

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ ТЕТРАЗОЛСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ МОРФОЛИН-4-ИЛ-1,3,5-ТРИАЗИНА И 4-МЕТИЛПИПЕРИДИН-1-ИЛ-1,3,5-ТРИАЗИНА

© 2023 г. О. В. Миколайчук^{1,2,*}, А. В. Протас^{1,2}, Е. А. Попова^{1,2}, М. Д. Лутцев¹,
Е. Ю. Смирнов^{3,4}, В. А. Голотин^{1,3}, В. А. Островский⁵, И. В. Корняков⁶,
К. Н. Семенов^{1,2,5,6}, В. В. Шаройко^{1,2,6}, О. Е. Молчанов², Д. Н. Майстренко²

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова,
ул. Л. Толстого 6–8, Санкт-Петербург, 197022 Россия

² Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, 197758 Россия

³ Государственный научно-исследовательский институт озерного и речного рыбного хозяйства,
Санкт-Петербург, 199004 Россия

⁴ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия

⁵ Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет),
Санкт-Петербург, 190013 Россия

⁶ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия
*e-mail: olgamedchem@gmail.com

Поступило в редакцию 8 марта 2023 г.

После доработки 4 апреля 2023 г.

Принято к печати 12 апреля 2023 г.

Синтезированы новые тетразолсодержащие производные морфолин-4-ил-1,3,5-триазины и 4-метилпиперидин-1-ил-1,3,5-триазины. Методом МТТ-теста исследована цитотоксическая активность полученных соединений в отношении опухолевых клеточных линий печени человека Huh-7 и легкого человека A549. Показано, что данные вещества не проявляют выраженного цитотоксического действия. Наиболее значительную противоопухолевую активность проявил 1,3,5-триазин, содержащий в качестве заместителей 5-фенилтетразол-2-илацетогидразидный фрагмент и 4-метилпиперидиновый цикл, а также 1,3,5-триазин, содержащий 5-метил-1*H*-тетразол-1-илацетогидразидный фрагмент и два морфолиновых цикла. Для данных соединений методом УФ спектроскопии было изучено взаимодействие с ДНК. Для N'-(4,6-диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-метил-1*H*-тетразол-1-ил)ацетогидразида определена константа связывания с ДНК ($K_{\text{bin}} 9.02 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) и изучена способность ингибировать тирозинкиназный домен поверхностных рецепторов. Показано, что исследованные тетразолсодержащие производные 1,3,5-триазины не проявляют антиоксидантных свойств в отношении NO-радикалов и не вызывают фотоиндуцированный гемолиз.

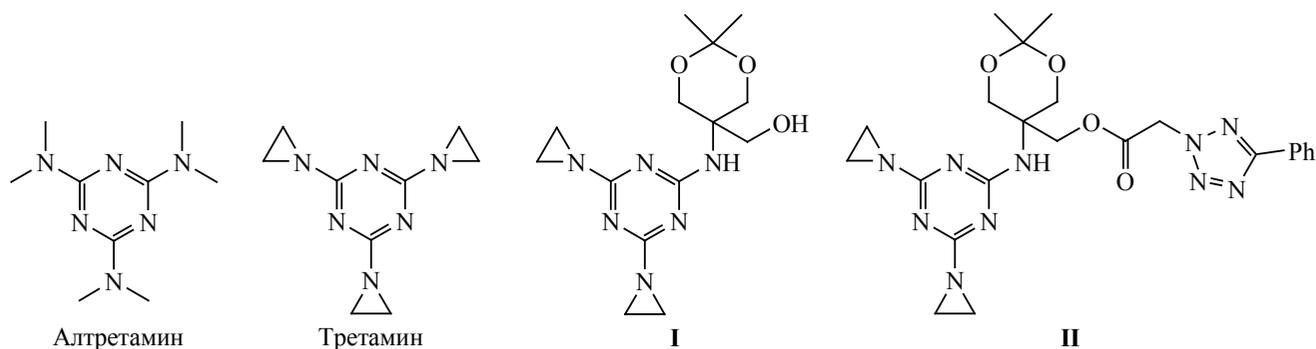
Ключевые слова: 1,3,5-триазин, 5-арилтетразолы, 5-метил-1*H*-тетразол-1-илацетогидразид, 5-фенил-2*H*-тетразол-2-илацетогидразид, цитотоксическая активность, ингибирующая активность

DOI: 10.31857/S0044460X23050050, **EDN:** DBSPYI

Производные 1,3,5-триазины проявляют различные виды биологической активности (противоопухолевую, антибактериальную, противовирусную, противовоспалительную, фунгицидную

и др.) и широко используются в современной медицинской химии при разработке разнообразных активных фармацевтических субстанций [1]. Так, одним из перспективных направлений при-

Схема 1.



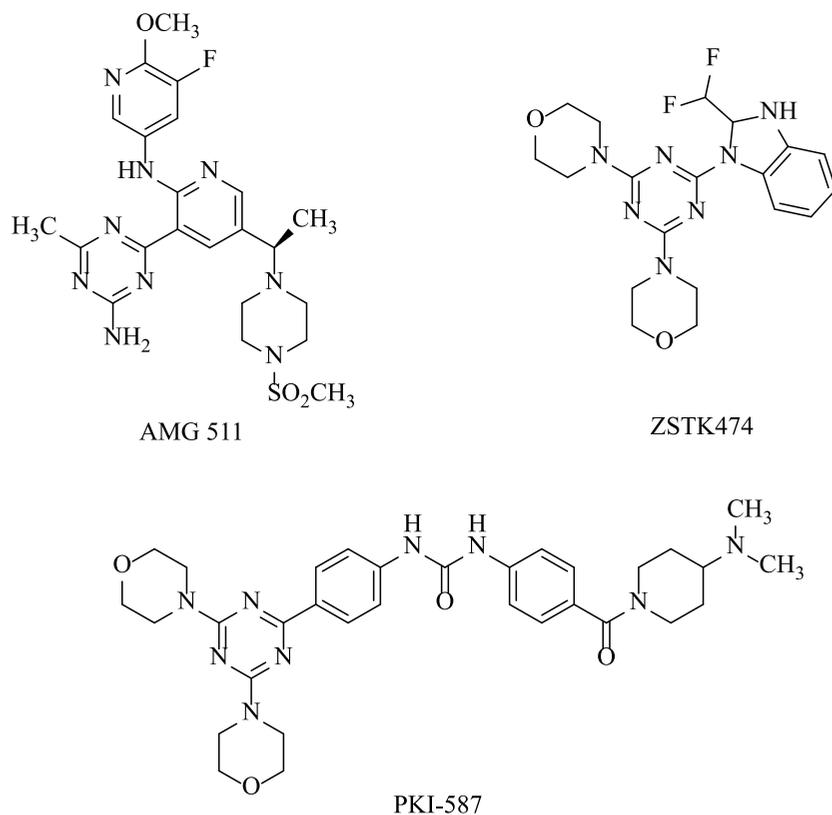
менения 1,3,5-триазинов является получение высокоэффективных цитостатиков [1, 2]. Цитотоксическая активность 1,3,5-триазинов может быть обусловлена их действием на различные биологические мишени опухолевых клеток [3]. Например, такие производные 1,3,5-триазина, как алтретамин ($N^2, N^2, N^4, N^4, N^6, N^6$ -гексаметил-1,3,5-триазин-2,4,6-триамин), третамин (2,4,6-триэтиленимино-1,3,5-триазин), (5-{[4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]-амино}-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метанол **I**, являются алкилирующими агентами [4] (схема 1). Метаболиты данных веществ образуют ковалентные связи с молекулами ДНК в том числе опухолевых клеток, препятствуя репликации ДНК [5].

Стоит отметить, что в ряде случаев оказывается эффективным получение гибридных молекул, содержащих в своей структуре два и более гетероциклических фрагмента. Более того, известен факт, когда замена азидной группы на тетразольный цикл приводит к существенному снижению токсичности без потери биологической активности [6]. Однако в ряде случаев ключевым моментом при разработке фармацевтических агентов является тот факт, что введение тетразольного кольца в субстраты делает продукты более устойчивыми к действию разрушающих ферментов. Это позволяет впоследствии существенно снизить дозировку препарата и, следовательно, уменьшить токсическое воздействие на организм. Стоит отметить, что в ряде случаев оказывается эффективным получение гибридных молекул, содержащих в своей структуре два и более гетероциклических

фрагмента. Так, общепризнанным фармакофорным фрагментом является тетразольный цикл, который рассматривают как биоизостерический, метаболически стабильный аналог *цис*-амидной или карбоксильной групп [6–9]. Тетразолы являются важными фармакофорами и проявляют различные виды биологической активности [6–8]. Стоит отметить, что к настоящему времени не описаны случаи того, что введение тетразольного цикла в структуру биологически активного вещества или замена в молекуле субстрата, например, амидной или карбоксильной группы, тетразолильным фрагментом, приводит к увеличению токсичности. Более того, известен факт, когда замена азидной группы на тетразольный цикл приводит к существенному снижению токсичности без потери биологической активности [10]. Однако ключевым моментом в ряде случаев при разработке фармацевтических агентов является тот факт, что введение тетразольного кольца в субстраты делает продукты устойчивыми к действию разрушающих ферментов. Это позволяет существенно снизить дозировку препарата и, следовательно, уменьшить токсическое воздействие на организм [6].

Ранее нами было показано, что введение 5-фенилтетразол-2-илацетильного фрагмента в структуру цитостатика (5-{[4,6-бис(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]амино}-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метанола **1** привело к увеличению противоопухолевой активности полученного [(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-2*H*-тетразол-2-ил)]ацетата **2** (схема 1) в от-

Схема 2.



ношении опухолевой клеточной линии SK-HEP-1 [4].

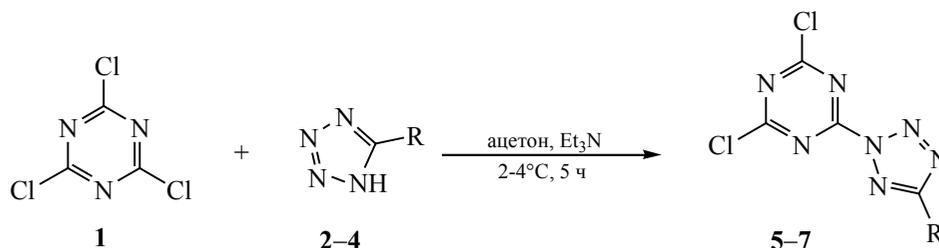
Также в настоящее время активно развивается направление, связанное с синтезом производных 1,3,5-триазина, которые являются ингибиторами киназ. Показано, что цитостатические агенты на основе 1,3,5-триазинов могут воздействовать на опухолевые клетки за счет связывания со специфическими сайтами киназ, таких как PI3K, EGFR, ROCK и др. [2, 11]. Высокую ингибирующую активность показали производные 1,3,5-триазина, содержащие в качестве заместителей пиперидиновые и морфолиновые фрагменты [12]. Так, AMG 511, ZSTK 474 (схема 2) ингибиторы PI3K пан-класса I дошли до стадии клинических испытаний [13]. 1,3,5-Триазин AMG 511 продемонстрировал значительную противоопухолевую активность *in vivo*, обусловленную блокированием пути PI3K (EC_{50} 228 нг/мл на модели печени мыши) [11, 14].

1,3,5-Триазин ZSTK 474 является АТФ-конкурентным ингибитором киназ и ингибирует p110 α ,

p110 β , p110 γ и p110 δ с IC_{50} 16, 44, 5 и 49 нМ. соответственно. Также 1,3,5-триазин ZSTK 474 при пероральном введении показал высокую противоопухолевую активность за счет подавления фосфорилирования Akt без токсических эффектов на моделях мешей с ксенографтами опухолей человека [11]. Бисморфолино-1,3,5-триазин PKI-587 ингибирует рап-PI3K/mTOR (схема 2). Показано, что в данных соединениях морфолиновый фрагмент играет важную роль. Атомы кислорода морфолиновых циклов участвуют в образовании водородных связей в ключевой шарнирной области АТФ-связывающего кармана обоих ферментов, как фосфоинозитид-3-киназы PI3K пан-класса I, так и mTOR [15].

В данной работе синтезированы и охарактеризованы производные морфолин-4-ил-1,3,5-триазина и 4-метилпиперидин-1-ил-1,3,5-триазина, содержащие в 1,3,5-триазиновом цикле в качестве заместителей 5-арилтетразолильный, 5-метил-1*H*-тетразол-1-илацетогидразидный и 5-фенил-2*H*-тетразол-2-илацетогидразидный

Схема 3.



R = Ph [2, 5 (84%)], 2-OH-C₆H₄ [3, 6 (68%)], 3-NO₂-4-OH-C₆H₃ [4, 7 (55%)].

фрагменты. Методом МТТ-теста исследована цитотоксическая активность полученных соединений в отношении опухолевых клеточных линий Nuh-7 и A549. Для соединений, показавших наибольшее цитотоксическое действие, методом УФ спектроскопии изучено взаимодействие с ДНК. Для N'-(4,6-диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-метил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидразида изучена способность ингибировать тирозинкиназный домен поверхностных трансмембранных рецепторов клеток линии Nuh-7 – EGFR и Her-2. Кроме того, для некоторых тетразолсодержащих производных 1,3,5-триазинов проведено исследование антиоксидантных свойств.

Синтез тетразолсодержащих производных морфолин-4-ил-1,3,5-триазина и 4-метилпиперидин-1-ил-1,3,5-триазина. Для синтеза замещенных 1,3,5-триазинов в качестве исходного реагента использовали доступный цианурхлорид **1**. Варьируя температурный режим реакции, проводили последовательное нуклеофильное замещение атомов хлора цианурхлорида **1** на тетразолильные, морфолиновые и 4-метилпиперидиновые фрагменты. Так, взаимодействием цианурхлорида **1** с 5-арилтетразолами **2–4** были получены производные 1,3,5-триазина **5–7**, содержащие в цикле 5-арилтетразолильные заместители (схема 3). Данные реакции проводили в ацетоне в присутствии триэтиламина в соответствии с методикой, описанной нами ранее для синтеза соединения **5**, увеличив реакционное время с 3 до 5 ч [16].

Реакцией цианурхлорида **1** с гидразидом 5-метилтетразол-1-илукусусной кислоты **8** и гидрази-

дом 5-фенилтетразол-2-илукусусной кислоты **10** в диоксане в присутствии K₂CO₃ были получены соединения **9** и **11** соответственно, в которых тетразольный цикл связан с 1,3,5-триазином через линкерную ацетогидразидную группу (схема 4).

Взаимодействием цианурхлорида **1** с 4-(трифторметил)анилином было получено соединение **12**, которое затем было введено в реакции с гидразидом 5-метилтетразол-1-илукусусной кислоты **8** и гидразидом 5-фенилтетразол-2-илукусусной кислоты **10** для синтеза дизамещенных 1,3,5-триазинов **13** и **14** соответственно (схема 5).

Полученные соединения **5–7**, **9**, **11**, **13**, **14** далее были использованы для синтеза производных морфолин-4-ил-1,3,5-триазинов и 4-метилпиперидин-1-ил-1,3,5-триазинов (схемы 6, 7). Так, синтез соединений **15–20**, **22**, **23** проводили в ацетоне с добавлением водного раствора NaOH (10 мас%), вводя в реакцию морфолин или 4-метилпиперидин соответственно, и выдерживали реакционную смесь сначала при комнатной температуре в течение 20 ч (в случае соединений **22**, **23** в течение 14 ч), а затем в течение 4 ч при 50°C (табл. 1). При получении 1,3,5-триазина **21** в качестве растворителя использовали диоксан.

Полученные соединения были охарактеризованы методами спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C{H}, масс-спектрометрии и элементного C,H,N-анализа. Структура соединений **9** и **12** также была подтверждена данными РСА. В спектрах ЯМР ¹³C{H} замещенных 1,3,5-триазинов **5–7**, **9**, **11–23** в зависимости от типа заместителей наблюдаются сигналы атомов углерода триазинового цикла при

Схема 4.

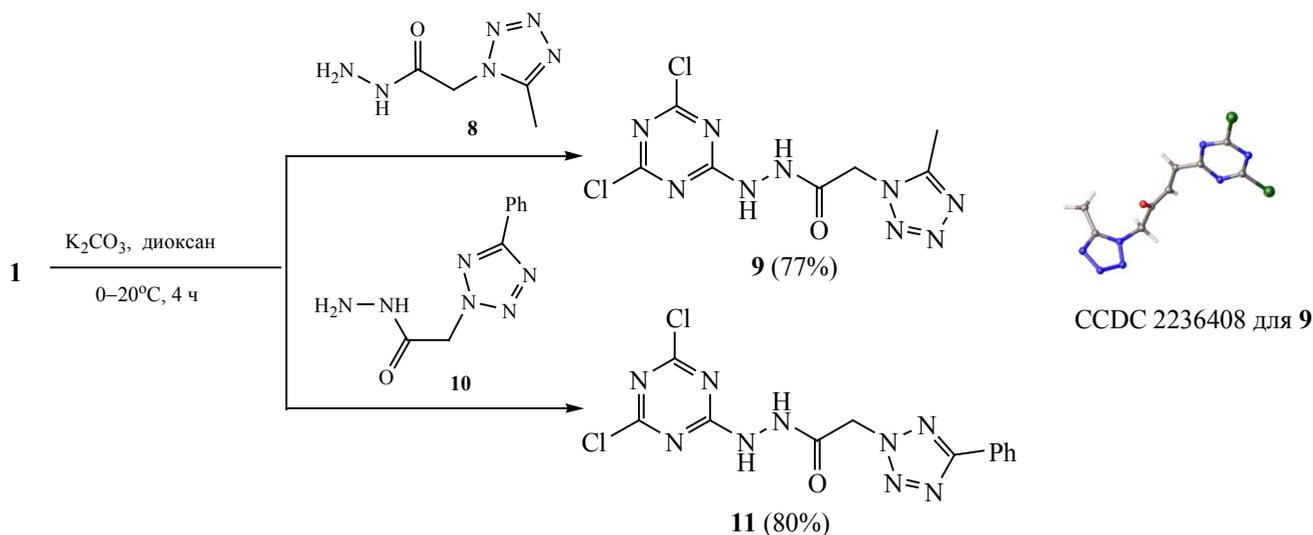
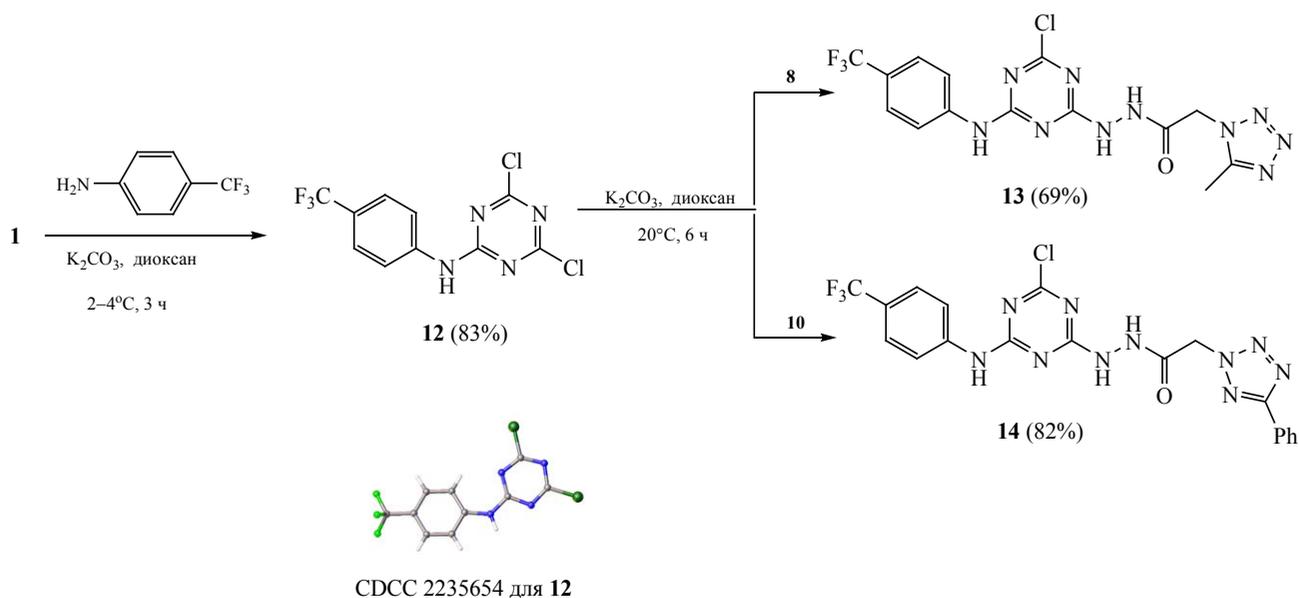


Схема 5.



153.1–172.1 м. д. Для 1,5-дизамещенного тетразольного цикла в соединениях **9**, **13**, **19** и **22** проявляются сигналы атомов углерода при 153.9, 154.7, 153.7 и 154.3 м. д. соответственно, а для 2,5-дизамещенного цикла в соединениях **5-7**, **11**, **14**, **15-18**, **20**, **21**, **23** – при 164.0–165.0 м. д. В спектрах ЯМР ^1H соединений **15**, **18-20**, **22** и **23** протоны метиленовых групп морфолиновых циклов прояв-

ляются при 3.46–3.59 и 3.61–3.78 м. д., 4-метилпиперидиновых циклов – при 1.51–1.72 и 2.59–2.91 м. д. В спектрах ЯМР $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ производных морфолин-4-ил-1,3,5-триамина **15**, **18-20**, **22** и **23** наблюдаются соответствующие сигналы эндоциклических атомов углерода морфолиновых циклов при 43.7–48.7 м. д. и 66.4–68.7 м. д., а в производных 4-метилпиперидин-1-ил-1,3,5-триамина **16**, **17**, **21** –

Таблица 1. Выходы соединений 15–21

№	R ¹	R ²	R ³	Выход, %
15			Cl	75
16				75
17			Cl	68
18			Cl	58
19				79
20				72
21				54

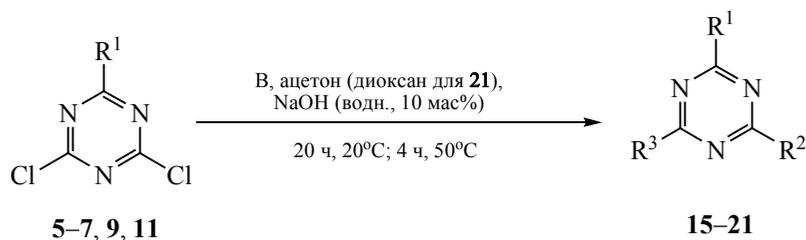
4-метилпиперидиновых циклов при 30.8–31.2, 33.9–34.1 и 54.1–56.3 м. д.

Влияние тетразолсодержащих производных морфолин-4-ил-1,3,5-триазина и 4-метилпиперидин-1-ил-1,3,5-триазина на выживаемость опухолевых клеточных линий Huh-7 и A549. В данной работе методом МТТ-теста исследована цитотоксическая активность соединений 15–23 в отношении опухолевых клеточных линий печени человека Huh-7 и легкого человека A549. Проведенные исследования показали, что соединения 15–23 *in vitro* не проявляют выраженного цитотоксического действия в отношении исследуемых клеточных линий. Наиболее значительную цитотоксическую активность проявил 1,3,5-триазин 19, содержащий в качестве заместителей 5-метил-

тетразол-1-илацетогидразидный фрагмент и морфолиновые циклы, а также соединение 21, содержащее 5-фенилтетразол-2-илацетогидразидный фрагмент и 4-метилпиперидиновые циклы. При инкубации клеточных линий Huh-7 и A549 в течение 48 ч с соединениями 19 и 21 (с 100.0 мкМ.) выживаемость клеток составляла (49±6)% и (51±8)% для соединения 19 и (46±7)% и (48±7)% для соединения 21 соответственно.

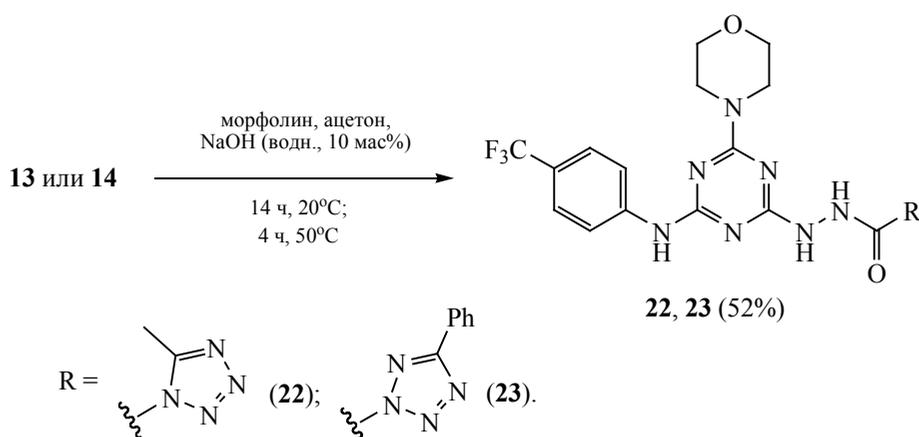
Исследование взаимодействия тетразолсодержащих производных 1,3,5-триазина 9, 19 и 21 с ДНК методом УФ спектроскопии. Как отмечено выше, один из возможных механизмов цитотоксического действия производных 1,3,5-триазина основан на взаимодействии данных соединений или их метаболитов с молеку-

Схема 6.



B = морфолин (**15, 18–20**) или 4-метилпиперидин (**16, 17, 21**).

Схема 7.



лами ДНК опухолевых клеток, которое приводит к повреждению и нарушению репликации ДНК [1, 2]. В данной работе методом УФ спектроскопии исследовано взаимодействие тетразолсодержащих производных 1,3,5-триазина **9**, **19** и **21** с ДНК. Наличие в молекуле ДНК хромофорных групп азотистых гетероциклических оснований обуславливает присутствие в УФ спектрах водных растворов ДНК в диапазоне от 200 до 350 нм широкой полосы поглощения с максимумом поглощения при 260 нм. Как правило, взаимодействие биологически активного вещества с биополимером в водных растворах 0.9% NaCl при pH 7.4 приводит к характеристичным изменениям в электронных спектрах поглощения ДНК [17]. Характер данных спектральных изменений обусловлен типом взаимодействия вещества с ДНК. Так, бороздочное связывание может приводить к гиперхромному эффекту, а интеркаляция, наоборот, может сопро-

вождаться уменьшением оптической плотности раствора с бато- или гипсохромным сдвигом полосы спектра поглощения [17–19].

На рис. 1 представлены рассчитанные спектры поглощения ДНК в 0.9%-ных водных растворах NaCl при постоянной концентрации ДНК (5.7 мкМ.) и различных концентрациях соединений **9** (рис. 1а), **19** (рис. 1б) и **21** (рис. 1в). Установлено, что при увеличении концентрации 1,3,5-триазинов **9**, **19** и **21** в УФ спектрах наблюдается гиперхромный эффект. При этом в случае добавления к раствору ДНК дихлорзамещенного 1,3,5-триазина **9**, содержащего 5-метилтетразол-1-илацетогидразидный фрагмент, также наблюдается появление максимума поглощения при 343 нм. Таким образом, принимая во внимание незначительные изменения спектральных характеристик растворов ДНК, тем не менее нельзя исключать возможность взаимодействия 1,3,5-триазинов **9**, **19** и **21** с биопо-

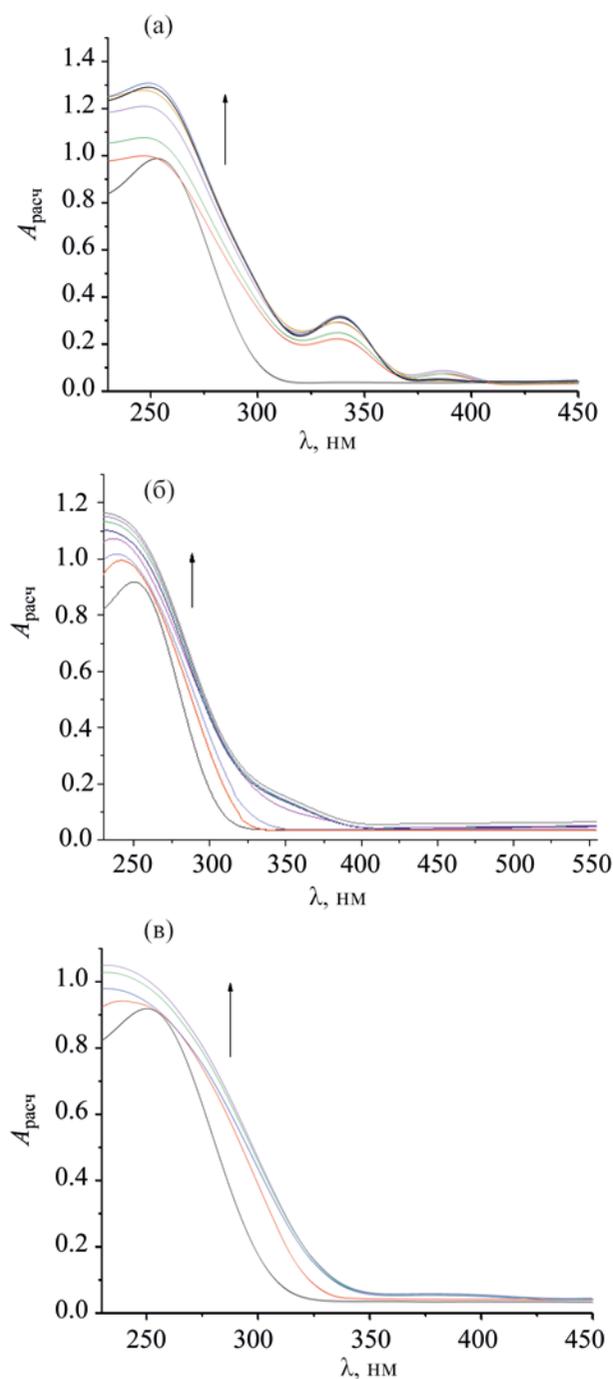


Рис. 1. Рассчитанные спектры поглощения ДНК (c 5.7 мкМ.) в присутствии соединений **9** (а), **19** (б) и **21** (в) при различных концентрациях (c 0, 0.57–14.25 мкМ.). $A_{\text{расч}} = A_{\text{набл}} - A_{\text{соед}}$, где $A_{\text{набл}}$ – наблюдаемое значение оптической плотности раствора ДНК в присутствии 1,3,5-триазина **9**, **19** или **21**; $A_{\text{соед}}$ – значение оптической плотности раствора соединения **9**, **19** или **21**, определенное из зависимости Бугера–Ламберта–Бера.

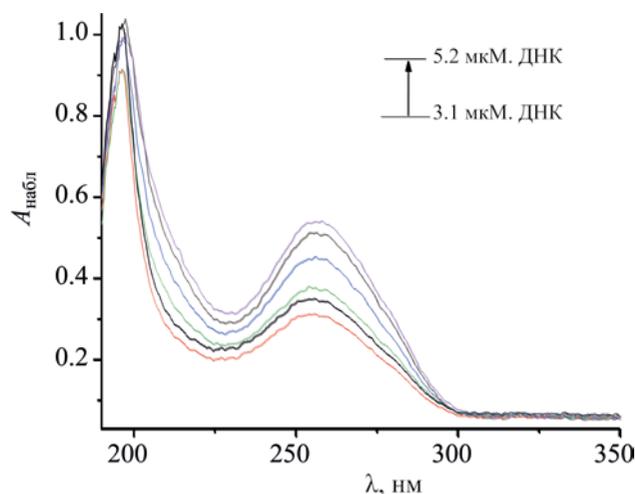


Рис. 2. Спектр поглощения соединения **19** (2.3 мкМ.) при различных концентрациях ДНК (c 3.1–5.2 мкМ.).

лимером с образованием ассоциатов.

Также были получены УФ спектры ДНК при различных концентрациях (3.1, 3.3, 3.8, 4.7, 5.0, 5.2 мкМ.) в присутствии соединения **19** (2.3 мкМ.) в 0.9%-ном растворе NaCl, pH 7.4 (рис. 2).

Используя полученные данные, для 1,3,5-триазина **19** с ДНК была построена зависимость Вольфа–Шиммера и рассчитаны величины K_{bin} с использованием уравнения Вольфа–Шиммера (1) [20].

$$\frac{\text{ДНК}}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{\text{ДНК}}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_{\text{bin}}(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}, \quad (1)$$

где K_{bin} – константа связывания; $[\text{ДНК}]$ – равновесная концентрация ДНК, ε_a , ε_f и ε_b – коэффициенты молярной экстинкции ($A_{\text{набл}}/[\text{M}]$), коэффициент молярной экстинкции несвязанного соединения **19** и коэффициент молярной экстинкции соединения **19**, полностью связанного с ДНК соответственно.

Зависимость $[\text{ДНК}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ от $[\text{ДНК}]$ является линейной ($y = -0.3961x + 7.855$, R^2 0.946). Полученное значение K_{bin} $9.02 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ подтверждает возможное взаимодействие 1,3,5-триазина **19** с ДНК. Принято считать, что при сильном взаимодействии вещества с ДНК константа связывания K_{bin} находится в диапазоне 10^5 – 10^8 M^{-1} [21]. Низкое значение полученной константы связывания

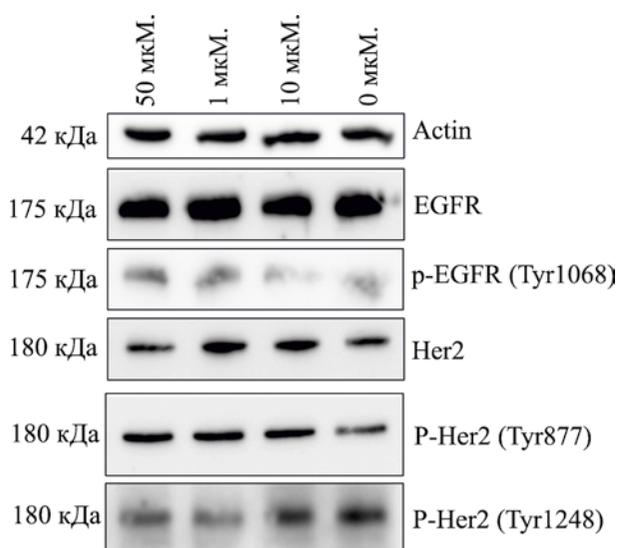


Рис. 3. Результаты иммуноблоттинга лизатов клеток линии Nuh-7 после инкубации клеток в течение 6 ч с соединением **19** (*c* 1–50 мкМ.).

может свидетельствовать о возможности нековалентного бороздочного связывания, как было показано в работе [21] для пиразолсодержащих 1,3,5-триазинов.

Исследование ингибирующего действия 1,3,5-триазина **19 в отношении тирозинкиназного домена поверхностных рецепторов.** На модельном соединении **19** была изучена способность оказывать ингибирующее действие в отношении фосфорилирования тирозинкиназного домена трансмембранных рецепторов клеток Nuh-7 – EGFR и Her-2. Результаты иммуноблоттинга с использованием специфических антител против pEGFR (Tyr-1068) и pHer-2 (Tyr-877 и Tyr-1248) показали отсутствие выраженного ингибирования фосфорилирования тирозинкиназного домена в присутствии соединения **19** в концентрациях 1 и 10 мкМ. (рис. 3).

Антиоксидантная активность. Изучение взаимодействия тетразолсодержащими производными 1,3,5-триазина **5, **9**, **16** и **19** с NO-радикалами.** На модельных соединениях **5**, **9**, **16** и **19** было проведено исследование связывания тетразолсодержащими производными 1,3,5-триазина NO-радикалов в сравнении с азидом натрия. Полученные данные свидетельствуют о том, что тетразол-

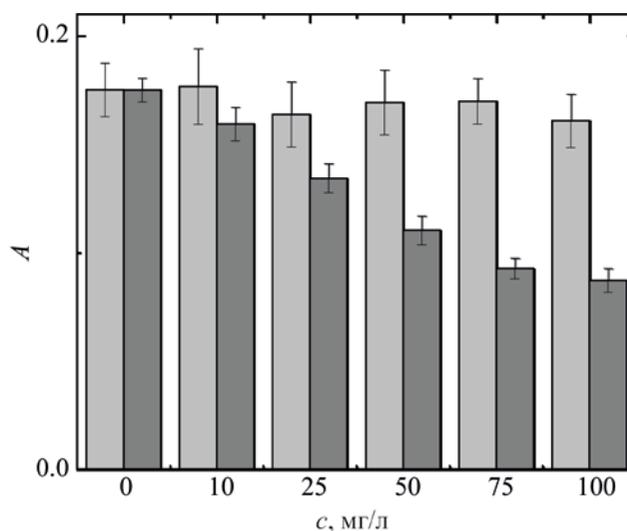


Рис. 4. Влияние соединения **9** на захват NO-радикалов (светло-серый) и азиды натрия (темно-серый).

олсодержащие дихлорзамещенные 1,3,5-триазины **5** и **9** не поглощают NO-радикалы и не обладают антирадикальной активностью в отношении NO-радикалов (рис. 4). Введение в *s*-триазиновый цикл двух 4-метилпиперидиновых (соединение **16**) и морфолиновых заместителей (соединение **19**) не оказало влияния на связывание NO-радикалов. Полученные данные для соединений **9**, **16** и **19** аналогичны данным, представленным на рис. 4.

Влияние тетразолсодержащих производных 1,3,5-триазина **19 и **21** на фотоиндуцированный гемолиз эритроцитов человека.** В связи с тем, что биологически активные вещества могут вызывать гемолиз, который зачастую приводит к анемии, гипертонии и почечной токсичности у пациентов, определение гемосовместимости входит в число основных тестов при определении биосовместимости потенциальных лекарственных средств.

На рис. 5 представлена концентрационная зависимость степени фотоиндуцированного гемолиза от концентрации вещества **21**. Аналогичный характер зависимости также наблюдался для соединения **19**. Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что тетразолсодержащие производные 1,3,5-триазина, содержащие в качестве заместителей морфолино-

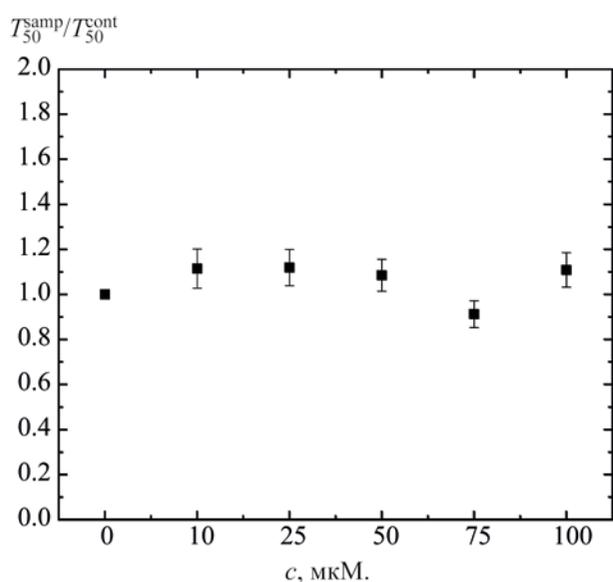


Рис. 5. Концентрационная зависимость степени фотоиндуцированного гемолиза в присутствии вещества **21**. c – молярная концентрация соединения **21**, T_{50}^{smp} – время фотоиндуцированного гемолиза 50% эритроцитов в присутствии соединения **21**, $T_{50}^{control}$ – время фотоиндуцированного гемолиза 50% эритроцитов в присутствии физиологического раствора.

вые циклы **19** и 4-метилпиперидиновые циклы **21**, не проявляют антиоксидантной активности и не оказывают влияния на фотоиндуцированный гемолиз.

Таким образом, синтезированы и охарактеризованы новые тетразолсодержащие производные морфолин-4-ил-1,3,5-триазина и 4-метилпиперазин-1-ил-1,3,5-триазина. Наиболее заметный цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеточных линий Huh-7 и A549 проявили 1,3,5-триазин **19**, содержащий в качестве заместителей 5-метилтетразол-1-илацетогидразидный фрагмент и морфолиновые циклы, а также соединение **21**, содержащее 5-фенилтетразол-2-илацетогидразидный фрагмент и 4-метилпиперидиновые циклы. Показано, что данные соединения вызывают изменения спектральных характеристик растворов ДНК, что может свидетельствовать о взаимодействии их с биополимером. При этом значение константы связывания с ДНК (K_{bin} 9.02×10^4 M^{-1}) для N'-(4,6-диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-метил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидрази-

да может указывать на нековалентный тип данного взаимодействия по типу бороздочного связывания. На примере модельных соединений – тетразолсодержащих производных 1,3,5-триазина – показано, что данные вещества не проявляют антиоксидантных свойств, не вызывают фотоиндуцированный гемолиз и оказывают незначительное ингибирующее действие в отношении тирозинкиназного домена трансмембранных рецепторов клеток Huh-7 – EGFR и Her-2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР 1H и $^{13}C\{^1H\}$ зарегистрированы на приборе Bruker Avance III 400 (400.13 и 100.61 МГц соответственно) в $CDCl_3$ и $DMCO-d_6$ при 25°C. Масс-спектральный анализ выполнен на приборе Bruker Daltonik GmbH MaXis (Германия). УФ спектры зарегистрированы в диапазоне 200–400 нм на спектрофотометре Beckman Coulter DU 800 с использованием кварцевых кювет (l 1 см).

Общая методика синтеза соединений 5–7. К раствору цианурхлорида (3.3 ммоль) в 40 мл ацетона добавляли раствор соответствующего 5-арилтетразола (3.6 ммоль) в 20 мл ацетона и триэтиламин (4.1 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 ч при 2–4°C. По окончании времени выдержки выпавшие в осадок продукты соединений **5** и **6** отфильтровывали, промывали водой и сушили в токе воздуха. При получении соединения **7** реакционную смесь по окончании времени выдержки упаривали при пониженном давлении. Продукт **7** очищали методом колоночной хроматографии (хлороформ–метанол, 9.5:0.5).

2,4-Дихлор-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-1,3,5-триазин (5). Выход 0.82 (84%). Описание и спектральные характеристики соединения **5** совпадают с опубликованными в работе [16].

2-[2-(4,6-Дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2H-тетразол-5-ил]фенол (6). Выход 0.7 г (68%), белые кристаллы, т. пл. 181–183°C. Спектр ЯМР 1H ($DMCO-d_6$), δ , м. д.: 7.97 д. д (1H, CH_{Ph} , J 7.8, 1.6 Гц), 7.42–7.37 м (1H, CH_{Ph}), 7.13–6.99 м (1H, CH_{Ph}). Спектр ЯМР ^{13}C ($DMCO-d_6$), δ_C , м. д.: 168.1 ($C_{триазин}$), 164.3 (C_{N_4}), 148.1 (C_{Ph}), 131.0 (CH_{Ph}), 129.9 (CH_{Ph}), 120.4 (C_{Ph}), 118.3 (CH_{Ph}). Найдено, %: С 38.48; Н 1.89; N 31.39. $C_{10}H_5Cl_2N_7O$. Вычислено, %: С 38.73; Н 1.63; N 31.62.

4-[2-(4,6-Дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2H-тетразол-5-ил]-2-нитрофенол (7). Выход 0.64 г (55%), желтые кристаллы, т. пл. 193–195°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 8.03 с (1H, CH_{Ph}), 7.83 д (1H, CH_{Ph} , J 7.7 Гц), 7.38 д (1H, CH_{Ph} , J 7.1 Гц). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 169.9 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 169.4 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 164.3 (CN_4), 154.0 (C_{Ph}), 138.2 (CH_{Ph}), 134.5 (C_{Ph}), 126.5 (C_{Ph}), 118.0 (CH_{Ph}), 113.6 (CH_{Ph}). Найдено, %: С 33.66; Н 1.19; N 31.47. $\text{C}_{10}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_3$. Вычислено, %: С 33.82; Н 1.14; N 31.56.

Синтез соединений **9**, **11** осуществлен в соответствии с методикой, описанной в работе [16].

N'-(4,6-Дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-метил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидразид (9). Выход 1.41 г (77%), белые кристаллы, т. пл. 218–220°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 5.29 с (2H, CH_2), 2.49 с (3H, CH_3). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 164.8 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 164.6 ($\text{C}=\text{O}$), 161.4 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 153.9 (CN_4), 59.7 (CH_2), 8.9 (CH_3). Масс-спектр, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 306.0195 [$M + \text{H}$] $^+$. Структура моноклинная, $P2_1$ (по. 4), a 4.6421(3) Å, b 12.0534(7) Å, c 21.3634(15) Å, β 93.039(6)°, V 1193.67(13) Å 3 , Z 2, T 100.15 К, $\mu(\text{CuK}\alpha)$ 4.888 мм $^{-1}$, $d_{\text{выч}}$ 1.653 г/см 3 , 9900 отражений (4.142° \leq 2θ \leq 139.976°), из них уникальных 4421 (R_{int} 0.0687, R_{sigma} 0.0887). R_1 0.0749 [$I > 2\sigma(I)$], wR_2 0.2111. CCDC 2236408.

N'-(4,6-Дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетогидразид (11). Выход 1.75 г (80%). Спектральные характеристики соединения **11** совпадают с описанными ранее [16].

4,6-Дихлор-N-[4-(трифторметил)фенил]-1,3,5-триазин-2-амин (12). К раствору цианурхлорида (0.92 г, 4.97 ммоль) в 30 мл диоксана при 2–4°C при перемешивании прибавляли раствор 0.8 г (4.97 ммоль) 4-(трифторметил)анилина в 30 мл диоксана и 0.6 г K_2CO_3 . Реакционную смесь выдерживали при 2–4°C в течение 3 ч. По окончании времени выдержки отфильтровывали осадок и упаривали раствор при пониженном давлении. Проводили экстракцию в системе хлороформ–вода. Органический слой сушили безводным CaCl_2 и упаривали при пониженном давлении. Выход 1.28 г (83%), белые кристаллы, т. пл. 195–197°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.:

8.82 с (1H, NH), 7.77–7.65 м (2H, CH_{Ph}), 7.65–7.62 м (2H, CH_{Ph}). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 154.6 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 153.1 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 141.6 (C_{Ph}), 128.8 (C_{Ph}), 128.6 (CH_{Ph}), 126.6 (CH_{Ph}), 124.2 (CF_3), 120.9 (CH_{Ph}). Найдено, %: С 37.98; Н 1.69; N 18.14. $\text{C}_{10}\text{H}_5\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_4$. Вычислено, %: С 38.86; Н 1.63; N 18.13. Структура моноклинная, $P2_1/n$ (по. 14), a 7.1447(2) Å, b 8.1567(2) Å, c 19.6791(6) Å, β 96.337(3)°, V 1139.83(6) Å 3 , Z 4, T 100(2) К, $\mu(\text{CuK}\alpha)$ 5.463 мм $^{-1}$, $d_{\text{выч}}$ 1.801 г/см 3 , 7347 отражений (9.042° \leq 2θ \leq 149.98°) из них уникальных 2307 (R_{int} 0.0327, R_{sigma} 0.0345). R_1 0.0346 [$I > 2\sigma(I)$], wR_2 0.0917. CCDC 2235654.

Общая методика синтеза соединений **13**, **14**.

К раствору 4,6-дихлор-N-(4-(трифторметил)фенил)-1,3,5-триазин-2-амин **12** (0.6 г, 1.94 ммоль) в 50 мл диоксана при перемешивании прибавляли раствор 2.04 ммоль 2-(5-метил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидразида **9** или N'-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетогидразида **11** в 40 мл диоксана и 0.3 г (2.17 ммоль) K_2CO_3 . Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 6 ч. По окончании времени выдержки реакционную смесь фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Очистку продукта проводили методом колоночной хроматографии (хлороформ–метанол, 9.5:0.5).

N'-(4-Хлор-6-{4-(трифторметил)фенил}амино}-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-метил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидразид (13). Выход 0.57 г (69%), белые кристаллы, т. пл. 216–218°C (разл.). Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 7.84–7.80 м (2H, CH_{Ph}), 7.74–7.71 м (2H, CH_{Ph}), 5.40 с (2H, CH_2), 2.41 с (3H, CH_3). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 168.9 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 164.8 ($\text{C}=\text{O}$), 164.5 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 154.7 (CN_4), 131.2 (C_{Ph}), 129.8 (CH_{Ph}), 126.9 (CF_3), 120.6 (CH_{Ph}), 54.3 (CH_2), 10.5 (CH_3). Найдено, %: С 40.51; Н 2.92; N 31.08. $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClF}_3\text{N}_{10}\text{O}$. Вычислено, %: С 39.22; Н 2.82; N 32.67.

N'-(4-Хлор-6-{4-(трифторметил)фенил}амино}-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетогидразид (14). Выход 0.78 г (82%), белые кристаллы, т. пл. 220–222°C. Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ , м. д.: 10.76 с (1H, NH), 10.25 с (1H, NH), 8.00 с (4H, CH_{Ph}), 7.85 д (1H, CH_{Ph} , J 7.4 Гц), 7.67 д (1H, CH_{Ph} , J 8.4 Гц), 7.55 д (4H, CH_{Ph} , J 17.7 Гц), 5.75 с (2H, CH_2). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6), δ_{C} , м. д.: 168.9 ($\text{C}_{\text{триазин}}$), 164.8 ($\text{C}=\text{O}$), 164.6

(CN₄), 164.5 (C_{триазин}), 142.8 (CH_{Ph}), 131.2 (CH_{Ph}), 129.8 (CH_{Ph}), 129.67 (CH_{Ph}), 127.2 (CH_{Ph}), 126.8 (CH_{Ph}), 126.7 (CH_{Ph}), 120.6 (CH_{Ph}), 53.9 (CH₂). Найдено, %: С 46.49; Н 2.88; N 28.54. C₁₉H₁₄ClF₃N₁₀O. Вычислено, %: С 49.01; Н 2.92; N 27.11.

Общая методика синтеза соединений 15–21.

К раствору соединения 5 (6, 7, 9 или 11) (1.2 ммоль) в 50 мл ацетона (диоксана при получении 21) добавляли 2.5 ммоль морфолина или 4-метилпиперидина в 5 мл 10%-ного водного раствора NaOH. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 20 ч, затем при 50°C в течение 4 ч. По окончании времени выдержки реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Очистку продукта проводили методом колоночной хроматографии (хлороформ–метанол, 9:1, для соединений 15, 16; хлороформ–метанол, 9.5:0.5 для соединений 17, 20, 21).

4-[4-Хлор-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]морфолин (15). Выход 0.39 г (75%), белые кристаллы, т. пл. 227–229°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 8.05 д. д (2H, CH_{Ph}, *J* 7.5, 1.9 Гц), 7.57 д. д (3H, CH_{Ph}, *J* 5.7, 4.8 Гц), 3.62 д (4H, CH₂, *J* 4.4 Гц), 3.57 д (4H, CH₂, *J* 4.1 Гц). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 165.8 (C_{триазин}), 165.0 (C_{триазин}), 164.5 (CN₄), 129.5 (C_{Ph}), 128.7 (C_{Ph}), 127.2 (CH_{Ph}), 126.2 (CH_{Ph}), 67.23 (CH₂), 45.34 (CH₂). Масс-спектр, *m/z*: 345.0811 (*I*_{отн.}, %).

2,4-Бис(4-метилпиперидин-1-ил)-6-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-1,3,5-триазин (16). Выход 0.39 г (75%), белые кристаллы, т. пл. 212–214°C (разл.). Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 7.71–7.59 м (2H, CH_{Ph}), 7.51 д. т (3H, CH_{Ph}, *J* 10.4, 6.8 Гц), 2.82 д. д (4H, CH₂, *J* 22.7, 12.0 Гц), 2.69 т (4H, CH₂, *J* 11.9 Гц), 1.72–1.63 м (5H, CH₂, CH), 1.62–1.58 м (5H, CH₂, CH), 0.91 с (3H, CH₃), 0.89 с (3H, CH₃). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 165.8 (C_{триазин}), 165.2 (C_{триазин}), 164.0 (CN₄), 130.3 (C_{Ph}), 129.0 (CH_{Ph}), 128.9 (CH_{Ph}), 126.8 (CH_{Ph}), 56.3 (CH₂), 54.1 (CH₂), 33.9 (CH₂), 31.2 (CH₂), 31.1 (CH₂), 22.3 (CH₃), 22.0 (CH₃). Найдено, %: С 64.21; Н 6.69; N 28.11. C₂₂H₂₉N₉. Вычислено, %: С 62.98; Н 6.97; N 30.05.

2-{2-[4-Хлор-6-(4-метилпиперидин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]-2H-тетразол-5-ил}фенол (17). Выход 0.41 г (68%), белые кристаллы, т. пл. 211–213°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.:

8.01–7.93 м (1H, CH_{Ph}), 7.25–7.05 м (1H, CH_{Ph}), 6.99–6.77 м (2H, CH_{Ph}), 2.91–2.78 м (5H, 2CH₂, 1CH), 1.65 д. д (4H, *J* 19.1, 6.1 Гц), 0.91 д (3H, CH₃, *J* 6.2 Гц). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 169.24 (C_{триазин}), 168.25 (C_{триазин}), 164.02 (CN₄), 129.05 (CH_{Ph}), 126.55 (CH_{Ph}), 119.15 (CH_{Ph}), 116.34 (CH_{Ph}), 43.70 (CH), 33.98 (CH₂), 30.83 (CH₂), 22.04 (CH₃). Найдено, %: С 55.01; Н 3.71; N 29.24. C₁₆H₁₇N₈ClO. Вычислено, %: С 51.55; Н 4.60; N 30.06.

4-[2-(4-Хлор-6-морфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-2H-тетразол-5-ил]-2-нитрофенол (18).

Выход 0.33 г (58%), светло-желтые кристаллы, т. пл. 199–201°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 8.33 с (1H, CH_{Ph}), 7.93 д. д (1H, CH_{Ph}, *J* 19.7, 9.2 Гц), 7.70–7.52 м (1H, CH_{Ph}), 3.74 д. д (4H, CH₂, *J* 21.0, 4.3 Гц), 3.67–3.51 м (4H, CH₂). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 165.09 (C_{триазин}), 164.99 (CN₄), 153.69 (C_{Ph}), 137.86 (C_{Ph}), 126.17 (CH_{Ph}), 119.45 (CH_{Ph}), 115.12 (CH_{Ph}), 66.5 (CH₂), 44.0 (CH₂). Найдено, %: С 40.89; Н 3.54; N 30.04. C₁₄H₁₂ClN₉O₄. Вычислено, %: С 41.44; Н 2.98; N 31.07.

N'-(4,6-Диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-метил-1H-тетразол-1-ил)ацетогидразид (19).

Выход 0.32 г (79%), белые кристаллы, т. пл. 255–257°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 5.25 с (2H, CH₂), 3.78–3.64 м (8H, CH₂), 3.59–3.46 м (8H, CH₂), 2.48 с (3H, CH₃). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 167.5 (C_{триазин}), 165.2 (C=O), 153.7 (CN₄), 66.5 (CH₂), 48.7 (CH₂), 8.6 (CH₃). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 406.2062 [*M* + H]⁺.

N'-(4,6-Диморфолино-1,3,5-триазин-2-ил)-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)ацетогидразид (20).

Выход 0.37 г (72%), белые кристаллы, т. пл. 273–275°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 8.14–7.93 м (2H, CH_{Ph}), 7.70–7.43 м (3H, CH_{Ph}), 5.57 с (2H, CH₂), 3.56 уш. с (16H, CH₂). Спектр ЯМР ¹³C (ДМСО-*d*₆), δ_C, м. д.: 166.8 (C_{триазин}), 165.1 (C=O), 164.5 (CN₄), 131.2 (CH_{Ph}), 129.8 (CH_{Ph}), 126.8 (C_{Ph}), 66.4 (CH₂), 53.9 (CH₂), 43.7 (CH₂). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 468.2211 [*M* + H]⁺.

N'-[4,6-Бис(4-метилпиперидин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил]-2-(5-фенил-2H-тетразол-2-ил)-ацетогидразид (21).

Выход 0.44 (54%), белые кристаллы, т. пл. 291–293°C. Спектр ЯМР ¹H (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 8.63 с (1H, NH), 8.06 д. д (2H,

CH_{Ph}, *J* 7.1, 2.2 Гц), 7.59–7.55 м (3H, CH_{Ph}), 5.58 с (2H, CH₂), 2.88–2.59 м (4H, CH₂), 1.70–1.51 м (8H, CH₂), 0.89 с (3H, CH₃), 0.87 с (3H, CH₃). Спектр ЯМР ¹³C (DMCO-*d*₆), δ_C, м. д.: 169.6 (C_{триазин}), 167.7 (C_{триазин}), 164.7 (C=O), 164.5 (CN₄), 131.1 (CH_{Ph}), 129.7 (CH_{Ph}), 127.3 (CH_{Ph}), 126.8 (CH_{Ph}), 54.1 (CH₂), 43.3 (CH₂), 34.1 (CH₂), 31.1 (CH₂), 22.3 (CH₃). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 429.1663 [*M* + H]⁺.

Общая методика синтеза соединений 22, 23.

К раствору соединения 13 или 14 (1.2 ммоль) в 50 мл ацетона прибавляли раствор 1.5 ммоль морфолина в 5 мл 10%-ного водного раствора NaOH. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании при комнатной температуре в течение 14 ч, затем при 50°C в течение 4 ч. По окончании времени выдержки реакционную смесь упаривали при пониженном давлении.

2-(5-Метил-1*H*-тетразол-1-ил)-*N'*-{4-морфолино-6-[(4-(трифторметил)фенил)амино-1,3,5-триазин-2-ил]ацетогидразид (22). Получен в смеси. Спектр ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆), δ, м. д.: 7.44–7.41 м (2H, CH_{Ph}), 7.34–7.32 м (2H, CH_{Ph}), 5.46 с (2H, CH₂), 3.77–3.74 м (4H, CH₂), 3.61–3.57 м (4H, CH₂), 2.33 с (3H, CH₃). Спектр ЯМР ¹³C (DMCO-*d*₆), δ_C, м. д.: 168.9 (C_{триазин}), 164.8 (C=O), 164.5 (C_{триазин}), 154.3 (CN₄), 126.8 (CH_{Ph}), 125.9 (CH_{Ph}), 120.7 (CH_{Ph}), 120.6 (CH_{Ph}), 66.5 (CH₂), 66.1 (CH₂), 54.3 (CH₂), 48.9 (CH₂), 48.7 (CH₂), 10.3 (CH₃). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 480.1818 [*M* + H]⁺.

***N'*-{4-Морфолино-6-[(4-(трифторметил)фенил)амино]-1,3,5-триазин-2-ил}-2-(5-фенил-2*H*-тетразол-2-ил)ацетогидразид (23).** Очистку продукта проводили методом колоночной хроматографии (хлороформ–метанол, 9:1). Выход 0.34 г (52%), белые кристаллы, т. пл. 196–198°C. Спектр ЯМР ¹H (DMCO-*d*₆), δ, м. д.: 10.1 с (1H, NH), 9.2 с (1H, NH), 8.25 м (2H, CH_{Ph}), 7.50 д. д (3H, CH_{Ph}, *J* 7.9, 1.2 Гц), 7.47 д. д (2H, CH_{Ph}, *J* 8.3, 1.9 Гц), 7.35 д. д (2H, CH_{Ph}, *J* 7.8, 2.3 Гц), 5.47 с (2H, CH₂), 3.68–3.63 м (4H, CH₂), 3.60–3.57 м (4H, CH₂). Спектр ЯМР ¹³C (DMCO-*d*₆), δ_C, м. д.: 172.1 (C_{триазин}), 169.7 (C_{триазин}), 168.1 (C_{триазин}), 164.4 (C=O), 164.3 (CN₄), 131.0 (CH_{Ph}), 128 (CH_{Ph}), 127 (CH_{Ph}), 126.7 (CH_{Ph}), 121.1 (CH_{Ph}), 124.7 (CH_{Ph}), 120.7 (CH_{Ph}), 68.7 (CH₂), 54.8 (CH₂), 44.3 (CH₂). Масс-спектр, *m/z* (*I*_{отн.}, %): 542.1810 [*M* + H]⁺.

Изучение цитотоксичности соединения 15–23. МТТ-Анализ проводили на опухолевых клеточных линиях Huh-7 (гепатокарцинома человека) и A549 (аденокарцинома человека) согласно методике [22]. Клетки в концентрации 5·10³ на лунку помещали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 12 ч в среде DMEM с добавлением 10% термически инактивированной фетальной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. После культивирования в лунки добавляли свежую среду DMEM, содержащую различные концентрации соединений 15–23, и планшет затем инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере CO₂-инкубатора в присутствии 20% O₂, 5% CO₂. Через 48 ч в лунки добавляли 0.1 мл DMEM и 0.02 мл МТТ-реагента (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 DMCO и измеряли оптическую плотность на планшетном фотометре ALLSHENG AMR-100T при λ 540 нм, вычитая фоновую оптическую плотность при λ 690 нм.

Иммуноблоттинг лизатов клеток Huh-7. 10%-ный полиакриламидный гель использовали для белкового электрофореза по стандартной методике [23]. Для переноса белков с полиакриламидного геля применяли нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.2 мкм (Bio-Rad). Перенос белков осуществляли в камере (Bio-Rad) при силе тока 0.3 А в течение 2 ч. После блокирования неспецифических сайтов связывания на мембране с использованием 5%-ного обезжиренного молока в буферном растворе PBS-T (PBS + 0.1% Твин-20), мембраны инкубировали со специфическими антителами (в разведении 1/1000), разведёнными в том же буферном растворе с молоком в течение ночи [p-HER2 (Tyr1248 и Tyr877) (Cell Signaling), p-EGFR (Tyr1173) (Cell Signaling)]. После трехкратного промывания с использованием PBS-T вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, и хемилюминесцентный субстрат для детекции пероксидазы хрена были использованы в соответствии с инструкцией производителя (Bio-Rad). Интенсивность сигнала хемилюминесценции детектировали на приборе Chemidoc (Bio-Rad).

Изучение связывания NO-радикалов с соединениями 5, 9, 16 и 19. Для определения степени связывания NO-радикалов использовали модельную реакцию Грисса–Илосвая [24, 25]. Для проведения эксперимента реакционную смесь, содержащую 1 мл нитропрусида натрия (*c* 15 мкМ.) и 0.5 мл водного раствора соединений **5, 9, 16 и 19** инкубировали 150 мин в шейкере-термостате при 60°C по ранее описанной методике [4]. Затем к 0.25 мл полученного раствора добавляли 0.5 мл PBS (pH 7.4) и 0.5 мл 1%-ного раствора реактива Грисса. Полученную смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Образовавшееся диазосоединение определяли спектрофотометрическим методом при λ 540 нм. В качестве контроля использовались аналогичные концентрации азида натрия.

Фотоиндуцированный гемолиз соединений 19 и 21. Эритроциты получали из цитратной крови путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин с последующей трехкратной промывкой физиологическим раствором. Далее клетки стабилизировали не менее суток при 4°C в реактиве Олсвера, который применяется как антикоагулянт и состоит из хлорида натрия (0.42%), лимонной кислоты (0.055%), цитрата натрия (0.8%) и D-глюкозы (2.05%).

Перед использованием эритроциты трижды отмывали от реактива Олсвера физиологическим раствором, и готовили стандартную суспензию клеток в PBS (pH 7.4). Антиоксидантные свойства оценивали с использованием устройства для исследования фотоиндуцированного цитолиза по методике, опубликованной ранее [26]. Согласно этой методике в экранированной кювете с длиной оптического пути 5 мм готовили инкубационную смесь, содержащую 0.1 мл стандартной суспензии эритроцитов, 0.6 мл PBS (pH 7.4), 0.08 мл раствора с различным содержанием соединений **19** и **21** и 0.02 мл фотосенсибилизатора радахлорин [0.35%-ный раствор для внутривенного введения, основная субстанция – (7*S*,8*S*)-13-винил-5-(карбоксиметил)-7-(2-карбоксиэтил)-2,8,12,17-тетраметил-18-этил-7*H*,8*H*-порфири-3-карбоновая кислота]. В качестве контроля использовали инкубационную смесь, содержащую физиологический раствор. Полученную инкубационную смесь, общим объемом 0.8 мл, термостатировали в кювет-

ном отсеке спектрофотометра в течение 3 мин при 37°C и постоянном перемешивании, затем облучали красным лазером Laserland LED-2000 (Besram Technology Inc., 659 нм, мощность – 55 мВ, доза облучения – 3.5 Дж/см²). После завершения облучения регистрировали снижение оптической плотности раствора при 800 нм.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

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

Голотин Василий Александрович, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0385-2463>

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

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

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

Семёнов 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 «Рентгенодифракционные 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. Singla P., Luxami V., Paul K. // Eur. J. Med. Chem. 2015. Vol. 18. N 102. P. 39. doi 10.1016/j.ejmech.2015.07.037

2. Cascioferro S., Parrino B., Spanò V., Carbone A., Montalbano A., Barraja P., Diana P., Cirrincione G. // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. Vol. 15. N 142. P. 523. doi 10.1016/j.ejmech.2017.09.035
3. Maliszewski D., Drozdowska D. // *Pharmaceuticals*. 2022. Vol. 15. N 2. P. 221. doi 10.3390/ph15020221
4. 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., Molchanov O.E., Maistrenko D.N., Semenov K.N. // *Russ. Chem. Bull.* 2022 Vol. 71. P. 1050. doi 10.1007/s11172-022-3507-1
5. Konstantinov S.M., Berger M.R. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Berlin: Springer, 2008. P. 53. doi 10.1007/978-3-540-38918-7_178
6. 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
7. 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
8. 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
9. Herr R.J. // *Bioorg. Med. Chem.* 2002. Vol. 10. N 11. P. 3379. doi 10.1016/S0968-0896(02)00239-0
10. Пат. RU (11) 2 124 020(13) C1 (1993). Роспатент // 1998. 22 О 393
11. Shin-ichi Y., Yasuhisa F., Ichiro K., Hisashi Y., Toshiyuki M., Hiroaki G., Shuichi H., Kanami Y., Takao Y. // *JNCI*. 2006. Vol. 98. N 8. P. 545. doi 10.1093/jnci/djj133
12. Miller M.S., Pinson J.A., Zheng Z., Jennings I.G., Thompson P.E. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. Vol. 23. N 3. P. 802-5. doi 10.1016/j.bmcl.2012.11.076
13. Norman M.H., Andrews K.L., Bo Y.X.Y., Booker S.K., Caenepeel S., Cee V.J., D'Angelo N.D., Freeman D.J., Herberich B.J., Hong F.T., Jackson C.L.M., Jiang J., Lanman B.A., Liu L.B., McCarter J.D., Mullady E.L., Nishimura N., Pettus L.H., Reed A.B., Miguel T.S., Smith A.L., Stec M.M., Tadesse S., Tasker A., Aidassani D., Zhu X.C., Subramanian R., Tamayo N.A., Wang L., Whittington D.A., Wu B., Wu T., Wurz R.P., Yang K., Zalameda L., Zhang N., Hughes P.E. // *J. Med. Chem.* 2012. Vol. 55. P. 7796. doi 10.1021/jm300846z
14. Dehnhardt C.M., Venkatesan A.M., Chen Z., Delos-Santos E., Ayril-Kaloustian S., Brooijmans N., Yu K., Hollander I., Feldberg L., Lucas J., Mallon R. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. Vol. 16. P. 4773. doi 10.1016/j.bmcl.2011.06.063
15. Миколайчук О.В., Протас А.В., Попова Е.А., Молчанов О.Е., Майстренко Д.Н., Островский В.А., Павлюкова Ю.Н., Шаройко В.В., Семенов К.Н. // *ЖОХ*. 2022. № 9. С. 1368. doi 10.31857/S0044460X22090050; Mikolaichuk O.V., Protas A.V., Popova E.A., Molchanov O.E., Maistrenko D.N., Ostrovskii V.A., Pavlyukova Y.N., Sharoyko V.V., Semenov K.N. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2022. Vol. 92. P. 1621. doi 10.1134/S1070363222090055
16. Sirajuddin M., Ali S., Badshah A. // *J. Photochem. Photobiol. (B)*. 2013. Vol. 124. P. 1. doi 10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013
17. Миколайчук О.В., Протас А.В., Попова Е.А., Мухаметшина А.В., Овсепян Г.К., Трифонов Р.Е. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2018. С. 1312; Mikolaichuk O.V., Protas A.V., Popova E.A., Mukhametshina A.V., Ovsepyan G.K., Trifonov R.E. // *Russ. Chem. Bull.* 2018. Vol. 67. P. 1312. doi 10.1007/s11172-018-2217-1
18. Topalä T., Bodoki A., Oprean L., Oprean R. // *Farmacía*. 2014. Vol. 62. P. 1049.
19. García-Ramos J.C., Galindo-Murillo R., Cortés-Guzmán F., Azuara L.R. // *J. Mex. Chem. Soc.* 2013. Vol. 57. N 3. P. 245 doi 10.29356/jmcs.v57i3.213
20. Wolfe A., Jr G.H.S., Meehan T. // *Society*. 2002. Vol. 26. P. 6392.
21. Raghu M.S., Pradeep Kumar C.B., Prashanth M.K., Yogesh Kumar K., Prathibha B.S., Kanthimathi G., Alissa S.A., Alghulikah H.A., Osman S.M. // *New J. Chem.* 2021 Vol. 45. P. 13909. doi 10.1039/D1NJ02419A
22. Mikolaichuk O.V., Popova E.A., Protas A.V., Rakipov 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
23. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970 Vol. 227. N 5259. P. 680. doi 10.1038/227680a0
24. Abdelhalim A.O.E., Sharoyko V.V., Meshcheriakov A.A., Martynova S.D., Ageev S.V., Iurev G.O., Mulla H.A.I., Petrov A.V., Solovtsova I.L., Vasina L.V., Murin I.V., Semenov K.N. // *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2020. Vol. 29 P. 102284. doi 10.1016/j.nano.2020.102284
25. Gaponenko I.N., Ageev S.V., Iurev G.O., Shemchuk O.S., Meshcheriakov A.A., Petrov A.V., Solovtsova I. L., Vasina L.V., Tennikova T.B., Murin I.V., Semenov K.N., Sharoyko V.V. // *Toxicology in Vitro*. 2020. Vol. 62. P. 104683. doi 10.1016/j.tiv.2019.104683
26. Galebskaya L.V., Solovtsova I.L., Miroshnikova E.B., Mikhailova I.A., Sushkin M.E., Razumny A.V., Babina A.V., Fomina V.A. // *Biomed. Photonics*. 2017. Vol. 6. N 3. P. 33. doi 10.24931/2413-9432-2017-6-3-33-38

Synthesis and Study of Some Properties of New Tetrazole-Containing Derivatives of Morpholin-4-yl-1,3,5-triazine and 4-Methylpiperidin-1-yl-1,3,5-triazine

O. V. Mykolaichuk^{a,b,*}, A. V. Protas^{a,b}, E. A. Popova^{a,b}, M. D. Lutsev^a,
E. Yu. Smirnov^{c,d}, V. A. Golotin^{a,c}, V. A. Ostrovsky^e, I. V. Korniyakov^f,
K. N. Semenova^{b,e,f}, V. V. Sharoiko^{a,b,f}, O. E. Molchanov^b, and D. N. Maistrenko^b

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

^b Academician A. M. Granov Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies,
Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, 197758 Russia

^c State Research Institute of Lake and River Fisheries, St. Petersburg, 199004 Russia

^d Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

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

^f St. Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: olgamedchem@gmail.com

Received March 8, 2023; revised April 4, 2023; accepted April 12, 2023

New tetrazole-containing derivatives of morpholin-4-yl-1,3,5-triazine and 4-methylpiperidin-1-yl-1,3,5-triazine were synthesized. Cytotoxic activity of the compounds obtained against human liver tumor cell lines Huh-7 and human lung A549 was studied by the MTT test. It was shown that these substances do not exhibit a pronounced cytotoxic effect. The most significant antitumor activity was shown by 1,3,5-triazine containing 5-phenyltetrazol-2-ylacetohydrazide fragment and 4-methylpiperidine ring as substituents, as well as 1,3,5-triazine containing 5-methyl-1*H*-tetrazol-1-ylacetohydrazide fragment and two morpholine rings. For these compounds, the interaction with DNA was studied by UV spectroscopy. For *N*⁷-(4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-yl)-2-(5-methyl-1*H*-tetrazol-1-yl)acetohydrazide, the DNA binding constant was determined ($K_{\text{bin}} 9.02 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) and studied the ability to inhibit the tyrosine kinase domain of surface receptors. It was shown that the studied tetrazole-containing derivatives of 1,3,5-triazine do not exhibit antioxidant properties with respect to NO-radicals and do not cause photoinduced hemolysis.

Keywords: 1,3,5-triazine, 5-aryltetrazoles, 5-methyl-1*H*-tetrazol-1-ylacetohydrazide, 5-phenyl-2*H*-tetrazol-2-ylacetohydrazide, cytotoxic activity, inhibitory activity