

индивидуальных диастереомеров олигонуклеотидов является хроматографическое разделение их смеси, образующейся в процессе синтеза. С этой целью использовали обращенно-фазовую [14, 25], ионообменную [26] или прямо-фазовую адсорбционную хроматографии [7, 17, 27]. Было отмечено [28, 29], что успех разделения непредсказуем и определяется особенностями структуры конкретного диастереомера.

В этой связи разработка универсального хроматографического метода представляет собой важную методологическую задачу. Наиболее эффективным считается подход, основанный на различной стабильности комплементарных комплексов, образуемых диастереомерами неионных аналогов олигонуклеотидов [2, 7, 15, 30, 31].

Первые фракционирование диастереомеров по комплементарному принципу было осуществлено в работе [7]. При разных температурах проводили гель-фильтрацию на сефадексе G-50 комплексов poly(dA) со смесью всех возможных диастереомеров гептаэтилового эфира октатимидилата. В пике полимера совместно с poly(dA) элюировались диастереомеры октатимидилата, образующие комплексы с poly(dA), а в пике олигомера элюировались диастереомеры, не образующие такие комплексы при заданной температуре колонки. В результате был получен ряд фракций диастереомеров неустойчивого состава, различающихся по комплексообразующим свойствам.

Существенно более технологичный вариант фракционирования диастереомеров был осуществлен на колонке с poly(A), иммобилизованной на BrCN-сефарозе [32] (фракционировали октаэтиловый триэфир нонатимидилуридина) и на колонке с d(pA)<sub>16</sub>, иммобилизованным на Лихросорбе-NH<sub>2</sub> [33] (фракционировали производное октатимидилата с чередующимися фосфодиефирными и метилфосфонатными связями). Фосфотриэфирное или метилфосфонатное производное наносили на колонку при 0° С, поднимали температуру колонки на несколько градусов и проводили элюцию, собирая фракцию диастереомеров, элюируемых при заданной температуре. Затем снова поднимали температуру и проводили следующую элюцию и т. д. Было получено несколько фракций диастереомеров, различающихся прочностью комплекса с иммобилизованными poly(A) или гексадекадезокснаденилатом.

Оба вышеприведенных метода не позволили получить индивидуальные диастереомеры олиготимидилатов либо из-за сложности разделяемых смесей, либо в связи с невысокой эффективностью использованных хроматографических методик разделения.

В настоящей работе осуществлено высокоэффективное разделение диастереомеров ряда этиловых фосфотриэфиров октануклеотида d(pGCCAACA). Разделение проводили с использованием носителя на основе Лихросорба-NH<sub>2</sub>, к алифатической ампрогруппе которого через фосфамидную связь был ковалентно присоединен комплементарный олигонуклеотид d(pTGTGGC). Иммобилизацию осуществляли по методу [33], однако в отличие от цитированной работы для увеличения эффективности разделения сорбент упаковывали в стальную колонку под давлением.

На первом этапе работы была проведена проверка аффинных свойств приготовленной колонки. Смесь двух олигонуклеотидов, d(pCCAACA) и d(pCAAACA), наносили на колонку при температуре, близкой к 0° С. Элюцию проводили 0,02 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,18 М хлористый натрий при постоянном увеличении температуры колонки. На хроматограмме наблюдаются два пика (рис. 1), причем первый из них соответствует гексануклеотиду, а второй, выходящий при более высокой температуре, — гептануклеотиду. Увеличение ионной силы элюирующего буфера от 0,2 до 0,5 М NaCl увеличивает температуру удерживания обоих олигонуклеотидов (температура, при которой пик элюиру-

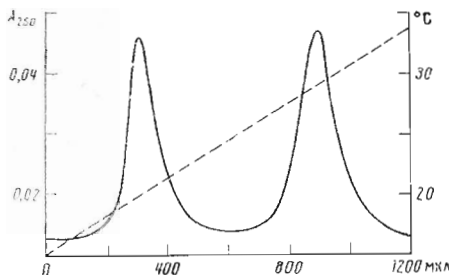


Рис. 1

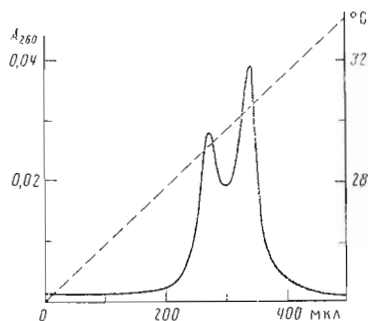


Рис. 2

Рис. 1. Разделение комплементарной хроматографией смеси олигонуклеотидов  $d(pCCAAACA)$  и  $d(pCAAACA)$  на Лихросорбе- $NH_2$  с иммобилизованным  $d(pTGTTCGC)$ ; элюция буфером 1 (см. «Экспер. часть»), температурный градиент  $0,8^\circ/\text{мин}$ , скорость элюции  $50 \text{ мкл}/\text{мин}$

Рис. 2. Разделение комплементарной хроматографией смеси диастереомеров олигонуклеотида  $d[GCC(Et)AAACA]$ . Условия см. подпись к рис. 1, температурный градиент  $1^\circ/\text{мин}$

ется с колонки) на  $3-4^\circ \text{C}$ . Эти факты свидетельствуют, что удержание олигонуклеотидов на колонке является результатом их комплементарного воздействия с олигонуклеотидом, ковалентно присоединенным к неподвижной фазе. В контрольном эксперименте в тех же условиях через колонку пропускали некомплементарный олигонуклеотид  $d(pTTTTTTTT)$ . Последний элюировался в объеме, близком к свободному объему колонки, т. е. практически не удерживался на колонке. Этот результат позволяет утверждать, что все иные виды взаимодействий (включая ионные, гидрофобные и др.), кроме комплементарных, не вносят существенного вклада в удержание олигонуклеотидов на колонке.

Для разделения смеси диастереомеров пробу наносили на колонку при  $1^\circ \text{C}$  и проводили элюцию  $0,02 \text{ M}$  натрий-фосфатным буфером ( $\text{pH } 7,4$ ), содержащим  $0,18 \text{ M}$  хлористый натрий при постоянном повышении температуры. Из данных рис. 2 видно, что происходит разделение двух диастереомеров олигонуклеотида  $d[GCC(Et)AAACA]$ , причем разность температур удерживания достигает  $2-3^\circ \text{C}$ .

Однако лучшего разделения диастереомеров удается достигнуть, если хроматографию проводить при постоянной температуре колонки, на несколько градусов более низкой, чем температура удерживания. После нанесения смеси диастереомеров на колонку при  $1^\circ \text{C}$  насос останавливали, поднимали плавно температуру колонки до необходимого значения и проводили элюцию при постоянной температуре (рис. 3а). Экспериментально подобрали состав элюирующего раствора, позволяющий улучшить селективность и эффективность разделения диастереомеров:  $0,18 \text{ M}$  калий-фосфатный буфер ( $\text{pH } 7,5$ ), содержащий  $30\%$  ацетонитрила. Колебания температуры в процессе хроматографии составляли не более  $0,05^\circ \text{C}$ .

В подобранных условиях удалось разделить практически все синтезированные производные олигонуклеотида  $d(GCCAAACA)$ , содержащие 1,2 или 3 фосфотриэфирные группировки (рис. 3-6). Из приведенных данных видно, что хроматографические профили разделения смеси диастереомеров олигонуклеотидов, имеющих одну этильную группу, а, следовательно, одну пару диастереомеров, состоят из двух пиков, соответствующих индивидуальным диастереомерам. Анализируя эти профили, можно отметить, что большое влияние на времена удерживания и селективность разделения диастереомеров оказывают ближайшие к этильной группе основания.

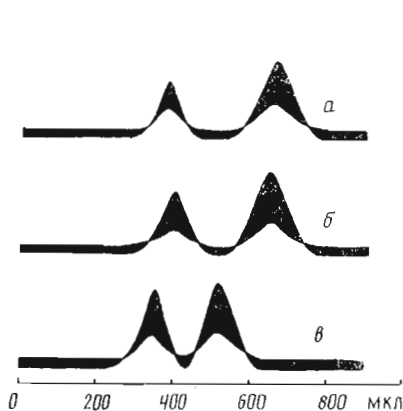


Рис. 3

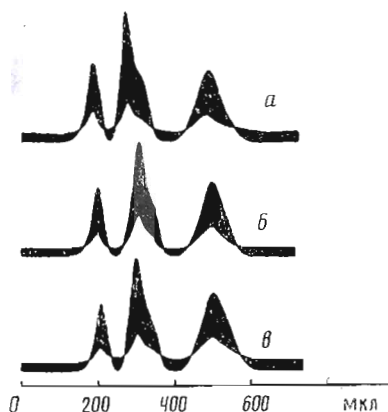


Рис. 4

Рис. 3. Разделение комплементарной хроматографией смеси диастереомеров олигонуклеотидов  $d[\text{GCCA}(\text{Et})\text{AACA}]$  (а),  $d[\text{GCCAA}(\text{Et})\text{ACA}]$  (б),  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{AAACA}]$  (в). Колонка см. рис. 1, температура  $25^\circ\text{C}$ , элюция буфером 2, скорость элюции 50 мкл/мин, детекция при двух длинах волн 260/280 нм

Рис. 4. Разделение комплементарной хроматографией смеси диастереомеров олигонуклеотидов  $d[\text{GCCA}(\text{Et})\text{A}(\text{Et})\text{ACA}]$  (а),  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{A}(\text{Et})\text{AACA}]$  (б),  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{AA}(\text{Et})\text{ACA}]$  (в). Условия см. подпись к рис. 3

Так, для олигонуклеотидов  $d[\text{GCCA}(\text{Et})\text{AACA}]$  и  $d[\text{GCCAA}(\text{Et})\text{ACA}]$ , имеющих одинаковое окружение для этильной группы (аденин-аденин), профили элюции совпадают как по объему удерживания, так и по селективности разделения (рис. 3а, б). В то же время олигонуклеотид  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{AAACA}]$ , отличающийся от первых двух по ближайшему окружению этильной группы, отличается и по профилю элюции.

Более сложная картина наблюдается при разделении диастереомеров олигонуклеотидов, содержащих две этильные группы. Ожидаемое число фракций в этом случае четыре. Однако, как следует из рис. 4, профили хроматографии для олигонуклеотидов  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{A}(\text{Et})\text{AACA}]$ ,  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{AA}(\text{Et})\text{ACA}]$  и  $d[\text{GCCA}(\text{Et})\text{A}(\text{Et})\text{ACA}]$  содержат по три ярко выраженных пика. Площадь среднего пика примерно в 2 раза больше, чем площадь любого из крайних. Во всех случаях средний пик имеет признаки деления на две фракции, которые удалось более четко разделить при более низкой температуре (рис. 5). Резонно предположить, учитывая ярко выраженную аддитивность влияния этильных групп на прочность комплексообразования, что крайние фракции являются гомоизомерными ( $Sp-Sp$  и  $Rp-Rp$ ), а средняя — смесью ( $Sp-Rp$  и  $Rp-Sp$ ).

Как и в случае олигонуклеотидов с одной этильной группой, на времена удерживания олигонуклеотидов с двумя этильными группами оказывает влияние ближайшее окружение этих групп. Так, олигонуклеотиды  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{A}(\text{Et})\text{AACA}]$  и  $d[\text{GCC}(\text{Et})\text{AA}(\text{Et})\text{ACA}]$  различаются только положением одной этильной группы при одинаковом их ближайшем окружении. Профили элюции их диастереомеров практически совпадают (рис. 4б, в). Для олигонуклеотида  $d[\text{GCCA}(\text{Et})\text{A}(\text{Et})\text{ACA}]$  одна из этильных групп имеет другое окружение по сравнению с вышеуказанными олигонуклеотидами. Это отличие проявляется в хроматографическом профиле. Например, объемы удерживания пиков для профиля «а» на 20–50 мкл меньше, чем соответствующих пиков для профилей «б, в» (рис. 4а–в). Следует отметить также, что разность объемов удерживания крайних фракций диастереомеров олигонуклеотидов с двумя этильными группами не-

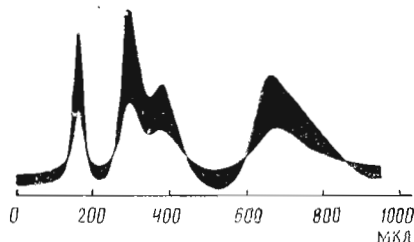


Рис. 5. Разделение комплементарной хроматографией смеси диастереомеров олигонуклеотида  $d[GCCA(Et)A(Et)ACA]$ . Условия см. подпись к рис. 3, температура колонки  $20^{\circ}C$ .

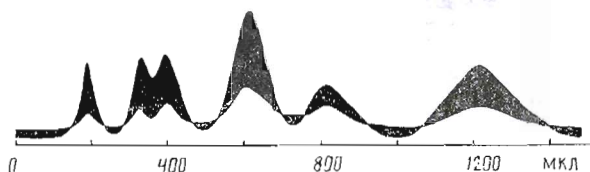


Рис. 6. Разделение комплементарной хроматографией смеси диастереомеров олигонуклеотида  $d[GCC(Et)A(Et)A(Et)ACA]$ . Условия см. подпись к рис. 3, температура колонки  $20^{\circ}C$ .

сколько больше, чем эта разность в случае олигонуклеотидов с одной этильной группой (ср. рис. 3 и 4).

Наличие трех этильных групп в составе олигонуклеотида  $d[GCC(Et)A(Et)A(Et)ACA]$  еще более усложняет картину комплементарной хроматографии (рис. 6), комментировать которую в терминах абсолютных конфигураций фосфотриэфирных фрагментов без детального анализа каждой из фракций не представляется возможным. Можно лишь отметить, что на хроматограмме ясно видно 6 (вместо 8 ожидаемых) пиков, причем, площадь двух из них примерно в 2 раза больше площади любого из оставшихся. Значительно увеличена разность времен удерживания крайних фракций по сравнению с предыдущими случаями.

Таким образом, использование метода комплементарной хроматографии в ВЭЖХ-варианте позволяет получить индивидуальные диастереомеры этиловых фосфотриэфиров олигонуклеотидов, содержащих одну или две этильные группы. Для олигонуклеотидов с большим числом фосфотриэфирных фрагментов полностью разделить смесь диастереомеров не удается. Можно, однако, надеяться, что детальный подбор условий разделения на высокоэффективных колонках с комплементарными сорбентами (варьирование длины и структуры иммобилизованного олигонуклеотида, размера и качества сорбента, температуры разделения, используемого буфера и т.п.) в сочетании с последующей обращенно-фазовой хроматографией отдельных фракций, содержащих неразделенные диастереомеры, позволит решить проблему разделения на индивидуальные диастереомеры этиловых фосфотриэфиров олигонуклеотидов в каждом конкретном случае.

### Экспериментальная часть

В работе использовали ацетонитрил для ВЭЖХ (Merck, ФРГ), натрий фосфорнокислый однозамещенный (ч. д. а.), натрий хлористый (ч. д. а.), калий фосфорнокислый однозамещенный (ос. ч.), EDTA (Serva, ФРГ), какодилат натрия (Serva, ФРГ). Использовали буферные растворы, приготовленные на бидистиллированной воде: 0,18 М натрий хлористый, 0,02 М натрий фосфорнокислый однозамещенный, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ како-

динат натрия, рН 7,4 (буфер 1); 0,18 М калий фосфорнокислый однозамещенный в 30% водном ацетонитриле, рН 7,5 (буфер 2). Величину рН растворов измеряли на рН-метре модели 501 (ORION RESEARCH, США), оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре Specord M40 (Carl Zeiss Jena, ГДР).

Фосфотриэфиры производные олигонуклеотидов синтезированы на полимерном носителе с использованием комбинации фосфотриэфирного и Н-фосфонатного методов. Дезоксинуклеозиды (dA, dC, dG) ацилировали по экзоциклической аминогруппе по методу [34], используя для dA *m*-бромбензоильную, для dG ацетильную и для dC бензоильную защитную группы. О-Хлорфениловые эфиры N-ацил-5'-О-диметокситритилнуклеозидов получали как описано в работе [35]. Н-Фосфонатные производные нуклеозидов синтезировали по методу [36]. Фосфотриэфирную конденсацию проводили в присутствии N-окиси 4-диметиламинопиридина [37] или N-окиси 4-морфолинопиридина [38]. В качестве конденсирующего реагента использовали 2,4,6-тринизопропилбензолсульфохлорид. Н-Фосфонатную конденсацию осуществляли с использованием пивалонилхлорида и последующим этилированием межнуклеотидной Н-фосфонатной связи в присутствии четыреххлористого углерода, абсолютного этанола и N-метилимидазола. Защитные группы удаляли концентрированным аммиаком при 20°С в течение 16 ч. Деблокированные олигонуклеотиды очищали ионообменной и обращенно-фазовой хроматографией. Структуру олигонуклеотидов и положение этильных заместителей в них определяли по методу [39].

Для разделения диастереомеров использовали комплементарный сорбент [32], приготовленный на основе Лихросорба-NH<sub>2</sub> (10 мкм, Merck, ФРГ), с ковалентно присоединенным олигонуклеотидом d(pTGTTTGCC). Емкость аффинного сорбента составляла 1 мкмоль октануклеотида на 1 г сухого полимера. Сорбент упаковывали в стальную колонку (1×60 мм) с использованием насоса высокого давления, модель 110 (Altex, США). Хроматографию проводили на жидкостном хроматографе Милихром-1 (Научприбор, г. Орел). Температуру колонки задавали с помощью жидкостного термостата путем прокачивания теплоносителя через внешнюю термостатирующую стеклянную рубашку. Точность поддержания температуры составляла 0,05°С. Температуру регистрировали с помощью термопары и цифрового вольтметра Ц1516.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамова Т. В., Лебедев А. В., Райт А. С.* // Молекуляр. биология. 1988. Т. 22. Вып. 5. С. 1285–1292.
2. *Miller P. S., Yano J., Yano E., Carroll C., Jayaraman K., Ts'o P. O. P.* // Biochemistry. 1979. V. 18. № 23. P. 5134–5143.
3. *Miller P. S., Fang K. N., Kondo S., Ts'o P. O. P.* // J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. № 24. P. 6657–6665.
4. *Stec W. J., Zon G., Egan W., Byrd R. A., Phillips L. R., Gallo K. A.* // Tetrahedron Lett. 1985. V. 26. № 18. P. 2194–2194.
5. *Moody H. M., van Genderen M. P. H., Kolbe L. H., Kochen H. J. M., Meijer E. M., Buck H. K.* // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 12. P. 4769–4782.
6. *Miller P. S., Braiterman L. T., Ts'o P. O. P.* // Biochemistry. 1977. V. 16. № 9. P. 1988–1996.
7. *Miller P. S., Dreon N., Pulford S. M., McParland K. B.* // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 20. P. 9659–9665.
8. *Jayaraman K., McParland K. B., Miller P. S., Ts'o P. O. P.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1537–1541.
9. *Karpova G. G., Knorre D. G., Ryte A. S., Stephanovich L. E.* // FEBS Lett. 1980. V. 122. № 1. P. 21–23.
10. *Agris C. H., Blake K. R., Miller P. S., Reddy M. P., Ts'o P. O. P.* // Biochemistry. 1986. V. 25. № 20. P. 6268–6275.
11. *Abramova T. V., Vlassov V. V., Lebedev A. V., Ryte A. S.* // FEBS Lett. 1988. V. 236. № 1. P. 243–245.

12. Miller P. S., Barrett J. C., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. № 24. P. 4887-4896.
13. Barrett J. C., Miller P. S., Ts'o P. O. P. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. № 24. P. 4897-4906.
14. Gallo K. A., Shao K.-I., Phillips L. R., Regan J. B., Koziolkiewicz M., Uznanski B., Stec W. J., Zon G. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 18. P. 7405-7420.
15. Summers M. F., Powell G., Egan W., Byrd R. A., Wilson W. D., Zon G. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 18. P. 7421-7436.
16. Bower M., Summers M. F., Powell C., Shinozuka K., Regan J. B., Zon G., Wilson W. D. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 15. № 2. P. 4915-4930.
17. Абрамова Т. В., Лебедев А. В. // *Биоорган. химия*. 1983. Т. 9. № 6. С. 824-831.
18. Miller P. S., Annan N. D., McParland K. B., Pulford S. M. // *Biochemistry*. 1982. V. 21. № 10. P. 2507-2512.
19. Noble S. A., Fisher E. F., Caruthers M. H. // *Nucl. Acids Res.* 1984. V. 12. № 7. P. 3387-3404.
20. Uznanski B., Koziolkiewicz M., Stec W. J., Zon G. // *Chem. scr.* 1986. V. 26. № 1. P. 251-260.
21. Lesnikowski Z. J., Wolkamin P. J., Stec W. J. // *Tetrahedron Lett.* 1987. V. 28. № 45. P. 5535-5538.
22. Brill W. K.-D., Caruthers M. H. // *Nucleosides and Nucleotides*. 1989. V. 8. № 5/6. P. 1011-1014.
23. Lesnikowski Z. J., Jaworska M., Stec W. J. // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. № 24. P. 11675-11689.
24. Lebedev A. V., Rife J. P., Seligsohn H. W., Wenzinger G. R., Wickstrom E. // *Tetrahedron Lett.* 1990. V. 31. № 6. P. 855-858.
25. Stec W. J., Zon G., Uznanski B. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 236. № 2. P. 263-280.
26. Jensen D. E., Reed D. J. // *Biochemistry*. 1978. V. 17. № 24. P. 5098-5107.
27. Katti S. B., Agrawal K. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 44. P. 5327-5330.
28. Dorman M. A., Noble S. A., McBride L. J., Caruthers M. H. // *Tetrahedron*. 1984. V. 40. № 1. P. 95-102.
29. Marugg J. E., de Vromm E., Dreef C. E., Tromp M., van der Marel C. A., van Boom C. H. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 5. P. 2171-2185.
30. Абрамова Т. В., Воробьев Ю. Н., Лебедев А. В. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. № 10. С. 1335-1347.
31. Durand M., Maurizot J. C., Asseline U., Barbier C., Tuong N. T., Helene C. // *Nucl. Acids Res.* 1989. V. 17. № 5. P. 1823-1837.
32. Карпова Г. Г., Козлова О. О., Пичко Н. П. // *Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук*. 1983. № 7. Вып. 3. С. 96-100.
33. Zarytova V. F., Shishkina I. G. // *Analyt. Biochem.* 1990. V. 188. № 1. P. 214-218.
34. Ti G. S., Gaffney B. L., Jones R. A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1982. V. 104. № 5. P. 1316-1319.
35. Горбунов Ю. А., Зиновьев В. В., Речкунова Н. И., Овечкина Л. Г., Попов С. Г., Малыгин Э. Г. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 12. С. 1629-1637.
36. Marugg G. E., Tromp M., Kuyl-Yeheskiely E., van der Marel G. A., van Boom J. H. // *Tetrahedron Lett.* 1986. V. 27. № 23. P. 2661-2664.
37. Горбунов Ю. А., Самуков В. В. Способ триэфирного синтеза олигонуклеотидов: А. с. 1351938 СССР.
38. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. // *Биоорган. химия*. 1985. Т. 11. № 8. С. 1087-1096.
39. Петренко В. А., Поздняков П. И., Киприянов С. М., Болдырев А. Н., Семенова Л. Н., Сиволобова Г. Ф. // *Биоорган. химия*. 1986. Т. 12. № 8. С. 1088-1100.

Поступила в редакцию  
16.V.1991

После доработки  
29.VIII.1991

I. A. VTORUSHINA\*, Yu. A. GORBUNOV\*, V. F. ZARYTOVA, N. I. KOMAROVA,  
A. V. LEBEDEV, S. G. LOKHOV, A. V. MANAJENKO, A. N. SINIAKOV\*,  
I. G. SHISHKINA

**STUDY OF DIASTEREOMERS OF NONIONIC OLIGONUCLEOTIDE  
ANALOGUES. VI. SEPARATION OF DIASTEREOMERS OF ETHYL  
PHOSPHOTRIESTERS OF OCTANUCLEOTIDE d(GCCAAACA) BY MEANS  
OF HIGH PERFORMANCE COMPLEMENTARY (AFFINITY)  
CHROMATOGRAPHY**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,  
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk;*

*\* All-Union Research Institute of Molecular Biology, Minmedprom,  
Novosibirsk Region, Kol'tsovo*

Diastereomers of oligonucleotide ethyl phosphotriesters were separated by high-performance complementary (affinity) chromatography on a column with the immobilized complementary oligonucleotide. The elution buffer contained 0.18 M  $K_2HPO_4$ , pH 7.5, and 30% acetonitrile. The temperature of the separation was a few degrees lower than  $T_m$  of corresponding oligonucleotide complexes. The diastereomers separated completely or partially were: d[GCC(Et)AAACA], d[GCCA(Et)AACA], d[GCAA(Et)ACA], d[GCC(Et)-A(Et)AACA], d[GCC(Et)AA(Et)ACA], d[GCCA(Et)A(Et)ACA], d[GCC(Et)A(Et)A-(Et)ACA].