

## Palbociclib 有关物质的分析及合成

袁 铎<sup>1</sup>, 朱 雄<sup>2</sup>, 张仕金<sup>2</sup>, 王 铎<sup>3</sup>, 李志裕<sup>1\*</sup>, 孙丽萍<sup>1\*\*</sup><sup>(1)</sup>中国药科大学药学院, 南京 210009; <sup>(2)</sup>中国药科大学医药化工研究所, 南京 210009;<sup>(3)</sup>南京师范大学附属中学, 南京 210003)

**摘 要** 为控制 palbociclib 药品质量, 从 palbociclib 原料药中分离并鉴定了 3 个有关物质: 8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8*H*-吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮(**A**)、8-环戊基-5-甲基-6-乙烯基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8*H*-吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮(**B**)和 4-[6-(6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-7-氧代-7,8-二氢吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2-基氨基)-吡啶-3-基]-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(**C**)。分析了这些有关物质产生的原因并进行了设计合成, 其结构经质谱、核磁共振氢谱确证。

**关键词** palbociclib; 结构鉴定; 有关物质; 合成

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)06-0696-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150610

## Analysis and synthesis of the related substances of palbociclib

YUAN Duo<sup>1</sup>, ZHU Xiong<sup>2</sup>, ZHANG Shijin<sup>2</sup>, WANG Duo<sup>3</sup>, LI Zhiyu<sup>1\*</sup>, SUN Liping<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Medicinal and Chemistry Institute of China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>3</sup>Affiliated High School of Nanjing Normal University, Nanjing 210003, China

**Abstract** To strengthen the quality control of palbociclib, three related substances were separated from the bulk drug. These substances were identified as 8-cyclopentyl-5-methyl-2-((5-(piperazin-1-yl)pyridin-2-yl)amino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**A**), 8-cyclopentyl-5-methyl-2-((5-(piperazin-1-yl)pyridine-2-yl)amino)-6-vinylpyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (**B**), tert-butyl 4-(6-((6-acetyl-8-cyclopentyl-5-methyl-7-oxo-7,8-dihydropyrido[2,3-*d*]pyrimidin-2-yl)amino)pyridin-3-yl)piperazine-1-carboxylate (**C**). Based on the structures of the impurities, the possible routes to them were discussed, and their structures were elucidated by <sup>1</sup>H NMR and MS.

**Key words** palbociclib; structural identification; related substances; synthesis

Palbociclib(又名 PD0332991, **1**), 化学名为 6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8*H*-吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮, 是美国辉瑞公司开发的细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6(CDK4/6)抑制剂<sup>[1]</sup>, 商品名 Ibrance。2015 年 2 月, FDA 加速批准了 palbociclib 与来曲唑(Letrozole)联合用药用于治疗 ER 阳性/HER2 阴性绝经后转移性乳腺癌患者, 使之成为首个 FDA 批准的 CDK4/6 抑制剂药物并获准在美国上市<sup>[2]</sup>。

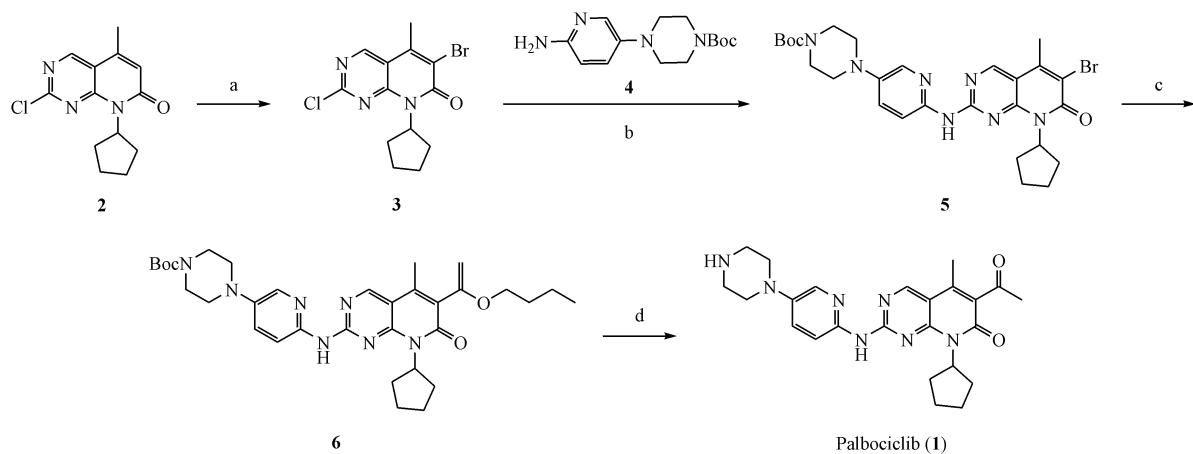
目前, 文献公开报道的 palbociclib 的合成途径主要有两种<sup>[1,3]</sup>。本课题组参照文献[3]方法, 以

2-氯-8-环戊基-5-甲基-8*H*-吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮(**2**)为原料, 溴化后与 4-(6-氨基-吡啶-3-基)-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(**4**)经二(三甲基硅基)氨基锂(LiHMDS)作用缩合制得中间体 **5**, 再经钯催化的 Heck 偶联反应得到中间体 **6**, 最后在酸的作用下重排并脱保护制得 palbociclib(**1**), 合成路线见路线图 1。

在对 palbociclib 粗品进行 HPLC 分析时, 发现存在 3 个主要杂质 **A**、**B**、**C**, 其出峰保留时间( $t_R$ )分别为 7.565、14.441 和 54.171 min, palbociclib 保留时间为 8.555 min(图 1)。为了确证各杂质结

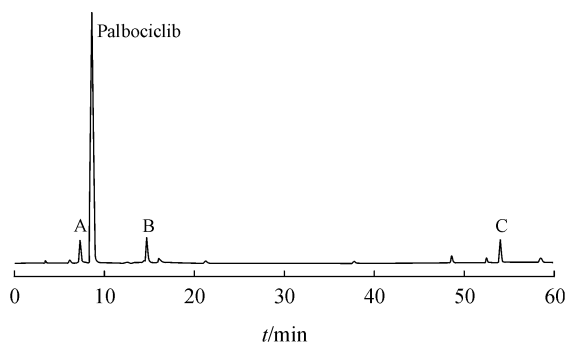
构,使用制备液相分离并富集了 3 种杂质纯品,质谱分析其相对分子质量分别为 405.3、431.3 和 547.3。<sup>1</sup>H NMR 分析显示,与 palbociclib 氢谱相比,杂质 **A** 少了 6 位乙酰基中甲基氢的峰,多出一较高位移的单峰;杂质 **B** 也少了 6 位乙酰基中甲基

氢的峰,多出两组共计 3 个氢的峰;而杂质 **C** 氢谱中出现了较小位移的 9 个氢的单峰,综合考虑杂质的分子量信息,推测了 3 个杂质的可能结构(图 2),分析其产生的可能原因并进行合成。

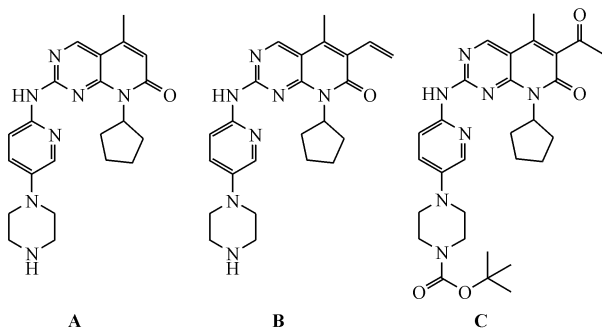


**Scheme 1** Synthetic route of palbociclib

Reagents and conditions: (a)  $\text{Br}_2$ ,  $\text{AcONa}$ ,  $\text{AcOH}$ ,  $75\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 h, 81%; (b) Lithium hexamethyldisilazide, toluene,  $10\text{ }^\circ\text{C}$ , 2 h, 83%; (c) Butyl vinyl ether,  $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ ,  $N,N$ -diisopropylethylamine,  $n\text{-BuOH}$ ,  $110\text{ }^\circ\text{C}$ , 24 h, 86%; (d) trifluoroacetic acid, dichloromethane, r. t., 16 h, 89%



**Figure 1** HPLC diagram of palbociclib (three related substances: A, B, C)



**Figure 2** Structures of the three related substances

## 1 杂质来源分析及合成路线设计

通过对 palbociclib (**1**) 的合成路线进行分析,推测杂质 **A** 的产生可能是由于起始原料 **2** 溴代不完全,残留的 **2** 与 **4** 经缩合生成 **7**, **7** 在酸中脱保护生成 **A**;也有可能是 **5** 在进行 Heck 偶联反应时以正丁醇为氢源脱卤产生的副产物<sup>[4]</sup>;杂质 **B** 可能是 **5** 在进行 Heck 反应时的副产物 **8** 经重排并脱保护形成的<sup>[5]</sup>;而杂质 **C** 的生成是由于酸作用下,重排比脱保护快很多,中间体 **6** 未完全脱保护的产物。杂质 **A**、**B**、**C** 产生的可能原因如图 3 所示。

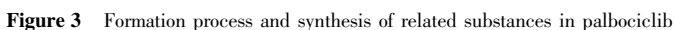
基于上述分析,化合物 **2**、**4** 缩合后生成的中间体 **7** 经酸脱保护可直接制得杂质 **A**;杂质 **B** 的合成则以化合物 **5** 与三丁基乙烯基锡(**9**)经 stille 偶联制得烯基中间体 **10**,再经酸脱保护生成;而杂质 **C** 则可由化合物 **6** 在酸中较快重排制备。所设计的杂质合成路线反应较为温和,收率也较高。

## 2 杂质的合成

### 2.1 仪器与试剂

HPLC 检测使用岛津 LC-2010C<sub>HT</sub> 液相色谱仪;<sup>1</sup>H NMR 采用 Bruker ACF-300 型核磁共振仪测

物 **3**、**5**、**6** 参照文献[3]合成,其余试剂均为市售分析纯产品。



### 2.2.1 8-环戊基-5-甲基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8*H*-吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮(杂质A)的合成<sup>[3]</sup>

将所得化合物 **7** (1.0 g, 2 mmol) 加入二氯甲烷 60 mL 中搅拌溶解, 向其中滴加三氟乙酸 15 mL, 室温下搅拌 20 h 后加入饱和碳酸氢钠溶液 100 mL, 搅拌 10 min 后分液, 有机相使用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥后减压蒸干溶剂所得淡黄色固体为杂质 **A** (0.7 g, 87%)。MS:  $m/z$  406.3  $[M + H]^+$ ;  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ , 300 MHz)  $\delta$ : 9.92 (1H, s, C<sub>2</sub>-NH), 8.82 (1H, s, C<sub>4</sub>-H), 8.75 (1H, s, piperazine-NH), 8.06 (1H, d,  $J = 2.76$  Hz, Py-H), 7.91 (1H, d,  $J = 9$  Hz, Py-H), 7.52 (1H, m, Py-H), 6.22 (1H, s, C<sub>6</sub>-H), 5.80 (1H, m, cyclopentane-CH-), 3.35 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub>  $\times$  2), 3.21 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub>  $\times$  2), 2.38 (3H, s, C<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.25 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.89 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.74 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.59 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>)。

### 2.2.2 8-环戊基-5-甲基-6-乙烯基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-8*H*-吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-7-酮(杂质B)的合成<sup>[1]</sup>

在  $\text{N}_2$  气氛下,向 50 mL 三颈瓶中依次加入化合物 **5** (1.0 g, 1.71 mmol)、甲苯 20 mL、四(三苯基膦)钯 (0.24 g, 0.21 mmol)、三丁基乙烯基锡 (**9**) (0.81 g, 2.57 mmol), 搅拌均匀后升温至  $110^\circ\text{C}$  反应 6 h, 冷却, 抽滤, 滤饼用少量甲苯洗涤, 干燥得黄色固体 **10** (0.69 g, 76%)。MS:  $m/z$

532.3 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ: 9.85 (1H, s, C<sub>2</sub>-NH), 8.88 (1H, s, C<sub>4</sub>-H), 8.05 (1H, d, *J* = 2.78 Hz, Py-H), 7.90 (1H, d, *J* = 8.95 Hz, Py-H), 7.48 (1H, m, Py-H), 6.65 (1H, m, -CH = CH<sub>2</sub>), 5.96 (2H, m, -CH = CH<sub>2</sub>), 5.66 (1H, m, cyclopentane-CH-), 3.24 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub> × 2), 2.95 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub> × 2), 2.62 (3H, s, C<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.25 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.98 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.75 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.66 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.42 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)。

将所得化合物 **10** (0.7 g, 1.32 mmol) 加入二氯甲烷 40 mL 中搅拌溶解, 向其中滴加三氟乙酸 10 mL, 室温下搅拌 20 h 后加入饱和碳酸氢钠溶液 80 mL, 搅拌 10 min 后分液, 有机相使用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥后减压蒸干溶剂所得黄色固体为杂质 **B** (0.57 g, 86%)。MS: *m/z* 432.3 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ: 9.84 (1H, s, C<sub>2</sub>-NH), 8.92 (1H, s, C<sub>4</sub>-H), 8.01 (1H, d, *J* = 2.94 Hz, Py-H), 7.86 (1H, d, *J* = 8.91 Hz, Py-H), 7.44 (1H, m, Py-H), 6.70 (1H, m, -CH = CH<sub>2</sub>), 5.86 (2H, m, -CH = CH<sub>2</sub>), 5.56 (1H, m, cyclopentane-CH-), 3.04 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub> × 2), 2.85 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub> × 2), 2.58 (3H, s, C<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.24 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.91 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.75 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.60 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>)。

2.2.3 4-[6-(6-乙酰基-8-环戊基-5-甲基-7-氧代-7,8-二氢吡啶并[2,3-*d*]嘧啶-2-基氨基)-吡啶-3-基]-噻吩-1-羧酸叔丁酯(杂质 **C**)的合成

将化合物 **6** (2.0 g, 3.32 mmol) 加入二氯甲烷 100 mL 中搅拌溶解, 向其中滴加三氟乙酸 25 mL, 室温下搅拌 10 min 后加入饱和碳酸氢钠溶液 150 mL 淬灭反应, 搅拌 10 min 后分液, 有机相使用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥后经柱色谱纯化[硅胶 200 ~ 300 目, 洗脱剂: 甲醇: 二氯甲烷(1:50)]得到淡黄色固体为杂质 **C** (1.1 g, 62%)。MS: *m/z* 547.3 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ: 10.06 (1H, s, C<sub>2</sub>-NH), 8.96 (1H, s, C<sub>4</sub>-H), 8.07 (1H, d, *J* = 2.67 Hz, Py-H), 7.86 (1H, d, *J* = 9.15 Hz, Py-H), 7.50 (1H, m, Py-H), 5.82 (1H, m, cyclopentane-CH-), 3.48 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub> × 2), 3.12 (4H, m, piperazine CH<sub>2</sub> × 2), 2.42 (3H, s, C<sub>6</sub>-COCH<sub>3</sub>), 2.31 (3H, s, C<sub>5</sub>-CH<sub>3</sub>), 2.23 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.89 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.76

(2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.59 (2H, m, cyclopentane-CH<sub>2</sub>), 1.43 (9H, s, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)。

### 3 结果

对制备的杂质 **A**、**B**、**C** 与 palbociclib 粗品进行 HPLC 分析(工作站: Labsolutions; 色谱柱: Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液; 柱温: 40 °C; 流速: 1.0 mL/min; 波长: 220 nm), 发现 3 个杂质与 palbociclib 粗品中的主要杂质的保留时间完全一致, 而且合成的杂质与分离得到的杂质核磁共振氢谱相符, 可以判定 palbociclib 产品中的主要杂质即为所合成的 **A**、**B**、**C**。

### 4 结论

本研究合成了 palbociclib, 并对粗品中主要杂质进行分离并推测其结构; 再采用合成杂质对照品的方法, 通过色谱峰保留时间、<sup>1</sup>H NMR、MS 等验证, 确定了 palbociclib 原料药中主要杂质的归属。本工作解决了杂质研究所需对照品问题, 为 palbociclib 的质量研究和杂质控制提供了帮助。

### 参考文献

- [1] Toogood PL, Harvey PJ, Repine JT, *et al.* Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6[J]. *J Med Chem*, 2005, **48**(7): 2388 - 2406.
- [2] Mayer EL. Targeting breast cancer with CDK inhibitors[J]. *Curr Oncol Rep*, 2015, **17**(5): 1 - 5.
- [3] Erdman DT, Flamme CM, Nelson JD, *et al.* Preparation of 2-(pyridin-2-ylamino)-pyrido-[2, 3-*d*]pyrimidin-7-ones: WO, 2008032157[P]. 2007-08-27.
- [4] Moon J, Lee S. Palladium catalyzed-dehalogenation of aryl chlorides and bromides using phosphite ligands[J]. *J Organomet Chem*, 2009, **694**(3): 473 - 477.
- [5] Murray PM, Bower JF, Cox DK, *et al.* A robust first-pass protocol for the Heck-Mizoroki reaction[J]. *Org Process Res Dev*, 2013, **17**(3): 397 - 405.