

Festphasen- Oligonukleotid- Synthese

Von der Phosphoramidit-Chemie zur skalierbaren Produktion –
Grundlagen, Prozesskette und der KNAUER OligoScaler.

Inhaltsverzeichnis

TEIL I · GRUNDLAGEN

- 01 Vorwort & Zielsetzung
- 02 Historische Entwicklung & Bedeutung
- 03 Chemische Grundlagen & Schutzgruppenkonzept
- 04 Der Phosphoramidit-Syntheszyklus
- 05 Feste Träger & Reagenzien

TEIL II · ANWENDUNG & PROZESS

- 06 Modifikationen & therapeutische Oligonukleotide
- 07 Downstream-Prozesskette
- 08 Skalierung & Prozessentwicklung

TEIL III · PLATTFORM & INTEGRATION

- 09 Der KNAUER OligoScaler
- 10 Integration in den KNAUER Life-Science-Workflow
- 11 Qualitätskontrolle und regulatorische Aspekte

TEIL IV · ABSCHLUSS

- 12 Zusammenfassung und Ausblick
- 13 Anhang: Glossar, Abkürzungen, Literatur

HINWEIS Dieses Dokument ist als druckbares A4-Booklet (PDF-Export über die Druckfunktion des Browsers) und zugleich als wiederverwendbarer Webseiten-Inhalt konzipiert. Sämtliche Grafiken sind vektorbasiert eingebettet, sodass die Datei eigenständig und offline nutzbar ist.

01 Vorwort & Zielsetzung

Synthetische Oligonukleotide gehören heute zu den am breitesten eingesetzten Werkzeugen der Life Sciences. Kurze, chemisch definierte DNA- oder RNA-Stränge dienen als Primer in der Polymerase-Kettenreaktion (**PCR**), als Sonden in der quantitativen PCR (qPCR), als Adapter- und Indexsequenzen im Next-Generation-Sequencing (**NGS**), als Guide-RNAs in CRISPR/Cas-Systemen, als Bausteine für DNA-Origami und molekulare Datenspeicherung sowie als Wirkstoffe in einer wachsenden Klasse von Nukleinsäure-Therapeutika. Diese Vielfalt an Anwendungen macht die Oligonukleotidsynthese zu einer Querschnittstechnologie, die Grundlagenforschung, Diagnostik und pharmazeutische Produktion gleichermaßen unterstützt.

Das vorliegende Booklet richtet sich an wissenschaftliche Anwender mit Hochschul- oder Promotionsabschluss in Chemie, Biochemie, Molekularbiologie sowie Prozess- und Bioingenieurwesen. Es setzt Grundkenntnisse der Nukleinsäurechemie voraus und verfolgt das Ziel, die Prinzipien der Festphasen-Oligonukleotidsynthese systematisch, präzise und anwendungsnah darzustellen – von der historischen Entwicklung über die zugrundeliegende Chemie bis hin zu Fragen der Prozessführung, Analytik und industriellen Skalierung.

Der Aufbau folgt einer fachlichen Logik: Die einleitenden Kapitel (1–5) behandeln die historische Herleitung, die chemischen Grundlagen und den eigentlichen Syntheseablauf einschließlich der verwendeten festen Trägermaterialien. Die nachfolgenden Kapitel vertiefen Aspekte der Reaktionsführung, der Aufreinigung und Analytik, der Sondertypen von Oligonukleotiden (z. B. modifizierte oder therapeutische Oligonukleotide) sowie der Prozessskalierung vom Labor- in den Produktionsmaßstab. Ein wiederkehrender Schwerpunkt liegt dabei auf der Frage, wie sich eine im Kleinmaßstab etablierte Synthesechemie robust und reproduzierbar auf größere Ansätze übertragen lässt – ein Thema, das im Kontext modularer, skalierbarer Syntheseplattformen wie dem KNAUER OligoScaler an mehreren Stellen des Booklets wieder aufgegriffen wird.

02 Historische Entwicklung & Bedeutung

2.1 Von der Lösungssynthese zur Festphase

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden reicht in ihren Anfängen bis in die 1950er-Jahre zurück. Alexander Todd und Har Gobind Khorana entwickelten in dieser Zeit die sogenannte **Phosphodiester-Methode**, mit der sich Nukleotide in Lösung schrittweise miteinander verknüpfen ließen. Diese Arbeiten waren fundamental für das Verständnis der Nukleinsäurechemie, jedoch war die Lösungssynthese außerordentlich aufwendig: Nach jedem Kupplungsschritt musste das Produkt aus dem Reaktionsgemisch isoliert und gereinigt werden, bevor der nächste Baustein angefügt werden konnte. Die Ausbeuten sanken mit zunehmender Kettenlänge rapide, sodass die Synthese längerer, definierter Sequenzen praktisch nicht realisierbar war.

Den entscheidenden konzeptionellen Anstoß zur Lösung dieses Problems lieferte ein Verfahren, das ursprünglich nicht für Nukleinsäuren, sondern für Peptide entwickelt wurde: 1963 stellte Robert Bruce Merrifield das Prinzip der **Festphasensynthese** vor. Die wachsende Kette wird dabei kovalent an ein unlösliches, partikuläres Trägermaterial gebunden; überschüssige Reagenzien und Nebenprodukte lassen sich nach jedem Reaktionsschritt einfach durch Filtration und Waschen entfernen, ohne dass eine Isolierung des Zwischenprodukts erforderlich ist. Für diese Arbeit wurde Merrifield 1984 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Das Festphasenprinzip bildete damit den konzeptionellen Ursprung für die spätere Festphasen-Oligonukleotidsynthese.

2.2 Übertragung auf Nukleotide und die Phosphoramidit-Chemie

Robert Letsinger übertrug das Festphasenkonzept in den späten 1960er- und den 1970er-Jahren auf die Synthese von Oligonukleotiden und entwickelte hierfür den **Phosphittriesters-Ansatz**, bei dem dreiwertige Phosphorverbindungen als reaktive Zwischenstufen genutzt wurden. Dieser Ansatz war chemisch vielversprechend, litt jedoch zunächst an der begrenzten Stabilität und Reaktivität der eingesetzten Kupplungsreagenzien.

Der eigentliche Durchbruch gelang 1981 Serge Beaucage und Marvin Caruthers mit der Einführung der **Phosphoramidit-Chemie**. Sie entwickelten Nukleosid-Bausteine mit einer Phosphoramidit-Funktion am 3'-Ende, die sich durch hohe Stabilität bei Lagerung und gleichzeitig hohe Reaktivität nach chemischer Aktivierung auszeichnen. Diese Kombination aus Lagerstabilität und Kupplungseffizienz erwies sich als entscheidender Vorteil gegenüber den zuvor verwendeten Phosphittriesters- und Phosphodiester-Reagenzien und machte die Phosphoramidit-Chemie zur Grundlage nahezu aller heute eingesetzten Syntheseverfahren.

Bereits ab 1983 folgte die **Automatisierung** der Festphasensynthese: Die ersten kommerziellen DNA-Synthesizer, unter anderem von Applied Biosystems, ermöglichten die programmgesteuerte, sequenzielle Abarbeitung der Syntheseschritte ohne manuelle Eingriffe.

Die Kombination aus robuster Phosphoramidit-Chemie und automatisierter Prozessführung erlaubte erstmals die reproduzierbare Herstellung von Oligonukleotiden in Routinequalität.

2.3 Warum sich die Phosphoramidit-Chemie durchsetzte

Drei Faktoren waren maßgeblich für den Erfolg der Phosphoramidit-Methode gegenüber konkurrierenden Verfahren: Erstens die hohe erzielbare **Kupplungseffizienz** pro Zyklus, die auch die Synthese längerer Sequenzen mit vertretbarer Gesamtausbeute erlaubt. Zweitens die vergleichsweise kurze **Reaktionszeit** pro Zyklus, wodurch sich Syntheszeiten im Bereich von Minuten pro Base realisieren lassen. Drittens die gute **Automatisierbarkeit** des Verfahrens: Alle vier Kernschritte des Zyklus (siehe Kapitel 4) lassen sich mit flüssigen Reagenzien und einfachen Fest-Flüssig-Trennoperationen durchführen, was die Konstruktion automatisierter Synthesizer wesentlich vereinfachte.

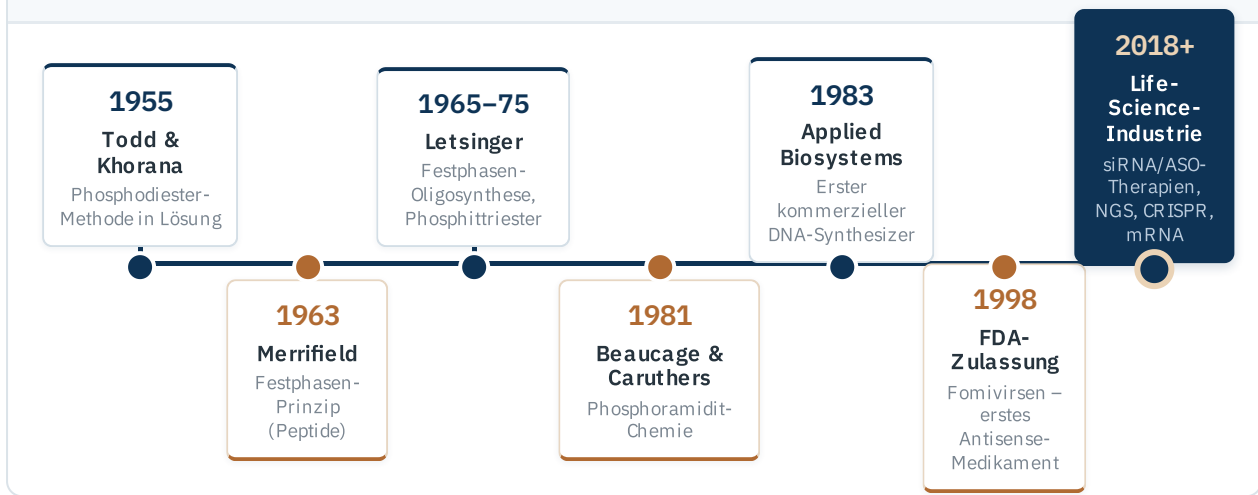
2.4 Bedeutung für die heutige Life-Science-Industrie

Die Verfügbarkeit robuster, automatisierter Synthesechemie hat die Nachfrage nach synthetischen Oligonukleotiden über Jahrzehnte kontinuierlich wachsen lassen. In der Genomik und Diagnostik sind kurze DNA-Oligonukleotide unverzichtbar: Als Primer und Adaptermoleküle sind sie fester Bestandteil von NGS-Bibliotheksvorbereitungen, als markierte Sonden ermöglichen sie die sequenzspezifische Detektion in der qPCR, und als Guide-RNAs steuern sie die Zielerkennung von CRISPR/Cas-Systemen in der Genom-Editierung. Auch in der strukturellen DNA-Nanotechnologie (DNA-Origami) und im aufkommenden Feld der DNA-basierten Datenspeicherung bilden synthetische Oligonukleotide die molekulare Grundlage.

Eine zweite, industriell zunehmend bedeutsame Anwendung liegt im Bereich der **therapeutischen Oligonukleotide**. Mit Fomivirsen wurde 1998 das erste Antisense-Oligonukleotid (**ASO**) für die klinische Anwendung zugelassen; es folgten weitere ASO-Wirkstoffe wie Nusinersen und Inotersen. Parallel dazu etablierte sich die Klasse der siRNA-Therapeutika (small interfering RNA), beispielsweise Patisiran und Givosiran, häufig konjugiert mit N-Acetylgalactosamin (**GalNAc**) zur gezielten Aufnahme in Leberzellen. Auch die Herstellung und Qualitätskontrolle von mRNA-Impfstoffen stützt sich auf synthetische Oligonukleotide, etwa als Primer für die Template-Herstellung oder als Referenzmaterialien in der analytischen Kontrolle.

Dieser wachsende und diversifizierte Bedarf – von Forschungsmengen im Nanomol- bis Mikromolbereich bis hin zu Produktionsmengen für klinische und kommerzielle Wirkstoffe – stellt neue Anforderungen an die industrielle Skalierung der Synthese. Fragen der Reaktorauslegung, der Reagenzienökonomie und der Prozessübertragung zwischen Maßstäben gewinnen entsprechend an Bedeutung und werden in späteren Kapiteln dieses Booklets vertieft behandelt.

ABB. 01 Meilensteine der Oligonukleotid-Synthese



03 Chemische Grundlagen & Schutzgruppenkonzept

3.1 Aufbau von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren bestehen aus einer Abfolge von Nukleotiden, die jeweils aus drei Komponenten aufgebaut sind: einer heterozyklischen **Nukleobase** (Adenin, Guanin, Cytosin sowie Thymin in der DNA bzw. Uracil in der RNA), einem Zuckerbaustein (**2'-Desoxyribose** in der DNA, Ribose in der RNA) und einer Phosphatgruppe. Die Nukleotide sind über ein **Phosphodiester-Rückgrat** miteinander verknüpft, das die 3'-Position eines Zuckers mit der 5'-Position des nachfolgenden Zuckers verbindet. Biologische Nukleinsäurestränge werden in 5'→3'-Richtung gelesen und auch enzymatisch in dieser Richtung synthetisiert.

Die chemische Festphasensynthese verläuft demgegenüber in **umgekehrter Richtung**, also 3'→5': Das erste Nukleosid ist über seine 3'-Position an den festen Träger gebunden, und jeder nachfolgende Baustein wird über sein 3'-Phosphoramidit an die freie 5'-Hydroxylgruppe der wachsenden Kette gekuppelt. Diese Syntheserichtung ist eine direkte Konsequenz der Chemie des Phosphoramidit-Zyklus und hat keine biologische Entsprechung.

3.2 Das Schutzgruppenkonzept

Damit die Kupplung an jedem Zyklus ausschließlich an der gewünschten Position – der freien 5'-Hydroxylgruppe der wachsenden Kette – erfolgt, müssen alle übrigen reaktiven Zentren des Moleküls temporär blockiert werden. Dieses **Schutzgruppenkonzept** ist der eigentliche Kern der selektiven Oligonukleotidsynthese und betrifft vier funktionelle Gruppen:

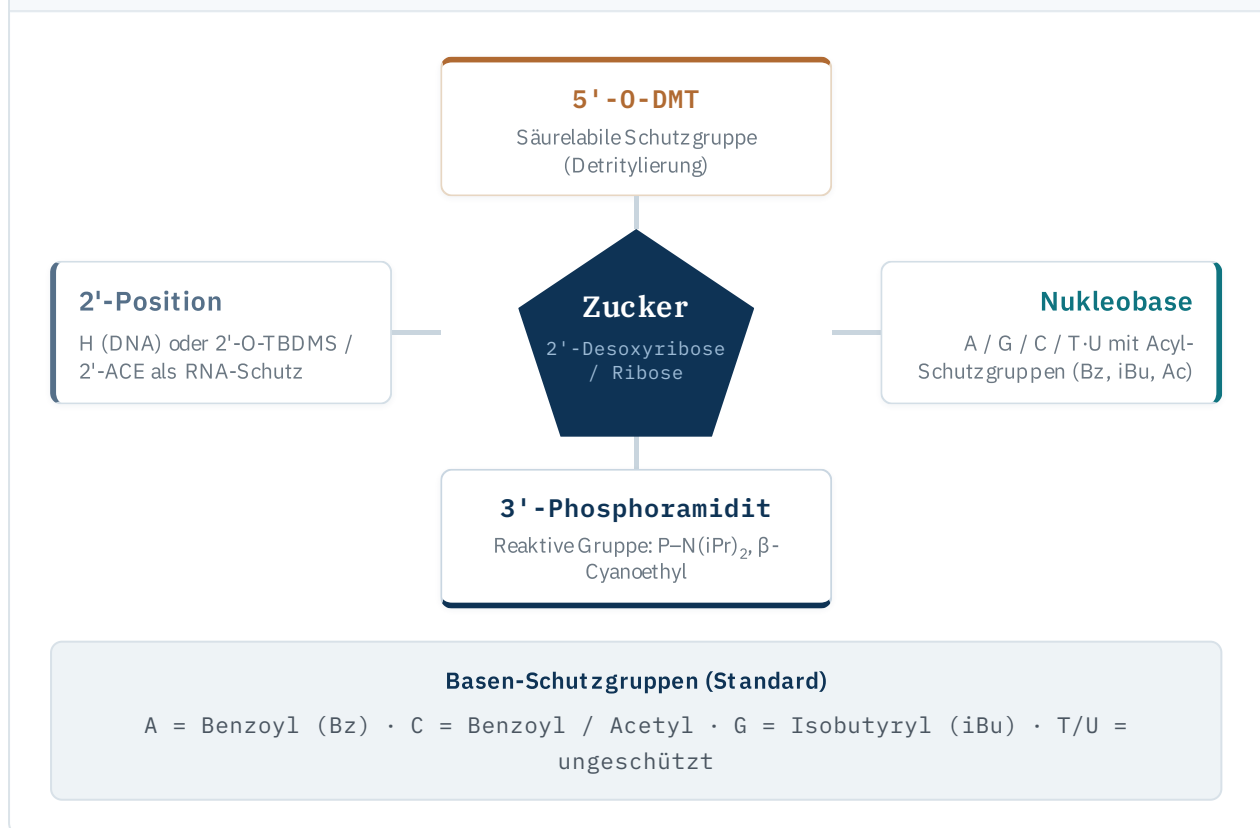
- Die **5'-Hydroxylgruppe** wird mit einer säurelabilen Dimethoxytritylgruppe (**DMT**) geschützt. Sie wird zu Beginn jedes Zyklus gezielt und selektiv entfernt (Detritylierung), ohne die übrigen Schutzgruppen anzugreifen.
- Die **exocyclischen Aminogruppen** der Nukleobasen Adenin, Cytosin und Guanin sind nukleophil und müssen vor Nebenreaktionen während der Kupplung und Oxidation geschützt werden. Üblich sind Benzoyl-Schutzgruppen (Bz) für Adenin und Cytosin sowie Isobutyryl-Schutzgruppen (iBu) für Guanin; diese Gruppen sind basenlabil und werden erst in der abschließenden Entschützung entfernt.
- Die **Phosphatgruppe** des neu gebildeten Phosphittriesters trägt eine β -Cyanoethyl-Schutzgruppe, die ebenfalls basenlabil ist und im Zuge der abschließenden Entschützung eliminiert wird.
- Bei der RNA-Synthese kommt zusätzlich eine Schutzgruppe an der **2'-Hydroxylgruppe** zum Einsatz, etwa tert-Butyldimethylsilyl (**TBDMS**) oder Bis(2-acetoxyethoxy)methyl (**ACE**). Sie muss orthogonal zu den übrigen Schutzgruppen entfernbar sein.

Entscheidend für das Gelingen der Synthese ist die **Orthogonalität** dieser Schutzgruppen: Jede Gruppe muss unter Bedingungen entfernbar sein, die die übrigen Schutzgruppen nicht beeinträchtigen. Die säurelabile DMT-Gruppe wird selektiv im sauren Milieu abgespalten, während die basenlabilen Schutzgruppen an Nukleobasen und Phosphat erst am Ende der Synthese unter basischen bzw. nukleophilen Bedingungen entfernt werden. Diese chemische Entkopplung ermöglicht die zyklische, iterative Kettenverlängerung ohne ungewollte Nebenreaktionen an bereits eingebauten Bausteinen.

3.3 Der Phosphoramidit-Baustein

Der zentrale Reaktionspartner jedes Kupplungsschritts ist das **Phosphoramidit**: ein Nukleosid, dessen 5'-Hydroxylgruppe mit DMT geschützt ist und dessen 3'-Position eine Phosphoramidit-Funktion trägt. Diese besteht aus einem dreiwertigen Phosphoratom mit einer Diisopropylamino-Gruppe als Abgangsgruppe und einer β -Cyanoethyl-Gruppe als Schutzgruppe für den Phosphorsauerstoff. Nach Aktivierung durch ein saures Azol-Reagenz (siehe Kapitel 4) reagiert das Phosphoramidit selektiv mit der freien 5'-Hydroxylgruppe des trägergebundenen Oligonukleotids und bildet eine Phosphittriesters-Bindung. Die Kombination aus DMT-Schutzgruppe, basengeschützter Nukleobase und Phosphoramidit-Funktion mit β -Cyanoethyl-Schutz macht den Baustein zu einem lagerstabilen, aber hochreaktiven Reagenz – die chemische Grundvoraussetzung für den im folgenden Kapitel beschriebenen Synthesezyklus.

ABB. 02 Der Phosphoramidit-Baustein und seine Schutzgruppen



04 Der Phosphoramidit-Syntheszyklus

Die Festphasensynthese von Oligonukleotiden nach dem Phosphoramidit-Verfahren erfolgt als iterativer Zyklus aus vier chemischen Grundschritten, der für jede anzufügende Base einmal durchlaufen wird. Jeder dieser Schritte adressiert eine spezifische chemische Anforderung und ist auf die vorangegangenen und nachfolgenden Schritte abgestimmt.

4.1 Detritylierung

Zu Beginn jedes Zyklus wird die säurelabile DMT-Schutzgruppe von der 5'-Hydroxylgruppe der trägergebundenen Kette entfernt. Hierzu wird eine Lösung einer schwachen organischen Säure – üblicherweise Trichloressigsäure (**TCA**) oder Dichloressigsäure (**DCA**) in einem inerten Lösungsmittel – über den Träger geleitet. Das dabei freigesetzte DMT-Kation ist intensiv farbig (orange) und lässt sich photometrisch quantifizieren; diese Eigenschaft wird genutzt, um die Kupplungseffizienz jedes einzelnen Zyklus messtechnisch zu verfolgen (Tritylwert-Analyse). Nach der Detritylierung liegt die freie 5'-Hydroxylgruppe für den folgenden Kupplungsschritt bereit.

4.2 Kupplung

Der Kupplungsschritt ist der chemisch anspruchsvollste und für die Gesamtausbeute der Synthese wichtigste Teilschritt. Das ankommende Phosphoramidit wird zusammen mit einem sauren Aktivator – typischerweise Tetrazol oder alternative Azol-Aktivatoren wie Ethylthiotetrazol (**ETT**) oder Benzylthiotetrazol (**BTT**) – auf den Träger gegeben. Der Aktivator protoniert die Diisopropylamino-Abgangsgruppe des Phosphoramidits und erzeugt so eine hochreaktive Zwischenstufe, die mit der freien 5'-Hydroxylgruppe unter Ausbildung einer neuen **Phosphittriesters-Bindung** reagiert. Unter optimierten Bedingungen werden pro Kupplungsschritt Effizienzen im Bereich von etwa 99 bis 99,7 % erreicht.

4.3 Capping

Auch bei optimierter Kupplungsschemie reagiert ein kleiner Anteil der 5'-Hydroxylgruppen nicht mit dem Phosphoramidit. Würden diese unreaktierten Ketten im nächsten Zyklus weiter verlängert, entstünden Fehlsequenzen, denen ein Baustein fehlt (sogenannte **(n-1)-Fehlsequenzen**), die sich chromatographisch nur schwer von der Zielsequenz abtrennen lassen. Um dies zu verhindern, werden im Capping-Schritt alle nicht umgesetzten 5'-Hydroxylgruppen irreversibel acetyliert. Als Reagenzien dienen üblicherweise Essigsäureanhydrid (Ac_2O) in Kombination mit N-Methylimidazol (**NMI**) als katalytischer Base.

4.4 Oxidation

Die im Kupplungsschritt gebildete Phosphitriester-Bindung enthält dreiwertigen Phosphor (P(III)) und ist chemisch instabil. Im letzten Teilschritt des Zyklus wird dieser Phosphitriester durch eine Iod-Lösung (I_2 in Wasser/Pyridin) zum stabilen Phosphotriester mit fünfwertigem Phosphor (P(V)) oxidiert, welcher dem natürlichen Phosphodiester-Rückgrat entspricht. Soll stattdessen ein **Phosphorothioat**-Rückgrat erzeugt werden, wird anstelle der Oxidation eine Sulfurierungsreaktion durchgeführt, bei der ein Schwefelatom anstelle eines Sauerstoffatoms in die Phosphatgruppe eingebaut wird.

4.5 Kupplungseffizienz und Gesamtausbeute

Da der Zyklus für jede Base im Oligonukleotid einmal durchlaufen wird, multipliziert sich die Effizienz jedes einzelnen Kupplungsschritts über die gesamte Synthese. Für eine Sequenz aus n Basen ergibt sich die theoretische Gesamtausbeute näherungsweise als:

$$\text{Gesamtausbeute} = \text{Kupplungseffizienz}^n$$

Bei einer für eine gut optimierte Synthese typischen Kupplungseffizienz von 99,5 % pro Zyklus ergibt sich für ein Oligonukleotid von 20 Basen Länge eine theoretische Gesamtausbeute von etwa $0,995^{19} \approx 91 \%$ (19 Kupplungsschritte für 20 Basen, da der erste Baustein bereits trägergebunden vorliegt). Bei längeren Sequenzen macht sich dieser exponentielle Zusammenhang deutlich stärker bemerkbar, was die Bedeutung einer möglichst hohen und reproduzierbaren Kupplungseffizienz unterstreicht.

GRÖSSENORDNUNG Ein vollständiger Synthesesyklus (Detritylierung, Kupplung, Capping, Oxidation) benötigt typischerweise wenige Minuten pro Base. Die genaue Zykluszeit hängt von Trägertyp, Reagenzienführung und Gerätekonfiguration ab.



Ein Zyklus verlängert die Kette um ein Nukleotid · typischerweise 3–6 min pro Base

05 Feste Träger & Reagenzien

5.1 Prinzip der Festphase

Das Grundprinzip der Festphasensynthese besteht darin, das wachsende Oligonukleotid kovalent an ein unlösliches, partikuläres Trägermaterial zu binden. Das erste Nukleosid der Sequenz ist über einen Linker fest an den Träger gekoppelt, während alle nachfolgenden Reagenzien – Phosphoramidite, Aktivator, Capping- und Oxidationsreagenzien – in flüssiger Phase im Überschuss zugeführt werden. Dieser Reagenzienüberschuss treibt die jeweilige Reaktion zu hoher Umsetzung, ohne dass eine aufwendige Zwischenaufreinigung erforderlich wäre: Nicht umgesetzte Reagenzien und lösliche Nebenprodukte werden nach jedem Reaktionsschritt einfach durch Waschen des Trägers entfernt. Diese Trennung durch simples Waschen anstelle einer chromatographischen Aufreinigung nach jedem Schritt ist der entscheidende praktische Vorteil des Festphasenprinzips und die Voraussetzung für die Automatisierbarkeit des gesamten Verfahrens.

5.2 Trägermaterialien

Als feste Trägermaterialien haben sich im Wesentlichen zwei Klassen etabliert:

ABB. 04 Feste Träger im Vergleich

CPG

Controlled Pore Glass



Basis	Poröses Glas (anorganisch)
Poren	500–3000 Å, definiert wählbar
Quellung	keine – starr, formstabil
Beladung	niedrige µmol/g
Eignung	lange Sequenzen, variable Maßstäbe

Polystyrol

PS / hochvernetzt



Basis	Vernetztes Polystyrol (polymer)
Poren	gel- / makroporös
Quellung	quillt in organ. Lösungsmitteln
Beladung	höher, teils >100 µmol/g
Eignung	robuste Standardsynthesen, Skalierung

Gemeinsam: ein Linker (meist Succinyl) verbindet das erste Nukleosid mit dem Träger; die Abspaltung des fertigen Oligos erfolgt basisch (z. B. wässriges Ammoniak).

CPG zeichnet sich durch seine hohe Formstabilität aus: Da es in organischen Lösungsmitteln nicht quillt, bleibt die Porenstruktur über den gesamten Syntheseverlauf konstant, was

besonders bei der Synthese langer Sequenzen von Vorteil ist. Polystyrol-basierte Träger hingegen quellen in den während der Synthese verwendeten organischen Lösungsmitteln, was den Zugang der Reagenzien zu den reaktiven Zentren im Inneren der Partikel begünstigen kann, gleichzeitig aber andere Anforderungen an die mechanische Auslegung von Synthesäulen stellt. Die Wahl des Trägermaterials sowie der Porengröße richtet sich in der Praxis nach der gewünschten Sequenzlänge, dem angestrebten Maßstab und den verfahrenstechnischen Randbedingungen der eingesetzten Syntheseplattform.

Das erste Nukleosid ist über einen **Succinyl-Linker** an den Träger gebunden, der nach abgeschlossener Synthese durch die abschließende Ammoniak- oder Aminbehandlung gespalten wird und das Oligonukleotid vom Träger freisetzt. Alternativ kommen **Universal-Supports** zum Einsatz, bei denen kein sequenzspezifisches erstes Nukleosid vorab an den Träger gekoppelt werden muss; die erste Base wird stattdessen im ersten regulären Kupplungsschritt eingeführt, was die Trägerlogistik vereinfacht.

5.3 Reagenzien- und Lösungsmittelübersicht

Neben dem festen Träger benötigt jede Synthese eine definierte Reihe an Reagenzienlösungen, die in separaten Vorratsbehältern des Synthesizers bereitgestellt und über Ventile zyklisch dosiert werden:

- **Amidite** – die vier (bzw. bei modifizierten Sequenzen mehr) Phosphoramidit-Bausteine, typischerweise gelöst in wasserfreiem Acetonitril.
- **Aktivator** – Tetrazol- oder alternative Azol-Lösung zur Aktivierung des Phosphoramidits im Kupplungsschritt.
- **Oxidizer** – Iod-Lösung (I_2 /Wasser/Pyridin) zur Oxidation, bzw. Sulfurierungsreagenz für Phosphorothioat-Synthesen.
- **Capping A/B** – zwei Komponenten (Ac_2O -Lösung und NMI-Lösung), die im Capping-Schritt zusammengeführt werden.
- **Deblock** – die saure Detritylierungslösung (TCA oder DCA in einem inerten Lösungsmittel).

Für alle Reagenzien und Lösungsmittel gilt eine zentrale Randbedingung: Die Synthesechemie ist gegenüber Wasserspuren empfindlich, da Feuchtigkeit sowohl die Aktivierung des Phosphoramidits als auch die Kupplungsreaktion selbst beeinträchtigen kann. **Wasserfreie Bedingungen** – von der Reagenzienqualität über die Lagerung bis zur Gasatmosphäre im Synthesizer – sind daher über den gesamten Prozess hinweg einzuhalten.

06 Modifikationen & therapeutische Oligonukleotide

Unmodifizierte DNA- oder RNA-Oligonukleotide sind für den Einsatz als Wirkstoff nur eingeschränkt geeignet. Sie werden durch Serum- und Zellnukleasen rasch abgebaut, zeigen eine ungünstige Pharmakokinetik mit schneller renaler Elimination, können unspezifische Immunreaktionen auslösen und weisen häufig eine unzureichende Duplex-Affinität auf. Chemische Modifikationen des Rückgrats, der Zuckereinheit, der Nukleobasen sowie die Anbindung funktioneller Konjugate adressieren diese Limitierungen gezielt und haben die Entwicklung therapeutischer Oligonukleotide als eigenständige Wirkstoffklasse erst ermöglicht.

6.1 Modifikationen des Phosphat-Rückgrats

Die mit Abstand am weitesten verbreitete Rückgrat-Modifikation ist das **Phosphorothioat** (PS), bei dem ein nichtverbrückendes Sauerstoffatom der Phosphodiester-Bindung durch Schwefel ersetzt wird. Diese Substitution erfolgt während der Festphasensynthese im Oxidationsschritt: Anstelle der wässrigen Iod-Lösung wird ein Schwefel-Transfer-Reagenz eingesetzt. Phosphorothioate erhöhen die Nuklease-Resistenz erheblich, verbessern die Plasmaproteinbindung und damit die Pharmakokinetik, senken jedoch tendenziell die Bindungsaffinität zum komplementären Strang geringfügig.

Da das Phosphoratom durch die Schwefel-Substitution zum Stereozentrum wird, entstehen bei Standardsynthese diastereomere Gemische (R_p/S_p) an jeder PS-verknüpften Position. Diese **Chiralität** beeinflusst Stabilität, Proteinbindung und biologische Aktivität einzelner Diastereomere unterschiedlich stark; stereodefinierte Synthesestrategien sind Gegenstand aktueller Prozessentwicklung.

6.2 2'-Zucker-Modifikationen

Modifikationen an der 2'-Position der Ribose beeinflussen sowohl die Nuklease-Stabilität als auch die Duplex-Affinität:

- **2'-O-Methyl** (2'-OMe): natürlich vorkommende Modifikation, erhöht Affinität und Nuklease-Resistenz moderat.
- **2'-O-Methoxyethyl** (2'-MOE): sterisch anspruchsvollere Variante mit weiter verbesserter Affinität und Stabilität, breit eingesetzt in ASO-Wirkstoffen.
- **2'-Fluor** (2'-F): kleine, stark elektronegative Gruppe, begünstigt eine C3'-endo-Zuckerkonformation und erhöht dadurch die Duplex-Stabilität, häufig kombiniert mit 2'-OMe in siRNA.
- **Locked Nucleic Acid** (LNA): eine Methylenbrücke fixiert den Zucker in der C3'-endo-Konformation, was zu einer sehr stark erhöhten Bindungsaffinität pro Einheit führt.

Wegen ihrer hohen Affinität werden 2'-MOE- und LNA-Bausteine häufig in einem **Gapmer-Design** eingesetzt: Modifizierte Flügelregionen an beiden Strangenden flankieren einen zentralen, unmodifizierten DNA-Bereich („Gap“). Nur dieser DNA-Gap wird nach Hybridisierung an die Ziel-mRNA von RNase H erkannt und gespalten, während die Flügel die Nuklease-Stabilität und Bindungsaffinität sicherstellen.

6.3 Konjugate und funktionelle Liganden

Über Amino-, Thiol- oder alkinhaltige Linker sowie Spacer-Phosphoramidite lassen sich am 5'- oder 3'-Ende (seltener auch intern) funktionelle Gruppen anbinden:

- **GalNAc** (N-Acetylgalactosamin), meist als trivalentes Konjugat: bindet mit hoher Avidität an den **Asialoglykoprotein-Rezeptor** (ASGPR) auf Hepatozyten und ermöglicht leberspezifisches Targeting.
- **Cholesterin**: erhöht durch Bindung an Lipoproteine die zelluläre Aufnahme und verlängert die Zirkulationszeit.
- **Peptide**: ermöglichen zell- oder gewebespezifisches Targeting bzw. verbesserte Membranpermeation.
- **Fluorophore und Quencher**: zentral für diagnostische Anwendungen, etwa in Hybridisierungssonden (FRET- oder Molecular-Beacon-Formate).

ABB. 05 Chemische Modifikationen therapeutischer Oligonukleotide

Rückgrat-Modifikation

- **Phosphorothioat (PS)** – erhöht Nuklease-Stabilität
- Verbessert Pharmakokinetik & Proteinbindung
- Erzeugt Stereozentren (R_p/S_p-Chiralität)

2'-Zucker-Modifikation

- **2'-OMe / 2'-MOE** – Affinität & Stabilität
- **2'-F · LNA** – hohe Duplex-Affinität
- Basis des Gapmer-Designs

Konjugate & Liganden

- **GalNAc** – Leber-Targeting (Hepatozyten)
- Cholesterin, Peptide, Fluorophore
- Spacer (C3/C6), Biotin, Amino-Linker

ANWENDUNGSKLASSEN

Antisense-Oligonukleotide (ASO) · siRNA · Aptamere · CpG-Oligonukleotide · mRNA-Bausteine

GAPMER-PRINZIP Modifizierte, hochaffine Flügelregionen (z. B. 2'-MOE oder LNA) an beiden Enden schützen einen zentralen DNA-Gap vor Nukleasen und sorgen für ausreichende Bindungsaffinität, während nur der unmodifizierte Gap-Bereich nach Hybridisierung an die Ziel-mRNA von RNase H erkannt und gespalten wird.

6.4 Wirkstoffklassen im Überblick

Auf Basis dieser Modifikationschemie haben sich mehrere therapeutische Oligonukleotid-Klassen etabliert: **Antisense-Oligonukleotide** (ASO) binden komplementär an eine Ziel-mRNA und vermitteln im Gapmer-Format deren RNase-H-Abbau oder modulieren als vollmodifizierte

ASOs das Spleißen; **siRNA** wird nach zellulärer Aufnahme in den RISC-Komplex eingebaut; **Aptamere** binden Zielproteine über ihre 3D-Faltung; **CpG-Oligonukleotide** wirken als Immunmodulatoren, und modifizierte **mRNA-Bausteine** erhöhen die Translationseffizienz. Zugelassene Beispiele sind Fomivirsen, Nusinersen, Patisiran und Inclisiran.

07 Downstream-Prozesskette

Die Festphasensynthese liefert das trägergebundene, vollständig geschützte Oligonukleotid. Erst die nachgelagerten Prozessschritte – Abspaltung, Entschützung, Analytik, Aufreinigung, Entsalzung und Formulierung – überführen dieses Zwischenprodukt in einen anwendungs- bzw. wirkstofftauglichen Reinstoff.

7.1 Abspaltung vom Träger und globale Entschützung

Im ersten Schritt wird das Oligonukleotid vom festen Träger abgespalten und es werden die permanenten Schutzgruppen an den exocyclischen Aminofunktionen der Basen sowie am Phosphat entfernt. Für DNA- und die meisten modifizierten Oligonukleotide ist die Behandlung mit konzentriertem **wässrigem Ammoniak** Standard, teils kombiniert mit Methylamin (als **AMA-Gemisch**), was die Entschützungszeit bei erhöhter Temperatur deutlich verkürzt. Bei RNA-Synthesen ist zusätzlich die Entfernung der 2'-Schutzgruppe (üblicherweise TBDMS) erforderlich; dieser Schritt erfolgt aus Stabilitätsgründen getrennt, häufig mit **Tetrabutylammoniumfluorid** (TBAF) in wasserfreiem Milieu.

7.2 Analytik und In-Process-Control

Ein durchgängiges analytisches Monitoring begleitet den gesamten Downstream-Prozess:

- **IP-RP-HPLC** – Standardmethode zur Trennung nach Kettenlänge und Hydrophobizität, häufig unter Ausnutzung des lipophilen DMT-Rests.
- **Anionenaustausch (AEX)** – Trennung primär nach Ladung, unabhängig vom DMT-Status.
- **HILIC** – ergänzende Trennmethode, besonders bei stark hydrophilen oder hochmodifizierten Oligonukleotiden.
- **Kapillargelelektrophorese (CGE)** – hochauflösende Trennung nach Molekülgröße, wichtig zur Detektion von n–1/n+1-Verunreinigungen.
- **LC-MS** – Identitäts- und Massenbestimmung, essenziell zur Bestätigung der korrekten Sequenz.
- **UV-Quantifizierung** (260 nm) – Bestimmung von Gehalt und Konzentration auf Basis des Extinktionskoeffizienten.

Eine prozessrelevante Weichenstellung betrifft die Frage, ob die 5'-terminale **DMT**-Schutzgruppe vor der Analytik/Aufreinigung entfernt wird oder nicht – die sogenannte **DMT-on/DMT-off**-Strategie. DMT-on-Material lässt sich chromatographisch stärker von Fehlsequenzen abgrenzen, erfordert jedoch einen zusätzlichen Detritylierungsschritt nach der Aufreinigung.

7.3 Präparative Aufreinigung

Für die präparative Reinigung sind IP-RP- und AEX-Chromatographie die etablierten Verfahren, häufig auch kombiniert (Orthogonalstrategie), um komplementäre Selektivitäten auszunutzen. Die **DMT-on-Reinigung** nutzt die hydrophobe DMT-Gruppe gezielt zur Abtrennung verkürzter Fehlsequenzen. Zentrale Auslegungsgrößen sind die **Beladung** und die **dynamische Kapazität** des Säulenmaterials, welche die erzielbare Reinheit gegen Durchsatz und Ausbeute abwägen.

7.4 Entsalzung, Pufferaustausch und Konzentrierung

Nach der chromatographischen Reinigung liegt das Produkt in salzhaltigen, verdünnten Puffern vor. Zur Entsalzung, zum Pufferaustausch und zur Aufkonzentrierung kommen vor allem **Tangentialflussfiltration** (TFF / UF/DF) als kontinuierliches, scale-up-fähiges Membranverfahren, die **Fällung** (z. B. ethanolisch) als kostengünstige Isolierung sowie die **Festphasenextraktion** (SPE) für kleinere Mengen zum Einsatz.

7.5 Formulierung, Lyophilisierung und finale Freigabe

Das entsalzte Produkt wird üblicherweise **lyophilisiert**, um eine lagerstabile, transportfähige Form zu erhalten, und je nach Anwendung in die finale Formulierung (z. B. wässriger Puffer, Lipidnanopartikel-Formulierung bei siRNA) überführt. Die abschließende **Qualitätskontrolle** vor Freigabe umfasst Reinheit und Gehalt, Identitätsbestätigung (LC-MS) sowie bei parenteralen Anwendungen die Prüfung auf **Endotoxine**.

ABB. 06 Downstream-Prozesskette: vom Rohprodukt zum reinen Oligonukleotid



In-Process-Control (IPC) begleitet jeden Schritt · finale Freigabe nach Identität, Reinheit (HPLC), Gehalt und Endotoxin.

08 Skalierung & Prozessentwicklung

Oligonukleotide durchlaufen im Verlauf ihrer Entwicklung mehrere Größenordnungen im Herstellungsmaßstab: von der **Forschung** im nmol- bis μ mol-Bereich über die Herstellung für **präklinische und klinische Studien** im μ mol- bis mmol-Bereich bis hin zur **kommerziellen Produktion** im mmol- bis Mol-Maßstab, entsprechend Chargengrößen im Multi-Kilogramm-Bereich. Diese Skalierung stellt eigene Anforderungen an Prozess- und Anlagentechnik, die über eine reine Volumenvergrößerung hinausgehen.

8.1 Herausforderungen der Maßstabsvergrößerung

Mit wachsendem Säulendurchmesser und -volumen verändern sich die physikalischen Randbedingungen der Synthese:

- **Wärme- und Stofftransport** – größere Reaktionsvolumina erschweren einen gleichmäßigen Wärmeabtrag exothermer Schritte sowie eine homogene Durchmischung.
- **Gleichmäßige Durchströmung** – Kanalbildung oder ungleichmäßige Flussverteilung kann lokal zu unvollständiger Kupplung führen.
- **Reagenzienverbrauch und -kosten** – da Amidite kostenintensiv sind, wird die **Amidit-Äquivalenz** zum zentralen Kostenhebel im Großmaßstab.
- **Lösungsmittelmengen und Nachhaltigkeit** – Wasch- und Spülschritte dominieren den Verbrauch; Reduktion und Recycling gewinnen an Bedeutung.
- **Zykluszeit** – die Dauer eines vollständigen Zyklus bestimmt maßgeblich den Durchsatz und damit die Wirtschaftlichkeit.
- **Reproduzierbarkeit und Dokumentation** – chargenübergreifende Konsistenz und GMP-konforme Dokumentation sind unabdingbar.

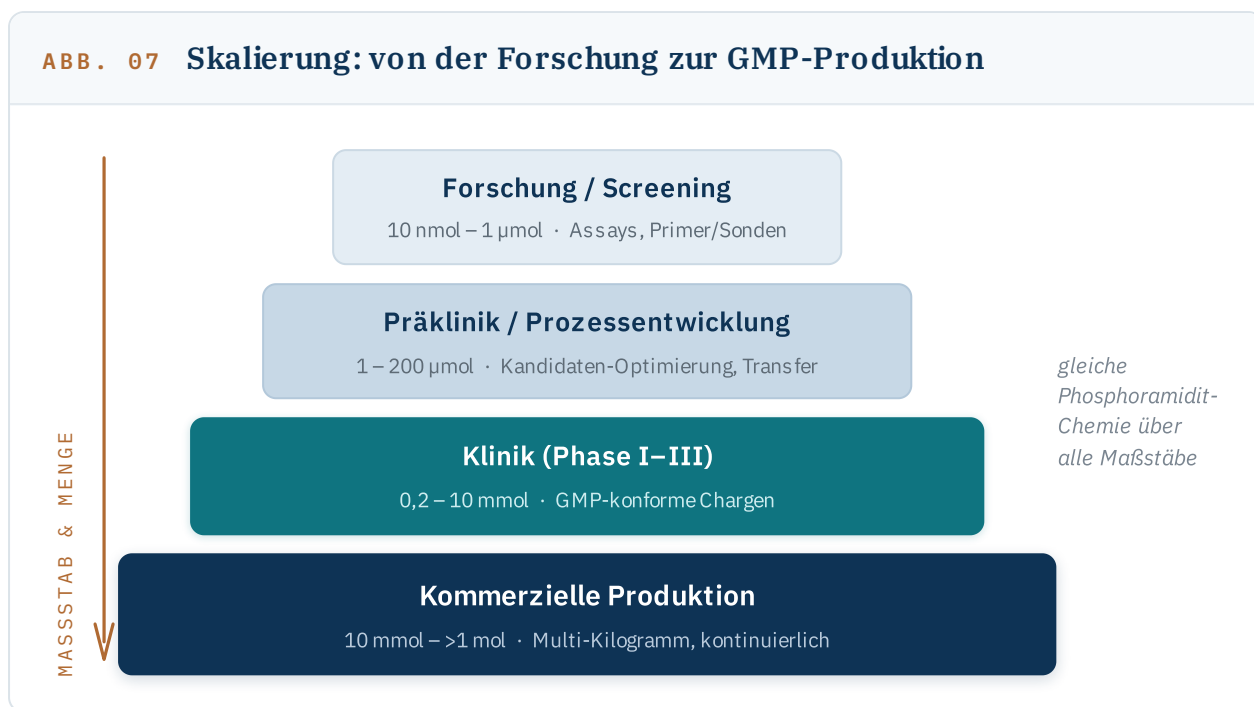
8.2 Konsistenter Methoden- und Skalentransfer

Ein zentrales Prinzip der Prozessentwicklung lautet, über alle Entwicklungsstufen hinweg **dieselbe Synthesechemie** beizubehalten – dieselben Amidit-Bausteine, dieselbe Kupplungschemie, vergleichbare Zyklusparameter. Ein solcher konsistenter Ansatz reduziert das Risiko, dass beim Übergang zwischen Maßstäben neue Verunreinigungsprofile auftreten, und vereinfacht die analytische Brückenbildung zwischen Chargen. Ein durchgängiger Transfer – von der Sequenzoptimierung im Labor bis zur Produktion – verkürzt Entwicklungszeiten und stärkt die regulatorische Nachvollziehbarkeit.

8.3 Kosten- und Nachhaltigkeitsaspekte

Mit zunehmendem Produktionsmaßstab rücken ökonomische und ökologische Aspekte stärker in den Vordergrund. Dazu zählen die **Amidit-Ökonomie**, also die gezielte Reduktion des Amidit-

Überschusses bei gleichbleibender Kupplungseffizienz, sowie Konzepte zum **Lösungsmittel-Recycling**, etwa die Rückgewinnung von Acetonitril. Diese Aspekte sind eng mit der Wahl und Auslegung der Syntheseplattform verknüpft.



09 Der KNAUER OligoScaler

Die Festphasensynthese von Oligonukleotiden folgt im Labor- und im Produktionsmaßstab demselben chemischen Zyklus aus **Detritylierung**, Kupplung, Capping und Oxidation bzw. Sulfurierung. Der Übergang von der Forschungssynthese im Mikromol-Maßstab zu Mengen für präklinische Studien, klinische Prüfmuster oder die kommerzielle Herstellung stellt jedoch andere Anforderungen an Gerätetechnik, Prozesskontrolle und Dokumentation. Reaktionszeiten, Durchmischung, Reagenzienzufuhr und die Entfernung von Nebenprodukten müssen bei größeren Trägerbett-Volumina reproduzierbar ablaufen, ohne dass Kupplungseffizienz oder Sequenzreinheit abfallen. Für diesen Übergang positioniert KNAUER den **OligoScaler** als dedizierte, skalierbare Synthesepattform innerhalb seines Life-Science-Portfolios, das neben (U)HPLC- und präparativen Chromatographiesystemen (AZURA-Reihe) auch Technologien zur Lipid-Nanopartikel(LNP)-Formulierung umfasst.

Konzept und funktionaler Aufbau

Auf konzeptioneller Ebene lässt sich eine solche Synthesepattform als Zusammenspiel mehrerer funktionaler Einheiten beschreiben (Abb. 08):

- **Reagenzien- und Lösungsmittelvorlage** – Bevorratung der Amidit-Lösungen, Aktivator-, Capping-, Oxidations- bzw. Sulfurierungsreagenzien sowie Wasch- und Detritylierungslösungen, ausgelegt für den kontinuierlichen Betrieb über viele Zyklen.
- **Präzise Fluidik** – ein Ventilblock mit Dosierpumpen, der die exakte, zeitlich definierte Zuführung der Reagenzien zur Synthesekolonnen steuert und Kreuzkontamination vermeidet.
- **Synthesekolonnen mit Trägerbett** – das Reaktionsgefäß, in dem der feste Träger (CPG oder polymer) vorgelegt und durchströmt wird; Geometrie und Durchflussführung ermöglichen gleichmäßige Benetzung auch größerer Volumina.
- **Detektions- und Monitoring-Einheit** – eine photometrische Messstelle im Ablauf des Detritylierungsschritts für eine zyklusaufgelöste Verfolgung des Reaktionsfortschritts.
- **Steuerungssoftware** – die Instanz, über die Synthesemethoden definiert, Zyklen parametrisiert und Prozessdaten erfasst und dokumentiert werden.

Diese Beschreibung ist funktions- und konzeptbasiert zu verstehen; sie bildet das allgemeine Prinzip einer automatisierten, skalierbaren Festphasensynthese ab, ohne einzelne Baugruppen oder Spezifikationswerte im Detail festzulegen.

Modulare Plattform für die skalierbare Festphasen-Oligonukleotidsynthese

REAGENZIEN- & LÖSUNGSMITTEL-VORLAGE

Amidite

A G C T/U

Aktivator

Azol / Tetrazol

Oxidation

/ Sulfurierung

Capping A/B

Ac₂O / NMI

Detrityl.

TCA

Wasch-LM

Acetonitril



Präzise Fluidik · Ventilblock & Dosierpumpen



Synthesekolonne

Trägerbett (CPG / PS)

gleichmäßig durchströmt, skalierbares Bett-Volumen



Detritylierungs-Monitoring

UV/VIS · DMT⁺-Kation (495 nm)

Lösungsmittel-Recycling / Abfall

Reagenzien-Ökonomie



Steuerungssoftware & Prozessdokumentation

Methodeneditor · Echtzeit-Trendkurven · Kupplungseffizienz pro Zyklus · Audit-Trail (GMP-fähig) · elektronische Batch-Records

Detritylierungs-Monitoring als Qualitätsmerkmal

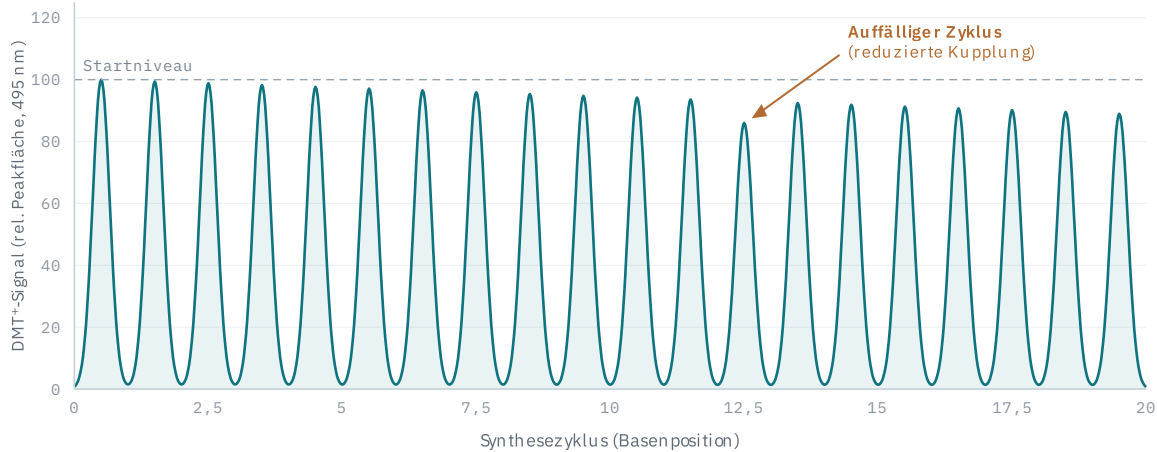
Ein zentrales Element der Prozessüberwachung ist das **Detritylierungs-Monitoring**, auch als **Trityl-Assay** bezeichnet. Bei der Abspaltung der DMT-Schutzgruppe zu Beginn jedes Zyklus wird das freigesetzte **DMT-Kation** (DMT⁺) in Lösung gebracht, das im sichtbaren Spektralbereich eine charakteristische, intensive Absorption zeigt. Wird der Detritylierungsablauf photometrisch verfolgt, lässt sich die pro Zyklus freigesetzte DMT-Menge relativ vergleichen und damit ein indirektes Maß für die Kupplungseffizienz des jeweils vorangegangenen Zyklus ableiten (Abb. 09). Ein deutlicher, unerwarteter Abfall des Trityl-Signals deutet auf eine unvollständige Kupplung oder eine Beeinträchtigung des Trägerbetts hin und kann so frühzeitig erkannt werden.

Für die Prozessentwicklung und die Auslegung neuer Sequenzen oder Trägerchargen liefert die zyklus aufgelöste Trityl-Kurve ein direktes, laufend aktualisiertes Bild des Synthesefortschritts. In Kombination mit einer durchgehenden Dokumentation der Trendkurven ergibt sich eine Grundlage, auf der Abweichungen nachvollzogen und Chargen im Nachhinein bewertet werden können.

PRAXISRELEVANZ

Das Trityl-Signal ist ein relatives, kein absolutes Maß für die Kupplungseffizienz; es ersetzt keine analytische Freigabeproofung des Endprodukts (Kapitel 11), liefert aber ein wertvolles Echtzeit-Werkzeug zur Prozessverfolgung und frühzeitigen Fehlererkennung.

ABB. 09 Detritylierungs-Monitoring: Echtzeit-Qualitätskontrolle pro Zyklus



Die Fläche jedes DMT⁺-Peaks ist proportional zur Kupplungsausbeute des vorangegangenen Schritts – Trends werden sofort sichtbar.

Skalierbarkeit, Software und Anwendungen

Mit zunehmendem Trägerbett-Volumen steigt der Bedarf an Amiditen, Aktivator und Lösungsmitteln näherungsweise proportional an; auf einer für größere Maßstäbe ausgelegten Plattform gewinnt daher der effiziente Umgang mit Reagenzien – etwa durch angepasste Dosierstrategien und teilweise Rückführung von Lösungsmitteln – an Bedeutung. Eine modular aufgebaute Plattform erlaubt es, dieselbe Methodik von der Entwicklung bis zur größeren Herstellungscharge fortzuführen, ohne bei jedem Maßstabswechsel eine neue Systemarchitektur etablieren zu müssen.

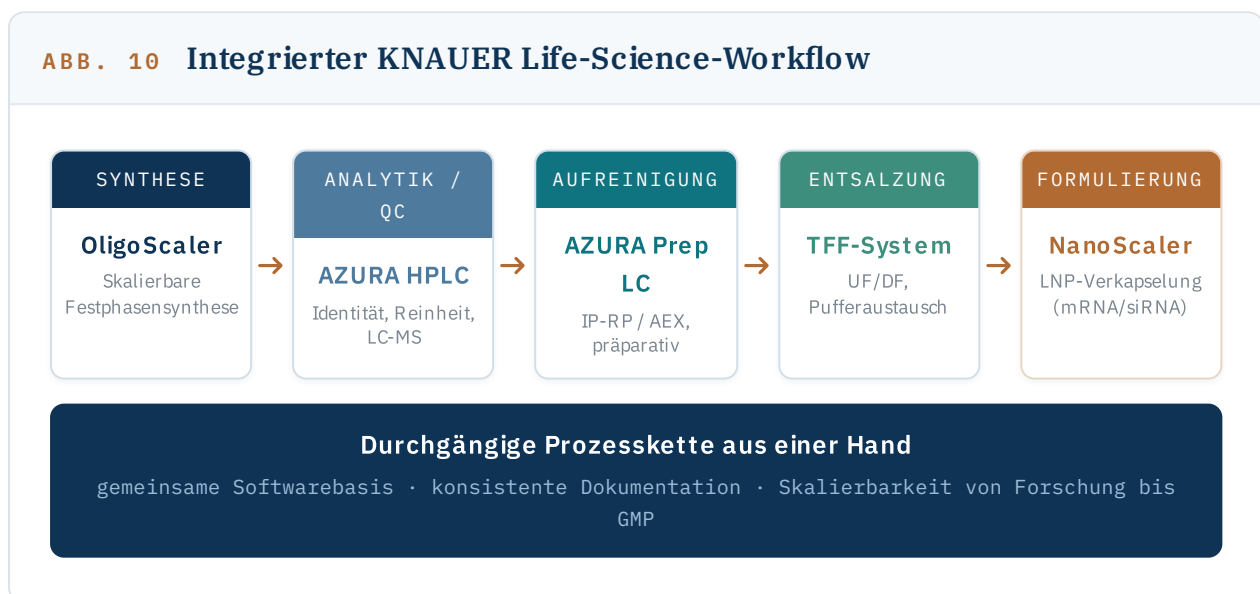
Die Steuerungssoftware umfasst typischerweise einen **Methodeneditor** für Zyklusparameter, Reagenzienvolumina und Reaktionszeiten sowie eine fortlaufende Aufzeichnung von **Trendkurven** (u. a. des Trityl-Signals). Für Anwendungen in Richtung GMP-naher Herstellung sind Funktionen wie ein lückenloser **Audit-Trail**, eine Benutzer- und Rechteverwaltung sowie eine exportierbare Chargendokumentation von Bedeutung. Solche Plattformen richten sich an ein Spektrum von der akademischen und industriellen **Forschung** über die **Prozessentwicklung** bis hin zur **Vorbereitung klinischer bzw. GMP-naher Herstellung** therapeutischer Oligonukleotide.

10 Integration in den KNAUER Life-Science-Workflow

Ein therapeutisches Oligonukleotid – etwa ein **Antisense-Oligonukleotid (ASO)**, ein **siRNA-Duplex** oder eine mRNA – durchläuft nach der eigentlichen Synthese oder Transkription eine Reihe weiterer Prozessschritte, bevor ein applikationsfähiges Produkt vorliegt. Aus Sicht eines Herstellers, der neben der Synthesepattform auch Chromatographie- und LNP-Formulierungstechnologien anbietet, ergibt sich die Möglichkeit, diese Schritte als durchgehende Prozesskette zu betrachten (Abb. 10):

- **Synthese** des Rohprodukts auf der Festphase (OligoScaler),
- **Analytik und Freigabeprüfung (QC)** mittels (U)HPLC-Systemen der AZURA-Reihe,
- **präparative Aufreinigung** über präparative Chromatographie (AZURA-Prep, IP-RP oder AEX),
- **Entsalzung und Pufferaustausch**, häufig über Tangentialflussfiltration (TFF / UF/DF),
- **Formulierung**, bei mRNA- oder siRNA-Wirkstoffen häufig als Verkapselung in **Lipid-Nanopartikel (LNP)**.

ABB. 10 Integrierter KNAUER Life-Science-Workflow



Der Nutzen eines solchen, aus einer Hand stammenden Workflows liegt weniger in einem einzelnen Gerät als in der Konsistenz über die Prozesskette hinweg: eine gemeinsame Softwarebasis und einheitliche Dokumentationslogik erleichtern die Rückverfolgbarkeit vom Ausgangsmaterial bis zum formulierten Produkt, und die Abstimmung der Anlagengrößen zwischen Synthese-, Aufreinigungs- und Formulierungsschritt vereinfacht die Maßstabsübertragung einer einmal etablierten Route.

Diese Prozesskette gewinnt vor dem Hintergrund des wachsenden Feldes der **mRNA-** und **LNP-basierten** Arzneistoffe sowie der zunehmenden Zahl zugelassener Oligonukleotid-Therapeutika

an Bedeutung: Mit steigendem klinischem und kommerziellem Bedarf wächst der Anspruch an robuste, gut dokumentierte und skalierbare Herstellprozesse über die gesamte Kette von der Synthese bis zur Formulierung.

11 Qualitätskontrolle und regulatorische Aspekte

Analytische Freigabeparameter

Unabhängig vom Maßstab der Herstellung muss ein Oligonukleotid-Produkt vor seiner Freigabe anhand mehrerer analytischer Parameter charakterisiert werden:

- **Identität** – in der Regel über **LC-MS**, die das Molekulargewicht des Volllängenprodukts bestätigt und Massenabweichungen durch fehlende oder zusätzliche Basen aufdeckt.
- **Reinheit** – mittels **HPLC** (IP-RP oder AEX) oder **Kapillarelektrophorese**, zur quantitativen Erfassung von Verunreinigungen relativ zum Hauptpeak.
- **Gehalt** – quantitative Bestimmung der Wirkstoffmenge, üblicherweise über UV-Absorption bei 260 nm.
- **Sequenzintegrität** – Bestätigung, dass die Nukleotidabfolge der Zielsequenz entspricht, etwa durch MS-Fragmentierungsanalyse.
- **Endotoxin- und Bioburden-Prüfung** – insbesondere für parenterale oder klinische Anwendungen.

Prozesskontrolle und GMP-Prinzipien

Für die Herstellung klinischer oder kommerzieller Chargen orientieren sich Prozesskontrolle und Dokumentation an den Prinzipien der **Guten Herstellungspraxis (GMP)**, wie sie unter anderem in der **ICH-Q7-Leitlinie** für Wirkstoffe beschrieben sind. Dazu gehören eine lückenlose **Chargendokumentation** (Batch Record), definierte **Reinigungsvalidierung** zwischen Chargen zur Vermeidung von Kreuzkontamination sowie eine durchgehende **Rückverfolgbarkeit** von Ausgangsmaterialien, Prozessparametern und Prüfergebnissen. Die in Kapitel 9 beschriebene prozessbegleitende Dokumentation liefert hierfür einen Teil der erforderlichen Prozessdaten, ersetzt jedoch nicht die vollständige, qualitätsgesicherte Chargendokumentation im regulatorischen Sinn.

Verunreinigungsprofile therapeutischer Oligonukleotide

Therapeutische Oligonukleotide weisen typische, gut charakterisierte Verunreinigungsclassen auf, die im Rahmen der Freigabeprüfung gezielt adressiert werden:

- **(n-1)-Sequenzen** (Fehlsequenzen mit einer fehlenden Base, meist Folge unvollständiger Kupplung) und **(n+1)-Sequenzen** (Sequenzen mit einer zusätzlichen Base).
- **Depurinierung** – der säurekatalysierte Verlust einer Purinbase, begünstigt durch wiederholte saure Detritylierungsschritte.

- **Diastereomere**ngemische bei **Phosphorothioat**-modifizierten Positionen, da die Sulfurierung ein neues Stereozentrum erzeugt.

Die analytische Auflösung und Quantifizierung dieser Verunreinigungs-klassen ist ein wesentlicher Bestandteil der Prozess- und Produktcharakterisierung therapeutischer Oligonukleotide und wird zunehmend auch regulatorisch erwartet.

12 Zusammenfassung und Ausblick

Die Festphasensynthese von Oligonukleotiden ist eine ausgereifte, gut verstandene Chemie, deren zuverlässige Übertragung vom Labor- in den Produktionsmaßstab jedoch eigene technische und prozessuale Anforderungen stellt. Skalierbare Syntheseplattformen wie der KNAUER OligoScaler adressieren diesen Übergang durch eine auf größere Trägerbett-Volumina ausgelegte Fluidik, ein Echtzeit-Detritylierungs-Monitoring zur zyklusaufgelösten Prozessverfolgung sowie eine prozessbegleitende Dokumentation. Eingebettet in eine durchgehende Prozesskette aus Synthese, chromatographischer Aufreinigung, Entsalzung und gegebenenfalls LNP-Formulierung ergibt sich eine Grundlage für die Herstellung von Oligonukleotid-Wirkstoffen von der Forschung bis in Richtung klinischer und kommerzieller Anwendung.

Mehrere Entwicklungslinien prägen das Feld der Oligonukleotidsynthese und -herstellung absehbar auch weiterhin:

- ein wachsender Markt für **Oligonukleotid-Therapeutika** (ASOs, siRNA, weitere Modalitäten), der die Nachfrage nach robusten, skalierbaren Herstellprozessen erhöht,
- ein zunehmendes Interesse an **Nachhaltigkeit und grüner Chemie**, etwa durch reduzierten Lösungsmittelverbrauch und Reagenzien-Recycling,
- die Weiterentwicklung **enzymatischer Syntheseverfahren** als Ergänzung oder Alternative zur klassischen Phosphoramidit-Chemie,
- **Prozessintensivierung** und Ansätze zu kontinuierlichen Syntheseverfahren anstelle klassischer Batch-Zyklen,
- eine fortschreitende **Digitalisierung** der Prozessführung und der Einsatz von Prozessanalysetechnologie (**PAT**) zur laufenden Bewertung der Produktqualität.

KERNAUSSAGE

Konsistente Synthesechemie über alle Maßstäbe, echtzeitfähige Prozessüberwachung und eine durchgängige, dokumentierte Prozesskette sind die drei Säulen einer reproduzierbaren Oligonukleotid-Herstellung – von der Forschung bis zur GMP-Produktion.

13 Anhang: Glossar, Abkürzungen, Literatur

Glossar

Phosphoramidit

Aktivierter, geschützter Nukleosid-Baustein, monomerer Baustein der Festphasensynthese.

CPG (Controlled Pore Glass)

Poröses Glasmaterial, häufig als fester Träger für die Synthese eingesetzt.

Capping

Blockierung nicht umgesetzter 5'-OH-Gruppen nach der Kupplung zur Minimierung von Fehlsequenzen.

Phosphorothioat (PS)

Internukleotidbindung mit Schwefel statt eines Sauerstoffatoms; erhöht die Nuklease-Resistenz.

GalNAc

N-Acetylgalactosamin-Konjugat; vermittelt Aufnahme in Hepatozyten über den ASGP-Rezeptor.

TFF (Tangentialflussfiltration)

Membranverfahren zur Entsalzung, Konzentrierung und zum Pufferaustausch.

DMT-on / DMT-off

Ob die terminale DMT-Gruppe am Endprodukt belassen (on) oder entfernt wird (off).

DMT (Dimethoxytrityl)

Säurelabile Schutzgruppe an der 5'-OH-Funktion, vor jedem Kupplungsschritt abgespalten.

Detritylierung

Säure Abspaltung der DMT-Schutzgruppe zu Beginn jedes Syntheszyklus.

Gapmer

ASO-Design mit zentralem DNA-Abschnitt und modifizierten Flügeln; ermöglicht RNase-H-Abbau.

LNA (Locked Nucleic Acid)

Nukleotidanalogon mit Methylenbrücke; erhöht die Bindungsaffinität zur Ziel-RNA.

IP-RP / AEX

Chromatographische Trennverfahren nach Hydrophobie bzw. Ladung des Oligonukleotids.

Kupplungseffizienz

Anteil der pro Zyklus erfolgreich verknüpften Bausteine; bestimmt Ausbeute und Reinheit.

ASO / siRNA

Antisense-Oligonukleotid bzw. small interfering RNA – zwei therapeutische Wirkstoffklassen.

Abkürzungsverzeichnis

DNA Desoxyribonukleinsäure

RNA Ribonukleinsäure

DMT Dimethoxytrityl

TCA Trichloressigsäure

CPG Controlled Pore Glass

PS Phosphorothioat

ASO Antisense-

Oligonukleotid

siRNA small interfering

RNA

LNA Locked Nucleic Acid

MOE 2'-O-Methoxyethyl

IP-RP Ionenpaar-

Umkehrphase

AEX Anionenaustausch

HILIC Hydrophile

Interaktion

LC-MS LC-

Massenspektrometrie

TFF

Tangentialflussfiltration

UF/DF Ultra-/Diafiltration

GMP Gute

Herstellungspraxis

GalNAc N-

Acetylgalactosamin

NGS Next-Generation

Sequencing

PAT Process Analytical

Tech.

ICH Int. Council f.

Harmonisation

Weiterführende Literatur und Quellen

1. Merrifield, R. B. (1963): Grundlegende Arbeit zur Festphasensynthese von Peptiden, die das methodische Prinzip begründete, auf dem auch die Oligonukleotidsynthese aufbaut.
2. Letsinger, R. L. u. Mitarb. (1960er–1970er): frühe Arbeiten zur Festphasensynthese von Oligonukleotiden und zur Entwicklung chemischer Kupplungsstrategien.
3. Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. (1981): grundlegende Arbeit zur Phosphoramidit-Methode, die die heute dominierende Synthesechemie etablierte.
4. Übersichtsartikel bzw. Lehrbuchkapitel zur chemischen Festphasensynthese von Oligonukleotiden (Reagenzien, Zyklus, Schutzgruppenstrategien).
5. Aktueller Übersichtsartikel zu therapeutischen Oligonukleotiden (ASOs, siRNA, GalNAc-Konjugate) zu Wirkmechanismen, Modifikationen und klinischem Entwicklungsstand.
6. KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH: Produkt- und Fachinformationen zum OligoScaler sowie zum AZURA-Portfolio und zur LNP-Formulierungstechnologie ([knauer.net](https://www.knauer.net)). Für aktuelle Spezifikationen wird auf die jeweils gültige Herstellerdokumentation verwiesen.