

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АДЕНОЗИНА И ЕГО АЗА- И ДЕАЗААНАЛОГОВ КАК АНТАГОНИСТОВ И ИНГИБИТОРОВ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

П.П. Пурыгин, Ю.П. Зарубин,¹ И.А. Ильичёва, В.Л. Флорентьев²

Полуэмпирическим методом AM1 проведены предварительные конформационные исследования молекул аденозина, его 2-, 8-аза и 1-, 3-, 7-, 9-дезааналогов, а также их 1*H*-катионов (кроме 1-дезааденозина). Сравнение распределения электростатических зарядов в этих производных аденозина, полученное для активной области их конформаций, с известными экспериментальными данными, касающимися характера их связывания с активным центром аденозиндезаминазы, приводит к двум заключениям: 1) для протекания реакции ферментативного дезаминирования важно протонирование атома азота N1; 2) для связывания нуклеозида с активным центром аденозиндезаминазы необходимо наличие отрицательного электростатического потенциала в положениях 1, 3 и 7 гетероцикла, а также в положениях C3' и C5' у атомов кислорода 3'-ОН- и 5'-ОН-групп остатка *β*-D-рибофуранозы. На основании результатов расчёта и экспериментальных данных предложен механизм связывания остатка гетероцикла в субстрате и его аза- и деазааналогах с активным центром фермента.

Введение

Аденозиндезаминаза (аденозинаминогидролаза КФ 3.5.4.4) (далее – АДА) является ключевым ферментом катаболизма аденозина или 2'-дезоксааденозина в живых организмах и играет исключительно важную роль в регуляции иммунитета у млекопитающих [1], осуществляя гидролитическое превращение аденозина (2'-дезоксааденозина) в инозин (2'-дезоксиинозин) и аммиак согласно следующей схеме (схема 1):



Схема 1. R = OH – аденозин (инозин); H – 2'-дезоксааденозин (2'-дезоксиинозин)

¹Пётр Петрович Пурыгин, Юрий Павлович Зарубин, кафедра органической химии, Самарский государственный университет

²Ирина Алексеевна Ильичёва, Владимир Леонидович Флорентьев, лаборатория химии белкового синтеза, институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

В активном центре этого фермента содержится кофактор – ион Zn^{2+} , необходимый для проявления АДА каталитической активности [2]. Таким образом, это цинксодержащий металлофермент.

Отклонения содержания АДА от нормы в различных тканях организма, носящие генетический характер, приводят к двум различным энзимопатиям. В случае недостатка этого фермента в лимфоидных тканях возникает особый комбинированный иммунодефицит (SCID)³, связанный с угнетающим действием избытка 2'-деоксиаденозина на биосинтез ДНК в Т- и В-лимфоцитах (образующийся dATP аллостерически ингибирует рибонуклеотидредуктазу) и, как следствие, на их размножение [3]. В случае избытка АДА в эритроцитах (в 40–70 раз больше нормы) имеет место гемолитическая анемия, при которой снижен биосинтез АТФ, NAD, NADP и других нуклеотидов, для которых аденозин является предшественником [4].

На протяжении последних 35 лет ведутся интенсивные исследования в области синтеза и изучения субстратных свойств различных аналогов аденозина в отношении данного фермента. Интерес к ингибиторам АДА обусловлен их возможностью влиять на концентрацию аденозина в ткани, рост и функции лимфоцитов, а также усиливать химиотерапевтическое действие аналогов аденозина [5]. Например, такие соединения, как (+)-эритро-9-[2(*S*)-гидрокси-3(*R*)-нонил]аденин и 2'-дезоксикоформицин (рис. 1) используются в экспериментальных работах по изучению механизма действия метаболитов и аналогов аденозина, развития иммунного ответа и иммунодефицитности, а также в химиотерапии рака [6].

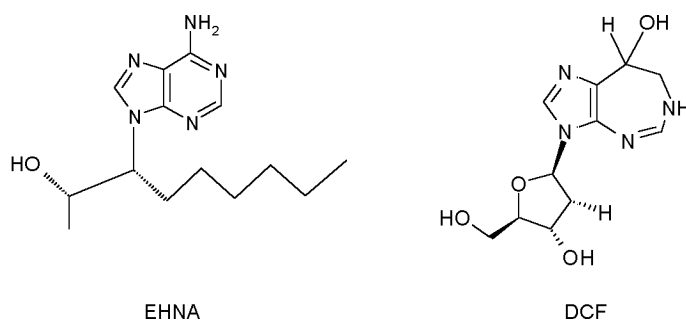


Рис. 1. EHNA – (+)-эритро-9-[2(*S*)-гидрокси-3(*R*)-нонил]аденин; DCF – 2'-дезоксикоформицин

Для ряда ингибиторов АДА были установлены цитотоксическое действие [7–10], противоопухолевая [11–15] и противовирусная активность [10, 16, 17], в частности, против вируса СПИДа [17]. Некоторые из этих ингибиторов были запатентованы: изокоформицин [18, 19], пуринрибонуклеозид [20], адеципенол (OM-3223) [21], 2-хлоропентостатин [22], замещённые пуринарибонуклеозиды [23], различные азоло[1,3]дiazепин-5-олы [24].

В результате многочисленных исследований был обоснован возможный механизм реакции дезаминирования аденозина и его аналогов в активном центре АДА как реакции нуклеофильного замещения цинк-активированной молекулой воды амино- или другой функциональной группы в положении 6 гетероциклического остатка по механизму S_NAr . Он был предложен впервые в работе [25]. Авторами было установлено,

³SCID – severe combined immunodeficiency

что АДА обладает дехлороназной активностью, катализируя отщепление хлорид-иона от 6-хлоропуринрибонуклеозида с образованием стехиометрических количеств инозина и хлорид-ионов (схема 2). Эти данные указывают на наличие одного активного центра в молекуле фермента, ответственного как за дезаминирование, так и за дехлорирование.

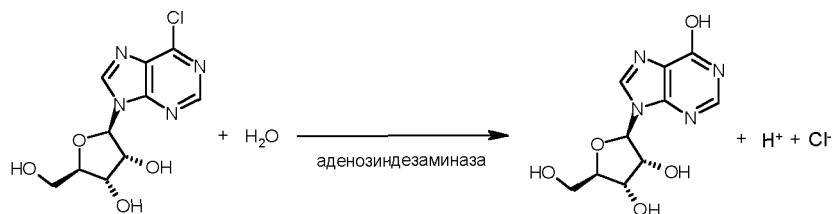


Схема 2. Превращение 6-хлоропуринрибонуклеозида в инозин под действием АДА

Несколько позже другой группой исследователей были получены сходные данные в отношении других аналогов аденозина [26]. Был сделан вывод, что АДА катализирует нуклеофильное замещение в положении 6 пуринового гетероцикла. Позднее были определены K_m и V_{max} гидролиза аденозина и его замещённых аналогов [27]. Изучение зависимости K_m от pH указывает на существование у фермента диссоциирующих групп с pK_a 5,3–6,1 и 9,5–10,2 и диссоциирующей группы, включённой в образование фермент-субстратного комплекса с pK_a 5,7–6,3. Значительные колебания величин V_{max} с различными субстратами показывают, что конечный гидролиз общего промежуточного продукта не является этапом, лимитирующим скорость реакции.

В последующих работах [28, 29] было показано, что для связывания с активным центром фермента необязательно присутствие NH_2 -группы в положении 6 остатка пурина. Замена атома водорода в положении 2 на NH_2 -, OH - или CH_3 -группу приводит к уменьшению K_i . Обнаруживается корреляция между основностью при N1 и K_i независимо от природы заместителя. Введение в положение 6 CH_3 -группы приводит к потере ингибирующих свойств [28]. Зависимость величины K_m от химической структуры субстратов и величины K_i для ингибиторов от их структуры показывает, что важным фактором, определяющим связывание с активным центром фермента, является основность атома N1 пуринового гетероцикла [29].

В работе [30] по результатам кинетических исследований методом остановленной струи ингибиторы АДА впервые были разделены на 3 группы по характеру их связывания с этим ферментом. К первой группе отнесены ингибиторы – аналоги основного состояния субстрата, для которых характерно очень быстрое ингибирование при различной прочности связывания (K_d 0,2–12 мкМ), например, пуринрибонуклеозид. Во второй группе представлены ингибиторы типа 9-эритро-(2-гидрокси-3-нонил)аденина, которые ингибируют АДА, быстро образуя с ней комплексы, претерпевающие затем медленные конформационные изменения. Третью группу составили ингибиторы – аналоги переходного состояния (типа коформицина), очень медленно образующие первичный комплекс с АДА, который посредством конформационных изменений превращается в более прочный ассоциат (K_d 1 пМ–5 мкМ). На основании полученных данных сделан вывод о том, что активный центр фермента имеет структуру, приспособленную для связывания основного состояния субстрата, последующий переход к промежуточному комплексу сопровождается некоторой перестройкой этой структуры.

В 1986 году было исследовано строение ингибирующего комплекса АДА с радиоактивным 2'-дезоксикоформицином, являющимся устойчивым аналогом переходного состояния в реакции ферментативного дезаминирования [31]. Определено влияние рН на скорости комплексообразования и диссоциации. С помощью изотопных меток исследовано строение комплекса. Анализ УФ спектров и характер влияния рН на связывание фермента и ингибитора свидетельствуют о том, что 2'-дезоксикоформицин связывается в комплекс в виде нейтральных частиц у центра, менее полярного, чем вода. Фермент и ингибитор удерживаются вместе водородными связями высокой прочности (~ 10 ккал/моль). Предположено, что дезаминирование протекает с прямой атакой молекулы воды, а фермент выступает в роли общего основного катализатора.

В 1990 году впервые была экспериментально обнаружена протонированная форма аналога субстрата в активном центре АДА [32]. Конкурентный аналог аденозина – 1- N^6 -этилено-[эритро-9-(2(*S*)-гидрокси-3(*R*)-нонил)]аденин (схема 3) – интенсивно флуоресцирующее соединение с квантовым выходом $\sim 0,6$ и временем жизни 23 нс.

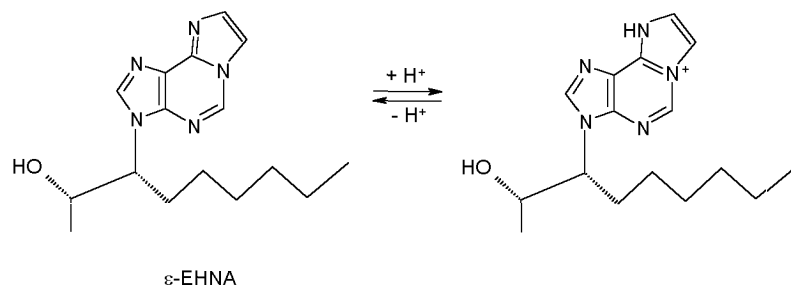


Схема 3. Равновесие протонирования 1- N^6 -этилено-[эритро-9-(2(*S*)-гидрокси-3(*R*)-нонил)]аденина (ϵ -EHNA) в активном центре АДА

Этот конкурентный ингибитор ($K_i = (4,06 \pm 1,00) \cdot 10^{-6}$ М) сочетает способность к ингибированию, свойственную (+)-эритро-9-[2(*S*)-гидрокси-3(*R*)-нонил]аденину, со спектральными свойствами N^6 -этиленoadенина. С помощью ЭВМ получен спектр возбуждения изученного ингибитора в активном центре фермента. Этот спектр напоминает таковой ингибитора в буферном растворе с рН 5,5 и указывает на сдвиг в равновесии протонирования, имеющем место в активном центре.

Наряду с механизмом реакции нуклеофильного замещения по типу S_NAr был предложен механизм 1,6-присоединения молекулы воды (по типу Ad_N) к пуририбонуклеозиду [33]. В разбавленном водном растворе константа равновесия для реакции присоединения воды к нейтральной форме пуририбонуклеозида равна $2 \cdot 10^{-9}$. Образующийся комплекс охарактеризован методами ^{13}C -ЯМР и УФ спектроскопии. Полученные данные сопоставлены с результатами изучения комплексов пуририбонуклеозида с АДА. Было выдвинуто предположение, что пуририбонуклеозид связывается ферментом как 1,6-ковалентный гидрат, а не через SH-группу активного центра. Расчёты показали, что эффективная активность субстратной воды в активном центре составляет $\sim 10^{10}$ М. Величина K_i для активного диастереомера 6-гидрокси-1,6-дигидропуририбонуклеозида равна $1,6 \cdot 10^{-13}$ М, что на ~ 8 порядков меньше значений K_d для комплексов АДА с аденозином (субстрат) или инозином (продукт).

Из имеющихся литературных данных можно сделать вывод, что, вероятнее всего, реакция ферментативного дезаминирования протекает по механизму S_NAr . В

пользу этого механизма говорит факт обнаружения в активном центре АДА протонированной формы аналога аденозина – 1- N^6 -этилено-[эритро-9-(2(*S*)-гидроксиз(3(*R*)-нонил)]аденина.

В последние 10 лет проводятся исследования аденозина и его аналогов как субстратов и ингибиторов АДА методами компьютерной химии. В работе [34] с использованием методов MNDO и AM1 проведено квантово-химическое исследование 10 субстратов АДА. Обнаруженная корреляция между рассчитанными *ab initio* зарядами пуриновых и пиримидиновых гетероциклов и скоростью катализируемой ферментом реакции дезаминирования нуклеозидов ($\log V_{\max}$) позволила предположить, что протонирование атома азота N1 гетероцикла является важным моментом в стадии, лимитирующей скорость реакции. В то же время полученная в этих расчётах предпочтительность *анти*-конформации 8-замещённых производных аденозина не коррелировала с величиной $\log V_{\max}$.

В другой статье [35] с помощью метода возмущений определяли вклад в величину свободной энергии связывания с АДА ОН-группы аналога переходного состояния – небуларина. Для этого вычисляли разность свободных энергий сольватаций 1,6-дигидропуринового и 6-гидроксиз-1,6-дигидропуринового комплекса. Вычисленное изменение свободной энергии ΔG , связанное с сольватацией, равно -11,8 ккал/моль, что предполагает разность свободных энергий взаимодействия исследуемых ингибиторов с ферментом, по крайней мере, в 20 ккал/моль. Из-за отсутствия в то время кристаллографических данных для фермента были построены модели фермент-ингибиторного комплекса. Активный центр рассматривался как COO^- -группа, способная образовывать водородную связь с ОН-группой аналога. В первой модели рассматривалась ассоциация CH_3COO^- -иона с модифицированным ингибитором. Вторая модель включала в себя гидрофобный карман с внутренним остатком глутамата в активном центре. С помощью моделей были вычислены изменение свободной энергии ассоциации и общее изменение свободной энергии связывания как в присутствии, так и в отсутствие воды. Из полученных результатов следовало, что замена только лишь COO^- -группы не может объяснить влияние ОН-группы на связывание без дополнительных взаимодействий в активном центре АДА.

В работе [36] методом молекулярной механики изучали конформационную гибкость аденозина в газовой фазе. Результаты расчётов показывают, что аденозин главным образом находится в *анти*-конформации (гликозидный торсионный угол находится в интервале $200\text{--}210^\circ$); менее устойчивой является *син*-конформация (гликозидный торсионный угол $50\text{--}60^\circ$). Рибоза устойчива в двух конформационных областях псевдовращений: *N*- ("north") и *S*- ("south"), причём в *S*-области устойчивы и *анти*-, и *син*-конформации. Совместное рассмотрение псевдовращений рибозы и вращений вокруг гликозидной связи позволили выявить три преимущественные конформации аденозина: *S-анти*, *N-анти* и *S-син*. Для определения активных конформаций аденозина в активном центре АДА было рассмотрено 69000 конформеров аденозина. Активные конформации характеризуются: изгибами рибозы с фазовыми углами между 304 и 32° , 160 и 224° , гликозидными торсионными углами от 150 до 235° ; для вращений вокруг экзоциклической связи преимущественными являются *гош-гош*- и *гош-транс*-конформации.

В последние годы появились данные по рентгеноструктурному анализу кристаллов АДА в комплексе с различными ингибиторами [2, 37–40], включая мутантные формы фермента [41, 42]. После определения пространственной структуры АДА было проведено теоретическое исследование ингибирования этого фермента 8(*R*)-коформацином и 8(*R*)-дезоксикоформацином [43], различающимися лишь нали-

чием или отсутствием 2'-ОН-группы в остатке β -D-рибофуранозы. Динамика траектории молекул в течение 100 пс обнаруживает, что Asp19 и His17 взаимодействуют по 5'-ОН-группе углеводной части обоих ингибиторов. 2'- и 3'-ОН-группы сахаров находятся вблизи поверхности "белок-вода" и могут быть стабилизированы остатками аминокислот белка или водой. Гибкость остатков при открытии активного центра помогает объяснить слабое различие в связывании двух ингибиторов и то, как субстраты/ингибиторы могут входить в недоступный связующий участок.

Всё это позволило понять в общих чертах механизм ферментативного дезаминирования аденозина и его различных аналогов, однако до сих пор нет компьютерного анализа данных о взаимосвязи между структурой, конформацией и субстратными свойствами различных аналогов аденозина, модифицированных как по гетероциклическому, так и по углеводному остатку. Немногочисленны также данные о механизме связывания субстрата и его аналогов с активным центром фермента на уровне взаимодействия атомов и функциональных групп [2, 37–43]. Подобные исследования необходимы для установления взаимосвязи "структура-субстратные свойства" у различных аналогов аденозина в отношении АДА, чтобы в дальнейшем проводить более целенаправленный поиск веществ, устойчивых к дезаминированию и/или ингибирующих данный фермент. Такие соединения могут быть как "химическими инструментами" для исследования особенностей метаболизма в различных клеточных и тканевых культурах, так и потенциальными противоопухолевыми и противовирусными препаратами, а также иммунодепрессантами.

Для изучения механизма связывания субстрата и его аналогов с активным центром АДА нами были выбраны аденозин и его различные аза- и деазапроизводные. Интерес к этой группе соединений обусловлен следующими причинами.

Во-первых, эти соединения имеют неизменённый остаток β -D-рибофуранозы, что сохраняет все его специфические взаимодействия с активным центром фермента.

Во-вторых, замещения на атомы С и N, на группы СН и NH в различных положениях остатка гетероцикла приводят не только к изменению распределения электронной плотности в нём, но и к изменению характера его связывания с различными функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА.

В-третьих, все соединения этой группы являются изоэлектронными, стерические изменения структуры гетероцикла в них минимальны, а локализация NH₂-группы, функционально значимой для ферментативного дезаминирования, не изменена.

В-четвёртых, для всех этих соединений имеются данные о субстратных свойствах в отношении АДА млекопитающих.

В-пятых, несмотря на то, что для ряда молекул этих соединений ранее были проведены квантово-химические исследования различными полуэмпирическими методами [44–47], их результаты во многом устарели, и, самое главное, они зачастую несопоставимы друг с другом, не проведено обсуждение результатов квантово-химических расчётов данных молекул в отношении конкретных ферментов.

В настоящей работе проведен анализ распределения электростатического потенциала в молекулах аденозина, его 2-, 8-аза- и 1-, 3-, 7-, 9-дезааналогов, а также их 1H-катионов (кроме 1-дезааденозина), в области конформаций, активных по отношению к АДА. Полученные результаты расчётов сопоставлены с экспериментальными данными по субстратной активности этих соединений для данного фермента.

В табл. 1 приведён список всех исследованных соединений, их систематические и тривиальные названия, литературные ссылки, в которых описаны субстратные свойства аденозина и его аза- и деазааналогов в отношении АДА.

Таблица 1

Систематические, тривиальные названия и сокращённые обозначения для аденозина и его аза- и деазааналогов

N п/п	Систематическое название по номенклатуре ИЮПАК	Тривиальное название	Сокращённое обозначение	Литература
1	7-амино-3-(1'- β -D-рибофуранозил)- 3H-имидазо[4,5-b]пиридин	1-деазааденозин	1cAdo	[38, 48–51]
2	4-амино-7-(1'- β -D-рибофуранозил)- 7H-имидазо[4,5-d]-1,2,3-триазин	2-азааденозин	2nAdo	[7]
3	4-амино-1-(1'- β -D-рибофуранозил)- 1H-имидазо[4,5-c]пиридин	3-деазааденозин	3cAdo	[48–50]
4	4-амино-7-(1'- β -D-рибофуранозил)- 7H-пирроло[2,3-d]пиримидин	7-деазааденозин (туберцидин)	7cAdo	[48–50, 52–56]
5	7-амино-3-(1'- β -D-рибофуранозил)- 3H-1,2,3-триазоло[4,5-d]пиримидин	8-азааденозин	8nAdo	[54, 56]
6	4-амино-7-(1'- β -D-рибофуранозил)- 5H-пирроло[3,2-d]пиримидин	9-деазааденозин	9cAdo	[57]
7	6-амино-9-(1'- β -D-рибофуранозил)- 9H-имидазо[4,5-d]пиримидин	аденозин	Ado	[25–29, 52–56]

1. Расчётная часть

Распределение электростатического потенциала в молекулах аденозина и его аза- и деазааналогов, а также их 1H-катионов, рассчитывали в области конформаций, активных по отношению к АДА, полуэмпирическим методом AM1, предложенным Дьюаром с соавт. [58] для расчёта гетероциклических соединений взамен более раннего метода MNDO, неспособного правильно воспроизводить энергию водородных связей. Развитый позднее на базе AM1 полуэмпирический метод PM3, репараметризованный с учётом большего числа экспериментальных характеристик молекул (в нём заметно уменьшена энергия невалентного отталкивания), оказался непригодным из-за некорректных результатов расчёта распределения электронной плотности в протонированных гетероциклах по сравнению с непротонированными.

Так, по результатам проведённых нами расчётов на атоме C6 частичный положительный заряд в 1H-катионах нуклеозидов оказался меньше (!), чем в молекулах, что находится в полном противоречии с экспериментальными данными и результатами расчётов по методам MNDO и AM1. Расчёты проведены с помощью программных пакетов Chem3D Ultra [59] и HyperChem [60].

Структуры молекул и 1H-катионов нуклеозидов были созданы в программе HyperChem. Значения стартовых углов и типов конформаций для всех структур следующие: гликозидный торсионный угол $\chi=244,60^\circ$, *анти*-конформация; амплитуда складчатости β -D-рибофуранозы $\tau_m=43,85^\circ$; торсионный угол $\phi=119,84^\circ$, *S*-конформер β -D-рибофуранозы, O1'-*эндо*-конформация; экзоциклический торсионный угол $\psi=304,47^\circ$, *гош-гош*-конформер. Полученные структуры сохранялись в ENT-формате и далее их энергии минимизировались в программе Chem3D Ultra.

При минимизации энергии были установлены следующие параметры в программе Chem3D Ultra. Minimize Energy: Job Type – Minimize Energy, Minimum RMS Gradient – 0.100. Theory: Method – AM1, Wave Function – Closed Shell (Restricted). Properties: Properties – Heat of Formation, Gradient Norm, Dipole, Charges; Charges – Mulliken. General: Additional Keywords – CHARGE=+1 (только для 1H-катионов) LET DDMIN=0.0.

После окончания минимизации полученные структуры были перенесены обратно в HyperChem для расчёта изоповерхностей электростатических потенциалов. Сначала методом Single Point на атомах рассчитывались частичные Net-заряды, затем проводился расчёт изоповерхностей. В основном использовались параметры по умолчанию, были изменены следующие опции: Molecular Properties: Property – Electrostatic Potential, Representation – 3D Isosurface; Isosurface Grid: Grid Mesh Size – Fine; Isosurface Rendering: Total charge density contour value – 0.05 (для молекул) или 0.2 (для 1*H*-катионов)⁴, Rendering – Wire mesh.

Были получены данные расчётов следующих характеристик: теплоты образования молекулы или 1*H*-катиона (ккал/моль), сродства к протону (ккал/моль), распределения электронной плотности (дол. эл.), дипольного момента (Д), длин связей (Å), валентных и торсионных углов (°). Ниже обсуждаются наиболее значимые из них.

2. Результаты и их обсуждение

Энергия каждой из структур минимизирована в одной из возможных конформационных областей, которая по данным работы [36] является активной в отношении АДА. Поэтому результаты расчётов позволяют оценить различия в распределении электронной плотности, а значит и электростатического потенциала, между аденозином и его аза- и деазааналогами, между молекулами и соответствующими 1*H*-катионами.

Для всех молекул нуклеозидов и их 1*H*-катионов (см. табл. 2, 4 и 5), кроме 1-дезааденозина, наблюдается увеличение частичного положительного заряда на атоме углерода С6 при присоединении в *орто*-положение протона к атому азота N1 гетероцикла, что подтверждает экспериментальные данные о необходимости протонирования этого атома азота для успешного протекания ферментативной реакции дезаминирования [28, 29], особенно, если в качестве нуклеофила выступает цинк-активированная молекула воды [38]. В табл. 2 приведены данные по суммарным дипольным моментам молекул и их 1*H*-катионов (Д), частичным зарядам на атоме углерода С6 (дол. эл.), разностям между зарядами на атоме С6 (дол. эл.) у 1*H*-катионов и соответствующих им молекул, а в табл. 3 – по теплотам образования молекул и соответствующих им 1*H*-катионов (ккал/моль), сродству молекул к протону (ккал/моль).

Таблица 2

Электрические характеристики молекул аденозина, его аза- и деазааналогов и их 1*H*-катионов⁵

N п/п	Соединение	Дипольный момент молекулы суммарный, Д	Дипольный момент 1 <i>H</i> -катиона суммарный, Д	Заряд на атоме С6 в молекуле, дол. эл.*	Заряд на атоме С6 в 1 <i>H</i> -катионе, дол. эл.*	Разность зарядов на атоме С6, дол. эл.*
1	1cAdo	1,411	–	0,217	–	–
2	2nAdo	3,817	10,827	0,250	0,371	0,121
3	3cAdo	2,721	9,702	0,257	0,370	0,113
4	7cAdo	1,862	11,760	0,251	0,366	0,115
5	8nAdo	2,441	14,016	0,320	0,407	0,087
6	9cAdo	5,216	15,886	0,180	0,355	0,175
7	Ado	0,711	11,969	0,297	0,382	0,085

⁴ Это минимальные значения, при которых ещё не наблюдается разрыв изоповерхностей электростатических потенциалов

⁵ * – В таблице даны значения Mulliken-зарядов

Таблица 3

Энергетические характеристики молекул аденозина, его аза- и деазааналогов и их 1*H*-катионов

N п/п	Соединение	Теплота образования молекулы, ккал/моль	Теплота образования 1 <i>H</i> -катиона, ккал/моль	Средство молекулы к протону, ккал/моль
1	1cAdo	-104,05	—	—
2	2nAdo	-57,30	95,27	152,57
3	3cAdo	-100,85	34,86	135,71
4	7cAdo	-101,13	37,97	139,10
5	8nAdo	-51,95	96,87	148,82
6	9cAdo	-112,02	27,43	139,45
7	Ado	-90,56	51,86	142,12

Таблица 4

Значения Mulliken-зарядов на атомах в молекулах аденозина и его аза- и деазааналогов (дол. эл.)

Имена атомов	1cAdo	2nAdo	3cAdo	7cAdo	8nAdo	9cAdo	Ado
C1	-0,356	—	—	—	—	—	—
N1	—	-0,203	-0,277	-0,304	-0,309	-0,268	-0,310
H1	0,208	—	—	—	—	—	—
C2	-0,044	—	-0,035	-0,001	0,023	-0,039	0,008
N2	—	0,066	—	—	—	—	—
H2	0,228	—	0,227	0,264	0,274	0,268	0,267
C3	—	—	-0,321	—	—	—	—
H3	—	—	0,212	—	—	—	—
N3	-0,240	-0,174	—	-0,276	-0,264	-0,214	-0,273
C4	0,100	0,062	0,066	0,138	0,122	0,049	0,116
C5	-0,179	-0,216	-0,190	-0,249	-0,305	-0,137	-0,237
C6	0,217	0,250	0,257	0,251	0,320	0,180	0,297
N6	-0,510	-0,507	-0,499	-0,502	-0,517	-0,452	-0,524
1H6	0,299	0,323	0,300	0,285	0,324	0,244	0,320
2H6	0,277	0,318	0,289	0,294	0,315	0,265	0,310
C7	—	—	—	-0,214	—	—	—
N7	-0,163	-0,144	-0,156	—	-0,056	-0,330	-0,149
H7	—	—	—	0,220	—	0,328	—
C8	-0,043	-0,043	-0,050	-0,110	—	-0,065	-0,050
N8	—	—	—	—	0,064	—	—
H8	0,284	0,292	0,283	0,246	—	0,250	0,287
C9	—	—	—	—	—	-0,158	—
N9	-0,316	-0,291	-0,327	-0,275	-0,279	—	-0,310
C1'	0,146	0,118	0,144	0,142	0,154	0,064	0,145
H1'	0,209	0,191	0,214	0,208	0,241	0,175	0,211
O1'	-0,315	-0,312	-0,312	-0,313	-0,309	-0,300	-0,314
C2'	-0,028	-0,078	-0,033	-0,030	-0,031	-0,023	-0,030
H2'	0,192	0,229	0,178	0,189	0,189	0,171	0,191
O2'	-0,377	-0,361	-0,367	-0,378	-0,372	-0,377	-0,377
HO2'	0,275	0,259	0,276	0,275	0,276	0,267	0,276
C3'	-0,090	-0,083	-0,090	-0,089	-0,092	-0,090	-0,090
H3'	0,203	0,207	0,178	0,203	0,202	0,188	0,204
O3'	-0,381	-0,375	-0,376	-0,381	-0,378	-0,380	-0,380
HO3'	0,259	0,259	0,260	0,260	0,260	0,255	0,261
C4'	-0,093	-0,061	-0,095	-0,093	-0,080	-0,095	-0,094
H4'	0,172	0,190	0,177	0,170	0,177	0,162	0,174
C5'	-0,112	-0,113	-0,116	-0,111	-0,114	-0,106	-0,113
1H5'	0,141	0,145	0,146	0,141	0,143	0,136	0,142
2H5'	0,157	0,167	0,159	0,157	0,160	0,151	0,159
O5'	-0,377	-0,380	-0,382	-0,378	-0,374	-0,383	-0,377
HO5'	0,259	0,263	0,262	0,260	0,254	0,265	0,258

Таблица 5

Значения Mulliken-зарядов на атомах в катионах 1*H*-аденозиния и его аза- и деазааналогов (дол. эл.)

Имена атомов	1 <i>H</i> -2nAdo	1 <i>H</i> -3cAdo	1 <i>H</i> -7cAdo	1 <i>H</i> -8nAdo	1 <i>H</i> -9cAdo	1 <i>H</i> -Ado
N1	-0,371	-0,359	-0,408	-0,416	-0,395	-0,409
H1	0,389	0,350	0,354	0,362	0,356	0,357
C2	—	-0,050	0,058	0,081	0,039	0,065
N2	0,150	—	—	—	—	—
H2	—	0,273	0,314	0,324	0,318	0,318
C3	—	-0,198	—	—	—	—
N3	-0,007	—	-0,150	-0,139	-0,120	-0,144
H3	—	0,299	—	—	—	—
C4	0,071	0,096	0,166	0,163	0,081	0,155
C5	-0,184	-0,182	-0,244	-0,289	-0,178	-0,214
C6	0,371	0,370	0,366	0,407	0,355	0,382
N6	-0,475	-0,503	-0,510	-0,484	-0,524	-0,492
1H6	0,375	0,369	0,352	0,375	0,339	0,373
2H6	0,341	0,329	0,333	0,339	0,336	0,333
C7	—	—	-0,199	—	—	—
N7	-0,114	-0,132	—	-0,018	-0,303	-0,125
H7	—	—	0,250	—	0,347	—
C8	-0,017	-0,020	-0,082	—	-0,003	-0,018
N8	—	—	—	0,112	—	—
H8	0,337	0,323	0,289	—	0,329	0,331
C9	—	—	—	—	-0,130	—
N9	-0,225	-0,268	-0,215	-0,213	—	-0,253
C1'	0,086	0,101	0,089	0,108	0,023	0,092
H1'	0,237	0,208	0,229	0,259	0,206	0,232
O1'	-0,286	-0,299	-0,292	-0,272	-0,297	-0,291
C2'	-0,068	-0,073	-0,070	-0,076	-0,065	-0,069
H2'	0,222	0,205	0,224	0,221	0,196	0,225
O2'	-0,348	-0,349	-0,352	-0,347	-0,358	-0,351
HO2'	0,275	0,272	0,271	0,274	0,265	0,273
C3'	-0,076	-0,079	-0,076	-0,077	-0,076	-0,076
H3'	0,196	0,197	0,196	0,191	0,177	0,193
O3'	-0,364	-0,368	-0,366	-0,362	-0,368	-0,365
HO3'	0,272	0,271	0,268	0,270	0,266	0,269
C4'	-0,038	-0,030	-0,032	-0,040	-0,029	-0,034
H4'	0,226	0,212	0,216	0,225	0,207	0,222
C5'	-0,130	-0,123	-0,127	-0,130	-0,128	-0,130
1H5'	0,156	0,159	0,151	0,157	0,150	0,153
2H5'	0,152	0,152	0,146	0,150	0,147	0,148
O5'	-0,410	-0,417	-0,400	-0,410	-0,416	-0,404
HO5'	0,256	0,262	0,250	0,252	0,257	0,252

Из данных табл. 2 и 3 видно, что дипольные моменты у 1*H*-катионов всегда выше, чем у исходных молекул, разности между зарядами на атоме C6 у 1*H*-катионов и молекул меняются от 0,085 дол. эл. (аденозин) до 0,175 дол. эл. (9-деазааденозин), сродство к протону у молекул изменяется незначительно – от 135,71 ккал/моль (3-деазааденозин) до 152,57 ккал/моль (2-азааденозин). Однако эти характеристики никак не коррелируют с субстратными свойствами аденозина и его аза- и деазааналогов, что позволило выдвинуть предположение о важной роли взаимодействий определённых положений в гетероцикле с различными функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА. Наряду с этими взаимодействиями не меньшую роль может играть конформация как самого остатка β -*D*-рибофуранозы, так и его конформация относительно остатка гетероцикла. В табл. 4 и 5 приведены данные по рассчитанным значениям Mulliken-зарядов на атомах в молекулах и

1*H*-катионах нуклеозидов (дол. эл.), из которых следует, что протонирование остатка гетероцикла приводит к существенному изменению распределения электронной плотности в нём, в то время как в остатке β -*D*-рибофуранозы значения Mulliken-зарядов для молекул аденозина, его аза- и деазааналогов и их 1*H*-катионов различаются незначительно.

Как свидетельствуют экспериментальные данные, 7-деазааденозин не проявляет субстратных свойств и не является конкурентным или неконкурентным ингибитором АДА млекопитающих [48–50, 52–56]. Как показывают квантово-химические расчёты, он не имеет в положении 7 гетероцикла отрицательного электростатического потенциала (см. рис. 6). Из данных рентгеноструктурного анализа (далее – РСА) известно, что замена остатка Asp296 на Ala296 приводит к почти полной потере каталитической активности данной мутантной формы АДА [41]. Таким образом, можно заключить, что образование водородной связи между атомом водорода COOH-группы остатка Asp296 и атомом азота N7 остатка гетероцикла играет исключительно важную роль в связывании субстрата или его аналога с активным центром АДА. Для 9-деазааденозина [57], имеющего в положении 7 гетероцикла NH-группу, а в положении 9 – атом углерода, наблюдается картина, аналогичная 7-деазааденозину (рис. 8).

1-Деазааденозин, в отличие от 7- и 9-деазааденозинов, является сильным конкурентным ингибитором АДА и ею не дезаминируется [48–51]. Несмотря на отсутствие отрицательного электростатического потенциала в положении 1 гетероцикла (рис. 3), он является сильным ингибитором фермента вследствие своей изоэлектронности или изоструктурности катиону 1*H*-аденозиния (рис. 15). В случае 1-деазааденозина удалось провести РСА его фермент-ингибиторного комплекса для АДА мыши [38] (рис. 2). При связывании субстрата с активным центром АДА мыши, по всей видимости, происходит образование водородной связи между COOH-группой остатка Glu217 и атомом азота N1 гетероцикла с последующим его протонированием, что невозможно в случае 1-деазааденозина. Это подтверждается данными РСА для фермент-ингибиторного комплекса 6(*R*)-гидрокси-1,6-дигидропуририбозидом с АДА мыши, в котором COOH-группа остатка Glu217 протонирует атом азота N1 гетероцикла [2] (см. рис. 2).

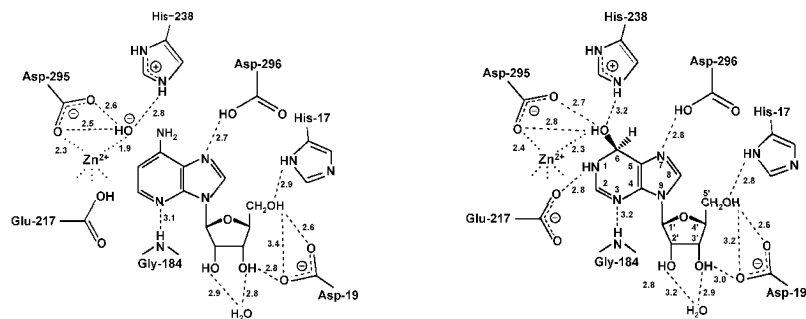


Рис. 2. Схематическая диаграмма взаимодействий между АДА и 1-дезааденозином (слева) и между АДА и 6(*R*)-гидрокси-1,6-дигидропуририбозидом (справа) по данным РСА. Числа около пунктирных линий показывают расстояния (Å) между уточнёнными неводородными атомами. Точечные линии изображают координационные взаимодействия с цинком. Данные взяты из работы [38]

Для 3-дезааденозина, в отличие от 1-дезааденозина, наблюдается меньшая ингибиторная активность, и он также не дезаминируется АДА [48–50]. Это можно объяснить тем, что в данном случае образуется водородная связь между атомом азота N7 гетероцикла и COOH-группой остатка Asp296, но отсутствует водородная связь между протоном CONH-группы остатка Gly184 и атомом азота N3 гетероцикла [2, 38] по причине замещения этого атома азота на СН-группу. Это, вероятно, приводит к тому, что в силу стерических затруднений вместо переноса протона от COOH-группы остатка Glu217 на атом азота N1 гетероцикла происходит лишь образование соответствующей водородной связи, что недостаточно для дезаминирования 3-дезааденозина АДА. Согласно результатам квантово-химических расчётов, молекула 3-дезааденозина не имеет в положении 3 гетероцикла отрицательного электростатического потенциала (рис. 5).

Для 2-азааденозина скорость ферментативного дезаминирования существенно ниже, чем для аденозина [7], так как эндоциклический атом азота, находящийся в положении 2 гетероцикла (*мета*-положение) вместо СН-группы, в силу своей электроноакцепторности резко снижает способность гетероцикла дезаминироваться цинк-активированной молекулой воды по механизму S_NAr . Область отрицательного электростатического потенциала в молекуле 2-азааденозина охватывает атомы азота N1, N2 и N3 (рис. 4), её взаимодействие с протоном COOH-группы остатка Glu217, вероятно, дополнительно снижает скорость дезаминирования этого соединения.

8-Азааденозин дезаминируется также медленнее, чем аденозин, для которого он является и конкурентным ингибитором [54, 56]. Это можно объяснить тем, что область отрицательного электростатического потенциала, создаваемого атомами азота N7 и N8 гетероцикла, в молекуле 8-азааденозина (рис. 7) больше, чем в молекуле аденозина (рис. 9). В результате остаток Asp296 связывает молекулу 8-азааденозина более эффективно, что приводит к уменьшению скорости ферментативного дезаминирования данного соединения.

Для остатка β -D-рибофуранозы в исследованных нуклеозидах характерно наличие областей отрицательного электростатического потенциала в положениях C2', C3' и C5' у атомов кислорода соответствующих OH-групп (рис. 3–9). При этом 3'-ОН- и 5'-ОН-группы вовлечены в сложную систему водородных связей в активном центре АДА [38]. COO⁻-группа остатка Asp19 образует одновременно три водородные связи: две с 5'-ОН-группой и одну – с 3'-ОН-группой. Остаток His17 посредством протона при атоме N1 имидазольной группы образует водородную связь с атомом кислорода 5'-ОН-группы. 2'-ОН- и 3'-ОН-группы образуют водородные связи с одной из молекул воды в кристаллической структуре комплекса фермент-ингибитор, но наличие 2'-ОН-группы не является необходимым условием для связывания субстрата или его аналога с активным центром АДА, так как она не образует каких-либо водородных связей с остатками аминокислот в активном центре фермента.

Для катионов 1*H*-аденозиния, его 2-, 8-аза- и 3-, 7-, 9-дезааналогов изоповерхность электростатического потенциала существенно меняет свой вид: за счёт протонирования молекул исчезают полностью области отрицательного электростатического потенциала, размеры которых больше ван-дер-ваальсовых радиусов атомов в 1*H*-катионах нуклеозидов, а области положительного электростатического потенциала в положениях 1, 2 и 6 гетероцикла сходны с таковой у 1-дезааденозина (рис. 10–15). Это позволяет выдвинуть предположение, что молекула 1-дезааденозина проявляет ингибиторные свойства в отношении АДА не только в силу структурного сходства с катионом 1*H*-аденозиния, но и сходства изоповерхности электростатического потенциала, не имея при этом положительного заряда.

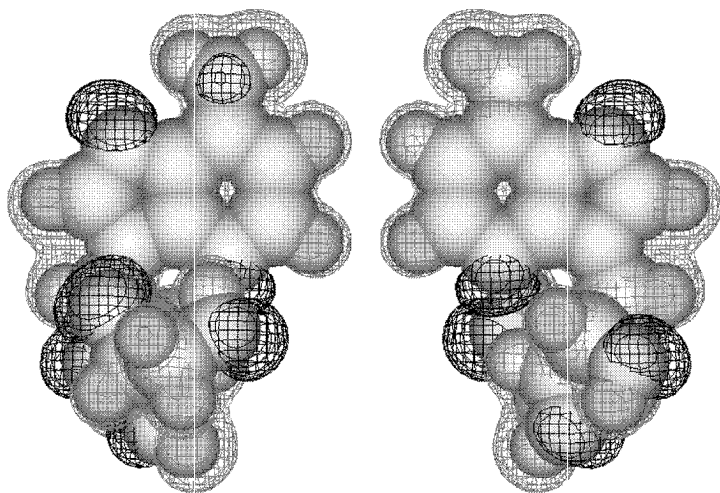


Рис. 3. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекуле 1-дезааденозина

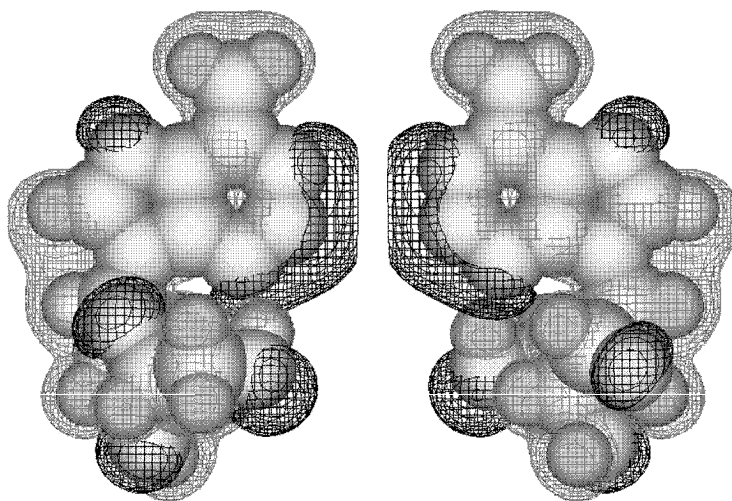


Рис. 4. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекуле 2-азааденозина

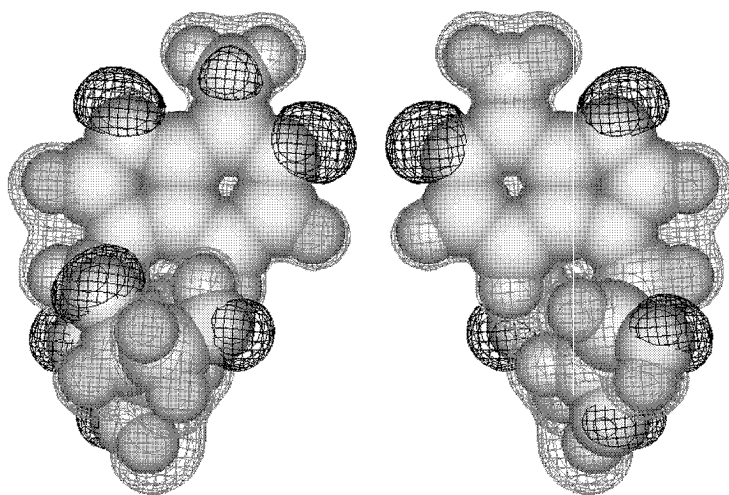


Рис. 5. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекуле 3-дезааденозина

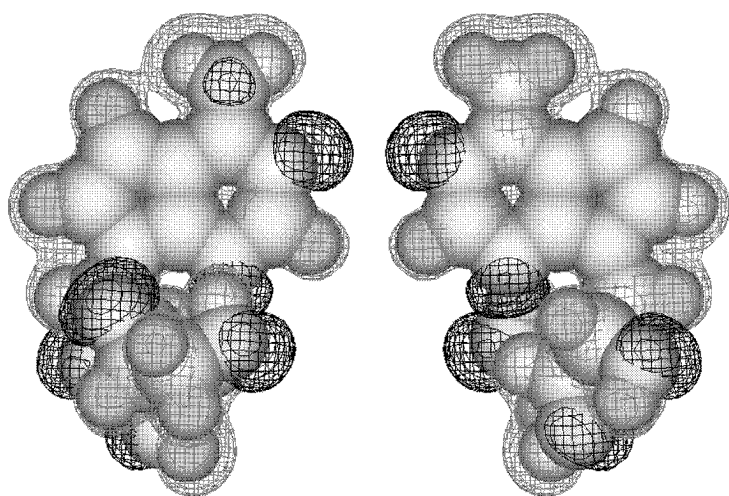


Рис. 6. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекуле 7-дезааденозина

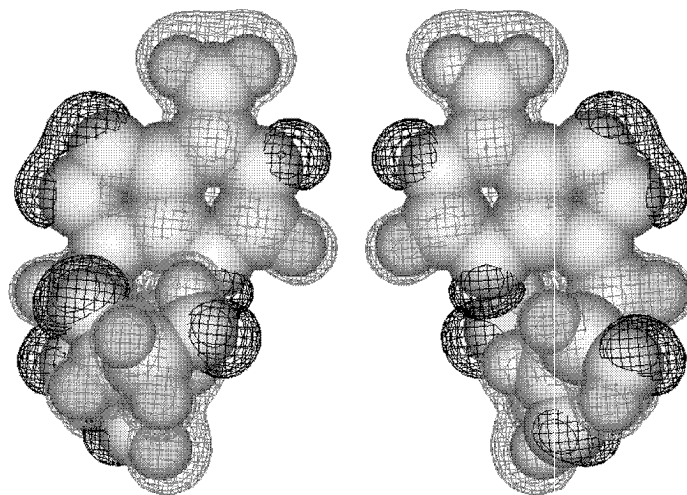


Рис. 7. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекуле 8-азааденозина

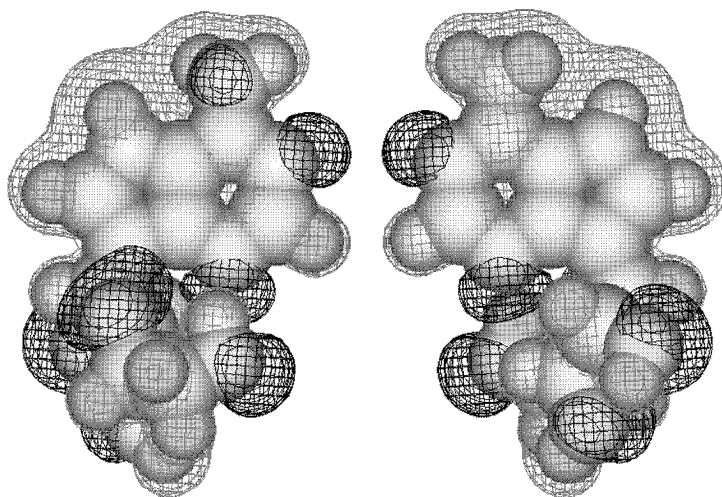


Рис. 8. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекуле 9-дезааденозина

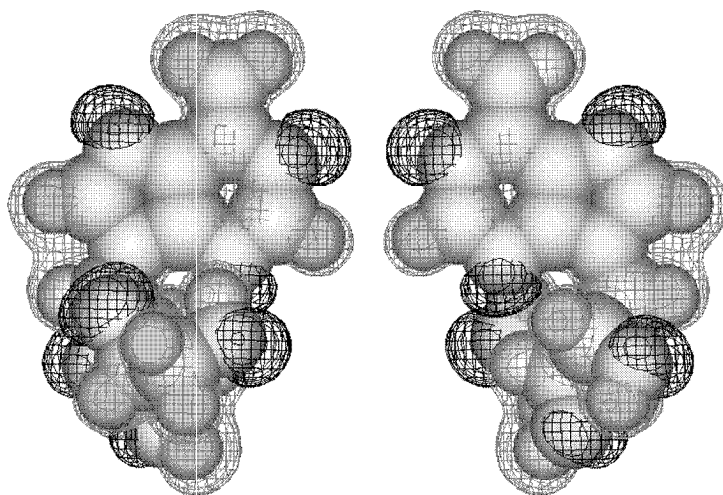


Рис. 9. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекуле аденозина

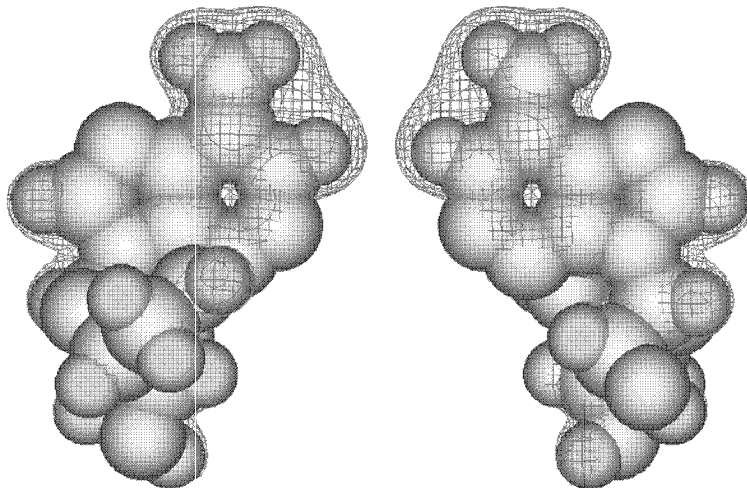


Рис. 10. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в катионе 1H-2-азааденозиния

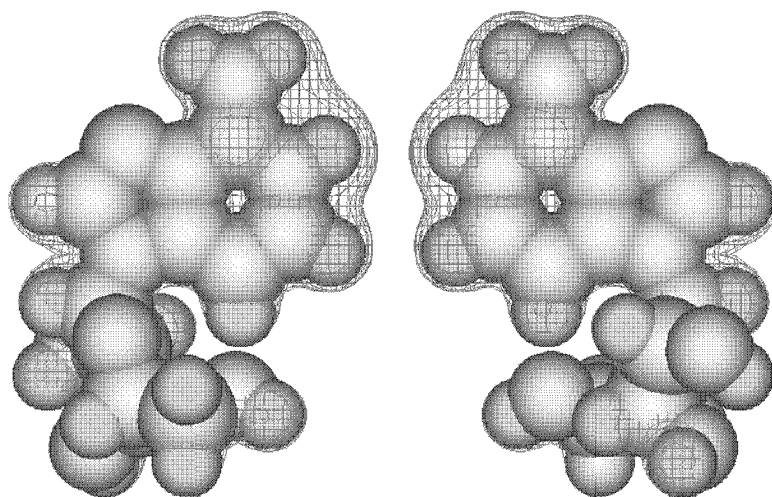


Рис. 11. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в катионе $1H$ -3-дезааденозиния

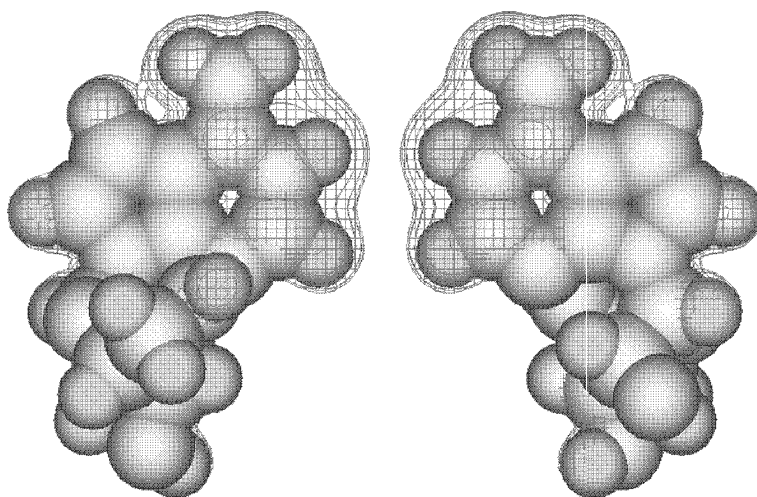


Рис. 12. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в катионе $1H$ -7-дезааденозиния

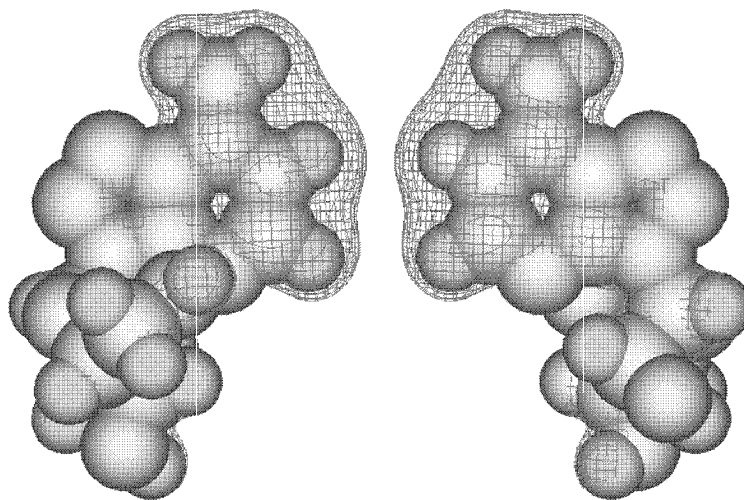


Рис. 13. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в катионе $1H$ -8-азааденозиния

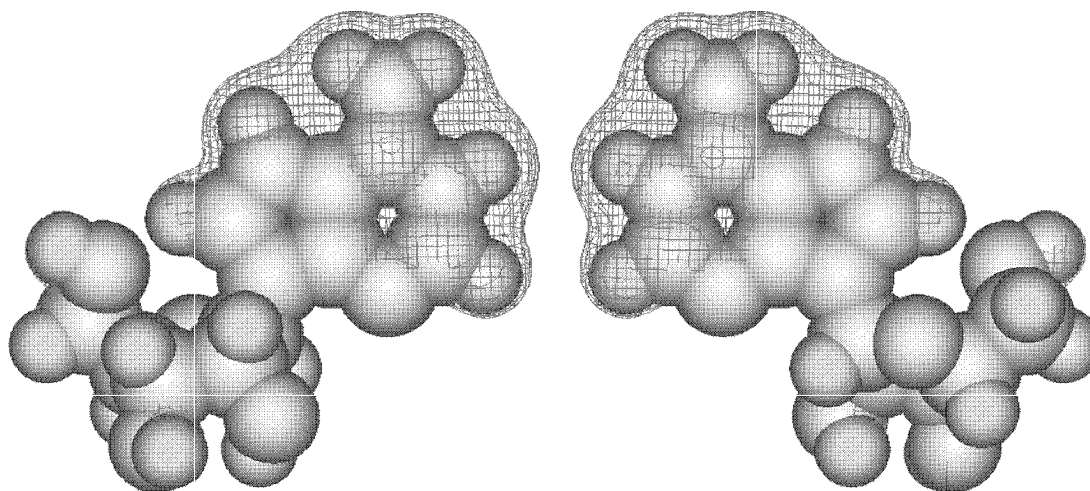


Рис. 14. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в катионе $1H$ -9-дезааденозиния

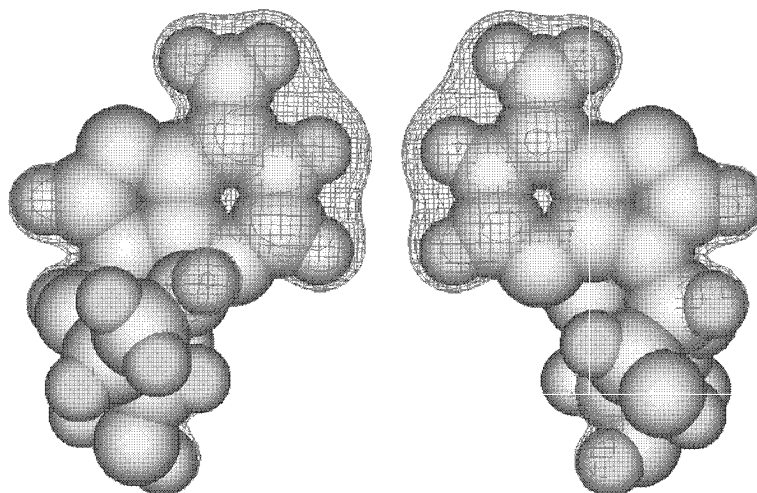


Рис. 15. Изоповерхности электростатических потенциалов в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в катионе 1*H*-аденозиния

Конформационные характеристики молекул аденозина и его аза- и деазааналогов даны в табл. 6 и 7. Конформации гликозидной связи C1'-N(C)9 лежат в области *сверх-анти*-конформации – значения торсионного угла O1'C1'N(C)9C4 (χ) от 283,40°

Таблица 6

Конформационные характеристики молекул аденозина, его аза- и деазааналогов и амплитуда складчатости остатка β -*D*-рибофуранозы в них

N п/п	Молекула	Торсионный угол O1'C1'N(C)9C4 (χ), °	Конформация гликозидной связи C1'-N(C)9	Амплитуда складчатости β - <i>D</i> - рибофуранозы τ_m , °
1	1cAdo	284,11	<i>сверх-анти</i>	20,13
2	2nAdo	284,93	<i>сверх-анти</i>	1,13
3	3cAdo	286,70	<i>сверх-анти</i>	13,13
4	7cAdo	286,49	<i>сверх-анти</i>	20,96
5	8nAdo	284,75	<i>сверх-анти</i>	20,34
6	9cAdo	288,68	<i>сверх-анти</i>	23,48
7	Ado	283,40	<i>сверх-анти</i>	19,89

Таблица 7

Конформационные характеристики остатка β -*D*-рибофуранозы в молекулах аденозина и его аза- и деазааналогов

N п/п	Молекула	Торсионный угол O3'C3'C2'C1' (ϕ), °	Конформеры и конформации β - <i>D</i> - рибофуранозы	Торсионный угол O5'C5'C4'O1' (ψ), °	Конформация экзоциклической связи C5'-C4'
1	1cAdo	137,51	<i>N</i> -конформер, C3'- <i>эндо</i>	280,62	<i>гош-гош</i>
2	2nAdo	116,04	<i>S</i> -конформер, O1'- <i>эндо</i> -C1'- <i>экзо</i>	245,21	<i>гош-гош</i>
3	3cAdo	130,69	<i>N</i> -конформер, C3'- <i>эндо</i>	287,47	<i>гош-гош</i>
4	7cAdo	136,84	<i>N</i> -конформер, C3'- <i>эндо</i>	279,53	<i>гош-гош</i>
5	8nAdo	137,17	<i>N</i> -конформер, C3'- <i>эндо</i>	47,13	<i>гош-транс</i>
6	9cAdo	133,93	<i>N</i> -конформер, C3'- <i>эндо</i> -C4'- <i>экзо</i>	285,36	<i>гош-гош</i>
7	Ado	136,98	<i>N</i> -конформер, C3'- <i>эндо</i>	283,40	<i>гош-гош</i>

(аденозин) до $288,68^\circ$ (9-дезааденозин)⁶. Эта конформация, наряду с *анти*-конформацией, является благоприятной для связывания аденозина и его аза- и деазааналогов с активным центром АДА [48], поэтому сильные различия в субстратных свойствах у данных аналогов аденозина можно объяснить особенностями строения гетероциклов и характером их связывания с активным центром фермента, что уже обсуждалось выше. Амплитуда складчатости β -D-рибофуранозы τ_m , характеризующая максимальное отклонение от плоскости различных атомов фуранозного цикла внутри остатка сахара, меняется в пределах от $1,13^\circ$ (2-азааденозин) до $23,48^\circ$ (9-дезааденозин). В основном у молекул нуклеозидов, кроме 2-азааденозина, остатки β -D-рибофуранозы являются *N*-конформерами, а их конформации в большинстве случаев относятся к типу *C3'-эндо*, за исключением 2-азааденозина (*O1'-эндо-C1'-экзо*) и 9-дезааденозина (*C3'-эндо-C4'-экзо*). Конформация экзоциклической связи *C5'-C4'* в основном *гош-гош* – значения торсионного угла *O5'C5'C4'O1'* (ψ) от $245,21^\circ$ (2-азааденозин) до $287,47^\circ$ (3-дезааденозин), за исключением 8-азааденозина, для которого эти параметры соответственно *гош-транс* и $47,13^\circ$.

Конформационные характеристики катионов *1H*-аденозиния и его аза- и деазааналогов даны в табл. 8 и 9. Конформации гликозидной связи *C1'-N(C)9*, за исключением *1H*-9-дезааденозиния, лежат в области *сверх-анти*-конформации – значения торсионного угла χ от $259,11^\circ$ (*1H*-аденозиний) до $297,10^\circ$ (*1H*-3-дезааденозиний), для *1H*-9-дезааденозиния $\chi=144,12^\circ$ (*сверх-син*-конформация). Амплитуда складчатости τ_m для β -D-рибофуранозы приобретает отрицательные значения и меняется в пределах от $-13,05^\circ$ (*1H*-3-дезааденозиний) до $17,66^\circ$ (*1H*-аденозиний).

Таблица 8

Конформационные характеристики катионов *1H*-аденозиния, его аза- и деазааналогов и амплитуда складчатости остатка β -D-рибофуранозы в них

N п/п	<i>1H</i> -Катион	Торсионный угол <i>O1'C1'N(C)9C4</i> (χ), $^\circ$	Конформация гликозидной связи <i>C1'-N(C)9</i>	Амплитуда складчатости β -D- рибофуранозы τ_m , $^\circ$
1	<i>1H</i> -2nAdo	260,98	<i>сверх-анти</i>	17,35
2	<i>1H</i> -3cAdo	297,10	<i>сверх-анти</i>	-13,05
3	<i>1H</i> -7cAdo	263,64	<i>сверх-анти</i>	16,20
4	<i>1H</i> -8nAdo	262,74	<i>сверх-анти</i>	17,12
5	<i>1H</i> -9cAdo	144,12	<i>сверх-син</i>	2,08
6	<i>1H</i> -Ado	259,11	<i>сверх-анти</i>	17,66

Таблица 9

Конформационные характеристики остатка β -D-рибофуранозы в катионах *1H*-аденозиния и его аза- и деазааналогов

N п/п	<i>1H</i> -Катион	Торсионный угол <i>O3'C3'C2'C1'</i> (ϕ), $^\circ$	Конформеры и конформации β -D- рибофуранозы	Торсионный угол <i>O5'C5'C4'O1'</i> (ψ), $^\circ$	Конформация экзоциклической связи <i>C5'-C4'</i>
1	<i>1H</i> -2nAdo	124,02	<i>N</i> -конформер, <i>O1'-экзо-C1'-эндо</i>	287,61	<i>гош-гош</i>
2	<i>1H</i> -3cAdo	109,33	<i>S</i> -конформер, <i>O1'-эндо-C1'-экзо</i>	276,30	<i>гош-гош</i>
3	<i>1H</i> -7cAdo	126,22	<i>N</i> -конформер, <i>C1'-эндо</i>	263,64	<i>гош-гош</i>
4	<i>1H</i> -8nAdo	125,29	<i>N</i> -конформер, <i>C1'-эндо</i>	287,82	<i>гош-гош</i>
5	<i>1H</i> -9cAdo	117,81	<i>S</i> -конформер, <i>C2'-эндо</i>	47,46	<i>гош-транс</i>
6	<i>1H</i> -Ado	124,86	<i>N</i> -конформер, <i>O1'-экзо-C1'-эндо</i>	286,73	<i>гош-гош</i>

⁶Все обозначения и расчётные формулы для определения конформаций нуклеозидов взяты из работы [36]

Конформация типа *сверх-анти* для 1*H*-катионов нуклеозидов является благоприятной для протекания ферментативной реакции дезаминирования в активном центре АДА, поэтому существенные различия в субстратных свойствах исследуемых соединений связаны с различиями в структуре остатка гетероцикла и характером его взаимодействия с остатками аминокислот в активном центре фермента.

Остатки β -*D*-рибофуранозы в 1*H*-катионах нуклеозидов относятся как к *N*-, так и к *S*-конформерам. Но, в отличие от молекул нуклеозидов, их конформации различаются значительно, что указывает на сильное влияние остатка гетероцикла, протонированного по положению 1.

Конформация экзоциклической связи C5'-C4' в основном *гош-гош* – значения торсионного угла ψ от 263,64° (1*H*-7-дезааденозиний) до 287,82° (1*H*-8-азааденозиний). Исключение составляет 1*H*-9-дезааденозиний, для которого эти параметры соответственно *гош-транс* и 47,46°.

Как показывают результаты расчётов, благоприятная в большинстве случаев ориентация 5'-ОН-группы в молекулах исследуемых нуклеозидов, согласно имеющимся данным [61], является одним из необходимых условий для связывания субстрата или его аналогов с активным центром АДА.

Исходя из экспериментальных данных и результатов квантово-химических расчётов, можно предположить следующий порядок связывания остатка гетероцикла в молекуле субстрата с активным центром АДА:

- 1) образование водородной связи между атомом азота N7 гетероцикла и атомом водорода COOH-группы остатка Asp296;
- 2) образование водородной связи между атомом водорода COOH-группы остатка Glu217 и атомом азота N1 гетероцикла;
- 3) образование водородной связи между атомом азота N3 гетероцикла и атомом водорода CONH-группы остатка Gly184;
- 4) протонирование атома азота N1 гетероцикла путём переноса протона от COOH-группы остатка Glu217.

Такая система водородных связей субстрата в активном центре АДА максимально благоприятствует нуклеофильной атаке цинк-активированной молекулы воды на атом углерода C6 гетероцикла и, следовательно, протеканию ферментативной реакции дезаминирования [2, 38].

Таким образом, можно сделать вывод, что в случае аденозина и его аза- и деазааналогов главную роль в проявлении различных субстратных свойств играют специфические взаимодействия определенных положений гетероцикла с остатками аминокислот в активном центре АДА, а конформационные особенности β -*D*-рибофуранозы играют, по-видимому, второстепенную роль.

Литература

- [1] Franco R., Valenzuela A., Lluís C., Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes // Immunol. Rev. 1998. V.161. P.27–42.
- [2] Wilson D.K., Rudolph F.B., Quijcho F.A. Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations // Science. 1991. V.252. N 5010. P.1278–1284.
- [3] Kefford R.F., Fox R.M. Purinogenic lymphocytotoxicity: clues to a wider chemotherapeutic potential for the adenosine deaminase inhibitors // Cancer Chemother. and Pharmacol. 1983. V.10. N 2. P.73–78.

- [4] Valentine W.N., Tanaka K.R., Paglia D.E. Hemolytic anemias and erythrocyte enzymopathies // *Ann. Intern. Med.* 1985. V.103. N 2. P.245–257.
- [5] Agarwal R.P. Inhibitors of adenosine deaminase // *Pharmacol. and Ther.* 1982. V.17. N 3. P.399–429.
- [6] Glazer R.I. Adenosine deaminase inhibitors: their role in chemotherapy and immunosuppression // *Cancer Chemother. and Pharmacol.* 1980. V.4. N 4. P.227–235.
- [7] Bennett L.L. Jr, Allan P.W., Carpenter J.W., Hill D.L. Nucleosides of 2-azapurines – cytotoxicities and activities as substrates for enzymes metabolizing purine nucleosides // *Biochem. Pharmacol.* 1976. V.25. N 5. P.517–521.
- [8] Crabtree G.W., Agarwal R.P., Parks R.E. Jr, Lewis A.F., Wotring L.L., Townsend L.B. *N*-Methylformycins. Reactivity with adenosine deaminase, incorporation into intracellular nucleotides of human erythrocytes and L1210 cells and cytotoxicity to L1210 cells // *Biochem. Pharmacol.* 1979. V.28. N 9. P.1491–1500.
- [9] Franchetti P., Cappellacci L., Grifantini M., Lupidi G., Nocentini G., Barzi A. 8-Aza analogues of deaza purine nucleosides. Synthesis and biological evaluation of 8-aza-1-deazaadenosine and 2'-deoxy-8-aza-1-deazaadenosine // *Nucleosides and Nucleotides*. 1992. V.11. N 5. P.1059–1076.
- [10] Sessler J.L., Magda D.J., Lynch V., Gilbert M.S., Bernstein D.I. The synthesis of 2-amino 7-substituted purines // *Nucleosides and Nucleotides*. 1989. V.8. N 3. P.431–448.
- [11] Chao D.L., Kimball A.P. Deamination of arabinosyladenine by adenosine deaminase and inhibition by arabinosyl-6-mercaptapurine // *Cancer Res.* 1972. V.32. N 8. P.1721–1724.
- [12] Cristalli G., Vittori S., Eleuteri A., Franchetti P., Grifantini M., Lupidi G., Capolongo L., Pesenti E. Synthesis and antitumor activity of 6-substituted purine and deazapurine nucleosides: [Pap.] 9 th Int. Round Table "Nucleosides, Nucleotides, and their Biol. Appl." Uppsala, July 30 – Aug. 3, 1990 // *Nucleosides and Nucleotides*. 1991. V.10. N 1–3. P.253–257.
- [13] Dutta S.P., Bernacki R.J., Bloch A., Chheda G.B. Synthesis and biological activity of 6-hydroxyguanidino- and 6-hydroxyureidopurine and their ribonucleosides // *Nucleosides and Nucleotides*. 1990. V.9. N 2. P.151–162.
- [14] Bussolari J.C., Ramesh K., Stoeckler J.D., Chen S.F., Panzica R.P. Synthesis and biological evaluation of N^4 -substituted imidazo- and *v*-triazolo[4,5-*d*]pyridazine nucleosides // *J. Med. Chem.* 1993. V.36. N 25. P.4113–4120.
- [15] Oertel F., Winter H., Kazimierczuk Z., Vilpo J.A., Richter P., Seela F. Synthesis and properties of methylthiopyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine 2'-deoxy- β -*D*-ribonucleosides // *Liebigs Ann. Chem.* 1992. N 11. P.1165–1170.
- [16] Baker D.C., Haskell T.H., Putt S.R. Prodrugs of 9- β -*D*-arabinofuranosyladenine. 1. Synthesis and evaluation of some 5'-(O-acyl)-derivatives // *J. Med. Chem.* 1978. V.21. N 12. P.1218–1221.
- [17] Nair V., Nuesca Z.M. Isodideoxynucleosides: A conceptually new class of nucleoside antiviral agents // *J. Amer. Chem. Soc.* 1992. V.114. N 20. P.7951–7953.
- [18] Умэдзава Х., Такэути Т., Кондо С., Симадзаки М. Изокоформицин и способ его получения // Заявка 53-34796, Япония. Оpubл. 31.03.78. РЖ Химия. 1979. 11О206П.
- [19] Umezawa H., Takeuchi T., Kondo S., Shimazaki M. Isocoformycin and a process for the production thereof // Пат. 1553797, Англия. Оpubл. 10.10.79. РЖ Химия. 1980. 16О171П.

- [20] Удагава Т., Кобаяси Т., Яманака С., Уэмура А. Ингибитор аденозиндезаминазы // Заявка 58-52223, Япония. Оpubл. 28.03.83. РЖ Химия. 1984. 10О264П.
- [21] Омура С., Танака Х., Имамура Н. Способ получения соединения ОМ-3223 // Заявка 62-81387, Япония. Оpubл. 14.04.87. РЖ Химия. 1988. 6О178П.
- [22] Schaumberg J.P., Hokanson G.C., French J.S., Tunac J.B., Underhill M.A. 2-Chloropentostatin compound having adenosine deaminase inhibitory activity // Пат. 4713372, США. Оpubл. 15.12.87. РЖ Химия. 1988. 20О168П.
- [23] Vince R. Adenosine deaminase resistant antiviral purine arabinonucleosides // Пат. 4383114, США. Оpubл. 10.05.83. РЖ Химия. 1984. 1О139П.
- [24] Townsend L.B., Acevedo O.L. Azolo[1,3]diazepine-5-ol compounds and their uses // Пат. 4935505, США. Оpubл. 19.06.90. РЖ Химия. 1992. 1О146П.
- [25] Cory J.G., Suhadolnik R.J. Dechloronase activity of adenosine deaminase // Biochemistry. 1965. V.4. N 9. P.1733–1735.
- [26] Bär H.P., Drummond G.I. On the mechanism of adenosine deaminase action // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. V.24. N 4. P.584–587.
- [27] Baer H.P., Drummond G.I., Gillis J. Studies on the specificity and mechanism of action of adenosine deaminase // Arch. Biochem. and Biophys. 1968. V.123. N 1. P.172–178.
- [28] Ronca G., Zucchelli G. Competitive inhibition of adenosine deaminase by purine and pyrimidine bases // Biochim. et biophys. acta. 1968. V.159. N 1. P.203–205.
- [29] Maguire M.H., Sim M.K. Studies on adenosine deaminase. 2. Specificity and mechanism of action of bovine placental adenosine deaminase // Eur. J. Biochem. 1971. V.23. N 1. P.22–29.
- [30] Frieden C., Kurz L.C., Gilbert H.R. Adenosine deaminase and adenylate deaminase: comparative kinetic studies with transition state and ground state analogue inhibitors // Biochemistry. 1980. V.19. N 23. P.5303–5309.
- [31] Frick L., Wolfenden R., Smal E., Baker D.C. Transition-state stabilization by adenosine deaminase: structural studies of its inhibitory complex with deoxycoformycin // Biochemistry. 1986. V.25. N 7. P.1616–1621.
- [32] Caiolfa V.R., Gill D., Parola A.H. The protonated form of 1-*N*⁶-etheno-[*erythro*-9-(2-hydroxy-3-nonyl)] adenine is identified at the active site of adenosine deaminase // FEBS Lett. 1990. V.260. N 1. P.19–22.
- [33] Jones W., Kurz L.C., Wolfenden R. Transition-state stabilization by adenosine deaminase: 1,6-addition of water to purine ribonucleoside, the enzyme's affinity for 6-hydroxy-1,6-dihydropurine ribonucleoside, and the effective concentration of substrate water at the active site // Biochemistry. 1989. V.28. N 3. P.1242–1247.
- [34] Orozco M., Lluís C., Mallol J., Canela E.I., Franco R. Quantum chemical study of the electronic and conformational characteristics of adenosine and 8-substituted derivatives: functional implications in the mechanism of reaction of adenosine deaminase // J. Pharm. Sci. 1990. V.79. N 2. P.133–137.
- [35] Hansen L.M., Kollman P.A. Free energy perturbation calculations on models of active sites: Applications to adenosine deaminase inhibitors // J. Comput. Chem. 1990. V.11. N 8. P.994–1002.
- [36] Orozco M., Velasco D., Canela E.I., Franco R. Determination of the conformational preferences of adenosine at the active site of adenosine deaminase // J. Amer. Chem. Soc. 1990. V.112. N 23. P.8221–8229.
- [37] Sharff A.J., Wilson D.K., Chang Z., Quirocho F.A. Refined 2.5 Å structure of murine adenosine deaminase at pH 6.0 // J. Mol. Biol. 1992. V.226. N 4. P.917–921.

- [38] Wilson D.K., Quioco F.A. A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water // *Biochemistry*. 1993. V.32. N 7. P.1689–1694.
- [39] Wilson D.K., Quioco F.A. Crystallographic observation of a trapped tetrahedral intermediate in a metalloenzyme // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V.1. N 10. P.691–694.
- [40] Wang Z., Quioco F.A. Complexes of adenosine deaminase with two potent inhibitors: X-ray structures in four independent molecules at pH of maximum activity // *Biochemistry*. 1998. V.37. N 23. P.8314–8324.
- [41] Sideraki V., Mohamedali K.A., Wilson D.K., Chang Z., Kellems R.E., Quioco F.A., Rudolph F.B. Probing the functional role of two conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase // *Biochemistry*. 1996. V.35. N 24. P.7862–7872.
- [42] Sideraki V., Wilson D.K., Kurz L.C., Quioco F.A., Rudolph F.B. Site-directed mutagenesis of histidine 238 in mouse adenosine deaminase: substitution of histidine 238 does not impede hydroxylate formation // *Biochemistry*. 1996. V.35. N 47. P.15019–15028.
- [43] Marrone T.J., Straatsma T.P., Briggs J.M., Wilson D.K., Quioco F.A., McCammon J.A. Theoretical study of inhibition of adenosine deaminase by (8*R*)-coformycin and (8*R*)-deoxycoformycin // *J. Med. Chem.* 1996. V.39. N 1. P.277–284.
- [44] Saran A., Mitra C., Pullman B. Molecular orbital studies on the structure of nucleoside analogs. I. Conformation of 8-azapurine nucleosides // *Biochim. et biophys. acta*. 1978. V.517. N 1. P.255–264.
- [45] Singh P., Hodgson D.J. 8-Azaadenosine. Crystal structure of its monohydrate and conformational analysis for rotation around the glycosyl bond // *J. Amer. Chem. Soc.* 1977. V.99. N 14. P.4807–4815.
- [46] Saran A., Mitra C. Molecular orbital studies on nucleoside antibiotics: Part II. Conformation of virazole, tubercidin and coformycin // *Indian J. Biochem. Biophys.* 1979. V.16. N 5. P.304–309.
- [47] Saran A., Chatterjee C.L. Molecular orbital studies on the structure of nucleoside analogs. IV. Conformation of 3-deazapurine nucleosides // *Int. J. Quantum Chem.* 1984. V.25. N 4. P.743–752.
- [48] Ikehara M., Fukui T. Studies of nucleosides and nucleotides. LXIII. Deamination of adenosine analogs with calf intestine adenosine deaminase // *Biochim. et biophys. acta*. 1974. V.338. N 2. P.512–519.
- [49] Lupidi G., Riva F., Cristalli G., Grifantini M. Inhibition of adenosine deaminase by deaza derivatives of adenosine and purine riboside // *Ital. J. Biochem.* 1982. V.31. N 6. P.396–403.
- [50] Lupidi G., Cristalli G., Marmocchi F., Riva F., Grifantini M. Inhibition of adenosine deaminase from several sources by deaza derivatives of adenosine and EHNA // *J. Enzyme. Inhib.* 1985. V.1. N 1. P.67–75.
- [51] Kurz L.C., Moix L., Riley M.C., Frieden C. The rate of formation of transition-state analogues in the active site of adenosine deaminase is encounter-controlled: implications for the mechanism // *Biochemistry*. 1992. V.31. N 1. P.39–48.
- [52] Cory J.G., Suhadolnik R.J. Structural requirements of nucleosides for binding by adenosine deaminase // *Biochemistry*. 1965. V.4. N 9. P.1729–1732.
- [53] Frederiksen S. Specificity of adenosine deaminase toward adenosine and 2'-deoxyadenosine analogues // *Arch. Biochem. Biophys.* 1966. V.113. N 2. P.383–388.
- [54] Agarwal R.P., Sagar S.M., Parks R.E., Jr. Adenosine deaminase from human erythrocytes: purification and effects of adenosine analogs // *Biochem. Pharmacol.* 1975. V.24. N 6. P.693–701.

- [55] Krajewska E., De Clercq E., Shugar D. Nucleoside-catabolizing enzyme activities in primary rabbit kidney cells and human skin fibroblasts // *Biochem. Pharmacol.* 1978. V.27. N 10. P.1421–1426.
- [56] Simon L.N., Bauer R.J., Tolman R.L., Robins R.K. Calf intestine adenosine deaminase. Substrate specificity // *Biochemistry.* 1970. V.9. N 3. P.573–577.
- [57] Zimmerman T.P., Deeprose R.D., Wolberg G., Stopford C.R., Duncan G.S., Miller W.H., Miller R.L., Lim M.I., Ren W.Y., Klein R.S. Inhibition of lymphocyte function by 9-deazaadenosine // *Biochem. Pharmacol.* 1983. V.32. N 7. P.1211–1217.
- [58] Dewar M.I.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart J.J.P. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model // *J. Amer. Chem. Soc.* 1985. V.107. N 13. P.3902–3909.
- [59] Chem3D Ultra™ 4.0 for Windows 95/NT. CambridgeSoft Corp. 1997.
- [60] HyperChem™ 5.02 Evaluation Release for Windows 95/NT. Hypercube, Inc. 1997.
- [61] Калининченко Е.Н., Бейгельман Л.Н., Михайлов С.Н., Михайлопуло И.А. Субстратная специфичность аденозиндеаминазы. Роль метильных групп при 2', 3' и 5'-атомах углерода аденозина // *Биоорган. химия.* 1988. Т.14. N 9. С.1157–1161.

QUANTUM CHEMICAL STUDY OF ADENOSINE AND ITS AZA- AND DEAZAANALOGUES AS ANTAGONISTS AND INHIBITORS OF ADENOSINE DEAMINASE OF MAMMALIA

P. Purygin, Yu. Zarubin⁷ I. Il'icheva, V. Florentiev⁸

The previous conformational investigations of adenosine molecule, its 2-, 8-aza- and 1-, 3-, 7-, 9-deazaanalogues, as well as their 1*H*-cations (except 1-deazaadenosine) were provided by means of semi-empirical AM1 method. Comparison of the electrostatic charge distribution in this adenosine derivatives obtained for the active region of their conformations with the known experimental data concerning their binding affinity at the active site of adenosine deaminase leads to the number of conclusions: 1) the importance of protonation of the nitrogen atom N1 for running the reaction of enzymatic deamination; 2) the urgency of the negative electrostatic potential in the positions 1, 3 and 7 of the heterocycle as well as in the position C3' and C5' of 3'-OH- and 5'-OH-groups oxygen atoms of *fi*-*D*-ribofuranose for binding nucleoside at the active site of the adenosine deaminase. The mechanism of binding of heterocycle residue in substrate and of its aza- and deazaanalogues at the active site of the enzyme was suggested on the basis of calculations and experimental data.

⁷Pyotr Purygin, Yuri Zarubin, chair of organic chemistry, Samara state university

⁸Irina Il'icheva, Vladimir Florentiev, laboratory of protein synthesis chemistry, Engelhardt institute of molecular biology of Russian Academy of Sciences