



УДК 577.338:577.123.36

## ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТОВ И ИНГИБИТОРОВ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ I. АДЕНОЗИН И ЕГО АЗА- И ДЕЗАЗААНАЛОГИ

© 2002 г. Ю. П. Зарубин<sup>\*#</sup>, И. А. Ильичева<sup>\*\*</sup>, П. П. Пурыгин<sup>\*</sup>, В. Л. Флорентьев<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Самарский государственный университет, кафедра органической химии,  
443011, Самара, ул. Акад. Павлова, 1;

<sup>\*\*</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Поступила в редакцию 08.08.2001 г. Принята к печати 22.10.2001 г.

Проведены компьютерные исследования аза- и дезазааналогов аденозина, включая их  $\text{H}^+$ -катионные формы (за исключением 1-дезазааденозина), с целью изучения взаимосвязи между их структурой и субстратными свойствами в отношении аденозиндезаминазы млекопитающих. С использованием неэмпирического метода STO-3G получено зарядовое распределение и карты электростатического потенциала вблизи ван-дер-ваальсовых поверхностей, а с помощью метода молекулярной механики (ММ<sup>+</sup>) произведен конформационный анализ этих соединений. Обсуждается механизм, лежащий в основе субстратной специфичности аденозиндезаминазы млекопитающих.

*Ключевые слова:* аденозиндезаминаза; механизм субстратной специфичности, аденозин; аналоги аза- и дезаза-; теоретическое исследование.

### ВВЕДЕНИЕ

Аденозиндезаминаза (КФ 3.5.4.4, ADA) – ключевой фермент катаболизма аденозина или 2'-дезоксиаденозина в живых организмах, играющий исключительно важную роль в регуляции иммунитета у млекопитающих [1], осуществляющий гидролитическое превращение этих нуклеозидов в инозин (2'-дезоксиинозин) и аммиак. На протяжении последних 35 лет ведутся интенсивные исследования в области синтеза и изучения субстратных свойств различных аналогов аденозина, в частности, обладающих ингибиторными свойствами в отношении ADA. Интерес к ним определяется их способностью влиять на концентрацию аденозина в ткани, на рост и функции лимфоцитов, а также усиливать химиотерапевтическое действие других аналогов аденозина, катаболизируемых ADA [2]. В результате ряда исследований был обоснован возможный механизм реакции дезаминирования аденозина и его аналогов в активном центре ADA как реакции нуклеофильного замещения цинка активированной молекулой воды амино- или другой функциональной группы в шестом положении остатка гетероцикла по механизму  $S_N\text{Ar}$  [3–6]. Было установлено, что важным фактором, определяющим акцептирование

субстратов или ингибиторов в активном центре фермента, является основность атома N1 пуринового гетероцикла [7, 8]. В 1990 г. впервые была экспериментально обнаружена протонированная форма аналога субстрата – 1- $N^6$ -этно-[эритро-9-(2S)-гидрокси-(3R)-нонил]аденина – в активном центре ADA [9]. Изучены также субстратные свойства аналогов аденозина с различными заместителями в фуранозном остатке и выдвинуто предположение о том, что фермент акцептирует субстрат только с одной определенной конформацией рибофуранозного цикла (C3'-эндо) [10, 11].

В последние 10 лет проводились полуэмпирические квантово-химические расчеты аденозина и его аналогов как субстратов и ингибиторов ADA [12–15]. После появления результатов РСА кристаллов ADA в комплексе с различными ингибиторами [16–20] были проведены теоретические исследования ингибирования этого фермента (8R)-коформицином и (8R)-2'-дезоксикоформицином [21] и акцептирования им различных аналогов аденозина, модифицированных по остатку  $\beta$ -D-рибофуранозы [22]. Все это позволило в общих чертах понять механизм ферментативного дезаминирования аденозина. Однако до сих пор нет систематизированных данных о взаимосвязи между структурой аналогов аденозина, особенностями их конформации и субстратными свойствами в отношении аденозиндезаминазы. Установление такой взаимосвязи даст возможность проводить целенаправленный поиск веществ, устойчивых к дезаминированию и/или ингибирующих ADA.

Сокращения: ADA – аденозиндезаминаза; РСА – рентгеноструктурный анализ;  $S_N\text{Ar}$  – механизм нуклеофильного замещения в ароматическом ряду.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (8462) 34-54-59; эл. почта: zarubin@ssu.samara.ru).

Для изучения взаимосвязи структура–субстратные свойства и механизма акцептирования субстрата и его аналогов в активном центре ADA нами были выбраны аденозин и его аза- ( $z^2\text{Ado}$ ,  $z^8\text{Ado}$ ) и дезазааналоги ( $c^1\text{Ado}$ ,  $c^3\text{Ado}$ ,  $c^7\text{Ado}$ ,  $c^9\text{Ado}$ )\*.

Выбор объектов обусловлен рядом причин. 1. Все соединения имеют неизменный остаток  $\beta$ -D-рибофуранозы, что сохраняет для них специфические взаимодействия с активным центром фермента. 2. Замещения на атомы (С или N) или на атомные группы (СН или NH) в различных положениях гетероцикла приводят не только к изменению распределения электронной плотности в нем, но и к изменению характера его связывания с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре ADA. 3. Все соединения изоэлектронны, стерические отличия в структуре гетероцикла у них минимальны, а локализация 6-NH<sub>2</sub>-группы, которая является ключевой для ферментативного дезаминирования, не изменена. 4. Для всех соединений имеются данные о субстратных свойствах в отношении ADA (см. табл. 5).

Для ряда из этих соединений ранее были проведены квантово-химические исследования различными полуэмпирическими методами [23–26]. Однако отсутствие единообразия в методах расчетов не позволяет произвести сопоставление результатов между собой и соотнести вычислительные данные с экспериментальными фактами.

В данной работе для всех семи перечисленных выше соединений, а также для всех возможных 1H<sup>+</sup>-катионов проведено исследование поверхности потенциальной энергии и найдены варианты низкоэнергетических конформаций. Кроме того, получены карты распределения электростатического потенциала вблизи ван-дер-ваальсовых поверхностей нуклеозидов в конформациях, которые, по данным PCA, являются наиболее благоприятными для акцептирования молекул и удерживания их 1H<sup>+</sup>-катионов в активном центре ADA. Расчетные характеристики молекул и катионов сопоставлены с имеющимися в литературе данными по субстратной и ингибиторной активности соединений в отношении ADA. Полученные результаты позволили предложить механизм акцептирования субстрата в активном центре фермента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Расчет парциальных зарядов на атомах молекул нуклеозидов и их 1H<sup>+</sup>-катионов показывает, что протонирование атома N1 приводит к заметному изменению электронной плотности в остат-

ке гетероцикла и мало влияет на ее распределение в остатке  $\beta$ -D-рибозы. Для всех 1H<sup>+</sup>-катионов наблюдается заметное возрастание (в среднем на 0.1 долю электрона, далее д.э.) положительного заряда на атоме С6. Этот факт поясняет причину, по которой протонирование атома N1 необходимо для протекания ферментативной реакции дезаминирования [7, 8], когда в качестве нуклеофила выступает цинкактивированная молекула воды в виде гидроксидона [18].

Структурные и энергетические характеристики наиболее выгодных конформеров аза- и дезазааналогов аденозина в *N*- и *S*-областях в сравнении с аденозином приведены в табл. 1. Данные таблицы показывают, что *анти*-ориентация основания по отношению к рибозному циклу оказывается предпочтительной практически для всех молекул. Только у  $z^8\text{Ado}$  в *S*-области более устойчив *син*-конформер. Конформация вокруг экзотрической связи С4'–С5' зависит от состояния псевдотворщения рибозы (*транс-гош* в случае *N*-конформеров и *гош-гош* в случае *S*-конформеров). В обоих случаях диапазоны значений торсионного угла  $\psi$  узкие. Наиболее выгодным состоянием псевдотворщения рибозы являются *твист*-конформации (в *S*-области С1'-экзо-С2'-эндо – фазовый угол *P* около 150°, а в *N*-области С2'-экзо-С3'-эндо – фазовый угол *P* не превышает 10°). Исключение составляют  $c^7\text{Ado}$  и  $c^9\text{Ado}$ . Для них в *N*-области предпочтительнее состояние конверта (С3'-эндо). Значения амплитуды складчатости цикла  $\tau_m$  лежат в узком диапазоне и близки к полученным ранее [15].

Анализируя табл. 1, можно видеть, что среди исследуемых нуклеозидов нет ни одного, для которого конформационное состояние субстрата или аналога в активном центре ADA, обнаруживаемое с помощью метода PCA [ $\chi = -118\dots-101^\circ$  (*анти*- и *сверх-анти*-конформации,  $\psi = -80\dots-60^\circ$  (*гош-гош*-конформация), псевдотворщение цикла С3'-эндо] [16–20], было бы низкоэнергетическим. В дальнейшем мы будем называть это состояние “активным”. Для того чтобы определить локальные минимумы с более высокой потенциальной энергией, находящиеся в этой области, мы дополнительно детально ее просканировали. В качестве стартовых структур оптимизации были использованы обе (как *N*-, так и *S*-) стандартные формы рибозы. В результате оказалось (см. табл. 2), что в исследуемой области торсионные углы  $\chi$  и  $\psi$  в энергетических минимумах для всех нуклеозидов лежат в очень узком диапазоне значений и не зависят от конформации цикла рибозы. Это позволяет ADA акцептировать молекулу субстрата или аналога не только с С3'-эндо-, но и с С2'-эндо-конформацией цикла, а *S* → *N*-переход может происходить уже непосредственно в активном центре фермента.

\* Аббревиатура модифицированных по гетероциклу производных аденозина дана в соответствии с рекомендациями номенклатурной комиссии IUPAC-IUB (<http://www.chem.gtw.ac.uk/iupac>): z – аза (N вместо C), c – дезаза (C вместо N), индекс – место замены в гетероцикле.

**Таблица 1.** Структурные и энергетические\* характеристики наиболее устойчивых конформаций молекул аденозина и его аза- и дезазааналогов в *N*- и *S*-областях псевдотвращения

| Молекула                  | Конформер | $\chi$                | $\psi$              | $P$                 | $\tau_m$ | $E_p$ |
|---------------------------|-----------|-----------------------|---------------------|---------------------|----------|-------|
| Ado                       | <i>N</i>  | 189.8 ( <i>анти</i> ) | 181.0 ( <i>tg</i> ) | 10.5 ( ${}^3T_2$ )  | 38.8     | 0     |
|                           | <i>S</i>  | 194.0 ( <i>анти</i> ) | 292.0 ( <i>gg</i> ) | 151.2 ( ${}_1T^2$ ) | 37.7     | 0.19  |
| <i>c</i> <sup>1</sup> Ado | <i>N</i>  | 188.0 ( <i>анти</i> ) | 179.0 ( <i>tg</i> ) | 9.9 ( ${}^3T_2$ )   | 39.3     | 0.81  |
|                           | <i>S</i>  | 180.5 ( <i>анти</i> ) | 296.0 ( <i>gg</i> ) | 149.0 ( ${}_1T^2$ ) | 37.5     | 0     |
| <i>z</i> <sup>2</sup> Ado | <i>N</i>  | 184.9 ( <i>анти</i> ) | 181.0 ( <i>tg</i> ) | 8.6 ( ${}^3T_2$ )   | 38.8     | 0     |
|                           | <i>S</i>  | 194.0 ( <i>анти</i> ) | 293.0 ( <i>gg</i> ) | 151.8 ( ${}_1T^2$ ) | 37.5     | 0.12  |
| <i>c</i> <sup>3</sup> Ado | <i>N</i>  | 190.9 ( <i>анти</i> ) | 181.0 ( <i>tg</i> ) | 14.5 ( ${}^3T_2$ )  | 38.5     | 0     |
|                           | <i>S</i>  | 198.0 ( <i>анти</i> ) | 178.0 ( <i>tg</i> ) | 152.4 ( ${}_1T^2$ ) | 39.6     | 0.45  |
| <i>c</i> <sup>7</sup> Ado | <i>N</i>  | 199.9 ( <i>анти</i> ) | 181.0 ( <i>tg</i> ) | 19.7 ( ${}^3E$ )    | 38.8     | 0.02  |
|                           | <i>S</i>  | 202.0 ( <i>анти</i> ) | 292.0 ( <i>gg</i> ) | 151.8 ( ${}_1T^2$ ) | 37.2     | 0     |
| <i>z</i> <sup>8</sup> Ado | <i>N</i>  | 223.0 ( <i>анти</i> ) | 181.0 ( <i>tg</i> ) | 4.7 ( ${}^3T_2$ )   | 36.8     | 0     |
|                           | <i>S</i>  | 36.0 ( <i>син</i> )   | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 148.9 ( ${}_1T^2$ ) | 38.3     | 0.10  |
| <i>c</i> <sup>9</sup> Ado | <i>N</i>  | 179.8 ( <i>анти</i> ) | 300.0 ( <i>gg</i> ) | 19.9 ( ${}^3E$ )    | 39.5     | 1.60  |
|                           | <i>S</i>  | 180.0 ( <i>анти</i> ) | 296.0 ( <i>gg</i> ) | 145.0 ( ${}_1T^2$ ) | 37.8     | 0     |

\* Торсионные углы  $\chi$ (C4–C9–C1'–O4'),  $\psi$ (O4'–C4'–C5'–O5'), а также параметры псевдотвращения  $P$  (фазовый угол) и  $\tau_m$  (амплитуда) приведены в градусах;  $E_p$  – разность (в ккал/моль) между значением конформационной энергии данного конформера и значением энергии в конформации, отвечающей глобальному минимуму этого соединения.

**Таблица 2.** Структурные и энергетические\* характеристики локальных минимумов молекул аденозина и его аза- и дезазааналогов в “активных” конформациях нуклеозидов

| Молекула                  | Конформер | $\chi$                | $\psi$              | $P$                 | $\tau_m$ | $E_p$ |
|---------------------------|-----------|-----------------------|---------------------|---------------------|----------|-------|
| Ado                       | <i>N</i>  | 240.9 ( <i>анти</i> ) | 291.0 ( <i>gg</i> ) | 28.6 ( ${}^3E$ )    | 37.9     | 2.39  |
|                           | <i>S</i>  | 240.9 ( <i>анти</i> ) | 292.0 ( <i>gg</i> ) | 152.7 ( ${}_1T^2$ ) | 37.6     | 1.41  |
| <i>c</i> <sup>1</sup> Ado | <i>N</i>  | 241.9 ( <i>анти</i> ) | 291.0 ( <i>gg</i> ) | 29.8 ( ${}^3E$ )    | 38.1     | 2.73  |
|                           | <i>S</i>  | 240.9 ( <i>анти</i> ) | 291.0 ( <i>gg</i> ) | 150.3 ( ${}_1T^2$ ) | 38.0     | 1.56  |
| <i>z</i> <sup>2</sup> Ado | <i>N</i>  | 240.8 ( <i>анти</i> ) | 292.0 ( <i>gg</i> ) | 28.4 ( ${}^3E$ )    | 37.7     | 1.98  |
|                           | <i>S</i>  | 240.9 ( <i>анти</i> ) | 292.0 ( <i>gg</i> ) | 153.5 ( ${}_1T^2$ ) | 37.4     | 1.40  |
| <i>c</i> <sup>3</sup> Ado | <i>N</i>  | 242.0 ( <i>анти</i> ) | 291.0 ( <i>gg</i> ) | 30.2 ( ${}^3E$ )    | 38.1     | 2.66  |
|                           | <i>S</i>  | 241.2 ( <i>анти</i> ) | 291.0 ( <i>gg</i> ) | 150.4 ( ${}_1T^2$ ) | 38.3     | 1.56  |
| <i>c</i> <sup>7</sup> Ado | <i>N</i>  | 240.7 ( <i>анти</i> ) | 291.1 ( <i>gg</i> ) | 38.0 ( ${}_4T^3$ )  | 38.7     | 2.42  |
|                           | <i>S</i>  | 240.4 ( <i>анти</i> ) | 291.0 ( <i>gg</i> ) | 152.7 ( ${}_1T^2$ ) | 37.3     | 1.42  |
| <i>z</i> <sup>8</sup> Ado | <i>N</i>  | 244.9 ( <i>анти</i> ) | 290.0 ( <i>gg</i> ) | 22.9 ( ${}^3E$ )    | 39.2     | 2.23  |
|                           | <i>S</i>  | 241.8 ( <i>анти</i> ) | 289.0 ( <i>gg</i> ) | 146.9 ( ${}_1T^2$ ) | 39.7     | 1.68  |
| <i>c</i> <sup>9</sup> Ado | <i>N</i>  | 241.1 ( <i>анти</i> ) | 292.0 ( <i>gg</i> ) | 30.1 ( ${}^3E$ )    | 38.2     | 2.95  |
|                           | <i>S</i>  | 240.8 ( <i>анти</i> ) | 292.0 ( <i>gg</i> ) | 151.0 ( ${}_1T^2$ ) | 37.8     | 3.03  |

\* Обозначения те же, что и в табл. 1.

Протонирование атома N1 гетероцикла в молекулах нуклеозидов приводит к существенным изменениям конформационных характеристик образующихся  $1H^+$ -катионов в *N*- и *S*-областях (см. табл. 3). Однако параметры наиболее устойчивых конформаций, активных по отношению к ферменту (см. табл. 4), практически не отличаются от таковых для непротонированных молекул

нуклеозидов. Поэтому одними конформационными особенностями нельзя объяснить значительные различия субстратных свойств соединений рассматриваемой группы в отношении ADA (данные по кинетическим параметрам дезаминирования и ингибирования, известные из экспериментов с указаниями на литературные источники приведены в табл. 5).

**Таблица 3.** Структурные и энергетические\* характеристики наиболее устойчивых конформаций  $1\text{H}^+$ -катионов аденозина и его аза- и дезазааналогов в *N*- и *S*-областях псевдообращения

| $1\text{H}^+$ -Катион             | Конформер | $\chi$                | $\psi$              | <i>P</i>              | $\tau_m$ | $E_p$ |
|-----------------------------------|-----------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------|-------|
| $1\text{H}^+$ -Ado                | <i>N</i>  | 200.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 22.2 ( ${}^3E$ )      | 38.1     | 0.39  |
|                                   | <i>S</i>  | 209.0 ( <i>анти</i> ) | 294.0 ( <i>gg</i> ) | 152.3 ( ${}_{1T^2}$ ) | 39.1     | 0     |
| $1\text{H}^+$ -z <sup>2</sup> Ado | <i>N</i>  | 200.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 21.9 ( ${}^3E$ )      | 38.0     | 0     |
|                                   | <i>S</i>  | 207.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 153.9 ( ${}_{1T^2}$ ) | 38.8     | 0.12  |
| $1\text{H}^+$ -c <sup>3</sup> Ado | <i>N</i>  | 198.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 25.7 ( ${}^3E$ )      | 37.9     | 0.82  |
|                                   | <i>S</i>  | 193.0 ( <i>анти</i> ) | 293.0 ( <i>gg</i> ) | 150.0 ( ${}_{1T^2}$ ) | 38.7     | 0     |
| $1\text{H}^+$ -c <sup>7</sup> Ado | <i>N</i>  | 205.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 28.5 ( ${}^3E$ )      | 38.1     | 0     |
|                                   | <i>S</i>  | 210.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 154.2 ( ${}_{1T^2}$ ) | 38.6     | 0.37  |
| $1\text{H}^+$ -z <sup>8</sup> Ado | <i>N</i>  | 244.0 ( <i>анти</i> ) | 184.0 ( <i>tg</i> ) | 33.5 ( ${}^3E$ )      | 38.7     | 0     |
|                                   | <i>S</i>  | 11.0 ( <i>син</i> )   | 294.0 ( <i>gg</i> ) | 149.1 ( ${}_{1T^2}$ ) | 39.8     | 0.16  |
| $1\text{H}^+$ -c <sup>9</sup> Ado | <i>N</i>  | 194.0 ( <i>анти</i> ) | 296.0 ( <i>gg</i> ) | 20.0 ( ${}^3E$ )      | 37.7     | 0.16  |
|                                   | <i>S</i>  | 211.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 151.2 ( ${}_{1T^2}$ ) | 39.3     | 0     |

\* Обозначения те же, что и в табл. 1.

**Таблица 4.** Структурные и энергетические\* характеристики локальных минимумов  $1\text{H}^+$ -катионов аденозина и его аза- и дезазааналогов в “активных” конформациях нуклеозидов

| $1\text{H}^+$ -Катион             | Область  | $\chi$                | $\psi$              | <i>P</i>              | $\tau_m$ | $E_p$ |
|-----------------------------------|----------|-----------------------|---------------------|-----------------------|----------|-------|
| $1\text{H}^+$ -Ado                | <i>N</i> | 241.0 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 29.6 ( ${}^3E$ )      | 36.2     | 1.24  |
|                                   | <i>S</i> | 241.3 ( <i>анти</i> ) | 294.0 ( <i>gg</i> ) | 155.8 ( ${}_{1T^2}$ ) | 38.1     | 0.51  |
| $1\text{H}^+$ -z <sup>2</sup> Ado | <i>N</i> | 241.0 ( <i>анти</i> ) | 294.2 ( <i>gg</i> ) | 29.2 ( ${}^3E$ )      | 35.9     | 0.96  |
|                                   | <i>S</i> | 241.1 ( <i>анти</i> ) | 294.1 ( <i>gg</i> ) | 157.4 ( ${}_{1T^2}$ ) | 37.8     | 0.74  |
| $1\text{H}^+$ -c <sup>3</sup> Ado | <i>N</i> | 241.2 ( <i>анти</i> ) | 295.0 ( <i>gg</i> ) | 31.6 ( ${}^3E$ )      | 36.5     | 1.81  |
|                                   | <i>S</i> | 241.0 ( <i>анти</i> ) | 293.0 ( <i>gg</i> ) | 156.3 ( ${}_{1T^2}$ ) | 36.9     | 1.51  |
| $1\text{H}^+$ -c <sup>7</sup> Ado | <i>N</i> | 240.8 ( <i>анти</i> ) | 295.1 ( <i>gg</i> ) | 40.0 ( ${}_{4T^3}$ )  | 36.9     | 1.02  |
|                                   | <i>S</i> | 240.7 ( <i>анти</i> ) | 294.0 ( <i>gg</i> ) | 157.1 ( ${}_{1T^2}$ ) | 37.7     | 1.21  |
| $1\text{H}^+$ -z <sup>8</sup> Ado | <i>N</i> | 253.1 ( <i>анти</i> ) | 294.9 ( <i>gg</i> ) | 25.8 ( ${}^3E$ )      | 38.1     | 0.44  |
|                                   | <i>S</i> | 241.8 ( <i>анти</i> ) | 290.9 ( <i>gg</i> ) | 151.6 ( ${}_{1T^2}$ ) | 38.7     | 0.70  |
| $1\text{H}^+$ -c <sup>9</sup> Ado | <i>N</i> | 241.0 ( <i>анти</i> ) | 295.9 ( <i>gg</i> ) | 29.5 ( ${}^3E$ )      | 36.0     | 1.10  |
|                                   | <i>S</i> | 241.3 ( <i>анти</i> ) | 294.0 ( <i>gg</i> ) | 153.9 ( ${}_{1T^2}$ ) | 38.8     | 0.38  |

\* Обозначения те же, что и в табл. 1.

Мы предположили, что важную роль в различии субстратных свойств аналогов аденозина, наряду с характером взаимодействий их структурных фрагментов с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре ADA, играет также порядок акцептирования этих структурных фрагментов. Для проверки этого предположения мы проанализировали характер поверхности электростатического потенциала в “активных” конформациях всех соединений выбранной группы. Анализ распределения областей электростатических потенциалов в исследуемой группе аналогов (рис. 1) и данных РСА [17, 18] показывает, что ключевую роль в акцептировании молекулы субстрата играет образование водородной связи

между атомом N7 гетероцикла в субстрате и протоном  $\gamma$ -COOH-группы остатка Asp296 в активном центре ADA. Поэтому  $c^7$ Ado [27, 30–32] и  $c^9$ Ado [35] не являются ни субстратами, ни ингибиторами данного фермента.

Далее должно происходить последовательное образование двух водородных связей: между атомом N1 гетероцикла и протоном  $\delta$ -COOH-группы остатка Glu217 и между атомом N3 гетероцикла и протоном NH-группы остатка Gly184. В случае  $c^1$ Ado в образовании водородной связи участвует атом N3 гетероцикла, а в случае  $c^3$ Ado – атом N1 гетероцикла. Молекула  $c^1$ Ado изoeлектронна и изоструктурна катиону  $1\text{H}^+$ -Ado, а молекула  $c^3$ Ado

неспособна протонироваться по атому азота N1 из-за увеличения расстояния между ним и протоном  $\delta$ -COOH-группы остатка Glu217. Поэтому  $c^1$ Ado [27, 31–33] более сильный конкурентный ингибитор, чем  $c^3$ Ado [31–33]\*. Оба соединения не являются субстратами для ADA.

Молекулы  $z^2$ Ado и  $z^8$ Ado имеют в соответствующих положениях электрооакцепторные атомы азота вместо СН-групп, но их субстратные свойства резко различаются. В молекуле  $z^2$ Ado атом N2 в *мета*-положении по отношению к группе  $\delta$ -NH<sub>2</sub> сильно снижает способность гетероцикла к дезаминированию по механизму  $S_NAr$ . Парциальные заряды на атомах N1 (–0.22 д. э.) и N3 (–0.20 д. э.) на 0.12 д.э. ниже, чем в молекуле аденозина. Это приводит к понижению для атома N1 сродства к протону  $\delta$ -COOH-группы остатка Glu217 и к ослаблению водородной связи между атомом N3 и протоном NH-группы остатка Gly184. Поэтому  $z^2$ Ado дезаминируется намного медленнее, чем аденозин [28].

В молекуле  $z^8$ Ado замещение углерода на азот в восьмом положении приводит к перераспределению зарядов в триазольной части гетероцикла. Заряды на атомах N7 (–0.18 д. э.) и N8 (–0.04 д. э.) в молекуле  $z^8$ Ado существенно меньше, чем на атоме N7 (–0.28 д. э.) в молекуле аденозина. Это приводит к ослаблению электростатического взаимодействия между атомом N7 гетероцикла и протоном  $\gamma$ -COOH-группы остатка Asp296. В результате молекула  $z^8$ Ado акцептируется медленнее, а это приводит к уменьшению скорости дезаминирования  $z^8$ Ado по сравнению с аденозином в одинаковых условиях [29, 34].

Не менее важную роль в процессе акцептирования нуклеозидного субстрата играют взаимодействия его  $\beta$ -D-рибозного остатка с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре ADA [17, 18] (рис. 2). Согласно экспериментальным данным, ни 5'-дезоксид-Ado [36, 37], ни 5'-O-метил-Ado [30] не являются субстратами или ингибиторами ADA, а 3'-дезоксид-Ado дезаминируется немногим медленнее, чем Ado или 2'-дезоксид-Ado [10]. Из этого следует, что 5'-ОН-группа в остатке  $\beta$ -D-рибозы играет такую же важную роль в акцептировании субстрата ADA, как и атом N7 в остатке гетероцикла. Таким образом, процесс начального акцептирования субстрата в активном центре фермента носит взаимозависимый и кооперативный характер с участием функциональных групп аминокислотных остатков His17, Asp19 и Asp296. Группа 3'-ОН, хотя и важна для акцептирования субстрата в активном центре ADA, играет только второстепенную роль.

\* В работе [33] сообщается, что  $c^3$ Ado является субстратом для ADA, но очень плохим, нет данных по  $K_m$  и  $V_{max}$ .

**Таблица 5.** Кинетические параметры дезаминирования ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) и ингибирования ( $K_i$ ) для аденозина, его аза- и дезазааналогов в отношении ADA

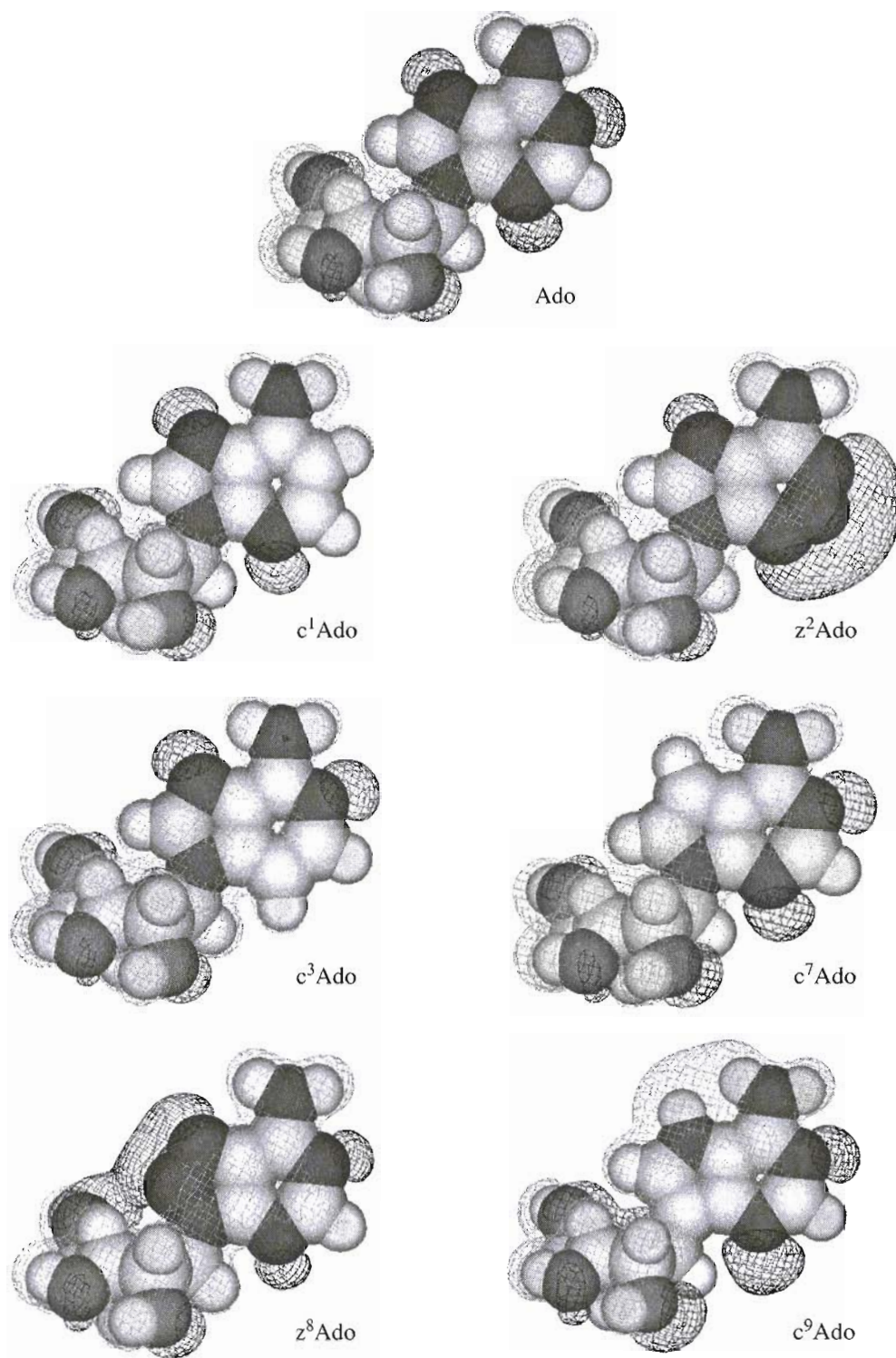
| Соединение | $K_m$ , мкМ | $K_i$ , мкМ | $V_{max}$ (отн.), % | Литература  |
|------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|
| Ado        | 67          | –           | –                   | [27]        |
|            | 29          | –           | 100                 | [28]        |
|            | 25          | –           | 100                 | [29]        |
|            | 58          | –           | 100                 | [30]        |
| $c^1$ Ado  | –           | 2.0         | –                   | [27]        |
|            | –           | 0.662       | –                   | [31]        |
|            | –           | 0.66        | –                   | [32]        |
|            | –           | 0.18        | –                   | [33]        |
| $z^2$ Ado  | 670         | н/д         | 102                 | [28]        |
| $c^3$ Ado  | –           | н/д         | –                   | [27]        |
|            | –           | 359         | –                   | [31]        |
|            | –           | 360         | –                   | [32]        |
|            | н/д         | 257         | н/д                 | [33]        |
| $c^7$ Ado  | –           | –           | –                   | [27, 30–32] |
| $z^8$ Ado  | 130         | н/д         | 310                 | [29]        |
|            | 96          | 145         | 217                 | [34]        |
| $c^9$ Ado  | –           | –           | –                   | [35]        |

Н/д – нет данных; – для аналога означает, что реакция дезаминирования не идет.

Для всех изученных  $1H^+$ -катионов поверхность электростатического потенциала существенно меняет свой вид (рис. 3). Полностью исчезают области отрицательных значений, размеры которых больше ван-дер-ваальсовых радиусов атомов, а области положительных значений в положениях 1 и 6 гетероцикла сходны с таковыми молекулы  $c^1$ Ado (ср. рис. 1). Это позволяет предположить, что молекула  $c^1$ Ado проявляет ингибиторные свойства в отношении ADA не только в силу структурного сходства с катионом  $1H^+$ -Ado, но и благодаря сходству поверхности электростатического потенциала (хотя и не имеет положительного заряда).

Исходя из экспериментальных данных и результатов квантово-химических и молекулярно-механических расчетов, можно предположить следующий механизм акцептирования субстрата активным центром ADA. 1. Кооперативное образование трех водородных связей: а) между атомом O5' субстрата и протоном при атоме N1 имидазольной группы остатка His17; б) между протоном H5' субстрата и атомами кислорода  $\gamma$ -COO<sup>–</sup>-группы остатка Asp19; в) между атомом N7 субстрата и протоном  $\gamma$ -COOH-группы остатка Asp296. При этом происходит отбор конформеров с *гош-гош*-ориентацией вокруг C4'–C5' ( $\psi = -80 \dots -60^\circ$ ). 2. Образование водородной связи между атомом N1 субстрата и

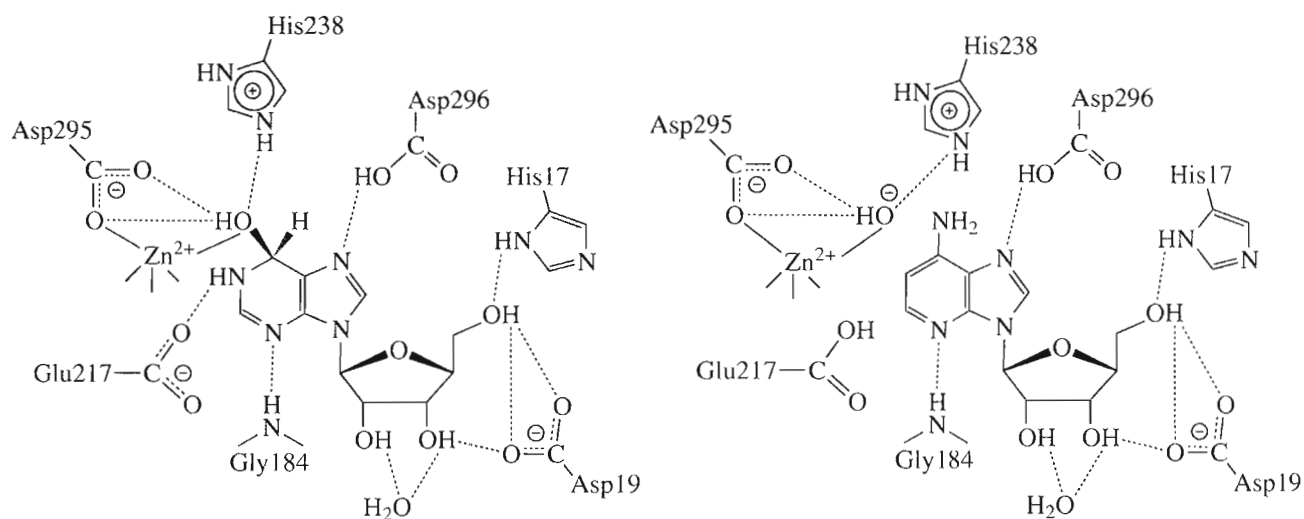




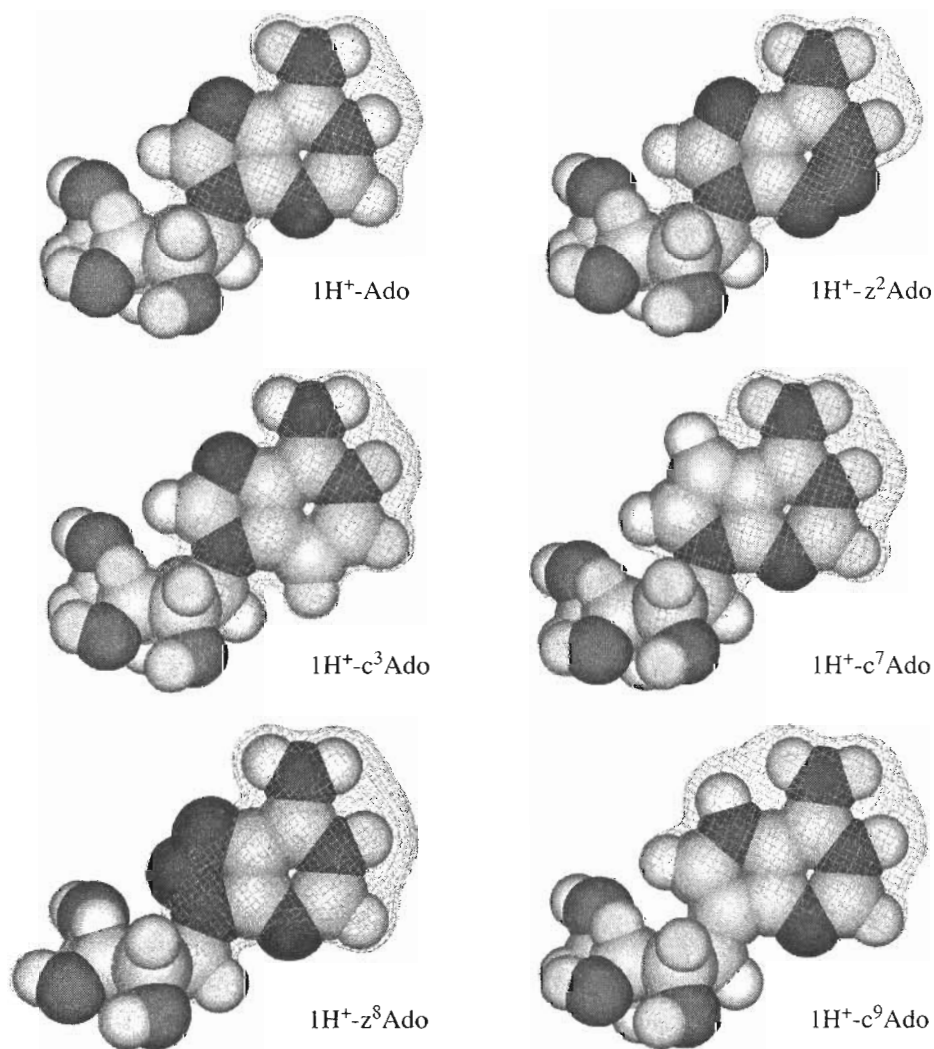
**Рис. 1.** Поверхность электростатического потенциала в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в молекулах аденозина и его аза- и дезазааналогов. Области отрицательных и положительных значений электростатических потенциалов показаны черной и серой сетками соответственно.

протоном  $\delta$ -COOH-группы остатка Glu217. При этом фиксируется *анти*- или *сверх-анти*-ориентация вокруг гликозидной связи ( $\chi = -120 \dots -100^\circ$ ).  
3. Образование водородной связи между атомом N3

субстрата и протоном NH-группы остатка Gly184.  
4. Протонирование атома N1 субстрата путем переноса протона от  $\delta$ -COOH-группы остатка Glu217. В процессе фиксации субстрата в активном центре



**Рис. 2.** Схема взаимодействий по данным PCA (6S)-гидрокси-1,6-дигидропуририбозида [17] (слева) и с<sup>1</sup>Ado [18] (справа) с функциональными группами активного центра ADA. Связи иона цинка (Zn<sup>2+</sup>) показаны сплошными линиями, водородные связи – пунктирными.



**Рис. 3.** Поверхность электростатического потенциала в сравнении с ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов в 1H<sup>+</sup>-катионах аденозина и его аза- и дезазааналогов.

происходит смещение  $S \longleftrightarrow N$ -конформационного равновесия цикла рибозы в  $N$ -область.

Предложенный механизм акцептирования молекулы субстрата в активном центре ADA позволяет объяснить отличия в субстратных свойствах аза- и дезазааналогов аденозина различным характером взаимодействия атомов азота, СН- и NH-групп в определенных положениях остатка гетероцикла в молекулах этих соединений с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре данного фермента.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Расчеты проведены с использованием программного пакета HyperChem [38]. Для получения параметров структур, характеризующих их конформации, была разработана специальная программа NuclConf. Все обозначения и расчетные формулы для определения конформационных параметров нуклеозидов взяты из работы [15].

В качестве исходных шаблонов для построения всех структур были использованы обе конформации аденозин-5'-монофосфата из базы данных программы HyperChem. Таким образом, для всех нуклеозидов оптимизация потенциальной энергии была произведена из двух стартовых конформаций – C2'-эндо ( $S$ -область) и C3'-эндо ( $N$ -область).

Для расчета поверхности потенциальной энергии нуклеозидов был выбран метод ММ<sup>+</sup>, параметризация которого позволяет получать результаты, хорошо согласующиеся с экспериментальными данными, что выгодно отличает его от полумпирических методов расчета. Атомные заряды нуклеозидов и их 1Н<sup>+</sup>-катионов (по Малликену) рассчитаны методом *ab initio* в базе STO-3G и практически не зависят от конформации [39]. Последнее обстоятельство очень важно для последующих расчетов поверхности потенциальной энергии.

Исследование конформаций на потенциальной поверхности каждого из соединений проходило в три этапа. На первом этапе производили сканирование поверхности по двум торсионным углам: гликозидному O4'-C1'-N(C)9-C4 ( $\chi$ ) и экзоциклическому O5'-C5'-C4'-O4' ( $\psi$ ) в диапазоне от  $-180^\circ$  до  $+180^\circ$  с шагом  $10^\circ$ , оптимизируя структуры по всем остальным конформационным параметрам. Процесс сканирования производили дважды, используя в качестве стартовых значения параметров обеих стандартных конформаций рибозы (в  $N$ - и  $S$ -областях). Затем окрестности конформеров с наиболее низкой энергией сканировали в интервале  $\pm 10^\circ$  с шагом  $1^\circ$ , также оптимизируя структуры по остальным параметрам. И, наконец, уточняли положения локальных минимумов в найденных интервалах значений углов  $\chi$  и  $\psi$  с помощью оптимизации с ограничениями. Это позволи-

ло определить практически все наиболее устойчивые конформации в  $N$ - и  $S$ -областях для каждого из соединений. Дополнительно аналогичным образом были найдены все локальные минимумы с более высоким уровнем потенциальной энергии, относящиеся к конформациям, которые, по данным PCA, характерны для нуклеозидов в активном центре ADA. Для них с помощью метода *ab initio* в базе STO-3G были рассчитаны изоповерхности электростатического потенциала.

Для анализа субстратных свойств аза- и дезазааналогов аденозина и описания предполагаемого механизма акцептирования субстрата в активном центре ADA мыши использовали данные PCA комплексов ADA мыши с (6S)-гидрокси-1,6-дигидропуририбозидом [17] и с<sup>1</sup>Ado [18] (структуры 2ada и 1add в Brookhaven Data Bank, www.pdb.bnl.gov).

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 01-04-48830).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franco R., Valenzuela A., Lluis C., Blanco J. // Immunol. Rev. 1998. V. 161. P. 27–42.
2. Agarwal R.P. // Pharmacol. Ther. 1982. V. 17. P. 399–429.
3. Cory J.G., Suhadolnik R.J. // Biochemistry. 1965. V. 4. P. 1733–1735.
4. Bar H.P., Drummond G.I. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1966. V. 24. P. 584–587.
5. Baer H.P., Drummond G.I., Gillis J. // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 123. P. 172–178.
6. Frick L., Wolfenden R., Smal E., Baker D.C. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 1616–1621.
7. Ronca G., Zucchelli G. // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 159. P. 203–205.
8. Maguire M.H., Sim M.K. // Eur. J. Biochem. 1971. V. 23. P. 22–29.
9. Caiolfa V.R., Gill D., Parola A.H. // FEBS Lett. 1990. V. 260. P. 19–22.
10. Mikhailopulo I.A., Wiedner H., Cramer F. // Biochem. Pharmacol. 1981. V. 30. P. 1001–1004.
11. Калинин Е.Н., Бейгельман Л.Н., Михайлов С.Н., Михайлопуло И.А. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. С. 1157–1161.
12. Orozco M., Canela E.I., Franco R. // Mol. Pharmacol. 1989. V. 35. P. 257–264.
13. Orozco M., Canela E.I., Franco R. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 188. P. 155–163.
14. Orozco M., Lluis C., Mallol J., Canela E.I., Franco R. // J. Pharm. Sci. 1990. V. 79. P. 133–137.
15. Orozco M., Velasco D., Canela E.I., Franco R. // J. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 112. P. 8221–8229.
16. Wilson D.K., Rudolph F.B., Quioco F.A. // Science. 1991. V. 252. P. 1278–1284.
17. Sharff A.J., Wilson D.K., Chang Z., Quioco F.A. // J. Mol. Biol. 1992. V. 226. P. 917–921.
18. Wilson D.K., Quioco F.A. // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 1689–1694.



19. Wilson D.K., Quioco F.A. // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V. 1. P. 691–694.
20. Wang Z., Quioco F.A. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 8314–8324.
21. Marrone T.J., Straatsma T.P., Briggs J.M., Wilson D.K., Quioco F.A., McCammon J.A. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 277–284.
22. Ford H., Dai F., Mu L., Siddiqui M.A., Nicklaus M.C., Anderson L., Marquez V.E., Barchi J.J., Jr. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. P. 2581–2592.
23. Saran A., Mitra C., Pullman B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. V. 517. P. 255–264.
24. Singh P., Hodgson D.J. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1977. V. 99. P. 4807–4815.
25. Saran A., Mitra C. // *Indian J. Biochem. Biophys.* 1979. V. 16. P. 304–309.
26. Saran A., Chatterjee C.L. // *Int. J. Quantum Chem.* 1984. V. 25. P. 743–752.
27. Ikehara M., Fukui T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. V. 338. P. 512–519.
28. Bennett L.L., Jr., Allan P.W., Carpenter J.W., Hill D.L. // *Biochem. Pharmacol.* 1976. V. 25. P. 517–521.
29. Agarwal R.P., Sagar S.M., Parks R.E., Jr. // *Biochem. Pharmacol.* 1975. V. 24. P. 693–701.
30. Krajewska E., De Clercq E., Shugar D. // *Biochem. Pharmacol.* 1978. V. 27. P. 1421–1426.
31. Lupidi G., Riva F., Cristalli G., Grifantini M. // *Ital. J. Biochem.* 1982. V. 31. P. 396–403.
32. Lupidi G., Cristalli G., Marmocchi F., Riva F., Grifantini M. // *J. Enzyme. Inhib.* 1985. V. 1. P. 67–75.
33. Kurz L.C., Moix L., Riley M.C., Frieden C. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 39–48.
34. Simon L.N., Bauer R.J., Tolman R.L., Robins R.K. // *Biochemistry.* 1970. V. 9. P. 573–577.
35. Zimmerman T.P., Deeproose 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. // *Biochem. Pharmacol.* 1983. V. 32. P. 1211–1217.
36. Bloch A., Robins M.J., McCarthy J.R., Jr. // *J. Med. Chem.* 1967. V. 10. P. 908–912.
37. Hampton A., Harper P.J., Sasaki T. // *Biochemistry.* 1972. V. 11. P. 4736–4739.
38. HyperChem™ 5.02 Evaluation Release for Windows 95/NT. Hypercube, Inc. 1997.
39. Kwiatkowski J.S., Pullman B. // *Int. J. Quantum. Chem.* 1979. V. 15. P. 499–510.

## Theoretical Study of Antagonists and Inhibitors of Mammalian Adenosine Deaminase. I. Adenosine and Its Aza- and Deazaanalogues

Yu. P. Zarubin<sup>#</sup>, I. A. Il'icheva<sup>\*\*</sup>, P. P. Purygin<sup>\*</sup>, and V. L. Florent'ev<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup> Phone: +7 (8462) 34-5459; e-mail: zarubin@ssu.samara.ru

<sup>\*</sup> Department of Organic Chemistry, Samara State University, ul. Akademika Pavlova 1, Samara, 443011 Russia

<sup>\*\*</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, GSP Moscow, 117984 Russia

Aza- and deazaanalogues of adenosine, including their 1-protonated forms (except for that of 1-deazaadenosine), were studied by computer computation to find a relationship 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 were calculated for these compounds using the *ab initio* STO-3G method. The conformational studies were carried out by the MM<sup>+</sup> method of molecular mechanics. The mechanism that determines the substrate selectivity of mammalian adenosine deaminase is discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* adenosine deaminase, substrate selectivity mechanism; adenosine, azaanalogues, deazaanalogues, theoretical study