



УДК 547.963.32.07:542.953.2

НУКЛЕОФИЛЬНЫЙ КАТАЛИЗ МЕЖНУКЛЕОТИДНОЙ
КОНДЕНСАЦИИ
В ФОСФОТРИЭФИРНОМ СИНТЕЗЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Калюшин А. Л., Берлин Ю. А., Колосов М. Н.

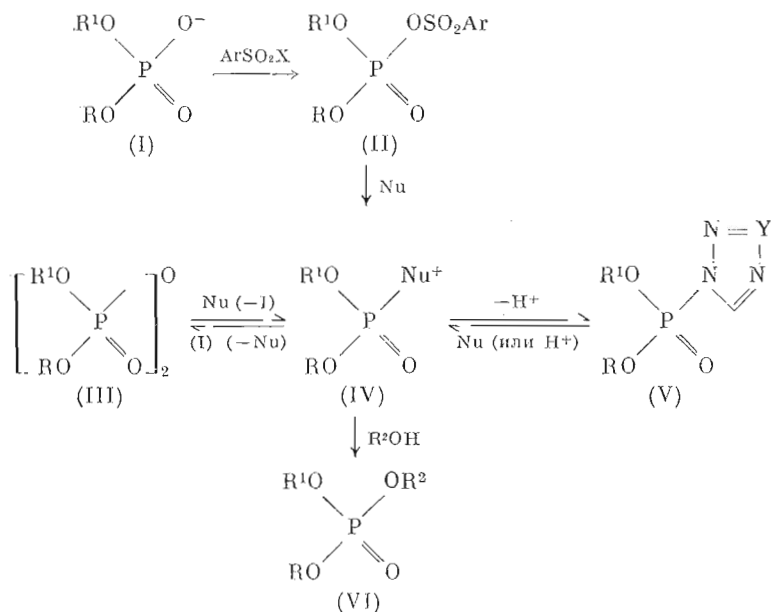
*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Предложен общий механизм межнуклеотидных фосфотриэфирных конденсаций под действием реагентов типа $ArSO_2X$, в котором центральную роль играет нуклеофильный катализ. На примере конденсации $(DMTr)Tr(PhCl)$ с $bzC(AC)$ под действием TPS-хлорида исследован каталитический эффект тетразола, нитротриазола, метилимидазола и диметиламинопиридина в диоксане, пиридине и ацетонитриле. Установлено, что в пиридиновом растворе конденсация быстрее всего протекает с диметиламинопиридином, а в ацетонитриле — с метилимидазолом, причем добавление к последнему триэтиламина вызывает дальнейшее увеличение скорости реакции. Для препаративного синтеза рекомендовано использовать в качестве нуклеофильного катализатора метилимидазол и проводить межнуклеотидную конденсацию в ацетонитриле при высокой концентрации сульфохлорида, а также триэтиламина (для нуклеотидов, не содержащих гуанина), беря OH-компонент, *P*-компонент, TPS-хлорид, метилимидазол (и триэтиламин) в мольном отношении 1:1,5:3:3(:5). Метод проверен на производных тимидина, цитидина, аденозина и гуанозина. Найдено, что в рекомендуемых условиях реакция с 0,1 M нуклеозидом заканчивается за 5–10 мин, выход продукта конденсации около 90%.

Ключевой стадией в фосфотриэфирном синтезе олигонуклеотидов является конденсация дизамещенной фосфатной группы моноэфира нуклеотида (*P*-компонента) с гидроксильной группой другого нуклеотида или нуклеозида (OH-компонента), предпочтительно 3'-*P* с 5'-OH. Обычно эту конденсацию проводят в пиридиновом растворе с помощью арилсульфазолидов: тетразолидов [1], триазолидов [2], нитротриазолидов [3] или нитроимидазолидов [4]. При их взаимодействии с *P*-компонентом образуются различные «активированные фосфаты», от реакционной способности и соотношения которых зависят суммарная скорость реакции и выход конечного продукта. Поэтому выяснение структуры и путей образования промежуточных веществ имеет важное значение для рационального выбора оптимальных условий межнуклеотидной конденсации и для разработки более эффективных методов синтеза олигонуклеотидов в растворе и на полимерном носителе.

По нашему мнению, все фосфотриэфирные межнуклеотидные конденсации под действием реагентов типа $ArSO_2X$ протекают по изображенному на схеме общему механизму, центральную роль в котором играет нуклеофильный катализ. Действительно, ранее в нашей лаборатории было установлено [5], что при взаимодействии фосфодиаэфиров (I) с $ArSO_2$ -триазолидом образуются тетразамещенные пирофосфаты (II) и фосфотриазолиды (V, $Y=CH$), реакции которых со спиртами катализируются пиридином, еще сильнее метилимидазолом и в особенности диметиламинопиридином, причем этот катализ является специфическим нуклеофильным [6]. Согласно современным представлениям о механизме нуклеофильного катализа (см., например, [7]), отсюда следует, что активными интермедиатами в рассматриваемых реакциях O-фосфорилирования являются катионы типа (IVa).

Использованы следующие сокращения: DMAP — 4-*N,N*-диметиламинопиридин, DMTr — 4,4'-диметокситригид, Im — имидазол-1, MeIm — 1-метylimидазол, Ntr — 3-нитро-1,2,4-триазолил-1, PhCl — 4-хлорфенил, Py — пиридин, Tet — тетразолил-1, Trt — 1,2,4-триазолил-1, TPS — 2,4,6-триизопропилбензолсульфонил. В формулах (и названиях) нуклеотидов и нуклеозидов префикс d (дезокс) ради краткости опущен.



R^1 и R^2 : 3'- и 5'-нуклеозил; Nu (а): Py, MeIm или DMAP; (б): TriH, NtrH, TetH; X: Cl, Tri, Ntr или Tet; Y: CH, CNO₂ или N.

С другой стороны, при исследовании межнуклеотидных конденсаций под действием TPS-хлорида и TPS-тетразолида Д. Г. Кнорре и В. Ф. Зарытова нашли, что единственными промежуточными веществами, обнаруживаемыми в реакционном растворе по спектрам ³¹P-ЯМР, являются пирофосфаты (III) и что фосфорилирование ими оксисоединений сильно катализируется тетразолом, выделившимся из TPS-тетразолида на первой стадии реакции или специально добавленным в среду [8]. По нашим данным, межнуклеотидную конденсацию ускоряет также нитротриазол, который по величине каталитического эффекта близок к тетразолу (см. ниже). Таким образом, существует ряд азотистых пяти- и шестичленных гетероциклов, которые способны эффективно катализировать реакцию фосфотриэфирной конденсации. Все они содержат электронодонорный центр N ≡ в высокосопреженной или полностью ароматической системе, но сильно различаются по кислотно-основным свойствам, в связи с чем их целесообразно разделить на две группы: а) нуклеофилы типа третичных оснований (пиридин, метилимидазол, диметиламинопиридин), б) нуклеофилы типа N-незамещенных азолов (триазол, цитротриазол, тетразол).

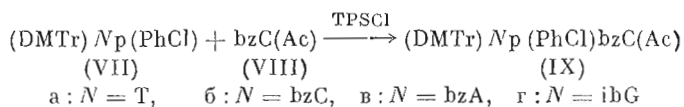
Обсуждая механизм фосфотриэфирных конденсаций под действием TPS-тетразолида, Д. Г. Кнорре и В. Ф. Зарытова пришли к заключению [8], что активными фосфорилирующими соединениями в этих реакциях являются фосфотетразолиды (V, Y=N). Аналогичный вывод был независимо сделан канадскими исследователями [9], которые вместо TPS-тетразолида использовали для межнуклеотидных конденсаций смесь TPS-хлорида с тетразолом в соотношении 1:3. Мы тоже считаем, что при активации фосфодиаэфиров (I) образуются фосфазолиды (V), когда в реакционной среде присутствуют нуклеофилы типа б, и что эти фосфазолиды способны O-фосфорилировать нуклеозиды и нуклеотиды. Однако в отличие от авторов цитированных работ [8, 9] мы предполагаем, что главными реакционноспособными интермедатами при межнуклеотидных конденсациях под действием арилсульфазолидов являются не электронейтральные соединения (V), а катионы типа (IVа) и (IVб), образующиеся в результате нуклеофильного замещения при P-атоме смешанных ангидридов (II)*. Эти катионы содержатся в реакционном растворе в низкой кон-

* Катионы (IVб) могут, кроме того, образоваться из фосфазолидов (V) и пирофосфатов (III) непосредственно при взаимодействии с тетразолом или нитротриазолом, а также обходным путем (V или III) → (IVа, Nu=Py) → (IVб), если конденсация проводится в растворе пиридина или последний был недостаточно полно удален при азеотропном высушивании исходных P- и OH-компонентов.

центрации (т. е. равновесия (III) \rightleftharpoons (IV) и (V) \rightleftharpoons (IV) сильно смещены влево), но образуются и реагируют с большой скоростью, вследствие чего конденсация протекает главным образом по схеме (I) \rightarrow (II) \rightarrow (IV) \rightarrow (VI). Иными словами, роль нуклеофильного катализатора в фосфотриэфирной конденсации, по нашему мнению, состоит в том, что он переводит смешанные ангидриды (II), фосфазолиды (V) и пирофосфаты (III) в высоко-реакционное состояние (IV); в результате происходит снижение энергии активации и соответственно увеличивается скорость образования триэфира (VI).

Изложенные представления основаны на том факте, что механизм катализа метилимидазолом принципиально аналогичен имидазольному (см. [7]), и на предположении, что эта аналогия может быть распространена на другие N-незамещенные азолы типа три- и тетразола. Вместе с тем очевидно, что наряду со сходством между катализаторами группы *a* и *b* имеются существенные различия. Например, только в случае нуклеофилов типа *b* реакционноспособный интермедиат (IV) может накапливаться в менее активной, депротонированной форме (V).

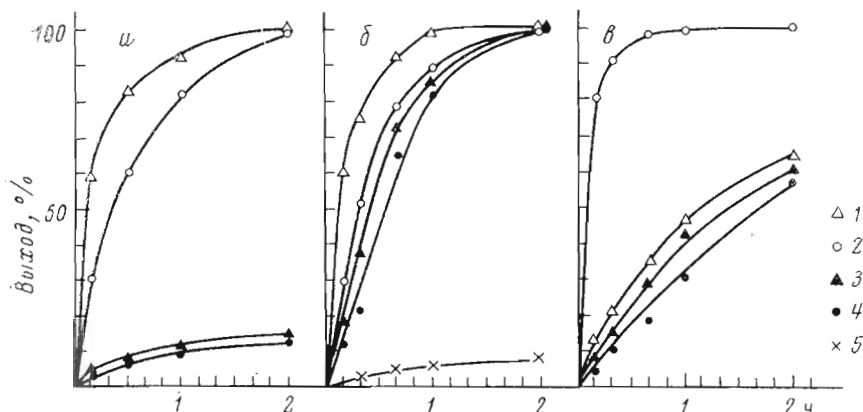
Для того чтобы выяснить, какой из нуклеофилов является лучшим катализатором межнуклеотидной конденсации, мы предприняли сравнительное изучение влияния тетразола, нитротриазола, метилимидазола и диметиламинопиридина на реакцию образования защищенного динуклеозид-фосфата (IX) под действием TPS-хлорида. Следует отметить, что смеси TPS-хлорида с тетразолом и с диметиламинопиридином ранее уже были описаны в качестве *P*-активирующих реагентов, но применялись в неординарных условиях и для разных межнуклеотидных конденсаций (TPS-Cl + TetH — для конденсаций типа 3'-*P*+5'-OH [9], а TPS-Cl + DMAP — для конденсаций 3'-OH+5'-*P* [8]), вследствие чего было невозможно сопоставить их эффективность.



Мы исследовали конденсацию (VII) + (VIII) \rightarrow (IX) в двух вариантах: при низких и высоких концентрациях OH- и *P*-компонентов. В обоих случаях соотношение компонентов и катализатора отличалось от использованного в работах [8, 9] и было выбрано исходя из следующих соображений: 1) в большинстве межнуклеотидных конденсаций *P*-компонент по сравнению с OH-компонентом является менее дорогостоящим, в связи с чем его целесообразно брать в избытке; 2) реакция (I) \rightarrow (II) — лимитирующая стадия процесса активации *P*-компонента, поэтому для быстрого протекания конденсации необходимо, чтобы концентрация TPS-хлорида была достаточно высокой; 3) от количества взятого катализатора зависит содержание в реакционной среде активного интермедиата (IV) и, как следствие, суммарная скорость конденсации, причем эффект, вызываемый изменением концентрации катализатора, должен уменьшаться по мере ее увеличения.

В аналитическом варианте конденсацию проводили в трех растворителях, сильно различающихся по диэлектрической проницаемости, — в диоксане (ϵ 2,2), пиридине (ϵ 12,3) и ацетонитриле (ϵ 36,2) — при начальной концентрации OH-компонента (VIII) 0,02 М, *P*-компонента (VIIa) 0,03 М, TPS-хлорида и нуклеофильного катализатора 0,2 М. За ходом реакции следили, анализируя пробы реакционной смеси хроматографией на силуфоле. Относительные количества продукта конденсации (IXa) и непрореагировавшего *P*-компонента (VIIa), остающегося на старте хроматограммы, определяли при помощи цветной реакции на тритильную группу, как описано в статье [9]. Данные анализа представлены в виде кинетических кривых на рисунках *a—e*.

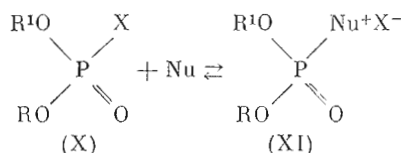
Полученные результаты позволяют сделать несколько выводов и предположений. Во-первых, во всех трех исследованных нами растворителях нитротриазол по своей каталитической активности оказался близок к



Конденсация 0,02 M bzC(Ac) с 0,03 M (DMTr)Tr(PhCl) под действием 0,2M TPSCl в присутствии 0,2 M нуклеофильного катализатора DMAP (1), MeIm (2), TetH (3), NtrH (4) и в отсутствие катализатора (5): а - в диоксане, б - в пиридине, в - в ацетонитриле

тетразолу. Этот факт представляет определенный практический интерес, поскольку сам нитротриазол синтетически более доступен, чем тетразол, а его N-сульфонильные и N-фосфорильные производные более устойчивы. Механизм катализа для обоих азолов, очевидно, аналогичен. Ранее было обнаружено, что тетразол в пиридиновом растворе не реагирует с арилсульфохлоридами [9]; мы подтвердили это наблюдение и нашли, что в отличие от тетразола нитротриазол с TPS-хлоридом в пиридине образует соответствующий арилсульфазолид, но реакция протекает медленно и за 2 ч (к моменту завершения межнуклеотидной конденсации, см. рисунок б) проходит лишь на 17% (определено титрованием Cl^- по Фольгарду). Поэтому представляется вероятным, что в отсутствие сильного основания, например триэтиламина, способного ионизировать тетразол и нитротриазол, образование фосфазолидов (V; $\text{Y}=\text{N}$ или CNO_2) происходит преимущественно через стадию катиона (IV, $\text{Nu}=\text{Py}$) (см. примечание на с. 661).

Рассматривая зависимость каталитического эффекта от растворителя, следует иметь в виду, что ранее, при обсуждении структуры «активированных фосфатов», мы для простоты игнорировали роль противоионов и даже сам факт их существования. Между тем очевидно, что эти интермедиаты представляют собой ионные пары (XI), а не свободные катионы (IV). Разделение зарядов в таких парах должно зависеть от нуклеофильности группы Nu, диэлектрической проницаемости среды и сольватации молекулы, причем повышение полярности растворителя должно в общем случае приводить к усилению ионного характера пары и понижению энергии переходного состояния при нуклеофильном замещении у P-атома. Поэтому можно ожидать, что при увеличении основности катализатора и полярности растворителя равновесие $(\text{X}) \rightleftharpoons (\text{XI})$ будет смещаться вправо и благодаря повышению концентрации активного интермедиата (XI) возрастет скорость межнуклеотидной конденсации



В полном согласии с этими представлениями было найдено, что в диоксане и пиридине (рисунки а, б) каталитический эффект усиливается при повышении основности нуклеофила ($\text{DMAP} > \text{MeIm} > \text{NtrH} \approx \text{TetH}$) и при увеличении полярности среды (пиридин > диоксан). Однако при переходе к ацетонитрилу, еще более полярному, чем пиридин (Z соответственно 71,3 и 64,0), только метиламидазол дал ожидаемое дальнейшее увеличение скорости межнуклеотидной конденсации, в то время как для остальных

исследованных катализаторов наблюдалось падение активности, причем с диметиламинопиридином реакция протекала даже медленнее, чем в диоксане. Причины этой аномалии неясны; во всяком случае большая скорость реакции в пиридине не может объясняться аддитивным эффектом растворителя, так как сам по себе пиридин является сравнительно слабым катализатором (рисунок б).

Наиболее интересным фактом, несомненно, является высокая каталитическая активность метилимидазола в растворе ацетонитрила, значительно превышающая эффект диметиламинопиридина в этом растворителе (рисунок в). Она тем более неожиданна, что метилимидазол как основание сильно уступает диметиламинопиридину (pK_a соответственно 7,3 и 9,8), а сродство к протону должно быть важной характеристикой катализатора, поскольку образование межнуклеотидной связи сопряжено с депротонированием гидроксильной группы ОН-компонента. Учитывая это, мы попытались еще более увеличить скорость фосфотриэфирной конденсации с помощью общего основного катализа триэтиламино (pK_a 10,7) в дополнение к специфическому нуклеофильному катализу метилимидазолом. Действительно, при конденсации 0,01 М ОН-компонента (VIII) с 0,015 М *P*-компонентом (VIIa) под действием 0,1 М TPS-хлорида и 0,1 М метилимидазола в ацетонитриле происходило заметное увеличение скорости реакции в присутствии 0,2 М триэтиламина, и выход продукта конденсации (IXa) составлял (в скобках — выход в отсутствие триэтиламина): через 20 мин — 58% (35%), 50 мин — 93% (51%), 90 мин — 100% (78%).

На основании результатов, полученных при изучении нуклеофильного катализа в аналитическом варианте реакции (VII) + (VIII) → (IX), нами для препаративного синтеза олигонуклеотидов были избраны следующие условия фосфотриэфирной конденсации: растворитель — ацетонитрил, катализатор — метилимидазол, начальные концентрации — ОН-компонента 0,1 М, *P*-компонента 0,15 М, TPS-хлорида 0,3 М, метилимидазола 0,3 М и (см., впрочем, ниже) триэтиламина 0,5 М. Следует отметить, что ранее, при проведении межнуклеотидной конденсации традиционным методом в пиридиновом растворе, как правило, использовали очень высокие концентрации нуклеотидного материала и конденсирующего реагента, чтобы компенсировать низкую скорость реакции и завершить конденсацию по возможности быстрее (обычно за 1–2 ч). Однако из-за вязкости сиропообразных реакционных смесей применение высококонцентрированных растворов крайне нежелательно при синтезе на полимерном носителе. Поэтому мы ограничились сравнительно невысокой концентрацией ОН-компонента, сохранив его прежнее соотношение с *P*-компонентом и уменьшив избыток TPS-хлорида и метилимидазола до 2-кратного (по отношению к *P*-компоненту).

В этих условиях конденсация нуклеозида (VIII) с мононуклеотидами (VIIa)–(VIIr) практически завершалась за 5 мин при комнатной температуре; спустя еще 5 мин (время, необходимое для контроля полноты превращения по ТСХ) реакционную смесь обрабатывали обычным способом и продукт конденсации выделяли хроматографией на силикагеле. Выход чистых динуклеозидфосфатов (IXa), (IXб) и (IXв) составлял соответственно 90, 98 и 92%, но защищенная «двойка» GrC была получена с выходом лишь 65%, причем в процессе конденсации реакционная смесь сильно темнела. Предполагая, что это связано с побочными реакциями по гуаниновому ядру, мы отказались от применения триэтиламина и увеличили на 5 мин продолжительность конденсации; в результате выход хроматографически индивидуального (IXг) возрос до 88%. В связи с этим катализ смесью $MeIm + Et_3N$ целесообразно использовать только для нуклеотидов, не содержащих гуанина, а в остальных случаях ограничиваться одним метилимидазолом.

Таким образом, нами разработан новый метод синтеза олигонуклеотидов, основанный на нуклеофильном катализе фосфотриэфирной конденсации метилимидазолом в ацетонитриле. Этот метод позволяет осуществить межнуклеотидную конденсацию за 5–10 мин с выходом около 90%, тогда

как по «усовершенствованному фосфотриэфирному методу» Наранга и сотр. для завершения реакции требуется 2 ч (при сравнимой концентрации нуклеотидного материала и 3–5-мольном избытке мезитилсульфотетразолида в пиридине), а выход продуктов конденсации составляет 60–80% [10]. Разработанный нами метод технически прост, не требует применения труднодоступных или неустойчивых реагентов и благодаря высокой скорости реакции представляется перспективным для автоматического твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

Экспериментальная часть

В работе использовали 4-диметиламинопиридин, тетразол и 3-нитротриазол, высушенные над P_2O_5 ; они имели описанные в литературе температуры плавления и давали одно пятно при хроматографии на силуфоле. 1-Метилимидазол (n_D^{20} 1,4975) получали по методу [11], защищенные нуклеотиды — по методу [12]. Пиридин обезвоживали кипячением с CaH_2 и хранили над молекулярными ситами 4 Å, диоксид высушивали натрием, ацетонитрил перегоняли с P_2O_5 и затем CaH_2 .

1. *Влияние катализатора и растворителя на скорость фосфотриэфирной межнуклеотидной конденсации.* 15 мкмоль Р-защищенного нуклеотида (DMTr)Tr(CiPh) (CNEt) децанэтилировали действием 2 мл смеси триэтиламин — пиридин — вода (1:3:1) по методу [13], упаривали и к остатку прибавляли 10 мкмоль нуклеозида (VIII). Затем прибавляли 100 мкмоль катализатора (диметиламинопиридина, тетразола или нитротриазола), смесь высушивали азеотропной отгонкой с пиридином, под конец удаляя его досуха, и приливали раствор 100 мкмоль TPS-хлорида в 0,5 мл исследуемого растворителя. При использовании в качестве катализатора метилимидазола его прибавляли непосредственно перед TPS-хлоридом. Реакционную смесь выдерживали при 20° С, отбирали пробы и хроматографировали на силуфоле 60F 254 (Merck) в системе хлороформ — метанол, 9:1. Из зон, содержащих исходный нуклеотид (R_f 0,2) и продукт конденсации (R_f 0,5), вещества элюировали 1 мл смеси 60% $HClO_4$ — метанол (1:1) и измеряли оптическое поглощение элюатов при 500 нм. Выход продукта конденсации (%) рассчитывали, умножая на 150 отношение оптического поглощения элюата из зоны с R_f 0,5 к суммарному поглощению обоих элюатов. Результаты представлены на рисунках а–в.

2. *Катализируемый метилимидазолом синтез олигонуклеотидов (IX).* 116 мг (0,15 ммоль) Р-защищенного нуклеотида (VIa) децанэтилировали, как в предыдущей методике, прибавили 37 мг (0,1 ммоль) нуклеозида (VIII) и смесь высушили трехкратным упариванием с безводным пиридином. Затем прибавили раствор 91 мг (0,3 ммоль) $TPSCl$, 25 мкл (0,3 ммоль) 1-метилимидазола и 70 мкл (0,5 ммоль) триэтиламина в 1 мл ацетонитрила. Через 5 мин на контрольной ТСХ не было обнаружено пятна исходного нуклеозида (VIII). Реакционную смесь выдержали при 20° С еще 5 мин, прилили 1 мл 50% водного пиридина и спустя 30 мин растворители полностью отогнали, под конец с толуолом. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (1×13 см), элюируя градиентом концентрации метанола в хлороформе (от 0 до 5%; 200 мл, 450 мл/ч). Получили 96 мг (90%) динуклеотида (IXa).

Точно так же были синтезированы динуклеотиды (IXб) (выход 98%) и (IXв) (выход 92%). При синтезе этим методом (IXг) выход колебался от 60 до 67%, но при проведении конденсации аналогичным образом в течение 15 мин в отсутствие триэтиламина выход (IXг) составил 88%.

Соединения (IX а–г) и продукты их детритилирования имели ожидаемые УФ-спектры и были индивидуальными по данным ТСХ и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A. Can. J. Chem., 1976, v. 54, № 4, p. 670–672.
2. Kalagiri N., Itakura K., Narang S. A. J. Amer. Chem. Soc., 1975, v. 97, № 25, p. 7332–7337.

3. Reese C. B., Titmas R. C., Yau L. *Tetr. Lett.*, 1978, v. 19, № 30, p. 2727-2730.
4. van Boom J. H., Burgers P. M. J., van der Marel G., Verdegaal C. H. M., Wille G. *Nucleic Acids Res.*, 1977, v. 4, № 4, p. 1047-1063.
5. Добрынин В. Н., Боладырева Е. Ф., Быстров Н. С., Северцова И. В., Чернов Б. К., Колосов М. Н. *Биоорг. химия*, 1978, т. 4, № 4, с. 523-534.
6. Добрынин В. Н., Быстров Н. С., Чернов Б. К., Северцова И. В., Колосов М. Н. *Биоорг. химия*, 1979, т. 5, № 8, с. 1254-1256.
7. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии. М.: Мир, 1972, с. 61-138.
8. Knorre D. G., Zarytova V. F. In: *Phosphorus chemistry directed towards biology*/Ed. Stec W. J. Oxford: Pergamon Press, 1980, p. 13-31.
9. Seth A. K., Jay E. *Nucl. Acids Res.*, 1980, v. 8, № 22, p. 5445-5459.
10. Narang S. A., Hsiung H. M., Brousseau R. In: *Methods in Enzymology*, v. 68/Ed. Wu R. N. Y.: Acad. Press, 1979, p. 90-98.
11. Häring M. *Helv. chim. acta*, 1959, v. 42, № 6, p. 1845-1846.
12. Stawinski J., Pozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.
13. Crea R., Kraszlewski A., Hirose T., Itakura K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 12, p. 5765-5769.

Поступила в редакцию
15.XII.1987'

NUCLEOPHILIC CATALYSIS OF INTERNUCLEOTIDE CONDENSATIONS IN PHOSPHOTRIESTER SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES

KAYUSHIN A. L., BERLIN Yu. A., KOLOSOV M. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow*

A general mechanism is proposed for internucleotide phosphotriester condensations effected by coupling reagents of the $ArSO_2X$ type, which implies the key role of nucleophilic catalysis and involves the cations (IV) as highly reactive phosphorylating intermediates. The catalytic effect of tetrazole, 3-nitro-1,2,4-triazole, 1-methylimidazole, and 4-dimethylaminopyridine in dioxane, pyridine, and acetonitrile upon the condensation of (DMTr)dTp(PhCl) with dbzC(Ac) in the presence of TPSCl has been studied. MeIm in acetonitrile proved to be the most potent catalyst, the condensation being additionally promoted by a strong base, e.g. triethylamine. This is recommended as a method of choice for the preparation of oligonucleotides. Condensations of 0.1 M dbzC(Ac) with (DMTr)dNp(PhCl) (where N stands for any of the four nucleosides) in the presence of TPSCl and MeIm run at the 1:1.5:3:3 molar ratio of the reagents are complete within 5 to 10 min, the isolation yield being 88 to 98 per cent.