



靶向突变p53蛋白的抗肿瘤药物*

王若亚 张 鸳 张继虹 俞 飞**

(昆明理工大学医学院, 昆明 650500)

摘要 p53蛋白是人体内十分重要的肿瘤抑制因子,通过调节细胞周期阻滞、诱导细胞凋亡等作用发挥肿瘤抑制功能。突变后的p53蛋白不仅具有显性负性效应(dominant negative effect, DN)抑制野生型p53蛋白功能,而且还通过功能获得性效应(gain of function, GOF)调节细胞代谢、侵袭、迁移等方式促进肿瘤的发生。p53蛋白在超过50%的肿瘤组织中发生突变,是肿瘤细胞区别于正常细胞的一个特异性药物靶点。因此,针对突变p53蛋白开发新型抗癌药物一直是研究的热点。长期以来,由于突变p53蛋白表面较为光滑,缺乏药物结合口袋,使其被认为是一个不可成药的靶点。随着高通量筛选技术的发展以及对突变p53蛋白结构的深入了解,许多靶向突变p53蛋白的小分子化合物被报道并在体外展现出较好的抗肿瘤活性,多款基于突变p53蛋白研发的化合物已经进入临床试验阶段。本文就靶向p53蛋白治疗肿瘤的直接和间接策略进行综述,重点针对突变p53蛋白重激活剂与降解突变p53蛋白的小分子化合物作用机制进行梳理,以期后续开发靶向突变p53蛋白药物的创新提供帮助。

关键词 p53蛋白, 癌症治疗, 抗癌药物, p53重激活剂, 降解突变p53蛋白

中图分类号 R3, R9, R73

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0014

p53蛋白是由TP53基因编码的53 ku蛋白,与p63蛋白和p73蛋白同属于p53样转录因子家族,其活性对于预防肿瘤的发生和发展至关重要^[1]。自1979年p53蛋白首次以癌蛋白抗原被报道以来,经过40多年的研究,人们不仅重新发现了p53蛋白的抑癌功能,而且认识到TP53基因是迄今为止发现与人类肿瘤相关度最高的基因。p53蛋白在生物体内可以暂停细胞周期进程,启动分子应答机制对损伤的DNA进行修复,并参与细胞分化、细胞凋亡等多种途径^[2-3]。同时,野生型p53蛋白调控着生物三大物质的代谢^[4],通过限制细胞核酸物质的合成与对葡萄糖的摄取等作用抑制细胞生长。总之,p53蛋白可以看作是细胞内一个复杂而庞大的信号转导与调控网络的中心枢纽,在使细胞能够各司其职发挥正常功能方面起着重要的作用。在无应激的哺乳动物细胞中,p53蛋白通过不断的泛素化和26S蛋白酶体系的降解维持在较低水平,在应激状态下,p53蛋白可经过一系列如磷酸化、乙酰化、甲基化等蛋白质加工过程后被激活^[5-6]。

正因为p53蛋白有着难以取代的重要作用,因

此它一旦发生突变对细胞正常功能的影响是巨大的。突变后的p53蛋白不仅会丧失原本抑癌功能,同时还会进一步促进肿瘤的发生发展^[7-8]。研究表明,约50%的人类癌症中发现了突变p53蛋白,其主要突变类型为错义突变。科学家们尝试了多种靶向突变p53蛋白治疗癌症的策略,目前以恢复突变p53蛋白野生型构象及MDM2与p53蛋白相互作用抑制剂为代表的药物研究取得了较大突破。

1 p53蛋白的结构与功能

1.1 p53蛋白的结构

p53蛋白在人体内以四聚体的形式发挥作用,单体间通过反向 α 螺旋和反向 β 折叠相互作用形成二聚体,二聚体借助平行的螺旋-螺旋接触面形成四聚体,其结构类似一个十字架。每个单体由393

* 国家自然科学基金(81960670),云南省科技厅科技计划(202001AS070012)和云南(昆明)周德敏专家工作站(YSZJGZZ-2020046)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 18087122003, E-mail: feiyuz8@163.com

收稿日期: 2023-01-10, 接受日期: 2023-03-02

个氨基酸残基组成,从N端到C端依次可分为反式激活结构域(TAD)(1~61)、富脯氨酸结构域(PXXP)(62~94)、DNA结合域(DBD)(95~292)、低聚结构域(OD)(326~356)、羧基端结构域(CRD)(357~393)^[9](图1)。TAD区包含TAD1(1~40)和TAD2(41~61),介导p53蛋白的转录活性。TAD1和TAD2不仅可以共同调节一些常见基因的转录,也可以相互独立介导不同基因的反式激活^[10]。此外,p53蛋白N端还包含泛素连接酶MDM2的结合位点,MDM2可以与p53蛋白相结合并对其泛素化标记,进而使p53蛋白被蛋白酶体降解。富含脯氨酸的结构域(62~94)以

PXXP序列重复多次(P,脯氨酸;X可以是任何氨基酸),该区域与p53蛋白介导的细胞凋亡和生长抑制有关。DBD可以与DNA进行序列特异性结合(95~292),它包含1个中央样免疫球蛋白 β 夹层支架、环状片螺旋结构和2个大环状结构,该区域在整个进化过程中高度保守,大约80%的TP53基因突变都发生在该区域。DBD后面是连接区域(293~325)以及OD(326~356),其中OD是p53蛋白四聚体化从而发挥功能所必需的,此外OD还包含一个核输出信号序列。CRD(357~393)是高度非结构化的,涉及多个不同的作用,如DNA结合、赋予蛋白质稳定性、辅助因子招募等^[9]。



Fig. 1 Schematic diagram of p53 protein structure

图1 p53蛋白结构示意图

1.2 p53蛋白的功能

p53蛋白是人体内十分重要的抑癌转录因子。正常情况下,细胞中的p53蛋白维持在一个较低的水平,这主要是由体内E3泛素连接酶MDM2介导完成的。p53蛋白与MDM2形成的反馈调节通路^[11],导致细胞内p53蛋白的半衰期为6~20 min。各种各样的细胞应激如DNA损伤、端粒侵蚀、代谢改变、缺氧、有丝分裂纺锤体功能异常以及几种不同的致癌基因如Ras、Myc和Ets的突变激活等均可以引起机体针对MDM2和p53蛋白的修饰,这些修饰抑制了MDM2的活性,导致p53蛋白水平升高并激活,启动了一系列不同的转录程序^[12]。每一种应激压力都由一组不同的蛋白质检测,这些蛋白质向MDM2和/或p53蛋白发出信号并对其进行修饰。根据修饰(磷酸化、乙酰化、甲基化等)和细胞类型(如分化状态、细胞是否转化或正常、细

胞是否正在分裂或休眠),启动一个p53蛋白介导的信号通路(图2)。

激活状态下的p53蛋白通过与DNA序列(称为p53反应元件或p53结合位点)特异性结合诱导下游靶基因*p21*、*PUMA*、*NOXA*的表达,促进细胞凋亡、衰老、细胞周期阻滞、代谢改变、血管生成等多种作用,此外p53蛋白并非所有功能都是通过充当转录因子来实现的,比如细胞质中(尤其是定位于线粒体)的p53蛋白也参与调节糖酵解、氧化磷酸化、活性氧和自噬等^[13]。除了直接调节肿瘤细胞代谢外,p53蛋白还可以通过影响肿瘤微环境抑制肿瘤的发生,其中很重要的一点是调节微环境中的免疫细胞,目前大量证据表明,p53蛋白可以影响免疫系统功能,通过调节肿瘤相关免疫细胞的代谢活动进而影响肿瘤发展^[14]。

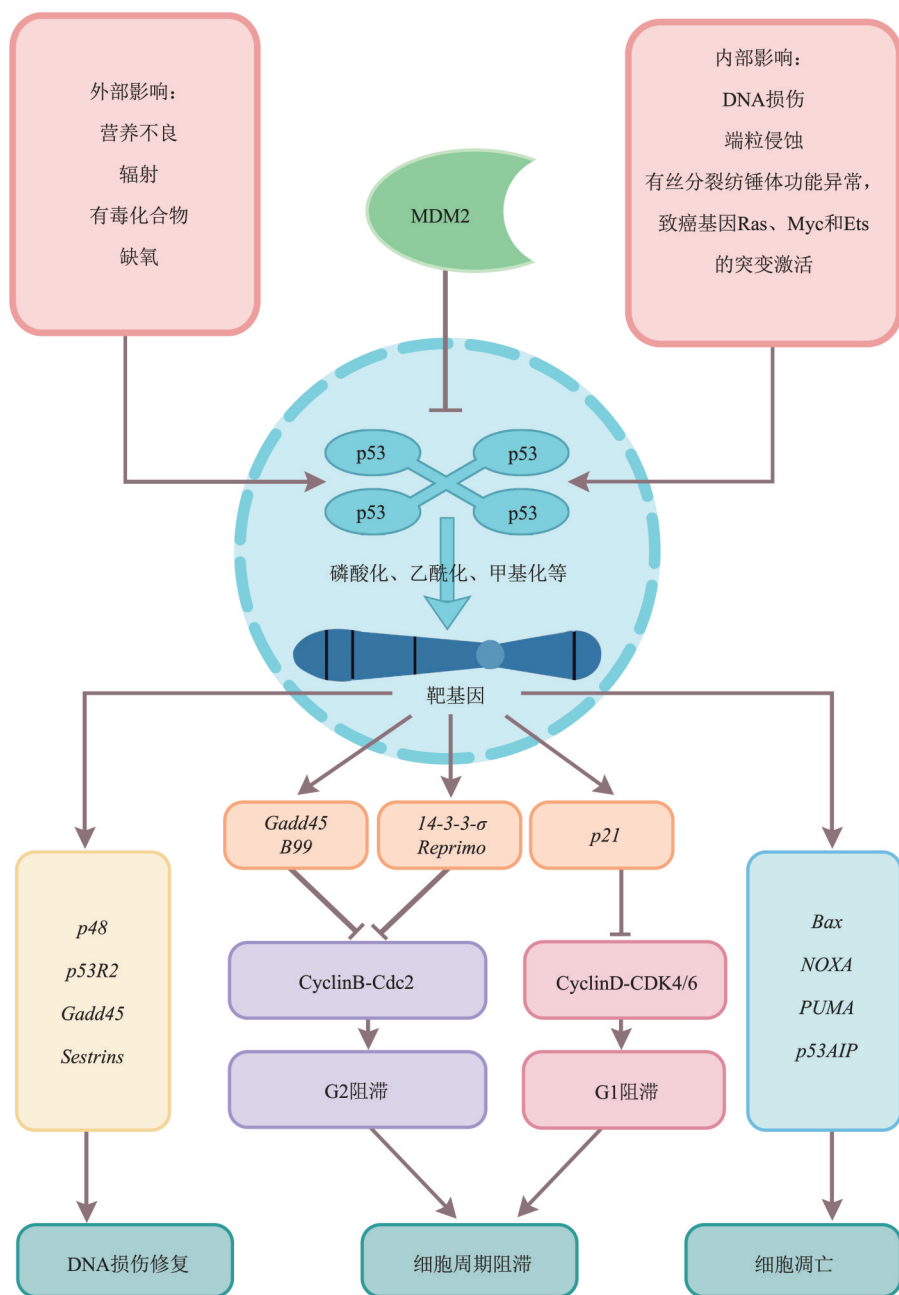


Fig. 2 Function of p53 protein
图2 p53蛋白的功能

p53蛋白是细胞中维持稳态的重要肿瘤抑制因子。在整个生命周期中，细胞都面临着持续的压力（内源压力、外部压力），每一种压力都由一组不同的蛋白质检测，这些蛋白质向MDM2和/或p53蛋白发出信号并对其进行修饰。启动一个p53蛋白介导的信号通路诱导细胞凋亡、衰老、分化等多种作用。

2 p53蛋白主要突变类型与特征

自从在人类结肠癌中首次发现 TP53 突变基因以来，大量 DNA 测序项目已经检测了所有人类癌症中 TP53 基因的突变频率。总的来说，TP53 基因

突变的频率通常取决于癌症的类型^[15-16]，睾丸畸形癌中突变最少（1%~3%），浆液性卵巢癌中突变最多（100%）。组织和细胞类型都影响 TP53 基因突变的频率，多种突变类型导致 p53 蛋白原本功能的丧失。在整个 TP53 基因突变类型中，缺失、插

入、移码和无义突变的发生率为10%，大多数情况下导致蛋白质不能产生或迅速被降解。其余90%的突变类型为错义突变^[17]，在这些突变中，90%定位于DBD，其中175、245、248、249、273和282氨基酸位点是其热点突变^[18]，p53^{R175H}与p53^{R273H}分别为p53蛋白错义突变的第一和第三大类型，其 β 片层结构都被很好地保存了下来，疏水表面变大，环的灵活性变高，从而易于在细胞内积聚^[19]。其次作为p53蛋白第二大错义突变类型的p53^{R248Q}，热稳定性较低，可通过与STAT3结合并使其磷酸化，从而持续激活STAT3信号通路促进癌细胞的迁移^[20]。事实上与野生型p53蛋白相比，大多数突变p53蛋白除丧失与DNA结合及调控转录的能力最终导致抑癌功能丧失外，还会获得新的致癌活性以促进癌症的进展，称为功能获得性效应(gain of function, GOF)，突变p53蛋白的GOF活性在1993年首次得到证实，当时Dittmer等^[21]报道了p53^{R175H}和p53^{R273H}的异位表达赋予了p53蛋白缺失细胞在软琼脂中形成集落和在裸鼠中形成异种移植瘤的能力，此后，包括使用细胞培养系统和小

鼠模型以及临床研究在内的大量证据表明，许多p53蛋白错义突变均具有GOF活性以促进癌症的发生。到目前为止，已经报道了多种突变p53蛋白GOF活性，包括促进细胞增殖、转移、基因组不稳定性、代谢重编程、肿瘤微环境重塑、免疫抑制和癌症治疗抵抗^[5, 22]。

3 靶向突变p53蛋白治疗肿瘤的策略

寻找靶向突变p53蛋白的药物一直是治疗癌症的研究热点。然而，野生型p53蛋白和大多数突变p53蛋白缺乏结合口袋或变构位点，阻碍了常规的药物设计，因此经常被认为是“不可成药的”靶点。更重要的是，在人类肿瘤中已经发现2 000多种p53蛋白的突变形式，它们的结构、稳定性和生物学功能各不相同，几乎不可能用单一药物靶向所有p53蛋白的突变形式，对于每一种p53蛋白突变体，可能需要专门的药物治疗^[23-24]。

本文主要梳理了两种靶向突变p53蛋白以治疗癌症的策略：a. 恢复突变p53蛋白野生型构象；b. 降解突变p53蛋白（图3）。并简要介绍了3种间

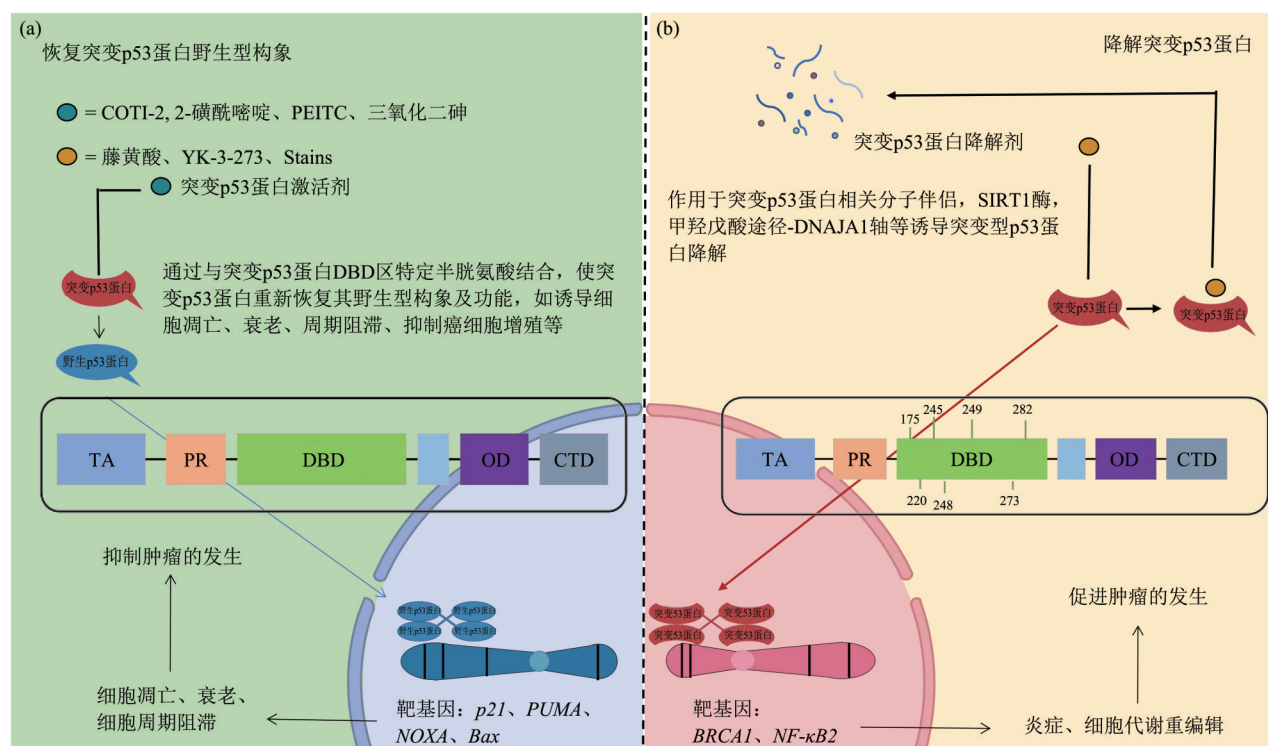


Fig. 3 Strategies for cancer therapy targeting degradation or restoration of wild-type conformation of mutated p53 protein

图3 恢复或降解突变p53蛋白治疗癌症的策略

(a) 突变p53蛋白被p53蛋白激活剂恢复为野生型构象后被导入细胞核并四聚化，获得与其靶基因（如p21、Bax、PIGs、P41）结合的能力，诱导肿瘤抑制反应（细胞周期阻滞、凋亡和衰老），抑制肿瘤发生。(b) 突变p53蛋白不仅失去了与肿瘤抑制基因结合的能力，而且还获得了转录激活致癌基因（如NF-κB2、BRCA1）的功能，以诱导肿瘤的发生。突变p53蛋白降解剂可直接与突变p53蛋白结合，诱导其降解并抑制肿瘤的发生。

接靶向突变p53蛋白治疗癌症的策略。尽管几十年来科学家们提出了各种各样针对突变p53蛋白治疗癌症的方式,但截至目前仍没有开发出一款疗效较为理想的药物,也正因如此,科学家们对p53蛋白的研究热情持续未减,未来无论哪种治疗策略及药物,若可以有效靶向突变p53蛋白治疗癌症,都将对人类医学产生划时代意义。

3.1 恢复突变p53蛋白野生型构象

p53蛋白属于热敏蛋白,突变后具有折叠与去折叠两种状态转换的能力,因此是否可以利用一些小分子化合物逆转突变构象,使突变p53蛋白重新恢复其野生型构象或功能呢?通过计算机对数千种化合物进行高通量筛选,发现极少数化合物似乎有这一能力,通过恢复突变p53蛋白的特定野生型功

能,如诱导凋亡、促进细胞周期阻滞和抑制癌细胞增殖,证实了这种“突变体再激活”。

3.1.1 COTI-2

COTI-2是通过计算机高通量筛选发现的一种具有口服活性的第三代胺苯硫脲化合物^[25](图4)。已被证明能与突变p53蛋白结合,恢复突变p53蛋白野生型活性,并使野生型p53蛋白靶基因表达正常化^[26-28]。除此之外,COTI-2似乎也能独立于p53蛋白发挥作用,该化合物可激活AMPK、抑制mTOR通路、诱导肿瘤细胞DNA损伤引起复制应激。COTI-2的这些不依赖p53蛋白发挥的效应可能进一步促进其抗癌作用,因为研究发现,诱导DNA损伤和复制应激会引起细胞凋亡,而抑制mTOR信号传导是一种成熟的治疗癌症的策略。

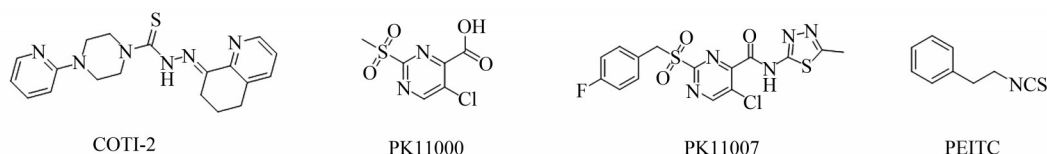


Fig. 4 Schematic diagram of reactivator structure of mutated p53 protein

图4 突变p53蛋白重激活剂结构示意图

与上述活性一致, Synnott等^[26]发现COTI-2可抑制多种恶性肿瘤细胞系和动物模型中肿瘤的生长,并且在研究的动物模型中具有良好的耐受性,没有发病或体重减轻的不良现象出现^[26-27]。Salim等^[25]发现,COTI-2可作为单一药物通过两种途径对多种头颈部癌细胞发挥明显的抗肿瘤作用,一方面COTI-2显著增强了对顺铂和/或辐射出现耐药性的头颈部癌肿瘤细胞对这些治疗的敏感性,另一方面COTI-2可在TP53基因缺失或突变的头颈部癌细胞中诱导凋亡,而在含野生型p53蛋白的头颈部癌细胞中,COTI-2诱导衰老而非凋亡,这可能是由于COTI-2可增强含野生型p53蛋白的细胞中p21表达,而p21是这些细胞中已知的衰老诱导物^[29]。除此之外, Maleki等^[30]还发现,在乳腺癌细胞系中表达突变p53蛋白的细胞系比含有野生型p53蛋白的细胞对COTI-2更敏感。目前,COTI-2正在进行一项针对复发性妇科癌症治疗的临床I期试验,初步药代动力学评价显示,口服该化合物的药峰时间(T_{max})在15~90 min之间,半衰期为8~10 h,并且其耐受性良好,最常见的不良反应为恶心、呕吐、疲劳和腹痛。在接受治疗的24名患者中,只有2名(8%)需要减少剂量。然而,到目前为止

在参与试验的妇科癌症患者中,还没有肿瘤消退的证据^[31]。

总之,COTI-2在多种含突变p53蛋白的肿瘤细胞中具有非常有效的治疗效果,即使这些肿瘤细胞对顺铂和辐射具有固有的耐药性,此外,该药物似乎以一种新颖的方式发挥其作用,包括重新激活野生型p53蛋白靶基因,诱导肿瘤细胞凋亡等。事实上,COTI-2在含野生型TP53基因的肿瘤细胞中同样诱导许多凋亡基因上调,但细胞凋亡并不明显,很可能是因为这些促凋亡基因并没有在蛋白质水平上被COTI-2诱导^[26]。

3.1.2 2-磺酰嘧啶

p53^{Y220C}突变是p53蛋白第9大突变类型,位于p53蛋白S3/S4环和S7/S8环之间的220位酪氨酸突变成半胱氨酸。p53^{Y220C}突变不仅直接破坏突变氨基酸与周围氨基酸Leu145和Thr155之间的氢键,而且降低了p53^{Y220C} cluster区域的折叠片S3和S8之间的氢键数量,使p53^{Y220C}突变所形成的亲水性空腔变大,加速了水分子进入该蛋白质内部,大大降低p53蛋白的热稳定性^[32]。为了能够找到具有较好靶向这种特殊突变活性的小分子化合物,Bauer等^[33]通过差示扫描荧光法(DSF)筛选了一

个旨在结合p53^{Y220C}突变诱导产生的空腔配体文库,发现了一个2-磺酰嘧啶小分子PK11000(5-氯-2-甲磺酰嘧啶-4-羧酸)(图4),它可将突变p53^{Y220C}蛋白融化温度明显提高($\Delta T_m > 1.2K$)^[34],并且根据光散射法测定蛋白质聚合动力学怀疑PK11000与突变p53蛋白属于共价结合。然而后期发现PK11000还可以使细胞内其他突变类型的p53蛋白融化温度升高,证实其稳定突变p53蛋白活性不是通过与p53^{Y220C}突变腔结合而实现的。

Synnott等^[35]发现,2-磺酰嘧啶在生物环境条件下仅与高度亲核的半胱氨酸发生SNAr反应,因此是选择性化学修饰蛋白质的有用工具。通过HSQC NMR数据及ESI质谱,证实了PK11000对p53^{Cys182}和p53^{Cys277}的特异性烷基化作用,PK11000对Cys182和Cys277的特异性修饰可在不损害p53蛋白与DNA亲和力的情况下提高蛋白质稳定性。

PK11007为PK11000的类似物,是温和的硫醇烷基化剂(图4),相对于PK11000具有更好的抗癌活性,这可能与膜透性改善(疏水性更强)、巯基反应活性提高(吸电子取代基更强)和烷基化选择性增加(4-氟苯取代导致亲核芳香族取代的空间位阻)等有关,此外PK11007还可通过两条途径发挥抗癌作用,即p53蛋白依赖和p53蛋白非依赖途径^[33]。PK11007可选择性结合暴露于突变p53蛋白表面的两个半胱氨酸即Cys182和Cys277从而稳定突变p53蛋白,并不损害其DNA结合活性。在一些癌细胞系中,不稳定的突变p53蛋白被PK11007重新激活,导致p53蛋白靶基因如*p21*和*PUMA*的上调而引起细胞凋亡。然而更普遍的是,PK11007可独立于p53蛋白通过消耗细胞内的谷胱甘肽,诱导细胞内活性氧水平的高度升高及内质网(ER)应激造成细胞凋亡^[36],PK11007和其他2-磺基嘧啶化合物作为抗癌药物的先导具有很大的潜力。

3.1.3 异硫氰酸苯乙酯(PEITC)

PEITC大量存在于豆瓣菜和十字花科蔬菜中^[37](图4),对多种肿瘤细胞表现出生长抑制活性,尤其对表达突变p53^{R175}蛋白的肿瘤细胞具有优先抑制活性^[38]。p53^{R175H}突变是人类癌症中最常见的p53蛋白错义突变,估计为5.6%的发生率。事实上,PEITC已经在临床I期和II期试验中进行了研究,作用机制包括恢复突变p53蛋白野生型构象、抑制肿瘤细胞迁移、诱导II期解毒酶、细胞周期阻滞^[24-25]和诱导氧化应激促进凋亡^[39]等。

此外,PEITC处理还会使突变p53^{R175}蛋白对MDM2依赖的蛋白酶体降解敏感。Lam-Ubol等^[40]将蛋白酶体抑制剂MG132或特异性MDM2抑制剂Nutlin-3与PEITC分别或共同处理SK-BR-3细胞。发现与单独PEITC处理相比,MG132或Nutlin-3均可以使SK-BR-3细胞全裂解液(WCL)中突变p53蛋白显著积累。这一结果表明,突变p53^{R175}蛋白稳定性降低是由于MDM2依赖的蛋白酶体的降解。这可能是由于PEITC将突变p53^{R175}蛋白恢复为野生型构象,而野生型p53蛋白在细胞内受MDM2的调控^[41]。

Choudhury等^[42]用PEITC处理SK-BR-3细胞时,发现高浓度($>8 \mu\text{mol/L}$)的PEITC会引起突变p53^{R175}蛋白发生聚集。由于蛋白质聚集物会引发自噬清除,Bommareddy等^[43]便研究了突变p53^{R175}蛋白的降解是否经历自噬。他们将 $8 \mu\text{mol/L}$ PEITC和氯喹(CHQ)共同处理SK-BR-3细胞,在细胞裂解液中发现突变p53^{R175}蛋白水平较单独PEITC处理时明显升高,而用 $4 \mu\text{mol/L}$ PEITC做相同处理时突变p53^{R175}蛋白水平并无明显差异,这表明了高浓度PEITC可能诱导突变p53^{R175}蛋白发生聚集并自噬。PEITC诱导的自噬,突变p53^{R175}蛋白的再活化及其随后对降解途径的敏感性均有助于其依赖突变p53蛋白发挥抗癌活性。

近年来科学家们的研究方向主要集中于从化学文库中寻找能重新激活突变p53蛋白的小分子化合物。然而,以膳食为基础预防或治疗突变p53蛋白的研究仍然很少。PEITC的发现提供了第一个突变p53蛋白被饮食中化合物激活的例子^[44],对癌症预防和治疗具有重要意义。

3.1.4 三氧化二砷(ATO)

p53蛋白突变类型高达数千种,多为错义突变^[15],由于在其DBD缺乏广泛适用的变构调控位点,这就使得针对突变p53蛋白的治疗显得尤为棘手。尽管Zinc(NSC319726)靶向锌配合位点已经显示了具有拯救突变p53蛋白的活性,但其对突变p53^{R175}蛋白具有高度特异性并影响p53蛋白DNA结合活性^[45]。还有一个值得注意的结合位点,涉及到一个远离DNA结合表面的裂缝,目前已经开发出多种可插入这个缝隙的小分子如PK083、PK15796等,从而稳定突变p53蛋白。然而遗憾的是,这种结合裂隙是p53^{Y220C}突变所特有的,并不适用于其他p53蛋白突变体。因此还需不断寻找靶向突变p53蛋白新的变构位点化合物。

ATO 是一种治疗急性早幼粒细胞白血病的药物, 可通过与半胱氨酸反应拯救结构突变型 p53 蛋白。砷结合突变 p53 蛋白的晶体结构揭示了一个隐藏的变构位点, 该位点位于远离突变 p53 蛋白 DBD 区的 ABP 口袋, 涉及三个砷配位半胱氨酸。砷结合并稳定了突变 p53 蛋白 DBD 区的环-片-螺旋基序和整个 β 夹层结构, 赋予结构突变型 p53 蛋白热稳定性和转录活性^[46], 值得注意的是, 砷与 ABP 口袋中的半胱氨酸三联体的特异性结合不同于其他作用于突变 p53 蛋白半胱氨酸的小分子化合物, 如 APR-246, 后者杂乱地结合暴露于蛋白质表面的半胱氨酸^[47]。但砷结合的半胱氨酸三联体同样可能存在于其他蛋白质中, 从而使 ATO 产生独立于突变 p53 蛋白的抗癌活性或细胞毒性^[48]。在细胞和小鼠异种移植模型中, ATO 重新激活了突变 p53 蛋白野生型活性并抑制肿瘤的发生。在对 ATO 介导拯救的 25 个人类癌症中最常见突变 p53 蛋白实验中发现, 所有的结构突变型 p53 蛋白都可以被拯救, 尽管程度不同。有趣的是, 接触突变型 p53 蛋白 p53^{S241F}、p53^{R248W} 也显示出被拯救的迹象, 这说明某些接触突变型 p53 蛋白活性丧失也是由于构象改变引起的。尽管 ATO 对结构突变型 p53 蛋白具有普遍的拯救作用, 但它们的野生型活性并不总是被有效地恢复, 因为除了整体折叠外, 局部 p53 蛋白 DNA 结合表面的完整性也决定了 ATO 拯救转录活性的效率^[49]。

ATO 联合维甲酸治疗 APL 为癌症治疗提供了新思路^[50]。令人鼓舞的是, ATO 的治疗潜力在血液^[51]和一些实体肿瘤^[52]的临床实验中已有报道。目前一项针对含有突变 p53 蛋白的血液系统恶性肿瘤的 I 期临床试验正在进行。

3.2 降解突变p53蛋白

TP53 基因的错义突变产生异常蛋白质, 其抑癌功能被取消的同时也可获得促进肿瘤细胞侵袭、转移和化疗耐药的能力 (GOF)^[53], 最近的研究结果表明, 突变 p53 蛋白的敲除降低了携带突变 p53 蛋白的肿瘤细胞的致癌特性。因此, 确定突变 p53 蛋白稳定/降解的特异机制以及识别不改变野生型 p53 蛋白水平而使突变 p53 蛋白降解的化合物是至关重要的。靶向降解突变 p53 蛋白可能是开发新型抗癌药物的一种有前景的方法。

3.2.1 藤黄酸 (GA)

GA 是从甘草干乳胶中分离出来的一种黄酮 (图 5), 在体内外均表现出强大的生物活性, 如激

活凋亡途径、诱导细胞周期阻滞、抑制端粒酶和拓扑异构酶 II 活性以及抑制血管生成等^[54-55]。迄今为止的所有研究都表明, GA 是一种有效的抗癌剂, 通过不同的机制具有不同的分子靶点。作为抗肿瘤候选药物, GA 目前正在进行中国食品和药物管理局批准的 II 期临床试验。

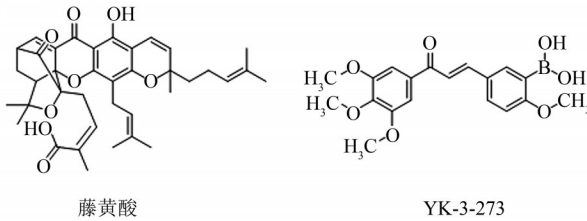


Fig. 5 Schematic diagram of small molecular compounds degrading mutated p53 protein

图5 降解突变p53蛋白的小分子化合物结构示意图

GA 可以抑制含有野生型 p53 蛋白的肿瘤细胞生长, 这是由于其可以抑制 MDM2 表达, 增加肿瘤细胞内野生型 p53 蛋白水平, 从而发挥抑癌作用^[56]。然而, 半数以上的人类癌症中发现了突变型 p53 蛋白, 有趣的是, GA 对 MDM2 的影响在含有突变型 p53 蛋白的细胞中是不同的, Qin 等^[56]发现在 GA 处理后的 MDA-MB-435 细胞中, MDM2 蛋白水平和 p53-MDM2 相互作用均未受到显著影响, 尽管已有报道 MDM2 可促进突变型和野生型 p53 蛋白的降解, 但越来越多的研究表明, 作为 E3 泛素连接酶的 MDM2 在突变型 p53 蛋白的降解中并不那么重要。而另一种突变 p53 蛋白降解途径, 涉及分子伴侣 Hsc70 和 Hsp90 以及泛素/蛋白酶体系统的密切合作, 这种降解途径的重要点在于伴侣相关泛素连接酶 CHIP, CHIP 通过与 Hsc70 和 Hsp90 的羧基端结合, 与 E2 酶一起介导分子伴侣结合目标蛋白的泛素化, 并诱导蛋白酶体降解目标蛋白。Hsc70 和 Hsp90 在内的多种分子伴侣可特异性识别突变型 p53 蛋白^[57], 并在增强突变 p53 蛋白的稳定性中发挥重要作用。Liu 等^[58]发现, GA 可以通过调节这些分子伴侣进而达到降解突变 p53 蛋白的目的, GA 可以上调 Hsc70, 下调 Hsp90 的表达, 而对 CHIP 的蛋白质水平没有显著影响, 进一步的免疫沉淀表明, GA 改变了突变 p53 蛋白和分子伴侣之间的相互作用, 呈浓度依赖性地破坏 Hsp90 与突变 p53 蛋白相互作用, 并促进 Hsc70/突变 p53 蛋白和 CHIP/Hsc70/突变 p53 蛋白复合物的形成。随后

Wang 等^[59]在MDA-MB-435细胞中转染CHIP siRNA后,用GA处理相关细胞时发现伴侣相关泛素连接酶消失导致突变p53蛋白水平的增加,这一发现强调了GA降解突变p53蛋白的机制,即GA通过上调与突变p53蛋白特异性结合的分子伴侣,并与CHIP、E2酶、26S蛋白酶体一起介导突变p53蛋白的泛素化降解。

除此之外GA还可以增加携带突变p53蛋白的癌细胞对化疗药物的敏感性^[60]。这可能是由于突变p53蛋白本身就是克服肿瘤耐药性的药物开发潜在靶点^[61],GA显著降低了肿瘤细胞中突变p53蛋白水平,从而使其对化疗药物的敏感性增加。

3.2.2 YK-3-273

YK-3-237为combretastatin a4 (CA-4)的硼酸查尔酮类似物^[62](图5),是SIRT1酶激活剂并对广泛含突变p53蛋白的肿瘤细胞表现出抗增殖活性。

SIRT1酶是针对p53^{K382}残基上的一个众所周知的去乙酰化酶。无论是野生型还是突变p53蛋白的去乙酰化都明显依赖于SIRT1酶的催化。野生型p53^{K382}残基的乙酰化被认为是其保持稳定^[63]的重要决定因素,突变p53蛋白高度稳定的机制目前尚不清楚,但Alves-Fernandes等^[64]发现,在TNBC细胞中,小分子化合物YK-3-237激活了SIRT1酶活性降低了突变p53蛋白的乙酰化,使突变p53蛋白水平明显下降。Rozenberg等^[65]通过real-time PCR定量分析发现,YK-3-273在肝癌细胞系HUH-7中可诱导GADD45、PTEN和PERP mRNA的表达,在乳腺癌细胞系T47D中,可诱导GADD45和p21 mRNA的表达,在鼻咽癌细胞系CNE-2中,诱导p21 mRNA的表达,在3种不同的TNBC细胞株HS578T、MDA-MB-468和SUM149PT中诱导野生型p53靶基因*PUMA*和*NOXA*的表达^[66],这些结果提示,YK-3-237介导的去乙酰化可抑制突变p53蛋白在多种肿瘤细胞中的功能,并特异性释放突变p53蛋白对野生型p53靶基因的转录抑制。然而,YK-3-237激活SIRT1酶的分子机制需要进一步阐明。最近报道称,YK-3-237只有在蛋白质被7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)标记的情况下才能激活其SIRT1酶活性,不能针对新生p53蛋白发挥作用^[67]。此外,YK-3-237还能激活人SIRT2酶活性,降低了细胞中 α 微管蛋白水平。通过SIRT2酶脱乙酰作用减少 α 微管蛋白可能与降解突变p53蛋白,上调野生型p53蛋白靶基因的表达共同发挥抗肿瘤

作用^[66]。

但是目前SIRT1酶在人类癌症中的作用还存在争议^[64],已有报道称SIRT1酶抑制剂和激活剂(如白藜芦醇)都能抑制人类肿瘤细胞株的生长^[68]。虽然最近已经开发了几种SIRT1酶激活剂,但这些化合物的抗癌作用尚未见报道。鉴于SIRT1酶在癌症、衰老、糖尿病和神经元疾病等许多生物过程中的作用日益增加,YK-3-237可能会是一个很有研究和开发价值的小分子化合物。

3.2.3 他汀类(Stains)

突变p53蛋白在肿瘤细胞中的稳定存在对其GOF活性至关重要^[53],然而目前对突变p53蛋白稳定/降解的特异机制还知之甚少。通过高通量筛选,发现了Stains降胆固醇药物可作为结构突变型p53蛋白的降解诱导物,并且对野生型p53蛋白和接触突变型p53蛋白的影响很小。

突变p53蛋白本质上是不稳定的,因为细胞中E3泛素连接酶MDM2及CHIP均可以诱导其降解^[69],但是在肿瘤细胞中,突变p53蛋白却可以与多种分子伴侣如Hsp90、Hsc70、DNAJA1等相互作用从而保持稳定的状态^[70]。甲羟戊酸途径在结构突变型p53蛋白的稳定以及GOF活性中发挥重要的作用。结构突变型p53蛋白可以结合并激活SREPB转录因子,从而上调参与甲羟戊酸途径的多种酶合成大量的5-磷酸甲羟戊酸(MVP),而5-磷酸甲羟戊酸的上调又可以反过来促进结构突变型p53蛋白与DNAJA1等多种分子伴侣的相互作用,从而使结构突变型p53蛋白在肿瘤细胞中保持稳定的状态,就这样形成了一个正反馈循环^[71]。并且5-磷酸甲羟戊酸还可以通过调节蛋白质的异戊二烯化,促进肿瘤细胞黏附、迁移和增殖过程中靶蛋白的膜附着^[72]。HMG-CoA还原酶是催化甲羟戊酸途径的第一步限速酶^[73],Stains药物通过抑制HMG-CoA还原酶活性,特异性减少细胞内5-磷酸甲羟戊酸的生成,抑制结构突变型p53蛋白与分子伴侣DNAJA1相互作用,从而使结构突变型p53蛋白被细胞内E3泛素连接酶MDM2及CHIP介导的泛素化标记并降解。

Stains药物可以抑制对癌症进展至关重要的两种细胞活动——蛋白质异戊二烯化和突变p53蛋白的稳定化,它是一款较为理想的靶向结构突变型p53蛋白的小分子抑制剂。此外,Stains药物还可使含突变p53^{R172H}蛋白的肿瘤细胞对阿霉素敏感,这表明了Stains药物可作为独立或与其他化疗药物

联合治疗肿瘤的潜在作用^[74]。然而, Moon等^[75]发现在小鼠模型中只有阿托伐他汀和瑞舒伐他汀的日剂量分别达到30 mg/kg和10 mg/kg时才会有较好的抗肿瘤效果, 这相当于约140 mg和约50 mg的人体剂量, 高于成人规定的临床剂量, 这也是为什么Stains药物治疗癌症的临床试验结果存在争议。因此目前最重要的是发现降低Stains药物剂量的同时仍保留其诱导突变p53蛋白降解能力的方法。

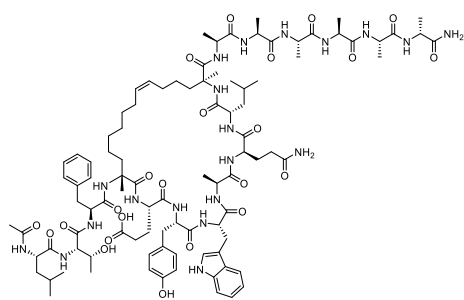
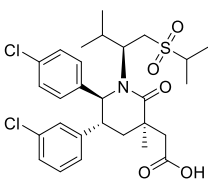
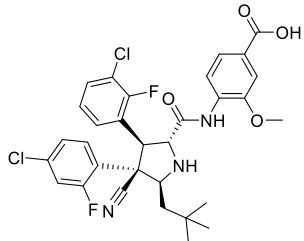
通过Stains药物抑制甲羟戊酸途径-DNAJA1轴诱导结构突变型p53蛋白降解可能代表了一种有希望的治疗癌症的策略。

3.3 间接靶向p53蛋白治疗肿瘤的策略

3.3.1 重新激活被抑制的野生型p53蛋白功能

在保持野生型 *TP53* 基因表达的肿瘤细胞中, 最广泛采用的治疗方法是抑制野生型 p53 蛋白的降解。野生型 p53 蛋白降解的机制涉及 E3 泛素连接酶 MDM2 对其泛素化标记, 最终导致野生型 p53 蛋白被细胞自身蛋白酶体所降解。MDM2 介导的泛素化依赖其与野生型 p53 蛋白的直接结合, 促使人们寻找抑制 MDM2-p53 结合的小分子作为稳定野生型 p53 蛋白并使其恢复效力的工具。于是大量靶向 MDM2 蛋白以重新激活野生型 p53 蛋白功能的小分子应运而生 (表 1)。

Table 1 MDM2/MDMX-p53 inhibitors and their mechanisms of action
表1 MDM2/MDMX-p53抑制剂及其作用机制

化合物名称	临床进展	作用机制
ALRN-6924 	非随机性临床实验1/2期 (NCT02264613)	ALRN-6924是唯一一种MDM2和MDMX双重抑制剂, 在临床前研究显示其具有相当的抗肿瘤作用 ^[76] 后进入临床试验。由于MDM2和MDMX具有不同的抗p53蛋白活性, 针对p53-MDM2和p53-MDMX的双重拮抗剂可能比单独抑制其中任何一种途径的效果更好 ^[77]
AMG232 	非随机性临床实验1期 (NCT02016729)	可抑制三种含野生型p53蛋白的肿瘤细胞系(SJSA-1、HCT116和ACHN)增殖。一种有效的、选择性的、口服的p53-MDM2相互作用抑制剂 ^[78]
Idasanutlin 	非随机性临床实验1期 (NCT01773408)	Idasanutlin (RG7388) 是一种强效的选择性MDM2拮抗剂, 可抑制p53-MDM2的结合, 成剂量依赖性促进p53蛋白稳定、细胞周期阻滞和细胞凋亡 ^[76]

3.3.2 利用miRNA抑制含突变p53蛋白的肿瘤发生

miRNA 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的单链 RNA 分子^[79], 主要功能为抑制其靶 mRNA 的转译或促进其降解, 因此, miRNA 水

平的改变可以通过转录后机制进一步影响蛋白质水平。野生型 p53 蛋白可通过直接激活转录或促进成熟来调节 miRNA 水平^[80], 而突变 p53 蛋白会导致 p53/miRNA 轴的失调和其他 miRNA 的上调, 从而

赋予额外的致癌能力，如体细胞重编程等（表2）。此外，最近一些研究聚焦于循环miRNAs，探索其

诊断和预后潜力，表明miRNAs的潜在临床应用价值。miRNAs可能是一种有效的癌症治疗工具。

Table 2 miRNA agonists and their mechanisms of action

表2 miRNA激动剂及其作用机制

化合物名称	癌症类型	作用靶点	作用机制
MRX34	多发性癌	miR-34a	miR-34a是最早报道的由p53蛋白直接调控的miRNAs ^[81] 。野生型p53蛋白的激活可以上调miR-34a的表达，其与野生型p53蛋白共同发挥抗肿瘤作用。已有证据表明，miR-34a在癌症组织中的表达水平低于正常组织，如肠癌、乳腺癌和肺癌 ^[82] ，在MCF7/ADR细胞中，miR-34a异位表达可通过抑制Notch1显著抑制肿瘤生长，因此，miR-34a可以看作是癌症治疗的一个靶点。MRX34是miR-34a激动剂，在一期临床试验中，首次探索了miRNA相关治疗药物的应用。然而，由于产生较严重的免疫反应，这项研究并未成功
miR-223-3p agomir	肺癌	miR-223-3p	Masciarelli等 ^[8] 发现，在肺癌中突变p53蛋白可以结合miR-223-3p启动子并抑制其表达。但同时突变p53蛋白也是miR-223-3p的靶点，miR-223-3p可通过miR-223-5p-突变p53蛋白反馈环来抑制突变p53蛋白的表达，从而发挥肿瘤抑制作用。miR-223-3p agomir治疗可显著抑制肺癌在体内的进展

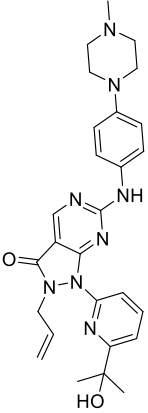
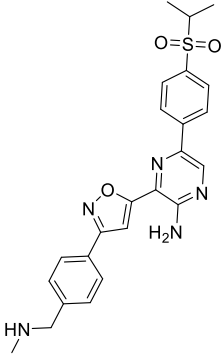
3.3.3 利用合成致死抑制含突变p53蛋白的肿瘤发生

与直接靶向突变p53蛋白药物相比，合成致死方法对p53蛋白结构的依赖较小，这表明它可以广

泛作用于多种p53蛋白突变类型。根据肿瘤细胞中所含突变p53蛋白功能丧失（loss of function, LOF）和GOF的不同，可使用不同的策略（表3）。

Table 3 Inhibition of tumorigenesis containing mutated p53 proteins based on synthetic lethal effects

表3 基于合成致死效应抑制含突变p53蛋白的肿瘤发生

化合物名称	作用位点	临床进展	作用机制
MK-1775	WEE1	非随机性临床实验2期	MK-1775对多种恶性肿瘤细胞具有细胞毒性，可选择性地靶向并抑制WEE1，导致DNA复制过程中损伤未及时修复而引起肿瘤细胞凋亡 ^[83] 。MK-1775对WEE1的抑制作用可以加强各种DNA损伤剂的细胞毒性，并且在p53蛋白缺失的恶性肿瘤中表现得更加明显。使用MK-1775、顺铂和多西他赛（NCT02508246）联合治疗头颈部鳞状细胞癌的临床试验验证了WEE1和p53蛋白之间这种合成致死性的有效性和安全性 ^[84]
			
M6620	ATR	非随机性临床实验2期	M6620作为ATR抑制剂，可以干扰细胞对错误DNA的修复 ^[85] ；拓扑替康，是一种拓扑异构酶抑制剂，常用于肺癌等实体瘤的治疗，其作用机制是干扰细胞DNA的复制。M6620与拓扑替康的联合使用使肿瘤细胞DNA复制过程中产生一堆错误而且得不到修复，进而凋亡 ^[86]
			

4 总结与展望

p53蛋白是人体内天然免疫和抗肿瘤反应的重要组成部分。其突变不仅会造成原本抑癌功能的丧失, 甚至还会出现一些促进癌症发生的新功能。几十年来, 科学家们为了战胜突变p53蛋白提出了各种各样的观点, 除上文提到的几种策略外, 还提出从水解的突变p53蛋白中提取特异性肽作为新抗原由抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 提供给B细胞和T细胞以激活免疫反应^[87], 利用靶向突变p53蛋白的小分子设计蛋白质水解靶向嵌合体 (proteolysis-targeting chimeras, PROTAC) 化合物以降解毒突变p53蛋白等多种方式, 达到治疗癌症的目的。然而目前绝大多数针对突变p53蛋白的药物仍处于初级阶段, 没有一款上市, 因此现在就断定针对突变p53蛋白的治疗会对癌症有效还为时过早, 但是一旦有针对突变p53蛋白疗效较好的化合物出现, 就有可能开创癌症治疗新时代, 特别是在p53蛋白功能障碍在人类癌症中如此普遍存在的情况下。

总的来说, 突变p53蛋白是一个有吸引力的癌症治疗靶点, 随着针对突变p53蛋白的治疗策略及药物不断开发, 根据患者的TP53基因突变情况设计个性化的治疗方案将成为可能。

参 考 文 献

- [1] Cai B H, Hsu Y C, Yeh F Y, *et al.* p63 and p73 activation in cancers with p53 mutation. *Biomedicines*, 2022, **10**(7): 1490
- [2] Kon N, Churchill M, Gu W, *et al.* Robust p53 stabilization is dispensable for its activation and tumor suppressor function. *Cancer Res*, 2021, **81**(4): 935-944
- [3] Demir Ö, Barros E P, Offutt T L, *et al.* An integrated view of p53 dynamics, function, and reactivation. *Curr Opin Struct Biol*, 2021, **67**: 187-194
- [4] 项芬芬, 张学梅, 高英慧, 等. p53与物质能量代谢的关系. *国际内分泌代谢杂志*, 2017, **37**(4): 262-265
Xiang F F, Zhang X M, Gao Y H, *et al.* *Int J Endocrinol Metab*, 2017, **37**(4): 262-265
- [5] Hafner A, Bulyk M L, Jambhekar A, *et al.* The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, **20**(4): 199-210
- [6] Nagpal I, Yuan Z-M. The basally expressed p53-mediated homeostatic function. *Front Cell Dev Biol*, 2021, **9**: 775312
- [7] Sabapathy K, Lane D P. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, **15**(1): 13-30
- [8] Masciarelli S, Fontemaggi G, Di Agostino S, *et al.* Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene*, 2014, **33**(12): 1601-1608
- [9] Levine A J. Targeting therapies for the p53 protein in cancer treatments. *Annu Rev Cancer Biol*, 2019, **3**(1): 21-34
- [10] Naryzhny S N, Legina O K. Structural-functional diversity of p53 proteoforms. *Biomed Khim*, 2019, **65**(4): 263-276
- [11] Dobbstein M, Levine A J. Mdm2: open questions. *Cancer Sci*, 2020, **111**(7): 2203-2211
- [12] Levine A J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. *Nat Rev Cancer*, 2020, **20**(8): 471-480
- [13] Liu Y, Gu W. The complexity of p53-mediated metabolic regulation in tumor suppression. *Semin Cancer Biol*, 2022, **8**: 54-32
- [14] Xiao Y, Chen J, Zhou H, *et al.* Combining p53 mRNA nanotherapy with immune checkpoint blockade reprograms the immune microenvironment for effective cancer therapy. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 758
- [15] Zehir A, Benayed R, Shah R H, *et al.* Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*, 2017, **23**(6): 703-713
- [16] Lawrence M S, Stojanov P, Mermel C H, *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 2014, **505**(7484): 495-501
- [17] Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Hum Mutat*, 2014, **35**(6): 672-688
- [18] Freed-Pastor W A, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev*, 2012, **26**(12): 1268-1286
- [19] Li L, Li X, Tang Y, *et al.* Common cancer mutations R175H and R273H drive the p53 DNA-binding domain towards aggregation-prone conformations. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, **22**(17): 9225-9232
- [20] Schulz-Heddergott R, Stark N, Edmunds S J, *et al.* Therapeutic ablation of gain-of-function mutant p53 in colorectal cancer inhibits stat3-mediated tumor growth and invasion. *Cancer Cell*, 2018, **34**(2): 298-314
- [21] Dittmer D, Pati S, Zambetti G, *et al.* Gain of function mutations in p53. *Nat Genet*, 1993, **4**(1): 42-46
- [22] Levine A J. The many faces of p53: something for everyone. *J Mol Cell Biol*, 2019, **11**(7): 524-530
- [23] Chillemi G, Kehrloesser S, Bernassola F, *et al.* Structural evolution and dynamics of the p53 proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, **7**(4): a028308
- [24] Li Y, Wang Z, Chen Y, *et al.* Salvation of the fallen angel: reactivating mutant p53. *Br J Pharmacol*, 2019, **176**(7): 817-831
- [25] Salim K Y, Maleki Vareki S, Danter W R, *et al.* COTI-2, a novel small molecule that is active against multiple human cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget*, 2016, **7**(27): 41363-41379
- [26] Synnott N C, O'connell D, Crown J, *et al.* COTI-2 reactivates mutant p53 and inhibits growth of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2020, **179**(1): 47-56

- [27] Lindemann A, Patel A A, Silver N L, *et al.* COTI-2, a novel thiosemicarbazone derivative, exhibits antitumor activity in HNSCC through p53-dependent and -independent mechanisms. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(18): 5650-5662
- [28] Basu B, Gourley C, Gabra H, *et al.* PISARRO: a EUTROC phase 1b study of APR-246 with carboplatin (C) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in relapsed platinum-sensitive high grade serous ovarian cancer (HGSOC). *Ann Oncol*, 2016, **27**(suppl_6): 5571
- [29] Wagner K D, Wagner N. The senescence markers p16INK4A, p14ARF/p19ARF, and p21 in organ development and homeostasis. *Cells*, 2022, **11**(12): 1966
- [30] Maleki Vareki S, Salim K Y, Danter W R, *et al.* Novel anti-cancer drug COTI-2 synergizes with therapeutic agents and does not induce resistance or exhibit cross-resistance in human cancer cell lines. *PLoS One*, 2018, **13**(1): e0191766
- [31] Westin S N, Nieves-Neira W, Lynam C, *et al.* Abstract CT033: safety and early efficacy signals for COTI-2, an orally available small molecule targeting p53, in a phase I trial of recurrent gynecologic cancer. *Cancer Res*, 2018, **78**(13 Supplement): CT033-CT033
- [32] 沈洪辰, 丁吉勇, 李丽, 等. Y220C 突变体影响 p53C 蛋白质构象转换的分子动力学模拟. *物理化学学报*, 2016, **32**(10): 2620-2627
Shen H C, Ding J Y, Li L, *et al.* *Acta Phys Chim Sin*, 2016, **32**(10): 2620-2627
- [33] Bauer M R, Joerger A C, Fersht A R. 2-Sulfonylpyrimidines: mild alkylating agents with anticancer activity toward p53-compromised cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(36): E5271-E5280
- [34] Boeckler F M, Joerger A C, Jaggi G, *et al.* Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(30): 10360-10365
- [35] Synnott N C, Bauer M R, Madden S, *et al.* Mutant p53 as a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer: preclinical investigation with the anti-p53 drug, PK11007. *Cancer Lett*, 2018, **414**: 99-106
- [36] Gottlieb E, Voutsden K H. p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, **2**(4): a001040
- [37] Krishnan M, Venkidasamy B. PEITC: a prospective natural metabolite in oral cancer treatment. *Oral Oncol*, 2022, **133**: 106044
- [38] Aggarwal M, Saxena R, Asif N, *et al.* p53 mutant-type in human prostate cancer cells determines the sensitivity to phenethyl isothiocyanate induced growth inhibition. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, **38**(1): 307
- [39] Biswas S, Mahapatra E, Das S, *et al.* PEITC: a resounding molecule averts metastasis in breast cancer cells *in vitro* by regulating PKC δ /Aurora A interplay. *Heliyon*, 2022, **8**(11): e11656
- [40] Lam-Ubol A, Fitzgerald A L, Ritdej A, *et al.* Sensory acceptable equivalent doses of β -phenylethyl isothiocyanate (PEITC) induce cell cycle arrest and retard the growth of p53 mutated oral cancer *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct*, 2018, **9**(7): 3640-3656
- [41] Munisamy M, Mukherjee N, Thomas L, *et al.* Therapeutic opportunities in cancer therapy: targeting the p53-MDM2/MDMX interactions. *Am J Cancer Res*, 2021, **11**(12): 5762-5781
- [42] Choudhury S, Kolukula V K, Preet A, *et al.* Dissecting the pathways that destabilize mutant p53: the proteasome or autophagy?. *Cell Cycle*, 2013, **12**(7): 1022-1029
- [43] Bommarreddy A, Hahm E R, Xiao D, *et al.* Atg5 regulates phenethyl isothiocyanate-induced autophagic and apoptotic cell death in human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2009, **69**(8): 3704-3712
- [44] Aggarwal M, Saxena R, Sinclair E, *et al.* Reactivation of mutant p53 by a dietary-related compound phenethyl isothiocyanate inhibits tumor growth. *Cell Death Differ*, 2016, **23**(10): 1615-1627
- [45] Ha J H, Prela O, Carpizo D R, *et al.* p53 and zinc: a malleable relationship. *Front Mol Biosci*, 2022, **9**: 895887
- [46] Chen S, Wu J L, Liang Y, *et al.* Arsenic trioxide rescues structural p53 mutations through a cryptic allosteric site. *Cancer Cell*, 2021, **39**(2): 225-239
- [47] Zhang Q, Bykov V J N, Wiman K G, *et al.* APR-246 reactivates mutant p53 by targeting cysteines 124 and 277. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(5): 439
- [48] Gummlich L. ATO stabilizes structural p53 mutants. *Nat Rev Cancer*, 2021, **21**(3): 141
- [49] Joerger A C, Ang H C, Fersht A R. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(41): 15056-15061
- [50] De Thé H, Pandolfi P P, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for oncoprotein-targeted cure. *Cancer Cell*, 2017, **32**(5): 552-560
- [51] Hu X, Cai J, Zhu J, *et al.* Arsenic trioxide potentiates Gilteritinib-induced apoptosis in FLT3-ITD positive leukemic cells *via* IRE1 α -JNK-mediated endoplasmic reticulum stress. *Cancer Cell Int*, 2020, **20**: 250
- [52] Wang L, Liang W, Peng N, *et al.* The synergistic antitumor effect of arsenic trioxide combined with cytotoxic T cells in pulmonary metastasis model of colon cancer. *Oncotarget*, 2017, **8**(65): 109609-109618
- [53] Dolma L, Muller P A J. GOF mutant p53 in cancers: a therapeutic challenge. *Cancers*, 2022, **14**(20): 5091
- [54] Hatami E, Jaggi M, Chauhan S C, *et al.* Gambogic acid: a shining natural compound to nanomedicine for cancer therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, **1874**(1): 188381
- [55] Li M, Su F, Zhu M, *et al.* Research progress in the field of gambogic acid and its derivatives as antineoplastic drugs. *Molecules*, 2022, **27**(9): 2937
- [56] Qin J J, Li X, Hunt C, *et al.* Natural products targeting the p53-MDM2 pathway and mutant p53: recent advances and implications in cancer medicine. *Genes Dis*, 2018, **5**(3): 204-219
- [57] Gong L, Zhang Q, Pan X, *et al.* p53 protects cells from death at the heatstroke threshold temperature. *Cell Rep*, 2019, **29**(11): 3693-3707
- [58] Liu Y, Chen Y, Lin L, *et al.* Gambogic acid as a candidate for cancer

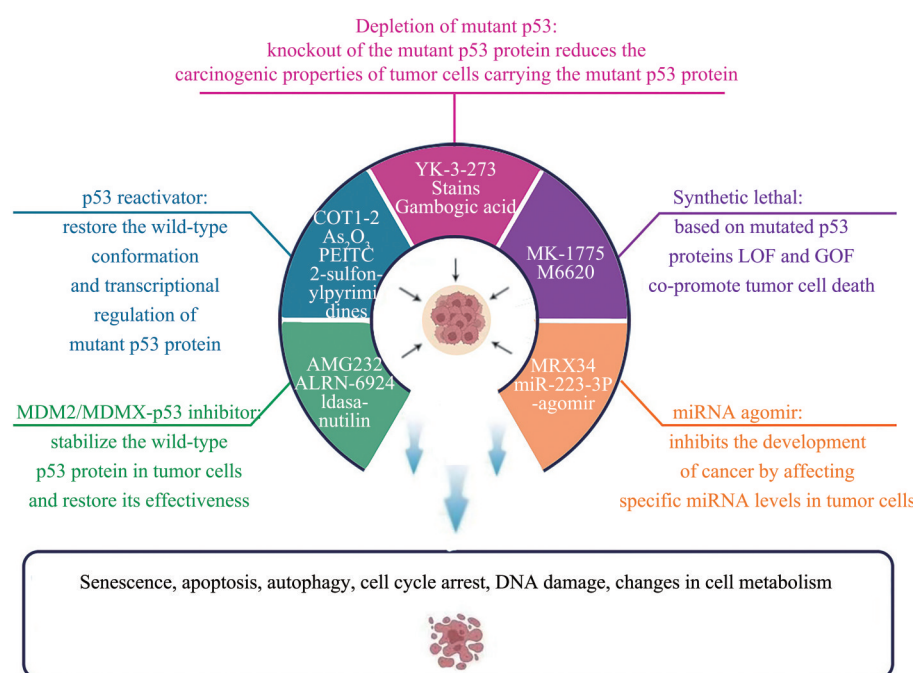
- therapy: a review. *Int J Nanomedicine*, 2020, **15**: 10385-10399
- [59] Wang J, Zhao Q, Qi Q, *et al.* Gambogic acid-induced degradation of mutant p53 is mediated by proteasome and related to CHIP. *J Cell Biochem*, 2011, **112**(2): 509-519
- [60] Huang J, Zhu X L, Wu Y, *et al.* Combined effects of low-dose gambogic acid and Na131 in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncol Lett*, 2021, **22**(2): 588
- [61] Mccubrey J A, Meher A K, Akula S M, *et al.* Wild type and gain of function mutant TP53 can regulate the sensitivity of pancreatic cancer cells to chemotherapeutic drugs, EGFR/Ras/Raf/MEK, and PI3K/mTORC1/GSK-3 pathway inhibitors, nutraceuticals and alter metabolic properties. *Aging*, 2022, **14**(8): 3365-3386
- [62] Lakshminarasimhan M, Rauh D, Schutkowski M, *et al.* Sirt1 activation by resveratrol is substrate sequence-selective. *Aging*, 2013, **5**(3): 151-154
- [63] Jeon B N, Yoon J H, Han D, *et al.* ZNF509S1 downregulates PUMA by inhibiting p53K382 acetylation and p53-DNA binding. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2017, **1860**(9): 962-972
- [64] Alves-Fernandes D K, Jasiulonis M G. The role of SIRT1 on DNA damage response and epigenetic alterations in cancer. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(13): 3153
- [65] Rozenberg J M, Zvereva S, Dalina A, *et al.* The p53 family member p73 in the regulation of cell stress response. *Biol Direct*, 2021, **16**(1): 23
- [66] Yi Y W, Kang H J, Kim H J, *et al.* Targeting mutant p53 by a SIRT1 activator YK-3-237 inhibits the proliferation of triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget*, 2013, **4**(7): 984-994
- [67] Hubbard B P, Gomes A P, Dai H, *et al.* Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science*, 2013, **339**(6124): 1216-1219
- [68] Ren B, Kwah M X Y, Liu C, *et al.* Resveratrol for cancer therapy: challenges and future perspectives. *Cancer Lett*, 2021, **515**: 63-72
- [69] Martinho M S, Nancarrow D J, Lawrence T S, *et al.* Chaperones and ubiquitin ligases balance mutant p53 protein stability in esophageal and other digestive cancers. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, **11**(2): 449-464
- [70] Ji L, Liu C, Yuan Y, *et al.* Key roles of rho GTPases, YAP, and mutant p53 in anti-neoplastic effects of statins. *Fundam Clin Pharmacol*, 2020, **34**(1): 4-10
- [71] Parrales A, Thoenen E, Iwakuma T. The interplay between mutant p53 and the mevalonate pathway. *Cell Death Differ*, 2018, **25**(3): 460-470
- [72] Shimoyama S. Statins are logical candidates for overcoming limitations of targeting therapies on malignancy: their potential application to gastrointestinal cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, **67**(4): 729-739
- [73] Gunasekaran B, Shukor M Y. HMG-CoA reductase as target for drug development. *Methods Mol Biol*, 2020, **2089**: 245-250
- [74] Jiang W, Hu J W, He X R, *et al.* Statins: a repurposed drug to fight cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, **40**(1): 241
- [75] Moon H, Hill M M, Roberts M J, *et al.* Statins: protectors or pretenders in prostate cancer?. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, **25**(4): 188-196
- [76] Yee K, Papayannidis C, Vey N, *et al.* Murine double minute 2 inhibition alone or with cytarabine in acute myeloid leukemia: results from an idasanutlin phase 1/1b study. *Leuk Res*, 2021, **100**: 106489
- [77] Saleh M N, Patel M R, Bauer T M, *et al.* Phase 1 trial of ALRN-6924, a dual inhibitor of MDMX and MDM2, in patients with solid tumors and lymphomas bearing wild-type TP53. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(19): 5236-5247
- [78] Erba H P, Becker P S, Shami P J, *et al.* Phase 1b study of the MDM2 inhibitor AMG 232 with or without trametinib in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2019, **3**(13): 1939-1949
- [79] He B, Zhao Z, Cai Q, *et al.* miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *Int J Biol Sci*, 2020, **16**(14): 2628-2647
- [80] Krell J, Frampton A E, Colombo T, *et al.* The p53 miRNA interactome and its potential role in the cancer clinic. *Epigenomics*, 2013, **5**(4): 417-428
- [81] Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, *et al.* Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, 2007, **6**(13): 1586-1593
- [82] Hong D S, Kang Y K, Borad M, *et al.* Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer*, 2020, **122**(11): 1630-1637
- [83] Duan Y, Dong X, Nie J, *et al.* Weel1 kinase inhibitor MK-1775 induces apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells and enhances the efficacy of doxorubicin involving downregulation of Notch pathway. *Oncol Lett*, 2018, **16**(4): 5473-5481
- [84] Méndez E, Rodríguez C P, Kao M C, *et al.* A phase I clinical trial of AZD1775 in combination with neoadjuvant weekly docetaxel and cisplatin before definitive therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2018, **24**(12): 2740-2748
- [85] Konstantinopoulos P A, Cheng S C, Wahner Hendrickson A E, *et al.* Berzosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in platinum-resistant high-grade serous ovarian cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 2020, **21**(7): 957-968
- [86] Thomas A, Redon C E, Sciuto L, *et al.* Phase I study of ATR inhibitor M6620 in combination with topotecan in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*, 2018, **36**(16): 1594-1602
- [87] Sobhani N, D'angelo A, Wang X, *et al.* Mutant p53 as an antigen in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(11): 4087

Antitumor Drugs Targeting Mutant p53 Protein*

WANG Ruo-Ya, ZHANG Yuan, ZHANG Ji-Hong, YU Fei**

(Medical School, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Graphical abstract



Abstract The p53 protein is an essential tumor suppressor in the human body that plays a critical role in preventing tumor formation by controlling cell cycle arrest and promoting apoptosis. Mutations in the p53 gene are frequently observed in more than 50% of tumor tissues and lead to the generation of mutant p53 proteins, which not only have a dominant-negative effect (DN) that hinders the function of wild-type p53 protein but also have gain-of-function (GOF) effects that stimulate tumor development by regulating cell metabolism, invasion, migration, and other processes. Therefore, mutant p53 protein has become a specific drug target for cancer therapy. However, the lack of a drug-binding pocket and smooth surface of mutant p53 proteins have made them undruggable targets for a long time. In recent years, with the development of high-throughput screening technology and an enhanced understanding of the structure and conformational changes exhibited by mutant p53 proteins, a multitude of small molecule compounds directed against mutant p53 protein have been identified, exhibiting substantial *in vitro* anti-tumor efficacy. Moreover, some of these compounds have entered clinical trials. This review summarized the direct and indirect strategies for the treatment of cancers targeting mutant p53, with a primary focus on the mechanisms of action of small molecule compounds that reactivate mutant p53 protein or degrade mutant p53 protein. The aim is to provide assistance for the development of innovative drugs targeting mutant p53 protein in the future.

Key words p53 protein, cancer treatment, anticancer drugs, p53 reactivator, depletion of mutant p53 protein

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0014

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81960670), Science and Technology Plan of Science and Technology Department of Yunnan Province (202001AS070012), and Expert Workstation of Zhou Demin, Yunnan (Kunming) (YSZJGZZ-2020046).

** Corresponding author.

Tel: 86-18087122003, E-mail: feiyuz8@163.com

Received: January 10, 2023 Accepted: March 2, 2023