



УДК 546.100.02.3:547.15/17

СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ ОЛАНЗАПИНА

© 2005 г. В. П. Шевченко[#], И. Ю. Нагаев, Ю. В. Кузнецов, Е. В. Полунин,
А. А. Зозуля, Н. Ф. Мясоедов

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

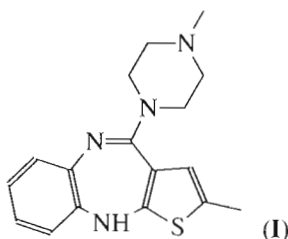
Поступила в редакцию 24.09.2004 г. Принята к печати 03.02.2005 г.

Осуществлен химический синтез оланзапина – 2-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-4*H*-тиено[2,3-*b*][1,5]бенздиазепина, отработаны условия введения трития в это соединение и получен меченный тритием оланзапин с молярной радиоактивностью – 12 Ки ммоль⁻¹.

Ключевые слова: оланзапин, синтез; тритий.

ВВЕДЕНИЕ

Оланзапин – 2-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-4*H*-тиено[2,3-*b*][1,5]бенздиазепин (**I**) – один из наиболее эффективных представителей нейрорептиков (антипсихотиков) нового поколения, которые характеризуются эффективностью при купировании не только позитивной, но и негативной симптоматики у больных шизофренией, отсутствием побочных эффектов, связанных с нарушением функционирования экстрапирамидной системы, и механизмом действия, определяемым способностью взаимодействовать с серотониновыми, дофаминовыми и другими рецепторами [1, 2].



Цель данной работы – синтез меченного тритием оланзапина. Необходимый для получения меченого препарата оланзапин (**I**) был синтезирован по модифицированной методике [3] и далее использован для оптимизации условий введения трития в данное соединение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез оланзапина (**I**) осуществляли как предложено ранее [3] исходя из 2-амино-5-метилтиофен-3-карбонитрила (**II**), получаемого по методу Гевальда [4] (схема). При сохранении последовательности стадий, приведенных в патенте [3], нами были усовершенствованы методики выделе-

ния промежуточных продуктов и внесены изменения в соотношение реагентов и время проведения реакций.

При конденсации соединения (**II**) с орто-фторнитробензолом в присутствии NaH в THF получен нитронитрил (**III**). Последний при восстановлении SnCl₂ в HCl и одновременной циклизации давал хлоргидрат 4-амино-2-метил-10*H*-тиено[2,3-*b*][1,5]бенздиазепина (**IV**), кипячение которого с *N*-метилпиперазином в смеси DMSO и толуола в течение 24 ч привело с выходом 65% к целевому оланзапину (**I**), физико-химические характеристики которого совпали с описанным в патенте [3]. В результате получено более 2 г оланзапина (**I**), который был использован для отработки условий введения метки в оланзапин.

Получить меченый оланзапин с сохранением нативной структуры немеченого предшественника можно только методом изотопного обмена. Наиболее часто реакция обмена проводится жидкофазным методом (между растворенным соединением и тритиевой водой) или твердофазным методом (между нанесенным на катализатор веществом и газообразным тритием) [5].

Наиболее удачной методикой изотопного обмена с тритиевой водой считается получение тритиевой воды непосредственно в реакционной ампуле, для чего в реакционную ампулу помещают PdO, исходное соединение и катализатор (обычно палладиевый, нанесенный на инертный носитель – Al₂O₃, активированный уголь, BaSO₄, CaCO₃ и т.п.), заполняют ее газообразным тритием и выдерживают при 70°C течение 10–15 мин. В этих условиях происходит полное восстановление PdO с образованием тритиевой воды. Затем содержимое ампулы (образовавшуюся тритиевую воду, вещество и активированный катализатор) замораживают жидким азотом, ампулу вакуумируют для удаления газообразного трития и заполняют аргоном. После внесения в ампулу раствора три-

[#] Автор для переписки (факс: (095) 196-02-21; эл. почта: na-gaev@img.ras.ru).

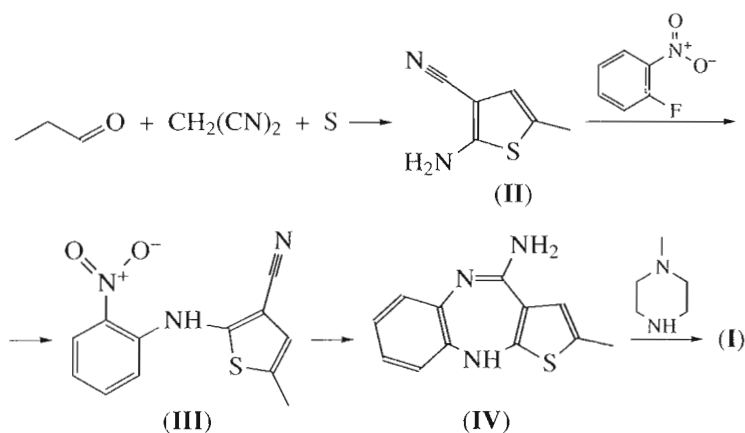


Схема.

этиламина в диоксане ее запаивают для предотвращения попадания паров тритиевой воды в атмосферу и далее выдерживают при перемешивании либо при комнатной температуре (в случае оланзапина в течение 16 ч), либо при более высокой температуре (100–170°C) в термостате.

Сущность твердофазного метода заключается в нагревании смеси органического вещества и катализатора (способы приготовления этих смесей приведены выше) в атмосфере газообразного трития.

В результате проведенных исследований (таблица) оказалось, что обмен трития на протий между газообразным тритием и оланзапином при использовании твердофазного метода оказался более эффективным по сравнению с введением метки изотопным обменом с тритиевой водой. При этом наилучший результат достигнут при проведении процесса при 200°C.

Очистку меченого оланзапина проводили в две стадии: вначале колоночной хроматографией (КХ) на силикагеле (рис. 1) получали искомый продукт с 85%-ной радиохимической чистотой (рис. 2), затем после очистки методом ВЭЖХ радиохимическая чистота повышалась до 98–99% (рис. 3). Таким образом, получен высокомеченный тритием оланзапин с молярной радиоактивностью 12 Ки ммоль⁻¹ и радиохимической чистотой 98–99%.

Полученный препарат меченого оланзапина планируется в дальнейшем использовать для изучения нейробиохимических механизмов шизофрении и ряда других психических заболеваний. Кроме того, при использовании меченого оланзапина может быть отработана методика для поиска пептидных препаратов, обладающих фармакологическим профилем этого нейролептика (I).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Катализаторы, растворители, стандарты и реагенты – коммерческие препараты. Температуры плавления определены на микронагревательном столике “Voetius”. Спектры ¹H-ЯМР сняты на спектрометре Bruker WM-250 (250.13 МГц), масс-спектры – на приборе Kratos MS с прямым вводом в ионный источник. ТСХ осуществляли на пластинках Sorbfil (АО “Сорбполимер”, Россия) в системах хлороформ-метанол-10 н. аммиак, 20 : 1 : 0.04 (А) и 20 : 1.5 : 0.1 (Б).

ВЭЖХ меченого оланзапина осуществляли на колонке Kromasil 100C₁₈, 7 мкм (4 × 150 мм) при скорости элюции 1.0 мл мин⁻¹, в системе метанол–аммоний–фосфатный буфер (рН 2.8) (1 : 3) (время удерживания оланзапина (τ) 5.13 мин).

Для приема и обработки хроматографических данных использовалась система “МультиХром” (ООО “Амперсенд”, Россия) на базе IBM PC/AT. Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике с эффективностью регистрации трития

Зависимость выхода и относительной молярной радиоактивности оланзапина от условий реакции изотопного обмена*

Температура, °С	Выход, %	Отн. мол. радиоакт., %**
23	60	7
150	77	3
180	17	34
200	10	100

* Первая строка – изотопный обмен с тритиевой водой, 16 ч, диоксан–триэтиламин; остальные строки – твердофазная реакция: катализатор – 5% Pd/BaSO₄, время реакции – 10 мин, давление газообразного трития – 333 гПа.

** За 100% принята максимальная молярная радиоактивность в данной серии экспериментов.

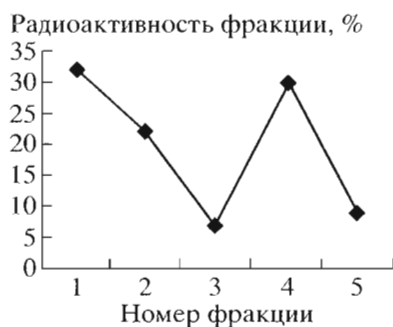


Рис. 1. Распределение радиоактивности по фракциям при КХ на силикагеле (за 100% принята суммарная радиоактивность пяти фракций). Система хлороформ-метанол (3 : 2), объем фракций – 4 мл.

30% в диоксановом сцинтиляторе. Выбор условий введения тритиевой метки проводили с использованием 1% трития [6–8].

Химический синтез оланзапина

2-Амино-5-метилтиофен-3-карбонитрил (II). К смеси 15 г (0.47 моль) серы, 33 г (0.56 моль) пропионового альдегида в 95 мл DMF при интенсивном перемешивании и охлаждении добавили 40 мл триэтиламина с такой скоростью, чтобы температура реакционной смеси оставалась в пределах 5–10°C. После этого охлаждение сняли и перемешивали реакционную смесь примерно 1 ч. Затем к реакционной смеси по каплям прибавили раствор 31.5 г (0.47 моль) малондинитрила в 60 мл DMF, сохраняя температуру реакционной смеси в

пределах 18–20°C, и перемешивали еще 3 ч. Далее реакционную смесь вылили в 800 мл воды со льдом, водный слой отделили, остаток экстрагировали хлороформом (3 × 200 мл). Органический слой последовательно промыли несколько раз водой, насыщенным раствором сульфата натрия и сушили безводным сульфатом натрия. После удаления растворителя и двукратного упаривания остатка с безводным толуолом получили 39 г (60%) 2-амино-5-метилтиофен-3-карбонитрила (II) в виде черно-коричневого твердого остатка, который использовали в следующей стадии.

2-(2-Нитроанилино)-5-метилтиофен-3-карбонитрил (III). К интенсивно перемешиваемой взвеси 14.5 г (60% дисперсия в масле, 0.36 моль) NaH в 50 мл сухого THF в атмосфере аргона прибавили по каплям раствор 28.2 г (0.2 моль) 2-фторнитробензола и 27.6 г (0.2 моль) 2-амино-5-метилтиофен-3-карбонитрила (II) в 250 мл сухого THF и перемешивали сутки при 25°C. Затем реакционную смесь вылили в 0.5 л лед. воды и экстрагировали хлороформом (3 × 200 мл). Объединенные экстракты промывали 10% HCl, затем водой, после чего сушили безводным сульфатом натрия. Остаток после удаления растворителя дважды перекристаллизовали из изопропанола. Получили 12.2 г (23%) 2-(2-нитроанилино)-5-метилтиофен-3-карбонитрила (III) с т. пл. 97–100°C (лит. данные [3] 99–102°C). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 2.47 (3 H, с), 6.78 (1 H, с), 6.97 (1 H, т), 7.20 (1 H, д), 7.56 (1 H, т), 8.27 (1 H, д), 9.63 (1 H, уш.с).

Хлоргидрат 4-амино-2-метил-10H-тиено[2,3-b][1,5]бенздиазепина (IV). К взвеси 5.0 г (0.019 моль) 2-(2-нитроанилино)-5-метилтиофен-3-карбонит-

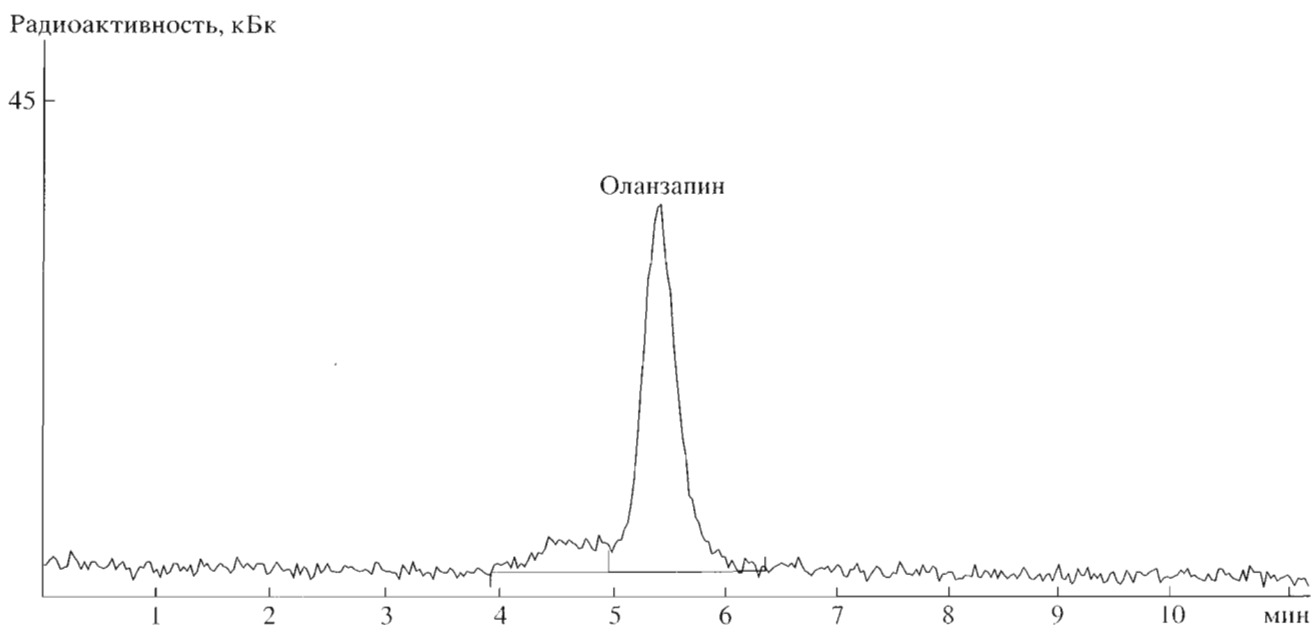


Рис. 2. Аналитическая ВЭЖХ фракции 4 после КХ на силикагеле. Профиль элюата по радиоактивности.

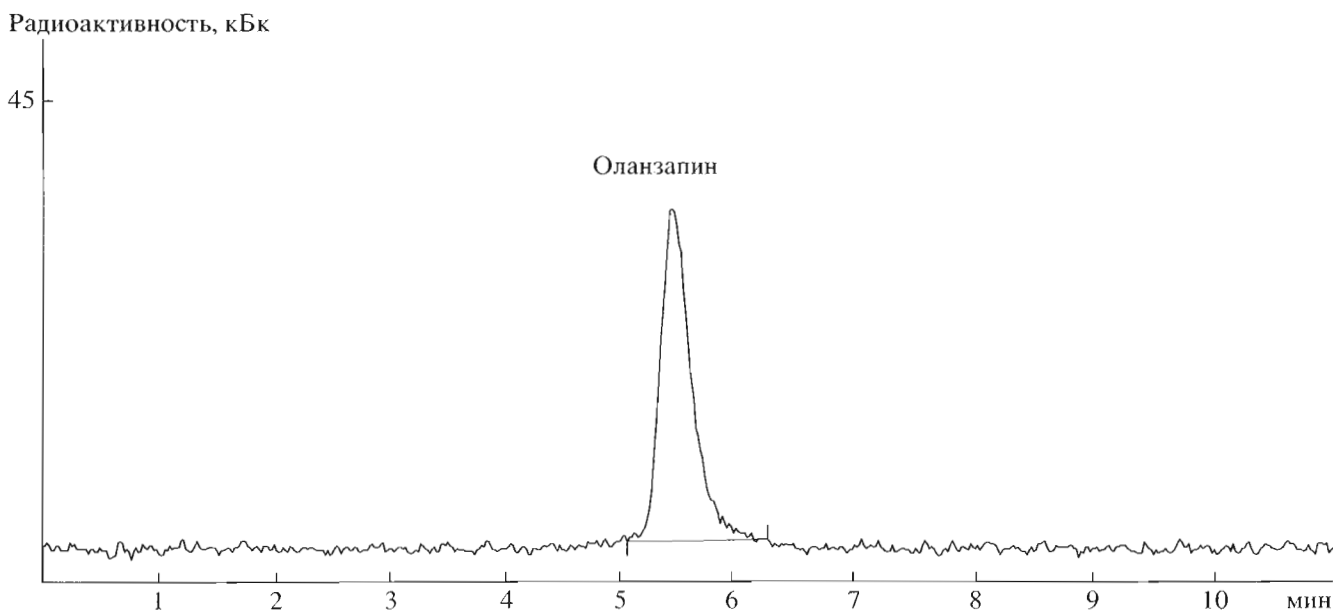


Рис. 3. Анализ меченого оланзапина после очистки методом ВЭЖХ. Профиль элюата по радиоактивности.

рила (III) в 55 мл этанола при 50°C в течение 10 мин добавили раствор 13.6 г (0.060 моль) хлорида олова в 45 мл конц. HCl. Затем смесь кипятили при перемешивании в течение 1.5 ч, упарили до половинного объема и оставили в холодильнике при +5°C на ночь. Выпавший осадок отфильтровали, промыли небольшим количеством воды и перекристаллизовали из этанола. Получили 6.9 г (65%) хлоргидрата 4-амино-2-метил-10H-тиено[2,3-*b*][1,5]бенздиазепина (IV) с т. пл. >250°C (лит. данные [3] >250°C). Спектр ¹H-ЯМР (DMSO-*d*₆, δ, м.д.): 2.24 (3 H, с), 6.80–7.15 (5 H, м), 8.90–9.15 (2 H, уш. д), 9.58 (1 H, уш. с), 11.27 (1 H, уш. с).

2-Метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-4H-тиено[2,3-*b*][1,5]бенздиазепин (I). Смесь 6.9 г (0.012 моль) хлоргидрата 4-амино-2-метил-10H-тиено[2,3-*b*][1,5]бенздиазепина (IV), 30 мл *N*-метилпиперазина, 40 мл DMSO и 40 мл толуола кипятили с обратным холодильником в течение 24 ч, затем добавили 50 мл воды и оставили при +5°C для кристаллизации. Выпавший осадок отфильтровали и перекристаллизовали из ацетонитрила. После высушивания в вакууме при 60°C получили 2.48 г (65%) целевого соединения (I), т. пл. 195–196°C (лит. данные [3] 195°C). *R*_f 0.39 (A), *R*_f 0.90 (B). Спектр ¹H-ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 2.30 (3 H, с), 2.35 (3 H, с), 2.48 (4 H, м), 3.55 (4 H, м), 5.00 (1 H, уш. с), 6.39 (1 H, с), 6.60 (1 H, д), 6.80–7.15 (3 H, м). MS, *m/z* (I, %): 312 (26.3, *M*⁺), 254 (9.4), 242 (100), 229 (68.4), 213 (53.7).

Получение меченого тритием оланзапина

а) В реакционную ампулу помещали 3 мг оланзапина (I), нанесенного на 60 мг 5% Pd/BaSO₄, вакуумировали ее до давления 0.1 Па, заполняли газобразным тритием до давления 333 гПа и выдерживали при температуре 200°C 10 мин. Избыточный тритий удаляли вакуумированием. После охлаждения продукты реакции экстрагировали метанолом (6 × 1 мл), катализатор отфильтровывали, фильтраты упаривали, остаток растворяли в метаноле (3 мл) и вновь упаривали; эту операцию (удаление лабильного трития) повторяли до прекращения падения радиоактивности раствора. Как показал анализ методом ВЭЖХ, реакционная смесь содержала 0.6 мг (выход 20%) меченого оланзапина с радиохимической чистотой около 6%.

Раствор полученного меченого оланзапина (I) в 0.5 мл смеси хлороформ–метанол (5 : 1) наносили на колонку (10 × 200 мм) с 5 г силикагеля (Силикагель L, 100/250 мкм, Chemapol, Чехия) и последовательно элюировали 20 мл хлороформа, смесями хлороформа с метанолом в соотношении 10 : 1 (10 мл), 7 : 3 (10 мл). Контроль этих элюатов методом ТСХ (система А) показал отсутствие меченого оланзапина. При дальнейшем элюировании 40 мл смеси хлороформа с метанолом 3 : 2 отобраны фракции по 4 мл каждая. Анализ методом ТСХ показал, что практически весь меченый оланзапин находился в четвертой фракции (рис. 1). В ней было обнаружено 0.45 мг (выход 15%) меченого вещества с радиохимической чистотой 85% (рис. 2) Полученный препарат очищали препаративной ВЭЖХ. Выход меченого препарата составил 0.3 мг (выход – 10% в расчете на исход-

ный немеченый продукт), молярная радиоактивность 12 Ки ммоль⁻¹, радиохимическая чистота (рис. 3) 98–99%.

б) Реакцию проводили, как описано в методике (а), при 150°C в течение 15 мин. Выход меченого препарата достигал 77%, молярная радиоактивность – 0.3 Ки ммоль⁻¹, радиохимическая чистота – 98–99%.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и гранта Научные школы № НШ-2150.2003.4 под руководством академика Н.Ф. Мясоедова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barnes T.R.E., McPhillips M.A. // *British J. Psychiatry*. 1999. V. 174. P. 34–43.
2. Campiani G., Nacci V., Bechelli S., Ciani S.M., Garofalo A., Fiorini I., Wikstrom H., et al. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 3763–3772.
3. Charrabarti J.K., Hotten T.M., Tupper D.E. US Patent 5229382. 20.07.1993.
4. Hassner A., Stumer C. *Organic Synthesis Based on Name Reactions and Unnamed Reactions*. N. Y.: Pergamon, 1994.
5. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. Меченные тритием липофильные соединения. М.: Наука, 2003. 246 с.
6. Шевченко В.П., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // *Радиохимия*. 1998. Т. 40. С. 79–83.
7. Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф. // *Радиохимия*. 1999. Т. 41. С. 289–299.
8. Шевченко В.П., Фараджева С.В., Нагаев И.Ю., Мясоедов Н.Ф. // *Радиохимия*. 1998. Т. 40. С. 84–88.

A Synthesis of Tritium-labeled Olanzapine

V. P. Shevchenko[#], I. Yu. Nagaev, Yu. V. Kuznetsov,
E. V. Polunin, A. A. Zozulya and N. F. Myasoevov

[#]Fax: (095) 196-0221; e-mail: nagaev@img.ras.ru
Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
pl. akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

A synthesis of olanzapine, 2-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-4H-thieno[2,3-b][1,5]benzodiazepine was carried out, and the conditions for its tritium labeling were optimized, to get a tritium-labeled olanzapine preparation with molar radioactivity of 12 Ci/mmol. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: olanzapine, synthesis, tritium