

На правах рукописи



ЛЕВШУКОВА ПОЛИНА ОЛЕГОВНА

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,5-ТРИАЗИНА**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург
2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Куваева Елена Владимировна кандидат фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Селиванова Ирина Анатольевна доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), профессор кафедры химии

Шутов Роман Вадимович кандидат фармацевтических наук, акционерное общество «Биокад», владелец продукта департамента разработки инновационных малых молекул

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «17» декабря 2024 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

Актуальность работы

Производные 1,3,5-триазины важный класс гетероциклических соединений, на основе которых созданы и создаются новые лекарственные препараты. Среди них известны противомикробные средства (поназурил), стимуляторы дыхания (алмитрин), недеполяризующие миорелаксанты (изоциурония бромид), антипротозойные средства (меларсомин). Следует отметить 1,3,5-триазины, обладающие противоопухолевой активностью, которые нашли свое применение в медицинской практике за счет своей эффективности и низкой токсичности: алтретамин, использующийся при лечении рака яичников; азацитидин и децитабин, применяющиеся для лечения больных с миелодиспластическим синдромом, хроническим миеломоноцитарным лейкозом и острым миелолейкозом.

Ряд производных 1,3,5-триазины широко используется в сельском хозяйстве ввиду своих гербицидных и фунгицидных свойств (прометрин, атразин).

Известные методы получения замещенных 1,3,5-триазинов базируются, в основном, на нуклеофильном замещении атома хлора [1] или трихлорметильной группы [2] в цианурхлориде. Эти подходы многостадийны и часто дают целевой продукт с невысоким выходом [3]. В литературе известны методы трансформации 5-членных и 6-членных гетероциклических систем, которые используют для получения производных 1,3,5-триазины с разными заместителями в положении 2,4,6 с наименьшим количеством стадий. Поэтому разработка новых подходов к получению 1,3,5-триазинового цикла с разными заместителями в положениях 2,4,6, на наш взгляд, является актуальным и перспективным направлением. Фармакологические исследования новых производных обсуждаемых триазинов открывают новые горизонты в создании эффективных и безопасных лекарственных средств [4].

Степень разработанности темы исследования

Ранее в работах [5-11] Яковлева И.П., Комарова А.В., Препьялова А.В., Захса В.Э., Лалаева Б.Ю. и др. было показано, что взаимодействие 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с гидразином, метилгидразином и фенилгидразином в среде абсолютного метанола, при комнатной температуре протекает с расщеплением связи C²-О оксазинового цикла с последующей циклизацией образующихся промежуточных ациклических продуктов в 2-(1,3-дизамещенные-1,2,4-триазол-5-ил)алкановые кислоты. Черновым Н.М. [12] было впервые показано, что расщепление 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов гуанидином в присутствии эквимольного количества метилата натрия в метаноле при комнатной температуре

приводит к получению производных 1,3,5-триазина. Способы получения 2,4,6-тризамещённых-1,3,5-триазинов путём рециклизации 2,5-дизамещённых-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов двуцентровыми 1,3-бинуклеофильными компонентами: алкил- и арилимидамидами, S-метилизотиомочевиной - не описаны. Нет литературных данных и об их биологической активности.

Цель и задачи исследования

Целью работы является получение новых производных 1,3,5-триазина на основе реакции 2,5-дизамещённых-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с алкил- и арилимидамидами, S-метилизотиомочевиной, доказательство строения полученных соединений, изучение их биологической активности.

Для этого предстояло решить следующие основные задачи:

1. Разработать лабораторные способы получения новых производных 1,3,5-триазина путем рециклизации 2,5-дизамещённых-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов двуцентровыми 1,3-бинуклеофильными реагентами: алкил- и арилимидамидами, S-метилизотиомочевиной.

2. Доказать строение и индивидуальность синтезированных соединений с помощью современных методов анализа: ЯМР-спектроскопии (^1H и ^{13}C), масс-спектрометрии, ИК-спектроскопии, элементного анализа, тонкослойной хроматографии (ТСХ).

3. Установить потенциал биологической активности полученных соединений путем компьютерного анализа с помощью программ GUSAR и PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances).

4. Определить острую токсичность и провести изучение некоторых видов биологической активности синтезированных веществ *in vitro* и *in vivo*.

5. Для соединения с наиболее оптимальным соотношением активности и безопасности – разработать параметры аттестации для первичного стандартного образца.

Научная новизна

Разработаны лабораторные методы синтеза новых производных 1,3,5-триазина. Доказано их строение и индивидуальность. Изучена острая токсичность, противомикробная, противогрибковая, диуретическая и противоопухолевая активности.

Впервые показано, что:

➤ Взаимодействие 2,5-дизамещённых-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с 1,3-бинуклеофильными реагентами в среде пропанола в присутствии пропилата натрия, в течение 4-8 ч., приводит к получению производных 1,3,5-триазина с выходом 43-88% в пересчете на соответствующий 2,5-дизамещённый-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-он.

➤ Рециклизация 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов 1,3-бинуклеофильными реагентами в среде диметилсульфоксида (ДМСО) при температуре 95-98 °С позволила сократить время реакции до 1.0-3.5 ч. и получить целевые продукты с выходом 51-80% в пересчете на соответствующий 2,5-дизамещенный-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-он.

➤ С помощью программ GUSAR и PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) определен потенциал биологической активности полученных триазинов *in silico*: с высокой долей вероятности ($P_a \geq 0,5$) для них прогнозируется противомикробная, противогрибковая, диуретическая и противоопухолевая активность.

➤ Прогноз острой токсичности производных 1,3,5-триазинов *in silico* коррелирует с данными эксперимента *in vivo*. Полученные соединения относятся к 4 и 5 классам токсичности – малотоксичны или практически нетоксичны.

➤ 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазин обладает противоопухолевой активностью в отношении карциномы легкого человека, которая сравнима с современными эталонными лекарственными препаратами.

Теоретическая и практическая значимость

Разработаны лабораторные методы синтеза, доказано строение и индивидуальность ранее неописанных производных 1,3,5-триазина.

По результатам компьютерного скрининга, исследований *in vitro* и *in vivo* ряда синтезированных 1,3,5-триазина отобрано соединение с оптимальным соотношением активности и безопасности – 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазин, которое проявило выраженную противоопухолевую, умеренную противогрибковую и диуретическую активности. Для 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазинов разработаны параметры аттестации для первичного стандартного образца.

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры органической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 29.03.2024). Результаты диссертационного исследования использованы в научно-исследовательской деятельности кафедры органической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 07.05.2024).

Получено два патента: патент **2812149 С1** Российская Федерация, МПК С07D 251/24 (2006.01) А61К 31/53 (2006.01) А61Р 31/10 (2006.01). 2,4-диарил-6-алкил-1,3,5-триазины и способ их получения / П.О. Левшукова, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, И.П. Яковлев, Л.А. Тунгускова, Г.В. Ксенофонтова, Е.Н. Кириллова; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. - № 2023114893; заявл. 06.06.2023; опубл. 23.01.2024; патент **2825131 С1** Российская Федерация, МПК С07D 251/24 (2006.01) А61К 31/53 (2006.01) А61Р 31/10 (2006.01). Производные 1,3,5-триазина и способ их получения / П.О. Левшукова, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, И.П. Яковлев, Л.А. Тунгускова, Т.Л. Семакова, М.В. Сопова, И.И. Тернинко; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. - № 2023114891; заявл. 06.06.2023; опубл. 21.08.2024.

Методология и методы исследования

Исследование проводилось в период с 2021 по 2024 гг. Базовыми объектами являлись производные 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-оны, алкил- и арилимидамы, S-метилизотиомочевина. Теоретическую основу исследования составляли труды зарубежных и отечественных ученых по синтезу и свойствам производных 1,3,5-триазина. Методология исследования заключалась в получении ранее неописанных производных 1,3,5-триазинов, изучении их строения и биологической активности.

При проведении исследования был использован комплекс химических, биологических методов и статистическая обработка результатов.

Для доказательства строения и индивидуальности полученных в ходе исследования соединений, использованы современные физико-химические методы анализа: ИК, ЯМР-спектроскопия на ядрах ^1H , ^{13}C , масс-спектрометрия, элементный анализ, ТСХ.

Положения, выносимые на защиту

- Разработка лабораторных методов синтеза новых производных 1,3,5-триазина.
- Доказательство строения и индивидуальности синтезированных соединений с помощью ИК, ЯМР спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа, ТСХ.
- Прогноз биологической активности и токсичности полученных триазинов *in silico*.
- Изучение острой токсичности, противомикробной, противогрибковой, диуретической и противоопухолевой активностей целевых 1,3,5-триазинов *in vitro* и *in vivo*.
- Разработка первичного стандартного образца и параметров аттестации для 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазина.

Личный вклад автора

Основная часть работы выполнена лично автором (не менее 95% общего объема), а именно: сбор, анализ и систематизация литературных данных; постановка цели и задач исследования; химический синтез целевых соединений; обработка и интерпретация спектральных (ИК, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии) данных; изучение острой токсичности, биологической активности; статистическая обработка полученных результатов, их обобщение и формулирование выводов; оформление патентов, написание статей, и представление докладов по теме диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно: пункту 1 – Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ; пункту 2 – Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.

Степень достоверности и апробация работы

Результаты работы представлены на II Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы» (Ташкент, 2021); XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2022); III Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы» (Ташкент, 2022); Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященной 50-летию кафедры токсикологической химии (Пермь, 2022); XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2023); XIV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2024).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки

России для опубликования основных научных результатов диссертаций, а также 1 статьи в издании, включенном в международные наукометрические базы данных Scopus и Web of science. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в рамках тематики государственного задания «Синтез, изучение строения, фармакологического действия новых биологических активных веществ или модифицированных субстанций, препаратов и разработка валидированных методик их стандартизации» (номер государственной регистрации 01201252028).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, включает 27 таблиц, иллюстрирована 71 рисунком и состоит из введения, обзора литературы по теме исследования и 4 глав собственных исследований, экспериментальной части, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Список литературы включает 80 источников, в том числе 62 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

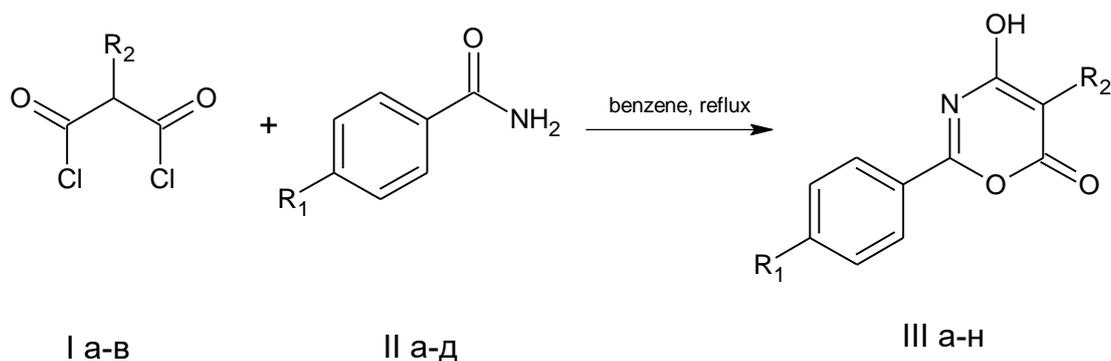
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы обсуждаются методы синтеза производных 1,3,5-триамина рециклизацией различных пяти- и шестичленных гетероциклических систем.

Большое внимание в главе уделено результатам изучения биологической активности данного класса соединений. Показано, что производные 1,3,5-триамина обладают высоким биологическим потенциалом, таким как ингибиторы карбоангидразы, противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное, противоопухолевое действие, что делает их перспективной основой для проектирования и разработки новых лекарственных средств.

ГЛАВА 2. СИНТЕЗ И СТРОЕНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,5-ТРИАЗИНА

2,5-дизамещенные-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-оны были получены по известной методике [64] взаимодействием малонилдихлоридов (I а-в) с ариламидами карбоновых кислот (II а-д) в среде кипящего бензола в течение 4-8 часов с выходом 68-85% (рисунок 1).



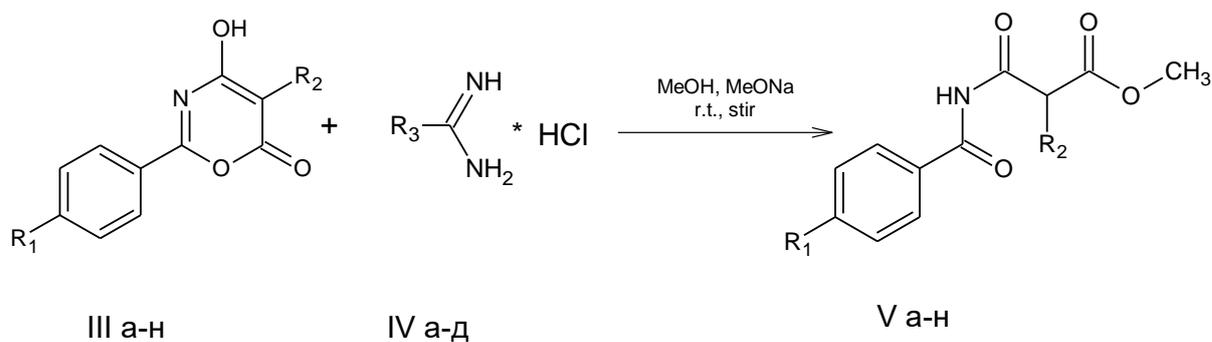
где $R_1 = \text{NO}_2, \text{Cl}, \text{H}, \text{CH}_3, \text{OCH}_3$

$R_2 = \text{Me}, \text{n-But}, \text{Ph}$

Рисунок 1. Схема синтеза 2,5-дизамещённых-4-гидрокси-6Н1,3-оксазин-6-онов

Ранее [12] на кафедре органической химии СПХФУ были получены производные 1,3,5-триазин-2-амин-а путем расщепления 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов гуанидином гидрохлоридом в среде метанола в присутствии эквимолярного количества метилата натрия при температуре 18-20 °С в течение 24-48 ч.

Проведение реакции 1,3-оксазинов (III а-н) с 1,3-бинуклеофильными реагентами (IV а-в) в аналогичных условиях в течение 20-40 часов приводило к образованию сложных эфиров N-замещенных малонамовых кислот (V а-н) (рисунок 2). Вероятно, это связано с протеканием конкурирующей реакции нуклеофильного расщепления оксазинов (III а-н) метанолом (находящимся в избытке) по углеродному атому С2-гетероцикла, что связано с меньшей нуклеофильностью выбранных амидинов по сравнению с гуанидином.



где $R_1 = \text{NO}_2, \text{Cl, H, CH}_3, \text{OCH}_3$

$R_2 = \text{Me, n-But, Ph}$

$R_3 = \text{CH}_3, \text{Ph, S-Met}$

Рисунок 2. Схема образования сложных эфиров N-замещенных малонамовых КИСЛОТ

Было установлено, что взаимодействие 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов (III а-н) с этанимидамидом (IV а) и бензолкарбоксимидамидом (IV б) в среде метанола в присутствии метилата натрия, (аналогичные условия приведены в патенте 2765005 С111 [65]), протекает в течение 10-14 часов, а выход целевых 1,3,5-триазинов составил всего 20-57%.

С целью сокращения времени реакции и увеличения выхода целевых продуктов было решено провести реакцию 2,5-дизамещенных-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов (III а-н) с 1,3-бинуклеофильными реагентами (IV а-в) в среде более высококипящего спирта - пропанола в присутствии пропилата натрия. Время реакции сократилось до 4-8 ч, а выход производных 1,3,5-триазина (VI а-н – VIII а-н) составил 43-88% (рисунок 3).

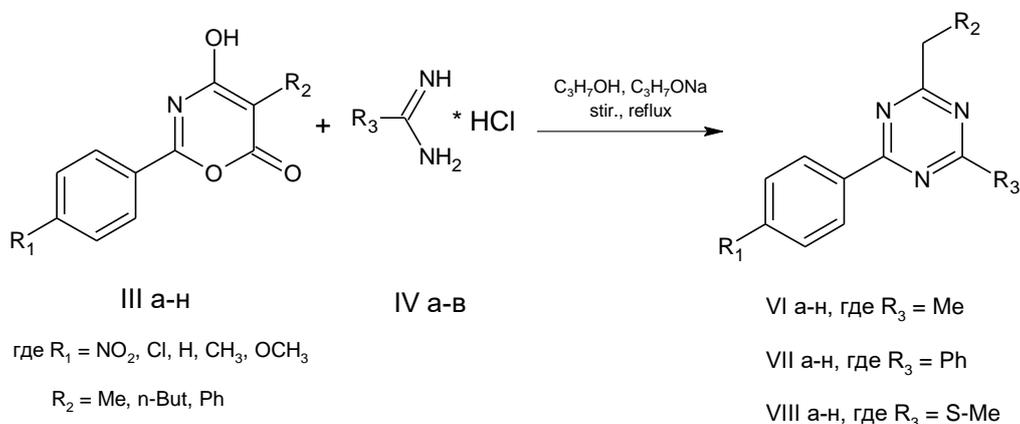


Рисунок 3. Синтез 1,3,5-триазинов (III а-н, - V а-н) в пропиловом спирте

Для исключения стадии получения оснований имидамидов (применение алкоголята), нами успешно был использован диметилсульфоксид (ДМСО). В результате, в среде диметилсульфоксида, при температуре 95-98 °С, целевые продукты были получены с выходом 51-80% (рисунок 4). Проведение реакции при 20-25°С не приводит к получению ожидаемых соединений. Нагревание реакционной массы выше 110°С приводит к её осмолению.

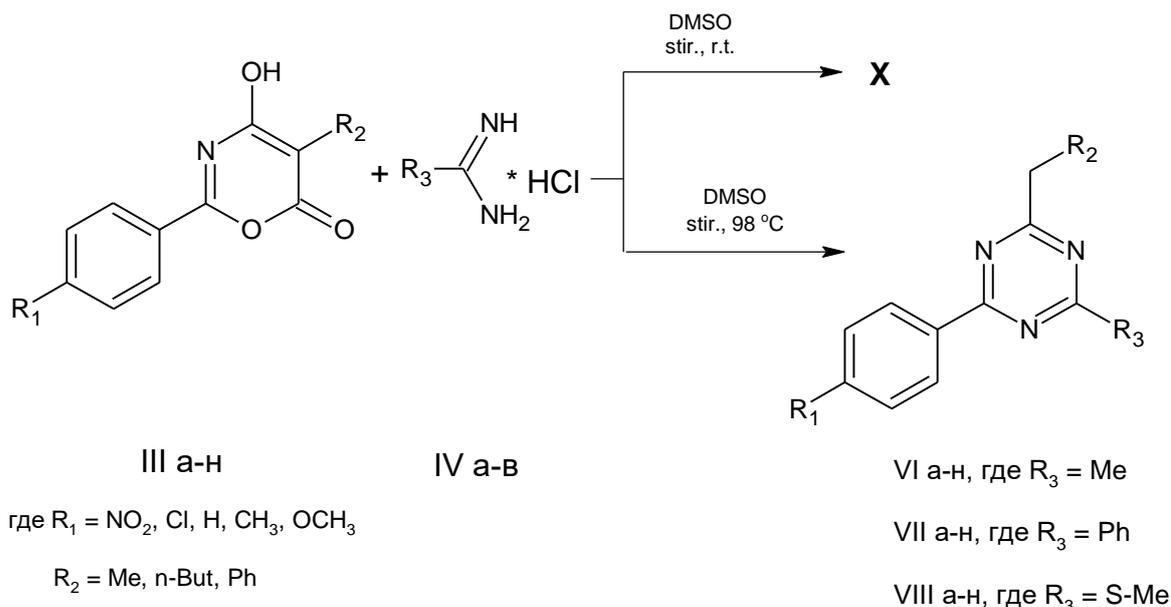


Рисунок 4. Синтез 1,3,5-триазинов (III а-н, - V а-н) в ДМСО

Нами было установлено, что определяющее влияние на время протекания изучаемой реакции и выход целевого продукта оказывает выбор растворителя (в нашем случае, как показано выше, оптимальным является ДМСО) и строение исходных реагентов (нуклеофильность амидина и электронная природа заместителя в фенильном фрагменте оксазина). Бензамидин за счет электронодонорного влияния фенильного заместителя обладает большей нуклеофильностью, чем ацетамидин. Акцепторные заместители R¹ в оксазине ускоряют реакцию и увеличивают выход целевого продукта. Заместители R² в оксазиновом цикле незначительно влияют на время протекания реакции и выход ожидаемого продукта.

Контроль за ходом реакции, чистотой и индивидуальностью полученных продуктов, осуществляли с помощью ТСХ на пластинах TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck), элюент этилацетат (Merck, марка ч.д.а.), детектирование в УФ свете.

Строение полученных 1,3,5-триазинов было установлено с помощью современных методов анализа: ИК, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа.

В спектре ЯМР ^1H раствора 2-(4-метилфенил)-4-пентил-6-фенил-1,3,5-триазина (VII з) в CDCl_3 (рисунок 5) наблюдаются сигналы протонов CH_3 -группы этильного радикала у C_4 0.99 м.д. (3H, т, $J = 6.7$), сигналы протонов CH_3 - группы у бензольного кольца у C_2 2.49 (3H, с), сигнал протонов $-\text{CH}_2$ - групп 1.46 (2H, т, $J = 5.0$); 1.50 (2H, т, $J = 6.9$); 2.01 (2H, м); 3.03 м.д. (2H, т, $J = 7.6$), и сигналы протонов ароматических колец 8.59 (2H, д, $J = 7.8$); 7.60 (1H, д, $J = 6.6$); 7.57 (2H, д, $J = 8.2$); 7.37 (2H, д, $J = 7.8$)

В спектре ЯМР ^{13}C данного соединения (VII з) в CDCl_3 (рисунок 6) наблюдаются сигнал атома углерода CH_3 - группы этильного радикала у C_4 (14.08 м.д.), сигнал углерода CH_3 - группы у бензольного кольца у C_2 (21.73 м.д.), сигналы атомов углерода $-\text{CH}_2$ -группы (22.58-31.64 м.д.), сигналы атомов углерода бензольного кольца (128.60-142.96 м.д.). В слабом поле при 171.07 м.д., 171.17 м.д. и 180.06 м.д. наблюдаются сигналы атомов углерода триазинового цикла « C_2 », « C_6 » и « C_4 ».

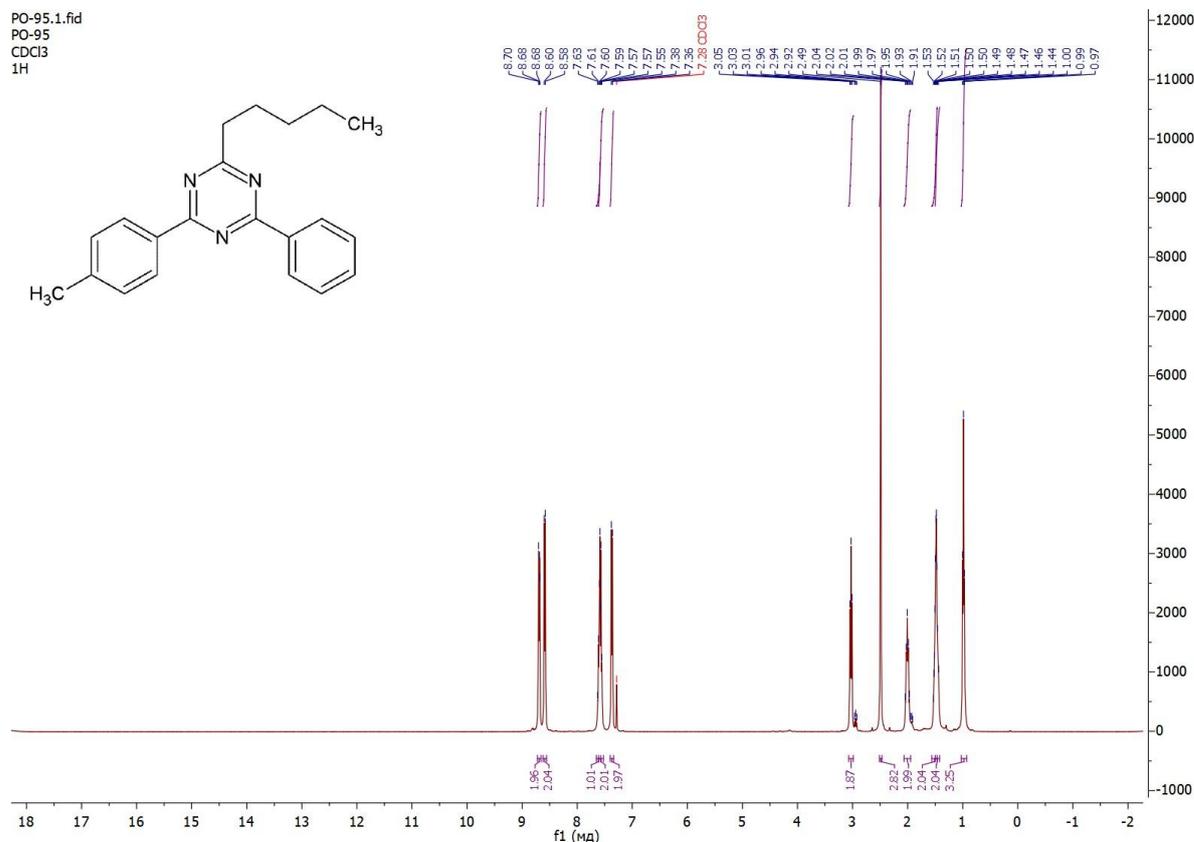


Рисунок 5. Спектр ЯМР ^1H раствора 2-(4-метилфенил)-4-пентил-6-фенил-1,3,5-триазина (VII з) в CDCl_3

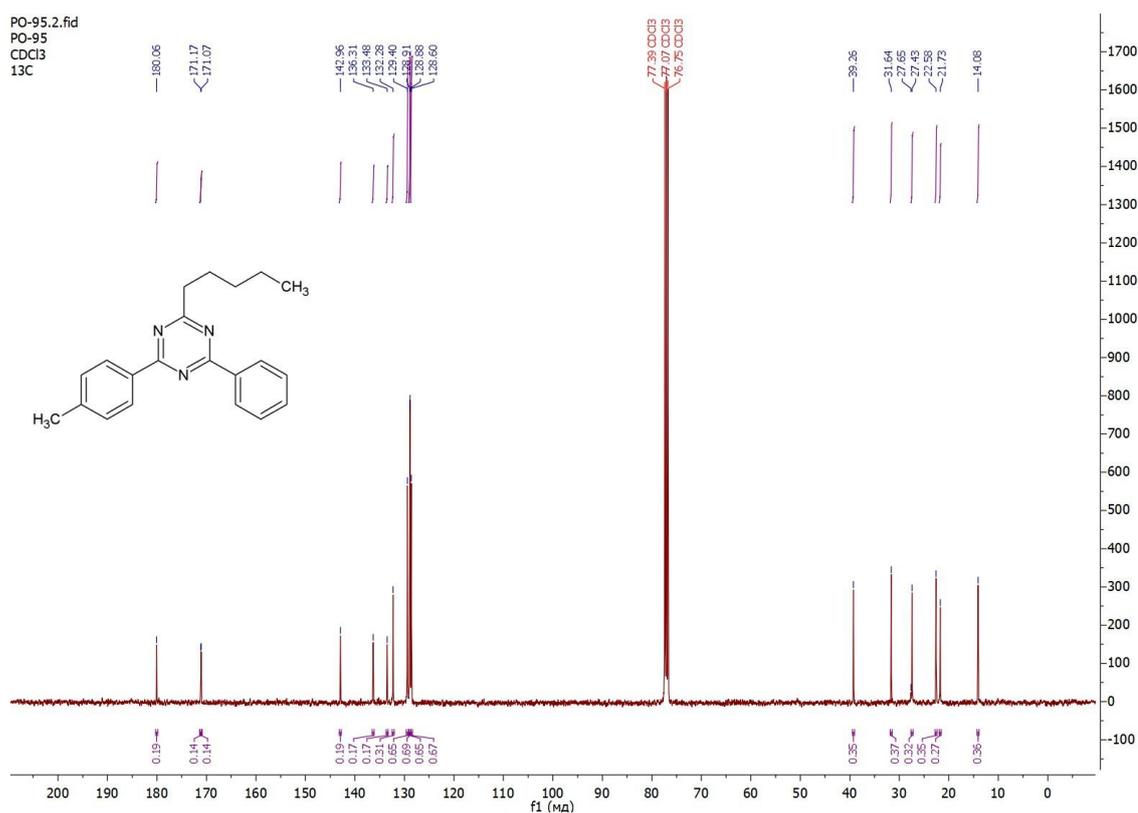


Рисунок 6. Спектр ЯМР ^{13}C раствора 2-(4-метилфенил)-4-пентил-6-фенил-1,3,5-триазина (VII з) в CDCl_3

В инфракрасном спектре (диски KBr) 2-(метилсульфанил)-4-(4-нитрофенил)-6-этил-1,3,5-триазина (VIII а) идентифицируются: триазиновый цикл по полосе поглощения при 1525 см^{-1} ($\nu\text{C}=\text{N}(\text{аром.})$), валентные колебания CH_3 -группы этильного радикала при 2945 см^{-1} ($\nu_{\text{ас}}\text{C}-\text{H}$), валентные колебания CH_3 -группы у атома серы при 2983 см^{-1} ($\nu_{\text{ас}}\text{C}-\text{H}$) (рисунок 7).

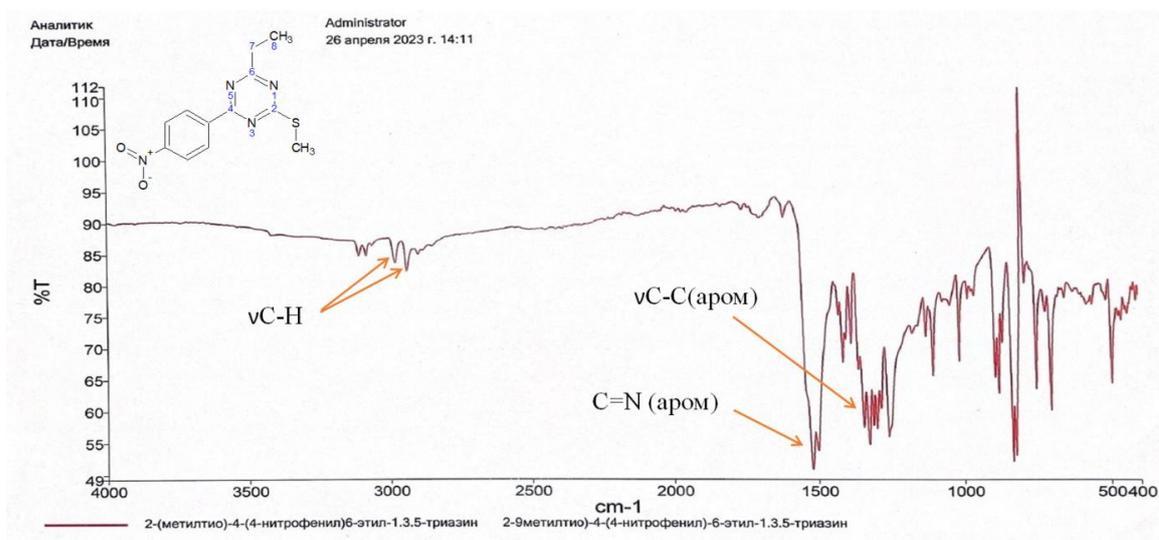


Рисунок 7. ИК-спектр 2-(метилсульфанил)-4-(4-нитрофенил)-6-этил-1,3,5-триазина (VIII а) в диске KBr

Строение полученных триазинов (VI а-н) доказано и масс-спектрометрией высокого разрешения (HRMS-ESI). Например, для 2-метил-4-(4-нитрофенил)-6-этил-1,3,5-триазина (V а) значение m/z $[M+H]^+$ молекулярного иона соответствует массе молекулярного иона. m/z $[M+H]^+$ вычислено для $C_{12}H_{13}N_4O_2$: 245.1033; найдено: 245.1027. Масс-спектр представлен на рисунке 8.

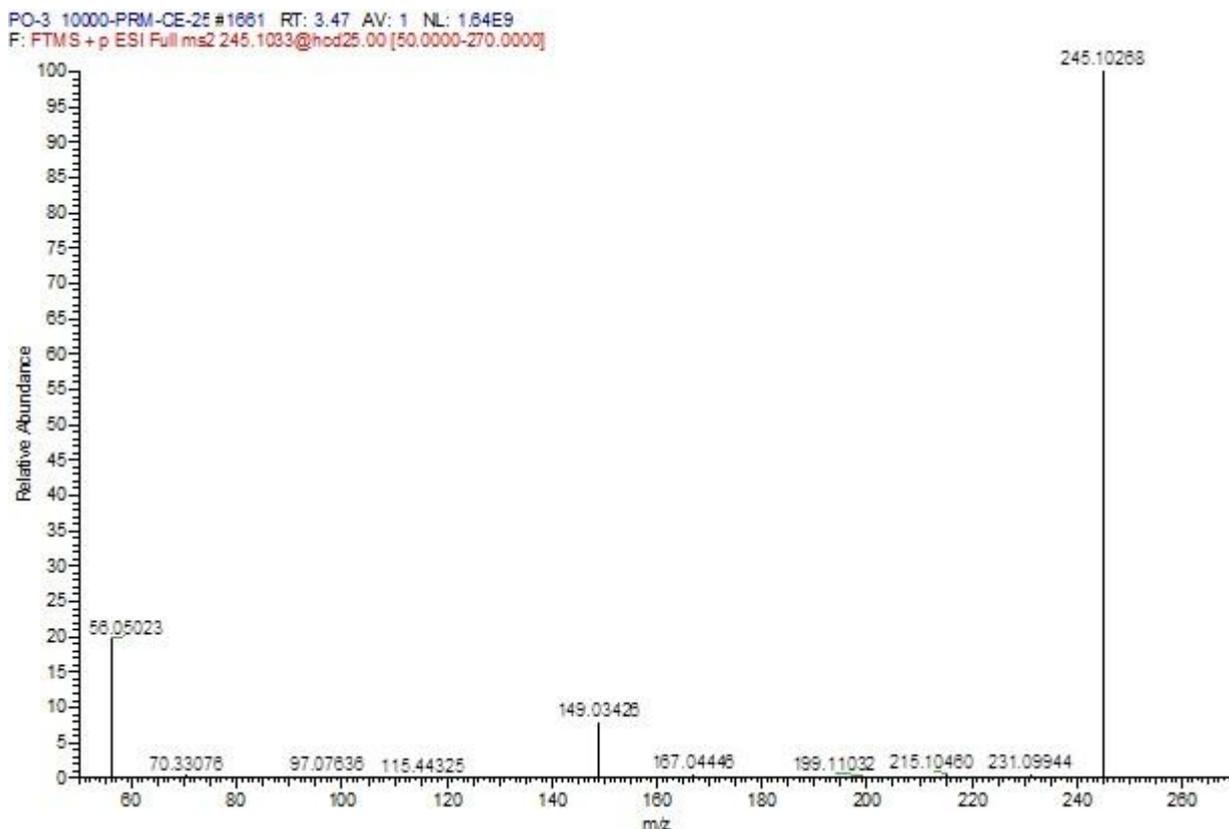


Рисунок 8. Масс-спектр 2-метил-4-(4-нитрофенил)-6-этил-1,3,5-триазина (VI а)

ГЛАВА 3. ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Для выбора наиболее перспективного соединения для дальнейших исследований, а также для сокращения числа экспериментов на животных был проведен предварительный компьютерный скрининг ряда синтезированных молекул. Согласно концепции «3 R», а именно принципу «Reduction», необходимо использовать альтернативный метод, который заключается в достижении воспроизводимых результатов с использованием минимального количества животных.

Для установления спектра биологической активности синтезированных соединений была использована компьютерная программа PASS 2022 (Prediction of Activity Spectra for Substances) [69], позволяющая

предсказать несколько тысяч видов активности лекарственно-подобных химических соединений на основе их структурных формул. Для каждого соединения были найдены Probability to be active (Pa) - вероятность того, что исследуемое соединение будет биологически активным по данному критерию. В таблице 1 приведен ранжированный по количеству синтезированных 1,3,5-триазинов список с ожидаемым видом биологической активности.

Таблица 1 – Прогнозируемая системой PASS online 2022 потенциальная биологическая активность синтезированных 1,3,5-триазинов

Pa	Количество соединений	Активность
0,10 – 0,11	9	Ингибитор циклооксигеназы-2
0,19 – 0,22	13	Антигипоксическая
0,29 – 0,34	14	Лечение алопеции
0,26 – 0,39	14	Вазодилатирующая
0,23 – 0,31	16	Антагонист интерлейкина-6
0,35– 0,58	16	Противомикробная
0,29 – 0,55	18	Стимулятор функции почек
0,35– 0,58	21	Противогрибковая
0,30 – 0,63	27	Цитотоксическая (карцинома легких)

Таким образом, по данным прогноза Way2Drug, изучение противогрибковой, противомикробной, диуретической и противоопухолевой активностей является перспективным для ряда синтезированных производных 1,3,5-триазина.

Перед тем как приступить к экспериментальному исследованию острой токсичности *in vivo* полученных соединений, был проведен компьютерный скрининг *in silico* с помощью программы GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships).

Прогнозируемая токсичность исследуемых соединений составляет от 341 до 1296 мг/кг.

В ходе изучения острой токсичности *in silico* установлено, что соединения, имеющие в качестве заместителя (R³) фенильную группу, обладают наибольшим значением LD₅₀.

Наличие акцепторных заместителей R¹ уменьшает токсичность. Если же R¹ - донорный заместитель, то происходит увеличение токсичности.

Заместитель R² не оказывает значительного влияния на значение LD₅₀.

Определение острой токсичности проводили на белых аутбредных мышцах самцах массой 20±2 г, из которых были сформированы 5 групп по 10 животных. 1,3,5-триазины (VI а, б, VII а, б, г, к, VIII а, е) вводили однократно, внутрибрюшинно в интервале доз от 510 до 1700 мг/кг в виде суспензий в смеси диметилсульфоксид (ДМСО) : вода для инъекций (1:5) с использованием в качестве стабилизатора суспензии твин-80 (гидроксиэтилированный сорбитан). Наблюдение за животными осуществляли в течение 72 ч. Регистрировали развитие основных симптомов и время гибели животных.

Экспериментальная среднелетальная доза рассчитана с использованием инсталлированного программного обеспечения «Prism 9.0.1». Прогнозируемые и экспериментальные значения LD₅₀ для некоторых синтезированных 1,3,5-триазинов представлены в таблице 2. Установлено, что прогнозируемые и экспериментальные значения LD₅₀ коррелируют между собой, исследуемые соединения относятся к классу 4 «малотоксичны» и 5 «практически нетоксичны» (классификация по К.К. Сидорову) [71].

Таблица 2 – Прогнозируемые и экспериментальные значения LD₅₀ для некоторых синтезированных 1,3,5-триазинов

Соединение	Прогнозируемое значение LD ₅₀ (мг/кг)	Экспериментальное значение LD ₅₀ (мг/кг)
VI а	641	650
VI б	741	950
VI г	362	440
VII а	1087	1300
VII б	1215	1450
VII к	814	900
VIII а	510	600
VIII е	572	590

Определение минимально подавляющей концентрации (МПК) проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде - мясопептонном бульоне (МПБ) с последующим высевом на агаризованную среду.

Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения (VI а, б, г, й, VII б, VIII й) обладают слабой антимикробной активностью [73].

Активность в отношении грамотрицательных штаммов (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) наиболее выражена у п-метилзамещённого соединения (VIг) (рисунок 9).

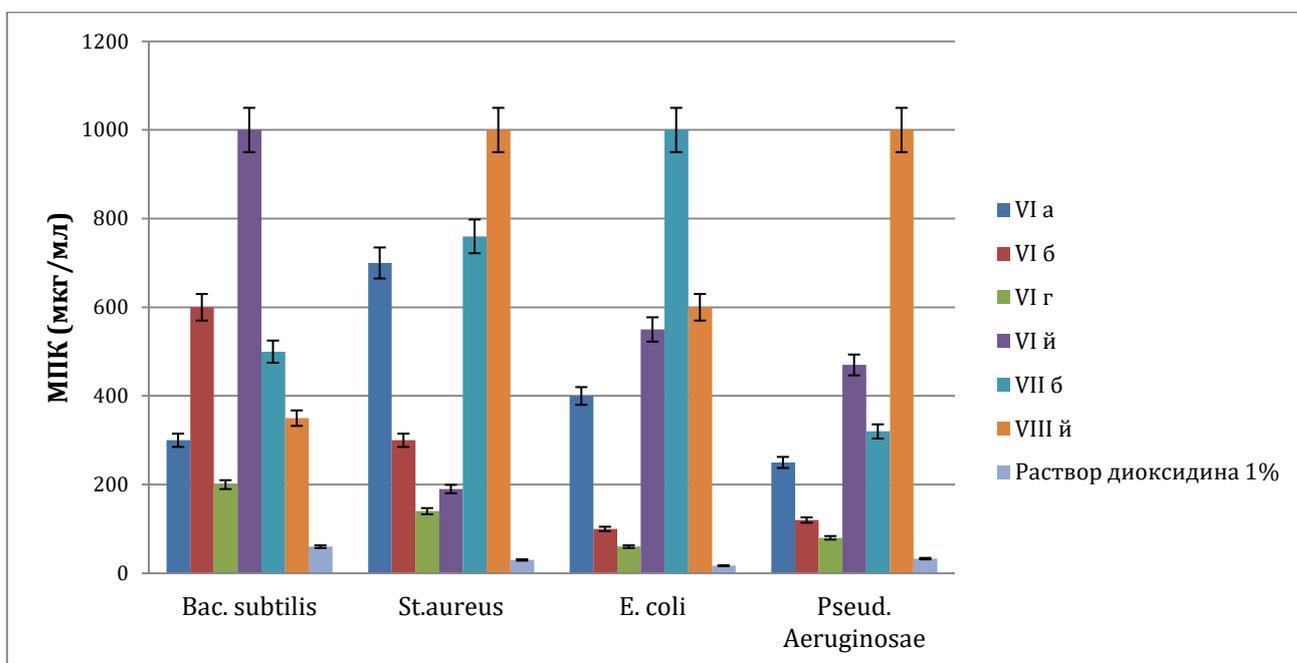


Рисунок 9. Противомикробная активность синтезированных соединений

Определение минимально подавляющей концентрации (МПК) проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде - мясопептонном бульоне (МПБ) с последующим высевом на агар Сабуро.

Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения (VI а, б, г, й, VII б, VIII й) обладают умеренной противогрибковой активностью (таблица 10) [66].

Введение ароматического заместителя в структуру 1,3,5-триазина увеличивает ингибирующую активность в отношении дрожжевой культуры *Sac.cerevisie* (рисунок 10).

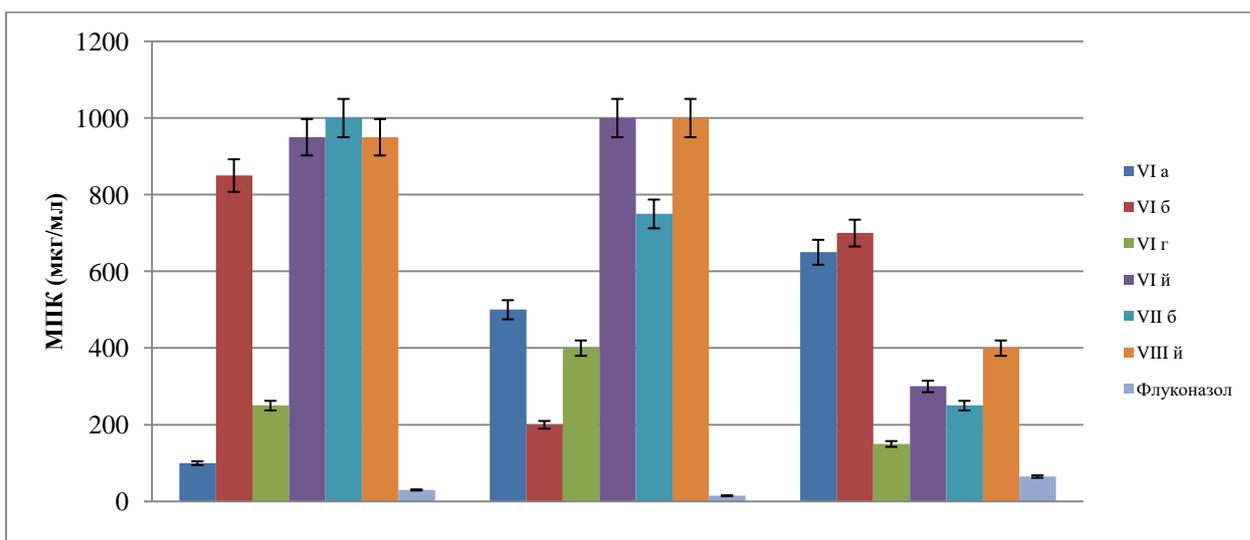


Рисунок 10. Противогрибковая активность синтезированных соединений

Исследование влияния на диурез *in vivo* показало, что исследуемые соединения (VI б; VII а; VIII а, б, г, й) обладают диуретической активностью, особенно в первый час эксперимента, и находятся на одном уровне с препаратами сравнения. Исследуемые соединения находятся на одном уровне с препаратами сравнения. Результаты эксперимента представлены в виде диаграммы динамики диуреза (рисунок 11).

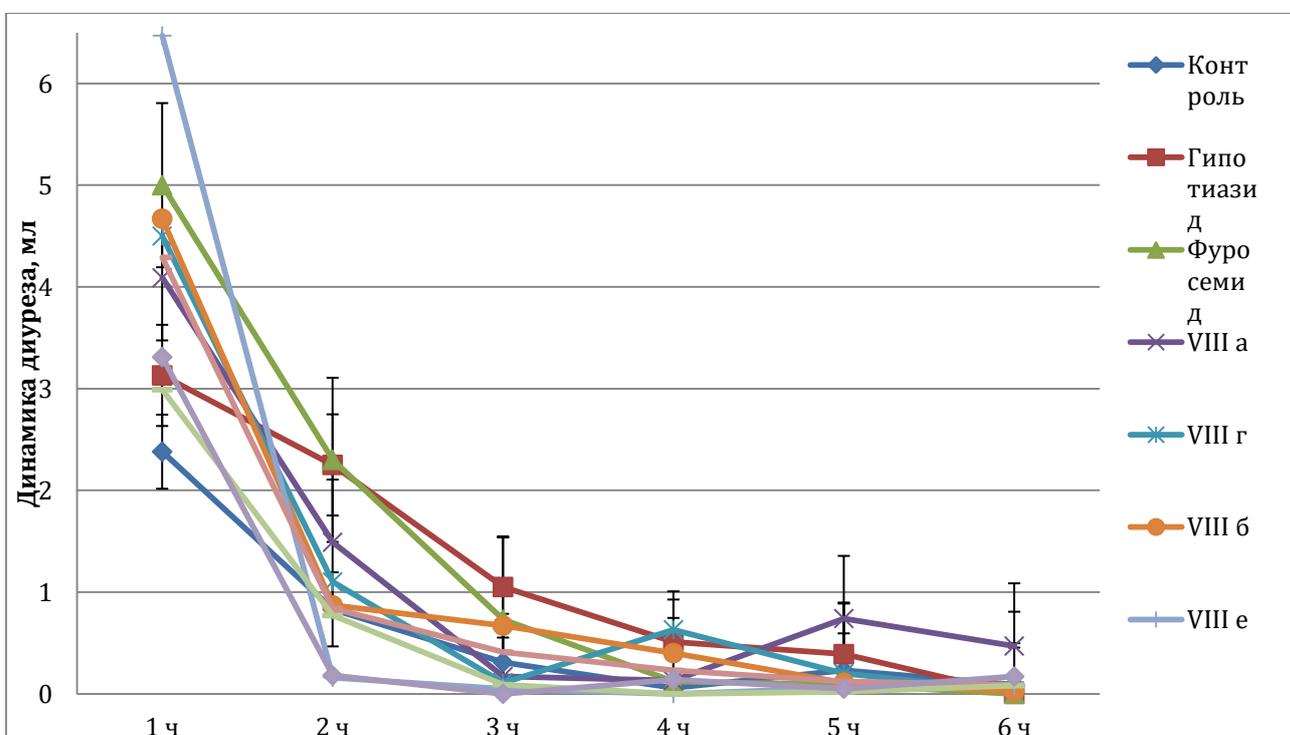


Рисунок 11. Динамика диуреза (мл) изучаемых лекарственных препаратов в течение 6 часов

В качестве опухолевых клеток-мишеней использовали клеточную линию карциномы легкого человека (А-549). Оценку жизнеспособности проводили методом проточной цитофлуориметрии.

По результатам исследования можно сделать вывод, что фармакологический эффект не сильно зависит от концентрации исследуемого вещества: от возрастания дозировки активность не возрастала и не уменьшалась.

Исследование противоопухолевой активности *in vitro* показало, что введение в структуру исследуемого соединения еще одного бензольного кольца (соединение VII б) способствовало увеличению цитотоксичности (практически полное вымирание опухолевой клеточной культуры).

Результаты оценки жизнеспособности клеток карциномы легкого человека (А-549) представлены на рисунке 12.

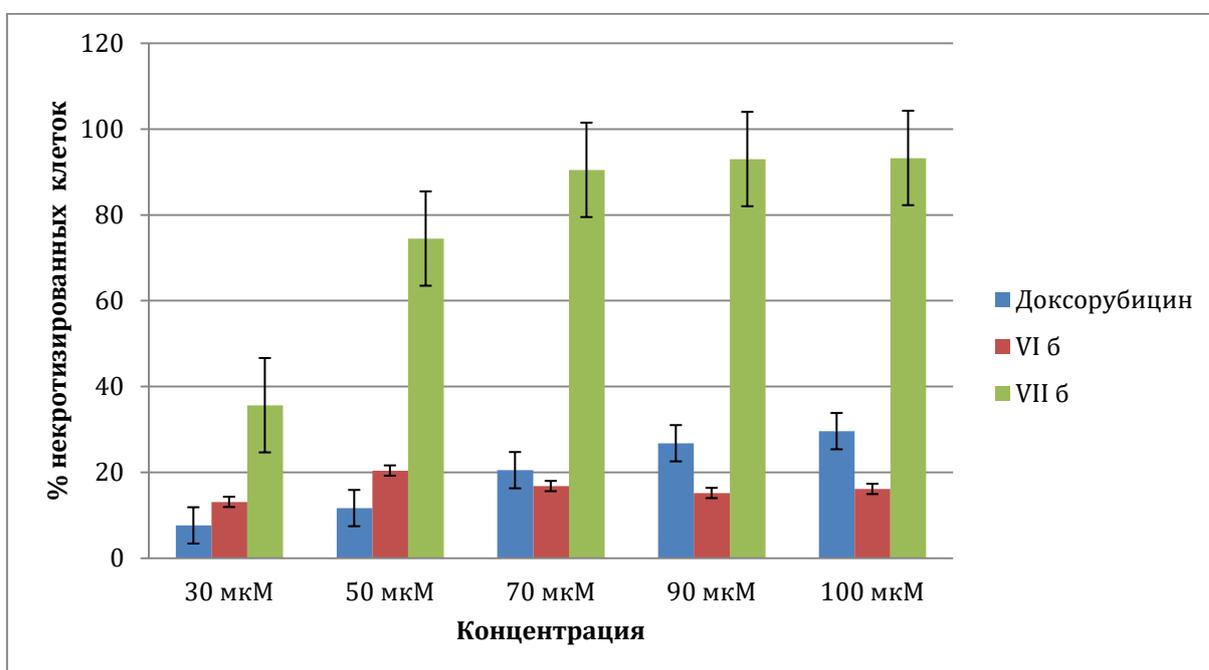


Рисунок 12. Результаты оценки жизнеспособности клеток на этапе «некроз»

ГЛАВА 4. ПАРАМЕТРЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ 2-ФЕНИЛ-4-(4-ХЛОРФЕНИЛ)-6-ЭТИЛ-1,3,5-ТРИАЗИНА

Получен первичный стандартный образец 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазина (VII б) и разработаны основные параметры его аттестации: подтверждена структура, определены такие параметры, как остаточные органические растворители, неорганические примеси (хлориды, сульфатная зола), родственные примеси. Установлено количественное содержание основного компонента с помощью материального баланса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные итоги диссертационной работы сводятся к следующим основным положениям:

1. На основе реакции 2,5-дизамещённых-4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с двуцентровыми 1,3-бинуклеофильными реагентами: алкил- и арилимидамидами, S-метилизотиомочевинной разработаны лабораторные методы получения новых производных 1,3,5-триазины. Установлено, что на выход целевых продуктов и время протекания реакции определяющее влияние оказывает выбор растворителя, электронное строение исходных 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов и 1,3-бинуклеофильных реагентов. Увеличение нуклеофильности амидинов и введение электроноакцепторных заместителей R1 в оксазиновый фрагмент ускоряют реакцию и увеличивают выход целевого продукта. Оптимальным растворителем (метанол, пропанол, ДМСО) для получения целевых 1,3,5-триазинов является ДМСО.

2. Строение и индивидуальность полученных соединений доказано с помощью ЯМР-, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, элементного анализа и ТСХ.

3. Проведен прогноз биологической активности полученных производных 1,3,5-триазины *in silico*. Показано, что с высокой долей вероятности они обладают противомикробной и противоопухолевой активностью.

4. С использованием программы GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships) осуществлен компьютерный скрининг острой токсичности. Установлено, что прогнозируемые и экспериментальные значения LD50 коррелируют между собой. Исследуемые соединения относятся к классу 4 «малотоксичны» и 5 «практически нетоксичны» (классификация по К.К. Сидорову).

5. Выполненные исследования биологической активности синтезированных 1,3,5-триазинов *in vivo* и *in vitro* показывают, что многие из них обладают противогрибковой, противомикробной, диуретической и противоопухолевой активностью, что хорошо согласуется с результатами компьютерного тестирования этих соединений.

6. Получен первичный стандартный образец 2-фенил-4-(4-хлорфенил)-6-этил-1,3,5-триазины. Разработаны основные параметры его аттестации.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Куваева, Е.В. Синтез и оценка противомикробной активности новых производных 1,3,5-триазина / Е.В. Куваева, **П.О. Левшукова**, Д.А. Колесник, Е.Н. Кириллова, И.П. Яковлев, Ю.М. Ладутько // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25, №7. – С. 39-43.
2. **Левшукова, П.О.** Подход к синтезу и изучение фармакологических эффектов новых производных 1,3,5-триазина / **П.О. Левшукова**, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, Е.Н. Кириллова, Д.Ю. Ивкин // Фармация. – 2024. – Т. 73, № 1. – С. 52-56.
3. **Левшукова, П.О.** Реакция 4-гидрокси-6Н-1,3-оксазин-6-онов с имидамидами – путь к получению новых производных 1,3,5-триазина / **П.О. Левшукова**, Д.А. Колесник, М.О. Досина, И.П. Яковлев, Л.А. Тунгускова, Е.В. Куваева, Т.Л. Семакова, Г.В. Ксенофонтова, Ю.Г. Походня // Химия гетероциклических соединений. – 2024. – Т. 60, №1/2. – С. 48-51.
4. **Левшукова, П.О.** Биологическая активность производных 1,3,5-триазина // **П.О. Левшукова**, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, И.П. Яковлев, Г.В. Ксенофонтова // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». – Ташкент: Изд-во ТФИ, 2021. – С. 313-314.
5. **Левшукова, П.О.** Основные подходы к синтезу 1,3,5-триазиновых систем / **П.О. Левшукова**, Д.А. Колесник // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2022. – С. 35–39.
6. **Левшукова, П.О.** Синтез и оценка противомикробной активности новых производных 1,3,5-триазина / **П.О. Левшукова**, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, И.П. Яковлев, Г.В. Ксенофонтова, Т.Л. Семакова // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». – Ташкент: Изд-во ТФИ, 2022. – С. 119.
7. **Левшукова, П.О.** Синтез и оценка противомикробной активности нового производного 1,3,5-триазина / **П.О. Левшукова**, Л.А. Тунгускова, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева // Сборник материалов Научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященной 50-летию кафедры

токсикологической химии, Пермь, 14 - 15 декабря 2022 г. – Пермь: Научно-практический журнал Вестник Пермской государственной фармацевтической академии, 2022. – С. 110-112.

8. **Левшукова, П.О.** Синтез и оценка противомикробной активности нового производного 1,3,5-триазина / **П.О. Левшукова, Л.А. Тунгускова** // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2023. – С. 22–25.

9. **Левшукова, П.О.** Синтез и антифунгальная активность новых производных 2,4-диарил-6-алкил-1,3,5-триазина/ **П.О. Левшукова, Л.А. Тунгускова** // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2024. – С. 66–68.

Патенты:

1. Патент 2812149 С1 Российская Федерация, МПК С07D 251/24 (2006.01) А61К 31/53 (2006.01) А61Р 31/10 (2006.01). 2,4-диарил-6-алкил-1,3,5-триазины и способ их получения / **П.О. Левшукова, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, И.П. Яковлев, Л.А. Тунгускова, Г.В. Ксенофонтова, Е.Н. Кириллова**; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. - № 2023114893; заявл. 06.06.2023; опубл. 23.01.2024.

2. Патент 2825131 С1 Российская Федерация, МПК С07D 251/24 (2006.01) А61К 31/53 (2006.01) А61Р 31/10 (2006.01). Производные 1,3,5-триазина и способ их получения / **П.О. Левшукова, Д.А. Колесник, Е.В. Куваева, И.П. Яковлев, Л.А. Тунгускова, Т.Л. Семакова, М.В. Сопова, И.И. Тернинко**; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. - № 2023114891; заявл. 06.06.2023; опубл. 21.08.2024.