



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.151.042/4

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННЫЙ СИНТЕЗ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ

Яковлева Г. М.

Институт биохимии Академии наук БССР, Гродно *

Обзор посвящен целенаправленному синтезу специфических ингибиторов ферментов. В рамках современных концепций ферментативного катализа рассмотрены известные классы специфических ингибиторов: стабильные аналоги субстратов, связывающиеся с ферментами в комплексы, моделирующие комплексы Михаэлиса или действующие на стадии химического превращения субстратов; конформационные ингибиторы; аналоги субстратов, способные участвовать в ферментативных превращениях с образованием модифицированных продуктов; субстраты-«самоубийцы»; стадийные ингибиторы; аналоги переходного состояния; мультисубстратные аналоги; сочетанные субстраты. Представлены типы химических модификаций структуры специфических субстратов, наиболее широко использующиеся при создании ингибиторов ферментов. Обсуждены возможности методов количественной взаимосвязи между структурой и биологической активностью вещества (QSAR) и методов математического моделирования для прогнозирования оптимальной структуры ингибиторов.

СОДЕРЖАНИЕ ОБЗОРА

Введение

I. Основные принципы рационального, базирующегося на механизме ферментативной реакции подхода к созданию специфических ингибиторов ферментов

I. 1. Аналоги субстратов

I. 2. Аналоги активированных интермедиатов ферментативных превращений специфических субстратов

II. Химические возможности создания специфических ингибиторов

II. 1. Фосфорсодержащие соединения

II. 2. Серосодержащие аналоги природных субстратов

II. 3. Возможности использования соединений мышьяка в создании специфических ингибиторов

II. 4. Нитроаналоги карбоновых кислот

III. Конкретные примеры ингибиторов, созданных с учетом механизма реакции, катализируемой определенным ферментом

III. 1. Специфические ингибиторы PLP-зависимых ферментов

III. 2. Специфические ингибиторы аденозиндеаминазы

III. 3. Специфические ингибиторы амидогидролаз

IV. Использование методов оценки количественной взаимосвязи между структурой и биологической активностью вещества (QSAR) и методов математического моделирования в рациональном поиске специфических ингибиторов ферментов

Заключение

* Настоящий адрес: филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Пущино.

Принятые сокращения и обозначения: PALA — N-фосфоацетил-L-аспартат; PLP — пиридоксальфосфат; E — фермент; S — субстрат; N — промежуточное соединение ферментативного превращения субстрата; P — продукт; I — ингибитор; Nu — нуклеофильная группа; K_e — константа равновесия ферментативной реакции; K_n — константа равновесия соответствующей некатализируемой реакции; K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса; K_t — константа диссоциации комплекса фермент — переходное состояние субстрата; K_{ms} — константа диссоциации фермент-мультисубстратного комплекса; k_e , k_{cat} — константа скорости ферментативной реакции; k_n — константа скорости соответствующей некатализируемой реакции.

Специфические ингибиторы ферментов традиционно и с давних пор широко используются как инструменты в фундаментальных исследованиях индивидуальных ферментов, в изучении их механизмов действия, субстратной специфичности, топографии активных центров и т. п. [1]. В настоящее время внимание исследователей все более привлекает возможность использования специфических ингибиторов для направленной регуляции ферментативной активности на уровне intactной клетки и целого организма [2, 3]. Следует отметить, что исследования *in vivo* представляют особый интерес с точки зрения практической медицины и сельского хозяйства, поскольку биологическая активность многих химиотерапевтических препаратов [3–6], а также средств борьбы с различными вредителями в сельском хозяйстве [7, 8] обусловлена их воздействием на определенные ферменты-мишени.

Один из интересных аспектов применения специфических ингибиторов ферментов связан с их ролью в изучении явления амплификации генов [9, 10]. Резистентные мутантные клетки, отобранные с помощью ингибиторов, таких, как метотрексат, коформин, *N*-фосфоноацетил-*L*-аспартат (PALA), метвининсульфоксимиин и др., представляют собой богатые источники ферментов-мишеней, на которые действуют ингибиторы (до 50% от общего белка клетки), соответствующих мРНК и генов [9–11].

Цель настоящего обзора состоит в рассмотрении современного состояния проблемы рационального создания специфических ингибиторов ферментов. Основное внимание при этом будет обращено на факторы, определяющие способность создаваемых специфических ингибиторов избирательно и эффективно воздействовать на определенные ферменты и не затрагивать другие, даже родственные, в том числе изоформы одного и того же фермента. Обзор не касается вопросов, связанных с биологической активностью специфических ингибиторов *in vivo*, которая, как известно, зависит от их способности к проникновению в клетку, возможности биотрансформации под воздействием внутриклеточных ферментов (активация и катаболизм), присутствия в клетке ферментов-мишеней, устойчивости последних, состояния пула конкурирующих природных метаболитов и т. п. Это обширная и очень важная область исследования, которая требует специального обсуждения. Некоторые аспекты данной проблемы в применении к химиотерапевтическому действию специфических ингибиторов освещены в обзоре [3, 6].

За последние 10–15 лет в области создания специфических ингибиторов ферментов произошел качественный перелом. Если прежде их обнаруживали случайно, главным образом в результате испытания различных биологически активных природных и синтетических веществ, то сейчас благодаря расширившимся представлениям о специфичности и механизме действия ферментов существует реальная возможность целенаправленного синтеза необходимых соединений. Начало этому этапу положила работа Дженкса, в которой он, анализируя действие ингибиторов пролинерацемазы (КФ 5.1.1.4.), впервые сформулировал идею создания ингибитора, моделирующего возможное переходное состояние субстрата в ферментативной реакции [12]. Независимо Хомутовым с сотр. [13] на примере пиридоксальфосфат (PLP)-зависимых ферментов была предложена концепция создания ингибиторов путем моделирования различных состояний субстрата — от основного до высокоактивированных промежуточных соединений, образующихся в ходе ферментативной реакции. Этими же авторами при исследовании механизма ингибирования PLP-зависимых ферментов антибиотиком *L*-цикloserином впервые было отмечено, что действие ингибитора может быть обусловлено включением его в нормальный каталитический процесс, в ходе которого активируется латентная группировка ингибитора, способная ковалентно связываться с функциональными группами активного центра фермента [14, 15]. Таким образом, были изложены основные представления о высокоспецифических ингибиторах типа субстратов-«самоубийц». Свое дальнейшее развитие принципы целенаправлен-

пого синтеза специфических ингибиторов ферментов получили в работах Вольфендена [16], Линхарда [17], Бартлетта [18] и др.

В результате сформировался рациональный подход к созданию специфических ингибиторов ферментов. Он основан на рассмотрении химического механизма конкретной ферментативной реакции и предполагает моделирование соединений, включенных в процесс ферментативного превращения субстрата. Теоретической основой такого подхода являются современные концепции ферментативного катализа, в соответствии с которыми интерпретируется сродство специфических ингибиторов к ферменту.

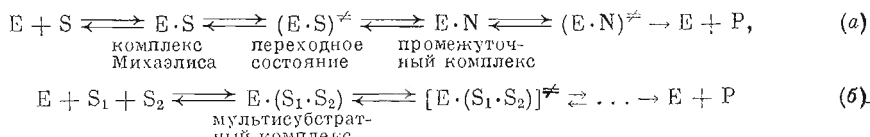
В настоящем обзоре в рамках обсуждаемого подхода приведена классификация известных типов специфических ингибиторов (глава I) и обсуждены возможности создания новых ингибиторов с помощью различных методов химической модификации (глава II). Необходимо подчеркнуть, что органическая химия и химия элементоорганических соединений открывают широчайшие возможности для создания специфических ингибиторов ферментов. Рассмотренные в обзоре примеры составляют далеко не полный перечень известных вариантов. Здесь обсуждаются в основном аналоги карбоновых и аминокислот, природных фосфатов, в том числе нуклеотидов, и их производные, созданные на основе фосфор-, серо-, мышьяк- и азотсодержащих соединений. Отдельную главу (III) составляет систематическое изложение известных типов специфических ингибиторов для PLP-зависимых ферментов, амидогидролаз и аденозиндезаминазы (КФ 3.5.4.2). Следует отметить, что в обзоре наряду с результатами, полученными в последние годы (до 1985 г. включительно), приводятся данные более ранних работ, которые представляют методологический интерес и сохраняют свою актуальность.

Заключительная часть обзора посвящена краткому (без привлечения математического аппарата) рассмотрению компьютерных методов, которые интенсивно развиваются в настоящее время и все более широко используются при поиске новых веществ с заданной биологической активностью [19]. Они включают методы расчета количественной взаимосвязи между структурой и активностью вещества (QSAR), конформационный анализ и методы молекулярного моделирования, в том числе молекулярной графики.

I. Основные принципы рационального, базирующегося на механизме ферментативной реакции подхода к созданию специфических ингибиторов ферментов

В настоящее время стало очевидным, что любая ферментативная реакция представляет собой сложный многостадийный процесс, протекающий через образование ряда промежуточных комплексов (схема 1).

Схема 1



E — фермент; S, S₁, S₂ — субстраты; N — промежуточное соединение ферментативного превращения субстрата; P — продукт

Ферментативная реакция: односубстратная (a) и с участием двух субстратов (b)

В зависимости от того, какое состояние субстрата имитирует ингибитор, его можно отнести к классу аналогов, моделирующих основное состояние субстрата, либо к классу аналогов высокоактивированных промежуточных форм ферментативного превращения субстратов. Первый класс включает ингибиторы, связывающиеся с ферментами в комплексы, моделирующие комплексы Михаэлиса; ингибиторы, действующие на стадии химического превращения субстратов; вещества, способные участвовать в ферментативных превращениях с образованием модифицированных продуктов (строго

говоря, эти соединения не являются ингибиторами, однако они, как правило, угнетают ферментативную активность вследствие очень низкой скорости их превращения на ферменте); конформационные ингибиторы и субстраты-«самоубийцы». Второй класс аналогов образуют стадийные ингибиторы, аналоги переходного состояния, мультисубстратные аналоги и сочетанные субстраты.

Следует подчеркнуть, что мы не рассматриваем отдельно реакции, катализируемые кофакторзависимыми ферментами, поскольку общие принципы подхода распространяются и на этот случай: возможны специфические ингибиторы, являющиеся аналогами кофактора или промежуточных кофермент-субстратных комплексов, образующихся на ферменте в ходе реакции.

Очевидно, что приведенная классификация в некоторой степени условна, так как сродство ингибитора к ферменту может определяться сразу несколькими факторами, в результате чего для ряда случаев не представляется возможным однозначно идентифицировать тип ингибитора. Тем не менее на основе данной классификации можно ввести термин «специфические ингибиторы», которого в литературе до сих пор не имеется, несмотря на широкое распространение этого понятия. *Специфические ингибиторы* можно определить как структурные аналоги субстратов (или интермедиатов), которые, реагируя с ферментами, реализуют в активном центре взаимодействия, характерные для динамичного фермент-субстратного комплекса на той или иной стадии ферментативной реакции, но препятствуют дальнейшему протеканию процесса.

Необходимо отметить, что среди специфических ингибиторов известны вещества, связывающиеся с ферментами как обратимо, так и необратимо. Большинство ингибиторов из вышеупомянутых классов образуют хотя и достаточно прочные, но обратимые комплексы с ферментами. Необратимым типом взаимодействия характеризуются, например, субстраты-«самоубийцы» или аналоги субстратов при наличии в их структуре группировки, способной к образованию прочных ковалентных связей с аминокислотными остатками активного центра, действующие по принципу аффинных реагентов.

В общем виде сродство ингибиторов к ферментам зависит от: а) структурного соответствия (комплементарности) молекулы ингибитора активному центру фермента, в обеспечении которого значительную роль играет конформационная подвижность молекулы ингибитора; б) природы сил, обуславливающих взаимодействие ингибитора с ферментом, что в конечном итоге влияет на прочность комплекса фермент — ингибитор. Установлено, что в образовании последнего могут участвовать ковалентные связи, электростатические силы (ионное, ион-дипольное и диполь-дипольное взаимодействия), гидрофобные силы, водородные связи и комплексы с переносом заряда [20].

1.1. Аналоги субстратов

Для получения специфических ингибиторов наиболее естественным представляется создание соединений, моделирующих структуру специфического субстрата. Ферменты отличаются от других типов катализаторов высокой избирательностью в отношении субстрата. Однако она не является абсолютной, что открывает определенные возможности для модификации последнего [13]. Очевидно, что при изменении структуры молекулы субстрата важно учитывать функции составляющих ее частей в конкретной ферментативной реакции. Модифицированная молекула должна сохранять сродство к ферменту и в некоторых случаях определенную способность к свойственному субстрату превращению. В общем случае модификация осуществляется путем замены отдельных группировок в реагирующем или не реагирующем в данной ферментативной реакции фрагменте молекулы специфического субстрата. Получаемые таким образом аналоги могут либо ингибировать ферментативный процесс, либо проявлять субстратоподобные свойства.

Из высказанных соображений следует, что действие аналогов субстратов может проявляться на различных стадиях, соответствующих ферментативному превращению субстрата.

1.1.1. Аналоги субстратов, связывающиеся с ферментами в комплексы Михаэлиса

Известны ингибиторы, которые за счет ковалентных взаимодействий связываются с ферментом в комплексе, моделирующей комплекс Михаэлиса, с образованием которого начинается ферментативный катализ.

Предполагается, что образование комплекса Михаэлиса протекает быстро и обратимо и не сопровождается какими-либо химическими изменениями; фермент и субстрат удерживаются вместе за счет сил физической природы [21]. Специфичность на стадии связывания субстрата ферментом, по-видимому, определяется геометрическим и электронным соответствием (комплементарностью) структуры молекулы субстрата структуре соответствующего участка белковой молекулы [22, 23]. В зависимости от структуры субстрата и природы функциональных групп активного центра фермента в образовании комплекса Михаэлиса могут принимать участие взаимодействия гидрофобного или электростатического характера, водородные связи и другие более слабые взаимодействия [24].

Факторы, определяющие сродство специфического субстрата к ферменту, должны быть учтены и при создании ингибиторов описываемого типа. При этом, как правило, используются изостерические замены отдельных структурных фрагментов молекулы специфического субстрата. Например, допустима замена атома водорода на фтор, поскольку ван-дер-ваальсовы радиусы водорода (1,20 Å) и фтора (1,35 Å) близки. Иногда с помощью определенных модификаций, а именно за счет введения в структуру аналога субстрата дополнительных связывающих детерминант (например, положительно или отрицательно заряженной группировки, которой при связывании ингибитора будет соответствовать протон в активном центре), удается получить субстратоподобные ингибиторы, обладающие значительно более высоким сродством к ферменту, чем прототип-субстрат [25].

1.1.2. Аналоги субстратов, действующие на стадии химического превращения субстрата

Аналог специфического субстрата может реагировать с определенной группой активного центра (например, с протетической), образуя аддукт, имитирующий промежуточное соединение ферментативного превращения субстрата, но неспособный к дальнейшему превращению [26, 27].

1.1.3. Аналоги субстратов, способные участвовать в ферментативных превращениях с образованием модифицированных продуктов

Было установлено, что аналоги субстратов, в которых модифицирован не реагирующий в данной ферментативной реакции фрагмент молекулы, могут включаться в нормальную ферментативную реакцию. Однако, как правило, процесс их ферментативного превращения протекает значительно медленнее (с заметным понижением величины максимальной скорости реакции) и характеризуется большим значением K_m по сравнению с реакциями специфических субстратов [28, 29], т. е. полученные соединения являются «худшими» субстратами. Их участие в последовательной цепи превращений *in vivo* может привести к уменьшению скорости синтеза конечных продуктов и ингибированию последующих биохимических процессов [3].

Реакционноспособные аналоги субстратов с заменой реагирующего фрагмента молекулы представляют особый интерес для изучения механизма ферментативной реакции. Для специфического субстрата постулирует-

ся, что процесс его ферментативного превращения протекает через образование продуктивного фермент-субстратного комплекса [30, 31]. Предполагают, что формирование последнего осуществляется ступенчато: вначале образуется неспецифический сорбционный комплекс, затем фиксированный, который изомеризуется в продуктивный. Соответственно, каждой стадии отвечает определенный уровень специфичности фермента. Если строение сорбционного комплекса характеризуется подвижностью его компонентов, то в фиксированном реализуется максимально возможное число взаимодействий между нетрансформируемыми фрагментами молекулы субстрата и белком, обусловленных топохимическим соответствием реагентов. На стадии же образования продуктивного комплекса фермент, по-видимому, дискриминирует состояние реагирующего фрагмента субстрата [30, 31].

В соответствии с изложенными представлениями можно предполагать различие в реализуемых механизмах ферментативного превращения для специфического и модифицированного по реагирующему фрагменту субстратов. Это обстоятельство делает описанные соединения весьма ценными инструментами в изучении тонких особенностей механизмов ферментативных реакций.

1.1.4. Конформационные ингибиторы

Следствием акта «узнавания» ферментом субстрата является необходимая для ферментативного катализа ориентация реагирующего фрагмента молекулы субстрата относительно каталитических групп активного центра фермента или кофактора. Предполагают, что надлежащую комплементарность обеспечивают конформационные (геометрические) изменения белка и сопряженные с ними конформационные перестройки молекулы лиганда (субстрата), а также индуцированные изменения электронной структуры белка и лиганда при связывании последнего [12, 32]. С учетом этих предположений предлагается три альтернативных варианта структуры специфических ингибиторов.

Это, во-первых, конформационные ингибиторы, структурные аналоги субстрата, содержащие функциональную группу, свойства которой зависят от конформации соединения (см. гл. III. 1.2). Причем в растворе они существуют в неактивной форме, и их ингибиторные свойства обусловлены конформационными изменениями, появляющимися только при взаимодействии с ферментами [13, 33, 34].

Второй вариант включает конформационно-ограниченные, как правило, циклические структуры, отвечающие по стерическим требованиям конформации связанного на ферменте специфического субстрата (гл. III. 3.2). Установление биологически активной конформации специфических ингибиторов представляет собой сложную задачу, которая может быть решена с привлечением комплекса физико-химических методов и теоретического конформационного анализа [19]. Прежде всего встают вопросы: насколько соответствует конформация ингибитора в растворе его конформации в связанном состоянии на ферменте и какова роль конформационной подвижности молекулы ингибитора в обеспечении его надлежащей ориентации на активном центре?

В-третьих, для ферментов, субстратами которых являются относительно жесткие молекулы типа циклических форм углеводов, нуклеозидов и нуклеотидов, было предложено использование конформационно-подвижных аналогов субстрата [35] (гл. III. 2). При этом принимались в расчет соображения о том, что такой аналог, коль скоро он может существовать в конформациях, близких к переходному состоянию, будет обладать достаточно высоким сродством к ферменту. Подобные ингибиторы должны удовлетворять следующим требованиям: наличие по возможности максимального числа свойственных субстрату функциональных групп, принимающих участие в связывании с ферментом, и всех групп, непосредственно реагирующих в ферментативной реакции; проявление аналогами повышен-

ной по сравнению с природными субстратами конформационной подвижности, причем наиболее важно увеличение подвижности именно в районе реагирующих групп [35].

1.1.5. Субстраты-«самоубийцы»

Субстраты-«самоубийцы» [36], или синкаталитические ингибиторы [31] (или, как их еще называют, ферментактивируемые необратимые ингибиторы [37], ингибиторы-«самоубийцы» [36], k_{cat} -ингибиторы [38, 39]), являются в определенной мере структурными аналогами нормального физиологического субстрата фермента-мишени, однако они обязательно содержат скрытую, потенциально реакционноспособную группировку. В некоторых случаях синкаталитический ингибитор не имеет очевидного структурного сходства со специфическим субстратом и, следовательно, не может реализовать нековалентные взаимодействия с ферментом, характерные для специфического субстрата в комплексе Мпхаэлиса [38]. Но для большинства известных ингибиторов данного типа специфичность, по видимому, проявляется уже на стадии связывания в нековалентном комплексе [36]. Основным фактором, определяющим избирательность их действия, является то, что в свою активную форму, способную необратимо инактивировать фермент, ингибитор превращается самим ферментом, поскольку активация субстрата-«самоубийцы» требует специфического механизма, обеспечиваемого лишь определенным ферментом и, как следствие, область реагирования образующейся активной формы ингибитора ограничивается каталитическим центром фермента [36, 40]. Из всего этого следует, что при создании ингибиторов-«самоубийц» необходимо иметь в виду как принцип структурного подобия субстрату, так и возможности превращения вводимых группировок в соответствии с механизмом катализируемой данным ферментом реакции [40–42].

Необходимо отметить, что возможны два типа необратимой инактивации ферментов синкаталитическими ингибиторами: действительно необратимое ингибирование, обусловленное ковалентной модификацией каталитических остатков активного центра, или же псевдообратимая инактивация за счет прочного нековалентного связывания с ферментом продукта ферментативного превращения субстрата-«самоубийцы» [43]. Ниже будут рассмотрены примеры ингибиторов того и другого типа.

Благодаря высокой специфичности и необратимости действия субстраты-«самоубийцы» представляют большой интерес как лекарственные препараты [37, 40, 42, 44]. Спектр их фармакологической активности весьма широк: среди них обнаружены противоопухолевые и гипотензивные препараты, антидепрессанты и антикоагулянты [40, 42]. Очевидно, что в регуляции ферментативной активности на уровне клетки и целого организма субстраты-«самоубийцы» имеют преимущество по сравнению с обычными аффинными реагентами [45–47], поскольку последние содержат уже готовую реакционноспособную группировку и не могут обеспечить избирательную дезактивацию необходимых компонентов в сложной системе ферментов [36].

1.2. Аналоги активированных интермедиатов ферментативного превращения специфических субстратов

1.2.1. Стадийные ингибиторы

Как уже отмечалось выше (схема 1), в ходе ферментативного превращения субстрата образуются реакционноспособные, как правило короткоживущие, комплексы. Поскольку синтез промежуточных соединений на ферменте требует определенной энергии активации, было предположено, что их стабильные аналоги должны обладать большим сродством к ферменту, чем субстраты [43]. Такой тип ингибиторов получил название «стадийные», так как с их помощью можно осуществлять воздействие на отдельные стадии химического превращения субстрата на ферменте.

Данные представления хорошо укладываются в современные концепции, согласно которым ферментативный катализ достигается за счет стабилизации ферментом высокоактивированных метастабильных состояний субстрата [30, 48—50] *. В настоящее время из этих состояний выбраны три основные гипотетические формы, которые служат прототипами для трех различных классов специфических ингибиторов, рассматриваемых ниже.

1.2.2. Аналоги переходного состояния

По сравнению со всеми другими типами ингибиторов для аналогов переходного состояния теория разработана наиболее глубоко. В основе создания таких аналогов лежит концепция стабилизации ферментом субстрата в переходном состоянии. Последняя предполагает, что фермент проявляет более высокое сродство к субстрату в переходном состоянии, чем к исходному субстрату или продуктам. Это означает, что субстрат, образуя комплекс с ферментом, осуществляет лишь часть возможных взаимодействий вследствие того, что фермент некомплементарен субстрату в его основном состоянии. Комплементарность достигается лишь в переходном состоянии субстрата, и при этом реализуются еще не использованные возможности связи его с ферментом [21, 31, 51].

Предполагают, что в стабилизации переходного состояния кроме лабильной ковалентной связи могут принимать участие водородные связи, электростатические, гидрофобные взаимодействия, строго ориентированные в пространстве, а также ряд других факторов (энтропийные изменения, сольватационные эффекты, конформационная перестройка белковой глобулы) [17].

Таким образом, энергия образования нековалентного комплекса субстрата с активным центром фермента лишь частично отражается в наблюдаемом связывании субстрата [52, 53]. В то же время значительная часть потенциальных фермент-субстратных взаимодействий сохраняется для реализации на химической стадии реакции, имеющей, как правило, наиболее высокий барьер свободной энергии вдоль координаты реакции [24]. С этой точки зрения взаимодействия функциональных групп субстрата с активным центром было предложено разделить на специфические, продуктивные и непродуктивные (неспецифические). Непродуктивные взаимодействия субстрата с ферментом нарушаются при образовании им переходного состояния. Продуктивные фермент-субстратные взаимодействия сохраняются в переходном состоянии. Наконец, специфическими взаимодействиями являются те, эффективность которых не только сохраняется, но и возрастает при образовании субстратом переходного состояния [24].

Такая классификация предполагает, что специфичность фермента на стадиях связывания субстрата, с одной стороны, и его химического превращения — с другой, может существенно различаться. Иначе говоря, структурные элементы субстрата (например, нереагирующий фрагмент молекулы) могут играть различную роль во взаимодействии с ферментом (и в ускорении ферментативного процесса) на различных стадиях реакции [24]. Этот важнейший вывод теории субстратной специфичности имеет особое значение для создания аналогов переходного состояния и интерпретации их свойств. Пример необходимости учитывать данное обстоятельство (подробно рассмотренный, гл. III, 2) — неудачная попытка получения эффективного ингибитора путем простого механического сочетания отдельных функционально важных структурных фрагментов аналога специфического субстрата и соответствующего аналога переходного состояния.

* Цель настоящего обзора не состоит в подробном изложении теорий ферментативного катализа. Здесь рассматриваются лишь отдельные аспекты, имеющие непосредственное отношение к обсуждаемой теме. Подробнее с вопросами теории ферментативного катализа можно ознакомиться в монографиях [21, 31, 51—54].

По определению, аналоги переходного состояния — это устойчивые соединения, моделирующие переходное состояние субстрата на скорость-лимитирующей стадии ферментативной реакции (имеется в виду, естественно, химическая стадия). Очевидно, они должны связываться с ферментом более прочно, чем субстрат, поскольку уже в своем основном состоянии обязаны осуществлять взаимодействия, характерные для субстрата лишь в переходном состоянии [12, 24, 55]. Термодинамический цикл, суммирующий принципы данного подхода, представлен на схеме 2 [16, 56, 57].

Схема 2



Схема превращения субстрата в рамках концепции стабилизации ферментом переходного состояния реакции

Эта схема была модифицирована и применена к такому случаю катализа, когда в переходном состоянии имеется ковалентная связь между субстратом и ферментом [58]. Математическое решение цикла (схема 2) свидетельствует о том, что сродство субстрата в переходном состоянии к ферменту во столько раз превышает сродство самого субстрата, во сколько раз скорость ферментативной реакции выше скорости некатализуемой реакции, протекающей по тому же механизму. Так как обычные значения отношения констант скоростей ферментативной и некатализуемой реакций $k_e/k_n = 10^{10} - 10^{14}$ и величины константы диссоциации фермент-субстратного комплекса $K_s = 10^{-4}$ М, то константа диссоциации комплекса фермент — переходное состояние субстрата (K_t) должна достигать величины 10^{-14} М и ниже. Такого сродства не наблюдалось ни для одного из известных ингибиторов. Это расхождение между экспериментальными и теоретически предсказанными данными является следствием ограничений самой концепции стабилизации переходного состояния. Во-первых, ферментативный катализ обуславливается не только стабилизацией переходного состояния, но и рядом других факторов [52], т. е. само по себе химическое превращение субстрата далеко не всегда лимитирует скорость всего ферментативного процесса. В то же время в структуре аналога учесть все особенности катализа, в том числе вероятный перенос протона, пока не представляется возможным [53]. Во-вторых, само понятие «структура» переходного состояния — аппроксимация процесса. Как известно, при создании аналогов переходного состояния учитывается постулат Хэммонда, который гласит, что, если в ходе реакции образуется нестабильное высокоэнергетическое промежуточное соединение, то переходный комплекс будет близок к нему по структуре [59]. Таким образом, возможно создание лишь приблизительных аналогов переходного состояния, поскольку идеальное моделирование переходного состояния, т. е. по сути дела моделирование процесса образования и разрыва химических связей, стабильными структурами не представляется возможным.

Известно свыше 100 специфических ингибиторов как синтетического, так и природного происхождения (антибиотики, токсины), действие которых рассматривается по типу действия аналогов переходного состояния [60, 61]. В этой связи возникает вопрос отнесения того или иного ингибитора к аналогам переходного состояния. Необходимое, но недостаточное свойство, характерное для аналога переходного состояния, — низкая по сравнению со специфическим субстратом константа диссоциации его комплекса с ферментом [24]. Отмечается, однако, что само по себе прочное связывание ферментом ингибитора не может служить критерием отнесения его к аналогам переходного состояния, так как оно в ряде случаев может быть артефактом [21, 53].

Характерной чертой аналогов переходного состояния является то, что они, как правило, медленнее связываются с ферментом, чем специфиче-

ские субстраты или субстратоподобные ингибиторы (гл. III. 2) [62, 63] *. Предполагают, что такой характер ингибирования может быть обусловлен тем, что требуется определенное время для конформационной перестройки фермента, обеспечивающей эффективное связывание аналога переходного состояния. Так, рентгеноструктурный анализ показал, что если при связывании субстратов (дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата) кристаллы триозофосфатизомеразы практически остаются неизменными (сокращение составляет всего 1,5%), то в случае связывания аналога переходного состояния (2-фосфогликолевой кислоты) наблюдаются значительно большие изменения (5%) [16, 60].

Количественный критерий отнесения к аналогам переходного состояния был предложен для ингибиторов ферментов, специфичность которых проявляется в максимальных скоростях реакции, а не в наблюдаемом связывании субстрата. Согласно теории стабилизации переходного состояния, энергия связывания нереагирующего фрагмента молекулы субстрата, обуславливающая k_{cat} , должна проявляться в переходном состоянии, но не в фермент-субстратном комплексе [24, 53]. Таким образом, нереагирующий фрагмент молекулы субстрата, не влияющий на константу скорости некатализируемой реакции (k_n) и на связывание субстрата (K_s), для сохранения равенства, приведенного на схеме 2, должен в одинаковой мере увеличивать k_e и уменьшать K_t [16, 57]. Для ферментов, характеризующихся гидрофобным характером специфичности, в рамках экстракционного механизма катализа удалось оценить вклад каждого метиленового звена нереагирующего фрагмента молекулы во взаимодействие аналога переходного состояния с ферментом [24].

1.2.3. Мультисубстратные аналоги

Многие ферменты катализируют реакции с участием двух субстратов. Если кинетические исследования показывают, что реакция протекает через образование тройного комплекса фермента с двумя субстратами, то есть основания полагать, что в переходном состоянии субстраты связаны друг с другом. В таком случае ферментативное превращение обязательно включает стадию извлечения субстратов из разбавленного раствора и сближения их на активном центре [66]. Предполагают, что увеличение скорости реакции, обусловленное сближением двух субстратов в активном центре фермента, может составлять величину до 10^8 раз за счет выигрыша в энтропии по сравнению с соответствующей некатализируемой реакцией в растворе [53].

Очевидно, что устойчивые соединения, моделирующие гипотетический мультисубстратный комплекс столкновения (схема 1, б) благодаря наличию в их структуре связывающих детерминант обоих субстратов, должны обладать значительным сродством к ферменту [16, 66]. Поскольку речь идет о моделировании состояния субстратов, еще не подвергшихся химическому превращению, связывание идеального мультисубстратного аналога должно отражать вклад в катализ только чисто физических (энтропийных) факторов [16, 53].

1.2.4. Сочетанные субстраты

Термин «сочетанные (collected) субстраты» введен совсем недавно для описания специфических ингибиторов, которые в своей структуре содержат одновременно характерные элементы аналога субстрата в переходном

* Аналоги переходного состояния являются прочно связывающимися ингибиторами, т. е. такими, которые производят значительное ингибирование при концентрациях, соизмеримых с общей концентрацией фермента в эксперименте (1—5 μM). К тому же они являются медленно связывающимися ингибиторами, поскольку при концентрациях, которые вызывают заметное ингибирование, равновесие между ферментом, ингибитором и фермент-ингибиторным комплексом достигается не прежде, чем произойдет значительное превращение субстрата. Для описания специфического поведения ферментов в присутствии медленно, но прочно связывающихся ингибиторов используется кинетика, отличная от кинетики Михаэлиса — Ментен [1, 64, 65].

состоянии и мультисубстратного аналога [67, 68]. Как и в случае мультисубстратного аналога, благодаря аддитивности связывающих характеристик составных частей молекулы сочетанный субстрат (А—В), по-видимому, реализует преимущество в энергии связывания за счет той энтропии, которая затрачивается на ковалентное соединение молекул А и В, обладающих независимыми поступательными и вращательными степенями свободы [69]. Теоретический предел для сродства мультисубстратного аналога, как уже указывалось выше (см. I. 2.3), не превышает величины $K_1 = 10^{-8}$ М. Сочетанный субстрат имеет к тому же дополнительное преимущество в связывании, обусловленное структурным сходством с переходным состоянием.

Очевидно, ингибиторы указанного типа возможны для ферментов, катализирующих либо реакции с участием нескольких субстратов, либо реакции, ведущие к образованию нескольких продуктов (сочетанный субстрат для обратной реакции).

Подводя итог рассмотренному выше материалу, следует отметить, что в настоящее время в рамках существующих концепций ферментативного катализа предлагается моделирование трех возможных высокоактивированных (гипотетических!) состояний ферментативного превращения субстратов* с получением трех типов специфических ингибиторов: аналогов переходного состояния, мультисубстратных аналогов и сочетанных субстратов. Что же касается промежуточных химически реальных соединений, синтезируемых на ферменте, то для описания их аналогов, по определению, наиболее приемлем термин «стадийные ингибиторы».

II. Химические возможности создания специфических ингибиторов

II.1. Фосфорсодержащие соединения

Широкие возможности в создании специфических ингибиторов ферментов открывает химия фосфора, о чем свидетельствует значительное количество публикаций по фосфорсодержащим аналогам природных субстратов и их производным. Среди них представлены: 1) стабильные фосфонатные аналоги природных фосфатов, включая нуклеотиды, фосфолипиды и т. п., которые могут как ингибировать ферментативный процесс, так и проявлять субстратные свойства, отличные от свойств специфических субстратов; 2) фосфонатные аналоги карбоновых и аминокислот, которые при связывании в активном центре фермента могут реализовать дополнительные электростатические взаимодействия, обусловленные наличием в структуре модифицированного звена двух гидроксильных групп (эти соединения при взаимодействии с ферментами могут образовывать комплекс, имитирующий комплекс Михаэлиса, или же взаимодействовать с протетической группой активного центра); 3) стабильные фосфонатные аналоги ацилфосфатов типа мультисубстратных аналогов и стадийных ингибиторов.

С помощью тетраэдрического фосфора оказалось также возможным моделировать различные состояния карбоксильной функции в ферментативных реакциях ацильного переноса. При замене карбонильной группировки специфического субстрата на фосфорильную группу получены три типа стабильных аналогов: аналоги переходного состояния; соединения, действующие по типу сочетанных субстратов; соединения, которые при связывании на ферменте образуют ковалентный фермент-ингибиторный комплекс, моделирующий переходное состояние фермент-субстратного комплекса. Их создание основывается на том, что по геометрическим и электронным параметрам соединения, содержащие тетраэдрический фосфор, достаточно близко имитируют тетраэдрический аддукт, образующийся в ре-

* Необходимо подчеркнуть, что, в свою очередь, эффективность связывания специфических ингибиторов с ферментом, отражая вклад в катализ определенных факторов, является подчас чуть ли не единственным подтверждением положения той концепции, которая послужила основой для создания данного типа специфических ингибиторов.

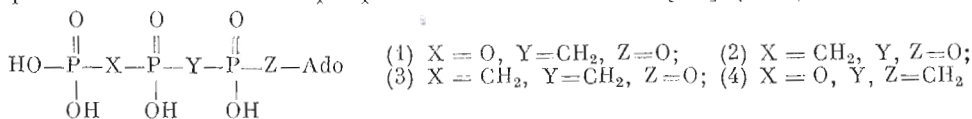
акции нуклеофильного замещения у карбоксильного атома углерода. Образование фермент-ингибиторного комплекса в случае использования данных аналогов могут определять следующие факторы: 1) дополнительная водородная связь, которую фосфорорганический аналог благодаря наличию в своей структуре гидроксильных групп может реализовать на ферменте; 2) координационная связь, которую вследствие своей сильно выраженной комплексообразующей способности ингибитор может образовывать в активном центре с существенным для катализа ионом металла; 3) ковалентная связь с нуклеофилом активного центра, образуемая благодаря фосфорилирующим свойствам фосфорсодержащего ингибитора.

Кроме того, на основе фосфорорганических соединений возможно моделирование переходного состояния сложноэфирной группы в реакции ацильного переноса и получение реакционноспособных веществ, обладающих субстратными свойствами.

III.1.1. Стабильные аналоги субстратов

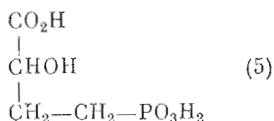
III.1.1a. Фосфонатные аналоги природных фосфатов

Нуклеотиды и другие высокоактивированные фосфаты являются важнейшими компонентами метаболизирующих клеток и включены во многие ферментативные превращения. Макроэргические фосфаты с химической точки зрения представляют собой либо ангидриды, либо сложные эфиры фосфорных кислот [70]. Сложноэфирная и ангидридная связи в этих соединениях легко гидролизуются. Возможно получение стабильных аналогов природных фосфатов на фосфонатной основе за счет замены атома кислорода на метиленовое звено [8, 28, 71]. Таким образом, были синтезированы все возможные фосфонатные аналоги АТФ [72] (1—4):



Получен также фосфонатный аналог P^1, P^4 -бис(5'-аденозил)тетрафосфата (Ар₄А) [73] вещества, играющего роль клеточного регулятора [74].

Известны фосфонатные аналоги ряда субстратов системы ферментов гликолиза. Например, фосфометильный аналог (5) 3-фосфо-*D*-глицерата



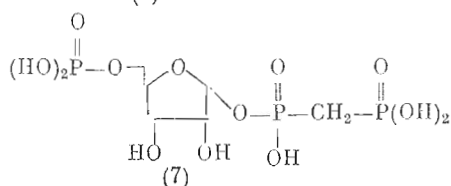
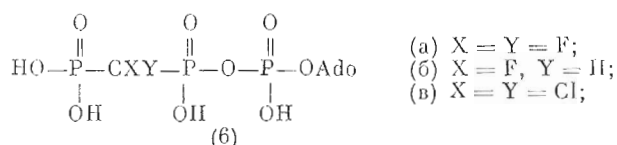
является конкурентным ингибитором фосфоглицератфосфомутазы (КФ 5.4.2.1) [75]. Аналогичный 1-фосфометильный аналог *D*-фруктозо-1,6-бисфосфата является хорошим ингибитором фруктозо-бисфосфатазы (КФ 3.1.3.11) [76].

Фосфонатные аналоги природных фосфатов включают только одну замену сложноэфирного или фосфоангидридного атома кислорода на метиленовое звено и, будучи изостеричными исходным соединениям, должны, по-видимому, связываться на ферменте подобно своим прототипам. В этой связи отмечается их возможная роль в изучении механизма действия соответствующих ферментов с помощью инструментальных методов анализа (ЯМР-спектроскопия) [75].

Однако фосфонатные аналоги связываются ферментами несколько хуже, чем природные субстраты. Очевидно, это обусловлено различием их структурных и электронных параметров [8, 28]. Установлено, что геометрия молекулы особенно изменяется в области модифицированного фрагмента (искажение углов и длин связей составляет около 13%), на геометрии остальной части молекулы фосфонатная замена сказывается мало (изменение 1—2%). Ухудшается также конформационная подвижность молекулы фосфонатного аналога по сравнению с фосфатным прототипом.

По-видимому, это затрудняет для фосфоната ту надлежащую ориентацию в активном центре фермента, которая predeterminedена для субстрата S_N2 -механизмом реакции фосфорильного переноса [8]. Кроме того, замена электроотрицательного атома кислорода на метиленовую группу приводит к перераспределению электронной плотности на фосфорильной группе, что изменяет физико-химические свойства молекулы, в частности величину pK_a . По сравнению с фосфатом фосфонат имеет большую основность [8, 28]. При pH 7 только 26% фосфоната существует в полностью ионизированном состоянии ($pK' 6,20$ и $pK'' 7,45$) [75]. Это обстоятельство ухудшает комплексообразующие свойства данных соединений, что, в свою очередь, находит отражение в понижении сродства их к металлзависимым ферментам [77].

В этой связи представляют интерес α -галогенфосфонаты, в особенности фторпроизводные, которые являются значительно более близкими по физико-химическим свойствам к фосфатным прототипам, чем обычные фосфонаты [8]. Предполагается, что α -галогенфосфонатные аналоги нуклеотидов типа (6) весьма перспективны как стабильные аналоги субстратов в ферментативных исследованиях [76, 79].



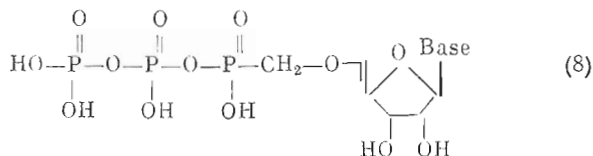
Фосфонатные аналоги природных фосфатов благодаря стабильности P—C-связи* проявляют ингибиторные свойства. Когда же замена не затрагивает реакционный центр молекулы, т. е. когда ферментативное превращение не требует переноса фосфонометильной группировки, фосфонатные аналоги, как было показано в случае аналогов АТФ и ряда субстратов системы ферментов гликолиза, способны проявлять субстратные свойства в ферментативных реакциях и своим участием модифицировать (замедлять) нормальный каталитический процесс [28, 72, 84–86]. При этом возможно образование соответствующих фосфонатных аналогов продуктов. Так, 5-фосфо- α -D-рибозил-1-метилендифосфонат (7) был синтезирован в реакции, катализируемой рибозофосфатпирофосфокиназой (КФ 2.7.6.1), при использовании в качестве субстрата вещества (4) [80]. В свою очередь, соединение (7) оказалось донором 5-фосфорибозильного остатка в реакциях, катализируемых рядом никотинамид-фосфорибозилтрансфераз (КФ 2.4.2.12) различного происхождения, причем наибольшее сродство соединения (7) отмечено в отношении ферментов из животных источников. Этот пример свидетельствует о том, что фосфонатные аналоги могут служить зондами для исследования субстратной специфичности гомологичных ферментов. Кроме того, была показана ценность соединения (7) в кинетических исследованиях никотинамид-фосфорибозилтрансфераз, потому что единственный продукт его химического гидролиза (ме-

* Предполагают, что устойчивость фосфонатов к гидролизу обусловлена меньшей электроотрицательностью метиленовой группировки по сравнению с заменяемым кислородом, что приводит к неспособности этой группировки как акцентировать пару электронов, так и занимать аксиальное положение в пентавалентном интермедiate, возникающем по механизму реакции нуклеофильного замещения у атома фосфора [80].

Обсуждая химию фосфонатных соединений, следует упомянуть о том, что известно соединение, CH_2-P -связь в котором лабильна и подвергается гидролизу. Это фосфоноацетальдегид, образующийся при биологической утилизации 2-аминоэтилфосфоновой кислоты [81–83].

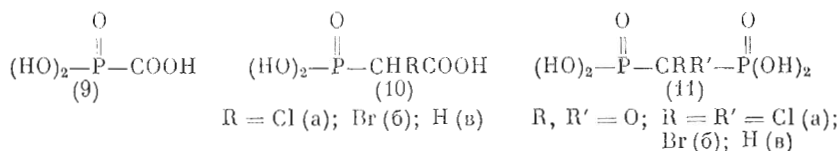
тилендифосфоная кислота) идентичен нуклеотидному продукту ферментативного превращения [80].

Недавно были химически получены дифосфонилметилпроизводные рибонуклеозидов (соединения типа 8)



в которых остаток фосфорной кислоты в α -положении замещен остатком метанфосфоновой кислоты. Введение CH_2 -группы между нуклеозидом и остатком фосфорной кислоты вносит в молекулу элемент большей конформационной подвижности, из чего следует возможность более легкого приспособления конформации молекулы к требованиям места связывания на ферменте. В то же время в этих аналогах увеличено расстояние между P^{α} и $\text{C}5'$. Интересным свойством этих соединений является их устойчивость в щелочной среде и к действию нуклеаз. Данные соединения ингибировали РНК-полимеразную реакцию со значением $K_i \sim 10^{-5}$ М. Из полученных результатов вытекает, что свойства фосфора в α -положении соединения (8) значительно изменены. В реакции, катализируемой уридинкиназой (КФ 2.7.1.48), аналог (8) может служить донором фосфатной группы, но низкое значение V свидетельствует о том, что изменение стерических параметров молекулы и электронного состояния β - и γ -атомов фосфора сказывается на каталитическом действии фермента [87].

Помимо исследований *in vivo* фосфонатные аналоги природных фосфатов могут найти применение в фармакологической практике [88–90]. Например, фосфонатные аналоги (9)–(11) пирофосфата



подавляют репликацию *in vitro* и *in vivo* ряда ДНК-содержащих вирусов, включая вирусы гриппа, цитомегаловируса, герпеса и др. [90]. Механизм действия таких препаратов основан на неконкурентном ингибировании индукции вирусной ДНК-полимеразы за счет взаимодействия с участком фермента, связывающим пирофосфат. Есть основания полагать, что при связывании с полимеразой эти соединения координируют с существенным для катализа ионом цинка и препятствуют освобождению пирофосфата на стадии элонгации полинуклеотидной цепи [90].

С точки зрения противовирусного действия фосфонатных аналогов пирофосфата представляет также интерес обнаруженная у метилдифосфоновой (11в) и фосфонуксусной (10в) кислот способность участвовать в реакции пирофосфоролита РНК, катализируемой РНК-полимеразой (КФ 2.7.7.6) [91]. При этом в первом случае показано образование аналогов трифосфатов нуклеотидов типа (2), приведенного выше, а во втором — нуклеозидмонофосфатов.

И.1.16. Фосфонатные аналоги карбоновых и аминокислот

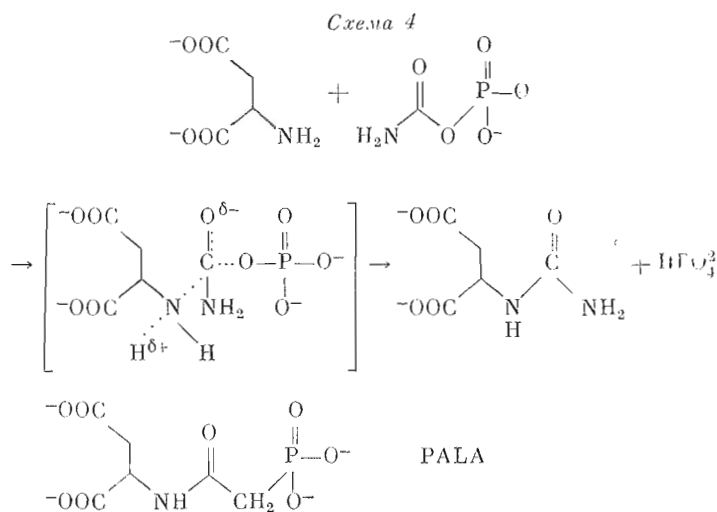
В литературе широко представлены фосфонатные аналоги аминокислот и карбоновых кислот, которые были получены путем замещения карбоксильной функции на фосфонатную группировку [92–97]. Очевидно, что такая замена ведет к значительному изменению в структуре модифицированного фрагмента по сравнению с прототипом. Известно, что карбоксильная группа отличается от фосфонатной как по геометрии (тригональная и тетраэдрическая соответственно), так и по распределению электронной плотности. Тем не менее фосфонатные аналоги карбоновых кислот оказались эффективными ингибиторами ряда декарбоксилаз

пильной группы соединение (16), по-видимому, реагирует в активном центре фермента с тиаминпирофосфатом, образуя фосфонатный аналог (18) α -лактилтиаминпирофосфата [99, 100].

II.1.2. Аналоги активированных интермедиатов ферментативных превращений карбоновых и аминокислот

II.1.2а. Стабильные фосфонатные аналоги активированных интермедиатов ацилфосфатного типа

Мультисубстратные аналоги. Стабильная фосфонатная основа оказалась приемлемой для создания мультисубстратных аналогов. Для аспарат-карбамоилтрансферазы (КФ 2.1.3.2), ключевого фермента биосинтеза пиримидинов, был синтезирован эффективный ингибитор PALA [101, 102], значения K_i которого при взаимодействии с ферментами из разных источников варьируют от 10^{-8} до 10^{-9} М [101]. PALA связывается с ферментом приблизительно в 1000 раз прочнее, чем карбамоиласпарат, причем взаимодействует одновременно с карбамоилфосфат- и *L*-аспаратсвязывающими участками фермента. Ранее полагали, что PALA действует по типу аналога переходного состояния в транскарбамоилазной реакции. Однако детальное рассмотрение структуры PALA свидетельствует о том, что данный ингибитор является скорее мультисубстратным аналогом, поскольку моделирует сближение субстратов в ферментативной реакции до момента их химического взаимодействия (схема 4).



Механизм реакции, катализируемой аспарат-карбамоилтрансферазой, и структура PALA

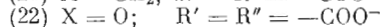
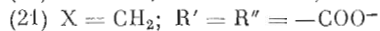
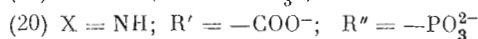
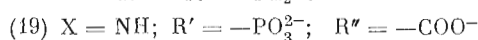
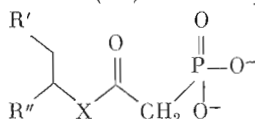
PALA находит широчайшее применение в исследованиях механизма каталитического действия фермента и его аллостерической регуляции [10, 102—104]. Один из подходов к кинетическому изучению гомотропных эффектов в аспарат-карбамоилтрансферазе заключается, например, в анализе явления активации, вызываемой низкими концентрациями ингибитора [105]. Как было обнаружено, PALA увеличивает скорость прямой реакции в 3 раза, а обратной — в 15 раз. Очевидно, связывание ингибитора с активным центром одной из субъединиц повышает каталитическую активность соседних субъединиц, так что молекулы фермента с одним или несколькими блокированными центрами превращают субстраты с более высокой скоростью, чем молекулы фермента с полным набором активных центров.

Помимо исследований *in vitro* PALA используется также в химиотерапевтической практике [3]. Блокируя ключевую стадию биосинтеза пиримидинов, PALA эффективно подавляет пролиферацию некоторых видов медленно растущих солидных опухолей [106]. Данные по противоопухолевой активности PALA представлены в обзоре [3]. Отмечается, что, поскольку PALA представляет собой производное фосфонукусусной кислоты,

при рассмотрении механизма действия этого ингибитора *in vivo* следует учитывать биологический эффект самой кислоты, являющейся одним из возможных метаболитов PALA [3].

Принимая во внимание вышеизложенное, можно понять интерес к получению новых аналогов на основе структуры PALA. Например, синтезированы фосфонатные аналоги ингибитора типа (19) и (20) с заменой карбоксильной функции на фосфонатную группировку. Ожидается, что подобные соединения будут лучше транспортироваться через биологические мембраны, чем PALA [107].

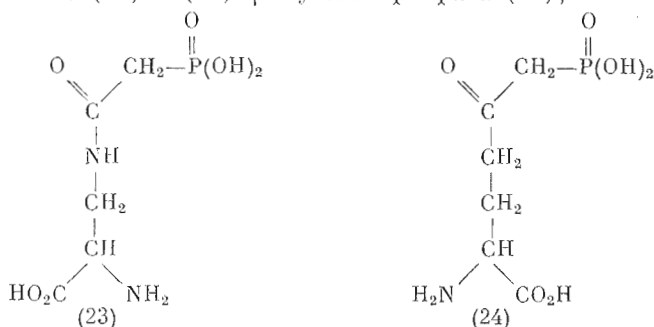
Известны также метиленовый (21) и кислородный (22) аналоги PALA



в которых амидный азот заменялся соответственно на метиленовое звено и кислород. Соединение (21) связывалось с ферментом примерно в 7 раз, а (22) — в 100 раз хуже, чем PALA. Такое уменьшение сродства данных ингибиторов объясняют увеличением рK_a их карбонильного кислорода (в частности, рK_a фосфоацетатного эфира (22) составляет -4,6, в то время как для PALA рK_a = -3,3). Это ухудшает их способность к протонированию, а в соответствии с механизмом ферментативной реакции, приведенным на схеме 4, требуется, чтобы переходное состояние включало нейтрализацию парциального отрицательного заряда, возникающего на кислороде, возможно, за счет взаимодействия с протоном некоего кислотного остатка каталитического центра [108].

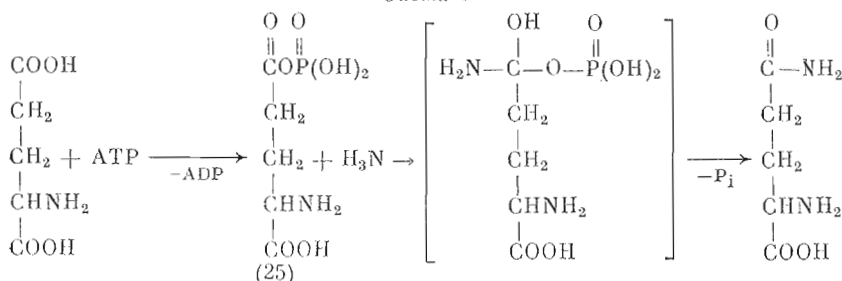
Стадийные ингибиторы. Ферментативная активация карбоновых кислот в реакциях биосинтеза белка, амидов, жирных кислот и др., сопряженная с гидролизом пиррофосфатной связи в молекуле АТФ, как правило, протекает через образование промежуточных активированных соединений ацилфосфатного типа — ацилфосфатов или ациладенилатов.

Фосфонатная модификация была использована при получении стабильных аналогов (23) и (24) γ-глутамилфосфата (25),



интермедиата в реакции, катализируемой глутаминсинтетазой (КФ 6.3.1.2) (схема 5) [109]:

Схема 5

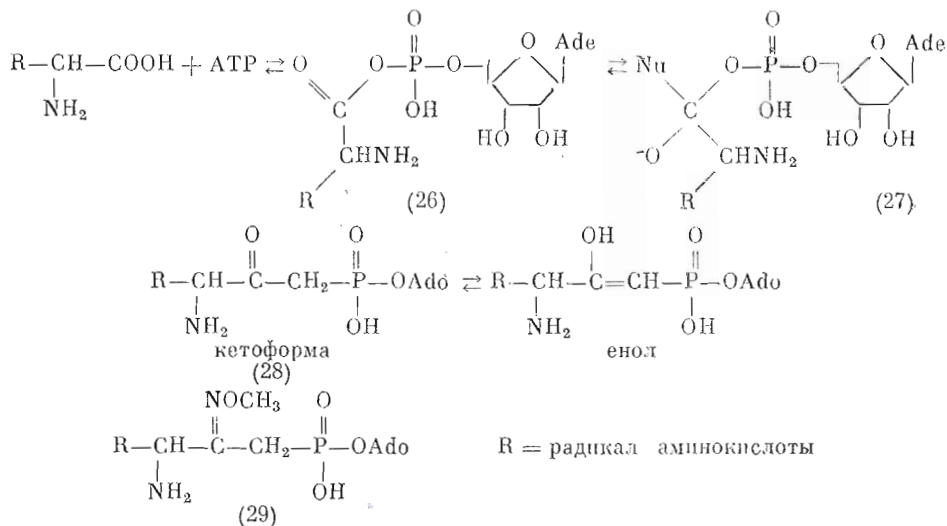


Механизм реакции, катализируемой глутаминсинтетазой

При изучении взаимодействия аналогов (23) и (24) с глутаминсинтетазой из различных источников оказалось, что фермент из *E. coli* связывает эти соединения не прочнее, чем субстрат — *L*-глутаминовую кислоту, в то время как с ферментом из листьев гороха связывание соединений (23) и (24) на два порядка эффективнее [110].

Реакция аминоацилирования тРНК протекает, по-видимому, через промежуточное образование 5'-аминоацетиладенилата (26) (схема 6).

Схема 6

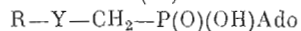
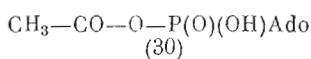


Механизм реакции аминоацилирования тРНК и аналоги интермедиата (26)

При замене лабильной фосфоангидридной связи в молекуле (26) на устойчивую C—P-связь был получен ряд стабильных β-кетофосфонатных аналогов типа (28) [111, 112].

Одно из преимуществ фосфонатной модификации состоит в том, что на ее основе возможно варьировать структуру звена, соответствующего реагирующему фрагменту молекулы (26). По этому принципу был получен *O*-метилкосим (29) [113]. В отличие от соединения типа (28), которое за счет кетоеполюной таутомерии может существовать в виде двух структурных изомеров, различающихся по расположению ацильного фрагмента молекулы, в соединении (29) положение двойной связи строго фиксировано, и его геометрия соответствует планарной тригональной геометрии кетоформы (28).

Еще более широко свойства фосфонатной модификации были использованы при моделировании структуры 5'-ацетиладенилата (30), промежуточного соединения в реакции, катализируемой ацетил-CoA-синтетазой (КФ 6.2.1.1) [113]:



	R	Y
(31)	CH ₃	CO
(32)	CH ₃	C(NOCH ₃)
(33)	OH	CO
(34)	CH ₃ O	CO
(35)	H	CO

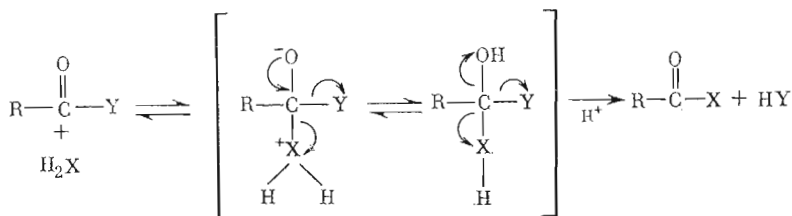
Из многообразия превращений, свойственных подобным структурам, наибольший интерес в процессе исследования ферментативной реакции, по-видимому, представляет взаимодействие карбонильной группы с функциональными группами активного центра (образование полуацеталей, карбиноламинов, азометинов), а также с меркаптогруппой CoA (с образованием полуацетала, близкого по строению к возможному промежуточному соединению ферментативной реакции) или с гидроксилом молекулы

воды (с образованием гидратированной формы). Однако такие предположения о механизме взаимодействия ингибиторов с ферментом требуют дальнейшей проверки.

Рассмотренные выше фосфонатные аналоги 5'-ациладенилатов проявляли ингибиторную активность в реакциях, катализуемых соответствующими синтетазами. Однако если в случае ацетил-СоА-синтетазы родство полученных соединений (31)—(35) было таким же, как и для ацетил-аденилата, или даже несколько выше, то аналоги (28) и (29) 5'-валиладенилата связывались с валил-тРНК-синтетазой (КФ 6.1.1.9) на порядки слабее, чем прототип (26) [113].

II.1.26. Аналоги переходного состояния

Установлено, что перенос ацильной группы как в обычных неэнзиматических реакциях, так и в ферментативных протекает по механизму нуклеофильного замещения у sp^2 -гибридизованного атома углерода через образование тетраэдрического интермедиата [52, 114]. Есть данные, позволяющие считать, что переходное состояние для реакции ацильного переноса близко к тетраэдрическому интермедиату и по энергетическим, и по электронным параметрам [115, 116] (схема 7):



R — углеводородный остаток, Y — уходящая группа, X — акцептор ацильной группы.

Схема 7. Механизм реакции ацильного переноса

Для моделирования переходного состояния в ферментативных превращениях карбоксильной группы было предложено использовать фосфорсодержащие соединения, имеющие тетраэдрическую геометрию в области модифицированного фрагмента [117].

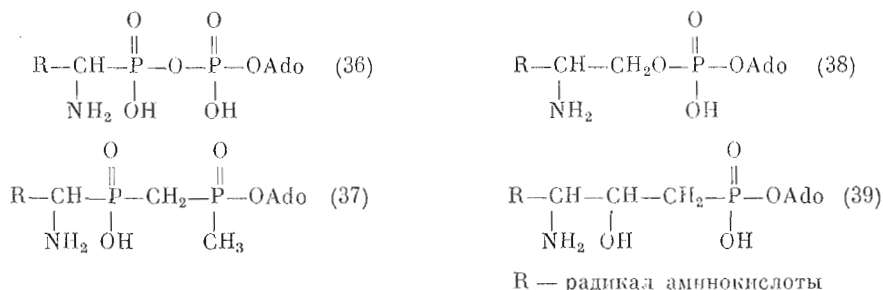
В реакции, катализируемой аминоксил-тРНК-синтетазами (схема 6), дальнейшее превращение образующегося промежуточного 5'-аминоациладенилата (26), очевидно, включает в себя стадию образования тетраэдрического продукта присоединения (27), причем в зависимости от механизма действия фермента нуклеофилом может быть определенная группа фермента или тРНК (или вода).

В качестве аналогов переходного состояния данной ферментативной реакции (в случае осуществления последнего из указанных механизмов) были синтезированы 5'-аминофосфиладенилаты (36) [117, 118]. Они оказались сильными и специфическими ингибиторами соответствующих ферментов, конкурентными по отношению к обоим субстратам, аминокислоте и АТР; при этом обнаружена корреляция между родством ингибитора и строением его аминофосфометильной части.

Следует отметить, что несмотря на то, что пиродифосфатная связь в соединении (36) лабильна и достаточно реакционноспособна, не было установлено катализируемых синтетазами реакций ферментативного гидролиза Р—О—Р-связи, аминофосфонирования групп активного центра, взаимодействия с неорганическим пиродифосфатом с образованием АТР или аминофосфонирования тРНК [118].

Устойчивый фосфорорганический аналог (37) переходного состояния субстрата в реакции аминокислотирования получен на пиродифосфонатной основе [119].

Для моделирования тетраэдрического интермедиата (27) были использованы также соединения, содержащие тетраэдрический атом углерода в области, соответствующей реагирующему фрагменту молекулы 5'-аминоациладенилата (26). Это аминоалкиловый эфир АМР типа (38) [120—122] и оксиметиленовый аналог (39) [113].



При анализе сродства вышеприведенных ингибиторов (28, 29, 36—39) к ферменту обращает на себя внимание тот факт, что соединение (39) связывалось на два порядка эффективнее, чем соединения (28) и (29), имеющие тригональную группу в β-положении к фосфору нуклеотида [113]. Высокая эффективность оксиметиленового аналога (39) ($K_1=4,7 \cdot 10^{-7}$ М) в случае взаимодействия с валил-тРНК-синтетазой хорошо согласуется с сильным ингибирующим действием смешанного ангидрида аминокислотных кислот и АМР (36) (K_1 порядка 10^{-7} М) [118], а также аминоалкилового эфира АМР (38) (K_1 около 10^{-8} М) [111]. Эти данные в совокупности свидетельствуют о стабилизации ферментом тетраэдрического аддукта в ходе ферментативной реакции [113].

Следует отметить, что у аминоалкиловых эфиров АМР (соединения типа (38)) обнаружена антибактериальная и противоопухолевая активности [120—122].

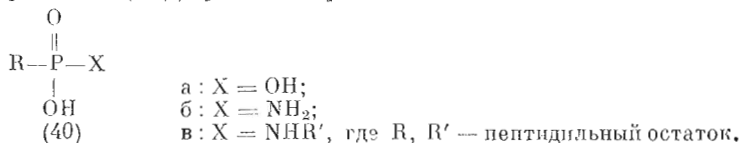
Аналогичные ингибиторы известны для ацетил-СоА-синтетазы [113]. Кроме того, для этого фермента получен потенциально реакционноспособный фосфонатный аналог, содержащий хлор в β-положении к фосфору нуклеотида. В противоположность аналогам 5'-валиладенилата аналог 5'-ацетиладенилата с тетраэдрической геометрией в области, соответствующей участвующему в реакции фрагменту молекулы, действовали на фермент примерно так же, как и аналоги с тригональной группировкой в β-положении к атому фосфора нуклеотида. Это свидетельствует об отсутствии предпочтительности тетраэдрического промежуточного соединения на стадии ферментативной реакции, непосредственно предшествующей образованию ацетил-СоА.

Таким образом, при помощи серии аналогов 5'-ациладенилатов было показано, что специфичность ферментов, катализирующих химически однотипные реакции ацильного переноса, к промежуточным состояниям субстрата на отдельных стадиях реакции может быть различной [113].

Важнейшей группой ферментов, катализирующих превращения по механизму реакции ацильного переноса, являются пептидгидролазы, представляющие часть обширного класса амидогидролаз [31]. Как известно, эти ферменты в зависимости от природы группировки, существенной для катализа, делятся на сериновые, тиоловые, карбоксильные или металл-содержащие амидогидролазы [31]. Для каждой группы амидогидролаз известны фосфорорганические ингибиторы, которые реализуют специфическое связывание в активном центре соответственно особенностям отдельных ферментов рассматриваемой группы. Среди таких ингибиторов известны аналоги переходного состояния, сочетанные субстраты и аналоги, образующие ковалентный фермент-ингибиторный комплекс, моделирующий фермент-субстратный комплекс в переходном состоянии.

На основе фосфорорганических соединений получены эффективные ингибиторы Zn^{2+} -зависимых амидогидролаз. Это фосфонатные аналоги аминокислот, их амидов, пептидов, в структуре которых модифицируется

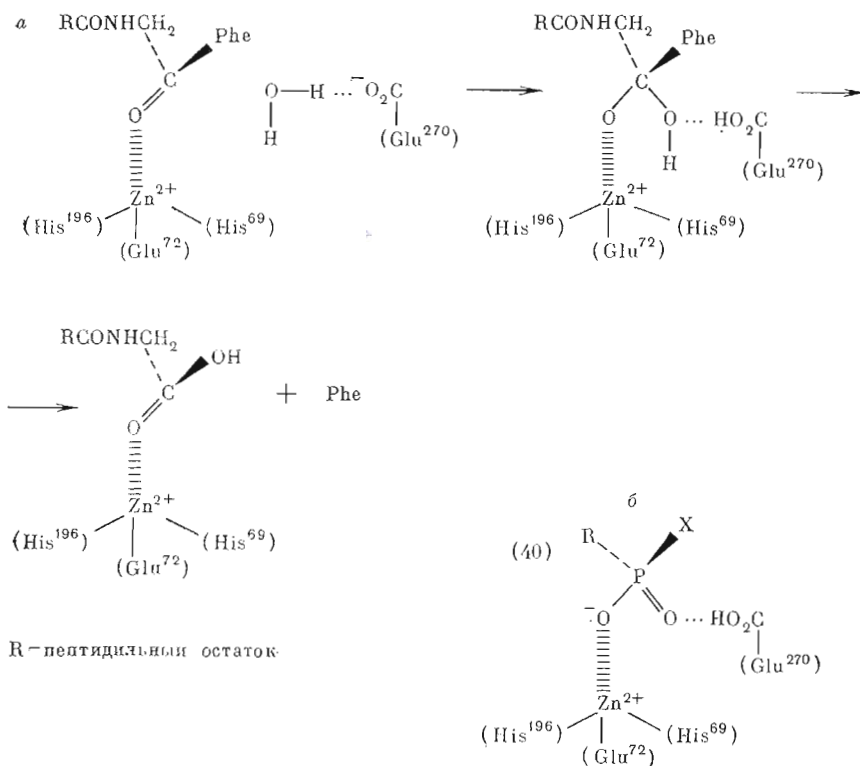
либо концевая карбоксильная группа, либо амидная (пептидная) связь (структуры типа (40)) [123—128]:



Фосфоамидсодержащие аналоги пептидов являются мощными ингибиторами карбоксипептидазы А (КФ 3.4.12.2) [123], термолизина (КФ 3.4.24.4) [126], дипептидилкарбоксипептидазы (КФ 3.4.15.1), энкефалиназы (КФ 3.4.24.11) [129]. При этом синтезированные ингибиторы могут утратить некоторые свойства, присущие прототипу. Так, у аналога энкефалина, содержащего фосфоамидатную группировку, опиоидная активность, свойственная прототипу, не была обнаружена [129].

В соответствии с механизмом реакции для Zn^{2+} -зависимых амидогидролаз, который предполагает прямой гидролиз субстрата без промежуточного образования ацилфермента* с включением электрофильного катализа ионом металла (схема 8), соединения типа (40), связываясь с фер-

Схема 8



Механизм реакции, катализируемой Zn^{2+} -зависимыми амидогидролазами (а), и связывание фосфорорганического ингибитора типа (40) в активном центре (б). Нумерация аминокислотных остатков соответствует карбоксипептидазе А

ментом, по-видимому, имитируют тетраэдрический интермедиат, образующийся в активном центре фермента в результате атаки молекулой воды по карбонильному углероду расщепляемой связи.

Замена тригональной карбоксамидной группировки в молекуле пептида на тетраэдрический амидофосфинильный остаток в аналогах (40 б, в), очевидно, ведет к значительному изменению в структуре молекулы: уменьшаются углы связей, от 120° для $\text{C}-\text{C}-\text{N}$ до 109° для $\text{C}-\text{P}-\text{N}$;

* Недавно появилась работа, в которой получено прямое доказательство образования смешанного ангидрида (с участием γ -карбоксильной группы Glu²⁷⁰) как ацилферментного интермедиата в реакции гидролиза сложноэфирных и пептидных связей, катализируемой карбоксипептидазой А [130].

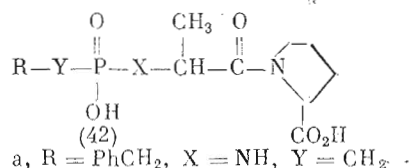
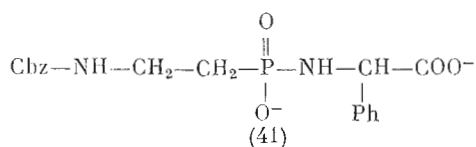
несколько удлиняются сами связи, к тому же аналог и прототип характеризуются различным распределением электронной плотности в области модифицированной группировки. Вследствие одинарного характера P—N-связи предполагают, что молекула аналога более конформационно подвижна в сравнении с прототипом. Возможно, что фосфамидные аналоги связываются на белке в конформации, несколько отличной от конформации прототипа, и при этом могут реализовать другую систему водородных связей. Предполагают, что это обстоятельство следует учитывать при использовании фосфамидных аналогов коротких пептидов в различных биологических исследованиях [129].

Что же касается связывания таких аналогов с ферментами, то данные рентгеноструктурных исследований комплекса термолитина с природным ингибитором фосфорамидоном ($K_1=2,8 \cdot 10^{-8}$ М) свидетельствуют, что фосфамидная связь ингибитора занимает положение расщепляемой амидной связи специфического субстрата, причем фосфорильный атом кислорода непосредственно связывается с Zn^{2+} без участия молекулы воды [131]. Предполагают, что надлежащую для этого взаимодействия ориентацию облегчает возможность вращения вокруг одинарной P—N-связи [127].

Значения констант ингибирования для соединений типа (40) варьируют в пределах 10^{-6} — 10^{-9} М. Устойчивость фосфамидных аналогов дипептидов к ферментативному гидролизу объясняют, во-первых, тем, что атака этих соединений молекулой воды по атому фосфора в соответствии с $S_N 2$ -механизмом нуклеофильного замещения, вероятно, невыгодна по стерическим и электронным параметрам, а во-вторых, тем, что известное для раствора кислотно-катализируемое расщепление P—N-связи по $S_N 1$ -механизму на ферменте неосуществимо [127].

Прочность комплекса фосфорорганических ингибиторов (40) с Zn^{2+} -зависимыми амидогидролазами обусловлена прежде всего легкостью образования координационной связи между остатком фосфоновой кислоты и ионом Zn^{2+} . Подтверждением этому является тот факт, что соответствующий этиловый эфир, неспособный к комплексообразованию с металлами, имеет сродство к ферменту приблизительно в 2000 раз меньше, чем кислота (40a) [124].

Значительная роль в образовании комплекса между соединениями типа (40) и ферментом отводится также структуре нереагирующего фрагмента молекулы. В случае карбоксипептидазы А важным фактором, например, является связывание фенильного кольца молекулы ингибитора (41)



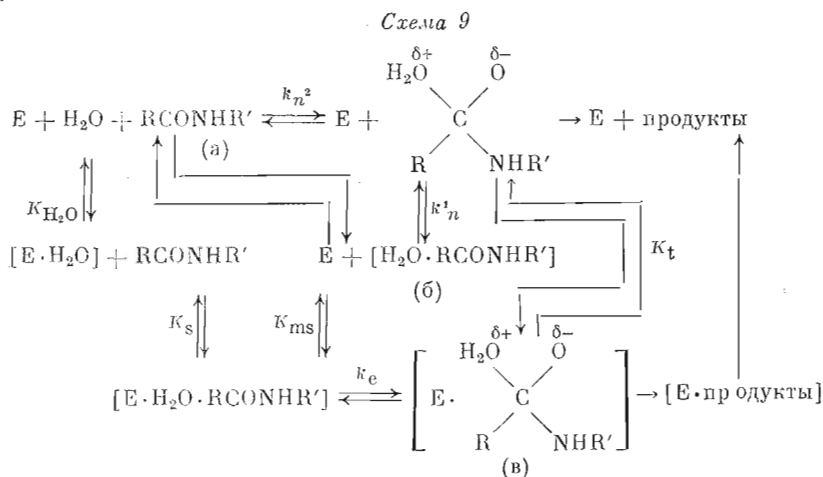
в гидрофобном кармане активного центра [123].

Для дипептидилкарбоксипептидазы (КФ 3.4.15.1) было проведено детальное изучение влияния структуры фосфамидных ингибиторов на их эффективность [128]. Было показано, что при сохранении остатка N-пропионилпролина, существенного для связывания (структура (42)), на эффективность ингибирования сильно влияет также природа фрагментов R, Y и X. Наилучшее связывание достигается в случае соединения (42a) ($I_{50}=7 \cdot 10^{-9}$ М) [128]. Любое изменение в группе R=PhCH₂ уменьшает активность ингибитора, по-видимому, вследствие неоптимального взаимодействия бокового радикала с S_1 -подцентром связывания на ферменте. Замещение CH₂(Y) на кислород приводит к получению значительно менее эффективных ингибиторов, но, почему фосфонатная структура предпочтительнее для связывания, чем фосфатная, не установлено. Соединения (42) с X=O в меньшей степени проявляют ингибиторную активность, чем ингибиторы с X=NH, и, по всей вероятности, не являются аналогами

переходного состояния. Разумное объяснение этому вытекает из того обстоятельства, что дипептидилкарбоксипептидазе в меньшей степени свойственна эстеразная активность, чем пептидазная, т. е. фермент гидролизует эфиры с меньшей скоростью, чем пептиды, хотя и связывает субстраты обоих классов приблизительно одинаково. Таким образом, можно предполагать, что переходное состояние субстрата в реакции гидролиза эфиров стабилизировано ферментом менее, чем для реакции гидролиза амидов. Это подтверждают данные рентгеноструктурного анализа, которые свидетельствуют, что в случае использования фосфатов ($X=O$) в качестве ингибиторов отсутствует дополнительная водородная связь, реализуемая между фосфамидным фрагментом структуры (42a), $X=NH$ и карбонильным кислородом Ala^{113} в молекуле фермента [128]. В то же время отмечено, что ферменты не проявляют избирательности к атому кислорода фосфорильной группировки, что допускает его замену в молекуле ингибитора, например, на атом серы [129].

Критерием отнесения фосфамидных ингибиторов Zn^{2+} -зависимых протеиназ к аналогам переходного состояния послужило то обстоятельство, что в ряду ингибиторов термолизина при изменении той части структуры, которая соответствует нереагирующему фрагменту молекулы субстрата, была установлена прямая корреляция между K_i и K_m/k_{cat} [126].

Заранее можно было предполагать, что рассматриваемые ингибиторы могут имитировать субстрат в трех его состояниях, возможных при фермент-субстратных взаимодействиях: а) субстрат (пептид) в его основном состоянии; б) мультисубстратный комплекс (пептид + вода, сближенные в активном центре на расстояние длины ковалентной связи); в) субстрат в переходном состоянии (схема 9).



Цикл возможных состояний субстрата в реакции гидролиза пептидной связи металлзависимыми протеиназами

Анализ взаимодействия ингибиторов с ферментами и величины K_i свидетельствуют о том, что соединения типа (40) не являются субстратоподобными ингибиторами, а также бисубстратными аналогами, поскольку из математической обработки процесса, представленного на схеме 9, для последних выводится зависимость их констант ингибирования только лишь от значений K_s для субстратов. В свою очередь, соединения (40), которые являются аналогами переходного состояния, связываются с ферментами более прочно, чем мультисубстратные аналоги, в той степени, в которой стадия химического превращения осуществляется быстрее в активном центре фермента, чем в гипотетическом бисубстратном комплексе столкновения (б) [126].

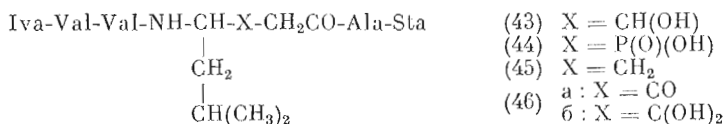
Исходя из вышесказанного, на наш взгляд, более справедливо было бы отнести соединения типа (40) к сочетанным субстратам. Однако в литературе существует мнение, что модифицированные пептиды (40) с тетраэдрическим фосфором и ионизированной Р—О-группировкой в своем

основном состоянии могут связываться в активном центре Zn^{2+} -зависимых амидогидролаз с образованием комплекса, который аналогичен фермент-субстратному комплексу в его переходном состоянии [126].

II.1.2в. Сочетанные субстраты

Для карбоксипептидазы А известен специфический ингибитор, который действует по типу сочетанного субстрата. Это фосфонатный аналог бисубстратного ингибитора 2-бензилянтарной кислоты (обсуждается в гл. III. 3.2) — 2-бензил-3-фосфонопропионовая кислота, $K_i=2,2 \cdot 10^{-7}$ М [132]. Данное соединение одновременно сочетает структурные характеристики бисубстратного аналога и аналога переходного состояния с тетраэдрической геометрией атома фосфора, имитирующего тетраэдрически гибридизованный атом углерода, образующийся при нуклеофильной атаке карбонильной группировки специфического субстрата.

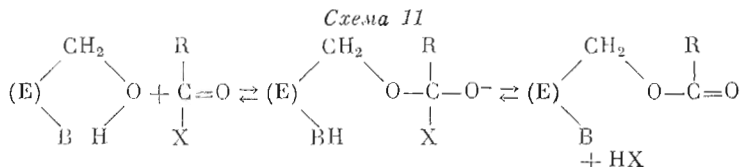
Для ингибирования карбоксильных амидогидролаз, как и Zn^{2+} -зависимых, эффективным оказалось использование фосфорорганических соединений. Был синтезирован фосфинатный аналог аминокислоты статины, $(CH_3)_2-CHCH_2-CH(NH_2)-CH(OH)-COOH$ (Sta), и показано, что введение его в соответствующую олигопептидную последовательность природного ингибитора пепстатина (43) приводит к созданию очень прочно и медленно связывающегося с пепсином (КФ 3.4.23.1) ингибитора (44):



K_i для более активного диастереомера менее $7 \cdot 10^{-11}$ М, период его связывания τ_b 115 мкс; K_i для другого диастереомера составляет $2 \cdot 10^{-7}$ М. Столь значительная разница в средстве диастереомеров свидетельствует о стереоспецифичности связывания соединения (44) в активном центре [133]. Высокое средство фосфинатного ингибитора (44) к ферменту объясняют не только тем, что при связывании в активном центре он, реализуя дополнительную водородную связь с карбоксильной группой активного центра, имитирует тетраэдрический интермедиат, образующийся в реакции ферментативного гидролиза пептидной связи. Но и в дополнение в структуре ингибитора учтен фактор сближения субстратов (пептида и молекулы воды) на активном центре фермента в ходе ферментативной реакции [134]. Этот вывод сделан на основании данных по связыванию пепстатина (43), для которого оказалось невозможным полностью объяснить его высокое средство к ферменту ($K_i=4,6 \cdot 10^{-11}$ М) только геометрическим подобием его структуры тетраэдрическому интермедиату, поскольку соответствующий дезоксианалог пепстатина (45), также имеющий тетраэдрическую геометрию при C-3, в 4000 раз менее эффективен [134]. Было предположено, что в случае карбоксильных протеиназ основной вклад в энергию взаимодействия ингибитора с ферментом вносит эффект вытеснения из активного центра в соответствии с экстракционным механизмом молекул воды [135]. Разница между соединением (43) и его дезоксианалогом (45) состоит в том, что первый вытесняет из активного центра в растворитель дополнительную молекулу воды, связывающуюся двумя каталитическими остатками аспарагиновой кислоты (схема 10). Выигрыш в энтропии при этом составляет 10–16 э.е., что соответствует 3–5 ккал энергии связывания, и это количественно объясняет наблюдаемую разницу в константах диссоциации соответствующих фермент-ингибиторных комплексов [134]. В приведенную схему хорошо укладывается действие ряда других аналогов пепстатина, включая его кетоаналог (46) [134]. Все это в совокупности позволило предположить, что пепстатин (43) является стабильным аналогом одновременно двух субстратов реакции гидролиза амидной связи: пептидной цепи и связанной на ферменте воды.

II.1.2г. Соединения, связывающиеся на ферменте в ковалентный фермент-ингибиторный комплекс, моделирующий переходное состояние фермент-субстратного комплекса

Сериновые и (или тиоловые) протеиназы и эстеразы катализируют реакции ацильного переноса через образование промежуточного эфира (или тиоэфира) с каталитическим остатком серина (или цистеина) (схема 11).



B — основная группировка активного центра, R, X — фрагменты молекулы специфического субстрата.

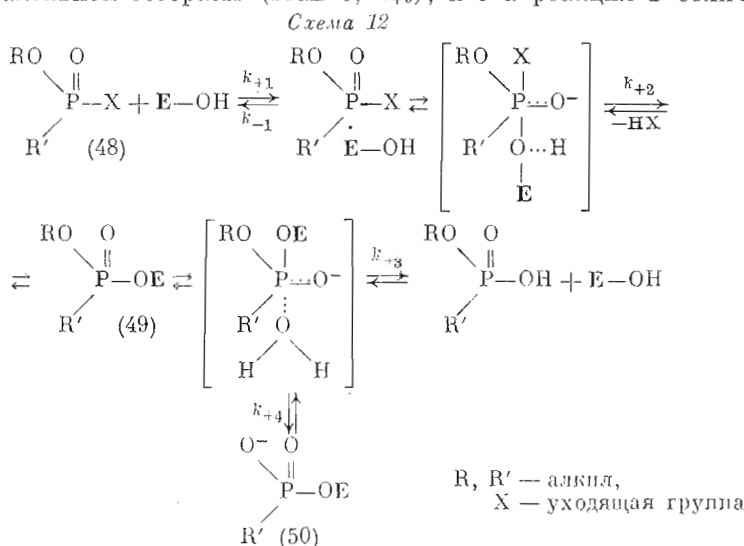
Механизм реакций ацилирования и деацилирования сериновых гидролаз с участием основной группировки активного центра

Переходное состояние субстрата в реакции ацилирования или деацилирования, вероятно, близко к тетраэдрическому интермедиату (47), образуемому в ходе ферментативной реакции [116].

Для сериновых гидролаз классическими необратимыми ингибиторами являются фосфорилирующие реагенты [136]. Установлено, что в ацилировании и фосфорилировании участвует одна и та же гидроксильная группа определенного остатка серина [20] (занимающая, как было показано, 195-е положение в молекуле трипсина). Реакция фосфорилирования и дефосфорилирования фермента (схема 12) протекает через стадии, аналогичные стадиям гидролиза специфического субстрата, которые, однако, характеризуются другими константами скоростей [137].

На схеме представлены две устойчивые тетраэдрические структуры, которые могли бы моделировать переходное состояние субстрата в реакции гидролиза ацилфермента. Это интактный ингибитор (48) и фосфорилированный фермент (49). Как показано в случае ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7), реальной моделью переходного состояния для этой реакции является соединение (49) [137].

Первый этап реакции фосфорилирования (k_{+1}, k_{-1}) состоит в образовании обратимого комплекса типа комплекса Михаэлиса [136]. Стадия 2 (k_{+2}) — собственно фосфорилирование. В некоторых случаях фосфорилфермент (49) спонтанно реактивируется с образованием нативной каталитически активной эстеразы (этап 3, k_{+3}), и эта реакция в отличие от

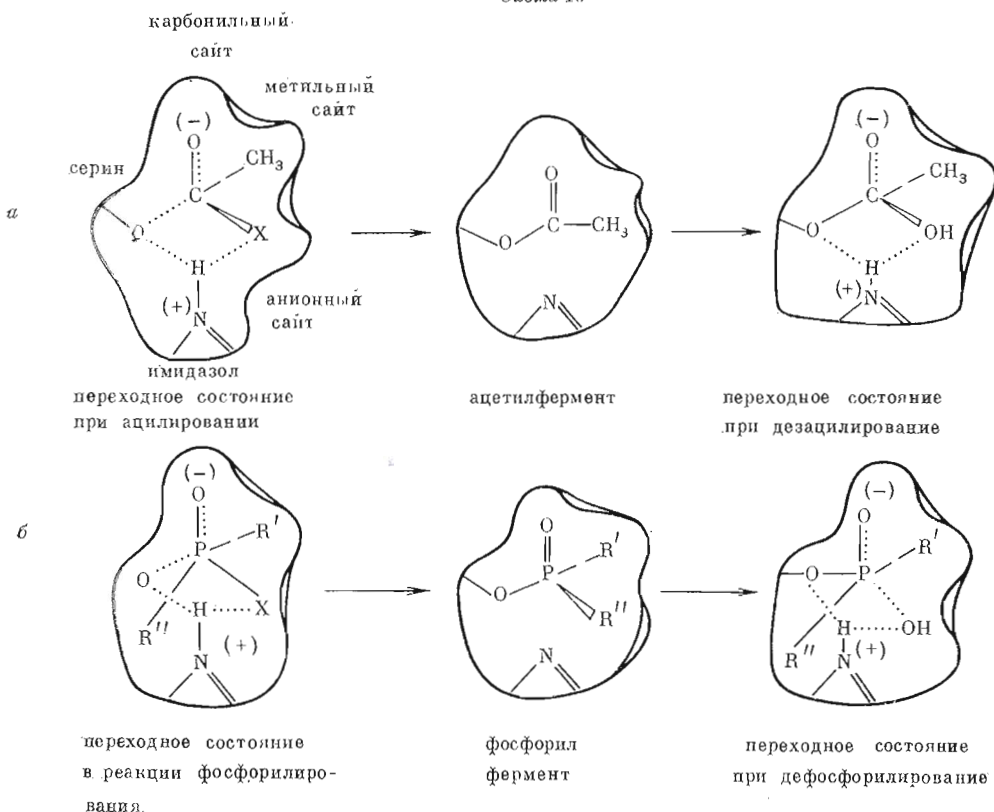


Взаимодействие фосфорсодержащих ингибиторов с сериновыми гидролазами

диметиламиноэтилдиметилфосфоната различаются на 2,5 порядка ($1 \cdot 10^7$ и $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{миг}^{-1}$ соответственно) [20].

Известно, что сериновые гидролазы проявляют большую избирательность по отношению к конфигурации хирального атома углерода субстрата [21, 31]. Стереоспецифичность ферментов к оптическим антиподам ингибитора типа (48) свидетельствует о том, что связывание молекулы фосфорорганического аналога в области реагирующего фрагмента осуществляется в нескольких точках активного центра (схема 13) [137].

Схема 13



X — уходящая группа в молекуле субстрата или ингибитора, R', R'' — алкил.

Связывание субстрата (а) и фосфорсодержащего ингибитора (б) на активном центре ацетилхолинэстеразы

Таким образом, фосфорсодержащие ингибиторы сериновых гидролаз благодаря наличию в их структуре активной группировки ковалентно связываются с гидроксилом серина активного центра с образованием фермент-ингибиторного комплекса, моделирующего возможное переходное состояние фермент-субстратного комплекса в ферментативной реакции. При этом специфичность связывания с ферментом-мишенью обеспечивается введением в структуру ингибитора соответствующего нереагирующего фрагмента молекулы субстрата. Следует отметить, что данные ингибиторы нашли применение при лечении ряда метаболических и инфекционных заболеваний [136].

Фосфорсодержащие ингибиторы представляют также большой интерес для структурных исследований сериновых гидролаз с применением инструментальных методов, так как с помощью данных соединений возможно введение различных зондов в активный центр соответствующего фермента. Например, (7-нитробенз-2-окси-1,3-диазол)аминоалкилметилфторфосфонат (53) содержит хромофорную группировку, чувствительную к окружению, и, как было показано, связывается с высокой скоростью с ацетилхолинэстеразой с образованием прочного комплекса, реактивируемого под

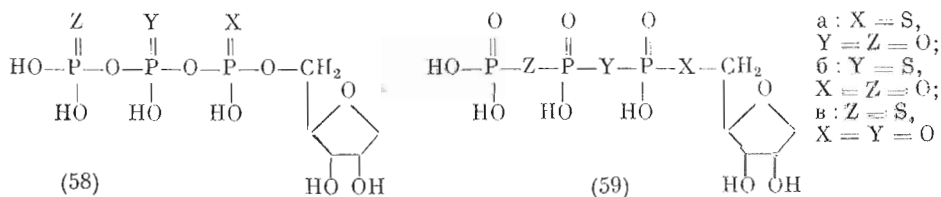
k_{cat} [146]) субстратная специфичность пептидилтрансферазного центра резко возрастает и указанная реакция для аналога (55) не идет [142, 143]. Все это дает основание предполагать, что ферментативное превращение для аналога (55) реализуется не на уровне продуктивного комплекса, а, по всей вероятности, на стадии фиксированного комплекса.

II.2. Серосодержащие аналоги природных субстратов

Большое значение в качестве специфических ингибиторов ферментов имеют серосодержащие соединения. Для них, как и для фосфорорганических аналогов, существует несколько возможностей образования субстратоподобных структур. Это прежде всего аналоги природных фосфатов и карбоновых кислот, созданные путем изостерической замены атома кислорода на серу*. Такие соединения представляют особую ценность для детального изучения механизмов ферментативных реакций. Кроме того, введением в аналог атома серы можно получить стабильные структуры, моделирующие основное и переходное состояния карбоксилсодержащих субстратов.

II.2.1. Тиофосфатные аналоги нуклеотидов и других фосфатов

Принципиально возможно получение двух типов (58 и 59) аналогов нуклеотидов:



Внимание исследователей особенно привлекают соединения типа (58), которым в последние годы было посвящено несколько превосходных обзоров [148–151]. Интерес к этим соединениям вызван рядом их уникальных свойств.

Во-первых, эти соединения стабильнее своих кислородных прототипов, но в то же время способны проявлять субстратные свойства в ферментативных реакциях с образованием соответствующих тиоаналогов продуктов [152–154]** или выступать в роли аллостерических регуляторов ферментативной активности [156–158]. Причем эти соединения отличает избирательность действия: как было показано, в отношении некоторых ферментов тиоаналоги (58) проявляют ингибиторную активность [152, 158–160]. Объяснение такому дифференцированному поведению в каждом конкретном случае до сих пор не найдено [148].

Во-вторых, при замещении атома кислорода α - или β -фосфорильной группировки на серу в молекуле нуклеозидтрифосфата возникает новый хиральный центр. Это обстоятельство делает аналоги (58) ценным инструментом в исследовании стереохимии реакций нуклеофильного замещения у атома фосфора, катализируемых нуклеотидилтрансферазами, фосфотрансферазами, фосфогидролазами и АТФ-зависимыми синтетазами [153, 161–164].

В-третьих, сера и кислород различаются по способности к комплексообразованию с металлами. Например, Cd^{2+} координирует только с серой, а Mg^{2+} , наоборот, только с кислородом; Co^{2+} же способен к хелатообразованию с обоими атомами. Благодаря этому обстоятельству удается устано-

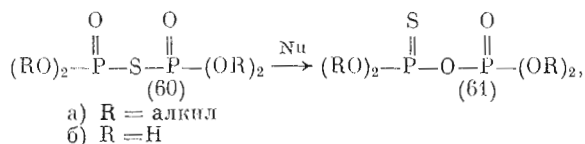
* В литературе широко обсуждаются физико-химические последствия такой замены. Например, рассмотрены в сравнении электронные структуры фосфорильной и тиофосфорильной связей [147].

** Для фосфотиоатных аналогов в сравнении с соответствующими фосфатами наблюдается 20–30-кратное уменьшение V и некоторое увеличение значения K_m [155].

вить стереохимию металл-субстратного комплекса на ферменте и различить его состояния на различных этапах реакции [165—167]. Следует отметить, что свойство серы в отличие от кислорода связывать тяжелые металлы значительно облегчает манипуляции по выделению и изучению свойств ДНК и РНК, которые содержат в своей структуре тионуклеотиды [148, 168].

В-четвертых, термодинамические параметры реакций тиоаналогов и их кислородных прототипов различны. Например, реакция гидролиза $MgATP_{PS}$ (58б) до $MgADP_{PS}$ на 2,4 ккал/моль экзергоничнее, чем соответствующее превращение АТФ в АДФ. Поэтому становится возможным определение констант равновесия таких реакций фосфорильного переноса, когда прямое определение затруднено вследствие очень сильного смещения равновесия в сторону АТФ [149].

Соединения типа (59) с заменой фосфоангидридной связи на тиоангидридную представляют несомненный интерес для энзимологических исследований. Однако в литературе до сих пор не имеется сведений о синтезе этих веществ, что, по-видимому, объясняется их крайней неустойчивостью. Описан лишь синтез симметричных тетраалкилмопотиопирофосфатов (60а) и получение неорганических солей симметричного монотиопирофосфата (60б) [169]. Трудность работы с подобными соединениями состоит в том, что эфиры симметричного монотиопирофосфата (60а) под действием нуклеофилов легко изомеризуются в несимметричные производные (61),



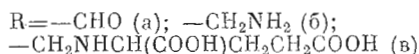
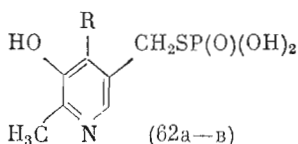
тогда как время полугидролиза ($\tau_{1/2}$) соответствующего свободного тетрааниона (60б) с образованием фосфата и тиофосфата составляет при рН 8 и 25° С всего несколько минут. Таким образом, соединение (60б) гидролизуеться значительно быстрее в водном растворе, чем пирофосфат. Следует отметить, что тиопирофосфат показывает такую же рН-зависимость скорости гидролиза, что и кислородный прототип, и его стабильность значительно возрастает при значениях рН (при рН 10,05 $\tau_{1/2}=4,23$ ч). Устойчивость соединения (60) повышается также в присутствии солей, что свидетельствует о существовании отрицательного солевого эффекта. Установлено, что симметричный монотиопирофосфат (60б) является субстратом для неорганической пирофосфатазы (КФ 3.6.1.4) и скорость его ферментативного гидролиза сравнима со скоростью гидролиза пирофосфата [169].

На основе серосодержащих аналогов нуклеотидов получены тиофосфатные аналоги нуклеиновых кислот, представляющие большой интерес в качестве удобных инструментов для исследования ферментов их метаболизма, а также как потенциальные противовирусные препараты. В зависимости от положения атома серы в межнуклеотидном тиофосфатном остатке можно выделить три группы монотиофосфатных аналогов: 1) 3'-S-тиофосфатные аналоги, содержащие С3'-S-P-связи, 2) 5'-S-тиофосфатные аналоги, содержащие P-S-C5'-связи, 3) тиофосфатные аналоги, содержащие связи типа O-P(S)-O. Аналоги первой группы пока еще не получены. Представители последней группы проявили широкий спектр биологической активности, в том числе матричные свойства и интерферогенную активность [148]. 5'-Фосфотиозфирные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов отличаются от природных прототипов несколько большей длиной межнуклеотидной связи и, возможно, конформацией углеводных остатков, что не мешает им, однако, образовывать вторичную структуру, близкую к структуре природных нуклеиновых кислот, и комплементарно взаимодействовать как друг с другом, так и с синтетическими полинуклеотидами [170]. Сочетание этих свойств с большей устойчивостью к ферментативному гидролизу и способностью к мягкому расщеплению под действием окислителей, а также легкая доступность таких соединений, связанная

с возможностью их синтеза при помощи реакций нуклеофильного замещения, делает 5'-S-тиофосфатные аналоги нуклеиновых кислот весьма перспективными объектами для биохимических исследований и, возможно, заместителями синтетических олигонуклеотидов в ряде процессов. Данные соединения являются субстратами ряда важных ферментов метаболизма ДНК, таких, как ДНК-полимераза I *E. coli* (КФ 2.7.7.7), полинуклеотидлигаза (КФ 6.5.1.1) и полинуклеотидкиназа фага Т4, различных нуклеаз (КФ 3.1.4.9) [171].

Помимо вышерассмотренных аналогов нуклеотидов известны также тиопроизводные других биологически важных фосфатов [172].

5'-Тиофосфорные эфиры пиридоксала, пиридоксамина и пиридоксил-L-глутаминовой кислоты (62a—в) были использованы для исследования конформационных изменений, сопровождающих реакцию ферментативного переаминирования, катализируемую PLP-зависимыми ферментами [173].



Эти соединения содержат активированную тиофосфорную связь, которая легко гидролизуеться. При изучении комплексов веществ (62a—в) с апо-аспартат-аминотрансферазой установлено, что в определенных условиях (рН 3,5) происходит отщепление от фермента дефосфорилированных форм данных соединений. Предполагают, что расщепление тиофосфорной связи в ходе ферментативной реакции вызвано следующим обстоятельством. На промежуточных стадиях ферментативного превращения субстрата возникает индуцированное им строгое соответствие между фосфоэфирным фрагментом кофермента и соответствующим участком активного центра фермента. В случае тиофосфорного аналога субстрат вызывает те же самые конформационные изменения, однако это приводит к несоответствию между объемистым тиофосфорным фрагментом и фосфорилсвязывающим участком, вынужденному сближению функциональных групп белка с C5-фрагментом аналога (62) и последующей активации и расщеплению тиофосфорной связи [173].

II.2.2. Серосодержащие аналоги карбоновых кислот и их производные

Применение в энзиматических исследованиях тиоаналогов карбоновых кислот, их эфиров и амидов, в которых карбонильный атом кислорода заменяется на серу, с одной стороны, обусловлено чисто методическими причинами, т. е., например, легкостью проведения для таких соединений кинетических исследований [174, 175] или же возможностью привлечения дополнительных методов исследования, таких, как резонансная рамановская спектроскопия [176—180]. С другой стороны, благодаря менее выраженной способности серы по сравнению с кислородом к делокализации отрицательного заряда при образовании резонансных структур и к образованию водородных связей эти соединения являются превосходными инструментами в сравнительном изучении структурных особенностей специфических субстратов [181, 182], а также топографии активных центров ферментов и факторов, обуславливающих ферментативный катализ [176—179, 183, 184]. Например, в исследованиях механизма действия панаина (КФ 3.4.22.2) широко используются N-ацилглицинттионэфиры, содержащие хромофорную группировку, регистрируемую методом резонансной рамановской спектроскопии. Установлено, что значения k_{cat}/K_m для кислородных прототипов и соответствующих тионэфиров совпадают, хотя в то же время величины k_{cat} для тиоаналогов в 20—30 раз ниже, чем для эфиров [180].

Известны также аналоги эфиров карбоновых кислот с тиозаменой сложноэфирного атома кислорода. Были синтезированы тиобезиловые

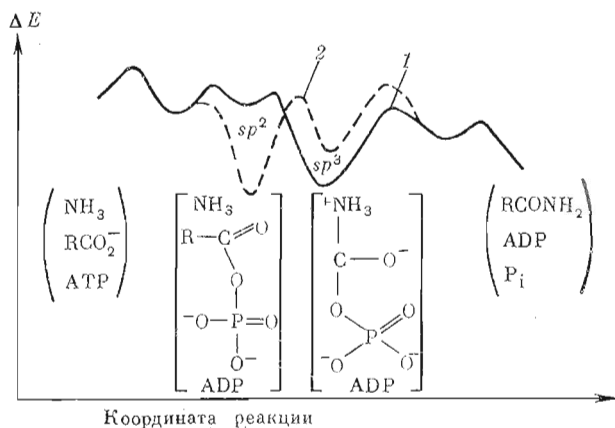
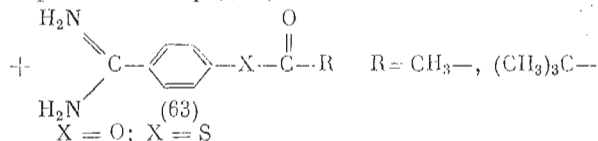


Диаграмма реакции синтеза глутамина глутаминсинтетазой из *E. coli* (1), из листьев гороха (2)

эферы некоторых пептидов, оказавшиеся эффективными субстратами химотрипсиноподобных ферментов [185]. Например, химотрипсин катализирует с одинаковыми скоростями гидролиз *n*-нитрофенилового и *n*-нитротифенилового эфиров *N*-ацетилтриптофана [186]. Однако известно, что механизмы реакций *O*- и *S*-ацильного переноса значительно различаются. Помимо различий в геометрических размерах меркапто- и гидроксигруппа имеют ряд других различий. Так, значение pK_a для *n*-амидинофенола составляет величину 8,0, а для тиоаналога — 5,0, т. е. при pH 8,0 последнее соединение полностью диссоциирует и существует в виде тиофенолят-иона, в то время как амидинофенол при этом значении pH представляет собой эквимолекулярную смесь фенола и фенолят-иона.

На основании этого предполагают, что скоростьюопределяющей стадией в случае ферментативного гидролиза вышеупомянутых соединений является образование тетраэдрического интермедиата, на которое не оказывает влияния природа уходящей группы [186].

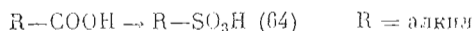
В свою очередь, ферментативная реакция гидролиза тиоаналога (63), катализируемая трипсином, протекает значительно медленнее, чем гидролиз кислородного прототипа [186]. Поскольку способность к спонтанному гидролизу для этих соединений идентична, отмеченная разница может быть обусловлена стерическими факторами: так как ковалентный радиус серы на 0,4 Å больше, чем радиус кислорода, а валентные углы связей, образованных серой и кислородом, составляют соответственно 100 и 114°



положение реакционного центра в тиоаналоге смещается [186].

II.2.3. Стабильные аналоги природных субстратов на основе серосодержащих соединений

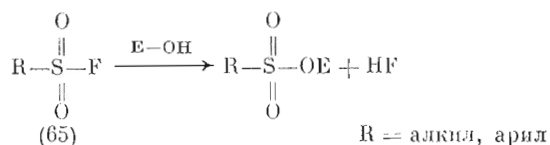
При замене карбоксильной группы субстрата на сульфогруппу были получены стабильные аналоги карбоновых кислот (64), неспособные к ферментативному превращению (в частности, к декарбоксилированию), но обладающие достаточно высоким сродством к соответствующим ферментам [98].



Подобно получению устойчивых фосфонатных аналогов природных фосфатов сульфонатная модификация с заменой сложноэфирной связи на метиленовое звено была использована при создании стабильного структурного аналога стандартного субстрата арилсульфатазы (КФ 3.1.6.1) — *n*-пирокатехолсульфата [188].

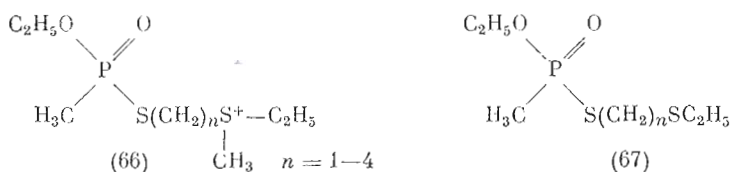
11.2.4. Ингибиторы, образующие при взаимодействии с ферментами ковалентный комплекс, моделирующий фермент-субстратный комплекс в его переходном состоянии

Среди необратимых и избирательных ингибиторов сериновых протеиназ известны сульфонилфториды (65)



действие которых основано на сульфонилировании каталитического остатка серина фермента с образованием устойчивых сульфонил-ферментных комплексов [189, 190]. На основе бензолсульфонилфторидов были разработаны эффективные ингибиторы сериновых протеиназ, которые были, например, в 10–179 раз более реакционноспособны, чем соответствующие хлорметилкетоны [185]. К достоинствам рассматриваемого типа ингибиторов (65) следует отнести также их достаточную устойчивость в водных растворах.

Известны и серосодержащие фосфорорганические ингибиторы холинэстераз [20, 191]. При изучении антихолинэстеразной активности соединений типа (66) и (67)

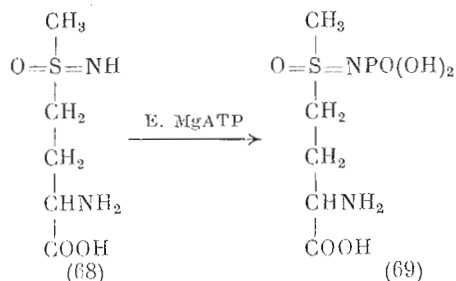


показано, что вещества, содержащие сульфониновую группу (66), обладают большей антиферментной активностью, чем незаряженные соединения (67). Среди фосфорорганических ингибиторов (66), содержащих катионную группу, наибольшей антихолинэстеразной активностью обладало соединение с $n=1$. По-видимому, это можно объяснить тем, что атом серы в сульфониновой группе этого соединения находится на таком же расстоянии от атома фосфора, что и атом азота от атома углерода карбонильной группы в молекуле ацетилхолина (4,7 Å). Именно в этом случае создаются наиболее благоприятные условия для взаимодействия фосфорорганического ингибитора в двух точках — с анионным участком и нуклеофильной группировкой эстеразного центра холинэстераз [20].

11.2.5. Возможности химии серосодержащих соединений в создании аналогов переходного состояния и синкаталитических ингибиторов

Для глутаминсинтетазы известен специфический ингибитор — метионинсульфоксимин (68), который является природным токсином и первоначально был обнаружен в отбеленной муке [38]. При изучении действия соединения (68) было установлено, что в присутствии АТФ и Mg^{2+} (или Mn^{2+}) фосфорилируется только один из четырех диастереомеров, *L*-метионин-(*S*)-сульфоксимин, и образующиеся метионинсульфоксиминфосфат (69) и АДФ остаются связанными с ферментом, необратимо инактивируя последний [192–194]. Эта реакция протекает аналогично первой стадии биосинтеза глутамина, когда в результате взаимодействия между *L*-глутаминовой кислотой и АТФ образуется активированный интермедиат, γ -глутамилфосфат (25, схема 5) [195]. Предложенный механизм ингибирования глутаминсинтетазы соединением (68) подтверждается тем фактом, что мутантный фермент, не обладающий глутамилтрансферазной

активностью, резистентен по отношению к ингибитору (68) [196].



Соединение (69) так прочно связывается с ферментом, что не удаляется ни гель-фильтрацией, ни продолжительным диализом. Таким образом, метионинсульфоксимин (68) можно рассматривать как субстрат-«самоубийцу» глутаминсинтетазы, поскольку продукт его ферментативного превращения необратимо инактивирует фермент. Это на самом деле квази-необратимое ингибирование, так как при взаимодействии не происходит образования ковалентной связи.

С другой стороны, результаты ЭПР- и ЯМР-исследований свидетельствуют о том, что метионинсульфоксиминфосфат (69) имитирует тетраэдрический интермедиат или переходное состояние глутамилтрансферазной реакции [197], образующееся в нормальной каталитической реакции при атаке аммиаком ферментсвязанного γ -глутамилфосфата.

Показано, что глутаминсинтетаза и γ -глутамилцистеинсинтетаза (КФ 6.3.2.2) также ингибируются химически синтезированным аналогом (69); причем, если в случае глутаминсинтетазы ингибирование протекает более эффективно в присутствии Mg^{2+} и ADP, то для второго фермента скорость инактивации увеличивается при добавлении Mn^{2+} и уменьшается при добавлении нуклеотидов. Для этих ферментов отмечена разница в прочности комплекса с соединением (69): при разбавлении комплекс с γ -глутамилцистеинсинтетазой самопроизвольно диссоциирует [192].

Из данных по конкуренции производного (69) с субстратами следует, что ингибитор взаимодействует по крайней мере с тремя подцентрами связывания на глутаминсинтетазе, с теми, которые обычно связывают глутамат, аммиак и концевой фосфорильный остаток АТФ [192].

Вероятно, в процесс связывания соединения (69) с глутаминсинтетазой включены 3–4 карбоксильные группы каждой субъединицы фермента, так как при протонировании их (значения рН 3,5–4,6) инактивированный фермент полностью восстанавливает свою активность, при этом выделяется примерно по одному эквиваленту ингибитора и ADP и два эквивалента Me^{2+} на каждую субъединицу. Реактивация полностью обратима; при нейтрализации инкубационного раствора фермент вновь связывает ингибитор [198].

С помощью ингибитора (68) проведено исследование, которое свидетельствует о возможности использования специфических ингибиторов для изучения тонких особенностей механизма действия гомологичных ферментов [109]. Показано, что для глутаминсинтетаз из разных источников значения констант ингибирования соединением (68) значительно варьируют [7, 109, 199] (для фермента из *E. coli* $K_i = 9,6 \cdot 10^{-7}$ М, из листьев гороха — $2,0 \cdot 10^{-5}$ М, из мозга овцы — $2,1 \cdot 10^{-5}$ М). Таким образом, ситуация оказывается обратной той, которая имеет место в случае фосфонатных аналогов γ -глутамилфосфата (23) и (24), характеризующихся более высоким сродством к ферменту из листьев гороха в сравнении с ферментом из *E. coli*.

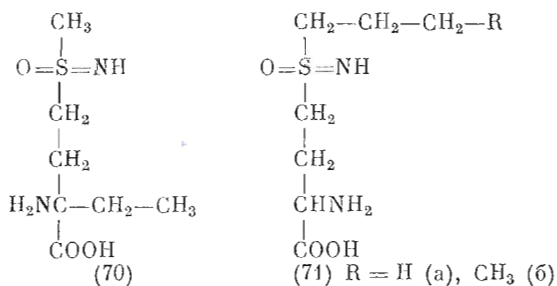
На основании совокупности полученных данных предполагается, что глутаминсинтетаза из *E. coli* стабилизирует γ -глутамилфосфат как основное промежуточное соединение ферментативной реакции, в то время как гомологичный фермент из листьев гороха — тетраэдрический аддукт его ферментативного превращения [109]. Из этого различия по сродству к промежуточным состояниям субстрата для глутаминсинтетаз из разных

источников следует различие в энергетических профилях соответствующих ферментативных реакций (рисунок) [109].

Метионинсульфоксимин (68), как было показано, ингибирует транспорт аммиака в азотфиксирующих бактериях [200], причем данный эффект наблюдается только после проникновения ингибитора в клетку. Установлено, что внутриклеточное накопление соединения (68) различными штаммами бактерий осуществляется очень быстро и достигает концентрации 10^{-3} М.

Один из интересных аспектов применения метионинсульфоксими-на (68) связан с его использованием в селекции растений [201]. Вследствие существования мутантов табака, устойчивых к соединению (68) и одновременно к *Pseudomonas tabaci*, была предложена идея использования метионинсульфоксими-на для скрининга протопластов в целях регенерации из последних растений, устойчивых к *P. tabaci* [202].

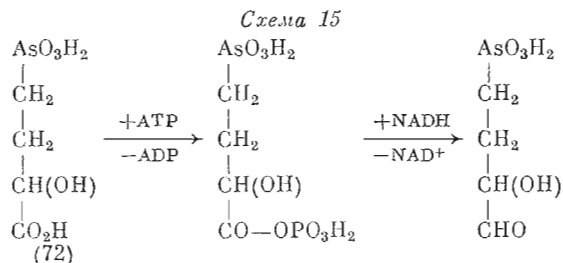
На основе структуры ингибитора (68) были синтезированы избирательные ингибиторы глутаминсинтетазы [α -этилметионинсульфоксимин (70) и γ -глутамилцистеинсинтетазы (протионинсульфоксимин (71а) и бутионинсульфоксимин (71б))] [203, 304]. Как и соединение [68], вещества (71а и б) ингибируют фермент через образование фосфорилированного аддукта, причем соединение (71б) в 200 раз более эффективно, чем метионинсульфоксимин (68).



II.3. Возможности использования соединений мышьяка в создании специфических ингибиторов

Органические производные мышьяковой кислоты были использованы как аналоги биологически активных фосфатов и как аналоги переходного состояния для карбонилсодержащих субстратов.

Арсенометильные аналоги природных фосфатов, в которых модифицировался не реагирующий фрагмент молекулы, обнаруживали субстратоподобные свойства [205, 206]. Так, аналог (72) 3-фосфоглицерата, участвовал в реакциях, приведенных на схеме 15, причем значение K_m для него было близко к K_m субстрата, но k_{cat} было в 1300 раз ниже [29, 206].



Участие арсенометильного аналога 3-фосфоглицерата в последовательной цепи реакций, катализируемых фосфоглицераткиназой (КФ 2.7.2.3) и глицеральдегидфосфат-дегидрогеназой (КФ 1.2.1.13)

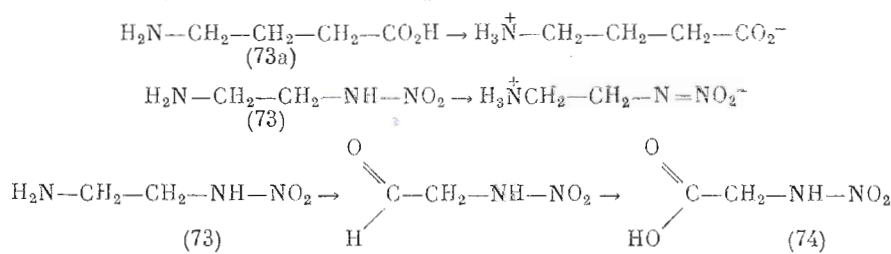
По аналогии с известными фосфорорганическими ингибиторами Zn^{2+} -зависимых протеиназ [123—128] был синтезирован аналог специфического субстрата дипептидилкарбоксицептидазы, содержащий тетраэдрический атом мышьяка, 2-арсоацетил-L-пролин [207]. Однако это соединение

оказалось в 2000 раз слабее по ингибиторному действию, чем 2-фосфоноацетил-*L*-пролин, возможно, вследствие стерических причин, так как As-C- и As-O-связи значительно длиннее, чем соответствующие расстояния P-C и P-O [206].

II.4. Нитроаналоги карбоновых кислот

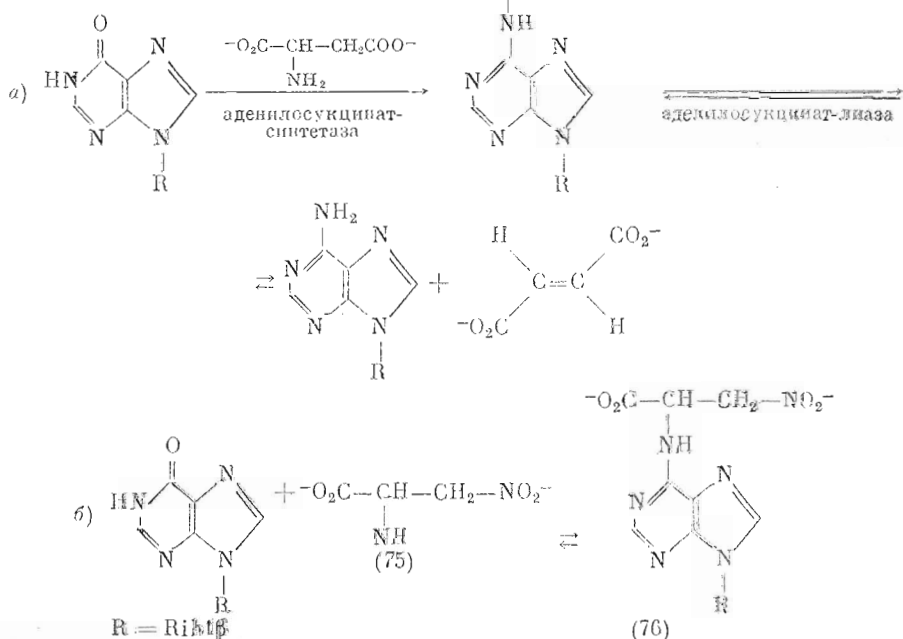
В дополнение к рассмотренным соединениям следует упомянуть еще один очень интересный тип аналогов, получаемых при замене карбоксильной группы на нитрогруппировку. Благодаря особенностям химии нитросоединений эти аналоги в отношении одних ферментов могут проявлять субстратоподобные свойства, а по отношению к другим являться эффективными ингибиторами.

Был синтезирован нитроаналог (73) γ -аминомасляной кислоты (73a), выполняющей важную роль медиатора процессов торможения в центральной нервной системе [208]. Полученное соединение, так же как и (73a), при физиологических значениях pH существует в виде цвиттер-иона. Соединение (73) включается в цикл ферментативных реакций, который осуществляется для (73a) в мозге, превращаясь посредством аминобутират-аминотрансферазы (КФ 2.6.1.19) и дегидрогеназы янтарного полуальдегида (КФ 1.2.1.16) в *N*-нитроглицин [74], который, в свою очередь, являясь аналогом янтарной кислоты, ингибирует превращение по циклу Кребса, действуя на сукцинадегидрогеназу (КФ 1.3.99.1) [208].



Субстратные свойства проявлял также нитроаналог (75) аспарагиновой кислоты [209]. Аденилосукцинат-синтетазы (КФ 6.3.4.4) катализиро-

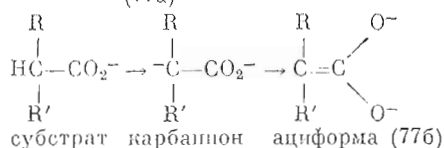
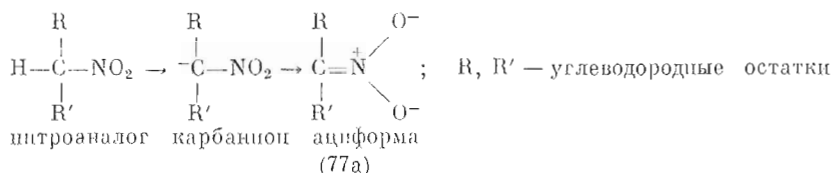
Схема 16
 $-\text{O}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{CO}_2^-$



Нормальная цепь превращения субстрата (a) и участие нитроаналога (75) аспарагиновой кислоты (б) в реакции, катализируемой аденилосукцинат-синтетазой

вала образование аналога (76) аденилосукцината с 30% эффективностью (схема 16). Последний оказался неплохим ингибитором аденилосукцината-лиазы (КФ 4.3.2.2) со значением K_i , в 28 раз меньшим, чем K_m для субстрата [209].

Предполагают, что ингибирующее действие нитроаналогов субстратов некоторых лиаз обусловливается легкостью образования α -карбаниона (pK_a нитроалканов находятся в диапазоне значений от 9 до 11) [210]. Карбанион стабилизируется резонансом за счет делокализации электронов на атомах кислорода нитрогруппы; таким образом, получается ациформа (77а) с sp^2 -гибридизованным атомом углерода:



В катализе, который осуществляют лиазы, стабилизация аналогичной формы субстрата (77б), по-видимому, играет значительную роль. Вследствие этого ингибиторы с тригональной геометрией в области, соответствующей α -углеродному атому субстрата, могут обладать высоким сродством к ферменту.

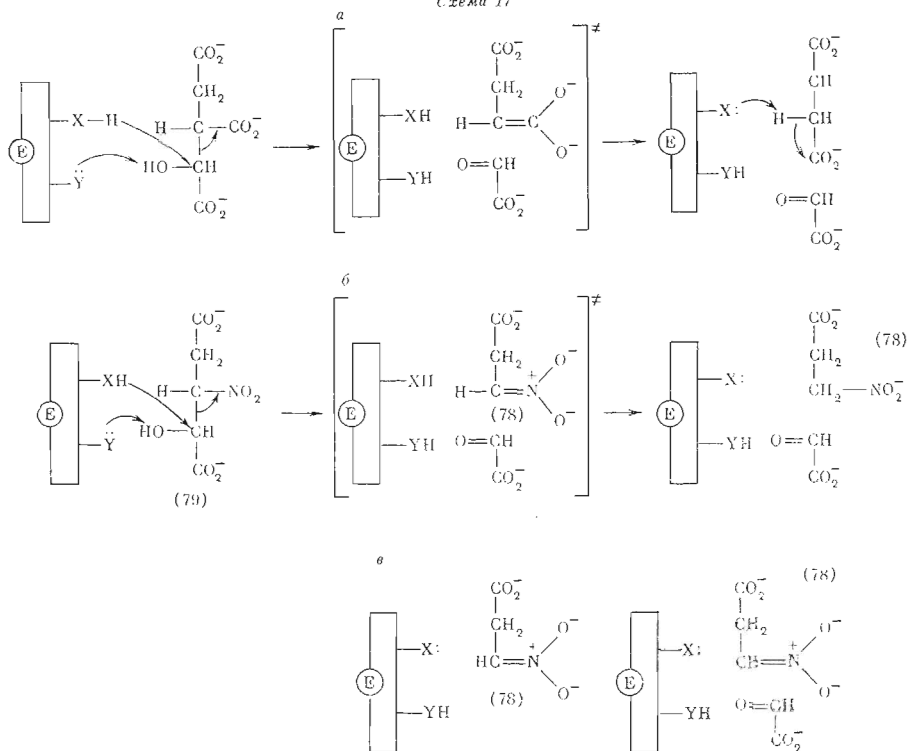
3-Нитропропановая кислота (78) (схема 17), аналог продукта реакции, катализируемой изоцитрат-лиазой (КФ 4.1.3.1), связывалась с ферментом в 6500 раз прочнее ($K_{1(\text{нак})} \leq 1,7 \cdot 10^{-8}$ М, K_1 для полностью ионизированной формы, как предполагают, не должна превышать $1,5 \cdot 10^{-9}$ М), чем сукцинат (K_m $1,1 \cdot 10^{-3}$ М) [211]. Процесс связывания соединения (78) с ферментом проходил медленно, по-видимому в две стадии. Интересно, что соответствующий фосфонат связывается лишь в 3 раза прочнее, чем субстрат. Данное обстоятельство подчеркивает важную роль для взаимодействия аналога с ферментом геометрии интермедиата, имитирующего ациформу (77а), а не заряда группировки, замещающей HOOC -группу.

В свою очередь, 1-гидрокси-2-нитро-1,3-пропандикарбоновая кислота (79) оказалась субстратом в прямой реакции, катализируемой изоцитрат-лиазой (схема 17). Рацемический нитроаналог (79) изоцитрата имел K_m $9,5 \cdot 10^{-5}$ М и V , составляющую 0,8% от V для D_s -изоцитрата ($K_m = 8,0 \cdot 10^{-6}$ М) [211].

Аналогичное исследование было проведено для нитроаналогов субстратов аргининосукцинат-синтетазы (КФ 6.3.4.5) и аргининосукцинат-лиазы (КФ 4.3.2.1) [212]. Первый фермент с максимальной скоростью, составляющей 60% от соответствующей величины для аспартата, и близким отношением V/K_m (85%) катализировал превращение D, L -3-нитро-2-аминопропионовой кислоты в аналог субстрата лиазы, который оказался сильным конкурентным ингибитором последнего фермента [212].

III. Конкретные примеры ингибиторов, созданных с учетом механизма реакции, катализируемой определенным ферментом

Итак, мы рассмотрели некоторые варианты химической модификации, предлагаемые для моделирования самих субстратов, а также интермедиатов их ферментативных превращений. Но это лишь одна сторона проблемы, другая состоит в необходимости учитывать состояние фермента-мишени и механизм катализируемой им реакции. Для некоторых ферментов механизм действия достаточно хорошо выяснен, благодаря чему становится



X, Y — функциональные группы активного центра фермента.

Взаимодействие субстрата (а), нитросубстрата (б) и нитроингибитора (в) с изоцитрат-лиазой

возможным определении путей целенаправленного поиска специфических ингибиторов. К этим ферментам относятся прежде всего PLP-зависимые ферменты и амидогидролазы.

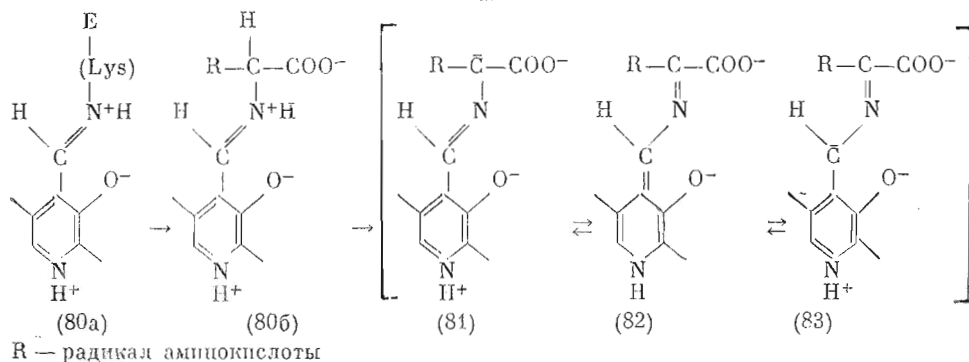
III.1. Специфические ингибиторы PLP-зависимых ферментов

PLP служит кофактором ферментов, катализирующих несколько различных типов превращений аминокислот. Включение кофактора в эти реакции позволяет рассматривать их механизм с единых позиций. Здесь этот механизм будет рассмотрен кратко и без доказательств, единственно с целью показать возможности для создания специфических ингибиторов*.

Для большинства до сих пор исследованных PLP-зависимых ферментов показано, что кофермент связывается в активном центре с остатком лизина с образованием основания Шиффа (внутренний альдимин) (80а). На стадии, которая, по-видимому, является общей для этой группы ферментов, аминогруппа субстрата замещает лизин с образованием внешнего альдимина (80б) (схема 18).

В этом соединении благодаря нековалентному взаимодействию субстрата с ферментом отсутствует вращение относительно C^α—N-связи, в силу чего фиксируется геометрия остальных трех связей при C^α. Связь, перпендикулярная к плоскости, в которой расположены коферментное кольцо и двойная связь альдимина, вследствие делокализации ее электронов

* Для подробного ознакомления с деталями и доказательством механизма можно рекомендовать обзоры [52, 213].



Механизм образования ключевого промежуточного соединения в реакциях, катализируемых PLP-зависимыми ферментами

за счет резонанса с π -электронной системой ослабляется. Так как каждая из трех связей субстрата может занимать это положение, реакции PLP-зависимых ферментов могут быть подразделены на три категории: элиминирование водорода, карбоксильной группы или R. Отщепление одной из этих группировок (на схеме 18 представлено элиминирование водорода) приводит к образованию ключевого промежуточного соединения, которое может быть представлено карбанионной или хиноидальными каноническими формами (81–83) (схема 18). В хиноидальном интермедиате (82) нейтрализация избыточной электронной плотности может происходить либо в результате протонирования одного из электронно-обогащенных атомов углерода ($4'$ -C кофермента или C^α субстрата), либо за счет элиминирования β - или γ -заместителя, что в конечном итоге определяет специфичность катализируемой данным ферментом реакции.

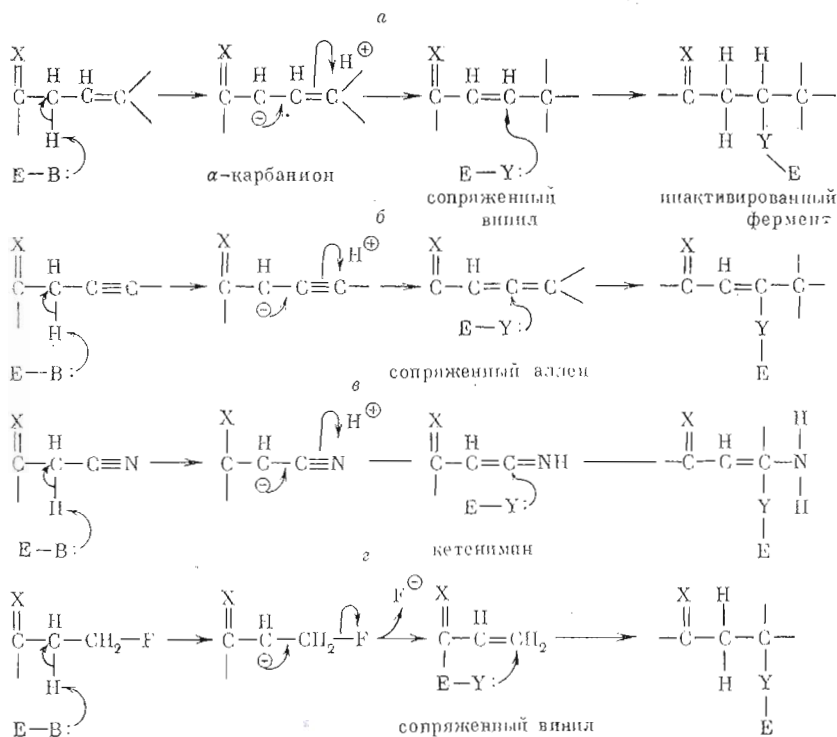
III.1.1. Синкаталитические ингибиторы PLP-зависимых ферментов

Наиболее распространенными субстратами-«самоубийцами» пиридоксальфосфатзависимых ферментов являются соединения, которые ингибируют фермент-мишень по реакции типа реакции Михаэля [36, 42].

Аналоги субстратов, которые содержат электроноакцепторные группы в β -положении соответствующей аминокислоты (например, винил, ацетиленил, нитрилфторметильную группы), могут быть легко превращены в акцептор Михаэля ферментом-мишенью в соответствии с механизмом катализируемой им реакции через образование α -карбаниона (схема 19). Последующая перегруппировка ведет к образованию сопряженных электрофилов (винила, аллена или кетенимина). Эти группировки, в свою очередь, легко подвергаются атаке со стороны нуклеофилов активного центра, что ведет к необратимой инактивации фермента.

Следует отметить, что из фторпроизводных более активны ди- и трифторзамещенные. Если для β -фтор-D-аланина на одно событие инактивации аланинацетамиды (КФ 5.1.1.1) приходилось в среднем 800 безвредных для фермента превращений аналога субстрата в пируват, F^- , NH_4^+ , то для трифтораланина это соотношение составляло 1:40 [36].

Лабелизацию связей C—F можно представить следующим образом: при возникновении отрицательного заряда на углероде, соседнем с C—F, благодаря эффекту β -карбанионной активации облегчается элиминирование иона фтора. Углерод при двойной связи может подвергнуться атаке нуклеофилом, и, если имеются другие атомы фтора, связанные с этим углеродом, последующие реакции элиминирования-присоединения могут привести к расщеплению всех связей C—F [214]. Рассмотренные ингибиторы с электроноакцепторными группами в β -положении помимо чисто научного интереса представляют также большую практическую ценность, поскольку являются эффективными химиотерапевтическими средствами



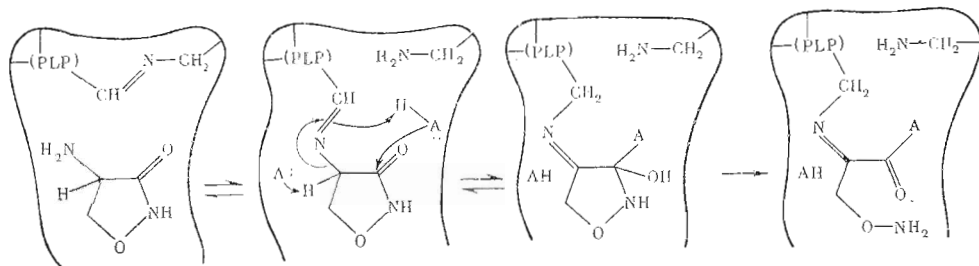
X — PLP, B — основание, Y — нуклеофил активного центра.

Схемы инактивации PLP-зависимых ферментов субстратами-«самоубийцами», содержащими в β -положении соответствующей аминокислоты винильную (а), этинильную (б), нитрильную (в), фторметильную (г) группировки

и широко применяются при лечении различных патологических состояний [4, 42, 215–218].

Тормозящее действие антибиотика *L*-цикloserина на PLP-зависимые ферменты обусловлено ацилирующими свойствами [14, 15]. На основании данных химического и оптического исследования некоторых субстратоподобных аналогов этого антибиотика, а также идентификации продуктов деградации инактивированного комплекса [^{14}C]цикloserина с аспаргатаминотрансферазой (КФ 2.6.1.2) [219] был предложен следующий механизм торможения пиридоксальных ферментов [15] (схема 20).

Схема 20



НА, А — функциональные остатки активного центра.

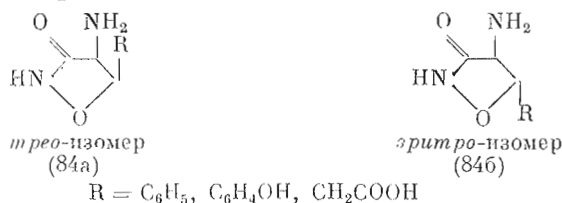
Механизм реакции ингибирования PLP-зависимых ферментов *L*-цикloserином

Начальные стадии ингибирования совпадают с первыми этапами нормальной ферментативной реакции. Оксиминовый фрагмент изоксазolidинового цикла, имеющий pK_a 4,5 и играющий роль модифицированной кар-

боксильной группы, закрепляется на том же участке активного центра, где происходит фиксирование карбоксильной группы субстрата. Аминогруппа циклосерина подобно аминогруппе субстрата вступает в реакцию трансальдиминизации, в результате которой образуется альдимин. На стадии образования альдимины возможно вытеснение ингибитора субстратами (амино- и кетокислотами), сопровождающееся восстановлением активности фермента. Необратимая стадия торможения наблюдается при превращении альдимины в кетимин. При этом затрагиваются те же группы, которые катализируют превращение субстрата в процессе нормальной ферментативной реакции. В результате ацилирования облегчается переход протона к карбонильному углероду кофермента, происходит прототропная перегруппировка альдимины в кетимин, и реакция ингибирования останавливается на этой стадии.

Выяснение механизма действия *L*-циклосерина позволило сформулировать принципы направленной модификации аминокислот для получения специфических ингибиторов PLP-зависимых ферментов как изменение молекулы субстрата посредством образования циклической группировки эфира гидроксамовой кислоты, моделирующей карбоксильную группу и обладающей ацилирующими свойствами [13].

Путем построения гетероциклической системы изоксазолидона-3 на основной углеродной цепи аминокислоты осуществлен синтез ингибиторов ферментативных превращений фенилаланина, тирозина, глутаминовой кислоты как представителей трех различных классов аминокислот [14, 220, 221], при этом, если аланину ($R=H$) соответствует в данном ряду единственный ингибитор — циклодурин, для других аминокислот возможно образование по крайней мере двух изомерных изоксазолидонов (84а и б)

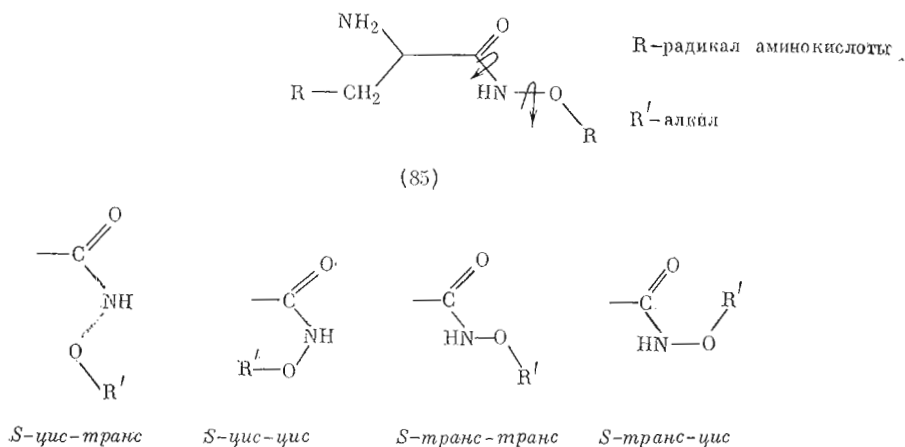


Эти полифункциональные ингибиторы обладают жестко фиксированной конфигурацией, комплементарной субстратному участку активного центра, что позволяет судить о реальной конформации субстрата, вступающего во взаимодействие с ферментом. Необратимость действия ингибиторов (84) обуславливается наличием в их структуре группировки циклического эфира гидроксамовой кислоты.

III.1.2. Конформационные ингибиторы PLP-зависимых ферментов

Очевидно, что при поиске конформационных ингибиторов (веществ, которые по комплексу своих свойств не должны, казалось бы, тормозить ферменты, однако при связывании с последними претерпевают такие изменения в своей структуре, которые приводят к появлению новых свойств) необходимо знание конформации субстрата в активном центре фермента. На основе полученных для ингибиторов типа (84) данных был предложен путь видоизменения молекулы субстрата без существенной потери ее специфичности, состоящий в замене карбоксильной группы на алкоксиамидную группировку. Тем самым определен класс органических соединений, среди которых могли быть найдены конформационные ингибиторы — класс эфиров аминокарбогидроксамовых кислот (85), которые не имеют жесткой циклической структуры изоксазолидона (84), однако содержат в своей молекуле все элементы структуры субстрата [33]. Соединения типа (85) оказались сильными и специфическими ингибиторами соответствующих трансаминаз [34]. Принимая во внимание, что циклические ингибиторы (84), обладающие *цис*-конформацией, комплементарны субстратному участку активного центра фермента, можно объяс-

нить ингибирующие свойства соединений (85) трансформацией их в активном центре, в результате чего происходит вынужденное изменение *транс*-конформации (85) (реально существующей в растворе неактивной формы) на комплементарную субстратной площадке, напряженную *S-цис-цис*-конформацию, находясь в которой данные соединения обладают ацилирующими свойствами.



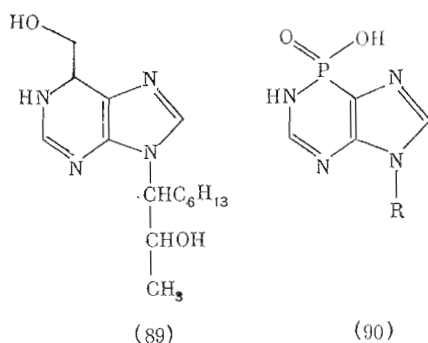
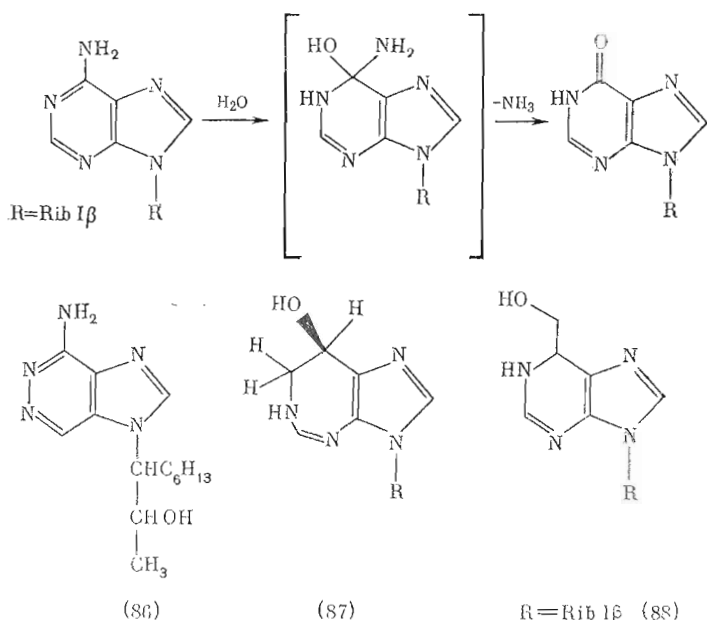
Таким образом, данные, полученные при исследовании механизма торможения PLP-зависимых ферментов конформационными ингибиторами, подтверждают возможность вынужденного изменения конформации низкомолекулярного соединения под влиянием белковой молекулы. Молекула белка вызывает направленное изменение в молекуле ингибитора, фиксируя ту реакционную конформацию, которая обладает максимальным средством к активному центру благодаря ее многоточечной фиксации на субстратной площадке активного центра фермента [33, 34].

III.2. Специфические ингибиторы аденозиндезаминазы

Для аденозиндезаминазы (КФ 3.5.4.4) известно несколько типов специфических ингибиторов, которые представляют большой интерес ввиду того, что являются эффективными противоопухолевыми средствами. Фермент катализирует реакцию гидролитического расщепления С—N-связи по механизму нуклеофильного замещения у sp^2 -гибридизованного атома углерода с образованием тетраэдрического интермедиата [57] (схема 21).

Конформационно-подвижный аналог субстрата, 9-[(+)-эригро-2-гидроксинаван-3-ил]аденин (EHNA (86)), в котором жесткое пятичленное кольцо рибозы заменено на разомкнутую цепь, служит эффективным ингибитором фермента ($K_i=1,3 \cdot 10^{-9}$ М) [62]. Другой тип эффективных ингибиторов аденозиндезаминазы — аналоги, моделирующие тетраэдрический интермедиат, возникающий при атаке водой комплекса аденозиндезаминаза—субстрат. К ним относятся антибиотик коформации (87) (K_i порядка 10^{-9} М), 1,6-дигидро-6-гидроксиметилпурин-9-рибозид (DHMRP (88)) ($K_i=7,0 \cdot 10^{-7}$ М) [222] и фосфорорганические аналоги типа (90) ($K_i=10^{-7}-10^{-9}$ М) [18, 223].

Была сделана попытка в структуре одного соединения (89) представить оба фрагмента, обуславливающие эффективное связывание как аналога субстрата (EHNA (86)), так и аналога его переходного состояния (DHMRP (88)). Однако в полученной аддитивным путем структуре не реализовались преимущества исходных ингибиторов, и соединение (89) проявляло значительно меньшее сродство к ферменту ($K_i=1,2 \cdot 10^{-5}$ М) [222]. Этот пример подтверждает положение теории субстратной специфичности о том, что структурные элементы субстрата могут играть разную роль в обеспечении специфичности связывания на различных стадиях ферментативной реакции [24].



Механизм реакции, катализируемой аденозиндеаминой

Приведенные выше значения констант ингибирования не обнаруживают очевидной разницы между аналогами субстрата в его основном и переходном состояниях. Тем не менее детальные кинетические исследования ингибирования аденозиндеамины и родственного фермента, АМР-деамины (КФ 3.5.4.6), показали, что характерной чертой аналогов переходного состояния является не столько прочность комплекса с ферментом (K_i может изменяться в диапазоне 10^{-6} — 10^{-12} М), сколько медленное образование этого комплекса (константа скорости для связывания аналога переходного состояния субстрата с ферментом на 2—3 порядка ниже, чем соответствующая константа для диффузионно-контролируемого процесса связывания аналога основного состояния субстрата) [62]. Методом тушения триптофановой флуоресценции установлено, что связывание аналогов переходного состояния с аденозиндеаминой сопровождается значительными конформационными изменениями белка, причем эти изменения были одинаковы для всех аналогов переходного состояния [224]. Эти данные являются свидетельством в пользу предположения о том, что медленное связывание такого рода аналогов обусловлено тем, что первоначально структура фермента комплементарна субстрату в его основном состоянии, а для эффективного связывания субстрата в переходном состоянии требуется значительная перестройка активного центра.

III.3. Специфические ингибиторы амидогидролаз

Для амидогидролаз по сравнению с другими ферментами известно, пожалуй, наибольшее количество разнообразных специфических ингибиторов. Большой интерес к поиску ингибиторов данных ферментов объясняется прежде всего исключительной ролью последних в регуляции метаболизма, поддержании нормального физиологического состояния живых организмов и использованием их ингибиторов в качестве фармакологических средств, и здесь достигнут значительный прогресс [4]. Нужно отметить также, что сама природа в процессе эволюции создала значительное количество специфических пептидоподобных ингибиторов амидогидролаз.

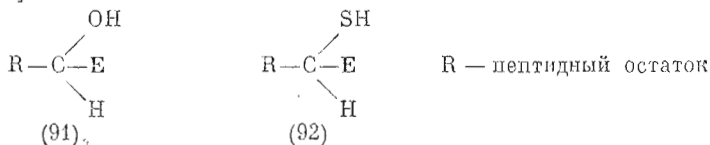
В монографии [31] рассмотрен ряд ингибиторов амидогидролаз как синтетического, так и природного происхождения. В нашем обзоре будет представлена современная интерпретация отдельных аспектов действия ранее известных и недавно синтезированных специфических ингибиторов этих ферментов.

III.3.1. Ингибиторы сериновых амидогидролаз

Помимо вышерассмотренных фосфорсодержащих ингибиторов и сульфонилфторидов известен еще ряд соединений, которые инактивируют сериновые ферменты с образованием фермент-ингибиторных комплексов разной устойчивости, моделирующих переходное состояние фермент-субстратного комплекса.

Альдегиды. Эффективными обратимыми ингибиторами сериновых, а также тиоловых амидогидролаз являются альдегидные аналоги специфических субстратов [225–230]. Например, Ac-Phe-NHCH₂C(H)O ингибирует папанин (КФ 3.4.22.2) со значением $K_i=5 \cdot 10^{-8}$ М [229], а Ac-Pro-Ala-Pro-NHCH₂-(CH₂)C(H)O — эластазу (КФ 3.4.21.11) с $K_i=8 \cdot 10^{-7}$ М [226]. Подобные соединения были обнаружены в природе среди микробных токсинов [31].

Ингибирующее действие альдегидных аналогов основано на специфическом связывании этих соединений в активном центре фермента и образовании связи полуацетального (с гидроксильной группой серина) или полутиоацетального (с цистеином в случае тиоловых протеиназ) типа [231, 232]:



Полученные таким образом аддукты (91) и (92), по-видимому, моделируют тетраэдрический интермедиат (схема 22а), образующийся на стадии дезацилирования фермента (схема 11 и 22б). Мнения о том, являются ли альдегидные производные специфических субстратов в действительности аналогами переходного состояния, достаточно противоречивы. С одной стороны, проведенные в рамках экстракционного механизма катализа расчеты свидетельствуют, что альдегиды-ингибиторы, по-видимому, не реализуют те дополнительные связывающиеся взаимодействия, которые характерны для специфического субстрата в переходном состоянии [24]. В то же время было отмечено, что структурные модификации не реагирующего фрагмента субстрата, приводящие к реализации вторичных взаимодействий с ферментом, не влияя значительно на K_m , ведут к 105-кратному увеличению отношения k_{cat}/K_m для специфических субстратов и 78-кратному уменьшению величины K_i соответствующих альдегидных ингибиторов [231]. Это дало основание предполагать, что ферментсвязанная форма таких соединений (в виде полуацетала (91) или полутиоацетала (92)) использует преимущество в связывании, отличающее переходный комплекс от комплекса Михаэлиса.

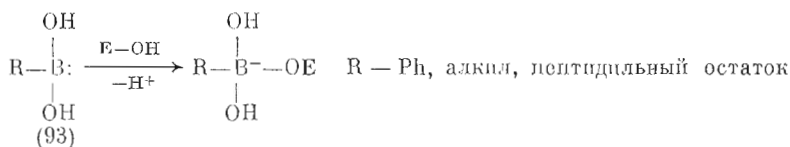
Известно, что альдегиды в водном растворе почти нацело гидратированы [233]. Однако с сериновыми или тиоловыми протеиназами альдегидные аналоги связываются, находясь в свободной форме, так как их восстановленные (спиртовые) производные обладают весьма низким сродством к ферментам [226, 231]. Следовательно, получаемые в опыте значения констант ингибирования в общем случае бывают завышены, поскольку рассчитываются на общее содержание альдегида в растворе без учета концентрации его гидратированной формы [233, 234].

Существование ковалентной связи между ферментом и альдегидами-ингибиторами доказано с помощью методов ^{13}C -ЯМР, рентгеноструктурного анализа и изотопных эффектов [49, 235—237]. Причем предполагают, что образование этой связи сопровождается значительными потерями энтропии [238].

Представляет интерес использование альдегидных соединений в исследованиях *in vivo*. Оказалось, что альдегидный аналог динентиды N-Cbz-пролин-пролина, ингибируя очищенную пролин-эндопептидазу с $K_i = 1,4 \cdot 10^{-8}$ М, также значительно подавляет ее активность во всех тканях организма крысы, причем эффект сохраняется в течение 6,5 ч после введения однократной дозы ингибитора [239]. Обнаруженное ингибирование фермента в ткани мозга свидетельствует о том, что альдегидный аналог легко преодолевает гематоэнцефалический барьер [239].

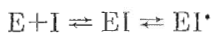
Производные борных кислот. Эффективными ингибиторами сериновых протеиназ являются также аналоги специфических субстратов, содержащие вместо карбоксильной группы остаток борной кислоты [31]. Первоначально использовались алкил- и арилборные кислоты [66, 240—248], но недавно были получены также борные аналоги пептидов, которые благодаря дополнительным связывающим взаимодействиям P_1 — P_5 -структурных подцентров молекулы ингибитора с соответствующими зонами активного центра обладали значительно более высоким сродством к ферменту ($K_i (0,1-20) \cdot 10^{-9}$ М) [249], чем углеводородные производные борной кислоты (K_i порядка $10^{-3}-10^{-6}$ М).

С помощью методов рентгеноструктурного анализа и инфракрасной спектроскопии показано, что замещенные борные кислоты (93)



имея исходную тригональную геометрию реагирующей группировки, взаимодействуют с НО-группой сериона активного центра с образованием тетраэдрического комплекса типа аддукта Льюиса, причем один из гидроксильных борной кислоты располагается в оксианонном центре фермента, а другой занимает положение, соответствующее положению уходящей NH-группировки специфического субстрата (схема 22в) [250, 251].

Установлено, что процесс образования тетраэдрического аддукта протекает ступенчато через стадию невалентного связывания ингибитора (93) в активном центре



и характеризуется такими же термодинамическими параметрами, что и нормальная реакция образования ацилфермента [252].

Необходимо подчеркнуть, что процесс ингибирования ферментов борными аналогами пептидов (93) прогрессивно развивается во времени. Предполагают, что медленная фаза пвактиващи связана с конформационными изменениями в молекуле фермента, обеспечивающими оптимальное связывание ингибитора [249].

Вопрос отщесения соединений (93), так же как и альдегидов, к аналогам переходного состояния до сих пор однозначно не решен [24, 31, 66].

В качестве ингибиторов гидролитических ферментов предложено также использовать *фторзамещенные кетоаналоги специфических субстратов*.

кетоны. Последние помимо связи с остатком серина образуют дополнительную ковалентную связь с ферментом за счет алкилирования остатка гистидина [254, 255].

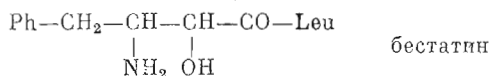
III.3.2. Ингибиторы металлсодержащих амидогидролаз

В последние годы наиболее интенсивно ведутся работы в области поиска ингибиторов металлсодержащих амидогидролаз. Этот интерес обусловлен тем, что данные ферменты включены, в частности, в важнейшие процессы регуляции кровяного давления и их специфические ингибиторы представляют значительную фармакотерапевтическую ценность [256].

Для них, как и для сериновых амидогидролаз, в качестве ингибиторов известны *заместительные борные кислоты* [207, 257], *альдегидные* [258, 259] и *трифторметилкетонные аналоги* [253] специфических субстратов.

С помощью математических расчетов, кинетических исследований и спектральных методов установлено, что 1-бутанборная кислота действует по типу аналога переходного состояния по отношению к аминокептидазе из *Aeromonas proteolytica* (КФ 3.4.11.10) [260], причем в ее взаимодействии с ферментом определяющую роль играет ферментсвязанный ион Zn^{2+} . В свою очередь, для взаимодействия субстратоподобного ингибитора, амида валериановой кислоты, с ферментом ион Zn^{2+} не существует. Такая разница позволяет предположить, что ферментсвязанный ион Zn^{2+} взаимодействует с субстратом на стадии каталитического превращения последнего, но не включается в образование комплекса Михаэлиса [257].

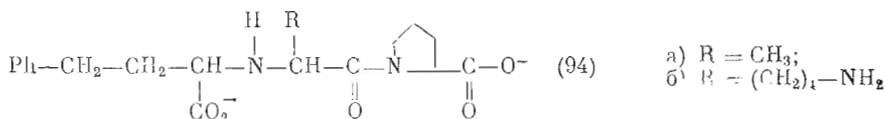
Ингибитором карбоксипептидазы А является и альдегид $HC(O)CH_2CH_2 \cdot (CH_2Ph)COOH$ (95) ($K_i = 4,8 \cdot 10^{-7}$ М) [258]. Предполагают, что комплекс гидрата этого соединения с активным центром моделирует комплекс, образующийся при прямой атаке водой ферментсвязанного пептидного субстрата (схема 8). Основанием для такого предположения послужило рассмотрение альдегида (95) как аналога известного ингибитора аминокептидаз бестатина, механизм взаимодействия которого с цитозольной аминокептидазой (КФ 3.4.11.1) изучался с помощью изотопного обмена в H_2 [^{18}O] [259]:



В отношении трифторметилкетонов, которые являются достаточно эффективными ингибиторами металлзависимых ферментов (например, константа ингибирования карбоксипептидазы А 2-бензил-4-оксо-5,5,5-трифторпентановой кислотой составляет $2 \cdot 10^{-7}$ М), данные по механизму действия еще менее определены. Вероятно, эффективное ингибирование — результат образования прочно связанного тетраэдрического аддукта, который подобен тетраэдрическому интермедиату, образуемому в ходе гидролиза субстратов. Однако, является ли этот аддукт гидратированным кетоном или образуется при присоединении остатка Glu^{270} к трифторметилкетону, не установлено [253].

Помимо вышерассмотренных ингибиторов для металлсодержащих амидогидролаз есть ингибиторы, не имеющие структурных аналогов среди ингибиторов других классов амидогидролаз.

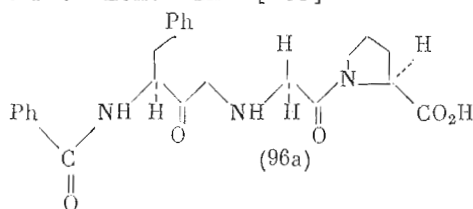
N-Карбоксиалкилдипептиды. Ингибиторы этого класса были получены сравнительно недавно, но уже нашли применение в фармакологической практике [261]. Такие соединения в своей структуре вместо карбонильного атома углерода расщепляемой амидной связи субстрата содержат тетраэдрическую карбоксиметильную группировку [262].



Данные рентгеноструктурных исследований свидетельствуют о том, что оба атома кислорода N-карбоксиметильной группировки участвуют в связывании Zn^{2+} [263]. Возможно, именно этот бидентантный способ связывания обеспечивает преимущественное средство ингибиторов данного типа к ферменту по сравнению с субстратами, для которых координационная связь с ионом Zn^{2+} в комплексе Михаэлиса не реализуется [264]. Интересно, что такого типа соединение N^{α} -[(S)-1-карбокси-3-фенилпропил]-L-аланил-L-пролин, или так называемый эналаприлат (94a), обладает исключительно высоким средством к пептидилдипептидазе ($K_1 = 2 \cdot 10^{-10}$ M), однако с введением в его структуру в положение, соседнее с фенильным кольцом, дополнительного N-ацильного фрагмента, способного к взаимодействию с S_2 -подцентром связывания на ферменте, эффективность ингибитора не только не возрастает, но даже резко падает [261].

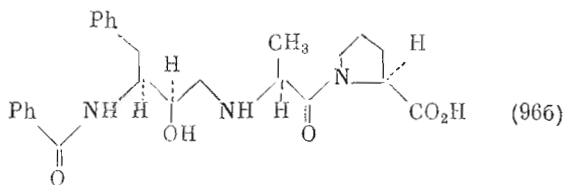
Детальное кинетическое исследование механизма ингибирования пептидилдипептидазы из легкого кролика эналаприлатом (94a) и соответствующим L-лизил-L-пролилпроизводным, лизиноприлом (94б) ($K_1 = 1 \cdot 10^{-10}$ M), позволило установить, что эти соединения действуют по типу сочетанных субстратов [68].

Кетометилдипептиды и их восстановленные (спиртовые) производные. По отношению ко всем Zn^{2+} -зависимым амидогидролазам высоким средством характеризуются ингибиторы, имеющие в своей структуре группировку, способную образовывать комплексы с металлами. Негидролизуемые кетометиленовые аналоги субстратов, в структуру которых между карбонильным углеродом и атомом азота расщепляемой амидной связи вводится метиленовое звено, являются уникальными ингибиторами (значения K_1 порядка 10^{-9} M) пептидилдипептидазы в том смысле, что они не содержат в явном виде группировку, способную вступать в координационное взаимодействие с ионом Zn^{2+} [265].



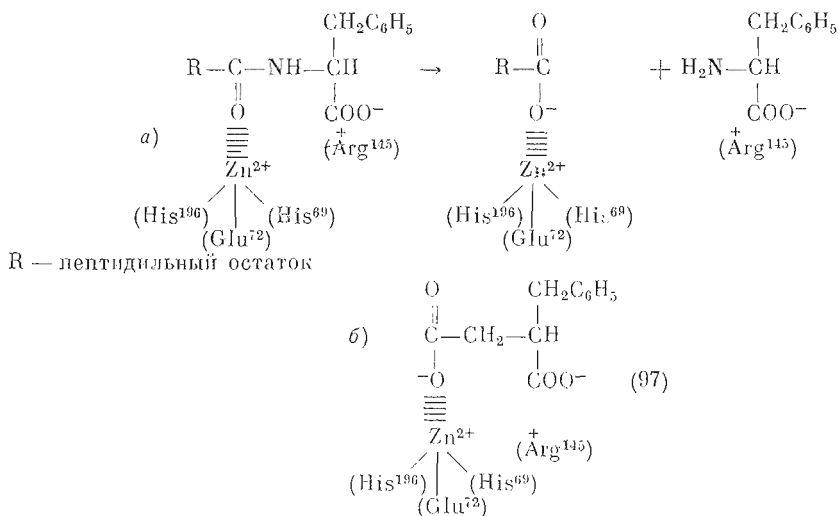
С учетом способности кетоаналога (46a) пепстатина при связывании с ферментом присоединять молекулу воды с образованием тетраэдрического интермедиата (46б) [266] было предположено, что родственные ему соединения типа (96a) на ферменте превращаются под действием либо молекулы воды, либо нуклеофила активного центра в тетраэдрический аддукт, уже способный связывать ион Zn^{2+} . Подтверждением этой гипотезы служит то обстоятельство, что Zn^{2+} задействован только на гидролитической стадии катализа и не существует для первоначального связывания субстрата в комплексе Михаэлиса. Следовательно, взаимодействие кетопроизводного с Zn^{2+} происходит на стадии, имитирующей процесс нормального каталитического гидролиза субстрата [267]. Такому взаимодействию способствует также то, что кетонный карбонил по стереохимическим параметрам близок карбонилу амидной группировки [268].

Для моделирования переходного состояния субстрата в реакции ферментативного расщепления амидной связи предлагаются также ингибиторы типа (96б), полученные на основе аминокислотной модификации молекулы специфического субстрата пептидилдипептидазы. Значение K_1 в случае (R)-изомера (96б) составляет $2,8 \cdot 10^{-8}$ M [269].



Мультисубстратные аналоги. Для карбоксипептидазы А известен сильный ингибитор — *L*-бензиляргинная кислота (97) ($K_i=6,4 \cdot 10^{-9}$ М) [270]. Предполагают, что она моделирует гипотетический комплекс сближения продуктов прямой реакции в активном центре фермента и является мультисубстратным аналогом для обратной реакции (схема 23). рН-Зависимость константы ингибирования указывает на взаимодействие кислоты (97) с ферментом в форме моноаниона, но данные ^{13}C -ЯМР-спектроскопии свидетельствуют о том, что ингибитор в действительности связывается как дианион. По-видимому, в процессе связывания соединения (97) осуществляется протонирование какой-то функциональной группировки фермента [48].

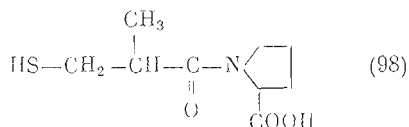
Схема 23



Механизм реакции, катализируемой карбоксипептидазой А (а), и связывание мультисубстратного аналога *L*-бензиляргинной кислоты (97) на активном центре фермента (б)

Следует отметить, что по аналогии с соединением (97) были получены ингибиторы, содержащие аминокислотные остатки специфического субстрата, для дипептидилкарбоксипептидазы — фермента, включенного, как известно, в ренин-ангиотензиновую систему организма человека. Эти соединения обладали антигипертензивной активностью [271].

Соединение (97) послужило прототипом для создания ингибитора карбоксипептидазы А другого типа — (2*R*, 3*S*)-2-бензил-3-меркаптопропионовой кислоты, — содержащего меркаптогруппировку для комплексообразования с металлами и являющегося аналогом кантоприла (98) [272].



Кантоприл (98), эффективный конкурентный ингибитор пептидилдиэстеразы ($K_i=4,7 \cdot 10^{-9}$ М), широко используется как гипотензивное средство [4]. Это соединение не оказывает ингибирующего действия на другие протеазы в концентрации до 10^{-3} М. Исключительно высокое сродство кантоприла (98) к пептидилдиэстеразе предисполагает его комплементарность активному центру. Данные по кантоприлу в совокупности с результатами по связыванию его аналогов позволили сделать предположение о топографии активного центра данного фермента [272]. Связывание кан-

топрила, по-видимому, обуславливается несколькими типами взаимодействий: координационной связью меркаптогруппировки с ионом Zn^{2+} , водородной связью карбонильной группы, ионной связью карбоксильной функции, а также гидрофобными взаимодействиями CH_3 -группы и пролинового кольца [273].

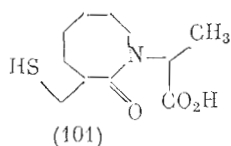
Помимо вышерассмотренных ингибиторов Zn^{2+} -зависимых амидогидролаз следует упомянуть еще один тип ингибиторов, имеющих в своей структуре группировку, способную образовывать комплексы с металлами. Так, гидроксамовые производные аминокислот Val и Leu ингибируют аминоклептидазу из *Aeromonas proteolytica*, причем фермент проявляет стереоспецифичность при взаимодействии с этими производными (только D-изомеры являются эффективными ингибиторами — K_i порядка 10^{-9} М) [274].

Конформационные ингибиторы. Для ингибиторов термоллизина бензилоксикарбонил-L-фенилаланина (99) и β -фенилпропионил-L-фенилаланина (100), являющихся аналогами субстрата, Phe-Ala, были проведены прямые исследования конформаций молекул в ферментсвязанном и свободном состояниях соответственно с помощью рентгеноструктурного анализа и метода ЯМР [275, 276]. Оказалось, что в различных растворителях конформация Phe-Ala и соединений (99) и (100) в области $C^\alpha-C^\beta$ - и $C^\alpha-N$ -связей, а также соотношение конформеров остаются близкими [276]. Однако в связанном на ферменте состоянии конформации этих соединений различаются [275]. Было установлено, что конформация производного (99) на ферменте соответствует конформеру субстрата с наиболее низкой энергией в растворе, а для производного (100) ситуация была обратной. Кроме того, было показано, что конформационные изменения в активном центре термоллизина при связывании аналогов (99) и (100) незначительны. Предполагают, что потери энтропии при связывании менее устойчивого конформера (99) или (100) могут компенсироваться энергией фермент-ингибиторных взаимодействий [277].

На основании полученных данных удалось сделать оценку влияния конформационной подвижности молекулы ингибитора на эффективность его действия [276]. Установлено, что, если константа равновесия конформационного перехода между ротамерами субстрата хотя бы в 100 раз превышает скорость его ферментативного превращения, относительное содержание в растворе конформеров соответствующего ингибитора не будет влиять на его K_i [276].

Значительной предсказательной силой в создании эффективных ингибиторов ферментов обладает метод теоретического конформационного анализа [278].

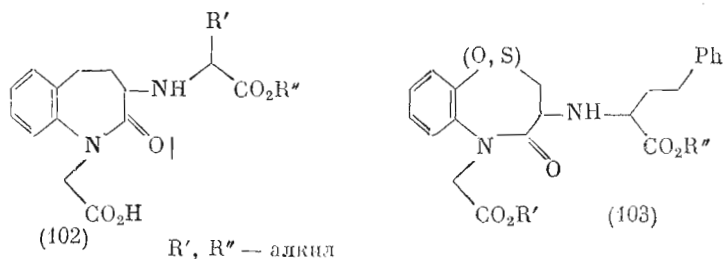
С учетом стерических и структурных ограничений была определена конформация калтоприла, которую он имеет, будучи связанным пептидилдипептидазой [279]. Теоретические расчеты показывают, что наилучшим образом это конформационное состояние может быть передано 7–8-членной структурой лактамного кольца. Наиболее эффективным из этой серии соединений оказалось производное (101) ($K_i=5,3 \cdot 10^{-8}$ М), которое имеет в своей структуре все существенные для связывания в активном центре группировки:



В связи с этим интересно отметить, что среди низкоэнергетических конформаций всех известных ингибиторов пептидилдипептидазы, включая фосфонаты, существует единая общая конформация, соответствующая конформации 8-членного лактамного кольца [280].

Дальнейшие исследования по поиску конформационно-ограниченных аналогов пептидилдипептидазы привели к производным 1-бензазепин-2-она (102) [281] и 1,5-бензотиазепина (103) [282], проявляющим актив-

ность, соизмеримую с ингибиторным действием эналаприлата (94а):

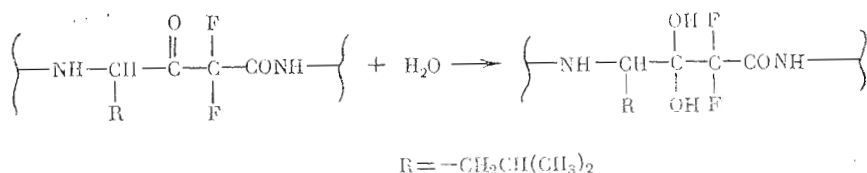


III.3.3. Карбоксильные протеиназы

Для данных ферментов помимо ранее рассмотренного фосфорорганического аналога типа (44) и пепстатина (43) предлагаются несколько типов ингибиторов, действующих по типу сочетанных субстратов.

Кетоаналог пепстатина (46а), как свидетельствуют данные ¹³С-ЯМР-исследований [266, 283], превращается в тетраэдрический гем-диольный аддукт (46б) посредством катализируемого ферментом присоединения воды. Этот псевдосубстрат — в 50 раз менее эффективный ингибитор пепсина, чем соответствующий статинсодержащий пептид (43). Такое понижение сродства к ферменту объясняют слабой тенденцией кетонов подвергаться превращению в тетраэдрические аддукты под действием нуклеофилов. Введение электроакцепторных атомов фтора по метиленовому углероду, соседнему с карбонилем, привело к созданию дифторстатонсодержащих пептидов (104), которые благодаря их повышенной способности к гидратации (схема 24) оказались эффективными ингибиторами пепсина ($K_1=6 \cdot 10^{-11}$ М) [253] и ренина ($K_1=5,2 \cdot 10^{-10}$ М) [284].

Схема 24



Реакция гидратации дифторсодержащих кетоаналогов пептидов

В этой связи представляет интерес то, что для ренина недавно был предложен новый класс ингибиторов на основе 1,2-гликолей дипептидов. Так, бутилоксикарбоилфенилаланил-N-[(1S,2R)-1-бензил-(2,3-дигидроксипропил)]-L-лейцинамид при ингибировании ренина из сыворотки человека имеет $K_1=8,7 \cdot 10^{-6}$ М [285]. Соединения данного типа представляют собой стабильные аналоги геминального гликоля, образующегося при связывании соответствующего альдегидного ингибитора на ферменте.

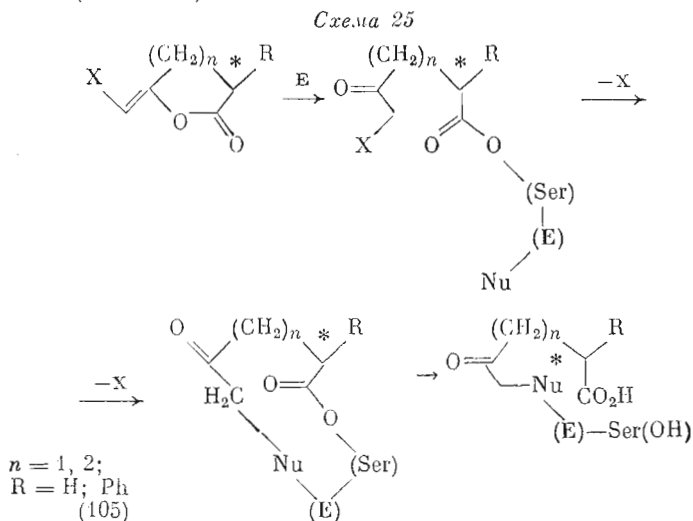
III.3.4. Субстраты-«самоубийцы» амидогидролаз*

В последние годы достигнут значительный прогресс в области создания ферментактивируемых необратимых ингибиторов сериновых протеиназ. Недавно были синтезированы галоиденоллактоны [286], 6-хлор-2-пироны [287, 288], пептидилкарбаматы [289], замещенные изобензофураноны [290], 3,4-дихлоризокумарин [291]. Принцип их действия основан на том, что эти соединения подвергаются гидролитическому расщеплению, одновременно инактивируя фермент.

Например, галоиденоллактоны (105) реагируют с сериновыми амидогидролазами с образованием ацилфермента, в результате чего высвобож-

* Обзор синкаталитических ингибиторов представлен в монографии [31].

дается активная галоидкетонная группировка, которая способна алкилировать нуклеофил активного центра, что приводит к необратимой инактивации фермента (схема 25)



Ингибирование сериновых амидогидролаз галоиденоллактонами

IV. Использование методов оценки количественной взаимосвязи между структурой и биологической активностью вещества (QSAR) и методов математического моделирования в рациональном поиске специфических ингибиторов ферментов

Итак, рассмотренный в обзоре материал свидетельствует о возможности использования качественно различных модификаций структуры специфического субстрата при создании специфических ингибиторов ферментов. В связи с рациональным поиском эффективных ингибиторов представляет интерес установление количественных пределов допустимых вариаций в структуре.

В настоящее время прогресс в рациональном поиске специфических ингибиторов в значительной мере стимулируется привлечением компьютерных статистических методов [292], с помощью которых возможно установить корреляционную связь между структурными параметрами соединения и проявляемой им биологической активностью. Предложено несколько методов описания биологической активности, в основе которых лежат принципы либо множественного регрессионного анализа, либо теории распознавания образов (ТРО) [293]. Аддитивно-статистическая модель Фри-Вильсона и физико-химическая модель Ганша непосредственно предназначены для нахождения корреляционных уравнений «структура — активность» и основаны на использовании регрессионного подхода [294, 295]. Поскольку этот подход применим лишь в том случае, когда зависимость биологической активности от физико-химических параметров является непрерывной функцией, он в основном ограничивается рамками определенного ряда близко родственных химических соединений и не годится для поиска новых рядов биологически активных соединений. Предсказательная способность ТРО в последнем аспекте значительно выше. Для количественного описания связи «структура — активность» в рамках ТРО наиболее широко применяются факторный и дискриминантный анализ, а также логико-структурный подход [296—298]. Методы ТРО позволяют провести оптимальное прогнозирование наиболее активных соединений без нахождения корреляционных уравнений типа «структура — активность». Разница между всеми предлагаемыми моделями заключается главным образом в способе параметризации структурных признаков.

В каждом конкретном случае выбор между непараметрическим методом Фри-Вильсона, параметрическим методом Ганша или методами ТРО зависит от количества имеющихся данных по биологическим испытаниям, числа испытуемых соединений, степени variability результатов и т. д. Сейчас наибольшее распространение получил полумэмпирический метод Ганша, согласно которому биологическая активность рассматривается как функция липофильности молекул, а также их электронных и стерических характеристик. В ряду известных ингибиторов некоторых протеиназ, тетрагидрофолатдегидрогеназы (КФ 1.5.1.3), моноаминоксидазы (КФ 1.4.3.4) и других с помощью этого метода удалось количественно оценить вклад отдельных группировок структуры ингибитора во взаимодействие с ферментом и установить направление оптимизации структуры с целью получения наиболее эффективных ингибиторов [299–304].

Создание специфических ингибиторов с помощью теоретических выкладок представляет несомненный интерес. Однако следует подчеркнуть формализованную сторону этого подхода, состоящую в том, что основные условия, позволяющие применять математические функции для прогнозирования новых соединений с заданной активностью, определяются уже не законами биофизической химии, а законами математической статистики. В этой связи особенно остро встает необходимость математического выражения всех факторов, обуславливающих биологическую активность соединения, а именно химическую, пространственную и электронную структуру молекулы и ее физико-химические свойства*. Следует подчеркнуть, что существующие до сих пор корреляции не могут решить всех вопросов о связи между структурой и биологической активностью. В предложенных моделях обычно рассматриваются электронная структура и физико-химические свойства молекулы, может быть учтена ее топология, т. е. ее первичная химическая структура — число химических связей, разветвленность и т. п., но не пространственная структура (в частности, конформация), точный учет которой требует разработки новых подходов.

Методы молекулярного моделирования и молекулярной графики. В решении проблемы, связанной с динамическими аспектами пространственной структуры молекулы ингибитора и необходимостью учитывать изменения ее конформации при смене условий окружения и в процессе связывания на ферменте, намечилось направление, состоящее в использовании методов ЯМР и рентгеноструктурного анализа в совокупности с теоретическими методами конформационного анализа, молекулярного моделирования и компьютерной графики [306, 307]. С помощью такого подхода удается, в частности, определить структурные элементы, обеспечивающие оптимальное связывание ингибитора в активном центре фермента [306, 307].

За последние 4–5 лет значительный прогресс в области молекулярного моделирования был достигнут за счет облегчения компьютерного представления трехмерной структуры молекул [19]. С помощью молекулярной графики поиск новых активных аналогов осуществляется путем конструирования трехмерной конформации «нового» соединения, имитирующей «замороженную» активную конформацию известного активного соединения [19]. Кроме того, в сочетании с данными рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии методы молекулярного моделирования дают возможность вычислить константы связывания лиганда с рецептором [19, 308, 309]. Вычисленные таким образом константы ингибирования и скорости инактивации химотрипсина галоидеполактонами хорошо совпадали с экспериментально полученными данными [310].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре изложены представления о возможных подходах к целенаправленному синтезу специфических ингибиторов, существующие в литературе на настоящий момент. Вследствие интенсивного развития данной

* Например, в работе [305] обсуждается возможность математического описания структурных изменений ингибитора за счет взаимодействия с окружающей средой.

области есть основания полагать, что некоторые из рассмотренных положений будут расширены и уточнены в самом ближайшем будущем.

Автор считает своим приятным долгом выразить благодарность Р. М. Хомутов, В. К. Антонову, Е. С. Северицу, Н. Б. Тарусовой, В. А. Шибневу за обсуждение и ценные критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М.: Мир, 1982, т. 2, гл. 8.
2. Хомутов Р. М., Денисова Г. Ф., Хомутов А. Р., Белостоцкая К. М., Шлосман Р. Б., Арамонова Е. Ю. Биоорганическая химия, 1985, т. 11, № 11, с. 1574—1576.
3. Преображенская М. П., Мельник С. Я. Аналоги компонентов нуклеиновых кислот — ингибиторы нуклеинового обмена. М.: Итоги науки и техники, сер. «Биоорганическая химия», 1984, т. 1.
4. Enzyme inhibitors as drugs/Ed. Sandler M. Baltimore, MD: University Park Press, 1980.
5. Ching Chang Wang. J. Med. Chem., 1984, v. 27, № 1, p. 15—19.
6. Elion G. Cancer Res., 1985, v. 45, № 7, p. 2943—2950.
7. Leason M., Cunliffe D., Parkin D., Lea P., Mifflin B. Phytochem., 1982, v. 21, № 4, p. 855—857.
8. Blackburn M. Chemistry and Industry, 1981, № 7, p. 134—138.
9. Fox M. Nature, 1984, v. 307, № 5948, p. 212—213.
10. Stark G., Bartlett P. Pharmacol. Ther., 1983, v. 23, № 1, p. 45—78.
11. Stark G., Wahl G. Ann. Rev. Biochem., 1984, v. 53, p. 447—491.
12. Jencs W. In: Current aspects of biochemical energetics/Eds Kaplan N., Kennedy E. N. Y.: Acad. Press, 1966, p. 273—298.
13. Хомутов Р. М., Северин Е. С. В кн.: Современные проблемы химии пептидов и белков. М.: Наука, 1969.
14. Хомутов Р. М., Северин Е. С., Гуляев Н. Н. Изв. АН СССР, 1966, № 11, с. 1990—1993.
15. Хомутов Р. М., Северин Е. С., Ковалева Г. К., Гуляев Н. Н., Глущев Н. В., Сащенко Л. П. В сб.: Химия и биология пиродоксалевого катализа. М.: Наука, 1968, с. 381—391.
16. Wolfenden R. Ann. Rev. Biophys. and Bioeng., 1976, v. 5, p. 271—306.
17. Lienhard G. Science, 1973, v. 180, p. 149—154.
18. Bartlett P., Hunt J., Adams J., Gehret J.-C. Bioorgan. Chem., 1978, v. 7, № 4, p. 421—436.
19. Hopfinger A. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 9, p. 1133—1139.
20. Лошадкин И. А. Журн. Вsesоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1971, т. XVI, № 4, с. 403—411.
21. Ферри Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980.
22. Браунштейн А. Е., Карпейский М. Я. Журн. Вsesоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1971, т. XVI, с. 403—411.
23. Карпейский М. Я. Молекулярная биология, 1976, т. 10, № 6, с. 1197—1210.
24. Клясов А. А., Березин И. В. Ферментативный катализ. М.: МГУ, 1980.
25. Brand L., Lowenstein J. Biochemistry, 1978, v. 17, № 8, p. 1365—1370.
26. Kluger R., Pike D. J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, № 13, p. 4504—4506.
27. O'Brien T., Kluger R., Pike D., Gennis R. Biochem. et biophys. acta, 1980, v. 613, № 1, p. 10—17.
28. Ehgel R. Chem. Rev., 1977, v. 77, № 1, p. 349—367.
29. Adams S., Sparkes M., Dixon H. Biochem. J., 1983, v. 213, № 1, p. 211—215.
30. Карпейский М. Я., Яковлев Г. И., Антонов В. К. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, № 5, с. 645—654.
31. Антонов В. К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1983.
32. Ivanov V., Karpeisky M. Adv. Enzymol., 1969, v. 32, p. 21—53.
33. Severin E., Gnuchev N., Kovaleva G., Gulyaev N., Khomutov R. In: Pyridoxal catalysis's enzymes and model systems. I. U. B. Symposium Series, 1968, v. 35, p. 651—662.
34. Северин Е. С., Ковалева Г. К., Туманян В. Г., Хомутов Р. М. В кн.: Структура и функции активных центров ферментов. М.: Наука, 1974, с. 108—139.
35. Крицын А. М., Михайлов С. П., Флорентьев В. Л. Молекулярная биология, 1975, т. 9, № 1, с. 121—125.
36. Walsh C. Mol. Biol., Biochem. and Biophys. Chemical Recognition in Biology/Eds Chapeville F., Haenni A.-L. Berlin — Heidelberg — N. Y.: Springer-Verlag, 1980, v. 32, p. 62—77.
37. Enzyme-activated irreversible inhibitors/Eds Seiler N., Jung M., Koch-Weser J. Amsterdam, Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1978.
38. Rando R. Accounts Chem. Res., 1975, v. 8, № 8, p. 281—288.
39. Rando R. Science, 1974, v. 185, № 4146, p. 320—324.
40. John R. In: Enzyme Inhibitors as Drugs/Ed. Sandler M. Baltimore M. D.: University Park Press, 1980, p. 73—93.
41. Walsh C. Tetrahedron, 1982, v. 38, № 7, p. 871—909.
42. Penning T. Trends Pharmacol. Sci., 1983, v. 4, № 5, p. 212—217.
43. Abeles R., Maycock A. Accounts Chem. Res., 1976, v. 9, № 9, p. 313—319.
44. Cristopherson R., Duggleby R. Eur. J. Biochem., 1983, v. 134, № 2, p. 331—335.

45. Affinity Labeling. Methods in Enzymol./Eds Jacoby W., Wilchek M. N. Y.— San Francisco — I.: Acad. Press, 1977, v. 46.
46. *Chakravarty P., Krafft G., Katzenellenbogen J. J. Biol. Chem.*, 1982, v. 257, № 2, p. 610—612.
47. *Holmes M., Tronzud D., Matthews B. Biochemistry*, 1983, v. 749, № 1, p. 84—90.
48. *Wolfenden R., Anderson L. In: Chemical approaches to understanding enzyme catalysis. Biomimetic chemistry and transition-state analogs/Eds Green B., Ashani Y., Chipman D. Amsterdam: Elsevier, 1982, p. 287—295.*
49. *Wolfenden R. In: Mol. Biol., Biochem. and Biophys. Chemical Recognition in Biology/Eds Chapeville F., Haenni A.-L. Berlin — Heidelberg — N. Y.: Springer-Verlag, 1980, v. 32, p. 43—49.*
50. *Jencs W. In: Mol. Biol., Biochem. and Biophys. Chemical Recognition in Biology/Eds Chapeville F., Haenni A.-L. Berlin — Heidelberg — N. Y.: Springer-Verlag, 1980, v. 32, p. 3—25.*
51. *Мецлер Д. Бюхимия. М.: Мир, 1980, т. 2, с. 49.*
52. *Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972.*
53. *Jencs W. Adv. in Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1975, v. 43, p. 219—410.
54. *Глассстон С., Лейдлер К., Эйринг Г. Теория абсолютных скоростей реакций. М.: ИЛ, 1948.*
55. *Wolfenden R. Nature*, 1969, v. 223, № 5207, p. 704—705.
56. *Wolfenden R. Accounts Chem. Res.*, 1972, v. 5, № 1, p. 10—18.
57. *Transition states of biochemical processes/Eds Gandor R., Schowen R. N. Y.— L.: Plenum Press, 1978.*
58. *Schray K., Klinman J. Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, v. 57, № 3, p. 641—648.
59. *Hammond G. J. Amer. Chem. Soc.*, 1955, v. 77, № 2, p. 334—338.
60. *Wolfenden R. Meth. Enzymol.*, 1977, v. 46, p. 15—28.
61. *Lindquist R. In: Drug Design/Ed. Ariens. N. Y.: Acad. Press, 1975, v. 5, p. 24.*
62. *Frieden C., Kurz L., Gilbert H. Biochemistry*, 1980, v. 19, № 23, p. 5303—5309.
63. *Danonberg P., Lockshin A. Adv. Enzyme Regul.*, 1982, № 20, p. 99—110.
64. *Morrison J. Trends Biochem. Sci.*, 1982, v. 7, № 3, p. 102—105.
65. *Cha S. Biochem. Pharmacol.*, 1975, v. 24, p. 2177—2185.
66. *Lienhard G. In: Enzyme inhibitors as drugs/Ed. Sandler M. Baltimore M. D.: University Park Press, 1980, p. 43—51.*
67. *Rich D. J. Med. Chem.*, 1985, v. 28, № 3, p. 263—273.
68. *Bull H., Thornberry N., Cordes M., Patchett A., Cordes E. J. Biol. Chem.*, 1985, v. 260, № 5, p. 2952—2962.
69. *Jencs W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, v. 78, № 7, p. 4046—4050.
70. *Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. М.: Мир, 1970.*
71. *Hutchinson D. Organophosphorus Chem.*, 1973, v. 4, p. 143—175.
72. *Yount R. Adv. in Enzymol.*, 1975, v. 43, p. 1—57.
73. *Тарусова Н. Б., Шумянцева В. В., Крылов А. С., Карпейский М. Я., Хомутов Р. М. Биоорг. химия*, 1983, т. 9, № 6, с. 838—843.
74. *Zamecnik P. Anal. Biochem.*, 1983, v. 134, № 1, p. 1—10.
75. *McAlleese S., Fothergill-Gilmore L., Dixon H. Biochem. J.*, 1985, v. 230, № 2, p. 535—542.
76. *Stribling D. Biochem. J.*, 1974, v. 141, № 3, p. 725—728.
77. *Яковлева Г. М., Острожский Ю. М. Биоорг. химия*, 1985, т. 11, № 9, с. 1279—1282.
78. *Blackburn M., Kent D., Kolkman F. J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1981, p. 1188—1190.
79. *Lewara N., Shen P., McKenna C. Fed. Proc.*, 1982, v. 41, № 3, p. 860.
80. *McClard R., Fischer A., Mauldin S., Jones M. Bioorg. Chem.*, 1984, v. 12, № 4, p. 339—348.
81. *Nause J., Rosenberg H. Biochim. et biophys. acta*, 1968, v. 165, № 3, p. 438—447.
82. *Smith J., Giegel D. Arch. Biochem. and Biophys.*, 1982, v. 213, № 2, p. 595—601.
83. *Dumora J., Lacoste A.-C., Cassaigne A. Eur. J. Biochem.*, 1983, v. 133, № 1, p. 119—125.
84. *Milner-White J., Rycroft D. Eur. J. Biochem.*, 1983, v. 133, № 1, p. 169—172.
85. *Dixon H., Sparkes M. Biochem. J.*, 1974, v. 141, № 3, p. 715—719.
86. *Adams P., Harrison R., Inch T. Biochem. J.*, 1974, v. 141, № 3, p. 729—732.
87. *Шебеста К., Голы А., Горюка К., Весель И., Розенберг И. В кн.: Физико-химические проблемы ферментативного катализа. М.: Наука, 1984, с. 90—96.*
88. *Jung A., Bornand J., Mermillod B., Edouard C., Meuneir P. Cancer Res.*, 1984, v. 44, № 7, p. 3007—3011.
89. *Вельтищев Ю. Е., Юрьева Э. А., Кудрин А. Н., Корытный А. М., Архипова О. Г., Алексеева Н. В., Кришцикая Л. В., Щербакова В. К., Варсанович Е. А. Хим.-фармацевт. журн.*, 1983, № 3, с. 282—290.
90. *Hutchinson D., Clod P., Naugh M. Phosphorus and Sulfur*, 1983, v. 14, p. 285—293.
91. *Rozovskaya T., Rechinsky V., Bibilashvili R., Karpeisky M., Tarusova N., Khotulov R., Dixon H. Biochem. J.*, 1984, v. 224, № 2, p. 645—650.
92. *Yamauchi K., Mitsuda Y., Kinoshita M. Bull. Chem. Soc. Japan*, 1975, v. 48, p. 3285—3286.
93. *Kafarski P., Mastalerz P. Roczn. chem. Ann. Soc. Chem. Polon.*, 1977, v. 51, p. 433—437.

94. Тарусова Н. Б., Гандурина И. А., Жуков Ю. Н., Яковлева Г. М., Хомутов Р. М. Изв. АН СССР, 1979, № 7, с. 1596—1599.
95. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Жуков Ю. Н., Гандурина И. А. Изв. АН СССР, 1979, № 9, с. 2118—2122.
96. Kluger R., Nakaoka K., Tsui W.-C. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, № 23, p. 7388—7392.
97. Kluger R., Tsui W.-C. Can. J. Biochem., 1981, v. 59, № 10, p. 810—815.
98. Kluger R., Nakaoka K. Biochemistry, 1974, v. 13, № 5, p. 910—914.
99. Kluger R., Chin J., Smyth T. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 4, p. 884—888.
100. Kluger R., Smyth T. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 5, p. 1214—1216.
101. Yacobson G., Stark G. In: Enzymes (3-rd edn.)/Ed. Boyer P. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. 9, p. 226—308.
102. Swyryd E., Seaver S., Stark G. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 21, p. 6945—6950.
103. Monako H., Foote J. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 25, p. 7900—7904.
104. Foote J., Lauritzen A., Lipscomb W. J. Biol. Chem., 1985, v. 260, № 17, p. 9624—9629.
105. Foote J., Schachman H. J. Mol. Biol., 1985, v. 186, № 1, p. 175—184.
106. Monks A., Anderson L., Strong J., Cysyk R. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 22, p. 13564—13569.
107. Kafarski P., Lejezak B., Mastalerz P., Dus D., Radzikowski C. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 11, p. 1553—1555.
108. Farrington K., Kumar A., Wedler F. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 11, p. 1668—1673.
109. Wedler F., Horn B. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 23, p. 7530—7538.
110. Wedler F., Horn B., Roby W. Arch. Biochem. and Biophys., 1980, v. 202, № 2, p. 482—490.
111. Southgate C., Dixon H. Biochem. J., 1978, v. 175, № 5, p. 461—465.
112. Pike D., Beevers L. Biochim. et biophys. acta, 1982, v. 708, № 2, p. 203—209.
113. Яковлева Г. М., Тарусова Н. Б., Бирюков А. И., Хомутов Р. М. Биоорган. химия, 1984, т. 5, № 2, с. 213—219.
114. Stein R., Elroud J., Showen R. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 8, p. 2446—2452.
115. Showen R. In: Transition states of biochemical processes/Eds Gandor R., Shourn R. N. Y.—L.: Plenum Press, 1978, p. 77—114.
116. Bilkadi Z., De Lorimier R., Kirsch J. J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 15, p. 4317—4322.
117. Biriukov A. I., Ishmuratov B. Kh., Khomutov R. M. FEBS Lett., 1978, v. 91, № 2, p. 249—252.
118. Хомутов Р. М., Осипова Т. И., Бирюков А. И., Ишмуратов Б. Х. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 1, с. 56—63.
119. Тарусова Н. Б., Новикова З. С., Прищепенко А. А., Яковлева Г. М., Хомутов Р. М. Изв. АН СССР, 1982, № 2, с. 402—404.
120. Cassio D., Robert-Gero M., Shire D., Waller J.-P. FEBS Lett., 1973, v. 35, № 3, p. 827—835.
121. Cassio D., Lemoine F., Waller J.-P., Boissonas R. Biochemistry, 1967, v. 6, № 3, p. 827—835.
122. Robert-Gero M., Lawrence F., Vigier P. Cancer Res., 1975, v. 35, № 12, p. 3571—3576.
123. Jacobsen N., Bartlett P. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, № 3, p. 654—657.
124. Galardy R., Kontoyiannidou-Ostrem V., Kortylewicz Z. Biochemistry, 1983, v. 22, № 8, p. 1990—1995.
125. Galardy R., Grobelny D. Biochemistry, 1983, v. 22, № 19, p. 4556—4561.
126. Bartlett P., Marlowe C. Biochemistry, 1983, v. 22, № 20, p. 4618—4624.
127. Yamauchi K., Ohtsuki S., Kinoshita M. Biochim. et biophys. acta, 1985, v. 827, № 3, p. 275—282.
128. Thorsett E., Harris E., Peterson E., Greenlee W., Patchett A., Ulm E., Vassil T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, № 7, p. 2176—2180.
129. Elliott R., Marks N., Berg M., Portoghese P. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 9, p. 1208—1216.
130. Sandler M., Witzel H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1985, v. 132, № 2, p. 681—687.
131. Weaver L., Kester W., Matthews B. J. Mol. Biol., 1977, v. 114, № 1, p. 119—132.
132. Grobelny D., Goli U., Galardy R. Biochem. J., 1985, v. 232, № 1, p. 15—19.
133. Bartlett P., Kezer W. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 15, p. 4283—4285.
134. Rich D., Bernatowicz M., Agarwal N., Kawai M., Salituro F., Schmidt P. Biochemistry, 1985, v. 24, № 13, p. 3165—3173.
135. Andrews P., Carson J., Caselli A., Spark M., Woods R. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 3, p. 393—399.
136. Aldridge W. In: Enzyme inhibitors as drugs/Ed. Sandler M. Baltimore, M. D.: University Park Press, 1980, p. 115—125.
137. Ashani J., Green B. In: Chemical approaches to understanding enzyme catalysis. Biomimetic chemistry and transition-state analogs/Eds Green B., Ashani Y., Chipman D. Amsterdam: Elsevier, 1982, p. 169—187.
138. Herrador M., Buruaga J., Suarez D. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 1, p. 146—149.
139. Masson P., Goasdoue J.-L. Biochim. et biophys. acta, 1986, v. 869, № 3, p. 304—313.
140. Lambden L., Bartlett P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 112, № 3, p. 1085—1090.
141. Berman H., Olshefski D., Gilbert M., Decker M. J. Biol. Chem., 1985, v. 260, № 6, p. 3462—3468.

142. Яковлева Г. М., Тарусова Н. Б., Викторова Л. С., Куханова М. К., Хомутов Р. М. Биорган. химия, 1981, т. 7, № 2, с. 248–255.
143. Tarrusova N. B., Yakovleva G. M., Victorova L. S., Kukhanova M. K., Khomutov R. M. FEBS Lett., 1981, v. 130, № 1, p. 85–87.
144. Тарусова Н. Б., Куханова М. К., Хомутов Р. М. Биорган. химия, 1978, т. 4, № 9, с. 1175–1180.
145. Zemlicka J., Chladek S. Coll. Czech. Chem. Commun., 1969, v. 34, p. 1007–1014.
146. Kukhanova M. K., Victorova L. S., Burd S. V., Gottikh B. P., Kravetsky A. A., Sprinzl M. FEBS Lett., 1980, v. 118, p. 176–180.
147. Schmidt M., Gordon M. J. Amer. Chem. Soc., 1985, v. 107, № 7, p. 1922–1930.
148. Eckstein F. Accounts Chem. Res., 1979, v. 12, № 6, p. 204–210.
149. Cohn M. Accounts Chem. Res., 1982, v. 15, № 10, p. 326–332.
150. Cohn M. Annual Rev. Biophys. and Bioeng., 1982, v. 11, p. 23–42.
151. Frey P. Tetrahedron, 1982, v. 38, p. 1541–1563.
152. Meyer T., Wielckens K., Thiem J., Hiltz H. Eur. J. Biochem., 1984, v. 140, № 3, p. 531–537.
153. Lee C., Suchadolnik R. Biochemistry, 1985, v. 24, № 3, p. 551–555.
154. Palmio J., Linnala-Kankkunen A., Mälnpää P. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1985, v. 126, № 1, p. 103–108.
155. Niewiarowski W., Uznanski B. Eur. J. Biochem., 1985, v. 153, № 1, p. 145–153.
156. Rothermel J., Jastorff B., Botelho L. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 13, p. 8151–8155.
157. Rothermel J., Perrillo N., Marks J., Botelho L. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 24, p. 15294–15300.
158. Asano T., Pedersen S., Scott C., Ross E. Biochemistry, 1984, v. 23, № 23, p. 5460–5467.
159. Nishimura J., Mitchell T. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 15, p. 9642–9645.
160. Hamed E., Lin C. J. Biol. Chem., 1984, v. 23, № 17, p. 11060–11069.
161. Midelfort C., Sarton-Miller I. J. Biol. Chem., 1978, v. 253, № 13, p. 7127–7129.
162. Rossomondo E., Smith L., Cohn M. Biochemistry, 1979, v. 18, № 25, p. 5670–5674.
163. Connolly B., Eckstein F., Grotjahn L. Biochemistry, 1984, v. 23, № 9, p. 2026–2031.
164. Pearson J., Cusack N. Eur. J. Biochem., 1985, v. 151, № 2, p. 373–375.
165. Smithers G., O'Sullivan K. Biochemistry, 1984, v. 23, № 20, p. 4773–4778.
166. Pecoraro V., Hermes J., Cleland W. Biochemistry, 1984, v. 23, № 22, p. 5262–5271.
167. Tomasselli A., Marquetant R., Nodu L., Goody R. Eur. J. Biochem., 1984, v. 142, № 2, p. 287–289.
168. Stec W., Zon G., Egan W., Stec B. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 20, p. 6077–6079.
169. Loewus D., Eckstein F. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 10, p. 3287–3292.
170. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. Биорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1525–1534.
171. Богачев В. С., Кумарев В. П., Рыбаков В. Н. Биорган. химия, 1986, т. 12, № 1, с. 133–140.
172. Tsai T.-C., Jiang R.-T., Tsai M.-D. Biochemistry, 1984, v. 23, № 23, p. 5564–5570.
173. Хурс Е. Н., Метцлер Д. Е., Хомутов Р. М. Молекулярн. биология, 1979, т. 13, № 4, с. 912–917.
174. Powers J., McRae B., Tanaka T., Cho K., Cook R. Biochem. J., 1984, v. 220, № 2, p. 569–573.
175. Froede H., Wilson I. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, № 17, p. 11010–11013.
176. Lee H., Storer A., Carey P. Biochemistry, 1983, v. 22, № 20, p. 4781–4789.
177. Storer A., Lee H., Carey P. Biochemistry, 1983, v. 22, № 20, p. 4789–4796.
178. Carey P., Lee H., Ozaki Y., Storer A. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 26, p. 8258–8262.
179. Huber C., Carey P., Hsi S.-C., Lee H., Storer A. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 26, p. 8263–8268.
180. Carey P., Storer A. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1984, v. 13, p. 25–49.
181. Lee H., Storer A., Carey P. Biochemistry, 1983, v. 22, № 20, p. 4618–4624.
182. Zacharias D., Murray-Rust P., Preston R., Glusker J. Arch. Biochem. and Biophys., 1983, v. 222, № 1, p. 22–34.
183. Asboth B., Polgar L. Biochemistry, 1983, v. 22, № 1, p. 117–122.
184. Campbell P., Nashed N., Lapinskas B., Gurriery J. J. Biol. Chem., 1983, v. 258, № 1, p. 59–66.
185. Powers J., Tanaka T., Harper W., Minematsu Y., Barker L., Lincoln D., Crumley K., Fraki J., Schechter N., Lazarus G., Nakajima K., Nakashino K., Neurath H., Woodbury R. Biochemistry, 1985, v. 24, № 8, p. 2048–2058.
186. Tanizawa K., Kanaoka Y. J. Biochem., 1985, v. 97, № 1, p. 275–280.
187. Santry L., McClelland R. J. Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 10, p. 3167–3172.
188. Zucker-Franklin D., Nabi Z., Corey E., Corey D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1985, v. 126, № 1, p. 540–543.
189. Yoshimura T., Barker L., Powers J. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 9, p. 5077–5084.
190. Lively M., Powers J. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 525, № 1, p. 171–179.
191. Григорьева Г. М., Коничева Н. В., Абдувахабов А. А. Биорган. химия, 1983, т. 9, № 8, с. 1040–1046.
192. Meister A. In: Enzyme-activated irreversible inhibitors/Eds Seiler N., Jung M., Koch-Weser J. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1978.
193. Gorman E., Ginsburg A. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 14, p. 8244–8252.

194. *Shrake A., Ginsburg A., Wedler F., Sugiyama Y.* J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 14, p. 8238–8243.
195. *Wedler F., Sugiyama Y., Fisher K.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 9, p. 2168–2177.
196. *Miller E., Brenchley J.* J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 21, p. 10778–10780.
197. *Villafranca J., Ash D., Wedler F.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1975, v. 66, № 3, p. 1003–1010.
198. *Maurizi M., Ginsburg A.* J. Biol. Chem., 1982, v. 257, № 8, p. 4721–4728.
199. *Акенцова Н. П., Евстигнеева З. Г., Пушкин А. В., Соловьева П. А., Крегович В. Л.* Биохимия, 1983, т. 48, № 7, с. 1209–1213.
200. *Kleiner D., Alef K., Hartmann A.* FEBS Lett., 1983, v. 164, № 1, p. 121–123.
201. *Пеэг Дж.* В кн.: Борьба с болезнями растений: устойчивость и восприимчивость. М.: Колос, 1984, с. 20–37.
202. *Carlson P.* Science, 1973, v. 180, № 4093, p. 1366–1368.
203. *Griffith O., Anderson M., Meister A.* J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 4, p. 1205–1210.
204. *Walsh C.* Ann. Rev. Biochem., 1984, v. 53, p. 493–535.
205. *Webster D., Sparkes M., Dixon H.* Biochem. J., 1978, v. 169, № 1, p. 239–244.
206. *Kamiya K., Cruse W., Kennard D.* Biochem. J., 1983, v. 213, № 1, p. 217–223.
207. *Galaray R., Kortylewicz Z.* Biochem. J., 1985, v. 226, № 2, p. 447–454.
208. *Alston T., Porter D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1981, v. 103, № 3, p. 1077–1082.
209. *Porter D., Rudie N., Bright H.* Arch. Biochem. and Biophys., 1983, v. 225, № 1, p. 157–163.
210. *Schloss J., Cleland W.* Biochemistry, 1982, v. 21, № 18, p. 4420–4427.
211. *Schloss J., Porter D., Bright H., Cleland W.* Biochemistry, 1980, v. 19, № 11, p. 2358–2362.
212. *Raushel F.* Arch. Biochem. and Biophys., 1984, v. 232, № 2, p. 520–525.
213. *Braunstein A. E.* In: The Enzymes (3-rd edn)/Ed Boyer P. N. Y.: Acad. Press, 1973, v. IX, p. 379–481.
214. *Watabe J., Matsuda A., Santi D., Bergstrom D., Ruth J.* J. Med. Chem., 1979, v. 22, № 2, p. 339–340.
215. *Zwelling L., Kerrigan D., Marton L.* Cancer Res., 1985, v. 45, № 3, p. 1122–1126.
216. *Dudek E., Lerner E., Johnston J.* J. Med. Chem., 1983, v. 26, № 12, p. 1733–1741.
217. *Poso H., McCann P., Tanskanen R., Bey P., Sjoerdsma A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1984, v. 125, № 1, p. 205–210.
218. *Sunkara P., Chang C., Prakash N., Lachmann P.* Cancer Res., 1985, v. 45, № 9, p. 4067–4070.
219. *Карпейский М. Я., Бреусов Ю. Н.* Биохимия, 1965, т. 30, № 1, с. 153–160.
220. *Хомугов Р. М., Северин Е. С., Гуляев Н. Н.* Изв. АН СССР, 1967, № 7, с. 1602–1624.
221. *Хомугов Р. М., Северин Е. С., Ковалева Г. К.* Докл. АН СССР, 1965, т. 161, № 5, с. 1227–1230.
222. *Woo P., Baker D.* J. Med. Chem., 1982, v. 25, № 5, p. 603–605.
223. *Ashley G., Bartlett P.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, v. 108, № 4, p. 1467–1474.
224. *Kurz L., La Sard D., Frieden C.* Biochemistry, 1985, v. 24, № 6, p. 1342–1346.
225. *Ito A., Tokawa K., Shimizu B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, v. 49, № 2, p. 343–349.
226. *Tompson R.* Biochemistry, 1973, v. 12, № 1, p. 47–51.
227. *O'Connor J., Wolfenden R.* J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 19, p. 6351–6355.
228. *Aoki T., Yamasaki H., Oya H.* Mol. Biochem. and Parasitol., 1983, v. 8, № 2, p. 89–97.
229. *Westeric J., Wolfenden R.* J. Biol. Chem., 1971, v. 247, № 24, p. 8195–8197.
230. *Yoshimoto T., Kawahara K., Matsubara F., Kado K., Tsuru D.* J. Biochem., 1985, v. 98, № 4, p. 975–979.
231. *Tompson R.* Biochemistry, 1974, v. 13, № 27, p. 5495–5500.
232. *O'Connor J., Wolfenden R.* J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 24, p. 8195–8197.
233. *Lienhard G., Jehes W. J.* Amer. Chem. Soc., 1966, v. 88, № 17, p. 3982–3995.
234. *Lewis C., Wolfenden R.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 22, p. 4886–4890.
235. *Rich D., Bernatowicz M., Schmidt P. J.* Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 12, p. 3535–3536.
236. *Malthouse P., Mackenzie N., Boyd A., Scott I. J.* Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 6, p. 1685–1686.
237. *Gamsik M., Malthouse P., Primrose W., Mackozie N., Boye A., Russel R., Scott I. J.* Amer. Chem. Soc., 1983, v. 105, № 20, p. 6324–6325.
238. *Tompson R., Bauer C.-A.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 8, p. 1552–1558.
239. *Wilk S., Orłowski M. J.* Neurochem., 1983, v. 41, № 1, p. 69–75.
240. *Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К.* Докл. АН СССР, 1968, т. 183, с. 1435–1438.
241. *Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К.* Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 4, с. 558–570.
242. *Роганова Т. В., Клаус Р., Иванова А. Г., Гинодман Л. М., Антонов В. К.* Биоорганич. химия, 1976, т. 2, № 6, с. 837–845.
243. *Роганова Т. В., Васильева Н. В., Гинодман Л. М., Антонов В. К.* Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 5, с. 694–698.
244. *Ярв Я. Л., Спэжк М. А., Лапгаль Ю. Л., Роганова Т. В.* Биоорганич. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1364–1371.

245. *Rotanova T. V., Ivanova A. G., Antonov V. K., Rakadjicva A., Blagoev B.* Int. J. Peptide and Protein Res., 1976, v. 8, № 2, p. 225–231.
246. *Koehler K., Lienhard G.* Biochemistry, 1971, v. 10, № 13, p. 2477–2483.
247. *Koehler K., Hess G.* Biochemistry, 1974, v. 13, № 26, p. 5345–5350.
248. *Lindquist R., Terry C.* Arch. Biochem. and Biophys., 1974, v. 160, № 1, p. 135–144.
249. *Kettner C., Shenvi A. J.* Biol. Chem., 1984, v. 259, № 24, p. 15106–15114.
250. *Hess G., Seybert D., Lewis A., Spoonhower J.* Science, 1975, v. 189, p. 384–386.
251. *Matthews D., Alden R., Birktoft J., Freer S., Kraut J. J.* Biol. Chem., 1975, v. 250, № 18, p. 7120–7126.
252. *Jones J., Trowbridge C. J.* Biol. Chem., 1983, v. 258, № 4, p. 2135–2142.
253. *Gelb M., Svaren J., Abeles R.* Biochemistry, 1985, v. 24, № 8, p. 1813–1817.
254. *Kraut J.* Ann. Rev. Biochem., 1977, v. 46, p. 331–358.
255. *Powers J., Gupton B., Harley A., Nishino N., Whitley R.* Biochim. et biophys. acta, 1977, v. 485, № 1, p. 156–166.
256. *Шварц Г. Я., Граник В. Г.* Хим.-фармацевт. журн., 1984, № 3, с. 271–282.
257. *Baker J., Prescott J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1985, v. 130, № 3, p. 1154–1160.
258. *Galaray R., Kortylewicz Z.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 9, p. 2083–2087.
259. *Frick L., Wolfenden R.* Biochem. et biophys. acta, 1985, v. 829, № 3, p. 311–318.
260. *Baker J., Prescott J.* Biochemistry, 1983, v. 22, № 23, p. 5322–5331.
261. *Greenlee W., Allilone P., Perlow D., Patchett A., Ulm E., Vassil T. J.* Med. Chem., 1985, v. 28, № 4, p. 434–442.
262. *Patchett A., Harris E., Tristram E., Wyratt M., Wu M., Taub D., Peterson E., Ikeler T., Broeke J., Payne L., Ondeyka D., Thorsett E., Greenlee W., Lorh N., Hoffsommer R., Joshua H., Ruyle W., Rothrock J., Aster S., Maycock A., Robinson F., Hirschmann R., Sweet C., Ulm E., Gross D., Vassil T., Stone C.* Nature, 1980, v. 288, № 5788, p. 281–283.
263. *Monsingo A., Matthews B.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 24, p. 5724–5729.
264. *Hangauer D., Monsingo A., Matthews B.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 24, p. 5730–5741.
265. *Natarajan S., Gordon E., Sabo E., Godfrey J., Weller H., Plušćec J., Rom M., Cushman D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1984, v. 124, № 1, p. 141–147.
266. *Rich D., Bernatowicz M., Schmidt P. J.* Amer. Chem. Soc., 1982, v. 104, № 12, p. 3535–3536.
267. *Gordon E., Natarajan S., Plušćec J., Weller H., Godfrey J., Rom M., Sabo E., Engelbrecht J., Cushman D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1984, v. 124, № 1, p. 148–155.
268. *Baldwin J. J.* Chem. Soc. Chem. Commun., 1976, № 17, p. 738–741.
269. *Gordon E., Godfrey J., Plušćec J., Von Langen D., Natarajan S.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1985, v. 126, № 1, p. 419–426.
270. *Byers L., Wolfenden R. J.* Biol. Chem., 1972, v. 247, № 2, p. 606–608.
271. *Шварц Г. Я., Граник В. Г.* Хим.-фармацевт. журн., 1984, № 3, с. 271–282.
272. *Ondetti M., Condon M., Reid J., Sabo E., Cheung H., Cushman D.* Biochemistry, 1979, v. 18, № 8, p. 1427–1430.
273. *Cushman D., Ondetti M., Cheung H., Sabo E., Antonaccio M., Rubin B.* In: Enzyme inhibitors as drugs/Ed. Sandler M. Baltimore M. D.: University Park Press, 1980, p. 231–247.
274. *Wilkes S., Prescott J. J.* Biol. Chem., 1983, v. 258, № 22, p. 13517–13521.
275. *Kester W., Matthews D.* Biochemistry, 1977, v. 16, № 11, p. 2506–2516.
276. *Shiek T.-L., Byrn S. J.* Med. Chem., 1982, v. 25, № 4, p. 403–408.
277. *Ghosh I., Rao V.* Int. J. Biol. Macromol., 1982, v. 4, № 3, p. 130–136.
278. Конформация и функция биологических молекул. Рига: Зинатне, 1984.
279. *Thorsett E., Harris E., Aster S., Peterson E., Taub D., Patchett A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, v. 111, № 1, p. 166–171.
280. *Rich D. J.* Med. Chem., 1985, v. 28, № 3, p. 263–273.
281. *Stanton J., Watthey J., Desai M., Finn B., Babiarz J., Tomasselli H. J.* Med. Chem., 1985, v. 28, № 11, p. 1603–1606.
282. *Slade J., Astanton J., Ben-David D., Mazzenga G. J.* Med. Chem., 1985, v. 28, № 10, p. 1517–1521.
283. *Schmidt P., Holladay M., Salituro F., Rich D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1985, v. 129, № 2, p. 597–602.
284. *Thaisrivongs S., Pals D., Kati W., Turner S., Thomasco L. J.* Med. Chem., 1985, v. 28, № 11, p. 1553–1555.
285. *Babler M., Bittner S., Yang P.-C., Corrobo D.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1985, v. 132, № 1, p. 155–161.
286. *Krafft G., Katzenellenbogen J. J.* Biol. Chem., 1982, v. 257, № 2, p. 610–612.
287. *Westkaemper R., Abeles R.* Biochemistry, 1983, v. 22, № 13, p. 3256–3264.
288. *Gelb M., Abeles R.* Biochemistry, 1984, v. 23, № 26, p. 6596–6604.
289. *Tsuyi K., Agha B., Shinogi M., Digenis G.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1984, v. 122, № 2, p. 571–576.
290. *Hemmi K., Harper W., Powers J.* Biochemistry, 1985, v. 24, № 8, p. 1841–1848.
291. *Harper W., Hemmi K., Powers J.* Biochemistry, 1985, v. 24, № 8, p. 1831–1841.
292. *Seydel J., Shaper K.-J.* In: Enzyme inhibitors as drugs/Ed. Sandler M. Baltimore M. D.: University Park Press, 1980, p. 53–71.
293. *Ландэй М. А.* Молекулярные механизмы действия физиологически активных веществ. М.: Наука, 1981.

294. Хэлл К. Хим.-фармацевт. журн., 1980, № 10, с. 15–30.
295. Martin J. J. Med. Chem., 1981, v. 24, № 3, p. 229–237.
296. Голендер В. Е., Розенблит А. Б. Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1980, т. XXV, № 1, с. 28–35.
297. Гитлина Л. С., Саусиль А. Э., Голендер В. Е., Розенблит А. Б., Дубур Г. Я. Хим.-фармацевт. журн., 1984, № 7, с. 839–844.
298. Korman G. J. Amer. Chem. Soc., 1984, v. 106, № 24, p. 7315–7321.
299. Кибирев В. К., Гершкович А. А., Серебряный С. Б. Укр. биохим. журн., 1983, т. 55, № 3, с. 271–276.
300. Hansh C., Hathaway B., Guo Z., Dias S., Deitrich S., Blaney J., Lagridge R., Volz K., Kaufman B. J. Med. Chem., 1984, v. 27, № 2, p. 129–143.
301. Martin M., Sanz F., Campillo M., Pardo L., Perez J., Turno J. Int. J. Quantum. Chem., 1983, v. 23, № 4, p. 1643–1652.
302. Hays S., Tobes M., Gildersleeve D., Wieland D., Beierwaltes W. J. Med. Chem., 1984, с. 27, № 1, p. 15–19.
303. McDonald I., Lacoste J., Bey P., Palfreyman M., Zreika M. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 2, p. 186–193.
304. Dove S., Coats E., Scharfenberg P., Franke R. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 4, p. 447–451.
305. Раевский О. А., Лукьянов Н. В., Мартынов И. В. Хим.-фармацевт. журн., 1983, т. XVII, № 12, с. 1472–1476.
306. Smith N., Hanshen C., Kim K., Omiya B., Fukumura G., Selassie C., Low P., Blaney J., Langridge R. Arch. Biochem. and Biophys., 1982, v. 215, № 1, p. 319–328.
307. Birdsall B., Feeney J., Pascual C., Roberts G., Kompis I., Then R., Müller K., Kroehn A. J. Med. Chem., 1984, v. 27, № 12, p. 1672–1676.
308. Andrews P., Craik D., Martin J. J. Med. Chem., 1984, v. 27, № 12, p. 1648–1657.
309. Goodford P. J. Med. Chem., 1985, v. 28, № 7, p. 849–857.
310. Naruto S., Motoc L., Marshall G., Daniels S., Sofia M., Katzenellenbogen J. J. Amer. Chem. Soc., 1985, v. 107, № 18, p. 5262–5270.

Поступила в редакцию
9.X.1985

После доработки
30.VI.1986

APPROACHES TO SYNTHESIS OF SPECIFIC INHIBITORS OF ENZYME

YAKOVLEVA G. M.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Byelorussian SSR

The review deals with directed synthesis of specific enzyme inhibitors. They are classified within the framework of the mechanistic approach, namely, stable analogues of substrates, which form enzyme complexes mimicking the Michaelis complex or those which influence the chemical stages of enzyme catalysis; conformational inhibitors; substrate analogues participating in enzyme reactions and producing modified products; suicide inhibitors; stage inhibitors (inhibitors influencing certain stages of enzyme reaction); transition state analogues; multisubstrate analogues and collected substrates. Types of chemical modification used in synthesis of the specific inhibitors are discussed. Some possibilities of the quantity structure-activity relationship methods, computer modelling and molecular graphics in designing the optimal structure of inhibitors are mentioned.