

· 药学前沿 ·

MDM2 与 MDM4 抑制剂的研究进展

李春红, 杜宏金, 温小安*, 孙宏斌

(中国药科大学新药研究中心, 江苏省代谢性疾病药物重点实验室, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

摘要 p53 在 DNA 修复、细胞周期阻滞、细胞凋亡、衰老、自噬及代谢等的调控中发挥着重要作用。MDM2 和 MDM4 是 p53 的关键负调控因子, 其抑制剂已成为抗肿瘤药物研究的热点。目前, 7 个 MDM2 抑制剂(RG7112, MI-77301, RG7388, AMG232, CGM097, MK-8242 及 DS-3032b)和 1 个 MDM2/MDM4 双重抑制剂(ALRN-6924)已进入临床研究阶段。本文重点从分子发现过程、药理活性、临床研究进展等方面对已进入临床研究的 MDM2 抑制剂进行综述, 此外, 还重点介绍 MDM2/MDM4 双重抑制剂的研究进展。

关键词 MDM2; MDM4; 抑制剂; p53; 抗肿瘤药物; 进展

中图分类号 TQ460.31; R914.2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)01-0001-15

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150101

Advances in inhibitors of MDM2 and MDM4

LI Chunhong, DU Hongjin, WEN Xiao'an*, SUN Hongbin

Center of Drug Discovery, Jiangsu Key Laboratory of Drug Discovery for Metabolic Diseases, State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The protein p53 plays an important role in the regulation of DNA repair, cell cycle arrest, apoptosis, senescence, autophagy and metabolism. MDM2 and MDM4 are the key negative regulatory proteins of p53. Inhibition of MDM2 and MDM4 has become a research hotspot in cancer therapy. Currently, seven MDM2 inhibitors (RG7112, MI-77301, RG7388, AMG232, CGM097, MK-8242, DS-3032b) and one MDM2/MDM4 dual inhibitor (ALRN-6924) have entered clinical trials. This paper highlights small molecule discovery, pharmacological activities and clinical research advances of MDM2 inhibitors in clinical trials. In addition, this review introduces research advances of MDM2/MDM4 dual inhibitors.

Key words MDM2; MDM4; inhibitor; p53; anti-tumor drug; advances

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. ZJ14140, ZJ13160)

p53 是人体最重要的肿瘤抑制因子, 于 1979 年被发现^[1]。p53 在致癌因子、DNA 损伤、缺氧、热休克、紫外照射等压力刺激下被激活, 从而调控细胞 DNA 修复、生长周期阻滞、凋亡、衰老、自噬、代谢等, 以维持细胞正常功能^[2-3]。然而, 在约 50% 的肿瘤中, p53 由于基因突变或缺失而失活; 在其余 50% 肿瘤(p53 野生型)中, p53 也因受到多种机制的负调控而不能发挥正常功能^[4-5]。人体内 MDM2(鼠双微体 2)及其同源蛋白 MDM4(鼠双

微体 4)是 p53 的主要负调控蛋白^[6-7]。近 10% 的肿瘤存在 MDM2 基因扩增或 MDM2 过表达现象, 在某些特定类型肿瘤中这一现象的比例更高, 比如肝癌(44%)、骨肉瘤(20%)、软组织肉瘤(31%)。类似地, 10% ~ 20% 肿瘤(包括乳腺癌、胃癌、结肠癌和肺癌)存在 MDM4 基因扩增或 MDM4 过表达现象, 甚至高达 65% 的视网膜母细胞瘤存在该现象^[8]。抑制肿瘤细胞中 MDM2、MDM4 对 p53 的负调控作用, 可以激活 p53 通路, 进而诱导肿瘤细胞周期阻滞

* 收稿日期 2015-01-20 *通信作者 Tel: 025-83271198 E-mail: wxagj@126.com

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. ZJ14140, ZJ13160)

和凋亡,抑制肿瘤细胞增殖^[9-12]。首类MDM2小分子抑制剂Nutlins系列的发现对于MDM2抑制剂的研究具有里程碑意义^[13],此后,各类MDM2小分子抑制剂相继被报道。近年来,MDM4抑制剂尤其是MDM2/MDM4双重抑制剂已逐渐引起新药研发人员的重视。

1 p53、MDM2及MDM4的相互作用

p53由393个氨基酸构成5个功能区(图1):

①N端转录激活区,其3个关键氨基酸(Phe19、

Trp23及Leu26)可结合转录辅因子(如p300),参与转录过程;②脯氨酸富集区(PR);③DNA结合区,该区包含1个Zn离子并可与特定的DNA序列结合;④寡聚区,该区负责转录状态下p53四聚体的形成;⑤C端,该区是对蛋白酶体敏感的开放区域,包含9个碱性氨基酸残基,可进行乙酰化、甲基化、泛素化等翻译后修饰。p53受到上游信号刺激后被激活,通过与特定的DNA序列结合,进而调控下游p21、MDM2、GADD45、Bax等的表达^[14-16]。

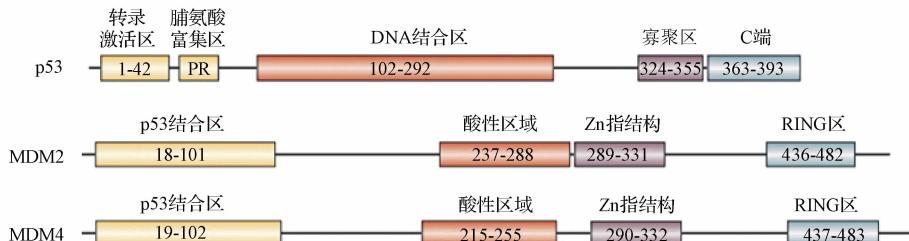


图1 p53及MDM2、MDM4的结构^[16]

MDM2作为p53的下游蛋白,主要影响p53的转录活性和稳定性,从而与p53形成负反馈通路(图2)。一方面,MDM2的N端可与p53的转录激活区结合从而将其遮蔽,使p53的转录活性受到抑制。另一方面,MDM2可通过RING区发挥E3连接酶作用将p53泛素化,单泛素化的p53被转运出

细胞核进而多泛素化,最终被蛋白酶体降解^[17-18]。MDM2的酸性区域可诱导p53构象变化使其利于泛素化^[19],MDM2的中心区域还对p53进出核具有调控作用。此外,MDM2还可自身泛素化降解,保持正常细胞中p53水平的稳定性。

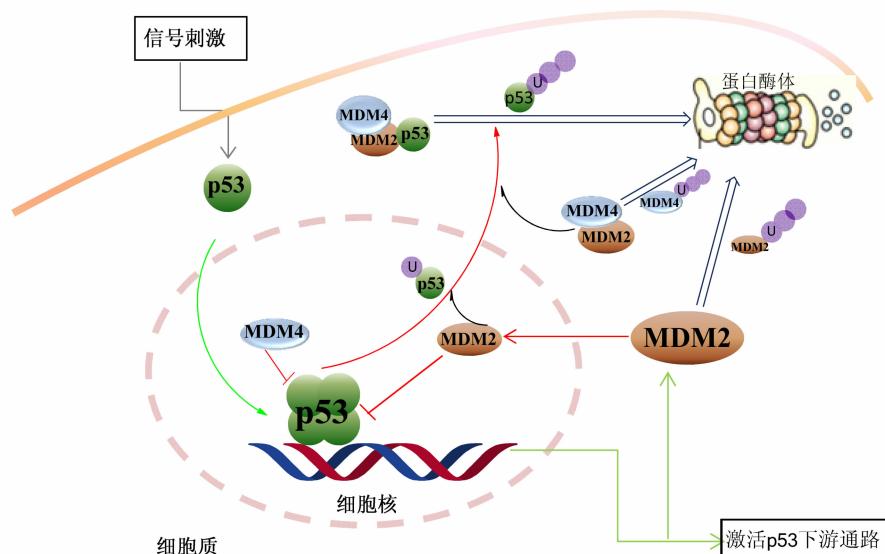


图2 MDM2、MDM4对p53的调控

MDM4的N端也可结合在p53的转录激活区,直接抑制p53的转录活性。而MDM4的RING区自身不具备E3连接酶功能,却能通过与MDM2的RING区发生作用,使MDM4和MDM2形成异源二聚体而发挥E3连接酶功能,从而促进p53的多泛素化^[20~22]。同时,MDM2可介导MDM4的泛素化降解。MDM4作为p53的泛素化竞争底物,有利于保持正常细胞中p53水平的稳定性^[23]。

1996年,Kussie等^[24]解析了MDM2(17~125序列)与p53(15~29序列)所形成的复合物晶体结构(图3-A,PDB:1YCR)。研究发现,MDM2的p53结合区(17~125序列),其三级结构由两个 $\beta\alpha\beta\alpha$ 重复结构域组成。p53的转录激活区(15~29序列)以 α 螺旋形式通过3个关键氨基酸(Phe19、Trp23及Leu26)与MDM2的N端疏水区域相结合。MDM2上的3个关键结合位点连同其邻近的氨基酸一起分别组成3个结合口袋,即F19口袋、W23口袋与L26口袋。

2007年,Popowicz等^[25]解析了MDM4(23~111序列)与p53(15~29序列)所形成的复合物晶体结构(图3-B,PDB:3DAB)。研究表明,MDM4与p53的结合模式类似于MDM2与p53的结合模式。所不同的是,MDM4的L26口袋由Val49、Met53、Pro95、Leu98及Tyr99组成,而MDM2的L26口袋由Met50、Leu54、His96、Ile99及Tyr100组成。由于MDM4的Met53链长比MDM2的Leu54长,且MDM4的Tyr99为闭合构象,而MDM2的Tyr100呈开放构象,因此MDM4的L26口袋相对更浅、更窄。已报道的干扰p53-MDM2/MDM4蛋白-蛋白相互作用的抑制剂均为模拟p53的3个关键氨基酸(Phe19、Trp23及Leu26)与MDM2或MDM4结合。

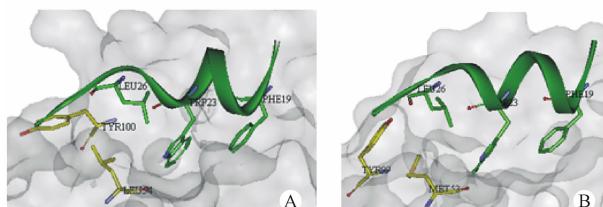


图3 p53-MDM2(A)和p53-MDM4(B)晶体结构示意图

2 MDM2抑制剂

Lane课题组早期发现,将p53缩短到p53(16~27)时仍对MDM2具有一定的抑制活性

($IC_{50}=8.7\text{ }\mu\text{mol/L}$)^[26]。该课题组还通过噬菌体展示技术筛选到1个12肽(MPRFMDYWEGLN),其MDM2抑制活性是p53(16~27)的29倍^[27],表明肽类化合物可作为MDM2抑制剂的设计起点。

2004年,Roche制药公司报道通过高通量筛选首次获得MDM2小分子抑制剂,即Nutlins系列化合物^[13]。Nutlins系列化合物具有p53依赖的抗肿瘤活性,例如:Nutlin-1(图5)可升高人结肠癌细胞HCT-116(p53野生型)中p53、MDM2及p21的水平,而对人结肠癌细胞SW480(p53突变型)的MDM2和p21的水平无影响;Nutlin-3a可有效抑制骨肉瘤细胞SJS-1(p53野生型)异种移植小鼠的肿瘤生长。Nutlins的发现,首次证明可通过小分子抑制p53-MDM2蛋白-蛋白相互作用,从而激活野生型p53及其下游通路并诱导肿瘤细胞周期阻滞和凋亡。此后,各类p53-MDM2小分子抑制剂相继被发现,已有许多篇综述对其进行总结^[28~31]。在此,着重介绍已进入临床研究的7个MDM2小分子抑制剂的发现过程、药理活性以及临床研究进展等。

2.1 RG7112

Nutlin-3a(化合物2)具有较强的MDM2抑制活性($IC_{50}=88\text{ nmol/L}$)。Nutlin-3a与MDM2的共晶结构(图4,PDB:4J3E)显示,Nutlin-3a的两个对氯苯基分别插入MDM2的W23和L26口袋,苯环A的邻位异丙氧基和对位甲氧基分别结合在F19口袋、L22位点,而哌嗪侧链则远离这些结合位点,阻止溶剂与结合表面的接触。Roche公司对Nutlin-3a进行结构改造(图5),将其咪唑环的4、5位氢以甲基取代,苯环A的对位环甲氧基以叔丁基代替,以阻止咪唑环和苯环A的代谢失活。同时,将异丙氧基用乙氧基代替以减小相对分子质量,将亲水性的羰基哌嗪侧链替换成甲磺酰丙基取代的哌嗪,最终优化得到MDM2抑制活性比Nutlin-3a强4倍的化合物3(RG7112)^[32]。

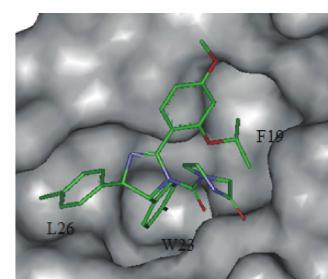


图4 Nutlin-3a与MDM2的结合模式

RG7112 具有 p53 依赖的抗肿瘤活性, 对 MDM2 过表达肿瘤细胞 HCT-116、SJSAs-1 及结肠癌细胞 RKO 的抑制活性 ($IC_{50} = 0.4 \mu\text{mol/L}$) 比 Nutlin-3a 强 3 倍。动物实验表明, SJSAs-1 细胞株异种移植小鼠每天 1 次经口给予 50 mg/kg 的 RG7112, 14 d

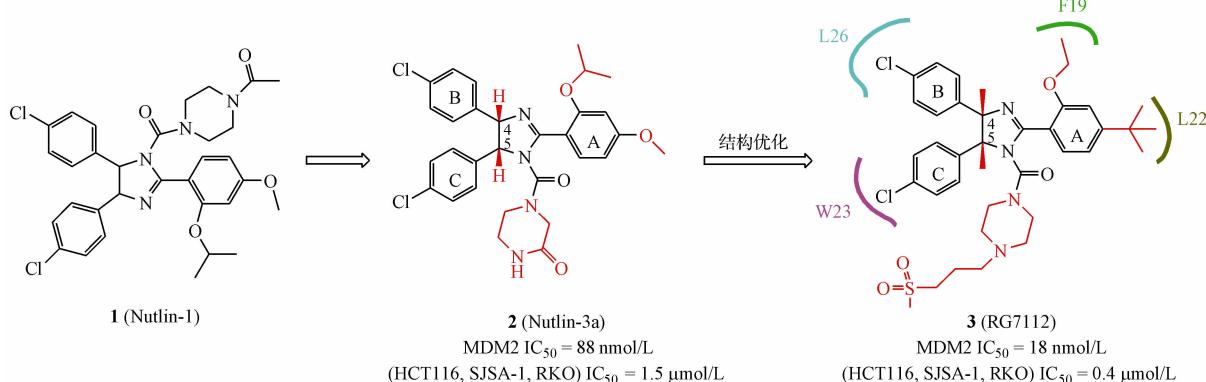


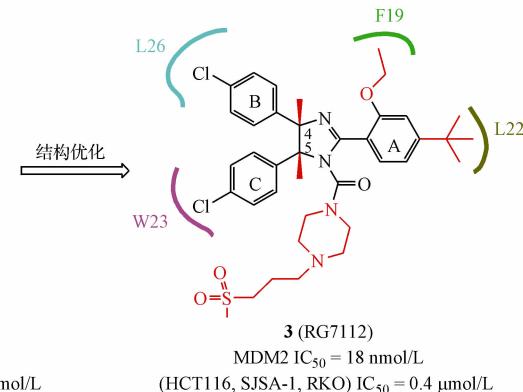
图 5 MDM2 抑制剂 RG7112 的发现

RG7112 是首个进入临床研究的 p53-MDM2 蛋白-蛋白相互作用抑制剂。2007 年起, Roche 制药公司开展了 RG7112 单独给药治疗实体瘤 (NCT00559533、NCT01164033 及 NCT01143740) 与血液瘤 (NCT00623870)、联合多柔比星治疗软组织肉瘤 (NCT01605526) 及联合阿糖胞苷治疗急性髓性白血病 (NCT01635296) 的 I 期临床研究, 这些 I 期临床研究均已完成。2012 年, 还针对临床给药有效的肿瘤患者开展了一项拓展研究 (NCT01677780)^[34]。2012 年公布的临床结果显示, RG7112 可以激活 p53, 提高 p21 水平, 但其对脂肪瘤的疗效并不理想。在 20 例患者中仅 1 例对药物有部分应答, 14 例病情稳定, 5 例病情恶化, 并出现血小板减少和白细胞减少等严重不良反应^[35]。然而, 同年的一份报告指出, RG7112 治疗急性髓性白血病的临床研究证明了 MDM2 抑制剂的有效性, 31 例患者中有 6 例对 RG7112 有响应, 20% 以上患者出现恶心、腹泻和呕吐等严重不良反应^[36]。2013 年, Yee 等^[37] 报道, 阿糖胞苷抵抗的急性髓性白血病患者对 RG7112 联合阿糖胞苷治疗完全应答, 且 PK 数据与单一疗法相仿, 提示没有药物间相互作用, 不良反应 (大于 20%) 多为腹泻或感染。

2.2 MI-77301

MI-77301 是王少萌课题组报道的高活性 MDM2 抑制剂 (图 6)。研究人员经结构筛选发现吲哚酮可模拟 p53 的 Trp23, 进而设计了一系列吲

后, 肿瘤抑制率可达 74%, 剂量达到 100 mg/kg 时可致肿瘤消退^[33]。RG7112 的药代动力学 (PK) 性质良好 (小鼠, 50 mg/kg, po: AUC = 251.2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, $c_{\max} = 15.5 \mu\text{g/mL}$, $t_{1/2} = 8.8 \text{ h}$)。



哚酮螺环化合物, 从中发现化合物 4 具有一定的 MDM2 抑制活性 (抑制剂常数 $K_i = 8.46 \mu\text{mol/L}$)^[38]。该课题组进而以化合物 4 为先导物, 经结构优化得 MDM2 亲和力增强 3 000 倍的化合物 5 (MI-63)。MI-63 可更完全地占据 MDM2 的 L26 和 F19 口袋, 其吗啉环侧链使化合物的亲水性得以增强, 而苯环上氟原子则可增强化合物的代谢稳定性。MI-63 对前列腺癌细胞 LNCaP 具有较好的抑制作用, IC_{50} 达到 0.28 $\mu\text{mol/L}$ ^[39]。然而, MI-63 的 PK 性质不理想 (大鼠, 25 mg/kg, po: $F = 10\%$, $t_{1/2} = 1.3 \text{ h}$)。

MI-63 经进一步结构优化得到 PK 性质改善的化合物 6 (MI-219, 大鼠, 25 mg/kg, po: $F = 65\%$, $t_{1/2} = 1.4 \text{ h}$)。MI-219 对肿瘤细胞 SJSAs-1、LNCaP 和人前列腺癌 22Rv1 的 IC_{50} 约为 0.4 ~ 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 。SJSAs-1 细胞株异种移植小鼠每天 2 次经口给予 200 mg/kg 的 MI-219, 14 d 肿瘤抑制率可达 86%, 剂量为 300 mg/kg 时肿瘤生长被完全抑制^[40]。MI-219 的异构体 7 (MI-147) 也有较强的 MDM2 抑制活性^[41]。

然而, MI-219 并不稳定, 易由 *trans-cis* 构型异构化为 *cis-cis* 构型, 且 MI-219 存在剂量大、服药频次高的缺点。研究人员进一步对其结构优化, 获得具有 *cis-cis* 构型的高活性化合物 8 (MI-77301) 和 9 (MI-888)^[42-43]。MI-77301 对 MDM2 的亲和力极强, 它不仅可模拟 p53 的 3 个关键氨基酸与 MDM2

相互作用,还可诱导 MDM2 的 N 端 10~25 无序序列重新折叠,从而增加额外疏水作用。MI-77301 对人去分化脂肪肉瘤细胞系 DDLPS 具有较好的抑制活性 (IC_{50} 约为 $0.067 \sim 0.404 \mu\text{mol/L}$)^[44]。急性白血病肿瘤细胞 RS4;11 异种移植小鼠每天 1 次经口给予 200 mg/kg 的 MI-77301,4 周后,肿瘤

可完全消退;同样条件下,LNCaP 细胞株异种移植小鼠的肿瘤部分(80%)消退^[45],且 MI-77301 耐受性良好。MI-888 也表现出良好的体内外抗肿瘤活性。RS4;11 细胞株异种移植小鼠每天 1 次经口给予 200 mg/kg 的 MI-888,3 周后肿瘤即可完全消退,且具有持续性^[46]。

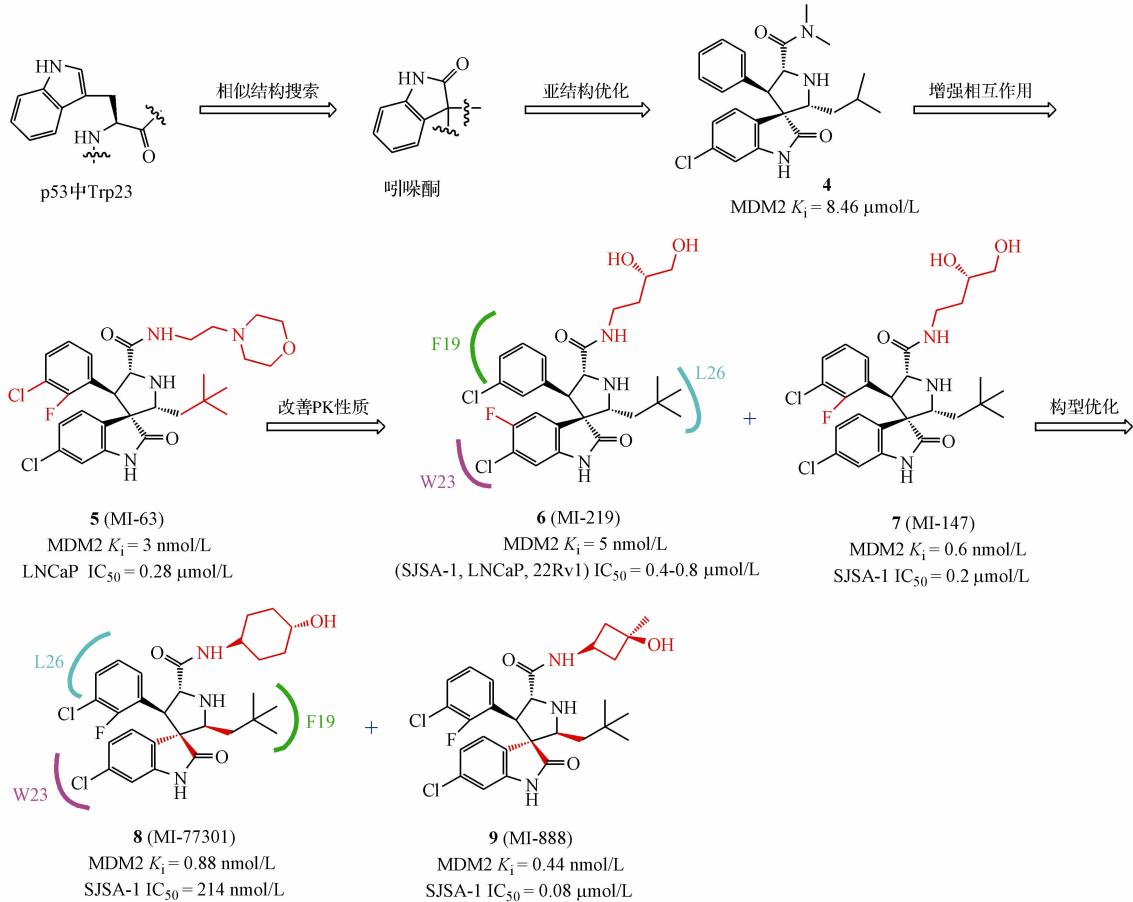


图 6 MDM2 抑制剂 MI-77301 的发现

2012 年起, Sanofi-Aventis 制药公司对 MI-77301 进行 I 期临床研究,评估其单独给药(NCT01985191)和联合 MEK 变构抑制剂 Pimasertib 用药(NCT01636479)的有效性和安全性^[47]。

2.3 RG7388

RG7388 是 Roche 制药公司报道的第 2 代 MDM2 小分子抑制剂。研究人员比较 MI-63 及其非对映异构体 **10** 的结合模式,发现这两个化合物与 MDM2 的 F19、L26 口袋结合时取代基发生了互换(图 7-A, PDB:3LBL)。而 RG7112、MI-219 中相应 W23 和 L26 口袋的取代基均为 cis 构型,trans 构型的影响知之甚少。研究人员于是将化合物 **10** 的

吲哚环打开,设计了一系列具有稳定 trans 构型的吡咯烷化合物,其中化合物 **11** 具有较好的 MDM2 抑制活性。共晶结构(图 7-B, PDB:4JRG)显示,化合物 **11** 不但可以通过吡咯烷 C α 羰基与非洲爪蟾蜍 MDM2 的 His92(对应于人源 MDM2 的 His96)形成氢键,还可通过间氯苯基与之产生 π - π 堆积作用。由于化合物 **11** 的邻二醇链等片段易代谢,研究人员于是对化合物 **11** 进一步结构优化,得到 PK 性质大为改善的化合物 **12**,并在此基础上获得高活性化合物 **13**(RG7388)。RG7388 的 MDM2 抑制活性比化合物 **12** 强 3 倍。细胞实验研究表明,RG7388 对肿瘤细胞 SJS-A-1、RKO 和 HCT-116 具有很好的细胞增

殖抑制作用, IC_{50} 近 0.03 $\mu\text{mol/L}$ 。相比 RG7112, RG7388 使 SJSAs-1 细胞株异种移植小鼠达到相同肿瘤抑制率所需剂量和血药浓度更低^[48-49]。

2011 年, 3 项针对 RG7388 的 I 期临床研究启动, 分别用于评估 RG7388 治疗晚期恶性肿瘤 (NCT01462175)、单独或联合阿糖胞苷治疗急性髓性白血病 (NCT01773408) 的有效性和安全性以及联合泊沙康唑治疗实体瘤时的药物相互作用 (NCT01901172)。其中第一项已完成, 其余两项正

在招募患者^[50]。

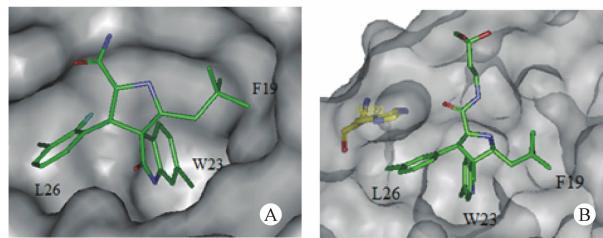


图 7 化合物 10(A) 及 11(B) 与 MDM2 的结合模式

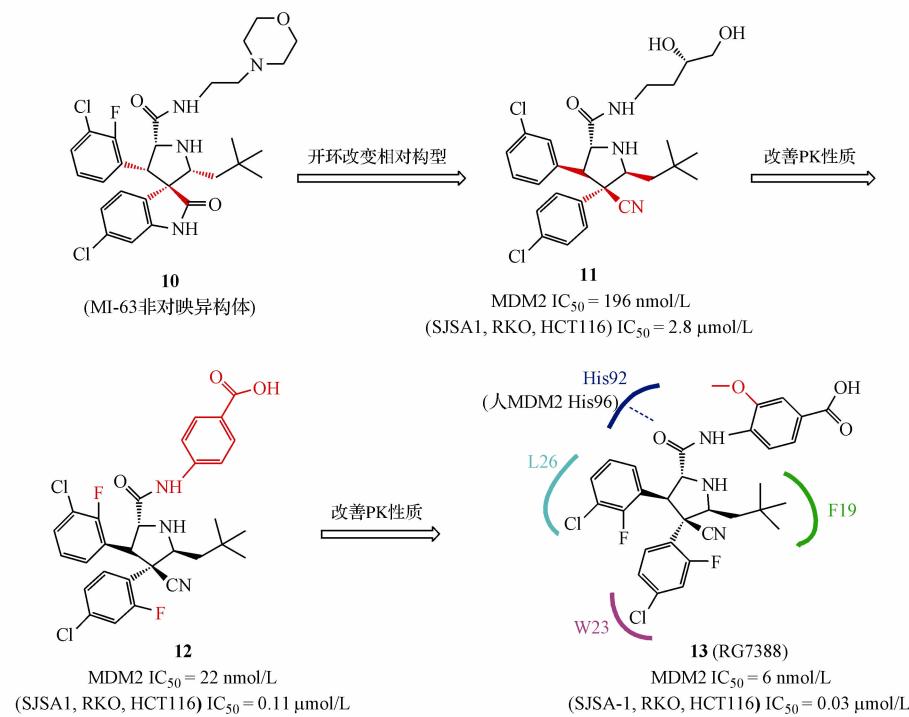


图 8 MDM2 抑制剂 RG7388 的发现

2.4 AMG232

Amgen 公司基于 p53 及小分子抑制剂与 MDM2 的复合晶体结构分析, 从头设计了多类新型骨架化合物, 从中筛选到二芳基取代吗啉酮化合物 **14** (图 9) 具有一定的 MDM2 抑制活性 ($IC_{50} = 5 \mu\text{mol/L}$)^[51]。化合物 **14** 经结构改造得 MDM2 抑制活性增强 16 倍的化合物 **15**, 它除可与 His96 发生 $\pi-\pi$ 堆积作用外还可能与之发生静电作用。化合物 **15** 的骨架替换成哌啶酮并进行构型优化, 所得化合物 **16** 对 MDM2 有较强的抑制活性, IC_{50} 达 34 nmol/L。对化合物 **16** 进行构象控制得到活性增强 15~17 倍的化合物 **17**, 3 位甲基的引入使得骨架在与 MDM2 结合时可稳定保持在利于结合的间扭式 (gauche) 构象, 亲水性叔丁氧羰基取代基的

引入则使该部位能完全插入到 F19 口袋中。共晶结构 (图 10-A, PDB:4OAS) 研究表明, 化合物 **17** 的 3 位羧基还可与 His96 发生静电作用。

然而, 化合物 **17** 的 PK 性质不佳, 其预测人体清除率较高 [$CL = 0.55 \text{ L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$], 半衰期太短 ($t_{1/2} = 0.28 \text{ h}$)。经对化合物 **17** 的氮取代基进行优化, 得化合物 **18** (AM-8553), 其 PK 性质有所改善 ($CL = 0.03 \text{ L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$, $t_{1/2} > 12 \text{ h}$)^[52]。研究人员在分析化合物 **18** 与 MDM2 的共晶结构后 (图 10-B, PDB:4ERF), 推测占据未充分利用的 Gly58 区域 (“Gly58 shelf”) 有助于提高活性。因此, 在化合物 **18** 中引入各种取代磺酰基, 结果得到活性极强的化合物 **19** (AMG232), 它对 MDM2 抑制活性 IC_{50} 达 0.6 nmol/L, 对 SJSAs-1 细胞增殖抑制活性

IC_{50} 达9.1 nmol/L。AMG232对p53野生型肿瘤细胞的选择性高达2500倍。12只SJSA-1细胞株异种移植小鼠每天1次经口给予60 mg/kg的AMG232,连续3周,其中10只小鼠肿瘤消退且无显著体重下降。相比AM-8553[大鼠,0.5 mg/kg,iv:CL=1.2 L/(h·kg), $t_{1/2}=3.5$ h]AMG232具有更好的PK性质[大鼠,0.5 mg/kg,iv:CL=0.66 L/(h·kg), $t_{1/2}=2.4$ h]^[53],且在有效剂量下表现

出较好的安全性。最近,研究人员进一步将AMG232中易醛糖化的羧基酰胺化,得到活性和PK性质更佳的化合物20(AM-7029,小鼠:iv CL=0.026 L/(h·kg),po F=30%;狗:iv CL=0.69 L/(h·kg),po F=45%)^[54]。AM-7029在SJSA-1细胞株异种移植小鼠(半数有效剂量ED₅₀=2.6 mg/kg)和HCT-116细胞株异种移植鼠(ED₅₀=10 mg/kg)上表现出较强的抗肿瘤活性。

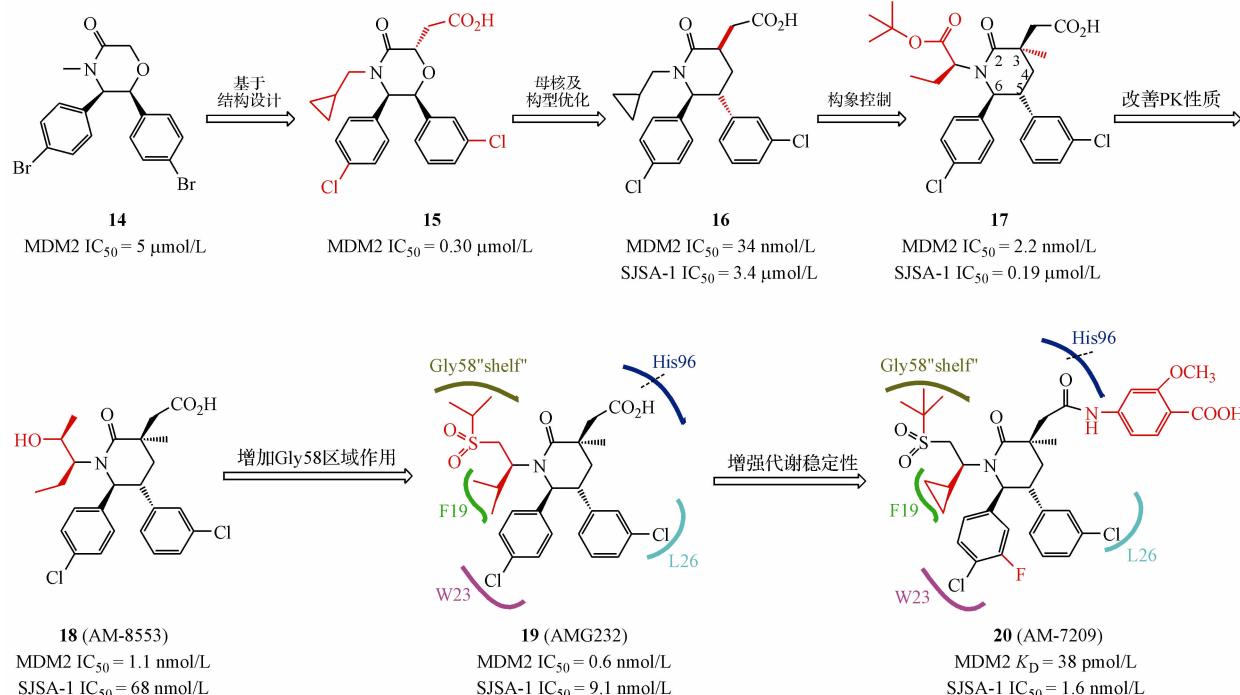


图9 MDM2抑制剂AMG232的发现

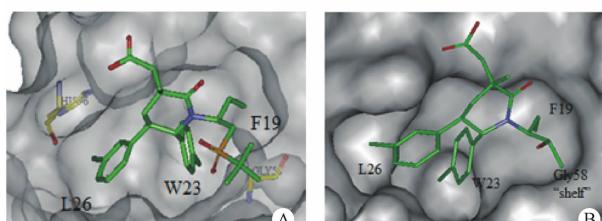


图10 化合物17(A)及18(B)与MDM2的结合模式

Amgen公司分别于2012和2013年启动AMG232治疗晚期实体瘤(NCT01723020)以及单独或联合曲美替尼治疗急性髓性白血病(NCT02016729)的I期临床研究,患者尚在招募中。2014年,该公司还申请了AMG232联合曲美替尼和达拉菲尼治疗转移性黑色素瘤的Ia/IIb期临床研究(NCT02110355),目前尚未开始招募患者^[55]。

2.5 CGM097

2011年,Novartis公司公开了具有异喹啉酮和喹唑啉酮骨架的新结构类型MDM2抑制剂,其中CGM097(图11)对MDM2的抑制活性最好($IC_{50}=0.8 \text{ nmol/L}$),对MDM4也有一定抑制活性($IC_{50}=2.10 \mu\text{mol/L}$)^[56]。Novartis公司还于2012年公开了CGM097的硫酸氢盐晶形^[57],但尚未公布其细胞活性、PK性质及动物实验数据。2013年,Novartis公司启动CGM097治疗晚期实体瘤的I期临床研究(NCT01760525),目前正在招募患者^[58]。

2.6 MK-8242及DS-3032b

Merck公司于2011年启动了一个MDM2抑制剂(MK-8242)的两项I期临床研究,一项治疗晚期实体瘤(NCT01451437),另一项为单独或联合阿糖胞苷治疗急性髓性白血病(NCT01463696,现已被

终止)^[59],但 MK-8242 的分子结构尚未公开。在 Merck 公司报道的 MDM2 抑制剂中,化合物 **22**(图 11)具有较好的生物活性^[60–61]。Daiichi Sankyo 公司也于 2013 年启动了一个 MDM2 小分子抑制剂(DS-3032b)的 I 期临床研究,评估其多剂量递增

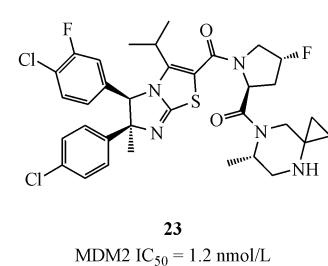
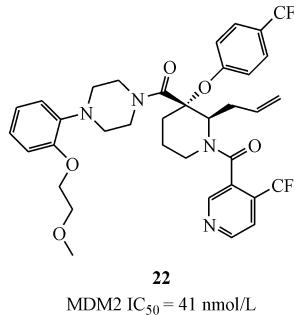
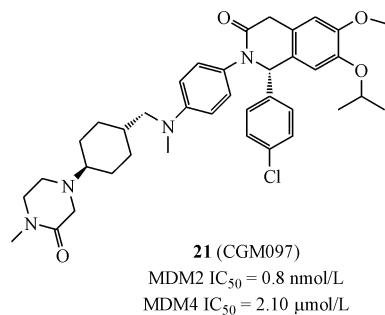


图 11 MDM2 小分子抑制剂 **21**~**23** 的结构

3 MDM2/MDM4 双重抑制剂

由于 MDM4 的 L26 口袋相对更窄、更浅,因此多数 MDM2 小分子抑制剂对 MDM4 的抑制活性较差^[65]。例如, Nutlin-3a 对 MDM4 的亲和力比 MDM2 弱得多,导致不能有效诱导 MDM4 过表达肿瘤细胞凋亡,这就是所谓的 Nutlin 抵抗^[20,66]。MDM2/MDM4 双重抑制剂可望对 MDM2 和 MDM4 过表达肿瘤均有效^[67–68]。然而,MDM2/MDM4 双重抑制剂的设计具有较大的挑战性,目前报道的 MDM2/MDM4 双重抑制剂多为肽或拟肽类,高活性 MDM2/MDM4 小分子抑制剂甚少。

3.1 肽类双重抑制剂

早在 1999 年,Lane 课题组已发现 p53 肽段(QETFSSDLWKLLP)对 MDM2、MDM4 均有一定抑制活性(MDM2 IC₅₀ = 3 μmol/L, MDM4 IC₅₀ = 1.128 μmol/L),并用噬菌体展示技术筛选出另一个 12 肽(MPRFMDYWEGLN)具有 MDM2/MDM4 双重抑制活性(MDM2 IC₅₀ = 0.15 μmol/L, MDM4 IC₅₀ = 1.65 μmol/L)^[69]。

2007 年,Chen 等^[70]报道 MDM2/MDM4 双重抑制剂 pDI(LTFEHYWAQLTS, MDM2 IC₅₀ = 10 nmol/L, MDM4 IC₅₀ = 100 nmol/L),其 MDM4 抑制活性比 p53 强 10 倍。pDI 保留有 p53 的 3 个关键氨基酸,但含有比 p53 更舒展的 α 融合结构。pDI 可抑制 MDM4 过表达 HCT-116 细胞株异种移植小鼠的肿瘤细胞增殖,首次在动物水平证明了

治疗晚期实体瘤和淋巴瘤的效果(NCT01877382)^[62],但其结构也未公开。Daiichi Sankyo 公司曾公开一系列二氢咪唑并噻唑类 MDM2 小分子抑制剂^[63–64],其中化合物 **23**(图 11)对 MDM2 具有很强的抑制活性。

MDM2/MDM4 双重抑制剂的抗肿瘤活性。2010 年,该课题组报道了对 pDI 的结构优化工作,发现 pDI 的 Leu1、Tyr6、Ala8 和 Thr11 分别用 Glu、Trp、Ser、Leu 替换后所得到的 pDIQ,其 MDM4 结合活性增强 5 倍,原因在于 pDIQ 的 Leu11 可随 MDM4 的 Tyr99 抵抗而发生构象改变,从而插入到 α2α2' 形成的疏水沟槽^[71]。

2009 年,研究人员报道了高活性的肽类 MDM2/MDM4 双重抑制剂 PMI(TSFAEYWNLLSP, MDM2 K_i = 3 nmol/L, MDM4 K_i = 4 nmol/L)^[72]。PMI 与 MDM2 结合时,其 Pro12 处于无序状态(图 12-A, PDB:3LNZ),而与 MDM4 结合时,其 Pro12 类似于 pDIQ 的 Leu11 插入到额外的疏水区,使作用增强(图 12-B, PDB:3EQY)。PMI 的 Asn8 被 Ala 替代后得到具有更稳定螺旋构象的 PMI_{Asn8Ala},其活性更强(MDM2 K_i = 0.49 nmol/L, MDM4 K_i = 2.4 nmol/L)^[73]。遗憾的是,PMI 对 HCT-116 肿瘤细胞的抑制活性却远低于 Nutlins,原因可能在于多肽 PMI 易水解、难入胞等。

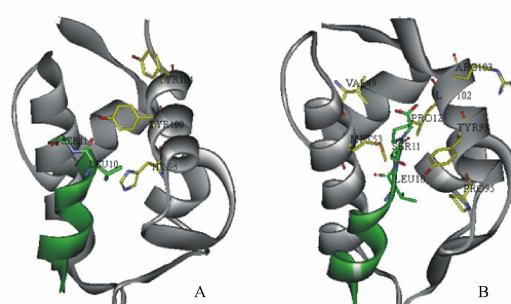
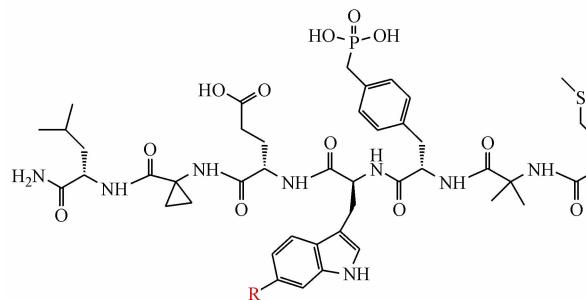


图 12 PMI 肽与 MDM2(A)和 MDM4(B)的结合模式

Novartis 制药公司于 2009 年报道了两个拟肽 MDM2/MDM4 双重抑制剂 **24** 和 **25**(图 13)。尤其化合物 **25** 对 MDM2、MDM4 具有较强的结合活性 ($MDM2 K_i = 7 \text{ nmol/L}$, $MDM4 K_i = 36 \text{ nmol/L}$)。它与 MDM4 结合时可引起 MDM4 的 N 端区域构象改



24 (R = H, MDM4 $K_i = 75 \text{ nmol/L}$)
25 (R = Cl, MDM2 $K_i = 7 \text{ nmol/L}$, MDM4 $K_i = 36 \text{ nmol/L}$)

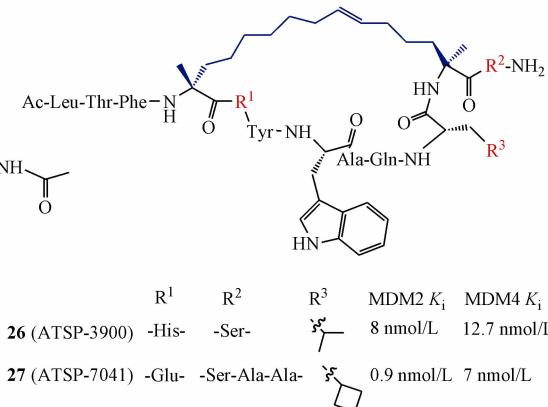
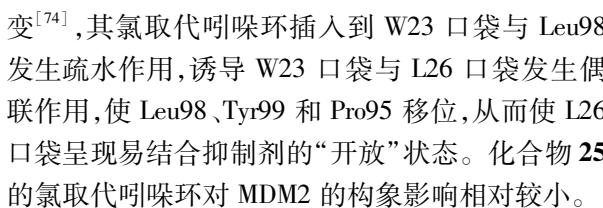


图 13 MDM2/MDM4 肽类双重抑制剂 24~27 的结构

Bernal 等^[75]于 2010 年报道了 MDM2/MDM4 双重抑制剂 SAH-p53-8 (Ac-QSQQTF* NLWRLL* QN-NH2)，它是 p53 (14 ~ 29) 片段的 Ser20 和 Pro27 残基经烯链连接而形成的装订肽 (staple peptide)，这种设计使肽保持了更稳定的螺旋构象，可改善多肽类药物的稳定性和透膜性。SAH-p53-8 对 MDM2、MDM4 具有较强的抑制活性 (MDM2 IC₅₀ = 216 nmol/L, MDM4 IC₅₀ = 229 nmol/L)。细胞活性测试中，SAH-p53-8 对多种 p53 野生型肿瘤细胞表现出显著的细胞增殖抑制活性，对 Nutlin-3a 抵抗的人绒毛癌细胞 JEG-3 (MDM4 过表达) 作用明显，而对正常细胞无抑制活性。量效分析实验显示，在 MDM2/MDM4 双过表达的肿瘤细胞中，SAH-p53-8 和 Nutlin-3a 可发挥协同作用，但在仅 MDM2 过表达的肿瘤细胞中，SAH-p53-8 并不能增强 Nutlin-3a 的活性。

2013 年, Roche 制药公司报道了基于 pDI(Ac-LTFeHYWAQLTS-NH₂) 所进行的装订肽设计工作^[68]。研究人员首先得到比 SAH-p53-8 活性更高的装订肽 **26** (ATSP-3900) ($MDM2 K_i = 8 \text{ nmol/L}$, $MDM4 K_i = 12.7 \text{ nmol/L}$), 其 Tyr22 和 staple 链都参与疏水作用。ATSP-3900 经进一步结构优化, 其 His21 被 Glu 所取代以增强水溶性, 同时 Leu26 被环丁基取代氨基酸代替并延长 C 端肽链以增强疏水作用, 得到可保持稳定螺旋构象 (pH = 7.0 时保

持 70% 螺旋) 的装订肽 **27** (ATSP-7041)。ATSP-7041 对 MDM2、MDM4 都表现出良好的亲和力 ($MDM2\ K_i = 0.9\ nmol/L$, $MDM4\ K_i = 7\ nmol/L$) , 可剂量依赖地激活 MDM4 过表达肿瘤细胞 MCF-7 中的 p53 信号通路, 升高 p21、MDM2 和 MIC-1 的水平。给 MCF-7 细胞株异种移植小鼠隔日注射 $30\ mg/kg$ 的 ATSP-7041, 维持 23 d, 肿瘤抑制率达到 87%, 并且具有良好的 DMPK 性质及组织分布特性。

美国 Aileron Therapeutics 生物制药公司于 2014 年 10 月宣布其装订肽类 MDM2/MDM4 双重抑制剂 ALRN-6924 进入 I、II 期临床研究^[76]，它有望比已进入临床研究的选择性 MDM2 小分子抑制剂更加有效。ALRN-6924 是第一个进入人体试验的装订肽类药物，然而目前关于它的信息尚少。Aileron Therapeutics 公开的专利中提及不同类型的 大环拟肽类抑制剂。

2014 年, Lee 等^[77]发展了一类新型 MDM2/MDM4 双重抑制剂 p53LZ2。他们将 p53 转录激活区的 3 个关键氨基酸整合到具有 α 螺旋骨架的同源二聚体亮氨酸拉链结构上, 并将氨基酸 Glu10、Lys15 进行 Gly、Ser 替换, 得到 p53LZ2。该分子通过链内盐桥键和链间疏水作用维持结构稳定, 以 1:2 的比例同 MDM2 或 MDM4 的 N 端形成复合体, 从而阻断 MDM2 或 MDM4 与 p53 的结合。测试显示, p53LZ2 与 MDM2、MDM4 有较强的结合力(解离常数为 1.2 nM)。

离常数 K_D , MDM2 $K_D = 18 \text{ nmol/L}$, MDM4 $K_D = 80 \text{ nmol/L}$), 强于野生型 p53 (MDM2 $K_D = 61.3 \text{ nmol/L}$, MDM4 $K_D = 202 \text{ nmol/L}$)。细胞活性测试显示, p53LZ2 可以显著抑制 MDM2 过表达肿瘤细胞 SJSA-1 ($\text{IC}_{50} = 3.12 \mu\text{mol/L}$)、HCT-116 ($\text{IC}_{50} = 6.13 \mu\text{mol/L}$) 及 MDM2/MDM4 双过表达肿瘤细胞 MCF-7 ($\text{IC}_{50} = 2.20 \mu\text{mol/L}$) 的增殖。p53LZ2 可以升高 p53 及其下游蛋白 MDM2、p21、MIC-1 的水平,而不影响 P53 基因水平。

3.2 小分子双重抑制剂

2010 年, Reed 等^[78]报道了首个 MDM4 小分子抑制剂 SJ-172550(图 14),该化合物可与 p53 竞争 MDM4 的结合口袋(半数有效浓度 $\text{EC}_{50} = 4.3 \mu\text{mol/L}$)。SJ-172550 可以激活成视网膜细胞瘤的 p53 通路,诱导细胞凋亡,但并不引起 p53 水平升高。另有研究发现,SJ-172550 通过可逆共价方式与 MDM4 结合,使 MDM4 锁定在不利于与 p53 结合的构象^[79],但 SJ-172550 的作用机制可能远较此复杂。

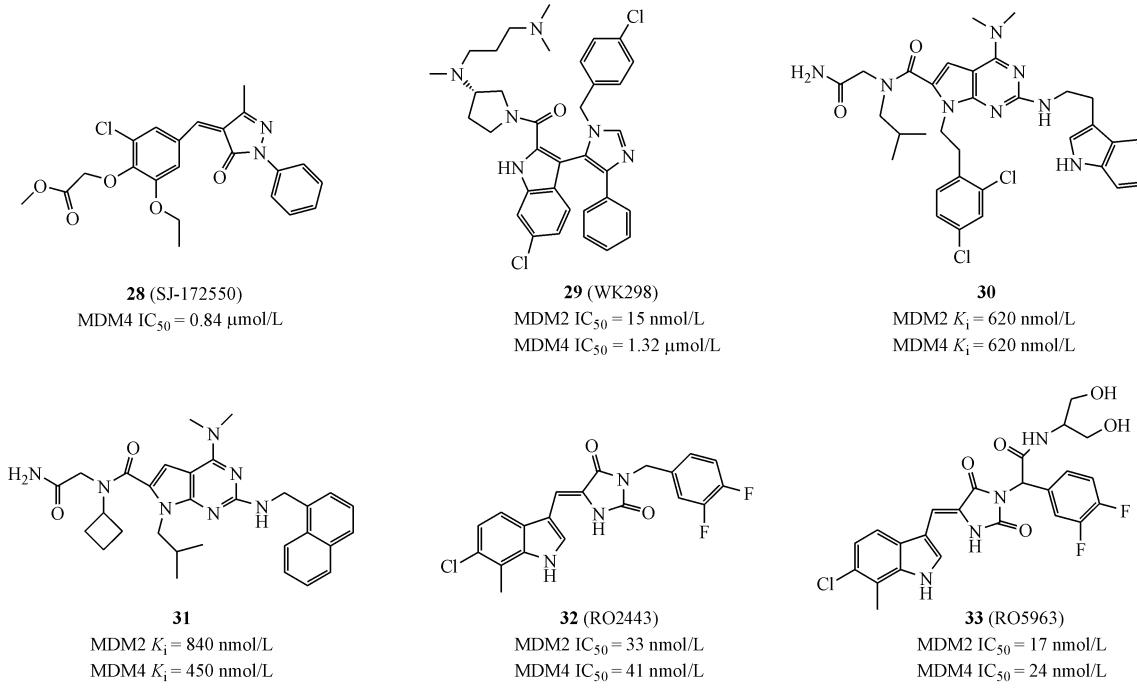


图 14 MDM2/MDM4 小分子双重抑制剂 28~33 的结构

Boettcher 等^[80]公开了一类 3-咪唑基吲哚类 MDM2/MDM4 小分子双重抑制剂,其中化合物 29 (WK298) 具有较好的活性。2012 年,结合有小分子抑制剂的 MDM4 晶体结构首次被报道^[65](图 15),Popowicz 等发现 WK298 的氯代吲哚恰好插入 MDM4 的 W23 口袋,其吲哚 NH 与 His54 形成氢键。WK298 虽不能像拟肽化合物 25 一样使 MDM4 的 L26 口袋完全打开,但可使 L26 口袋被诱导为“开放/闭合”的过渡态构象,从而契合氯代苯基。对比 p53-MDM4 和 WK298-MDM4 共晶结构可发现,WK298 中插入到 F19 口袋的苯基近乎垂直于 p53 的 Phe19,与 MDM4 的疏水作用较弱。然而,WK298 的 *N,N*-二甲基丙胺可覆盖 MDM4 的 Phe19 区域,与 Met61、Tyr66 可产生额外的疏水作用。

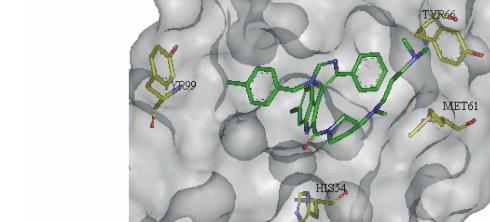


图 15 化合物 29 与 MDM4 的结合模式

2012 年有文献报道了吡咯并嘧啶类 MDM2/MDM4 小分子双重抑制剂 30 和 31(图 14)。化合物 30 和 31 的活性优于 p53,且溶解性和入胞能力比肽类抑制剂好。化合物 30 和 31 剂量依赖地升高 p53 野生型非小细胞肺癌细胞 H460 的 p53 和 p21 水平,诱导 caspase 3/7 水平升高,而对 p53 缺

失型非小细胞肺癌 H1299 则无活性^[81]。

吲哚海因类化合物 **32** (RO2443) 是 Roche 制药公司于 2012 年所报道的高活性 MDM2/MDM4 双重抑制剂 ($MDM2\text{ IC}_{50}=33\text{ nmol/L}$, $MDM4\text{ IC}_{50}=41\text{ nmol/L}$)^[67]。研究表明, 两分子 RO2443 通过 $\pi-\pi$ 堆积作用平行排列, 诱导两分子 MDM2 或 MDM4 形成同源或异源二聚体(图 16, PDB:3U15), 每个 RO2443 分子的吲哚环插入到一分子 MDM2 或 MDM4 的 F19 口袋, 而其二氟苯基则插入到另一分子 MDM2 或 MDM4 的 W23 口袋。在化合物 **32** 的二氟苄亚甲基上引入亲水基团得到活性提高近 2 倍的化合物 **33** (RO5963)。细胞实验表明, RO5963 剂量依赖地诱导 p53 野生型肿瘤细胞的周期阻滞和凋亡, 对 HCT-116 (MDM2 过表达)、MCF-7 (MDM2/MDM4 双过表达)、RKO (MDM2 过表达) 肿瘤细胞的 IC_{50} 约为 $2\sim3\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。RO5963 在 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 浓度下与 MCF-7 肿瘤细胞共孵育 48 h, 可杀死 70% 的肿瘤细胞。然而, RO5963 对 MDM2 过表达肿瘤细胞的抑制活性弱于 Nutlin-3a。

2012 年, Vogel 等^[82] 报道借助虚拟筛选发现石

胆酸(图 17, **34**)是 MDM2/MDM4 双重抑制剂。研究发现, 石胆酸可以竞争 MDM2 及 MDM4 的 p53 结合位点且对 MDM4 亲和力更强, 表明石胆酸可能是 MDM2/MDM4 的天然配体。石胆酸是具有肝毒性的内源性疏水次级胆汁酸, 具有致癌及促凋亡活性。研究表明, 石胆酸可激活 p53, 升高 caspase 3/7 的水平, 引起 HCT-116 肿瘤细胞凋亡。2014 年, Boltjes 等^[83] 报道基于 Ugi-四组分反应的新方法筛选到选择性 MDM4 抑制剂 **35**(图 17), 其对 MDM4 抑制活性($K_i=5\text{ }\mu\text{mol/L}$)是 MDM2 的 10 倍。

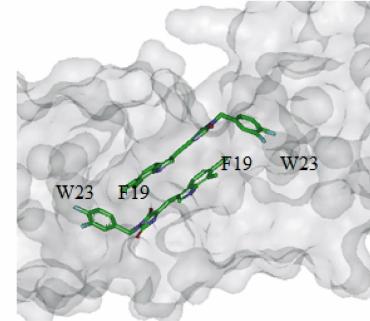


图 16 两分子 RO2443 诱导两分子 MDM4 形成同源二聚体

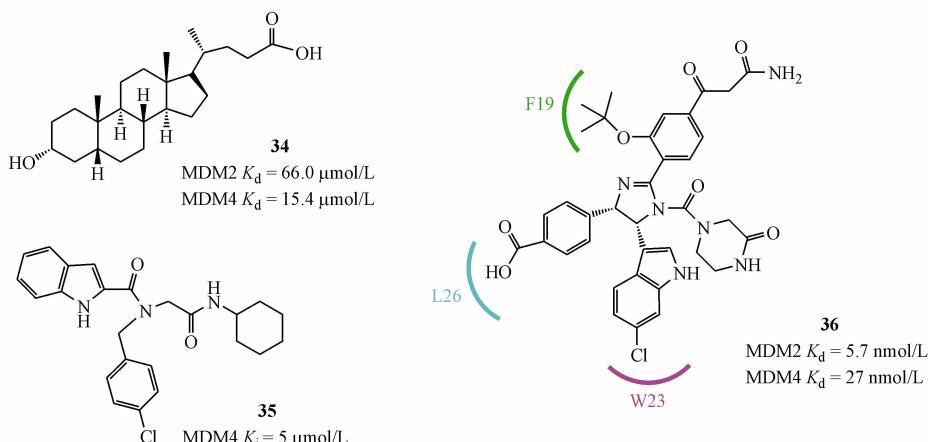


图 17 MDM2/MDM4 小分子双重抑制剂 **34~36** 的结构

Qin 等^[84] 将 MDM2 抑制剂 Nutlin-3a 成功改造成为高活性的 MDM2/MDM4 双重抑制剂 **36**(图 17)。Qin 等分析认为, 小分子 MDM2 抑制剂不能很好地与 MDM4 结合, 其原因之一可能在于 MDM4 的 W23 口袋和 L26 口袋柔性较大而易发生构象变化。晶体结构(图 18)比较分析发现, 结合有 Nutlin-3a 的 MDM2 构象与结合有 p53 肽的 MDM4 构象非常接近。因此, Nutlin-3a 被选作先导物以改善分子柔性为导向进行结构优化, 使其匹配结合有

p53 的 MDM4 构象, 结果得到高活性的 MDM2/MDM4 双重抑制剂 **36**(亲和力常数 K_d , $MDM2\text{ }K_d=5.7\text{ nmol/L}$, $MDM4\text{ }K_d=27\text{ nmol/L}$), 其对 MDM4 的亲和力比 Nutlin-3a($K_d=6.5\text{ }\mu\text{mol/L}$)提高了近 240 倍。细胞活性测试显示, 化合物 **36** 剂量依赖地激活 p53 野生型肿瘤细胞(HCT-116、RKO、H460a)的 p53 通路, 诱导 p21 水平升高, 对 MDM2、MDM4 过表达或 MDM2/MDM4 双过表达的小鼠胚胎成纤维肿瘤细胞 MEF 均有抑制作用。

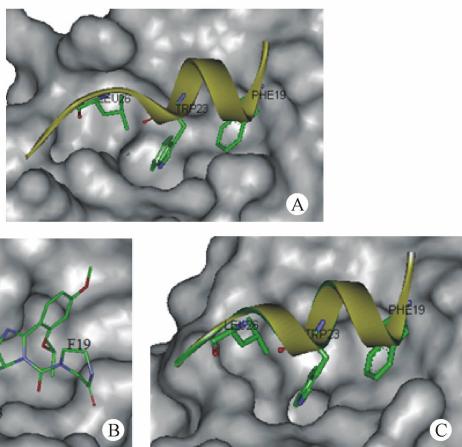


图18 p53-MDM2(A)、Nutlin-3a-MDM2(B)及p53-MDM4(C)结合模式比较

4 结语

近年来随着对p53研究的不断深入,一系列围绕p53通路的潜在抗肿瘤靶点被发现。其中,MDM2抑制剂发展最为迅速,并已有7个小分子化合物进入临床研究。尽管如此,MDM2抑制剂的疗效、抗瘤谱、不良反应及耐药性等问题还有待进一步研究,p53-MDM2相关信号通路也仍需深入理解。而MDM2/MDM4双重抑制剂尤其是小分子双重抑制剂的设计存在很大挑战,其开发仍处于起步阶段,目前只有1个肽类MDM2/MDM4双重抑制剂进入临床研究阶段。“诱导契合”作用以及提高小分子柔性为设计高活性MDM2/MDM4小分子双重抑制剂提供了思路,相信小分子双重抑制剂的研究在不久的将来会有突破性进展。

参考文献

- [1] Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells [J]. *Nature*, 1979, **278**(5701): 261-263.
- [2] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, **408**(6810): 307-310.
- [3] Jin SK, Levine AJ. The p53 functional circuit [J]. *J Cell Sci*, 2001, **114**(23): 4139-4140.
- [4] Feki A, Irminger-Finger I. Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, **52**(2): 103-116.
- [5] Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation [J]. *Cell*, 2009, **137**(4): 623-634.
- [6] Jones SN, Roe AE, Donehower LA, et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53 [J]. *Nature*, 1995, **378**(6553): 206-208.
- [7] Parant J, Chavez-Reyes A, Little NA, et al. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53 [J]. *Nat Genet*, 2001, **29**(1): 92-95.
- [8] Wade M, Li YC, Wahl GM, et al. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, **13**(2): 83-96.
- [9] Chen LH, Agrawal S, Zhou WQ, et al. Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**(1): 195-200.
- [10] Bottger A, Bottger V, Sparks A, et al. Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo [J]. *Curr Biol*, 1997, **7**(11): 860-869.
- [11] Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma [J]. *Nature*, 2006, **444**(7115): 61-66.
- [12] Jean-Christophe WM, Michael AD, Aart GJ. MDMX: from bench to bedside [J]. *J Cell Sci*, 2007, **120**(3): 371-378.
- [13] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 [J]. *Science*, 2004, **303**(5659): 844-848.
- [14] Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division [J]. *Cell*, 1997, **88**(3): 323-331.
- [15] Momand J, Zambetti GP, Olson DC, et al. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation [J]. *Cell*, 1992, **69**(7): 1237-1245.
- [16] Cheok CF, Verma CS, Baselga J, et al. Translating p53 into the clinic [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, **8**(1): 25-37.
- [17] Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: MDM2 and MDMX set the tone [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, **20**(5): 299-309.
- [18] Freedman DA, Levine AJ. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6 [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(12): 7288-7293.
- [19] Wallace M, Worrall E, Pettersson S, et al. Dual-site regulation of MDM2 E3-ubiquitin ligase activity ligase activity [J]. *Mol Cell*, 2006, **23**(2): 251-263.
- [20] Popowicz GM, Czarna A, Rothweiler U, et al. Molecular basis for the inhibition of p53 by Mdmx [J]. *Cell Cycle*, 2007, **6**(19): 2386-2392.
- [21] Wang X. p53 regulation: teamwork between RING domains of MDM2 and MdmX [J]. *Cell Cycle*, 2011, **10**(24): 4225-4229.
- [22] Wang X, Wang J, Jiang X. MdmX protein is essential for MDM2 protein-mediated p53 polyubiquitination [J]. *J Biol Chem*, 2011, **286**(27): 23725-23734.
- [23] Mancini F, Di Conza G, Monti O, et al. Puzzling over MDM4-p53 network [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, **42**(7): 1080-1083.
- [24] Kussie PH, Gorina S, Marechal V, et al. Structure of the MDM2

- oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain [J]. *Science*, 1996, **274**(5289):948–953.
- [25] Popowicz GM, Czarna A, Holak TA. Structure of the human Mdmx protein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain [J]. *Cell Cycle*, 2008, **7**(15):2441–2443.
- [26] Bottger V, Böttger A, Howard SF, et al. Identification of novel Mdm2 binding peptides by phage display [J]. *Oncogene*, 1996, **13**(10):2141–2147.
- [27] Bottger A, Böttger V, Garcia-Echeverria C, et al. Molecular characterization of the Hdm2-p53 interaction [J]. *J Mol Biol*, 1997, **269**(5):744–756.
- [28] Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: Implications for therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(6):1888–1893.
- [29] Wang S, Zhao YJ, Bernard D, et al. Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction for new cancer therapeutics [J]. *Top Med Chem*, 2012, **8**:57–80.
- [30] Khoo KH, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(3):217–236.
- [31] Zhao Y, Aguilar A, Bernard D, et al. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 inhibitors) in clinical trials for cancer treatment [J]. *J Med Chem*, 2014. doi: 10.1021/jm501092z.
- [32] Vu B, Wovkulich P, Pizzolato G, et al. Discovery of RG7112: a small-molecule MDM2 inhibitor in clinical [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, **4**(5):466–469.
- [33] Tovar C, Graves B, Packman K, et al. MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models [J]. *Cancer Res*, 2013, **73**(8):2587–2597.
- [34] US NIH. ClinicalTrials.gov. a) A study of RO5045337 [RG7112] in patients with advanced solid tumors [EB/OL]. (2007-11-15) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00559533>. b) A study of RO5045337 [RG7112] in patients with hematologic neoplasms [EB/OL]. (2008-02-18) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00623870>. c) A study of RO5045337 in patients with liposarcomas prior to debulking surgery [EB/OL]. (2010-06-11) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01143740>. d) A study of RO5045337 in patients with solid tumors [EB/OL]. (2010-07-15) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01164033>. e) An extension study of RO5045337 in patients participating in previous cancer studies [EB/OL]. (2012-08-30) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01677780>. f) A study of RO5045337 in combination with doxorubicin in patients with soft tissue sarcoma [EB/OL]. (2012-05-04) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01605526>. g) A study of RO5045337 in combination with cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia [EB/OL]. (2012-06-12) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01635296>.
- [35] Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, et al. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study [J]. *Lancet Oncol*, 2012, **13**(11):1133–1140.
- [36] Roche home. Promising data presented at ASH support continued development of multiple investigational medicines and demonstrate breadth of Roche's robust hematology pipeline. [EB/OL]. (2012-12-11) [2015-01-20]. <http://www.roche.com/investors/uploads/inv-update-2012-12-11.htm>.
- [37] Yee K, Martinelli G, Assouline S, et al. Phase 1b study of the MDM2 antagonist RG7112 in combination with 2 doses/schedules of cytarabine [C]//Abstract of the 55nd ASH Annual Meeting and Exposition. New Orleans, 2013.
- [38] Ding K, Lu YP, Zaneta NC, et al. Structure-based design of potent and non-peptide small-molecule inhibitors of the p53-MDM2 interaction [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(29):10130–10131.
- [39] Ding K, Lu YP, Zaneta NC, et al. Structure-based design of spirooxindoles as potent, specific small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction [J]. *J Med Chem*, 2006, **49**(12):3432–3435.
- [40] Shangary S, Qin D, McEachern D, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, **105**(10):3933–3938.
- [41] Yu S, Qin D, Shangary S, et al. Potent and orally active small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction [J]. *J Med Chem*, 2009, **52**(24):7970–7973.
- [42] Zhao Y, Liu L, Sun W, et al. Diastereomeric spirooxindoles as highly potent and efficacious MDM2 inhibitors [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135**(19):7223–7234.
- [43] Carry JC, Garcia-Echeverria C. Inhibitors of the p53/hdm2 protein-protein interaction-path to the clinic [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, **23**(9):2480–2485.
- [44] Dos-Santos O, Lagarde P, Pérot G, et al. Human dedifferentiated liposarcomas growth inhibition by SAR299155, a potent and selective disruptor of the MDM2-p53 interaction [J]. *Eur J Cancer*, 2012, **48**(5):S245–S246.
- [45] Wang S, Sun W, Zhao Y, et al. SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression [J]. *Cancer Res*, 2014, **74**(20):5855–5865.
- [46] Zhao Y, Yu S, Sun W, et al. A potent small-molecule inhibitor of the MDM2-p53 interaction (MI-888) achieved complete and durable tumor regression in mice [J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(13):5553–5561.

- [47] US NIH. ClinicalTrials.gov. a) Phase 1 safety testing of SAR405838 [EB/OL]. (2012-07-02) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01636479>. b) A safety and efficacy study of SAR405838 and pimasertib in cancer patients [EB/OL]. (2013-10-31) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01985191>.
- [48] Ding Q, Zhang Z, Liu JJ, et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development [J]. *J Med Chem*, 2013, 56(14): 5979 - 5983.
- [49] Bartkowitz DJ. Substituted pyrrolidine-2-carboxamides: US, 20100152190[P]. 2010-06-17 [2015-1-20].
- [50] US NIH. ClinicalTrials.gov. a) A first-in-human study of RO5503781 in patients with advanced malignancies, except leukemia [EB/OL]. (2011-10-27) [2015-1-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01462175>. b) A study of RO5503781 as single agent or in combination with cytarabine in patients with acute myelogenous leukemia [EB/OL]. (2013-01-18) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01773408>. c) A study of the drug-drug interaction of RO5503781 and posaconazole, the relative bioavailability of new formulations of RO5503781 and the food-effect on the pharmacokinetics of RO5503781 in patients with solid tumors [EB/OL]. (2013-07-09) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01901172>.
- [51] Rew Y, Sun D. Discovery of a small molecule MDM2 inhibitor (AMG232) for treating cancer [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(15): 6332 - 6341.
- [52] Bernard D, Zhao Y, Wang S. AM-8553: a novel MDM2 inhibitor with a promising outlook for potential clinical development [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(11): 4934 - 4935.
- [53] Sun D, Li Z, Rew Y, et al. Discovery of AMG 232, a potent, selective, and orally bioavailable MDM2-p53 inhibitor in clinical development [J]. *J Med Chem*, 2014, 57(4): 1454 - 1472.
- [54] Rew Y, Sun D, Yan X, et al. Discovery of AM-7209, a potent and selective 4-amidobenzoic acid inhibitor of the MDM2-p53 interaction [J]. *J Med Chem*, 2014. doi:org/10.1021/jm501550p.
- [55] US NIH. ClinicalTrials.gov. a) A phase 1 study evaluating AMG 232 in advanced solid tumors [EB/OL]. (2012-11-5) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01723020>. b) A phase 1b study evaluating AMG 232 alone and in combination with trametinib in acute myeloid leukemia [EB/OL]. (2013-11-21) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02016729>. c) A phase 1b/2a study evaluating AMG 232 in metastatic melanoma [EB/OL]. (2014-04-08) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02110355>.
- [56] Joerg B. Substituted isoquinolinones and quinazolinones: WO, 2011076786[P]. 2011-06-30 [2015-01-20].
- [57] Joerg B. Crystalline form of an inhibitor of MDM2/4 and p53 interaction: WO, 2012066095[P]. 2012-05-24 [2015-01-20].
- [58] US NIH. ClinicalTrials.gov. A phase I dose escalation study of CGM097 in adult patients with selected advanced solid tumors (CGM097X2101) [EB/OL]. (2013-01-02) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01760525>.
- [59] US NIH. ClinicalTrials.gov. a) Study of MK-8242 alone and in combination with cytarabine in participants with acute myelogenous leukemia (P07649) [EB/OL]. (2011-10-11) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01451437>. b) Study of safety and pharmacokinetics of MK-8242 in participants with advanced solid tumors (P07650) [EB/OL]. (2011-10-28) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01463696>.
- [60] Ma Y. Substituted piperidines that increase p53 activity and the uses thereof: US, 20080004287[P]. 2008-01-03 [2015-01-20].
- [61] Ma Y, Lahue BR, Gibeau CR, et al. Pivotal role of an aliphatic side chain in the development of an HDM2 inhibitor [J]. *ACSMed ChemLett*, 2014, 5(5): 572 - 575.
- [62] US NIH. ClinicalTrials.gov. A phase 1 multiple ascending dose study of DS-3032b, an oral murine double minute 2 (MDM2) inhibitor, in subjects with advanced solid tumors or lymphomas [EB/OL]. (2013-06-11) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01877382>.
- [63] Miyazaki M, Naito H, Sugimoto Y, et al. Lead optimization of novel p53-MDM2 interaction inhibitors possessing dihydroimidazothiazole scaffold [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(3): 728 - 732.
- [64] Uoto K. Imidazothiazole derivative having 4,7-diazaspiro[2.5]octane ring structure: WO, 2009151069[P]. 2009-12-12 (2015-01-20).
- [65] Popowicz GM, Czarna A, Wolf S, et al. Structures of low molecular weight inhibitors bound to MDMX and MDM2 reveal new approaches for p53-MDMX/MDM2 antagonist drug discovery [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(5): 1104 - 1111.
- [66] Patton JT, Mayo LD, Singhi AD, et al. Levels of HdmX expression dictate the sensitivity of normal and transformed cells to nutlin-3 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3169 - 3176.
- [67] Graves B, Thompson T, Xia M, et al. Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(29): 11788 - 11793.
- [68] Chang YS, Graves B, Guerlavais V, et al. Stapled α -helical peptide drug development: a potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for p53-dependent cancer therapy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(36): E3445 - 3454.
- [69] Böttger V, Böttger A, Garcia-Echeverria C, et al. Comparative study of the p53-MDM2 and p53-MDMX interfaces [J]. *Oncogene*, 1999, 18(1): 189 - 199.
- [70] Hu B, Gilkes DM, Chen J. Efficient p53 activation and apoptosis by simultaneous disruption of binding to MDM2 and MDMX [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8810 - 8817.
- [71] Phan J, Li Z, Kasprzak A, et al. Structure-based design of high affinity peptides inhibiting the interaction of p53 with MDM2 and

- MDMX[J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(3):2174–2183.
- [72] Pazgier M, Liu M, Zou G, et al. Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, **106**(12):4665–4670.
- [73] Li C, Pazgier M, Yuan W, et al. Systematic mutational analysis of peptide inhibition of the p53-MDM2/MDMX interactions [J]. *J Mol Biol*, 2010, **398**(2):200–213.
- [74] Kallen J, Goepfert A, Blechschmidt A, et al. Crystal structures of human MdmX(HdmX) in complex with p53 peptide analogues reveal surprising conformational changes [J]. *J Biol Chem*, 2009, **284**(13):8812–8821.
- [75] Bernal F, Wade M, Godes M, et al. A stapled p53 helix overcomes HDMX-mediated suppression of p53 [J]. *Cancer Cell*, 2010, **18**(5):411–422.
- [76] US NIH. ClinicalTrials.gov. Safety study of ALRN-6924 in patients with advanced solid tumors [EB/OL]. (2014-10-07) [2015-01-20]. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02264613>.
- [77] Lee JH, Kang E, Lee J, et al. Protein grafting of p53TAD onto a leucine zipper scaffold generates a potent HDM dual inhibitor [J]. *Nat Commun*, 2014. doi:10.1038/ncomms4814.
- [78] Reed D, Shen Y, Shelat AA, et al. Identification and characterization of the first small molecule inhibitor of MDMX [J]. *J Biol Chem*, 2010, **285**(14):10786–10796.
- [79] Bista M, Smithson D, Pecak A, et al. On the mechanism of action of SJ-172550 in inhibiting the interaction of MDM4 and p53 [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(6):e37518.
- [80] Boettcher A. 3-Imidazolyl-indoles for the treatment of proliferative disease: WO, 2008119741 [P]. 2008-10-09 [2015-01-20].
- [81] Lee JH, Zhang Q, Jo S, et al. Novel pyrrolopyrimidine-based α -helix mimetics: cell-permeable inhibitors of protein-protein interactions [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, **133**(4):676–679.
- [82] Vogel SM, Bauer MR, Joerger AC, et al. Lithocholic acid is an endogenous inhibitor of MDM4 and MDM2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(42):16906–16910.
- [83] Boltjes A, Huang Y, van de Velde R, et al. Fragment-Based library generation for the discovery of a peptidomimetic p53-MDM4 inhibitor [J]. *ACS Comb Sci*, 2014, **16**(8):393–396.
- [84] Qin L, Yang F, Zhou C, et al. Efficient reactivation of p53 in cancer cells by a dual MdmX/MDM2 inhibitor [J]. *J Am Chem Soc*, 2014. doi:10.1021/ja509223m.

· 本刊讯 ·

《中国药科大学学报》开通论文“快速通道”

为满足具有重大发现的论文、基金资助论文以及研究生论文等需要加快处理的要求,本刊编辑部特设“快速通道”,对符合要求的论文采用快速审稿流程,在收稿2周内将论文审稿结果(发表或修改后发表、按普通稿件处理、退稿)告知作者。审稿后,一经采用,本刊承诺在3个月内予以刊登。

“快速通道”论文投稿要求:

1. 具有重大发现的论文、基金资助论文、研究生论文等需要加快处理的论文,可以进入“快速通道”处理;
2. 应提供说明论文需要通过“快速通道”发表的理由,并在本刊投稿系统的“备注”处加以说明和注解;
3. 稿件应符合本刊《投稿须知》的要求,并附至少1位具高级职称的同行专家推荐意见;
4. 作者可推荐1~2名审稿专家(需注明其详细的联系方式,包括E-mail)供编辑部参考。

本刊编辑部对“快速通道”论文的声明:

1. 本刊拒绝一稿两投、两发(包括网上已经全文发表)的稿件。本刊将对所有来稿进行学术不端文献检测系统查新,杜绝学术不端。
2. 审稿通过可被本刊录用的稿件,但由于刊期原因未能及时见刊的,本刊将为作者开具稿件录用证明,以便研究生作者能顺利申请答辩。
3. “快速通道”论文免收审稿费,经专家审稿评价为优秀的研究性论文、选题前沿的热点综述性论文免收发表费。