



УДК 577.113.6

2-ФТОРКОРДИЦЕПИН: ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ *IN VITRO*

© 2025 г. А. О. Арнаутова*, **, #, К. В. Антонов*, Е. А. Зорина*, М. А. Симонова*,
А. С. Парамонов*, О.С. Жукова***, М. В. Киселевский***, А. Л. Каюшин*,
И. В. Фатеев*, Е. В. Дорофеева*, Б. З. Елецкая*, М. Я. Берзина*, О. С. Смирнова*,
Т. В. Егорова****, Р. С. Есипов*, А. И. Мирошников*, И. Д. Константинова*

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

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

*** Институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей
Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина,
Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4к1

**** Московский педагогический государственный университет,
Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1с1

Поступила в редакцию 05.03.2025 г.

После доработки 24.03.2025 г.

Принята к публикации 25.03.2025 г.

Предложены и реализованы два метода получения 2-фторкордицепина: химический синтез из 2-фтораденозина с выходом 34% и химико-ферментативный синтез с выходом 66%, включающий получение 3-дезоксиритропентофуранозо-1-фосфата и последующее трансгликозилирование с помощью пурииннуклеозидофосфорилазы *E. coli*. Проведена оценка цитотоксической активности 2-фторкордицепина *in vitro*. Показано, что 2-фторкордицепин проявляет антиметаболический эффект в отношении ряда опухолевых клеточных линий (Jurkat, Raji, MCF-7, THP-1, U937, A549, LS174T), что позволяет рассматривать это соединение в качестве перспективного кандидата для дальнейшего изучения *in vivo*.

Ключевые слова: аналоги нуклеозидов, 2-фторкордицепин, пурииннуклеозидфосфорилаза

DOI: 10.31857/S0132342325030105, **EDN:** KQZBWD

ВВЕДЕНИЕ

Среди биологически активных нуклеозидов известен кордицепин (3'-дезоксаденозин, 3'-dAdo) – природный аналог аденозина (рис. 1), обнаруженный в спорыньевых грибах *Cordyceps militaris* – пиреномицетах, паразитирующих на некоторых видах насекомых. Кордицепин имеет широкий спектр биологической активности и используется с древних времен в китайской медицине [1–3]. Результаты исследований свидетель-

ствуют о том, что 3'-dAdo обладает выраженными противоопухолевыми свойствами [4–6]. Было показано, что 3'-dAdo индуцирует апоптоз в клетках рака печени [7–9], карциномы почек [10, 11], рака легкого, рака простаты, рака молочной железы [12–16], клетках хронической миелоидной лейкемии [17–19], глиобластомы [20], нейробластомы [21]. Кроме того, кордицепин инициирует арест клеточного цикла в клетках линий рака толстого кишечника и мочевого пузыря [22, 23].

Сокращения: 3'-dAdo – 3'-дезоксаденозин; Ado – аденозин; ADA – аденозиндеаминаза (Adenosine Deaminase); 3'-dIno – 3'-дезоксиинозин; 2-F-3'-dAdo – 2-фтор-3'-дезоксаденозин или 2-фтор-кордицепин; PNP – пурииннуклеозидфосфорилаза *E. coli*; 2-F-Ado – 2-фтораденозин; 1-P-3-dRib – 1-альфа фосфат 3-деоксирибозы; MeCN – ацетонитрил; DMAP – диметил-аминопиридин; DCM – дихлорметан, DMSO – диметилсульфоксид, SDS – натрия додецилсульфат.

Автор для связи: (тел.: +7 (965) 145-58-94; эл. почта: arnautova_ibch@mail.ru).

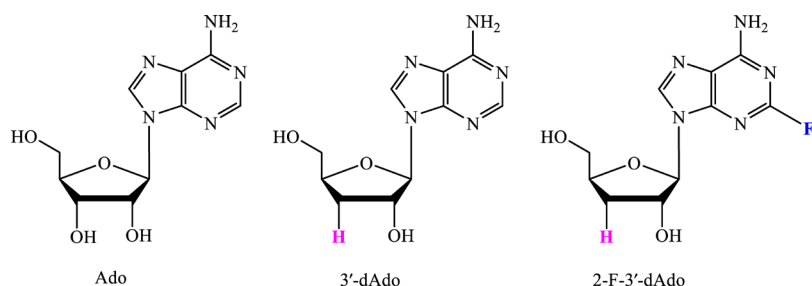


Рис. 1. Аденозин, кордицепин и 2-фтор-кордицепин.

Кордицепин способен ингибировать биосинтез пуринов [24]. Оказавшись внутри клетки, он фосфорилируется до 5'-моно-, ди- и три-фосфатов [25]. Показано, что 5'-монофосфат кордицепина ингибирует активность фосфорибозил-пирофосфат-амидотрансферазы, что приводит к затруднению биосинтеза пуринов *de novo* [26]. Кроме того, 3'-dAdo терминирует элонгацию РНК. В процессе транскрипции ДНК-зависимая РНК-полимераза включает 3'-dAdo в растущую цепь вместо Ado, что приводит к терминации транскрипции (эксперименты на дрожжах и клетках млекопитающих) [27–29].

Известно, что 3'-dAdo обладает противовирусной активностью в отношении ряда РНК-содержащих вирусов: вируса иммунодефицита человека, вируса лейкоза крупнорогатого скота и вируса Эпштейна–Барра [30–37]. В недавних исследованиях [38] показано, что кордицепин способен подавлять размножение новых резистентных штаммов SARS-CoV-2 *in vitro* с очень низким значением EC_{50} (около 2 мкМ), превосходя по этому показателю как ремдесивир (препарат, одобренный FDA для лечения SARS-CoV-2 в США), так и его активный метаболит GS-441524.

В экспериментах *in vitro* показано, что кордицепин проявляет иммуномодулирующее, антиоксидантное [39], противовоспалительное [40], антимикробное, антифибротическое, нейропротекторное [41], антидепрессивное [42], противогрибковое [43] и антидиабетическое [44–46] действия.

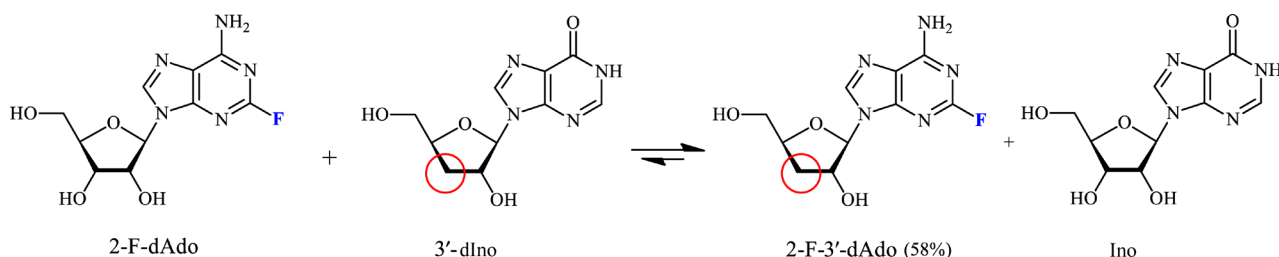
Но, несмотря на широкий спектр биологической активности кордицепина, есть ряд ограничений его клинического применения. Оказалось, что кордицепин токсичен как для раковых клеток, так и для здоровых эритроцитов [47, 48]. Кроме того, в исследованиях *in vivo* показано, что 3'-dAdo повреждает здоровые органы мышей

(печень и почки) [49]. Еще один неблагоприятный фактор заключается в том, что при попадании в организм 3'-dAdo подвергается воздействию аденозиндезаминазы человека (ADA), превращаясь в 3'-дезоксиаденозин и теряя свою активность. 3'-Дезоксиаденозин имеет короткий период полураспада и быстро выводится из организма [50, 51].

Невозможно использовать в качестве лекарственных препаратов нуклеозиды, быстро метаболизируемые ADA. Один из вариантов решения этой проблемы – введение в структуру пуринового основания атомов F или Cl – был предложен еще в 1967 году [52, 53]. Позднее было установлено, что 2-фтор-3'-дезоксиаденозин (2-F-3'-dAdo) обладает противоопухолевой активностью в отношении клеток MOLT4 *in vitro* с IC_{50} 2.44 ± 0.69 мкМ, в то время как для 3'-dAdo $IC_{50} > 100$ мкМ. Кроме того, показано, что 2-F-3'-dAdo эффективен при лечении инфекции, вызванной *Trypanosoma brucei* у мышей, и может применяться перорально, несмотря на относительно короткий период полураспада в плазме [54].

Известны два способа получения 2-фторкордицепина: химический и химико-ферментативный синтез. Впервые 2-F-3'-dAdo был получен химически из 2-амино-3'-дезоксиаденозина селективным диазотированием 2-аминогруппы в присутствии фтороборной кислоты с выходом 18% [52]. Позднее 2-фторкордицепин синтезировали из 3'-dAdo с использованием α -ацетоксиизобутирилбромида с выходом всего 2% [54]. Более высокого выхода 2-F-3'-dAdo в 50% удалось достичь прямым рибозилированием коммерчески доступного 2-фтораденина 5-*O*-бензоил-1,2-ди-*O*-ацетил-3-дезоксид-рибозой в присутствии *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамида и триметилсилилтрифторметансульфоната [54].

Ранее нами был предложен химико-ферментативный синтез 2-F-3'-dAdo с применением генно-инженерной пурииннуклеозидфосфорилазы *E. coli* на стадии трансгликозилирования. В качестве донора 3-дезоксирибозы использовали 3'-dIno и 2-фтораденозин (2-F-Ado) как источник 2-фтораденина (рис. 2) [55]. При конверсии 2-F-Ado в 2-F-3'-dAdo до 70% выход составил 58%. Преимущества этого способа – стерео- и региоспецифичность и, как следствие, отсутствие побочных продуктов реакции, простота выделения продукта из реакционной смеси. Недостаток метода заключается в продолжительном времени стадии трансгликозилирования (до 20 дней) (рис. 2).



Условия реакции: 2-F-Ado : 3'-dIno (1.0 : 1.5), калий-фосфатный буфер (2 мМ, pH 7.0), PNP *E. coli* (17.2 е.а./мл), 52°C, 12 дней, 58% [55].

Рис. 2. Схема реакции трансгликозилирования 2-F-Ado и 3'-dIno в синтезе 2-фторкордицепина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основе химического синтеза 2-фторкордицепина лежит подход, который использовался ранее для получения кордицепина [56] с некоторыми изменениями (рис. 3). В качестве исходного соединения выбрали полученный нами ранее 2-F-Ado (I) [57], который обрабатывали α-ацетоксиизобутирилбромидом с образованием смеси соединений (II) и (III). За ходом реакции следили по ТСХ в системе хлороформ–метанол 9 : 1. Смесь продуктов (II) и (III) выделяли обращенно-фазовой хроматографией с суммарным выходом 60%.

Затем проводили дегалогенирование интермедиатов (II) и (III) гидрированием на H₂/Pd и без промежуточного выделения полупродуктов реакционную смесь обрабатывали водно-метанольным раствором аммиака. В результате получили смесь двух нуклеозидов: целевого – 2-фтор-3'-дезоксаденозина (2-F-3'-dAdo, IV) и побочного – 2-амино-3'-дезоксаденозина (2-NH₂-3'-

dAdo, V) (по данным LC-MS). Соединения (IV) и (V) выделены обращенно-фазовой хроматографией с выходом 34 и 2%, соответственно.

Предложенный нами способ получения 2-F-3'-dAdo оказался наиболее эффективным среди известных дивергентных методов (синтез 2-F-3'-dAdo из 2-амино-3'-дезоксаденозина с выходом – 18% [52], синтез 2-F-3'-dAdo из 3'-dAdo с выходом – 2% [54]). Этот метод региоселективен, не требует выделения промежуточных продуктов и может быть легко масштабирован.

В качестве альтернативы мы предлагаем новую модификацию химико-ферментативного синтеза 2-фторкордицепина (IV). В работе [55] в качестве донора углеводного остатка мы использовали 3'-dIno и 2-фтораденозин как источник 2-фтораденина (рис. 2). Трансгликозилирование в синтезе пуриновых нуклеозидов обычно осуществляют, используя в качестве донора углеводного остатка пиримидиновые нуклеозиды. Такой процесс считается термодинамически более выгодным, чем перенос углеводного остатка с

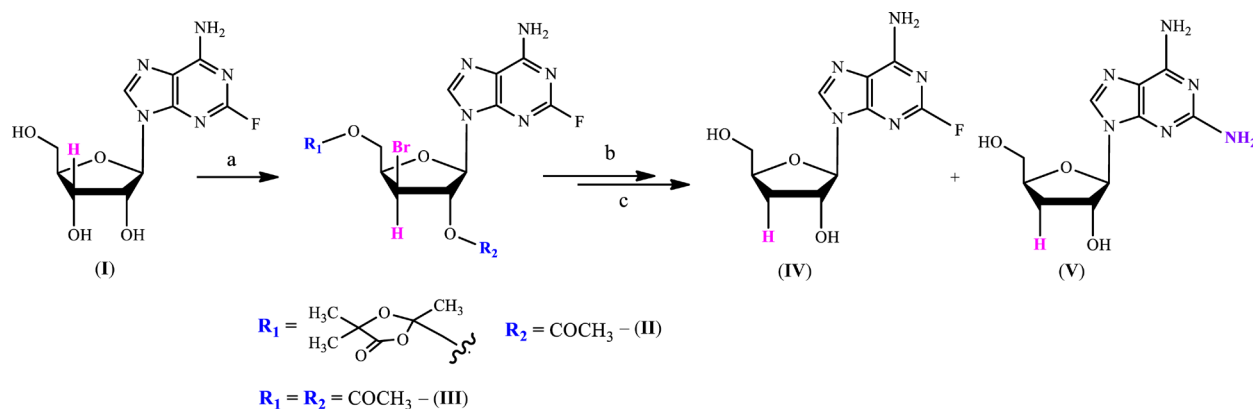


Рис. 3. Схема синтеза 2-F-3'-dAdo, где (a) – α-ацетоксиизобутирилбромид/MeCN, (b) – H₂/Pd, (c) – NH₃, CH₃OH.

пуринового основания на модифицированное пуриновое [58–62]. Тем не менее, нам удалось достичь конверсии 70% и выход 2-фторкордицепина составил 58%. Существенным недостатком описанного способа синтеза было медленное протекание реакции (12–45 дней) при использовании высокой концентрации фермента (17.2 е.а./мл). Очевидно, что скорость образования 2-фторкордицепина существенно зависела от количества образовавшегося 1-альфа фосфата 3-дезоксирибозы при фосфорилизе 3'-dIno. Именно этот процесс оказался лимитирующим фактором в синтезе 2-фторкордицепина. Мы предположили, что использование в реакции трансгликозилирования химически синтезированного “готового” 1-альфа фосфата 3-дезоксирибозы позволит существенно сократить время синтеза и, может быть, даже сэкономить какое-то количество PNP.

На первом этапе был химически синтезирован 1-альфа фосфат 3-дезоксирибозы (1-P-3-dRib, VI) (рис. 4), на втором этапе проведен ферментативный синтез фторкордицепина из 2-фторадеозина и фосфата 3-дезоксирибозы (рис. 5).

1-Альфа фосфат 3-дезоксирибозы (VI) синтезировали из D-ксилофуранозы (VII) по методике [63] с некоторыми изменениями в соответствии со схемой, представленной на рис. 4.

На первой стадии ацетонирование ксилозы (VII) приводит к 1,2,3,5-ди-O-изопропилиден-D-ксилозе, которая без выделения в мягких условиях гидролизует с образованием 1,2-O-изопропилиденксилозы (VIII) с выходом 79%. После выделения полученное соединение (VIII) обрабатывали толуоилхлоридом с региоселективным образованием 1,2-O-изопропилиден-5-O-толуоил-

ксилофуранозы (IX), которую выделяли кристаллизацией с выходом 75%.

На следующей стадии вводили тиокарбонил-имидазольную группу по третьему положению производного (IX) ацилированием тиокарбонил-диимидазолом в присутствии DMAP. В результате реакции был получен тиокарбонильное производное (X) с выходом 75%.

Затем проводили дезоксигенирование соединения (X) кипячением в диоксане с диметилфосфитом при добавлении перекиси бензоила до образования соединения (XI). Следует отметить, что увеличение продолжительности реакции дезоксигенирования существенно влияет на ее результат. Попытки уменьшить количество перекиси бензоила (в смеси накапливается продукт его разложения – бензойная кислота) приводили к увеличению времени реакции с 1–2 до 4–6 ч, при этом наблюдалось образование побочного продукта – имидазолилкарбоната из-за окисления тиокарбоната кислородом воздуха. В связи с этим, реакцию проводили в токе аргона, однако сильный поток газа охлаждал систему и замедлял процесс. Таким образом, стадия дезоксигенирования стала самым тонким и технически сложным этапом синтеза.

Более того, мы подтвердили наблюдение, сделанное в работе [63], что большой избыток фосфита (что само по себе – недостаток данного метода) сильно влияет на выход продукта (XI). Изначально мы использовали 20-ти кратный мольный избыток диметилфосфита, однако, получив продукт (XI) с крайне низким выходом (28%), увеличили этот избыток до 40 моль-эквивалентов и выход продукта увеличился до 71%.

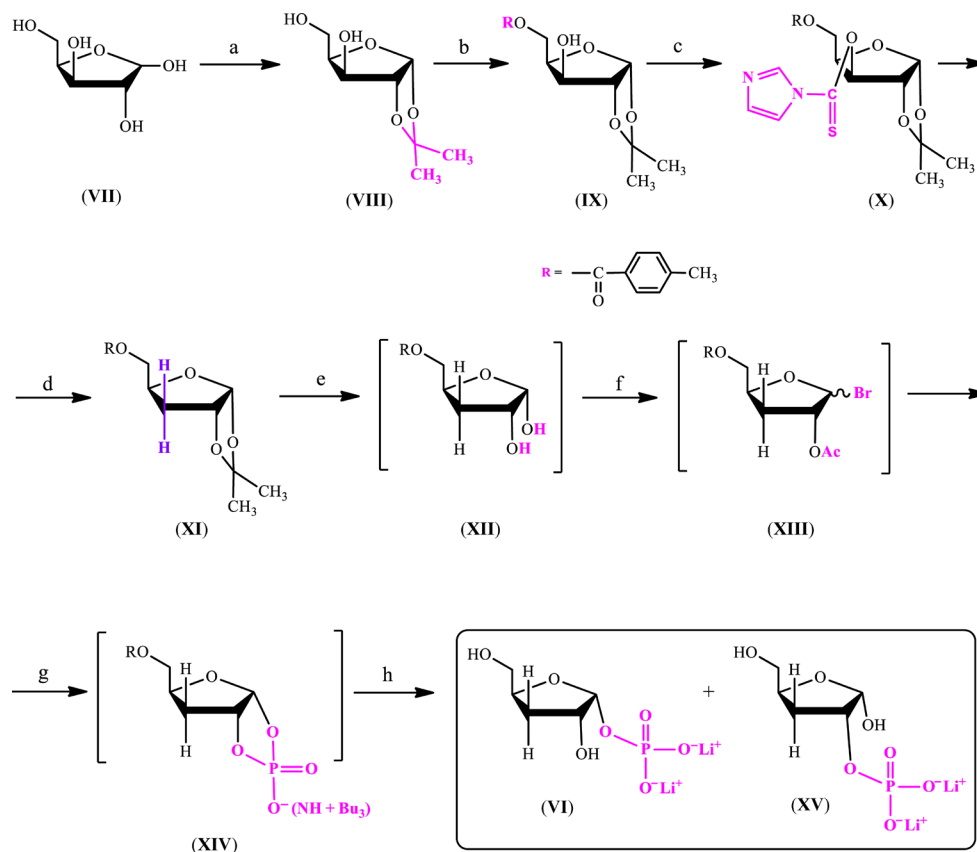


Рис. 4. Схема синтеза соединения (VI), где (a) – H_2SO_4 , ацетон, H_2O , (b) – толуилхлорид, пиридин, (c) – тиокарбонилдиимидазол, ДМАП, MeCN, (d) – диметилфосфит, перекись бензоила, диоксан, (e) – уксусная кислота, вода, (f) – ацетилбромид, ангидрид уксусной кислоты, диоксан, H_3PO_4 , (g) – H_3PO_4 , Bu_3N , (h) – $LiOH$, H_2O .

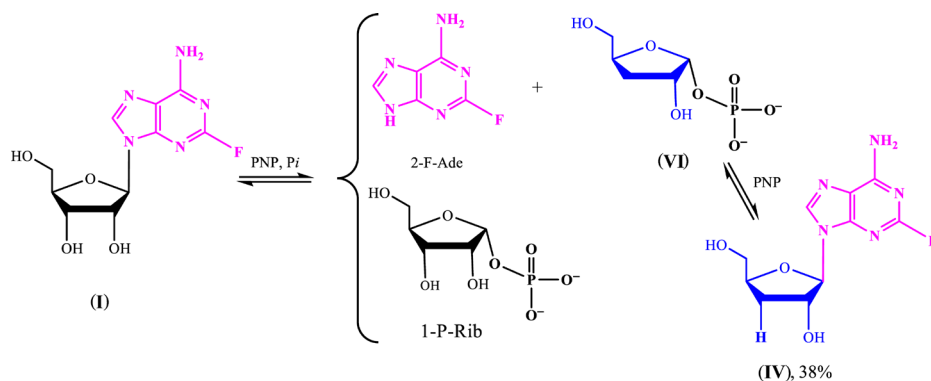


Рис. 5. Схема синтеза 2-F-3'-dAdo.

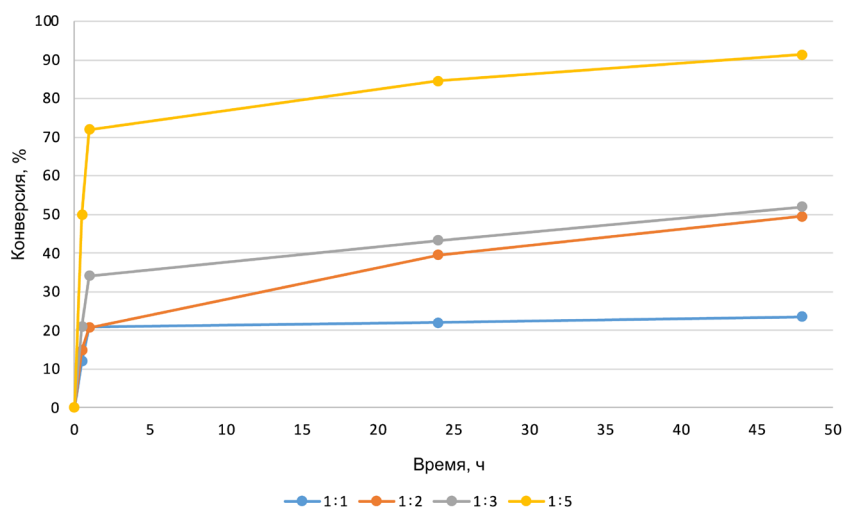
Нами была предпринята попытка “one pot” фосфорилирования изопропилиденового производного (XI). Соединение (XI) обрабатывали водной уксусной кислотой для удаления изопропилиденовой группы с образованием частично защищенного углевода (XII). После чего без дополнительной очистки пентозу (XII) растворили в ангидриде уксусной кислоты, добавили твердую фосфорную кислоту и ацетилбромид. В результате протекали

две последовательные реакции – перацетилирование и образование бромгалонозы (XIII). После добавления диоксана и трибутиламина к реакционной смеси образуется трибутиламмонийфосфат, который реагирует с бромгалонозой (XIII). Через сутки к полученной смеси добавили гидроксид лития и воду, при этом избыток фосфорной кислоты удаляется в виде нерастворимого Li_3PO_4 . Осаждение из концентрированного вод-

ного раствора метанолом и ацетоном дает гомогенную (по данным ТСХ) смесь органических фосфатов в виде литиевых солей. Качественная реакция на гликозил-фосфат (кислотный гидролиз) показывает, что эта смесь превращается в углевод частично, вероятно, основная масса – это негидролизуемый 2-монофосфат (XV). По-видимому, он образуется в результате щелочного гидролиза промежуточного 1,2-*O*-циклофосфата (XIV), причем считается, что соотношение (XV) к (VI) составляет 4 : 1 [64]. Преимущественное образование 1,2-*O*-циклофосфата (XIV) само по себе не тривиально и требует отдельного ис-

следования. Наличие 1-монофосфата (VI) подтверждается ферментативной реакцией. В нашем случае плюсом химико-ферментативного подхода выступает возможность избежать сложной (в молекуле нет хромофоров) процедуры выделения и очистки целевого 1-фосфата (VI), т.к. изомерный 2-фосфат (XV) не субстрат и не ингибитор PNP.

На втором этапе синтеза мы оптимизировали условия ферментативного синтеза (рис. 5) 2-F-3'-dAdo (IV) из синтезированного 1-P-3-dRib (VI) и 2-F-Ado (I): соотношение исходных субстратов, pH, температура, концентрация PNP (рис. 6–9).



Условия: объем реакции 1 мл, 50°C, 10 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.0), PNP 7 е.а./мл.

Рис. 6. Динамика накопления нуклеозида (IV) в зависимости от соотношения 2-F-Ado к 1-P-3-dRib.

Из представленных на диаграмме данных (рис. 6) очевидно, что значение конверсии 2-F-Ado (I) в 2-F-3'-dAdo (IV) прямо пропорционально мольному избытку 1-P-3-dRib (VI) в реакционной смеси. Наибольшая конверсия (91%) достигается при соотношении 2-F-Ado к 1-P-3-dRib – 1 : 5 за 48 ч, но для дальнейших реакций выбрали соотношение 1 : 3 с конверсией 52%.

Результаты экспериментов по оптимизации pH в диапазоне значений 7.0 – 11.0 представлены на рис. 7. Оказалось, что изменение pH калий-фосфатного буфера с 7.0 до 8.0 существенно влияло на увеличение конверсии – содержание фторкордицепина выросло в 2 раза с 43.2% до 89.67%. Дальнейшее увеличение pH приводило к снижению конверсии.

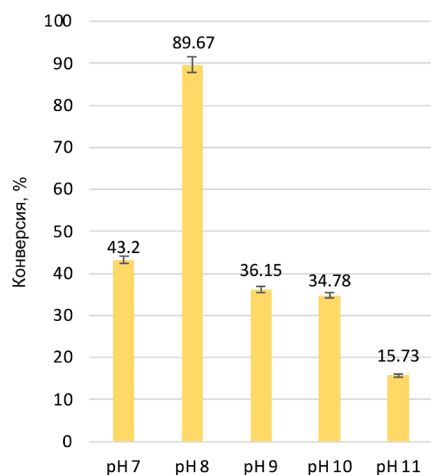
На рис. 8 показана зависимость конверсии 2-F-Ado в соединение (IV) от температуры реакцион-

ной смеси в диапазоне 25–60°C. Очевидно, что оптимальная температура для проведения ферментативной реакции – значения 40 и 50°C.

На диаграмме (рис. 9) представлена зависимость конверсии 2-F-Ado в 2-F-3'-dAdo от концентрации PNP. Видно, что при концентрациях фермента 7, 10.5 и 21 е.а./мл значения конверсии близкие и одинаково высокие (97.23–99.1%). Снижение концентрации PNP до 0.7 е.а./мл приводит к уменьшению значения конверсии до 69.28%.

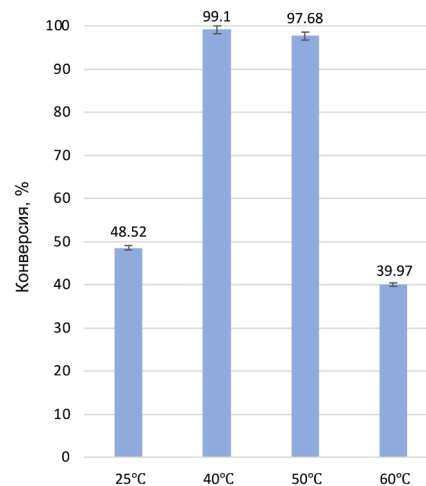
После оптимизации условий был синтезирован 2-фторкордицепин. Динамика накопления нуклеозида (IV) показана на рис. 10: конверсия 84.72% была достигнута за 72 ч. Нуклеозид (IV) выделен обращенно-фазовой хроматографией с выходом 66%.

Состав соединений (IV) и (V) подтвержден данными масс-спектрометрии, а структуры – данными



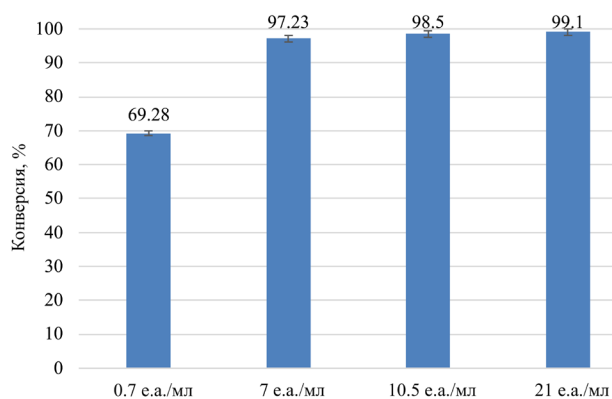
Условия: объем реакции 1 мл, 50°C, 2-F-Ado:1-P-3-dRib – 1 : 3, 10 mM калий-фосфатный буфер, PNP 7 е.а./мл.

Рис. 7. Зависимость конверсии 2-F-Ado в соединение (IV) (168 ч) от значения pH калий-фосфатного буфера.



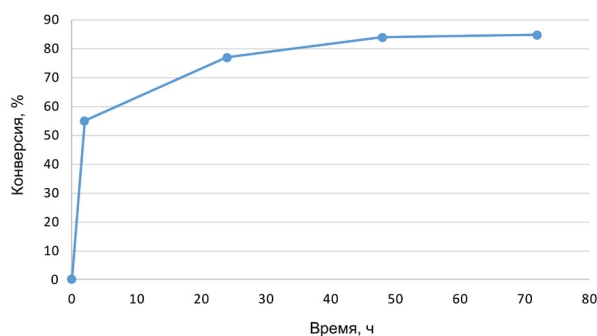
Условия: объем реакции 1 мл, 2-F-Ado : 1-P-3-dRib – 1 : 3, 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 8.0), PNP 7 е.а./мл.

Рис. 8. Зависимость конверсии 2-F-Ado в соединение (IV) (120 ч) от температуры реакционной смеси.



Условия: объем реакции 1 мл, 50°C, 2-F-Ado : 1-P-3-dRib – 1 : 3, 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 8.0).

Рис. 9. Зависимость конверсии 2-F-Ado в соединение (IV) (120 ч) от концентрации PNP.



Условия: объем реакции 100 мл, 50°C, 2-F-Ado : 1-P-3-dRib – 1 : 3, 10 mM калий-фосфатный буфер (pH 8.0), PNP – 10.5 е.а./мл.

Рис. 10. Динамика накопления 2-F-3'-dAdo.

ЯМР-спектроскопии (^1H , ^{13}C , COSY и HSQC, HMBC (^1H , ^{13}C), (^1H , ^{15}N)), соединений (X), (XI), (XV) – данными ЯМР-спектроскопии (^1H).

Исследование цитотоксической активности 2-F-3'-dAdo на опухолевых клетках человека *in vitro*. Цитотоксическую активность 2-F-3'-dAdo и 3'-dAdo исследовали на клеточных линиях Jurkat (Т-клеточная лимфома), Raji (В-клеточная лимфома), MCF-7 (карцинома молочной железы), THP-1 (моноцитарный лейкоз), U937 (лейкемическая моноцитарная лимфома), SKOV3 (рак яичников), A549 (немелкоклеточный рак легкого), LS174T (карцинома толстого кишечника), WI-26 (линия клеток фибробластов человека) с помощью колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток (MTT-теста) с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиума бромид (MTT).

На рис. 11 представлены кривые зависимости выживаемости клеток различных линий от концентраций 2-F-3'-dAdo и кордицепина. С помощью этих кривых были вычислены величины GI_{50} – концентрации, при которых выживаемость клеток снижалась до 50% (табл. 1).

2-F-3'-dAdo проявлял цитотоксическую активность по отношению к клеткам всех линий, кроме SKOV3 (рис. 11, табл. 1). Наибольшую активность 2-F-3'-dAdo демонстрировал на клетках моноцитарного лейкоза THP-1 и на клетках фибробластов человека WI-26, что говорит о его токсичности не только к клеткам опухолевого, но и нормального происхождения. Проблема высокой токсичности 2-фторкордицепина к нормальным клеткам может нивелироваться применением средств его таргетной доставки к опухолям или комбинированной терапией.

Результаты МТТ показали, что исследуемый 3'-dAdo менее токсичен по сравнению с 2-F-3'-dAdo и проявляет цитотоксическую активность только к клеткам MCF-7 (рис. 11 и табл. 1).

Данные сравнительного изучения цитотоксичности кордицепина и его фторированного аналога однозначно свидетельствуют о том, что введение атома фтора во второе положение пуринового основания приводит к увеличению цитотоксичности нуклеозида (сравните синюю (Cord) и красную (F-Cord) линии трендов на рис. 11). Исключение – линия SKOV3, на которую не действовал ни кордицепин, ни его фторированный аналог.

Таблица 1. Результаты анализа цитотоксичности 2-F-3'-dAdo и 3'-dAdo на различных клеточных линиях

Линия клеток	GI_{50} (95% ДИ), мкМ	
	2-F-3'-dAdo	3'-dAdo
Jurkat	13.5 (11.3–16.2)	>100
Raji	38.0 (27.1–47.3)	>100
MCF-7	11.2 (8.9–14.3)	19.5 (11.9–34.5)
THP-1	3.8 (1.6–8.2)	>100
U937	17.6 (10.7–29.8)	>50
SKOV3	>100	>100
A549	51.6 (42.6–62.4)	н/а
LS174T	13.2 (9.1–20.9)	н/а
WI-26	4.6 (4.4–4.7)	>100

Примечание: GI_{50} – концентрация, при которой выживаемость клеток снижалась до 50%, ДИ – доверительный интервал, н/а – не анализировали.

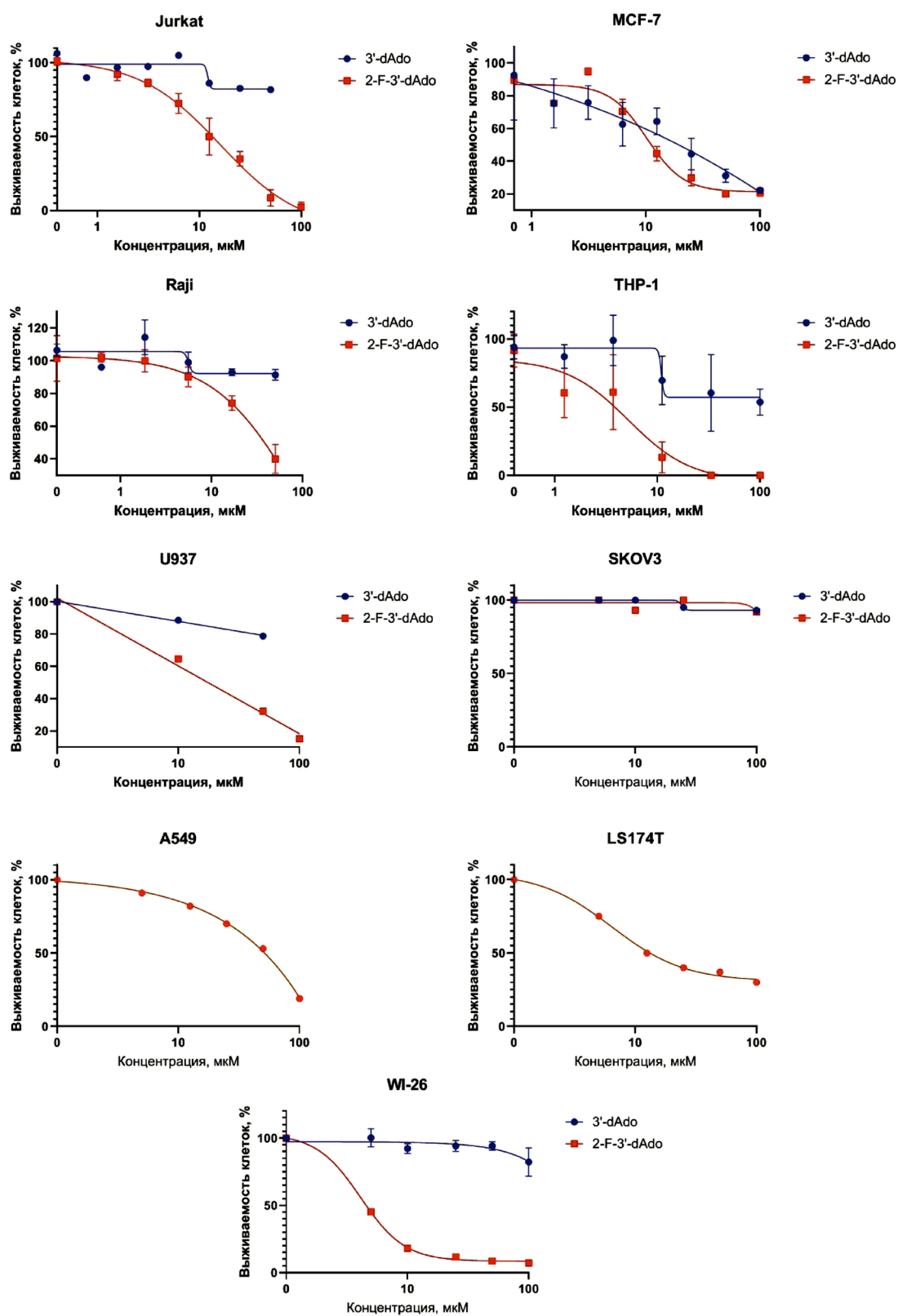


Рис. 11. Кривые зависимости выживаемости клеток различных линий от концентраций 2-F-3'-dAdo и 3'-dAdo.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы коммерческие реактивы и растворители отечественного производства со степенью чистоты “хч” и выше, а также реактивы Sigma-Aldrich (США) без дополнительной очистки (если не указано иное).

2-Фторадеозин был синтезирован в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН [57]. Использовали генно-инженерную пуриннуклеозидфосфорилазу *E. coli* (концентрация белка по методу Бредфорд 29 мг/мл, активность 50 е.а./мг белка), которая была получена в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН [65].

Для колоночной хроматографии использовали Silica gel 60 (Fluka). Для колоночной обращено-фазовой хроматографии использовали Silica gel C18-Reversed phase (Fluka). Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовали пластинки с силикагелем (TLC Slica gel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany).

Аналитическую ВЭЖХ проводили на аппаратуре Waters (Waters 1525, Waters 2489, Breeze 2) в следующих системах: *система 1* – колонка Ascentis Express C18, 3.0 × 75 мм, 2.7 мкм, скорость потока 0.5 мл/мин, детекция при 280 нм. Буфер А – 0.1% трифторуксусная кислота в воде, буфер В – 70% ацетонитрил в 0.1% водной трифторуксусной кислоте, градиент концентрации 0–30% В, 15 мин.

Система 2 – колонка Nova Pak C18, 4.6 × 150 мм, 4 мкм, скорость потока 0.5 мл/мин, детекция при 260 нм. Буфер А – 20% водный метанол, буфер В – метанол, градиент концентрации 0–100% В, 15 мин.

Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке MZ-PREPARATIVE, 20 × 250 мм, PerfectSil Target, ODS-3 5 мкм, скорость потока 4 мл/мин, детекция при 260 нм.

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker Avance DRX-700 в DMSO-*d*₆ или в D₂O (соединение VI) при 303 К. Рабочая частота для ЯМР ¹H – 700 МГц, для ¹³C – 176 МГц, для ¹⁵N – 71 МГц. Химические сдвиги измерены в м.д. (δ) относительно остаточных сигналов протонов DMSO (2.50 м.д.) или D₂O (4.79 м.д.) в качестве внутреннего стандарта. Константы спин-спинового взаимодействия (*J*) измерены в Гц.

Хромато-масс-спектрометрию проводили в системе Agilent 6210 TOF LC/MS (Agilent Technologies, USA).

9-(3'-Дезокси-β-D-рибофуранозил)-2-фторадезин (IV). 2-Фторадеозин (I) (100 мг, 0.35 ммоль) растворяли в 8 мл ацетонитрила. К полученному раствору добавляли 0.26 мл (1.77 ммоль) α-ацетоксиизобутирилбромида в 0.7 мл 90% водного ацетонитрила. За ходом реакции следили с помощью ТСХ в системе хлороформ–метанол, 9 : 1. Через сутки добавляли 8 мл насыщенного раствора Na₂CO₃ (до слабощелочной реакции).

Раствор сконцентрировали до 5 мл. К остатку добавляли 10 мл хлороформа, водный слой промывали хлороформом (3 × 10 мл), объединенные органические слои промывали 0.1 М раствором бикарбоната триэтиламония (2 × 10 мл), высушивали Na₂SO₄ и сконцентрировали.

Промежуточные соединения (II) и (III) выделяли колоночной хроматографией (колонка 15 × 170 мм) в градиенте концентрации метанола в хлороформе (0–4%, по 150 мл каждого). Суммарный выход защищенных продуктов – 105.9 мг (60%). Содержание соединений (II) и (III) в смеси составляло 80 и 20%, соответственно, по данным ВЭЖХ.

ESI/MS [*M*+H]⁺: вычислено для C₁₈H₂₂BrFN₅O₇ (II) 518.0608, 520.0588, найдено 518.0708/520.0701, вычислено для C₁₄H₁₆BrFN₅O₇ (III) 432.0241, 434.0220, найдено 432.0341, 434.01250.

Суспензию 134 мг 10% палладия на угле помещали в 11 мл метанола и пропускали ток водорода (до прекращения насыщения катализатора водородом) в течение 1 ч при перемешивании. Добавляли 160 мг карбоната кальция, через 1 ч добавляли раствор 106 мг (0.21 ммоль) смеси соединений (II) и (III) в 20 мл метанола и продолжали пропускать водород при перемешивании. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе этилацетат–этанол, 3 : 2 и ВЭЖХ в *системе 1*. По окончании реакции (10 ч) реакционную смесь переносили на фильтр с цеолитом, отфильтровывали и осадок промывали метанолом (50 мл). Фильтрат упаривали, добавляли 10 мл хлороформа, водный слой промывали хлороформом (3 × 10 мл), объединенные органические слои промывали 0.1 М раствором бикарбоната триэтиламония (2 × 10 мл), высушивали Na₂SO₄ и упаривали досуха.

Остаток 84 мг растворяли в 1 мл метанола и добавляли 2 мл 25% водного раствора аммиака. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе хлороформ–метанол, 9 : 1. Через 1 ч реакционную смесь упаривали досуха и остаток растворяли в воде. Целевой продукт выделяли колоночной обращенно-фазовой хроматографией на Separon SGX C18 (1.8 × 25 см, элюция градиентом концентрации метанола в воде, 0–30%, 200 мл, скорость элюции 6 мл/мин). Фракции, содержащие продукт (IV), объединяли, упаривали и лиофилизировывали. Выход целевого соединения (IV) – 31.5 мг (34%), чистота по данным ВЭЖХ – 97.8%.

ЯМР ^1H : 8.34 (с, 1H, H-8), 7.79 (с, 2H, 6-NH₂), 5.77 (д, $J = 1.9$, 1H, H-1'), 5.65 (уш. с., 1 H, OH-2'), 4.98 (т, $J = 5.5$, 1H, 5'-OH), 4.55–4.51 (м, 1H, H-2'), 4.38–4.33 (м, 1H, H-4'), 3.72–3.67 (м, 1H, H-5'), 3.58–3.50 (м, 1H, H-5'), 2.25–2.19 (м, 1H, H-3'), 1.93–1.87 (м, 1H, H-3'). ЯМР ^{13}C : 158.99 (C2), 158.01 (C6), 150.58 (C4), 139.72 (C8), 117.84 (C5), 91.16 (C1'), 81.38 (C4'), 75.21 (C2'), 62.83 (C5'), 34.37 (C3'). ЯМР ^{15}N : 241.9 (N7), 174.5 (N9), 87.6 (NH₂). ESI/MS [$M + \text{H}$]⁺: вычислено для C₁₀H₁₃FN₅O₃ 270.1002, найдено 270.1014.

Фракции, содержащие соединение (V), объединяли, упарили и лиофилизировывали. Выход соединения (V) – 1.5 мг (2%), чистота по данным ВЭЖХ – 99.9%.

ЯМР ^1H : 8.50 (с, 1H, H-2), 7.69 (д, $J = 8.0$, 1H, H-7), 7.67 (д, $J = 7.8$, 1H, H-4), 7.30–7.26 (м, 1H, H-5), 7.26–7.22 (м, 1H, H-6), 5.88 (д, $J = 2.4$, 1H, H-1'), 5.71 (д, $J = 3.5$, 1H, 2'-OH), 5.03 (т, $J = 5.4$, 1H, 5'-OH), 4.47–4.43 (м, 1H, H2'), 4.41–4.36 (м, 1H, H4'), 3.74–3.69 (м, 1H, H-5'), 3.58–3.54 (м, 1H, H-5'), 2.23–2.17 (м, 1H, H-3'), 1.92 (ддд, $J = 3.0, 6.4, 9.2$, 1H, H-3'). ЯМР ^{13}C : 144.24 (C9), 142.15 (C2), 133.21 (C8), 122.97 (C5), 122.38 (C6), 119.98 (C7), 111.52 (C4), 92.36 (C1'), 80.77 (C4'), 75.06 (C2'), 62.75 (C5'), 34.23 (C3'). ЯМР ^{15}N : 245.8 (N3), 166.6 (N1). ESI/MS [$M + \text{H}$]⁺: вычислено для C₁₀H₁₄N₆O₃ 267.1127, найдено 267.1213.

1,2-О-Изопропилиденксилофураноза (VIII). D-Ксилозу (VII) (10 г, 70 ммоль) порциями вносили в раствор 18 г (10 мл) концентрированной серной кислоты в 260 мл ацетона, перемешивали 30 мин при комнатной температуре до полной гомогенизации смеси. Гомогенную смесь перемешивали еще 40 мин (контроль ТСХ, система хлороформ–этанол 10%). При охлаждении до-

бавляли раствор 3.5 г Na₂CO₃ в 100 мл воды. Перемешивали при комнатной температуре еще 30 мин. Процесс гидролиза 3,5-О-изопропилиденовой группы контролировали с помощью ТСХ. По окончании реакции добавили 17 г безводного карбоната натрия. Контролировали pH смеси, осадок отфильтровывали, раствор упаривали. Остаток очищали флеш-хроматографией на силикагеле, элюируя по 100 мл хлороформом, 5, 10, 15% метанола в хлороформе. Фракции продукта (VIII) упаривали, остаток сушили в течение 12 ч в вакууме над P₂O₅. Выход фуранозы (VIII) – 10 г (79%).

5-О-Толуил-1-2-изопропилиденксилофураноза (IX). Соединение (VIII) (4.34 г, 20 ммоль) растворяли в 50 мл сухого DCM и 3.7 мл пиридина. К полученному раствору при охлаждении льдом и перемешивании прикапывали раствор толуил-хлорида (2.9 мл, 22 ммоль) в 20 мл DCM в течение 30 минут. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе хлороформ–метанол, 9 : 1. Раствор промывали 0.01 N HCl, водой, высушивали безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток растворяли в 5 мл CCl₄ и добавляли 5 мл н-пентана до помутнения смеси. Реакционную смесь оставляли на ночь при 4°C. Выпавшие кристаллы отфильтровывали, промывали пентаном (3 × 100 мл) и высушивали в вакууме над P₂O₅. Получили 4.65 г кристаллического производного (IX). Дополнительно из маточного раствора выделили 0.6 г продукта. Общий выход – 5.25 г (75%). Т. пл. 45°C, [α]_D 14° (с, 1.0; CHCl₃).

5-О-Толуил-1-2-О-изопропилиден-3-О-тиокарбонилимидазолксилофураноза (X). Соединение (IX) (3 г, 9.7 ммоль), тиокарбонилидиимидазол (1.78 г, 10 ммоль) и DMAP (0.6 г, 5 ммоль) растворяли в 50 мл безводного ацетонитрила. Через 1.5 ч реакция прошла полностью (ТСХ в системе гексан–этилацетат, 1 : 1). Смесь промывали 0.01N HCl, водой, высушивали безводным Na₂SO₄ и сконцентрировали. Соединение (X) выделяли кристаллизацией из 50 мл диэтилового эфира. Осадок отфильтровывали, промывали холодным эфиром (3 × 100 мл) и высушивали в вакууме над P₂O₅. Получили 2.31 г кристаллического производного (X). Дополнительно из маточного раствора выделили 0.7 г продукта. Общий выход – 3.01 г (75%). Т. пл. = 115°C, [α]_D = –34° (с, 1.5; CHCl₃). ЯМР ^1H : 8.46 (с, 1H, Im H-2), 7.82 (д, 2 H, $J = 7.8$, Ph H-2), 7.80–7.78 (м, 1H, Im

H-5), 7.31 (д, 2H, $J = 8.1$, Ph H-3), 7.11–7.08 (м, 1H, Im H-4), 6.07 (д, $J = 4.0$, 1H, H-1), 5.87 (д, $J = 3.1$, 1H, H-3), 4.93 (д, $J = 4.0$, 1H, H-2), 4.76–4.72 (м, 1H, H-4), 4.65 (дд, $J = 4.8$, 11.7, 1H, H-5), 4.55 (дд, $J = 7.1$, 12.0, 1H, H-5), 2.38–2.36 (м, 3H, CH₃Ph), 1.49 (с, 3H, CH₃), 1.29 (с, 3H, CH₃).

5-О-Толуоил-1,2-О-изопропилиден-3-дезоксипентропентофураноза (XI). Соединение (X) (3.2 г, 7.6 ммоль) растворяли в 85 мл диоксана и 38 мл диметилфосфита. К полученному раствору добавляли 1.25 мл 8% раствора перекиси бензоила в диоксане порциями по 0.25 мл каждые 20 мин. Реакцию проводили при барботировании аргона и кипячении. За ходом реакции следили при помощи ТСХ в системе гексан-этилацетат, 1 : 1. По окончании реакции смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Соединение (XI) выделяли колоночной хроматографией на слое силикагеля (3 см, диаметр 6 см), элюируя 50 мл пентана и по 100 мл 3, 6, 10, 15, 20, 30% этилацета в пентане. Выход дезоксипроизводного (XI) – 1.6 г (71%) в виде подвижного масла.

ЯМР ¹H: 7.86 (д, $J = 8.1$, 2H, Ph H-2), 7.34 (д, $J = 8.0$, 2H, Ph H-3), 5.80 (д, $J = 4.2$, 1H, H-1), 4.80–4.77 (м, 1H, H-2), 4.44 (дд, $J = 3.0$, 11.7, 1H, H-5a), 4.42–4.37 (м, 1H, H-4), 4.26 (дд, $J = 5.7$, 11.7, 1H, H-5b), 2.39 (с, 3H, CH₃Ph), 2.09 (дд, $J = 4.5$, 13.4, 1H, H-3a), 1.77–1.71 (м, 1H, H-3b), 1.41 (с, 3H, CH₃), 1.25 (с, 3H, CH₃).

3-Дезокси-эритропентофуранозо-1-фосфат (VI). Раствор соединения (XI) (2.2 г, 7.5 ммоль) в 5 мл уксусной кислоты и 1 мл воды выдерживали при 100°C в течение 2 ч, упаривали и соупаривали с толуолом (3 × 50 мл). Остаток растворяли в 1 мл уксусного ангидрида. К полученной смеси добавляли 2.5 г (25 ммоль) твердой фосфорной кислоты и 0.47 мл (6 ммоль) ацетилбромид и выдерживали при 50°C в течение 2 ч, затем при комнатной температуре 5 ч, после чего растворяли в 150 мл диоксана, добавляли 50 мл трибутиламина и оставляли на ночь.

К раствору добавляли LiOH (3.6 г, 150 ммоль) и 70 мл воды. Полученную гетерогенную смесь оставляли при перемешивании на 10 ч. Осадок отфильтровывали, раствор нейтрализовали 2N HCl и концентрировали до 5 мл. К раствору добавляли 10 мл метанола, 20 мл ацетона и оставляли при 4°C на 10 ч. Осадок отделяли центрифугированием. Процедуру переосаждения проводили аналогично. Твердый аморфный осадок сушили в

вакууме над P₂O₅. Выход – 0.72 г (40%). ЯМР ¹H (D₂O): 5.59–5.46 (м, 1H, H-1), 3.80–3.32 (м, 1H, H-4), 3.68–3.61 (м, 1H, H-2), 3.58–3.48 (м, 2H, H-5), 2.15–2.07 (м, 1H, H-3a), 2.05–1.96 (м, 1H, H-3b).

Ферментативный синтез 9-(3'-дезоксип-Д-рибофуранозил)-2-фтораденина (IV). 2-Фтораденозин (18.4 мг, 0.06 ммоль) растворяли в 100 мл воды при нагревании и перемешивании. Добавляли 40.7 мг (0.18 ммоль) соединения (XI) и 136 мг (1 ммоль) KH₂PO₄, pH доводили до 8.0, добавляли 1050 е.а. PNP, реакционную смесь инкубировали при 50°C в течение 3 дней при периодическом перемешивании. Реакцию останавливали добавлением 20 мл метанола. Раствор концентрировали и выделяли целевой продукт (IV) обращенно-фазовой хроматографией на Separon CGX C18 (3 × 16 см, элюция градиентом концентрации метанола в воде, 0–30%, 300 мл, скорость потока 4 мл/мин). Фракции, содержащие продукт (IV), объединяли, упаривали и лиофилизировали. Выход целевого соединения (IV) – 10.7 мг (66%), чистота по данным ВЭЖХ – 99.0%.

ЯМР ¹H: 8.34 (с, 1H, H-8), 7.79 (с, 2H, 6-NH₂), 5.77 (д, $J = 1.9$, 1H, H-1'), 5.65 (уш. с., 1H, OH-2'), 4.98 (т, $J = 5.5$, 1H, 5'-OH), 4.55–4.51 (м, 1H, H-2'), 4.38–4.33 (м, 1H, H-4'), 3.72–3.67 (м, 1H, H-5'), 3.58–3.50 (м, 1H, H-5'), 2.25–2.19 (м, 1H, H-3'), 1.93–1.87 (м, 1H, H-3'). ЯМР ¹³C: 158.99 (C2), 158.01 (C6), 150.58 (C4), 139.72 (C8), 117.84 (C5), 91.16 (C1'), 81.38 (C4'), 75.21 (C2'), 62.83 (C5'), 34.37 (C3'). ЯМР ¹⁵N: 241.9 (N7), 174.5 (N9), 87.6 (NH₂). ESI/MS [$M + H$]⁺: вычислено для C₁₀H₁₃FN₅O₃ 270.1002, найдено 270.1014.

Биологические эксперименты. Цитотоксическую активность синтезированных соединений тестировали на опухолевых клеточных линиях: Jurkat, Raji, MCF-7, THP-1, U937, SKOV3, A549, LS174T, а также на линии клеток фибробластов человека WI-26. Линии клеток Jurkat, Raji, MCF-7 и THP-1 получены из клеточного банка ГНЦ ИБХ РАН. Линии клеток U937, SKOV3, A549, LS174T любезно предоставлены Банком опухолевых штаммов РОНЦ им. Н. Н. Блохина. Линии клеток фибробластов человека WI-26 предоставлены Молодежной лабораторией биофотоники и нанотехнологии МПГУ.

Для определения цитотоксичности нуклеозиды растворяли в DMSO, а затем доводили до нужной концентрации соответствующей питательной средой без сыворотки. Для учета влияния DMSO

на выживаемость клеток сходным образом готовили растворы DMSO в бессывороточных средах в соответствующих концентрациях.

Клетки линий Jurkat, Raji, и THP-1, U937, SKOV3, A549 и LS174T культивировали в среде RPMI1640 (Gibco, США), содержащей 2 мМ глутамина (Gibco, США), 10 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и 10% фетальной коровьей сыворотки (Gibco, США). Клетки линии MCF-7 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco, США), содержащей 2 мМ глутамина, 100 мкг/мл инсулина (ГНЦ ИБХ РАН, Россия), 10 мкг/мл гентамицина и 10% фетальной коровьей сыворотки. Все клеточные линии культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Клетки линии фибробластов человека WI-26 культивировали в среде DMEM, содержащей 2 мМ L-глутамина, 1% раствора PenStrep (100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и 10% фетальной коровьей сыворотки. Отсутствие контаминации культур микоплазмой контролировали методом ПЦР с помощью набора Мусо Real-Time (Евроген, Россия).

Оценивали выживаемость клеток в присутствии нуклеозидов в исследуемых концентрациях. Клетки высевали в 96-луночные плоскодонные микропланшеты (Sarstedt, Германия) при плотности посева 5000 клеток/луночку для клеток линии MCF-7, 8000 клеток/луночку для клеток линий U937, SKOV3, A549 и LS174T и 10 000 клеток/луночку для клеток линий Jurkat, Raji, THP-1 и WI-26, и инкубировали ночь в CO₂-инкубаторе. Растворы исследуемых соединений добавляли в лунки в объеме 20 мкл. Общий инкубационный объем составлял 200 мкл. Время инкубации с нуклеозидами составило 48 ч для клеток линий Jurkat, Raji, THP-1, SKOV3, A549, LS174T и WI-26, 72 часа для клеток линии MCF-7 и 96 ч для клеток линии U937.

По окончании инкубации в каждую лунку планшетов добавляли по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, США) в физиологическом растворе в концентрации 2.5 мг/мл. Клетки инкубировали с МТТ в CO₂-инкубаторе в течение 2 ч. По окончании инкубации в лунки планшетов с суспензионными культурами (линии Jurkat, Raji, THP-1 и U937) добавляли по 20 мкл 30% водного раствора SDS и 30 мкл DMSO. Содержимое лунок тщательно перемешивали пипетированием до полного растворения кристаллов формазана и с помощью планшетного спектрофотометра Packard SpectraCount

(Perkin Elmer, США) измеряли оптическую плотность в лунках планшетов при 540 нм. Выживаемость клеток в лунках вычисляли по формуле:

$$(A_t - A_{\phi}) / (A_{\text{DMSO}} - A_{\phi}) \times 100\%,$$

где A_t – поглощение при 540 нм в лунке с анализируемым веществом в определенной концентрации, A_{ϕ} – средняя величина поглощения при 540 нм в лунках без клеток (фон), A_{DMSO} – поглощение при 540 нм в лунках с соответствующей концентрацией DMSO.

В случае адгезивных клеток (линии MCF-7, SKOV3, A549, LS174T и WI-26) по окончании инкубации с МТТ из лунок удаляли жидкость и добавляли в лунки по 100 мкл DMSO. Содержимое лунок тщательно перемешивали пипетированием до полного растворения кристаллов формазана и с помощью планшетного спектрофотометра измеряли оптическую плотность в лунках планшетов при 540 нм. Выживаемость клеток в лунках вычисляли по формуле:

$$A_t / A_{\text{DMSO}} \times 100\%,$$

где A_t – поглощение при 540 нм в лунке с анализируемым веществом в определенной концентрации, A_{DMSO} – поглощение при 540 нм в лунках с соответствующей концентрацией DMSO.

Результаты выражали в виде средних значений по 2–4 параллельным измерениям в 2–3 опытах в виде выживаемости клеток в %. Коэффициент корреляции при параллельных измерениях не превышал 30%.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы Prism 9. Строили кривые зависимости выживаемости клеток от концентраций нуклеозидов, проводили регрессионный анализ и вычисляли значение GI_{50} – концентрацию анализируемых веществ, снижающую выживаемость клеток до 50% – и 95% доверительный интервал для этого значения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны и реализованы два новых способа получения 2-фторкордицепина: химический синтез из 2-фтораденозина и химико-ферментативный – с использованием PNP *E. coli* и литиевой соли фосфата 3-дезоксирибозы. Первый способ позволяет синтезировать 2-F-3'-dAdo с выходом 34% в 3 стадии и может быть легко масштабирован, а по эффективности такой синтез сопоставим с известными химическими методами.

В рамках второго способа разработан и проведен новый химический синтез 3-дезоксиритропентофуранозо-1-фосфата в 8 стадий, а также осуществлен ферментативный синтез 2-F-3'-dAdo с выходом 66%. Преимущество второго способа заключается в снижении времени, необходимого для наработки продукта по реакции трансгликозилирования: конверсия исходного 2-фторадеозина во 2-фторкордицепин достигается за 72 ч, что существенно меньше, чем в ранее предложенных нами способах (12-20 дней). Синтезированный 1-P-3-dRib может использоваться в качестве донора 3-дезоксирибозы для ферментативного синтеза новых модифицированных 3'-дезоксирибозидов.

Также проведена оценка цитотоксической активности 2-F-3'-dAdo в отношении клеточных линий человека различного происхождения – опухолевого и нормального – *in vitro*. 2-Фторкордицепин обладает антиметаболической активностью в отношении линий клеток Jurkat, Raji, MCF-7, TNP-1, U937, A549, LS174T, что делает 2-F-3'-dAdo потенциальным кандидатом для дальнейших исследований *in vivo*.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование не имеет финансовой поддержки.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи и дали одобрение на окончательный вариант текста.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Cunningham K., Manson W., Spring F., Hutchinson S.* // *Nature*. 1950. V. 949. P. 166.

2. *Chen Y. J.* // *Life Sci*. 1997. V. 60. P. 2349–2359. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)00291-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)00291-9)
3. *Ng T.B., Wang H.X.* // *J. Pharm. Pharmacol*. 2005. V. 57. P. 1509–1519. <https://doi.org/10.1211/jpp.57.12.0001>
4. *Chu C. K., Baker D. C.* // *Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents* / Eds. Plenum Press: New York, 1993.
5. *Herdewijn, P.* // *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine* / Ed. Wiley-VCH: Weinheim, 2008.
6. *Thomadaki H., Scorilas A., Tsiapalis C.M., Havredaki M.* // *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008. V. 61. P. 251–265. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0533-5>
7. *Shao L.W., Huang L.H., Yan S., Jin J.D., Ren S.Y.* // *Oncol. Lett*. 2016. V. 12. P. 995–1000. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4706>
8. *Zhou Y., Guo Z., Meng Q., Lu J., Wang N., Liu H., Liang Q., Quan Y., Wang D., Xie J.* // *Anti-Cancer Agents Med. Chem*. 2017. V. 17. P. 143–149. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160526114555>
9. *Lee H.H., Jeong J.-W., Lee J.H., Kim G.-Y., Cheong J., Jeong Y.K., Yoo Y.H., Choi Y.H.* // *Oncol. Rep*. 2013. V. 30. P. 1257–1264. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2589>
10. *Yamamoto K., Shichiri H., Uda A., Yamashita K., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Hirai M.* // *Phytother. Res*. 2015. V. 29. P. 707–713. <https://doi.org/10.1002/ptr.5305>
11. *Hwang J.-H., Joo J.C., Kim D.J., Jo E., Yoo H.-S., Lee K.-B., Park S.J., Jang I.-S.* // *Am. J. Cancer Res*. 2016. V. 6. P. 1758. <https://doi.org/2156-6976/ajcr0035711>
12. *Joo J.C., Hwang J.H., Jo E., Kim Y.-R., Kim D.J., Lee K.-B., Park S.J., Jang I.-S.* // *Oncotarget* 2017. V. 8. P. 12211–12224. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14661>
13. *Hwang J.H., Park S.J., Ko W.G., Kang S.-M., Lee D.B., Bang J., Park B.-J., Wee C.-B., Kim D.J., Jang I.-S.* // *Am. J. Cancer Res*. 2017. V. 7. P. 417. <https://doi.org/2156-6976/ajcr005071>
14. *Tao X., Ning Y., Zhao X., Pan T.* // *J. Pharm. Pharmacol*. 2016. V. 68. P. 901–911. <https://doi.org/10.1111/jphp.12544>
15. *Zhang C., Zhong Q., Zhang X., Hu D., He X., Li Q., Feng T.* // *J. Chin. Med. Mater*. 2015. V. 38. P. 786–789.
16. *Lee D., Lee W.-Y., Jung K., Kwon Y.S., Kim D., Hwang G.S., Kim C.-E., Lee S., Kang K.S.* // *Biomolecules* 2019. V. 9. P. 414. <https://doi.org/10.3390/biom9090414>

17. Tian T., Song L., Zheng Q., Hu X., Yu R. // *Pharm. Mag.* 2014. V. 10. P. 325–331.
<https://doi.org/10.4103/0973-1296.137374>
18. Ko B.-S., Lu Y.-J., Yao W.-L., Liu T.-A., Tzean S.-S., Shen T.-L., Liou J.-Y. // *PLoS ONE*. 2013. V. 8. e76320.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076320>
19. Liao Y., Ling J., Zhang G., Liu F., Tao S., Han Z., Chen S., Chen Z., Le H. // *Cell Cycle* 2015. V. 14. P. 761–771.
<https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000097>
20. Baik J.-S., Mun S.-W., Kim K.-S., Park S.-J., Yoon H.-K., Kim D.-H., Park M.-K., Kim C.-H., Lee Y.-C. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 26. P. 309–314.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1507.07090>
21. Li Y., Li R., Zhu S., Zhou R., Wang L., Du J., Wang Y., Zhou B., Ma, L. // *Oncol. Lett.* 2015. V. 9. P. 2541–2547.
<https://doi.org/10.3892/ol.2015.3066>
22. Lee S.-J., Moon G.-S., Jung K.-H., Kim W.-J., Moon S.-K. // *Food Chem. Toxicol.* 2010. V. 48. P. 277–283.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.042>
23. Lee S.-J., Kim S.-K., Choi W.-S., Kim W.-J., Moon S.-K. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2009. V. 490. P. 103–109.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.09.001>
24. Kuchta R.D. // *Curr. Protocols Chem. Biol.* 2010. V. 2. P. 111–124.
<https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch090203>
25. Klenow H. // *Biochim. Biophys. Acta* 1963. V. 76. P. 347–353.
26. Rottman F., Guarino A.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1964. V. 89. P. 465–472.
27. Holbein S., Wengi A., Decourty L., Freimoser F.M., Jacquier A., Dichtl B. // *RNA*. 2009. V. 15. P. 837–849.
<https://doi.org/10.1261/rna.1458909>
28. Horowitz B., Goldfinger B.A., Marmur J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1976. V. 172. P. 143–148.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90059-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90059-x)
29. Müller W.E., Seibert G., Beyer R., Breter H.J., Maidhof A., Zahn R.K. // *Cancer Res.* 1977. V. 37. P. 3824–3833.
30. Müller W.E., Weiler B.E., Charubala R., Pfeleiderer W., Leserman L., Sobol R.W., Suhadolnik R.J., Schröder // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 2027–2033.
<https://doi.org/10.1021/bi00222a004>
31. Rose R. // *N Engl J Med.* 1999. V. 340. P. 115–126.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>
32. Kim H.G., Shrestha B., Lim S.Y., Yoon D.H., Chang W.C., Shin D.J., Han S.K., Park S.M., Park J.H., Park H.I., Sung J.M., Jang Y., Chung N., Hwang K.C., Kim T.W. // *Eur J Pharmacol.* 2006. V. 545. P. 192–199.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.06.047>
33. Nair C.N., Panicali D.L. // *J Virol.* 1976. V. 20. P. 170–176.
<https://doi.org/10.1128/JVI.20.1.170-176.1976>
34. Richardson L.S., Ting R.C., Gallo R.C., Wu A.M. // *Int. J. Cancer.* 1975. V. 15. P. 451–456.
<https://doi.org/10.1002/ijc.2910150311>
35. Hashimoto K., Simizu B. // *Arch Virol.* 1976. V. 52. P. 341–345.
<https://doi.org/10.1007/BF01315623>
36. Leinwand L., Ruddle F.H. // *Science*. 1977. V. 197. P. 381–383.
<https://doi.org/10.1126/science.17919>
37. Person A., Ben-Hamida F., Beaud G. // *Nature* 1980. V. 287. P. 355–357. 0.1038/287355a0
38. Amgad M. Rabie // *ACS Omega*. 2022. V. 7. P. 2960–2969.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05998>
39. Ramesh T., Yoo S.-K., Kim S.-W., Hwang S.-Y., Sohn S.H., Kim I. W., Kim S.-K. // *Exp. Gerontol.* 2012. V. 47. P. 979–987.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.09.003>
40. Niida A., Hiroko T., Kasai M., Furukawa Y., Nakamura Y., Suzuki Y., Sugano S., Akiyama T. // *Oncogene*. 2004. V. 23. P. 8520–8526.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207892>
41. Qin P., Li X.-K., Yang H., Wang Z.-Y., Lu D.-X. // *Molecules*. 2019. V. 24. P. 2231.
<https://doi.org/10.3390/molecules24122231>
42. Li B., Hou Y., Zhu M., Bao H., Nie J., Zhang G.Y., Shan L., Yao Y., Du K., Yang H., Li M., Zheng B., Xu X., Xiao C., Du J. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2016. V. 19. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv112>
43. Ahn Y.J., Park S.J., Lee S.G., Shi S.C., Choi D.H. // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 2744–2748.
<https://doi.org/10.1021/jf990862n>
44. Dong Y., Jing T., Meng Q., Liu C., Hu S., Ma Y., Liu Y., Lu J., Cheng Y., Wang D., Teng L. // *Biomed. Res. Int.* 2014, V. 2014. 160980.
<https://doi.org/10.1155/2014/160980>
45. Shin S., Lee S., Kwon J., Moon S., Lee C.K., Cho K., Ha N.J., Kim K. // *Immune Netw.* 2009. V. 9. P. 98–105.
<https://doi.org/10.4110/in.2009.9.3.98>
46. Yun Y.H., Han S.H., Lee S.J., Ko S.K., Lee C.K., Ha N.J., Kim K.J. // *Nat. Prod. Sci.* 2003. V. 9. P. 291–298.

47. Lee H.J., Burger P., Vogel M., Fries K., Bruning A. // *Investig. New Drugs*. 2012. V. 30. P. 1917–1925. <https://doi.org/10.1007/s10637-012-9859-x>
48. Lui J.C., Wong J.W., Suen Y.K., Kwok T.T., Fung K.P., Kong S.K. // *Arch. Toxicol.* 2007. V. 81. P. 859–865. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0214-5>
49. Dalla Rosa, L. da Silva A.S., Gressler L.T., Oliveira C.B., Dambros M.G., Miletto L.C., Franca R.T., Lopes S.T., Samara Y.N., da Veiga M.L., Monteiro S. G. // *Parasitology*. 2013. V. 140. P. 663–671. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001990>
50. Hassan S. El Khadem, El Sayed H. El Ashry // *Carbohydr. Research*, 1973. V. 29, Issue 2. P. 525–527. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83043-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83043-8)
51. Tsai Y.J., Lin L.C., Tsai T.H. // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. P. 4638–4643. <https://doi.org/10.1021/jf100269g>
52. Dickinson M., Holly F. // *J. Med. Chem.* 1967. V. 275. P. 1165–1167. <https://doi.org/10.1021/jm00318a042>
53. Gillerman I., Fischer B. // *J. Med. Chem.* 2011. V. 54. P. 107–121. <https://doi.org/10.1021/jm101286g>
54. Vödnala S.K., Lundback T., Yeheskieli E., Sjöberg B., Gustavsson A.L., Svensson R., Olivera G.C., Eze A.A., de Koning H.P., Hammarstrom L.G., Rottenberg M.E. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. P. 9861–9873. <https://doi.org/10.1021/jm401530a>
55. Denisova A.O., Tokunova Y.A., Fateev I.V., Breslav A.A., Leonov V.N., Dorofeeva E.V., Lutonina O.I., Muzyka I. S., Esipov R.S., Kayushin A.L., Konstantinova I.D., Miroshnikov I.A., Stepchenko V.A., Mikhailopulo I.A. // *Synthesis*. 2017. V. 49. P. 4853–4860. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1590804>
56. Robins M.J., Wilson J.S., Madej D., Low N.H., Hansske F., Wnuk S.F. // *J. Org. Chem.* 1995. V. 60. P. 7902–7908. <https://doi.org/10.1021/jo00129a034>
57. Berzin V. B., Dorofeeva E. V., Leonov V. N., Miroshnikov A. I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. P. 193–196. <https://doi.org/10.1134/s1068162009020071>
58. Hori N., Watanabe M., Sunagawa K., Uehara K., Mikami Y. // *J. Biotechnol.*, 1991. V. 17. P. 121–131. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(91\)90003-E](https://doi.org/10.1016/0168-1656(91)90003-E)
59. Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D. // *Pharmacol. Ther.*, 2000. V. 88. P. 349–425. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(00\)00097-8](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(00)00097-8)
60. Taran S.A., Verevkin K.N., Feofanov S.A., Miroshnikov A.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. P. 739–745. <https://doi.org/10.1134/S1068162009060107>
61. Del Arco J., Fernández-Lucas J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. P. 7805–7820. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9242-8>
62. Xu L., Li H.M., Lin J. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2023. V. 39. P. 286. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03721-1>
63. Zlatev I., Vasseur J.-J., Morvan F. // *Tetrahedron Lett.* 2008. V. 49. P. 3288–3290. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.03.079>
64. Fathi R., Jordan F. // *J. Org. Chem.* 1986. V. 51. P. 4143–4146. <https://doi.org/10.1021/jo00372a008>
65. Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovskiy D.V., Chupova L.A., Muravyova T.I., Miroshnikov A.I. // *Protein Expr. Purif.* 2002. V. 24. P. 56–60. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1524>

2-Fluorocordycepin: Chemoenzymatic Synthesis and Study of Anticancer Activities *In Vitro*

A. O. Arnautova*, **, #, K. V. Antonov*, E. A. Zorina*, M. A. Simonova*, A. S. Paramonov*, O. C. Zhukova***, M. V. Kiselevskiy***, A. L. Kayushin*, I. V. Fateev*, E. V. Dorofeeva*, B. Z. Eletskaia*, M. Ya. Berzina*, O. S. Smirnova*, T. V. Egorova****, R. S. Esipov*, A. I. Miroshnikov*, and I. D. Konstantinova*

Phone +7 (965) 145-58-94; e-mail arnautova_ibch@mail.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS,
ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

*** N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
ul. Kosigina 4/1, Moscow, 119334, Russia

**** Moscow Pedagogical State University,
ul. Malaya Pirogovskaya 1/1, Moscow, 119991 Russia

Two methods for obtaining 2-fluorocordycepin were proposed and implemented: chemical synthesis from 2-fluoroadenosine with a yield of 34% and chemical-enzymatic synthesis with a yield of 66%, including the production of 3-deoxyerythropentofuranose-1-phosphate and subsequent transglycosylation using *E. coli* purine nucleoside phosphorylase. The cytotoxic activity of 2-fluorocordycepin *in vitro* was assessed. It was shown that 2-fluorocordycepin exhibits an anti-metabolic effect on a number of tumor cell lines (Jurkat, Raji, MCF-7, THP-1, U937, A549, LS174T), which allows us to consider this compound as a promising candidate for the development of antitumor drugs.

Keywords: nucleoside analogues, 2-fluorocordycepin, purine nucleoside phosphorylase