

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АДЕНОЗИНА И ЕГО ИЗОСТЕРНЫХ АНАЛОГОВ. ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ИХ АКЦЕПТИРОВАНИЯ В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2003 Ю.П. Зарубин, Д.В. Миргородский, П.П. Пурыгин¹
И.А. Ильичева, В.Л. Флорентьев²

Методами компьютерного моделирования были изучены аденозин и его изостерные аналоги, включая их N1-протонированные формы (кроме 1-дезааналогов), с целью нахождения корреляций между их молекулярной структурой и субстратными свойствами для аденозиндезаминазы млекопитающих. Для этих соединений методом *ab initio* STO-3G были рассчитаны распределение зарядов на атомах и изоповерхности электростатического потенциала вблизи их ван-дер-Ваальсовых радиусов. Конформационные исследования были выполнены методом молекулярной механики MM+. Обсужден механизм акцептирования, определяющий субстратную селективность аденозиндезаминазы млекопитающих, и предсказаны возможные субстратные свойства для ранее неизученных аналогов аденозина.

Введение

Поиск новых лекарственных средств, устойчивых к действию различных ферментов, в частности ферментов катаболизма пуринов и пиримидинов, является одной из актуальных проблем современной медицинской химии и фармакологии [1–3]. Особое место среди таких ферментов занимает аденозиндезаминаза (АДА, КФ 3.5.4.4), осуществляющая превращение (2'-дезокс)аденозина в (2'-дезокс)инозин путем гидролитического замещения NH₂-группы на OH-группу в положении 6 остатка пурина. В результате этого различные фармакологически активные аналоги аденозина (Ado) превращаются в неактивные или малоактивные аналоги инозина [4]. АДА

¹Юрий Павлович Зарубин, Денис Викторович Миргородский, Петр Петрович Пурыгин, кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

²Ирина Алексеевна Ильичева, Владимир Леонидович Флорентьев, лаборатория химии белкового синтеза Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 32.

играет также исключительно важную роль в регуляции иммунитета у млекопитающих [5, 6].

К настоящему времени синтезировано значительное число аналогов Ado, часть из которых нашла применение в медицине и в биохимических исследованиях процессов метаболизма на уровне клеточных культур, тканей и органов [2]. Во многих случаях изучалась устойчивость этих соединений к ферментативному дезаминированию.

Однако существует немного работ, в которых бы исследовалась взаимосвязь между структурой, конформациями и субстратными свойствами для Ado и его аналогов в отношении АДА методами компьютерной химии [7–18]. Несмотря на наличие данных по рентгеноструктурному анализу (РСА) комплексов АДА–ингибитор [19–25], возможный механизм акцептирования субстрата или его аналогов в активном центре этого фермента в литературе до недавнего времени не был описан [14, 17, 18]. Поэтому представляется перспективным теоретическое изучение взаимосвязи “структура — субстратные и ингибиторные свойства” у различных аналогов Ado для АДА не только с целью описания возможного механизма акцептирования субстрата или его аналогов в активном центре данного фермента, но и предсказания возможных субстратных и ингибиторных свойств у плохо изученных или неизученных аналогов Ado.

Особое место среди них занимают изостерные аналоги, в которых имеются немодифицированный остаток β -D-рибофуранозы и замещения атомов в различных положениях остатка исходного пуринового гетероцикла на атомы С и N, на СН- и NH-группы при сохранении локализации NH_2 -группы [26–54]. Для большинства этих соединений в литературе описаны субстратные и ингибиторные свойства в отношении АДА млекопитающих [26–42]. Так как стерические изменения структуры гетероцикла в молекулах этих соединений минимальны, а характер их взаимодействий с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА сильно различается, данные аналоги Ado являются удобными “химическими инструментами” для изучения механизма акцептирования субстрата и его аналогов в активном центре этого фермента.

Структурные формулы всех исследованных молекул Ado, его изостерных аналогов и их $1h^+$ -катионов (кроме 1-дезапроизводных) приведены ниже на рис. 1 с пояснениями в табл. 1.

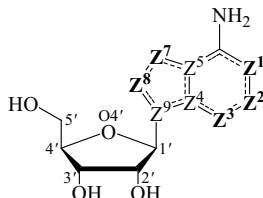


Рис. 1. Обобщенная структурная формула молекул Ado, его изостерных аналогов и их $1h^+$ -катионов

Таблица 1

Расположение заместителей в остатке гетероцикла для Ado, его изостерных аналогов и их $1h^+$ -катионов на рис. 1

Молекула нуклеозида	Заместители в соответствующих положениях остатка гетероцикла по пуриновой нумерации							
	$Z^{1б)}$	Z^2	Z^3	Z^4	Z^5	Z^7	Z^8	Z^9
Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	CH	N
z^2 Ado	N:	N:	N:	C	C	N:	CH	N
z^8 Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	N:	N
c^1 Ado	CH	CH	N:	C	C	N:	CH	N
c^3 Ado	N:	CH	CH	C	C	N:	CH	N
c^7 Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	CH	N
c^9 Ado	N:	CH	N:	C	C	NH	CH	C
z^2c^3 Ado	N:	N:	CH	C	C	N:	CH	N
z^5c^9 Ado ^{а)}	N:	CH	N:	C	N	N:	CH	C
z^8c^1 Ado	CH	CH	N:	C	C	N:	N:	N
z^8c^3 Ado ^{а)}	N:	CH	CH	C	C	N:	N:	N
z^8c^7 Ado	N:	CH	N:	C	C	CH	N:	N
$7H$ - z^8c^9 Ado	N:	CH	N:	C	C	NH	N:	C
$8H$ - z^8c^9 Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	NH	C
$z^{2,8}$ Ado ^{а)}	N:	N:	N:	C	C	N:	N:	N
$c^{1,3}$ Ado	CH	CH	CH	C	C	N:	CH	N
$c^{1,7}$ Ado	CH	CH	N:	C	C	CH	CH	N
$c^{3,7}$ Ado ^{а)}	N:	CH	CH	C	C	CH	CH	N
$z^{2,8}c^3$ Ado	N:	N:	CH	C	C	N:	N:	N
$z^{2,8}c^7$ Ado	N:	N:	N:	C	C	CH	N:	N
$z^2c^{3,7}$ Ado ^{а)}	N:	N:	CH	C	C	CH	CH	N
$z^8c^{1,7}$ Ado	CH	CH	N:	C	C	CH	N:	N
$c^{1,3,7}$ Ado ^{а)}	CH	CH	CH	C	C	CH	CH	N
$z^4c^{3,9}$ Ado	N:	CH	CH	N	C	N:	CH	C
$z^4c^{7,9}$ Ado ^{а)}	N:	CH	N:	N	C	CH	CH	C
$z^{4,8}c^9$ Ado ^{а)}	N:	CH	N:	N	C	N:	N:	C
$z^{4,8}c^{1,9}$ Ado ^{а)}	CH	CH	N:	N	C	N:	N:	C
$z^{4,8}c^{3,9}$ Ado	N:	CH	CH	N	C	N:	N:	C
$z^{4,8}c^{1,3,9}$ Ado ^{а)}	CH	CH	CH	N	C	N:	N:	C

Обозначения:

z^A — А-аза-, c^B — В-деаза-, $z^{A,C}$ — А,С-диаза-, $c^{B,D}$ — В,Д-дидеаза-, $c^{B,D,E}$ — В,Д,Е-тридеаза-.

а) для данных соединений субстратные свойства в отношении АДА не исследовались;

б) $Z^1 = NH$ для соответствующих $1h^+$ -катионов Ado ($1h^+$ -Ado) и его аналогов.

1. Расчетная часть

Исходные структуры молекул Ado, его изостерных аналогов (29 структур), а также их $1h^+$ -катионов (21 структура) были построены из шаблонов структур остатка аденозин-5'-монофосфата в программном пакете HyperChem 7.0 [55] со стартовыми конформациями рибофуранозного цикла C2'-эндо (*S*-область) и C3'-эндо (*N*-область).

Заряды на атомах структур молекул нуклеозидов и их $1h^+$ -катионов рассчитаны неэмпирическим методом STO-3G в режиме single point.

Для определения наиболее устойчивых конформаций у изучаемых структур методом молекулярной механики ММ+ использовались модифицированные скрипты [56], позволяющие проводить расчеты потенциальной энергии по трем торсионным углам — гликозидному O4'C1'N(C)9C(N)4 (χ) в диапазоне от -180° до $+180^\circ$ с шагом 5° и 1° (для определения точных значений параметров энергетических минимумов) и двум экзоциклическим — O5'C5'C4'C3' (γ) и HO5'O5'C5'C4' (β) — со следующими стартовыми значениями: -60° (–синклиальная, –ск), $+60^\circ$ (+синклиальная, +ск) и 180° (антиперипланарная, ап). Эти скрипты отличаются от ранее использованных [17, 18] тем, что позволяют анализировать значительно большее число конформационных областей молекул нуклеозидов и их $1h^+$ -катионов, при этом ниже вероятность перехода рибофуранозного цикла из *N*- в *S*-область псевдовращения.

Расчет сродства к протону у оптимальных для акцептирования в активном центре АДА конформаций молекул нуклеозидов проведен полуэмпирическим методом AM1 [57] в режиме single point.

Расчет изоповерхностей электростатических потенциалов в устойчивых конформациях молекул нуклеозидов и их $1h^+$ -катионов, оптимальных соответственно для акцептирования и удерживания в активном центре АДА, проведен неэмпирическим методом STO-3G в режиме single point.

Определение конформационных характеристик всех изученных структур осуществлялось с помощью специально созданной нами программы NuclConf. Все условные обозначения конформаций нуклеозидов и расчетные формулы для определения их параметров взяты из [58, 59].

2. Результаты и их обсуждение

Расчет парциальных зарядов (по Малликену) на атомах молекул Ado и его различных изостерных аналогов и их $1h^+$ -катионов показывает, что протонирование атома азота N1 приводит к заметному изменению электронной плотности в остатке гетероцикла и мало влияет на ее распределение в остатке β -D-рибофуранозы. Для всех $1h^+$ -катионов нуклеозидов наблюдается возрастание положительного заряда на атоме углерода C6 (с 0.25...0.29 до 0.33...0.38 дол. эл.). Это подтверждает экспериментальные данные о необходимости протонирования атома N1 гетероцикла для протекания ферментативной реакции дезаминирования [60, 61], когда в качестве нуклеофи-

ла выступает цинк-активированная молекула воды в виде гидроксид-иона [21]. Аномально высокие значения зарядов на атоме C6 в молекуле z^5c^9Ado (0.41 дол. эл.) и катионе $1h^+-z^5c^9Ado$ (0.51 дол. эл.) объясняются наличием эндоциклических электроноакцепторных атомов азота в положениях 1, 3 и 5 триазинового фрагмента гетероцикла.

Изучение конформационных характеристик наиболее низкоэнергетических структур молекул нуклеозидов в *N*- и *S*-областях псевдовращения рибофуранозного цикла показало, что *анти*-конформация вокруг гликозидной связи C1'-N(C)9 характерна для наиболее устойчивых минимумов большинства структур как в *N*-, так и в *S*-областях. Для ряда 8-азапроизводных *Ado* характерна устойчивая *син*-конформация вокруг гликозидной связи C1'-N(C)9 в случае нахождения рибофуранозного цикла в *S*-области. Объясняется это в основном отталкиванием отрицательных зарядов на атомах азота N8 гетероцикла и кислорода O4' рибофуранозы. При экранировании атома азота N8 водородом у $8H-z^8c^9Ado$ наблюдается классическая *анти*-конформация. *S*-конформеры молекул нуклеозидов более устойчивы, чем их соответствующие *N*-конформеры, они являются глобальными энергетическими минимумами соответствующих структур. Тип конформации вокруг экзоциклической связи C4'-C5' — *+ск*, он не зависит от области псевдовращения рибофуранозного цикла, при этом значения торсионного угла γ лежат в очень узком диапазоне ($\sim 60^\circ$).

Анализ водородных связей в активном центре АДА для различных структур фермент-ингибиторных комплексов по данным РСА [20–22, 25] показал, что наиболее оптимальная ориентация 5'-ОН-группы в системе водородных связей между водородом у атома азота N1 имидазольной группы остатка His17 и одним из атомов кислорода COO⁻-группы остатка Asp19 находится в области *-ск*-конформации торсионного угла β . Но наиболее устойчивой областью конформации торсионного угла β для молекул исследуемых нуклеозидов является *+ск*, что связано, по всей вероятности, с образованием водородной связи между атомами водорода HO5' экзоциклической 5'-ОН-группы и кислорода O4' рибофуранозного цикла в случае *+ск*-конформации торсионного угла γ .

В *N*-области для большинства молекул характерны близкие конформации рибофуранозного цикла группы C3'-*эндо* (в основном типа C3'-*эндо*-C4'-*экзо*). В *S*-области конформации рибофуранозного цикла относятся к C2'-*эндо*-группе (в основном типа C2'-*эндо*-C1'-*экзо*).

Таким образом, среди исследуемых молекул нуклеозидов нет ни одной, которая имела бы в наиболее устойчивой конформации параметры, характерные для аналогов субстрата в активном центре АДА, известные из данных РСА [20–22, 25], а именно: $\chi = -118 \dots -101^\circ$ (*анти*-конформации), $\gamma = 40 \dots 63^\circ$ (*+ск*-конформация), $\beta = -80 \dots -90^\circ$ (*-ск*-конформация), конформация рибофуранозного цикла типа C3'-*эндо* [20–22] или C3'-*эндо*-C4'-*экзо* [25]. Поэтому конформационная область ($\chi = -120 \dots -100^\circ$, $\gamma = 40 \dots 65^\circ$) была дополнительно детально просканирована с целью нахождения для мо-

лекул нуклеозидов всех вариантов устойчивых структур, причем как в N -, так и в S -областях. Было найдено, что, независимо от области псевдовращения рибофуранозного цикла, значения торсионных углов χ и γ лежат в очень узких диапазонах и попадают в область указанных выше параметров. Это позволяет АДА акцептировать в активном центре АДА молекулу субстрата или его аналога как в N -, так и в S -областях. Рибонуклеозиды акцептируются в N -области с конформацией $C3'$ -эндо [62]. Значения торсионного угла β для данных устойчивых конформаций лежат в основном в $+sk$ - и в $\pm an$ -областях, что может дополнительно замедлять акцептирование аналога субстрата в активном центре АДА. Переход в $C3'$ -эндо- [20–22] или $C3'$ -эндо- $C4'$ -экзо-конформацию [25] может происходить также в активном центре фермента. Рассчитанные конформационные напряжения в молекулах не превышают 5 ккал/моль относительно энергий их глобальных минимумов, принятых за 0.

Протонирование атома N1 гетероцикла в молекулах нуклеозидов приводит к существенным изменениям конформационных характеристик образующихся $1h^+$ -катионов нуклеозидов в N - и S -областях. Однако в S -области типы их конформаций остаются в основном прежними. Для 8-азапроизводных $1h^+$ -Ado в S -области характерна устойчивая *син*-конформация вокруг гликозидной связи, подобно 8-азапроизводным Ado. Значения торсионного угла β для данных устойчивых конформаций $1h^+$ -катионов нуклеозидов лежат в $\pm an$ -областях, что объясняется ослаблением водородной связи между атомами водорода HO5' и кислорода O4' вследствие протонирования.

Конформационные параметры наиболее низкоэнергетических структур $1h^+$ -катионов, оптимальных для удерживания в активном центре АДА, практически не отличаются от таковых для непротонированных молекул нуклеозидов. Для этих конформаций $1h^+$ -катионов нуклеозидов значения торсионного угла β также лежат в $\pm an$ -областях.

Значения амплитуды складчатости рибофуранозного цикла ψ_m для всех молекул и $1h^+$ -катионов нуклеозидов лежат в узком диапазоне и близки к ранее полученным [11, 17, 18].

Рассчитанные величины сродства к протону (см. [63]) по положению N1 гетероцикла для молекул нуклеозидов (кроме 1-дезапроизводных) показывают (табл. 2), что их значения находятся в пределах от 199.9 ккал/моль ($z^{2.8}$ Ado) до 229.1 ккал/моль ($c^{3.7}$ Ado). С увеличением числа электроноакцепторных атомов азота в гетероцикле сродство к протону снижается, а с увеличением числа электронодонорных СН-групп — возрастает. Для изомерных аналогов Ado величина сродства к протону по сравнению с Ado может как снизиться, так и возрасти.

Поэтому только конформационными особенностями и неодинаковым сродством к протону изученных аналогов Ado нельзя объяснить значительные различия в их субстратных свойствах в отношении АДА, известные из экспериментальных данных (табл. 3).

В связи с этим нами было выдвинуто предположение не только о важ-

Таблица 2

**Значения сродства к протону для молекул нуклеозидов
в областях конформаций, активных по отношению к АДА**

Молекула нуклеозида	Сродство к протону, ккал/моль
Ado	219.1
z^2 Ado	209.5
z^8 Ado	209.6
c^1 Ado	–
c^3 Ado	224.3
c^7 Ado	224.0
c^9 Ado	219.7
z^2c^3 Ado	219.2
z^5c^9 Ado	204.2
z^8c^1 Ado	–
z^8c^3 Ado	208.4
z^8c^7 Ado	215.3
$7H$ - z^8c^9 Ado	213.9
$8H$ - z^8c^9 Ado	219.4
$z^{2,8}$ Ado	199.9
$c^{1,3}$ Ado	–
$c^{1,7}$ Ado	–
$c^{3,7}$ Ado	229.1
$z^{2,8}c^3$ Ado	204.2
$z^{2,8}c^7$ Ado	205.5
$z^2c^{3,7}$ Ado	223.9
$z^8c^{1,7}$ Ado	–
$c^{1,3,7}$ Ado	–
$z^4c^{3,9}$ Ado	215.7
$z^4c^{7,9}$ Ado	208.2
$z^{4,8}c^9$ Ado	205.5
$z^{4,8}c^{1,9}$ Ado	–
$z^{4,8}c^{3,9}$ Ado	202.4
$z^{4,8}c^{1,3,9}$ Ado	–

ной роли взаимодействий тех или иных структурных фрагментов в молекулах исследуемых изостерных аналогов Ado с различными функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА, но и об определенном порядке их акцептирования. В качестве определяющего критерия была выбрана изоповерхность электростатического потенциала (ИЭП), так как изменение характера или отсутствие тех или иных водородных связей в системе фермент–лиганд должно приводить к различиям в субстратных и ингибиторных свойствах соответствующих нуклеозидов для АДА.

Анализ данных РСА (рис. 2), кинетических данных (табл. 3) и результатов расчетов ИЭП для молекул Ado и его изостерных аналогов показывает, что для оптимального акцептирования молекулы нуклеозида функциональными группами остатков аминокислот в активном центре фермента необ-

Таблица 3

**Кинетические параметры дезаминирования (K_m , V_{max})
и ингибирования (K_i) для Ado и его изостерных аналогов
в отношении АДА**

Соединение	K_m , мкМ	K_i , мкМ	V_{max} (отн.), %	Литература
Ado	67	—	—	[29]
	29	—	100	[26]
	25	—	100	[30]
	58	—	100	[31]
	33	—	100	[32]
	20	—	100	[33]
z^2 Ado	670	н/и	102	[26]
z^8 Ado	130	н/и	310	[30]
	96	145	217	[34]
c^1 Ado	—	2.0	—	[29]
	—	0.662	—	[35]
	—	0.66	—	[36]
	—	0.18	—	[37]
c^3 Ado	—	н/д	—	[29]
	—	359	—	[35]
	—	360	—	[36]
	н/д	257	н/д	[37]
c^7 Ado	—	—	—	[29, 31, 35, 36]
c^9 Ado	—	—	—	[38]
z^2c^3 Ado	н/д	н/д	н/д	[28]
z^8c^1 Ado	—	0.903	—	[27]
z^8c^7 Ado	250	н/и	6.4	[32]
	125	н/и	6.4	[33]
z^8c^9 Ado	1000	н/и	750–850	[30]
$c^{1,3}$ Ado	—	110	—	[35, 36]
$c^{1,7}$ Ado	—	—	—	[35, 36, 39]
$z^{2,8}c^3$ Ado	н/д	н/д	н/д	[28]
$z^{2,8}c^7$ Ado	440	н/и	0.2	[26]
$z^8c^{1,7}$ Ado	—	—	—	[40]
$z^4c^{3,9}$ Ado	—	?	—	[41]
$z^{4,8}c^{3,9}$ Ado	н/д	—	н/д	[42]

Примечания:

н/д — нет данных;

н/и — не исследовалось;

? — не установлено достоверно наличие или отсутствие ингибиторной активности для данного соединения

ходимо наличие областей отрицательного электростатического потенциала в положениях 1, 3 и 7 остатка гетероцикла (атомы азота N1, N3 и N7) и положениях 3' и 5' остатка β -D-рибофуранозы (атомы кислорода O3' и O5'), а также областей положительного электростатического потенциала у атомов водорода 5'-ОН-группы (HO5') и 3'-ОН-группы (HO3').

Снижение величин парциальных отрицательных зарядов на атомах азо-

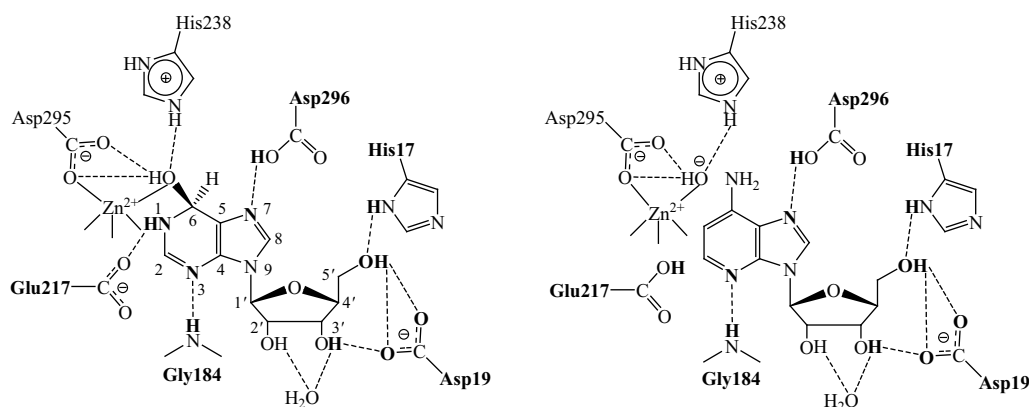


Рис. 2. Схема взаимодействий по данным РСА 6(S)-гидроксн-1,6-дигидропуририбозида [20] (слева) и $c^1\text{Ado}$ [21] (справа) с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА. Связи иона цинка (Zn^{2+}) показаны сплошными линиями, водородные связи — пунктирными

та N1, N3 или N7 вследствие электроноакцепторного действия атомов азота в соседних положениях гетероцикла (табл. 4) приводит к ухудшению субстратных свойств, а нахождение атомов азота или СН-групп в неканонических положениях гетероцикла (1–5, 7 и 8) приводит также к появлению ингибиторных свойств у изостерных аналогов Ado (табл. 3).

Молекулы нуклеозидов со сходным распределением областей электростатических потенциалов в гетероцикле проявляют или должны проявлять сходные субстратные и ингибиторные свойства для АДА.

Ключевую роль в акцептировании молекулы субстрата играет образование водородной связи между атомами азота N7 гетероцикла в субстрате и водорода COOH -группы остатка Asp296 в активном центре АДА. Поэтому $c^7\text{Ado}$ [29, 31, 35, 36], $c^9\text{Ado}$ [37] и $c^{1,7}\text{Ado}$ [35, 36, 39] не являются ни субстратами, ни ингибиторами для данного фермента (табл. 1). Можно предположить, что $c^{3,7}\text{Ado}$ [46], $z^2c^{3,7}\text{Ado}$ [47], $c^{1,3,7}\text{Ado}$ [49] и $z^4c^{7,9}\text{Ado}$ [50, 51], подобно $c^7\text{Ado}$, $c^9\text{Ado}$ и $c^{1,7}\text{Ado}$, также не должны быть ни субстратами, ни ингибиторами для АДА.

Не менее важную роль в процессе акцептирования субстрата играют взаимодействия остатка β -D-рибофуранозы в нуклеозидах с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА (рис. 2). По литературным данным, ни 5'-дезоксаденозин [64, 65], ни 5'-O-метиладенозин [31] не являются субстратами или ингибиторами для АДА, а 3'-дезоксаденозин дезаминируется немногим медленнее, чем Ado или 2'-дезоксаденозин [66]. Из этого следует, что 5'-ОН-группа в остатке β -D-рибофуранозы играет такую же важную роль в акцептировании субстрата АДА, как и атом азота N7 в остатке гетероцикла.

Таким образом, процесс начального акцептирования субстрата в активном центре фермента носит кооперативный характер с участием функциональных групп аминокислотных остатков His17, Asp19 и Asp296 (рис. 2).

Таблица 4

Значения парциальных зарядов на атомах азота N1, N3 и N7 гетероцикла для молекул Ado и его некоторых изостерных аналогов

Молекула нуклеозида	Заряды на атоме N1, дол. эл.	Заряды на атоме N3, дол. эл.	Заряды на атоме N7, дол. эл.
Ado	-0.34	-0.32	-0.28
z^2 Ado	-0.22	-0.20	-0.27
z^8 Ado	-0.34	-0.32	-0.18
c^1 Ado	–	-0.33	-0.28
c^3 Ado	-0.34	–	-0.28
z^2c^3 Ado	-0.24	–	-0.27
z^5c^9 Ado	-0.34	-0.30	-0.22
z^8c^1 Ado	–	-0.32	-0.19
z^8c^3 Ado	-0.34	–	-0.18
$8H-z^8c^9$ Ado	-0.35	-0.32	-0.18
$z^{2,8}$ Ado	-0.22	-0.19	-0.17
$z^{2,8}c^3$ Ado	-0.23	–	-0.18
$z^{2,8}c^7$ Ado	-0.22	-0.20	–
$z^{4,8}c^9$ Ado	-0.34	-0.19	-0.19
$z^{4,8}c^{1,9}$ Ado	–	-0.19	-0.20
$z^{4,8}c^{1,3,9}$ Ado	–	–	-0.21

3'-ОН-Группа играет второстепенную роль, хотя она и важна для акцептирования субстрата в активном центре АДА.

Далее должно происходить последовательное образование двух водородных связей: между атомами азота N1 гетероцикла и водорода COOH-группы остатка Glu217 и между атомами азота N3 гетероцикла и водорода CONH-группы остатка Gly184. В случае c^1 Ado и в образовании водородной связи участвует атом N3 гетероцикла, а в случае c^3 Ado — атом N1 гетероцикла. Молекула c^1 Ado изоэлектронна и изоструктурна катиону $1h^+$ -Ado, а молекула c^3 Ado неспособна протонироваться по атому азота N1 из-за увеличения расстояния между ним и атомом водорода COOH-группы остатка Glu217 (рис. 3). Поэтому c^1 Ado — более сильный конкурентный ингибитор, чем c^3 Ado³. Оба соединения не являются субстратами для АДА (табл. 3).

Подобно c^1 Ado и c^3 Ado, $c^{1,3}$ Ado также не субстрат для АДА, но в то же время он ингибитор, причем более сильный, чем c^3 Ado, и более слабый, чем c^1 Ado (табл. 3). Неожиданное усиление ингибиторных свойств $c^{1,3}$ Ado по сравнению с c^3 Ado объясняется, вероятно, тем, что молекула $c^{1,3}$ Ado структурно сходна с катионом $1h^+$ -Ado, несмотря на замену в положении 1 гетероцикла атома азота на СН-группу и отсутствие положительного заряда. Это подтверждает ранее выдвинутое предположение о том, что атом азота N7 гетероцикла является ключевым для акцептирования

³В [37], однако, сообщается, что c^3 Ado является субстратом для АДА, но очень плохим, нет данных по K_m и V_{max} .

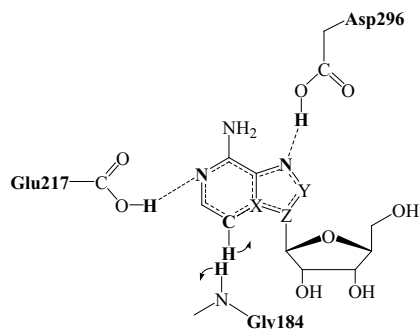


Рис. 3. Предполагаемая система водородных связей молекул $c^3\text{Ado}$ ($X = \text{C}$, $Y = \text{CH}$, $Z = \text{N}$), $z^4c^{3,9}\text{Ado}$ ($X = \text{N}$, $Y = \text{CH}$, $Z = \text{C}$) и $z^{4,8}c^{3,9}\text{Ado}$ ($X = Y = \text{N}$, $Z = \text{C}$) с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА

субстрата или его аналога активным центром данного фермента. В молекуле $z^8c^1\text{Ado}$ атом азота N8 влияет на распределение парциальных зарядов в 1,2,3-триазольной части гетероцикла, что приводит к ослаблению электростатического взаимодействия между атомами азота N7 гетероцикла и водорода COOH -группы остатка Asp296. В результате акцептирование молекулы $z^8c^1\text{Ado}$ протекает медленнее, что приводит к снижению ингибиторной способности $z^8c^1\text{Ado}$ по сравнению с $c^1\text{Ado}$ (табл. 1). $z^{4,8}c^{3,9}\text{Ado}$ является очень плохим субстратом для АДА и не ингибирует дезаминирование Ado. Только взаимодействие $z^{4,8}c^{3,9}\text{Ado}$ со 100-кратным количеством фермента по сравнению со стандартными условиями эксперимента привело к 70% превращению $z^{4,8}c^{3,9}\text{Ado}$ в 4,8-диаза-3,9-дидеазаинозин через 13 ч [42]. Поэтому данные по дезаминированию $c^3\text{Ado}$ [37], скорее всего, — реально протекающая реакция, а не артефакт. Для $z^4c^{3,9}\text{Ado}$ наблюдалась картина, аналогичная для $z^{4,8}c^{3,9}\text{Ado}$ при стандартной концентрации АДА [41]. Экспериментально наблюдаемое отсутствие ингибиторных свойств у $z^4c^{3,9}\text{Ado}$ и $z^{4,8}c^{3,9}\text{Ado}$ объясняется, по всей вероятности, влиянием электроноакцепторного атома азота в положении 4 (*мета*-положение относительно атома C6) остатка гетероцикла.

У $z^2\text{Ado}$ и $z^8\text{Ado}$ в соответствующих положениях имеются электроноакцепторные атомы азота вместо CH -групп, но их субстратные свойства резко различаются. В молекуле $z^2\text{Ado}$ атом азота N2 в *мета*-положении к атому углерода C6 сильно снижает способность гетероцикла к дезаминированию по механизму $\text{S}_\text{N}\text{Ar}$. Поэтому $z^2\text{Ado}$ дезаминируется намного медленнее, чем Ado (табл. 3).

В молекуле $z^8\text{Ado}$ атом азота N8 влияет на распределение парциальных зарядов в 1,2,3-триазольной части гетероцикла. В результате акцептирование молекулы $z^8\text{Ado}$ протекает медленнее, что приводит к уменьшению скорости ферментативного дезаминирования $z^8\text{Ado}$ по сравнению с Ado в одинаковых условиях V (отн.) при увеличении K_m и V_max (отн.) (табл. 3).

В отличие от $c^7\text{Ado}$, $z^8c^7\text{Ado}$ или $z^{2,8}c^7\text{Ado}$ дезаминируются АДА, хо-

тя и с меньшей скоростью, чем Ado. В данном случае роль атома азота N7 в Ado выполняет атом азота N8 в z^8c^7 Ado или $z^{2,8}c^7$ Ado. Начальное акцептирование молекул z^8c^7 Ado или $z^{2,8}c^7$ Ado активным центром фермента носит, по-видимому, более сложный характер (рис. 4). Это приводит к значительному увеличению K_m и резкому снижению V_{max} для z^8c^7 Ado по сравнению с Ado (табл. 1).

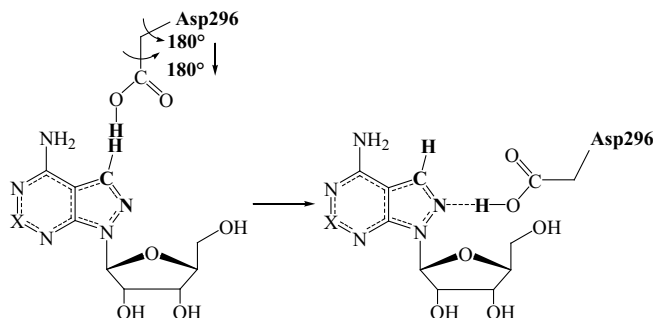


Рис. 4. Возможный механизм образования водородной связи между атомами азота N8 в молекулах z^8c^7 Ado ($X = CH$), $z^{2,8}c^7$ Ado ($X = N$) и водорода β -COOH-группы остатка Asp296 в активном центре АДА на начальной стадии акцептирования

Для таутомеров $7H$ - z^8c^9 Ado и $8H$ - z^8c^9 Ado характер начальной стадии акцептирования будет различным. В случае $8H$ - z^8c^9 Ado она должна протекать аналогично Ado, но медленнее из-за наличия в положении 8 гетероцикла электроноакцепторного атома азота N8. Так как в водном растворе имеются оба таутомера z^8c^9 Ado [67], то возможно акцептирование также и $7H$ - z^8c^9 Ado. Начальная стадия этого процесса должна сопровождаться меньшими конформационными изменениями бокового радикала остатка Asp296 в активном центре АДА (рис. 5) по сравнению с z^8c^7 Ado или $z^{2,8}c^7$ Ado (рис. 4).

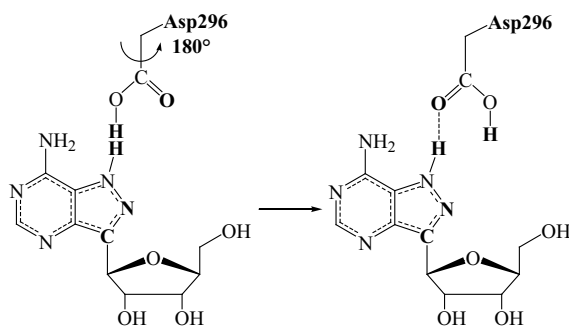


Рис. 5. Возможный механизм образования водородной связи между атомом водорода N7 в молекуле $7H$ - z^8c^9 Ado и карбонильным атомом кислорода β -COOH-группы остатка Asp296 в активном центре АДА на начальной стадии акцептирования

Это приводит к значительному увеличению K_m и V_{max} для z^8c^9 Ado по сравнению с Ado (табл. 3). При этом скорость дезаминирования V для

Ado и его изостерных аналогов при одинаковых молярных концентрациях будет уменьшаться в такой последовательности: $V(\text{Ado}) > V(z^8c^9\text{Ado}) > V(z^8c^7\text{Ado})$.

В отличие от $c^3\text{Ado}$, $z^2c^3\text{Ado}$ и $z^{2,8}c^3\text{Ado}$ являются очень медленно реагирующими субстратами и слабыми ингибиторами АДА [28]⁴. Сродство к протону у атома азота N1 в $z^2c^3\text{Ado}$ и $z^{2,8}c^3\text{Ado}$ ниже, чем у $c^3\text{Ado}$. Наличие электроноакцепторного атома азота в положении 2 гетероцикла в молекулах $z^2c^3\text{Ado}$ и $z^{2,8}c^3\text{Ado}$ вместо СН-группы должно было бы привести к ослаблению их ингибиторных свойств по сравнению с $c^3\text{Ado}$ и не способствовать дезаминированию. Однако $z^2c^3\text{Ado}$ и $z^{2,8}c^3\text{Ado}$ очень медленно дезаминируются, что можно объяснить только образованием водородной связи между атомами азота N2 в $z^2c^3\text{Ado}$ и $z^{2,8}c^3\text{Ado}$ и водорода CONH-группы остатка Gly184 в активном центре АДА (рис. 6).

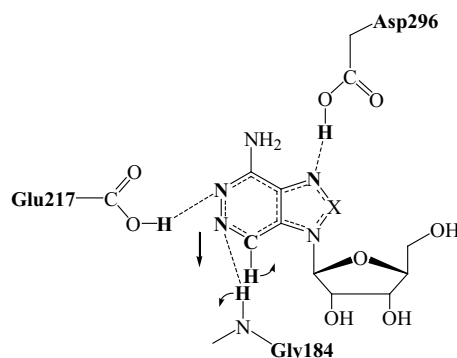


Рис. 6. Предполагаемая система водородных связей молекул $z^2c^3\text{Ado}$ ($X = \text{CH}$) и $z^{2,8}c^3\text{Ado}$ ($X = \text{N}$) с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА

Она значительно слабее, чем в случае наличия атома азота N3, но тем не менее способствует, хотя и в очень малой степени, переносу протона на атом азота N1 гетероцикла $z^2c^3\text{Ado}$ или $z^{2,8}c^3\text{Ado}$ от COOH-группы остатка Glu217, что необходимо для протекания ферментативной реакции дезаминирования.

Подобно $z^8c^7\text{Ado}$, $z^{2,8}c^7\text{Ado}$ также дезаминируется АДА, но значительно медленнее. При этом взаимодействие с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре фермента для атомов азота N1 и N3 в 1,2,3-триазиновой части гетероцикла подобно $z^2\text{Ado}$, а для атома азота N8 в пиразольной части гетероцикла — $z^8c^7\text{Ado}$ (рис. 4). Это значительно увеличивает K_m и резко снижает $V_{\max}$ для $z^{2,8}c^7\text{Ado}$ по сравнению с $z^8c^7\text{Ado}$ (табл. 3).

Как и $c^{1,7}\text{Ado}$, $z^8c^{1,7}\text{Ado}$ не является не только субстратом, но и ингибитором для АДА (табл. 3). Это представляется парадоксальным, так как структурно родственные соединения $z^8c^1\text{Ado}$ и $z^8c^7\text{Ado}$ — инги-

⁴Для $z^2c^3\text{Ado}$ K_m и K_i имеют очень большие значения, а $V_{\max}$ очень мала, поэтому данные отсутствуют.

битор и субстрат соответственно. Но если предположить, что в случае 8-аза-7-деазапроизводных Ado образование двух водородных связей — между атомами азота N8 субстрата и водорода COOH-группы остатка Asp296 и между атомами азота N1 субстрата и водорода COOH-группы остатка Glu217 — кооперативный процесс, то замена атома азота в положении 1 гетероцикла на СН-группу приводит к полной потере и субстратной, и ингибиторной активности $z^8c^{1,7}Ado$ для данного фермента. По этой причине изоструктурность молекулы $z^8c^{1,7}Ado$ катиону $1h^+-z^8c^7Ado$ уже не играет той роли, как и в случае других 1-деазапроизводных Ado.

Анализ распределения ИЭП [14, 17, 18] и изменения величин парциальных отрицательных зарядов на атомах азота N1, N3 или N7 в молекулах изостерных аналогов Ado (табл. 4) с изученными и неизученными субстратными (K_m , V_{max} и V (отн.)) и ингибиторными (K_i) свойствами для АДА позволил предложить следующие ряды возможных изменений этих свойств у различных нуклеозидов.

$$\begin{aligned}
 K_m(Ado) &\ll \underline{K_m(z^5c^9Ado)} < K_m(z^8c^9Ado); \\
 V_{max}(Ado) &\ll \underline{V_{max}(z^5c^9Ado)} < V_{max}(z^8c^9Ado); \\
 V(Ado) &> \underline{V(z^5c^9Ado)} > V(z^8c^9Ado). \\
 K_m(z^8Ado) &\ll K_m(z^2Ado) < \underline{K_m(z^{2,8}Ado)}; \\
 V(z^8Ado) &\gg V(z^2Ado) > \underline{V(z^{2,8}Ado)}. \\
 V_{max}(z^8Ado) &\gg \underline{V_{max}(z^{2,8}Ado)} > V_{max}(z^2Ado). \\
 K_m(z^2c^3Ado) &< K_m(z^{2,8}c^3Ado); \\
 K_i(z^2c^3Ado) &< K_i(z^{2,8}c^3Ado); \\
 V(z^2c^3Ado) &> V(z^{2,8}c^3Ado). \\
 K_m(z^8Ado) &< \underline{K_m(z^{4,8}c^9Ado)}; \\
 V(z^8Ado) &> \underline{V(z^{4,8}c^9Ado)}. \\
 K_i(c^1Ado) &< K_i(z^8c^1Ado) < K_i(c^{1,3}Ado) < \underline{K_i(z^{4,8}c^9Ado)} < \\
 &< \underline{K_m(z^{4,8}c^{1,3,9}Ado)}. \\
 K_m(c^3Ado) &< K_m(z^8c^3Ado) < K_m(z^4c^{3,9}Ado) < K_m(z^{4,8}c^{3,9}Ado); \\
 K_i(c^3Ado) &< K_i(z^8c^3Ado) < K_i(z^4c^{3,9}Ado) < K_i(z^{4,8}c^{3,9}Ado); \\
 V(c^3Ado) &> V(z^8c^3Ado) > V(z^4c^{3,9}Ado) > V(z^{4,8}c^{3,9}Ado).
 \end{aligned}$$

Для катионов $1h^+-Ado$ и его изостерных аналогов области положительного электростатического потенциала в положениях 1 и 6 гетероцикла сходны с таковыми у молекул c^1Ado [14, 17], z^8c^1Ado [18], $c^{1,3}Ado$, $z^{4,8}c^{1,3,9}Ado$ и $z^{4,8}c^{1,9}Ado$. Можно предположить, что молекулы c^1Ado , z^8c^1Ado и $c^{1,3}Ado$ проявляют ингибиторные свойства в отношении АДА не только в силу структурного сходства с катионом $1h^+-Ado$, но и сходства ИЭП, не имея при этом положительного заряда.

На основании литературных данных по изучению субстратных и ингибиторных свойств для АДА различных изостерных аналогов Ado и результатов квантово-химических и молекулярно-механических расчетов, можно

предположить, что процесс акцептирования молекулы Ado или его изостерного аналога функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА включает следующие стадии.

Стадия 1 — переход молекулы субстрата в активное конформационное состояние со следующими параметрами:

$\chi = -120 \dots -100^\circ$ (*анти*-конформация);

$\gamma = 40 \dots 65^\circ$ (*+ск*-конформация);

$\beta = -80 \dots -90^\circ$ (*-ск*-конформация);

равновесная конформация рибофуранозного цикла типа C3'-*эндо*.

Стадия 2 — кооперативное образование трех водородных связей:

между атомами кислорода O5' субстрата и водорода при атоме N1 имидазольной группы остатка His17;

между атомом водорода HO5' субстрата и атомами кислорода COO⁻-группы остатка Asp19;

между атомами азота N7 субстрата и водорода COOH-группы остатка Asp296.

В случае наличия у молекулы субстрата в положении 7 остатка гетероцикла СН-группы, а в положении 8 — атома азота, образование водородной связи происходит между атомами азота N8 субстрата и водорода COOH-группы после конформационных изменений бокового радикала остатка Asp296 в активном центре АДА.

Стадия 3 — образование водородной связи между атомами азота N1 субстрата и водорода COOH-группы остатка Glu217.

В случае 8-аза-7-дезапроизводных Ado образование двух водородных связей на стадиях 2 и 3 в активном центре АДА (между атомами азота N8 субстрата и водорода COOH-группы остатка Asp296 и между атомами азота N1 субстрата и водорода COOH-группы остатка Glu217) является кооперативным процессом.

Стадия 4 — образование водородной связи между атомами азота N3 субстрата и водорода CONH-группы остатка Gly184.

Если у молекулы в положении 3 остатка гетероцикла находится СН-группа, а в положении 2 — атом азота, то происходит образование очень слабой водородной связи между атомами азота N2 субстрата и водорода CONH-группы остатка Gly184 в активном центре АДА вследствие их взаимного смещения (рис. 6).

Стадия 5 — протонирование атома азота N1 гетероцикла в молекуле путем переноса протона от COOH-группы остатка Glu217.

Если в положениях 2 и 3 гетероцикла находятся СН-группы, то в этом случае перенос протона крайне затруднен по причине неоптимальной геометрии соответствующей водородной связи, образующейся на стадии 3.

В случае аденозина или 2'-дезоксаденозина такая система образующихся водородных связей субстрата в активном центре АДА максимально способствует нуклеофильной атаке цинк-активированной молекулы воды (в ви-

де гидроксид-иона) на атом углерода С6 гетероцикла и, следовательно, протеканию ферментативной реакции дезаминирования по механизму S_NAr .

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 03-04-48938).

Литература

- [1] Glazer R.I. Adenosine deaminase inhibitors: their role in chemotherapy and immunosuppression // *Cancer Chemother. and Pharmacol.* 1980. V. 4. No. 4. P. 227–235.
- [2] Agarwal R.P. Inhibitors of adenosine deaminase // *Pharmacol. and Ther.* 1982. V. 17. No. 3. P. 399–429.
- [3] Cristalli G., Costanzi S., Lambertucci C., Lupidi G., Vittori S., Volpini R., Camaioni E. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors // *Med. Res. Rev.* 2001. V. 21. No. 2. P. 105–128.
- [4] Montgomery J.A. Studies on the biologic activity of purine and pyrimidine analogs // *Med. Res. Rev.* 1982. V. 2. No. 3. P. 271–308.
- [5] Resta R., Thompson L.F. SCID: the role of adenosine deaminase deficiency // *Immunol. Today.* 1997. V. 18. No. 8. P. 371–374.
- [6] 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.
- [7] Orozco M., Canela E.I., Franco R. Theoretical study of the protonation and tautomerization of adenosine, formycin, and their 2-NH₂ and 2-F derivatives: functional implications in the mechanism of reaction of adenosine deaminase // *Mol. Pharmacol.* 1989. V. 35. No. 2. P. 257–264.
- [8] 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. No. 2. P. 133–137.
- [9] Orozco M., Canela E.I., Franco R. A quantum chemical study of the enzymatic deamination of benzoadenine derivatives. A theoretical model of the interactions occurring between nucleosides and the active site of adenosine deaminase // *Eur. J. Biochem.* 1990. V. 188. No. 1. P. 155–163.
- [10] Orozco M., Canela E.I., Franco R. Theoretical study of the hydroxyl nucleophilic attack on the 6-aminopyrimidine molecule: functional implications in the reaction mechanism of nucleoside deaminative enzymes // *J. Org. Chem.* 1990. V. 55. No. 9. P. 2630–2637.
- [11] 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. No. 23. P. 8221–8229.
- [12] 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. No. 8. P. 994–1002.

- [13] Marrone T.J., Straatsma T.P., Briggs J.M., Wilson D.K., Quijcho F.A., McCammon J.A. Theoretical study of inhibition of adenosine deaminase by (8*R*)-coformycin and (8*R*)-deoxycorformycin // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. No. 1. P. 277–284.
- [14] Пурыгин П.П., Зарубин Ю.П., Ильичева И.А., Флорентьев В.Л. Квантово-химическое исследование аденозина и его аза- и деазааналогов как антагонистов и ингибиторов аденозиндеаминазы млекопитающих // *Вестник Самарского гос. ун-та.* 1999. №4(12). С. 111–135.
- [15] Ford H., Jr., Dai F., Mu L., Siddiqui M.A., Nicklaus M.C., Anderson L., Marquez V.E., Barchi J.J., Jr. Adenosine deaminase prefers a distinct sugar ring conformation for binding and catalysis: kinetic and structural studies // *Biochemistry.* 2000. V. 39. No. 10. P. 2581–2592.
- [16] Bojack G., Earnshaw C.G., Klein R., Lindell S.D., Lowinski C., Preuss R. Design and synthesis of inhibitors of adenosine and AMP deaminases // *Org. Lett.* 2001. V. 3. No. 6. P. 839–842.
- [17] Зарубин Ю.П., Ильичева И.А., Пурыгин П.П., Флорентьев В.Л. Теоретическое исследование антагонистов и ингибиторов аденозиндеаминазы млекопитающих. I. Аденозин и его аза- и деазааналоги // *Биоорганическая химия.* 2002. Т. 28. №4. С. 315–323.
- [18] Зарубин Ю.П., Ильичева И.А., Пурыгин П.П., Флорентьев В.Л. Теоретическое исследование антагонистов и ингибиторов аденозиндеаминазы млекопитающих. II. Изомерные аза-деазааналоги аденозина // *Биоорганическая химия.* 2002. Т. 28. №5. С. 447–454.
- [19] 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. No. 5010. P. 1278–1284.
- [20] Sharff A.J., Wilson D.K., Chang Z., Quijcho F.A. Refined 2.5 Å structure of murine adenosine deaminase at pH 6.0 // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. No. 4. P. 917–921.
- [21] Wilson D.K., Quijcho 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. No. 7. P. 1689–1694.
- [22] Wilson D.K., Quijcho F.A. Crystallographic observation of a trapped tetrahedral intermediate in a metalloenzyme // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V. 1. No. 10. P. 691–694.
- [23] Sideraki V., Mohamedali K.A., Wilson D.K., Chang Z., Kellems R.E., Quijcho F.A., Rudolph F.B. Probing the functional role of two conserved active site aspartates in mouse adenosine deaminase // *Biochemistry.* 1996. V. 35. No. 24. P. 7862–7872.
- [24] Sideraki V., Wilson D.K., Kurz L.C., Quijcho 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. No. 47. P. 15019–15028.

- [25] Wang Z., Quiocho 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. No. 23. P. 8314–8324.
- [26] Bennett L.L., Jr, Allan P.W., Carpenter J.W., Hill D.L. Nucleosides of 2-aza-purines — cytotoxicities and activities as substrates for enzymes metabolizing purine nucleosides // *Biochem. Pharmacol.* 1976. V. 25. No. 5. P. 517–521.
- [27] 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. No. 5. P. 1059–1076.
- [28] Bussolari J.C., Ramesh K., Stoeckler J.D., Chen S.F., Panzica R.P. Synthesis and biological evaluation of N⁴-substituted imidazo- and *v*-triazolo-[4,5-*d*]pyridazine nucleosides // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. No. 25. P. 4113–4120.
- [29] Ikehara M., Fukui T. Studies of nucleosides and nucleotides. LXIII. Deamination of adenosine analogs with calf intestine adenosine deaminase // *Biochim. Biophys. Acta*. 1974. V. 338. No. 2. P. 512–519.
- [30] 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. No. 6. P. 693–701.
- [31] 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. No. 10. P. 1421–1426.
- [32] Bennett L.L., Jr, Allan P.W., Smithers D., Vail M.H. Resistance to 4-aminopyrazolo (3,4-*d*) pyrimidine // *Biochem. Pharmacol.* 1969. V. 18. No. 4. P. 725–740.
- [33] Hecht S.M., Frye R.B., Werner D., Fukui T., Hawrelak S.D. Synthesis and biological activity of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine nucleosides and nucleotides related to tubercidin, toyocamycin, and sangivamycin // *Biochemistry*. 1976. V. 15. No. 5. P. 1005–1015.
- [34] Simon L.N., Bauer R.J., Tolman R.L., Robins R.K. Calf intestine adenosine deaminase. Substrate specificity // *Biochemistry*. 1970. V. 9. No. 3. P. 573–577.
- [35] 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. No. 6. P. 396–403.
- [36] 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. No. 1. P. 67–75.

- [37] 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. No. 1. P. 39–48.
- [38] 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. No. 7. P. 1211–1217.
- [39] Cristalli G., Vittori S., Eleuteri A., Volpini R., Cola D., Camaioni E., Gariboldi P.V., Lupidi G. Synthesis of 1,7-dideazapurine ribonucleosides and deoxyribonucleosides // *Nucleos. Nucleot.* 1993. V. 12. No. 1. P. 39–53.
- [40] Sanghvi Y.S., Larson S.B., Willis R.C., Robins R.K., Revankar G.R. Synthesis and biological evaluation of certain C-4 substituted pyrazolo[3,4-*b*]pyridine nucleosides // *J. Med. Chem.* 1989. V. 32. No. 5. P. 945–951.
- [41] MacCoss M., Meurer L.C., Hoogsteen K., Springer J.P., Koo G., Peterson L.B., Tolman L., Emini E. Synthesis and biological evaluation of nucleosides containing 8-aminoimidazo[1,2-*a*]pyrazine as an isosteric replacement for adenine // *J. Heterocycl. Chem.* 1993. V. 30. No. 5. P. 1213–1220.
- [42] Schneller S.W., Thompson R.D., Cory J.G., Olsson R.A., De Clercq E., Kim I.-K., Chiang P.K. Biological activity and a modified synthesis of 8-amino-3- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyrazine, an isomer of formycin // *J. Med. Chem.* 1984. V. 27. No. 7. P. 924–928.
- [43] May J.A., Jr., Townsend L.B. Synthesis of *v*-triazolo(4,5-*c*)pyridine nucleosides and 4-(β -D-ribofuranosyl)amino-1,2,3-thiadiazolo(5,4-*b*)pyridine via a rearrangement // *J. Org. Chem.* 1976. V. 41. No. 8. P. 1449–1456.
- [44] Franchetti P., Messini L., Cappellacci L., Grifantini M., Nocentini G., Guarracino P., Marongiu M.E., La Colla P. 8-Aza derivatives of 3-deazapurine nucleosides. Synthesis and in vitro evaluation of antiviral and antitumor activity // *Antiviral. Chem. Chemother.* 1993. V. 4. No. 6. P. 341–352.
- [45] Tam S. Y.-K., Hwang J.-S., De Las Heras F.G., Klein R.S., Fox J.J. Nucleosides. CV. Synthesis of the 8-(β -D-ribofuranosyl)-pyrazolo[1,5-*a*]-1,3,5-triazine isosteres of adenosine and inosine (1) // *J. Heterocycl. Chem.* 1976. V. 13. No. 6. P. 1305–1308.
- [46] Cristalli G., Franchetti P., Grifantini M., Nocentini G., Vittori S. 3,7-Dideazapurine nucleosides. Synthesis and antitumor activity of 1-deazatubercidin and 2-chloro-2'-deoxy-3,7-dideazaadenosine // *J. Med. Chem.* 1989. V. 32. No. 7. P. 1463–1466.
- [47] Meade E.A., Wotring L.L., Drach J.C., Townsend L.B. Synthesis, antiproliferative, and antiviral activity of certain 4-aminopyrrolo[2,3-*d*]pyridazine nucleosides: an entry into a novel

- series of adenosine analogues // J. Med. Chem. 1992. V. 35. No. 3. P. 526–533.
- [48] Montgomery J.A., Thomas H.J. Nucleosides of 2-azapurines and certain ring analogs // J. Med. Chem. 1972. V. 15. No. 2. P. 182–187.
- [49] Walton E., Holly F.W., Jenkins S.R. Indole and 4-aminoindole nucleosides // J. Org. Chem. 1968. V. 33. No. 1. P. 192–197.
- [50] Pathil S.A., Otter B.A., Klein R.S. 4-Aza-7,9-dideazaadenosine, a new cytotoxic synthetic C-nucleoside analogue of adenosine // Tetrahedron Lett. 1994. V. 35. No. 30. P. 5339–5342.
- [51] Nishimura N., Kato A., Maeba I. Synthesis of pyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazine C-nucleosides. Isosteres of sangivamycin, tubercidin, and toyocamycin // Carbohydr. Res. 2001. V. 331. No. 1. P. 77–82.
- [52] Ramasamy K., Ugarkar B.G., McKernan P.A., Robins R.K., Revankar G.R. Synthesis and antitumor activity of certain 3- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazolo[3,4-*f*]-1,2,4-triazines related to formycin prepared via ring closure of a 1,2,4-triazine precursor // J. Med. Chem. 1986. V. 29. No. 11. P. 2231–2235.
- [53] Kang Y., Larson S.B., Robins R.K., Revankar G.R. Synthesis and biological evaluation of certain 3- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazolo[4,3-*b*]pyridazines related to formycin prepared via ring closure of pyridazine precursors // J. Med. Chem. 1989. V. 32. No. 7. P. 1547–1551.
- [54] Kobe J., Brdar B., Sorič J. Formycin analogs. II. Antiviral and cytotoxic *s*-triazolo[4,3-*a*]- and [1,5-*a*] pyridine derivatives // Nucleos. Nucleot. 1986. V. 5. No. 2. P. 135–151.
- [55] HyperChemTM 7.0 for Windows 95/98/ME/NT/2000/XP. Hypercube, Inc. 2002.
- [56] http://www.hyper.com/support/software/Scripts/script_index.html (раздел "Conformational Analysis")
или ftp://ftp.hyper.com/pub/scripts/tor_mm.scr.
- [57] 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. No. 13. P. 3902–3909.
- [58] IUPAC–IUB Joint Commission of Biochemical Nomenclature: Abbreviations and symbols for the description of conformations of polynucleotide chains // Eur. J. Biochem. 1983. V. 131. P. 9–15.
- [59] Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот // М.: Мир, 1987. С. 28–29.
- [60] Ronca G., Zucchelli G. Competitive inhibition of adenosine deaminase by purine and pyrimidine bases // Biochim. et biophys. acta. 1968. V. 159. No. 1. P. 203–205.
- [61] 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. No. 1. P. 22–29.

- [62] Калиниченко Е.Н., Бейгельман Л.Н., Михайлов С.Н., Михайлопуло И.А. Субстратная специфичность аденозиндезаминазы. Роль метильных групп при 2', 3' и 5'-атомах углерода аденозина // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. №9. С. 1157–1161.
- [63] Laboratory Exercises Using HyperChem®. Chapter 2. Molecular Geometry and Properties. 12. Proton Affinity. P. 50–51.
- [64] Bloch A., Robins M.J., McCarthy J.R., Jr. The role of the 5'-hydroxyl group of adenosine in determining substrate specificity for adenosine deaminase // J. Med. Chem. 1967. V. 10. No. 5. P. 908–912.
- [65] Hampton A., Harper P.J., Sasaki T. Substrate properties of cycloadenosines with adenosine aminohydrolase as evidence for the conformation of enzyme-bound adenosine // Biochemistry. 1972. V. 11. No. 25. P. 4736–4739.
- [66] Mikhailopulo I.A., Wiedner H., Cramer F. Substrate specificity of adenosine deaminase: the role of the substituents at the 2'- and 3'-carbons of adenine nucleosides, of their configuration and of the conformation of the furanose ring // Biochem. Pharmacol. 1981. V. 30. No. 9. P. 1001–1004.
- [67] Dodin G., Bensaude O., Dubois J.-E. Tautomerism of formycin. Mechanism of interconversion // J. Amer. Chem. Soc. 1980. V. 102. No. 11. P. 3897–3899.

Поступила в редакцию 19/XI/2003;
в окончательном варианте — 19/XI/2003.

**THEORETICAL STUDY OF ADENOSINE AND ITS
ISOSTERIC ANALOGUES. A POSSIBLE MECHANISM OF
THEIR BINDING IN AN ACTIVE SITE OF MAMMALIAN
ADENOSINE DEAMINASE**

© 2003 Y.P. Zarubin, D.V. Mirgorodsky, P.P. Purygin,⁵ I.A. Il'icheva,
V.L. Florent'ev⁶

Adenosine and its isosteric analogues including their N1-protonated forms (except for that of 1-deazaanalogues) are studied by computer modelling to find a relationships between their molecular structures and substrate properties for the mammalian adenosine deaminase. The atomic charge distribution and maps of the electrostatic potential around their van der Waals molecular surface are calculated for these compounds by using the *ab initio* STO-3G method. The conformational studies are carried out by the MM+ method of molecular mechanics. A mechanism of binding that determines the substrate selectivity of mammalian adenosine deaminase is discussed. The potential substrate properties are predicted for earlier unstudied adenosine analogues.

Paper received 19/XI/2003;

Paper accepted 19/XI/2003.

⁵Zarubin Yury Pavlovich (zarubin@ssu.samara.ru), Mirgorodsky Denis Viktorovich, Purygin Pyotr Petrovich, Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁶Il'icheva Irina Alekseevna, Florent'ev Vladimir Leonidovich Laboratory of protein synthesis chemistry, V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russia.