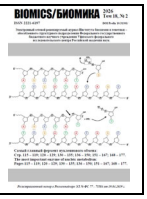
IBG UFRC RAS

BIOMICS

ISSN 2221-6197 https://biomicsj.ru



Химический синтез олигонуклеотидов: этапы 70-летнего пути

[1,2]Я.И. Алексеев*, [3]Р.Р. Гарафутдинов, [1]Д.А. Чемерис, [1]Б.Т. Шарипов,
[4]А.А. Воробьев, [1]С.В. Жевора, [1]А.В. Кузубов, [3]А.В. Чемерис

[1]ООО «Синтол», Российская Федерация, 127434, Москва, ул. Тимирязевская, д.42
[2]Институт аналитического приборостроения Российской академии наук,
Российская Федерация, Санкт-Петербург, 198095, ул. Ивана Черных, 31-33
[3]Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН
Российская Федерация, 450054, Уфа, пр. Октября, 71
[4]Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации, Российская Федерация, Киров
*E-mail: jalex@syntol.ru

Резюме

Более 70 лет назад, в августе 1955 г., вышла статья, в которой описан первый синтез динуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью. За прошедшие годы химический синтез олигонуклеотидов претерпел серьезную эволюцию, пройдя различные этапы: от фосфотриэфирного, через фосфонатный, фосфодиэфирный, фосфиттриэфирный, преобразованный затем в амидофосфитный. Последний является в настоящее время основным методом синтеза олигонуклеотидов с помощью автоматических ДНК-синтезаторов. В целом, амидофосфитный способ обеспечивает решение текущих задач науки и практики, за исключением получения протяженных олигонуклеотидов и крупномасштабного синтеза. Однако потребность в олигонуклеотидах будет неизбежно расти, в том числе их модифицированных форм, как в плане разнообразия, так и в количественном отношении. При этом должны будут интенсивно развиваться как твердофазный колоночный и микрочиповый синтезы, так и синтез в жидкой фазе, способный обеспечить производство килограммовых количеств терапевтических олигонуклеотидов. Можно прогнозировать, что потребность в относительно коротких олигонуклеотидах для сельского хозяйства через некоторое время будет измеряться тоннами.

Ключевые слова: олигонуклеотид, химический синтез олигонуклеотидов, амидофосфитный метод, ДНК-синтезатор, твердофазный колоночный синтез, микрочиповый синтез, синтез олигонуклеотидов в жидкой фазе

Цитирование: Алексеев Я.И., Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Шарипов Б.Т., Воробьев А.А., Жевора С.В., Кузубов А.В., Чемерис А.В. Химический синтез олигонуклеотидов: этапы 70-летнего пути. *Biomics*. 2026. 18(1). С/ 178-214. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-14

© **Авторы**, 2026, Я.И. Алексеев, Р.Р. Гарафутдинов, Д.А. Чемерис, Б.Т. Шарипов, А.А. Воробьев, С.В. Жевора, А.В. Кузубов, А.В. Чемерис

Chemical synthesis of oligonucleotides: stages of a 70-year journey

[1,2]Ya.I. Alekseev*, [3]R.R. Garafutdinov, [1]D.A. Chemeris, [1]B.T. Sharipov,
[4]A.A. Vorob`ev, [1]S.V. Zhevora, [1]A.V. Kuzubov, [3]A.V. Chemeris

[1]Syntol LLC, 42 Timiryazevskaya Str., 127434, Moscow, Russian Federation
[2]Institute for Analytical Instrumentation of RAS, 31-33, Ivana Chernykh Str.,
198095, St. Petersburg, Russian Federation
[3]Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences
71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russian Federation

[4]Research Center of the Federal State Budgetary Institution "48 Central Research Institute"
of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation
*E-mail: jalex@syntol.ru

Resume

More than 70 years ago, in August 1955, an article was published describing the first synthesis of dinucleotides with a natural phosphodiester bond. Over the years, the chemical synthesis of oligonucleotides has undergone a serious evolution, going through various stages from phosphotriester, through phosphonate, phosphodiester, phosphite triester, and then transformed into phosphoramidite. The latter approach is currently the main method of synthesis of oligonucleotides using automatic DNA synthesizers. In general, the phosphoramidite method provides solutions to current scientific and practical problems, with the exception of the production of extended oligonucleotides and large-scale synthesis. However, the demand for oligonucleotides will inevitably grow, including in their modified forms, both in terms of diversity and quantity. At the same time, both solid-phase column and microarray syntheses, as well as synthesis in the liquid phase, capable of producing kilogram amounts of therapeutic oligonucleotides, will have to be intensively developed. It can be predicted that the demand for relatively short oligonucleotides for agriculture will be measured in tons after a while.

Keywords: oligonucleotide, chemical synthesis of oligonucleotides, amidophosphite method, DNA synthesizer, solid-phase column synthesis, microarray synthesis, synthesis of oligonucleotides in the liquid phase

Citation: Alekseev Ya.I., Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Sharipov B.T., Vorob`ev A.A., Zhevora S.V., Kuzubov A.V., Chemeris A.V. Chemical synthesis of oligonucleotides: stages of a 70-year journey. *Biomics*. 2026. 18(1). 178-214. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2026-14 (In Russian)

© **The Authors**, 2026, Ya.I. Alekseev, R.R. Garafutdinov, D.A. Chemeris, B.T. Sharipov, A.A. Vorob`ev, S.V. Zhevora, A.V. Kuzubov, A.V. Chemeris

Содержание Стр.

Введение 180
Первое десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов 181
Второе десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов 182
Третье десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов 183
Четвертое и последующие десятилетия химического синтеза олигонуклеотидов 186
Носители для твердофазного колоночного синтеза олигонуклеотидов 190
Растворимые носители для синтеза олигонуклеотидов 191
Автоматические синтезаторы ДНК 192
Крупномасштабный синтез олигонуклеотидов в растворе 195
Заключение 196
Литература 197
References 206

Content Pages

Introduction 180
The first decade of chemical synthesis of oligonucleotides 181
The second decade of chemical synthesis of oligonucleotides 182
The third decade of chemical synthesis of oligonucleotides 183
The fourth and subsequent decades of chemical synthesis of oligonucleotides 186
Supports for solid-phase column synthesis of oligonucleotides 190
Soluble supports for the synthesis of oligonucleotides 191
Automatic DNA Synthesizers 192
Large-scale synthesis of oligonucleotides in solution 195
Conclusion 196
References (in Russian) 197
References 206

Введение

В настоящее время молекулярную биологию и целый ряд смежных дисциплин абсолютно невозможно представить без использования синтетических олигонуклеотидов разной длины, которые применяются в широком спектре современных методов и технологий. Олигонуклеотиды используются также в молекулярной диагностике в качестве праймеров при амплификации, в медицинских исследованиях и в фармацевтике, в том числе в виде аптамеров и терапевтических нуклеиновых кислот, что так или иначе связано с биологией и фундаментальной наукой. И даже такое, казалось бы, далекое, но при этом довольно активно развивающееся направление как долговременное хранение небиологической информации в молекулах ДНК, получившее стойкое обозначение как DNA Data Storage[1], в будущем немыслимо без крупномасштабного синтеза олигонуклеотидов. Однако последнему применению посвящено немало обзорных статей [Jo et al., 2024; Yu et al., 2024], поэтому коснемся его здесь очень кратко.

Основно внимание в данном обзоре будет сосредоточено на рассмотрении эволюции химического синтеза олигонуклеотидов, проделавшего большой 70-летний путь от момента получения первых динуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью [Michelson, Todd, 1955]. Этот путь можно подразделить на целый ряд этапов, в основе которых лежат те или иные химические реакции и превращения. При этом несмотря на то, что уже больше четырех десятилетий назад вполне оправданный выбор был сделан в пользу амидофосфитного метода синтеза на твердой фазе, который сейчас является основным, тем не менее, не все методологические вопросы решены. Так, в уже устоявшихся направлениях научной и практической деятельности постоянно растет масштаб применения как обычных, так и модифицированных тем или иным способом олигонуклеотидов, причем разнообразие последних становится все шире. Помимо этого, расширяется спектр применения олигонуклеотидов в связи с возникающими новыми приложениями их использования, о чем говорилось выше. И необходимо отвечать на эти вызовы времени.

В последнее десятилетие некую конкуренцию химическому синтезу олигонуклеотидов пытается составить ферментативный синтез оных с помощью терминальной нуклеотидилтрансферазы[2], но у этих подходов все же разные ниши, поскольку ферментативным способом можно синтезировать гораздо более протяженные олигонуклеотиды[3], востребованные в первую очередь в синтетической биологии, которая весьма бурно развивается, но она, впрочем, также нуждается и в коротких олигонуклеотидах. Однако ферментативным методом невозможно синтезировать широчайший спектр необходимых для других задач модифицированных олигонуклеотидов, в которых могут быть изменены кроме самих азотистых оснований как углеводный компонент, так и остаток фосфорной кислоты. Это придает таким олигонуклеотидам новые свойства, резко отличающие их от природных, поэтому уже довольно давно возникла новая аббревиатура XNA (Xeno Nucleic Acid), и в этой статье некоторым из них уделим определенное внимание. При этом за пределами рассмотрения останутся такие направления как синтез олиго**рибо**нуклеотидов (за редким исключением), химерных олигонуклеотидов, состоящих из участков ДНК/РНК, а также синтез конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами, заслуживающими отдельного рассмотрения каждое.

Несмотря на то, что химическому синтезу олигонуклеотидов, в том числе с рассмотрением исторических аспектов, посвящено значительное количество обзорных публикаций [Женодарова, Хабарова (Zhenodarova, Khabarova), 1966; Khorana, 1969; Zhdanov, Zhenodarova, 1975; Amarnath, Broom, 1977; Caruthers et al., 1983; Caruthers, 1991; Beaucage, Iyer, 1992; Brown, 1993; Pon, 2002; Reese, 2005; Abramova, 2013; Hogrefe et al., 2013], рассчитываем, что нам удастся затронуть вопросы, оставшиеся без внимания в большинстве других обзоров. Отметим вклад отечественных ученых в методологию олигонуклеотидного синтеза, включая его автоматизацию, среди которых нужно особо выделить (приведя по алфавиту) Т.В.Абрамову, Ю.А.Берлина, А.Г. Веньяминову, В.В. Власова, В.В.Горна, С.М.Грязнова, В.А.Ефимова, С.М.Женодарову, В.Ф.Зарытову, Д.Г.Кнорре, М.С. Купрюшкина, В.К.Потапова, М.А.Прокофьева, Д.В. Пышного, А.Н.Синякова, Ю.Г.Средина, З.А.Шабарову[4].

Однако наш обзор близко не может претендовать на исчерпывающую полноту, поскольку объять необъятное невозможно, а именно это и имеет место в связи с вопросами относительно разнообразия подходов к синтезу олигонуклеотидов и их

[1] На Всемирном экономическом форуме в 2019 г. в Давосе технология ‘DNA Data Storage’ была включена в Перечень десяти прорывных технологий, которые кардинально изменят жизнь человечества в будущем.

[2] чему мы недавно посвятили отдельную статью [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025]

[3] если химический синтез позволяет синтезировать с приемлемым выходом олигонуклеотиды длиной до 100 звеньев, то ферментативный позволяет синтезировать до 1000 звеньев и даже более

[4] заранее приносим свои извинения, если вдруг кто-то оказался нами забыт

многопланового использования. В качестве подтверждения этих слов достаточно обратиться к раннему обзору американских авторов [Amarnath, Broom, 1977], в котором уже на тот момент[5] список цитированной литературы составил 565 наименований, причем на долю отечественных ученых пришлось 64 публикации 1964-1975 гг.

Таким образом, здесь нами изложена лишь совсем малая толика из гигантского объема информации по олигонуклеотидному синтезу с тем расчетом, чтобы в целом, насколько это возможно, отразить ландшафт исследований в этой гигантской области человеческих знаний, и смеем надеяться, что наиболее важные моменты не были упущены. При этом, не имея возможности бесконечно увеличивать список цитируемой литературы, вынуждены ограничиться по большей части только пионерными работами и некоторыми наиболее значимыми результатами, полученными на разных этапах во многом благодаря олигонуклеотидному синтезу, а также отдельными публикациями отечественных авторов.

Разбив семь десятилетий химического синтеза олигонуклеотидов на ряд этапов (десятилетий), хотим заметить, что они довольно условны, поскольку в ходе одного этапа зарождались подходы, в полной мере проявлявшиеся в следующем десятилетии или даже позже. Тем не менее, подобное деление в виде этапов большого пути, на наш взгляд, имеет право быть. При этом нельзя исключать того, что предложенные некоторое время назад те или иные подходы к химическому синтезу олигонуклеотидов, включая технологические решения и пока остающиеся почти незамеченными, проявят себя в будущем.

Первое десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов

Как уже говорилось выше, более 70 лет назад в августе 1955 г. была опубликована эпохальная статья, в которой сообщалось о химическом синтезе тиминовых динуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью 3` : 5`[6] [Michelson, Todd, 1955]. Отдавая должное важности этого события[7], Нобелевский комитет вскоре присудил Лорду А.Тодду Нобелевскую премию по химии 1957 г. за исследования нуклеотидов и нуклеотидных коферментов.

При химическом синтезе первых двух динуклеотидов d(TpT) и d(pTpT) с фосфодиэфирной связью, произведенном в лаборатории Тодда, использован метод синтеза, позже названный фосфотриэфирным, однако он затем фактически оказался забытым на целое десятилетие. Природный характер образовавшейся межнуклеотидной связи был подтвержден ферментативным разрушением созданного динуклеотида. Чуть позже под руководством Тодда синтезирован динуклеотид аденозил-уридинфосфат, что было сделано уже другим методом [Hall et al., 1957]. Разработанный тогда ими новый способ синтез также оказался забыт, и только через три десятилетия он обрел новое рождение в виде *H*-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов, которого ниже коснемся.

Как ни странно, но Тодд вскоре потерял интерес к синтезу олигонуклеотидов, а его коллега A.M.Michelson в конце 1950-х гг покинул Кембридж, но при этом в 1963 г. опубликовал фундаментальный труд в виде книги ‘The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides’. Незадолго до этого Michelson с коллегами подготовили несколько статей, в одной из которых он сообщил о синтезе олигонуклеотидных аналогов с измененной углеводной частью и включением серы в остаток фосфорной кислоты [Michelson, 1962].

Одной из причин забвения в конце 1950-х гг. разработанных в лаборатории Тодда двух разных методов синтеза олигонуклеотидов стало появление в те же годы (третьего) фосфодиэфирного метода синтеза [Gilham, Khorana, 1958], разработанного под руководством Х.Г.Кораны[8], ставшего спустя 10 лет Нобелевским лауреатом по физиологии и медицине 1968 г. за вклад в расшифровку генетического кода и изучение механизмов синтеза белков», разделив премию с М.Ниренбергом и Р.Холли.

Фосфодиэфирный метод синтеза, в котором происходит конденсация нуклеозидного компонента с незащищенной 3`-ОН-группой с нуклеотидным компонентом, несущим свободную 5`-фосфомоноэфирную группу, надолго стал основным методом, с помощью которого велся синтез олигонуклеотидов. Однако одним из главных его недостатков была крайне низкая скорость конденсации. Причем, такой синтез был «под силу» только высококлассным химикам.

---

[5] рукопись этой статьи получена редакцией 9 января 1976 г.

[6] так в то время было принято указывать направление цепи ДНК

[7] вполне возможно, что тогда Нобелевский комитет проявил огромную прозорливость, не до конца понимая всю важность олигонуклеотидного синтеза

[8] стоит заметить, что у Нобелевских лауреатов 1957 и 1968 гг. А.Тодда и Х.Г.Кораны имеется совместная публикация 1953 г. (за их совместным авторством и без иных соавторов), ставшая результатом работы второго в лаборатории первого, в которой они описали новый метод получения пирофосфатов [Khorana, Todd, 1953].

На протяжении многих лет под руководством Кораны продолжалось совершенствование фосфодиэфирного метода синтеза олигонуклеотидов. Важным прорывом явилось применение для конденсации дициклогексилкарбодиимида при синтезе ‘dideoxyribonucleotides’[9] [Khorana et al., 1957]. Однако позже выяснилось, что арилсульфохлориды для этого предпочтительнее. При этом Кораной с коллегами были предложены защитные соединения для реакционных групп нуклеотидов и нуклеозидов [Schaller et al., 1963], часть которых до сих пор используются при синтезе олигонуклеотидов уже другими методами. Но при этом Кораной защита фосфатных групп не производилась, что на самом деле вело к появлению побочных продуктов.

Синтез олигонуклеотидов в те годы осуществлялся двояко: в ступенчатом варианте очередной нуклеотид присоединялся шаг за шагом, тогда как в блочном варианте присоединение происходило изначально синтезированными блоками по два-три-четыре нуклеотида[10] с тем расчетом, чтобы при синтезе основного более протяженного олигонуклеотида уменьшить число этапов конденсации ввиду требующегося для них продолжительного времени [Weimann, Khorana, 1962].

Второе десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов

Несмотря на то, что фосфодиэфирный метод синтеза олигонуклеотидов продолжал активно использоваться до конца 1970-х гг., тем не менее, мы решили отсчет второго этапа (десятилетия) химического синтеза олигонуклеотидов начать с 1965 г., когда был предложен способ синтеза на твердой фазе, которой послужили гранулы сополимера стирола и дивинилбензола [Letsinger, Mahadevan, 1965]. С учетом того, что твердофазный синтез решает сразу много проблем с удалением ставших ненужными реагентов и очисткой промежуточного продукта при переходе от одного этапа к другому без трудоемкого хроматографического разделения продуктов реакционной смеси, неудивительно, что на выбор носителя для синтеза олигонуклеотидов оказалось обращено пристальное внимание. При этом предложено таковых немало, но их коснемся в специальном разделе дальше.

Во второй половине 1960-х гг. внимание исследователей оказалось вновь обращено на первоначальный фосфотриэфирный метод, и были предложены его серьезные усовершенствования [Eckstein, Rizk, 1967; Letsinger et al., 1967; Reese, Saffhill, 1968; Letsinger, Ogilvie, 1969]. Следующие улучшения этого метода, резко увеличившие его производительность, сделаны в 1973 г. [Catlin, Cramer, 1973; Itakura et al., 1973], что позволило назвать его модифицированным фосфотриэфирным методом. Используя предложенные подходы стало возможным синтезировать 20-ти звенные олигонуклеотиды за несколько месяцев, тогда как ранее на это уходил целый год или даже больше.

Возвращаясь в середину 1960-х гг., надо сказать, что интересным решением стало применение для синтеза олигонуклеотидов растворимых носителей (осаждаемых затем другим растворителем), что облегчило переход от одного этапа к другому при синтезе в растворе, обеспечивающим почти количественный выход благодаря тому, что все реакции идут в однородной среде [Cramer et al., 1966; Hayatsu, Khorana, 1966; 1967]. Толчком к такому варианту синтеза олигонуклеотидов послужила работа отечественных ученых по пептидному синтезу, в которой ими предложена эта красивая идея [Shemyakin et al., 1965]. Причем в конце своей статьи они упомянули, что, помимо пептидного синтеза, такой подход также может быть применен для синтеза олигонуклеотидов и полисахаридов. Но на данных вопросах остановимся отдельно ниже.

Применение растворимых носителей для синтеза олигонуклеотидов заставило авторов твердофазного синтеза в своей новой публикации [Letsinger, Mahadevan, 1966], дабы сразу разграничить используемую ими методику синтеза, вывести в заголовок слова об использовании нерастворимого полимерного носителя, коими в той их работе послужили несколько иные сополимеры стирола с *n*-винилбензойной кислотой, с 2,3-диметилбутадиеном и с 0,2% *n*-дивинилбензолом в качестве сшивающего агента.

В то (второе) десятилетие была завершена расшифровка генетического кода, что без синтеза большого количества олигонуклеотидов фосфодиэфирным методом сделать тогда было проблематично или даже невозможно и Кораной вместе с сотрудниками внесен большой вклад в то глобальное исследование, что отмечено Нобелевской премией, о чем говорилось выше. Также под руководством Кораны проведен синтез фосфодиэфирным методом полноразмерного гена для аланиновой тРНК дрожжей и это стало тогда

[9] нужно заметить, что тогда под ‘dideoxyribonucleotides’ понимали обычные динуклеотиды, объединенные фосфодиэфирной связью, а не современный «дидезоксирибонуклеотид», лишенный второй гидроксильной группы в углеводном компоненте, который нашел применение в ферментативном секвенировании ДНК по Сэнгеру с дидезокситерминаторами

[10] к блочному синтезу олигонуклеотидов мы еще вернемся

грандиозным достижением, о чем было сообщено в 1970 г. [Agarwal et al., 1970].

Третье десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов

Третье десятилетие химического синтеза олигонуклеотидов началось с того, что в 1975 г. вышла статья [Letsinger et al., 1975], в которой было обращено внимание, что трехвалентный фосфор гораздо реакционноспособнее, нежели пятивалентный. Это привело к разработке нового метода синтеза олигонуклеотидов, названного фосфиттриэфирным [Letsinger, Lunsford, 1976] и получившего дальнейшее развитие, в том числе в твердофазном варианте [Matteucci, Caruthers, 1980], что явилось важным шагом на пути к автоматизации всего процесса. В своей следующей статье [Matteucci, Caruthers, 1981] эти авторы привели схему аппарата для «машинного» синтеза олигонуклеотидов, на которой изобразили реакционную колонку, сосуды с реагентами, насос, инжектор, спектрофотометр для контроля качества процесса синтеза. Наибольшего прорыва удалось достичь после того, как оказался разработан новый вариант фосфиттриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов, названный амидофосфитным, в котором в качестве синтонов стали применяться амидофосфиты дезоксинуклеозидов [Becauge, Caruthers, 1981]. После того, как качестве активатора стал использоваться 1*H*-тетразол этот метод получил дополнительное серьезное преимущество [McBride, Caruthers, 1983]. Применение для защиты фосфитной группы β-цианоэтильной группы заметно упростило депротекцию и выделение конечного продукта [Sinha et al., 1984].

При этом в те годы продолжалось совершенствование и фосфотриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов [Narang et al., 1979; 1980; Efimov et al., 1982]. Целый ряд дальнейших улучшений амидофосфитного метода привел к тому, что в настоящее время он стал основным методом синтеза олигонуклеотидов и на нем стоит остановиться подробнее.

В амидофосфитном методе для синтеза олигонуклеотидов в качестве синтонов используются амидофосфиты, представляющие собой по сути обычные азотистые основания, в которых все реакционноспособные группы (амино-, гидроксильные, фосфатные) защищены соответствующими блокаторами нежелательных реакций. Так, для остатков аденозина и цитидина применяются 6-N-бензоил (Bz) , а для гуанозина используется 2-N-изобутирил (iBu), тогда как тимидин не требует подобной защиты ввиду отсутствия у него экзоциклических аминогрупп. Фосфитная группа защищается β-цианэтильной группой (CE), а также диизопропиламинной группой (*i*Pr_2N), тогда как 5`-OH группа защищается диметокситритилом (DMT). Структурные формулы ставших классическими амидофосфитов приведены на рис. 1.

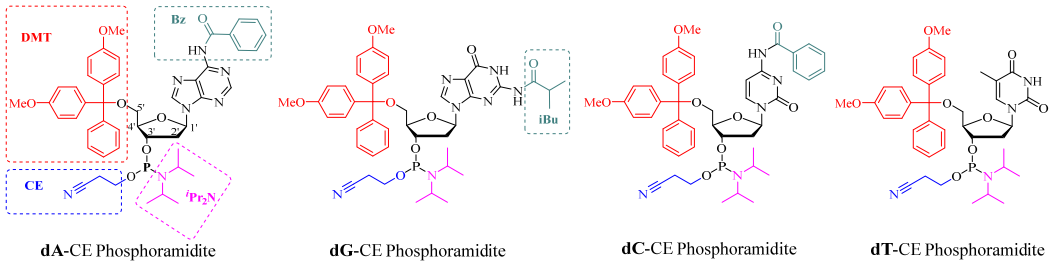


Рис. 1. Структурные формулы четырех основных амидофосфитов, где защитные группы выделены цветом и заключены в рамки
Fig. 1. Structural formulas of the four main phosphoroamidites, where the protective groups are highlighted in color and enclosed in frames

Помимо перечисленных защитных групп предложено также немало иных, в том числе обеспечивающих более мягкие условия финальной депротекции, но при этом страдающие другими недостатками. Большинство таких защитных групп удаляются по завершению всего синтеза, за исключением 4,4`-диметокситритильной группы, которая удаляется в начале каждого цикла, так как к данному месту присоединяется очередной нуклеотид.

Кроме амидофосфитов в виде стандартных нуклеозидов, могут использоваться и другие синтоны с модифицированными азотистыми основаниями, а также синтоны, служащие для дальнейшего введения различных реакционных групп, используемых обычно постсинтетически для мечения олигонуклеотидов флуоресцентными красителями, биотином, либо для введения прочих модификаций.

Современный твердофазный олигонуклеотидный синтез состоит из циклического повторения четырех стадий или этапов в виде реакций депротекции (удаление тритильной защиты), конденсации, кэпирования, окисления/сульфуризации, осуществляемого путем пошагового добавления соответствующих реагентов после удаления отработавших и промывки твердой фазы с растущей цепью ДНК (рис. 2). Для большей наглядности на данном рисунке различные защитные группы выделены каждая своим цветом.

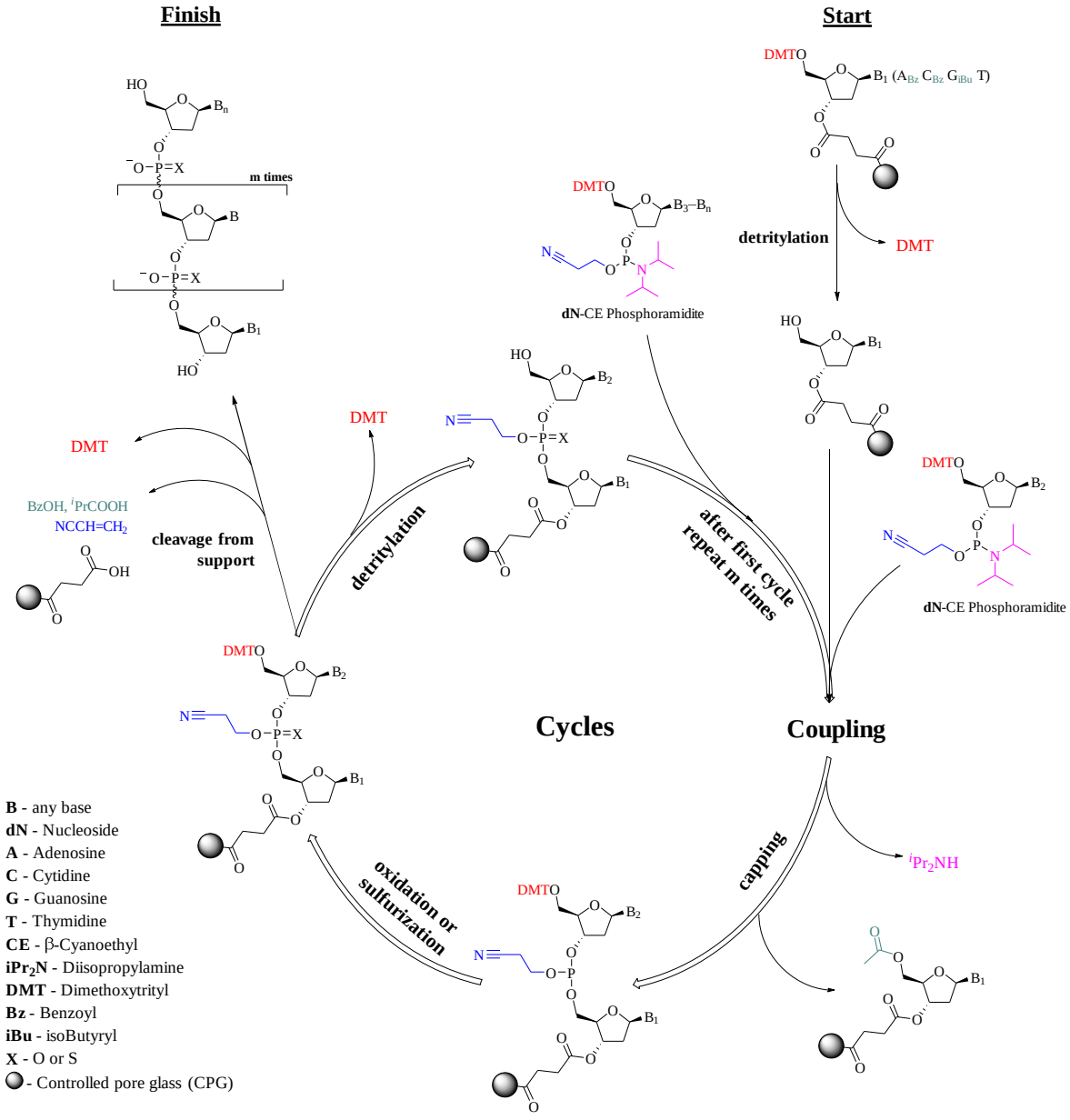


Рис. 2. Схема синтеза олигонуклеотидов амидофосфитным методом (Пояснения в тексте)
Fig. 2. Scheme of synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite method (Explanations in the text

Во многих экспериментальных статьях, обзорах, а также на различных web-страницах приведены последовательности химических реакций при классическом амидосфитном синтезе олигонуклеотидов в рамках

одного цикла, однако большинство их них излишне схематичны и не дают полного представления о входящих субстратах и удаляемых защитных группах. Мы попытались изобразить наиболее полное прохождение этих процессов, акцентировав внимание, что циклами синтеза правильнее считать добавление третьего и последующего фосфорамидитов, поскольку первый этап депротекции следует считать лишь вхождением в циклический процесс.

Представленная на рис. 2 схема синтеза начинается с азотистого основания, обозначенного как B_1. По ходу синтеза к нему присоединяется азотистое основание B_2 и затем очередные азотистые основания обозначенные как B_n и они могут быть любыми, как несущими защитные группы (Bz, iBu), так и без оных для T. Во время конденсации при добавлении очередного нуклеотида удаляется также диизопропиламинная группа, на место которой на стадии окисления или сульфуризации встает кислород (O) или сера (S) и соответственно возникает природная фосфодиэфирная связь либо тиофосфатная, устойчивая к действию нуклеаз. Но перед этим проводится этап кэпирования, служащий для блокирования непрореагировавших субстратов и вывода их из дальнейшего синтеза, в противном случае в следующем цикле к ним может присоединиться следующий нуклеотид, создав тем самым пропуск нуклеотида. Для продолжения синтеза и перехода к следующему циклу производится удаление DMT. Оно также производится по завершению синтеза и снятия готового олигонуклеотида с твердой фазы и финальной депротекции.

В результате удаления слабой кислотой защитной диметокситритильной группы у закрепленного на твердой фазе стартового нуклеотида (или у последнего нуклеотида при продолжающимся синтезе) появляется свободная 5`-гидроксильная группа, к которой на следующей стадии конденсации будет присоединен очередной нуклеотид, доставляемый в реакцию в виде активированного каким-либо азолом (например, 1*H*-тетразолом) соответствующего фосфорамидита, согласно прописи синтезируемой нуклеотидной последовательности. Сейчас такая конденсация протекает за считанные секунды (около 20 сек) и в результате олигонуклеотид удлиняется на одно звено. Несмотря на добавление активированного фосфорамидита в большом избытке, не исключается вероятность того, что не все свободные 5`-OH группы с ним прореагируют и тогда в реакционной смеси могут остаться олигонуклеотиды из предыдущего цикла, готовые к реакции со следующим фосфорамидитом, следствием чего станет ошибка синтеза в виде пропущенного нуклеотида. Чтобы это исключить требуется стадия кэпирования, в ходе которой происходит выведение из дальнейшего процесса синтеза непрореагировавшей во время конденсации части 5`-гидроксильных групп путем их ацетилирования, устойчивого к действию слабых кислот в следующих циклах при удалении новых диметокситритильных групп. В результате конденсации между соседними нуклеотидами формируется неприродная трехкоординированная фосфитная связь, которую необходимо окислить и образовать через фосфотриэфирную фосфодиэфирную связь. Либо создать тиофосфатную путем сульфуризации. Так, в 1984 г. было сообщено о синтезе амидофосфитным методом модифицированного олигонуклеотида с тиофосфатной связью, в котором вместо одного из кислородов фосфатной группы находится сера [Stec et al., 1984]. При этом нужно заметить, что подобные модификации с присутствием серы в межнуклеотидной связи осуществлялись и раньше с помощью фосфотриэфирного метода [Cook et al., 1969]. В итоге на твердой фазе будет находиться синтезируемый тот или иной олигонуклеотид с защищенной 5`-гидроксильной группой, которую для начала нового цикла требуется удалить, как описано выше.

По завершению синтеза производится снятие всех защитных групп и самого синтезированного олигонуклеотида с твердофазного носителя аммонолизом, что приводит к появлению функциональной одноцепочечной ДНК с гидроксильными группами на 3`- и 5`-концах (в случае синтеза обычного немодифицированного олигонуклеотида) после чего готовый олигонуклеотид осаждают этанолом и в отдельных случаях его уже можно использовать. Дальнейшая очистка синтезированного олигонуклеотида в зависимости от его состава (модификаций) и стоящих задач проводится или с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, или высокоэффективной жидкостной хроматографией.

При эффективности олигонуклеотидного синтеза амидофосфитным методом, превышающей обычно 99,5%, выход целевого продукта в виде 20-звенного олигонуклеотида составляет более 90% и из них менее 1% может быть представлено олигонуклеотидом из 19 звеньев (N-1), причем недоставать будет только концевого нуклеотида на 5`-конце, малозначимого для проведения ПЦР и некоторых других задач. Однако при необходимости клонирования образующегося ампликона в некоторых случаях бывает важен нуклеотид на 5`-конце праймера (олигонуклеотида). Синтез олигонуклеотидов обычно ведется в направлении 3`→5` и на их 5`-конце будет отсутствовать присущая природной ДНК фосфатная группа, и для ее введения во время синтеза необходимо использовать специальный синтон или проводить постсинтетическую модификацию с

помощью АТФ и полинуклеотидкиназы фага Т4 в тех случаях, когда предстоит этап клонирования ампликонов, хотя иногда можно обойтись и без этого, предоставив такому фосфорилированию произойти *in vivo*.

В настоящее время синтез, например, 20-звенного олигонуклеотида занимает менее трех часов в отличие от многих месяцев, требовавшихся на такой синтез использовавшимися ранее методами олигонуклеотидов даже меньшей длины, не говоря уже о крайне низком прежде выходе конечного продукта.

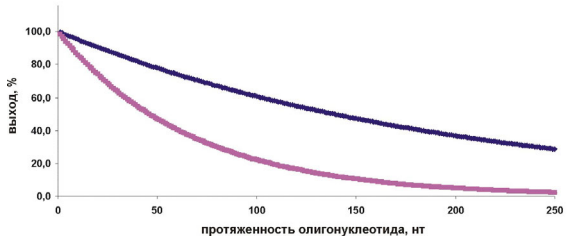


Рис. 3. Теоретический выход олигонуклеотидов в зависимости от их длины и разной эффективности синтеза. Синяя кривая – 99,5%, лиловая – 99% усредненных эффективностей синтеза в каждом цикле.

Fig. 3. Theoretical yield of oligonucleotides depending on their length and different synthesis efficiency. The blue curve is 99.5%, the purple one is 99% of the average synthesis efficiencies in each cycle.

Эффективность присоединения очередных нуклеотидов в первых и последних циклах для протяженных олигонуклеотидов будет заметно различаться, но поскольку это трудно оценить, то обычно приводят единые значения для всех циклов (рис. 3). При этом многие фирмы принимают заказы на синтез олигонуклеотидов до 100 звеньев длиной, что в целом гарантирует и выполнение заказа и точность синтеза.

В описываемое десятилетие благодаря химическому синтезу олигонуклеотидов получены важные результаты. Так, в 1975 и в 1977 гг. фосфотриэфирным методом разными группами авторов синтезирован лактозный оператор *E.coli* в виде 31 п.н. дуплекса [Itakura et al., 1975; Goeddel et al., 1977]. Поскольку аминокислоты кодируются тремя нуклеотидами, то в 1978 г. также фосфотриэфирным методом синтезированы все 64 возможных тринуклеотидных синтона [Hirose et al., 1978], после чего 32 из них использованы для синтеза генов А и В цепей инсулина человека [Crea et al., 1978]. В 1979 г. сообщено о завершении многолетней работы по синтезу фосфодиэфирным методом функционально-активного гена для тирозинового супрессора тРНК *E.coli* общей длиной 207 п.н. [Khorana, 1979]. В 1981 г. вышла статья, описывающая синтез гена интерферона человека размером 514 п.н., для чего потребовался синтез с помощью твердофазного фосфотриэфирного метода 66 олигонуклеотидов разного размера [Edge et al., 1981].

Однако во всех этих работах использовались довольно короткие олигонуклеотиды, в большинстве своем не превышающие в длину 20 звеньев, но благодаря амидофосфитному методу в 1983 г. удалось синтезировать два олигонуклеотида длиной 51 звено каждый, что сделало их на тот момент самыми длинными, полученными химическим синтезом без каких-либо ферментативных этапов лигирования [Adams et al., 1983].

Но самый важный результат того десятилетия, непосредственно связанный с олигонуклеотидами, это разработка К.Мюлисом в 1983-1985 гг. полимеразной цепной реакции (ПЦР) [Saiki et al., 1985], за что ему в 1993 г. присуждена Нобелевская премия. Причем Мюллис в то время работал химиком-синтетиком в американской фирме Cetus и сам синтезировал олигонуклеотиды, что сыграло немаловажную роль в этом его изобретении. Хотя, справедливости ради, следует сказать, что еще в конце 1960-х гг. в лаборатории Кораны был поставлен эксперимент с использованием некоей матрицы длиной 30 нуклеотидов и двух направленных навстречу друг другу праймеров длиной 9 и 10 нуклеотидов, результат которого доложен K.Kleppe на Gordon Conference on Nucleic Acids в 1969 г., идейно очень близкий к тому, что позже сделал Мюллис [Templeton, 1992].

В рассматриваемое десятилетие, помимо разработки ПЦР, в 1978 г. предложен другой очень важный метод в виде сайт-направленного мутагенеза, в котором олигонуклеотиды играют решающую роль, за что также была присуждена Нобелевская премия по химии М.Смиту вместе с Мюллисом.

Появление ПЦР с термостабильной Taq полимеразой [Kogan et al., 1987; Saiki et al., 1988] очень сильно изменило не только молекулярную биологии, но и многие смежные дисциплины, вызвав массовый синтез коротких олигонуклеотидов для их использования в ПЦР в качестве праймеров, но это уже произошло в следующее десятилетие.

Четвертое и последующие десятилетия химического синтеза олигонуклеотидов

Поскольку в предыдущие три десятилетия в плане совершенствования химического синтеза олигонуклеотидов как фосфодиэфирным, фосфотриэфирным, фосфитным и амидофосфитным методами были достигнуты серьезные успехи, то в дальнейшем грандиозных прорывов казалось бы ждать не приходилось. Тем не менее, в 1986 г. опубликованы две статьи [Froehler et al., 1986; Garegg

et al., 1986], в которых *H*-фосфонатный метод синтеза олигонуклеотидов после его первоначальной разработки в конце 1950-х гг. под руководством Тодда [Hall et al., 1957] после тридцатилетнего забвения можно сказать возродился и до сих пор используется, но в небольших масштабах. При этом *H*-фосфонатная химия больше подходит для синтеза олигонуклеотидов с различными модификациями фосфатной группы [Kraszewski, Stawinski, 2007]. Некоторое время продолжалось совершенствование и фосфотриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов [Efimov et al., 1986].

А в 1991 г. родилось новое направление в твердофазном синтезе в виде микрочипового способа синтеза олигонуклеотидов *in situ*, в котором на подходящей подложке из стекла, кремния, карбида кремния либо полиэтилентерефталата одновременно синтезируются множество олигонуклеотидов с отличающимися последовательностями. При этом они или остаются на своих местах после завершения синтеза и завершающего деблокирования, становясь в этом случае ДНК-чипами и служа для проведения молекулярной гибридизации с исследуемыми образцами ДНК или РНК, либо происходит удаление всех олигонуклеотидов в виде их пула в единый раствор для последующих операций с ними для синтеза генов [Tian et al., 2004], или для организации долговременного хранения небиологических данных в молекулах ДНК [Rebimbas et al., 2026].

Так, в статье, посвященной управляемому светом[11] синтезу 1024 пептидов на твердой подложке, которой служило микроскопное предметное стекло, заодно было сообщено о синтезе подобным образом и динуклеотида [Fodor et al., 1991]. Спустя несколько лет этими авторами была выполнена работа [Pease et al., 1994], в которой создан прообраз специального ДНК-чипа для секвенирования путем гибридизации, содержащий в тот момент на аналогичной стеклянной подложке 256 октануклеотидов, синтезированных *in situ* с помощью фотолитографии для чего предварительно синтезированы соответствующие амидофосфиты с фотолабильной N-ацильной группой. Также было подсчитано, что для ДНК-чипов с подобной плотностью с учетом дифракции света 65536 октануклеотидов могут разместиться на площади 0,64 кв.см, а 1048576 додекануклеотидов разместятся на 2,56 кв.см.

Однако вышеописанный способ микрочипового синтеза с использованием масок требует заранее изготовленного большого их количества. Так, для синтеза 25-ти звенного олигонуклеотида таких масок необходимо 100 (4×N). Причем смены таких масок занимают немало времени и это сильно увеличивает продолжительность синтеза. Применение технологии DMD (Digital Micromirror Device) или иначе цифрового микрозеркального устройства, используемого в DLP-проекторах, позволило вести безмасочный синтез олигонуклеотидов *in situ* [Singh-Gasson et al., 1999], что нашло затем широкое применение. Важным преимуществом безмасочного синтеза является упрощенная возможность коммерческого изготовления ДНК-чипов с любыми нуклеотидными последовательностями заказчика.

Другой подход к синтезу олигонуклеотидов *in situ* на подходящей поверхности заключается в использовании специального струйного принтера, доставляющего необходимые реагенты в нужное место [Blanchard et al., 1996]. Позднее было сообщено, что, используя эту технологию, удалось добиться *in situ* синтеза олигонуклеотидов длиной до 150 звеньев [LeProust et al., 2010]. При синтезе ДНК-чипов описано также применение полупроводниковых фоторезистов [McGall et al., 1996].

Еще одним способом синтеза олигонуклеотидов *in situ* на подложках из стекла и прочих материалов служит электрохимическое управление этим процессом [Egeland et al., 2002; 2005]. Не так давно сообщено об изготовлении ДНК-чипов с 25 млн. точек (т.е. разных олигонуклеотидов) на 1 кв. см, что достигнуто с помощью электрохимически направленного синтеза ДНК в виде избирательного приложения напряжения к реакционным точкам, вызывающего окислительно-восстановительное превращение гидрохинона/бензохинона в органическом растворителе, ведущее к локальному образованию протонов, удаляющих диметокситритильную защитную группу у растущих олигонуклеотидов и обеспечивающих присоединение очередного нуклеотида [Nguyen et al., 2021].

Предложенные подходы к изготовлению ДНК-чипов[12] путем синтеза олигонуклеотидов *in situ* коммерциализованы различными фирмами и имеют устойчивый спрос. Олигонуклеотидному синтезу *in situ* посвящено немало обзоров разных лет [Gao et al., 2004; Ma et al., 2024], в которых имеется большое количество ссылок на оригинальные работы, с которыми при необходимости можно ознакомиться и поэтому на этих вопросах больше останавливаться не будем.

[11] в местах, где должен присоединяться очередной пептид (нуклеотид), свет, направляемый через специальную маску, снимал защитную фотолабильную группу

[12] Изготовление ДНК-чипов посредством нанесения предсинтезированных олигонуклеотидов на твердую подложку с помощью специального струйного принтера или каким иным способом здесь нами не рассматривается.

Выше уже отмечалось, что химический синтез олигонуклеотидов амидофосфитным методом ведется в направлении 3`→5`, однако разработан и обратный вариант в виде 5`→3` колоночного синтеза [Wagner, Pfeiderer, 2000], но он значительно дороже ввиду гораздо меньшего масштаба использования и применяется для особых целей. Что касается синтеза *in situ* с целью изготовления ДНК-чипов, то синтез в направлении 5`→3` имеет определенное значение так как позволяет получать олигонуклеотиды, фиксированные на подложке по 5`-концу и со свободными 3`-концами, пригодными для их удлинения с помощью подходящей ДНК полимеразы, например при детекции однонуклеотидного полиморфизма и посему такой подход в ряде случаев используется [Beier, Hoheisel, 2002; Albert et al., 2003; Hölz et al., 2018].

Как уже говорилось выше, в предыдущем десятилетии для синтеза генов были заготовлены синтоны всех возможных 64 триплетов[13] [Hirose et al., 1978], но в 1990-х гг. к этому вернулись и подобные синтоны оказались представлены триплетными амидофосфитами с целью некоего упрощения синтеза генов, кодирующих белки. На протяжении ряда лет такие работы проводились несколькими группами ученых, включая россиян [Sondek, Shortle, 1992; Virnekäs et al., 1994; Ono et al., 1995; Kayushin et al., 1996]. Впрочем, это можно считать не повторением 1970-х гг., а вариантом предложенного еще Кораной в начале 1960-х гг. блочного синтеза олигонуклеотидов. Однако широкого распространения такой подход не получил.

Тем не менее, недавно предложено использовать синтоны из динуклеотидов, которых достаточно иметь всего 16 разных [Shi et al., 2024]. Как ни странно, но в будущем, возможно, это будет востребовано в большей степени, чем триплетные синтоны, поскольку появляется возможность для хранения цифровой информации в молекулах ДНК обходиться еще меньшим количеством динуклеотидных синтонов, потенциально увеличивая (теоретически в два раза) длины синтезируемых олигонуклеотидов, доведя их до 500 звеньев вместо пока максимальных 250[14], что также весьма важно. Так, для бинарных чисел «0» и «1» в их двухразрядной кодировке комбинаций может быть только четыре: «00», «01», «10», «11» и, используя при этом принцип пиримидин-пуринового кодирования соответственно «нулей» и «единиц», достаточно будет всего четырех синтонов из динуклеотидов - `PyPy`, `PyPu`, `PuPy`, `PuPu`. Однако для исключения появления нежелательных вторичных структур в реально синтезируемой нуклеотидной последовательности, состоящей в итоге из тех же A, C, G и T, нужно озаботиться о некоторой вырожденности уже «компьютерно-нуклеинового кода» для чего следует заготовить восемь динуклеотидных синтонов (например, с учетом 50% GC состава в них - вот этих: `CT` и `TC`, `CA` и `AC`, `GT` и `TG`, `AG` и `GA`) и это вполне может быть приемлемо для подобного синтеза.

Помимо обычных линейных олигонуклеотидов описан синтез их разветвленных форм в виде дендримеров за счет использования специальных синтонов, что позволяет применять их как в качестве праймеров, так и гибридизационных проб с увеличенным числом меток на 5`-концах [Shchepinov et al., 1997], а также для создания различных объемных наноконструкций [Shchepinov et al., 1999]. Другими авторами предложены аналогичные разветвленные олигонуклеотидные конструкции под названием bDNA (branched), имеющие схожее предназначение [Horn et al., 1997]. Описано также разветвление синтезируемых олигонуклеотидов через остатки фосфорной кислоты [Heinonen, Lönnberg, 2004].

Тем же Caruthers с соавторами предложено амидофосфитный олигонуклеотидный синтез, состоящий из четырех этапов, сократить до двух этапов за счет использования перокси аниона, обеспечивающего депротекцию (удаление карбоновой защиты вместо тритильной) и окисление, а также обходиться без стадии кэпирования [Sierzchala et al., 2003; Dellinger et al., 2005].

Во Введении мы упомянули про модифицированные олигонуклеотиды с измененными азотистыми основаниями, углеводной частью и остатками фосфорной кислоты, что со временем привело к необходимости использования для них специальной аббревиатуры в виде XNA. Неприродных нуклеиновых кислот, устойчивых в частности к действию нуклеаз, синтезировано уже немало, и про тиофосфатные речь уже шла и пойдет еще. Здесь же в хронологическом порядке осуществления синтеза таких соединений приведем некоторые из них, преимущественно с иным углеводным компонентом, в ряде случаев заметно увеличивая стабильность образуемых с ними гетеродуплексов.

Итак, аббревиатура XNA объединяет такие модификации как PMO (Phosphorodiamidate

[13] Здесь, пожалуй, стоит вспомнить, что еще в 1966 г. Корана с сотрудниками синтезировали все 64 варианта триплетов в виде риботринуклеотидов [Lohrmann et al., 1966], что способствовало выяснению генетического кода.

[14] Что касается максимально возможной длины синтезируемых олигонуклеотидов химическим путем, то к этому вопросу обратимся ниже.

Morpholino Oligonucleotide) [Stirchak et al., 1989], PNA (Peptide) [Nielsen et al., 1991], ANA (Arabinose) [Giannaris et al., 1994], HNA (Hexitol) [Van Aerschot et al., 1995], UNA (Unlocked) [Nielsen et al., 1995], XyloNA (Xylose) [Alekseev et al., 1996], BNA (Bridged) [Obika et al., 1997; 1997a], LNA (Locked) [Singh et al., 1998], tc-DNA (tricyclo) [Steffens et al., 1999], CeNA (Cyclohexene) [Wang et al., 2000], TNA (Threose) [Schöning et al., 2000], GNA (Glycol) [Zhang et al., 2004], ONA (Oxepane) [Sabatino et al., 2007], SNA (Serinol) [Kashida et al., 2011], BuNa (acyclic (S)-butyl) [Kumar et al., 2013], PGO (Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides) [Купрюшкин и др. (Kupryushkin et al.), 2014]. Справедливости ради следует заметить, что впервые углевод в нуклеозиде заменил Michelson [1962].

Недавно японскими авторами вместо XNA предложено другое обозначение модифицированных нуклеиновых кислот – ΩNA (Omega) [Hamada et al., 2026]. Ими было показано, что практически все буквы латинского алфавита уже задействованы при обозначении неприродных химически синтезируемых нуклеиновых кислот. Но, они в частности, не отметили форму ДНК в виде L-DNA [Urata et al., 1992], являющейся стереоизомером природной и ее особенность заключается в том, что две цепи L-DNA с комплементарными нуклеотидами двойную спираль меж собой не формируют, что бывает востребовано в молекулярной биологии в отдельных случаях. Что касается PNA, то в отличие от присущего истинным молекулам ДНК, а также другим модификациям сахарофосфатного остова, как в виде вариаций его углеводного компонента, так и несколько видоизмененной фосфорной кислоты (тиофосфат, метилфосфонат, фторфосфат, амидофосфат, боранофосфат), соединяющих соседние азотистые основания фосфодиэфирной связью, в остове пептидно-нуклеиновой кислоты нет ни того, ни другого компонента или их аналогов, а состоит тот остов из N-(2-аминоэтил)глициновых остатков, связанных пептидной связью. Однако для некоторых задач в молекулярной биологии не столь важно, каким образом соединены соседние азотистые основания, поскольку главное, чтобы они находились друг от друга на расстоянии, обеспечивающем образование водородных связей с себе комплементарными в антипараллельной цепи (ДНК). В связи с PNA можно еще добавить, что с помощью безмасочной фотолитографии изготовлен ДНК-чип из 256 PNA олигонуклеотидов, размещенных на стеклянной подложке размером 210×210 мкм [Liu et al., 2007]. Также нельзя не отметить, что помимо PNA, электронейтральный остов имеют PMO и PGO, что способствует их проникновению в клетку, тогда как прочие XNA несут большой суммарный отрицательный заряд.

Получение модифицированных олигонуклеотидов и концепция комплементарно-адресованной модификации нуклеиновых кислот, впервые сформулированная отечественными авторами, получившая международное признание и заложившая основу нового направления в терапии – антисмысловой (antisense) технологии [Belikova et al., 1967], открыли широкие возможности по созданию терапевтических нуклеиновых кислот [Talap et al., 2021].

В 2016 г. в медицинскую практику для лечения спинальной мышечной атрофии внедрен препарат «Спинраза», представляющий собой 18-ти звенный олигонуклеотид с тиофосфатными связями, придающими ему устойчивость к воздействию нуклеаз. После этого еще несколько препаратов на этом принципе стали использоваться в качестве лекарственных средств, и еще около сотни ожидают разрешения. Однако при обычном синтезе получается снижающая действие таких препаратов рацемическая смесь из гигантского количества стереоизомеров O-P-S/S-P-O связей, подчиняющему формуле 2^n, где n соответствует числу нуклеотидов. Ранее было показано, что тиофосфатные Sp-олигонуклеотиды оказались более устойчивы к действию нуклеаз, нежели тиофосфатные Rp-олигонуклеотиды или их рацемическая смесь [Koziołkiewicz et al., 1997]. Другими авторами обнаружено, что использование 28-звенного тиофосфатного Sp-олигонуклеотида было более эффективно при антисенс-терапии [Inagawa et al., 2002]. Уже давно уделялось значительное внимание методам стереоконтролируемого синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов [Lu, 2006].

В последние годы приложены значительные усилия к получению чистых энантиомеров подобных олигонуклеотидов и для этого пришлось при синтезе «вернуться» к более подходящему для этой цели пятивалентному фосфору P(V) [Knouse et al., 2018; Huang et al., 2021; Nassir et al., 2025].

Поскольку мы в предыдущих разделах приводили наиболее важные результаты, полученные с использованием олигонуклеотидного синтеза, то и здесь продолжим это делать. Так, в области синтетической биологии выполнены эпохальные работы, в ходе которых под руководством К.Вентера были созданы (воспроизведены, исходя из известных геномных данных) первые полностью синтетические микроорганизмы – бактерии *Mycoplasma genitalium* с размером генома 582970 п.н. [Gibson et al., 2008] и *M.mycoides* с размером генома 1077947 п.н. [Gibson et al., 2010]. При этом для их многоэтапного конструирования синтезировано огромное количество олигонуклеотидов разной протяженности. Причем их авторы внедрили в эти геномы в межгенные участки

несколько коротких «водяных ДНК-знаков», свидетельствующих, что это искусственные микроорганизмы. Так, в частности, в геноме *M.mycoides* в четырех таких водяных знаках оказались закодированы фамилии авторов, их электронные адреса, а также три цитаты - “TO LIVE, TO ERR, TO FALL, TO TRIUMPH, TO RECREATE LIFE OUT OF LIFE.”- JAMES JOYCE; “SEE THINGS NOT AS THEY ARE, BUT AS THEY MIGHT BE.” – из книги “AMERICAN PROMETHEUS”; “WHAT I CANNOT BUILD, I CANNOT UNDERSTAND.” – RICHARD FEYNMAN. Собственно в использовании водяных ДНК-знаков эти авторы были не оригинальны и не одиноки, поскольку это делалось и до них при создании, например, трансгенных растений, о чем упоминается в одной из наших статей [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2021].

В еще одной работе уже из области DNA Data Storage в молекулах ДНК (олигонуклеотидах) было сохранено 35 различных файлов (размерами от 29 Кб до 44 Мб), представленных большим разнообразием их типов – txt, pdf, MP3, MP4, jpg, а также ряд архивированных общим объемом более 200 Мб [Organick et al., 2018]. Среди наиболее крупных и примечательных файлов следует отметить «Декларацию прав человека» на более чем 100 языках, видеоклип музыкальной рок-группы OK Go с песней «This Too Shall Pass», базу данных семян, хранящихся в Глобальном хранилище семян на Шпицбергене. Для этого потребовался синтез 13448372 олигонуклеотидов размерами 190 и 194 звена.

В описываемый в этом разделе период, занявший около четырех десятилетий из всего 70-ти летнего развития химического синтеза олигонуклеотидов, были совершены и иные достижения, но они будут приведены в последующих разделах, поскольку нам показалось, что так будет к месту и в целом логичнее.

Носители для твердофазного колоночного синтеза олигонуклеотидов

Поначалу химический синтез олигонуклеотидов велся в растворе, но после разработки в 1965 г. синтеза на твердой фазе со временем появилась возможность его автоматизации, что было спустя полтора десятилетия осуществлено и к чему далее перейдем. При этом еще до этого в качестве носителя синтезируемых олигонуклеотидов после предложенного первым сополимера так называемого «попкорнового» типа из стирола с дивинилбензолом [Letsinger, Mahadevan, 1965] стали испытываться и другие макроскопических размеров носители, которых ниже кратко коснемся, не затрагивая при этом различных модификаций их поверхности, включая соединения для ковалентной пришивки к ним первых (затравочных) нуклеотидов, к которым затем происходит присоединение последующих звеньев.

Так, отечественными авторами в 1971 г. был осуществлен синтез олигонуклеотидов на несколько измененных «попкорновых» носителях в виде изотактического полистирола и высокосшитого сополимера стирола и дивинилбензола, содержащего до 40% последнего [Потапов и др. (Potapov et al.), 1971; Зарытова и др. (Zarytova et al.), 1971]. Описано изготовление сополимерных носителей из стирола, дивинилбензола и *п*-метокси-*п*`-винилтрифенилкарбинола [Потапов и др. (Potapov et al.), 1973]. Спустя несколько лет этой группой авторов был предложен иной носитель для твердофазного синтеза, представляющий собой привитый на тефлоновые гранулы полистирол [Потапов и др. (Potapov et al.), 1978; Potapov et al., 1979]. Другие отечественные авторы использовали для твердофазного синтеза макропористый силикагель, в том числе выпускаемый под торговой маркой «Силохром» [Добрынин и др. (Dobrynin et al.),, 1983; Ломакин, Попов (Lomakin, Popov), 1985].

В 1972 г. в одном номере журнала Tetrahedron Letters вышла (следом друг за другом) целая серия статей немецких авторов, в которых ими предложены для твердофазного синтеза олигонуклеотидов разные носители, среди которых были шарики из непористого стекла (0,02 – 0,05 мм), а также силикагель [Köster, 1972]. Помимо них в той работе вскользь упоминались пористые кремнезем и стекло, причем применение последнего носителя получило развитие в их дальнейшей работе [Köster et al., 1983]. В 1977 г. другими авторами предложено использовать носитель из полидиметилакриламида [Gait, Sheppard, 1977], а также сшитый полиакрилморфолид [Narang et al., 1977], в 1980 г. применили в качестве носителя целлюлозные фильтры Whatman CC31 [Crea, Horn, 1980], в 1982 г. – сшитую полиакриламидную смолу [Gait et al., 1982] и носитель из кизельгура с полиамидом [Gait et al., 1982]. В 1984 г. опять вспомнили бумажные фильтры Whatman 3MM [Ott, Eckstein, 1984].

И это далеко не все испытывавшиеся носители для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, часть которых рассмотрена в специализированном обзоре [Pon, 1993].

Наиболее широко используемыми носителями для твердофазного синтеза олигонуклеотидов сейчас являются слегка набухающие в некоторых растворителях при синтезе полистирольные гранулы (PS), а также стойкое к различным реагентам пористое стекло с контролируемым размером пор, обозначаемое как `CPG` (Controlled Pore Glass), имеющее обычно диаметр шариков около 100 мкм, но отличаясь размерами пор. Так, было проведено

исследование эффективности синтеза олигонуклеотида длиной 75 звеньев и обнаружено, что лучшие результаты достигались с CPG с размером пор 1400Å [Kozlov et al., 2005]. В целом считается, что короткие олигонуклеотиды (до 20 звеньев) могут синтезироваться с использованием CPG с порами 500Å, олигонуклеотиды средней длины (от 20 до 80 звеньев) требуют CPG с порами 1000Å. Для более длинных олигонуклеотидов вплоть до 250 звеньев рекомендуется использовать CPG с порами в 2000Å и 3000Å. При этом необходимо иметь ввиду, что общая площадь поверхности CPG с увеличенным размером пор становится меньше. Однако с ростом олигонуклеотидных цепей при синтезе в порах CPG они (цепи) будут препятствовать проникновению новых порций реагентов к реакционным группам.

При этом для многих случаев крайне важна точность синтеза, которая в целом неизбежно снижается с ростом длины синтезируемых олигонуклеотидов. И этому вопросу недавно было уделено значительное внимание отечественными авторами [Синяков, Костина (Sinyakov, Kostina), 2025; Yakovleva et al., 2026].

Некоторое время назад вышла статья [Yin et al., 2024], а затем и подробный протокол [Fang et al., 2024], в которых сообщалось о синтезе амидофосфитным методом в автоматическом ДНК-синтезаторе двух олигонуклеотидов длиной 399 и 401 звено, где в качестве носителя использован CPG с порами в 2000Å. Для очистки синтезированных олигонуклеотидов авторы применили ранее разработанный ими подход [Fang, Fueangfung, 2010] с финальной полимеризацией целевого продукта фактически с полиакриламидным гелем за счет того, что последний синтон с нуклеотидом нес также специальные группировки в виде метакриламида и силильную группу, чтобы после удаления простой отмывкой загрязняющих реагентов, разрушить последнюю (силильную группу) и элюировать из геля готовый олигонуклеотид, ограниченный на 5`- и 3`-концах стандартными ОН-группами. Но на этом авторы тех работ не ограничились и позже опубликовали статью, в которой речь шла о синтезе олигонуклеотидов длиной 800 и 1728 звеньев [Yin et al., 2024]. В этом случае основной синтез (помимо контроля с использованием CPG) велся в течение нескольких суток на твердой фазе из стеклянных волокон и стеклянных шариков с гладкой поверхностью, что исключало негативный вклад пор CPG в рост цепей олигонуклеотидов. Диаметр таких волокон составлял около 8 мкм, а их длина могла достигать 1 см. Шарики имели диаметр 58 мкм. Выход 800-мерного олионуклеотида составил итоговые 0,38% на волокнах и 0,13% на шариках. 1728-мерный олигонуклеотид показал выход на стеклянных шариках в 0,16%. Для их очистки применялся тот же описанный выше подход с приполимеризацией к полиакриламиду. При этом авторы оценили качество синтеза путем клонирования синтезированных продуктов и секвенирования по Сэнгеру в общей сложности более 100 колоний, показавшее от 85 до 96% точности для 800-звенного олигонуклеотида, но только 44% правильных последовательностей для 1728-звенного олигонуклеотида. Однако в любом случае это в настоящее время является рекордом длины синтеза олигонуклеотидов химическим путем. При этом выход таких длинных олигонуклеотидов весьма низок и с этим трудно что-либо кардинально поделать при использовании химического синтеза, разве что переходить к жидкофазному синтезу, где все реакции идут в однородной среде с практически количественным выходом.

Важное значение для повышения эффективности синтеза олигонуклеотидов приобретают пришиваемые к носителям активаторные молекулы [Miyazaki et al., 2022]. Недавно значительное внимание уделено использованию для синтеза олигонуклеотидов всевозможных гибридных носителей с использованием CPG [Trzciński et al., 2024].

Помимо упомянутых выше различных носителей для синтеза олигонуклеотидов, предлагались и иные. Так, в 2013 г. вышла статья [Jensen et al., 2013], в которой описан синтез олигонуклеотидов в коммерческом ДНК синтезаторе с использованием стандартного протокола для амидофосфитного метода, где вместо CPG или PS в качестве носителя в реакционной колонке использовались парамагнитные шарики размером 1 мкм, удерживаемые в ней с помощью находящегося внутри другого шарика, представляющего собой постоянный магнит, или, используя магнитную пластину снаружи, поскольку используемые фильтры в таких колонках имеют отверстия гораздо крупнее и не способны задержать такие мелкие частицы. При этом авторы отметили, что синтез олигонуклеотидов на такой платформе позволяет синтезировать, помимо обычных олигонуклеотидов также и РНК и пептидно-нуклеиновую кислоту. Здесь нужно заметить, что еще в 1987 г. был выдан патент США за номером 4,638,032, в котором описывалось использование магнитных частиц в качестве носителей для синтеза на них различных полимерных соединений, включая ДНК, РНК и полипептиды [Benner, 1987].

Растворимые носители для синтеза олигонуклеотидов

В середине 1960-х гг. в качестве растворимого носителя для синтеза олигонуклеотидов предложены растворимые в пиридине производные полистирола в

виде его производных с *p*-метокситритилхлоридом [Hayatsu, Khorana, 1966; 1967] и с *p*-метоксифенилфенилметилхлоридом [Cramer et al., 1966]. В 1973 г. для этой цели предлагалось использовать растворимый в смеси пиридина и гексаметилфосфоротриамида поливиниловый спирт [Schott, 1973].

Также рассматривалась возможность применения в качестве носителя для синтеза олигонуклеотидов полиэтиленгликоля (PEG) с молекулярным весом 20000, который растворим в воде, диоксане и в том же пиридине, что позволяет в одной фазе вести контроль за процессом конденсации [Köster, 1972a]. Спустя почти два десятка лет такой подход с PEG лег в основу растворимых носителей для олигонуклеотидного синтеза, и данная технология получила название `HELP` (High Efficiency Liquid Phase), фактически объединив преимущества твердофазного синтеза и синтеза олигонуклеотидов в растворе фосфотриэфирным методом, переходя от стадии к стадии через осаждение диэтиловым эфиром и кристаллизацию без длительного хроматографического разделения продуктов для их очистки от непрорегировавших соединений [Bonora et al., 1990]. Затем эти авторы применили свой подход для аналогичного синтеза, но уже с помощью амидофосфитного метода, назвав его HELP Plus [Bonora et al., 1993]. Позже этот подход использовался ими для *H*-фосфонатного метода [Zaramella, Bonora, 1995], а затем для синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов [Bonora et al., 2000]. В дальнейшем при подобном способе синтеза с растворимой твердой фазой в качестве таковой выступали различные ионные жидкости [Donga et al., 2006; 2007; Huo, Chan, 2010]. В 2012 г. растворимым носителем для олигонуклеотидного синтеза было предложено использовать модифицированный β-циклодекстрин [Molina et al., 2012].

Предлагались и другие растворимые носители для синтеза олигонуклеотидов в растворе, но о них и в целом о данном способе синтеза будет говориться в соответствующем разделе данной статьи. К тому же нами завершается написание отдельного обзора по жидкофазному синтезу олигонуклеотидов, а также готовится подача заявки на патенты на оригинальный способ синтеза олигонуклеотидов в растворе и на так называемую полезную модель.

Автоматические синтезаторы ДНК

Разработка синтеза олигонуклеотидов на твердой фазе и подбор подходящих носителей для синтезируемых цепей ДНК вкупе с появлением удобного амидофосфитного метода вылились в долгожданную автоматизацию процесса синтеза и вызвали к жизни соответствующие специализированные приборы. Но и до этого автоматический синтез олигонуклеотидов уже производился.

Так, первый автоматический твердофазный синтез нескольких олигонуклеотидов длиной 8 и 9 звеньев еще фосфодиэфирным методом с помощью подвергнутого модернизации пептидного синтезатора модели 990 фирмы Beckman был осуществлен в 1977 г. [Gait, Sheppard, 1977]. Спустя несколько лет этими авторами синтезированы более протяженные олигонуклеотиды (до 12 звеньев длиной) с помощью уже фосфотриэфирного метода и было отмечено, что эта технология более быстрая и обеспечивает больший выход целевых продуктов [Gait et al., 1980]. Причем синтез проводился с использованием все того же модернизированного пептидного синтезатора фирмы Beckman и авторы указали, что по запросу могут прислать детальное описание произведенных конструктивных изменений этого пептидного синтезатора, чтобы он стал олигонуклеотидным.

Первая попытка вывести на рынок автоматический ДНК-синтезатор была предпринята в декабре 1980 г. американской фирмой Vega Biotechnologies, переделавшей свой пептидный синтезатор в модель Coder Model 280, но с 1984 она, не выдержав конкуренции, перестала выпускаться [Kaplan, 1985].

В 1981 г. канадскими авторами опубликована статья, в которой они описали синтез тетрадекамерного олигонуклеотида на управляемом компьютером приборе собственной конструкции, приведя схематическое расположение его узлов [Alvarado-Urbina et al., 1981]. Продолжительность цикла у них составила 30 мин, используя фосфитную химию. В 1984 г. вышли статьи двух групп американских авторов, в которых шла речь о конструировании автоматических ДНК-синтезаторов, рассчитанных на амидофосфитную химию. Одна из них [Hunkapiller et al., 1984] посвящена конструированию под руководством L.Hood целого ряда приборов в Калифорнийском технологическом институте, среди которых упоминался автоматический ДНК синтезатор, рассчитанный на использование разработанной одним из авторов той публикации (M.C.[15]) самой фосфитной технологии с эффективностью конденсации выше 96% и временем цикла около 10 мин. Авторы сообщили, что на их приборе можно синтезировать олигонуклеотиды длиной более 50 звеньев.

В другой статье [Warner et al., 1984] приведена схемотехника их прибора и сообщалось, что на нем синтезировано более 600 олигонуклеотидов размерами до 122 звеньев со временем цикла,

[15] Marvin Caruthers

занимающим 15 мин, и эффективностью конденсации 98,5% в каждом цикле.

Отечественными авторами еще в конце 1970-х гг. стали вестись разработки автоматических синтезаторов олигонуклеотидов [Потапов и др. (Potapov et al.), 1982]. Сначала была создана полуавтоматическая установка «Виктория-1», опытный образец которой изготавливался в Специальном конструкторско-технологическом бюро специальной электроники и аналитического приборостроения СО АН СССР. В той статье была приведена гидравлическая схема данной установки и сообщено об успешном синтезе фосфодиэфирным методом нонануклеотида (T-G-T-G-T-G-G-A-C)[16] с использованием упоминавшегося выше носителя из тефлоновых гранул с привитым полистиролом. Спустя пару лет появился более совершенный полностью автоматический ДНК-синтезатор модели «Виктория-4М», рассчитанный на фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов [Грязнов и др. (Gryaznov et al.), 1986].

Стоит обратиться к словам основоположника современного твердофазного синтеза олигонуклеотидов M.H.Caruthers, приведенным им в статье с символичным названием “The chemical synthesis of DNA/RNA: our gift to science` [Caruthers, 2013], где автор вспомнил намерения его самого и коллег создать метод, который был бы пригоден для машинного синтеза олигонуклеотидов и что самое главное, чтобы им могли оперировать не только химики. Собственно разработать такой метод [Matteucci, Caruthers , 1980; Beaucage, Caruthers, 1981] им действительно удалось. Продолжая в той же статье [Caruthers, 2013] свое повествование M.H.Caruthers привел фото первого амидофосфитного коммерческого ДНК-синтезатора модели 380A американской фирмы Applied Biosystems, который появился у него в лаборатории в декабре 1982 г., а в 1983 г. был выведен на рынок.

Однако с учетом того, что автоматические ДНК синтезаторы доступны были далеко не всем и с учетом высокой стоимости этих приборов и отсутствия навыков работы на них, другой основоположник в этот раз всего твердофазного синтеза олигонуклеотидов R.L.Letsinger опубликовал статью, в которой описан ручной способ пошагового синтеза олигонуклеотидов амидофосфитным методом с использованием подходящего шприца с вмонтированным на выходе специальным фильтром, удерживающим силикагельные частицы, используемые в качестве твердой фазы [Tanaka, Letsinger, 1982]. О подобном ручном синтезе олигонуклеотидов в пробирках упоминал и тот же Caruthers [deHaseth et al., 1983; Caruthers, 1985].

Предлагавшийся оригинальный способ параллельного ручного синтеза фосфотриэфирным методом сразу нескольких олигонуклеотидов на твердой фазе, в качестве которой служили целлюлозные диски из фильтровальной бумаги Whatman 3MM, заключался в том, что когда растущие цепи разных олигонуклеотидов должны удлиняться одним и тем же синтоном, то такие олигонуклеотиды собираются в одном и том же реакционном сосуде, а после завершения процесса они разделяются и заново объединяются в соответствии со следующими одинаковыми нуклеотидами [Frank et al., 1983]. Другие авторы сообщили, что за две недели им удалось синтезировать таким образом 254 олигонуклеотида с размерами от 8 до 22 звеньев, используя некие реакционные колонки, помечаемые как A, C, G и T, за счет помещения/перемещения таких дисков в конкретные колонки в зависимости от очередного присоединяемого нуклеотида [Matthes et al., 1984]. Данный подход получил название как «сегментный твердофазный синтез», но полностью его автоматизировать не удалось. Однако отечественными авторами он был использован для автоматического синтеза пяти олигонуклеотидов длиной 13-18 звеньев на установке «Виктория-2», в реактор которой помещались целлюлозные диски диаметром 10 мм (причем их могло помещаться там несколько десятков), что позволило в общей сложности обойтись 19 стадиями конденсации вместо стандартных 71 [Ломакин, Попов (Lomakin, Popov), 1985]. При этом реактор все же приходилось открывать и изменять комбинацию дисков.

В условиях некоторой нехватки и малой доступности ДНК синтезаторов такой подход с ручным синтезом олигонуклеоидов экспериментирующими молекулярными биологами стал использоваться и соответствующие готовые комплекты для его проведения поставлялись рядом фирм. При этом даже в конце 1980-х гг. когда уже автоматические ДНК-синтезаторы, помимо отечественной «Виктории-6М», выпускались целым рядом зарубежным фирм (Applied Biosystems, Biosearch, Systec, Cruachem, Pharmacia, Millipore и др.) публиковались подробные протоколы по ручному синтезу олигонуклеотидов как более передовым амидофосфитным методом [White, 1988], так и к тому времени несколько устаревшим фосфотриэфирным [O`Callaghan, Donnelly, 1988].

В качестве некоего подтверждения имевшего место в те годы определенного дефицита олигонуклеотидов может служить письмо редактору

[16] как в те годы было принято писать последовательности синтезируемых олигонуклеотидов, иногда добавляя еще перед скобками букву d(.-.-.), для уточнения, что это дезоксирибоолигонуклеотид

журнала Nature, опубликованное в номере за 5 января 1989 г. [Willems, 1989], в котором его автор отмечал огромный потенциал появившегося варианта ПЦР с термостабильной ДНК полимеразой и одновременно сетовал на ограниченную доступность для значительной части экспериментаторов олигонуклеотидных праймеров отчасти из-за их дороговизны и даже предлагал за счет небольших взносов заинтересованных лабораторий при одной из биологических коллекций создать некий депозитарий таких молекул ДНК, которые могли бы рассылаться по запросам.

Однако этого не потребовалось, поскольку появившиеся к тому времени коммерческие автоматические ДНК-синтезаторы «сделали свое дело» и заказной синтез олигонуклеотидов стал быстро «набирать обороты». Так, уже начиная с февральских номеров 1989 г., в том же журнале Nature (да и в других профильных журналах), целый ряд специализирующихся на этом бизнесе фирм стали размещать рекламные объявления о заказном синтезе олигонуклеотидов по цене 7,5 – 10 долларов за звено. Причем благодаря сильной конкуренции такой заказной синтез начал очень быстро и при этом резко дешеветь, став «нормой» для молекулярных биологов и прочно оставив ручной синтез в прошлом.

В России в настоящее время имеется несколько фирм, предоставляющих услуги в виде синтеза олигонуклеотидов «под заказ» и среди них одним из первых возникло ООО «Синтол», производящее, наряду с обычными олигонуклеотидами, синтезируемыми в широком количественном диапазоне (от 0,02 до 5 мкмоль), еще и множество их модификаций, что можно видеть из web-сайта фирмы https://www.syntol.ru.

Что касается самих автоматических ДНК-синтезаторов, то в настоящее время в разных странах, включая Россию, производятся для колоночного синтеза различные модели этих инструментов, отличающихся масштабами синтеза и количеством одновременно синтезируемых олигонуклеотидов, но на этом останавливаться не будем, упомянув лишь некие вехи и оригинальные решения. Так, в 1995 г. появился ДНК-синтезатор, синтез олигонуклеотидов в котором шел в стандартном 96-луночном полипропиленовом планшете [Lashkari et al., 1995]. В 2002 г. было сообщено о конструировании ДНК-синтезатора с 1536 реакционными емкостями [Cheng et al., 2002]. В 2014 г. вышла публикация, в которой авторы предложили свою конструкцию подобного ДНК-синтезатора с 1536 реакционными емкостями, но с возможностью увеличения их количества до 3456 лунок [Jensen et al., 2014].

В 1988 году был разработан, в 1989 году выпущен в серию первый одноколоночный автоматический синтезатор ДНК/РНК серии ASM-102U, в котором дозирование реагентов осуществлялось не по времени, как у синтезаторов серии «Виктория», а по объему, что в итоге оказалось более эффективным и позволило приборам ASM успешно выйти на отечественный и зарубежный рынки. Разработкой прибора руководил Ю.Г.Средин. Через 10 лет под его руководством компанией Биоссет www.biosset.com был начат серийный выпуск сначала 7-, а потом и 8-колоночных синтезаторов ДНК серии ASM-700/800, а еще через 10 лет были выпущены еще более производительные приборы серии ASM-1000/2000 для синтеза олигонуклеотидов в формате 96-луночного планшета.

В 2015 году стартовало серийное производство препаративных синтезаторов ДНК/РНК ASM-10, а в 2024 году компания Биоссет начала серийно производить синтезаторы ASM-32. В настоящее время в России при участии компании Биоссет стартует опытно-конструкторская работа по разработке синтезатора в плашке на 384 лунки. Это один из немногих примеров в отрасли, когда отечественные разработчики и производители высокотехнологических решений на равных конкурируют с ведущими мировыми компаниями. Несомненно, такие практики надо всячески поддерживать и пропагандировать в качестве прекрасного примера для подражания молодым начинающим компаниям.

Помимо стандартных конструкций, автоматический синтез олигонуклеотидов предлагалось вести в стеклянных капиллярах длиной 10.8 см с внутренним диаметром 0.8 мм, служившей твердой фазой, а другой особенностью было управление светом, позволяющее осуществлять присоединение очередного нуклеотида в местах капилляра, где происходило снятие фотолабильной защиты [Blair et al., 2006]. Авторы сообщили, что им удался одновременный синтез в одном таком капилляре в разных его местах нескольких олигонуклеотидов длиной от 25 до 70 звеньев, постсинтетически смываемых из капилляра вместе в одном растворе.

Описаны струйные ДНК-синтезаторы нового поколения, часть конструктивных элементов которых изготавливали с помощью 3D печати, а синтез велся как на CPG носителях, так и микрочиповым способом [Li et al., 2019; Kim et al., 2024; 2025].

Завершая краткое рассмотрение автоматических ДНК-синтезаторов, пожалуй, стоит также вспомнить довольно старое предложение вести крупномасштабный синтез олигонуклеотидов на твердой фазе амидофосфитным методом с использованием центрифуги, в том числе проточной с зональным ротором, с проработанными схемами таких конструкций [Anderson et al., 1995].

Крупномасштабный синтез олигонуклеотидов в растворе

Около десятилетия назад сокращения в виде LPOS, а заодно и SPOS, в которых ранее под буквой `O` скрывалось слово `Organic` получили новое значение и под ними стали также подразумеваться `Liquid-Phase Oligo Synthesis` и `Solid-Phase Oligo Synthesis` соответственно [Gaffney et al., 2015], призванные четче разграничивать синтез олигонуклеотидов в растворе и на твердой фазе, имеющие свои особенности. Пока эти аббревиатуры не очень широко используются, но можно предполагать, что, по крайней мере, LPOS будет набирать популярность в силу необходимости в будущем синтеза олигонуклеотидов в гораздо больших чем сейчас количествах. Причем в LPOS сейчас используется больше фосфотриэфирный метод синтеза, хотя также наряду с фосфорамидитным применяется и *H*-фосфонатный.

Как отмечено выше, синтез олигонуклеотидов на растворимых носителях берет начало в середине 1960-х гг. и был предложен как некая альтернатива только набирающему тогда популярность твердофазному синтезу. Важен вклад отечественных ученых [Shemyakin et al., 1965], которыми такой подход был реализован для пептидного синтеза, а затем перенят Кораной [Hayatsu, Khorana, 1966], а также немецкими учеными [Cramer et al., 1966], опубликовавшими краткие сообщения, причем работа последних вышла чуть раньше – 1 июля, а Кораны – 5 июля, да и их рукописи получены редакциями с еще большим разрывом - соответственно 9 мая и 31 мая 1966 г. Но в 1967 г. Корана опубликовал уже обстоятельную статью на этот счет [Hayatsu, Khorana, 1967].

Твердофазный синтез, хотя и сильно облегчает удаление использованных реагентов, обеспечивая легкую смену этапов, он далеко не идеален в силу ряда причин, тогда как растворимые носители в момент взаимодействия реакционных групп с реагентами находятся с ними в однородном растворе, облегчающим течение процесса, то и синтез идет, по сути, количественно. Причем достаточным оказывается лишь незначительного избытка добавляемых реагентов, притом, что в SPOS требуется их огромный 20 - 50-ти кратный избыток. Так, подсчитано, что чтобы синтезировать 1 кг тиофосфатных олигонуклеотидов твердофазным методом необходимо истратить 4 тонны реагентов, растворителей, носителей [Tedebark et al., 2011], что с учетом набирающей силу «зеленой химии», в том числе в области олигонуклеотидного синтеза приветствоваться не может [Andrews et al., 2021].

В LPOS после добавления соответствующего растворителя до той поры растворимые носители перестают быть таковыми, переходя в твердую фазу и утягивая вместе с собой из раствора пришитые к ним олигонуклеотиды. Это позволяет без трудоемкой хроматографии отделять их из раствора осаждением в центрифуге. Другой подход основан на различной растворимости носителей с олигонуклеотидами и реагентов в используемых растворителях, что позволяет вести экстракцию в делительной воронке. Еще проще избавляться от отработавших свое реактивов с помощью мембранной технологии, обрезающей прохождение через поры в специальной стойкой к агрессивным жидкостям мембране веществ большего размера, коими являются как раз носители с пришитыми к ним олигонуклеотидами.

В отличие от SPOS вариантов LPOS подход позволяет его гораздо легче масштабировать, что очень важно, когда необходимо синтезировать килограммовые количества терапевтических олигонуклеотидов. А с учетом роста подобных способов лечения различных болезней и расширения спектра таковых, в том числе протекающих в тяжелой форме и не имеющих других средств излечения, потребность в еще большем количестве подобных олигонуклеотидов будет только расти и следовательно объемы их синтеза должны не отставать. В этой связи неудивителен рост числа исследований в этой области. Только за последние годы опубликованы довольно подробные обзоры, включающие описание различных растворимых носителей для синтеза олигонуклеотидов, а также содержащие детальное рассмотрение происходящих процессов при LPOS [Lönnberg, 2017; Katayama, Hirai, 2018; Molina, Sanghvi, 2019; Virta, 2025]. При этом имеются целиком посвященные синтезу олигонуклотидов в растворе с использованием растворимых носителей обзоры и прежних лет [Gravert, Janda, 1997]. Поэтому здесь коротко коснемся только некоторых работ в дополнение к тем, что уже упоминали в других разделах.

Так, среди новых носителей для LPOS следует выделить тетраподальные, у которых их коровая часть, разветвляясь, позволяет вести синтез олигонуклеотидов сразу в четырех направлениях и среди них тетракис-(р-гидроксибифенил)адамантан [Singh et al., 2012], пентаэритритил [Kungurtsev et al., 2013], а также квадруплексный гидрогель на основе модифицированного PEG [Tanaka et al., 2018]. Не так давно предложен способ стереоконтролируемого LPOS синтеза на основе неких производных хиральных молекул лимонена для синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов [Rosenqvist et al., 2023]. Совсем недавно вышла статья, в которой сообщается, что впервые удалось провести LPOS от начала до конца в едином растворителе и все время синтеза все реагенты находились в однородной среде

в растворенном виде вплоть до конечной стадии лиофилизации целевых олигонуклеотидов [Gaffney et al., 2026]. При этом синтез происходил в специальном реакторе Nanostar-10, оборудованным мембранной диафильтрацией. Ранее этими авторами уже сообщалось о таком подходе к смене реагентов в реакционном сосуде путем нанофильтрации при синтезе олигорибонуклеотидов [Gaffney et al., 2015].

Подытоживая данный раздел, можно сказать, что в плане крупномасштабного синтеза олигонуклеотидов LPOS будет несомненно активно развиваться.

Заключение

Практически вся современная биологическая и медицинская науки, а также сопряженные с ней дисциплины, включая биотехнологию, а также ДНК-криминалистику [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2024], уже довольно давно не в состоянии обходиться без синтетических олигонуклеотидов, характеризующихся как весьма разной длиной, так и всевозможными модификациями их структуры, включая все составляющие нуклеотидов: сами азотистые основания, углеводные компоненты, остатки фосфорной кислоты. Для этого, как можно видеть из вышеизложенного, химическому синтезу олигонуклеотидов за прошедшие семь десятилетий пришлось проделать гигантский путь, претерпев целый ряд эволюционных и даже революционных преобразований, в том числе даже возвращаясь к истокам, что нельзя считать регрессией (с точки зрения биологической эволюции), поскольку это обеспечивало более мощное развитие. При этом фосфодиэфирный метод все же остался в прошлом, Н-фосфонатный имеет относительно небольшой масштаб применения, фосфотриэфирный для отдельных приложений по-прежнему используется, включая крупномасштабный синтез в растворе, но наиболее распространенным является амидофосфитный.

Основные вехи химического синтеза олигонуклеотидов, если расположить их по десятилетиям, могут выглядеть так:

1955 г. – синтез первых динуклеотидов фосфотриэфирным методом
1957 г. – синтез динуклеотидов фосфонатным методом
1958 г. – фосфодиэфирный метод

1965 г. – твердофазный метод синтеза
1966 г. – жидкофазный метод синтеза на растворимых носителях
1967 г. – ренессанс фосфотриэфирного метода

1975 г. – фосфиттриэфирный метод
1977 г. – автоматический синтезатор ДНК для фосфодиэфирного метода
1980 г. – автоматический синтезатор ДНК для фосфотриэфирного метода
1981 г. – амидофосфитный метод
1983 г. – автоматический синтезатор ДНК для амидофосфитного метода

1986 г. – ренессанс *H*-фосфонатного метода
1991 г. – микрочиповый синтез олигонуклеотидов
2015 г. – мембранная технология жидкофазного синтеза олигонуклеотидов на растворимых носителях

2018 г. – стереоселективный синтез тиофосфатных олигонуклеотидов на основе ренессанса P(V) химии.

При этом нужно заметить, что добавить можно еще столько же других вех (хотя и менее весомых), но это не даст абсолютно полной картины того, что за 70 прошедших лет удалось сделать по химическому синтезу олигонуклеотидов. Хотим напомнить, что, как уже говорилось во Введении, главной задачей данной публикации было отразить разноплановые исследования в этой необъятной области.

В настоящее время все существующие способы химического синтеза олигонуклеотидов технологически можно подразделить на несколько следующих групп: твердофазный колоночный синтез, (твердофазный же) микрочиповый синтез и синтез олигонуклеотидов растворе, имеющий каждый свои предназначения. Так, колоночный синтез позволяет в зависимости от выбираемого масштаба синтеза синтезировать обычно[17] микрограммовые и миллиграммовые количества олигонуклеотидов, которых в разных моделях ДНК-синтезаторов может одновременно синтезироваться свыше полутора тысяч разных, что в принципе вполне хватает для ведения научных исследований и для проведения ДНК-диагностики в ограниченных масштабах. Микрочиповая технология рассчитана на одновременный синтез десятков и сотен тысяч и даже миллионов разных

[17] Справедливости ради следует сказать, что имеются коммерческие ДНК-синтезаторы на твердой фазе, обеспечивающие килограммовый выход олигонуклеотидов.

олигонуклеотидов, представленных каждый в пикограммовых и наногаммовых количествах, находящих применение, как в научных, так и в диагностических исследованиях. На микрочиповый синтез олигонуклеотидов по причине массового параллелизма процесса возлагаются определенные надежды для обеспечения долговременного хранения небиологической информации в молекулах ДНК. Впрочем, и колоночный синтез для этих целей (для некоторых решений) также подходит, если с его помощью формировать, например, специальные олиготеки, в том числе в виде модифицированных олигонуклеотидов [Garafutdinov et al., 2022]. Синтез олигонуклеотидов в растворе потенциально дает возможность синтезировать граммовые и даже многокилограммовые количества олигонуклеотидов, которые требуются для терапевтических целей и спрос на такие объемы будет расти с учетом внедрения в лечебную практику все большего числа разрешенных к применению подобных препаратов на основе тиофосфатных или морфолино модифицированных олигонуклеотидов [Mohammed et al., 2024]. К тому же прекращаются сроки действия патентов на ряд антисмысловых олигонуклеотидов и будет развиваться рынок дженериков.

При этом возможно даже еще больший рынок для модифицированных олигонуклеотидов откроется для их использования на практике в сельском хозяйстве в области растениеводства для борьбы с вредителями и патогенами растений и животных [Krasnodębski et al., 2023; Delavari et al., 2026]. Отечественными учеными уже на протяжении многих лет разрабатывается новый тип инсектицидов – ДНК-инсектицидов в виде, в том числе коротких олигонуклеотидов [Оберемок и др. (Oberemok et al.), 2016; Oberemok et al., 2022]. Для таких сельскохозяйственных целей количества требуемых олигонуклеотидов будут измеряться, по крайней мере, уже центнерами[18], а возможно даже и тоннами.

Таким образом, можно смело констатировать, что спрос на количества олигонуклеотидов как в плане их разнообразия, так и в весовом измерении будет неизбежно расти и конкуренция среди производителей таковых станет увеличиваться, что будет вести к снижению цен, которая должна опираться, в том числе на уменьшение себестоимости подобных синтезов, а для этого требуются новые научные изыскания, включая перспективные технологические решения.

В качестве подтверждения вышесказанного можно обратиться к многочисленным прогнозам мирового рынка олигонуклеотидов, подготовленных разными фирмами, специализирующихся в этих областях. Однако их оценки показывают большой разброс, причиной чему является то, какие аспекты и направления они брали в анализ, посему здесь будет дана некая компиляция имеющихся сведений. Причем все сходятся во мнении, что мировой рынок синтеза олигонуклеотидов будет устойчиво расти со среднегодовым темпом роста (CAGR) в пределах от 10% до 19%, но при этом стартовые и конечные величины отличаются у этих обозревателей более чем в два раза. Так, если принять во внимание весь диапазон, то получим следующие оценочные данные: с примерено 4,9 – 10,8 млрд долларов США в 2025 г. мировой рынок олигонуклеотидного синтеза достигнет 20 – 50 млрд к 2030 – 2035 гг. При этом, учитывая и разнообразный научно-исследовательский сектор и различную молекулярную диагностику, и терапевтические олигонуклеотиды, а также некоторые другие направления, никто не принимал в внимание сельскохозяйственное производство, в котором рост применения олигонуклеотидов, начинаясь фактически с нуля, может быть гигантским. А может и не быть вовсе. И тут все зависит от результатов текущих и будущих исследований.

Что касается рынка техники в виде производства олигонуклеотидных синтезаторов, то для него также прогнозируется заметный рост с CAGR от 10 до 14%, стартуя в 2025 г. в среднем с 2,3 млрд. долларов США до 5 млрд. к 2034 г. При этом сейчас в таких прогнозах учитываются лишь инструменты, основанные на твердофазном синтезе, что легко объяснимо полным отсутствием в настоящее время коммерчески производимых LPOS олигонуклеотидных синтезаторов, поскольку они еще не перешагнули уровень лабораторных разработок. Однако есть полная уверенность, что это случится в ближайшие год-два-три и потребуется внесение заметных корректировок в нынешние прогнозы.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 26.03.2026 г.
Доработана после рецензирования: 22.05.2026 г.
Принята к публикации: 27.05.2026 г.

Литература

1. Добрынин В.Н., Филиппов С.А., Быстров Н.С. и др. Катализируемый метилимидазолом быстрый синтез олигодезоксинуклеотидовфосфотриэфирным путем на силикагельном носителе в дихлорэтане. *Биоорг. химия*. 1983. 9(5). 706-710.
2. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Сахабутдинова А.Р. и др. Ферментативный синтез

[18] привычными измерениями для аграриев

олигонуклеотидов. *Biomics*. 2025. 17(4). С.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30
3. Грязнов С.М., Потапов В.К., Горн В.В. и др. Полный автоматический синтез фосфотриэфирным методом олигодезоксинуклеотидов на синтезаторе «Виктория-4М». *Биополимеры и клетка*. 1986. 2(6). 311–316.
4. Женодарова С.М., Хабарова М.И. Химические методы синтеза полинуклеотидов. *Успехи химии*. 1966. 35(7). 1265-1276.
5. Зарытова В.Ф., Потапов В.К., Шабарова З.А. и др. Синтез олиглуклеотидов на полимерных носителях. Синтез олигодезоксинуклеотидов, содержащих дезоксигуаниловую кислоту. *Доклады Академии наук СССР*. 1971. 199(5). 1072 -1074.
6. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых килсот. *Acta Naturae*. 2014. 6(4). 123-125.
7. Ломакин А.И., Попов С.Г. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. II. Использование сегментных носителей на основе целлюлозы. *Биоорган. химия*. 1985. 11(7). 927-933.
8. Ломакин А.И., Ястребов С.И., Попов С.Г. Автоматический синтез олигодезоксирибонуклеотидов. I. Исследование носителей на основе силикагеля марки «Силохром». *Биоорган. химия*. 1985. 11(7). 920-926.
9. Оберемок В.В., Лайкова Е.В., Зайцев А.С. и др. Создание ДНК-инсектицидов – новое направление в защите растений. *Защита и карантин растений*. 2026. (11). 14-16.
10. Потапов В.К., Звездина В.В., Кочеткова М.Н. и др. Препаративный синтез олигонуклеотидных блоков на высокосшитом полимерном носителе. *Доклады Академии наук СССР*. 1973. 209(2). 364–366.
11. Потапов В.К., Потемкин В.К., Горн В.В. и др. Полуавтоматический твердофазный синтез олигодезоксирибонуклеотидов. *Доклады Академии наук СССР*. 1982. 263(6). 1386–1389.
12. Потапов В.К., Туркин С.И., Вейко В.П. и др. Использование нового типа полимерного носителя в синтезе олигонуклеотидов. *Доклады Академии наук СССР. Химия*. 1978. 241(6). 1352 – 1354.
13. Потапов В.К., Чехмачева О.Г., Шабарова З.А. и др. Синтез олигонуклеотидов на полимерных носителях. Синтез дезокси-[тимидили-(3`→5`)-аденилил-(3`→5`) аденилил-(3`→5`)-аденозина. *Доклады Академии наук СССР*. 1971. 196(2). 360–363.
14. Сахабутдинова А.Р., Михайленко К.И., Гарафутдинов Р.Р. и др. «Водяные ДНК-знаки» в виде встроенных в геномы различных организмов чужеродных последовательностей ДНК и не только встроенных. *Biomics*. 2021. 13(4). 368-386. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-26
15. Синяков А.Н., Костина Е.В. Методы очистки синтетических олигонуклеотидов и исправления ошибок в синтетической ДНК. *Молекулярная Биология*. 2025. 59(4). 544–556. doi: 10.31857/S0026898425040021
16. Чемерис А.В., Аминев Ф.Г., Гарафутдинов Р.Р. и др. ДНК-криминалистика. М.: Наука. 2022. 466 С.
17. Abramova T. Frontiers and approaches to chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Molecules*. 2013. 18(1). 1063-75. doi: 10.3390/molecules18011063
18. Adams SP, Kavka KS, Wykes EJ et al. Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers. *J. Am. Chem. Soc*. 1983. 105(3). 661-663. doi: 10.1021/ja00341a078
19. Agarwal KL, Büchi H, Caruthers MH et al. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*. 1970. 227(5253). 27-34. doi: 10.1038/227027a0
20. Albert TJ, Norton J, Ott M et al. Light-directed 5`-->3` synthesis of complex oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*. 2003. 31(7). e35. doi: 10.1093/nar/gng035
21. Alekseev YI, Krynetskaya NF, Tashlytsky VN et al. Interaction of *Escherichia coli* ribonuclease H with hybrid duplexes containing 2'-deoxyxylothymidine, 2'-deoxy-2' fluorouridine or alpha-thymidine. *Nucleosides and Nucleotides*. 1996. 15(9). 1545-1558. doi: 10.1080/07328319608002453
22. Alvarado-Urbina G, Sathe GM, Liu WC et al. Automated synthesis of gene fragments. *Science*. 1981. 214(4518). 270-274. doi: 10.1126/science.6169150
23. Amarnath V, Broom AD. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chemical Reviews*. 1977. 77(2). 183–217. doi:10.1021/cr60306a002
24. Anderson NG, Anderson NL, Taylor J et al. Large-scale oligonucleotide synthesizers. I. Basic principles and system design. *Appl Biochem Biotechnol*. 1995. 54(1-3). 19-42. doi: 10.1007/BF02787909
25. Andrews BI, Antia FD, Brueggemeier SB et al. Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem*. 2021. 86(1). 49-61. doi: 10.1021/acs.joc.0c02291
26. Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1981. 22(20). 1859-1862. doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7
27. Beaucage SL, Iyer RP. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*. 1982. 48(12). 2223-2311. doi: 10.1016/S0040-4020(01)88752-4
28. Beier M, Hoheisel JD. Analysis of DNA-microarrays produced by inverse in situ oligonucleotide

synthesis. *J Biotechnol*. 2002. 94(1). 15-22. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00416-3
29. Belikova AM, Zarytova VF, Grineva NI. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett*. 1967. 37. 3557-3562. doi: 10.1016/s0040-4039(01)89794-x.
30. Benner SA. Magnetic particles as supports for organic synthesis. US Patent No 4,638,032. Jan. 20, 1987.
31. Blair S, Richmond K, Rodesch M et al. A scalable method for multiplex LED-controlled synthesis of DNA in capillaries. *Nucleic Acids Res*. 2006. 34(16). e110. doi: 10.1093/nar/gkl641
32. Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE. High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996. 11(6–7). 687-690. doi: 10.1016/0956-5663(96)83302-1
33. Bonora GM, Biancotto G, Maffini M et al. Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(5). 1213-1217. doi: 10.1093/nar/21.5.1213
34. Bonora GM, Rossin R, Zaramella S et al. A Liquid-Phase Process Suitable for Large-Scale Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *Org. Process* Res. *Dev.* 2000. 4(3). 225 – 231. doi: 10.1021/op990096l
35. Bonora GM, Scremin CL, Colonna FP et al. HELP (high efficiency liquid phase) new oligonucleotide synthesis on soluble polymeric support. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18(11). 3155-3159. doi: 10.1093/nar/18.11.3155
36. Brown D.M. A brief history of oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol*. 1993. 20. 1-17. doi: 10.1385/0-89603-281-7:1
37. Brzezinska J, Trzciński S, Strzelec J et al. From CPG to hybrid support: Review on the approaches in nucleic acids synthesis in various media. *Bioorg Chem*. 2023. 140. 106806. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106806
38. Caruthers MH. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science*. 1985. 230(4723). 281-285. doi: 10.1126/science.3863253
39. Caruthers MH. Chemical synthesis of DNA and DNA analogs. *Acc. Chem. Res*. 1991. 24(9). 278-284. doi: 10.1021/ar00009a005
40. Caruthers MH. The chemical synthesis of DNA/RNA: our gift to science. *J Biol Chem*. 2013. 288(2). 1420-1427. doi: 10.1074/jbc.X112.442855
41. Caruthers MH, Beaucage SL, Becker C et al. Deoxyoligonucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gene Amplif Anal*. 1983. 3. 1-26.
42. Catlin JC, Cramer F. Deoxy oligonucleotide synthesis via the triester method. *J. Org. Chem*. 1973. 38(2). 245–250. doi: 10.1021/jo00942a011
43. Cheng JY, Chen HH, Kao YS et al. High throughput parallel synthesis of oligonucleotides with 1536 channel synthesizer. *Nucleic Acids Res*. 2002. 30(18). e93. doi: 10.1093/nar/gnf092
44. Cook AF, Holman MJ, Nussbaum AL. Nucleoside S-alkyl phosphorothioates. III. Application to oligonucleotide synthesis. *J. Am. Chem. Soc*. 1969. 91(23). 6479–6484. doi: 10.1021/ja01051a052
45. Cramer F, Helbig R, Hettler H et al. Oligonucleotide Synthesis with a Soluble Polymer as Carrier. *Angew. Chem. Int. Edit*. 1966. 5(6). 601.
46. Crea R, Horn T. Synthesis of oligonucleotides on cellulose by a phosphotriester method. *Nucleic Acids Res*. 1980. 8(10). 2331-2348. doi: 10.1093/nar/8.10.2331
47. Crea R, Kraszewski A, Hirose T et al. Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978. 75(12). 5765-5769. doi: 10.1073/pnas.75.12.5765
48. deHaseth PL, Goldman RA, Cech CL et al. Chemical synthesis and biochemical reactivity of bacteriophage lambda PR promoter. *Nucleic Acids Res*. 1983. 11(3). 773-787. doi: 10.1093/nar/11.3.773
49. Delavari A, Keykhasaber M, Miri MA et al. Control of *Phytophthora capsici*, which causes root and stem rot, using encapsulated oligonucleotide DNA. *Sci Rep*. 2026. 16(1). 4215. doi: 10.1038/s41598-025-34330-7
50. Dellinger DJ, Betley JR, Wyrzykiewicz TK et al. Synthesis of DNA using a new two-step cycle. *Methods Mol Biol*. 2005. 288. 1-16. doi: 10.1385/1-59259-823-4:001
51. Donga RA, Hassler M, Chan TH et al. Oligonucleotide synthesis using ionic liquids as soluble supports. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007. 26(10-12). 1287-1293. doi: 10.1080/15257770701530533
52. Donga RA, Khaliq-Uz-Zaman SM, Chan TH et al. A novel approach to oligonucleotide synthesis using an imidazolium ion tag as a soluble support. *J Org Chem*. 2006. 71(20). 7907-7910. doi: 10.1021/jo061279q
53. Eckstein F, Rizk I. Synthesis of oligonucleotides by use of phosphoric triesters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 1967. 6(8). 695-697. doi: 10.1002/anie.196706951
54. Edge MD, Green AR, Heathcliffe GR et al. Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. *Nature*. 1981. 292(5825). 756-762. doi: 10.1038/292756a0
55. Efimov VA, Buryakova AA, Dubey IY et al. Application of new catalytic phosphate protecting groups for the highly efficient phosphotriester oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14(16). 6525-6540. doi: 10.1093/nar/14.16.6525
56. Efimov VA, Reverdatto SV, Chakhmakhcheva OG. New effective method for the synthesis of oligonucleotides via phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res*. 1982. 10(21). 6675-6694. doi: 10.1093/nar/10.21.6675
57. Egeland RD, Marken F, Southern EM. An Electrochemical Redox Couple Activitated by

Microelectrodes for Confined Chemical Patterning of Surfaces. *Analytical Chemistry.* 2002. 74(7). 1590-1596. doi: 10.1021/ac010953v
58. Egeland RD, Southern EM. Electrochemically directed synthesis of oligonucleotides for DNA microarray fabrication. *Nucleic Acids Res*. 2005. 33(14). e125. doi: 10.1093/nar/gni117
59. Fang S, Arneson R, Yin Y et al. De Novo Synthesis of Error-Free Long Oligos. *Curr Protoc*. 2024. 4(10). e70028. doi: 10.1002/cpz1.70028
60. Fang S, Fueangfung S. Scalable synthetic oligodeoxynucleotide purification with use of a catching by polymerization, washing, and releasing approach. *Org Lett*. 2010. 12(16). 3720-3723. doi: 10.1021/ol101316g
61. Fiers W, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XXII. Enzymic degradation. An exonuclease from lactobacillus acidophilus R26. A. Purification, properties, and substrate specificity. *J Biol Chem*. 1963. 238(8). 2780-2788. doi: 10.1016/S0021-9258(18)67897-4
62. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 1991. 251(4995). 767-773. doi: 10.1126/science.1990438
63. Frank R, Heikens W, Heisterberg-Moutsis G et al. A new general approach for the simultaneous chemical synthesis of large numbers of oligonucleotides: segmental solid supports. *Nucleic Acids Res*. 1983. 11(13). 4365-4377. doi: 10.1093/nar/11.13.4365
64. Froehler BC, Ng PG, Matteucci MD. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Res*. 1986. 14(13). 5399–5407. doi: 10.1093/nar/14.13.5399
65. Gaffney PRJ, Jarrett-Wilkins C, Yeo J et al. Fully Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Organic Process Research & Development*. 2026. 30(1). 98-120. doi: 10.1021/acs.oprd.5c00346
66. Gaffney PR, Kim JF, Valtcheva IB et al. Liquid-Phase Synthesis of 2`-Methyl-RNA on a Homostar Support through Organic-Solvent Nanofiltration. *Chemistry*. 2015. 21(26). 9535-9543. doi: 10.1002/chem.201501001
67. Gait MJ, Matthes HW, Singh M et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. VII. Solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by a continuous flow phosphotriester method on a kieselguhr-polyamide support. *Nucleic Acids Res*. 1982. 10(20). 6243-6254. doi: 10.1093/nar/10.20.6243
68. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides: a new solid-phase method. *Nucleic Acids Res*. 1977. 4(4). 1135-1158. doi: 10.1093/nar/4.4.1135
69. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. II. Machine-aided solid-phase syntheses of two nonanucleotides and an octanucleotide. *Nucleic Acids Res*. 1977. 4(12). 4391-4410. doi: 10.1093/nar/4.12.4391
70. Gait MJ, Singh M, Sheppard RC et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. IV. Improved solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides through phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res*. 1980. 8(5). 1081-1096. doi: 10.1093/nar/8.5.1081
71. Gao X, Gulari E, Zhou X. *In situ* synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers*. 2004. 73(5). 579-596. doi: 10.1002/bip.20005
72. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA. *Biosystems*. 2022. 215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
73. Garegg PJ, Lindh I, Regberg T et al. Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Letters*. 1986. 27. 4051-4054. doi: 10.1016/S0040-4039(00)84908-4
74. Giannaris PA, Damha MJ. Hybridization properties of oligoarabinonucleotides. *Can. J. Chem*. 1994. 72(3). 909-918. doi: 10.1139/v94-118
75. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 2008. 319(5867). 1215-20. doi: 10.1126/science.1151721
76. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science. 2010. 329(5987). 52-56. doi: 10.1126/science.1190719
77. Gilham PT, Khorana HG. Studies on polynucleotides. I. A new and general method for the chemical synthesis of the C5″-C3″ Internucleotidic linkage. syntheses of deoxyribo-dinucleotides[1]. *J. Am. Chem. Soc*. 1958. 80(23). 6212–6222. doi: 10.1021/ja01556a016
78. Goeddel DV, Yansura DG, Caruthers MH. Studies on gene control regions. 1. Chemical synthesis of lactose operator deoxyribonucleic acid segments. *Biochemistry*. 1977. 16(9). 1765-1772. doi: 10.1021/bi00628a001
79. Gravert DJ, Janda KD. Organic Synthesis on Soluble Polymer Supports: Liquid-Phase Methodologies. *Chem. Rev*. 1997. 97(2). 489–510. doi: 10.1021/cr9600641
80. Hall RH, Todd A, Webb RF. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *J. Chem. Soc.* 1957. 3291-3296. doi: 10.1039/JR9570003291
81. Hamada S, Murayama K, Takezawa Y et al. Omega Nucleic Acids (ΩNA), Ultimate Nucleic Acids for Future Technology. *Molecules*. 2026. 31(3). 523. doi: 10.3390/molecules31030523

82. Hayatsu H, Khorana HG. Deoxyribooligonucleotide Synthesis on a Polymeric Support. *J. Am. Chem. Soc.* 1966. 88(13). 3182–3183. doi: 10.1021/ja00965a086
83. Hayatsu H, Khorana HG. Studies on polynucleotides. LXXII. Deoxyribooligonucleotide synthesis on a polymer support. *J Am Chem Soc*. 1967. 89(15). 3880-3887. doi: 10.1021/ja00991a035
84. Heinonen P, Lönnberg H. Synthesis of phosphate-branched oligonucleotides. Bioconjug Chem. 2004 Nov-Dec;15(6):1158-60. doi: 10.1021/bc049845g
85. Hirose T, Crea R, Itakura K. Rapid synthesis of trideoxyribonucleotide blocks. *Tetrahedron Letters*. 1978. 19(28). 2449-2452. doi: 10.1016/S0040-4039(01)94797-5
86. Hogrefe RI, Midthune B, Lebedev A. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. Isr. J. Chem. 2013. 53(6-7). 326-349. doi: 10.1002/ijch.201300032
87. Hölz K, Hoi JK, Schaudy E et al. High-Efficiency Reverse (5`→3`) Synthesis of Complex DNA Microarrays. *Sci Rep.* 2018. 8(1). 15099. doi: 10.1038/s41598-018-33311-3
88. Horn T, Chang CA, Urdea MS. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. *Nucleic Acids Res*. 1997. 25(23). 4842-4849. doi: 10.1093/nar/25.23.4842
89. Huang Y, Knouse KW, Qiu S et al. A P(V) platform for oligonucleotide synthesis. *Science*. 2021. 373(6560). 1265-1270. doi: 10.1126/science.abi9727
90. Hunkapiller M, Kent S, Caruthers M et al. A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins. *Nature*. 1984. 310(5973). 105-111. doi: 10.1038/310105a0
91. Huo C, Chan TH. A novel liquid-phase strategy for organic synthesis using organic ions as soluble supports. *Chem Soc Rev.* 2010. 39(8). 2977-3006. doi: 10.1039/b914497h
92. Inagawa T, Nakashima H, Karwowski B et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model. *FEBS Lett*. 2002. 528(1-3). 48-52. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03235-0
93. Itakura K, Bahl CP, Katagiri N et al. A Modified Triester Method for the Synthesis of Deoxyribopolynucleotides. *Can. J. Chem*. 1973. 51. 3649–3651.doi:10.1139/v73-543
94. Itakura K, Katagiri N, Narang SA et al. Chemical synthesis and sequence studies of deoxyribooligonucleotides which constitute the duplex sequence of the lactose operator of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1975. 250(12). 4592-4600. doi: 10.1016/S0021-9258(19)41343-4
95. Jensen M, Roberts L, Johnson A et al. Next generation 1536-well oligonucleotide synthesizer with on-the-fly dispense. *J. Biotechnol*. 2014. 171. 76-81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.027
96. Jensen MA, Akhras MS, Fukushima M et al. Direct oligonucleotide synthesis onto super-paramagnetic beads. *J Biotechnol*. 2013. 167(4). 448-453. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.006
97. Jensen TB, Langkjaer N, Wengel J. Unlocked nucleic acid (UNA) and UNA derivatives: thermal denaturation studies. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2008. (52). 133-134. doi: 10.1093/nass/nrn068
98. Jo S, Shin H, Joe SY et al. Recent progress in DNA data storage based on high-throughput DNA synthesis. *Biomed Eng Lett.* 2024. 14(5). 993-1009. doi: 10.1007/s13534-024-00386-z
99. Kamaike K, Hasegawa Y, Ishido Y. Efficient syntheses of an oligonucleotide on a cellulose acetate derivative as a novel polymer-support using phosphotriester approach. *Tetrahedron Letters*. 1988. 29(6). 647–650. doi: 10.1016/S0040-4039(00)80172-0
100. Kaplan BE. The automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Trends in Biotechnology*. 1985. 3(10). 253-256. doi: 10.1016/0167-7799(85)90024-1
101. Kashida H, Murayama K, Toda T et al. Control of the chirality and helicity of oligomers of serinol nucleic acid (SNA) by sequence design. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011. 50(6). 1285-1288. doi: 10.1002/anie.201006498
102. Katayama S, Hirai K. Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. In: Obika S, Sekine M. (eds) Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides. Springer, Singapore. 2018. 83-95. doi: 10.1007/978-981-13-1912-9_5
103. Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI et al. A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res*. 1996. 24(19). 3748-3755. doi: 10.1093/nar/24.19.3748
104. Khorana HG. Nucleic acid synthesis. *Pure Appl. Chem.* 1968. 17. 349-381. doi: 10.1351/pac196817030349
105. Khorana HG. Total synthesis of a gene. *Science*. 1979. 203(4381). 614-625. doi: 10.1126/science.366749
106. Khorana HG, Razzell WE, Gilham PT et al. Syntheses of dideoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc*. 1957. 79(4). 1002-1003. doi: 10.1021/ja01561a065
107. Khorana HG. Todd AR. Studies on phosphorylation. Part XI. The reaction between carbodi-imides and acid esters of phosphoric acid. A new method for the preparation of pyrophosphates. *Journal of the Chemical Society*. 1953. 2257-2260. doi: 10.1039/jr9530002257

108. Kim J, Kim H, Bang D. OpenIDS2: A low-cost, 3D-printed, open-source platform for reproducible construction of DNA microarray synthesizers. *PLoS One*. 2025. 20(12). e0338478. doi: 10.1371/journal.pone.0338478
109. Kim J, Kim H, Bang D. An open-source, 3D printed inkjet DNA synthesizer. *Sci Rep*. 2024. 14(1). 3773. doi: 10.1038/s41598-024-53944-x
110. Knouse KW, deGruyter JN, Schmidt MA et al. Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science*. 2018. 361(6408). 1234-1238. doi: 10.1126/science.aau3369
111. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl J Med*. 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
112. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VI use of inorganic carriers. *Tetrahedron Letters*. 1972. 13(16). 1527-1530. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84677-3
113. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VIII use of polyethylenglycol. *Tetrahedron Letters*. 1972a. 13(16). 1534-1538. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84679-7
114. Köster H, Stumpe A, Wolter A. Polymer support oligonucleotide synthesis 13: Rapid and efficient synthesis of oligodeoxynucleotides on porous glass support using triester approach. *Tetrahedron Letters*. 1983. 24(8). 747-750. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81515-4
115. Koziołkiewicz M, Wójcik M, Kobylańska A et al. Stability of stereoregular oligo(nucleoside phosphorothioate)s in human plasma: diastereoselectivity of plasma 3'-exonuclease. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997. 7(1). 43-48. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.43
116. Kozlov IA, Dang M, Sikes K et al. Significant improvement of quality for long oligonucleotides by using controlled pore glass with large pores. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005. 24(5-7). 1037-1041. doi: 10.1081/ncn-200059761
117. Krasnodębski C, Sawuła A, Kaźmierczak U et al. Oligo-Not Only for Silencing: Overlooked Potential for Multidirectional Action in Plants. *Int J Mol Sci*. 2023. 24(5). 4466. doi: 10.3390/ijms24054466
118. Kraszewski A, Stawiński J. *H*-Phosphonates: Versatile synthetic precursors to biologically active phosphorus compounds. *Pure and Applied Chemistry*. 2007. 79(12). 2217 – 2227. doi:10.1351/pac200779122217
119. Kumar V, Gore KR, Pradeepkumar PI et al. Design, synthesis, biophysical and primer extension studies of novel acyclic butyl nucleic acid (BuNA). *Org Biomol Chem*. 2013. 11(35). 5853-5865. doi: 10.1039/c3ob41244j
120. Kungurtsev V, Laakkonen J, Molina AG et al. Solution-Phase Synthesis of Short Oligo-2′-deoxyribonucleotides by Using Clustered Nucleosides as a Soluble Support. Eur. J. Org. Chem. 2013. 6687-6693. doi: 10.1002/ejoc.201300864
121. Lashkari DA, Hunicke-Smith SP, Norgren RM et al. An automated multiplex oligonucleotide synthesizer: development of high-throughput, low-cost DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92(17). 7912-7915. doi: 10.1073/pnas.92.17.7912
122. LeProust EM, Peck BJ, Spirin K et al. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. *Nucleic Acids Res*. 2010. 38(8). 2522-2540. doi: 10.1093/nar/gkq163
123. Letsinger RL, Caruthers MH, Miller PS et al. Oligonucleotide syntheses utilizing beta-benzoylpropionyl, a blocking group with a trigger for selective cleavage. *J Am Chem Soc*. 1967. 89(26). 7146-7147. doi: 10.1021/ja01002a074
124. Letsinger RI, Finnan JL, Heavner GA et al. Letter: Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links. *J Am Chem Soc*. 1975. 97(11). 3278-3279. doi: 10.1021/ja00844a090
125. Letsinger RL, Lunsford WB. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J Am Chem Soc*. 1976. 98(12). 3655-3661. doi: 10.1021/ja00428a045
126. Letsinger RL, Mahadevan V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc*. 1965. 87(15). 3526–3527. doi: 10.1021/ja01093a058
127. Letsinger RL, Mahadevan V. Stepwise synthesis of oligodeoxyribonucleotides on an insoluble polymer support. *J Am Chem Soc*. 1966. 88(22). 5319-5324. doi: 10.1021/ja00974a053
128. Letsinger RL, Ogilvie KK. Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates. *J. Am. Chem. Soc*. 1969. 91(12). 3350–3355. doi: 0.1021/ja01040a042
129. Li H, Huang Y, Wei Z et al. An oligonucleotide synthesizer based on a microreactor chip and an inkjet printer. *Sci Rep*. 2019. 9(1). 5058. doi: 10.1038/s41598-019-41519-0
130. Liu ZC, Shin DS, Shokouhimehr M et al. Light-directed synthesis of peptide nucleic acids (PNAs) chips. *Biosens Bioelectron*. 2007. 22(12). 2891-2897. doi: 10.1016/j.bios.2006.12.005
131. Lohrmann R, Söll D, Hayatsu H et al. Studies on polynucleotides. LI. Syntheses of the 64 possible ribotrinucleotides derived from the four major ribomononucleotides. *J Am Chem Soc*. 1966. 88(4). 819-829. doi: 10.1021/ja00956a039
132. Lönnberg H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J Org Chem*. 2017. 13. 1368-1387. doi: 10.3762/bjoc.13.134

133. Lu Y. Recent advances in the stereocontrolled synthesis of antisense phosphorothioates. *Mini Rev Med Chem*. 2006. 6(3). 319-330. doi: 10.2174/138955706776073439
134. Ma Y, Zhang Z, Jia B et al. Automated high-throughput DNA synthesis and assembly. *Heliyon*. 2024. 10(6). e26967. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26967
135. Marshall WS, Caruthers MH. Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug. *Science*. 1993. 259(5101). 1564-1570. doi: 10.1126/science.7681216
136. Matteucci MD, Caruthers MH. The synthesis of oligodeoxyprimidines on a polymer support. *Tetrahedron Letters*. 1980. 21(8). 719-722. doi: 10.1016/S0040-4039(00)71455-9
137. Matteucci MD, Caruthers MH. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc*. 1981. 103(11). 3185-3191. doi: 10.1021/ja00401a041
138. Matthes HW, Zenke WM, Grundström T et al. Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale. *EMBO J.* 1984. 3(4). 801-805. doi: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb01888.x
139. McBride L.J., Caruthers M.H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Letters*. 1983. 24. 245-248. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81376-3
140. McGall G, Labadie J, Brock P et al. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. 93(24). 13555-13560. doi: 10.1073/pnas.93.24.13555
141. Michelson AM. Polynucleotides. Part IV. Synthesis of oligonucleotide analogous substituted in the sugar portion. *Journal of the Chemical Society*. 1962. 979–982. doi: 10.1039/JR9620000979
142. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3′:5′-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc*. 1955. 2632-2638. doi: 10.1039/JR9550002632
143. Miyazaki Y, Yoshida A, Okaniwa T et al. Oligonucleotide Synthesis on Porous Glass Resins Containing Activators. *Org Lett*. 2022. 24(21). 3807-3811. doi: 10.1021/acs.orglett.2c01348
144. Mohammed AA, AlShaer D, Al Musaimi O. Oligonucleotides: evolution and innovation. *Medicinal Chemistry Research*. 2024. 33. 2204–2220. doi:: 10.1007/s00044-024-03352-7
145. Molina AG, Kungurtsev V, Virta P et al. Acetylated and methylated β-cyclodextrins as viable soluble supports for the synthesis of short 2′-oligodeoxyribo-nucleotides in solution. *Molecules*. 2012. 17(10). 12102-20. doi: 10.3390/molecules171012102
146. Molina AG, Sanghvi YS. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2019. 77(1). e82. doi: 10.1002/cpnc.82
147. Narang CK, Brunfeldt K, Norris KE. Oligonucleotide synthesis on a crosslinked polyacrylmorpholide support. *Tetrahedron Letters*. 1977. 18(21). 1819-1822. doi: 10.1016/S0040-4039(01)83614-5
148. Narang SA, Brousseau R, Hsiung HM et al. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the modified triester method. *Methods Enzymol*. 1980. 65(1). 610-620. doi: 10.1016/s0076-6879(80)65063-0
149. Narang SA, Hsiung HM, Brousseau R. Improved phosphotriester method for the synthesis of gene fragments. *Methods Enzymol*. 1979. 68. 90-98. doi: 10.1016/0076-6879(79)68008-4
150. Nassir M, Gherardi L, Redman RL et al. An Improved P(V) Thio-Oligonucleotide Synthesis Platform. *Org Lett*. 2025. 27(1). 97-102. doi: 10.1021/acs.orglett.4c03980
151. Nguyen BH, Takahashi CN, Gupta G et al. Scaling DNA data storage with nanoscale electrode wells. *Sci Adv*. 2021. 7(48). eabi6714. doi: 10.1126/sciadv.abi6714
152. Nielsen P, Dreiøe LH, Wengel J. Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing acyclic nucleosides: introduction of three novel analogues and a summary. *Bioorg Med Chem*. 1995. 3(1). 19-28. doi: 10.1016/0968-0896(94)00143-q
153. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 1991. 254(5037). 1497-500. doi: 10.1126/science.1962210
154. Oberemok VV, Useinov RZ, Skorokhod OA et al. Oligonucleotide Insecticides for Green Agriculture: Regulatory Role of Contact DNA in Plant-Insect Interactions. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(24). 15681. doi: 10.3390/ijms232415681
155. Obika S, Morio K, Nanbu D et al. Synthesis and conformation of 3′-O,4′-C-methyleneribonucleosides, novel bicyclic nucleoside analogues for 2′,5′-linked oligonucleotide modification. *Chem. Commun*. 1997. (17). 1643–1644. doi: 10.1039/A704376G
156. O`Callaghan DM, Donnelly WJ. Oligonucleotide synthesis using the manual phosphotriester method. *Methods Mol Biol*. 1988. 4. 165-192. doi: 10.1385/0-89603-127-6:165
157. Ono A, Matsuda A, Zhao J et al. The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23(22). 4677-4682. doi: 10.1093/nar/23.22.4677
158. Organick L, Ang SD, Chen YJ et al. Random access in large-scale DNA data storage. *Nat. Biotechnol*. 2018. 36(3). 242-248. doi: 10.1038/nbt.4079
159. Ott J, Eckstein F. Filter disc supported oligonucleotide synthesis by the phosphite method.

Nucleic Acids Res. 1984. 12(23). 9137-9142. doi: 10.1093/nar/12.23.9137
160. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91(11). 5022-5026. doi: 10.1073/pnas.91.11.5022
161. Pon RT. Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol*. 1993. 20. 465-496. doi: 10.1385/0-89603-281-7:465
162. Pon RT. Chemical Synthesis of Oligonucleotides: From Dream to Automation. In book: Artificial DNA. Methods and Applications. Eds Khudyakov YuE, Fields HA. 2002. CRC Press. 1-80.
163. Potapov VK, Veiko VP, Koroleva ON et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides on a grafted polymer support. *Nucleic Acids Res*. 1979. 6(6). 2041-2056. doi: 10.1093/nar/6.6.2041
164. Rebimbas R, Glória I, Chegão J et al. DNA as a data storage medium. *J Biotechnol*. 2026. 414. 19-35. doi: 10.1016/j.jbiotec.2026.03.003
165. Reese CB. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org Biomol Chem*. 2005. 3(21). 3851-3868. doi: 10.1039/B510458K
166. Reese CB, Saffhill R. Oligonucleotide synthesis via phosphotriester intermediates: the phenyl-protecting group. *Chemical Comm. (London).* 1968. (13). 767-768. doi: 10.1039/C1968000076
167. Rosenqvist P, Saari V, Pajuniemi E et al. Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support. *J. Org. Chem*. 2023. 88(14). 10156–10163. doi: 10.1021/acs.joc.3c01006
168. Sabatino D, Damha MJ. Oxepane nucleic acids: synthesis, characterization, and properties of oligonucleotides bearing a seven-membered carbohydrate ring. *J Am Chem Soc*. 2007. 129(26). 8259-8270. doi: 10.1021/ja071336c
169. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
170. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
171. Schaller H, Weimann G, Lerch B et al. Studies on Polynucleotides. XXIV. The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4). Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3″ Phosphates. *J. Am. Chem. Soc*. 1963. 85(23). 3821–3827. doi: 10.1021/ja00906a021
172. Schöning K, Scholz P, Guntha S et al. Chemical etiology of nucleic acid structure: the alpha-threofuranosyl-(3'→2') oligonucleotide system. *Science*. 2000. 290(5495). 1347-1351. doi: 10.1126/science.290.5495.1347
173. Schott H. Polyvinyl Alcohol Substituted by Nucleotides as Carrier for Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1973. 12. 246-246. doi: 10.1002/anie.197302461
174. Shemyakin MM, Ovchinnikov YuA, Kinyushkin AA et al. Synthesis of peptides in solution on a polymeric support I. Synthesis of glycylglycyl-l-leucylglycine. *Tetrahedron Letters*. 1965. 6(27). 2323-2327. doi: 10.1016/S0040-4039(00)70379-0
175. Shchepinov MS, Mir KU, Elder JK et al. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res*. 1999. 27(15). 3035-3041. doi: 10.1093/nar/27.15.3035
176. Shchepinov MS, Udalova IA, Bridgman AJ et al. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(22). 4447-4454. doi: 10.1093/nar/25.22.4447
177. Shi A, Liu L, Wang F et al. A practical dinucleotide phosphoramidite chemistry for de novo DNA synthesis via block coupling. *Tetrahedron Letters*. 2024. 142. 155106. doi: 10.1016/j.tetlet.2024.155106
178. Sierzchala AB, Dellinger DJ, Betley JR et al. Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: a two-step cycle using peroxy anion deprotection. *J Am Chem Soc*. 2003. 125(44). 13427-13441. doi: 10.1021/ja030376n
179. Singh A, Tolev M, Schilling CI et al. Solution-Phase Synthesis of Branched DNA Hybrids via H-Phosphonate Dimers. *J. Org. Chem*. 2012. 77(6). 2718–2728. doi: 10.1021/jo202508n
180. Singh SK, Koshkin AA, Wengel J et al. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem.Commun*. 1998. (4). 455 - 456. doi: 10.1039/a708608c
181. Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y et al. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol*. 1999. 17(10). 974-978. doi: 10.1038/13664
182. Sinha ND, Biernat J, McManus J et al. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res*. 1984. 12(11). 4539-4557. doi: 10.1093/nar/12.11.4539
183. Sondek J, Shortle D. A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89(8). 3581-3585. doi: 10.1073/pnas.89.8.3581
184. Stec WJ, Zon G, Egan W. Automated solid-phase synthesis, separation, and stereochemistry of phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides.

J. Am. Chem. Soc. 1984. 106. 6077 – 6079. doi: 10.1021/ja00332a054
185. Steffens R, Leumann CJ. Synthesis and thermodynamic and biophysical properties ofTricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1999. 121(14). 3249 – 3255.doi: 10.1021/ja983570w
186. Stirchak EP, Summerton JE, Weller DD. Uncharged stereoregular nucleic acid analogs: 2. Morpholino nucleoside oligomers with carbamate internucleoside linkages. Nucleic Acids Res. 1989 Aug 11;17(15):6129-41. doi: 10.1093/nar/17.15.6129
187. Talap J, Zhao J, Shen M et al. Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021. 206. 114368. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114368.
188. Tanaka T., Letsinger R.L. Syringe method for stepwise chemical synthesis of oligonucleotides. Nucleic Acids Research. 1982. V. 10(10). P. 3249–3260. doi: 10.1093/nar/10.10.3249
189. Tanaka S, Yukami S, Fukushima K et al. Bulk pH-Responsive DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase, Large-Scale DNA Synthesis. *ACS Macro Lett.* 2018. 7(3). 295-299. doi: 10.1021/acsmacrolett.8b00063
190. Tedebark U, Scozzari A, Werbitzky O et al. Industrial-scale manufacturing of a possible oligonucleotide cargo CPP-based drug. *Methods Mol Biol*. 2011. 683. 505-524. doi: 10.1007/978-1-60761-919-2_36
191. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol*. 1992. 1(1). 58-72. doi: 10.1097/00019606-199203000-00008
192. Tian J, Gong H, Sheng N et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature*. 2004. 432(7020). 1050-1054. doi: 10.1038/nature03151
193. Trzciński S, Brzezinska J, Waligórski K et al. Hybrid Supports for Oligonucleotide Synthesis: Controlled Pore Glass Derivatives with Branched Amine-Ended Polyether or Polyimine. *Chemistry*. 2024. 30(69). e202403086. doi: 10.1002/chem.202403086
194. Urata H, Ogura E, Shinohara K et al. Synthesis and properties of mirror-image DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(13). 3325-3332. doi: 10.1093/nar/20.13.3325
195. Van Aerschot A, Verheggen I, Hendrix C et al. 1,5-Anhydrohexitol nucleic acids, a new promising antisense construct. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995. 34. 1338-1339. doi: 10.1002/anie.199513381
196. Virnekäs B, Ge L, Plückthun A et al. Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res*. 1994. 22(25). 5600-5607. doi: 10.1093/nar/22.25.5600
197. Virta P. From liquid-phase synthesis to chemical ligation: preparation of oligonucleotides and their backbone analogs in solution. *Nucleic Acids Res*. 2025. 53(20). gkaf1084. doi: 10.1093/nar/gkaf1084
198. Wagner T, Pfleiderer W. Synthesis of 2`-deoxyribonucleoside 5`-phosphoramidites: New building blocks for the inverse (5`-3`)-oligonucleotide approach. *Helvetica Chimica Acta*. 2000. 83(8). 2023-2035. doi: 10.1002/1522-2675(20000809)83:8<2023::AID-HLCA2023>3.0.CO;2-P
199. Wang J, Verbeure B, Luyten I et al. Cyclohexene Nucleic Acids (CeNA): Serum Stable Oligonucleotides that Activate RNase H and Increase Duplex Stability with Complementary RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2000.122(36). 8595–8602. doi: 10.1021/ja000018+
200. Warner BD, Warner ME, Karns GA et al. Construction and evaluation of an instrument for the automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *DNA*. 1984. 3(5). 401-411. doi: 10.1089/dna.1984.3.401
201. Weimann G, Khorana HG. Studies on Polynucleotides. XIII.1 Stepwise Synthesis of Deoxyribo-oligonucleotides. An Alternative General Approach and the Synthesis of Thymidine Di-, Tri- and Tetranucleotides Bearing 3″-Phosphomonoester End Groups[2]. *J. Am. Chem. Soc*. 1962. 84(3). 419–430. doi: 10.1021/ja00862a022
202. White H.A. Manual oligonucleotide synthesis using the phosphoramidite method. *New Nucleic Acid Techniques* 1988. 4. 193-213. doi: 10.1385/0-89603-127-6:193
203. Willems PJ. Primer availability. *Nature*. 1989. 337. 10. DOI: 10.1038/337010b0
204. Yakovleva KI, Pereverzev IM, Kechin AA et al. The Influence of the Capping Step During Solid-Phase Phosphoramidite Synthesis of Oligonucleotides on Synthetic Errors in Oligonucleotides. *Molecules*. 2025. 31(1). 94. doi: 10.3390/molecules31010094
205. Yin Y, Arneson R, Apostle A et al. Long oligodeoxynucleotides: chemical synthesis, isolation via catching-by-polymerization, verification via sequencing, and gene expression demonstration. *Beilstein J Org Chem*. 2023. 19. 1957-1965. doi: 10.3762/bjoc.19.146
206. Yin Y, Arneson R, Yuan Y et al. Long oligos: direct chemical synthesis of genes with up to 1728 nucleotides. *Chem Sci*. 2024. 16(4). 1966-1973. doi: 10.1039/d4sc06958g
207. Yu M, Tang X, Li Z et al. High-throughput DNA synthesis for data storage. *Chem Soc Rev*. 2024. 53(9). 4463-4489. doi: 10.1039/d3cs00469d
208. Zaramella S, Bonora GM. The Application of H-Phosphonate Chemistry in the HELP Synthesis of Oligonucleotides. *Nucleosides and Nucleotides*. 1995. 14(3–5). 809–812. doi: 10.1080/15257779508012477
209. Zhang L, Peritz A, Meggers E. A simple glycol nucleic acid. *J Am Chem Soc*. 2005. 127(12). 4174-4175. doi: 10.1021/ja042564z

210. Zhdanov RI, Zhenodarova SM. Chemical Methods of Oligonucleotide Synthesis. Synthesis. 1975. 4. 222-245. doi: 10.1055/s-1975-23714

References

1. Abramova T. Frontiers and approaches to chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Molecules*. 2013. 18(1). 1063-75. doi: 10.3390/molecules18011063
2. Adams SP, Kavka KS, Wykes EJ et al. Hindered dialkylamino nucleoside phosphite reagents in the synthesis of two DNA 51-mers. *J. Am. Chem. Soc*. 1983. 105(3). 661-663. doi: 10.1021/ja00341a078
3. Agarwal KL, Büchi H, Caruthers MH et al. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*. 1970. 227(5253). 27-34. doi: 10.1038/227027a0
4. Albert TJ, Norton J, Ott M et al. Light-directed 5`-->3` synthesis of complex oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*. 2003. 31(7). e35. doi: 10.1093/nar/gng035
5. Alekseev YI, Krynetskaya NF, Tashlytsky VN et al. Interaction of *Escherichia coli* ribonuclease H with hybrid duplexes containing 2'-deoxyxylothymidine, 2'-deoxy-2' fluorouridine or alpha-thymidine. *Nucleosides and Nucleotides*. 1996. 15(9). 1545-1558. doi: 10.1080/07328319608002453
6. Alvarado-Urbina G, Sathe GM, Liu WC et al. Automated synthesis of gene fragments. *Science*. 1981. 214(4518). 270-274. doi: 10.1126/science.6169150
7. Amarnath V, Broom AD. Chemical synthesis of oligonucleotides. *Chemical Reviews*. 1977. 77(2). 183–217. doi:10.1021/cr60306a002
8. Anderson NG, Anderson NL, Taylor J et al. Large-scale oligonucleotide synthesizers. I. Basic principles and system design. *Appl Biochem Biotechnol*. 1995. 54(1-3). 19-42. doi: 10.1007/BF02787909
9. Andrews BI, Antia FD, Brueggemeier SB et al. Sustainability Challenges and Opportunities in Oligonucleotide Manufacturing. *J. Org. Chem*. 2021. 86(1). 49-61. doi: 10.1021/acs.joc.0c02291
10. Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Letters*. 1981. 22(20). 1859-1862. doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7
11. Beaucage SL, Iyer RP. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*. 1982. 48(12). 2223-2311. doi: 10.1016/S0040-4020(01)88752-4
12. Beier M, Hoheisel JD. Analysis of DNA-microarrays produced by inverse in situ oligonucleotide synthesis. *J Biotechnol*. 2002. 94(1). 15-22. doi: 10.1016/s0168-1656(01)00416-3
13. Belikova AM, Zarytova VF, Grineva NI. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett*. 1967. 37. 3557-3562. doi: 10.1016/s0040-4039(01)89794-x.
14. Benner SA. Magnetic particles as supports for organic synthesis. US Patent No 4,638,032. Jan. 20, 1987.
15. Blair S, Richmond K, Rodesch M et al. A scalable method for multiplex LED-controlled synthesis of DNA in capillaries. *Nucleic Acids Res*. 2006. 34(16). e110. doi: 10.1093/nar/gkl641
16. Blanchard AP, Kaiser RJ, Hood LE. High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996. 11(6–7). 687-690. doi: 10.1016/0956-5663(96)83302-1
17. Bonora GM, Biancotto G, Maffini M et al. Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleic Acids Res*. 1993. 21(5). 1213-1217. doi: 10.1093/nar/21.5.1213
18. Bonora GM, Rossin R, Zaramella S et al. A Liquid-Phase Process Suitable for Large-Scale Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *Org. Process* Res. *Dev.* 2000. 4(3). 225 – 231. doi: 10.1021/op990096l
19. Bonora GM, Scremin CL, Colonna FP et al. HELP (high efficiency liquid phase) new oligonucleotide synthesis on soluble polymeric support. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18(11). 3155-3159. doi: 10.1093/nar/18.11.3155
20. Brown D.M. A brief history of oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol*. 1993. 20. 1-17. doi: 10.1385/0-89603-281-7:1
21. Brzezinska J, Trzciński S, Strzelec J et al. From CPG to hybrid support: Review on the approaches in nucleic acids synthesis in various media. *Bioorg Chem*. 2023. 140. 106806. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106806
22. Caruthers MH. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science*. 1985. 230(4723). 281-285. doi: 10.1126/science.3863253
23. Caruthers MH. Chemical synthesis of DNA and DNA analogs. *Acc. Chem. Res*. 1991. 24(9). 278-284. doi: 10.1021/ar00009a005
24. Caruthers MH. The chemical synthesis of DNA/RNA: our gift to science. *J Biol Chem*. 2013. 288(2). 1420-1427. doi: 10.1074/jbc.X112.442855
25. Caruthers MH, Beaucage SL, Becker C et al. Deoxyoligonucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gene Amplif Anal*. 1983. 3. 1-26.
26. Catlin JC, Cramer F. Deoxy oligonucleotide synthesis via the triester method. *J. Org. Chem*. 1973. 38(2). 245–250. doi: 10.1021/jo00942a011
27. Chemeris AV, Aminev FG, Garafutdinov RR et al. DNA criminalistics. M.: Nauka. 2024. 466 S. (In Russian)
28. Cheng JY, Chen HH, Kao YS et al. High throughput parallel synthesis of oligonucleotides with

1536 channel synthesizer. *Nucleic Acids Res*. 2002. 30(18). e93. doi: 10.1093/nar/gnf092
29. Cook AF, Holman MJ, Nussbaum AL. Nucleoside S-alkyl phosphorothioates. III. Application to oligonucleotide synthesis. *J. Am. Chem. Soc*. 1969. 91(23). 6479–6484. doi: 10.1021/ja01051a052
30. Cramer F, Helbig R, Hettler H et al. Oligonucleotide Synthesis with a Soluble Polymer as Carrier. *Angew. Chem. Int*. *Edit*. 1966. 5(6). 601.
31. Crea R, Horn T. Synthesis of oligonucleotides on cellulose by a phosphotriester method. *Nucleic Acids Res*. 1980. 8(10). 2331-2348. doi: 10.1093/nar/8.10.2331
32. Crea R, Kraszewski A, Hirose T et al. Chemical synthesis of genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978. 75(12). 5765-5769. doi: 10.1073/pnas.75.12.5765
33. deHaseth PL, Goldman RA, Cech CL et al. Chemical synthesis and biochemical reactivity of bacteriophage lambda PR promoter. *Nucleic Acids Res*. 1983. 11(3). 773-787. doi: 10.1093/nar/11.3.773
34. Delavari A, Keykhasaber M, Miri MA et al. Control of *Phytophthora capsici*, which causes root and stem rot, using encapsulated oligonucleotide DNA. *Sci Rep*. 2026. 16(1). 4215. doi: 10.1038/s41598-025-34330-7
35. Dellinger DJ, Betley JR, Wyrzykiewicz TK et al. Synthesis of DNA using a new two-step cycle. *Methods Mol Biol*. 2005. 288. 1-16. doi: 10.1385/1-59259-823-4:001
36. Dobrynin VN, Filippov SA, Bystrov NS et al. Methylimidazole-catalyzed rapid synthesis of oligodeoxynucleotides by the phosphotriester pathway on a silica gel carrier in dichloroethane. *Bioorg. Chemistry (Moscow)*. 1983. 9(5). 706-710.
37. Donga RA, Hassler M, Chan TH et al. Oligonucleotide synthesis using ionic liquids as soluble supports. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007. 26(10-12). 1287-1293. doi: 10.1080/15257770701530533
38. Donga RA, Khaliq-Uz-Zaman SM, Chan TH et al. A novel approach to oligonucleotide synthesis using an imidazolium ion tag as a soluble support. *J Org Chem*. 2006. 71(20). 7907-7910. doi: 10.1021/jo061279q
39. Eckstein F, Rizk I. Synthesis of oligonucleotides by use of phosphoric triesters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 1967. 6(8). 695-697. doi: 10.1002/anie.196706951
40. Edge MD, Green AR, Heathcliffe GR et al. Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. *Nature*. 1981. 292(5825). 756-762. doi: 10.1038/292756a0
41. Efimov VA, Buryakova AA, Dubey IY et al. Application of new catalytic phosphate protecting groups for the highly efficient phosphotriester oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1986. 14(16). 6525-6540. doi: 10.1093/nar/14.16.6525
42. Efimov VA, Reverdatto SV, Chakhmakhcheva OG. New effective method for the synthesis of oligonucleotides via phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res*. 1982. 10(21). 6675-6694. doi: 10.1093/nar/10.21.6675
43. Egeland RD, Marken F, Southern EM. An Electrochemical Redox Couple Activitated by Microelectrodes for Confined Chemical Patterning of Surfaces. *Analytical Chemistry.* 2002. 74(7). 1590-1596. doi: 10.1021/ac010953v
44. Egeland RD, Southern EM. Electrochemically directed synthesis of oligonucleotides for DNA microarray fabrication. *Nucleic Acids Res*. 2005. 33(14). e125. doi: 10.1093/nar/gni117
45. Fang S, Arneson R, Yin Y et al. De Novo Synthesis of Error-Free Long Oligos. *Curr Protoc*. 2024. 4(10). e70028. doi: 10.1002/cpz1.70028
46. Fang S, Fueangfung S. Scalable synthetic oligodeoxynucleotide purification with use of a catching by polymerization, washing, and releasing approach. *Org Lett*. 2010. 12(16). 3720-3723. doi: 10.1021/ol101316g
47. Fiers W, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XXII. Enzymic degradation. An exonuclease from lactobacillus acidophilus R26. A. Purification, properties, and substrate specificity. *J Biol Chem*. 1963. 238(8). 2780-2788. doi: 10.1016/S0021-9258(18)67897-4
48. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 1991. 251(4995). 767-773. doi: 10.1126/science.1990438
49. Frank R, Heikens W, Heisterberg-Moutsis G et al. A new general approach for the simultaneous chemical synthesis of large numbers of oligonucleotides: segmental solid supports. *Nucleic Acids Res*. 1983. 11(13). 4365-4377. doi: 10.1093/nar/11.13.4365
50. Froehler BC, Ng PG, Matteucci MD. Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Res*. 1986. 14(13). 5399–5407. doi: 10.1093/nar/14.13.5399
51. Gaffney PRJ, Jarrett-Wilkins C, Yeo J et al. Fully Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Organic Process Research & Development*. 2026. 30(1). 98-120. doi: 10.1021/acs.oprd.5c00346
52. Gaffney PR, Kim JF, Valtcheva IB et al. Liquid-Phase Synthesis of 2`-Methyl-RNA on a Homostar Support through Organic-Solvent Nanofiltration. *Chemistry*. 2015. 21(26). 9535-9543. doi: 10.1002/chem.201501001
53. Gait MJ, Matthes HW, Singh M et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. VII. Solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by a continuous flow phosphotriester method on a kieselguhr-polyamide support. *Nucleic Acids Res*. 1982. 10(20). 6243-6254. doi: 10.1093/nar/10.20.6243
54. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides: a new solid-phase method.

Nucleic Acids Res. 1977. 4(4). 1135-1158. doi: 10.1093/nar/4.4.1135
55. Gait MJ, Sheppard RC. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. II. Machine-aided solid-phase syntheses of two nonanucleotides and an octanucleotide. *Nucleic Acids Res*. 1977. 4(12). 4391-4410. doi: 10.1093/nar/4.12.4391
56. Gait MJ, Singh M, Sheppard RC et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. IV. Improved solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides through phosphotriester intermediates. *Nucleic Acids Res*. 1980. 8(5). 1081-1096. doi: 10.1093/nar/8.5.1081
57. Gao X, Gulari E, Zhou X. *In situ* synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers*. 2004. 73(5). 579-596. doi: 10.1002/bip.20005
58. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA. *Biosystems*. 2022. 215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
59. Garafutdinov RR, Nikonorov YuM, Sakhabutdinova AR et al. Enzymatic synthesis of oligonucleotides. *Biomics*. 2025. 17(4). P.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30 (In Russian)
60. Garegg PJ, Lindh I, Regberg T et al. Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Letters*. 1986. 27. 4051-4054. doi: 10.1016/S0040-4039(00)84908-4
61. Giannaris PA, Damha MJ. Hybridization properties of oligoarabinonucleotides. *Can. J. Chem*. 1994. 72(3). 909-918. doi: 10.1139/v94-118
62. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 2008. 319(5867). 1215-20. doi: 10.1126/science.1151721
63. Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. Science. 2010. 329(5987). 52-56. doi: 10.1126/science.1190719
64. Gilham PT, Khorana HG. Studies on polynucleotides. I. A new and general method for the chemical synthesis of the C5″-C3″ Internucleotidic linkage. syntheses of deoxyribo-dinucleotides[1]. *J. Am. Chem. Soc*. 1958. 80(23). 6212–6222. doi: 10.1021/ja01556a016
65. Goeddel DV, Yansura DG, Caruthers MH. Studies on gene control regions. 1. Chemical synthesis of lactose operator deoxyribonucleic acid segments. *Biochemistry*. 1977. 16(9). 1765-1772. doi: 10.1021/bi00628a001
66. Gravert DJ, Janda KD. Organic Synthesis on Soluble Polymer Supports: Liquid-Phase Methodologies. *Chem. Rev*. 1997. 97(2). 489–510. doi: 10.1021/cr960064l
67. Gryaznov SM, Potapov VK, Gorn VV et al. The all-machine synthesis of oligodeoxyribonucleotides by phosphotriester approach using automatic synthesizer «Victory-4M». *Biopolymers and Cell*. 1986. 2(6). 311-316. doi: 10.7124/BC.0001C9
68. Hall RH, Todd A, Webb RF. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *J. Chem. Soc.* 1957. 3291-3296. doi: 10.1039/JR9570003291
69. Hamada S, Murayama K, Takezawa Y et al. Omega Nucleic Acids (ΩNA), Ultimate Nucleic Acids for Future Technology. *Molecules*. 2026. 31(3). 523. doi: 10.3390/molecules31030523
70. Hayatsu H, Khorana HG. Deoxyribooligonucleotide Synthesis on a Polymeric Support. *J. Am. Chem. Soc.* 1966. 88(13). 3182–3183. doi: 10.1021/ja00965a086
71. Hayatsu H, Khorana HG. Studies on polynucleotides. LXXII. Deoxyribooligonucleotide synthesis on a polymer support. *J Am Chem Soc*. 1967. 89(15). 3880-3887. doi: 10.1021/ja00991a035
72. Heinonen P, Lönnberg H. Synthesis of phosphate-branched oligonucleotides. Bioconjug Chem. 2004 Nov-Dec;15(6):1158-60. doi: 10.1021/bc049845g
73. Hirose T, Crea R, Itakura K. Rapid synthesis of trideoxyribonucleotide blocks. *Tetrahedron Letters*. 1978. 19(28). 2449-2452. doi: 10.1016/S0040-4039(01)94797-5
74. Hogrefe RI, Midthune B, Lebedev A. Current Challenges in Nucleic Acid Synthesis. Isr. J. Chem. 2013. 53(6-7). 326-349. doi: 10.1002/ijch.201300032
75. Hölz K, Hoi JK, Schaudy E et al. High-Efficiency Reverse (5`→3`) Synthesis of Complex DNA Microarrays. *Sci Rep.* 2018. 8(1). 15099. doi: 10.1038/s41598-018-33311-3
76. Horn T, Chang CA, Urdea MS. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays. *Nucleic Acids Res*. 1997. 25(23). 4842-4849. doi: 10.1093/nar/25.23.4842
77. Huang Y, Knouse KW, Qiu S et al. A P(V) platform for oligonucleotide synthesis. *Science*. 2021. 373(6560). 1265-1270. doi: 10.1126/science.abi9727
78. Hunkapiller M, Kent S, Caruthers M et al. A microchemical facility for the analysis and synthesis of genes and proteins. *Nature*. 1984. 310(5973). 105-111. doi: 10.1038/310105a0
79. Huo C, Chan TH. A novel liquid-phase strategy for organic synthesis using organic ions as soluble supports. *Chem Soc Rev.* 2010. 39(8). 2977-3006. doi: 10.1039/b914497h
80. Inagawa T, Nakashima H, Karwowski B et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model. *FEBS*

Lett. 2002. 528(1-3). 48-52. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03235-0
81. Itakura K, Bahl CP, Katagiri N et al. A Modified Triester Method for the Synthesis of Deoxyribopolynucleotides. *Can. J. Chem*. 1973. 51. 3649–3651.doi:10.1139/v73-543
82. Itakura K, Katagiri N, Narang SA et al. Chemical synthesis and sequence studies of deoxyribooligonucleotides which constitute the duplex sequence of the lactose operator of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 1975. 250(12). 4592-4600. doi: 10.1016/S0021-9258(19)41343-4
83. Jensen M, Roberts L, Johnson A et al. Next generation 1536-well oligonucleotide synthesizer with on-the-fly dispense. *J. Biotechnol*. 2014. 171. 76-81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.11.027
84. Jensen MA, Akhras MS, Fukushima M et al. Direct oligonucleotide synthesis onto super-paramagnetic beads. *J Biotechnol*. 2013. 167(4). 448-453. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.006
85. Jensen TB, Langkjaer N, Wengel J. Unlocked nucleic acid (UNA) and UNA derivatives: thermal denaturation studies. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2008. (52). 133-134. doi: 10.1093/nass/nrn068
86. Jo S, Shin H, Joe SY et al. Recent progress in DNA data storage based on high-throughput DNA synthesis. *Biomed Eng Lett.* 2024. 14(5). 993-1009. doi: 10.1007/s13534-024-00386-z
87. Kamaike K, Hasegawa Y, Ishido Y. Efficient syntheses of an oligonucleotide on a cellulose acetate derivative as a novel polymer-support using phosphotriester approach. *Tetrahedron Letters*. 1988. 29(6). 647–650. doi: 10.1016/S0040-4039(00)80172-0
88. Kaplan BE. The automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Trends in Biotechnology*. 1985. 3(10). 253-256. doi: 10.1016/0167-7799(85)90024-1
89. Kashida H, Murayama K, Toda T et al. Control of the chirality and helicity of oligomers of serinol nucleic acid (SNA) by sequence design. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011. 50(6). 1285-1288. doi: 10.1002/anie.201006498
90. Katayama S, Hirai K. Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. In: Obika S, Sekine M. (eds) Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides. Springer, Singapore. 2018. 83-95. doi: 10.1007/978-981-13-1912-9_5
91. Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI et al. A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res*. 1996. 24(19). 3748-3755. doi: 10.1093/nar/24.19.3748
92. Khorana HG. Nucleic acid synthesis. *Pure Appl. Chem.* 1968. 17. 349-381. doi: 10.1351/pac196817030349
93. Khorana HG. Total synthesis of a gene. *Science*. 1979. 203(4381). 614-625. doi: 10.1126/science.366749
94. Khorana HG, Razzell WE, Gilham PT et al. Syntheses of dideoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc*. 1957. 79(4). 1002-1003. doi: 10.1021/ja01561a065
95. Khorana HG. Todd AR. Studies on phosphorylation. Part XI. The reaction between carbodi-imides and acid esters of phosphoric acid. A new method for the preparation of pyrophosphates. *Journal of the Chemical Society*. 1953. 2257-2260. doi: 10.1039/jr9530002257
96. Kim J, Kim H, Bang D. OpenIDS2: A low-cost, 3D-printed, open-source platform for reproducible construction of DNA microarray synthesizers. *PLoS One*. 2025. 20(12). e0338478. doi: 10.1371/journal.pone.0338478
97. Kim J, Kim H, Bang D. An open-source, 3D printed inkjet DNA synthesizer. *Sci Rep*. 2024. 14(1). 3773. doi: 10.1038/s41598-024-53944-x
98. Knouse KW, deGruyter JN, Schmidt MA et al. Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science*. 2018. 361(6408). 1234-1238. doi: 10.1126/science.aau3369
99. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *New Engl J Med*. 1987. 317(16). 985-990. doi: 10.1056/NEJM198710153171603
100. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VI use of inorganic carriers. *Tetrahedron Letters*. 1972. 13(16). 1527-1530. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84677-3
101. Köster H. Polymer support oligonucleotide synthesis VIII use of polyethylenglycol. *Tetrahedron Letters*. 1972a. 13(16). 1534-1538. doi: 10.1016/S0040-4039(01)84679-7
102. Köster H, Stumpe A, Wolter A. Polymer support oligonucleotide synthesis 13: Rapid and efficient synthesis of oligodeoxynucleotides on porous glass support using triester approach. *Tetrahedron Letters*. 1983. 24(8). 747-750. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81515-4
103. Koziołkiewicz M, Wójcik M, Kobylańska A et al. Stability of stereoregular oligo(nucleoside phosphorothioate)s in human plasma: diastereoselectivity of plasma 3'-exonuclease. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1997. 7(1). 43-48. doi: 10.1089/oli.1.1997.7.43
104. Kozlov IA, Dang M, Sikes K et al. Significant improvement of quality for long oligonucleotides by using controlled pore glass with large pores. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005. 24(5-7). 1037-1041. doi: 10.1081/ncn-200059761
105. Krasnodębski C, Sawuła A, Kaźmierczak U et al. Oligo-Not Only for Silencing: Overlooked Potential for

Multidirectional Action in Plants. *Int J Mol Sci*. 2023. 24(5). 4466. doi: 10.3390/ijms24054466
106. Kraszewski A, Stawiński J. *H*-Phosphonates: Versatile synthetic precursors to biologically active phosphorus compounds. *Pure and Applied Chemistry*. 2007. 79(12). 2217 – 2227. doi:10.1351/pac200779122217
107. Kumar V, Gore KR, Pradeepkumar PI et al. Design, synthesis, biophysical and primer extension studies of novel acyclic butyl nucleic acid (BuNA). *Org Biomol Chem*. 2013. 11(35). 5853-5865. doi: 10.1039/c3ob41244j
108. Kungurtsev V, Laakkonen J, Molina AG et al. Solution-Phase Synthesis of Short Oligo-2′-deoxyribonucleotides by Using Clustered Nucleosides as a Soluble Support. Eur. J. Org. Chem. 2013. 6687-6693. doi: 10.1002/ejoc.201300864
109. Kupryushkin MS, Pyshnyi DV, Stetsenko DA. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues. Acta Naturae. 2014 Oct;6(4):116-8.
110. Lashkari DA, Hunicke-Smith SP, Norgren RM et al. An automated multiplex oligonucleotide synthesizer: development of high-throughput, low-cost DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92(17). 7912-7915. doi: 10.1073/pnas.92.17.7912
111. LeProust EM, Peck BJ, Spirin K et al. Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process. *Nucleic Acids Res*. 2010. 38(8). 2522-2540. doi: 10.1093/nar/gkq163
112. Letsinger RL, Caruthers MH, Miller PS et al. Oligonucleotide syntheses utilizing beta-benzoylpropionyl, a blocking group with a trigger for selective cleavage. *J Am Chem Soc*. 1967. 89(26). 7146-7147. doi: 10.1021/ja01002a074
113. Letsinger RI, Finnan JL, Heavner GA et al. Letter: Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links. *J Am Chem Soc*. 1975. 97(11). 3278-3279. doi: 10.1021/ja00844a090
114. Letsinger RL, Lunsford WB. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J Am Chem Soc*. 1976. 98(12). 3655-3661. doi: 10.1021/ja00428a045
115. Letsinger RL, Mahadevan V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc*. 1965. 87(15). 3526–3527. doi: 10.1021/ja01093a058
116. Letsinger RL, Mahadevan V. Stepwise synthesis of oligodeoxyribonucleotides on an insoluble polymer support. *J Am Chem Soc*. 1966. 88(22). 5319-5324. doi: 10.1021/ja00974a053
117. Letsinger RL, Ogilvie KK. Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates. *J. Am. Chem. Soc*. 1969. 91(12). 3350–3355. doi: 0.1021/ja01040a042
118. Li H, Huang Y, Wei Z et al. An oligonucleotide synthesizer based on a microreactor chip and an inkjet printer. *Sci Rep*. 2019. 9(1). 5058. doi: 10.1038/s41598-019-41519-0
119. Liu ZC, Shin DS, Shokouhimehr M et al. Light-directed synthesis of peptide nucleic acids (PNAs) chips. *Biosens Bioelectron*. 2007. 22(12). 2891-2897. doi: 10.1016/j.bios.2006.12.005
120. Lohrmann R, Söll D, Hayatsu H et al. Studies on polynucleotides. LI. Syntheses of the 64 possible ribotrinucleotides derived from the four major ribomononucleotides. *J Am Chem Soc*. 1966. 88(4). 819-829. doi: 10.1021/ja00956a039
121. Lomakin AI, Popov SG. Automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. II. Use of segmental solid supports based on a cellulose. *Bioorg. Chem*. (Moscow). 1985. 11(7). 927-933.
122. Lomakin AI, Yastrebov SI, Popov SG. Automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. I. A study of solid supports based on silica gel “Silochrom”. *Bioorg. Chem. (Moscow)*. 1985. 11(7). 920-926.
123. Lönnberg H. Synthesis of oligonucleotides on a soluble support. *Beilstein J Org Chem*. 2017. 13. 1368-1387. doi: 10.3762/bjoc.13.134
124. Lu Y. Recent advances in the stereocontrolled synthesis of antisense phosphorothioates. *Mini Rev Med Chem*. 2006. 6(3). 319-330. doi: 10.2174/138955706776073439
125. Ma Y, Zhang Z, Jia B et al. Automated high-throughput DNA synthesis and assembly. *Heliyon*. 2024. 10(6). e26967. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e26967
126. Marshall WS, Caruthers MH. Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug. *Science*. 1993. 259(5101). 1564-1570. doi: 10.1126/science.7681216
127. Matteucci MD, Caruthers MH. The synthesis of oligodeoxyprimidines on a polymer support. *Tetrahedron Letters*. 1980. 21(8). 719-722. doi: 10.1016/S0040-4039(00)71455-9
128. Matteucci MD, Caruthers MH. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc*. 1981. 103(11). 3185-3191. doi: 10.1021/ja00401a041
129. Matthes HW, Zenke WM, Grundström T et al. Simultaneous rapid chemical synthesis of over one hundred oligonucleotides on a microscale. *EMBO J*. 1984. 3(4). 801-805. doi: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb01888.x
130. McBride L.J., Caruthers M.H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Letters*. 1983. 24. 245-248. doi: 10.1016/S0040-4039(00)81376-3
131. McGall G, Labadie J, Brock P et al. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. 93(24). 13555-13560. doi: 10.1073/pnas.93.24.13555

132. Michelson AM. Polynucleotides. Part IV. Synthesis of oligonucleotide analogous substituted in the sugar portion. *Journal of the Chemical Society*. 1962. 979–982. doi: 10.1039/JR9620000979
133. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3′:5′-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc*. 1955. 2632-2638. doi: 10.1039/JR9550002632
134. Miyazaki Y, Yoshida A, Okaniwa T et al. Oligonucleotide Synthesis on Porous Glass Resins Containing Activators. *Org Lett*. 2022. 24(21). 3807-3811. doi: 10.1021/acs.orglett.2c01348
135. Mohammed AA, AlShaer D, Al Musaimi O. Oligonucleotides: evolution and innovation. *Medicinal Chemistry Research*. 2024. 33. 2204–2220. doi:: 10.1007/s00044-024-03352-7
136. Molina AG, Kungurtsev V, Virta P et al. Acetylated and methylated β-cyclodextrins as viable soluble supports for the synthesis of short 2′-oligodeoxyribo-nucleotides in solution. *Molecules*. 2012. 17(10). 12102-20. doi: 10.3390/molecules171012102
137. Molina AG, Sanghvi YS. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2019. 77(1). e82. doi: 10.1002/cpnc.82
138. Narang CK, Brunfeldt K, Norris KE. Oligonucleotide synthesis on a crosslinked polyacrylmorpholide support. *Tetrahedron Letters*. 1977. 18(21). 1819-1822. doi: 10.1016/S0040-4039(01)83614-5
139. Narang SA, Brousseau R, Hsiung HM et al. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the modified triester method. *Methods Enzymol*. 1980. 65(1). 610-620. doi: 10.1016/s0076-6879(80)65063-0
140. Narang SA, Hsiung HM, Brousseau R. Improved phosphotriester method for the synthesis of gene fragments. *Methods Enzymol*. 1979. 68. 90-98. doi: 10.1016/0076-6879(79)68008-4
141. Nassir M, Gherardi L, Redman RL et al. An Improved P(V) Thio-Oligonucleotide Synthesis Platform. *Org Lett*. 2025. 27(1). 97-102. doi: 10.1021/acs.orglett.4c03980
142. Nguyen BH, Takahashi CN, Gupta G et al. Scaling DNA data storage with nanoscale electrode wells. *Sci Adv*. 2021. 7(48). eabi6714. doi: 10.1126/sciadv.abi6714
143. Nielsen P, Dreiøe LH, Wengel J. Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing acyclic nucleosides: introduction of three novel analogues and a summary. *Bioorg Med Chem*. 1995. 3(1). 19-28. doi: 10.1016/0968-0896(94)00143-q
144. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*. 1991. 254(5037). 1497-500. doi: 10.1126/science.1962210
145. Oberemok VV, Laikova EV, Zaitsev AS et al. The creation of DNA insecticides is a new direction in plant protection. *Protection and quarantine of plants*. 2026. (11). 14-16.
146. Oberemok VV, Useinov RZ, Skorokhod OA et al. Oligonucleotide Insecticides for Green Agriculture: Regulatory Role of Contact DNA in Plant-Insect Interactions. *Int J Mol Sci.* 2022. 23(24). 15681. doi: 10.3390/ijms232415681
147. Obika S, Morio K, Nanbu D et al. Synthesis and conformation of 3′-O,4′-C-methyleneribonucleosides, novel bicyclic nucleoside analogues for 2′,5′-linked oligonucleotide modification. *Chem. Commun*. 1997. (17). 1643–1644. doi: 10.1039/A704376G
148. O`Callaghan DM, Donnelly WJ. Oligonucleotide synthesis using the manual phosphotriester method. *Methods Mol Biol*. 1988. 4. 165-192. doi: 10.1385/0-89603-127-6:165
149. Ono A, Matsuda A, Zhao J et al. The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23(22). 4677-4682. doi: 10.1093/nar/23.22.4677
150. Organick L, Ang SD, Chen YJ et al. Random access in large-scale DNA data storage. *Nat. Biotechnol*. 2018. 36(3). 242-248. doi: 10.1038/nbt.4079
151. Ott J, Eckstein F. Filter disc supported oligonucleotide synthesis by the phosphite method. *Nucleic Acids Res*. 1984. 12(23). 9137-9142. doi: 10.1093/nar/12.23.9137
152. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91(11). 5022-5026. doi: 10.1073/pnas.91.11.5022
153. Pon RT. Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. *Methods Mol Biol*. 1993. 20. 465-496. doi: 10.1385/0-89603-281-7:465
154. Pon RT. Chemical Synthesis of Oligonucleotides: From Dream to Automation. In book: Artificial DNA. Methods and Applications. Eds Khudyakov YuE, Fields HA. 2002. CRC Press. 1-80.
155. Potapov VK, Chekhmacheva OG, Shabarova ZA et al. Synthesis of oligonucleotides on polymer carriers. Synthesis of deoxy-[thymidyl-(3`→5`)-adenylyl-(3`→5`) adenylyl-(3`→5`)-adenosine. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1971. 196(2). 360–363. (In Russian)
156. Potapov VK, Potemkin VK, Gorn VV et al. Semi-automatic solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1982. 263(6). 1386–1389.
157. Potapov VK, Turkin SI, Veiko VP et al. The use of a new type of polymer carrier in the synthesis of oligonucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1978. 241(6). 1352–1354. (In Russian)
158. Potapov VK, Veiko VP, Koroleva ON et al. Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides on a grafted

polymer support. *Nucleic Acids Res*. 1979. 6(6). 2041-2056. doi: 10.1093/nar/6.6.2041
159. Potapov VK, Zvezdina VV, Kochetkova MN et al. Preparative synthesis of oligonucleotide blocks on highly cross-linked polymeric carriers. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1973. 209(2). 364-366. (In Russian)
160. Rebimbas R, Glória I, Chegão J et al. DNA as a data storage medium. *J Biotechnol*. 2026. 414. 19-35. doi: 10.1016/j.jbiotec.2026.03.003
161. Reese CB. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org Biomol Chem*. 2005. 3(21). 3851-3868. doi: 10.1039/B510458K
162. Reese CB, Saffhill R. Oligonucleotide synthesis via phosphotriester intermediates: the phenyl-protecting group. *Chemical Comm. (London).* 1968. (13). 767-768. doi: 10.1039/C1968000076
163. Rosenqvist P, Saari V, Pajuniemi E et al. Stereo-Controlled Liquid Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides on a Soluble Support. *J. Org. Chem*. 2023. 88(14). 10156–10163. doi: 10.1021/acs.joc.3c01006
164. Sabatino D, Damha MJ. Oxepane nucleic acids: synthesis, characterization, and properties of oligonucleotides bearing a seven-membered carbohydrate ring. *J Am Chem Soc*. 2007. 129(26). 8259-8270. doi: 10.1021/ja071336c
165. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. 239(4839). 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
166. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985. 230(4732). 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
167. Sakhabutdinova AR, Mikhailenko KI, Garafutdinov RR et al. "DNA Watermarks" in the form of alien DNA sequences inserted in the genomes of various organisms and not only inserted ones. *Biomics.* 2021. 13(4). 368-386. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-26 (In Russian)
168. Schaller H, Weimann G, Lerch B et al. Studies on Polynucleotides. XXIV. The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4). Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3′ Phosphates. *J. Am. Chem. Soc*. 1963. 85(23). 3821–3827. doi: 10.1021/ja00906a021
169. Schöning K, Scholz P, Guntha S et al. Chemical etiology of nucleic acid structure: the alpha-threofuranosyl-(3'→2') oligonucleotide system. *Science*. 2000. 290(5495). 1347-1351. doi: 10.1126/science.290.5495.1347
170. Schott H. Polyvinyl Alcohol Substituted by Nucleotides as Carrier for Liquid Phase Oligonucleotide Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1973. 12. 246-246. doi: 10.1002/anie.197302461
171. Shemyakin MM, Ovchinnikov YuA, Kinyushkin AA et al. Synthesis of peptides in solution on a polymeric support I. Synthesis of glycylglycyl-l-leucylglycine. *Tetrahedron Letters*. 1965. 6(27). 2323-2327. doi: 10.1016/S0040-4039(00)70379-0
172. Shchepinov MS, Mir KU, Elder JK et al. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res*. 1999. 27(15). 3035-3041. doi: 10.1093/nar/27.15.3035
173. Shchepinov MS, Udalova IA, Bridgman AJ et al. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(22). 4447-4454. doi: 10.1093/nar/25.22.4447
174. Shi A, Liu L, Wang F et al. A practical dinucleotide phosphoramidite chemistry for de novo DNA synthesis via block coupling. *Tetrahedron Letters*. 2024. 142. 155106. doi: 10.1016/j.tetlet.2024.155106
175. Sierzchala AB, Dellinger DJ, Betley JR et al. Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: a two-step cycle using peroxy anion deprotection. *J Am Chem Soc*. 2003. 125(44). 13427-13441. doi: 10.1021/ja030376n
176. Singh A, Tolev M, Schilling CI et al. Solution-Phase Synthesis of Branched DNA Hybrids via H-Phosphonate Dimers. *J. Org. Chem*. 2012. 77(6). 2718–2728. doi: 10.1021/jo202508n
177. Singh SK, Koshkin AA, Wengel J et al. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem.Commun*. 1998. (4). 455 - 456. doi: 10.1039/a708608c
178. Singh-Gasson S, Green RD, Yue Y et al. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol*. 1999. 17(10). 974-978. doi: 10.1038/13664
179. Sinha ND, Biernat J, McManus J et al. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res*. 1984. 12(11). 4539-4557. doi: 10.1093/nar/12.11.4539
180. Sinyakov AN, Kostina EV. Error Correction Techniques in Synthetic Oligonucleotides and Synthetic DNA. *Mol Biol (Mosk).* 2025. 59(4). 544-556. doi: 10.31857/S0026898425040021 (In Russian)
181. Sondek J, Shortle D. A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89(8). 3581-3585. doi: 10.1073/pnas.89.8.3581
182. Stec WJ, Zon G, Egan W. Automated solid-phase synthesis, separation, and stereochemistry of phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides.

J. Am. Chem. Soc. 1984. 106. 6077 – 6079. doi: 10.1021/ja00332a054
183. Steffens R, Leumann CJ. Synthesis and thermodynamic and biophysical properties ofTricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1999. 121(14). 3249 – 3255.doi: 10.1021/ja983570w
184. Talap J, Zhao J, Shen M et al. Recent advances in therapeutic nucleic acids and their analytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021. 206. 114368. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114368.
185. Tanaka T., Letsinger R.L. Syringe method for stepwise chemical synthesis of oligonucleotides. Nucleic Acids Research. 1982. V. 10(10). P. 3249–3260. doi: 10.1093/nar/10.10.3249
186. Tanaka S, Yukami S, Fukushima K et al. Bulk pH-Responsive DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase, Large-Scale DNA Synthesis. *ACS Macro Lett.* 2018. 7(3). 295-299. doi: 10.1021/acsmacrolett.8b00063
187. Tedebark U, Scozzari A, Werbitzky O et al. Industrial-scale manufacturing of a possible oligonucleotide cargo CPP-based drug. *Methods Mol Biol*. 2011. 683. 505-524. doi: 10.1007/978-1-60761-919-2_36
188. Templeton NS. The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol*. 1992. 1(1). 58-72. doi: 10.1097/00019606-199203000-00008
189. Tian J, Gong H, Sheng N et al. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature*. 2004. 432(7020). 1050-1054. doi: 10.1038/nature03151
190. Trzciński S, Brzezinska J, Waligórski K et al. Hybrid Supports for Oligonucleotide Synthesis: Controlled Pore Glass Derivatives with Branched Amine-Ended Polyether or Polyimine. *Chemistry*. 2024. 30(69). e202403086. doi: 10.1002/chem.202403086
191. Urata H, Ogura E, Shinohara K et al. Synthesis and properties of mirror-image DNA. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(13). 3325-3332. doi: 10.1093/nar/20.13.3325
192. Van Aerschot A, Verheggen I, Hendrix C et al. 1,5-Anhydrohexitol nucleic acids, a new promising antisense construct. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995. 34. 1338-1339. doi: 10.1002/anie.199513381
193. Virnekäs B, Ge L, Plückthun A et al. Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res*. 1994. 22(25). 5600-5607. doi: 10.1093/nar/22.25.5600
194. Virta P. From liquid-phase synthesis to chemical ligation: preparation of oligonucleotides and their backbone analogs in solution. *Nucleic Acids Res*. 2025. 53(20). gkaf1084. doi: 10.1093/nar/gkaf1084
195. Wagner T, Pfleiderer W. Synthesis of 2`-deoxyribonucleoside 5`-phosphoramidites: New building blocks for the inverse (5`-3`)-oligonucleotide approach. *Helvetica Chimica Acta*. 2000. 83(8). 2023-2035. doi: 10.1002/1522-2675(20000809)83:8<2023::AID-HLCA2023>3.0.CO;2-P
196. Wang J, Verbeure B, Luyten I et al. Cyclohexene Nucleic Acids (CeNA): Serum Stable Oligonucleotides that Activate RNase H and Increase Duplex Stability with Complementary RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2000.122(36). 8595–8602. doi: 10.1021/ja000018+
197. Warner BD, Warner ME, Karns GA et al. Construction and evaluation of an instrument for the automated synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *DNA*. 1984. 3(5). 401-411. doi: 10.1089/dna.1984.3.401
198. Weimann G, Khorana HG. Studies on Polynucleotides. XIII.1 Stepwise Synthesis of Deoxyribo-oligonucleotides. An Alternative General Approach and the Synthesis of Thymidine Di-, Tri- and Tetranucleotides Bearing 3″-Phosphomonoester End Groups[2]. *J. Am. Chem. Soc*. 1962. 84(3). 419–430. doi: 10.1021/ja00862a022
199. White H.A. Manual oligonucleotide synthesis using the phosphoramidite method. *New Nucleic Acid Techniques* 1988. 4. 193-213. doi: 10.1385/0-89603-127-6:193
200. Willems PJ. Primer availability. *Nature*. 1989. 337. 10. DOI: 10.1038/337010b0
201. Yakovleva KI, Pereverzev IM, Kechin AA et al. The Influence of the Capping Step During Solid-Phase Phosphoramidite Synthesis of Oligonucleotides on Synthetic Errors in Oligonucleotides. *Molecules*. 2025. 31(1). 94. doi: 10.3390/molecules31010094
202. Yin Y, Arneson R, Apostle A et al. Long oligodeoxynucleotides: chemical synthesis, isolation via catching-by-polymerization, verification via sequencing, and gene expression demonstration. *Beilstein J Org Chem*. 2023. 19. 1957-1965. doi: 10.3762/bjoc.19.146
203. Yin Y, Arneson R, Yuan Y et al. Long oligos: direct chemical synthesis of genes with up to 1728 nucleotides. *Chem Sci*. 2024. 16(4). 1966-1973. doi: 10.1039/d4sc06958g
204. Yu M, Tang X, Li Z et al. High-throughput DNA synthesis for data storage. *Chem Soc Rev*. 2024. 53(9). 4463-4489. doi: 10.1039/d3cs00469d
205. Zaramella S, Bonora GM. The Application of H-Phosphonate Chemistry in the HELP Synthesis of Oligonucleotides. *Nucleosides and Nucleotides*. 1995. 14(3–5). 809–812. doi: 10.1080/15257779508012477
206. Zarytova VF, Potapov VK, Shabarova ZA, Knorre DG. Synthesis of oligonucleotides on polymer carriers. Synthesis of oligodeoxynucleotides containing deoxyguanylic acid. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1971. 199(5). 1072-1074. (In Russian)
207. Zhang L, Peritz A, Meggers E. A simple glycol nucleic acid. *J Am Chem Soc*. 2005. 127(12). 4174-4175. doi: 10.1021/ja042564z

208. Zhang N, Tan C, Cai P et al. Synthesis and properties of morpholino chimeric oligonucleotides. *Tetrahedron Letters*. 2008. 49(22). 3570-3573. doi: 10.1016/j.tetlet.2008.04.035

209. Zhdanov RI, Zhenodarova SM. Chemical Methods of Oligonucleotide Synthesis. Synthesis. 1975. 4. 222-245. doi: 10.1055/s-1975-23714

210. Zhenodarova SM, Khabarova MI. Chemical methods of synthesis of polynucleotides. *Russian Chemical Reviews*. 1966. 35(7). 531-537.