



УДК 577.113.6

© 1990 г.

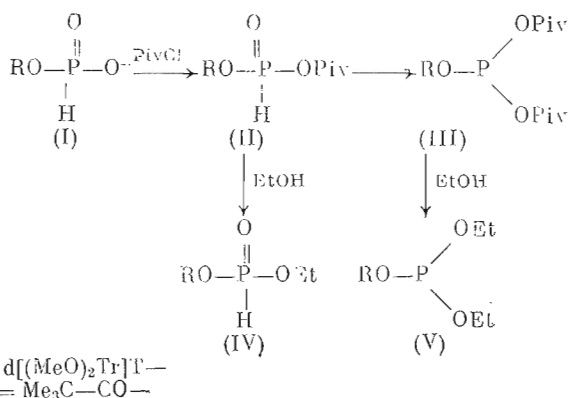
*В. А. Ефимов, И. Я. Дубей***МОДИФИКАЦИЯ Н-ФОСФОНАТНОГО МЕТОДА СИНТЕЗА  
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Разработана модификация Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов, включающая использование в качестве растворителя в реакциях межнуклеотидных конденсаций смеси ацетонитрила и хинолина. Данная методология позволяет свести к минимуму побочные процессы, связанные с образованием бисацилфосфитов при предактивации нуклеотидного компонента реакции. Эффективность метода продемонстрирована синтезом ряда олигодезоксирибонуклеотидов.

В последнее время достаточно широкое распространение получил твердофазный Н-фосфонатный метод синтеза олигонуклеотидов, основными чертами которого являются высокая скорость, эффективность, простота получения мономеров и их стабильность [1–4]. Поскольку межнуклеотидные конденсации в Н-фосфонатном методе проводят, как и в триэфирном, в присутствии конденсирующего реагента, в частности пивалоилхлорида [2–4], адамантоилхлорида [5], мезитилсульфонилнитротриазолида [6], этот метод не требует строгого соблюдения безводных условий в процессе конденсации. В отличие от фосфитамидного метода [7] окисление синтезируемого олигонуклеотида проводят один раз в конце синтеза. Кроме того, отсутствует необходимость блокирования межнуклеотидных фосфонатных групп. Все это делает Н-фосфонатный метод синтеза олигонуклеотидов весьма перспективным.

Однако данному методу присущи некоторые недостатки. Так, часто вместо индивидуального целевого продукта образуется смесь олигомеров различной длины [2, 8]. Причиной этого может быть либо недоокисление некоторых межнуклеотидных связей на последней стадии синтеза, которое приводит к расщеплению гидролитически неустойчивых диалкилфосфитных связей во время аммонолиза, либо, что более вероятно, так называемая предактивация нуклеотидного компонента реакции, т. е. его взаимодействие с конденсирующим реагентом до поступления в реакционную сферу носителя, к которому прикреплен нуклеозидный компонент (схема). Последнее отмечалось рядом авторов [1, 2, 9, 10]. Для устранения возможности протекания предактивации необходимо, во-первых, отказаться от просушивания носителя перед каждой новой конденсацией, так как при этом замедляется скорость проникновения реагентов в поры носителя. Во-вторых, в автоматическом варианте синтеза растворы мономеров необходимо подавать небольшими порциями по очереди, не допуская их предварительного смешения в коммуникациях синтезатора. Однако исключить предактивацию позволяют далеко не все конструкции современных синтезаторов. Поэтому представляло интерес решение этой проблемы на химическом уровне. С этой целью нами было предпринято изучение механизма реакции межнуклеотидной конденсации в Н-фосфонатном подходе, в частности предактивации нуклеотидного компонента реакции, при помощи ТСХ и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии.

В результате проведенных нами экспериментов было показано, что при взаимодействии Н-фосфоната (I) ( $\delta_{\text{HP}}$  2,10 м.д.,  $J_{\text{P,H}}^1$  606 Гц,  $J_{\text{P,H}}^3$



10 Гц) с пивалоилхлоридом (PivCl в пиридине сначала образуется смешанный ангидрид (II) (диастереомеры,  $\delta_{\text{HP}} 2,62$  и  $2,72$  м.д.,  $J_{\text{P,H}}^1 740$  Гц,  $J_{\text{P,H}}^3 10$  Гц), который в случае отсутствия нуклеозидного компонента вступает в дальнейшее взаимодействие с избытком PivCl и достаточно быстро превращается в бисацилфосфит (III) ( $\delta_{\text{HP}} 122,7$  м.д.,  $J_{\text{P,H}}^3 10$  Гц). При взаимодействии со спиртом производные (II) и (III) образуют соответственно диалкилфосфит (IV) ( $\delta_{\text{HP}} 8,56$  м.д.,  $J_{\text{P,H}}^1 704$  Гц, диастереоме-

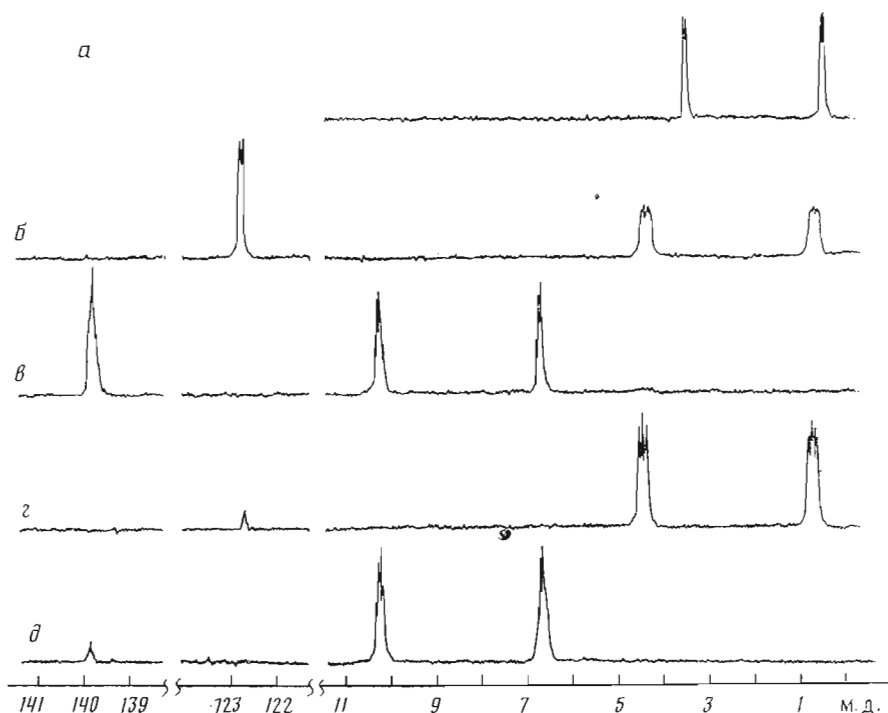


Рис. 1. P-ЯМР-спектры исходного  $\text{d}[(\text{MeO})_2\text{Tr}]^+\text{Tr}^-$  в смеси ацетонитрил – пиридин или ацетонитрил – хинолин (4:1) (а);  $\text{d}[(\text{MeO})_2\text{Tr}]^+\text{Tr}^-$  (1 экв.) в смеси ацетонитрил – пиридин (4:1) через 3 мин после прибавления 3 экв. PivCl (б); той же смеси после прибавления 2 экв. этанола (в);  $\text{d}[(\text{MeO})_2\text{Tr}]^+\text{Tr}^-$  в смеси ацетонитрил – хинолин через 3 мин после прибавления 5 экв. PivCl (г); той же смеси, что и в (г) через 3 мин после добавления 2 экв. этанола (д).

ры плохо разрешены) и триалкилфосфит (V) (мультиплет при  $139,9$  м.д.) (рис. 1а–д).

В присутствии 5 экв. PivCl в смеси ацетонитрила и пиридина (4:1) полное превращение (I) в производное (III) происходило за 5–7 мин. Изучение реакционной способности бисацилфосфита (III) показало, что он является менее активным фосфорилирующим реагентом, чем смешанный ангидрид (II). Так, если в нормальных условиях конденсации нуклеозидный компонент полностью исчезает за 20–30 с, то после пред-

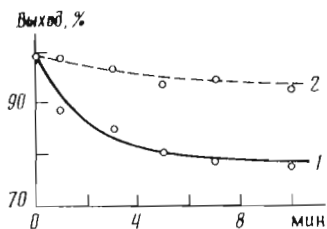


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость выхода продуктов межнуклеотидной конденсации на носителе  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{TrH}$  и  $d\Gamma$  от продолжительности предактивации в смеси ацетонитрил — лиридин (4:1) (1) или ацетонитрил — хинолин (4:1) (2)

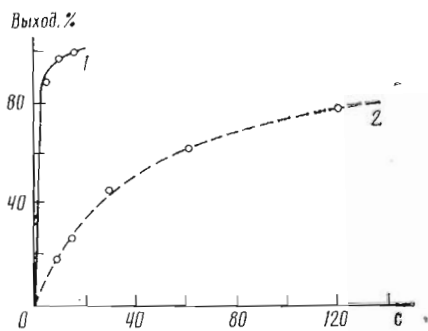


Рис. 3

Рис. 3. Скорость конденсации в присутствии пиридина (1) и  $N,N$ -диметиламинламина (2). К 0,05 М раствору  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]\text{TrH}$  в смеси ацетонитрил — пиридин (4:1) или ацетонитрил —  $N,N$ -диметиламин (4:1), содержащему 2 экв. этазола, прибавили 5 экв.  $\text{PivCl}$ . Через определенное время наносили аликвоту на пластинку ТСХ. После проведения хроматографии тритилсодержащие пятна элюировали 2% раствором трифторуксусной кислоты в ацетонитриле и определяли оптическую плотность элюата

активации — за 1,5 мин. Поэтому даже после непродолжительной предактивации нуклеотидного компонента реакция конденсации уже не доходит до конца в течение 2–3 мин, как это наблюдается в стандартных условиях, и с увеличением времени предактивации выход продукта конденсации постепенно падает, стабилизируясь после увеличения времени предактивации свыше 7 мин, когда в реакционной смеси присутствует практически только соединение (III) (рис. 2). Полученные данные могут быть объяснены тем, что хотя в бисалкилфосфите (III) атом фосфора, по-видимому, обладает большей электрофильностью, чем в смешанном ангидриде, он сильно экранирован пространственно. Возможно и другое объяснение — отсутствие нуклеофильного катализа в реакциях с бисалкилфосфитом в отличие от реакций со смешанным ангидридом.

Ранее считалось, что в  $H$ -фосфонатном методе стадия блокирования непрореагировавших гидроксильных групп на полимере не нужна, поскольку конденсирующий реагент в то же время является ацилирующим [3]. Однако, по нашему мнению, которое согласуется с мнением авторов работ [5, 6], из-за недостаточной высокой ацилирующей активности  $\text{PivCl}$  эта стадия необходима. Особенно в автоматическом варианте синтеза, когда вероятность предварительного смешения растворов нуклеотидного компонента и  $\text{PivCl}$  в клапанах и шлангах прибора заметно возрастает. При этом, во-первых, из-за образования бисаццилфосфита за время конденсации значительная часть  $\text{OH}$ -групп на полимере остается непрореагировавшей и, во-вторых, лишь часть из этих гидроксильных групп ацилируется  $\text{PivCl}$  (табл. 1). Этот эффект более выражен на первых стадиях синтеза в связи с затрудненным доступом реагентов к активным центрам на поверхности носителя. В результате происходит рост неправильных последовательностей, содержащих пропуски звеньев. Образуется значительное количество олигомеров на 1–2 звена короче целевого. Капирование может предотвратить рост неправильных последовательностей на полимере и значительно упростить очистку целевого олигонуклеотида. Однако введение этой стадии не решает проблему падения выходов от цикла к циклу при наращивании цепи, поэтому необходимо прежде всего снизить уровень образования бисаццилфосфита (III).

Возможные пути решения этой проблемы (снижение избытка конденсирующего реагента и использование агентов с объемистыми заместителями) оказались недостаточно эффективными на практике. Рекомендованное ранее снижение содержания пиридина в реакционной среде [11]

Соотношение выходов в реакциях фосфорилирования и ацилирования в процессе межнуклеотидной конденсации после преактивации

Время реакции, мин	Выход олигонуклеотида, % *		Непрореагировавший после 1-й конденсации ОН-компонент, %	
	1-я конденсация	2-я конденсация **	ацилированный	свободный
2	73	88	12	15
4	82	86	14	4
8	85	85	15	—

\* Выход дан в расчете на исходное для данной конденсации количество ОН-компонента.

\*\* Выход конденсации в отсутствие преактивации в этих условиях практически количественный.

Таблица 2

Последовательность операций одного цикла наращивания олигонуклеотидной цепи

Номер операции	Операция	Время, мин
1	Промывка дихлорэтаном *	1
2	Детритилирование (3% раствор дихлоруксусной кислоты в дихлорэтане) **	3
3	Ацетонитрил	1,5
4	Смесь ацетонитрил — хинолин (4 : 1)	1
5	Конденсация ***	2
6	Смесь ацетонитрил — хинолин (4 : 1)	1
7	Ацетонитрил	0,5

\* Скорость подачи растворителей 2,5 мл/мин.

\*\* В случае длинных олигонуклеотидов (свыше 30 звеньев) использовали дихлоруксусную кислоту в смеси дихлорэтан — хлористый метилен (1 : 1).

\*\*\* 200 мкл 0,05 М фосфоната и 200 мкл 0,25—0,30 М  $\text{PivCl}$  в смеси ацетонитрил — хинолин (4 : 1) подаются поочередно порциями (6 с со скоростью 0,4 мл/мин, между порциями пауза 6 с).

также не дает реального улучшения. Возможным решением этой проблемы является замена пиридина менее основными соединениями, поскольку превращение ангидрида (II) в производное (III) ускоряется в более основных условиях.

По аналогии с фосфодиэфирным [12] и фосфотриэфирным [13] методами в  $\text{N}$ -фосфонатном подходе можно предположить наличие нуклеофильного катализа в реакциях межнуклеотидной конденсации. Реакцию конденсации можно разделить на два этапа: образование смешанного ангидрида (что для реакции в присутствии диметиланилина подтверждено с помощью  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии) и его взаимодействие с ОН-компонентом. Следует отметить, что в отсутствие основания реакция образования межнуклеотидной связи с использованием в качестве нуклеотидного компонента  $\text{N}$ -фосфоната проходит относительно медленно и не до конца. В то же время в присутствии триэтиламина ( $\text{p}K_a$  10,7) скорость реакции значительно ниже, чем в пиридине ( $\text{p}K_a$  5,2). В случае  $\text{N,N}$ -диметиламина ( $\text{p}K_a$  5,1), не обладающего свойствами нуклеофильного катализатора, скорость конденсации также значительно ниже, чем в пиридине (рис. 3).

Ускорение реакции в целом может быть связано с нуклеофильным катализом на любом этапе реакции. Поскольку скорости ацилирования нуклеотида  $\text{PivCl}$  в присутствии пиридина и диалкиланилина одинаковы (рис. 4), можно предположить, что и скорость взаимодействия  $\text{PivCl}$  с  $\text{N}$ -фосфонатом с образованием смешанного ангидрида мало зависит от растворителя. В таком случае резкое ускорение конденсации в пиридине по сравнению с диметиланилином свидетельствует в пользу существова-

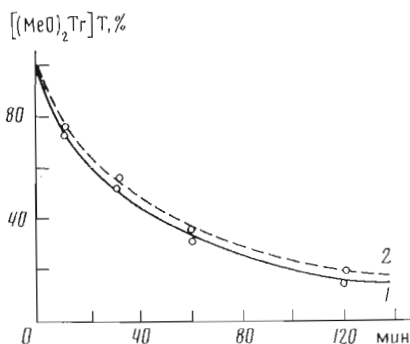


Рис. 4

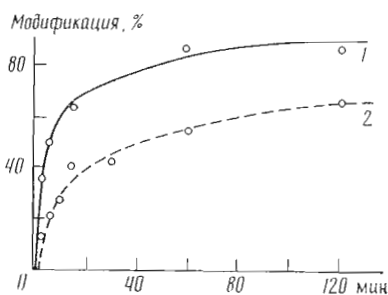


Рис. 5

Рис. 4. Скорость ацилирования нуклеозида  $\text{PivCl}$  в присутствии пиридина (1) и  $N,N$ -диметиланилина (2).  $0,1 \text{ M}$  раствор  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]T$  в смеси ацетонитрил — пиридин (4:1) или ацетонитрил —  $N,N$ -диметиланилин (4:1) выдерживали с 10 экв.  $\text{PivCl}$ . Через определенное время аликвоты анализировались ТСХ, как описано выше

Рис. 5. Скорость модификации гетероциклических оснований в присутствии пиридина (1) и хинолина (2).  $0,05 \text{ M}$  раствор  $d[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzC(Bz)$  в смеси ацетонитрил — пиридин (или хинолин) (4:1) обрабатывали 10 экв.  $\text{PivCl}$ . Через определенное время количество  $O^6$ -ацильного производного определяли анализом аликвоты ТСХ

ния нуклеофильного катализа пиридином на стадии фосфорилирования  $\text{OH}$ -компонента реакции смешанным ангидридом. Таким образом, для снижения скорости образования бисацилфосфита целесообразно использовать менее осыбный, чем пиридин, нуклеофильный катализатор. Нами были опробованы различные нуклеофильные катализаторы, в частности  $N$ -окиси пиридина ( $pK_a$  2–4) [11], 1-метилимидазол ( $pK_a$  7,3), 4-диметиламинопиридин ( $pK_a$  9,61), хинолин ( $pK_a$  4,8). Последний из них показал лучшие результаты.

В смеси ацетонитрила и хинолина, содержащей 20–25% последнего, реакция межнуклеотидной конденсации проходит столь же быстро, как в пиридине (30 с). Однако, по данным  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектроскопии, при взаимодействии фосфоната (1) с  $\text{PivCl}$  образуется только смешанный ангидрид, даже через 5 мин наблюдались только следы бисалкилфосфита, а следовательно, практически отсутствовало снижение выходов в реакции конденсации за счет преактивации (рис. 2). На твердой фазе реакция конденсации проходила за 2–2,5 мин с высоким выходом (98–99%). Как ацилирующий реагент  $\text{PivCl}$  менее активен в хинолине, чем в пиридине. Следует отметить и тот факт, что скорость модификации гетероциклических оснований под действием  $\text{PivCl}$  в этом растворителе примерно вдвое ниже, чем в пиридине (рис. 5).

Синтез олигонуклеотидов  $\text{H}$ -фосфонатным методом с использованием хинолина проводился нами как в ручном, так и в автоматическом вариан-

Таблица 3

Последовательности и выходы некоторых олигонуклеотидов, полученных модифицированным  $\text{H}$ -фосфонатным методом в присутствии хинолина

Последовательность	Длина цепи	Выход*, %	Средний выход на стадию, %
$d(\text{CGCAGCACGACGAAAGCTAAAATACGGTGTCTCTG})$	33	58	98,5
$d(\text{GATCTTGACA(C)}_7\text{TATAATGGTAC})$	38	33	97,4
$d(\text{GGGATACAAATTAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTCTTTT})$	39	70	99,0
$d(\text{AAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATGTATCCC})$	39	52	98,3

\* Выход дан в расчете на первое звено, присоединенное к носителю.

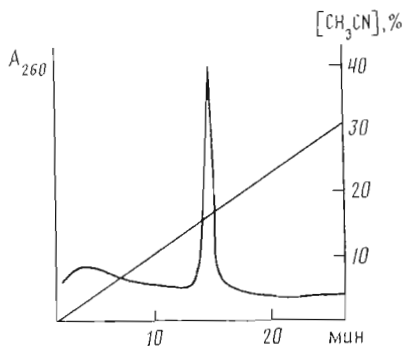


Рис. 6. Обращенно-фазовая хроматография 39-звенного олигонуклеотида (третий в табл. 3) после удаления защитных групп и очистки гель-электрофорезом

тс. Последовательность операций представлена в табл. 2. Был получен ряд олигонуклеотидов от 12- до 39-звенных, последовательности некоторых из них приведены в табл. 3. На рис. 6 показана обращенно-фазовая хроматография 39-звенного олигонуклеотида, полученного вышеописанным способом.

Таким образом, в результате изучения процесса преактивации нуклеотидного компонента в Н-фосфонатном методе синтеза олигонуклеотидов было показано его отрицательное влияние на ход реакции межнуклеотидной конденсации и ее выход. Кроме того, нами получены данные, подтверждающие вероятность протекания нуклеофильного катализа в данной реакции. На основании этих результатов предложен удобный метод твердофазного синтеза олигонуклеотидов с использованием в качестве растворителя хинолина, благодаря чему удалось в значительной степени исключить влияние преактивации на синтез.

### Экспериментальная часть

В работе применены следующие реагенты и материалы: мочеви́на (ос. ч.), защищенные нуклеозиды (Биолар, СССР), а также  $\text{PivCl}$  (Fluka, Швейцария), 1-метилимидазол, 4-диметиламинопиридин, дихлоруксусная кислота, акриламид, бисакриламид, трис (Merck, ФРГ). Ацетонитрил, пиридин, дихлорэтан, триэтиламин очищали как описано в работе [14]. Нуклеозид-Н-фосфонаты получали по методам [4, 15].

ВЭЖХ проводили на хроматографе Altex-332 (США) со скоростью потока 1 мл/мин. Обращенно-фазовую хроматографию олигонуклеотидов осуществляли на колонке LiChrosorb RP-18 ( $4,6 \times 120$  мм; Merck, ФРГ) с использованием градиента концентрации ацетонитрила (0–40%) в 0,1 М триэтиламмоний-ацетатном буфере (рН 8), а ионообменную хроматографию — на колонке с Nucleogen DEAE 60-7 ( $4 \times 125$  мм; Macherey-Nagel, ФРГ) с использованием градиента концентрации LiCl (0–1 М) в буфере, содержащем 20% ацетонитрила в 0,02 М ацетате натрия (рН 6,5).

Для обессоливания олигонуклеотидов использованы колонки PD-10 (Pharmacia, Швеция). ТСХ проводили на пластинках Silufol UV 254 (Kavalier, СССР) и Kieselgel 60 F 254 (Merck, ФРГ) в системе хлороформ — метанол (9 : 1).

Олигонуклеотидный синтез осуществляли на полимерном носителе на основе CPG-1000 (Sigma, США) емкостью 30–50 мкмоль/г. В автоматическом варианте использовали синтезатор Gene Assembler (Pharmacia, Швеция). Ручной синтез проводили в стеклянной колбочке ( $8 \times 40$  мм) на приборе фирмы Squachem (Англия).

Спектры  $^{32}\text{P}$ -ЯМР записывали на приборе Bruker WM 500 (ФРГ) с рабочей частотой 202 МГц без подавления взаимодействия P-{H}, химические сдвиги даны в миллионных долях относительно 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (внешний стандарт) с использованием 0,05 М растворов диметокситриэтилтиимидин-Н-фосфоната.

Последовательность операций при автоматическом синтезе олигонуклеотидов представлена в табл. 2. После окончания последней конденсации проводили окисление 2% I<sub>2</sub> в смеси пиридин — вода (98 : 2) [2] или насыщенным раствором I<sub>2</sub> в смеси ледяная уксусная кислота — пиридин (2 : 3), содержащей 1% H<sub>2</sub>O [8], в течение 10—15 мин в зависимости от длины олигонуклеотида. Затем носитель выдерживали ночь в концентрированном растворе аммиака при 55° С. После детритилирования (80% уксусная кислота, 15 мин) олигонуклеотид выделяли электрофорезом в полиакриламидном геле.

При ручном синтезе олигонуклеотидов равные объемы 0,05 М фосфата (10 экв. относительно количества первого нуклеозида на носителе) и 0,25 М РivCl в смеси ацетонитрил — пиридин (4 : 1) или ацетонитрил — хинолин (4 : 1) одновременно добавляли к помещенному на колонку полимеру с помощью шприцев и выдерживали 3 мин, перемешивая встряхиванием. Окисление, деблокирование и выделение олигонуклеотидов проводилось так же, как и в автоматическом варианте (табл. 2).

Определение выходов фосфорилирования и ацилирования после предактивации. Равные объемы 0,05 М d[(MeO)<sub>2</sub>Tr]TrH и 0,25 М РivCl в смеси ацетонитрил — пиридин (4 : 1) или ацетонитрил — хинолин (4 : 1) смешивали, выдерживали 7 мин и добавляли к закрепленному на носителе нуклеозидному компоненту (Т) из расчета 10 экв. Р-компонента на 1 экв. ОН-компонента. Через определенные интервалы определяли выход реакции конденсации детритилированием полимера 3% раствором дихлоруксусной кислоты в дихлорэтаноле. После этого проводили еще одну «нормальную» конденсацию. Приняв, что она проходит количественно, после детритилирования по разности значений определяли количество ацилированных и свободных ОН-групп после первой конденсации (см. табл. 1).

При проведении межнуклеотидных конденсаций в гомогенной фазе к 0,05 М раствору d[(MeO)<sub>2</sub>Tr]TrH прибавляли ОН-компонент, в качестве которого брали 0,8 экв. dbzA(Br) или 2 экв. этанола в смеси ацетонитрил — пиридин (4 : 1) или ацетонитрил — хинолин (4 : 1). Затем прибавляли 5 экв. РivCl (относительно Р-компонента). При проведении предактивации нуклеотидного компонента менялся порядок прибавления реагентов. Раствор d[(MeO)<sub>2</sub>Tr]TrH смешивали с РivCl и через определенное время к смеси добавляли ОН-компонент. Реакционную смесь анализировали при помощи ТСХ.

Авторы глубоко признательны А. С. Арсеньеву, И. Н. Пашковой и О. Г. Чахмахчевой за помощь в проведении эксперимента и оформлении работы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Garegg P. J., Redberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Chem. Scr. 1986. V. 26. № 1. P. 59—62.
2. Garegg P. J., Lindh I., Redberg T., Stawinski J., Stromberg R., Henrichson C. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 34. P. 4051—4054.
3. Froehler B. C., Matteucci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
4. Froehler B. C., Ng P. C., Matteucci M. D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 13. P. 5399—5407.
5. Andrus A., Efcavitch J. W., McBride L. J., Giusti B. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 8. P. 861—864.
6. Давыков Ю. В., Батчинова Н. В., Скопцова Н. В., Бесидский Е. С., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 5. С. 615—620.
7. Adams S. P., Kavka K. S., Wykes E. J., Holder S. B., Galluppi G. R. // J. Amer. Chem. Soc. 1983. V. 105. № 3. P. 661—663.
8. Kume A., Fujii M., Sekine M., Hata T. // J. Org. Chem. 1984. V. 49. № 12. P. 2139—2143.
9. Кумарев В. П., Баранова Л. В., Кобзев В. Ф., Кузнецов К. Д., Средин Ю. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 276—278.
10. Gaffney B. L., Jones R. A. // Tetrahedron Lett. 1988. V. 29. № 22. P. 2619—2622.
11. Garegg P. J., Redberg T., Stawinski J., Stromberg R. // Nucleosides and Nucleotides. 1987. V. 6. № 3. P. 655—662.
12. Грайфер Д. М., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Лебедев А. В., Резвушкин А. И. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 242. № 3. С. 616—619.
13. Eijimov V. A., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 10. P. 3651—3666.

14. Perrin D. D., Armarego W. L. F., Perrin D. R. // Purification of Laboratory Chemicals. Oxford: Pergamon Press, 1980. P. 551-562.
15. Marugg J. E., Tromp M., Kuyt-Yeheskiely E., van der Marel G. A., van Boom J. H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 23. P. 2661-2664.

Поступила в редакцию  
26.IV.1989

V. A. EFIMOV, I. Y. DUBEY

#### MODIFICATION OF THE H-PHOSPHONATE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS ON POLYMER SUPPORT

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

The mechanism of the internucleotide condensation and side-reactions in H-phosphonate approach has been investigated with the help of NMR-spectroscopy. On the basis of the results obtained a modification minimizing side-reactions in the course of the nucleotide component preactivation has been developed. It includes the use of acetonitrile - quinoline (4:1) mixture as the solvent in coupling reactions. The efficiency of the method is illustrated by the synthesis of oligodeoxynucleotides.