



УДК 547.963:3:543.544

## ВЭЖХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДТИОФОСФАТОВ

© 1997 г. В. Г. Метелев<sup>#</sup>, В. Н. Ташлицкий, С. Агравал\*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
119899, Москва, Воробьевы горы, химический факультет;

\* Корпорация "Hybridon", Кэمبرидж, Массачусетс, США

Поступила в редакцию 16.09.96 г. Принята к печати 10.04.97 г.

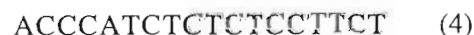
Описаны условия разделения синтетических олигодезоксирибонуклеозидтиофосфатов с помощью ВЭЖХ на слабом анионообменнике Wide-Pore PEI, а также смешанных олигодезоксирибонуклеотидов (с фосфатными и тиофосфатными межнуклеотидными связями) на носителе Partisphere C<sub>18</sub> в ион-парном режиме. Исследована зависимость времени удерживания олигонуклеотидов от нуклеозидного состава и количества тиофосфатных связей.

*Ключевые слова:* антисмысловые олигонуклеотиды, олигодезоксирибонуклеозидтиофосфаты, ВЭЖХ.

Олигодезоксирибонуклеозидтиофосфаты (ОТФ) в настоящее время являются важнейшими олигонуклеотидными аналогами, которые используются в разработке нового терапевтического подхода к лечению вирусных инфекций, малярии и других заболеваний [1–4]. ОТФ относительно просто синтезировать с помощью стандартных синтонов и реактивов, используемых в синтезе немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов (за исключением стадии окисления) [1, 5]. Однако методы хроматографического анализа ОТФ разработаны недостаточно. Между тем крайне важно иметь надежные методы очистки и контроля чистоты препаратов, предлагаемых для использования в качестве лекарств. ОТФ трудно анализировать с помощью ВЭЖХ в обращенно-фазовом режиме, так как в отличие от немодифицированных олигонуклеотидов у ОТФ каждая межнуклеотидная тиофосфатная группировка имеет хиральный центр, что приводит к существованию многочисленных диастереомеров. Ионнообменная ВЭЖХ ОТФ осложняется повышенным взаимодействием (по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами) с сильными анионообменными сорбентами, что приводит к значительному уширению пиков и неспецифической сорбции. Мы предложили хроматографическое разделение ОТФ на слабых анионообменных сорбентах и показали, что колонки Partisphere WAX (Whatman) могут быть успешно использованы для анализа ОТФ и смешанных олигонуклеозидтио-

фосфатов [6, 7]. К недостаткам хроматографии на WAX-колонках относится длительная подготовка этих колонок к работе и нестабильность сорбента при продолжительном использовании. Настоящее исследование посвящено разработке альтернативных подходов к ВЭЖХ-анализу и выделению ОТФ. Как показали наши эксперименты, описанные ниже, более удобен и устойчив к работе другой слабый анионообменный сорбент – Wide-Pore PEI, который представляет собой широкопористую силикагелевую матрицу с полиэтиленимином (поперечно не сшитым) в качестве стационарной фазы.

Для оптимизации условий разделения ОТФ на колонке SCOUT WP PEI были опробованы различные солевые системы на основе сульфата аммония (0.05–0.5 М), фосфатов (0.005–0.5 М) и пиррофосфатов (0.001–0.06 М) калия и натрия, бромида калия (0–1.4 М) (т.е. солей, используемых в хроматографии олигонуклеотидов и их производных [6–8]) в 15–40% ацетонитриле. Лучшее разделение компонентов смесей индивидуальных ОТФ (1)–(11), синтезированных на основе пентадекануклеотида (1) удлинением его с 5'-конца,



Сокращения: ОТФ – олигодезоксирибонуклеозидтиофосфаты, все межнуклеотидные связи тиофосфатные. Префикс "d" (дезокси) в обозначениях опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: Metelev@bioogr.chem.msu.su, факс: 939-31-81).

TCGCACCCATCTCTCTCCTTCT (8)

CTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT (9)

TCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT (10)

CTCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT (11)

и ОТФ, полученных при синтезе ACACCCAATTC-TGAAAATGG (12), было достигнуто при применении системы I, в состав которой входит 0.01 М пирофосфат калия (рН 6.3), 25% ацетонитрил и бромид калия (линейный градиент концентраций) (см., например, рис. 1, 2).

Было показано, что в этих условиях времена удерживания ОТФ зависят главным образом от заряда соединения (т.е. от числа нуклеозидных звеньев), что характерно для ионообменной хроматографии. ВЭЖХ-анализ смеси ОТФ  $dC_n$  ( $n = 2-21$ ) обнаружил значительную сорбцию олигодезоксирибозитидинтиофосфатов при  $n > 15$ , поэтому описанные выше условия не могут быть успешно использованы для ВЭЖХ ОТФ любого состава. Хроматография в системе I гетерогенных по нуклеозидному составу ОТФ с более высоким содержанием цитидиновых и/или гуанозиновых звеньев, чем у ОТФ (1)–(12), также сопровождалась их заметной сорбцией.

Применение другой хроматографической системы, в которой содержится 40% ацетонитрил и используется градиент концентраций пирофосфата калия (0.002–0.05 М, рН 6.3) (система II), дает более обнадеживающие результаты. Например, разделение смеси гомо-ОТФ  $dC_n$  ( $n = 2-21$ ) с применением новой системы II проходит удовлетворительно (см. рис. 3), хотя в этих условиях разрешение компонентов смесей из индивидуальных гетеро-ОТФ (1)–(11) несколько ухудшается. ВЭЖХ-анализ смесей гомо-ОТФ показал, что олигодезоксирибозитидилаты элюируются позднее соответствующих тимидилатов и аденилатов. Не отмечено прямой корреляции между гидрофобностью этих соединений и временами удерживания. Более точное представление о влиянии нуклеозидного состава на время удерживания ОТФ было получено из данных ВЭЖХ в системе II восьми индивидуальных 24-звенных дезоксирибонуклеозидтиофосфатов (см. таблицу).

Исходя из предположения аддитивности вклада каждого нуклеозидтиофосфатного звена  $t_R$  (время удерживания) 24-звенных олигонуклеозидтиофосфатов может быть рассчитано по уравнению

$$t_R = \delta t_R(T)n_T + \delta t_R(A)n_A + \delta t_R(C)n_C + \delta t_R(G)n_G, \quad (1)$$

где  $\delta t_R(N)$  и  $n_N$  – парциальный вклад во время удерживания и число соответствующих (Т, А, С и G) нуклеозидтиофосфатных звеньев. Решение системы восьми линейных уравнений, содержащих

четыре неизвестных, позволяет рассчитать парциальные вклады каждого нуклеозидтиофосфатного звена ( $\delta t_R(T) = 0.61 \pm 0.02$ ,  $\delta t_R(A) = 1.30 \pm 0.02$ ,  $\delta t_R(C) = 1.67 \pm 0.02$ ,  $\delta t_R(G) = 2.65 \pm 0.02$ ) и таким образом показать, что минимальное влияние на время удерживания ОТФ оказывают тимидиловые звенья, далее дезоксирибоадениловые, дезоксирибоцитидиловые и максимально влияют дезоксирибогуаниловые.

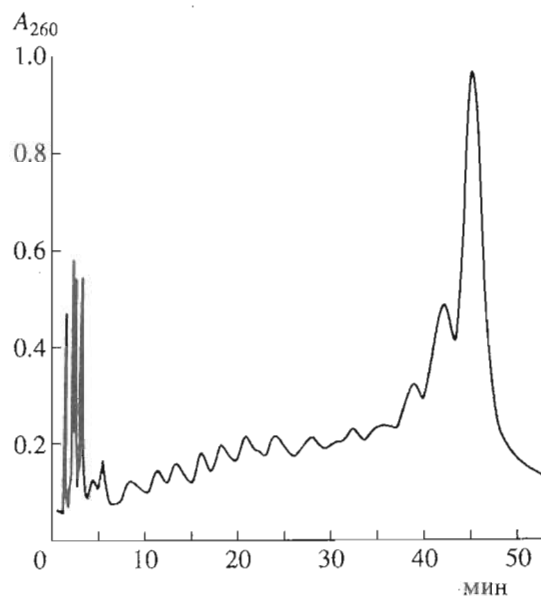


Рис. 1. Хроматографическое разделение реакционной смеси синтеза ОТФ (12) (после полного удаления защитных групп) в системе I,

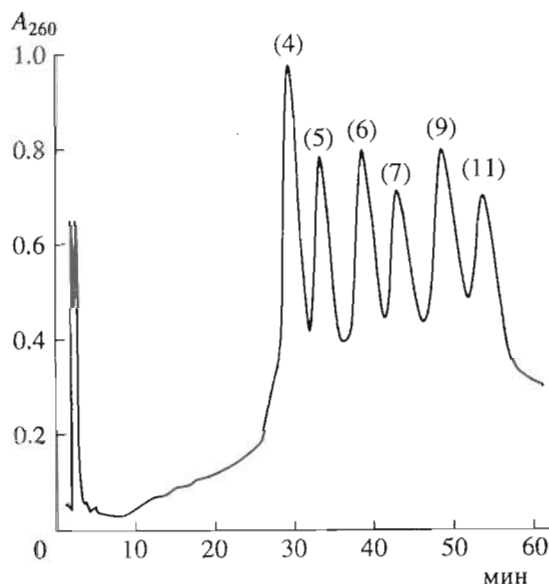


Рис. 2. Хроматографическое разделение смеси индивидуальных ОТФ (4), (5), (6), (7), (9) и (11) в системе I.

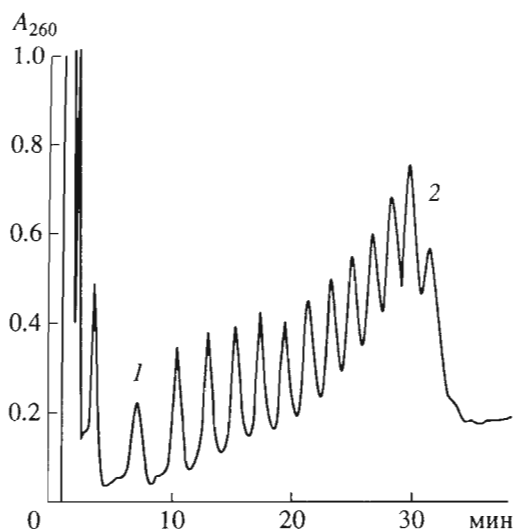


Рис. 3. Хроматографическое разделение смеси ОТФ  $dC_n$  ( $n = 2-21$ ) в системе II. 1 —  $dC_9$ ; 2 —  $dC_{21}$ .

Небольшая погрешность найденных величин, не превышающая 3%, свидетельствует о вращенности данной системы линейных уравнений и подтверждает применимость уравнения 1 для расчета времени удерживания 24-звенных ОТФ различного нуклеозидного состава. Ограничение использования уравнения 1 обусловлено зависимостью парциальных вкладов от длины анализируемого олигонуклеотида. Как видно из рис. 3, шаг времени удерживания для дезоксирибозитидинтиофосфатов уменьшается с увеличением числа звеньев при ВЭЖХ-анализе в системе II. Можно предположить, что парциальные вклады соответствующих нуклеозидтиофосфатов изменяются аналогично.

Суммируя сказанное, можно отметить, что разрешение ОТФ при ВЭЖХ на Wide-Pore PEI лучше, чем на использованном ранее Partisphere WAX [6]. Этот сорбент значительно устойчивее в работе и может быть успешно использован для

анализа многих ОТФ и их производных, за исключением ОТФ с очень высоким содержанием дезоксигуанозинового звеньев, когда хроматография сопровождается значительным уширением пиков и сорбцией.

Для уменьшения токсичности и повышения специфичности действия антисмысловых олигонуклеотидов в ряде исследований предложено ОТФ заменить олигодезоксирибонуклеотидами, в которых введено только несколько тиофосфатных межнуклеотидных связей (преимущественно по 3'- или 3'- и 5'-концам олигонуклеотидной цепи — см., например, [9]). При исследовании гидролитической устойчивости таких соединений в разных средах, а также при их хроматографическом анализе и анализе их производных, как показали наши опыты, удобно использовать ион-парную хроматографию. Метод ион-парной ВЭЖХ успешно применен для решения аналогичных задач при исследовании модифицированных олигонуклеотидов [10, 11]. Для анализа и разделения смешанных олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих фосфатные и тиофосфатные межнуклеотидные связи (см. схему), мы выбрали колонку Partisphere  $C_{18}$ . Оптимальной оказалась система III на основе 0.1 М фосфата калия (pH 7.14) и 2 мМ тетрабутиламмонийдигидрофосфата с линейным градиентом концентрации ацетонитрила от 12.5 до 50%.

Время удерживания олигодезоксирибонуклеотида в выбранных условиях определяется соотношением обычных и тиофосфатных межнуклеотидных связей. Для олигонуклеотидов (I)–(VI), в которых содержатся 0, 2, 3, 6, 10 и 26 тиофосфатных межнуклеотидных связей, оно равно соответственно 8.88, 10.94, 11.67, 14.14, 16.41 и 23.47 мин. Для олигонуклеотидов (VII)–(XI) с 0, 2, 6, 10 и 24 тиофосфатными межнуклеотидными связями время удерживания равно 7.57, 9.65, 13.52, 14.50 и 21.94 мин соответственно.

Как видно из рис. 4, зависимость прироста времени удерживания ( $\Delta t_R$ ) от числа межнуклеотидных тиофосфатных связей ( $N_s$ ) линейризуется в

Времена удерживания ( $t_R$ ) ОТФ при хроматографии в системе II

Олигодезоксирибонуклеозидтиофосфаты (последовательность 5' → 3')	Нуклеозидный состав				$t_R$ , мин
	A	G	C	T	
TCTCGCACCCATCTCTCTCCTTCT	2	1	12	9	30.99
CCCAGGTGCTCCTCTATCTCCTTT	2	2	10	10	31.26
GTTATCATCTCCACCAAGAGTTTG	6	4	6	8	32.86
AGCTCCTGGTAATCCTCGTTCTCC	3	4	9	8	33.98
CAAACCTCTTGGTGGAGATGATAAC	8	6	4	6	36.62
AACCTGCCACAGAAACCACCGTTC	8	3	10	3	36.88
GGAGAAGCAGGATTACCAGGAGCT	8	9	4	3	42.75
AAAGGAGATAGAGGAGAACCTGGG	10	10	2	2	44.1



## Схема.

обратных координатах ( $1/\Delta t_R$  от  $1/N_s$ ). Для двух исследованных серий олигонуклеотидов (I)–(VI) и (VII)–(XI) не обнаружена зависимость величины  $\Delta t_R$  от длины и нуклеозидного состава олигонуклеотида. Таким образом, прирост времени удерживания может быть рассчитан по уравнению

$$\Delta t_R = N_s / (\alpha N_s + \beta), \quad (2)$$

где  $\alpha$  и  $\beta$  – эмпирические константы.

По тангенсу угла наклона полученной прямой и отсекаемому ею на оси ординат отрезку на графике (рис. 4) были рассчитаны параметры  $\beta$  ( $0.9 \pm 0.025$ ) и  $\alpha$  ( $0.039 \pm 0.013$ ). Из найденного значения параметра  $\beta$  следует, что замена одной фосфодиэфирной связи на тиофосфатную требует увеличения концентрации ацетонитрила в элюирующем буфере на 0.6%. Это свидетельствует о высокой селективности данного метода. Таким образом, метод ион-парной ВЭЖХ, сочетающий информативность анионообменной хроматографии с относительной дешевизной и простотой обращенно-фазовой, успешно решает задачу анализа сложных смесей олигонуклеотидов, содержащих одну или несколько тиофосфатных межнуклеотидных связей.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ВЭЖХ проводили при комнатной температуре на хроматографе фирмы Waters, в состав которого входил насос Waters (модель 600), инжектор фирмы Rheodyne (модель 7125), контроллер Waters, УФ-детектор Waters (модель 484) и система обработки данных Waters (модель 746).

Синтез ОТФ осуществляли на автоматическом синтезаторе Biosearch (модель 8700) с использованием стандартных методик для амидофосфитного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, за исключением стадии окисления. Введение тиофосфатных связей осуществляли постадийным окислением образующегося межнуклеотидного фосфита

1% раствором 3*H*-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида в ацетонитриле, как описано в работе [5].

Для ВЭЖХ использовали следующие системы:

I: колонка SCOUT WP PEI (5 мкм;  $4.6 \times 50$  мм; фирма J.T. Barker), градиент концентрации бромида калия ( $0 \rightarrow 1.4$  М за 60 мин) в буфере, pH 6.3, содержащем 0.01 М пиррофосфат калия и 25% ацетонитрила. Скорость элюции 1 мл/мин;

II: колонка SCOUT WP PEI, градиент концентрации пиррофосфата калия ( $0.002 \rightarrow 0.05$  М за 60 мин), pH 6.3, в 40% ацетонитриле. Скорость элюции 1.5 мл/мин;

III: колонка Partisphere  $C_{18}$  (5 мкм;  $4.6 \times 125$  мм; фирма Whatman), градиент концентрации ацетонитрила ( $12.5 \rightarrow 50\%$  за 67 мин) в буфере, pH 7.14, содержащем 0.1 М фосфат калия и 2 мМ дигидрофосфат тетрабутиламмония. Скорость элюции 2 мл/мин.

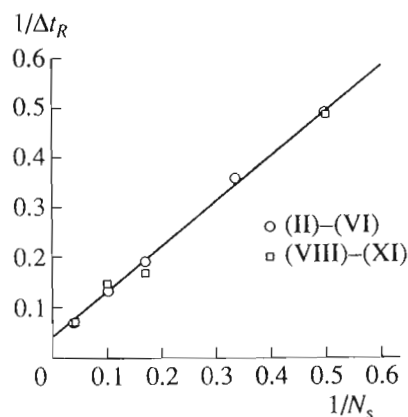


Рис. 4. Зависимость величины прироста времени удерживания олигодезоксирибонуклеотидов со смешанными межнуклеотидными связями от числа тиофосфатных связей (в обратных координатах). ВЭЖХ в системе III.

После нанесения соединений колонки до подключения градиента промывали начальными буферами в течение 2 мин.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50397).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zon G., Stec W.J. // *Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach* / Ed. F. Eckstein. Oxford: University Press, 1991. P. 87–108.
2. Sharma H.W., Narayanan R. // *BioAssays*. 1995. V. 17. P. 1055–1063.
3. Rapaport E., Levina A., Metelev V., Zamecnik P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 709–713.
4. Barker R., Metelev V., Rapaport E., Zamecnik P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 514–518.
5. Padmapriya A.A., Tang J., Agrawal S. // *Antisense Res. Dev.* 1994. V. 4. P. 185–199.
6. Metelev V., Agrawal S. // *Analyt. Biochem.* 1992. V. 200. P. 342–346.
7. Metelev V., Misiura K., Agrawal S. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1992. V. 660. P. 321–323.
8. Bergot B.J., Egan W. // *J. Chromatogr.* 1992. V. 599. P. 35–42.
9. Peyman A., Helsberg M., Kretzschmar G., Mag M., Grabley S., Uhlmann E. // *Biol. Chem. Hoppe–Seyler*. 1995. V. 376. P. 195–198.
10. Орецкая Т.С., Ибрагим Х.К.Х., Волков Е.М., Романова Е.А., Ташлицкий В.Н., Шабарова З.А. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 967–974.
11. Kubareva E.A., Petrauskene O.V., Karyagina A.S., Tashlitsky V.N., Nikolskaya I.I., Gromova E.S. // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. P. 4533–4538.

## HPLC of Oligodeoxyribonucleoside Phosphorothioates

V. G. Metelev\*, V. N. Tashlitskii\*, and S. Agrawal\*\*

\* *Chemical Faculty, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

\*\* *Hybridon, Inc., One Innovation Drive, Worcester, MA 01605, USA*

**Abstract**—Conditions are described for the separation of synthetic oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates by HPLC using a SCOUT WP PEI weak anion exchanger and for the separation of oligodeoxyribonucleotides with mixed phosphate and phosphorothioate internucleotide bonds on a Partisphere C<sub>18</sub> support in ion-pair conditions. The influence of the nucleoside composition and the number of phosphorothioate bonds on the retention time was studied.

*Key words:* antisense oligonucleotides, oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates, HPLC.