Teil I – Kurzbericht

Förderprojekt: GO-Bio initial Sondierungsphase (GBi4S) – Plattformtechnologie für die enzymatische de novo DNA Synthese (ezyDNA)
Förderkennzeichen: 16LW0414
Bewilligungszeitraum: 01.10.2023 bis 30.09.2024
Zuwendungsempfänger: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. (MPG)
Projektleiter: Herr. Dr. Sidney Becker

Wissenschaftlich-technischer Stand

Der entscheidende Treiber der biologischen Revolution in den letzten Jahrzehnten war der Zugang zu synthetischer DNA, die als Grundlage für zahlreiche routinemäßige Anwendungen in den Bereichen Life Science und Biopharma dient. Mit dem Aufkommen der synthetischen Biologie eröffnen sich künftig vielfältige Einsatzmöglichkeiten, insbesondere in der Gen- und Zelltherapie, der Impfstoffentwicklung sowie der Diagnostik. Dies wird zu einer stark wachsenden Nachfrage nach hochwertiger synthetischer DNA führen.
Seit den 1980er Jahren gilt die Phosphoramidit-Chemie als Goldstandard für die DNA-Synthese. Diese Technologie ist jedoch fehleranfällig, erzeugt toxische Abfallprodukte und ist auf die Herstellung kurzer DNA-Fragmente beschränkt. Die steigenden Anforderungen innovativer Anwendungen können mit dieser Methode nur unter erheblichem Aufwand oder gar nicht mehr erfüllt werden.
Um den wachsenden Bedürfnissen moderner Biotechnologischer Anwendungen gerecht zu werden und neue Innovationen zu ermöglichen, soll eine Plattformtechnologie für die enzymatische DNA-Synthese entwickelt werden. Diese neuartige Methode soll im Vergleich zu bestehenden Verfahren längere und fehlerfreie DNA-Fragmente unter umweltfreundlichen Bedingungen effizient produzieren. Im Zuge der Sondierungsphase sollte das Projekt auf seine Machbarkeit überprüft werden.

Ablauf des Vorhabens

Ziel dieses Projekts ist es, den Zugang zu synthetischen Nukleinsäuren grundlegend zu revolutionieren und damit neue Innovationen in Medizin, Landwirtschaft und Biotechnologie zu ermöglichen. In der Sondierungsphase wurden hierfür entscheidende Proof-of-Principle-Daten generiert. Dazu haben wir:

1. eine umfassende Markterkundung durchgeführt,
2. die wissenschaftliche und technische Machbarkeit evaluiert,
3. eine detaillierte Schutzrechteanalyse erstellt und
4. eine fundierte Implementierungsstrategie entwickelt.

Diese Schritte bilden die Grundlage für die Weiterentwicklung und Umsetzung der Technologie.

1) Um das kommerzielle Innovationspotenzial des Projekts umfassend zu bewerten, wurde eine detaillierte Marktanalyse durchgeführt, die sowohl eine Wettbewerbs- als auch eine Bedarfsanalyse umfasste. Dabei wurden potenzielle Zielmärkte identifiziert und hinsichtlich ihrer Marktgröße, Umsatzpotenziale und Zukunftsprognosen untersucht. Zudem wurden regionale Faktoren berücksichtigt, die Einfluss auf die Markteinführung und Skalierbarkeit der Technologie haben könnten. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Analyse möglicher Wettbewerber und ihrer bestehenden Produkte. Dabei wurden deren Stärken und Schwächen systematisch bewertet, um Marktchancen gezielt zu identifizieren. Parallel dazu erfolgte eine

Erhebung spezifischer Produktanforderungen potenzieller Kunden, um sicherzustellen, dass die zu entwickelnde Technologie optimal auf die Bedürfnisse des Marktes abgestimmt ist.

2) Mit Blick auf den Zielmarkt und dem Feedback von möglichen Kunden bzgl. der Produktanforderungen wurde die wissenschaftliche und technische Umsetzung evaluiert um ein passendes Produkt entwickeln zu können. Hierzu wurden unter anderem Polymerasen sowie verschiedene DNA-Bausteine für eine mögliche de novo DNA-Synthese evaluiert. Zudem wurden Strategien zur Fehlerkorrektur erarbeitet, um die Fehlerrate während der Synthese zu minimieren. Für die technische Umsetzung, insbesondere die Automatisierung der Technologie, wurden in Zusammenarbeit mit dem [redacted] mögliche Lösungen eruiert.
3) Eine umfassende Schutzrechteanalyse wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass für das Projekt eine vollständige Handlungsfreiheit (Freedom-to-Operate) besteht. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit einer spezialisierten Patentanwaltskanzlei eine detaillierte Recherche und Bewertung bestehender Schutzrechte vorgenommen. Neben den Patenten potenzieller Wettbewerber wurden auch Schutzrechte im Bereich relevanter Polymerasen sowie möglicher DNA-Bausteine systematisch untersucht. Ziel dieser Analyse war es, potenzielle Einschränkungen frühzeitig zu identifizieren, rechtliche Risiken zu minimieren und eine fundierte Grundlage für die Weiterentwicklung der Technologie zu schaffen.
4) Im letzten Arbeitspaket wurde auf Basis der Erkenntnisse aus der Sondierungsphase ein Implementierungs- und Verwertungsplan für das Projekt ausgearbeitet. Der Implementierungsplan umfasst detaillierte Schritte zur weiteren Entwicklung, Optimierung und Skalierung der Technologie, einschließlich möglicher Kooperationen mit Industrie- und Forschungspartnern. Die technischen als auch die wirtschaftlichen Aspekte der Umsetzung wurden hierbei berücksichtigt, um eine effektive Markteinführung und langfristige Verwertung der entwickelten Technologie zu gewährleisten. Parallel dazu wurde eine Verwertungsstrategie erarbeitet, mit dem Ziel eine nachhaltige und wirtschaftlich erfolgreiche Nutzung der Projektergebnisse sicherzustellen.

Ergebnisse

Während der Sondierungsphase konnten wir überzeugende Daten generieren, die das enorme kommerzielle und technologische Potenzial des ezyDNA-Projekts eindrucksvoll belegen. Unsere Entwicklung einer Plattformtechnologie für die de novo DNA-Synthese ist anspruchsvoll und birgt ein erhebliches Innovationspotenzial. Diese Technologie adressiert bestehende Marktdefizite und eröffnet eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten, wodurch sie einen bedeutenden Beitrag zum Fortschritt in den Bereichen Medizin, Biotechnologie und anderen zukunftsweisenden Branchen leisten kann.

Als attraktiver Zielmarkt wurde die Gen- und Zelltherapie identifiziert, ein Sektor, der durch hohe Wachstumsraten und einen signifikanten Bedarf an synthetischer DNA gekennzeichnet ist. Insbesondere werden lange, qualitativ hochwertige DNA-Fragmente benötigt. Diese Nachfrage kann unsere Technologie gezielt bedienen. Unsere Untersuchungen zeigen, dass Kunden bereit sind, für Produkte höherer Qualität einen Aufpreis zu zahlen, was den wirtschaftlichen Wert unserer Technologie zusätzlich unterstreicht. Der Zugang zu hochwertigen synthetischen Genen würde die Forschung und Entwicklung im Gesundheitssektor erheblich beschleunigen und somit neue Innovationen vorantreiben. Als Kundengruppen wurden somit forschungsintensive Pharma- und Biotechnologie Unternehmen sowie Universitäten und Forschungsinstitute identifiziert.

Die durchgeführte Patentrechtsanalyse konnte keine IP-Barrieren identifizieren und bescheinigte eine vollständige Handlungsfreiheit (Freedom-to-Operate). Angesichts dieser positiven Ergebnisse beabsichtigen wir, die Idee zeitnah über eine Patentanmeldung zu schützen. Dieser Schritt ist entscheidend, um auf dieser Grundlage eine Unternehmensgründung zu forcieren und die Technologie erfolgreich auf den Markt zu bringen.

Teil II – Sachbericht

Förderprojekt: GO-Bio initial Sondierungsphase (GBi4S) – Plattformtechnologie für die enzymatische de novo DNA Synthese (ezyDNA)
Förderkennzeichen: 16LW0414
Bewilligungszeitraum: 01.10.2023 bis 30.09.2024
Zuwendungsempfänger: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. (MPG)
Projektleiter: Herr. Dr. Sidney Becker

1. Problembeschreibung und Gesamtziel der Sondierungsphase

Der Zugang zu synthetischer DNA war in den letzten Jahrzehnten ein entscheidender Treiber der biologischen Revolution. Synthetische Oligonukleotide bilden die Grundlage zahlreicher routinemäßiger Anwendungen im Bereich Life Science und Biopharma. Mit dem Aufstieg der synthetischen Biologie eröffnen sich neue Anwendungsmöglichkeiten in den Bereichen Gen- und Zelltherapie, Impfstoffentwicklung und molekulare Diagnostik, was zu einer stark wachsenden Nachfrage nach synthetischen Oligonukleotiden und Genen führt.

Seit den 1980er-Jahren gilt die Phosphoramidit-Chemie als Goldstandard für die de novo DNA-Synthese. Diese Methode ist jedoch mit erheblichen Einschränkungen verbunden: Sie ist fehleranfällig, erzeugt toxische Abfallprodukte und kann nur kurze Nukleinsäurefragmente produzieren. Der Zugang zu vollständigen synthetischen Genen erfordert daher aufwendige Assemblierungsprozesse aus kürzeren Fragmenten. Zusätzlich sind kosten- und zeitintensive Screening-Verfahren notwendig, um fehlerfreie Sequenzen zu identifizieren. Synthesefehler können schwerwiegende Auswirkungen auf nachgelagerte Anwendungen haben, wodurch viele biotechnologische und medizinische Innovationen behindert oder sogar unmöglich gemacht werden. Besonders in der Medizin sind hochqualitative synthetische Nukleinsäuren essenziell, um höchste Sicherheits- und Wirksamkeitsstandards zu gewährleisten.

Im Vergleich zur chemischen Synthese bietet die enzymatische de novo DNA-Synthese nicht nur höhere Kupplungseffizienzen, sondern erfolgt auch unter umweltfreundlichen Bedingungen in Wasser, ohne den Einsatz toxischer Chemikalien. Diese Vorteile haben bereits vor rund zehn Jahren zur Gründung mehrerer innovativer Start-ups geführt, darunter DNA-Script, Ansa Biotechnologies, Molecular Assemblies, Nuclera, Telesis Bio und CamenaBio, die gemeinsam über 300 Millionen USD an Finanzierung eingeworben haben. Die meisten dieser Unternehmen verfolgen einen ähnlichen Ansatz, der auf der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) basiert – einer templateunabhängigen DNA-Polymerase.

Trotz erheblicher Investitionen konnten diese Methoden bislang die etablierte chemische DNA-Synthese nicht übertreffen. Während einige Unternehmen in ihren Whitepapern behaupten, Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 300 Nukleotiden herzustellen – vergleichbar mit der traditionellen chemischen de novo Synthese – zeigen Veröffentlichungen in Fachjournalen deutlich kürzere Sequenzen von maximal 20 Nukleotiden. Dies verdeutlicht die bestehenden technischen Herausforderungen und den anhaltenden Bedarf an innovativen Ansätzen zur effizienten enzymatischen DNA-Synthese.

Um diesen Herausforderungen zu begegnen, entwickeln wir eine innovative Plattformtechnologie für die enzymatische DNA-Synthese, die den Zugang zu synthetischer DNA grundlegend verändern soll.

Im Gegensatz zu bestehenden Ansätzen setzen wir auf eine Templat-abhängige Polymerase, die eine präzisere Kontrolle über den Syntheseprozess ermöglicht. Dieses Verfahren erlaubt die Herstellung längerer, fehlerfreier und hochreiner Nukleinsäurefragmente unter umweltfreundlichen Bedingungen und stellt somit eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen chemischen Synthese dar. Eine erfolgreiche Implementierung dieser Technologie für Oligonukleotide >300 nt wäre ein bedeutender technischer Fortschritt. Sie würde bestehende Marktdefizite schließen und neue Innovationen in der Biopharmazeutik sowie der synthetischen Biologie vorantreiben.

2. Detaillierte Beschreibung der Arbeitspakete des Vorhabens

In der Sondierungsphase wurden hierfür entscheidende Proof-of-Principle-Daten generiert. Dazu haben wir:

2.1 eine umfassende Markterkundung durchgeführt,
2.2 die wissenschaftliche und technische Machbarkeit evaluiert,
2.3 eine detaillierte Schutzrechteanalyse erstellt und
2.4 eine fundierte Implementierungsstrategie entwickelt.

Diese Schritte bilden die Grundlage für die Weiterentwicklung und Umsetzung der Technologie.

2.1 Markterkundung

Zur fundierten Bewertung des kommerziellen Innovationspotenzials des Projekts wurde in Zusammenarbeit mit dem Marktforschungsdienstleister Altrineo AG eine umfassende Markt- und Bedarfsanalyse durchgeführt. Ziel war es, potenzielle Märkte sowie spezifische Kundenanforderungen besser zu verstehen und die wirtschaftlichen Chancen der Technologie zu bewerten. Dabei wurden sowohl primäre Daten durch direkte Erhebungen bei potenziellen Wettbewerbern und Kunden als auch sekundäre Daten aus Marktstudien und Branchentrends ausgewertet.

Die chemische Synthese kurzer Oligonukleotide (<100 nt) ist bereits gut etabliert und bietet eine hohe Qualität bei niedrigen Kosten. Aufgrund bestehender Skaleneffekte wäre ein Markteintritt mit neuen Technologien in diesem Segment daher kaum wettbewerbsfähig. Dieses Segment wurde daher nicht weiter betrachtet.

Die Markt- und Bedarfsanalyse konzentrierte sich gezielt auf Märkte mit hohem Bedarf an langen Oligonukleotiden und Genen (>100 nt). Gerade für klinische Anwendungen sind synthetische Nukleinsäuren von höchster Qualität und Reinheit erforderlich – ein Bedarf, der mit der traditionellen chemischen Synthese nur mit erheblichem Kostenaufwand oder gar nicht gedeckt werden kann. Diese Marktlücke bietet großes Potenzial für eine enzymatische Synthese, die nicht nur eine höhere Qualität, sondern auch Kostenvorteile gegenüber bestehenden Technologien ermöglichen könnte. Zur fundierten Datenerhebung wurden Interviews mit führenden Forschungsinstituten und Unternehmen aus dem Gesundheitsbereich durchgeführt (siehe Abbildung 1).

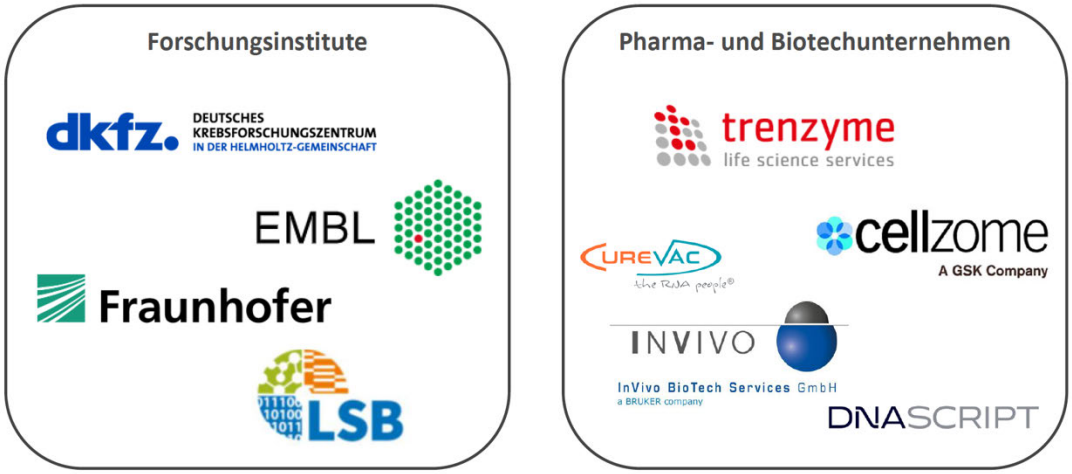

Abbildung 1. Forschungsinstitute und Pharma- bzw. Biotechnologieunternehmen mit denen Interviews für eine Markt- und Bedarfsanalyse geführt wurden.

Der globale Markt an synthetischer DNA wird bis zum Jahr 2027 ein Volumen von etwa 15,5 Milliarden USD aufweisen. Das durchschnittliche jährliche Wachstum beläuft sich dabei auf 16,7% (Abbildung 2).

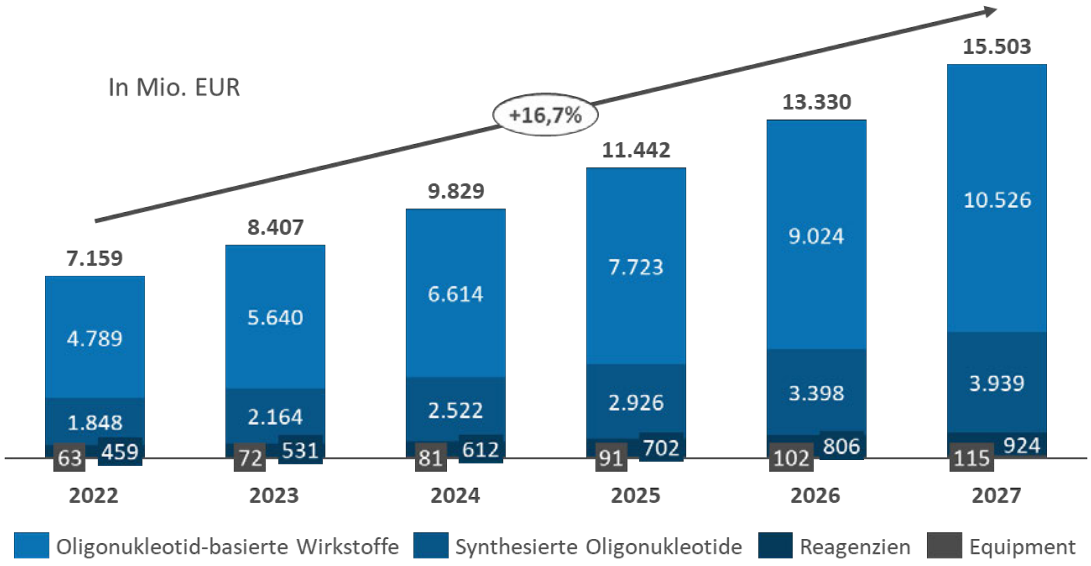

Abbildung 2. Globaler Markt für synthetische DNA. Datenquellen: WHO, FDA, NCBI, IASB (Industry Association of Synthetic Biology), OTS (Oligonucleotide Therapeutics Society).

Um den globalen Markt weiter zu unterteilen, wurden zunächst potenzielle Segmente als Zielmärkte definiert und anhand relevanter Faktoren wie Marktgröße, Umsatzpotenziale und Wachstumsaussichten eingehend untersucht. Zudem wurden regionale Gegebenheiten berücksichtigt, die die Markteinführung sowie die Skalierbarkeit der Technologie beeinflussen könnten. Hierbei wurden die folgenden vier Marktsegmente detailliert untersucht, welche in Abbildung 3 zusammengefasst wurden:

a) Biopharmazeutika
b) Gen- und Zelltherapie
c) Impfstoffe
d) DNA-Datenspeicherung

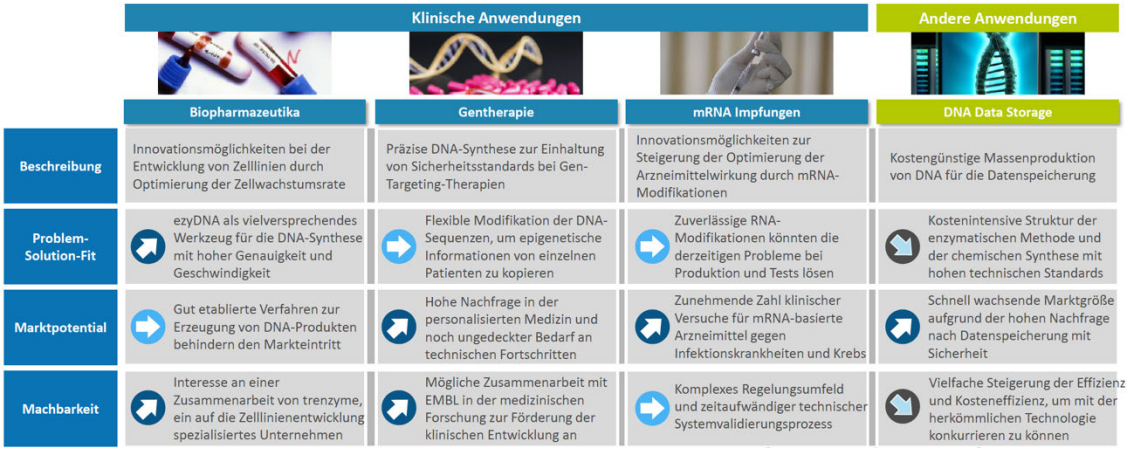

Abbildung 3. Zusammenfassung der untersuchten Marktsegmente in Bezug auf eine de novo DNA-Synthese mit unser Plattformtechnologie (ezyDNA).

Unter den analysierten Marktsegmenten erwies sich die Gen- und Zelltherapie nach eingehender Untersuchung als besonders attraktiv. Dieser Sektor verzeichnet ein starkes jährliches Wachstum von 21%, wobei die Entwicklungen in Nordamerika und Europa vergleichbar sind. Damit übertreffen die Wachstumsraten die Prognosen für den globalen Markt an synthetischer DNA.

Die kundenorientierte Bedarfsanalyse im Bereich der Gen- und Zelltherapie hat deutlich gemacht, dass die Fehlerrate synthetischer DNA eine entscheidende Rolle spielt. Diese Therapien eignen sich besonders gut für die personalisierte Medizin, was einen strategischen Vorteil darstellt, da zunächst keine umfassende Skalierung unserer Technologie erforderlich ist.

Darüber hinaus zeigt die Analyse, dass viele Projekte in diesem Bereich momentan noch in der Forschungs- und Entwicklungsphase stecken. Dies eröffnet die Möglichkeit eines zeitnahen Markteintritts durch strategische Partnerschaften mit biopharmazeutischen Unternehmen. Diese Option hat den zusätzlichen Vorteil, dass die regulatorischen Anforderungen im Vergleich zu therapeutischen Anwendungen relativ gering sind.

Forschungsintensive Pharma- und Biotechnologieunternehmen sowie Forschungsinstitute und Hochschulen lassen sich daher als potenzielle Kundengruppen definieren. Zwar besteht das Risiko, dass Wettbewerber ähnliche Zielgruppen anvisieren, jedoch bietet die hier beschriebene Technologie entscheidende Vorteile: Der Einsatz von Templat-abhängigen Polymerasen und entsprechenden Fehlerkorrekturmechanismen ermöglicht eine höhere Qualität der synthetischen DNA, was für klinische Anwendungen unerlässlich ist.

Zudem erlaubt der templat-basierte Ansatz die Synthese deutlich längerer Fragmente und die Integration von DNA-Modifikationen, die für die personalisierte Medizin möglicherweise enorme Vorteile bieten kann. Unter diesen Bedingungen zeigen sich die Kunden bereit, höhere Preise zu zahlen, was es ermöglicht, anfängliche höhere Kostenstrukturen aufgrund fehlender Skaleneffekte zu kompensieren.

2.2 Wissenschaftliche und technische Machbarkeit

Für die Evaluation der wissenschaftlichen Machbarkeit wurden verschiedene Patente und wissenschaftliche Literatur umfassend durchsucht und bewertet. Die Recherche gliederte sich in drei Teile: Teil I beschäftigt sich mit geeigneten Polymerase-Mutanten, während Teil II die Synthesewege für die erforderlichen Substrate untersucht. In Teil III stehen die Fehlerkorrekturmechanismen im Fokus. Abschließend wurde ebenfalls die technische Machbarkeit insbesondere eine Automatisierung der Technologie evaluiert.

Teil I: Polymerase Mutanten.
Die Recherche ergab, das vor allem Family-B Polymerasen und deren Mutanten besonders gut für den Einbau von 3‘-Hydroxy-geschützten dNTPs geeignet sind. Zu dieser Familie gehört z.B. die 9°N oder Vent Polymerase. Verschiedene Mutationen führen hierbei zu einem effizienteren Einbau der beschriebenen dNTPs. Die Polymerasen besitzen normalerweise Mutationen in der Exonuklease als auch der Polymerase Domain (Abbildung 4).

Clone	Motif A			Motif B		
	Amino Acid number					
name	408	409	410	484	485	486
Wild Type	L	Y	P	R	A	I
9DM	L	V	P	R	L	I
1A4	W	A	L	S	K	N
1A2	D	V	G	G	R	D
1E	M	L	F	K	H	N
1G	V	D	G	G	A	L
2E	V	A	L	I	S	N
2G4	S	S	L	N	A	Q
6D11	Y	A	L	T	H	H

Abbildung 4. Verschiedene Mutanten der 9°N Polymerase, welche besonders für den Einbau von 3‘-Hydroxy-geschützten dNTPs geeignet ist.

Teil II: Synthesewege für 3‘-Hydroxy-geschützte dNTPs
Hierbei wurden die gängigen Synthesemethoden für reversible Schutzgruppen an der 3‘-Hydroxygruppe evaluiert. In der wissenschaftlichen Literatur wird die Azidomethyl Schutzgruppe am häufigsten beschrieben, welche unter reduzierenden Bedingungen entfernt werden kann. Die Synthese beinhaltet eine Pummerer Umlagerung sowie eine Halogenierung gefolgt von einer Nukleophilen Substitution mit Azid (Abbildung 5). Alternativ kann aber auch eine Allyl schutzgruppe verwendet werden (hier nicht gezeigt), welche mittels Palladiumkatalyse entschützt werden kann.

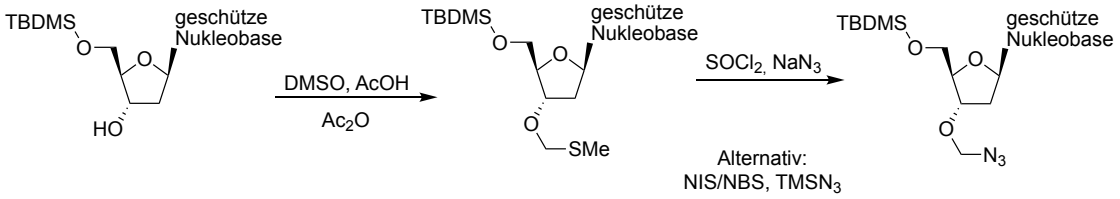

Abbildung 5. Synthese für die 3‘-Azidomethyl Schutzgruppe.

Die 3'-Hydroxy-geschützen Nukleoside müssen anschließend zum Triphosphat umgesetzt werden, um über Polymerasen eingebaut zu werden. Hier kommen verschiedene Synthese Strategien zum Einsatz. Die wohl gängigste Methode ist die Umsetzung mit $POCl_3$ sowie pyrophosphat um das Triphosphat nach wässrigem Work-up zu erhalten (Abbildung 6). Andere Methoden existieren ebenfalls in der wissenschafltichen Literature, diese werden aber eher selten verwendet.

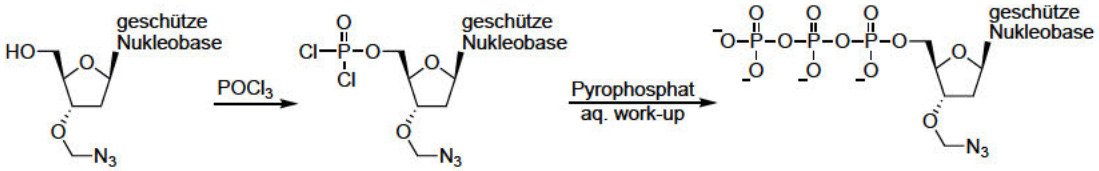

Abbildung 6. Synthese von Nukleosid Triphosphaten als Polymerase Substrat.

Teil III: Fehlerkorrekturmechanismen.

In der wissenschaftlichen Literatur wurden verschiedene Strategien zur Fehlerkorrektur identifiziert. Allerdings konnte bisher nicht mit Sicherheit der vielversprechendste Ansatz bestimmt werden, da eine praktische Evaluation erforderlich ist, um die Effektivität der Methoden zu überprüfen. Mit Hilfe der Fehlerkorrektur können korrekte Sequenzen angereichert werden, um ein aufwendiges Screening nach fehlerfreien Sequenzen zu minimieren oder sogar ganz zu beseitigen. Die relevantesten Strategien sind in nachfolgenden Literaturstellen beschrieben:

1) Ma S., Saaem, I., Jingdong Tian, J., Error Correction in Gene Synthesis Technology. Trends Biotechnol. 30, 147, doi:10.1016/j.tibtech.2011.10.002 (2012)

2) Zhang, J. et al. Efficient and Low-Cost Error Removal in DNA Synthesis by a High-Durability MutS. ACS Synth. Biol., 9, 940 doi:10.1021/acssynbio.0c00079 (2020)

3) Knyphausen, P., Lindenburg, L. & Hollfelder, F. Error-Free Synthetic DNA by Molecular Dictation. Trends Biotechnol 39, 861, doi:10.1016/j.tibtech.2021.02.001 (2021).

4) Choi, H. et al. Purification of multiplex oligonucleotide libraries by synthesis and selection. Nat Biotechnol 40, 47, doi:10.1038/s41587-021-00988-3 (2022).

Technische Machbarkeit

Für eine umfassende technische Evaluierung der Machbarkeit wurde eine Austausch mit dem [redacted] etabliert. Das [redacted] verfügt über weltweit führendes Know-how im Bereich der Mikrofluidik. In mehreren intensiven Gesprächen mit [redacted] und [redacted], beiden Experten mit langjähriger Erfahrung in der Entwicklung mikrofluidischer Systeme und deren Automatisierung für biotechnologische Anwendungen (z. B. PCR-Reaktionen), wurde die Machbarkeit der evaluierten Idee erörtert. Nach einhelliger Meinung der Experten stehen der technischen Umsetzung keine Barrieren entgegen. Das [redacted] hat zudem signalisiert, als potenzieller Kooperationspartner in das Projekt einzusteigen, um die fehlende technische Expertise zu ergänzen.

2.3 Schutzrechteanalyse zur Evaluation der Handlungsfreiheit.

Eine orientierende Schutzrechteanalyse wurde mit Hilfe von ABK Patent Attorneys durchgeführt. Da eine vollumfassende Schutzrechteanalyse mit dem Budget nicht möglich war, wurde die Analyse auf US- und europäische Patente sowie Patentanmeldungen und

internationale Patentanmeldungen beschränkt. Folgende potentielle Wettbewerber wurden identifiziert und in der Patentrecherche explizit berücksichtigt:

- Ansa Biotechnologie
- Camena Bioscience
- DNAScript
- Gen9
- Havard College
- Illumina
- Intelligent Biosystems
- Kern Systems
- Molecular Assemblies
- Nuclera
- Telesis Bio - Codex DNA

Insgesamt wurde die Recherche in drei Teile gegliedert. Teil I befasst sich mit modifizierten Polymerasen. Teil II behandelt 3'-Hydroxy-geschützte Nukleoside und Nukleotide, insbesondere 3'-Hydroxy-geschützte Nukleotidtriphosphate. Teil III betrifft Nukleoside und Nukleotide, insbesondere Nukleotidtriphosphate (NTP) mit modifizierten Nukleobasen, insbesondere mit multiplen Kodierungscharakter.

Teil I: Enzymatische DNA-Synthese unter Verwendung von DNA-Polymerase (TdT & Family-B Polymerasen)

Zwei relevante internationale Patentanmeldungen wurden identifiziert, aus denen Patente in den USA, Europa und mehreren anderen Ländern erteilt wurden. Die erteilten europäischen Patente sowie die internationalen Patentanmeldungen werden im Folgenden bewertet. In den Patenten werden unter anderem Mutanten der 9°N und Vent Polymerase beschrieben. die beiden europäischen Patente (EP2325304B1 und EP1664287B1) sind am 10. September 2024 ausgelaufen. Damit können die geschützten Polymerasen, die zugehörigen Nukleinsäure Moleküle und Vektoren sowie die Methoden, die solche Polymerasen verwenden, ohne das Risiko einer Patentverletzung genutzt werden.

Weitere Mutanten für den hoch effizienten Einbau von 3‘-Hydroxy-geschützten Nukleotiden besitzen weiterhin Patentschutz (z.B. EP2971070B2). Der Patentschutz könnte jedoch durch zusätzliche Mutationen welche mit positiven Eigenschaften für die de novo DNA-Synthese verbunden sind umgangen werden.

Teil II: DNA-Synthese mit 3'-Hydroxy-geschützten NTPs

Zwei relevante internationale Patentanmeldungen wurden identifiziert, aus denen Patente in den USA, Europa und mehreren anderen Ländern erteilt wurden. Die erteilten europäischen Patente sowie die internationalen Patentanmeldungen werden im Folgenden bewertet.

Das europäische Patent EP2209911B1 läuft am 17. Oktober 2028 aus und schützt spezifische 3'-Hydroxy-geschützte dNTPs und 3'-Hydroxy-geschützte ddNTPs sowie Methoden zur Bestimmung von Nukleotidresten. Allerdings besitzen die Nukleotide, die eine durch einen Fluorophor modifizierte Nukleobase enthalten, keine 3'-Hydroxygruppe. Andererseits enthalten die Nukleotide mit einer geschützten 3'-Hydroxygruppe keine modifizierte oder unnatürliche Nukleobase.

Das europäische Patent EP2725107B1 läuft am 17. Oktober 2028 und beschreibt Nukleotide mit einer geschützten 3'-Hydroxygruppe und einer unnatürlichen Nukleobase. Allerdings ist die Verwendung dieser speziellen unnatürlichen Nukleobase durch den Erfinder nicht vorgesehen, sodass für die derzeit beabsichtigten Ausführungsformen des Erfinders kein Risiko einer Patentverletzung in Bezug auf das Patent besteht. Darüber hinaus würde das Patent zeitnah auslaufen.

Teil III: Unnatürliche NTPs mit multiplen Kodierungscharakter (Mutation)
Zwei relevante internationale Patentanmeldungen wurden identifiziert, aus denen Patente in mehreren Ländern, darunter Europa, USA, China, Japan, Brasilien, Kanada, Russland, Südkorea, Mexiko, Australien, Neuseeland und Südafrika erteilt wurden. Die erteilten europäischen Patente sowie die internationalen Patentanmeldungen werden im Folgenden bewertet.
Die Patente WO9843991A1 und EP1660511B1 sind am 02. April 2018 sowie 27. August 2024 ausgelaufen. Beiden haben Nukleotide mit unnatürlichen Nukleobasen geschützt. Die wissenschaftliche Literatur Ref. III-1 bis Ref. III-5 stellt den Stand der Technik für jede neue Patentanmeldung in diesem Bereich dar. Die wissenschaftlichen Publikationen Ref. III-1 und Ref. III-2 legen nahe, dass modifizierte dNTPs mit unnatürlichen Basen für die duale Kodierung und Fehlerkorrektur in Nukleotidsequenzen verwendet werden könnten. Etwaige Patente zu den Inhalten von Ref. III-1 und Ref. III-2 wären inzwischen abgelaufen. Allerdings konnten wir keine Patente finden, die die Offenbarungen der wissenschaftlichen Literatur Ref. III-1 bis Ref. III-5 abdecken.

Ref. III-1 (*PNAS*, **1988**, *95*, p. 4258–4263)
Ref. III-2 (*Nucleic Acids Research***, 1998,** *26*, p.1144-49.)
Ref. III-3 (*Journal of Nucleic Acids*, **2012**, ID 530963)
Ref. III-4 (*Nucleic Acids Research,* **2015***, 43 (16), p.*8089–8099)
Ref. III-5 (*PLOS One*, **2009**, 4(6), e5766)

Die orientierende Freedom-to-Operate (FtO)-Analyse durch ABK Patent Attorneys hat ergeben, dass keine Patente identifiziert werden konnten, die der grundsätzlichen Idee im Wege stehen. Mehr als 200 Patentschriften wurden durchsucht, etwa 100 wurden evaluiert und etwa 20 wurden im Detail bewertet. Es kann festgestellt werden, dass bisher keine relevanten Patentschriften hinsichtlich der erfinderischen Nukleotide gefunden wurden, die eine geschützte 3'-O-Hydroxylgruppe aufweisen, wobei die Schutzgruppe aus Amino, Allyl, -CH2-N3 oder -CH2-CH2-CN ausgewählt ist, und einer unnatürlichen Nukleobase, wobei die unnatürliche Nukleobase für duale Kodierung geeignet ist.

2.4 Implementierungsstrategie

Im letzten Arbeitspaket wurde basierend auf den Erkenntnissen aus der Sondierungsphase ein umfassender Implementierungs- und Verwertungsplan für das Projekt ausgearbeitet. Dieser Plan definiert die strategischen Schritte zur weiteren Entwicklung, Optimierung und Skalierung der Technologie, um eine erfolgreiche Markteinführung zu gewährleisten.

Die wichtigsten Maßnahmen umfassen:
a) ***Patentanmeldung*** zum Schutz der innovativen Polymerase-Substrate, um die technologische Alleinstellung zu sichern und zukünftige Verwertungschancen zu optimieren.
b) ***Teamerweiterung***, insbesondere durch die gezielte Rekrutierung von Fachkräften mit spezifischer Expertise in den Bereichen Enzymtechnologie, Mikrofluidik und

Prozessautomatisierung.
c) ***Entwicklung und Konstruktion eines mikrofluidischen Systems*** zur Automatisierung des Syntheseprozesses, um eine höhere Reproduzierbarkeit, Effizienz und Skalierbarkeit zu erreichen.
d) ***Validierung und Optimierung des Systems*** durch gezielte Experimente und Tests, um eine hohe Prozessstabilität sowie die gewünschte Qualität der synthetisierten DNA sicherzustellen.
e) ***Erreichen einer vollautomatisierten de novo DNA-Synthese***, um die Technologie auf industrielle Standards vorzubereiten und deren Einsatz in Forschung und kommerziellen Anwendungen zu ermöglichen.
f) ***Gründung eines Unternehmens***, um die Technologie langfristig wirtschaftlich zu verwerten und strategische Partnerschaften mit relevanten Akteuren in der Biotechnologiebranche aufzubauen.

Durch diesen strukturierten Implementierungsplan soll sichergestellt werden, dass die entwickelte Technologie sowohl wissenschaftlich als auch wirtschaftlich erfolgreich umgesetzt werden kann.

Verwertungsstrategie
Als Business Model soll ein Synthese-Service für den Forschungsmarkt etabliert, der eine präzise, effiziente und fehlerfreie enzymatische DNA-Synthese ermöglicht. Dieser Service richtet sich an Akteure aus der Forschung und Entwicklung, die hochwertige synthetische DNA für ihre Projekte benötigen. Potenzielle Kunden sind vor allem forschungsintensive Biotechnologie- und Biopharma-Unternehmen sowie Forschungsinstitute und Hochschulen, die im Bereich der synthetischen Biologie spezialisiert sind.

Als Umsatz Modelle bieten sich die folgenden an:

- Pay-per-Order-Modell: Kunden zahlen je nach DNA-Länge, Sequenzkomplexität und benötigter Modifikation.
- Lizenzierung der Technologie: Möglichkeit zur Kooperation mit größeren Unternehmen, die die Syntheseplattform intern nutzen möchten.
- Partnerschaften & Förderprogramme: Zusammenarbeit mit Hochschulen und Forschungseinrichtungen zur Finanzierung innovativer Entwicklungen.

Mit diesem Geschäftsmodell wird eine frühe Marktdurchdringung im Forschungssektor angestrebt, während langfristig eine Expansion in industrielle und klinische Anwendungen möglich ist.

3. Verwertbarkeit des Ergebnisses

Während der Sondierungsphase konnten wir überzeugende Daten generieren, die das enorme kommerzielle und technologische Potenzial des ezyDNA-Projekts eindrucksvoll belegen. Die Ergebnisse zeigen klar, dass die enzymatische DNA-Synthese nicht nur eine innovative Alternative zur herkömmlichen chemischen Synthese darstellt, sondern auch signifikante Vorteile in Qualität, Skalierbarkeit und Nachhaltigkeit bietet.

Um dieses Potenzial voll auszuschöpfen, soll die Technologie geschützt, weiterentwickelt und zur Marktreife gebracht werden. Eine gezielte Patentanmeldung wird sicherstellen, dass die Innovationskraft des Projekts erhalten bleibt und langfristig wirtschaftlich verwertet werden kann.

Die von uns entwickelte Plattformtechnologie für die de novo DNA-Synthese adressiert zentrale Herausforderungen im Markt, insbesondere in den Bereichen Gen- und Zelltherapie, oder anderen

innovativen Anwendungen im Bereich der synthetischen Biologie. Sie ermöglicht die Synthese längerer DNA-Fragmente mit einer bisher unerreichten Präzision und Reinheit – ein entscheidender Vorteil für klinische und biotechnologische Anwendungen.

Die folgende Strategie soll die Verwertbarkeit der Ergebnisse sicherstellen:

- Unternehmensgründung & Skalierung: Langfristig ist die Gründung eines eigenen Unternehmens zur industriellen DNA-Produktion geplant.
- Kommerzielle Verwertung durch einen Synthese-Service: Die Technologie soll zunächst als Forschungsdienstleistung etabliert werden, um eine frühe Marktdurchdringung zu erzielen.
- Lizenzierung & strategische Partnerschaften: Kooperationen mit Biotech- und Pharmaunternehmen ermöglichen eine breite industrielle Anwendung.
- Erweiterung der Technologie: Neben der reinen DNA-Synthese könnten epigenetische Nukleotid-Modifikationen entwickelt werden, um spezialisierte Anwendungen in der personalisierten Medizin zu bedienen.

Mit dieser Strategie kann das ezyDNA-Projekt nicht nur als technologischer Vorreiter agieren, sondern auch nachhaltige wirtschaftliche Erträge generieren und den Innovationsvorsprung langfristig sichern.

4. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Die meisten Unternehmen in diesem Bereich befinden sich weiterhin in der Entwicklungsphase, weshalb nur begrenzte Informationen über spezifische technologische Fortschritte oder kommerzielle Anwendungen verfügbar sind. Trotz intensiver Forschungstätigkeit sind bislang keine bahnbrechenden wissenschaftlichen Publikationen bekannt, die grundlegende neue Strategien oder signifikante Verbesserungen des de novo DNA-Syntheseprozesses dokumentieren.

Allerdings deuten vereinzelte Unternehmensmeldungen und Patentanmeldungen darauf hin, dass insbesondere die Optimierung von Enzymen, die Miniaturisierung und Automatisierung mikrofluidischer Systeme sowie die Integration von Fehlerkorrekturmechanismen zu den zentralen Forschungsfeldern gehören. Während einige Firmen erste Pilotanwendungen in spezialisierten Forschungsumgebungen testen, ist ein breiter kommerzieller Durchbruch der enzymatischen DNA-Synthese noch nicht erfolgt. Dies unterstreicht das hohe Innovationspotenzial in diesem Bereich und eröffnet Chancen für neue Marktteilnehmer mit fortschrittlichen Lösungen.

5. Geplanten Veröffentlichungen der Ergebnisse

Neben der geplanten Patentanmeldung sollen die Forschungsergebnisse in einer renommierten wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht werden, um die wissenschaftliche Relevanz und Innovationskraft der entwickelten Technologie zu unterstreichen.

Die Veröffentlichung wird sich auf die methodischen Fortschritte der enzymatischen de novo DNA-Synthese konzentrieren und sowohl experimentelle Daten als auch potenzielle Anwendungsbereiche detailliert darstellen. Potenzielle Journale für die Publikation umfassen *Nature Biotechnology, Nucleic Acids Research, ACS Synthetic Biology* oder *Cell Reports Methods*, die eine hohe Sichtbarkeit in der biotechnologischen und synthetischen Biologie-Community gewährleisten.

Ziel der Veröffentlichung ist es, das wissenschaftliche Fundament der Technologie zu untermauern und die Forschungsgemeinschaft für zukünftige Kooperationen zu gewinnen. Darüber hinaus könnte die Publikation als Basis für Folgeprojekte dienen, die weiterführende Fragestellungen zur Optimierung der Polymerase oder zur Skalierung des Syntheseprozesses adressieren.