

**АЗИРИДИНСОДЕРЖАЩЕЕ ПРОИЗВОДНОЕ 1,3,5-ТРИАЗИНА  
С ОЛИГО(ЭТИЛЕНГЛИКОЛЕВЫМ) АЗИДНЫМ ЛИНКЕРОМ:  
ОЦЕНКА ДНК-ТРОПНОСТИ И ЦИТОТОКСИЧНОСТИ**

*Чернов И.С., Протас А.В., Попова Е.А., Шемчук О.С.*

**Чернов И.С.**

*Аспирант Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»*

*г. Санкт-Петербург, Россия;*

*научный сотрудник федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»,*

*г. Санкт-Петербург, Россия*

*i.chernov@green-van.ru*

**Протас А.В.**

*Кандидат химических наук, доцент кафедры общей и биоорганической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»,*

*г. Санкт-Петербург, Россия;*

*старший научный сотрудник федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»*

*г. Санкт-Петербург, Россия*

*aleksandra.protas@mail.ru*

**Попова Е.А.**

*доктор химических наук, профессор федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» г. Санкт-Петербург, Россия; заведующая лабораторией химии природных соединений федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»,*

*г. Санкт-Петербург, Россия*

*porova\_e\_a@bk.ru*

**Шемчук О.С.**

*аспирант федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова»*

*г. Санкт-Петербург, Россия;*

*научный сотрудник федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»*

*г. Санкт-Петербург, Россия*

*olja.shemchuk17@gmail.com*

*В работе синтезировано новое бифункциональное соединение — (5-((4-((2-{2-{2-(2-азидоэтокси)этокси}этокси}этил)амино)-6-(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метанол (3), содержащее один*

азиридиновый цикл и азидный полиэтоксиллинкер для последующей конъюгации с векторами адресной доставки методом «клик»-реакции. Структура целевого соединения подтверждена данными  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектроскопии и элементным анализом. Методом УФ-спектрофотометрии оценена константа связывания соединения с ДНК тимуса телёнка ( $K_b=1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), что указывает на умеренную ДНК-тропность. Цитотоксичность была оценена методом МТТ-теста на клеточных линиях НСТ-116 и рака шейки матки HeLa. Соединение 3 проявило незначительную цитотоксичность ( $\text{IC}_{50}=128 \text{ мкМ}$  на линии HeLa), на порядок меньшую, чем у исходного диоксадэа, содержащего два азиридиновых цикла ( $\text{IC}_{50}$  для диоксадэа 11,8 мкМ) [3], а на клеточных линиях НСТ-116 не проявило видимого эффекта.

**Ключевые слова:** 1,3,5-триазин; азиридин; азид; взаимодействие с ДНК; МТТ-тест; цитотоксичность

## **AZIRIDINE-CONTAINING 1,3,5-TRIAZINE DERIVATIVE WITH AN OLIGO(ETHYLENE GLYCOL) AZIDE LINKER: ASSESSMENT OF DNA TROPISM AND CYTOTOXICITY**

**Chernov I.S.**

*Postgraduate Student Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlov" Saint Petersburg, Russia; Research Scientist Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", Saint Petersburg, Russia  
i.chernov@green-van.ru*

**Protas A.V.**

*Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor at the Department of General and Bioorganic Chemistry, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlov" Saint Petersburg, Russia; Senior Research Scientist Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", Saint Petersburg, Russia  
aleksandra.protas@mail.ru*

**Popova E.A.**

*Doctor of Chemical Sciences, Professor Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlov" Saint Petersburg, Russia; Head of the Laboratory of Natural Compounds Chemistry Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", Saint Petersburg, Russia  
popova\_e\_a@bk.ru*

**Shemchuk O.S.**

*Postgraduate Student Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "First Saint Petersburg State Medical University named after Academician I. P. Pavlov" Saint Petersburg, Russia; Research Scientist Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", Saint Petersburg, Russia  
olja.shemchuk17@gmail.com*

*A new bifunctional compound, (5-((4-((2-{2-{2-(2- azidoethoxy)ethoxy}ethoxy}ethyl)amino)-6-(aziridin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-5-yl)methanol (3), containing one aziridine ring and an azide-terminated polyethoxy linker for subsequent conjugation with targeting vectors via click chemistry, has been synthesized. The structure of the target compound was confirmed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>CNMR spectroscopy and elemental analysis. The DNA-binding constant of the compound with calf thymus DNA was determined by UV spectrophotometry ( $K_b=1.13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), indicating moderate DNA tropism. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay on HCT-116 and HeLa cervical cancer cell lines. Compound 3 exhibited low cytotoxicity ( $IC_{50}=128 \mu\text{M}$  on HeLa cells), one order of magnitude lower than that of the parent dioksadet bearing two aziridine rings ( $IC_{50}$  for dioksadet =  $11.8 \mu\text{M}$ ) [3], while no visible effect was observed on HCT-116 cells.*

**Key words:** *1,3,5-triazine; aziridine; azide; interaction with DNA; MTT test; cytotoxicity*

**Введение.** Соединения, содержащие азиридиновые циклы, относятся к классическим ДНК-алкилирующим агентам, широко применяемым в химиотерапии [1, 2]. Они ковалентно связываются с ДНК, преимущественно по N7-положению гуанина, вызывая сшивку цепей и гибель опухолевых клеток [2]. Однако клиническое использование таких препаратов, как тиофосфамид или митомицин С, часто ограничено серьёзной системной токсичностью из-за их неселективного действия на здоровые ткани. Отсутствие избирательности остаётся главной проблемой, сдерживающей дальнейшее развитие этой группы противоопухолевых средств.

В последние годы активно развивается адресная доставка цитостатиков к опухоли, позволяющая повысить терапевтический индекс и снизить побочные эффекты. Введение азидной группы позволяет использовать полученное соединение в реакции азид-алкинового циклоприсоединения с молекулами-векторами для адресной доставки [4]. Ранее в литературе было описано соединение диоксадэт, содержащее два азиридиновых цикла и обладающее выраженной цитотоксичностью [3]. В настоящей работе мы сосредоточились на синтезе соединения, которое одновременно содержит алкилирующий азиридиновый фрагмент и линкер с концевой азидной группой, что обеспечивает возможность его последующей конъюгации с молекулами для адресной доставки. Вместо одного из азиридиновых колец мы ввели линкер с концевой азидной группой и тремя этиленоксидными звеньями. Это позволяет легко конъюгировать полученное со-

единение с алкинил-содержащими векторами [9]. Таким образом, синтезированный (5-((4-((2-{2-[2-(2-азидоэтокси)этокси]этокси}этил)амино)-6-(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метанол сочетает в себе ДНК-алкилирующий фрагмент и линкер для таргетной модификации. Данная работа посвящена его синтезу, характеристике и предварительной оценке свойств.

**Методы и материалы.** Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  регистрировали на спектрометре Bruker Avance III 400 (рабочие частоты 400.13 МГц и 100.61 МГц соответственно) в  $\text{CDCl}_3$  при 298.15 К.

**Синтез (5-[(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)амино]-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метанола (1).** К раствору 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина (1 г, 5,42 ммоль) в ацетоне добавили по каплям раствор трис(гидроксиметил)аминометана (0,61 г, 5,04 ммоль) в ацетоне. Перемешивали 1 ч, внесли каталитическую паратолуолсульфокислоту и безводный  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Контроль ТСХ (хлороформ–метанол, 9,5:0,5). Смесь отфильтровали, фильтрат упарили, очистили колоночной хроматографией (тот же элюент). Соединение 1 – масло желтого цвета (1,52 г, 4,66 ммоль, 86 %).

**Синтез (5-((4-((2-{2-{2-(2-азидоэтокси)этокси}этокси}этил)амино)-6-хлор-1,3,5-триазин-2-ил)амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метанола (2).** К раствору 1 (1,44 г, 4,66 ммоль) в хлороформе добавили по каплям раствор 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этан-1-амина (1,02 г, 4,66 ммоль) и триэтиламина (0,47 г, 4,66 ммоль) в хлороформе. Перемешивали 2 ч при 25 °С, экстрагировали хлороформ–вода. Органический слой высушили ( $\text{CaCl}_2$ ), упарили, очистили колоночной хроматографией (хлороформ–метанол). Соединение 2 – жёлтое масло (1,71 г, 3,50 ммоль, 75 %).

**Синтез (5-((4-((2-{2-{2-(2-азидоэтокси)этокси}этокси}этил)амино)-6-(азиридин-1-ил)-1,3,5-триазин-2-ил)амино)-2,2-диметил-1,3-диоксан-5-ил)метанола (3).** К раствору 2 (1,71 г, 3,5 ммоль) в хлороформе добавили азиридин (35 ммоль, 1,5 г) и триэтиламин. Перемешивали 3 ч при 44 °С, экстрагировали хлороформ–вода, органический слой высушили ( $\text{CaCl}_2$ ), упарили, очистили колоночной хроматографией (хлороформ–метанол). Соединение 3 – жёлтое масло (1,04 г, 2,10 ммоль, 60 %).

$^{13}\text{C}$  NMR (хлороформ-d)  $\delta$ : 26.5 ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ), 40.5 ( $\text{CH}_2(\text{azir})$ ), 50.6 ( $\text{CH}_2\text{-N}_3$ ), 54.4 ( $\text{C-CH}_2\text{OH}$ ), 64.4 ( $\text{CH}_2\text{-C-CH}_2$ ), 65.4 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 70.1 ( $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 70.4 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 70.6 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 77.3 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 98.9 ( $\text{O-C-O}$ ), 165.8 ( $\text{C-NH}$ ), 170.8 ( $\text{C-N}(\text{azir})$ ). Элементный анализ  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_{10}\text{O}_6$ : найдено С 47,69; Н 6,87; N 27,60; О 17,9, вычислено С 47,80; Н 6,82; N 27,88; О 19,10.

**Взаимодействие с ДНК.** Раствор соединения 3 (0,4 мМ в физрастворе, ДМСО  $\leq 0,5$  %) смешивали с ДНК тимуса телёнка (0,38 мМ) при постоянной концентрации 3 и варьируемой ДНК ( $[\text{DNA}]/[3] = 0,5\text{--}2$ ). После инкубации 1 ч регистрировали спектры, параметры связывания рассчитывали по уравнению Вульфа–Шимера [6].

**Цитотоксичность (МТТ).** Клетки НСТ-116 и HeLa высевали в 96-луночные планшеты ( $5 \times 10^3$ /лунку). Через 12 ч среду заменяли на свежую, инкубировали 48 ч, затем добавляли МТТ-реагент (0,02 мл, 5 мг/мл). Через 1 ч формазан

растворяли в ДМСО и измеряли оптическую плотность при 540 нм (фон 690 нм). Данные ( $n=5$ ) обрабатывали статистически, различия значимы при  $p<0,05$  [7,8].

**Обсуждение полученных результатов.** На первом этапе 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин ввели в реакцию с трис(гидроксиэтил)аминометаном, что привело к замещению одного атома хлора на аминогруппу. Добавление каталитических количеств пара-толуолсульфокислоты и безводного сульфата натрия вызвало ацетализацию с ацетоном, формируя диоксанный цикл (1). Далее один из оставшихся атомов хлора замещали азидным полиэтоксиланкером (триэтиламин), получив соединение 2 (выход 75%). На заключительной стадии оставшийся атом хлора замещали избытком азиридина (хлороформ, 44 °С, 3 ч). После колоночной хроматографии целевое соединение 3 выделили в виде жёлтого масла с выходом 60%. Структура 3 подтверждена данными ЯМР и элементного анализа.

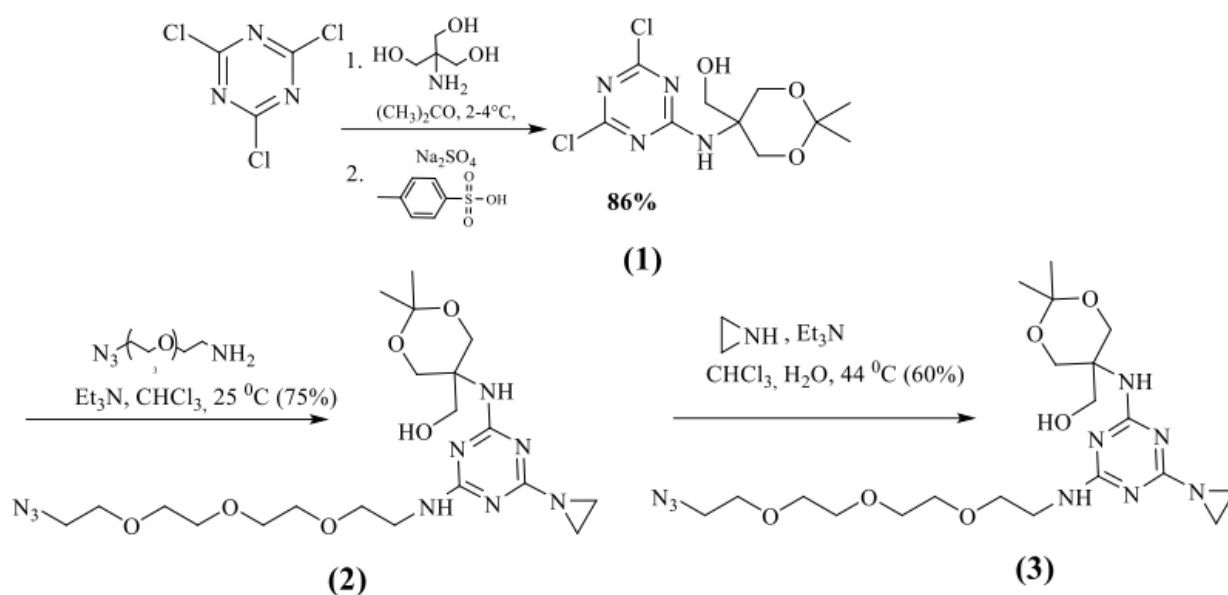


Схема 1. Синтез целевого соединения 3

В  $^1\text{H}$  ЯМР-спектре ( $\text{CDCl}_3$ ) синглет при 1.44 м.д. (6H) соответствует метильным группам диоксана, а синглет при 2.27 м.д. (4H) — азиридиновому кольцу. Мультиплет 3.40–3.85 м.д. (14H) относится к протонам PEG-3 и  $\text{CH}_2\text{OH}$ , синглет 3.89 м.д. (4H) — к  $\text{CH}_2\text{—O—C}$  диоксана. Синглет 5.83 м.д. (1H) отвечает  $\text{NH}$ -связи между триазином и диоксановым заместителем. Отсутствие сигналов в области 6–8 м.д. свидетельствует о полном замещении хлора.

В  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектре ( $\text{CDCl}_3$ ) наблюдаются сигналы: 26.5 ( $(\text{CH}_3)_2\text{C}$ ), 40.5 ( $\text{CH}_2$  азиридина), 50.6 ( $\text{CH}_2\text{—N}_3$ ), 54.4 ( $\text{C—CH}_2\text{OH}$ ), 64.4 и 65.4 (метилены диоксана), 70.1–70.6 (этиленоксидные фрагменты), 98.9 ( $\text{O—C—O}$ ), 165.8 ( $\text{C—NH}$ ) и 170.8 м.д. ( $\text{C—N}(\text{azir})$ ). Отсутствие пиков в области 120–140 м.д. подтверждает отсутствие непрореагировавших хлорпроизводных.

**Взаимодействие с ДНК.** Поскольку соединение 3 содержит азиридиновый цикл и относится к ДНК-алкилирующим агентам, его цитотоксическое действие реализуется через взаимодействие с ДНК. В связи с этим была оценена константа связывания  $K_b$  соединения 3 с ДНК.

Взаимодействие 3 с ДНК тимуса телёнка исследовали методом УФ-спектрофотометрии в 0,9 % растворе NaCl [5, 6]. При добавлении ДНК (6,25–100,0 мкМ в пересчёте на пары оснований) к раствору 3 (25 мкМ) наблюдали закономерные изменения спектра поглощения (рис. 1). Константу связывания  $K_b$  рассчитывали по модели Вульфа–Шимера [6]:

$$\frac{[DNA]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[DNA]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)},$$

где  $[DNA]$  — концентрация ДНК,  $\varepsilon_a$  — кажущаяся молярная экстинкция при данной концентрации ДНК,  $\varepsilon_f$  — молярная экстинкция свободного соединения 3, а  $\varepsilon_b$  — молярная экстинкция формы соединения, полностью связанной с ДНК.

Рассчитанное значение  $K_b$  составило  $1,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , что свидетельствует об умеренном связывании соединения 3 с ДНК.

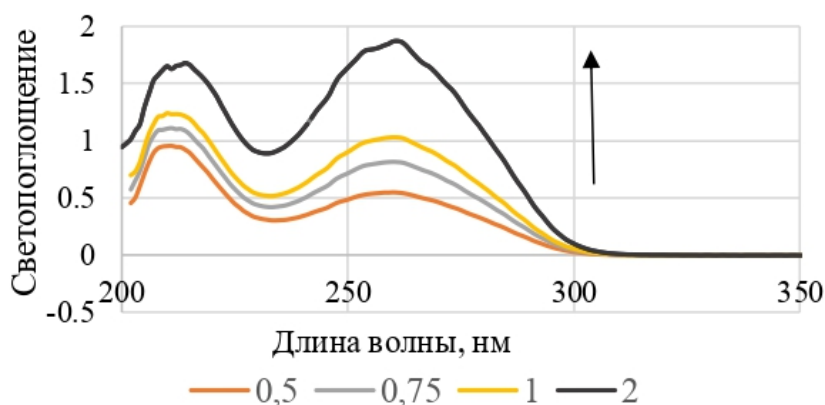


Рис. 1. График зависимости  $[DNA]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$  от  $[DNA]$  при молярных соотношениях  $[DNA]/[3]=0,5; 0,75; 1; 2$

**Исследование цитотоксичности.** Соединение 3 слабо ингибировало клетки HeLa ( $IC_{50} = 128 \pm 1,3 \text{ мкМ}$ ) — на порядок выше, чем у диоксадэты (11,8 мкМ) [3], и не проявляло активности на линии НСТ-116. Полученные данные свидетельствуют, что одного азиридинового цикла недостаточно для образования стабильных межцепочечных сшивок ДНК, критически важных для гибели опухолевых клеток. Моноазиридиновые производные, вероятно, вызывают только моноалкилирование, эффективно устраняемое репарацией, что и приводит к резкому падению цитотоксичности. Следовательно, для сохранения высокой противоопухолевой активности и возможности адресной доставки необходимо сохранять оба азиридиновых фрагмента, а линкер (например, азидный) вводить дополнительно, не замещая алкилирующие центры. Только такая конструкция обеспечит эффективное сшивание ДНК и платформу для конъюгации с векторными молекулами.

**Заключение.** Синтезированное соединение с одним азиридиновым циклом и азидсодержащим линкером проявило лишь незначительный противоопухолевый эффект, существенно уступая диоксадэту, содержащему два азиридиновых фрагмента ( $IC_{50}$  11,8 мкМ для линии рака шейки матки HeLa). Таким образом,

хотя введение азидного линкера открывает путь к адресной доставке, замена одного из двух азиридинов на полиэтитоксильный фрагмент приводит к потере противоопухолевой активности. Для сохранения высокого цитотоксического потенциала необходимо сохранять оба азиридиновых кольца, а азидную группу вводить за счёт дополнительной модификации, не затрагивающей алкилирующие центры. Данное исследование подчёркивает ключевую роль двух азиридиновых циклов при создании конъюгатов для таргетной терапии.

#### **Список литературы**

1. Giraldi T., Nisi C., Sava G. Antitumor aziridines: a review of structure-activity relationships. // *Medicinal Research Reviews*. – 1981. – Vol. 1, No. 3. – P. 221-250.
2. Singh R.K., Kumar S., Tomar R. et al. DNA alkylating agents in cancer therapy: from past to future. // *Current Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 22, No. 30. – P. 3483-3510.
3. Popova E.A., Protas A.V. и др. Synthesis and cytotoxicity of novel dioksadet derivatives with two aziridine rings. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2020. – Vol. 46, No. 5. – P. 789-795.
4. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2001. – Vol. 40, No. 11. – P. 2004-2021.
5. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – Chapter 8. – 400 p.
6. Wolfe A., Shimer G.H., Meehan T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into DNA. // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26, No. 20. – P. 6392-6396.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65, No. 1-2. – P. 55-63.
8. Freshney R.I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 7th ed. – Hoboken: Wiley-Blackwell, 2016. – Chapter 20. – 688 p.
9. Pérez B.C., Teixeira C., Gomes P. et al. Polyethylene glycol linkers in drug conjugates: impact on solubility, stability and bioactivity. // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 144. – P. 476-489.