

Schlussbericht Teil I (SenseUP GmbH)

KMU_i Bioökonomie

Fermentative RNA-Produktion

SenseUp GmbH

031B1114A

ZE

Förderkennzeichen

Fermentative RNA-Produktion

Vorhabenbezeichnung

04/2021-03/2024

Laufzeit des Vorhabens

04/2021-03/2024

Berichtszeitraum

SenseUp GmbH
Campus Forschungszentrum
52428 Jülich

Dr. rer. nat. Georg Schaumann
Tel +49 (0)2461 61 5529
g.schaumann@senseup.de

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Die Verantwortung für den Inhalt dieser
Veröffentlichung liegt beim Autor

I. Aufgabenstellung & Stand der Technik

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung einer Plattformtechnologie für die fermentative Produktion RNA-basierter Wirkstoffe, die z.B. als Biopestizide eingesetzt werden können. Gegenüber herkömmlichen Technologien, mit denen RNA nur im Gram-Maßstab zu Kosten von über 1.000 € pro Gram produziert werden kann, sollte die zu entwickelnde Plattformtechnologie eine beliebig skalierbare Produktion im Kilogramm-Maßstab ermöglichen und die Kosten auf unter 1 € pro Gram reduzieren. Diese Ziele konnten erheblich übertroffen werden.

II. Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde in 6 Arbeitspakete unterteilt, die in Kooperation mit der Universität Bielefeld, Center for Biotechnology (CeBiTec) durchgeführt wurden.

III. Wesentliche Ergebnisse

Mittels *metabolic engineering* und insbesondere Biosensor basierter *natural evolution* Routinen konnte der Titer heterologer Ziel-RNAs auf bis zu 1,8 g/L Kulturbrühe gesteigert werden (siehe Abbildung 1) und die maximale Länge heterologer Ziel-RNAs von wenigen Hundert Nukleotiden auf bis zu 1,9 KB gesteigert werden. Dies ist in erster Linie auf die Kombination starker Promotoren mit *high-copy-number* Plasmiden, gerichtetes und ungeichtetes Ausschalten von RNase-Aktivitäten und die thermodynamische Stabilisierung von RNA-Sekundärstrukturen (siehe Abbildung 2) zurückzuführen. Die Template-Sequenzstabilität und damit Qualität der synthetisierten RNAs konnte durch vollständiges Ausschalten von Rekombinaseaktivitäten maximiert werden. Damit ist es möglich auch hochrepetitive Template-Sequenzen wie PolyA₈₀ Tails stabil zu halten und für die *in vivo* Produktion entsprechender RNA-Moleküle zu verwenden. Die *in vivo* Stabilität polyadenylierter RNAs konnte durch nicht-endständige Einbettung der PolyA-Tails erreicht werden, die gleichzeitig eine Affinitätsaufreinigung mit folgender spurloser enzymatischer Abspaltung der Endgruppe ermöglicht. Die im Rahmen des Vorhabens erzielten Ergebnisse wurden in 3 Patentanmeldungen geschützt.

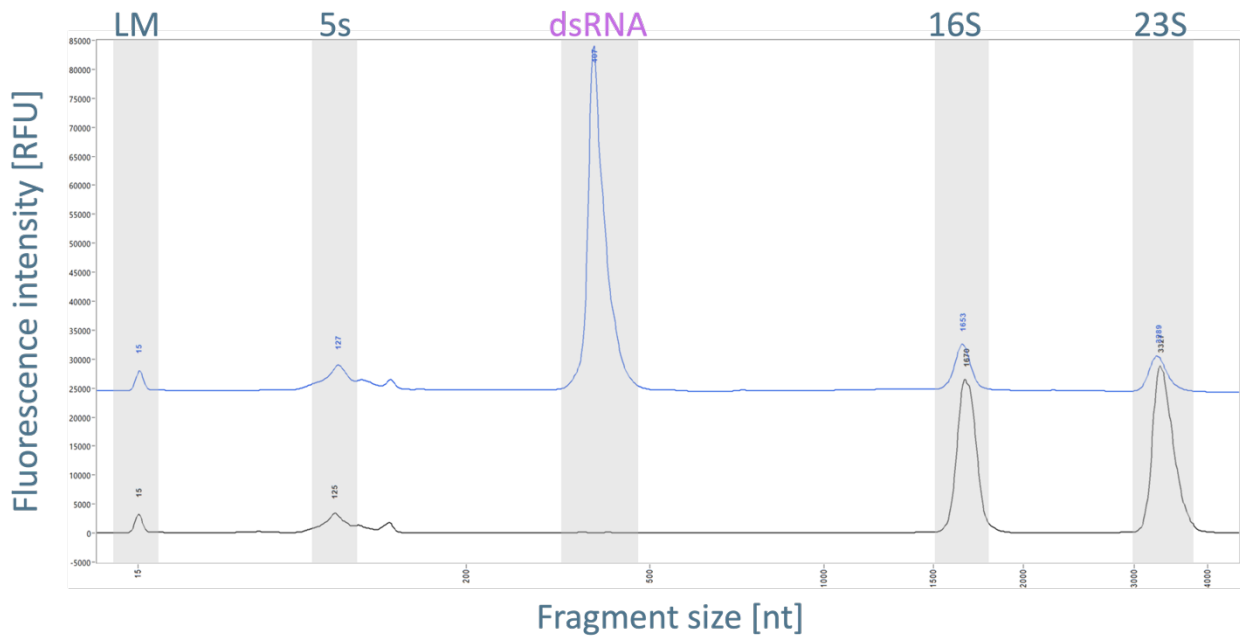


Abbildung 1: Elektroferrogramme zur qualitativen und quantitativen Analyse von Total-RNA-Extrakten dsRNA-exprimierender *C. glutamicum* Stämme. Schwarz, *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm; Blau, im Berichtszeitraum evolutiv optimierter *C. glutamicum* RNA-Produktionsstamm. LM, Laufmarker; 5s, 5s rRNA; dsRNA, heterologe Ziel-dsRNA; 16s, 16s rRNA; 23s, 23s rRNA.

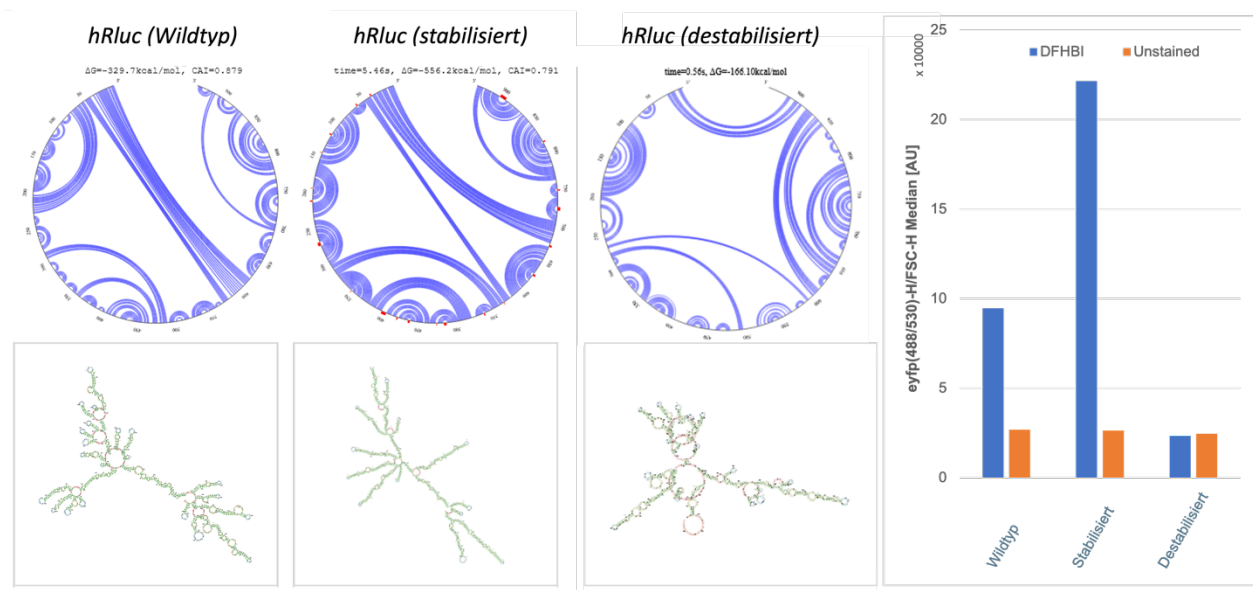


Abbildung 2: Links, Chord Diagramme, MFE ΔG sowie Illustrationen der Sekundärstrukturen von hRluc (Wildtyp), der thermodynamisch stabilisierten sowie destabilisierten RNA-Sequenz. Rechts, Titer der entsprechenden Transkripte in *C. glutamicum* Stämmen, detektiert via DFHBI vermittelter Fluoreszenz bei 488/530nm.

Schlussbericht Teil II (SenseUP GmbH)

KMU_i Bioökonomie

Fermentative RNA-Produktion

SenseUp GmbH

031B1114A

ZE

Förderkennzeichen

Fermentative RNA-Produktion

Vorhabenbezeichnung

04/2021-03/2024

Laufzeit des Vorhabens

04/2021-03/2024

Berichtszeitraum

SenseUp GmbH
Campus Forschungszentrum
52428 Jülich

Dr. rer. nat. Georg Schaumann
Tel +49 (0)2461 61 5529
g.schaumann@senseup.de

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Die Verantwortung für den Inhalt dieser
Veröffentlichung liegt beim Autor

I. Aufgabenstellung & Stand der Technik

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung einer Plattformtechnologie für die fermentative Produktion RNA-basierter Wirkstoffe. Diese werden als neue Wirkstoffklasse zunehmend in landwirtschaftlichen, forstwirtschaftlichen und pharmazeutischen Anwendungen eingesetzt und haben das Potential, Multi-Milliardenmärkte z.B. für Biopestizide zu revolutionieren. Diese stellen eine hochinteressante Alternative zu chemischen Pestiziden dar, da sie ein sehr breites Anwendungsspektrum bieten und durch ihre außerordentlich hohe Selektivität ökologisch unbedenklicher erscheinen. Es ist zu erwarten, dass die Bedeutung RNA-basierter Biopestizide künftig drastisch zunehmen wird, da der chemische Pflanzenschutz durch immer mehr Verbote und wenig neue Wirkstoffe immer problematischer wird und gleichzeitig wirkungsvolle Pestizide dringend benötigt werden, da durch Pflanzenschädlinge bis zu 40% der weltweiten Agrarproduktion verloren gehen, was einem jährlichen Schaden von ca. 100 Mrd. US-Dollar entspricht.

RNA-basierte Biopestizide greifen auf doppelsträngige RNA (dsRNA) zurück, die in Zellen des Zielorganismus (dem Pflanzenschädling) zu kleinen einzelsträngigen RNA-Fragmenten, der sogenannten RNA-Interferenz (RNAi) gespalten wird. Diese RNAi führt dann durch Hybridisierung mit RNAs der Zielzellen zum silencing spezifischer Gene und damit zur gezielten Eindämmung der Schädlingsausbreitung. Für landwirtschaftliche Anwendungen werden große Mengen dieser dsRNA benötigt (bei großflächiger Nutzung Hunderte Tonnen). Die Herstellung solcher großer Mengen RNA-basierter Wirkstoffe ist mit herkömmlichen Methoden jedoch sehr teuer bzw. nicht möglich (> 1.000 €/g RNA).

Die kommerzielle Produktion erfolgte bisher vorwiegend per in vitro Transkription (IVT), bei der mehrere hochreine Enzyme, Nukleotide, Kofaktoren und weitere definierte Reaktionskomponenten in umfassend kontrollierter Umgebung reagieren. Damit können qualitativ alle Ansprüche an das Produkt erfüllt werden, quantitativ unterliegt man aber starken Limitationen, da erstens alle Reaktionskomponenten sehr teuer sind und die in vitro Synthese größerer RNA-Mengen daher außerordentlich hohe Kosten verursacht und zweitens, einer Skalierung der Reaktionen technisch enge Grenzen gesteckt sind. Eine kostengünstigere, auf *E. coli* Rohextrakten basierende IVT wurde von der Firma Greenlight Biosciences (US) entwickelt und zur Produktion des weltweit ersten zugelassenen, sprühbaren dsRNA-Produktes zur Kontrolle des Colorado Potato Beetle verwendet (Calantha®, EPA-Zulassung in den USA am 4. Januar 2024). Der Produktionsprozess ist im Vergleich zum SenseUP-Prozess jedoch erheblich aufwendiger und bedarf

maßgeschneiderter Produktionsanlagen, die eine unflexible, CAPEX- und zeitintensive Skalierung mit sich bringen.

Die im Rahmen des Vorhabens zu entwickelnde Plattformtechnologie für die fermentative Produktion RNA-basierter Wirkstoffe sollte eine beliebig skalierbare Produktion im Kilogramm-Maßstab ermöglichen und die Kosten signifikant reduzieren. Die in der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung genannten Ziele (RNA-Titer >1g/L, Produktionskosten <1 €/g und Produktionspotential im Kg-Maßstab) konnten mit ~1,8 g/L, 0,29 €/g und Produktionspotential im Hundert-Tonnen Maßstab erheblich übertroffen werden.

II. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde in 6 Arbeitspakete unterteilt, die in Kooperation mit der Universität Bielefeld, Center for Biotechnology (CeBiTec) durchgeführt wurden (siehe Tabelle 1). Während der Laufzeit des Vorhabens wurde das Ziel der Arbeitspakete 3.4 und 3.5 angesichts neuer, vom Vorhaben unabhängiger technologischer und wirtschaftlicher Entwicklungen angepasst (siehe detaillierte fachliche Begründung auf Seite 10).

Tabelle 1: Arbeitsplan und Entwicklungsstand der Teilprojekte. Der SenseUp GmbH zugeordnete Arbeitspakete sind in schwarzer Schrift, dem CeBiTec zugeordnete Arbeitspakete in blauer Schrift dargestellt.

✓ (erfolgreich), ↗ (angepasst)

Status	Beschreibung
AP1	Erhöhung von RNA-Titer und -Länge
✓	1. Promotor/Terminator-Optimierung (plasmidbasiert)
✓	2. Konstruktion & Evaluation von ultra-high copy Plasmiden
✓	3. Loci- & Cassetten-Optimierung (chromosomal)
✓	4. Einsatz von Antiterminationssequenzen
AP2	Erhöhung der RNA-Stabilität
✓	1. Konstruktion & Evaluation von RNase Deletionsstämmen
✓	2. Sequenzspezifische Stabilisierung über anti-sense Oligonukleotide
AP3	RNA-Modifizierung (3'-Polyadenylierung & 5'-Capping)
✓	1. Konstruktion & Evaluation von RecA-Deletionsstämmen
✓	2. Etablierung hochpräziser PolyA-Analytik
✓	3. Untersuchung spezifischen Abbaus polyadenylierter Sequenzen

~	4. In vitro Capping im Fermentationsextrakt Produktion größerer dsRNA-Mengen mittels Batch-Fermentation
~	5. In vivo Capping mittels Dinucleosid-Tetraphosphaten dsRNA-schützende Inaktivierung der Biomasse
AP4	Evolute Optimierung
✓	1. RNA-Titer
✓	2. RNA-Länge
✓	3. RNase-Aktivität
✓	4. PolyA-Homogenität
AP5	Etablierung des down stream Prozess
✓	1. Evaluation des down-stream Prozess
✓	2. Affinitätsreinigung aus Fermentationsextrakt
AP6	Projektleitung
✓	1. Projektkoordination & Management

III. Wesentliche Ergebnisse

AP1: Erhöhung von RNA-Titer und -Länge

AP1.1 Promotor/Terminator-Optimierung (plasmidbasiert)

Im Zuge dieses Arbeitspaketes wurden verschiedene Promotor- und Terminator-Sequenzen mit dem Ziel verglichen, eine für RNA-Titer und -Länge optimale Kombination zu identifizieren. Zu Beginn des Projektes wurde ein Plasmid genutzt, das in etwa 30 Kopien pro Zelle vorliegt. Als Promotoren kamen der konstitutive F1 Promoter aus dem Bakteriophagen BFK20, sowie der induzierbare Promotor des Bakteriophagen T7 (zzgl. chromosomal- oder Plasmid-kodierter T7-Polymerase) und der konstitutive, synthetische Promoter Tac zum Einsatz. Als exemplarische RNA-Sequenzen wurden ein Abschnitt der humanen kleinen nuklearen RNA (*u1a*, 106 nt), das Strukturgen des Fluoreszenzproteins aus *Aequorea victoria* (*egfp*, 791 nt), das Strukturgen der Luciferase *hrluc* aus *Rhenilla reniformis* (936 nt) sowie das Strukturgen der Luciferase *luc2* aus *Photinus pyralis* (1653 nt) verwendet. Diese Zielsequenzen wurden mit einer Sensorsequenz (105

nt) fusioniert. Das sogenannte Broccoli RNA-Aptamer (im Folgenden als Broccoli Aptamer bezeichnet) bindet das Fluorophor (Z)-4-(3,5-Difluoro-4-hydroxybenzylidene)-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-one (DFHBI) und der so entstandene Komplex emittiert ein Fluoreszenzsignal, das deutlich stärker ist, als die Fluoreszenz von ungebundenem DFHBI. Somit ermöglicht die Fusion der Zielsequenz mit der Sensorsequenz die nichtinvasive Detektion *in vivo* produzierter RNA-Moleküle über gängige Fluoreszenzdetektionsmethoden (s. Abb. 1).

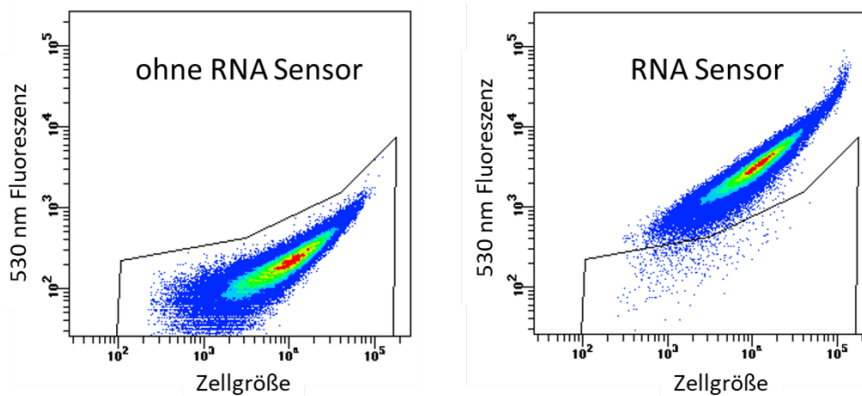


Abbildung 1: Durchflusszytometrische Aufnahmen von *C. glutamicum* Δrnc , transformiert mit pSU1-PT7-hrluc-TT7 (links) und pSU1-PT7-hrluc F30::broccoli-TT7 (rechts). Jeweils gemessen 10 min nach Zugabe von 500 μ M DFHBI.

Die Fluoreszenzintensität wurde durchflusszytometrisch in einem BD Biosciences, FACSAriaIII untersucht. Nach erfolgter RNA-Totalisolierung aus der Kulturbrühe wurde außerdem das RNA-Fragmentprofil mittels Kapillarelektrophore untersucht. Hierzu wurde ein Agilent Fragment Analyzer verwendet.

Die Produktion der o.g. RNA Sequenzen konnte unter diesen Voraussetzungen nicht nachgewiesen werden. Durch die chromosomale Deletion des Gens der Ribonuklease III (siehe AP 2.1) wurde die Produktion von U1A-Sensor RNA, ausgehend von pJC2-PT7-U1A-Sensor-TBKF20, möglich.

AP1.2 Konstruktion und Evaluierung von ultra-high copy Plasmiden

Wie in AP1.1 beschrieben konnte auf Basis einer Plasmidkopienzahl von ca. 30 pro Zelle keine ausreichende Gendosis erreicht werden. Das Plasmid trägt das pHM1519 Replikon und repliziert mittels *rolling-circle replication*. Dieses in *C. glutamicum* hyperreplizierende Replikon wurde mit dem pUC18 Replikationsursprung (ca. 600 Kopien in *Escherichia coli*) kombiniert, woraus das Plasmid pSU1 resultierte. Für die Klonierung sensibler *templates* (beispielsweise homopolymerische Sequenzen wie PolyA₈₀ s. AP3.1) wurde der in *C. glutamicum* hyperreplizierende Replikationsursprung mit dem pMB Replikationsursprung (Ca. 20-30 Kopien in *Escherichia coli*) kombiniert, woraus pSU2 hervorging.

AP1.3 Loci- & Cassetten-Optimierung (chromosomal)

Siehe Schlussbericht des CeBiTec.

AP1.4 Einsatz von Antiterminationssequenzen

Siehe Schlussbericht des CeBiTec.

Meilensteine:

Tabelle 2: Meilensteine Arbeitspaket 1

✓ (erreicht), ~ (angepasst)

	Monat	Meilenstein	Kriterien und Zielparameter
✓	12	1.1	Erreichen eines Ziel-RNA*-Titers von >400 mg/L im fed-batch Prozess
✓	12	1.3	Erreichen einer Ziel-RNA*-Länge von >800 bp

AP2: Erhöhung der RNA-Stabilität

AP2.1 Konstruktion und Evaluation von RNase Deletionsstämmen

Das Strukturgen der Ribonuklease III (RNaseC) wurde in insgesamt 6 verschiedenen *C. glutamicum* Wildtypen deletiert. Alle erstellten Stämme wiesen die für die Deletion des *rnc* Gens typische Steigerung der RNA-Ausbeute bei RNA-Totalisolationen auf und ermöglichen die Produktion der in AP1.1 beschriebenen RNAs. Darauf aufbauend wurden im aktuellen Berichtszeitraum weitere RNase-Deletionen untersucht, namentlich RNaseR, PNP und RNaseE. Die Deletion der RNaseE in Kombination mit Δrnc war nicht möglich. Es wird vermutet, dass diese Deletionskombination in einem letalen Phänotyp resultiert, da möglicherweise essentielle Schritte der zellulären RNA-Prozessierung gestört sein könnten. Die Deletion der RNaseR in Kombination mit Δrnc wurde erfolgreich vorgenommen, es zeigten sich jedoch keine Vorteile im Sinne höherer Ziel-RNA Titer. Die Deletion der PNP zusätzlich zur RNaseC erschien theoretisch geeignet, insbesondere den Abbau polyadenylierter RNA zu verhindern und wurde daher in zahlreichen Stämmen untersucht. Der vermutete Effekt konnte aber nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse boten jedoch Anlass zur Spekulation, dass ein Abbau polyadenylierter Sequenzen insbesondere bei deren Endständigkeit erfolgt. Im Umkehrschluss wurde erwogen, dass der Abbau bei nichtendständiger Position reduziert werden könnte. Dies wurde experimentell untersucht und bestätigt. Abbildung 2 illustriert die höhere relative Abundanz polyadenylierter Ziel-RNAs für PolyA₁₀ und PolyA₈₀-tails.

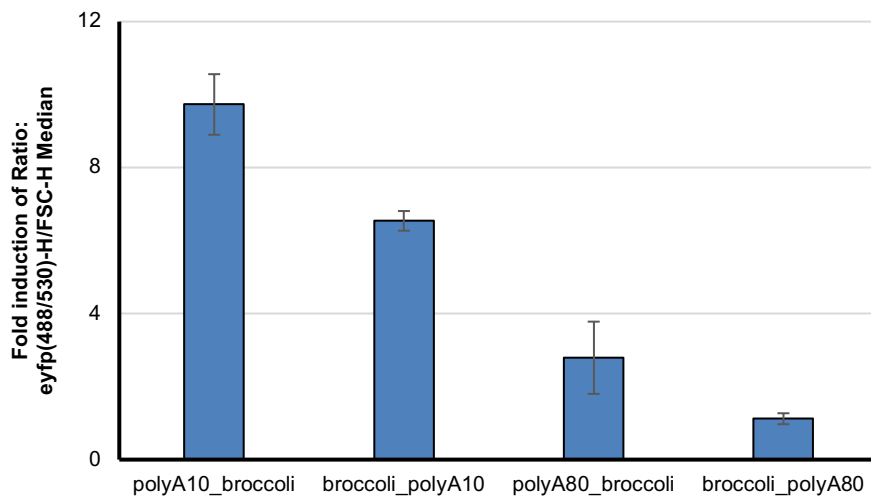


Abbildung 2: Relative Titer *in vivo* polyadenylierter Ziel-RNA mit endständigem und nicht-endständigem PolyA₁₀ bzw. PolyA₈₀ Tail. Gemessen wurde das Broccoli-basierte RNA-Sensorsignal als direkte Korrelation zur Abundanz der entsprechenden RNA.

Als abschließendes Ergebnis zeigt Abbildung 6 den Nachweis, *in vivo* produzierter RNA-Moleküle (Luziferase enkodierende Sequenz *hRluc*) mit PolyA₁₀- bzw. PolyA₈₀ Tails. Es wurde eine Patentanmeldung zur *in vivo* Produktion polyadenylierter RNA unter der Nummer EP23206560.7 angemeldet.

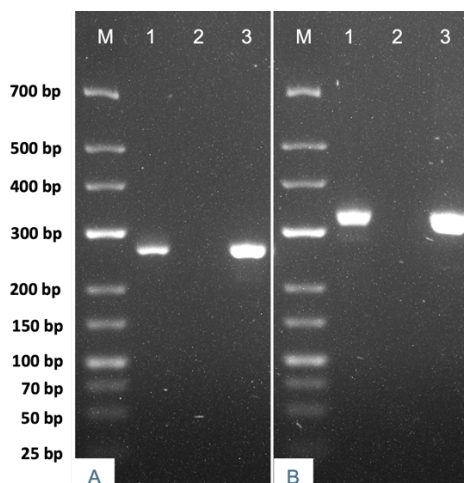


Abbildung 3: RT-PCR-Proben und Kontrollen von polyadenylierten RNAs, die durch *in-vivo*-Produktion in *C. glutamicum* Zellen erzeugt wurden. 1) zeigt die DNaseI-behandelten, RT-PCR-amplifizierten polyA-haltigen Fragmente der angegebenen Template-Plasmide. 2) zeigt die PCR-amplifizierte, DNaseI-behandelte RNA-Probe (Negativkontrolle; keine RT). 3) zeigt das PCR-amplifizierte Template-Plasmid, das für die RNA-*In-vivo*-Produktion verwendet wurde (Kontrolle). M, Marker. A, hRluc-polyA₁₀-broccoli. B, hRluc-polyA₈₀-broccoli

AP2.2 Sequenzspezifische Stabilisierung über anti-sense Oligonukleotide

Auch die in diesem Arbeitspaket geplanten Arbeiten nahmen, angesichts einer unerwarteten Entdeckung, einen sehr erfolgreichen, aber von der ursprünglichen Idee abweichenden, Verlauf. Anstelle sequenzspezifischer antisense Oligonukleotide werden bioinformatische Methoden zur Optimierung von RNA-Sekundärstrukturen eingesetzt, um einzelsträngige und damit verstärktem Abbau ausgesetzte Bereiche einer Ziel-RNA Sequenz zu minimieren. Das antisense Konzept bleibt also erhalten, wird aber anstelle artifizierlicher

Oligonukleotide durch interne Faltung der Ziel-RNA erreicht. Siehe dazu die Ausführungen zu AP4.3. Abbildung 4 illustriert zusammenfassend die Auswirkung sowohl stabilisierter als auch destabilisierter Sekundärstrukturen am Beispiel der Luziferase enkodierenden Sequenz *hRluc*. Es wurde eine Patentanmeldung mit dem Titel „Methods for RNA production“ unter der Nummer EP23151835.8 angemeldet.

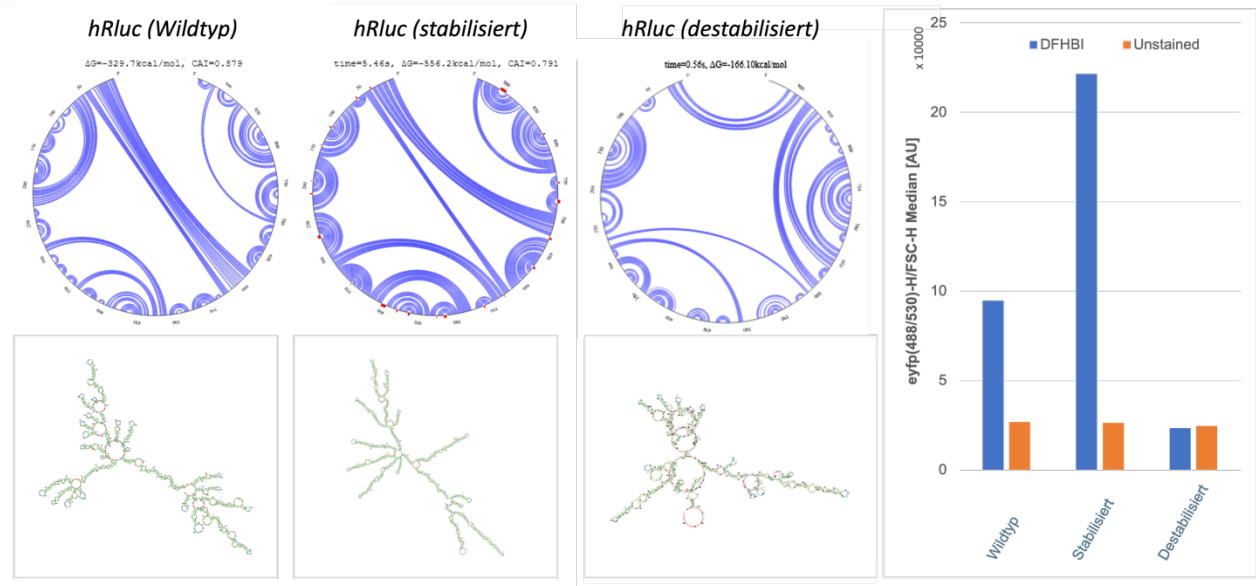


Abbildung 4: Links, Chord Diagramme, MFE ΔG sowie Illustrationen der Sekundärstrukturen von *hRluc* (Wildtyp), der thermodynamisch stabilisierten sowie destabilisierten RNA-Sequenz. Rechts, Titer der entsprechenden Transkripte in *C. glutamicum* Stämmen, detektiert via DFHBI vermittelter Fluoreszenz bei 488/530nm.

Meilensteine:

Tabelle 3: Meilensteine Arbeitspaket 2

✓ (erreicht), ~ (angepasst)

	Monat	Meilenstein	Kriterien und Zielparameter
✓	24	2.1	Identifizierung der produktivsten RNase-Deletionskombination
✓	24	2.2	Quantifizierung sequenzspezifischer Stabilisierung an zwei Ziel-RNAs

AP3: RNA-Modifizierung

AP3.1 Konstruktion und Evaluation von RecA-Deletionsstämmen

Dieses Arbeitspaket wurde entsprechend der Planung erfolgreich durchgeführt.

Die in AP3.2 beschriebenen Konstrukte mit PolyA₈₀ wurden genutzt um die erzeugten DrecA Stämme zu transformieren. Nach selektiver Kultivierung auf Agaplaten wurden je 8 Kolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR auf verkürzende Rekombination der PolyA₈₀ Sequenzen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass recA-defiziente Stämme keine Verkürzung der PolyA₈₀ Sequenz des Template-Plasmides aufwiesen, während in recA-Wildtyp Stämmen bereits nach einmaliger Kultivierung 25 % der Kolonien eine verkürzte PolyA-Vorlagesequenz aufwiesen (s. Abb. 3). In *E. coli* Stämmen mit bereits teilweiser Reduktion der homologen Rekombinationsaktivität erfolgte diese unerwünschte Verkürzung des PolyA-Templates gar in fast 90% der Kolonien.

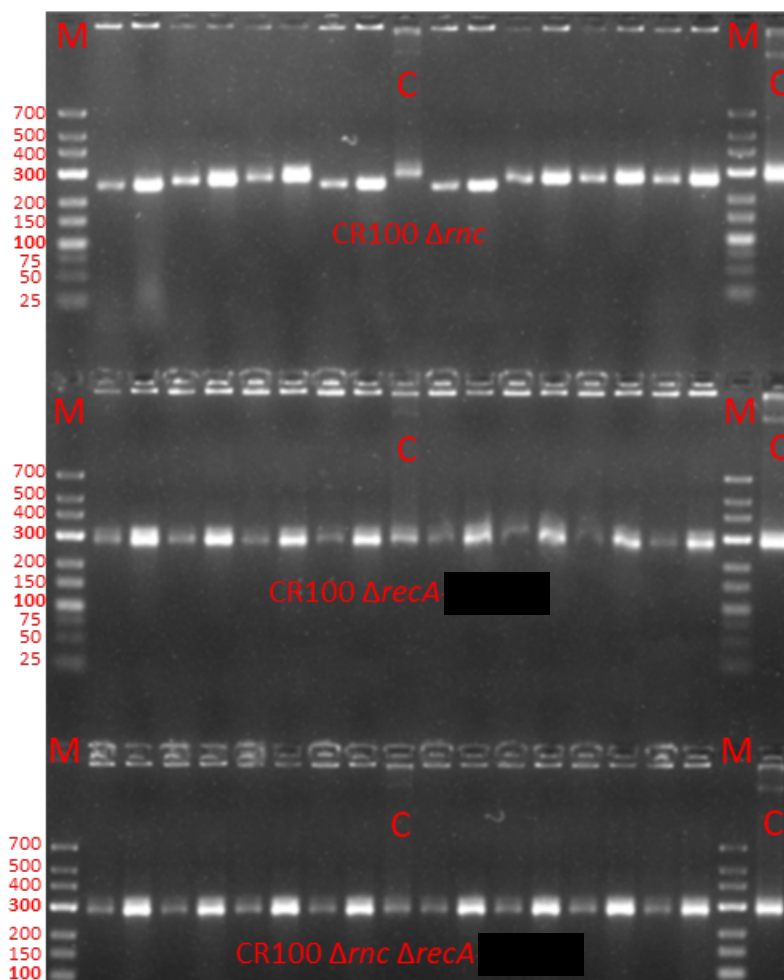


Abbildung 5: Einfluss der recA-Deletion auf die Stabilität von polyA₈₀ Vorlageplasmiden in je acht Kolonien von *C. glutamicum* Δrnc (Oberste Reihe), *C. glutamicum* ΔrecA (Mittlere Reihe) und *C. glutamicum* Δrnc ΔrecA (unterste Reihe). Die Stämme wurden mit dem Vorlageplasmid pSU2-P_{F1}-U1a-PolyA₈₀Sensor-T_{rmB} transformiert. Nach selektiver Kultivierung wurde mittels cPCR ein 297 bp Fragment amplifiziert, das den polyA₈₀ Bereich enthält. Ein cPCR Produkt mit verringerter Länge zeigt eine Verkürzung der PolyA₈₀ Sequenz an. Alle Reaktionen wurden als 2 μL und 8 μL Proben aufgetragen, um mengenbedingte Fehlinterpretationen auszuschließen. Abkürzungen: M, Größenmarker GeneRuler Low Range DNA Ladder; C, Kontrollreaktion bei der das Vorlageplasmid eingesetzt wurde.

Eine finale Bestätigung der Stabilität repetitiver Template-Sequenzen in diesen Stämmen erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Abbildung 6). Es wurde eine Patentanmeldung mit dem Titel „Strains having reduced recombination activity“ unter der Nummer EP23206554.0 angemeldet.

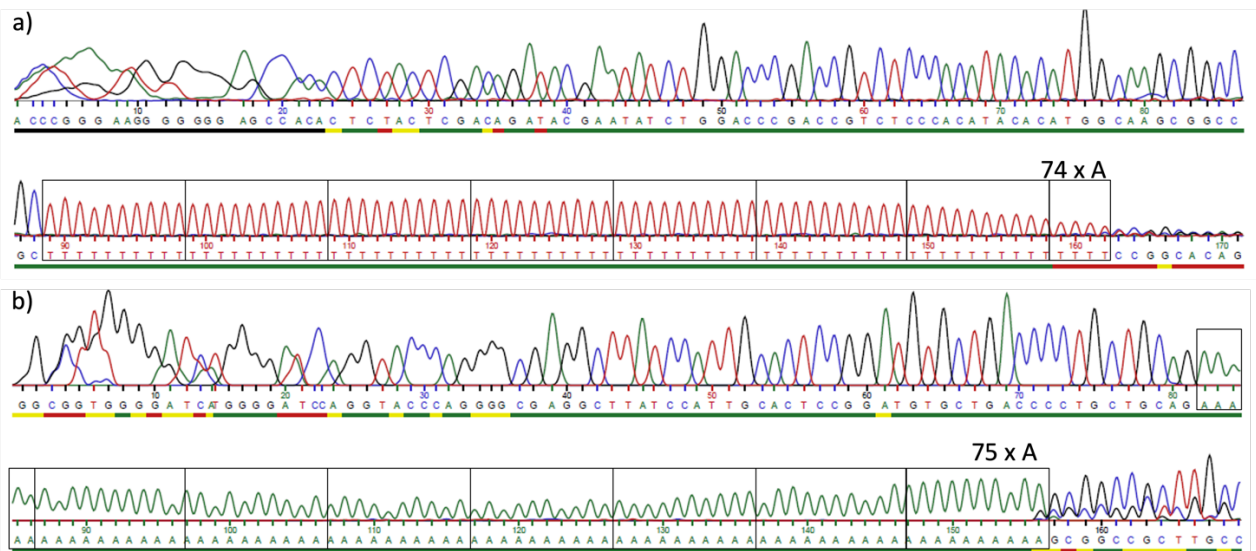


Abbildung 6: Nachweis der intakten PolyA₈₀-Tails in den aus *recA*-Deletionsstämmen erhaltenen Template-Plasmiden mittels Sanger-Sequenzierung. Eine Abweichung der Analyseergebnisse vom Soll-Wert um wenige Nukleotide ist technisch bedingt und wird regulatorisch akzeptiert.

AP3.2 Etablierung hochpräziser PolyA-Analytik

Siehe Schlussbericht des CeBiTec.

AP3.3 Untersuchung spezifischen Abbaus polyadenylierter Sequenzen in *C. glutamicum*

Siehe Schlussbericht des CeBiTec.

AP3.4 *In vitro* Capping im Fermentationsextrakt / Produktion größerer dsRNA-Mengen mittels Batch-Fermentation

Das ursprüngliche Ziel dieses Arbeitspaketes (*In vitro* Capping im Fermentationsextrakt) wurde – wie im zweiten Zwischenbericht angezeigt – angesichts veränderter technologischer Anforderungen und reduzierter Verwertungsperspektiven nicht weiterverfolgt.

Angesichts der COVID19-Pandemie verliefen die globalen Entwicklungen zu mRNA-Wirkstoffen während der Laufzeit des Vorhabens mit zuvor nie dagewesener Geschwindigkeit und Dynamik, u.a. mit neuen Erkenntnissen zur Überlegenheit modifizierter Basen enthaltender mRNA-Therapeutika (BioNtech vs. CureVac) sowie Bemühungen führender Hersteller pharmazeutischer mRNA zur Entwicklung neuartiger Cap-Strukturen. Vor diesem Hintergrund erschien eine aufwendige Entwicklung von Technologien zur Produktion einzelner, vermutlich in naher Zukunft überholter RNA-Modifikationen sowohl wissenschaftlich als auch hinsichtlich IP und Verwertungsperspektiven im Rahmen dieses Vorhabens nicht plausibel. Zeitgleich erfuhren nicht-pharmazeutischen RNA-Anwendungen im Pflanzenschutz, Bienenschutz, der Forstwirtschaft, Lebensmittelkonservierung und

Tiergesundheit, einerseits durch die prominente Rolle der RNA in der COVID-Pandemie und andererseits durch den weltweit dringenden Bedarf an nachhaltigen Alternativen zu herkömmlich eingesetzten Pestiziden und Antibiotika sehr hohe Aufmerksamkeit. Die resultierenden Marktbedürfnisse, die technologischen Vorteile der im Rahmen des Vorhabens entwickelten Produktionsplattform und deren Verwertungsperspektiven stellten und stellen sich folglich hochattraktiv dar. Insbesondere die Verwendung von *C. glutamicum* stellt in diesen Anwendungen einen einzigartigen Vorteil dar, da der GRAS und EFSA QPS Status auf der einen Seite und das intrazelluläre Produktionskonzept auf der anderen Seite die Verwendung dsRNA-enthaltender Zellen als Postbiotikum ermöglichen und auf diese Weise erhebliche Herausforderungen in der Formulierung und Zulassung von RNA-basierten Wirkstoffen umgehen. Daher stand dieses Konzept im weiteren Verlauf des Vorhabens im Fokus und es wurden darauf gerichtete, zusätzlich notwendige Entwicklungsschritte bearbeitet.

Daher wurden unter AP3.4 Arbeiten zur Produktion größerer Mengen dsRNA-enthaltender Zellen mittels Batch-Fermentation durchgeführt. In zahlreichen Batch-Kultivierungen wurden über 20 verschiedene dsRNA-Sequenzen produziert und insgesamt Gramm-Mengen dsRNA erzeugt, die für verschiedene Versuche zur Downstream-Prozessierung und Stabilität verwendet wurden. Durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden dabei maximale Titer von 1,8 g/L erreicht. Damit wurde der in diesem Vorhaben anvisierte Meilenstein 4.1 um 80% übertroffen. Gegenüber alternativen *in vivo* Produktionsverfahren für dsRNA auf Grundlage anderer Organismen wie z.B. *E. coli*, entspricht dies einem 10-fach höheren Titer (maximal für *E. coli* berichteter Titer ist ~180 mg/L, doi: 10.1016/j.btre.2018.e00292). Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Ergebnisse zweier Batch-Produktionen.

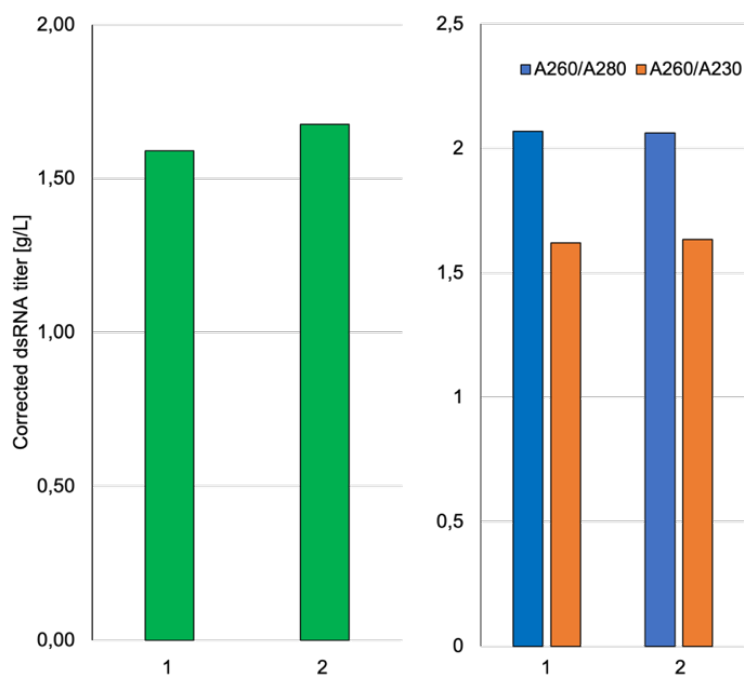


Abbildung 7: Exemplarische Ergebnisse der Batch-Produktion einer dsRNA-Sequenz (Varroa Calmodulin kodierende Sequenz, 186 NT). Links, dsRNA Titer bei einer OD600 von 120. Rechts, Absorptionsprofil der generierten dsRNA zur Qualitäts- und Reinheitskontrolle. 1, Batch 1; 2, Batch 2.

AP3.5 In vivo Capping mittels Dinucleosid-Tetraphosphaten / dsRNA-schützende Inaktivierung der Biomasse

Das ursprüngliche Ziel dieses Arbeitspaketes (In vivo Capping mittels Dinucleosid-Tetraphosphaten) wurde – wie im zweiten Zwischenbericht angezeigt – angesichts veränderter technologischer Anforderungen und reduzierter Verwertungsperspektiven nicht weiterverfolgt (siehe die Ausführungen zu AP 3.4). Stattdessen wurden Arbeiten zur dsRNA-schützenden Inaktivierung der Biomasse durchgeführt, die für den erfolgreichen Verlauf des Vorhabens von höherer Relevanz waren.

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Erhitzung der Fermentationsbrühe auf 60°C für 5 Minuten zur vollständigen Inaktivierung der Zellen führt. Eine ausreichende Stabilität der enthaltenen dsRNA konnte bis zu einer Temperatur von 95°C über 15 Minuten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8). Das so erhaltene, inaktivierte, getrocknete Produkt wurde über einen Zeitverlauf von bisher 6 Monaten hinsichtlich der Stabilität der in der Biomasse eingeschlossenen dsRNA überwacht. Wie in Abbildung 9 gezeigt, konnte bisher kein Abbau der dsRNA festgestellt werden.

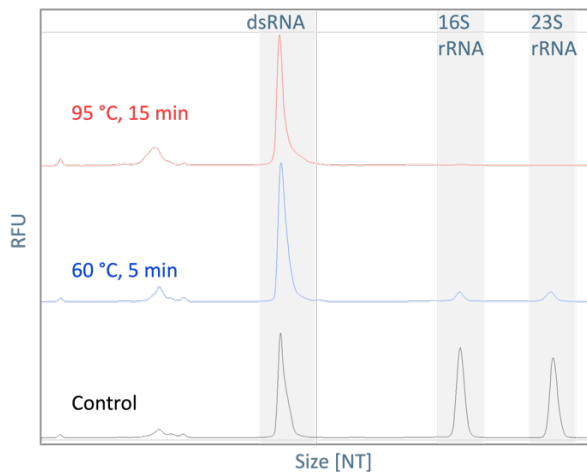


Abbildung 8: Elektroferrogramme von Total-RNA-Extraktionen hitzeinaktivierter, dsRNA-exprimierender *C. glutamicum* Stämme. dsRNA, heterologe Ziel-dsRNA; 16s, 16s rRNA; 23s, 23s rRNA.

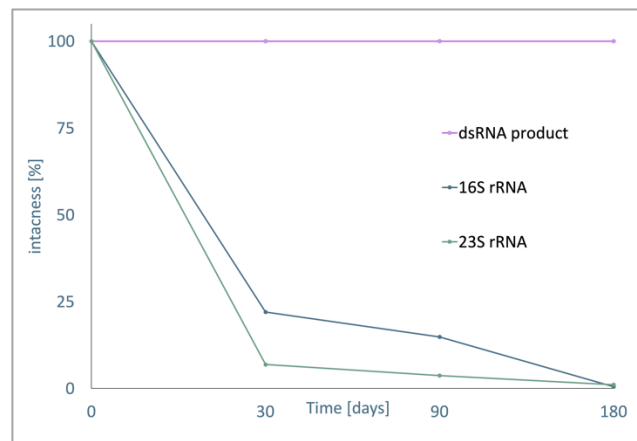


Abbildung 9: Ergebnisse zur Untersuchung der Lagerstabilität der in hitzeinaktivierten *C. glutamicum* Stämmen verkapselten RNA über 6 Monate (Temperatur 19-31°C, rel. Luftfeuchte 70-85%).

Meilensteine:

Tabelle 4: Meilensteine Arbeitspaket 3

✓ (erreicht), ~ (angepasst)

	Monat	Meilenstein	Kriterien und Zielparameter
✓	6	3.1	Erfolgreiche Konstruktion von RecA-Deletionsstämmen
✓	18	3.2	Etablierung hochpräziser PolyA-Analytik
~	36	3.3	Erfolgreiches in vitro Capping einer Ziel-RNA
✓	36		Produktion größerer dsRNA-Mengen mittels Batch-Fermentation
~	36	3.4	Erfolgreiches in vivo Capping der Ziel-RNA
✓	36		dsRNA-schützende Inaktivierung der Biomasse

AP4: Evolutive Optimierung

AP4.1 RNA-Titer

Der Titer exemplarischer Ziel-RNAs konnte im Berichtszeitraum durch zahlreiche evolutive Screening-Zyklen weiter erhöht werden. Es wurden Titer von bis zu 1,8g dsRNA pro Liter Kulturbrühe erreicht. Dabei stellte die heterologe dsRNA am Ende der Batch-Kultivierung über 60% der zellulären Gesamt-RNA dar (siehe Abbildung 10).

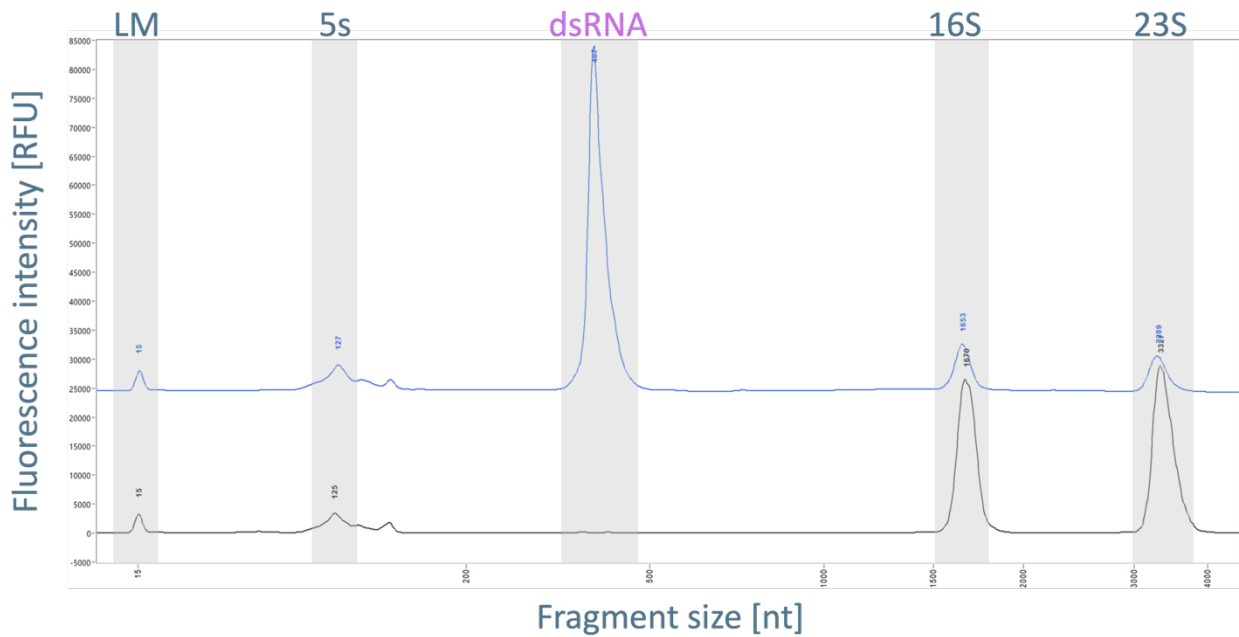


Abbildung 10: Elektroferrogramme zur qualitativen und quantitativen Analyse von Total-RNA-Extrakten dsRNA-exprimierender *C. glutamicum* Stämme. Schwarz, *C. glutamicum* Wildtyp-Stamm; Blau, im Berichtszeitraum evolutiv optimierter *C. glutamicum* RNA-Produktionsstamm. LM, Laufmarker; 5s, 5s rRNA; dsRNA, heterologe Ziel-dsRNA; 16s, 16s rRNA; 23s, 23s rRNA.

AP4.2 RNA-Länge

Die evolutive Erhöhung der maximal mittels *in vivo* Produktion darstellbaren RNA-Länge verlief ebenfalls erfolgreich. Nach Erreichen einer Länge von 1 knt im letzten Berichtszeitraum, wurde im aktuellen Berichtszeitraum eine Länge von 1,9 knt realisiert. Hierbei wurde eine 5'-untranslatierte Hilfssequenz mit der kodierenden Sequenz des Luziferasegens aus *Photinus pyralis* und einer RNA-Aptamer-Sequenz fusioniert (Gesamtlänge 1,9 knt). Im Ausgangsstamm konnte keine Produktion der Ziel-RNA nachgewiesen werden. Nach mehreren Zyklen biosensorbasierter natürlicher Evolution wurden zahlreiche Stämme mit vielfach erhöhtem Sensorsignal isoliert, in denen die produzierte 1,9 knt RNA eindeutig detektiert werden konnte (siehe Abbildung 11).

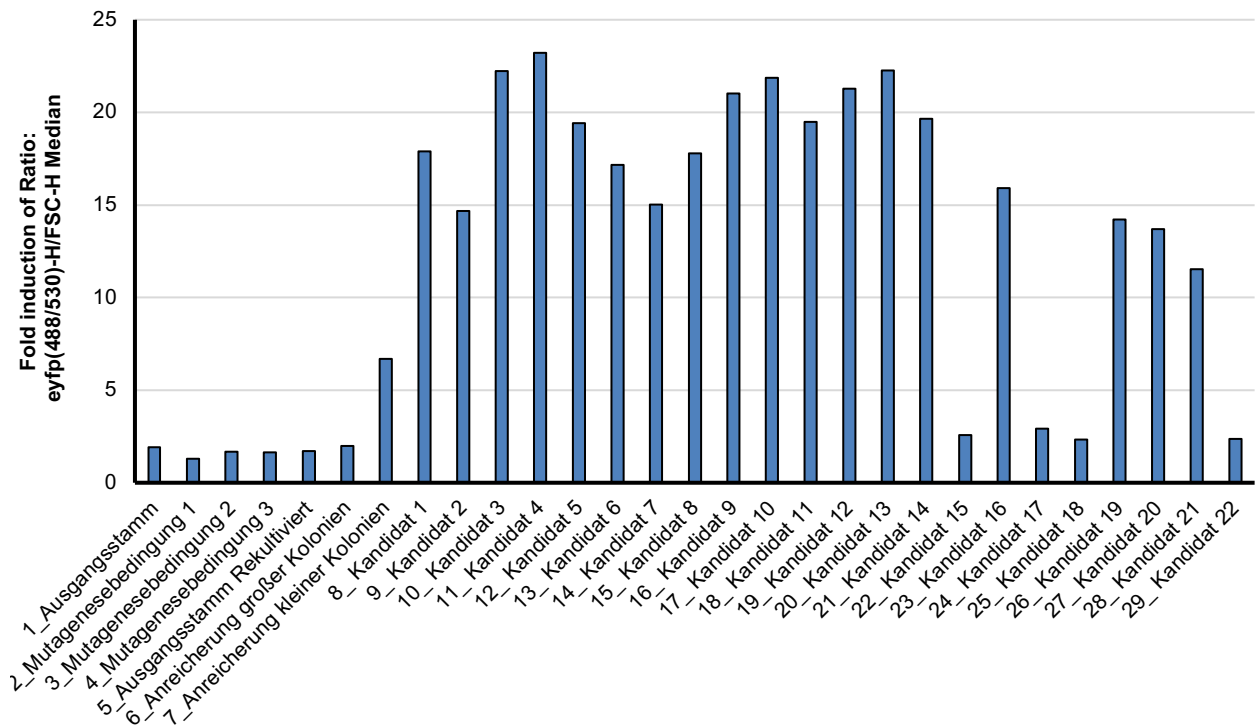


Abbildung 11: Signalintensitäten des RNA-Sensors in erfolgreich evolvierten *C. glutamicum* Stämmen zur Produktion einer 1,9 knt langen Ziel-RNA.

AP4.3 RNase-Aktivität

Die erfolgreiche evolutive Optimierung des *C. glutamicum* Plattformstammes ermöglicht eine starke Akkumulation von Ziel-RNA Molekülen in der Zelle, wie unter AP4.1 beschrieben. Diese Akkumulation ist mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht nur auf eine verstärkte Synthese, sondern auch auf reduzierten Abbau zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass noch unbekannte Abbauege und mittels gerichteter Verfahren nicht darstellbare Dosierungsaspekte von RNase-Aktivitäten durch das evolutive Vorgehen adressiert wurden.

Zusätzlich wurde spekuliert, dass über die evolutive Reduktion genereller RNase-Aktivität hinaus, eine verringerte Zugänglichkeit der Ziel-RNA für RNasen einen erheblichen Einfluss auf deren Stabilität haben könnte. RNA-Moleküle sind insbesondere dann anfällig für enzymatisch katalysierte Hydrolyse, wenn sie als Einzelstrang vorliegen oder lange einzelsträngige Bereiche aufweisen. Intramolekulare Sekundärstrukturen stabilisieren die RNA, sind jedoch im Gegensatz zu hoch strukturierten tRNAs, rRNAs und sRNAs im Falle von mRNA-Molekülen schwächer ausgeprägt und machen diese daher für RNasen besser zugänglich.

Die Sekundärstruktur von RNA-Molekülen kann mittels bioinformatischer Algorithmen zur Beschreibung der minimalen freien Energie (ΔG) vorhergesagt werden. Diese

Algorithmen können ebenfalls genutzt werden, um RNA-Sequenzen *in silico* so zu verändern, dass die intramolekulare Basenpaarung maximiert wird und eine thermodynamisch optimierte und stabilisierte RNA-Sekundärstruktur entsteht. Aufgrund der Redundanz des Triplett-Codes ermöglicht dieses Vorgehen eine Senkung der freien Energie der mRNA-Struktur, ohne die resultierende Aminosäuresequenz und das Protein von Interesse zu verändern. Dieses Konzept wurde für zahlreiche Ziel-RNAs umgesetzt und experimentell bestätigt. Angesichts der Vielzahl hier gezeigter Ergebnisse, sei an dieser Stelle auf Abbildung 4 verwiesen.

AP4.4 PolyA-Homogenität

Die erfolgreich verlaufene evolutive Optimierung des *C. glutamicum* Plattformstammes ist notwendige Grundlage zur *in vivo* Synthese polyadenylierter Ziel-RNAs und die Erfolge in AP2.1 zur Stabilisierung polyadenylierter Sequenzen gehen mit der stetigen evolutiven Weiterentwicklung des Stammes einher.

Die Homogenität von PolyA-tails wurde, anders als bei Antragstellung vorgesehen, nicht primär durch die Aktivierung der Rho-abhängigen Termination für polyadenylierte Ziel-RNA adressiert, sondern wird in den Arbeiten zu AP5.2 im Downstream-Prozess gelöst, der die geplante Affinitätschromatographische Reinigung mit einer enzymatischen Homogenisierung des PolyA-tails kombiniert. Damit wird konzeptionell sichergestellt, dass ausschließlich solche Sequenzen eluiert werden, die PolyA-tails mit korrekter und einheitlicher Länge aufweisen. Die Arbeiten wurden an exemplarischen PolyA₁₀- und PolyA₈₀-Tails durchgeführt und erfüllen damit die angestrebte und technisch relevante Mindestlänge von PolyA₆₀. Für weitere Erläuterungen wird auf AP5.2 verwiesen.

Meilensteine:

Tabelle 5: Meilensteine Arbeitspaket 4

✓ (erreicht), ~ (angepasst)

	Monat	Meilenstein	Kriterien und Zielparame-ter
✓/✓	12/18	4.1a/b	Erreichen eines Ziel-RNA*-Titers von 500 / 1000 mg/L
✓/✓	18/30	4.2a/b	Produktion einer Ziel-RNA* von >1000 / ~2000 bp
✓	36	4.3	Homogene Termination von mindestens PolyA60 Sequenzen

AP5: Etablierung des down stream Prozess

AP5.1 Evaluation des down-stream Prozess (Aufschluss, Stabilisierung)

Das Ziel dieses Arbeitspaketes wurde erreicht. Nach anfänglichen Herausforderungen bei Zellaufschluss und Extraktion fermentativ erzeugter Ziel-RNA, hervorgerufen durch Aggregatbildungen von stark akkumulierten Ziel-RNAs, die bei Verwendung üblicher RNA-Extraktions-Kits gemeinsam mit Zelltrümmern entfernt wurden, konnte durch die Verwendung eines enzymatischen Aufschlussverfahrens in Kombination mit einer anschließenden organischen Extraktion eine mehr als zehnfach erhöhte Extraktionsausbeute erreicht werden. Gleichzeitig ermöglicht die hohe *RNA Quality number* (Agilent Fragment Analyzer RQN 8-10, kein vorhandener Hintergrund durch Verunreinigungen oder Abbau) der so isolierten RNA eine exakte Bewertung der produzierten RNA Mengen.

AP5.2 Affinitätsreinigung via 3'-PolyA-tail aus Fermentationsextrakt

Das Ziel dieses Arbeitspaketes wurde erreicht. Es wurde ein grundlegend neues Konzept zur Affinitätsreinigung polyadenylierter und nicht-polyadenylierter RNA mit integrierter Homogenisierung des 3'-Endes (PolyA-tails) entwickelt. Das Konzept basiert auf einer Fusion der Ziel-RNA mit einer endständigen Bindesequenz, die spezifisch an immobilisierte Desoyribonukleotidsequenzen bindet, deren Enden von 2-O-methylierten Ribonukleotiden flankiert sind. Die so erreichte Immobilisierung der Ziel-RNA erlaubt eine sehr effektive Trennung von sonstigen Zellbestandteilen und unvollständigen Ziel-RNA Molekülen. Im Anschluss an die Reinigung wird RNaseH zugegeben, die eine nukleolytische Spaltung des Riboserückrades der Ziel-RNA im zur Desoyribonukleotidsequenz komplementären Bereich vollzieht. Abschließend erfolgt eine chromatografische Trennung der eluierten Ziel-RNA von der RNaseH und der Bindesequenz. Die im Vergleich zu nicht-modifizierten Ribonukleotidoligos drastisch erhöhte Stabilität der 2-O-methylierten Ribonukleotide ermöglicht die wiederholte Nutzung der immobilisierten Desoyribonukleotidsequenzen. Diese Ergebnisse wurden Teil der Patentanmeldung zur *in vivo* Produktion polyadenylierter RNA (EP23206560.7).

Meilensteine:

Tabelle 6: Meilensteine Arbeitspaket 5

✓ (erreicht), ~ (angepasst)

	Monat	Meilenstein	Kriterien und Zielparame-ter
✓	30	5.1	Aufschlusseffizienz >50% und Bestätigung der Ziel-RNA*-Qualität
✓	36	5.2	Affinitätschromatographische Reinigung fermentativ hergestellter Ziel-RNA

IV. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der größte Teil der Kosten ist mit 1.155.700,83 € durch Personalausgaben entstanden. Den zweitgrößten Teil stellen mit 132.583,37 € Ausgaben für vorhabenspezifisches Material, z.B. Enzyme, Material zur Nukleinsäureanalytik, Pipettier- und Kultivierungsgefäße sowie Chemikalien dar. Sonstige unmittelbare Vorhabenkosten in Höhe von 45.633,32 € umfassen Kosten für Schutzrechtsanmeldungen. Die Kosten für Abschreibungen auf ein vorhabenspezifisches Gerät betragen 19.361,66 €.

V. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Förderung des Vorhabens war notwendig, da äußerst explorative Entwicklungsarbeiten unternommen wurden und die Technologie komplexen Anwendungsszenarien gerecht werden muss, was hohe Entwicklungsrisiken mit sich bringt, die eine alleinige Finanzierung durch private Kapitalgeber unmöglich macht.

Die geleistete Arbeit und die dafür aufgewendeten Ressourcen waren angemessen, da die anspruchsvollen, explorativen Ziele mit im Vergleich zu vergleichbaren Forschungsvorhaben anderer Marktteilnehmer sehr geringen Ressourcen nicht nur erreicht, sondern erheblich übertroffen wurden.

VI. Verwertbarkeit der Ergebnisse und Anschlussarbeiten

Mit kommerziell etablierten RNA-Synthese Technologien wie der IVT, die für pharmazeutische Wirkstoffe zum Einsatz kommt, kostet die Herstellung eines Grams RNA Tausende Euro und disqualifiziert sich damit für viele Anwendungen, bei denen der RNA-Wirkstoff im Kilogramm bis Tonnen Maßstab benötigt wird, wie z.B. im biologischen Pflanzenschutz oder der Tiergesundheit.

Die SenseUP-Produktionsplattform ermöglicht die Herstellung von RNA im Hundert-Tonnenmaßstab und eine Senkung der Produktionskosten um mehr als das 1000-fache. Da der Fermentations- und Downstreamprozess keiner produktspezifischen Infrastruktur bedarf, kann weltweit auf bestehende Anlagen zurückgegriffen werden und so eine

flexible und rasche Skalierung der Produktion erfolgen. Damit wurde eine disruptive Technologie mit hohem Kommerzialisierungspotential entwickelt.

In diesem Zuge wurde ein KMUi-Antrag auf Förderung der Entwicklung eines dsRNA-basierten nachhaltigen Pflanzenschutzmittels gestellt, der unmittelbar auf den Ergebnissen und Erfolgen des Vorhabens aufbaut. Die privatwirtschaftlich gesicherte Kofinanzierung dieses Vorhabens, vielversprechende Verhandlungen zur darüberhinausgehenden Kommerzialisierung dsRNA-basierter Produkte, sowie zahlreiche Kooperationen mit privatwirtschaftlichen wie akademischen Partnern belegen das hohe Verwertungspotential der entwickelten Technologie.

VII. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Ein von der Firma Greenlight Biosciences (US) entwickeltes Produkt zur Kontrolle des *Colorado Potato Beetle*, *Calantha*®, wurde am 4. Januar 2024 als weltweit erstes sprühbares dsRNA-Produkt von der EPA in den USA zugelassen. Dies ist ein wichtiger Meilenstein in der Kommerzialisierung von dsRNA-Produkten als nachhaltige Alternativen zu herkömmlichen Wirkstoffen im Pflanzenschutz, erleichtert die regulatorische Perspektive für Produkte, die aufbauend auf der in diesem Vorhaben entwickelten Plattform entstehen werden und reduziert das Risiko von Verzögerungen in späteren Zulassungsverfahren erheblich, da hiermit ein Präzedenzfall besteht, der die geplante Zulassungsstrategie bestätigt und Positionen der Behörden offengelegt hat.

VIII. Veröffentlichung der Ergebnisse

Kernergebnisse des Vorhabens wurden bzw. werden im Rahmen der Offenlegung o.g. Patentanmeldungen veröffentlicht. Ausgewählte Ergebnisse des Vorhabens wurden außerdem in wissenschaftlichen Vorträgen präsentiert.