

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *in vitro* НОВЫХ ТЕТРАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ 2,4-ДИАМИНО-1,3,5-ТРИАЗИНА

© 2022 г. О. В. Миколайчук^{a,b,c,*}, А. В. Протас^{a,c}, Е. А. Попова^{a,c},
О. Е. Молчанов^c, Д. Н. Майстренко^c, В. А. Островский^d, Ю. Н. Павлюкова^d,
В. В. Шаройко^{a,b,c}, К. Н. Семенов^{a,b,c}

^a Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, ул. Льва Толстого 6–8, Санкт-Петербург, 197022 Россия

^b Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^c Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова, Санкт-Петербург, 197758 Россия

^d Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, 190013 Россия
*e-mail: olga19940519@mail.ru

Поступило в редакцию 30 июня 2022 г.

После доработки 20 июля 2022 г.

Принято к печати 21 июля 2022 г.

Синтезированы новые тетразолсодержащие производные 2,4-диамино-1,3,5-триазины. Методом МТТ-теста исследована цитотоксическая активность полученных соединений в отношении опухолевых клеточных линий Huh-7 и HeLa. Наиболее значительную противоопухолевую активность показали 1,3,5-триазины, содержащие в качестве заместителя 5-фенилтетразол-2-илацетогидразидный фрагмент. Полученные соединения практически не проявляли цитотоксического эффекта в отношении неопухолевых клеток линии почки эмбриона человека HEK293.

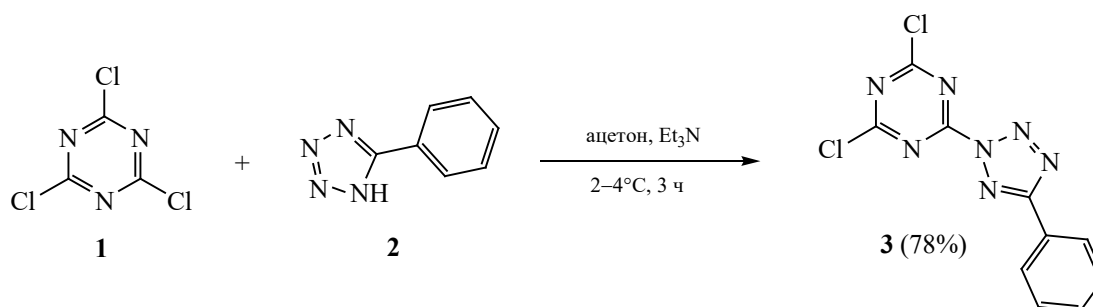
Ключевые слова: 1,3,5-триазины, тетразолы, МТТ-тест, цитотоксическая активность

DOI: 10.31857/S0044460X22090050, **EDN:** JNJDFD

1,3,5-Триазиновый цикл является фармакофорным фрагментом, который широко используется при разработке лекарственных средств различного терапевтического действия, в том числе высокоэффективных цитостатиков [1–4]. Противоопухолевая активность данных соединений может быть обусловлена действием 1,3,5-триазинов на различные биологические мишени опухолевых клеток [5–12]. Так, некоторые 2,4,6-замещенные производные 1,3,5-триазины, например, алтретамин (N²,N²,N⁴,N⁴,N⁶,N⁶-гексаметил-1,3,5-триазин-2,4,6-триамин), триэтилен-

меламин (2,4,6-триэтиленимино-1,3,5-триазин) являются алкилирующими агентами и проявляют цитостатический эффект за счет действия их метаболитов на молекулы ДНК [9]. Перспективным направлением разработки биологически активных веществ является получение гибридных молекул, содержащих в своей структуре два и более гетероциклических фрагмента. Так, введение в положения 2, 4 или 6 1,3,5-триазинового ядра некоторых пятичленных азотсодержащих гетероциклических фрагментов позволило получить вещества со значительной противоопухолевой активностью, на-

Схема 1.



пример, оказывающих ингибирующее действие на внутриклеточные протеинкиназы [2, 3, 13, 14].

Среди пятичленных азотсодержащих гетероциклов особое внимание привлекают тетразолы, уникальные свойства которых обусловлены их способностью участвовать как в кислотно-основных, ионных, координационных, так и в нековалентных взаимодействиях с образованием водородных связей (в том числе многоцентровых) с биологическими мишенями [15–21]. При этом введение тетразольного цикла в молекулу органического субстрата зачастую приводит к усилению биологической активности и пролонгированному действию лекарственного средства. Ранее нами был получен ([{5-[4,6-ди(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]амино}-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метил-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)]ацетат проявивший цитотоксическое действие в отношении клеток аденокарциномы печени человека SK-HEP-1 (IC₅₀ 22.2 мкМ.) и глиобластомы человека T 98G (IC₅₀ 44.9 мкМ.), который можно рассматривать как потенциальный цитостатик, действующий по механизму связывания с молекулой ДНК [22].

В данной работе получены и охарактеризованы производные 1,3,5-триазина, содержащие в положениях 2 и 4 гетероцикла диметиламиногруппу или метиламиногруппу, а в положении 6 – тетразольный фрагмент, соединенный с *s*-триазиновым циклом непосредственно или через линкерную группу. Исследована цитотоксическая активность полученных соединений *in vitro* в отношении опухолевых клеточных линий Huh-7 и HeLa, а также клеток линии почки эмбриона человека HEK293.

Синтез тетразолсодержащих производных 1,3,5-триазина. Для получения моно-, ди- и три-

замещенных 1,3,5-триазинов наиболее доступным и часто используемым реагентом является 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин (цианурхлорид) **1**. Атомы хлора в положениях 2, 4 и 6 *s*-триазинового цикла цианурхлорида **1** обладают различной реакционной способностью по отношению к нуклеофилам [23]. Варьирование температурного режима реакции позволяет последовательно вводить различные заместители в триазиновое кольцо. Как правило, монозамещение хлора проводится при 0°C и ниже, дизамещение – при комнатной температуре, тризамещение осуществляется от 60°C и выше. В настоящей работе взаимодействием цианурхлорида **1** с 5-фенилтетразолом **2** в ацетоне в присутствии триэтиламина при 2–4°C получен 2,4-дихлор-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-1,3,5-триазин **3** (схема 1).

Для синтеза *трет*-бутил-[2-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2H-тетразол-5-ил]карбаматов **6a** и **6b** предварительно была проведена постановка защитной Вос-группы по аминогруппе 5-аминотетразола **4**. Далее взаимодействием *трет*-бутил-(1H-тетразол-5-ил)карбамата **5** с цианурхлоридом **1** в диоксане была получена смесь N¹- и N²-региоизомеров **6a** и **6b** соответственно (схема 2). Последующее разделение соединений **6a** и **6b** методом колоночной хроматографии позволило получить *трет*-бутил-[2-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2H-тетразол-5-ил]карбамат **6b**. Для соединения **6a** были описаны отдельные сигналы из спектров ЯМР ¹H и ¹³C{H} смеси изомеров.

Взаимодействием 4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-амин **7** с хлорангидридом 5-фенилтетразол-2-илуксусной кислоты **8** в ацетонитриле в присут-

Схема 2.

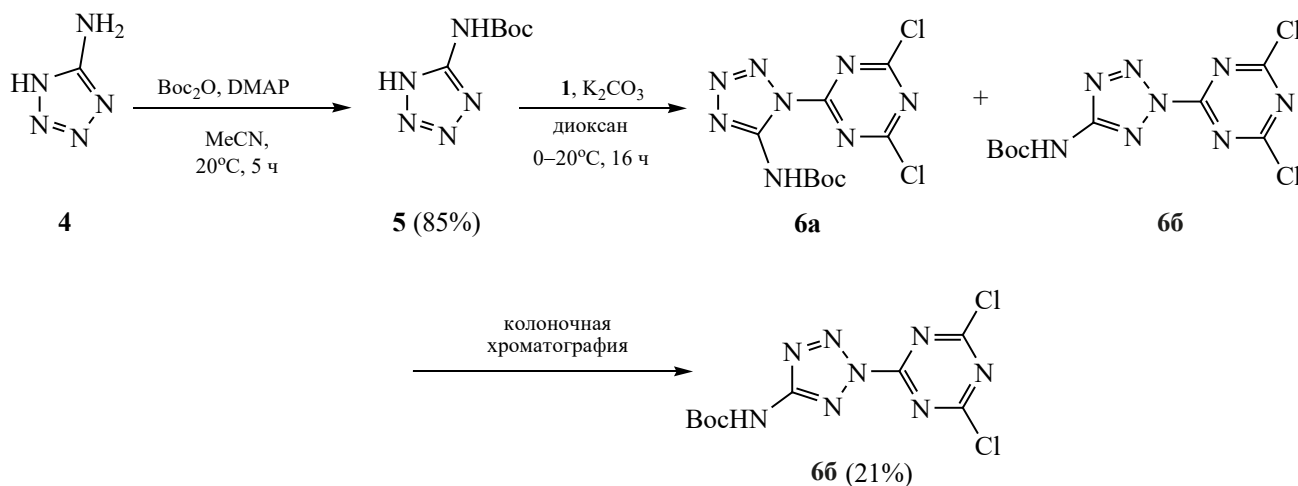
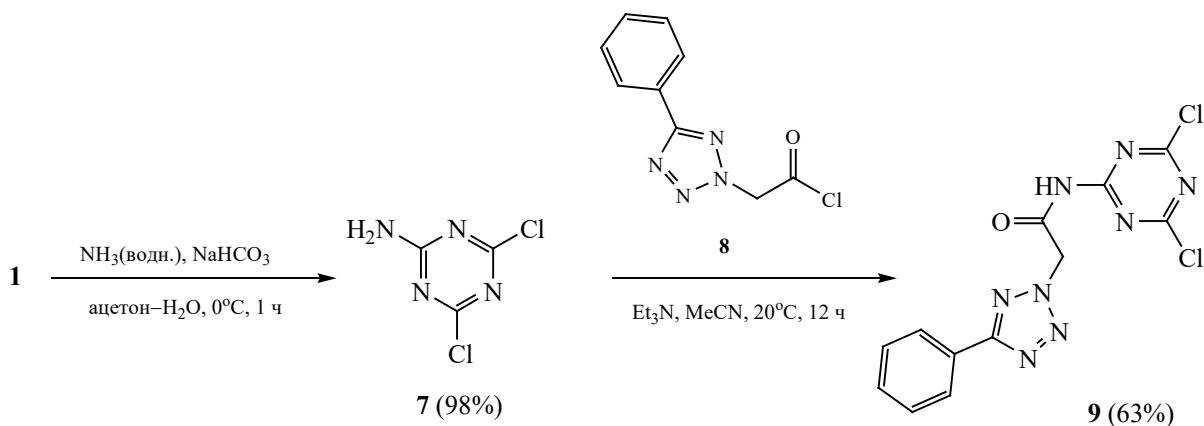


Схема 3.



ствии триэтиламина было получено соединение **9**, в котором тетразольный цикл связан с 1,3,5-триазином через линкерный ацетамидный фрагмент (схема 3).

Синтез соединения **11**, содержащего 5-фенилтетразол-2-ильный фрагмент, связанный с 2,4-дихлортриазином через линкерную ацетогидразидную группу, осуществляли посредством реакции гидразида 5-фенилтетразол-2-илуксусной кислоты с цианурхлоридом **1** в диоксане в присутствии K_2CO_3 (схема 4).

Далее из полученных тетразолсодержащих 2,4-дихлор-1,3,5-триазинов **3**, **66**, **9**, **11** реакцией

с диметиламином, который образуется *in situ* при действии NaOH на диметиламина гидрохлорид, были синтезированы соединения **12–16** (схема 5, табл. 1). Так, при действии эквимольного количества диметиламина на соединения **3** и **11** в водном ацетоне при 25°C получены производные 1,3,5-триазина **12** и **15** соответственно, содержащие одну диметиламиногруппу в триазиновом цикле. В случае использования 2-кратного избытка диметиламина по отношению к соединениям **66**, **9** и **11** при 40°C образуются соединения **13**, **14** и **16** соответственно, содержащие две диметиламиногруппы в триазиновом цикле. Взаимодействием соединения

Схема 4.

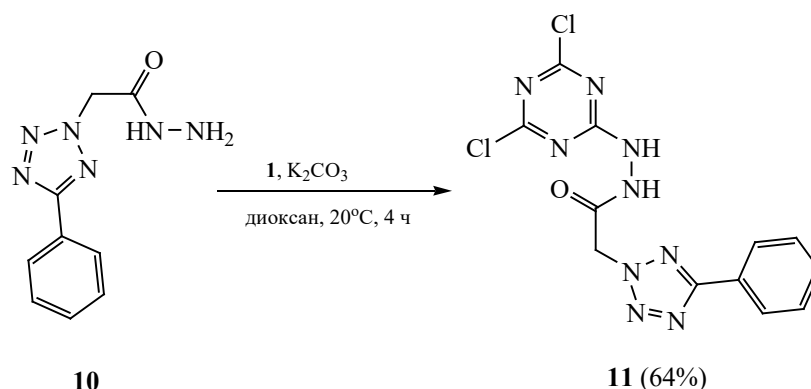
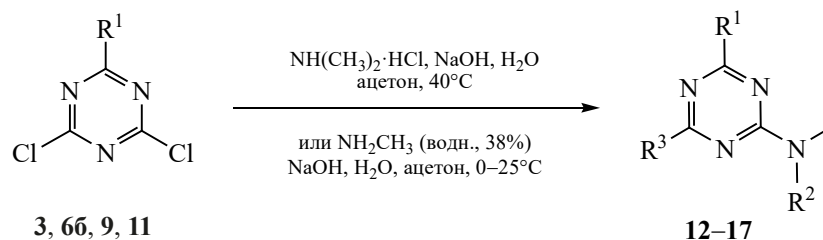


Схема 5.



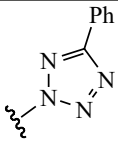
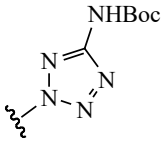
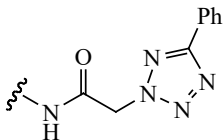
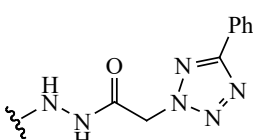
11 с водным раствором метиламина также было получено соединение **17**, содержащее в положениях 2 и 4 *s*-триазинового цикла NHCH_3 -группу.

Полученные соединения были охарактеризованы методами спектроскопии ЯМР ^1H и $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$, масс-спектрометрии и элементного C,H,N-анализа. В спектрах ЯМР $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ 2,4-дихлор-1,3,5-триазинов **3**, **66**, **9** и **11** наблюдаются сигналы атомов углерода триазинового цикла при 154.2–166.4 м. д., а также проявляются сигналы атомов углерода 2,5-дизамещенного тетразольного цикла при 160.8–164.7 м. д. В спектрах ЯМР ^1H соединений **12–16** присутствуют сигналы протонов $(\text{CH}_3)_2\text{N}$ -групп. Так, в спектрах ЯМР ^1H соединений **12** и **13** наблюдаются синглеты при 3.18 и 3.19 м. д. соответственно, и сигналы при 2.55–3.09 м. д. в случае соединений **14–16**. В спектре ЯМР ^1H соединения **17** сигнал протонов двух NHCH_3 -групп проявился синглетом при 3.58 м. д.

Исследование цитотоксической активности *in vitro* тетразолсодержащих произво-

дных 1,3,5-триазина. В данной работе методом МТТ-теста исследована цитотоксическая активность соединений **12–17** в отношении опухолевых клеточных линий Huh-7 и HeLa, а также неопухолевой клеточной линии почки эмбриона человека HEK293. Было установлено, что соединения **12–17** *in vitro* проявляют невысокую цитотоксическую активность в отношении исследуемых клеточных линий. Наиболее значительную цитотоксическую активность показали соединения **15** и **17** в отношении клеток линии Huh-7. При инкубации клеточной линии Huh-7 в течение 48 ч с соединением **15** (с 25.0 мкМ.) и с соединением **17** (с 0.4 мкМ.) выживаемость клеток составляла (64 ± 6) и $(41 \pm 8)\%$ соответственно. Соединения **12–17** не проявили или показали незначительную цитотоксическую активность в отношении клеток линии HEK293. Максимальный цитотоксический эффект в отношении клеток данной линии проявил тетразолсодержащий 1,3,5-триазин **17**. При инкубации клеточной линии HEK293 в течение

Таблица 1. Выходы соединений 12–17

| № | R ¹ | R ² | R ³ | Выход, % |
|----|---|-----------------|----------------------------------|----------|
| 12 |  | CH ₃ | Cl | 86 |
| 13 |  | CH ₃ | N(CH ₃) ₂ | 49 |
| 14 |  | CH ₃ | N(CH ₃) ₂ | 54 |
| 15 |  | CH ₃ | Cl | 44 |
| 16 | | | N(CH ₃) ₂ | 76 |
| 17 | | | NHCH ₃ | 77 |

48 ч с соединением **17** (с 100.0 мкМ.) выживаемость клеток составляла (70±3)%.

Таким образом, синтезированы и охарактеризованы новые тетразолсодержащие производные 2,4-диамино-1,3,5-триазина. Наиболее значительный цитотоксический эффект в отношении клеточной линии Huh-7 проявил 1,3,5-триазин, содержащий в качестве заместителей метиламиногруппу в положениях 2, 4 и 5-фенилтетразол-2-илацетогидразидный фрагмент в положении 6. Стоит отметить низкую цитотоксическую активность полученных соединений в отношении клеточной линии почки эмбриона человека HEK293.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хлорангидрид 5-фенилтетразол-2-илуксусной кислоты **8** и гидразид 5-фенилтетразол-2-илуксусной кислоты **10** получали согласно методикам, описанным в работах [24, 25] соответственно. Характеристики соединений **8**, **10** соответствовали литературным данным.

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C{¹H} зарегистрированы на приборе Bruker Avance III 400 (400.13 и 100.61 МГц соответственно) в CDCl₃ и ДМСО-*d*₆

при 25°C. Масс-спектральный анализ выполнен на приборе Bruker Daltonik GmbH MaXis (Германия). Элементный анализ (C, H, N) был проведен на анализаторе EuroVector EA 3028 HT CHNSO (Италия). Температуру плавления определяли на приборе марки ПТП SMP 10 (Германия) со скоростью нагрева 1 град/мин в интервале плавления. Исследования методом ТСХ проводили на пластинах с силикагелем 60 Merck F₂₅₄ (Германия).

2,4-Дихлор-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-1,3,5-триазин (3). К раствору цианурхлорида (4.34 ммоль) в 120 мл ацетона добавляли раствор 5-фенилтетразола (4.77 ммоль) в 20 мл ацетона и триэтиламин (4.77 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 2–4°C. По окончании времени выдержки выпавший в осадок продукт отфильтровывали и сушили в токе воздуха. Полученный продукт использовали для дальнейшего синтеза без дополнительной очистки. Выход 0.99 г (78%), желтые кристаллы, т. пл. 192–195°C (разл.) [26]. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 7.53–7.75 м (3H, CH_{Ph}), 8.10–8.41 м (2H, CH_{Ph}). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 126.8 (CH_{Ph}), 127.3 (CH_{Ph}), 129.9 (CH_{Ph}), 131.6 (CH_{Ph}), 162.4 (C_{триазин}), 164.7 (CN₄), 166.8 (C_{триазин}). Найдено, %:

C 40.76; H 1.86; N 33.29. C₁₀H₅Cl₂N₇. Вычислено, %: C 40.84; H 1.71; N 33.34.

трет-Бутил-(1H-тетразол-5-ил)карбамат (5). К раствору 5-аминотетразола (71 ммоль) в ацетонитриле (20 мл) при перемешивании прибавляли раствор ди-трет-бутилдикарбоната (71 ммоль) в ацетонитриле (30 мл) и затем 4-(диметиламино)пиридин (71 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре при перемешивании в течение 3 ч. По окончании времени выдержки реакционную массу упаривали при пониженном давлении. Продукт очищали методом колоночной хроматографии (хлорформ–метанол, 9.5:0.5). Выход 11.2 г (85%), желтые кристаллы, т. пл. 151–153°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 1.49 уш. с (9H, CH₃). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 28.3 (CH₃), 82.1 (C), 151.1 (CN₄), 152.6 (C=O). Найдено, %: C 38.98; H 5.87; N 37.90. C₆H₁₁N₅O₂. Вычислено, %: C 38.92; H 5.99; N 37.82.

трет-Бутил-[2-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1H-тетразол-5-ил]карбамат (6a) и трет-бутил-[2-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2H-тетразол-5-ил]карбамат (6b). К раствору трет-бутил-(1H-тетразол-5-ил)карбамата **5** (11.2 ммоль) в 40 мл диоксана добавляли K₂CO₃ (22.6 ммоль). В полученную суспензию при охлаждении до 0°C по каплям вводили раствор цианурхлорида (11.3 ммоль) в диоксане. Полученную реакционную массу нагревали до комнатной температуры и выдерживали в течение 16 ч. По окончании времени выдержки отфильтровывали осадок, промывали его водой и сушили в токе воздуха. Разделение региоизомеров **6a** и **6b** проводили методом колоночной хроматографии (хлорформ–метанол, 9.5:0.5).

трет-Бутил-[2-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1H-тетразол-5-ил]карбамат (6a). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 1.48 уш. с (9H, CH₃). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 30.7 (CH₃), 68.2 (C), 151.7 (CN₄), 154.4 (C=O), 161.1 (C_{триазин}).

трет-Бутил-[2-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2H-тетразол-5-ил]карбамат (6b). Выход 0.78 г (21%), желтые кристаллы, т. пл. 171–173°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 1.46 уш. с (9H, CH₃). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 28.7 (CH₃), 66.8 (C), 150.2 (C=O), 160.8 (C_{триазин}),

163.1 (CN₄). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 364.0234 [*M* – H][–]. Найдено, %: C 32.54; H 3.10; N 33.69. C₉H₁₀Cl₂N₈O₂. Вычислено, %: C 32.45; H 3.03; N 33.64; O 9.61.

4,6-Дихлор-1,3,5-триазин-2-амин (7). К раствору цианурхлорида (5.42 ммоль) в 20 мл ацетона добавляли 10 мл 28%-ного водного раствора аммиака (5.42 ммоль). Реакционную массу выдерживали при 0°C в течение 1 ч. По окончании времени выдержки выпавший в осадок продукт отфильтровывали и сушили в токе воздуха. Продукт использовали для последующего синтеза без дополнительной очистки. Выход 0.88 г (98%), белые кристаллы, т. пл. 145–148°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 8.56 с (2H, NH₂). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 167.4 (C_{триазин}), 169.6 (C_{триазин}). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 164.9729 [*M* + H]⁺.

N-(4,6-Дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетамид (9). К раствору 4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-амина (4.85 ммоль) в 120 мл ацетонитрила добавляли хлорангидрид 5-фенилтетразол-2-илуксусной кислоты (5.33 ммоль). Полученную суспензию при комнатной температуре перемешивали в течение 12 ч. По окончании времени выдержки растворитель отгоняли при пониженном давлении. Очистку продукта проводили методом колоночной хроматографии (хлорформ–метанол, 9:1). Выход 1.08 г (63%), белые кристаллы, т. пл. 185–187°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 5.49 с (2H, CH₂), 7.59–7.56 м (3H, CH_{Ar}), 7.88 уш. с (1H, NH), 8.09–8.07 м (2H, CH_{Ph}). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 55.1 (CH₂), 126.8 (CH_{Ph}), 127.4 (CH_{Ph}), 129.7 (CH_{Ph}), 131.0 (CH_{Ar}), 164.4 (CN₄), 166.5 (C_{триазин}), 166.5 (C=O), 169.7 (C_{триазин}). Найдено, %: C 41.01; H 2.41; N 31.87. C₁₂H₈Cl₂N₈O. Вычислено, %: C 41.05; H 2.30; N 31.91.

N'-(4,6-Дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетогидразид (11). К цианурхлориду (6.0 ммоль) в диоксане (25 мл) добавляли гидразид 5-фенилтетразол-2-илуксусной кислоты **10** (6.0 ммоль) и K₂CO₃ (9.0 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при комнатной температуре 4 ч. После фильтрации и отгона растворителя при пониженном давлении был выделен продукт, который очищали методом колоночной хроматографии (хлорформ–метанол,

9:1). Выход 1.58 г (76%), белые кристаллы, т. пл. 214–216°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 5.69 с (2H, CH_2), 7.55 м (3H, CH_{Ph}), 8.06 м (2H, CH_{Ph}), 10.82 с (1H, NH), 11.22 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 54.2 (CH_2), 126.8 (CH_{Ph}), 127.2 (CH_{Ph}), 129.8 (CH_{Ph}), 131.1 (CH_{Ph}), 164.3 (CN_4), 164.7 (C=O), 168.4 ($\text{C}_{\text{триазин}}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 366.0387 [$M + \text{H}$] $^+$.

Общая методика синтеза соединений 12–16.

Диметиламина гидрохлорид (10 ммоль) растворяли в водном растворе 10 мл NaOH (20 ммоль) при комнатной температуре. Полученный раствор прибавляли к раствору соответствующего 2,4-дихлор-6-замещенного 1,3,5-триазина **3**, **6**, **9** или **11** (5 ммоль) в ацетоне. При получении соединений **12** и **15** в реакцию вводили 5 ммоль диметиламина гидрохлорида и 10 ммоль NaOH. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при комнатной температуре в течение 12 ч. По окончании времени выдержки продукт либо выпадал в осадок (соединение **12**) или был получен после фильтрации с последующим отгоном растворителя при пониженном давлении (соединения **13–16**). Очистку соединений **13–16** проводили методом колоночной хроматографии (хлорформ–метанол, 9.5:0.5 для соединений **13** и **14** или хлорформ–метанол, 9:1 для соединений **15** и **16**).

4-Хлор-N,N-диметил-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-1,3,5-триазин-2-амин (12). Выход 1.3 г (86%), светло-желтые кристаллы, т. пл. 229–231°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 3.19 уш. с. (6H, CH_3), 7.62 м (3H, CH_{Ph}), 7.92–7.86 м (2H, CH_{Ph}). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 36.4 (CH_3), 127.2 (CH_{Ph}), 128.5 (CH_{Ph}), 129.8 (CH_{Ar}), 131.3 (CH_{Ph}), 164.2 (CN_4), 168.7 (C=O), 170.8 ($\text{C}_{\text{триазин}}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 302.1680 [M] $^+$. Найдено, %: C 47.49; H 3.51; Cl 11.55; N, 37.12. $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_8$. Вычислено, %: C 47.61; H 3.66; Cl 11.71; N 37.02.

трет-Бутил-{2-[4,6-бис(диметиламино)-1,3,5-триазин-2-ил]-2H-тетразол-5-ил}карбамат (13). Выход 0.43 г (49%), желтые кристаллы, т. пл. 220–222°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 1.27 уш. с (9H, CH_3), 3.18 с (12H, CH_3), 10.28 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 29.7 (CH_3), 37.0 [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$], 158.5 (C=O), 159.6 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 162.8 (CN_4). Найдено, %: C 44.50; H 6.28; N 40.02.

$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_{10}\text{O}_2$. Вычислено, %: C 44.56; H 6.33; N 39.98.

N-[4,6-Бис(диметиламино)-1,3,5-триазин-2-ил]-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетамид (14). Выход 0.99 г (54%), белые кристаллы, т. пл. 259–261°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 2.55 с (6H, CH_3), 2.56 с (6H, CH_3), 5.93 с (2H, CH_2), 7.65–7.45 м (3H, CH_{Ph}), 8.17–7.96 м (2H, CH_{Ph}), 10.45 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 35.8 (CH_3), 36.4 (CH_3), 54.5 (CH_2), 126.7 (CH_{Ph}), 126.7 (CH_{Ph}), 129.8 (CH_{Ph}), 131.0 (CH_{Ph}), 164.4 (CN_4), 164.9 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 170.4 (C=O). Найдено, %: C 52.26; H 5.38; N 37.98. $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_{10}\text{O}$. Вычислено, %: C 52.16; H 5.47; N 38.02.

N'-[4-Хлор-6-(диметиламино)-1,3,5-триазин-2-ил]-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетогидразид (15). Выход 0.82 г (44%), белые кристаллы, т. пл. 232–234°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 3.05 с (3H, CH_3), 3.06 с (3H, CH_3), 5.65 с (2H, CH_2), 7.57 м (3H, CH_{Ph}), 8.05 м (2H, CH_{Ar}), 9.77 с (1H, NH), 10.56 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 36.0 (CH_3), 53.5 (CH_2), 126.3 (CH_{Ph}), 126.7 (CH_{Ph}), 129.3 (CH_{Ph}), 130.7 (CH_{Ph}), 163.9 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 164.6 (CN_4), 166.2 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 168.2 (C=O). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 302.1680 [M] $^+$.

N'-[4,6-Бис(диметиламино)-1,3,5-триазин-2-ил]-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетогидразид (16). Выход 1.35 г (76%), белые кристаллы, т. пл. 206–208°C. Спектр ЯМР ^1H (CDCl_3), δ , м. д.: 3.03 с (6H, CH_3), 3.06 с (6H, CH_3), 5.42 с (2H, CH_2), 7.41 м (3H, CH_{Ar}), 8.04 м (2H, CH_{Ar}), 8.88 с (1H, NH), 9.97 с (1H, NH). Спектр ЯМР ^{13}C (CDCl_3), δ_{C} , м. д.: 35.3 (CH_3), 53.1 (CH_2), 126.1 (CH_{Ph}), 128.2 (CH_{Ph}), 128.3 (CH_{Ph}), 129.8 (CH_{Ph}), 163.2 (CN_4), 165.0 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 166.4 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 169.1 (C=O). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 384.2010 [$M + \text{H}$] $^+$.

N'-[4,6-Бис(метиламино)-1,3,5-триазин-2-ил]-2-(5-фенил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидразид (17). Раствор N'-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-фенил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидразида (1.2 ммоль) в 50 мл ацетона прибавляли к раствору метиламина (1 ммоль) в 10 мл 20%-ного раствора NaOH при охлаждении. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при комнатной температуре в течение 12 ч. Растворитель упаривали при пониженном давлении. Очистку продукта проводили методом колоночной хроматогра-

фии (хлорформ–метанол, 7:3). Выход 0.3 г (77%), белые кристаллы, т. пл. 245–247°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 3.58 с (6H, CH_3), 5.64 уш. с (2H, CH_2), 7.57 м (3H, CH_{Ph}), 8.06 м (2H, CH_{Ph}). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 27.6 (CH_3), 53.8 (CH_2), 126.8 (CH_{Ph}), 127.1 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ph}), 131.2 (CH_{Ph}), 164.5 (CN_4), 164.8 ($\text{C}_{\text{Триазин}}$), 166.7 ($\text{C}=\text{O}$). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 356.1699 [$M + \text{H}$] $^+$.

Изучение цитотоксичности. МТТ-Анализ (колориметрический тест с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромида проводили на клеточных линиях HeLa и Huh-7. В качестве контрольной линии использовалась клеточная линия НЕК293 согласно методике [27]. Клетки в концентрации 5×10^4 М. на лунку помещали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 12 ч в среде DMEM-F12 с добавлением 10% термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 50 Ед·мл $^{-1}$ пенициллина и 50 мкг·мл $^{-1}$ стрептомицина. После культивирования в лунки добавляли свежую среду DMEM-F12, содержащую различные концентрации соединений **12–17**. Далее планшет инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере CO_2 -инкубатора в присутствии 20% O_2 , 5% CO_2 . Через 48 ч в лунки добавляли 0.1 мл DMEM-F12 и 0.03 мл МТТ-реагента (0.5 мг/мл) и продолжали инкубировать в течение 1 ч, после чего удаляли супернатант. Образовавшиеся при восстановлении МТТ жизнеспособными клетками кристаллы формазана растворяли в 0.1 мл ДМСО и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре BioRad×Marx (США) при λ 540 нм, вычитая фоновую оптическую плотность при λ 690 нм.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Николайчук Ольга Владиславовна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0463-7725>

Протас Александра Владимировна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1920-9360>

Попова Елена Александровна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0507-2647>

Молчанов Олег Евгеньевич, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3882-1720>

Островский Владимир Аронович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3725-5077>

Шаройко Владимир Владимирович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3717-0471>

Семенов Константин Николаевич, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2239-2044>

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы работы выражают благодарность ресурсным центрам Санкт-Петербургского государственного университета «Магнитно-резонансные методы исследования», «Методы анализа состава вещества» и «Термогравиметрические и калориметрические методы исследования».

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (государственное задание по теме «Создание и оценка противоопухолевой активности конъюгатов неанелированных 1,3,5-триазинил-тетразолов с молекулами адресной доставки к мишеням клеток опухоли микроокружения»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh S., Mandal M.K., Masih A., Saha A., Ghosh S.K., Bhat H.R., Singh U.P. // Arch. Pharm. 2021. Vol. 354. N 6. Art. no. 2000363. doi 10.1002/ardp.202000363
2. Singla P., Luxami V., Paul K. // Eur. J. Med. Chem. 2015. Vol. 102. P. 39. doi 10.1016/j.ejmech.2015.07.037
3. Cascioferro S., Parrino B., Spanò V., Carbone A., Montalbano A., Barraja P., Diana P., Cirrincione G. // Eur. J. Med. Chem. 2017. Vol. 142. P. 523. doi 10.1016/j.ejmech.2017.09.035
4. Shah D.R., Modh R.P., Chikhaliya K.H. // Future Med. Chem. 2014. Vol. 6. N 4. P. 463. doi 10.4155/fmc.13.212
5. Sonawane R.P., Sikervar V., Sasmal S. // Compr. Heterocycl. Chem. 2022. Vol. 9. P. 181. doi 10.1016/B978-0-12-818655-8.00018-4
6. Maliszewski D., Drozdowska D. // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15. N 2. P. 221. doi 10.3390/ph15020221
7. Hiebel M.-A., Suzenet F. // Progr. Heterocycl. Chem. 2021. Vol. 33. P. 441. doi 10.1016/B978-0-323-98410-2.00014-X

8. *Hu J., Zhang Y., Tang N., Lu Y., Guo P., Huang Z.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2021. Vol. 32. Art. no. 115997. doi 10.1016/j.bmc.2021.115997
9. *Pratt W.B., Ruddon R.W.* *The anticancer drugs.* New York: Oxford University Press, 1979. 323 p.
10. *Krętownski R., Drozdowska D., Kolesińska B., Kamiński Z., Frączyk J., Cechowska-Pasko M.* // *Invest. New Drugs.* 2019. Vol. 37. N 5. P. 984. doi 10.1007/s10637-018-0712-8
11. *Rageot D., Bohnacker T., Melone A., Langlois J.-B., Borsari C., Hillmann P., Sele A.M., Beaufils F., Zvelebil M., Hebeisen P., Löscher W., Burke J., Doriano Fabbro D., Wymann M.P.* // *J. Med. Chem.* 2018. Vol. 61. N 22. P. 10084. doi 10.1021/acs.jmedchem.8b01262
12. *Beaufils F., Cmiljanovic N., Cmiljanovic V., Bohnacker T., Melone A., Marone R., Jackson E., Zhang X., Sele A., Borsari C., Mestan J., Hebeisen P., Hillmann P., Giese B., Zvelebil M., Fabbro D., Williams R.L., Rageot D., Wymann M.P.* // *J. Med. Chem.* 2017. Vol. 60. N 17. P. 7524. doi 10.1021/acs.jmedchem.7b00930
13. *Prasher P., Sharma M., Aljabali A.A.A., Gupta G., Negi P., Kapoor D.N., Singh I., Zacconi F.C., Pinto T.J.A., da Silva M.W., Bakshi H.A., Chellappan D.K., Tambuwala M.M., Dua K.* // *Drug Dev. Res.* 2020. Vol. 81. N 7. P. 837. doi 10.1002/ddr.21704
14. *Guo H., Diao Q.-P.* // *Curr. Top. Med. Chem.* 2020. Vol. 20. N 16. P. 1481. doi 10.2174/1568026620666200310122741
15. *Попова Е.А., Трифонов Р.Е., Островский В.А.* // *Усп. хим.* 2019. № 6. С. 644; *Popova E.A., Trifonov R.E., Ostrovskii V.A.* // *Russ. Chem. Rev.* 2019. Vol. 88. P. 644. doi 10.1070/RCR4864
16. *Островский В.А., Трифонов Р.Е., Попова Е.А.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2012. Т. 61. С. 765; *Ostrovskii V.A., Trifonov R.E., Popova E.A.* // *Russ. Chem. Bull.* 2012. Vol. 61. N 4. P. 768. doi 10.1007/s11172-012-0108-4
17. *Ostrovskii V.A., Popova E.A., Trifonov R.E.* // *Compr. Heterocycl. Chem.* 2022. P. 182. doi 10.1016/B978-0-12-818655-8.00131-1
18. *Herr R.J.* // *Bioorg. Med. Chem.* 2002. Vol. 10. N 11. P. 3379. doi 10.1016/S0968-0896(02)00239-0
19. *Popova E.A., Protas A.V., Trifonov R.E.* // *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2017. Vol. 17. N 14. P. 1856. doi 10.2174/1871520617666170327143148
20. *Ostrovskii V.A., Popova E.A., Trifonov R.E.* // *Adv. Heterocycl. Chem.* 2017. Vol. 123. P. 1. doi 10.1016/bs.aihch.2016.12.003
21. *Попова Е.А., Трифонов Р.Е.* // *Усп. хим.* 2015. Т. 84. С. 891; *Popova E.A., Trifonov R.E.* // *Russ. Chem. Rev.* 2015. Vol. 84. N 9. P. 891. doi 10.1070/RCR4527
22. *Миколайчук О.В., Шаройко В.В., Попова Е.А., Протас А.В., Фонин А.В., Ануфриков Ю.А., Малкова А.М., Шманёва Н.Т., Островский В.А., Семенов К.Н.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2022. № 5. С. 1050; *Mikolaichuk O.V., Sharoyko V.V., Popova E.A., Protas A.V., Fonin A.V., Anufrikov Y.A., Malkova A.M., Shmaneva N.T., Ostrovskii V.A., Semenov K.N.* // *Russ. Chem. Bull.* 2022. Vol. 71. N 5. P. 1050. doi 10.1007/s11172-022-3507-1
23. *Blotny G.* // *Tetrahedron.* 2006. Vol. 62. N 41. P. 9507. doi 10.1016/j.tet.2006.07.039
24. *Островский В.А., Данагулян Г.Г., Нестерова О.М., Павлюкова Ю.Н., Толстяков В.В., Зарубина О.С., Слепухин П.А., Есаулкова Я.Л., Мuryлева А.А., Зарубаев В.В., Трифонов Р.Е.* // *ХГС.* 2021. № 4. С. 448; *Ostrovskii V.A., Danagulyan G.G., Nesterova O.M., Pavlyukova Y.N., Tolstyakov V.V., Zarubina O.S., Slepukhin P.A., Esaulkova Y.L., Muryleva A.A., Zarubaev V.V., Trifonov R.E.* // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2021. Vol. 57. N 4. P. 448. doi 10.1007/s10593-021-02922-6
25. *Путис С.М., Зубарев В.Ю., Поплавский В.С., Островский В.А.* // *ХГС.* 2001. Т. 37. С. 759; *Putis S.M., Zubarev V.Y., Poplavskii V.S., Ostrovskii V.A.* // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2001. N 6. P. 759. doi 10.1023/A:1011909127876
26. *Верещачин Л.И., Верховина О.Н., Покатилов Ф.А., Пройдаков А.Г., Кижняев В.Н.* // *ХГС.* 2010. № 4. С. 206; *Vereshchagin L.I., Verkhovina O.N., Pokatilov F.A., Proidakov A.G., Kizhnyayev V.N.* // *Chem. Heterocycl. Compd.* 2010. Vol. 46. N 2. P. 206. doi 10.1007/s10593-010-0493-2
27. *Mikolaichuk O.V., Popova E.A., Protas A.V., Rakiropov I.T., Nerukh D.A., Petrov A.V., Charykov N.A., Ageev S.V., Tochilnikov G.V., Zmitrichenko I.G., Stukov A.N., Semenov K.N., Sharoyko V.V.* // *J. Mol. Liq.* 2022. Vol. 356. Art. no. 119043. doi 10.1016/j.molliq.2022.119043

Synthesis and *in vitro* Study of Cytotoxic Activity of New Tetrazole-Containing 2,4-Diamino-1,3,5-Triazine Derivatives

O. V. Mykolaichuk^{a,b,c,*}, A. V. Protas^{a,c}, E. A. Popova^{a,c}, O. E. Molchanov^c, D. N. Maistrenko^c, V. A. Ostrovskii^d, Yu. N. Pavlyukova^d, V. V. Sharoyko^{a,b,c}, and K. N. Semenov^{a,b,c}

^a I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia

^b St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^c A. M. Granov Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, 197758 Russia

^d St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, 190013 Russia

*e-mail: olga19940519@mail.ru

Received June 30, 2022; revised July 20, 2022; accepted July 21, 2022

New tetrazole-containing derivatives of 2,4-diamino-1,3,5-triazine were synthesized. The cytotoxic activity of the obtained compounds against Huh-7 and HeLa tumor cell lines was studied by the MTT test. The most significant antitumor activity was shown by 1,3,5-triazines containing a 5-phenyltetrazol-2-ylacetohydrazide fragment. The resulting compounds showed practically no cytotoxic effect on non-tumor cells of the human embryonic kidney line HEK293.

Keywords: 1,3,5-triazines, tetrazoles, MTT test, cytotoxic activity