av PC3 tumörtillväxt i jämförelse med endera terapin ensam. Resultaten av dessa undersökningar visar att kombinationen av Bcl-2 familjehämmare tillsammans med DTX är även effektiv *in vivo* och inte bara *in vitro* [7].

Sammanfattningsvis visade studie 1 att effekten av ABT-263 och ABT-737 gav en effektiv ökning av DTX-inducerande anti-tumör effekter på den delvis resistenta DTX i PC3 humana cellinjer, både *in vitro* och *in vivo* [7].

I Studie 2 gjordes det ett försök i att avgöra om terapeutiska medel, såsom sabutoclax, kan förstärka docetaxel ingreppet. En av de undersökta humana cellinjerna PC3 är som känt tidsmässigt okänsliga för docetaxel med en betydande fördröjning i uppkomsten av celldöd. Denna studie visade i monoterapi av sabutoclax och i kombinationsterapi med docetaxel en signifikant synergisk fördel av androgenresistent behandling, genom Docetaxel-brytning i PC3 kultur celler och med xenograft-modeller. Det noterades att c-Met fosforylering reducerades i tumörer som har behandlats med sabutoclax. De bakomliggande mekanismerna av dessa observationer är kvar för fastställning, men kan återspeglas med en nedström av konsekvensen av Sabutoclax-medierad kaspas aktivering eller i andra delar av det apoptotiska programmet i motsatsen till både docetaxel resistensen och c-Met signaleringen. Dock kan man inte utesluta möjligheten att sabutoclax faktiskt kan vara en direkt regulator av aktiveringsvägen av c-Met-receptorer för HGF. Mcl-1 och c-Met signaleringens förhållande förtjänar en ytterligare utforskning i framtida biokemiska och signalöverföringsstudier. Denna studie har slutligen kommit fram till att den pan-aktiva Bcl-2 familjeantagonisten Sabutoclax är tillräcklig för hämningen av tumörprogression av den avancerade prostatacancer modellen. Dessa uppgifter stödjer det potentiella rollen med att blockera återkopplings-liganden mellan c-Met signalering och Mcl-1. Effektiviteten av samverkan mellan sabutoclax med docetaxel som kombinationsterapi stöder framtida testning för även (förutom prostatacancer) annan avancerad cancer som utvecklar taxol motstånd [10].

Studie 3 var en randomiserad, dubbelblind, placebokontrollerad fas II-studie och hade som mål att utvärdera effekten av cancerbehandling med kombinationen av AT-101, docetaxel och prednison för mCRPC. Enligt resultatet visades ingen förbättring av medianöverlevnaden (18,1 jämfört med 17,8 månader, med p-värde =0,63) av den första slutpunkten för kombinationen av AT-101 med prednison och konventionell docetaxel. Det visades heller inte någon avsevärt förbättrad effekt genom tillsatsen av AT-101, i den andra slutpunkten. Dock visade det sig att en subgrupp av patienter med hög risk för mCRPC fick en numerisk nytta av ADP, men detta är inte statistisk signifikant då analysen var baserad på ett litet antal patienter. Bland riskgruppen däremot var placebo DP-gruppen numeriskt bättre, i den övergripande levnadsgraden. Det är dock noterbart att AT-101 inte riktar sig kraftigt till alla pro-överlevande Bcl-2 familjemedlemmar, dessutom är data som stöder Bcl-2 proteinernas specificitet (alltså Bax- eller Bak apoptotisk beroende aktivitet är begränsade). Kombinationsbehandlingen av DP och AT-101 uppfyllde inte den första slutpunkten för förbättrad överlevnad, men data visade ett bättre resultat hos högrisk grupp definierad av kliniska kriterier [11].

Studie 4 visade att det kan ske en kombination mellan Bcl-2 familjehämmare ABT-737 och Pim kinasinhibitorer för att inducera apoptos i prostatacancer celler och övervinna motståndet av celldöd som orsakas av höga överuttryck av Bcl-2 proteiner. De höga överuttrycken av Mcl-1 i prostatacancer cellinjer gör de resistent mot ABT-737:s verkan, men denna studie visade att tillägget av Pim-kinas hämmare minskar både de cellulära nivåerna av Mcl-1 och de höjda nivåerna av BH3 proteinet Noxa (en mycket specifik hämmare av Mcl-1 proteinet) som i sin tur ökade aktiviteten av ABT-737 [12]. Det visade sig även att halveringstiden av Mcl-1 proteinet minskar genom tillämpningen av Pim kinasinhibitorer i prostatacancer celler [12].

Studie 4 visade även att den apoptotiska aktiviteten ökar kraftigt för ABT-737 vid minskning av Mcl-1 proteinnivåer baserat på de cellkulturresultaten med hämning av Pim med SMI-4a, som kombinerades i *in vivo* djurexperimentet. Monoterapi i studien visade lite anticanceraktivitet medan kombinationsbehandlingen visade en hämmande tillväxt av LNCaP celler. Wester blot och immunohistokemi visade att denna kombinationsbehandling inducerar apoptos av dessa tumörceller och aktiverar UPR (eng. unfolded protein response). Dessa resultat, baserat på deras förmåga att reglera proteinsyntes och UPR, antyder på att Pim Kinasinhibitorer möjligtvis kan användas för att förstärka anti-canceraktiviteten av ABT-737 i kliniken [12].

De befintliga studierna i studie 5 validerar genomförbarheten hos angripandet av Bcl-2 liknande proteiner med användning av ABT-737 (som är BH3-mimetisk) för att inducera apoptos, men även mekaniska insikter som ger förslag på hur ABT-737 kan användas ensamt och i kombination, effektivt. I artikeln har det resonats att alla ämnen som hämmar BH3-enbart proteiner bör agera genom sina betydelsefulla nedströms effekt, Bax och Bak. Av de testade föreningarna i denna studie var det endast ABT-737 (utvecklats av strukturbaserad design och förbättrats kraftigt med läkemedelskemi) som agerade som en äkta BH3-hämmare/mimetika. Resultaten i denna studie visade att monoterapi av ABT-737 förmodligen är mest effektiv i de tumörer vars Mcl-1 proteiner är låga, frånvarande eller inaktiverade, troligen är ABT-737 även effektiv i de tumörer som innehåller höga nivåer av Bcl-2 eller Bcl-XL. Det upptäcktes även att uttrycket av Bcl-2 eller Bcl-XL kan försummas av detta läkemedel i olika scenarier. Trots att affiniteten hos ABT-737 för Bcl-2 och Bcl-XL är jämförbara så fann denna studie att affiniteten för Bcl-2 överuttryckande celler är mycket större [14].

Den här studien, studie 6, visade också att ABT-737 inte har samma hämmande effekt på Bcl-2, Bcl-XL och Bcl-w i det cellulära sammanhanget. I denna studie visas även att apoptos induceras genom att ABT-737 stör de redan existerade komplexen mellan pro- och anti-apoptotiska Bcl-2 proteiner. Den nya upptäckten i denna studie är att ABT-737 motståndet orsakas av Bcl-B (ett nytt Bcl-2 familjemedlem [20]) i två av de undersökta cellinjerna [18].

Utöver de strategier som har valts i denna litteraturstudie finns det flera andra strategier bland annat gossypol, den naturliga BH3-mimetikan, som är en annan strategi än docetaxel vilken också har visat lovande effekt i pågående kliniska fas II/III studier för human prostatacancer [21]. I denna litteraturstudie visas det att kombinationsterapi av de valda strategierna ger bättre effekt än monoterapi. Även gossypol har kombinerats med ett annat läkemedel, sorafenib.

Kombinationsbehandlings strategin med ABT-737 kan vara särskilt effektiv för att övervinna kemo resistent cancer tumörer med överuttryck av Bcl-2, vilket kan ge betydande kliniska fördelar [14]. För DTX (docetaxel) resistent humana prostatacancer så verkar ABT-737 och ABT-263 vara lovande för att återställa DTX känsligheten [14], då dessa minskade Bcl-2 uttrycket i PC3-celler [7]. Dock visar behandlingen av LNCaP celler med ABT-737 att det inducerade endast en liten del av apoptosen, men kombinationen med SMI-4a gav en högre grad av samverkan i att framkalla apoptos [11]. Återigen en kombinationsterapi för att få den önskade effekten. En annan kombination som också fungerar väl med ABT-737 är Pim

Kinasinhibitorer som har visats i flera andra studier, som även övervunnit resistensen mot celldöd i human prostatacancer celler med Bcl-2 överuttryck [12].

De strategier som har använts har haft målet att hämma Bcl-2 familjehämmare och utifrån resultaten som de har kommit fram till verkar Mcl-1 hämningen ha en stor betydelse för att inducera apoptos. Mcl-1 nedbrytningen kan bidra till att säkerställa en definitiv apoptos i prostataceller [14]. Dessutom har det visats att monoterapi av ABT-737 är effektivast i tumörer med inga eller ringa antal Mcl-1 proteiner [14], därför kan det vara bra att även fokusera på att hämma Mcl-1 eftersom monoterapi oftast är bäst ur patientens synvinkel då det gäller biverkningar. Därför rekommenderar jag att i framtida studier satsa på monoterapi som alltid är bäst för de svårt sjuka patienterna, om det finns möjlighet. En annan vinkel för att övervinna terapiresistens för prostatacancer är att angripa Bcl-2, som upptäckts orsaka ABT-737 resistensen [18].

De olika resultaten som fås i de olika studierna beror på olika faktorer, bland annat omgivningen som läkemedlet testas i. En annan viktig faktor är att det är svårt att härma människans alla aspekter av sjukdomen, dessutom har olika kroppar olika förmåga att hantera sjukdom och/eller läkemedel, vilket gör det ännu svårare att komma fram till en perfekt lösning/bekämpning av sjukdomen. Dock så har resultaten av studierna i de valda artiklarna varit ungefär lika vilket ger ett hopp om att strategierna kommer att bota de behandlingsresistenta prostatacancerpatienterna, men man ska ha i åtanke att detta arbete är för litet för att kunna dra slutsatsen av strategiernas/läkemedlets effektivitet.

8. Slutsats

Denna litteraturstudie gjordes för att hitta strategier som bekämpar behandlingsresistenta prostatatumörer med höga Bcl-2 halter, och för detta användes sex vetenskapliga artiklar som presenterade olika kombinationsterapier och monoterapier. De sökta strategierna/läkemedlen är Docetaxel och Pim kinashämmare med ABT-737, men även ABT-737 ensamt och med andra kombinationer för att kunna förstå dess funktion och effekt på nedregleringen av Bcl-2 familjproteiner.

Sammanfattningsvis visade resultaten av docetaxel kombinationsbehandlingen med ABT-263 minskad uttryck av Bcl-2 proteinet. Kombinationsbehandlingen av docetaxel och sabutoclax visade också en minskad tumörstorlek som etablerade sabutoclax som ett effektivt läkemedel. Även kombinationsbehandlingen Pim-hämmare SMI-4a med ABT-737 visade en minskad tumörtillväxt, *in vivo*. De undersökta artiklarna i detta examensarbete är inte tillräckliga för att säga att kombinationsterapin ger det önskvärda resultaten i att hämma/minska Bcl-2 proteiner/familjprotein. Det behövs således fler artiklar att undersöka men även att det görs fler studier för att få fram den "perfekta" och mest effektiva terapin för de behandlingsresistenta prostatatumörerna.

9. Tack

Jag vill först tacka min handledare Gerhard Gröbner för vägledningen och hjälpen som jag fått av honom genom examensarbetet. Sen vill jag även tacka min man som har varit ett starkt stöd för mig under hela examensarbetet men även under hela min studietid hittills. Sist men inte minst vill jag tacka min fyra-åriga son som har haft tålamodet med att vänta med många saker för att jag ska kunna bli klar med detta examensarbete.

10. Referenser

- [1] Martinez E. Prostatacancer. 1177.se. Västra Götalandsregion. Hämtat från: <http://www.1177.se/Vastra-Gotaland/Tema/Cancer/Cancerformer-och-fakta/Cancerformer/Prostatacancer/> [Uppdaterad 2014-12-19, Citerad 2015-01-29]
- [2] Gröbner G. Regulation of Mitochondrial Apoptosis by Bcl-2 Proteins: Basic Mechanisms and their Dependence on Protein-Lipid Interactions. Bilaga A VR-NT Ansökan 2013.
- [3] Bratt O. Prostatacancer. Internetmedicin.se. internetmedicin. Hämtat från: <http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=606#> [Uppdaterad 2015-02-02, Citerad 2015-02-10]
- [4] Hedefalk B. Vanliga frågor om prostatacancer. Cancerfonden.se. cancerfonden. Hämtat från: <http://www.cancerfonden.se/sv/Om-Cancerfonden/Fragor-och-svar/Vanliga-fragor-om-prostatacancer/> [uppdaterad 2014-05-23 Citerad 2015-02-10]
- [5] Leber B, Geng F, Kale J, Andrews DW. Drugs targeting Bcl-2 family members as an emerging strategy in cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2010 Sep 8;12:e28.
- [6] Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, et.al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Targets*. 2013 Jan; 17 (1):61-75.
- [7] Tamaki H, Harashima N, Hiraki M, Arichi N, Nishimura N, Shilina H, et.al. Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostata cancer cells to Docetaxel and promotes unexpected apoptotis under caspase-9 inhibition. *Oncotarget*. 2014 Nov 30; 5(22): 11399-412.
- [8] Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, et. al. PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. *Prostate*. 2011 Nov; 71(15): 1668–1679.
- [9] Banyard J, Chung I, Migliozi M, Phan DT, Wilson AM, Zetter BR, et. al. Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. *BMC Center*. 2014 Maj 30; 14:387: 1-15
- [10] Jackson RS 2end, Placzek W, Fernandez A, Ziaee S, Chu CY, Wei J, et.al. Sabutoclax, a Mcl-1 Antagonist, Inhibits Tumorigenesis in Transgenic Mouse and Human Xenograft Models of Prostate Cancer. *Neoplasia*. 2012 jul; 14(7): 656-65.
- [11] Sonpavde G, Matveev V, Burke JM, Caton JR, Fleming MT, Hutson TE, et. al. Randomized phase II trial of Docetaxel plus Prednisone in combination with placebo or AT-101, an oral small molecule Bcl-2 family antagonist, as first-line therapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*. 2012 jul; 23(7): 1803-8.
- [12] Song JH, Kraft AS, Pim kinase inhibitors sensitize prostate cancer cells to apoptosis triggered by Bcl-2 family inhibitor ABT-737. *Cancer Res*. 2012 Jan 1; 72(1): 294–303.
- [13] Buratovic S. Genomets Vaktare- p53. Uu.se Uppsala universitet. Hämtat från: http://www.uu.se/digitalAssets/162/162294_3buratovic-sonja-uppsats.pdf [uppdaterad 2009, Citerad 2015-02 29]

- [14] Van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE, et.al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell*. 2006 Nov; 10(5). 389-399.
- [15] Bleicken S, Landeta O, Landajuela A, Basanez G, Garcia-Saes AJ. Proapoptotic Bax and Bak proteins form stable protein-permeable pores of tunable size. *J Biol Chem*. 2013 Nov 15. 288(46):33241-52.
- [16] Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec; 17(6): 617-25.
- [17] Winter PS. ABT-737 Bcl-2 inhibitor. Apexbt.com. APEXBIO. Hämtat från: <http://www.apexbt.com/abt-737.html> [uppdaterad 2013, citerad 2015-03-01]
- [18] Rooswinkel RW, van de Kooij B, Verheij M, Borst J. Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death Dis* 2012 Aug 9;3:e366.
- [19] Apoptosis: Caspase Pathways. Rndsystems.com. R&Dsystems a bio-technie brand. Hämtat från: http://www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_FA98_ApoptosisCaspasePathways.aspx [uppdaterad 2014 citerad 2015-03-11]
- [20] Ke N, Godzik A, Reed JC. Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differently binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20. 276(16):12481-4.
- [21] Lian J, Ni Z, Dai X, Su C, Smith AR, Xu L. et. al. Sorafenib Sensitizes (-)- Gossypol-Induced Growth Suppression in Androgen- Independent Prostate Cancer Cells via Mcl-1 Inhibition and Bak Activation. *Molecular Mol Cancer Ther*. 2012 Feb; 11(2):416-26
- [22] Docetaxel accord 80mg/4 ml koncentrat till infusionsvätska, lösning. Lakemedelsverket.se. läkemedelsverket. Hämtat från: <http://www.lakemedelsverket.se/LMF/Lakemedelsinformation/?nplid=20110602000033&type=product> [citerad 2015-03-11]
- [23] Docetaxel Actavis. Fass.se.Läkemedelsindustriföreningen, LIF. Hämtat från: <http://www.fass.se/LIF/product?userType=0&nplId=20090611000036> [uppdaterad: 2014-10-14 citerad: 2015-03-12].
- [24] Prostata-das Männerorgan. Apotheken-umschau.de. Apotheken Umschau. Hämtat från: <http://www.apotheken-umschau.de/Prostata> [Citerad 2015-03-12]



Kemiska institutionen
901 87 Umeå, Sweden
Telefon: 090-786 50 00
Texttelefon 090-786 59 00
www.umu.se