



ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1 СРЕДИ 5-(4-ГАЛОГЕНФЕНИЛ)-5-ОКСОПЕНТИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ

© 2014 г. В. В. Комиссаров*, Е. С. Княжанская**, А. В. Агрохова**,
М. Б. Готтих**, А. М. Крицын*,#

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ул. Вавилова, 32

**МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет и Научно-исследовательский
институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991, Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 19.12.2013 г. Принята к печати 24.01.2014 г.

Посредством алкилирования урацила, тимина, цитозина, аденина, 6-хлорпурина и 2-амино-6-хлорпурина 5-хлор-1-(4-галогенфенил)пентаноами-1 получены новые полиметиленовые производные нуклеиновых оснований, изучены их физико-химические свойства. Исследовано влияние синтезированных соединений на активность интегразы ВИЧ-1.

Ключевые слова: нуклеозиды, полиметиленовые аналоги, алкилирование, интегразы ВИЧ-1.

DOI: 10.7868/S0132342314050091

ВВЕДЕНИЕ

На основе негликозидных аналогов нуклеозидов создан ряд лекарственных препаратов, успешно применяемых в терапии различных заболеваний человека. В качестве примеров можно привести негликозидные производные гуанина, используемые для лечения герпесных инфекций. Так, 2НМ-НВГ эффективен в отношении вируса *Varicella zoster*, пенцикловир эффективен в отношении *Herpes simplex* (типы 1 и 2) и *V. zoster*, вируса Эпштейна-Барр, а также цитомегаловируса [1].

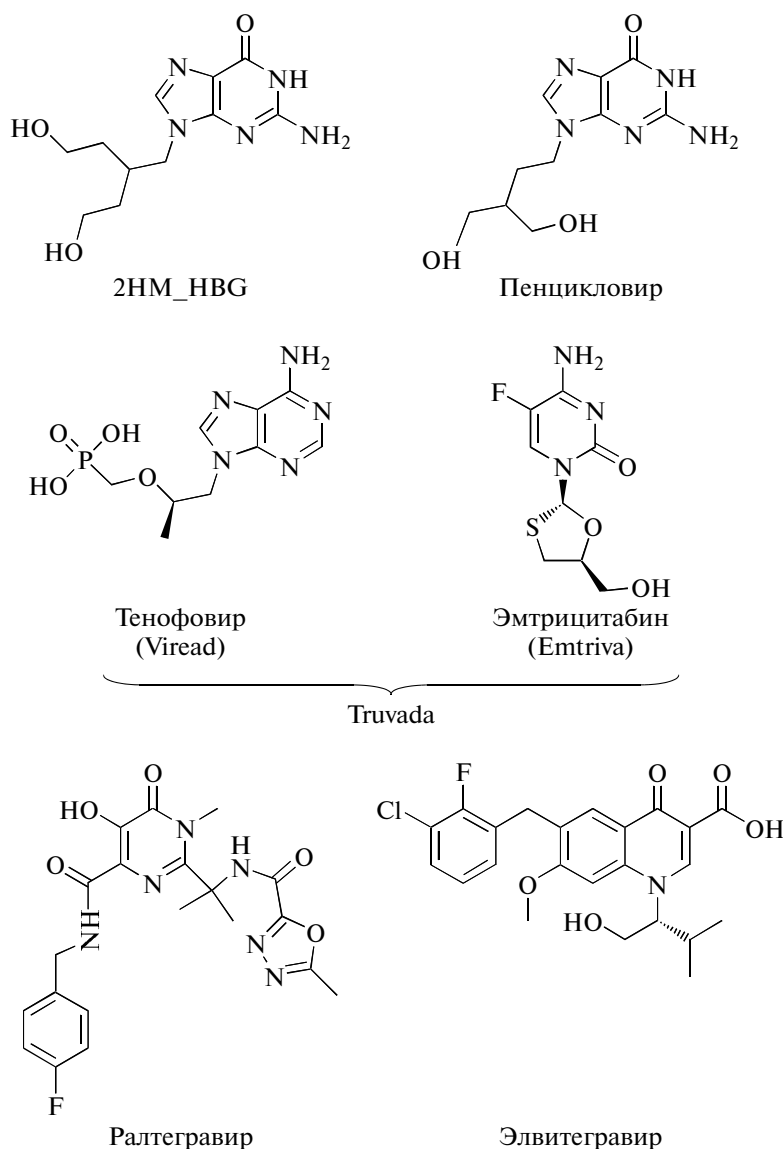
Производные нуклеиновых оснований находят применение при лечении ВИЧ-инфекции: наряду с традиционными препаратами нуклеозидной природы (азидотимидин, дидезоксиинозин, дидезоксицитидин, эмтрицитабин, тенофовир), связывающимися в активном центре обратной транскриптазы ВИЧ-1, активно изучаются ненук-

леозидные ингибиторы семейства НЕРТ [2], связывающиеся в гидрофобном кармане вблизи активного центра этого фермента [3].

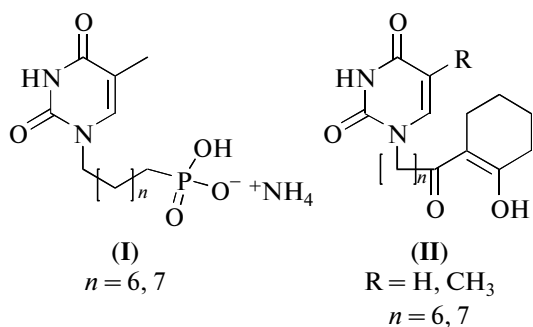
Кроме того, негликозидные производные гетероциклических оснований являются удобной моделью для изучения механизмов действия различных ферментов, связанных с нуклеиновым обменом. Среди подобных соединений большое внимание привлекают производные как природных, так и модифицированных азотистых оснований, несущие в ω-положении гидрофобной углеводородной цепи различные функциональные группы. Так некоторые соединения, структура которых представлена общей формулой (I), оказались эффективными ингибиторами тимидинфосфорилазы *E. coli* [4]. Аналог этого фермент в организме человека вовлечен в процессы ангиогенеза и апоптоза [5]. Соединения (II), синтез и свойства которых описаны нами ранее [6], оказались способны ингибировать как тимидин-, так и уридинфосфорилазу *E. coli* с эффективностью, сравнимой с эффективностью известных ингибиторов этих ферментов.

Сокращения: DBU – 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа.

Автор для связи (тел., факс: +7 (499) 135-14-05; эл. почта: amk@eimb.ru).



Формула 1. Некоторые ингибиторы обратной транскриптазы и интегразы ВИЧ-1.



Формула 2. Ингибиторы тимидин- и уридинфосфорилаз.

Аналогичные производные аденина и гипоксантина с углеводородной цепью длиной в 9 ато-

мов проявляют цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток линий K562 и НСТ116 [7].

Нами ранее были описаны ω -оксо- ω -фенил-алкил-пиримидины и пурины с различной длиной полиметиленовой цепи [8]. В работах [9, 10] было показано, что полиметиленовые производные гетероциклических оснований, в ω -положении которых находится гидроксильная, алкокси-карбонильная или карбоксильная группы, могут успешно применяться для изучения таких важных ферментов, как топоизомераза I человека и/или обратная транскриптаза ВИЧ-1. Еще одним ключевым ферментом ВИЧ-1 является его интеграз, которая осуществляет встраивание вирусной ДНК в геном зараженной клетки [11].

Первым разрешенным к применению в терапии ВИЧ-инфекции ингибитором интегразы является препарат ралтегравир [12]. Важнейший элемент его структуры сконструирован на основе пиримидинового цикла и отвечает за связывание ионов металла в активном центре фермента [13]. Вторым важным структурным элементом ралтегравира является *n*-фторфенильный заместитель [14]. Необходимо отметить, что галогенированный ароматический остаток присутствует в структуре большинства эффективных ингибиторов интегразы ВИЧ-1 [15]. Обычно в роли галогена выступает фтор, однако некоторые ингибиторы (элвитегравир, МК-2048) содержат также атом хлора.

В свете изложенного представлялось целесообразным установить, влияют ли на активность интегразы ВИЧ-1 производные нуклеиновых оснований, в ω -положении полиметиленовой цепи

которых находится *n*-галогенфеноновый фрагмент.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании ставилась задача получить соединения (IVa–v)–(IXa–v), в которых гетероциклическое основание **B** соединялось с *n*-галогенфеноновым фрагментом цепью из четырех метиленовых звеньев (схема). На основе шести гетероциклических оснований – тимина, урацила, цитозина, аденина, гуанина и гипоксантина – было получено шесть серий соединений (IVa–v)–(IXa–v). Поскольку непосредственная роль атома галогена в ингибирующем действии блокаторов интегразы не ясна, в каждой серии было получено по три соединения, содержащих в *para*-положении ароматического кольца атомы разных галогенов – фтор, хлор и бром.

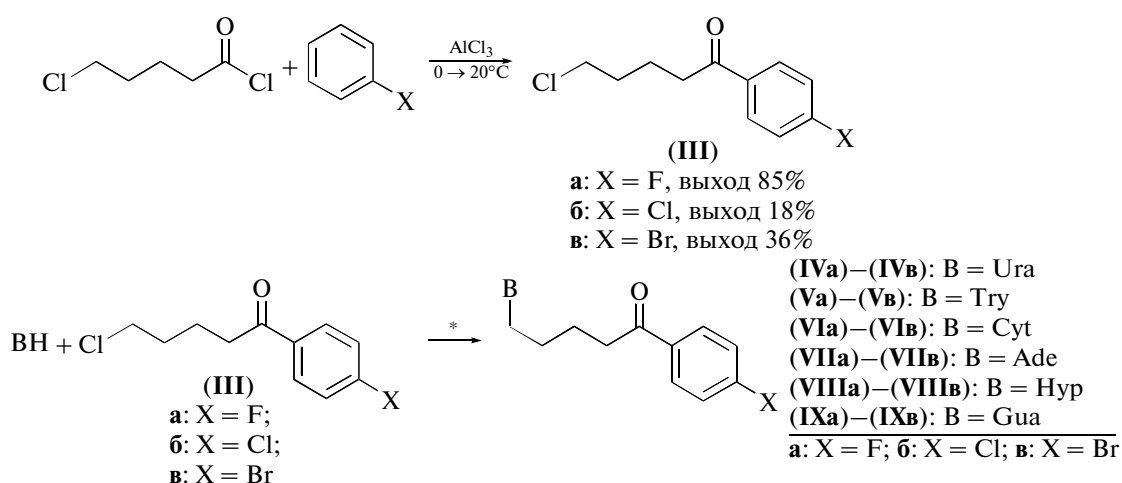


Схема. Схема синтеза производных гетероциклических оснований с концевой (*para*-галогенфенил)кетогруппой.

Синтез целевых соединений осуществляли в соответствии со схемой. Исходными алкилирующими реагентами служили соединения (III). Они были получены по реакции Фриделя-Крафтса ацилированием фтор-, хлор- или бромбензола хлорангидридом δ -хлорпентановой кислоты аналогично процедуре, описанной в работе [16]. В качестве катализатора использовался хлорид алюминия. В отличие от бензола, ацилирование галогенбензолов протекает медленнее и со значительным осмолением реакционной массы [17], что существенно понижает выходы конечных продуктов.

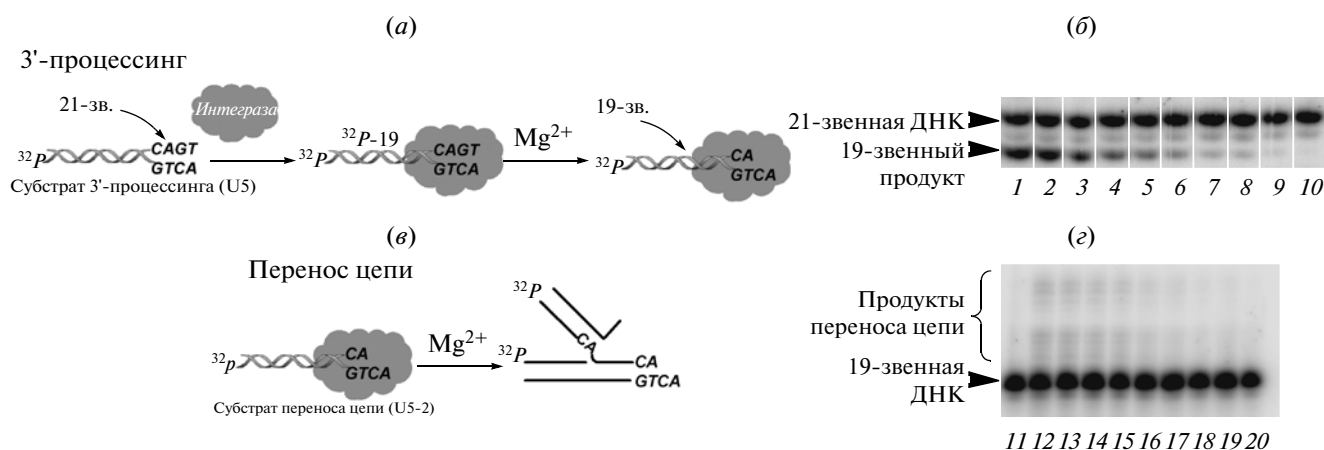
Алкилирование гетероциклических оснований осуществляли по ранее разработанному методу нагреванием смеси пиримидинового или пуринового основания, соединения (III) и DBU в диметилформамиде (метод А). Для синтеза производных цитози-

на мы применяли метод алкилирования его Na-соли в диметилформамиде (метод Б).

Конечные продукты выделяли колоночной хроматографией на силикагеле. Их строение подтверждено масс-спектрами и данными УФ- и ЯМР-спектроскопии.

При алкилировании урацила и тимина, помимо 1-замещенных производных, также в небольших количествах образовывались 1,3-бис-замещенные пиримидины. Основным продуктом алкилирования аденина являлся его 9-замещенный изомер, но, как и ожидалось [18], в незначительных количествах были выделены 3-замещенные производные. Для алкилирования гипоксантина наблюдалась типичная картина: помимо 9-замещенного изомера образовывалось 7-замещенное производное, от которого в случае соединения (VIIa) избавлялись многократной кристаллизацией из этилацетата. Эта процедура достаточно

* Условия см. экспериментальную часть.



Тестирование влияния соединения (IXб) на активность интегразы ВИЧ-1 в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи. (а) Схема реакции 3'-процессинга, катализируемой ИН ВИЧ-1 *in vitro*. (б) Репрезентативная ауторадиограмма анализа ингибирования реакции 3'-процессинга возрастающими концентрациями соединения (IXб) в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Дорожка 1 – нет ингибитора, дорожки 2–10 – возрастающие концентрации ингибитора, указанные в табл. 1. (в) Схема реакции переноса цепи, катализируемой интегразы ВИЧ-1 *in vitro*. (г) Репрезентативная ауторадиограмма анализа ингибирования реакции переноса цепи возрастающими концентрациями соединения (IXб) в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7 М мочевины). Дорожка 11 – нет ингибитора, дорожки 12–20 – возрастающие концентрации ингибитора, указанные в табл. 1.

трудоёмкая, поэтому для получения производных (VIIIб) и (VIIIв) мы применяли алкилирование 6-хлорпурина с последующим гидролизом (см. эксперимент. часть).

В ЯМР-спектрах синтезированных соединений четко различимы три группы сигналов: сигналы атомов остатка азотистого основания, сигналы атомов полиметиленовой цепи и сигналы арильного радикала (см. эксперимент. часть). В случае серии производных фторбензола (IVа)–(IXа) и ^1H -, и ^{13}C -спектры характеризуются дополнительным расщеплением сигналов атомов ароматического радикала, обусловленным их спин-спиновым взаимодействием с атомом фтора.

ЯМР-спектры синтезированных соединений позволяют однозначно установить положение заместителя при гетероциклическом основании, благодаря существенно различающимся наборам химических сдвигов атомов азотистого основания и атомов первого метиленового звена боковой цепи для различных изомеров положения. Характерные различия в спектрах 3- и 9-замещенных производных аденина были описаны А. Голи в статье [18]. Не менее существенные различия наблюдаются для 7- и 9-замещенных производных гипоксантина и гуанина. Благодаря этому достаточно однократно установить положение боковой цепи при пуриновом ядре методом НМВС (гетероядерной ЯМР-спектроскопии дальнего взаимодействия), чтобы в дальнейшем однозначно приписывать строение изомерным пуриновым производным на основании одномерных ЯМР-спектров.

Для исследования способности синтезированных соединений ингибировать интегразу ВИЧ-1 были выбраны 1-замещенные изомеры пиримидинового ряда и 9-замещенные изомеры пуринового ряда, обладающие наилучшей растворимостью среди синтезированных производных. Анализ ингибирующего действия этих соединений проводили по стандартной методике [19]. При репликации вируса интеграза катализирует две реакции: 3'-концевой процессинг, в результате которого с обоих 3'-концов вирусной ДНК удаляется динуклеотид GT, и перенос цепи, в ходе которого происходит встраивание вирусной ДНК в клеточную. Способность *n*-галогенфеновых производных гетероциклических соединений подавлять каталитическую активность интегразы была исследована в обеих реакциях с использованием рекомбинантного белка и ДНК-дуплексов U5B/U5A и U5B-2/U5A, соответствующих концевому участку U5 фрагмента длинного концевого повтора вирусной ДНК до и после отщепления динуклеотида GT. Соответственно, дуплекс U5B/U5A представлял собой субстрат интегразы в реакции 3'-концевого процессинга, а дуплекс U5B-2/U5A – в реакции переноса цепи. Необходимо отметить, что интеграза взаимодействует с клеточной ДНК, независимо от ее первичной структуры, поэтому, осуществляя реакцию переноса цепи, фермент может встраивать субстрат U5B-2/U5A в любую ДНК, в том числе и в сам этот субстрат. Схемы реакций 3'-процессинга и переноса цепи с использованием указанных субстратов приведены на рисунке, а и в.

Выходы реакций 3'-процессинга и переноса цепи при различных концентрациях соединения (IXб). Эффективность реакций представлена относительно реакции в отсутствие ингибитора

Ингибирование реакции 3'-процессинга			Ингибирование реакции переноса цепи		
номер дорожки на рисунке, б	концентрация (IXб), мкМ	эффективность реакции, %	номер дорожки на рисунке, г	концентрация (IXб), мкМ	эффективность реакции, %
2	200	81.27 ± 14.3	11	10	98.04 ± 16.6
3	350	70.02 ± 14	12	100	80.88 ± 15.3
4	500	52.76 ± 12.1	13	200	60.19 ± 13.3
5	750	34.2 ± 6.8	14	300	50.98 ± 10
6	900	17.76 ± 3.7	15	400	39.22 ± 8.5
7	1100	9.4 ± 1.2	16	500	26.08 ± 5.2
8	1300	3.27 ± 0.5	17	750	22.94 ± 1
9	1500	2.81 ± 0.52	18	1000	17.65 ± 2.9

Ни одно из 1-замещенных производных пиридинового ряда вплоть до 1 мМ концентрации не ингибировало каталитическую активность интегразы ни в одной из реакций. Аналогичные соединения аденина и гипоксантина также не проявляли ингибирующей активности в исследованном интервале концентраций (10–1500 мкМ). В то же время С1-производное гуанина (IXб) оказалась ингибитором обеих катализируемых интегразой реакций (рисунки б и г, таблица). При этом эффективность ингибирования реакции переноса цепи была несколько выше, чем 3'-процессинга: концентрация соединения (IXб), при которой эффективность реакции снижалась на 50% (IC₅₀), составила 516 ± 107 мкМ для 3'-процессинга и 284 ± 59 мкМ для переноса цепи.

Мы в своей работе отталкивались от структуры ралтегравира, который является ингибитором реакции переноса цепи (IC₅₀ для 3'-процессинга – 0.5 мкМ, для переноса цепи – 0.01 мкМ [20]), поэтому приятно отметить, что соединение (IXб) также более эффективно ингибировало эту реакцию. Интересно, что аналоги этого соединения, содержащие атомы фтора (IXа) и брома (IXв), оказались неэффективны в качестве ингибиторов интегразы. Однако роль атома галогена, присутствующего в структуре практически всех ингибиторов переноса цепи [15], в механизме ингибирования интегразы пока до конца не ясна [21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аденин, гипоксантин, гуанин, урацил, тимин, цитозин, 6-хлорпурин, 2-амино-6-хлорпурин (Sigma, США); 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU), гидрид натрия, 60% суспензия в минеральном масле (Fluka, Швейцария); CDCl₃, DMSO-d₆, фторбензол, хлорбензол, бромбензол, хлорид алюминия (Acros Organics, Бельгия), хлорангидрид 5-хлорпентановой

кислоты получен по методике [16]. Очистку и абсолютирование растворителей проводили по стандартным методикам [22]. ТСХ выполняли на пластинках Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия), используя системы: хлороформ–этанол: 19:1 (1); 18:2 (2); 17:3 (3); 19.5:0.5 (4). Соединения на хроматограммах обнаруживали по УФ-поглощению при 254 нм. Колоночную хроматографию проводили на силикагеле 60 (0.040–0.063 мм) (Merck, Германия).

Масс-спектры получали на приборе MS-30 (Kratos, Япония); метод ионизации – электронный удар. Спектры ЯМР регистрировали (δ, м.д.; КССВ, Гц) на спектрометре Bruker AMXIII-400 (Германия) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H-спектров и 100 МГц для ¹³C-спектров при 300 К в CDCl₃ и DMSO-d₆.

Рекомбинантная интеграза ВИЧ-1 была выделена из штамма-продуцента Rosetta *Escherichia coli* и очищена без добавления детергента, как описано в работе [23].

Олигонуклеотиды U5B (5'-GT-GTGGAAAATCTCTAGCAGT-3'), U5B-2 (5'-GT-GTGGAAAATCTCTAGCA-3') и U5A (5'-ACT-GCTAGAGATTTTCCACAC-3') синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК синтезаторе ABI 3400 (Applied Biosystems, США) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов (Glen Research, США).

Получение 5-галоген-1-(4-фторфенил)пентанов-1 (IIIа)-(IIIв). К охлажденному до 0°C раствору 43.3 г (50 ммоль) хлорангидрида 5-хлорпентановой кислоты в 20 мл соответствующего сухого галогенбензола при перемешивании прибавляли порциями 6.7 г (50 ммоль) безв. хлорида алюминия. Полученный раствор перемешивали 30 мин при 0°C и 1 ч при комнатной температуре, а затем выливали в 150 г льда. Органический слой отделяли, водный экстрагировали

хлористым метиленом (3 × 15 мл), экстракты объединяли, промывали 20 мл насыщ. раствора бикарбоната натрия, сушили безв. сульфатом натрия и упаривали растворитель. Остаток хроматографировали на колонке (5 × 10 см) с 70 г силикагеля, элюент — хлористый метилен.

5-Хлор-1-(4-фторфенил)пентанон-1 (IIIa). Получен с выходом 85%, т. кип. 135–137°C (1 мм рт. ст.) Масс-спектр: m/z 214.7 [M^+]. Рассчитана M 214.7 ($C_{11}H_{12}ClFO$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.65–1.85 (4 H, м, $CH_2CH_2CH_2Cl$); 2.86 (2 H, т, J 6.8, $COCH_2$); 3.45 (2 H, т, J 6.2, CH_2Cl); 6.99 (2 H, дд, $J_{m-H, o-H}$ 8.7, $J_{m-H, F}$ 8.7, м-Н, PhF); 7.86 (2 H, дд, $J_{o-H, m-H}$ 8.7, $J_{o-H, F}$ 5.3, о-Н, PhF). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 21.38 (CH_2CH_2CO); 31.95 (CH_2CH_2Cl); 37.34 ($COCH_2$); 44.65 (CH_2Cl); [115.50 (2 C, д, $J_{3-C, F}$ 22.1, C3 и C5); 130.54 (2 C, д, $J_{2-C, F}$ 9.1, C2 и C6); 133.30 (C1); 165.56 (1 C, д, $J_{4-C, F}$ 254.1, C4)] (C_6H_4F); 197.69 (CO).

5-Хлор-1-(4-хлорфенил)пентанон-1 (IIIб). Получен с выходом 49%. Масс-спектр: m/z 231.1 [M^+]. Рассчитана M 231.1 ($C_{11}H_{12}Cl_2O$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.80–1.95 (4 H, м, $CH_2CH_2CH_2Cl$); 2.97 (2 H, т, J 6.8, $COCH_2$); 3.57 (2 H, т, J 6.2, CH_2Cl); 7.42 (2 H, д, $J_{m-H, o-H}$ 8.7, м-Н, PhCl); 7.88 (2 H, д, $J_{o-H, m-H}$ 8.7, о-Н, PhCl). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 21.43 (CH_2CH_2CO); 31.97 (CH_2CH_2Cl); 37.52 ($COCH_2$); 44.59 (CH_2Cl); [128.19 (2 C, C3 и C5); 129.40 (2 C, C2 и C6); 135.19 (C1); 139.50 (C4)] (C_6H_4Cl); 198.25 (CO).

5-Хлор-1-(4-бромфенил)пентанон-1 (IIIв). Получен с выходом 39%. Масс-спектр: m/z 275.6 [M^+]. Рассчитана M 275.6 ($C_{11}H_{12}ClBrO$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.75–1.95 (4 H, м, $CH_2CH_2CH_2Cl$); 2.96 (2 H, т, J 6.8, $COCH_2$); 3.57 (2 H, т, J 6.1, CH_2Cl); 7.59 (2 H, д, $J_{o-H, m-H}$ 8.6, о-Н, PhBr), 7.80 (2 H, д, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, м-Н, PhBr). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 21.52 (CH_2CH_2CO); 32.06 (CH_2CH_2Cl); 37.61 ($COCH_2$); 44.68 (CH_2Cl); [128.32 (C4); 129.62 (2 C, C2 и C6); 132.02 (2 C, C3 и C5); 135.69 (C1);] (C_6H_4Br); 198.55 (CO).

Алкилирование гетероциклических оснований с использованием DBU (метод А). К суспензии 5 ммоль нуклеинового основания или его защищенного производного в 10 мл абсолютного DMF прибавляли 5.5 ммоль соответствующего алкилирующего реагента и 0.78 мл (5.5 ммоль) DBU. Смесь нагревали 20 ч при 80–100°C, ход реакции контролировали с помощью ТСХ. Реакционную смесь охлаждали и упаривали в вакууме. Остаток суспендировали в минимальном объеме хлористого метилена и хроматографировали на колонке (5 × 10 см) с 70 г силикагеля, элюент — градиент этанола в хлористом метилена (0 → 20%). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, остаток перекристаллизовывали.

Алкилирование натриевой соли цитозина (метод Б). К суспензии 0.55 г (5 ммоль) цитозина в 10 мл абсолютного DMF при перемешивании порциями прибавляли 0.21 г (5.2 ммоль) 60% суспензии гидроксида натрия в минеральном масле. После получасового перемешивания реакционной смеси прибавляли 5.5 ммоль соответствующего алкилирующего реагента. Смесь нагревали 20 ч при 80–100°C, ход реакции контролировали с помощью ТСХ в подходящей системе. Реакционную смесь охлаждали и упаривали в вакууме. Остаток суспендировали в минимальном объеме хлористого метилена и хроматографировали на колонке (5 × 10 см) с 70 г силикагеля, элюент — градиент этанола в хлористом метилена (0 → 20%). Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали, остаток перекристаллизовывали.

1-[5-(4-Фторфенил)-5-оксопентил]урацил (IVa). Получен по методу А с выходом 28%, R_f 0.25 (19.5 : 0.5), т. пл. 101–102°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 290.3 [M^+], 291.3 [$M + H^+$]. Рассчитана M 290.3 ($C_{15}H_{15}FN_2O_3$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.68–1.83 (4 H, м, H2' и H3'); 2.99 (2 H, т, J 6.4, H4'); 3.76 (2 H, т, J 6.7, H1'); 5.68 (1 H, д, $J_{5, 6}$ 7.8, H5); 7.10 (2 H, дд, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, $J_{m-H, F}$ 8.6, м-Н, PhF); 7.18 (1 H, д, $J_{6, 5}$ 7.8, H6); 7.95 (2 H, дд, $J_{o-H, m-H}$ 8.9, $J_{o-H, F}$ 5.4, о-Н, PhF), 9.48 (1 H, уш.с, H3). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 20.74 (C3'); 28.54 (C2'); 37.54 (C4'); 48.55 (C1'); 102.33 (C5); [115.79 (2 C, д, $J_{C, F}$ 22.0); 130.69 (2 C, д, $J_{C, F}$ 8.9); 133.27 (1 C, д, $J_{C, F}$ 3.1); 165.84 (1 C, д, $J_{4-C, F}$ 254.9)] (C_6H_4F); 144.39 (C6); 151.06 (C2); 163.87 (C4); 197.86 (C5').

В качестве побочного продукта при синтезе (IVa) по методу А с выходом 15% был получен 1,3-бис[5-(4-фторфенил)-5-оксопентил]урацил. R_f 0.61 (Г), масло.

1-[5-(4-Фторфенил)-5-оксопентил]тимин (Va). Получен по методу А с выходом 32%, R_f 0.33 (19.5 : 0.5), т. пл. 121–122°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 304.3 [M^+], 305.3 [$M + H^+$]. Рассчитана M 304.3 ($C_{16}H_{17}FN_2O_3$). 1H -ЯМР ($CDCl_3$): 1.68–1.82 (4 H, м, H2' и H3'); 1.89 (3 H, с, 5- CH_3); 2.98 (2 H, т, J 6.4, H4'); 3.72 (2 H, т, J 6.7, H1'); 6.99 (1 H, с, H6); 7.09 (2 H, дд, $J_{m-H, o-H}$ 8.7, $J_{m-H, F}$ 8.7, м-Н, PhF); 7.95 (2 H, дд, $J_{o-H, m-H}$ 8.7, $J_{o-H, F}$ 5.3, о-Н, PhF), 9.45 (1 H, уш.с, H3). ^{13}C -ЯМР ($CDCl_3$): 12.21 (5- CH_3), 20.69 (C3'); 28.45 (C2'); 37.46 (C4'); 48.09 (C1'); 110.72 (C5); [115.66 (2 C, д, $J_{C, F}$ 22.0); 130.58 (2 C, д, $J_{C, F}$ 9.4); 133.20 (1 C, д, $J_{C, F}$ 2.7); 165.71 (1 C, д, $J_{4-C, F}$ 254.9)] (C_6H_4F); 140.22 (C6); 151.05 (C2); 164.97 (C4); 197.85 (C5').

В качестве побочного продукта при синтезе (Va) по методу А с выходом 14% был получен 1,3-бис[5-(4-фторфенил)-5-оксопентил]тимин. R_f 0.64 (19.5 : 0.5), масло.

1-[5-(4-Фторфенил)-5-оксопентил]цитозин (VIa). Получен по методу Б с выходом 41%, R_f 0.47 (17 : 3), т. пл. 197–198°C (этанол). Масс-спектр: m/z 289.3 [M^+], 290.3 [$M + H^+$]. Рассчитана M 289.3 ($C_{15}H_{16}FN_3O_2$). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.50–1.70 (4 H, м, H2' и H3'); 3.04 (2 H, т, J 6.7, H4'); 3.66 (2 H, т, J 6.7, H1'); 5.63 (1 H, д, $J_{5,6}$ 7.2, H5); 6.93 (2 H, уш.с, 4-NH₂); 7.33 (2 H, дд, $J_{m-H, o-H}$ 8.9, $J_{m-H, F}$ 8.9, $m-H$, PhF); 7.57 (1 H, д, $J_{6,5}$ 7.2, H6); 8.03 (2 H, дд, $J_{o-H, m-H}$ 8.9, $J_{o-H, F}$ 5.6, $o-H$, PhF). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.54 (C3'); 28.18 (C2'); 37.29 (C4'); 48.18 (C1'); 92.97 (C5); [115.56 (2 C, д, $J_{C, F}$ 22.0); 130.75 (2 C, д, $J_{C, F}$ 9.4); 133.38 (1 C, д, $J_{C, F}$ 2.7); 164.87 (1 C, д, $J_{4-C, F}$ 251.8)] (C_6H_4F); 145.88 (C6); 155.74 (C2); 165.81 (C4); 198.33 (C5').

9-[5-(4-Фторфенил)-5-оксопентил]аденин (VIa). Получен по методу А с выходом 35%, R_f 0.33 (18 : 2), т. пл. 197–198°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 313.3 [M^+], 314.3 [$M + H^+$]. Рассчитана M 313.3 ($C_{16}H_{16}FN_5O$). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.58 (2 H, м, H2'); 1.88 (2 H, м, H3'); 3.05 (2 H, т, J 7.2, H4'); 4.19 (2 H, т, J 7.0, H1'); 7.11 (2 H, уш.с, 6-NH₂); 7.30 (2 H, дд, $J_{m-H, o-H}$ 8.9, $J_{m-H, F}$ 8.9, $m-H$, PhF); 8.00 (2 H, дд, $J_{o-H, m-H}$ 8.7, $J_{o-H, F}$ 5.6, $o-H$, PhF); 8.14 (2 H, уш.с, H2 и H8). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.57 (C3'); 28.76 (C2'); 37.00 (C4'); 42.57 (C1'); [115.46 (2 C, д, $J_{C, F}$ 22.0); 130.65 (2 C, д, $J_{C, F}$ 9.4); 133.32 (1 C, д, $J_{C, F}$ 2.7); 164.82 (1 C, д, $J_{4-C, F}$ 251.3)] (C_6H_4F); 118.70 (C5); 140.71 (C8); 149.51 (C4); 152.23 (C2); 155.85 (C6); 198.15 (C5').

В качестве побочного продукта при синтезе (VIa) по методу А с выходом 6% был получен 3-[5-(4-фторфенил)-5-оксопентил]аденин. R_f 0.09 (18 : 2).

9-[5-(4-Фторфенил)-5-оксопентил]гипоксантин (VIIa). Получен по методу А с выходом 21%, R_f 0.40 (18 : 2), т. пл. 202–203°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 314.3 [M^+], 315.3 [$M + H^+$]. Рассчитана M 314.3 ($C_{16}H_{15}FN_4O_2$). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.56 (2 H, м, H2'); 1.86 (2 H, м, H3'); 3.05 (2 H, т, J 7.0, H4'); 4.18 (2 H, т, J 6.8, H1'); 7.32 (2 H, дд, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, $J_{m-H, F}$ 8.6, $m-H$, PhF); 8.01 (3 H, м, $o-H$, PhF и H8); 8.10 (1 H, с, H2); 12.22 (1 H, уш.с, H1). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.52 (C3'); 28.96 (C2'); 37.01 (C4'); 43.06 (C1'); [115.56 (2 C, д, $J_{C, F}$ 22.0); 130.74 (2 C, д, $J_{C, F}$ 9.4); 133.32 (1 C, д, $J_{C, F}$ 2.7); 164.89 (1 C, д, $J_{4-C, F}$ 251.3)] (C_6H_4F); 123.91 (C5); 140.21 (C8); 145.31 (C2); 148.33 (C4); 156.60 (C6); 198.18 (C5').

В качестве побочного продукта при синтезе (VIIa) по методу А с выходом 20% был получен 7-[5-(4-фторфенил)-5-оксопентил]гипоксантин с R_f 0.40 (Б), от которого целевой продукт отделяли многократной кристаллизацией из этилацетата.

9-[5-(4-Фторфенил)-5-оксопентил]гуанин (IXa). Получен по методу А алкилированием 2-амино-6-

хлорпурина с последующим гидролизом сырого производного 2-амино-6-хлорпурина кипячением в 0.33 н растворе NaOH в течение 3.5 ч с суммарным выходом 26%, R_f 0.40 (18 : 2), т. пл. 128–129°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 329.3 [M^+], 330.3 [$M + H^+$]. Рассчитана M 329.3 ($C_{16}H_{16}FN_5O_2$). 1H -ЯМР (CDCl₃): 1.75 (2 H, м, H2'); 1.89 (2 H, м, H3'); 2.94 (2 H, т, J 7.2, H4'); 4.04 (2 H, т, J 7.0, H1'); 4.84 (2 H, уш.с, 2-NH₂); 7.02 (2 H, дд, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, $J_{m-H, F}$ 8.6, $m-H$, PhF); 7.45 (1 H, с, H8); 7.91 (2 H, дд, $J_{o-H, m-H}$ 8.7, $J_{o-H, F}$ 5.5, $o-H$, PhF). ^{13}C -ЯМР (CDCl₃): 21.16 (C3'); 29.44 (C2'); 37.62 (C4'); 43.05 (C1'); 115.24 (C5) [115.70 (2 C, д, $J_{C, F}$ 22.0); 130.65 (2 C, д, $J_{C, F}$ 9.4); 133.34 (1 C, д, $J_{C, F}$ 2.7); 167.7 (1 C, д, $J_{4-C, F}$ 254.5)] (C_6H_4F); 135.98 (C8); 152.43 (C4); 155.43 (C2); 159.25 (C6); 198.18 (C5').

1-[5-(4-Хлорфенил)-5-оксопентил]урацил (IVb). Получен по методу А с выходом 30%, R_f 0.4 (19 : 1), т. пл. 171–172°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 306.7 [M^+], 307.7 [$M + H^+$]. Рассчитана M 306.7 ($C_{15}H_{15}ClN_2O_3$). 1H -ЯМР (CDCl₃): 1.19–1.41 (4 H, м, H2' и H3'); 2.66 (2 H, т, J 6.5, H4'); 3.29 (2 H, т, J 6.5, H1'); 5.11 (1 H, д, $J_{5,6}$ 7.8, H5); 6.89 (1 H, д, $J_{6,5}$ 7.8, H6); 6.89 (2 H, д, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, $m-H$, PhCl); 7.44 (2 H, д, $J_{o-H, m-H}$ 8.6, $o-H$, PhCl); 10.54 (1 H, уш.с, H3). ^{13}C -ЯМР (CDCl₃): 19.54 (C3'); 27.33 (C2'); 36.54 (C4'); 46.81 (C1'); 100.72 (C5); [127.76 (2 C); 128.41 (2 C); 134.15; 137.99] (C_6H_4Cl); 143.53 (C6); 150.16 (C2); 163.08 (C4); 197.10 (C5').

1-[5-(4-Хлорфенил)-5-оксопентил]тимин (Vb). Получен по методу А с выходом 28%, R_f 0.54 (19 : 1), т. пл. 172–173°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 320.7 [M^+], 321.7 [$M + H^+$]. Рассчитана M 320.7 ($C_{16}H_{17}ClN_2O_3$). 1H -ЯМР (CDCl₃): 1.68–1.82 (4 H, м, H2' и H3'); 1.89 (3 H, с, 5-CH₃); 2.98 (2 H, т, J 6.4, H4'); 3.72 (2 H, т, J 6.4, H1'); 6.98 (1 H, с, H6); 7.40 (2 H, д, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, $m-H$, PhCl); 7.86 (2 H, д, $J_{o-H, m-H}$ 8.6, $o-H$, PhCl); 9.37 (1 H, уш.с, H3). ^{13}C -ЯМР (CDCl₃): 12.23 (5-CH₃), 20.63 (C3'); 28.44 (C2'); 37.53 (C4'); 48.08 (C1'); 110.74 (C5); [128.90 (2 C); 129.38 (2 C); 135.07; 139.55] (C_6H_4Cl); 140.19 (C6); 151.03 (C2); 164.26 (C4); 198.22 (C5').

В качестве побочного продукта при синтезе (Vb) по методу А с выходом 14% был получен 1,3-бис[5-(4-хлорфенил)-5-оксопентил]тимин. R_f 0.64 (19.5 : 0.5), масло.

1-[5-(4-Хлорфенил)-5-оксопентил]цитозин (VIb). Получен по методу Б с выходом 3.6%, R_f 0.47 (17 : 3), т. пл. 213–214°C (этанол). Масс-спектр: m/z 305.7 [M^+], 306.7 [$M + H^+$]. Рассчитана M 305.7 ($C_{15}H_{16}ClN_3O_2$). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.50–1.67 (4 H, м, H2' и H3'); 3.03 (2 H, т, J 6.7, H4'); 3.65 (2 H, т, J 6.7, H1'); 5.64 (1 H, д, $J_{5,6}$ 7.2, H5); 6.95 (2 H, уш.с, 4-NH₂); 7.56 (1 H, д, $J_{6,5}$ 7.2, H6); 7.70 (2 H, д, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, $m-H$, PhCl); 7.87 (2 H, д, $J_{o-H, m-H}$

8.6, *o*-H, PhCl); ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.47 (C3'); 28.16 (C2'); 37.38 (C4'); 48.18 (C1'); 93.03 (C5); [128.71 (2 C); 129.72 (2 C); 135.30; 137.90] (C₆H₄Cl); 145.89 (C6); 155.78 (C2); 165.82 (C4); 198.76 (C5').

9-[5-(4-Хлорфенил)-5-оксопентил]аденин (VIIб). Получен по методу А с выходом 36%, R_f 0.31 (18 : 2), т. пл. 209–210°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 329.7 [M^+], 330.7 [$M+H^+$]. Рассчитана M 329.7 (C₁₆H₁₆ClN₅O). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.55 (2 H, м, H2'); 1.86 (2 H, м, H3'); 3.05 (2 H, т, J 7.2, H4'); 4.17 (2 H, т, J 7.0, H1'); 7.13 (2 H, уш.с, 6-NH₂); 7.55 (2 H, д, $J_{\text{м-н, о-н}}$ 8.4, *m*-H, PhCl); 7.92 (2 H, д, $J_{\text{о-н, м-н}}$ 8.4, *o*-H, PhCl); 8.12 (1 H, с, H8); 8.14 (1 H, с, H2). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.50 (C3'); 28.77 (C2'); 37.11 (C4'); 42.59 (C1'); 118.71 (C5); [128.68 (2 C); 129.68 (2 C); 135.26; 137.89] (C₆H₄Cl); 140.76 (C8); 149.52 (C4); 152.28 (C2); 155.89 (C6); 198.63 (C5').

9-[5-(4-Хлорфенил)-5-оксопентил]гипоксантин (VIIIб). Получен по методу А алкилированием 6-хлорпурина с последующим гидролизом сырого производного 6-хлорпурина кипячением в 4% растворе HCl в течение 3 ч с суммарным выходом 27%. R_f 0.28 (18 : 2), т. пл. 231–232°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 330.7 [M^+], 331.7 [$M+H^+$]. Рассчитана M 330.7 (C₁₆H₁₅ClN₄O₂). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.55 (2 H, м, H2'); 1.85 (2 H, м, H3'); 3.04 (2 H, т, J 7.2, H4'); 4.17 (2 H, т, J 6.9, H1'); 7.55 (2 H, д, $J_{\text{м-н, о-н}}$ 8.7, *m*-H, PhCl); 7.93 (2 H, д, $J_{\text{о-н, м-н}}$ 8.7, *o*-H, PhCl); 8.00 (1 H, с, H8); 8.09 (1 H, с, H2); 12.22 (1 H, уш.с, H1). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.42 (C3'); 28.93 (C2'); 37.07 (C4'); 43.03 (C1'); 123.91 (C5); [128.68 (2 C); 129.68 (2 C); 135.24; 137.91] (C₆H₄Cl); 140.20 (C8); 145.29 (C2); 148.32 (C4); 156.59 (C6); 198.58 (C5').

9-[5-(4-Хлорфенил)-5-оксопентил]гуанин (IXб). Получен по методу А алкилированием 2-амино-6-хлорпурина с последующим гидролизом сырого производного 2-амино-6-хлорпурина кипячением в 0.33 н растворе NaOH в течение 3.5 ч с суммарным выходом 11%, R_f 0.11 (18 : 2), т. пл. >250°C (этанол). Масс-спектр: m/z 345.7 [M^+], 346.7 [$M+H^+$]. Рассчитана M 345.7 (C₁₆H₁₆ClN₅O₂). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.54 (2 H, м, H2'); 1.78 (2 H, м, H3'); 3.04 (2 H, т, J 7.2, H4'); 3.96 (2 H, т, J 7.0, H1'); 6.40 (2 H, уш.с, 2-NH₂); 7.56 (2 H, д, $J_{\text{м-н, о-н}}$ 8.7, *m*-H, PhCl); 7.68 (1 H, с, H8); 7.93 (2 H, д, $J_{\text{о-н, м-н}}$ 8.7, *o*-H, PhCl); 10.53 (1 H, уш.с, H2). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.49 (C3'); 28.83 (C2'); 37.14 (C4'); 42.33 (C1'); 116.55 (C5); [128.70 (2 C); 129.70 (2 C); 135.26; 137.91] (C₆H₄Cl); 137.37 (C8); 151.10 (C4); 153.41 (C2); 156.77 (C6); 198.65 (C5').

1-[5-(4-Бромфенил)-5-оксопентил]урацил (IVв). Получен по методу А с выходом 27%, R_f 0.65 (18 : 2), т. пл. 174–175°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 351.2 [M^+], 352.2 [$M+H^+$]. Рассчитана M 351.2

(C₁₅H₁₅BrN₂O₃). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.53–1.70 (4 H, м, H2' и H3'); 3.04 (2 H, т, J 6.8, H4'); 3.68 (2 H, т, J 6.8, H1'); 5.53 (1 H, д, $J_{5,6}$ 7.8, H5); 7.64 (1 H, д, $J_{6,5}$ 7.8, H6); 7.71 (2 H, д, $J_{\text{о-н, м-н}}$ 8.6, *o*-H, PhBr); 7.87 (2 H, д, $J_{\text{м-н, о-н}}$ 8.6, *m*-H, PhBr); 11.16 (1 H, уш.с, H3). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.25 (C3'); 27.86 (C2'); 37.25 (C4'); 47.10 (C1'); 100.74 (C5); [127.05; 129.82 (2 C); 131.66 (2 C); 135.60] (C₆H₄Br); 145.57 (C6); 150.87 (C2); 163.62 (C4); 198.86 (C5').

1-[5-(4-Бромфенил)-5-оксопентил]тимин (Vв). Получен по методу А с выходом 22%, R_f 0.48 (19 : 1), т. пл. 187–190°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 365.2 [M^+], 366.2 [$M+H^+$]. Рассчитана M 365.2 (C₁₆H₁₇BrN₂O₃). ^1H -ЯМР (CDCl₃): 1.70–1.80 (4 H, м, H2' и H3'); 1.90 (3 H, с, 5-CH₃); 2.98 (2 H, т, J 6.4, H4'); 3.73 (2 H, т, J 7.0, H1'); 6.98 (1 H, с, H6); 7.68 (2 H, д, $J_{\text{о-н, м-н}}$ 8.6, *o*-H, PhBr); 7.79 (2 H, д, $J_{\text{м-н, о-н}}$ 8.6, *m*-H, PhBr); 9.09 (1 H, уш.с, H3). ^{13}C -ЯМР (CDCl₃): 12.36 (5-CH₃), 20.74 (C3'); 28.56 (C2'); 37.63 (C4'); 48.22 (C1'); 110.88 (C5); [128.40; 129.60 (2 C); 132.04 (2 C); 135.58] (C₆H₄Br); 140.28 (C6); 151.04 (C2); 164.23 (C4); 198.50 (C5').

1-[5-(4-Бромфенил)-5-оксопентил]цитозин (VIв). Получен по методу Б с выходом 8.2%, R_f 0.47 (17 : 3), т. пл. 217–218°C (этанол). Масс-спектр: m/z 350.2 [M^+], 351.2 [$M+H^+$]. Рассчитана M 350.2 (C₁₅H₁₆BrN₃O₂). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.46–1.77 (4 H, м, H2' и H3'); 3.02 (2 H, т, J 6.8, H4'); 3.65 (2 H, т, J 6.6, H1'); 5.62 (1 H, д, $J_{5,6}$ 7.2, H5); 6.92 (2 H, уш.с, 4-NH₂); 7.57 (1 H, д, $J_{6,5}$ 7.2, H6); 7.71 (2 H, д, $J_{\text{о-н, м-н}}$ 8.6, *o*-H, PhBr); 7.87 (2 H, д, $J_{\text{м-н, о-н}}$ 8.6, *m*-H, PhBr); ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.44 (C3'); 28.14 (C2'); 37.35 (C4'); 48.16 (C1'); 92.97 (C5); [127.02; 129.83 (2 C); 131.66 (2 C); 135.62] (C₆H₄Br); 145.88 (C6); 155.72 (C2); 165.79 (C4); 198.95 (C5').

9-[5-(4-Бромфенил)-5-оксопентил]аденин (VIIв). Получен по методу А с выходом 34%, R_f 0.39 (18 : 2), т. пл. 206–207°C (этилацетат). Масс-спектр: m/z 374.2 [M^+], 375.2 [$M+H^+$]. Рассчитана M 374.2 (C₁₆H₁₆BrN₅O). ^1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.55 (2 H, м, H2'); 1.86 (2 H, м, H3'); 3.04 (2 H, т, J 7.2, H4'); 4.17 (2 H, т, J 7.0, H1'); 7.14 (2 H, уш.с, 6-NH₂); 7.70 (2 H, д, $J_{\text{о-н, м-н}}$ 8.6, *o*-H, PhBr); 7.85 (2 H, д, $J_{\text{м-н, о-н}}$ 8.6, *m*-H, PhBr); 8.12 (1 H, с, H8); 8.14 (1 H, с, H2). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.48 (C3'); 28.77 (C2'); 37.08 (C4'); 42.58 (C1'); 118.71 (C5); [127.03; 129.79 (2 C); 131.63 (2 C); 135.57] (C₆H₄Br); 140.75 (C8); 149.51 (C4); 152.27 (C2); 155.88 (C6); 198.82 (C5').

9-[5-(4-Бромфенил)-5-оксопентил]гипоксантин (VIIIв). Получен по методу А алкилированием 6-хлорпурина с последующим гидролизом сырого производного 6-хлорпурина кипячением в 4% растворе HCl в течение 3 ч с суммарным выходом

24%. R_f 0.27 (18 : 2), т. пл. 242°C (разл.) (этилацетат). Масс-спектр: m/z 375.2 [M^+], 376.2 [$M + H^+$]. Рассчитана M 375.2 ($C_{16}H_{15}BrN_4O_2$). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.54 (2 H, м, H2'); 1.84 (2 H, м, H3'); 3.04 (2 H, т, J 7.2, H4'); 4.17 (2 H, т, J 6.9, H1'); 7.70 (2 H, д, $J_{o-H, m-H}$ 8.5, o -H, PhBr); 7.85 (2 H, д, $J_{m-H, o-H}$ 8.5, m -H, PhBr); 8.01 (1 H, с, H8); 8.10 (1 H, с, H2); 12.25 (1 H, уш.с, H1). ^{13}C -ЯМР (DMSO- d_6): 20.42 (C3'); 28.97 (C2'); 37.09 (C4'); 43.07 (C1'); 123.93 (C5); [127.13; 129.86 (2 C); 131.71 (2 C); 135.58] (C_6H_4Br); 140.29 (C8); 145.38 (C2); 148.36 (C4); 156.65 (C6); 198.84 (C5').

9-[5-(4-Бромфенил)-5-оксопентил]гуанин (IXв).

Получен по методу А алкилированием 2-амино-6-хлорпурина с последующим гидролизом сырого производного 2-амино-6-хлорпурина кипячением в 0.33 н растворе NaOH в течение 3.5 ч с суммарным выходом 13%, R_f 0.34 (19 : 1), т. пл. 126–127°C (этанол). Масс-спектр: m/z 390.2 [M^+], 391.2 [$M + H^+$]. Рассчитана M 390.2 ($C_{16}H_{16}BrN_5O_2$). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): 1.71 (2 H, м, H2'); 1.87 (2 H, м, H3'); 2.91 (2 H, т, J 7.2, H4'); 4.01 (2 H, т, J 7.0, H1'); 4.79 (2 H, уш.с, 2-NH₂); 7.43 (1 H, с, H8); 7.52 (2 H, д, $J_{o-H, m-H}$ 8.6, o -H, PhBr); 7.71 (2 H, д, $J_{m-H, o-H}$ 8.6, m -H, PhBr). ^{13}C -ЯМР (CDCl₃): 20.94 (C3'); 29.25 (C2'); 37.50 (C4'); 42.81 (C1'); 115.10 (C5); [120.06; 129.42 (2 C); 131.78 (2 C); 135.79] (C_6H_4Br); 135.44 (C8); 152.48 (C4); 155.27 (C2); 159.16 (C6); 198.35 (C5').

Ингибирование реакции 3'-концевого процессинга. Для получения радиоактивно-меченного дуплекса U5B/U5A 10 пмоль олигонуклеотида U5B инкубировали с 10 ед. акт. T4-полинуклеотидкиназы (Fermentas, Литва) и 50 мкКи (16 пмоль) [γ - ^{32}P] АТФ (3000 Ки/ммоль) в 20 мкл реакционной смеси, содержащей буфер 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, в течение 1 ч при 37°C. Затем киназу инактивировали добавлением 2 мкл 250 мМ водного EDTA и нагреванием до 65°C в течение 10 мин. Добавляли эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида U5A и формировали дуплекс U5B/U5A нагреванием смеси олигонуклеотидов до 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Полученный дуплекс окончательно очищали от избытка [γ - ^{32}P]АТФ и солей на колонке MicroSpin G-25 Columns (Amersham Biosciences, США) согласно условиям производителя.

Затем 0.1 пмоль ^{32}P -меченного дуплекса U5B/U5A инкубировали с 2 пмоль интегразы в 20 мкл реакционной смеси, содержащей буфер (20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 10% DMSO) в присутствии возрастающих концентраций ингибитора (1–1500 мкМ) при 37°C в течение 2 ч. Реакцию останавливали добав-

лением 80 мкл стоп-раствора (7 мМ EDTA, 0.3 М ацетат натрия, 10 мМ Трис-НСl, рН 8, 0.125 мг/мл гликоген). Интегразу экстрагировали смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25 : 24 : 1), ДНК-дуплекс осаждали этиловым спиртом (250 мкл) и анализировали электрофоретически в 20% ПААГ с 7 М мочевиной. Ауторадиограммы получали на сканере GE Turphoon FLA 9500, денситометрию проводили с помощью программного обеспечения ImageQuant 5.0. Для расчета концентрации соединения, ингибирующего реакцию на 50% (IC₅₀), данные по эффективности реакции аппроксимировали с помощью функции экспоненциального убывания и вычисляли значение в точке, соответствующей 50%.

Ингибирование реакции переноса цепи. ^{32}P -меченный дуплекс U5B-2/U5A получали, как описано выше для U5B/U5A, исходя из ^{32}P -меченного олигонуклеотида U5B-2. Реакцию проводили в том же буфере, в котором проводили 3'-процессинг, используя ^{32}P -меченный дуплекс U5B-2/U5A (0.2 пмоль) и интегразу (2 пмоль). Для ингибирования переноса цепи реакцию проводили в присутствии возрастающих концентраций ингибитора (1–1500 мкМ) при 37°C в течение 2 ч. Выделение и анализ продуктов реакции проводили, как описано выше. Для расчета концентрации соединения, ингибирующего реакцию на 50% (IC₅₀), данные по эффективности реакции аппроксимировали с помощью функции экспоненциального убывания и вычисляли значение в точке, соответствующей 50%.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 12-04-00237-а, 12-04-32085-мол_а) и Стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов СП-6530.2013.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *De Clercq E.* // Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2000. V. 19 (10–12). P. 1531–1541.
2. *Pontikis R., Benhida R., Aubertin A.-M., Grierson D.S., Monneret C.* // J. Med. Chem. 1997. V. 40(12). P. 1845–1854.
3. *E. De Clercq* // Nature Reviews Drug Discovery 2007. V. 6. P. 1001–1018.
4. *Esteban-Gamboa A., Balzarini J., Esnouf R., De Clercq E., Camarasa M.-J., Perez-Perez M.-J.* // J. Med. Chem. 2000. V. 43. P. 971–983.
5. *Matsushita S., Nitanda T., Furukawa T., Sumizawa T., Tani A., Nishimoto K., Akiba S., Miyadera K., Fukushima M., Yamada Y., Yoshida H., Kanzaki T., Akiyama S.* // Cancer Res. 1999. V. 59. P. 1911–1916.
6. *Комиссаров В.В., Панова Н.Г., Крицын А.М.* // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. С. 75–82.

7. Комиссаров В.В., Волгарёва Г.М., Ольшанская Я.С., Чернышова М.Е., Завалишина Л.Э., Франк Г.А., Штиль А.А., Крицын А.М. // Биоорган. химия. 2009. Т. 35. С. 84–94.
8. Комиссаров В.В., Крицын А.М. // Биоорган. химия. 2010. Т. 36. С. 514–525.
9. Макинский А.А., Крицын А.М., Ульянова Е.А., Захарова О.Д., Невинский Г.А. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 735–742.
10. Макинский А.А., Крицын А.М., Ульянова Е.А., Захарова О.Д., Бугреев Д.В., Невинский Г.А. // Биоорган. химия. 2001. Т. 27. С. 191–196.
11. Приказчикова Т.А., Сычева А.М., Агапкина Ю.Ю., Александров Д.А., Готтих М.Б. // Успехи химии. 2008. Т. 77. С. 445–459.
12. Serrao E., Odde S., Ramkumar K., Neamati N. // *Retrovirology*. 2009. 6:25.
13. Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., Miller M.D. // *Science*. 2000. V. 287. № 5453. P. 646–650.
14. Krishnan L., Li X., Naraharisetty H. L., Hare S., Cherepanov P., Engelman A. // *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 15910–15915.
15. Королев С.П., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. // *Acta Naturae*. 2011. V. 3. P. 13–30.
16. Несмеянов А.Н., Захаркин Л.И. // *Изв. АН СССР. ОХН*. 1955. С. 224–238.
17. Brown H.C., Marino G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1962. V. 84. P. 1658–1661.
18. Meszarosova K., Holy A., Masojidkova M. // *Coll. Czech. Chem. Commun.* 2000. V. 65. P. 1109–1125.
19. Приказчикова Т.А., Волков Е.М., Зубин Е.М., Романова Е.С., Готтих М.Б. // *Мол. биол.* 2007. Т. 41. С. 130–138.
20. Королев С.П., Кондрашина О.В., Дружиловский Д.С., Старосотников А.М., Дутов М.Д., Бахраков М.А., Далингер И.Л., Филимонов Д.А., Шевелев С.А., Поройков В.В., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. // *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. С. 75–85.
21. Zhao X.Z., Maddali K., Vu B.C., Marchand C., Hughes S.H., Pommier Y., Burke T.R. Jr. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009. V. 19. С. 2714–2717.
22. Тумце Л., Айхер Т. // *Препаративная органическая химия*. Пер. с нем. М.: Мир, 1999. (Tietze L.F., Eichler T. // *Reaktionen und Synthesen im organische-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium*. New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1991).
23. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.F. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 9285–9294.

The Search of Novel Inhibitors of HIV-1 Integrase among 5-(4-Halogenophenyl)-5-Oxopentyl Derivatives of Nucleic Bases

V. V. Komissarov*, E. S. Knyazhanskaya**, A. V. Atrohova**,
M. B. Gottikh**, A. M. Kritzyn*.[#]

[#] Phone: +7 (499) 135-14-05; e-mail: amk@eimb.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

**Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department and Belozersky Institute
of Physical and Chemical Biology, Leninskie gory 1/40, Moscow, 119991 Russia

By alkylation of uracil, thymine, cytosine, adenine, 6-chloropurine, and 2-amino-6-chloropurine with 5-chloro-1-(4-halogenophenyl)-1-pentanones novel derivatives of nucleic bases were obtained, their physicochemical properties were studied. The influence of synthesized compounds on HIV-1 integrase was investigated.

Keywords: nucleosides, polymethylene analogues, alkylation, integrase HIV-1