

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.66:577.113.3:577.15

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-321-330>

Поступила в редакцию 28.05.2025

Received 28.05.2025

Л. Л. Биричевская, А. В. Дайнеко, А. С. Щеколова, А. И. Зинченко

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ОДНОРЕАКТОРНЫЙ ПРЕПАРАТИВНЫЙ СИНТЕЗ 6-ТНО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА

Аннотация. Разработан усовершенствованный биотехнологический способ получения 6-тио-2'-дезоксигуанозина – модифицированного нуклеозида, проявляющего уникально широкий спектр противоопухолевой активности. Препаративный однореакторный способ включает инкубирование при температуре 45 °С 6-тиогуанина и 2'-дезокситимидина в фосфатном буфере в присутствии рекомбинантных тимидинфосфорилазы и пуриннуклеозидфосфорилазы *Escherichia coli* и отличается от известного способа-аналога тем, что 2'-дезокситимидин и 6-тиогуанин вносят в реакционную смесь в количествах, намного превышающих их водорастворимость. Использование предлагаемого способа получения 6-тио-2'-дезоксигуанозина обеспечивает по сравнению с известным способом-прототипом увеличение выхода целевого продукта в расчете на исходный 2'-дезокситимидин с 14,6 до 33,5 % и повышение волюметрического выхода целевого продукта с 4,13 до 75,8 г/л реакционной смеси. Это существенно повышает эффективность использования единицы объема биореактора. Предлагаемый метод высокотехнологичен и может быть успешно применен в условиях производства.

Ключевые слова: 6-тио-2'-дезоксигуанозин, рекомбинантная тимидинфосфорилаза, рекомбинантная пуриннуклеозидфосфорилаза, биокатализ, 6-тиогуанин, 2'-дезокситимидин

Для цитирования: Ферментативный однореакторный препаративный синтез 6-тио-2'-дезоксигуанозина / Л. Л. Биричевская, А. В. Дайнеко, А. С. Щеколова, А. И. Зинченко // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 4. – С. 321–330. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-321-330>

Larysa L. Birycheuskaya, Hanna V. Daineka, Nastassia S. Shchokalava, Anatoli I. Zinchenko

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ONE-POT ENZYMATIC PREPARATIVE SYNTHESIS OF 6-THIO-2'-DEOXYGUANOSINE

Abstract. An improved biotechnological method for producing 6-thio-2'-deoxyguanosine, a modified nucleoside exhibiting a uniquely broad spectrum of antitumor activity, has been developed. The one-pot preparative method involves incubation of 6-thioguanine and 2'-deoxythymidine at 45 °C in phosphate buffer in the presence of recombinant *Escherichia coli* thymidine phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase. This method is distinct from the known analogue method in that 2'-deoxythymidine and 6-thioguanine are added to the reaction mixture in amounts that far exceed their water solubility. Utilizing the disclosed method of producing 6-thio-2'-deoxyguanosine increases yield of the end product based on the starting 2'-deoxythymidine from 14.6 to 33.5 % compared to the known prototype method and raises volumetric yield of the end product from 4.13 to 75.8 g/l of the reaction mixture. This significantly improves the efficiency of using a unit volume of the bioreactor. The proposed technology is high-tech and can be successfully applied under largescale production conditions.

Keywords: 6-thio-2'-deoxyguanosine, recombinant thymidine phosphorylase, recombinant purine nucleoside phosphorylase, biocatalysis, 6-thioguanine, 2'-deoxythymidine

For citation: Birycheuskaya L. L., Daineka H. V., Shchokalava N. S., Zinchenko A. I. One-pot enzymatic preparative synthesis of 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceeding of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 4, pp. 321–330 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-4-321-330>

Введение. Модифицированные аналоги нуклеозидов представляют собой группу синтетических молекул, которые имитируют природные нуклеозиды и широко используются в качестве противоопухолевых средств и для лечения некоторых вирусных инфекций с конца 1960-х гг. [1–3]. В последнее время эти соединения также привлекают повышенное внимание из-за их потенциального использования для борьбы с устойчивостью бактерий к антибиотикам [4].

В настоящее время биокаталитический синтез модифицированных нуклеозидов приобретает все большую популярность по сравнению с традиционными многостадийными и более экологически вредными химическими методами [5–7].

Синтез, катализируемый ферментами в составе целых клеток или в виде очищенных белков, имеет ряд преимуществ, таких как возможность проведения реакции в одном сосуде, контролируемая стерео-, регио- и энантиоспецифичность, а также мягкие условия реакции. В связи с этим наиболее часто используемым путем синтеза модифицированных нуклеозидов является реакция трансгликозилирования, катализируемая нуклеозидфосфорилазами или 2'-дезоксирибозилтрансферазами [8, 9].

Модифицированный нуклеозид 6-тио-2'-дезоксигуанозин (6ТДГ) обладает уникально широким спектром противоопухолевой активности, и на его основе как субстанции разрабатываются многообещающие таргетные препараты с двойным эффектом, выражающимся, с одной стороны, в избирательном уничтожении раковых клеток, а с другой – в активации хозяйского противоопухолевого иммунитета [10–12].

Химические методы синтеза 6ТДГ не являются экологически чистыми и характеризуются многостадийностью и низкими выходами [13–15].

Следует отметить, что впервые возможность ферментативного синтеза 6ТДГ (из дезоксирибозо-1-фосфата и 6-тиогуанина (6ТГ) с помощью пуриннуклеозидфосфорилазы (ПНФазы) животного происхождения) была продемонстрирована в 1964 г. [16].

Ранее в нашей лаборатории была продемонстрирована возможность получения 6ТДГ [17] из 2'-дезокситимидина (dThd) и 6ТГ при последовательном действии двух ферментов – тимидинфосфорилазы (ТФазы) и ПНФазы, изолированных из клеток двух рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* (рис. 1).

На первой стадии процесса ТФаза с участием неорганических фосфат-ионов (P_i) расщепляет dThd на тимин (Thy) и 2-дезоксирибозо-1-фосфат (промежуточный продукт). На второй стадии ПНФаза из 2-дезоксирибозо-1-фосфата и 6ТГ синтезирует 6ТДГ с высвобождением P_i .

Важно отметить, что исходные реагенты (нуклеозид и азотистое основание) в описанном варианте синтеза [17] берутся в низких (соответственно 0,1 и 0,02 моль/л) концентрациях. Процесс ведут при температуре 45 °С в 0,01 М калий-фосфатном буфере (рН 7,0) в течение 50 мин. Степень молярной конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси близка к количественной (99–100 %). После выделения целевого продукта из реакционной смеси путем упаривания ее до суха и многократной экстракции побочных продуктов реакции этанолом получили 0,43 г 6ТДГ с выходом 73 % на затраченный 6ТГ. При этом так называемый волюметрический выход 6ТДГ (выражается в количестве целевого продукта, получаемого с единицы объема реакционной смеси [18]) составляет всего 4,13 г/л.

Переход биотехнологической научной разработки, выполняемой, как правило, вначале в аналитическом варианте (предполагает использование минимального количества реагентов и катализаторов), на промышленный уровень требует повышенного количества ферментов и соответствующего препаративного оборудования. Проблема доступности ферментов-биокатализаторов

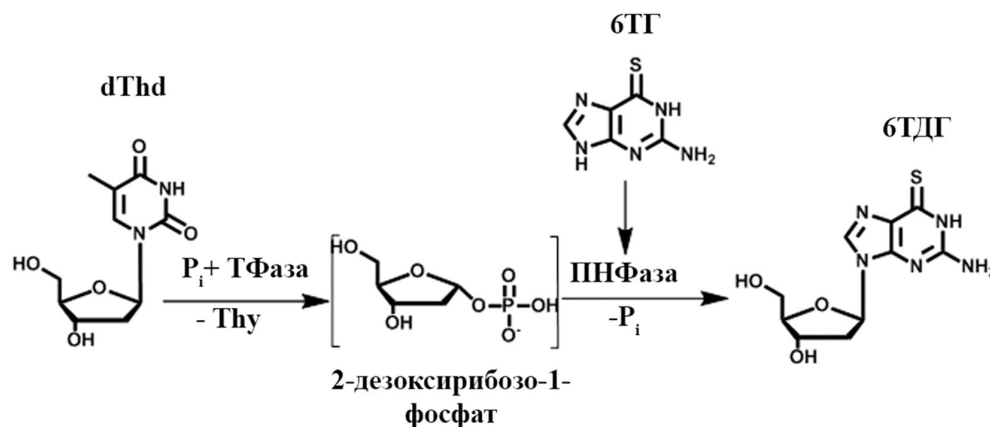


Рис. 1. Схема синтеза 6ТДГ с использованием рекомбинантных нуклеозидфосфорилаз

Fig. 1. Scheme of 6TDG synthesis using recombinant nucleoside phosphorylases

была решена нами путем создания генно-инженерных штаммов *E. coli* – продуцентов ТФазы и ПНФазы, которые депонированы в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под номерами БИМ В-2074 Д и БИМ В-452 Д соответственно.

При создании промышленных технологий получения химических и фармакологических субстанций (в отличие от аналитических способов синтеза) на первый план выступает не только количественное значение конечного выхода целевого продукта, но и экономическая составляющая, во многом зависящая от эффективности использования исходных реагентов и оборудования. В этой связи недостатками описанного нами ранее аналитического способа при его применении для получения десятков и сотен граммов 6ТДГ являются, с одной стороны, невысокий волюметрический выход 6ТДГ, что обуславливает низкую эффективность использования единицы объема биореактора; с другой – невысокий выход 6ТДГ в расчете на затраченный dThd (14,6 %), что приводит к высокому расходу этого нуклеозида, составляющему 5,81 г на получение 1 г целевого продукта.

Указанные недостатки ограничивают возможность применения рассматриваемого способа в условиях промышленного производства. Настоящее исследование посвящено изучению возможности повышения волюметрического выхода реакции синтеза 6ТДГ, что будет способствовать решению проблемы уменьшения объема биореактора, используемого для биокаталитического синтеза этого нуклеозида.

Материалы и методы исследования. В работе использовали рекомбинантную ПНФазу штамма *E. coli* БИМ В-452 Д и рекомбинантную ТФазу штамма *E. coli* БИМ В-2074 Д.

Реакционная смесь объемом 400 мл состояла из следующих компонентов: 0,8 М dThd, 0,4 М 6ТГ, 50 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,0), 180 ед/мл ТФазы и 20 ед/мл ПНФазы. Реакционную смесь инкубировали 6 ч при температуре 45 °С с перемешиванием.

Пробы отбирали каждые 30 мин, прогревали 2 мин при 100 °С, разбавляли в 400 раз дистиллированной водой высокой степени очистки (H_2O_{mq}) и фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм. Накопление продуктов реакции оценивали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Silufol-UV254 (Merk, Германия) в системе растворителей изопропанол–хлороформ–35%-й водный аммиак (10 : 10 : 1; об.), а также с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ) на колонке Luna C18(2) размером 4,6 × 150 мм с диаметром частиц сорбента 5 мкм (Phenomenex, США) с использованием хроматографической системы Wooking K2025 (Nanon, КНР). Регистрацию пиков осуществляли при длине волны 260 нм. Площади пиков рассчитывали с использованием программного обеспечения Wookinglab (Nanon).

Для оценки чистоты полученной химической субстанции 6ТДГ взвешивали точную навеску 28,3 мг, разводили в 100 мл H_2O_{mq} с добавлением диметилсульфоксида (Carl Roth, Германия) и анализировали методом ВЭЖХ. Присутствие примесей в образце определяли по наличию дополнительных пиков на хроматограмме, время выхода которых отличается от времени выхода стандартного образца 6ТДГ.

Структуру полученного соединения подтверждали с помощью УФ-, 1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Спектры поглощения записывали на регистрирующем спектрофотометре РВ-2201А (Solar, Республика Беларусь). Спектр ЯМР записывали на спектрометре Avance-500-DRX (Bruker, Германия). Масс-спектрометрический анализ осуществляли на масс-спектрометре Agilent 1200 LC/MC (Agilent Technologies, США).

Приведенные в работе экспериментальные данные представляют собой достоверный интервал среднего арифметического для 95%-го уровня вероятности.

Результаты и их обсуждение. Главным недостатком предложенного нами ранее ферментативного способа получения 6ТДГ является его сравнительно невысокий волюметрический выход, составляющий всего 4,13 г/л реакционной смеси. По нашему мнению, указанное обстоятельство обусловлено тем, что процесс ведется в условиях, когда исходные субстраты (dThd и 6ТГ) присутствуют в реакционной смеси только в растворенном состоянии в низкой концентрации.

В данной работе нами был осуществлен подбор оптимального содержания исходных субстратов (6ТГ и dThd) в реакционной смеси и их соотношения, в качестве отправной точки был

взят вариант, описанный в способе-прототипе. При этом в серии экспериментов при одновременном увеличении количества обоих субстратов параллельно изменяли их молярное соотношение от 1 : 5 (вариант прототипа) до 1 : 1.

В результате была определена максимально возможная загрузка реагентов, позволяющая поддерживать консистенцию реакционной смеси в необходимом полужидком состоянии, обеспечивающем техническую возможность проведения требуемого ферментативного процесса. При этом максимально возможное количество вносимого 6ТГ (как гораздо менее растворимого компонента) составило 0,4 моль/л. Результаты этого эксперимента приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Зависимость степени конверсии 6ТГ в 6ТДГ от молярного соотношения исходных субстратов

Table 1. Dependence of the degree of 6TG conversion into 6TDG on the molar ratio of the starting substrates

Молярное соотношение 6ТГ и dThd	Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси, %	Относительная эффективность, %
1 : 1	72 ± 4	73,5
1 : 1,5	87 ± 5	88,8
1 : 2	98 ± 3	100
1 : 3	98 ± 2	100
1 : 4	Технически затруднено	—

Как следует из данных табл. 1, максимальный выход целевого продукта достигается при двукратном молярном избытке dThd по отношению к количеству 6ТГ. Использование трехкратного избытка dThd является нецелесообразным.

Далее была экспериментально подобрана концентрация используемого в реакции калий-фосфатного буфера. Следует отметить, что в данном случае буфер обеспечивает не только поддержание необходимой pH реакционной среды, но и является источником фосфат-ионов, непосредственно участвующих в биохимической реакции. При этом влияние описываемого параметра на эффективность процесса неоднозначно. С одной стороны, повышение концентрации ионов фосфата благоприятствует фосфорилизу dThd, приводящему к образованию промежуточного продукта (дезоксирибозо-1-фосфата), необходимого для синтеза 6ТДГ. С другой стороны, фосфат-ионы могут способствовать фосфоролитическому разложению самого образующегося целевого продукта.

Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ (без выделения целевого продукта) в реакционной смеси, содержащей калий-фосфатный буфер с различной концентрацией, представлена в табл. 2. Из приведенных данных следует, что оптимальная концентрация вносимого в реакционную смесь калий-фосфатного буфера находится в пределах 0,02–0,05 М. Следует отметить, что применение его концентраций, превышающих 0,05 М, – нерационально.

Т а б л и ц а 2. Зависимость степени конверсии 6ТГ в 6ТДГ от концентрации калий-фосфатного буфера в реакционной смеси

Table 2. Dependence of the degree of 6TG conversion in 6TDG on the concentration of potassium phosphate buffer in the reaction mixture

Концентрация калий-фосфатного буфера в реакционной смеси, мМ	Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси, %	Относительная эффективность, %
0,0	0,0	0,0
0,27	72,0	72,1
5,0	96,2	96,3
10,0	97,6	98,6
20,0	99,5	99,6
50,0	99,9	100

Окончание табл. 2

Концентрация калий-фосфатного буфера в реакционной смеси, мМ	Степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ в реакционной смеси, %	Относительная эффективность, %
100,0	98,4	98,5
150,0	97,6	97,7
200,0	96,9	97,0
300,0	95,8	95,9

В подобранных условиях реакции нами был осуществлен катализируемый ферментами ТФазой и ПНФазой однореакторный синтез 6ТДГ в реакционной смеси объемом 400 мл. Динамика накопления целевого продукта реакции представлена на рис. 2.

Следует отметить, что в повторных препаративных синтезах максимальная степень конверсии 6ТГ в 6ТДГ, достигающая 98–99 мол. %, наблюдалась в интервале 4–6 ч от начала реакции.

Изменение состава компонентов реакционной смеси отслеживали методами ТСХ и ВЭЖХ. ВЭЖХ-хроматограмма, представленная на рис. 3, отражает содержание основных субстратов и продуктов реакции в реакционной смеси в конечной точке (спустя 6 ч инкубирования).

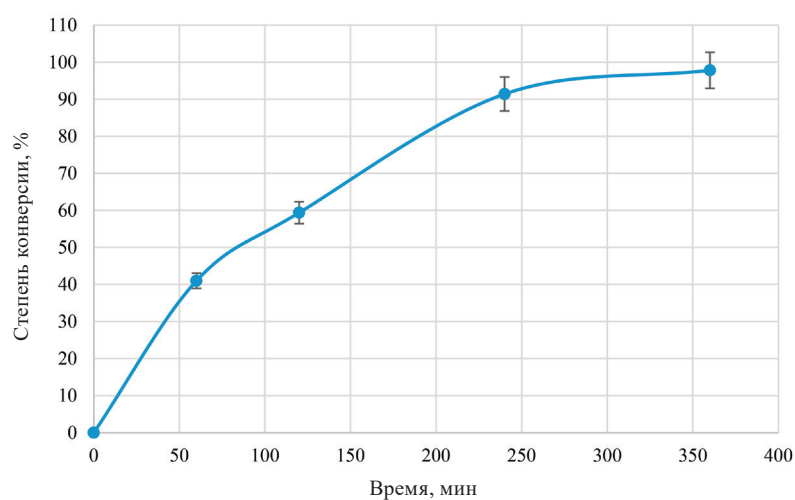


Рис. 2. Динамика накопления 6ТДГ в реакционной смеси

Fig. 2. Dynamics of 6TDG accumulation in the reaction mixture

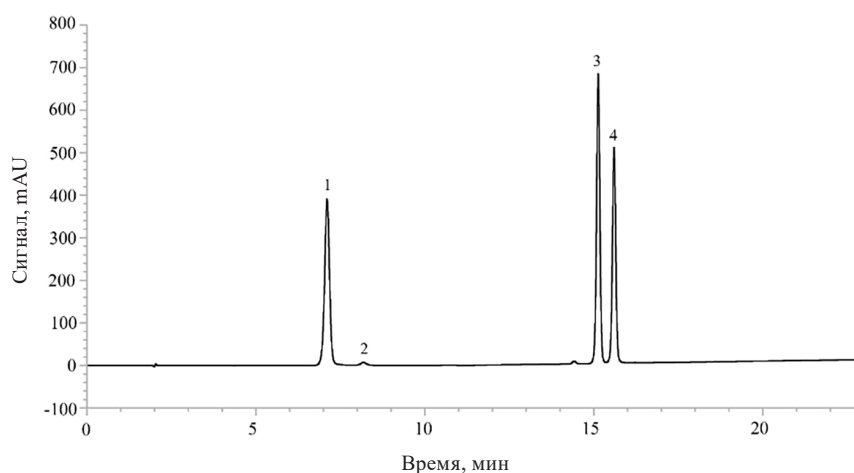


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма состава реакционной смеси спустя 6 ч инкубирования:

1 – Thy; 2 – 6ТГ; 3 – dThd; 4 – 6ТДГ

Fig. 3. HPLC chromatogram of the composition of the reaction mixture after 6 hours of incubation:

1 – Thy; 2 – 6TG; 3 – dThd; 4 – 6TDG

Согласно данным хроматограммы время элюции с колонки основных компонентов реакционной смеси составило: для Thy – 7,108 мин, 6ТГ – 8,185 мин, dThd – 15,130 мин, 6ТДГ – 15,600 мин.

Спустя 6 ч инкубирования конечную реакционную смесь фильтровали на стеклянном фильтре. Для удаления остаточных количеств белков осадок промывали 2 раза водой и отфильтровывали. За 2 цикла отмывки практически удалось избавиться от dThd и Thy. Наиболее трудоемким является удаление 6ТГ из-за его слабой растворимости. В дальнейших отмывках применяли этиловый спирт (98 %), в котором 6ТГ наиболее растворим.

После заключительного этапа отмывки субстанцию 6ТДГ фильтровали и высушивали при комнатной температуре 24 ч в защищенном от света месте. Полученный порошок гомогенизировали.

В результате препаративного ферментативного синтеза в реакционной смеси объемом 400 мл и последующего выделения конечного продукта реакции получено 30,46 г химической субстанции 6ТДГ с чистой 99,6 % согласно ВЭЖХ (рис. 4).

При хроматографировании на тонкослойных пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) подвижность целевого продукта совпадала с R_f контрольного препарата 6ТДГ фирмы MedChemExpress (США).

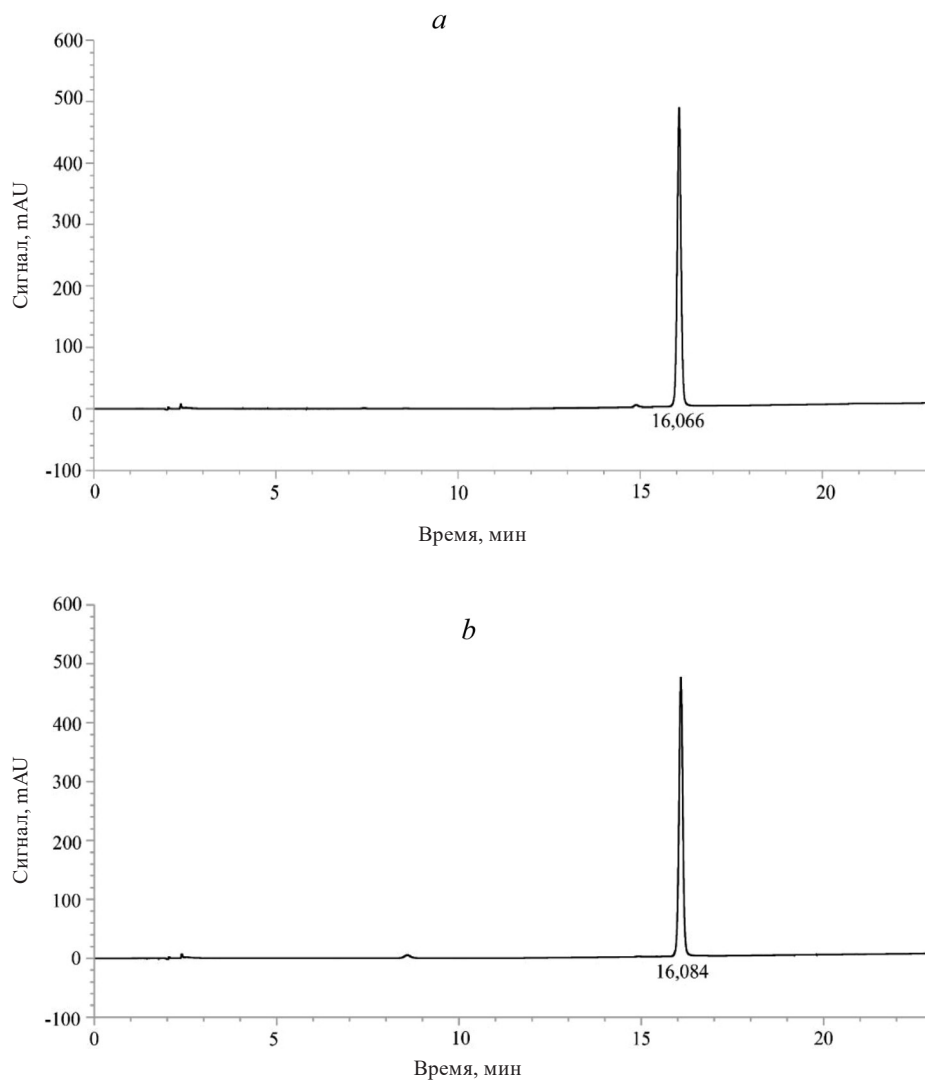


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма очищенной субстанции 6ТДГ (а) и референсного образца 6ТДГ (б)

Fig. 4. HPLC chromatogram of purified 6TDG substance (a) and reference 6TDG sample (b)

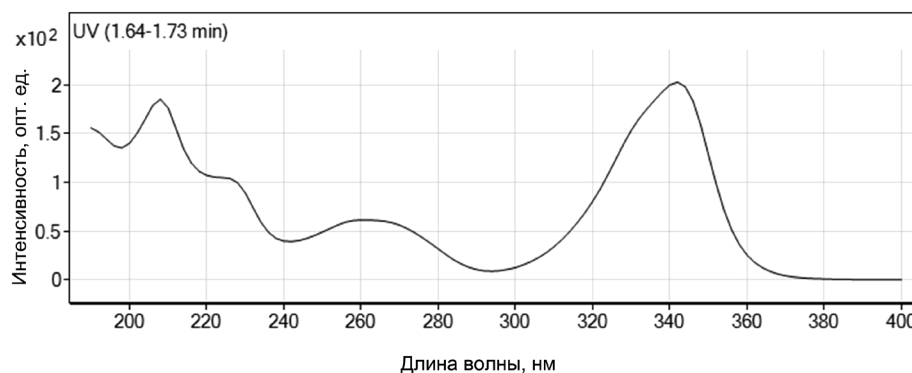


Рис. 5. УФ-спектр полученной субстанции 6ТДГ

Fig. 5. UV spectrum of the obtained 6TDG substance

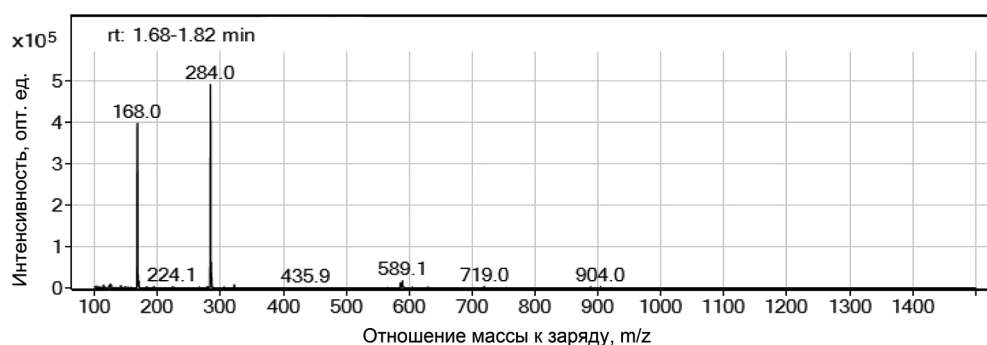


Рис. 6. Масс-спектр полученной субстанции 6ТДГ

Fig. 6. Mass spectrum of the obtained 6TDG substance

Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии полученной субстанции 6ТДГ (раствор в DMSO- d_6 , δ): 8.09 s (1H, H-8); 6.79 bs (NH_2); 6.08 dd (1H, H-1'); 4.31 m (1H, H-3'); 3.78 m (1H, H-4'); 3.50 m (2H, H-2'); 2.53 m (1H, H-5'); 2.12 m (1H, H-5''), а также положения максимумов поглощения в ультрафиолетовом спектре ($\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}, 342 \text{ nm}$) (рис. 5), соответствуют показателям для референсного образца 6ТДГ (MedChemExpress).

Значения изотопных пиков масс-спектрометрического анализа 6ТДГ 168,0 и 284,0 m/z соответствуют ионам $[(6\text{ТГ})+\text{H}]^+$ и $[(6\text{ТДГ})+\text{H}]^+$ соответственно (рис. 6).

Сравнение известного аналитического и разработанного препаративного способов получения 6ТДГ представлено в табл. 3. Использование предлагаемого способа получения 6ТДГ обеспечивает по сравнению с известным способом-прототипом увеличение выхода целевого продукта в расчете на исходный нуклеозид (dThd) с 14,6 до 33,5 % и повышение волюметрического выхода целевого продукта с 4,13 до 75,8 г/л реакционной смеси. Расход dThd на получение 1 г целевого продукта снижается с 5,81 до 2,53 г и существенно повышается эффективность использования единицы объема биореактора.

Таблица 3. Сравнение показателей известного и разработанного способов получения 6ТДГ

Table 3. Comparison of parameters of the known and developed methods of 6TDG production

Сравниваемые параметры	Прототип	Предлагаемое техническое решение
Концентрация dThd	100 ммоль/л	800 ммоль/л
Концентрация 6ТГ	20 ммоль/л	400 ммоль/л
Волюметрический выход 6ТДГ	4,13 г/л	75,8 г/л
Выход 6ТДГ на затраченный dThd	14,6 %	33,5 %
Выход на затраченный 6ТГ	73,0 %	67,0 %
Затраты dThd	5,81 г/г целевого продукта	2,53 г/г целевого продукта

Закключение. Таким образом, в отличие от описанного ранее аналитического способа синтеза, в настоящем исследовании в реакционную смесь нами внесены повышенные количества исходных субстратов, в частности, содержание 6ТГ повысили с 0,02 до 0,4 моль/л, а содержание dThd подняли с 0,1 до 0,8 моль/л, при этом снизив его избыток по отношению к 6ТГ с пятикратного до двукратного. Также увеличили (с 0,01 до 0,02 М) экспериментально подобранную концентрацию калий-фосфатного буфера, обеспечивающего необходимое для участия в процессе фосфорилиза dThd количество неорганического фосфата.

Существенно, что в предложенном нами варианте в начале процесса в растворенном состоянии находится только небольшая часть исходных dThd и 6ТГ. Но по мере синтеза 6ТДГ происходит постепенное дорастворение этих субстратов, находящихся в осадке. Следует отметить, что использование исходных нуклеозида и азотистого основания в концентрациях больших, чем в предложенном варианте, нерационально и малоэффективно, так как приводит к значительным техническим трудностям, связанным с перемешиванием реакционной смеси.

Отличительные особенности предложенного нами технического решения являются существенными ввиду того, что только при использовании указанных параметров процесса удастся достичь цели настоящего исследования – многократного повышения волюметрического выхода целевого продукта. Кроме того, при этом повышается более чем в 2 раза выход 6ТДГ в расчете на затраченный dThd. Предлагаемый метод высокотехнологичен и может быть успешно применен в условиях производства.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в расшифровке спектра ЯМР профессору Е. И. Квасюку (МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ), а также С. М. Грязнову за любезно предоставленный для работы реагент 6ТГ.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to Professor E. Kvasyuk (International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University) for assistance in decoding the NMR spectrum, and Dr. S. Gryaznov (MAIA Biotechnology, USA) for the 6TG reagent kindly provided for the work.

Список использованных источников

1. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases / L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet // *Nature Reviews. Drug Discovery*. – 2013. – Vol. 12, N 6. – P. 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
2. Biocatalytic synthesis of antiviral nucleosides, cyclic dinucleotides, and oligonucleotide therapies / K. J. D. Van Giesen, M. J. Thompson, Q. Meng, S. L. Lovelock // *JACS Au*. – 2023. – Vol. 3, N 1. – P. 13–24. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00481>
3. De Clercq, E. Selected milestones in antiviral drug development / E. De Clercq // *Viruses*. – 2024. – Vol. 16, N 2. – Art. 169. <https://doi.org/10.3390/v16020169>
4. Fighting antimicrobial resistance: innovative drugs in antibacterial research / R. D. Süssmuth, M. Kulike-Koczula, P. Gao, S. Kosol // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2025. – Vol. 64, N 10. – Art. e202414325. <https://doi.org/10.1002/anie.202414325>
5. Lewkowicz, E. S. Whole cell biocatalysts for the preparation of nucleosides and their derivatives / E. S. Lewkowicz, A. M. Iribarren // *Current Pharmaceutical Design*. – 2017. – Vol. 23, N 45. – P. 6851–6878. <https://doi.org/10.2174/1381612823666171011101133>
6. Enabling broader adoption of biocatalysis in organic chemistry / E. O. Romero, A. T. Saucedo, J. R. Hernandez-Melyendez [et al.] // *JACS Au*. – 2023. – Vol. 3, N 8. – P. 2073–2085. <https://doi.org/10.1021/jacsau.3c00263>
7. Verma, S. Recent developments and applications of biocatalytic and chemoenzymatic synthesis for the generation of diverse classes of drugs / S. Verma, S. Paliwal // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2024. – Vol. 25, N 4. – P. 448–467. <https://doi.org/10.2174/0113892010238984231019085154>
8. Del Arco, J. Purine and pyrimidine salvage pathway in thermophiles: a valuable source of biocatalysts for the industrial production of nucleic acid derivatives / J. Del Arco, J. Fernandez-Lucas // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 102, N 18. – P. 7805–7820. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9242-8>
9. Microbial biosynthesis of nucleos(t)ide analogs: applications, and engineering optimization / W. Yu, X. Wei, Y. Wu [et al.] // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2024. – Vol. 51, N 5. – P. 879–897. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2024.2435668>
10. Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine / I. Mender, S. Gryaznov, Z. G. Dikmen [et al.] // *Cancer Discovery*. – 2015. – Vol. 5, N 1. – P. 82–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-14-0609>
11. A Modified Nucleoside 6-Thio-2'-Deoxyguanosine Exhibits Antitumor Activity in Gliomas / Sh. Yu, Sh. Wei, M. Savani [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2021. – Vol. 27, N 24. – P. 6800–6814. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-21-0374>

12. A telomere-targeting drug depletes cancer initiating cells and promotes anti-tumor immunity in small cell lung cancer / B. Eglenen-Polat, R. R. Kowash, H. C. Huang [et al.] // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, N 1. – Art. 672. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44861-8>
13. A convenient synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine, *ara*-guanine, *ara*-6-thioguanine and certain related purine nucleosides by the stereospecific sodium salt glycosylation procedure / N. B. Hanna, K. Ramasamy, R. K. Robins, G. R. Revankar // *Journal of Heterocyclic Chemistry*. – 1988. – Vol. 25, N 6. – P. 1899–1903. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570250653>
14. Xu, Y. Z. Simple synthesis of 4-thiothymidine, 4-thiouridine and 6-thio-2'-deoxyguanosine / Y. Z. Xu, Q. Zheng, P. F. Swann // *Tetrahedron Letters*. – 1991. – Vol. 32, N 24. – P. 2817–2820. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)85095-m](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)85095-m)
15. Onizuka, K. A new odorless procedure for the synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine and its incorporation into oligodeoxynucleotides / K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2009. – Vol. 28, N 8. – P. 752–760. <https://doi.org/10.1080/15257770903155576>
16. Bieber, A. L. Enzymatic synthesis and some biochemical effects of 2'-deoxy-6-thioguanosine / A. L. Bieber, A. C. Sartorelli // *Nature*. – 1964. – Vol. 201. – Art. 624. <https://doi.org/10.1038/201624a0>
17. Атака на теломеры, или Подход к терапии рака с помощью 6-тио-2'-дезоксигуанозина / А. Береснев, Е. Квасюк, С. Квач, А. Зинченко // *Наука и инновации*. – 2016. – № 9. – С. 58–61.
18. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions / U. Horn, W. Strittmatter, A. Krebber [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 1996. – Vol. 46, N 5–6. – P. 524–532. <https://doi.org/10.1007/s002530050855>

References

1. Jordheim L. P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
2. Van Giesen K. J. D., Thompson M. J., Meng Q., Lovelock S. L. Biocatalytic synthesis of antiviral nucleosides, cyclic dinucleotides, and oligonucleotide therapies. *JACS Au*, 2023, vol. 3, no. 1, pp. 13–24. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00481>
3. De Clercq E. Selected milestones in antiviral drug development. *Viruses*, 2024, vol. 16, no. 2, art. 169. <https://doi.org/10.3390/v16020169>
4. Sussmuth R. D., Kulike-Koczula M., Gao P., Kosol S. Fighting antimicrobial resistance: innovative drugs in antibacterial research. *Angewandte Chemie International Edition*, 2025, vol. 64, no. 10, art. e202414325. <https://doi.org/10.1002/anie.202414325>
5. Lewkowicz E. S., Iribarren A. M. Whole cell biocatalysts for the preparation of nucleosides and their derivatives. *Current Pharmaceutical Design*, 2017, vol. 23, no. 45, pp. 6851–6878. <https://doi.org/10.2174/138161282366617101101133>
6. Romero E. O., Saucedo A. T., Hernandez-Melendez J. R., Yang D., Chakrabarty S., Narayan A. R. Enabling broader adoption of biocatalysis in organic chemistry. *JACS Au*, 2023, vol. 3, no. 8, pp. 2073–2085. <https://doi.org/10.1021/jacsau.3c00263>
7. Verma S., Paliwal S. Recent developments and applications of biocatalytic and chemoenzymatic synthesis for the generation of diverse classes of drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2024, vol. 25, no. 4, pp. 448–467. <https://doi.org/10.2174/0113892010238984231019085154>
8. Del Arco J., Fernandez-Lucas J. Purine and pyrimidine salvage pathway in thermophiles: a valuable source of biocatalysts for the industrial production of nucleic acid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, vol. 102, no. 18, pp. 7805–7820. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9242-8>
9. Yu W., Wei X., Wu Y., Jiang C., Tu Y., He B. Microbial biosynthesis of nucleos(t)ide analogs: applications, and engineering optimization. *Critical Reviews in Microbiology*, 2024, vol. 51, no. 5, pp. 879–897. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2024.2435668>
10. Mender I., Gryaznov S., Dikmen Z. G., Wright W. E., Shay J. W. Induction of Telomere Dysfunction Mediated by the Telomerase Substrate Precursor 6-Thio-2'-Deoxyguanosine. *Cancer Discovery*, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 82–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-14-0609>
11. Yu Sh., Wei S., Savani M., Lin X., Du K., Mender I., Siteni S. [et al.]. A Modified Nucleoside 6-Thio-2'-Deoxyguanosine Exhibits Antitumor Activity in Gliomas. *Clinical Cancer Research*, 2021, vol. 27, no. 24, pp. 6800–6814. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-21-0374>
12. Eglenen-Polat B., Kowash R. R., Huang H. C., Siteni S., Zhu M., Chen K., Bender. M. E. [et al.]. A telomere-targeting drug depletes cancer initiating cells and promotes anti-tumor immunity in small cell lung cancer. *Nature Communications*, 2024, vol. 15, no. 1, art. 672. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44861-8>
13. Hanna N. B., Ramasamy K., Robins R. K., Revankar G. R. A convenient synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine, *ara*-guanine, *ara*-6-thioguanine and certain related purine nucleosides by the stereospecific sodium salt glycosylation procedure. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1988, vol. 25, no. 6, pp. 1899–1903. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570250653>
14. Xu Y. Z., Zheng Q., Swann P. F. Simple synthesis of 4-thiothymidine, 4-thiouridine and 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Tetrahedron Letters*, 1991, vol. 32, no. 24, pp. 2817–2820. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(91\)85095-m](https://doi.org/10.1016/0040-4039(91)85095-m)
15. Onizuka K., Taniguchi Y., Sasaki S. A new odorless procedure for the synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine and its incorporation into oligodeoxynucleotides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2009, vol. 28, no. 8, pp. 752–760. <https://doi.org/10.1080/15257770903155576>
16. Bieber A. L., Sartorelli A. C. Enzymatic synthesis and some biochemical effects of 2'-deoxy-6-thioguanosine. *Nature*, 1964, vol. 201, art. 624. <https://doi.org/10.1038/201624a0>

17. Beresnev A., Kvasnyuk E., Kvach S., Zinchenko A. Attack on telomeres, or an Approach to cancer therapy using 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Nauka i innovatsii* [Science and Innovation], 2016, no. 9, pp. 58–61 (in Russian).

18. Horn U., Strittmatter W., Krebber A., Knüpfer U., Kujau M., Wenderoth R., Müller K., Matzku S., Plückthun A., Riesenberger D. High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, vol. 46, pp. 524–532. <https://doi.org/10.1007/s002530050855>

Информация об авторах

Биричевская Лариса Леонидовна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: larbir@mail.ru

Дайнеко Анна Васильевна – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: daineko1999@list.ru

Щеколова Анастасия Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastindeathnote@gmail.com

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by. <https://orcid.org/0000-0003-2401-2586>

Information about the authors

Larysa L. Birycheuskaya – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: larbir@mail.ru

Hanna V. Daineka – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: daineko1999@list.ru

Nastassia S. Shchokhalava – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastindeathnote@gmail.com

Anatoli I. Zinchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by. <https://orcid.org/0000-0003-2401-2586>