

托法替尼的结构鉴定与构象分析

张霞, 章国龙^{*}(华东医药集团新药研究院有限公司, 杭州 310011)

摘要: 目的 鉴定合成的托法替尼的化学结构, 并对其构象进行分析。方法 用 DMSO-d₆ 作溶剂, 通过测试该合成样品的 ¹H-NMR、¹H-NMR(DMSO-d₆+D₂O)、¹³C-NMR(包括常温、高温 60 °C、高温 120 °C 的图谱)、¹H-¹H COSY、DEPT、HSQC、HMBC 图谱及其关键中间体的常温 ¹³C-NMR 图谱, 参照文献与专著, 鉴定合成的托法替尼的化学结构, 并分析其构象。结果 确证了合成的托法替尼的化学结构。其常温 ¹³C-NMR 图谱中, 大多数信号出现裂分, 升温到 120 °C, 裂分信号合并, 推导在常温下, 因为围绕酰胺键的旋转受阻, 托法替尼在 DMSO-d₆ 溶液中以 2 种构象存在。结论 合成的托法替尼结构正确, 且常温下在 DMSO-d₆ 溶液中以 2 种构象存在。

关键词: 托法替尼; 构象; 核磁共振; 关键中间体; 受阻旋转

中图分类号: R914.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)05-0542-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.05.006

引用本文: 张霞, 章国龙. 托法替尼的结构鉴定与构象分析[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(5): 542-544.

Structure Determination and Conformational Analysis of Tofacitinib

ZHANG Xia, ZHANG Guolong^{*} (Huadong Medicine Group Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Hangzhou 310011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the structure and conformation of synthesized Tofacitinib. **METHODS** The ¹H-NMR, ¹H-NMR(DMSO-d₆+D₂O), ¹³C-NMR(at room and elevated temperature of 60 and 120 °C), ¹H-¹H COSY, DEPT, HSQC, HMBC spectra of Tofacitinib and ¹³C-NMR of its key intermediate at room temperature were recorded in DMSO-d₆. Based on the related literature, monograph and the ¹³C-NMR comparison of Tofacitinib and its key intermediate, the structure and conformation analysis of synthesized Tofacitinib in DMSO-d₆ were carried out. **RESULTS** The structure of synthesized Tofacitinib was determined on the basis of these spectral data. Most of the signals of Tofacitinib in ¹³C-NMR spectrum at room temperature were split while these split signals were merged when the temperature was increased to 120 °C. It might have two conformations in DMSO-d₆ at room temperature due to the restricted rotation about the carbon-nitrogen bond of the amide group. **CONCLUSION** The structure of synthesized Tofacitinib is confirmed and it may have two conformations in DMSO-d₆ at room temperature.

KEYWORDS: Tofacitinib; conformation; nuclear magnetic resonance; key intermediate; restricted rotation

托法替尼枸橼酸盐, 商品名为 Xeljanz, 由美国 Pfizer 公司研发, 2012 年 11 月 6 日 FDA 批准其片剂上市^[1], 用于对甲氨蝶呤治疗应答不充分或不耐受的中至重度活动性类风湿关节炎成人患者, 可单药使用或与甲氨蝶呤或其他非生物制品抗风湿药物联用。与目前大多数抗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)药物作用于细胞外靶点不同的是, 托法替尼通过抑制胞内靶点 JANUS 激酶(JAKs)达到抗 RA 的疗效^[2-6]。托法替尼化学名为 3-((3R, 4R)-4-甲基-3-(甲基(7H-吡咯并[2, 3-d]嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)-3-氧代丙腈, 有 1 个对映异构体和 1 对非对映异构体, 仅托法替尼(3R, 4R)对 JAKs 具有明显的抑制作用^[7], 具体结构见图 1。本研究以 DMSO-d₆ 为溶剂, 测试了托法替尼的

1D、2D NMR 数据及其关键中间体的常温 ¹³C-NMR 图谱, 首次对托法替尼的结构和构象进行了详细阐述^[7], 并推测了 DMSO 溶液中托法替尼常温下存在的 2 种构象^[8-18]。

1 材料与方法

1.1 样品

托法替尼样品(HPLC 测定纯度>99.0%)由华东医药集团新药研究院合成中心提供。

1.2 方法

所有 NMR 实验均在 Bruker AVANCE III 500 型超导高分辨核磁共振谱仪上完成。¹H-NMR 观测频率为 500.13 MHz, ¹³C-NMR 观测频率为 125.75 MHz, 使用 5 mm PABBO BB-1H/D Z-GRD 探头, 取约 30 mg 托法替尼样品, 以 DMSO-d₆ 为

作者简介: 张霞, 女, 博士, 高级工程师 Tel: (0571)89918211
Tel: (0571)89918211 E-mail: 545216153@qq.com

E-mail: 545216153@qq.com *通信作者: 章国龙, 男, 助理工程师

溶剂(TMS 为内标)测定 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR(包括常温、高温 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 、高温 $120\text{ }^\circ\text{C}$ 的图谱)、 ^1H - ^1H COSY、DEPT、HSQC、HMBC 及关键中间体的常温 ^{13}C -NMR。其中 ^1H -NMR 的谱宽为 15 kHz ，采样点数为 $65\ 536$ ，弛豫延迟时间为 1 s ； ^{13}C -NMR 的谱宽为 38 kHz ，采样点数为 $65\ 536$ ，弛豫延迟时间为 1.5 s 。

2 结果与讨论

参考文献[7]，托法替尼的核磁共振氢谱数据、碳谱数据及其关键中间体的碳谱数据归属见表 1~2。托法替尼分子中关键 HMBC 见图 2。

表 1 托法替尼及其关键中间体的核磁共振碳谱数据与信号归属(溶剂: DMSO-d₆)

Tab. 1 ^{13}C -NMR and DEPT 135 data and ascription of Tofacitinib and its key intermediate in DMSO-d₆

位置或碳原子种类	托法替尼			托法替尼关键中间体		文献(常温) (溶剂: CDCl ₃)
	δC -常温	δC - $60\text{ }^\circ\text{C}$	δC - $120\text{ }^\circ\text{C}$	δC -常温	DEPT-135(常温)	
-CN	116.71, 116.77	116.24	115.31	/	季碳	117.0, 116.9
-CH ₂ -CN	25.44, 25.38	25.11	24.48	/	季碳	25.8, 25.7
-CO	161.94, 162.12	161.85	161.51	/	季碳	162.52, 162.46
2	42.28	43.15	42.82	40.70	↓	43.1, 42.1
3	53.35	52.78	53.38	55.23	↑	56.8, 55.7
4	31.65, 31.40	31.63, 31.32	31.40	29.46	↑	31.8, 31.4
5	31.50	30.60	30.60	27.72	↓	30.7
6	42.93	43.15	42.82	34.95	↓	45.2
7	14.23, 13.90	14.12	14.04	11.51	↑	14.4, 13.9
8	34.51	34.42	34.07	39.22	↑	38.7, 35.8
1'	150.86, 150.82	150.55	150.15	142.35	↑(叔碳)	145.4, 145.1
2'	152.07, 152.02	151.86	151.78	145.23	季碳	159.0
3'	121.36	121.17	120.71	124.06	↑(叔碳)	124.0
4'	102.37, 102.32	102.09	101.55	104.45	↑(叔碳)	102.7
5'	102.82, 102.72	102.72	102.58	102.15	季碳	105.2, 104.9
6'	157.35, 157.39	157.41	157.54	153.58	季碳	159.3

表 2 托法替尼的核磁共振氢谱数据与信号归属(溶剂: DMSO-d₆)

Tab. 2 ^1H -NMR and ^1H - ^1H COSY data and ascription of Tofacitinib in DMSO-d₆

位置	δH	多重性	质子数	^1H - ^1H COSY	文献(溶剂: CDCl ₃)
CH ₂ -CN	3.98~4.06 4.09~4.15	m	2	/	3.96~4.06 4.08~4.20
2	3.82~3.94 3.61~3.78	m	2	5	3.68~3.86
3	4.85	s	1	4	4.78
4	2.35~2.42	m	1	9	2.34~2.46
5	1.69~1.73 1.80~1.86	m	2	8	1.76~1.95 1.52~1.67
6	3.40~3.42 3.61~3.78	m	2	7	3.37~3.46 3.14~3.22
7	1.00	d	3	6	1.07 1.04
8	3.26, 3.27		3	/	3.35
1'	8.10, 8.12	s	1	/	8.39, 8.37
3'	7.15	s	1	4'	7.40~7.44
4'	6.57, 6.56	s	1	3'	6.80~6.90
C~NH~CH	11.68	s	1	/	12.67, 12.63

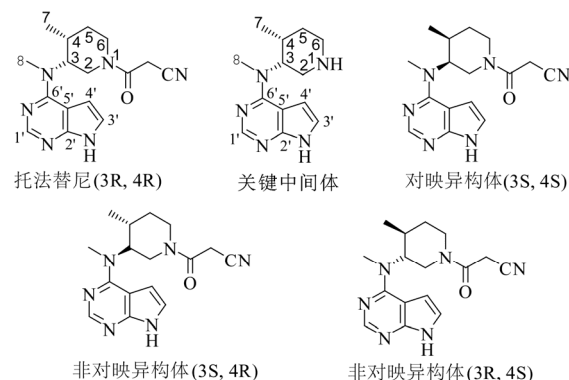


图 1 托法替尼及其关键中间体、光学异构体的化学结构式
Fig. 1 Chemical structures of Tofacitinib, stereoisomers and key intermediate

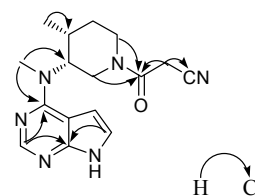


图 2 托法替尼分子中关键 HMBC 相关图谱
Fig. 2 Key HMBC relations of Tofacitinib

表 2 数据表明实测数据与文献数据一致，证明合成所得托法替尼结构正确。且 ^{13}C -NMR 常温谱中，托法替尼的大多数主峰均呈现 2 组信号，而其关键中间体(结构式见图 1)的各信号峰均只呈现 1 组信号。参照文献与专著[7-18]，理论推测由于酰胺键的碳氮键具有部分双键性，旋转受阻，常温下托法替尼在溶液中可能存在 2 种构象，见图 3。而温度升高后，由于 2 种构象的快速转换，裂分信号合并，与文献[7]一致。表 1 数据显示，

^{13}C -NMR 常温谱中, $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CN}$ 、 $-\text{CO}$ 信号均裂分, 而 ^{13}C -NMR 谱($120\text{ }^\circ\text{C}$)中只检测出 1 组信号, 与推测结果一致。

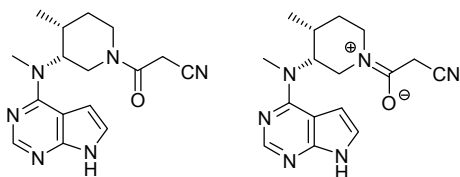


图 3 托法替尼 DMSO 溶液中的 2 种可能构象

Fig. 3 Two possible conformations of Tofacitinib in DMSO

3 结论

通过测试合成的托法替尼的 NMR 数据, 包括常温及高温条件下的 ^{13}C -NMR 图谱和其关键中间体在常温条件下的 ^{13}C -NMR 图谱, 确证了合成的托法替尼的结构, 且推导托法替尼在氘代二甲基亚砷溶液中室温下以 2 种构象存在, 参照文献推测可能因围绕酰胺碳氮键的旋转受阻所致, 与理论预测、专著和文献报道一致。

REFERENCES

- [1] ZHANG J Z. New drugs approved by FDA, USA, Nov. 2012 [J]. Shanghai Med Pharm(上海医药), 2013, 34(1): 61.
- [2] BURMESTER G R, BLANCO R, SCHOEMAN C C, et al. Tofacitinib (CP-690, 550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with all inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: a randomized phase 3 trial [J]. Lancet, 2013, 381(9865): 451-460.
- [3] ADOLFO M, MARIO J S, LEONARDO S S. Asymmetric total synthesis of tofacitinib [J]. Tetrahedron Letters, 2013(54): 5096-5098.
- [4] LANAGAN M E, BLUMENKOPF T A, BRISSETTE W H, et al. Discovery of CP-690, 550: a potent and selective Janus Kinase(JAK) inhibitor for the treatment of autoimmune diseases and organ transplant rejection [J]. Med Chem, 2010, 53(24): 8468-8484.
- [5] ZHAO F L, CHEN G H, YAO S L, et al. Synthesis of tofacitinib citrate [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(3): 201.
- [6] ZHANG Z K, KUANG C X. Synthesis of tofacitinib [J]. Chin

- J Pharm(中国医药工业杂志), 2013, 44(4): 321-323.
- [7] JIAN K J, KAMRAN G, FRANCESCA D, et al. Examining the chirality, conformation and selective kinase inhibition of 3-((3R, 4R)-4-methyl-3-(methyl(7H-pyrrolo [2, 3-d]pyrimidin-4-yl)amino)piperidin-1-yl)-3-oxopropanenitrile (CP-690, 550) [J]. Med Chem, 2008, 51(24): 8012-8018.
- [8] THOMAS L H, MARKUS R, NAOKO M, et al. Modulation of amide bond rotamers in 5-acyl-6, 7-dihydrothieno [3, 2-c]pyridines [J]. J Org Chem, 2015, 80(9): 4370-4377.
- [9] GONZÁLEZ-DE-CASTRO Á, BROUGHTON H, MARTÍNEZ-PÉREZ J A, et al. Conformational features of secondary N-cyclopropyl amides [J]. J Org Chem, 2015, 80(8): 3914-3920.
- [10] LIU G H, QIU X P, SIDDIQ M, et al. Temperature dependence of chain conformation and local rigidity of isomerized poly imides in dimethyl form amide [J]. Chem Res, Chin Univ, 2013, 29(5): 1022-1028.
- [11] LU J R. Synthesis and structural analysis of calcium dobesilate monohydrate [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2005, 22(2): 124-126.
- [12] NING Y C. Structural Identification of Organic Compounds and Organic Spectroscopy [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2000: 81.
- [13] SHEN L, JIANG J L, YU Y H, et al. Conformational analysis of trandolapril in solution by NMR [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2012, 33(1): 153-157.
- [14] YAN J Z, TONG S Q, SHENG L Q, et al. Studies on the chemical constituents of *Edgeworthia chrysantha* Lindl [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2004, 21(8): 31-33.
- [15] QING C. Spectrometric Identification of Organic Compounds [M]. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 2007: 161.
- [16] MENG X J. Density function theoretical study on isomerization reaction mechanism of glycine [J]. Acta Sci Nat Univ Nankaiensis(南开大学学报自然科学版), 2013, 46(3): 15-22.
- [17] SHI C Y, FAN S Z, LUO J. Preferred conformation of 6, 6-dimethyl-2, 2-bipyridine [J]. China Sciencepaper(中国科技论文), 2013, 8(9): 940-943.
- [18] WANG H S, LI J F, QIN J M, et al. Synthesis and conformation of maleopimaric acid diimide [J]. J Jishou Univ(Nat Sci Ed) (吉首大学学报: 自然科学版), 2014, 35(1): 64-67.

收稿日期: 2018-05-21

(本文责编: 曹粤锋)