

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Estratégias de química medicinal para
ativação da função supressora de tumores
da p53**

Mariana Nunes Esgueira Simões

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Manuel Duque Vieira

Marques dos Santos, Professora Auxiliar

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Estratégias de química medicinal para
ativação da função supressora de tumores
da p53**

Mariana Nunes Esgueira Simões

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Manuel Duque Vieira
Marques dos Santos, Professora Auxiliar

2021

Resumo

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, que inicia com a perda da função dos genes reguladores do ciclo celular por fatores ambientais e/ou internos.

A proteína supressora de tumores p53, também conhecida como "guardião do genoma", desempenha um papel fundamental no controlo do ciclo celular e na integridade do DNA, bem como outras funções celulares importantes. Para além disso, o especial interesse nesta proteína está relacionado com a sua inativação direta ou indireta em cerca de 50% das doenças malignas. Esta inativação é devido à presença de mutações no gene Tp53 ou pela elevada expressão dos seus reguladores negativos (MDM2 e MDMX). Por essa razão, desde a descoberta da proteína supressora de tumores p53, em 1979, esta tem sido objeto de intensa pesquisa e é considerada um alvo importante e desafiador na terapia contra o cancro.

Até ao momento várias classes de pequenas moléculas foram identificadas como potentes, seletivas e eficientes inibidores p53-MDM2. Para além disso, a inibição dual da interação p53-MDM2/MDMX mostrou ser uma abordagem alternativa, uma vez que resulta em ativação total da via dependente p53. O conhecimento dos requisitos estruturais cruciais para o desenvolvimento de inibidores de pequenas moléculas das interações p53-MDMs possibilitou a identificação de novos agentes antitumorais com maior eficácia *in vivo*.

Esta revisão, resume as principais abordagens de otimização que estão envolvidas no desenvolvimento e preparação de pequenas moléculas com capacidade de ativação e reativação da função supressora de tumor p53.

Palavras-chave: Cancro; Agentes Anticancerígenos; Química medicinal; p53; Desenho de fármacos.

Abstract

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, which begins with the loss of the function of cell cycle regulatory genes due to environmental and/or internal factors.

Tumor suppressor protein p53, also known as "guardian of the genome", plays a key role in cell cycle control and DNA integrity, as well as other important cellular functions. Furthermore, the special interest in this protein is related to its direct or indirect inactivation in about 50% of malignant diseases. This inactivation is due to the presence of mutations in the Tp53 gene or the high expression of its negative regulators (MDM2 and MDMX). For this reason, since the discovery of the p53 tumor suppressor protein in 1979, it has been the subject of intense research and is considered an important and challenging target in cancer therapy.

To date, several classes of small molecules have been identified as potent, selective and efficient p53-MDM2 inhibitors. Besides this, dual inhibition of the p53-MDM2/MDMX interaction was shown to be an alternative approach, as it results in full activation of the p53-dependent pathway. Knowledge of the crucial structural requirements for the development of small molecule inhibitors of p53-MDM interactions enabled the identification of new antitumor agents with greater efficacy in vivo.

This review summarizes the main optimization approaches that are involved in the development and preparation of small molecules capable of activating and reactivating the p53 tumor suppressor function.

Keywords: Cancer; Anticancer Agents; Medicinal Chemistry; p53; Drug Design.

Agradecimentos

Á minha querida família

Mãe (*Maria da Conceição Nunes Esgueira*),

Pai (*José Fernandes Simões*)

e Irmãs (*Ana Cláudia Esgueira Simões e Maria João Esgueira Simões*)

e ao meu fiel companheiro *Alexandre Santos*.

Esta monografia foi desenvolvida no âmbito do projeto PTDC/QUI-QOR/29664/2017 financiado pela FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia).

Abreviaturas

C_{max}: Concentração máxima

BDP: 1,4-benzodiazepina-2,5-dionas

BrdU: Bromo-2'-desoxiuridina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EdU: 5-etinil-2'-desoxiuridina

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

Et: Etil

FP: Polarização de fluorescência

GI₅₀: Concentração para 50% da inibição máxima da proliferação celular

Gln: Glutamina

His: Histidina

HTRF: Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (Fluorescência resolvida no tempo homogênea)

HTS: *High-throughput screening* (Rastreamento de alto rendimento)

IC₅₀: Concentração necessária para 50% da inibição máxima

K_i: Constante de inibição

Leu: Leucina

Lys: Lisina

MDM2: Minuto Duplo Murino 2

MDM4: Minuto Duplo Murino 4

Me: Metil

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

MTS:(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

MTT: Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

Mut: Mutante

NMR: Ressonância magnética nuclear

Phe: Fenilalanina

PK: propriedades farmacocinéticas

Py: Piridina

RNA: Ácido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal

SAR: Relação estrutura-atividade

Ser: Serina

SI: Índice de seletividade

SPR: *Surface Plasmon Resonance* (Ressonância de plasmão de superfície)

TDZ: 1,4 tienodiazepina-2,5-dionas

THF: Tetrahydrofurano

TR-FRET: *Time-resolved fluorescence resonance energy transfer* (Transferência de energia fluorescência resolvida no tempo)

Trp: Triptofano

WST-8: Tetrazólio solúvel em água-8: 2- (2-metoxi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-dissulfofenil) -2H-tetrazólio

Wt: tipo selvagem

Índice:

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Inibidores da interação p53-MDM2..... | 12 |
| 2.1. Cis-imidazolina (Nutlinas) | 13 |
| 2.2. Spirooxindóis..... | 16 |
| 2.2.1. Spiropirazolina Oxindoles..... | 16 |
| 2.2.2. Spirotiazolidina Oxindoles..... | 21 |
| 2.3. Pirrolidina-2-carboxamidas..... | 22 |
| 2.4. Piperidinonas e Morfolinonas..... | 25 |
| 2.5. Derivados de Benzodiazepinas..... | 31 |
| 2.6. Isoindolinonas..... | 33 |
| 2.7. Cromano-triazolopirimidinas..... | 34 |
| 2.8. Dihidroisoquinolinonas..... | 36 |
| 3. Inibidores da interação p53-MDMX e Duais p53- MDM2 e p53- MDMX..... | 39 |
| 3.1.Indoles..... | 40 |
| 4. Moléculas para degradação da MDM2..... | 44 |
| 5. Reativação da p53 mutante..... | 47 |
| 6. Conclusão..... | 50 |
| 7. Referências Bibliográficas | 52 |

Índice de Figuras:

| | |
|---|----|
| Figura 1. Otimização de Nutlinas até chegar ao composto RG7112. | 15 |
| Figura 2. Exemplos de oxindóis presentes na natureza..... | 16 |
| Figura 3. Otimização de spirooxindóis..... | 18 |
| Figura 4. Derivados de spirothiazolidinas..... | 21 |
| Figura 5. Identificação do composto RG7388 e outras otimizações..... | 24 |
| Figura 6. Otimização de piperidinona até chegar ao composto AMG23..... | 28 |
| Figura 7. Otimizações adicionais baseadas em AM-8553 para pesquisa de novos inibidores de MDM2..... | 29 |
| Figura 8. Otimizações adicionais baseadas em AGM-232 para pesquisa de novos inibidores de MDM2..... | 30 |
| Figura 9. Estrutura de derivados de BDP..... | 32 |
| Figura 10. Exemplos de derivados de benzodiazepinedionas. | 33 |
| Figura 11. Estratégias de otimizações do composto 49 ao 53..... | 34 |
| Figura 12. Estratégias de otimizações do composto 54 ao 56..... | 35 |
| Figura 13. Otimizações até chegar ao composto NVP-CGM097..... | 38 |
| Figura 14. Exemplo de inibidores da interação p53-MDMX..... | 40 |
| Figura 15. Exemplo de inibidores imidazol-indol WK298, WK23 e TAH-19..... | 41 |
| Figura 16. Estrutura dos inibidores RO-2443 e RO-5963..... | 42 |
| Figura 17. Pequenas moléculas que impedem a inibição de MDMX/MDM2..... | 43 |
| Figura 18. Esquema explicativo do mecanismo de ação da PROTAC. | 44 |
| Figura 19. Estrutura da PROTAC MD-222, MD-224 a partir do composto spirooxindole MI-1061 e descoberta de um novo ligante molecular MG-277..... | 45 |
| Figura 20. Estrutura da PROTAC TW-32..... | 46 |
| Figura 21. Pequenas moléculas direcionadas a p53 mutante..... | 49 |

1. Introdução

O cancro é uma doença multifatorial caracterizada pelo crescimento desregulado das células; as células tumorais replicam e espalham-se num processo chamado metástase, que é a maior causa das mortes relacionadas com o cancro [1].

Após quarenta anos de pesquisa estabeleceu-se que a proteína supressora de tumor p53 atua como um fator de transcrição, induzindo a expressão de vários alvos a jusante que desempenham um papel importante na regulação do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA, senescência, entre outros mecanismos celulares. Após sinais intrínsecos e extrínsecos de stresse celular, a ativação da via dependente de p53 pode comprometer o desenvolvimento e crescimento tumoral, evitando a proliferação de células danificadas com potencial oncogénico. Por essa razão, a p53 foi considerada como "guardião do genoma" por contribuir para a integridade do genoma [1-6].

Em condições fisiológicas e de stresse, a atividade supressora de tumor da p53 é estritamente regulada pela interação física com dois moduladores negativos, Minuto Duplo Murino 2 (MDM2) e 4 (MDMX), que atenuam ou inativam o efeito supressor tumoral da p53. Essas duas oncoproteínas exercem sua regulação negativa na atividade supressora tumoral p53 por meio de múltiplos mecanismos: (i) MDM2 e MDMX atenuam a função transcricional de p53, por meio de interação física com domínio NH₂-terminal de p53; (ii) MDM2 facilita a translocação de p53 do núcleo para o citoplasma, via domínio RING MDM2, tornando o p53 inacessível para atividade transcricional no núcleo; (iii) a atividade da ubiquitina ligase E3 da MDM2 promove a ubiquitinação da p53 e a degradação proteossomal subsequente. Embora a MDMX não seja uma ubiquitina ligase E3, ela é capaz de cooperar sinergicamente com o MDM2, potencializando a degradação da p53. O *feedback* autoregulatório entre a p53 e as proteínas MDM desempenha um papel crítico na regulação negativa da atividade da p53 sob estímulos fisiológicos e na eliminação da p53 acumulada sob estímulos de stresse. Uma desregulação deste *feedback* autoregulatório, por mutação/deleção do gene TP53 ou por uma elevada expressão de proteínas MDMs, podem neutralizar a função supressora de tumor p53 e promover uma proliferação incontrolável de células tumorais. A interrupção das interações de p53-MDM2 e p53-MDMX com pequenas

moléculas pode reativar a via dependente de p53 em células tumorais que retêm p53 do tipo selvagem e constitui uma estratégia atraente para a terapêutica do cancro [26].

Em 1996, determinou-se a estrutura cristalina da MDM2 complexada com a p53, fornecendo assim, os detalhes da interação p53-MDM2, surgindo, a possibilidade de desenho de inibidores desta interação. Especificamente, a estrutura cristalina mostra que a p53 adota uma configuração α -helicoidal e interage com a MDM2 principalmente através de três resíduos hidrofóbicos, Phe19, Trp23 e Leu26 que se agrupam num *pocket* hidrofóbico bem definido. Atualmente já foram descobertos novos aminoácidos importantes na interação p53-MDM2, como a Leu22 e a His96 e a investigação de novos inibidores da interação é alvo de grande estudo [27].

Vários artigos de revisão forneceram uma descrição detalhada dos processos de otimização que levou ao desenvolvimento de diferentes estratégias de química medicinal para ativação da função supressora de tumores da p53, tal como inibidores da interação p53-MDM2, inibidores da interação p53-MDMX e duais p53-MDM2 e p53-MDMX, moléculas para degradação da MDM2, e ainda reativação da p53 mutante. A presente revisão pretende dar uma visão geral e atualizada de diferentes moléculas capazes de ativar a função supressora de tumores da p53, com destaque nas diferentes estratégias de química medicinal, estudos de relacionamento estrutura-atividade (SAR), modos de ligação, dados bioquímicos, estudos mecanísticos e estudos pré-clínicos.

2. Inibidores da interação p53-MDM2

A MDM2 desempenha um papel primordial na inibição da função supressora de tumor p53 e antagoniza a p53 de forma direta. O bloqueio da interação MDM2-p53 liberta a proteína p53, restaurando assim a sua função supressora do tumor. Estas duas proteínas regulam-se mutuamente por *feedback* autoregulatório [7]. A ativação de p53 estimula a transcrição e produção de MDM2, que por sua vez se liga ao domínio de transativação N-terminal da p53, inibindo a sua função transcricional. A MDM2 também induz a exportação nuclear e degradação de p53 mediada por proteassoma pela atividade de ubiquitina ligase E3, promovendo mono e poliubiquitinação em vários resíduos de lisina. Esses eventos resultam em níveis diminuídos de p53 que, portanto, reduzem a expressão de MDM2, permitindo que a proteína p53 seja ativada novamente [8-10].

Pequenas moléculas que consigam bloquear a interação MDM2-p53 podem ter um potencial terapêutico para o tratamento de tumores humanos. A estrutura da p53 ligada a MDM2 adota uma conformação α -hélice e interage com MDM2 principalmente através de três resíduos hidrofóbicos, Phe19, Trp23 e Leu26. Os três resíduos-chave de ligação da p53 à MDM2, são compactos e bem definidos e sugerem a viabilidade do desenho de inibidores com alta afinidade para MDM2[10-13, 23].

Os inibidores MDM2/p53 mais promissores pertencem a diferentes classes de compostos, incluindo cis-imidazolininas, *spirooxindoles*, pirrolidinas, piperidinonas, derivados de benzodiazepinas, isoindolinonas e *dihidroisoquinolinonas*.

2.1. Cis-imidazolina (Nutlina)

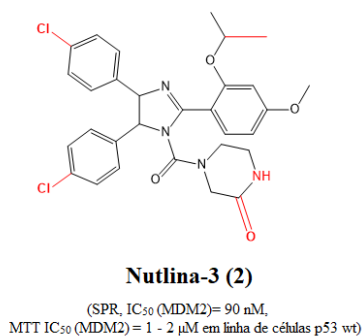
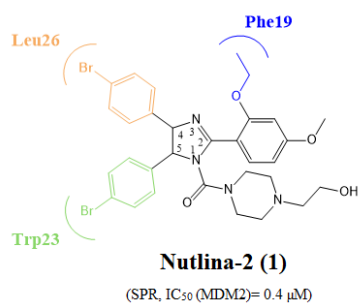
Apesar da investigação feita, o desenho de moléculas não-peptídicas específicas para a inibição da interação p53-MDM2, com um mecanismo de ação bem definido, provou ser muito mais difícil do que o previsto inicialmente. O primeiro avanço ocorreu em 2004, com a descoberta das nutlinas, pela empresa farmacêutica Hoffman-La Roche. Três compostos surgiram deste primeiro estudo, entre as nutlinas desenvolvidas inicialmente, foi o enantiopuro **Nutlina-3 (composto 2, figura 1)** que mostrou uma atividade mais promissora com um IC₅₀ de 1,5 µM em linha de células SJS-A-1 e um IC₅₀ de 90 nM num ensaio de ligação sem células (SPR) [12].

A estrutura cristalina da **Nutlina-2 (composto 1, figura 1)** complexada com a MDM2 mostrou claramente que as nutlinas mimetizam os três principais locais de ligação da p53 à MDM2 (Phe19, Trp23 e Leu26). A estrutura das nutlinas, consiste numa unidade de imidazolina tetrasubstituída, onde os dois substitutos para-bromofenil, nas posições 4 e 5, inserem-se diretamente em dois *pockets* no sítio de ligação MDM2 (Leu26 e Trp23, respetivamente). O átomo de bromo, posicionado na parte inferior do *pocket* Trp23, preenche uma pequena cavidade na superfície molecular de MDM2, que não é ocupada pelo anel indole da p53 Trp23. Encher este espaço com um átomo hidrofóbico, geralmente um halogénio, parece ser uma característica crítica de um inibidor MDM2 eficiente. O terceiro substituto fenil atinge o terceiro *pocket* Phe19 que é ocupado pela cadeia lateral do éter etílico. A cadeia N1 composta por um heterocíclico, com dois átomos de azoto e um grupo OH, não contribui para a sua atividade, mas funciona principalmente como “etiqueta de solubilidade” por aumentar consideravelmente a solubilidade em água; além disso, os três fragmentos de etileno hidrofóbicos melhoram os contatos hidrofóbicos, enquanto o grupo hidroxilo forma contatos polares com a cadeia lateral de Gln72. Todas essas características fornecem ao complexo uma superfície hidrofílica contínua [12-14].

Otimizações feitas na nutlina-3 para melhorar a sua afinidade de ligação à MDM2, citotoxicidade, farmacocinética e estabilidade química resultaram na descoberta de **RG7112 (composto 3, figura 1)**; o primeiro inibidor da interação a chegar a ensaios clínicos em pacientes com leucemia e neoplasias. A estratégia de otimização focou-se principalmente no estudo de diferentes grupos na cadeia lateral N1 e na remoção dos passivos de estabilidade encontrados nos compostos anteriores, e

preservar as características mais importantes para a ligação a MDM2, como os grupos de 4 clorofenil e isopropil, enquanto exploravam alterações em outros locais da molécula [14-15;28]. Como representado na **figura 1**, quatro grandes modificações foram feitas a Nutlina-3 para produzir RG7112: 1. um grupo de propil 3-(metilsulfonil) foi introduzido no anel piperidina para melhorar a ligação MDM2 e melhorar as propriedades farmacocinéticas (PK); 2. um grupo *tert-butil* foi usado para substituir o grupo de metoxi, que é um "ponto fraco" metabólico; 3. grupos metil no anel imidazolina foram adicionados para evitar a sua oxidação; 4. um grupo de éter etílico substituiu o éter isopropil, de modo a reduzir o peso molecular, mantendo uma boa afinidade de ligação a MDM2. Após as modificações substanciais na estrutura de Nutlina 3 para originar a estrutura final RG7112, verificou-se que ambos interagem com MDM2 de forma muito semelhante com base na sobreposição das estruturas cristalográficas. Os dois grupos de clorofenil ocupam os *pocket* Trp23 e Leu26 de MDM2, e o grupo etoxílico localizados no *pocket* Phe19. O metilsulfonil de RG7112 estende-se para fora do *pocket* de ligação e é exposto ao solvente [12-14].

O RG7112 apresentou melhores resultados em relação à Nutlina-3, (HTRF IC_{50} = 18 nM, MTT IC_{50} (MDM2) = 0.18 - 2.2 μ M em linha de células p53) e demonstra uma boa seletividade sobre linhas celulares p53 selvagem (IC_{50} = 5.7-20.3 μ M). Além disso, RG7112 numa dose diária de 100 mg/kg é capaz de reverter parcialmente o crescimento tumoral em modelos de camundongos de xenoinxertos de linhas celulares de osteossarcoma SJSA1 e MHM, não tendo mostrado sinais de toxicidade em camundongos [7]. Nos resultados dos ensaios clínicos (fase I) o composto demonstrou atividade anti-tumoral em pacientes com lipossarcoma, no entanto foram observados efeitos adversos graves incluindo neutropenia e trombocitopenia e, por isso, o composto foi retirado dos ensaios clínicos [88].



1. Otimização da cadeia N1
2. p-substituição
3. Adição de grupos metilo no anel imidazolina
4. Éter etílico substituiu o éter isopropil

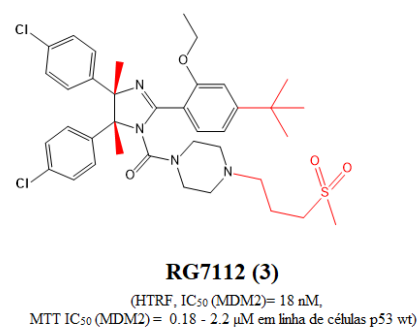


Figura 1. Otimização de Nutlinas até chegar ao composto RG7112.

Representação dos três *pockets* de ligação (Trp23-verde; Leu26-laranja; Phe19-azul), modificações com o objetivo de melhorar a propriedades farmacocinéticas a vermelho.

2.2. Spirooxindóis

2.2.1. Spiropirazolina Oxindole

Outro grupo de moléculas com grande promessa de inibir a interação p53-MDM2 são os spirooxindóis. Shaomeng Wang, da Universidade de Michigan, descreveu uma classe de compostos conhecidos como spirooxindóis usando uma estratégia computacional de novo *desing* baseada na estrutura onde o ponto de partida para estes estudos foi o *pocket* Trp23 da p53. Especificamente, o anel oxindole destes compostos mimetiza na perfeição o *pocket* Trp23, fornecendo ligações de hidrogénio (NH) e interações hidrofóbicas com a MDM2 (carbonilo), enquanto o anel spiro fornece uma estrutura rígida na qual os grupos hidrofóbicos se podem orientar para mimetizar a Leu26 e a Phe19. Numa primeira fase, iniciou-se a pesquisa de produtos naturais derivados de oxindole permitindo identificar alguns, como a **spirotriprostatina A** ou a **alstonisina (4 e 5, respetivamente, da Figura 2)**, embora, depois de conhecidas as suas estruturas, fosse claro que o impedimento estéreo não permitiria a ligação destes produtos naturais com a MDM2. No entanto, estes serviram como ponto de partida para o desenho de uma nova classe de inibidores da interação p53-MDM2 [29].

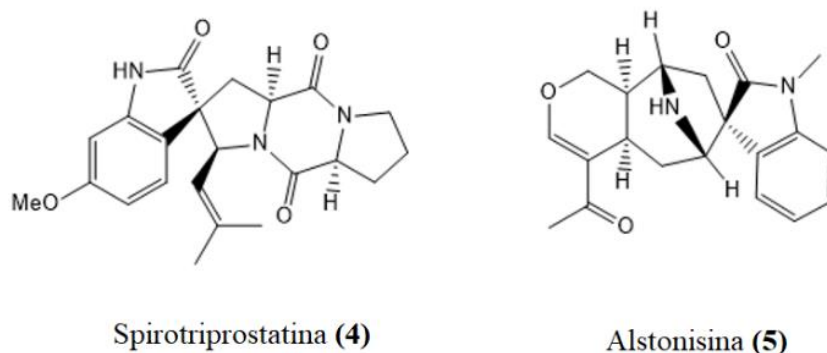


Figura 2. Exemplos de oxindóis presentes na natureza.

A partir desta estrutura de spirooxindóis foram feitos estudos onde foi descoberto o **composto 6** representado na **figura 3** (FP, K_i (MDM2) = 8.46 μM ; WST-8, IC_{50} (MDM2) = 9.7 μM , em linha de células LNCaP), e após várias otimizações e estudos estrutura-atividade (SAR) foi possível chegar ao **MI-43 (composto 7, figura 3)** que apresentou uma constante de afinidade de ligação para a MDM2 de 86 nM e um IC_{50}

de 0.83 μM em células cancerígenas da próstata humana com p53 *wild type* (LNCaP), com boa seletividade tanto para células normais como para células tumorais (FP, K_i (MDM2) = 86 nM; WST-8, IC_{50} (MDM2) = 0.83 μM , em linha de células LNCaP) [7]. Extensas análises de estrutura revelaram que o Leu22 da p53 também é fundamental para a ligação p53 a MDM2, pois está parcialmente exposto ao solvente e, portanto, mimetizar esse resíduo pode resultar não apenas num aumento da potência, como também na melhoria da PK, uma vez que poderia permitir a presença de grupos polares. Além disso, uma estratégia frequentemente eficaz para aumentar a estabilidade metabólica é a introdução de um átomo de flúor no grupo fenilo, que aumenta a potência. Estudos de acoplamento revelaram que não só esta cadeia lateral poderia mimetizar Leu22, mas o oxigênio da morfolina poderia possivelmente interagir por ligações de hidrogênio com Lys90 da MDM2 (mimetizando Glu17 da p53). Considerando tudo isto, o grupo de Wang atingiu o **MI-63 (composto 8, figura 3)** que mostrou ser altamente potente com uma constante de inibição de 3 nM, sendo 2000 vezes mais ativo do que o peptídeo p53 (FP, K_i (MDM2) = 3 nM; WST-8, IC_{50} (MDM2) = 0.28 μM , em linha de células LNCaP) [30, 88].

Mais tarde, em 2008, o mesmo grupo desenvolveu um composto chamado **MI-219 (composto 9, figura 3)**, com o objetivo de melhorar o perfil PK de MI-63, por este ter uma baixa biodisponibilidade oral, foram realizadas investigações adicionais, especialmente sobre o substituinte de morfolina. MI-219 mostrou resultados promissores, sendo ativo na reativação p53 e apresenta uma toxicidade muito baixa (FP, K_i (MDM2) = 13.1 nM, WST-8, IC_{50} (MDM2) = 0.7 μM , em linha de células SJSA-1). Outro composto bastante interessante nesta série foi **MI-147 (composto 10, figura 3)**. MI-147 mostrou valores muito baixos de K_i , sendo um inibidor altamente potente, capaz de ativar seletivamente p53 em linhas celulares SJSA-1 e induzir a morte celular dependente da dose (FP, K_i (MDM2) = 0.86 nM; WST-8, IC_{50} (MDM2) = 0.25 μM , em linha de células SJSA-1). No entanto, estes novos derivados exigiam altas doses orais (200-300 mg/kg) para conseguir inibir ou levar a uma regressão no crescimento tumoral em camundongos. Este último objetivo foi alcançado com o desenvolvimento de novos compostos, como **MI-888 e MI-77301 (compostos 11 e 12, respectivamente, figura 3)**, sintetizados numa nova série de otimizações na cadeia 5' da cauda pirrolidina, com a introdução de restrições conformacionais, na tentativa de aumentar a estabilidade metabólica [31-33, 88].

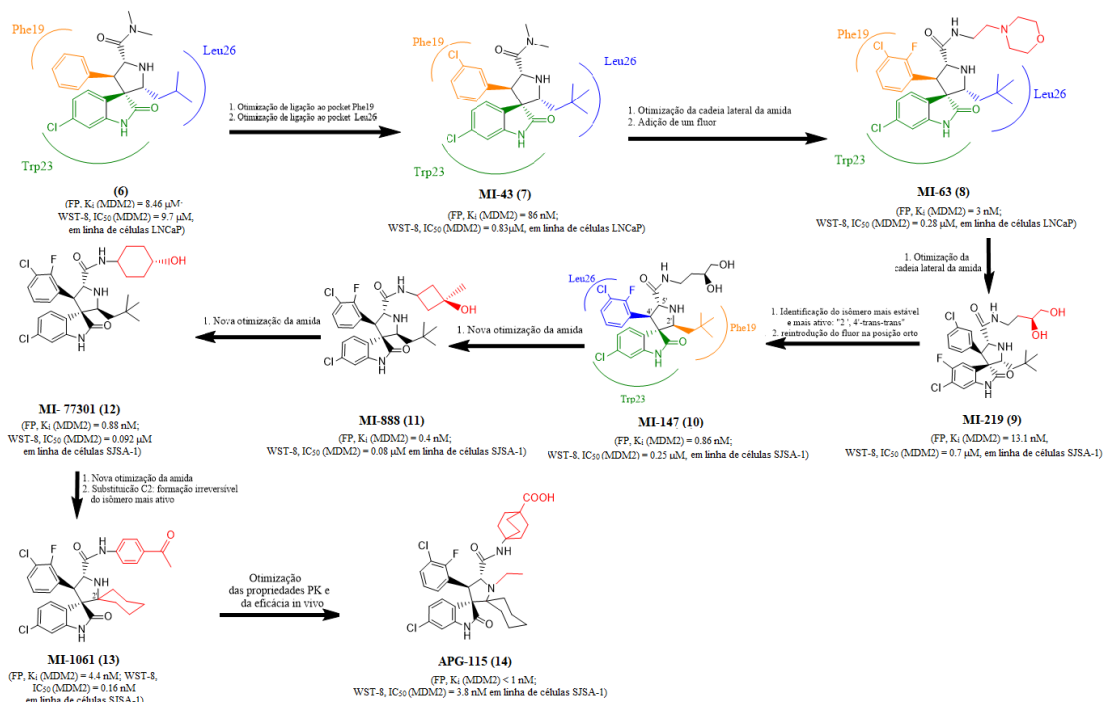


Figura 3. Otimização de spirooxindóis.

A otimização estrutural do composto MI-219 levou ao desenvolvimento do composto MI-888 (FP, K_i (MDM2) = 0.4 nM; WST-8, IC_{50} (MDM2) = 0.08 μ M em linha de células SJS-1), no qual a parte 1,2-diol da molécula foi restrita pela inserção de um anel ciclobutil, impedindo o metabolismo oxidativo. Além disso, o átomo de flúor foi removido do anel oxindole, levando ao aumento da afinidade de ligação MDM2 e melhora do perfil farmacocinético. Em 2012, o composto MI-888 demonstrou mais de 100 vezes seletividade sobre linhas celulares com p53 mutado, ativando uma via dependente de p53 que leva à interrupção do ciclo celular e/ou à apoptose em células tumorais *in vitro* e em modelos de tumor de xenoinxerto *in vivo* [12, 16].

Uma vez que MI-888 não conseguiu a regressão completa do tumor, o seu estudo foi dirigido na otimização da sua estrutura o que permitiu chegar ao composto MI-77301, também conhecido como SAR405838 onde exibe uma estereoquímica diferente no átomo de carbono quaternário e alterou padrões de substituição de halogênio em ambos os anéis fenil, bem como um grupo ciclohexanol [33]. O seu modo de ligação é semelhante ao de outros spirooxindoles, mimetiza os três resíduos-chave de p53 (Phe19, Leu26, Trp23). Ao contrário dos outros compostos, o MI-77301 captura interações adicionais. O átomo C1 de seu grupo oxindole estabelecem interações hidrofóbicas com MDM2. A cadeia lateral imidazol de His96 em MDM2 e o grupo carboxilo de MI-77301 interagem através de uma ligação de hidrogênio. Em contraste com as estruturas co-cristalinas de p53-MDM2 e nutlina-MDM2, em MI-77301-MDM2, o N-terminal de MDM2 forma extensas interações com MI-77301. Isso se deve ao dobrar de resíduos de MDM2, que interagem com MI-77301 através de Val14 e Thr16. Através dessas interações adicionais, o MI-77301 atinge grande afinidade de ligação (FP, K_i (MDM2) = 0.88 nM; WST-8, IC_{50} (MDM2) = 0.092 μ M em linha de células SJS-1). Bill et al. relataram os efeitos pré-clínicos do MI-77301 tanto nos modelos de lipossarcoma *in vitro* quanto *in vivo*. Este composto demonstrou ainda um perfil farmacocinético oral promissor em camundongos. Mesmo que administrado como agente único, induziu apoptose em baixas concentrações. MI-77301 promoveu regressão tumoral completa após administração oral de 200 mg/kg, enquanto outros potentes inibidores MDM2 (RG7112 e RG7388) não alcançaram esse efeito. Em conclusão, o MI-77301 mostrou dados pré-clínicos muito promissores e está atualmente em testes clínicos para vários tumores sólidos [33-34].

Mais tarde uma segunda geração de spirooxindóis com a descoberta de que alguns oxindoles da spiropirrolidina poderiam sofrer abertura reversível do anel e ciclização do anel de pirrolidina em solução prótica, dando origem a diferentes estereoisômeros com diferentes afinidades de ligação ao MDM2 [32]. Esta segunda geração possui substituintes simétricos na posição C2 do anel de pirrolidina que permitem uma conversão rápida e irreversível para o diastereoisômero mais ativo, como é o caso do **MI-1061 (composto 13, figura 3)** (FP, K_i (MDM2) = 4.4 nM; WST-8, IC_{50} (MDM2) = 0.16 nM em linha de células SJSA-1). Curiosamente, o melhor diastereómero revelou uma melhor ligação ao MDM2 com o anel pentil e fenil ocupando agora os *pockets* Phe19 (p53) e Leu26 (p53), respectivamente. Além disso, o carbonilo da cadeia lateral é capaz de estabelecer uma ligação H com a cadeia lateral de imidazol de His96 e o grupo hidroxilo terminal com a cadeia lateral de Lys94 [32, 88].

Os estudos de PK mostraram que o composto MI-1061 tinha valores de C_{max} e AUC consideravelmente mais baixos do que o composto MI-77301 após administração oral, indicando que é necessário melhorar ainda mais a PK oral para uma atividade antitumoral *in vivo* mais forte. Outras modificações estruturais para melhorar a absorção foram então realizadas através da diminuição da lipofilia, redução da acidez dos ácidos carboxílicos, aumento da basicidade do átomo de azoto no núcleo da pirrolidina, chegando então à descoberta do composto **APG-115 (composto 14, figura 3)**. APG-115 mostrou afinidade de ligação bastante alta para MDM2, com valores de K_i (MDM2) <1 nM e IC_{50} (MDM2) = 3.8 nM em linha de células SJSA-1 após uma única administração oral. Para além disso, o composto APG-115 atingiu a inibição significativa do crescimento dos tumores de xenoinxerto SJSA-1 em camundongos e demonstrou forte eficácia antitumoral no modelo de leucemia aguda RS4-11 [63].

2.2.2. Spiro[oxindol-3,3'-tiazolidinas] Oxindoles

Uma série de spiro[oxindol-3,3'-tiazolidinas] foram sintetizados, em que o **ISA27 (composto 15, figura 4)** destacou-se como o derivado mais potente em linhas celulares (MTT, IC_{50} (MDM2) = 0.87 μ M, em linha de células U937) [64]. Uma vez que o ISA27 apenas mimetiza dois dos três aminoácidos principais da p53, foram feitos posteriormente estudos de SAR focados na abertura do anel de imidazol do composto ISA27 na tentativa de aumentar a diversidade estrutural e introduzir pontos extras de ligação. Em 2013, **SM13 (composto 16, figura 4)** emergiu deste estudo com um melhor ajuste ao *pocket* (MTT, IC_{50} (MDM2) = 0.04 μ M, linha de células MCF-7) [65].

Estudos de *docking* sugeriram que a porção 3-ciclohexilcarboxi ocupava o *pocket* Trp23 (p53) e a cadeia lateral do éster etílico ocupava o *pocket* Phe19 (p53). O *pocket* Leu26 (p53) é apenas ligeiramente ocupada pelo anel oxindole, no entanto parece ser de alguma forma compensada por interações hidrofóbicas extras obtidas através do grupo N1-metilo. A inibição da interação p53-MDM2 foi avaliada *in vitro* através do método de ELISA, onde os compostos ISA27 e SM13 atingiram uma inibição de 25% e 30% da interação, respectivamente, atingindo melhores resultados comparativamente a nutlina-3 que inibiu apenas 19%. SM13 além de inibir a interação p53-MDM2, atua de forma estritamente dependente da p53 [39,40,62].

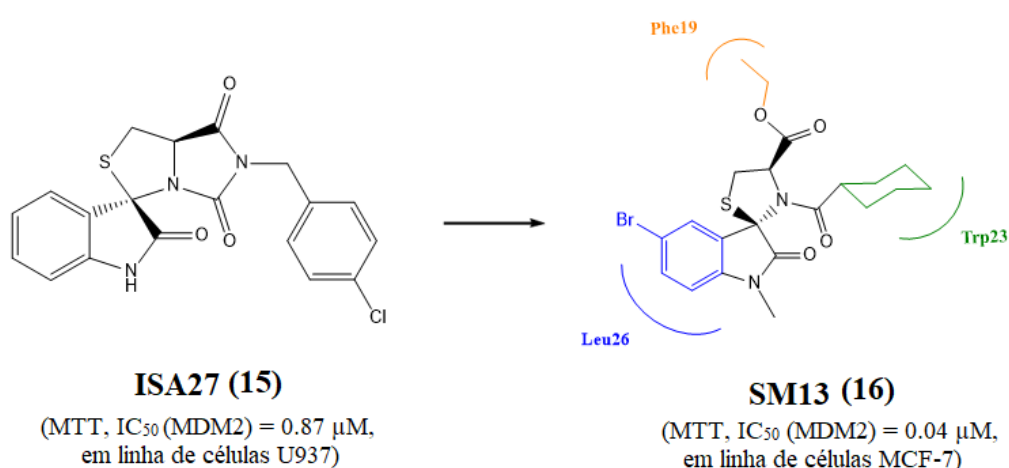


Figura 4. Derivados de spiro[oxindol-3,3'-tiazolidinas].

2.3. Pirrolidina-2-carboxamidas

Além dos inibidores de MDM2 à base de spirooxindole (conhecidos como série MI), o grupo de Graves identificou outra série de inibidores de MDM2, como RG7388, RO8994, RO2468 e RO5353 (**figura 5**). Este programa foi iniciado para identificar novos inibidores de MDM2 com novos *scaffolds*, nos quais dois grupos arilo (A e B no composto 17) são '*trans*' entre si, diferente dos compostos RG7112 e MI-219, onde anéis A e B em ambos os compostos são '*cis*' entre si [48].

Com base nas estruturas de RG7112 e MI-219 desenvolveram o **composto 17** representado na **figura 5** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 196 nM), que era menos potente do que RG7112 (IC_{50} (MDM2) = 18 nM), mas significativamente mais potente do que o seu enantiômero (IC_{50} (MDM2) > 10 000 nM). A introdução do átomo de flúor em ambos os anéis fenil originou o **composto 18** da **figura 5**, com melhor afinidade de ligação para MDM2 (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 74 nM). No entanto, os compostos 17 e 18 mostraram ter biodisponibilidade oral baixa e altas taxas de depuração em estudos de PK com camundongos. A resolução para este problema passou por substituir a cadeia lateral do diol, de modo a evitar a sua metabolização por oxidação. Posto isto, uma nova série de análogos com diversas cadeias laterais de amida foram desenvolvidas. Destes compostos, o **composto 19** representado na **figura 5** com o grupo de ácido *p*-benzóico mostrou perfis de PK, potência e seletividade celular significativamente melhores (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 22 nM). Hoffman-La Roche desenvolveu posteriormente **RG7388 (composto 20, figura 5)**, com modificações subsequentes pela introdução de grupos no anel fenil (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 6 nM; MTT, IC_{50} (MDM2) = 10 nM em linha de células SJS-1). Promoveu a regressão do tumor a 25 mg/kg com doses diárias em xenoinxertos de camundongos SJS-1. Comparativamente às nutlinas, RG7388 alcançou uma eficácia *in vivo* significativamente maior contra xenoinxertos de tumores de osteossarcoma humanos em relação ao composto RG7112, mesmo em doses mais baixas. Com a dose de 50 mg/kg, RG7112 alcançou 74% de inibição de crescimento tumoral, enquanto RG7388 obteve inibição de crescimento de 84% em doses muito menores (12.5 mg/kg) [16,22, 35-38].

A combinação de RG7388 com a estrutura de oxindole deu origem ao **composto 21** da **figura 5**, com semelhanças estruturais com MI-77301 mas uma ligeira diferença

na cadeia lateral da amida. No entanto, o composto 21 também demonstrou ter uma alta taxa de depuração (34.6 mL/min/kg) e boa biodisponibilidade oral (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 5 nM). O **RO8994 (composto 22, figura 5)**, (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 5 nM, IC_{50} (MDM2) = 13 nM, em linha de células SJSA-1) surgiu do estudo SAR focado especialmente em modificações adicionais na cadeia lateral, por meio de conversão do ácido carboxílico terminal por um grupo carboxamida, que exibiu taxa de depuração significativamente diminuída (5.8 mL/min/kg) e biodisponibilidade oral melhorada. Para além disso, o grupo aromático C, nos compostos RG7388 e RG8994, pode melhorar a estabilidade metabólica, propriedades PK, potência e seletividade celular e eficácia *in vivo*, em comparação com MI-888 com uma cadeia lateral de amida alifática, como representado na figura 5. RG7388 e RO8994 induzem a estabilização de p53, paragem do ciclo celular e apoptose em células tumorais que retêm p53 wt de forma dependente da dose e não genotóxica. A interação entre o grupo 6-clorooxindol e o *sub-pocket* Trp23 é considerada a mais crucial.

O grupo de Graves desenvolveu outras derivatizações de RO8994 no 6-clorooxindol por estratégias de substituição bioisotérica, criando uma nova série de análogos de RO8994. Entre esta série, **RO2468 (composto 23, figura 5)** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 6 nM; MTT, IC_{50} (MDM2) = 3 nM, em linha de células SJSA-1) e **RO5353 (composto 24, figura 5)** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 7 nM; MTT, IC_{50} (MDM2) = 2 nM em linha de células SJSA-1), mostraram-se promissores para o desenvolvimento clínico com excelentes perfis de PK, com eficácia *in vivo* em modelos de xenoinxerto SJSA1 e grande potência/seletividade celular. Além disso, estudos computacionais mostraram que esta série de compostos tinha modelos de ligação semelhantes com MI-77301. O 6-clorooxindol ocupou o *pocket* Trp23 com NH através de uma ligação de hidrogénio com o carbonil da MDM2, enquanto o grupo fenilo 2-fluoro-3-cloro e o grupo neopentilo foram preenchidos nos *pockets* hidrofóbicos Leu26 e Phe19, respetivamente [36-38,63].

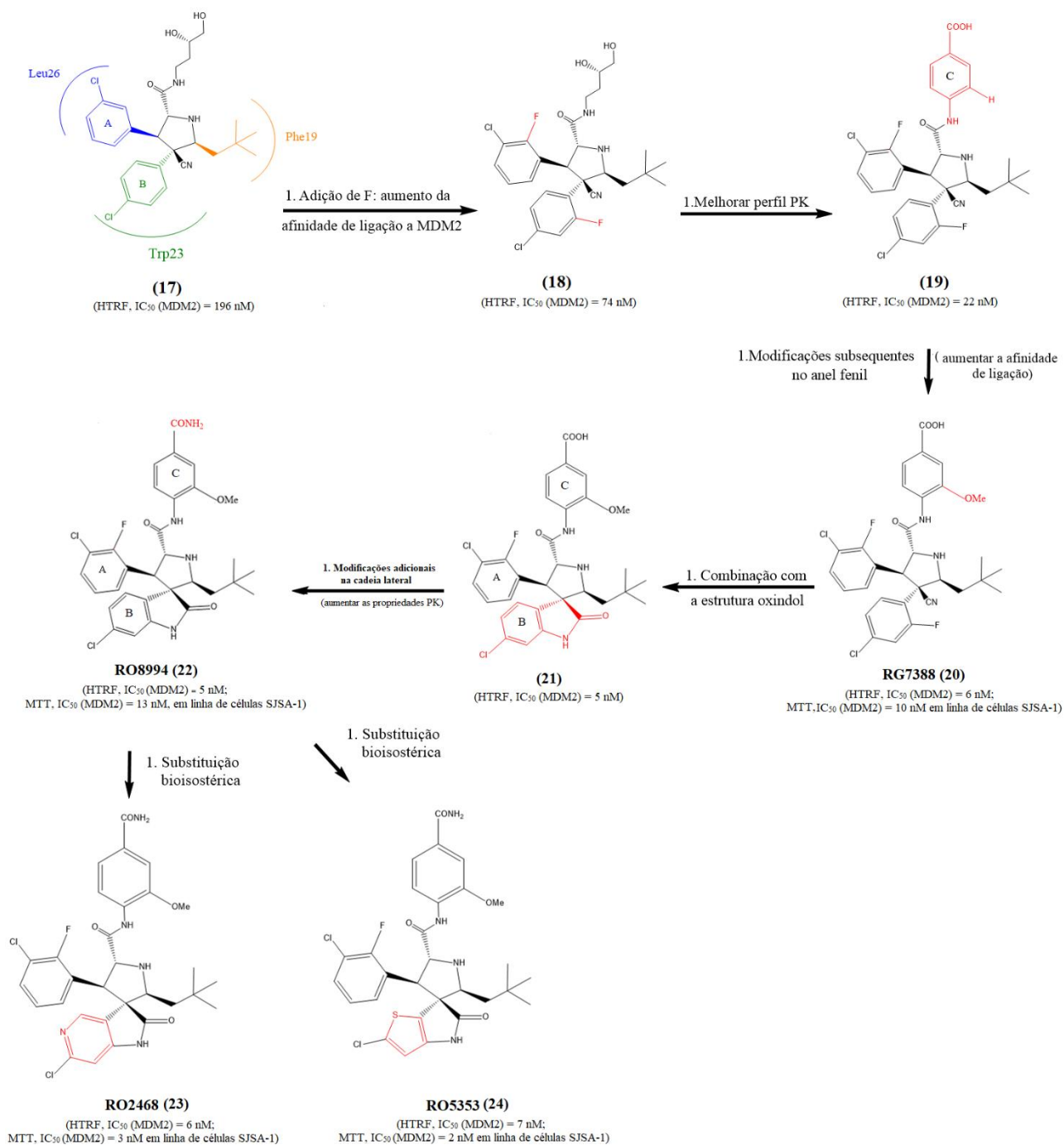


Figura 5. Identificação do composto RG7388 e outras otimizações.

2.4. Piperidinonas e Morfolinonas

Com base nas informações estruturais, o grupo Sun da Amgen inc. iniciou um novo projeto de *scaffolds* de piperidinona, seguido de extensas otimizações, com base no conhecimento de que a maioria dos inibidores têm dois grupos aromáticos vicinais ligados a um núcleo heterocíclico rígido. Dos vários *scaffolds* representativos obtidos a **morfolinona (composto 25, figura 6)**, exibiu um potencial de otimização adicional com um valor de IC_{50} (MDM2) = 5.4 μ M [68-70,63].

A introdução de um grupo benzil na posição C2 da morfolinona produziu o **composto 26 da figura 6** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 2.0 μ M), com uma potência cerca de 2.5 vezes superior, devido à interação entre o anel aromático do grupo benzil com o *pocket* Phe55 na região hidrofóbica. A estrutura cristalografica do composto 26 com MDM2 mostrou que os anéis 6- e 5-p-bromofenil ocupam o *pocket* Phe19 e Trp23, respetivamente. No entanto, um dos três *pockets* hidrofóbicos principais permanecia desocupado, pois a interação do grupo benzil não foi projetada para o *pocket* Leu26. Em vez disso, este interagiu com o *pocket* Phe55. Para resolver este problema, o átomo de bromo na posição *para* do grupo fenil C6 foi deslocado para a posição *meta*. O *pocket* Phe19 pode ser preenchido pela N-substituição do grupo metilo para o grupo ciclopropilmetilo, correspondente ao **composto 27 da figura 6** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 1.8 μ M), com afinidade de ligação ligeiramente aumentada. A posterior introdução de um grupo ácido acético na posição C2 no composto 27 levou ao desenvolvimento do **composto 28** representado na **figura 6** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 0.3 μ M; EdU, IC_{50} (MDM2) = 15.7 μ M, em linha de células SJS-A-1), com mais potência do que o composto 27. A estereoquímica desempenhou um papel fundamental no aumento da potência, como mostra os resultados obtidos após a variação da estereoquímica dos substituintes C2 e C6 no composto 28, dando origem ao **composto 29 da figura 6** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 0.14 μ M). No entanto, a proximidade do ácido carboxílico ao oxigênio da morfolinona poderia desestabilizar a conformação de ligação ideal por repulsão eletrostática, por essa razão, foi substituído o oxigênio por um grupo metileno, dando origem a derivados mais potentes com um núcleo de piperidinona, como é o caso do **composto 30** representado abaixo na **figura 6** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 34 nM; EdU, IC_{50} (MDM2) = 3.4 μ M em linha de células SJS-A-1) [57-59,63].

Os próximos estudos de SAR focaram-se principalmente nas alterações conformacionais de modo a garantir que a melhor conformação fosse favorecida. Para alcançar a ligação com o *pocket* Phe19 da MDM2, o grupo ciclopropilmetilo do composto 26 deve adotar uma orientação “*syn*” (para baixo). No entanto, uma vez que a anti-conformação alternativa é mais estável, previu-se que a introdução de um grupo no carbono alfa do azoto da piperidinona poderia direcionar adequadamente o grupo esperado para o *pocket*, desenvolvendo o **composto 31** da **figura 6** com potência significativamente melhorada (HTRF, IC₅₀ (MDM2) = 4.2 nM; EdU, IC₅₀ = 0.48 μM, em linha de células SJS-1). O grupo éster ajudou a orientar o N-substituinte no *pocket* hidrofóbico Phe19, conseguindo assim uma interação mais estável [71,72].

Outro aspeto importante observado na conformação de ligação é a necessidade dos grupos arilo C5 e C6 adotarem uma orientação tipo *gauche*, por ser a preferida para a ligação ótima. Para isso, a introdução de outro substituinte na posição C3 poderia criar uma repulsão favorecendo a conformação desejada. O controle conformacional por introdução de um grupo metilo em C3 deu origem ao **composto 32** da **figura 6** (HTRF, IC₅₀ (MDM2) = 2.2 nM; EdU, IC₅₀ (MDM2) = 0.19 μM, em linha de células SJS-1), cerca de 2-3 vezes mais potente do que o composto 27. A substituição do grupo éster, direcionado para fora da região do solvente, pelo grupo hidroximetilo resultou no **composto 33** da **figura 6**, **AM-8553** (HTRF, IC₅₀ (MDM2) = 1.1 nM; EdU, IC₅₀ (MDM2) = 68 nM, em linha de células SJS-1) mostrou alta potência e baixa depuração humana (CL = 0.03 L/h/kg), com capacidade de inibir o crescimento do tumor e até mesmo promover a regressão parcial do tumor. Outras otimizações foram estudadas com a intenção de conseguir preencher uma região hidrofóbica pouco explorada, denominada Gly58 próxima ao *pocket* Phe19. Com base nisso, mais estudos de SAR foram realizados na cadeia N-lateral para promover a nova interação na esperança de melhorar a afinidade de ligação a MDM2, mantendo uma seletividade favorável e uma baixa depuração intrínseca em hepatócitos humanos [69-72].

A substituição da fração do álcool secundário do composto AM-8553 por um grupo metilo e ciclopropilsulfonamida deu origem aos **compostos 34** e **35**, respetivamente ilustrado abaixo na **figura 6**. O composto 30 obteve uma baixa potência contra células SJS-1 possivelmente devido à baixa permeabilidade (HTRF, IC₅₀ (MDM2) = 0.1 nM; EdU, IC₅₀ (MDM2) = 0.24 μM, em linha de células SJS-1). A

otimização pela introdução de um grupo ciclopropil que se verificou estar em contato com o *pocket* Gly58, desencadeou a formação de um composto 35 altamente potente tanto no ensaio de proliferação celular (IC_{50} (MDM2) = 5 nM) como no ensaio bioquímico de HTRF (HTRF, IC_{50} = 0.2 nM). No entanto, ambos os compostos 34 e 35 mostraram depuração moderada a alta em hepatócitos de rato e humanos. Com o objetivo de promover a estabilidade metabólica, a estratégia adotada foi substituir a sulfonamida por uma porção de sulfona, dando origem ao **composto 36** representado na **figura 6**, com aumento da estabilidade metabólica e depuração intrínseca diminuída, com potência demonstrada em ensaios bioquímicos e proliferação celular (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 0.1 nM; EdU, IC_{50} (MDM2) = 3 nM, em linha de células SJSA-1) [16, 73].

Otimizações adicionais por n-substituição levaram ao **AMG-232 (composto 37, figura 6)**, e em 2012 o composto entra em ensaios clínicos. Embora o composto 36 fosse mais ativo do que AMG232, oferecia propriedades de PK mais pobres em estudos *in vivo*. AMG-232 mostrou cerca de 2500 vezes maior seletividade *in vivo* no modelo de osteossarcoma SJSA-1 amplificado por MDM2 (HTRF, IC_{50} = 0.6 nM; EdU, IC_{50} (MDM2) = 9.1 nM, em linha de células SJSA-1). A combinação de AMG232 com outros agentes citotóxicos, como cisplatina, carboplatina, doxorrubicina e irinotecano, resultou na eficácia anti-tumoral sinérgica. Relativamente á estrutura de ligação entre AMG232 e MDM2, como esperado, os três aminoácidos principais de p53, Phe19, Trp23 e Leu26, estão espelhados por isopropil, grupo aril C6 e grupo aril C5, respetivamente [68, 73].

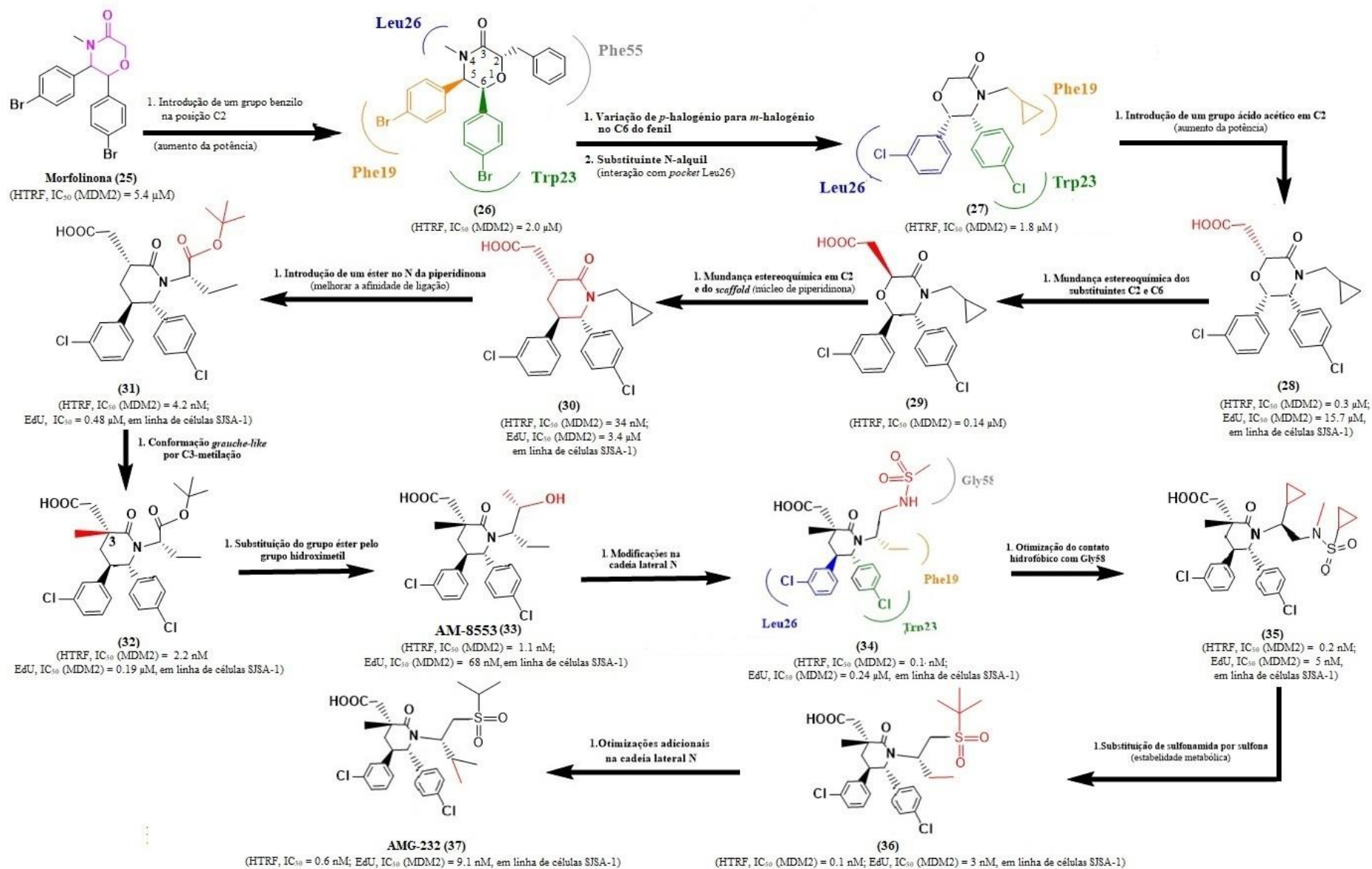


Figura 6. Otimização de piperidinona até chegar ao composto AMG23

Importa ainda salientar que uma simples variação de substituinte no grupo N pode dar origem a outros derivados potentes como por exemplo o **composto 38** representado na **figura 7**, (HTRF, IC₅₀ (MDM2) = 9 nM; EdU, IC₅₀ (MDM2) = 0.38 μM, em linha de células SJSA-1) [63].

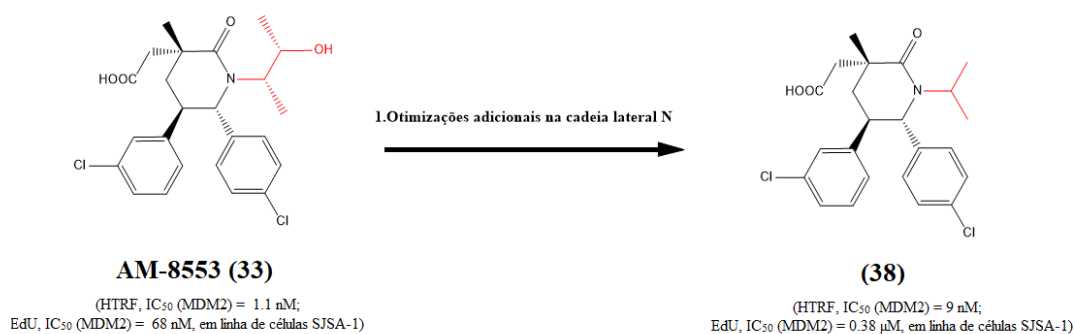


Figura 7. Otimizações adicionais baseadas em AM-8553 para pesquisa de novos inibidores de MDM2

Sabendo que as sulfonas geralmente têm inibição mínima em relação às enzimas CYP, outras otimizações foram realizadas pelo grupo Gonzalez, o que levou à descoberta de novos inibidores da MDM2, conhecidos como morfolinonas, onde as modificações focaram-se principalmente nas variações de substituintes N-alkil e na estrutura do núcleo, enquanto a porção de ácido acético permaneceu intacta. Entre os novos compostos, como **AM-8735 (composto 39, figura 8)** mostrou uma potência notável em ensaios bioquímicos e de proliferação celular (IC₅₀ (MDM2) = 0.4 e 25 nM, respetivamente), propriedades PK e excelente atividade antitumoral *in vivo* no modelo de xenoinxerto SJSA-1 (ED₅₀=41 mg/kg). O grupo Gonzalez explorou esta região substituindo o grupo do ácido acético por diversos isómeros de ácido. Após otimizações, identificaram um potente inibidor da MDM2 contendo tiazolil, **AM-6761 (composto 40, figura 8)**, que exibiu potência comparável (HTRF, IC₅₀ (MDM2) = 0,1 nM; EdU IC₅₀ (MDM2) = 16 nM, em linha de células SJSA-1), estabilidade metabólica melhorada em hepatócitos e excelente atividade antitumoral em modelo de xenoinxerto SJSA- 1 (ED₅₀ = 11 mg / kg), em comparação com AMG-232 [43, 44]. Relativamente às diferenças metabólicas, o composto AM-6761 é metabolizado principalmente por

vias oxidativas, enquanto o composto a AMG232 e seus análogos são metabolizados principalmente por glucuronidação da porção carboxilato [43,46].

O grupo Rew levantou a hipótese de que a substituição de ácidos carboxílicos por amidas pode reduzir a glucuronidação e melhorar ainda mais a estabilidade metabólica sem reduzir a potência. O grupo amida mostrou posteriormente ser capaz de interagir com His96 através de uma ligação de hidrogénio. Com base nisso, **AM-7209 (composto 41, figura 8)** foi desenvolvido substituindo os ácidos carboxílicos por amidas contendo grupo de ácido carboxílico terminal. Este último composto AM-7209 mostrou maior potência de ligação a MDM2, perfis de PK notáveis, bem como atividade antitumoral potente contra osteossarcomas SJSA-1 ($ED_{50} = 2,6$ mg/kg) (HTRF, IC_{50} (MDM2) < 0.1 nM; EdU, IC_{50} (MDM2) = 1.6 nM, em linha de células SJSA-1) [45].

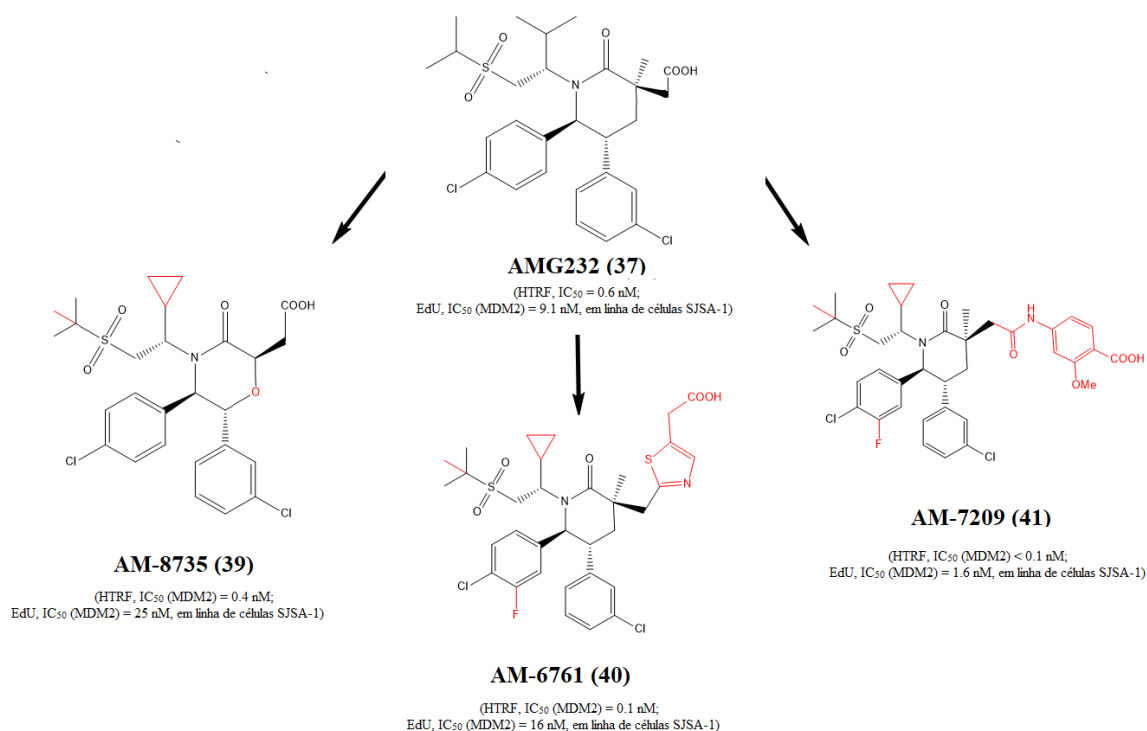


Figura 8. Otimizações adicionais baseadas em AGM-232 para pesquisa de novos inibidores de MDM2.

2.5. Derivados de Benzodiazepinas

O grupo Johnson & Johnson desenvolveu uma biblioteca de 1,4-benzodiazepina-2,5-dionas (BDP) para inibir a interação p53-MDM2. Em 2005, o composto mais ativo (**composto 42, figura 9**) apresentou uma constante de afinidade de ligação a MDM2 de 42 nM e um IC_{50} de 30 μ M quando testado numa linha de células tumorais da placenta com p53 *wild type* (FP, IC_{50} (MDM2) = 0.42 μ M; BrdU, IC_{50} (MDM2) = 30 μ M, em linha de células JAR). Como na maioria dos inibidores MDM2-p53, a ligação das BDPs é feita por pontes de hidrogénio nos locais Phe19, Trp23 e Leu26. O núcleo 1,4-diazepina dá a rigidez necessária a partir da qual os dois grupos clorofenil mimetizam perfeitamente Leu26 e Trp23 da p53, enquanto o grupo 7-iodofenil se insere no *pocket* Phe19. Embora este último grupo não se insira tão profundamente como no *pocket* Phe19 da p53, esta interação é aumentada porque o átomo de iodo faz contato com o grupo carbonil de Gln72 com uma força comparável a uma ligação de hidrogénio fraca [16,49-50].

Na tentativa de melhorar a solubilidade e a permeabilidade do composto 42, foi selecionado um grupo de solubilização, o ácido pentanóico em N1 para otimização adicional da PK. Verificou-se ainda que o grupo ácido era importante para a atividade, possivelmente por estabelecer uma ligação de hidrogénio com a Ser17 e, ainda, por colocar o grupo clorofenil na orientação correta por meio de repulsão estérica. Esta orientação de repulsão foi mantida quando o carboxilato foi substituído por um grupo metil com aumento da permeabilidade, dando origem ao **composto 43 da figura 9** (FP, IC_{50} (MDM2) = 0.70 μ M; BrdU, IC_{50} (MDM2) = 7 μ M, em linha de células MCF7) [16, 52-53].

Foram feitas modificações nos anéis de fenil-diazepina fundidos com o objetivo de aumentar a flexibilidade numa tentativa de melhorar o efeito mimético de Phe19, mantendo a orientação dos dois grupos clorofenil. No entanto, embora esta abordagem tenha produzido novos compostos ativos, os valores FP IC_{50} obtidos infelizmente foram maiores em comparação com a série original (**composto 44, figura 9**) (FP, IC_{50} (MDM2) = 3.6 μ M). O objetivo de desenvolver uma BDP mais potente levou ao desenvolvimento do **composto 45**, representado na **figura 9**, com um grupo *orto*-amino no anel N-benzílico (FP, IC_{50} (MDM2) = 0.55 μ M; BrdU, IC_{50} = 0.8 μ M, em linha de células MCF7) responsável pela ligação de hidrogénio adicional com o carbonilo da

Val93 (MDM2). Mais tarde, o efeito sinérgico do composto 45 em associação com a doxorrubicina foi observado, permitindo a visualização da atividade *in vivo* mediada pela doxorrubicina num modelo de xenoenxerto em doses que são inativas num tratamento de monoterapia [16, 51-53].

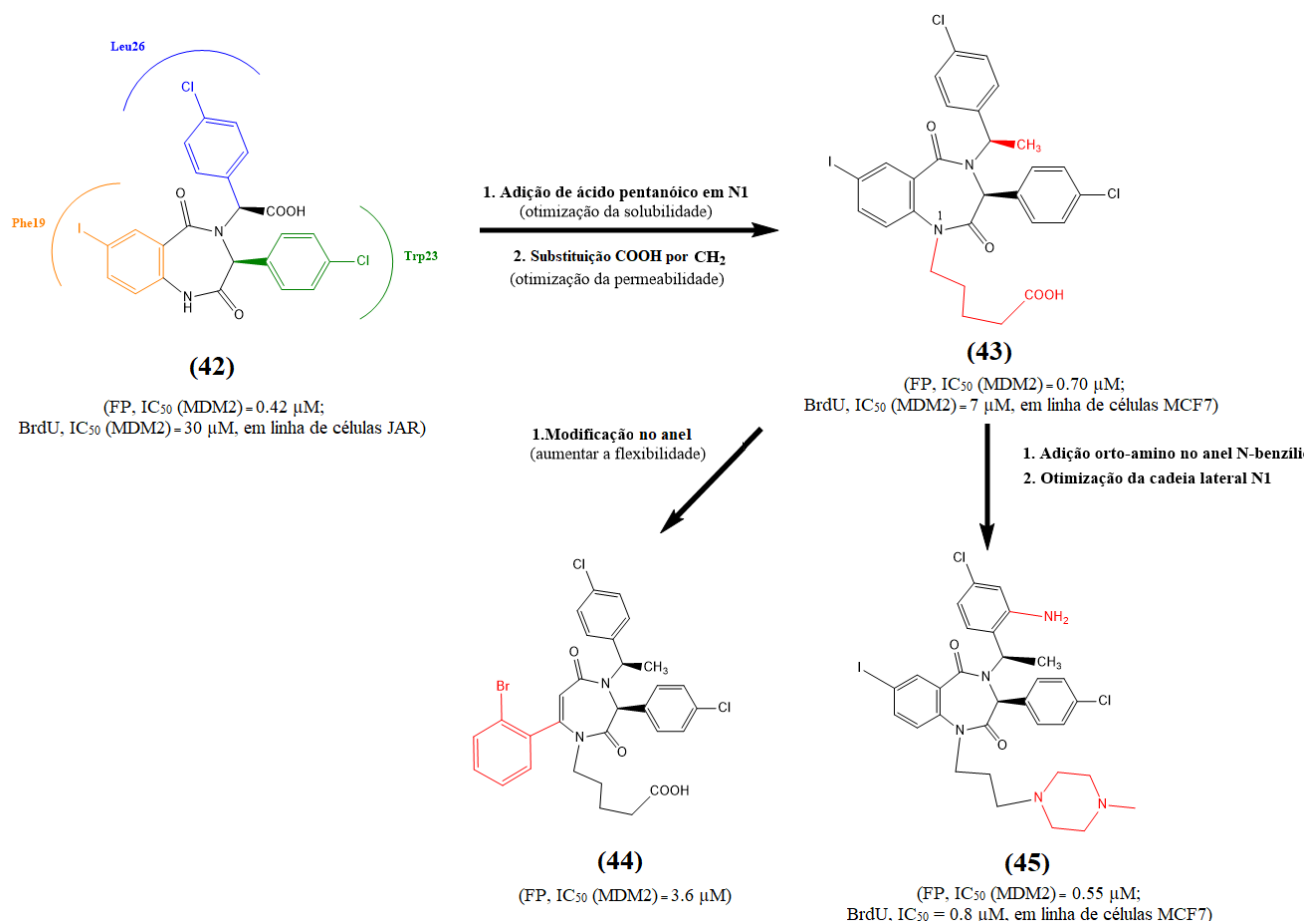


Figura 9. Estrutura de derivados de BDP.

Dois novos *scaffolds* foram relatados, 1,4 tienodiazepina-2,5-dionas (TDZ) e tio-benzodiazepínicos. Nos TDZ, o **composto 46** (**figura 10**), foi o que se destacou como composto principal (FP, K_i (MDM2) = 40 μM). A síntese e avaliação biológica dos tio-benzodiazepínicos mostraram que a simples substituição do oxigênio por um átomo de enxofre aumentou a potência. Neste estudo de SAR, o **composto 47** (FP, K_i (MDM2) = 5.34 μM; MTT, IC₅₀ (MDM2) = 1.06 μM, em linha de células U-2OS) emergiu como um potencial composto para otimizações futuras. Em 2016, novos

análogos de benzodiazepina foram relatados, mas sem mostrar melhor potência de inibição da MDM2. O **composto 48** representado abaixo na **figura 10** foi considerado o melhor derivado (FP K_i (MDM2) = 0.2 μ M; MTT, IC_{50} (MDM2) = 3.12 μ M, em linha de células U-2OS). Além disso, esses novos derivados não mostraram seletividade para células com p53 *wt*, como observado nos derivados 1,4-benzodiazepina-2,5-diona [16, 52-53].

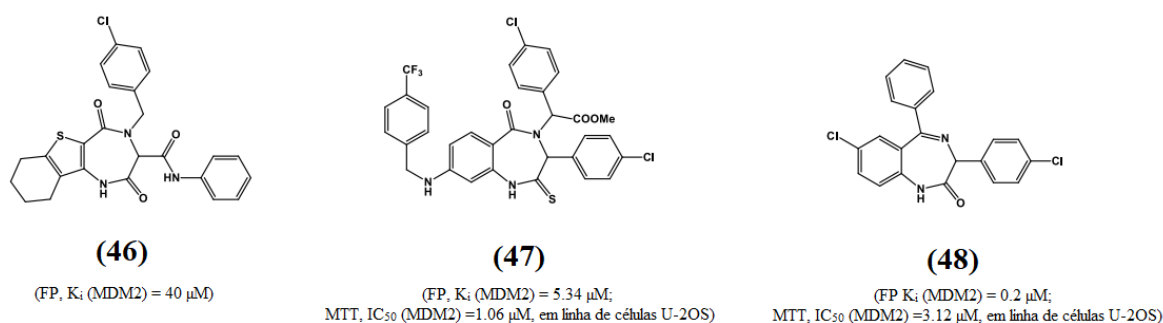


Figura 10. Exemplos de derivados de benzodiazepinedionas.

2.6. Isoindolinonas

As isoindolinonas revelaram-se como uma nova classe de inibidores, sendo que foram identificadas pela primeira vez como inibidores modestos da interação p53-MDM2 num estudo de ensaio de triagem de ligação p53-MDM2 *in vitro* (**49** da **figura 11**, IC_{50} (MDM2) ~ 200 μ M) [16]. O **composto 50**, representado na **figura 11**, surgiu como um composto líder, com um IC_{50} (MDM2) de 5.3 μ M num ensaio de ligação ELISA sem células. Como composto principal de otimização posteriores ao composto 50, destacou-se o **composto 51** representado na **figura 11** (ELISA, IC_{50} (MDM2) = 15.9 μ M). Várias outras modificações de modo a favorecer a interação com MDM2 foram feitas com a introdução de uma cadeia lateral rígida de alcoxi e a adição de substituintes em N-benzil, dando origem ao **composto 52** representado na **figura 11** (ELISA IC_{50} (MDM2) = 0.17 μ M; SRB, IC_{50} (MDM2) = 5.2 μ M, em linha de células SJS-1). A introdução de um 4-cloro no anel da isoindolinona aumentou ainda mais a potência de ligação e corresponde ao **composto 53**, **figura 11** (ELISA, IC_{50} (MDM2) = 0.044 μ M; SRB, IC_{50} = 3.7 μ M, em linha de células SJS-1). Além disso, em oposição ao

composto 52, o composto 53 mostrou seletividade 3 a 4 vezes superior, em relação às células com p53 wt [16, 54-56], J.Med. Chem 2011, 54,1233.

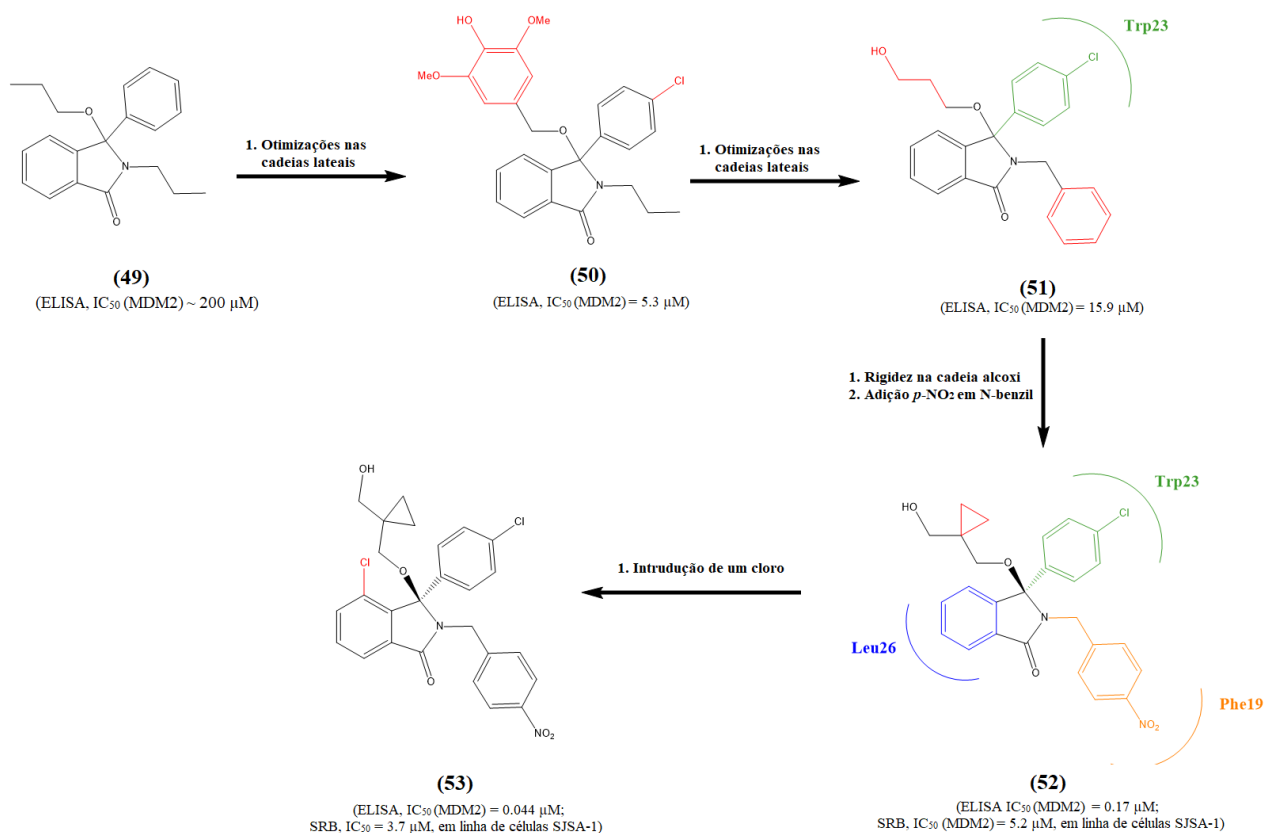


Figura 11. Estratégias de otimizações do composto 49 ao 53.

2.7. Cromano-triazolopirimidinas

O grupo Amgen descobriu um novo grupo designado por cromano-triazolopirimidinas, inibidores de p53-MDM2 com alto rendimento baseada em HTRF com cerca de 1.4 milhões de compostos, e sua ligação ao MDM2 foi confirmada por ressonância de plasmão de superfície (SPR). Deste estudo emergiu o **composto 54** representado na **figura 12**, em que apenas o isômero *syn*- (6*R*, 7*S*) foi considerado ativo (HTRF, IC₅₀ (MDM2) = 1.23 μM). Este composto tem uma estrutura bastante rígida, onde a ligação com MDM2 é feito a partir de dois grupos *para*-bromofenil em que C-6 interagem no *pocket* Trp23 (p53) e o grupo aromático C-7 interage no *pocket* Leu26 (p53), C-7 ainda estabelece uma interação de emparelhamento π fraca com a cadeia

lateral His96 de MDM2. O terceiro *pocket* chave Phe19 é mimetizado pelo anel D de cromeno [16, 57-59].

Verificou-se que os compostos acima referidos eram quimicamente instáveis e os diastereoisômeros individuais tendiam a se equilibrar, formando misturas mais estáveis, principalmente de anti-diastereoisômeros. Para se conseguir evitar a racemização sem afetar a potência, a solução passou pela metilação do N11. A otimização do composto principal passou pela introdução de variabilidade nos três anéis fenil envolvidos na ligação, sendo que a introdução de um grupo metoxi na posição 1D mostrou uma melhor atividade (**composto 55, figura 12**) (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 0.20 μ M). No entanto, acredita-se que esta atividade melhorada é produto da torção do núcleo da molécula devido à proximidade do N-metil e C1-metoxi que permite um melhor encaixe. Verificou-se que ocorria uma rápida N-desmetilação e consequente isomerização tautomérica, para ultrapassar este problema estudos de SAR foram realizados no N-substituinte, para aumentar a estabilidade metabólica, onde surgiu o **composto 56** representado na **figura 12** (HTRF, IC_{50} (MDM2) = 0.35 μ M). Em conclusão, ao bloquear o ponto fraco metabólico, foi possível melhorar substancialmente as propriedades PK, mantendo a sua potência [16, 57-59].

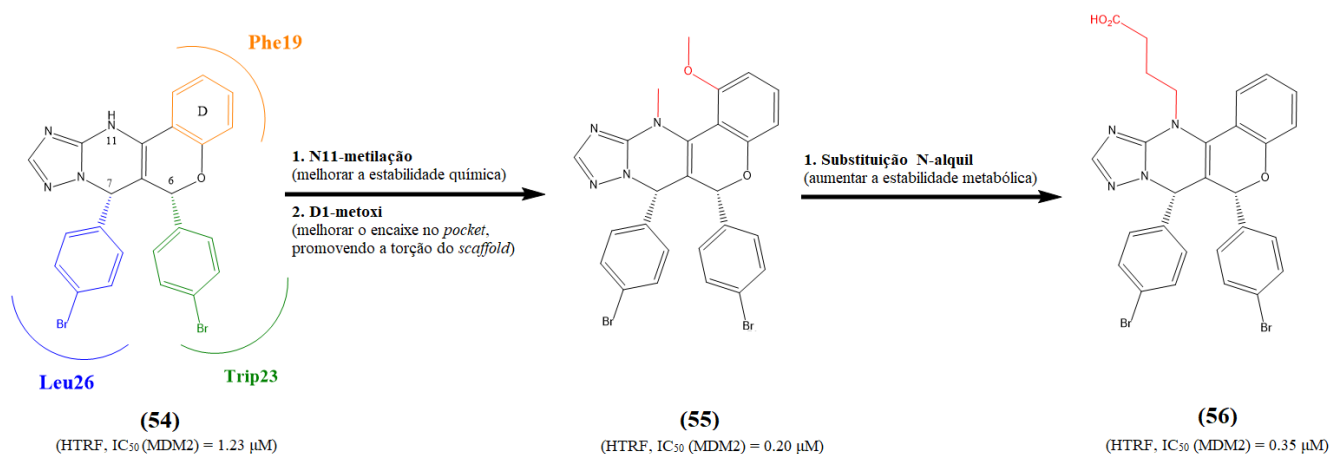


Figura 12. Estratégias de otimizações do composto 54 ao 56.

2.8. Dihidroisoquinolinonas

O desenvolvimento desta família de compostos foi iniciada pelo grupo Holzer com o objetivo de identificar novos inibidores das interações MDM2–p53. Após triagem de uma biblioteca contendo cerca de 50.000 compostos identificaram o **composto 57 (figura 13)**. Este composto inibiu as interações MDM2–p53 (TR-FRET, IC_{50} (MDM2) = 0.54 μ M), embora com uma fraca atividade não proliferativa contra células SJSA-1 (IC_{50} (MDM2) = 16.5 μ M) [52].

Otimizações adicionais focadas em diferentes substituintes nos anéis de fenil A e B, levaram ao desenvolvimento do **composto 58**, representado na **figura 13**, com afinidade de ligação ligeiramente aumentada (IC_{50} (MDM2) = 0.12 μ M). Os estudos de SAR indicaram que pequenos grupos de éter alifático no anel A e um *para* substituinte no anel B, particularmente o grupo de dimetila amino presente no composto 58, eram a melhor escolha em relação a outros possíveis grupos. A estrutura cristalografica do composto 58 com MDM2 sugeriu que a substituição de um grupo metilo, no grupo amino dimetilo do composto 58, por um grupo maior poderia oferecer interações extras com MDM2 no *subpocket* Phe19. O **composto 59** da **figura 13** mostrou afinidade de ligação ao MDM2 significativamente melhorada (IC_{50} (MDM2) = 8 nM), o grupo piridina formou uma interação π - π com o grupo fenol de Tyr67. A modelagem molecular mostrou que interações adicionais com Met62 e Gln72 no *subpocket* Phe19 através interações do tipo *van der Waals* e ligação de hidrogénio, respetivamente, que podem ser úteis para melhorar a capacidade de ligação. O **composto 60** da **figura 13** com uma *trans* ciclohexil-amina apresentou 2.7 vezes mais de afinidade de ligação e potência celular contra células SJSA-1 (IC_{50} (MDM2) = 3 nM, GI_{50} = 2.85 μ M) [52, 78].

A dimetilação do grupo NH_2 do composto 60 deu origem ao **composto 61** da **figura 13**, que mostrou ligeira inibição contra células SJSA-1 (IC_{50} (MDM2) = 3 nM). Verificou-se ainda que as estruturas desta série indicaram que a configuração *S* do centro quiral com o grupo *para*-clorofenil foi preferida. Através da separação quiral do composto 61 conseguiu-se isolar o **composto (R,S)-62**, que mostrou maior potência de ligação (IC_{50} (MDM2) = 1,9 nM) e boas propriedades *in vivo* ADME ($\log P$ = -4,4, $clint$ = 5,6 μ L/min/mg, $t_{1/2}$ = 246 min), no entanto, tinha uma biodisponibilidade oral relativamente baixa. A substituição do grupo isobutilo quiral para o grupo isopropílico

resultou na identificação do **composto 63** da **figura 13**, com potência idêntica ao composto 62 ($IC_{50} = 1,1$ nM, $GI_{50} = 0,71$ μ M em linha de células SJS-1).

De modo a aumentar a interação com o *pocket* Phe19, o grupo dimetil amina foi substituído por outros grupos cíclicos, dando origem ao **composto 64**, ilustrado na **figura 13**, com o grupo piperazin-2-ona, que mostrou a basicidade significativamente reduzida (IC_{50} (MDM2) = 16 nM) e potência celular contra células SJS-1 ($GI_{50} = 0,35$ μ M). Além disso, o composto 64 também apresentou boa absorção oral, mas com permeabilidade significativamente menor em comparação com o composto 62. Outra *N*-metilação no composto 64 levou à descoberta de **NVP-CGM097 (composto 65, figura 13)**, que possuía permeabilidade significativamente aumentada no ensaio PUMPA e aumento da biodisponibilidade e exposição oral em comparação com o composto 64. O NVP-CGM097 foi bem tolerado na inibição do crescimento de células SJS-1 em ratos e nenhuma mudança histopatologia foi observada após o tratamento diário a 30 mg/kg (IC_{50} (MDM2) = 1.7 nM). Curiosamente, o NVP-CGM097 exibiu espécies específicas de ligação ao MDM2. Outra substituição bioisotérica do anel fenil (anel B no composto 65) com *N*-heterociclo rendeu uma série de derivados com aumento da lipofilia e potência de ligação comparável a MDM2. Infelizmente, esta série de compostos reduziu a estabilidade hepática em humanos e macacos. [52, 77-79].

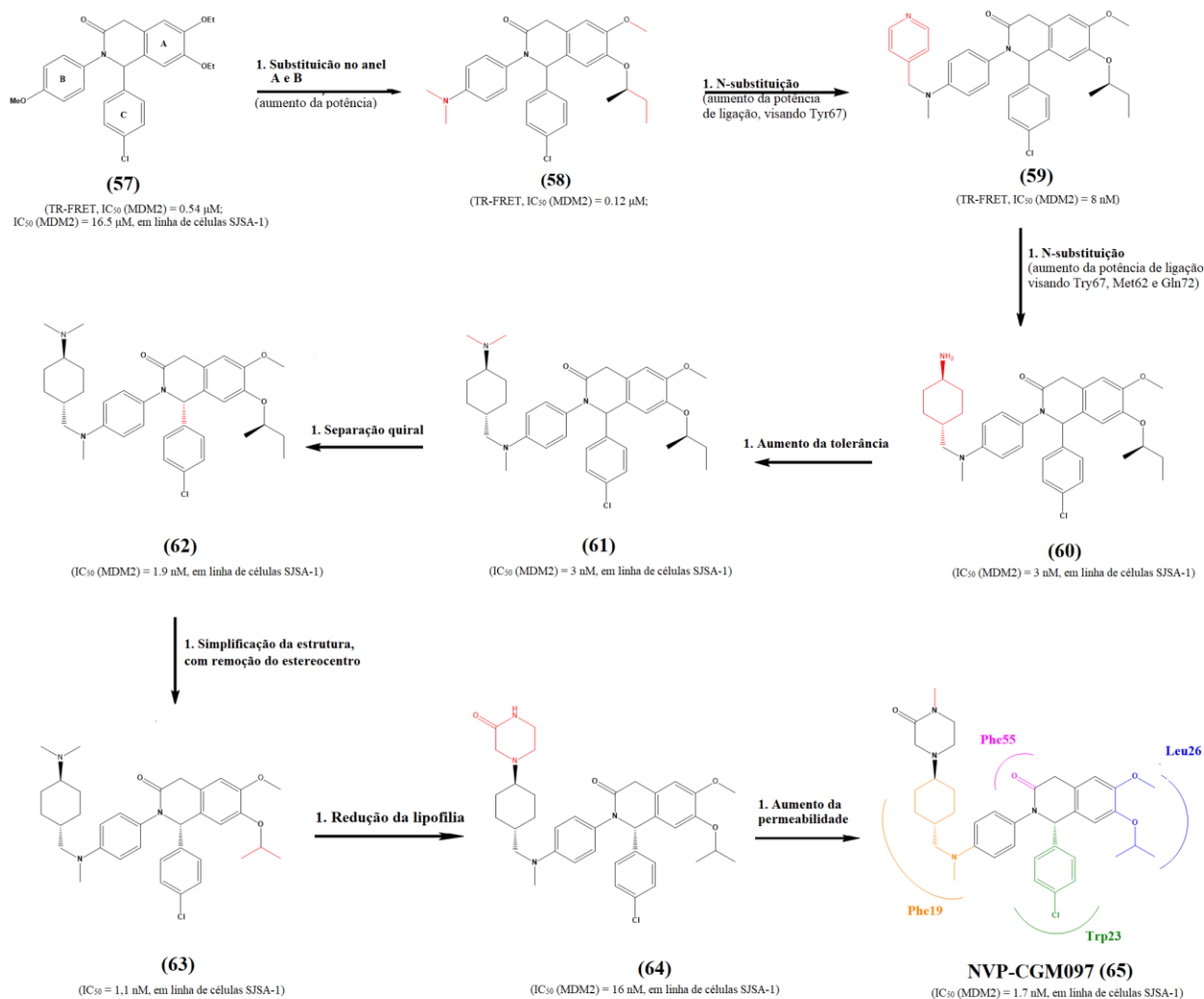


Figura 13. Otimizações até chegar ao composto NVP-CGM097.

3. Inibidores da interação p53-MDMX e Duais p53-MDM2 e p53-MDMX

Embora MDM2 seja o principal regulador negativo da p53, MDMX foi reconhecido mais recentemente como um modulador discreto da p53 e a sua elevada excreção é observada em vários tumores. O regulador MDMX está estruturalmente relacionado com a MDM2, sendo capaz de controlar a atividade da p53 principalmente pela inibição da função de transcrição. Além disso, os níveis de proteína MDMX são regulados pela degradação mediada pela ubiquitina MDM2. Uma vez que a inibição da interação p53-MDM2 aumenta os níveis de MDM2 por *feedback* auto-regulatório e, portanto, pode facilitar a degradação de MDMX, o problema da presença de MDMX pode ser diminuído ao direcionar essa interação. No entanto, embora sejam observados níveis reduzidos de MDMX em muitos tumores após o tratamento com nutlina-3, a eficácia do inibidor ainda pode estar comprometida, especialmente em tumores com elevada excreção da MDMX [8,52].

O primeiro inibidor da molécula MDMX, **SJ-172550 (composto 66, figura 14)** foi publicado apenas em 2010 por Reed et al. Este composto liga-se a MDMX no *pocket* de ligação da p53. Ensaio mais detalhados revelaram que a ligação de SJ-172550 com MDMX é estável e reversível, com um baixo micromolar (IC_{50} (MDMX) = 5 μ M), embora este composto também interaja com MDM2 é menos eficaz na inibição [52].

Em 2011, Wang et al. relatou duas moléculas que mostraram ativar p53 pela inibição de MDMX, os **compostos 67 e 68, XI-006 (NSC207895) e XI-011 (NSC146109)** respetivamente, ambos representados na **figura 14**. O composto XI-006, um 4-derivado de nitrobenzofuroxano, capaz de bloquear a transcrição MDMX (IC_{50} (MDMX) = 0.09 - 1.61 μ M). O composto XI-01, um derivado de pseudo-uréia, foi capaz de bloquear a transcrição MDMX e apresentou um efeito aditivo com nutlin-3a, em várias células de câncer de mama linhas [16,52, 69,88].

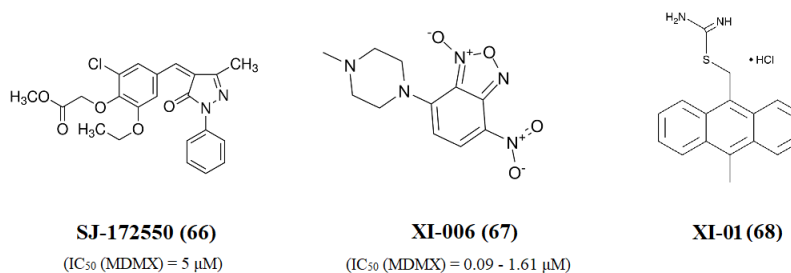


Figura 14. Exemplo de inibidores da interação p53-MDMX.

Embora inicialmente alguns relatórios tenham demonstrado os benefícios de inibir MDMX sozinho, especialmente devido à sua menor toxicidade em tecidos normais, agora é reconhecido que um resultado de ativação completa da p53 é favorecido e mais provável de ser alcançado com a inibição dupla de MDM2 e MDMX. Como esperado, os principais aspectos que precisam ser abordados para uma inibição adequada de ambas as proteínas encontram-se nos três *sub-pocket* Phe19, Trp23 e Leu26. A dificuldade da inibição dupla parece ser atribuída principalmente ao *pocket* Leu26, que é bastante diferente nas duas proteínas, o tamanho da cavidade Leu26 na MDMX e na MDM2 é diferente e pode ser a razão para uma ligação muito mais fraca comparada com a maioria dos inibidores de MDM2 conhecidos. Esta diferença representa um grande desafio no desenvolvimento de potentes inibidores duais MDMX e MDM2 [52, 88].

3.1. Indoles

Os compostos que possuem uma estrutura de imidazole-indole revelaram ser inibidores duais de MDMX e MDM2, com base nisso, foram desenvolvidos compostos imidazol-indóis, pela Novartis e pela Universidade de Pittsburgh [80].

WK298 também conhecido por Novartis-101 (**composto 69**), foi o primeiro inibidor imidazol-indol, que se ligava a MDMX com um valor K_i (MDMX) = 11 μM, enquanto **WK23** (**composto 70**), sem a cadeia lateral amina, exibiu uma constante de inibição 3 vezes superior para MDMX, K_i (MDMX) = 36 μM, representados na **figura 15**. Estes resultados obtidos mostraram a importância da cadeia lateral N-

dimetilpropilamina ligado na posição 2 do indole para aumentar a afinidade de ligação. Ambos os compostos ligam-se a MDM2 em quantidades nanomolar com excelente seletividade para MDM2 sobre MDMX (WK298 com K_i (MDM2) = 109 nM e WK23 com K_i (MDM2) = 916 nM). As duas moléculas diferem apenas no substituinte ligado à posição 2 da porção 6-cloroindol e, conseqüentemente, o núcleo central que mimetiza p53 é o mesmo. A estrutura cristalográfica revela que o anel 6-cloroindol mimetiza o Trp23 (p53) com o substituinte 6-cloro a aumentar a interação de ligação ao *pocket*, os restantes grupos 4-fenil e 1-benzil ocupam os *pockets* Phe19 e Leu26, respetivamente. Para além disso, o átomo de azoto do indole forma ligações de hidrogénio com Leu54, fornecendo proteção hidrofóbica extra na interface de MDMX e p53. A ramificação da cauda no composto WK298 aumentou não apenas as propriedades PK, mas também protege o *pocket* Phe19 do solvente. Holak et al. relataram uma série de compostos imidazole trissubstituídos como antagonistas p53-MDM2/X. Entre esses compostos, TAH-19 (**composto 71**) inibiu MDM2 potentemente com um valor K_i (MDM2) de 58 nM, mas mostrou inibição moderada contra MDMX (K_i (MDMX) = 26 300 nM), estrutura ilustrada na **figura 15** [61,52,88].

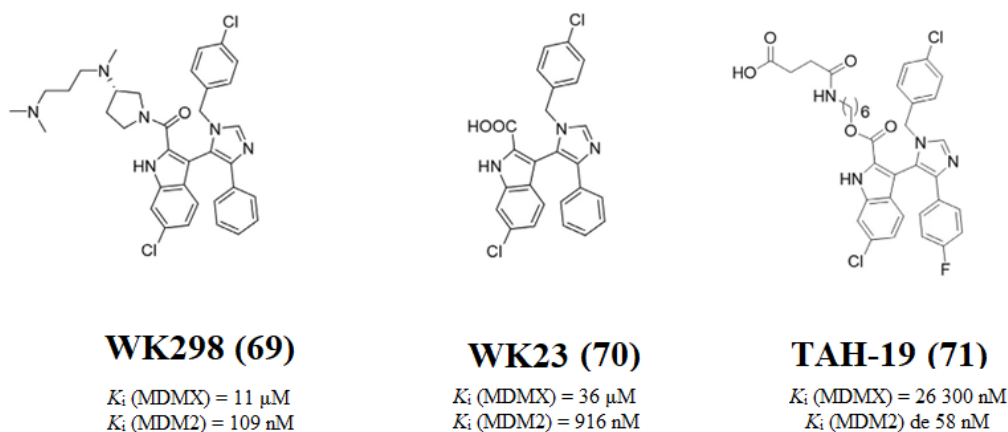


Figura 15. Exemplo de inibidores imidazol-indol WK298, WK23 e TAH-19.

Em 2012, Graves et al. relataram que as hidantoinas indolicos como **RO-2443** e **RO-5963**, (**72** e **73**, respetivamente da **figura 16**), inibem duplamente MDMX e MDM2 em baixos níveis de nanomolar. Desta triagem, o composto RO-2443 mostrou

similar atividade inibitória *in vitro* contra ambos MDM2 e MDMX (IC_{50} (MDM2) = 33 nM; IC_{50} (MDMX) = 41 nM). No entanto, este composto tinha baixa solubilidade em água. Otimização do RO-2443 para aumentar a solubilidade desenvolveu o derivado RO-5963, que foi ligeiramente mais potente como inibidor de MDM2 e MDMX (IC_{50} (MDM2) = 17.3 nM; IC_{50} (MDMX) = 24.7 nM). Curiosamente, o grupo coplanar indole da hidantoína e o grupo di-fluorofenil em ambos os compostos foram direcionados para os *pockets* Phe19 e Trp23, respectivamente, enquanto o *pocket* Leu26 não estava ocupado. Os modelos de ligação podem fornecer uma base estrutural para desenvolver novos inibidores duais [52, 88].

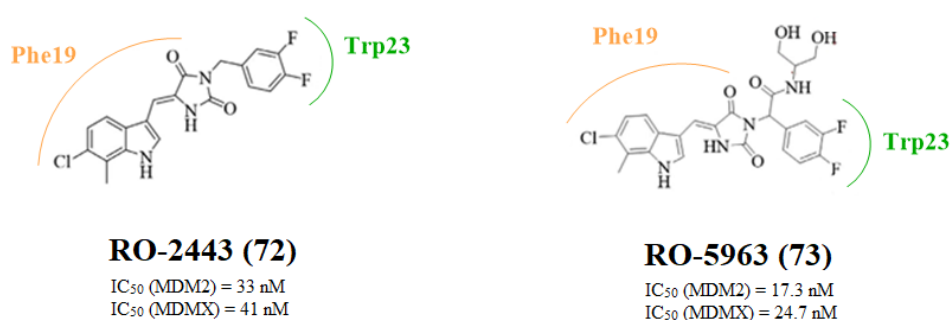


Figura 16. Estrutura dos inibidores RO-2443 e RO-5963.

YH239 (74, figura 17), um composto altamente seletivo para MDM2 sobre MDMX (FP, K_i (MDM2) = 400 nM). YH239 interagiu com os *pockets* Trp23 e Phe19. Acredita-se que padrões de substituição do átomo de fluor no anel fenil podem modular as interações aromáticas de pequenas moléculas com alvos de interesse, com base nisso, desenvolveu-se o **composto 75 (figura 17)** que mostrou melhor afinidade de ligação com MDM2 no ensaio FP (FP, K_i (MDM2) = 250 nM). Outros compostos surgiram com valores promissores como por exemplo, **YH184 (76, figura 17)** (FP, K_i (MDMX) = 5.5 μ M) com cerca de 10 vezes de seletividade para MDMX sobre MDM2 (FP, K_i (MDM2) = 54 μ M) e **OXAZ-1 (77, figura 17)**, com valores de EC_{50} = 2.4 μ M para MDMX e 1.0 μ M para MDM2 [79,88].

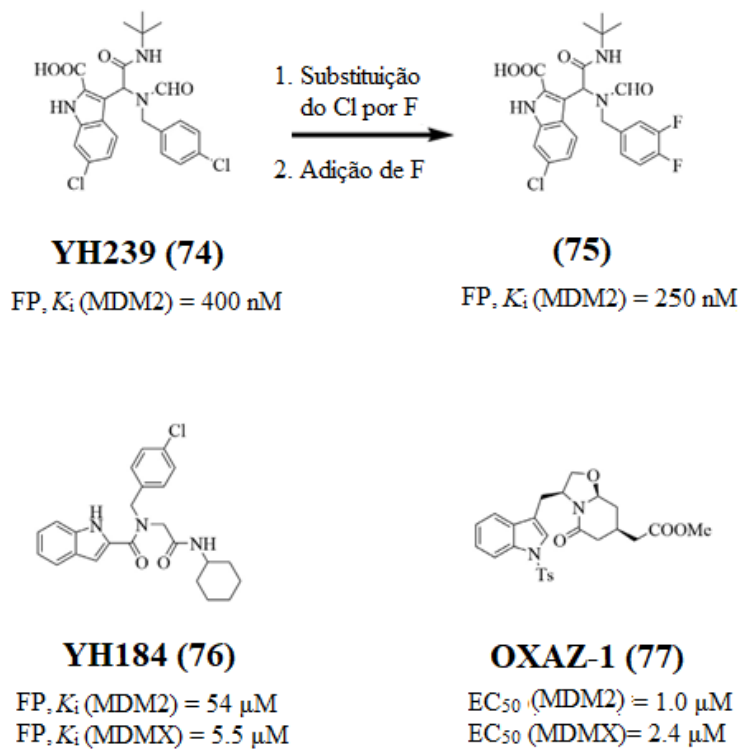


Figura 17. Pequenas moléculas que impedem a inibição de MDMX/MDM2.

4. Moléculas para degradação da MDM2

Apesar do progresso significativo no desenvolvimento de inibidores de MDM2, as estratégias acima referidas têm limitações significativas, como resistência ao fármaco, pouco tempo de ação e ainda problemas de toxicidade, associado á inibição da p53 e consequente expressão elevada e acúmulo de MDM2 em tecidos normais [75].

Como alternativa, foi desenvolvida uma nova abordagem terapêutica, denominada quimeras de direcionamento de proteólise (PROTACs), introduzido formalmente em 2001. PROTACs são moléculas heterobifuncionais com dois ligantes conectados por um ligante apropriado (**Figura 18**). Um ligante liga-se a uma proteína de interesse / proteína alvo, e o outro ligando liga-se a uma ubiquitina ligase E3. Esta molécula bifuncional em seguida, posiciona a ligase E3 em estreita proximidade com a proteína alvo para formar um complexo ternário. Este complexo subsequentemente promove poliubiquitinação da proteína alvo, marcando assim a proteína alvo e a sua consequente degradação no proteossoma. As PROTACs que têm como alvo a MDM2 contêm três componentes principais: um inibidor da MDM2, que se liga a MDM2; um ligando para recrutar a ligase E3; e um vinculador que conecta estas duas partes. A talidomida e seus análogos, pomalidomida e lenalidomida, são ligantes prontamente disponíveis para ubiquitina ligase E3, que tem sido utilizada para construir várias PROTAC [75,52,81].

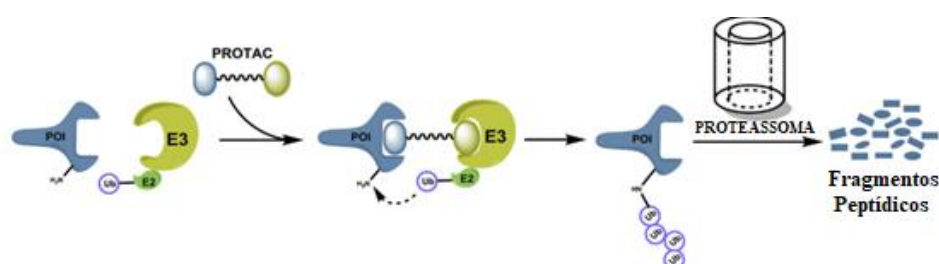


Figura 18. Esquema explicativo do mecanismo de ação da PROTAC. (POI: proteína de interesse MDM2; E3: Ciap, VHL, CRBN)

Recentemente, o grupo Wang desenvolveu as primeiras PROTAC para degradação da MDM2 a partir de um inibidor de spirooxindole, MI-1061, a **MD-222** e a **MD-224** (**78** e **79** da **figura 19**, respetivamente). A estrutura de MDM2 em complexo com o MI-1061 revelou que o grupo de ácido carboxílico no anel fenil do MI-1061 seria exposto à região do solvente, permitindo assim estar ligado aos ligantes CRBN. Destes compostos, MD-224 induziu a degradação rápida da MDM2 em células de leucemia humana <1 nM e inibe o crescimento de células RS4-11 (IC₅₀ = 1.5 nM). Observou-se uma eficácia significativamente melhorada da MD-224 em relação ao composto MI-1061, com regressão tumoral no modelo de xenoenxerto RS4-11 até 50% após a dosagem de 25 mg/kg de MD-224 sem qualquer sinal de toxicidade. MD-222, tal como MD-224, induz a rápida degradação da proteína MDM2 e ativação da p53 wt (MTT, IC₅₀ (MDM2) = 2.8 nM, em linha de células RS4-11).

A descoberta de um novo ligante **MG-277** (**composto 80**, **figura 19**) foi desenvolvido pela simplificação estrutural da MD-222. MG-277 inibiu a interação p53-MDM2 com um valor IC₅₀ (MDM2) = 67.5 nM no ensaio FP. A MG-277 induz apenas a degradação moderada da MDM2 e não ativa a p53 wt, mas é altamente potente na inibição do crescimento das células tumorais de forma independente da p53. MG-277 não atua por degradação da MDM2 mas induz a degradação de um fator de terminação da tradução, GSPT1 para alcançar a sua potente atividade anticancerígena. [75,52,82].

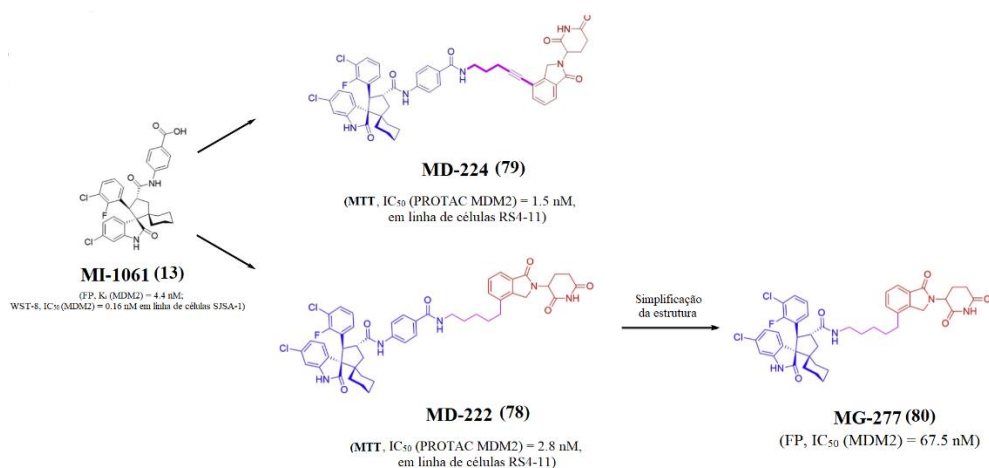


Figura 19. Estrutura da PROTAC MD-222, MD-224 a partir do composto spirooxindole MI-1061 e descoberta de um novo ligante molecular MG-277.

Tang et al. também desenvolveram uma série de novos PROTAC MDM2 pela conjugação do inibidor RG7112 da MDM2 (IC_{50} (MDM2) = 18 nM) com lenalidomida através de um *linker* adequado. O anel de piperazina em RG7112 é exposto à região do solvente e, portanto, permite que este se ligue à lenalidomida. Desta associação, **TW-32 (81, figura 20)** foi o composto mais promissor. TW-32 inibiu o crescimento de células RS4-11 com IC_{50} (PROTAC MDM2) = 3.2 nM e alcançou 90% da degradação MDM2 ($D_{Max} = 90\%$). Notavelmente, o TW-32 possui uma unidade C3 (um acetileno e um metileno) entre o inibidor da MDM2 e a lenalidomida, representando um dos elos mais curtos entre todos as moléculas PROTAC relatadas até agora [75,52,82].

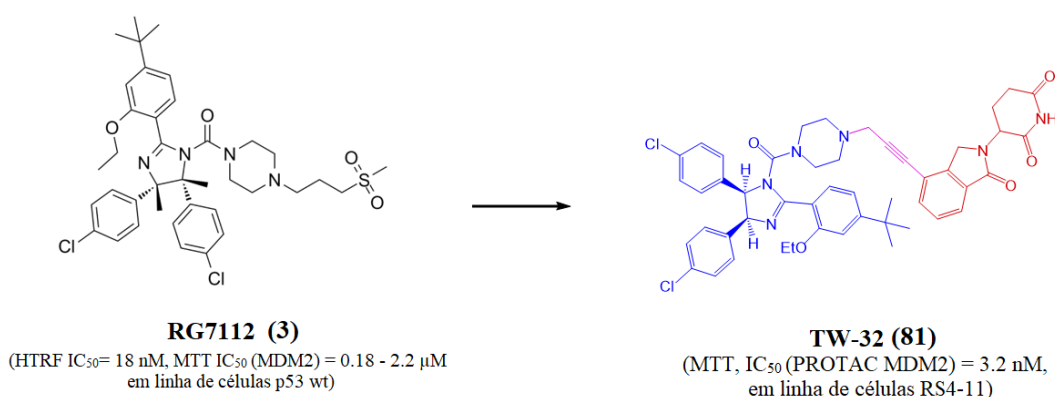


Figura 20. Estrutura da PROTAC TW-32.

5. Reativação da p53 mutante

A p53 mutante representa um importante alvo farmacológico. Estruturalmente a p53 contém 393 aminoácidos distribuídos por três domínios funcionais, ou seja, um domínio de ativação N-terminal (TAD), domínio de ligação ao DNA (DBD) e domínio de tetramerização C-terminal. O domínio do N-terminal inclui o subdomínio de transativação e uma região rica em prolina. O domínio central de ligação ao DNA é necessário para a ligação específica ao DNA e os aminoácidos dentro deste domínio são frequentemente mutados. Os Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 e Arg282 são relatados como pontos quentes de mutação em vários câncros humanos. Mutações na p53 levam à perda da sua função transcricional, pela interrupção de sua capacidade de reconhecer e ligar-se ao DNA. A região do C-terminal tem uma função regulatória. Os resíduos neste domínio C-terminal passam por modificações, incluindo fosforilação e acetilação [89].

Além do modelo clássico de inativação da proteína supressora de tumores p53, a p53 mutante (mut) exerce um efeito negativo dominante sobre a p53 selvagem (wt) disponível, inativando-a. Além disso, a p53mut pode adquirir novo ganho oncogénico de funções funcionais (GOF). Em particular, a p53mut pode interagir com proteínas supressoras de tumor, por exemplo, p63 e p73, inativando-as, contribuindo assim à progressão do tumor. A reativação da p53mut é aplicável a uma ampla gama de pacientes, devido à alta prevalência da p53mut em tumores. Além disso, uma vez que a expressão da p53mut é geralmente restrita a células tumorais, espera-se que as terapias direcionadas a p53mut sejam altamente seletivas [89, 95-96].

Nos últimos vinte anos, o rastreio da biblioteca química permitiu a identificação de várias pequenas moléculas que têm como alvo a p53mut. Na **figura 21** estão reunidos exemplos de moléculas mais relevantes que reativam a p53mut relatados até ao momento (CP-31398, STIMA-1, MIRA-1, PRIMA-1 e APR-246).

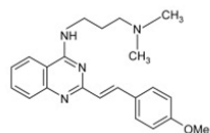
Rastinejad et al. desenvolveu a primeira molécula capaz de reativar a função selvagem da p53 mutante, **CP-31398 (82, figura 21)**. CP-31398 restaurou a conformação da p53 em células com p53mut, e consequente ativação da atividade

transcricional. No entanto, CP-31398 não avançou para ensaios clínicos devido a relatórios de atividades independentes da p53 e múltiplos efeitos secundários [89].

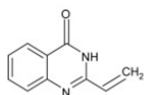
Um composto estruturalmente relacionado ao CP-31398 é o **STIMA-1 (83, figura 21)**. STIMA-1 foi identificado como um aceitador de Michael para modificar cisteínas do *pocket* da p53 localizado no domínio de ligação ao DNA. STIMA-1 tem como alvo células tumorais humanas que expressam mutações conformacionais (His175) e de contato (His273) no DNA. O composto demonstrou estimular a ligação ao DNA da p53mut em células H1299-His175. Devido a problemas de solubilidade, nenhum efeito foi observado no crescimento de xenoinxertos de tumor humano H1299-His175. Estudos biológicos revelaram que STIMA-1 foi mais potente em relação às linhas de células cancerígenas p53 mutantes do que CP-31398 e foi tão potente e seletivo para células que expressam p53mut quanto PRIMA-1 e MIRA-1 [85, 89].

O composto **MIRA-1 (84, figura 21)** foi escolhido por derivatização adicional devido à sua atividade seletiva para p53 mutante sobre as células cancerígenas p53 wt. MIRA-1 funciona por meio de uma reação de adição de Michael por ligação covalente a cisteínas e promove o redobramento de proteínas. Estudos computacional identificaram que este composto visa principalmente um *pocket* de p53 entre os loops L1 e L3, que contêm Cys124, Cys135 e Cys141. Apesar de sua promessa inicial, MIRA-1 exibiu alta citotoxicidade em linhas de células normais, demonstrando um mecanismo independente de p53 mutante [85,88].

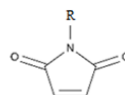
Selivanova et al. desenvolveu PRIMA-1 (**85, figura 21**) e seu análogo metilado mais potente PRIMA-1Met, comumente referido como APR-246 (**86, figura 21**), com capacidade de inibir o crescimento do tumor em camundongos xenoinxertados. A sua ação ocorre após serem convertidos em metileno quinuclidinona (MQ), um aceitador de Micheal que reage covalentemente com as cisteínas de p53 mutante, em particular Cys124 e Cys277, conduzindo assim a um ambiente oxidativo nas células tumorais, o que resulta no restabelecimento das espécies reativas de oxigênio (ROS). APR-246 foi o primeiro pequeno reativador da molécula p53 a entrar no desenvolvimento clínico [85].



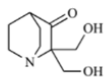
CP-31398 (82)



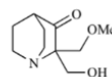
STIMA-1 (83)



MIRA-1 (84)



PRIMA-1 (85)



APR-246 (86)

Figura 21. Pequeñas moléculas direccionadas a p53 mutante

6. Conclusões

Já passaram mais de três décadas desde a descoberta da p53 e uma longa jornada para compreender estratégias de reativar a função de supressão de tumores p53 que está inativa nos cancros de modo a promover a oncogénese. A literatura científica agora evidencia a aplicação de vários compostos para restaurar a p53 mutante e poucos deles chegaram a ensaios clínicos. A heterogeneidade de tumores e p53 mutante representa um grande desafio no desenvolvimento de compostos seguros.

Além disso, as estratégias para reativar a p53 envolve a inibição dual das interações p53-MDM2 e p53-MDMX para ativar efetivamente a p53 selvagem. Com o avançar da investigação nesta área percebeu-se que a base para o desenvolvimento de um inibidor eficiente estava em moléculas em que a sua estrutura continha um anel central que oferecia rigidez ao composto de onde os seus substituintes hidrofóbicos interagem com os diferentes *pockets*. A variação dos substituintes vazia aumentar ou diminuir a afinidade de ligação para MDM2 ou MDMX. O vantajoso para a interação com MDM2 nem sempre se verificava com MDMX, e vice versa, devido a diferentes tamanhos e estruturas de MDM2 e MDMX. Embora ainda não haja inibidores de MDM2 e MDMX com os ensaios clínicos concluídos, nos últimos anos a inibição de ambas as proteínas (MDM2 e MDMX) representam uma grande esperança para o tratamento do cancro. Um dos compostos com resultados promissores, mas que ainda se encontra em ensaios clínicos é ALRN-6924, que está atualmente em fase clínica I/IIa.

No caso dos cancros mais agressivos em que a p53 sofre mutação, a estratégia envolve o desenvolvimento de pequenas moléculas que têm como alvo a p53 mutante. No entanto, a maioria dessas pequenas moléculas podem não ser adequadas no uso clínico devido a efeitos colaterais tóxicos e/ou propriedades farmacodinâmicas indesejáveis. Outras direções nesta área dependerão dos resultados dos ensaios clínicos que se encontram a decorrer.

Dada a frequência e a natureza agressiva dos tumores e resistência aos medicamentos existentes, nas últimas décadas, tem existido uma grande necessidade e esforço no desenvolvimento de novos estudos e aprimoramento das propriedades biomédicas de classes de compostos já conhecidos. Apesar de todo o avanço que se tem

dado nesta área ainda é extremamente importante que a ciência continue a investir na descoberta de novos compostos com maior seletividade e menores efeitos tóxicos.

7. Referências Bibliográficas

1. Zawacka-Pankau, Joanna; P53 Protein family; Faculty of Chemistry, University of Warsaw, Pasteura 1, 02-093 Warsaw, Poland; 22 September 2020
2. Rangel, L.P.; Ferretti, G.D.S.; Costa, C.L.; Andrade, S.M.M.V.; Carvalho, R.S.; Costa, D.C.F.; Silva, J.L. p53 reactivation with induction of massive apoptosis-1 (PRIMA-1) inhibits amyloid aggregation of mutant p53 in cancer cells, *Biol. Chem.* 2019, 294, 3670-3682.
3. Beloglazkina, A.; Zyk, N.; Majouga, A.; Beloglazkina, E Recent Small-Molecule Inhibitors of the p53-MDM2 Protein-Protein Interaction. *Molecules* 2020, 25, 1211
4. Loh, S.N. Follow the Mutations: Toward Class-Specific, Small-Molecule Reactivation of p53. *Biomolecules*. 2020 Feb; 10(2): 303.
5. Silva, J.L.; Cino, E.A.; Soares, I.N.; Ferreira, V.F.; de Oliveira, G.A.P. Targeting the Prion-like Aggregation of Mutant p53 to Combat Cancer. *Acc. Chem. Res.* 2018, 51, 181-190.
6. Lopes, E.A.; Gomes, S.; Saraiva, L.; Santos, M.M.M. Small Molecules Targeting Mutant p53: A Promising Approach for Cancer Treatment. *Curr. Chem.* 26 de setembro de 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867325666181116124308>
7. Ohnstad, H.O., Paulsen, E.B., Noordhuis, P., Berg, M., Lothe, R.A., Vassilev, L.T., and Myklebost, O., MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines. *BMC Cancer*, 2011.
8. Popowicz, G.M., Doemling, A., and Holak, T.A., The structure-based design of Mdm2/Mdmx-p53 inhibitors gets serious. *Angew Chem Int Ed*, 2011.
9. Ray-Coquard, I.; Blay, J. Y.; Italiano, A.; Le Cesne, A.; Penel, N.; Zhi, J.; Heil, F.; Rueger, R.; Graves, B.; Ding, M.; Geho, D.; Middleton, S. A.; Vassilev, L. T.; Nichols, G. L.; Bui, B. N. 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 *Lancet Oncol.* 2012
10. Czarna, A.; Beck, B.; Srivastava, S.; Popowicz, G.M.; Wolf, S.; Huang, Y.; Bista, M.; Holak, T.A.; Dömling, A. Robust generation of lead compounds for

- protein–protein interactions by computational and MCR chemistry: p53/HDM2 antagonists. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2010
11. Zheng, T., Wang, J., Song, X., Meng, X., Pan, S., Jiang, H., and Liu, L., Nutlin-3 cooperates with doxorubicin to induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells through p53 or p73 signaling pathways. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010.
 12. Y. ; Aguilar, Â.; Bernard D.; Wang S.; Small-Molecule Inhibitors of the MDM2–p53 Protein–Protein Interaction (MDM2 Inhibitors) in Clinical Trials for Cancer Treatment. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 3, 1038–1052
 13. Ding, K.; Lu, Y.; Nikolovska-Coleska, Z.; Qiu, S.; Ding, Y.; Gao, W.; Stuckey, J.; Krajewski, K.; Roller, P.P.; Tomita, Y.; et al. Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 2005
 14. Silva, J.L ;Lima, C. G. S.; Rangel, L. P.;Ferretti, G. D. S.;Pauli F. P.; Ribeiro, R. C. B.; Thais B. Silva; Silva F. C.; Ferreira, Vitor F.; Recent Synthetic Approaches towards Small Molecule Reactivators of p53; 20 April 2020
 15. Ding, Q.; Zhang, Z.; Liu, J.-J.; Jiang, N.; Zhang, J.; Ross, T. M.; Chu, X.-J.; Bartkovitz, D.; Podlaski, F.; Janson, C.; Tovar, C.; Filipovic, Z. M.; Higgins, B.; Glenn, K.; Packman, K.; Vassilev, L. T.; Graves, B. Discovery of RG7388, a potent and selective p53–MDM2 inhibitor in clinical development *J. Med. Chem.* 2013
 16. Ribeiro, C. J., Rodrigues, C. M., MoreiraOrcID, R., & Santos, M. M. (13 de maio de 2016). Chemical Variations on the p53 Reactivation Theme. *Pharmaceuticals*
 17. Bill, K.L.; Garnett, J.; Meaux, I.; Ma, X.; Creighton, C.J.; Bolshakov, S.; Barriere, C.; Debussche, L.; Lazar, A.J.; Prudner, B.C.; et al. SAR405838: A novel and potent inhibitor of the MDM2:p53 axis for the treatment of dedifferentiated liposarcoma. *Clin. Cancer Res.* 2016
 18. Zhang, Z.; Ding, Q.; Liu, J.J.; Zhang, J.; Jiang, N.; Chu, X.J.; Bartkovitz, D.; Luk, K.C.; Janson, C.; Tovar, C.; et al. Discovery of potent and selective spiroindolinone MDM2 inhibitor, RO8994, for cancer therapy. *Bioorg. Med. Chem.* 2014
 19. Zhang, Z.; Chu, X.J.; Liu, J.J.; Ding, Q.; Zhang, J.; Bartkovitz, D.; Jiang, N.; Karnachi, P.; So, S.S.; Tovar, C.; et al. Discovery of Potent and Orally Active

- p53-MDM2 Inhibitors RO5353 and RO2468 for Potential Clinical Development. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014
20. Foley, C.A.; Al-Issa, Y.A.; Hiller, K.P.; Mulcahy, S.P. Synthesis and structure-activity relationships of 1-aryl- β -carbolines as affinity probes for the 5-hydroxytryptamine receptor. *ACS Omega* 2019
21. Zheng, G.H.; Shen, J.J.; Zhan, Y.C.; Yi, H.; Xue, S.T.; Wang, Z.; Ji, X.Y.; Li, Z.R. Design, síntese e atividade *in vitro* e *in vivo* antitumour de derivados 3-benzylideneindolin-2-one, uma nova classe de inibidores de pequenas moléculas da interação MDM2-p53. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, *81*, 277-288.
22. Bandaru Srinivas , Ponnala Deepika , Lakkaraju Chandana , Bhukya Kumar Chaitanya , Shaheen Uzma , Nayarisseri Anuraj . Identification of High Affinity Non-Peptidic Small Molecule Inhibitors of MDM2-p53 Interactions through Structure-Based Virtual Screening Strategies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(9):3759-65. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.9.3759.
23. Gema Sanz, Madhurendra Singh, Sylvain Peugeot, Galina Selivanova; Inhibition of p53 inhibitors: progress, challenges and perspectives; *Journal of Molecular Cell Biology*, Volume 11, Issue 7, July 2019, Pages 586–599
24. Ding Q, Zhang Z, Liu JJ, Jiang N, Zhang J, Ross TM, et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem* 2013; 5979-83
25. Brown, C. J.; Lain, S.; Verma, C. S.; Fersht, A. R.; Lane, D. P. Awakening Guardian Angels: Drugging the p53 Pathway. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9 (12), 862–873.
26. Wang, S.; Zhao, Y.; Aguilar, A.; Bernard, D.; Yang, C. Targeting the MDM2–p53 Protein– Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017
27. Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. *Science* (80-). 1996, 274 (5289), 948–953.
28. Vu, B.; Wovkulich, P.; Pizzolato, G.; Lovey, A.; Ding, Q.; Jiang, N.; Liu, J. J.; Zhao, C.; Glenn, K.; Wen, Y.; Tovar, C.; Packman, K.; Vassilev, L.; Graves, B.

- Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development. *ACS Med. Chem. Lett.* 2013, 4 (5), 466–469.
29. Ding, K., Lu, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Qiu, S., Ding, Y.S., Gao, W., Stuckey, J., Krajewski, K., Roller, P.P., Tomita, Y., Parrish, D.A., Deschamps, J.R., and Wang, S.M., Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc*, 2005. 127(29): p. 10130-10131.
30. Wang, S.; Zhao, Y.; Aguilar, A.; Bernard, D.; Yang, C. Targeting the MDM2–p53 Protein– Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017.
31. Peterson, L. F., Lo, M.-C., Liu, Y., Giannola, D., Mitrikeska, E., Donato, N. J., Johnson Craig N., Wang Shaomeng, Mercer Jessica & Talpaz, M. (2017). *Induction of p53 suppresses chronic myeloid leukemia. Leukemia & Lymphoma*, 58(9), 2165–2175.
32. Wang, S., Sun, W., Zhao, Y., McEachern, D., Meaux, I., Barriere, C., Stuckey, J.A., Meagher, J.L., Bai, L., Liu, L., Hoffman-Luca, C.G., Lu, J., Shangary, S., Yu, S., Bernard, D., Aguilar, A., Dos-Santos, O., Besret, L., Guerif, S., Pannier, P., Gorge-Bernat, D., and Debussche, L., SAR405838: An optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression. *Cancer Res*, 2014. 74(20): p. 5855-5865
33. Zhao, Y., Yu, S., Sun, W., Liu, L., Lu, J., McEachern, D., Shargary, S., Bernard, D., Li, X., Zhao, T., Zou, P., Sun, D., and Wang, S., A potent small-molecule inhibitor of the MDM2-p53 interaction (MI-888) achieved complete and durable tumor regression in mice. *J Med Chem*, 2013. 56(13): p. 5553-556
34. Kim Minjee , Laramy Janice K. , Gampa Gautham , Parrish Karen E. , Brundage Richard , Sarkaria Jann N. , e Elmquist William F., Brain Distributional Kinetics of a Novel MDM2 Inhibitor SAR405838: Implications for Use in Brain Tumor Therapy, *Drug Metab Dispos.* 2019 Dec; 47(12): 1403–1414.
35. Khurana Arushi and Shafer A, MDM2 antagonists as a novel treatment option for acute myeloid leukemia: perspectives on the therapeutic potential of idasanutlin (RG7388), *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 2903–2910.

36. Zhang, Z., Chu, X.-J., Liu, J.-J., Ding, Q., Zhang, J., Bartkovitz, D., Jiang, N., Karnachi, P., So, S.-S., Tovar, C., Filipovic, Z.M., Higgins, B., Glenn, K., Packman, K., Vassilev, L., and Graves, B., Discovery of potent and orally active p53-MDM2 inhibitors RO5353 and RO2468 for potential clinical development. *ACS Med Chem Lett*, 2014. 5(2): p. 124-127.
37. Yu Bin ¹, Zheng Yi-Chao, Shi Xiao-Jing, Qi Ping-Ping, Liu, Natural Product-Derived Spirooxindole Fragments Serve as Privileged Substructures for Discovery of New Anticancer Agents, *Anticancer Agents Med Chem*. 2016;16(10):1315-24.
38. Ivanenkov, Y.A., Vasilevski, S.V., Beloglazkina, E.K., Kukushkin, M.E., Machulkin, A.E., Veselov, M.S., Chufarova, N.V., Chernyaginab, E.S., Vanzcool, A.S., Zyk, N.V., Skvortsov, D.A., Khutornenko, A.A., Rusanov, A.L., Tonevitsky, A.G., Dontsova, O.A., and Majouga, A.G., Design, synthesis and biological evaluation of novel potent MDM2/p53 small-molecule inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015. 25(2): p. 404-409
39. Sorriento, D., Del Giudice, C., Bertamino, A., Ciccarelli, M., Gomez-Monterrey, I., Campiglia, P., Novellino, E., Illario, M., Trimarco, B., De Luca, N., and Iaccarino, G., New small molecules, ISA27 and SM13, inhibit tumour growth inducing mitochondrial effects of p53. *Br J Cancer*, 2015. 112(1): p. 77-85.
40. Sorriento D, Giudice Del C, Bertamino Um, Ciccarelli M, Gomez-Monterrey Eu, Campiglia P, Novellino E, Illario M, Trimarco B, Luca De N & Iaccarino G; New small molecules, ISA27 and SM13, inhibit tumour growth inducing mitochondrial effects of p53; *British Journal of Cancer* volume 112, pages77-85 (2015)
41. Q. Ding, Z. Zhang, J.-J. Liu, N. Jiang, J. Zhang, T. M. Ross, X.-J. Chu, D. Bartkovitz, F. Podlaski, C. Janson, C. Tovar, Z. M. Filipovic, B. Higgins, K. Glenn, K. Packman, L. T. Vassilev, B. Graves, Discovery of RG7388, a Potent and Selective p53-MDM2 Inhibitor in Clinical Development, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 5979-5983

42. Natarajan Umamaheswari, Venkatesan Thiagarajan, Radhakrishnan Vijayaraghavan, Samuel Shila , Rasappan Periannan , Rathinavelu; Cell Cycle Arrest and Cytotoxic Effects of SAHA and RG7388 Mediated through p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1} in Cancer Cells; *Medicina (Kaunas)*. 2019 Jan 29;55(2):30.
43. A. Z. Gonzalez, J. Eksterowicz, M. D. Bartberger, H. P. Beck, J. Canon, A. Chen, D. Chow, J. Duquette, B. M. Fox, J. Fu, X. Huang, J. B. Houze, L. Jin, Y. Li, Z. Li, Y. Ling, M.-C. Lo, A. M. Long, L. R. McGee, J. McIntosh, D. L. McMinn, J. D. Oliner, T. Osgood, Y. Rew, A. Y. Saiki, P. Shaffer, S. Wortman, P. Yakowec, X. Yan, Q. Ye, D. Yu, X. Zhao, J. Zhou, S. H. Olson, J. C. Medina, D. Sun, Selective and Potent Morpholinone Inhibitors of the MDM2–p53 Protein–Protein Interaction, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 2472-2488.
44. A. Z. Gonzalez, Z. Li, H. P. Beck, J. Canon, A. Chen, D. Chow, J. Duquette, J. Eksterowicz, B. M. Fox, J. Fu, X. Huang, J. Houze, L. Jin, Y. Li, Y. Ling, M.-C. Lo, A. M. Long, L. R. McGee, J. McIntosh, J. D. Oliner, T. Osgood, Y. Rew, A. Y. Saiki, P. Shaffer, S. Wortman, P. Yakowec, X. Yan, Q. Ye, D. Yu, X. Zhao, J. Zhou, S. H. Olson, D. Sun, J. C. Medina, Novel Inhibitors of the MDM2-p53 Interaction Featuring Hydrogen Bond Acceptors as Carboxylic Acid Isosteres, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 2963-2988.
45. Y. Rew, D. Sun, X. Yan, H. P. Beck, J. Canon, A. Chen, J. Duquette, J. Eksterowicz, B. M. Fox, J. Fu, A. Z. Gonzalez, J. Houze, X. Huang, M. Jiang, L. Jin, Y. Li, Z. Li, Y. Ling, M.-C. Lo, A. M. Long, L. R. McGee, J. McIntosh, J. D. Oliner, T. Osgood, A. Y. Saiki, P. Shaffer, Y. C. Wang, S. Wortman, P. Yakowec, Q. Ye, D. Yu, X. Zhao, J. Zhou, J. C. Medina, S. H. Olson, Discovery of AM-7209, a Potent and Selective 4-Amidobenzoic Acid Inhibitor of the MDM2–p53 Interaction, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 10499-10511.
46. G. Liao, D. Yang, L. Ma, W. Li, L. Hu, L. Zeng, P. Wu, L. Duan, Z. Liu, The development of piperidinones as potent MDM2-p53 protein-protein interaction inhibitors for cancer therapy, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.044>.

47. A. J. Wagner, U. Banerji, A. Mahipal, N. Somaiah, H. Hirsch, C. Fancourt, A. O. Johnson-Levonas, R. Lam, A. K. Meister, G. Russo, C. D. Knox, S. Rose, D. S. Hong, Phase I Trial of the Human Double Minute 2 Inhibitor MK-8242 in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* 35 (2017) 1304-1311.
48. Konopleva, M., Martinelli, G., Daver, N., Papayannidis C., Wei A., Higgins B., Ott M., Macarenhas J., Andreeff M. (2020). *MDM2 inhibition: an important step forward in cancer therapy. Leukemia.* doi:10.1038/s41375-020-0949-z
49. Raboisson P., Marugán J.J., Schubert C., Koblisch H.K., Lu T., Zhao S. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of novel 1,4-diazepines as HDM2 antagonists. *Elife.* 2005;15:1857–1861.
50. Leonard K., Marugan J.J., Raboisson P., Calvo R., Gushue J.M., Koblisch H.K. Novel 1,4-benzodiazepine-2,5-diones as HDM2 antagonists with improved cellular activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16:3463–3468.
51. Koblisch H.K., Zhao S., Franks C.F., Donatelli R.R., Tominovich R.M., LaFrance L.V. Benzodiazepinedione inhibitors of the HDM2:p53 complex suppress human tumor cell proliferation *in vitro* and sensitize tumors to doxorubicin *in vivo*. *Mol Cancer Ther.* 2006;5:160–169.
52. Fang, Y., Liao, G., & Yu, B. (2020). *Small-molecule MDM2/X inhibitors and PROTAC degraders for cancer therapy: advances and perspectives. Acta Pharmaceutica Sinica B.* doi:10.1016/j.apsb.2020.01.003
53. Yu, Z., Zhuang, C., Wu, Y., Guo, Z., Li, J., Dong, G., Yao J., Sheng C., Miao Z. and Zhang, W. (2014). *Design, Synthesis and Biological Evaluation of Sulfamide and Triazole Benzodiazepines as Novel p53-MDM2 Inhibitors. International Journal of Molecular Sciences,* 15(9), 15741–15753. doi:10.3390/ijms150915741
54. Grigoreva T. A., Novikova D. S., Petukhov A. V., Gureev M. A., Garabadzhiu A. V., Melino G., Barlev A. Nickolai, Tribulovich V. G. (2017). Proapoptotic modification of substituted isoindolinones as MDM2-p53 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* 27 (23), 5197–5202. doi:10.1016/j.bmcl.2017.10.049

55. Hardcastle I. R., Ahmed S. U., Atkins H., Calvert A. H., Curtin N. J., Farnie G., Lunec, J. (2005). *Isoindolinone-based inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(5), 1515–1520. doi:10.1016/j.bmcl.2004.12.061
56. Chessari Gianni, Hardcastle Ian R., Structure-Based Design of Potent and Orally Active Isoindolinone Inhibitors of MDM2-p53 Protein-Protein Interaction. *J. Med. Chem.* 2021, 64, 7, 4071–4088. Publication Date: March 24, 2021
57. El-Bakhshawangy, N. M., El-Nassan, H. B., Kassab, A. E., & Taher, A. T. (2018). *Design, synthesis and biological evaluation of chromenopyrimidines as potential cytotoxic agents. Future Medicinal Chemistry*, 10(12), 1465–1481. doi:10.4155/fmc-2017-0324
58. Allen, J. G., Bourbeau, M. P., Wohlhieter, G. E., Bartberger, M. D., Michelsen, K., Hungate, R., Oliner, J. D. (2009). *Discovery and Optimization of Chromenotriazolopyrimidines as Potent Inhibitors of the Mouse Double Minute 2-Tumor Protein 53 Protein-Protein Interaction. Journal of Medicinal Chemistry*, 52(22), 7044–7053. doi:10.1021/jm900681h
59. Beck, H.P., DeGraffenreid, M., Fox, B., Allen, J.G., Rew, Y., Schneider, S., Saiki, A.Y., Yu, D.Y., Oliner, J.D., Salyers, K., Ye, Q.P., and Olson, S., Improvement of the synthesis and pharmacokinetic properties of chromenotriazolopyrimidine MDM2-p53 protein-protein inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. 21(9): p. 2752-2755.
60. Wang T., Li X., Sun S. EX527, a Sirt-1 inhibitor, induces apoptosis in glioma via activating the p53 signaling pathway. *Anticancer Drugs*. 2020 Jan;31(1):19-26. doi: 10.1097/CAD.0000000000000824.
61. Ruan H., Yu C. , Niu X. , Zhang W. , Liu H., Chen L., Xiong R., Sun Q., Jin C., Liu Y. , and Lai L.. Computational strategy for intrinsically disordered protein ligand design leads to the discovery of p53 transactivation domain I binding compounds that activate the p53 pathway. *Chem Sci*. 2021 Feb 28; 12(8): 3004–3016. doi: 10.1039/d0sc04670a.

62. Wang Y. , Zhu J. , Liu J. , Chen X. , Mihalic Jeff , Deignan Jeffrey , Yu M. , Daqing Sun , Kayser F. , McGee L., Lo M., Chen A. , Jing Z. , Ye Q., Huang X., Long M , Yakowec P., Oliner J., Olson S. , Medina J. Optimization beyond AMG 232: discovery and SAR of sulfonamides on a piperidinone scaffold as potent inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014 Aug 15;24(16):3782-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.06.073. Epub 2014 Jul 1.
63. Yu, B., & Liu, H.-M. (2018). *The Development of New Spirooxindoles Targeting the p53–MDM2 Protein-Protein Interactions for Cancer Therapy. Targeting Protein-Protein Interactions by Small Molecules*, 213–237. doi:10.1007/978-981-13-0773-7_8
64. Gomez-Monterrey I, Bertamino A, Porta A, Carotenuto A, Musella S, Aquino C, Granata I, Sala M, Brancaccio D, Picone D, Ercole C, Stiuso P, Campiglia P, Grieco P, Ianelli P, Maresca B, Novellino E (2010) Identification of the Spiro(oxindole-3,3'-thiazolidine)-Based Derivatives as Potential p53 Activity Modulators. *J Med Chem* **53**: 8319–8329.
65. Bertamino A, Soprano M, Musella S, Rusciano MR, Sala M, Vernieri E, Di Sarno V, Limatola A, Carotenuto A, Cosconati S, Grieco P, Novellino E, Illario M, Campiglia P, Gomez-Monterrey I (2013) Synthesis, *in vitro*, and in cell studies of a new series of [Indoline-3,2'-thiazolidine]-based p53 modulators. *J Med Chem* **56**: 5407–5421.
66. Erba H., Becker P, Shami P., Grunwald M., Flesher D., Zhu M., Rasmussen E., Henary H., Anderson A., Wang E., Phase 1b study of the MDM2 inhibitor AMG 232 with or without trametinib in relapsed/refractory acute myeloid leucemia. *Blood Adv.* 2019 Jul 9;3(13):1939-1949.
67. K. L. J. Bill, J. Garnett, I. Meaux, X. Ma, C. J. Creighton, S. Bolshakov, C. Barriere, L. Debussche, A. J. Lazar, B. C. Prudner, L. Casadei, D. Braggio, G. Lopez, A. Zewdu, H. Bid, D. Lev, R. E. Pollock, SAR405838: A Novel and Potent Inhibitor of the MDM2:p53 Axis for the Treatment of Dedifferentiated Liposarcoma, *Clin. Cancer Res.* 22 (2016) 1150-1160.

68. D. Sun, Z. Li, Y. Rew, M. Gribble, M. D. Bartberger, H. P. Beck, J. Canon, A. Chen, X. Chen, D. Chow, J. Deignan, J. Duquette, J. Eksterowicz, B. Fisher, B. M. Fox, J. Fu, A. Z. Gonzalez, F. Gonzalez-Lopez De Turiso, J. B. Houze, X. Huang, M. Jiang, L. Jin, F. Kayser, J. Liu, M.-C. Lo, A. M. Long, B. Lucas, L. R. McGee, J. McIntosh, J. Mihalic, J. D. Oliner, T. Osgood, M. L. Peterson, P. Roveto, A. Y. Saiki, P. Shaffer, M. Toteva, Y. Wang, Y. C. Wang, S. Wortman, P. Yakowec, X. Yan, Q. Ye, D. Yu, M. Yu, X. Zhao, J. Zhou, J. Zhu, S. H. Olson, J. C. Medina, Discovery of AMG 232, a Potent, Selective, and Orally Development, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 1454-1472
69. Y. Rew, D. Sun, F. Gonzalez-Lopez De Turiso, M. D. Bartberger, H. P. Beck, J. Canon, A. Chen, D. Chow, J. Deignan, B. M. Fox, D. Gustin, X. Huang, M. Jiang, X. Jiao, L. Jin, F. Kayser, D. J. Kopecky, Y. Li, M.-C. Lo, A. M. Long, K. Michelsen, J. D. Oliner, T. Osgood, M. Ragains, A. Y. Saiki, S. Schneider, M. Toteva, P. Yakowec, X. Yan, Q. Ye, D. Yu, X. Zhao, J. Zhou, J. C. Medina, S. H. Olson, Structure-Based Design of Novel Inhibitors of the MDM2-p53 Interaction, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 4936-4954.
70. Y. Rew, D. Sun, Discovery of a Small Molecule MDM2 Inhibitor (AMG 232) for Treating Cancer, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 6332-6341.
71. Lucas, B.S., Fisher, B., McGee, L.R., Olson, S.H., Medina, J.C., and Cheung, E., An expeditious synthesis of the MDM2-p53 inhibitor AM-8553. *J Am Chem Soc* 2012. 134(30): p. 12855-12860
72. Bernard, D., Zhao, Y., and Wang, S., AM-8553: A novel MDM2 inhibitor with a promising outlook for potential clinical development. *J Med Chem*, 2012. 55(11): p. 4934-4935.
73. Rew, Y. and Sun, D., Discovery of a small molecule MDM2 inhibitor (AMG 232) for treating cancer. *J Med Chem*, 2014. 57(15): p. 6332-6341
74. Yu, M., Wang, Y., Zhu, J., Bartberger, M.D., Canon, J., Chen, A., Chow, D., Eksterowicz, J., Fox, B., Fu, J., Gribble, M., Huang, X., Li, Z., Liu, J., Lo, M.-c., McMinn, D., Oliner, J.D., Osgood, T., Rew, Y., Saiki, A.Y., Shaffer, P., Yan, X., Ye, Q., Yu, D., Zhao, X., Zhou, J., Olson, S.H., Medina, J.C., and Sun, D.,

- Discovery of potent and simplified piperidinone-based inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *ACS Med Chem Lett*, 2014. 5(8): p. 894-899.
75. Yang L. , Song T. , Cheng Q. , Chen L. , and Chen J. , Mutant p53 Sequestration of the MDM2 Acidic Domain Inhibits E3 Ligase Activity. *Mol Cell Biol*. 2019 Feb 15; 39(4): e00375-18.
76. Qin J.-J. , Nag S. , Voruganti S. , Wang W. , and Zhang R. , Natural Product MDM2 Inhibitors: Anticancer Activity and Mechanisms of Action, *Curr Med Chem*. Author manuscript; available in PMC 2019 Aug 12.
77. Kallen J., Izaac A., Chau S., Wirth E., Schoepfer J., Mah R., Schlapbach A., Stutz S., Vaupel A., Guagnano V., Masuya K., Stachyra T., Salem B., Chene P., Gessier F., Holzer P., and Furet P., Structural States of Hdm2 and HdmX: X-ray Elucidation of Adaptations and Binding Interactions for Different Chemical Compound Classes. *Front Oncol*. 2020 Jul 23; 10:1219, doi:10.1002/cmdc.201900201.
78. Holzer P. *, Masuya K. , Furet P. , Kallen J. , Valat-Stachyra T., Ferretti S. , Joerg B., M. Bouisset-Leonard, Buschmann N., Pissot-Soldermann C., Rynn C., Ruetz S., Stutz S., Chène P. , Discovery of a Dihydroisoquinolinone Derivative (NVP-CGM097): A Highly Potent and Selective MDM2 Inhibitor Undergoing Phase 1 Clinical Trials in p53wt Tumors. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 16, 6348–6358, doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00810
79. Liu X., and Chen J. Modulation of p53 Transactivation Domain Conformations by Ligand Binding and Cancer-Associated Mutations. *Pac Symp Biocomput*. 2020; 25: 195–206.
80. Popowicz G.M., Czarna A., Wolf S., Wang K., Wang W., Dömling A. Estruturas de inibidores de baixo peso molecular ligados ao MDMX e MDM2 revelam novas abordagens para a descoberta de drogas antagonistas p53-MDMX/MDM2. *Ciclo celular*. 2010; 9:1104-1111.
81. Li X., Elmira E., Rohondia S., Wang J., Liu J. and Dou Q. P. A patent review of the ubiquitin ligase system: 2015-2018. *Expert Opin Ther Pat*. 2018 Dec; 28(12): 919–937.

82. Wang B., Wu S., Liu J., Yang K., Xie H., Tang W., Development of selective small molecule MDM2 degraders based on nutlin. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 176, 15 August 2019, Pages 476-491
83. Yu X., Narayanan S., Vazquez A. and Carpizo D. R. Small molecule compounds targeting the p53 pathway: are we finally making progress?. *Apoptosis*. 2014; 19(7): 1055–1068. Published online 2014 Apr 23.
84. Binayke, A., Mishra, S., Suman, P., Das, S., & Chander, H., Awakening the “guardian of genome”: reactivation of mutant p53 *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (2019) 83:1–15. doi:10.1007/s00280-018-3701-x
85. Miller, J.J., Gaiddon, C., & Storr, T., A balancing act: using small molecules for therapeutic intervention of the p53 pathway in cancer. Received 9th June 2020. DOI: 10.1039/d0cs00163e.
86. Arihara Y., Takada K., Kamihara Y., Hayasaka N., Hajime Nakamura, Murase K., Ikeda H., Iyama S., Sato T. , Miyanish K., Kobune M. and Kato J. Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017 Sep 12; 8(39): 65889–65899. Published online 2017 Jul 22. doi: 10.18632/oncotarget.19508
87. Miller J. J., Gaiddon C. and Storr T. A balancing act: using small molecules for therapeutic intervention of the p53 pathway in cancer. *Chemical Society Reviews*. Issue 19, 2020
88. Espadinha Margarida, Barcherini Valentina, Lopes A. Elizabeth and Santos Maria M.M. An Update on MDMX and Dual MDM2/X Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2018, 18, 647-660. DOI: 10.2174/1568026618666180604080119
89. Lopes Elizabeth A., Gomes Sara, Saraiva Lucília and Santos Maria M.M., Small Molecules Targeting Mutant P53: A Promising Approach for Cancer Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26, 7323-7336. DOI: 10.2174/092986732566618111612430