



论文

超分子抗癌药物双环铂的结构研究

杨旭清^{①②}, 金祥林^{②*}, 宋勤华^①, 汤卡罗^②, 杨振云^①, 张肖锋^①, 唐有祺^②

① 北京索普兴大药业公司, 北京 100081

② 北京分子动态与稳态国家重点实验室; 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: jxltkl@126.com

收稿日期: 2009-11-02; 接受日期: 2009-12-13

摘要 铂类抗癌药物在水中的溶解度和稳定性直接与药物的活性和毒性有关。几十年来, 为了改进药物的效能和降低药物的毒性, 做了大量的研究。超分子铂类化合物可能具有与众不同的物理化学性质, 我们成功设计和合成了一个新型的超分子抗癌药物-双环铂, 已证实双环铂对人类的恶性肿瘤有好的治疗效果。用 X 射线单晶衍射法测定了双环铂的晶体结构, 又用电喷雾离子化质谱研究了它在水溶液中的状态。根据实验结果提出了双环铂在水溶液中的结构模型, 解释了双环铂在水中好的稳定性和溶解度。

关键词
双环铂
晶体结构
超分子
抗癌

1 引言

20世纪60年代末期, Barnett Rosenberg 发现了顺铂(*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂])具有抗癌活性^[1, 2]。1978年, 顺铂经 FDA 批准为抗癌药物在美国上市, 几十年来一直用于治疗人类的各种癌症^[3]。在治疗的过程中, 发现顺铂是一种高毒性药物, 具有严重恶心呕吐和胃肠道毒性、强肾毒性、骨髓抑制、耳毒性、周围神经毒性等^[4]。为了克服顺铂高毒性的缺点, 对顺铂的结构进行改造来发现性能更好的铂类抗癌药物的工作一直延续至今, 已合成和筛选了 3000 多种铂类化合物^[5]。卡铂(Carboplatin)是筛选出的第二代的铂类抗癌药物, 它保留了顺铂的抗癌活性, 而且降低了毒性^[6]。但是卡铂仍有较重的毒副作用, 而且和顺铂有交叉的耐药性, 这些缺点限制了它的应用^[7]。

铂类抗癌药物的主要生物靶点是 DNA^[8-12]。一系列研究揭示, 顺铂可与 DNA 形成链之间或链内交联的顺铂-DNA 加合物^[13-15]。顺铂-DNA 加合物的形成使 DNA 的构型发生改变, 从而影响 DNA 复制, 引起癌细胞的死亡。顺铂-DNA 加合物是在研究用酶解经顺铂处理过的鲑鱼精子 DNA 的产物时证实的, 其

中有顺铂-GG(47%~65%), 顺铂-AG(23%~26%)和顺铂-GNG(c.a. 2%~6%)^[16, 17]。在各种加合物中, 发现 Pt 都和鸟嘌呤上 N7 原子成键。

早期研究表明, 具有抗癌活性的铂(II)配合物的结构式可用通式 *cis*(PtA₂X₂)来表示, 它应有以下结构特征^[18]:

(1) 配体以平面四方型构型与 Pt 顺式配位。

(2) X 称为离去基团, 它应是具有中等取代活性的两个单啮或一个双啮带负电荷配体。

(3) A 称为保留基团, 它应是非取代活性的 NH₃ 或中性胺类。

(4) 配合物应是中性。

铂类抗癌药物的水溶性、脂溶性和稳定性影响药物的效能和毒性。当药物分子从血液进入细胞质时, 细胞质中 Cl⁻的浓度低于血液中的浓度, 水解过程就可发生。已经证实带有弱配体(如 NO₃⁻)的配合物在注射入体内后迅速水解, 没有活性。同时强配体(如 CN⁻)和 Pt²⁺结合太牢固而不能离开, 在体内也没有活性。只有中等强度配体的中性的铂配合物才具有抗癌活性。

为了克服现有的铂类抗癌药物在水中不稳定的缺点, 我们设计合成了一个新的超分子抗癌药物-双环铂[顺(1,1 环丁二羧酸根)二氨合铂(II)(1,1 环丁二羧酸)]. 本文中, 我们报道双环铂的晶体结构和电喷雾质谱, 并根据实验数据提出了双环铂在水溶液中的结构模型, 解释了双环铂在水中有好的溶解度和非常稳定的原因. 临床前的研究揭示双环铂有很强的抗癌效能. 现在一期和二期临床试验已结束, 这部分的结果将另文报道.

2 材料和方法

双环铂的单晶从 0.12 M 浓度的水溶液在 4 °C 得到. 卡铂的单晶从过饱和的水溶液在室温条件下得到.

衍射数据在装有钼靶和石墨单色器(波长 0.07107 nm)的理学公司 AFC6S 四园衍射仪上收集, 共收集 2818 个衍射点. 结构解析和修正使用 SHELX97^[19].

质谱在布鲁克公司的离子陷阱电喷雾质谱仪上得到.

结构的图示使用 PyMol 程序产生^[20].

3 结果和讨论

3.1 卡铂和双环铂的晶体结构

测定了双环铂和卡铂的晶体结构, 卡铂结构用于与双环铂比较. 双环铂晶体结构测定的结果已存放 CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre), 编号为(CCDC 752861). 表 1 列出了二个晶体的晶体学参数和最终修正结果.

卡铂晶体结构测定的结果和已报道的结果^[21]一致, 卡铂的分子构型见图 1. 卡铂分子结构镜面对称, 对称面位于 Pt 和环丁烷基五个原子组成的平面. Pt 的配位构型为平面四方型, 二个 NH₃ 以顺式与 Pt 配位, Pt-N 的配位键长为 0.2035(4) nm, 1,1 环丁二羧酸根上二个羧基上的 O 与 Pt 配位, Pt-O 的键长为 0.2027(3) nm, 羧基上参与配位的 C-O 键长 0.1296(4) nm, 较没配位的 C-O 键长 0.1226(5) nm 长. 环丁四元环的平均键角为 90°, 存在较大的张力. Pt 的配位平面与四元环的二面角为 90°. 氨基上的氢原子与相邻卡铂分子上的羧基氧形成 N-H...O 氢键, 此氢键的 N 至 O 的距离在 0.30 nm 左右, 属一般强度的氢键.

表 1 卡铂(Carboplatin)和双环铂(Dicycloplatin)的晶体学数据和修正结果

| | Carboplatin | Dicycloplatin |
|--------------------------------|---|--|
| Empirical formula | C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Pt | C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₈ Pt |
| Formula weight | 371.27 | 515.39 |
| Crystal system | Orthorhombic | Monoclinic |
| Space group | P nma | P2(1)/c |
| Unit cell dimensions a | 0.7728(1) nm | 0.5679(2) nm |
| b | 1.0458(1) nm | 1.2107(2) nm |
| c | 1.1183(1) nm | 2.3430(5) nm |
| α | 90° | 90° |
| β | 90° | 95.25(2)° |
| γ | 90° | 90° |
| Volume | 0.9038(3) nm ³ | 1.6042(7) nm ³ |
| Final R indices (I > 2σ(I)) | R ₁ =0.0202, wR ₂ =0.0440 | R ₁ =0.0288, wR ₂ =0.0664 |

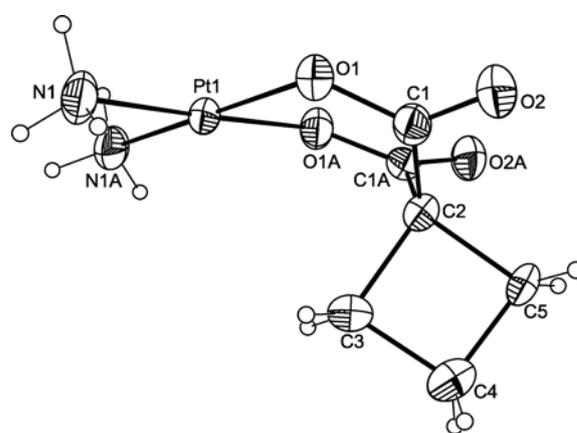


图 1 卡铂晶体结构中的分子构型

晶体结构测定表明, 双环铂晶体是由卡铂和 1,1 环丁二羧酸通过氢键而组成的. 卡铂和 1,1 环丁二羧酸在晶体中都是中性分子, 相对比例为 1:1. 卡铂部分的结构见图 2, 它的构型和卡铂晶体测得的构型一致, Pt-N 的平均键长为 0.2029(6) nm (0.2024 nm, 0.2034 nm), Pt-O 的平均键长为 0.2018(5) nm (0.2017 nm, 0.2018 nm), 和卡铂晶体中的键长基本一致. 另一部分 1,1 环丁二羧酸的结构见图 3, 它的构型与参与配位的 1,1 环丁二羧酸根基本一致. 只是由于强氢键的形成, 羧基上的 C=O 键长(0.1195 nm)短于自由酸中的键长(0.1214 nm), 而 C-OH 键长(0.1312 nm)长于自由酸中的键长(0.1308 nm)^[22].

3.2 在双环铂超分子中的氢键

两个中性分子以非共价键结合在一起的结构被称为超分子结构. 双环铂中的卡铂与 1,1 环丁二羧酸二个中性分子以氢键相结合, 是典型的超分子结构.

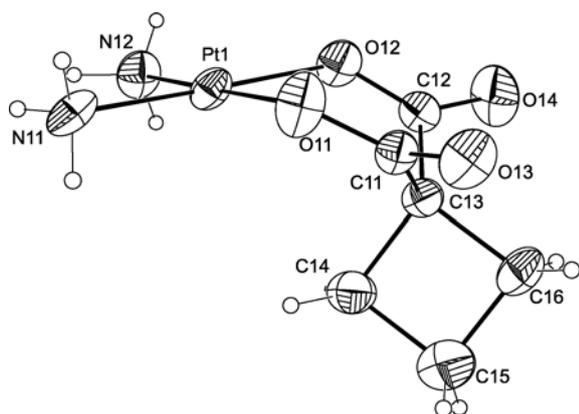


图2 双环铂晶体结构中卡铂部分的分子构型

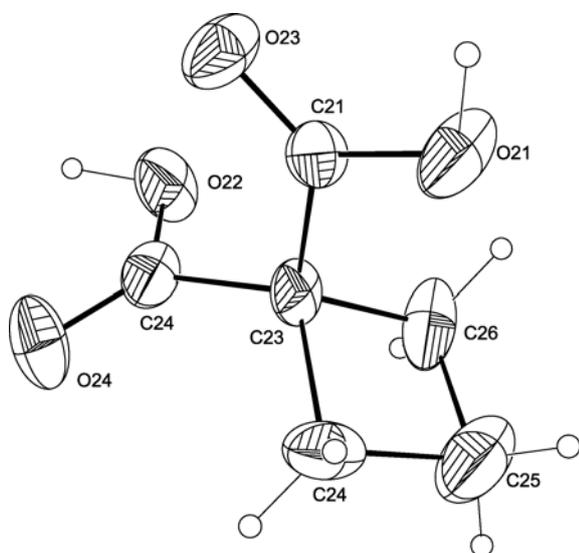
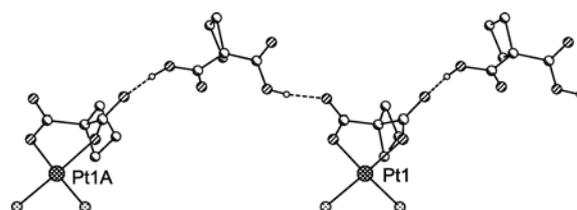
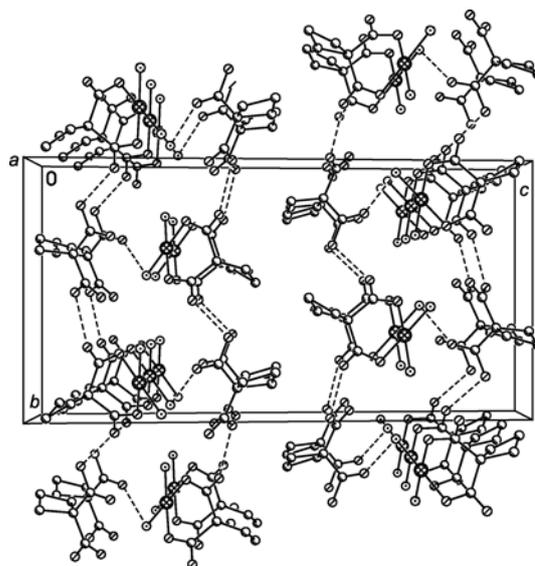


图3 双环铂晶体结构中1,1环丁二羧酸部分的分子构型

双环铂晶体中存在两类氢键. 一类是1,1环丁二羧酸上的-OH和卡铂中1,1环丁二羧酸根未参与配位的O形成O-H...O氢键,O与O的距离为0.2577和0.2626 nm,属于强氢键.在双环铂晶体中,每个卡铂分子有二个羧基上未配位的O分开在分子二边,可分别与两个1,1环丁二羧酸形成强氢键,而每个1,1环丁二羧酸也有二个-OH可分别与二个卡铂分子形成强氢键,两类分子相互交替,就形成了沿*b*轴方向的长链(图4).

另一类是NH₃和1,1环丁二羧酸上的O形成N-H...O氢键,N与O的距离为0.30 nm左右,属一般强度的氢键,与卡铂晶体结构中的N-H...O氢键相似.长链与长链之间又通过N-H...O氢键形成平行*ab*面的二维超分子聚合结构(图5).因而双环铂晶体

图4 双环铂晶体中沿*b*轴一维氢键聚合结构图5 双环铂晶体沿*a*轴的晶胞堆积图

的结构式应写成{[Pt(NH₃)₂C₆H₆O₄](C₆H₈O₄)_n}_n.

3.3 双环铂在水溶液中的结构

双环铂晶体在水中溶解时,二维超分子的氢键聚合结构必须打散.打散后双环铂的碎片在水中以何种形式存在无法直接确定.是以分开的卡铂和1,1环丁二羧酸,还是以氢键相连的超分子化合物{[Pt(NH₃)₂C₆H₆O₄](C₆H₈O₄)_n}(*n*=1, 2, ...)形式存在呢?这个结果可从双环铂水溶液的电喷雾离子化质谱(ESI)(图6)得到.谱中的M-1的离子峰出现在514.5处,化合物的分子量应是515.5,正好是一个卡铂和一个1,1环丁二羧酸分子量之和.这表明双环铂在水溶液中是由一个卡铂和一个1,1环丁二羧酸以氢键结合而成的超分子化合物.

氢键的键能介于共价键键能和范德华作用能之间.在水溶液中,分子间和分子内的氢键是处在断裂和再生成的变动之中.因此双环铂在水中的溶解过程可设想如下:第一步二维的氢键结构在水的作用

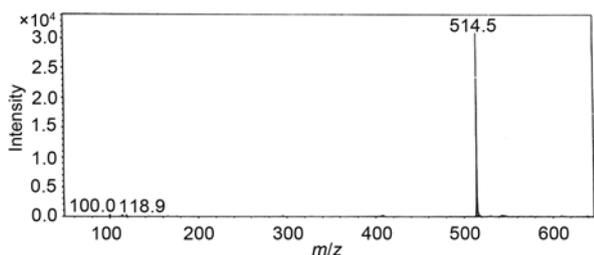


图 6 双环铂水溶液的电喷雾离子化质谱

下, 使连结链与链的二个 $N-H\cdots O$ 氢键断开, 散开成一维结构, 第二步一维结构中 0.2626 nm 的强氢键断开形成一个卡铂和一个 1,1 环丁二羧酸以 0.2577 nm 强氢键相连的中间物(图 7), 第三步 1,1 环丁二羧酸与卡铂分子改变相对位置, 使断开的 $O-H\cdots O$ 和二一个 $N-H\cdots O$ 氢键再次成键, 形成在水溶液中的双环铂的超分子(图 8(b)). 因而双环铂在水溶液中的结构可用计算机程序 $O^{[23]}$ 搭模型来得到. 搭模型时保持晶体结构中的卡铂和 1,1 环丁二羧酸的分子构型, 移动这二个分子的空间位置使超分子内有二个 $O-H\cdots O$ 强氢键(0.26 nm), 然后以卡铂中两个未配位的 O 的连线为轴转动 1,1 环丁二羧酸, 使羧基中未成氢键的 O 和卡铂中的 N 的距离转到一般氢键的距离(0.30 nm). 然后结构模型用程序 $XPLOR^{[24]}$ 作能量优化, 画出的水溶液中双环铂的结构见图 8(a). 双环铂在水溶液中成超分子, 分子内有二个 $O-H\cdots O$ 强氢键、二个 $N-H\cdots O$ 一般强度氢键, 氢键的数目和种类与晶体结构中一致. 因而当双环铂溶于水时, 体系的能量没有因多维氢键结构被打散而提高, 这也是双环铂在水中的溶解度较卡铂、顺铂好的原因. 同时由于超分子形成, 双环铂的分子量(515)较卡铂(371)高出 144 . 根据“相似者相溶”的规律, 分子量增加脂溶性也增加, 双环铂的脂溶性也较卡铂、顺铂为好. 顺铂、卡铂和双环铂在水中的溶解度、脂水分配系数 $ClogP$ 见表 2.

3.4 双环铂在水溶液中的稳定性

为了比较卡铂和双环铂在水中的稳定性, 1998

表 2 顺铂(Cisplatin),卡铂和双环铂在水中的溶解度和脂水分配系数

| | Cisplatin | Carboplatin | Dicycloplatin |
|---------------------------|-----------|-------------|---------------|
| $ClogP$ | -2.5 | 0.026 | 1.0 |
| Solubility($g\ L^{-1}$) | 2 | 15 | 40 |
| Molecular weight | 300 | 371 | 515 |

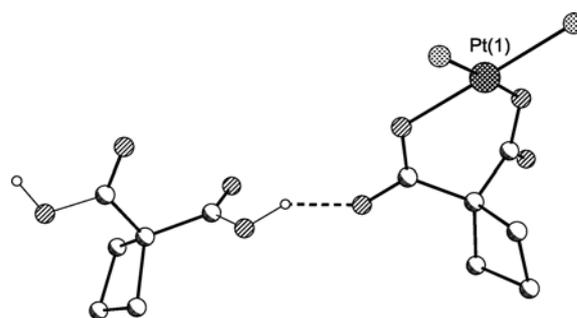


图 7 双环铂在水中溶解时的中间物

图 8 (a) 由计算机得到的双环铂在水溶液中的结构模型; (b) 双环铂在水溶液中的超分子结构式

年我们把卡铂和双环铂分别溶于水, 封装在针剂用的安瓿中在室温贮藏. 一个星期左右卡铂水溶液出现浑浊, 然后就有金属铂析出, 数量越来越多. 而双环铂水溶液一直清澈透明保持至今(见图 9). 比较新合成的和贮藏十周年的双环铂水溶液的质谱和 NMR, 没有发现两者的差别. 结果表明卡铂在水溶液中是不稳定的, 会水解, 而双环铂在水溶液中是稳定的. 这是利用“超分子”的巧妙构思克服了铂类抗癌药物在水中不稳定的最大缺点.

卡铂在水溶液中不稳定而双环铂在水溶液中稳定, 其机理推测如下: 水(H_2O)可看成由 H^+ 和 OH^- 组成, 水溶液中存在 H^+ 质子. 在 H^+ 的进攻下, 离去基团 1,1 环丁二羧酸根可接受 H^+ 后离开, 离去基团离开

而不论强氢键上的 H^+ 如何移动, 双环铂的结构始终不变. 此机理和实验结果是一致的, 这也说明了我们所提出的双环铂超分子模型是合理的. 反应式见图 11.

4 结论

我们用超分子的理论设计了一个铂类抗癌药物-双环铂. 双环铂的结构特征使一系列性能优于现已使用的铂类抗癌药, 如在水中的溶解度和稳定性和脂溶性. 双环铂临床前的研究和一期、二期临床研究揭示, 双环铂与老一代铂类抗癌药物(如卡铂)相比, 对各种恶性肿瘤有更好的效能和低的毒性. 二期临床的统计结果将另文发表.

图9 卡铂和双环铂在水溶液中的稳定性比较(放置 10 年)

后保留部分 $Pt(NH_3)_2$ 也无法稳定存在, 卡铂在水溶液中就解离了. 反应式见图 10.

双环铂是由一分子卡铂和一分子 1,1 环丁二羧酸组成的超分子, 超分子内有 $O-H\cdots O$ 强氢键. 因而在双环铂的水溶液中, 卡铂中的 1,1 环丁二羧酸根接受的 H^+ 是来自强氢键上的 H^+ , 而不是水中的 H^+ . 当 1,1 环丁二羧酸 OH 基上的 H^+ 移到卡铂中的 1,1 环丁二羧酸根时, 1,1 环丁二羧酸根成了 1,1 环丁二羧酸, 而原来的 1,1 环丁二羧酸成了 1,1 环丁二羧酸根, 它可和保留部分 $Pt(NH_3)_2$ 配位, 形成的配合物仍是卡铂, 卡铂再和 1,1 环丁二羧酸结合形成的仍然是双环铂. 因

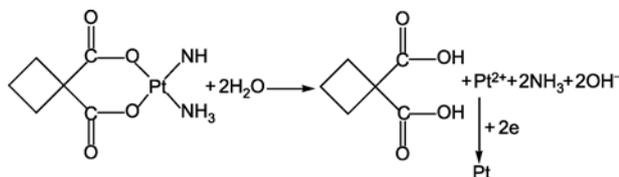


图 10 卡铂的水解反应

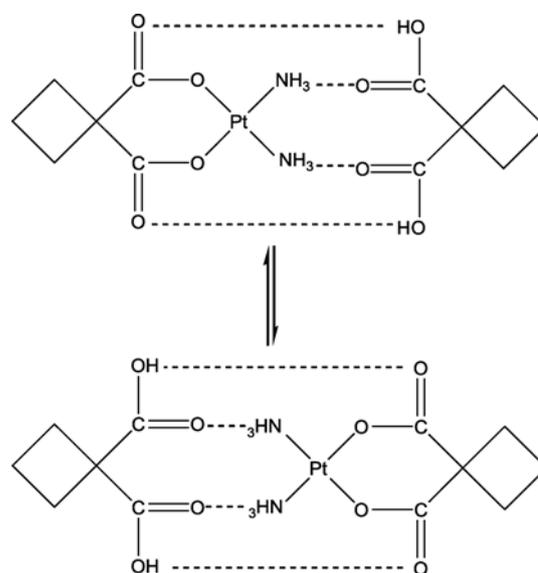


图 11 氢离子在双环铂超分子内部交换

致谢 感谢杨金力先生和崔维川先生在技术上的支持和宝贵意见.

参考文献

- 1 Rosenberg B, VanCamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 1965, 205: 698—699
- 2 Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 1969, 222: 385—386
- 3 Loehr PJ, Einhorn LH. Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med*, 1984, 100: 704—713
- 4 Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*, 2008, 6: 1—18
- 5 Gordon M, Hollander S. Review of platinum anticancer compounds. *J Med*, 1993, 24: 209—265
- 6 Yarbro CH. Carboplatin: a clinical review. *Semin Oncol Nurs*, 1989, 5: 63—69

- 7 Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*, 2000, 59 (Suppl 4): 9–17; discussion: 37–38
- 8 Beck DJ, Brubaker RR. Effect of *cis*-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1973, 116: 1247–1252
- 9 Drobnik J, Urbankova M, Krekulova A. The effect of *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) on *Escherichia coli* B. The role of *fil*, *exr* and *hcr* markers. *Mutat Res*, 1973, 17: 13–20
- 10 Macquet JP, Theophanides T. DNA-platinum interactions *in vitro* with *trans*- and *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂. *Bioinorg Chem*, 1975, 5: 59–66
- 11 Macquet JP, Theophanides T. DNA-platinum interactions. Characterization of solid DNA–K₂[PtCl]₄ complexes. *Inorg Chim Acta*, 1976, 18: 189–194
- 12 Brouwer J, van de Putte P, Fichtinger-Schepman AM, Reedijk J. Base-pair substitution hotspots in GAG and GCG nucleotide sequences in *Escherichia coli* K-12 induced by *cis*-diamminedichloroplatinum(II). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7010–7014
- 13 Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature*, 1995, 377: 649–652
- 14 van Garderen CJ, van Houte LP. The solution structure of a DNA duplex containing the *cis*-Pt(NH₃)₂[d(-GTG-)-N7(G),N7(G)] adduct, as determined with high-field NMR and molecular mechanics/dynamics. *Eur J Biochem*, 1994, 225: 1169–1179
- 15 Huang H, Zhu L, Reid BR, Drobnik GP, Hopkins PB. Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. *Science*, 1995, 270: 1842–1845
- 16 Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J. Adducts of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry*, 1985, 24: 707–713
- 17 Eastman A. Reevaluation of interaction of *cis*-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry*, 1986, 25: 3912–3915
- 18 祝世彤, 毛广照. 从构效关系看铂配合物的抗癌作用. *大学化学*, 1990, 4: 60–62
- 19 Sheldrick G M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A*, 2008, 64: 112–122
- 20 DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System (2002). DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>, 2002
- 21 Beagley B, Cruickshank DWJ, McAuliffe CA, Pritchard RG, Zaki AM, Beddoes RL, Cernik RJ, Mills OS. The crystal and molecular structure of *cis*-diammine-1,1-cyclobutanedicarboxoplatinum(II) [*cis*-Pt(NH₃)₂CBDCa]. Dynamic puckering of the cyclobutane ring. *J Mol Struct*, 1985, 130: 97–102
- 22 *International Tables for Crystallography*. Vol. C. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992. 700
- 23 Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard M. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, 1991, 47: 110–119
- 24 Brunger AT. *XPLOR Manual*, version 3.1. Yale University, New Haven, CT, 1992

Structural studies of dicycloplatin — an antitumor supramolecule

YANG XuQing^{1,2}, JIN XiangLin², SONG QinHua¹, TANG KaLuo², YANG ZhenYun¹,
ZHANG XiaoFeng¹ & TANG YouQi²

1 Beijing Suo Pu Xing Da Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing 100081, China

2 College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract: The solubility and stability of platinum-based anticancer agents have a direct bearing on their activity and toxicity. Much research has been conducted over the past decades in order to prepare drugs such as cisplatin and carboplatin with improved efficacy and reduced toxicity. Based on the premise that supramolecular platinum agents may have superior physicochemical properties, we successfully designed a novel anticancer agent, dicycloplatin, which has proven to be active against a number of human malignancies. The crystal structure of dicycloplatin has been determined. An aqueous solution of dicycloplatin was also studied using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Based on the experimental observations, a model of the structure in aqueous solution is proposed which explains both the higher solubility and higher stability of dicycloplatin compared with carboplatin.

Keywords: dicycloplatin, crystal structure, supramolecule, anticancer