

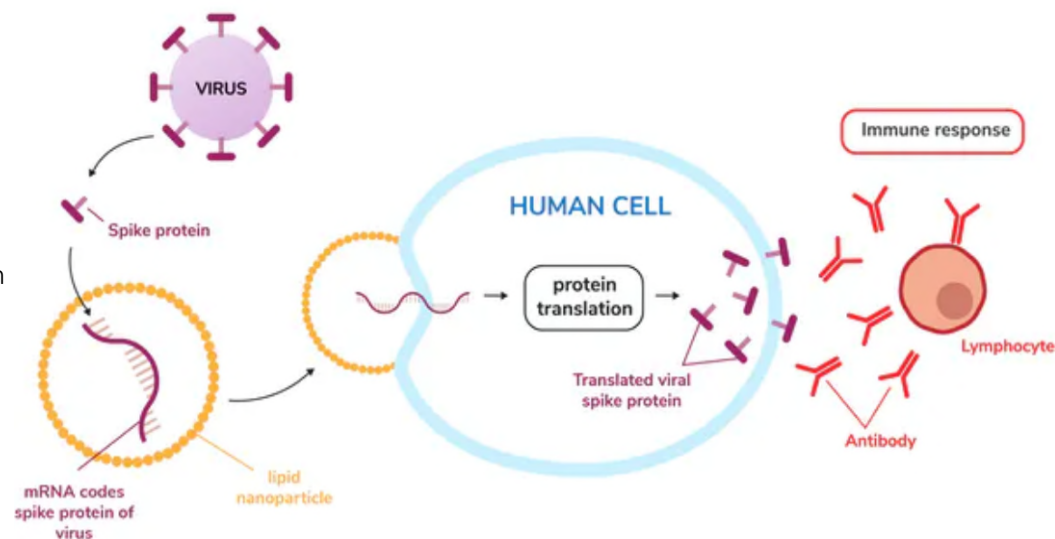


## Coronacrisis als innovatieversneller

### Samenvatting

Het actief farmaceutisch ingrediënt in de nieuwste coronavaccines is synthetisch nucleoside-gemodificeerd boodschapper-RNA (modRNA) die onze cellen ertoe aanzet het Spike oppervlakte-eiwit (Spike protein) van SARS-CoV-2 te maken. Vervolgens reageert ons afweersysteem op die eiwitten door antistoffen aan te maken (Figuur 1). Dit is een innovatie ten opzichte van traditionele vaccins, die verzwakte levende virussen, dode virussen, of stukjes van virussen gebruiken. Deze innovatie maakt niet alleen mogelijk een einde aan de pandemie; hij kan ook een omslagpunt zijn in hoe we geneesmiddelen ontwikkelen en bovendien tot meer baanbrekende innovaties leiden.

Naast de coronavaccines ontwikkelen grote farmaceutische en biotechnologiebedrijven andere producten die gemaakt zijn met dezelfde technologieën als boodschapper-RNA. Implementatie van innovaties gebeurt nu in een paar jaar tijd, waar het op de normale snelheid een decennium zou kosten. De nieuwe RNA technieken hebben een breed scala aan mogelijkheden. Het lezen van de moleculaire sequenties van RNA is inmiddels relatief eenvoudig en nieuwe toepassingen voor CRISPR-genbewerking komen bijna dagelijks in het nieuws. De eventuele kansen en bedreigingen voor de Nederlandse watersector zijn indirect, maar we verkennen ze hier omdat ze nu een aanzienlijke stroomversnelling doormaken.



Figuur 1: De synthetisch boodschapper-RNA van coronavaccines zorgt ervoor dat uw eigen cellen virale eiwitten aanmaken dat vervolgens de gewenste immuunrespons stimuleert. [Getty Images](#)



## Inleiding

Deze trendalert heeft een andere indeling dan de normale formule. De onderstaande beschrijving van de trend is beknopt en er is een extra hoofdstuk aan het einde. In het extra hoofdstuk staat meer achtergrondinformatie en een uitgebreider omschrijving van de opbrengsten van het trendonderzoek. Deze indeling is gekozen ten behoeve van de leesbaarheid van de trendalert. Tegelijkertijd heeft de achtergrondinformatie waarde, onder meer om op termijn de strategische relevantie van deze trend voor de eigen organisatie te begrijpen (betekenisgeving). Het kan ook als referentiedocument dienen.

## Trendbeschrijving

### Technieken voor de toediening van vaccines

Met deze trendalert signaleren we de ontwikkeling van nieuwe technieken: innovaties die door de noodzaak om coronavaccines te maken in een stroomversnelling zijn geraakt. Oorspronkelijk was de focus van de trendverkenning op synthetisch boodschapper-RNA productietechnieken. Uit dit onderzoek bleek dat de belangrijkste recente doorbraken (die coronavaccines mogelijk maakten) betreffen de nieuwe technieken voor de *toediening* van synthetisch boodschapper-RNA.

Voor de toediening van synthetisch boodschapper-

RNA ontbrak tot in de coronacrisis een goede aanpak om de RNA efficiënt en voldoende stabiel in menselijke lichaamcellen te krijgen. De oplossing zat in innovaties zoals nieuwe methodes voor het fabriceren van nanobolletjes gemaakt uit vetachtige moleculen die op menselijke celmembranen lijken (Liposomen). Deze innovaties maken dat onze lichamen de vaccines verdragen, maar ze zijn niet direct relevant voor de watersector.

### Ondersteunende technieken zoals PCR

De focus van de trendverkenning werd verlegd naar de meer algemene ondersteunende technologieën, die ook nodig zijn voor de productie van coronavaccines. Bijvoorbeeld, polymerasekettingreactie (PCR) technieken worden gebruikt voor de productie van synthetisch boodschapper-RNA en hebben veel andere toepassingen, ook in waterlaboratoria.

In een verkennend onderzoek van KWR (2021) is gekeken naar kwantitatieve PCR als een nieuwe diagnostische testsystemen. Voor de watersector is het echter nog niet praktisch haalbaar om de genetische targets voldoende te concentreren om ziekteverwekkers te detecteren met de nodige gevoeligheid. Dit komt doordat de concentraties van ziekteverwekkers in water heel laag zijn. Het is ook maar de vraag of er naar aanleiding van de technische innovaties tijdens de coronacrisis deze

methode wel bruikbaar wordt voor de detectie van ziekteverwekkers in water. Dit geldt ook voor de andere innovaties wat betreft ondersteunende technieken - de relevantie voor de watersector is vooral indirect. Daarom is er in het trendonderzoek opnieuw een kleine uitstapje gemaakt: deze keer naar CRISPR gerelateerde diagnostietechnologieën voor Covid-19.

### CRISPR gerelateerde diagnostietechnologieën

De CRISPR techniek is een van de grootste innovaties van de afgelopen eeuw. In 2020 werd zelfs de Nobelprijs voor chemie gewonnen door twee pioniers op het gebied van CRISPR-Cas9.<sup>1</sup> CRISPR technieken worden momenteel ontwikkeld om Covid-19 en andere infectieziekten snel te diagnosticeren, en op deze manier komen deze innovaties waarschijnlijk wel in een stroomversnelling door de coronacrisis.

TNO heeft een op CRISPR gebaseerde diagnostische techniek ontwikkeld, net zoals de bekende sneltest-strip-techniek van de MIT. En er is zelfs een enzym gevonden die de replicatie van een coronavirus in geïnfecteerde menselijke cellen kan stoppen.<sup>2</sup> Dat laatste is een grote stap in de ontwikkeling van antivirale geneesmiddelen. Directe consequenties voor de watersector zijn echter niet te verwachten. Daarom gaat de relevantie hoofdstuk vooral over indirecte gevolgen voor waterorganisaties.

<sup>1</sup> <https://www.agro-chemie.nl/nieuws/nobelprijs-voor-pioniers-op-het-gebied-van-genoombewerking/>

<sup>2</sup> <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24577-9>



## Relevantie

De ontwikkeling van synthetisch boodschapper-RNA technieken maakt onderdeel uit van het NBIC Convergentie megatrend<sup>3</sup>: ontwikkelingen op de raakvlakken tussen nanotechnologie, biotecnologie, informatie- en communicatietechnologie, en cognitiewetenschap versterken elkaar. En nieuwe combinaties van innovaties bieden nieuwe mogelijkheden.

### Indirecte impacts

Een kenmerk van NBIC Convergentie is dat innovaties op een deelgebied onvoorzien gevolgen hebben voor ontwikkelingen op andere deelgebieden. Bijvoorbeeld, de groeiende capaciteit en dalende kosten van dataopslag maakt het makkelijker om DNA-profielen in kaart te brengen. Voor het ontwikkelen van synthetisch boodschapper-RNA coronavaccines waren verschillende innovaties nodig die in de toekomst voor nieuwe toepassingen gebruikt kunnen worden die zelf weer tot nieuwe innovaties kunnen leiden.

Het voorspellen van welke innovaties de meeste impact gaan hebben, en waarop, is lastig. Voor de innovaties die door de coronacrisis een stroomversnelling doormaken zijn er diverse mogelijkheden. Naast de medische sector zijn de

landbouwsector en de voedselsector waarschijnlijke plekken waar aanverwante innovaties kunnen ontstaan.

De impact op de watersector zou ook indirect kunnen lopen via de landbouwsector. Synthetische micro-organismen kunnen een belangrijke rol spelen in de boerderijen van de toekomst, die niet alleen voedsel produceren maar ook medicijnen, energie en (bouw)materialen. Innovaties wat betreft 'enabling technologies' kunnen tot disruptieve innovaties leiden in de (industriële) productieprocessen zoals we die nu kennen. Indirecte gevolgen voor de watersector zouden kunnen lopen via bijvoorbeeld veranderingen in de oppervlaktewaterkwaliteit.

### High-throughput next-generation sequencing

Een directere kans van deze trend betreft versnelde ontwikkeling van chemogenetische RNA-labeling en high-throughput next-generation sequencing-technieken (Bijv. MinION). Voor de medische sector worden deze technieken o.m. gebruikt om de functie van bepaalde genen te onthullen, en in de coronacrisis wordt next-generation sequencing gebruikt om inzicht te geven in het mechanisme van SARS-CoV-2-infectie en om de progressie van een mutatie van COVID-19 te begrijpen.<sup>4</sup> Tegelijkertijd bieden deze technieken kansen voor

de watersector. Bijvoorbeeld als de innovaties tot lagere error rates en betere software voor MinION sequencing zouden leiden dan kunnen wordt het misschien mogelijk om de kwaliteit van het geproduceerde en gedistribueerde drinkwater te monitoren op microbiologische kwaliteit.<sup>5</sup>

### Milieumonitoring

Een tweede direct gevolg van deze trend is versnelde ontwikkeling van de mogelijkheden inzake rioolwateronderzoek. Voor de detectie van SARS-CoV-2 in rioolwater werd een vergelijkbare reverse transcriptie polymerasekettingreactie (RT-PCR) techniek gebruikt als die voor de neustesten voor SARS-CoV-2 wordt ingezet.<sup>6</sup> Innovaties op dit gebied kunnen kansen bieden voor bredere monitoring van waterkwaliteit (bijv. ook 'environmental surveillance' door Rijkswaterstaat en het RIVM)<sup>7</sup>.

### ICT en datasystemen werkorganisaties op orde brengen

Het testen/implementeren van nieuwe RNA technieken maakt bepaalde zwakke plekken/knelpunten zichtbaar. Vanwege de grote hoeveelheid data, en de snelheid waarmee deze wordt gegenereerd, moet het ICT-systeem van een laboratorium/organisatie op orde zijn willen ze met RNA en DNA technieken werken. Omdat we de

<sup>3</sup> <https://www.rathenau.nl/en/maakbare-levens/bio-nbic-convergence-medical-practice-daily-life>

<sup>4</sup> <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.632490/full>

<sup>5</sup> Heijnen, L. (2019). Verkenning van de toepassingsmogelijkheden van MinION sequencing. Rapport BTO 2019.057, KWR Water Research.

<sup>6</sup> Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., & Brouwer, A. (2020). Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage. medRxiv 2020.03. 29.20045880.

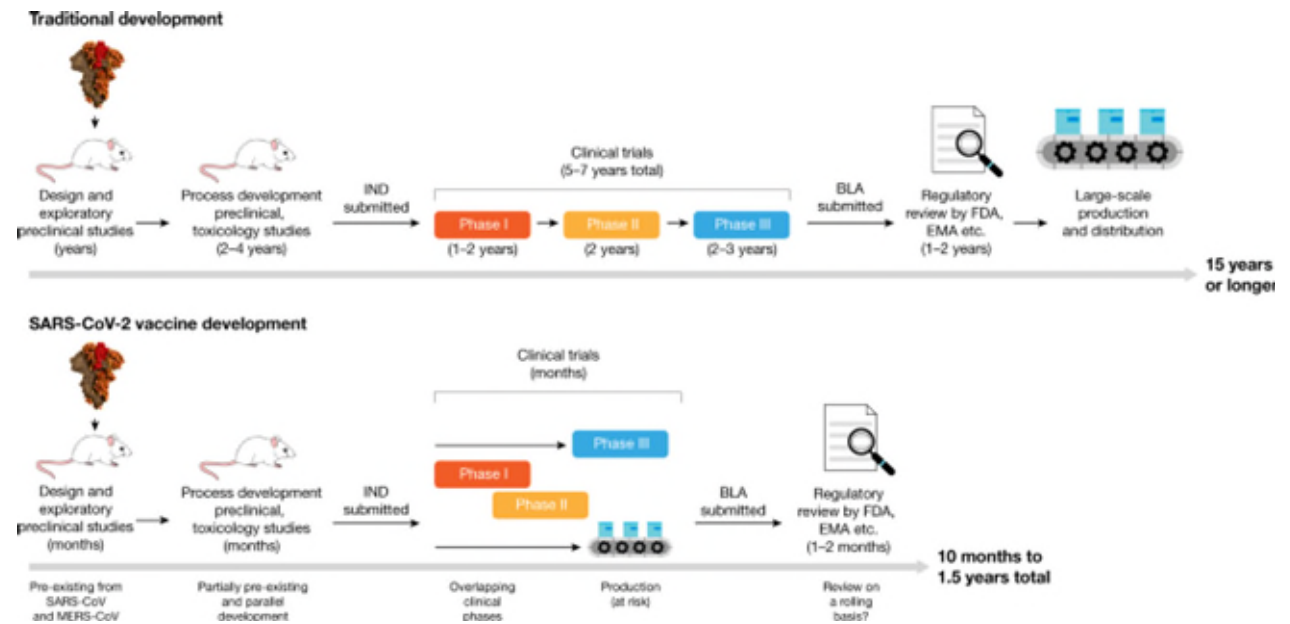
<sup>7</sup> <https://www.rivm.nl/innovatie-milieumonitoring>



relevantie van deze RNA en DNA technieken zien groeien geeft dit trend nog meer aanleiding voor de waterorganisaties om een toekomstgericht ICT strategie te ontwikkelen.

### Versnelde innovatie is mogelijk

Als laatste punt van relevantie is de conclusie dat in een crisis overheden en bedrijven innovaties wel tien keer zo snel als normaal kunnen ontwikkelen en toepassen. De ontwikkeling en de implementatie van coronavaccines heeft 1,5 jaar gekost waar het normaal 15 jaar zou kosten (Figuur 2)<sup>8</sup>. Gezien de groeiende stapel aan maatschappelijke opgaven (naar een circulaire economie, klimaatadaptatie, digitalisering, energietransitie, nieuwe voedselsystemen) wordt steeds duidelijker dat incrementele innovatie ontoereikend is. De ervaring met coronavaccines kan perspectief bieden voor andere sectoren inclusief de watersector.



Figuur 2: Tijd nodig om innovaties te implementeren<sup>6</sup>

<sup>8</sup> Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* **586**, 516–527 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>



## Extra achtergrond

Voor het lezen van dit extra hoofdstuk staat hier wat medische en biologische terminologie en achtergrondinformatie beschreven ter ondersteuning. De doelgroepen voor deze trendalert zijn strategen, beleidsadviseurs, en beslissers. (Micro)Biologen kunnen deze inleiding overslaan.

Er zijn vier hoofdgroepen van organische stoffen:

1. koolhydraten (waaronder suikers)
2. vetten (lipiden)
3. eiwitten (proteïnen)
4. nucleïnezuren (in DNA en RNA)

Aan het begin van de evolutie zijn uit deze niet-levende organische verbindingen *cellen* ontstaan, en pas later ook cellen met een celkern (bacteriën hebben geen celkern, maar die van hogere levensvormen wel).

Het celkernmembraan maakt dat verschillende soorten biomoleculen (waaronder DNA en RNA) gedifferentieerde rollen kunnen vervullen. Deze compartimentering (door membranen gescheiden delen van de cel) heeft ervoor gezorgd dat de vele vormen van plantaardig en dierlijk leven hebben kunnen ontstaan.

Uitwisseling door het kernmembraan heen, waardoor het DNA (in de celkern) de ribosomen (eiwitmachines in het celplasma) kan instrueren, wordt door RNA verzorgd. RNA is dus een soort intermediair.

### RNA

Ribonucleïnezuur (RNA) is een enkelstrengs biopolymeer bestaand uit relatief eenvoudige biomoleculen (nucleotiden) waarvan er grote aantallen aan elkaar geschakeld zijn. De volgorde van de nucleotiden (sequentie) legt de genetische informatie vast. In synthetisch boodschapper-RNA wordt deze sequentie gefabriceerd.

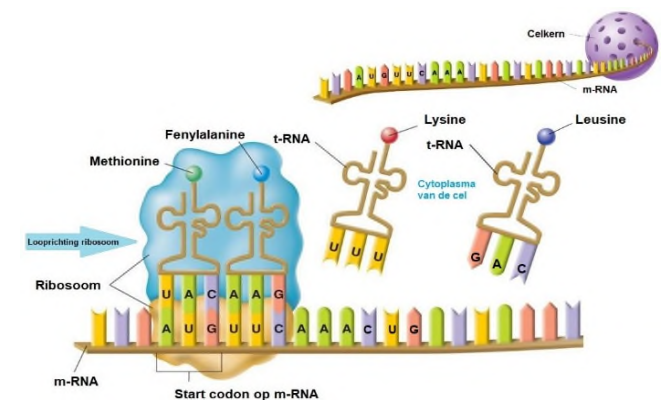
Op basis van functie zijn drie hoofdtypes RNA te onderscheiden:

1. tRNA (transfer)
2. rRNA (ribosomaal)
3. mRNA (boodschapper)

Van nature wordt mRNA door een enzym (RNA-polymerase) gemaakt. Dit enzym bindt zich aan het DNA (desoxyribonucleïnezuur) en verbreekt de waterstofbruggen tussen de twee ketens van de bekende DNA 'dubbele helix'. Vervolgens wordt, via een enzymatische reactie van de DNA ketens een omgekeerde kopie gemaakt. Deze kopie is mRNA. mRNA past door de poriën in de celkernmembraan en op deze manier kan de genetische informatie

van het DNA (die in de celkern zit verpakt) overgebracht worden naar de ribosomen (in het cytoplasma van de cel) waar deze moleculen de synthese van een ketens van aminozuren (peptides, eiwitten) initiëren.

tRNA is een katalysator die specifieke aminozuren naar de ribosomen (eiwitmachines) vervoert om de eiwitsynthese mogelijk te maken (Figuur 3). Ieder tRNA bevat een anticodon (code combinatie bestaand uit drie nucleotiden) en een bindingsplaats voor een bepaalde aminozuur. En ieder anticodon op het tRNA heeft een complementaire codon op het mRNA. Door de anticodons met de codons te combineren wordt de gecodeerde sequentie van aminozuren in een keten aan elkaar verbonden.



Figuur 3: Eiwitsynthese (ook wel proteïnebiosynthese)<sup>9</sup>

<sup>9</sup> <https://biologielessen.nl/index.php/dna/638-translatie>. Zie ook: <https://www.youtube.com/watch?v=wtT4EqbcGc&t=117s>





rRNA is een onderdeel van de ribosomen (eiwitmachines) die aminozuurketens (peptides, eiwitten) maken. Ribosomen hebben één onderdeel dat het mRNA afleest en één onderdeel waarin de aminozuurketens worden gevormd. De rRNA bindt het mRNA en het tRNA aan elkaar waardoor de gecodeerde keten van aminozuren kan worden gevormd. Via dit proces komt een gen tot uiting (genexpressie). rRNA is de meest voorkomende vorm van RNA (ongeveer 80% van het cellulaire RNA).

De synthese van eiwitten, door RNA mogelijk gemaakt, is een van de vitale functies van de menselijke lichaam. Eiwitten worden gebruikt voor de groei en het onderhoud van lichaamweefsels en hebben een essentiële functie voor het katalyseren van biochemische reacties (enzymen).

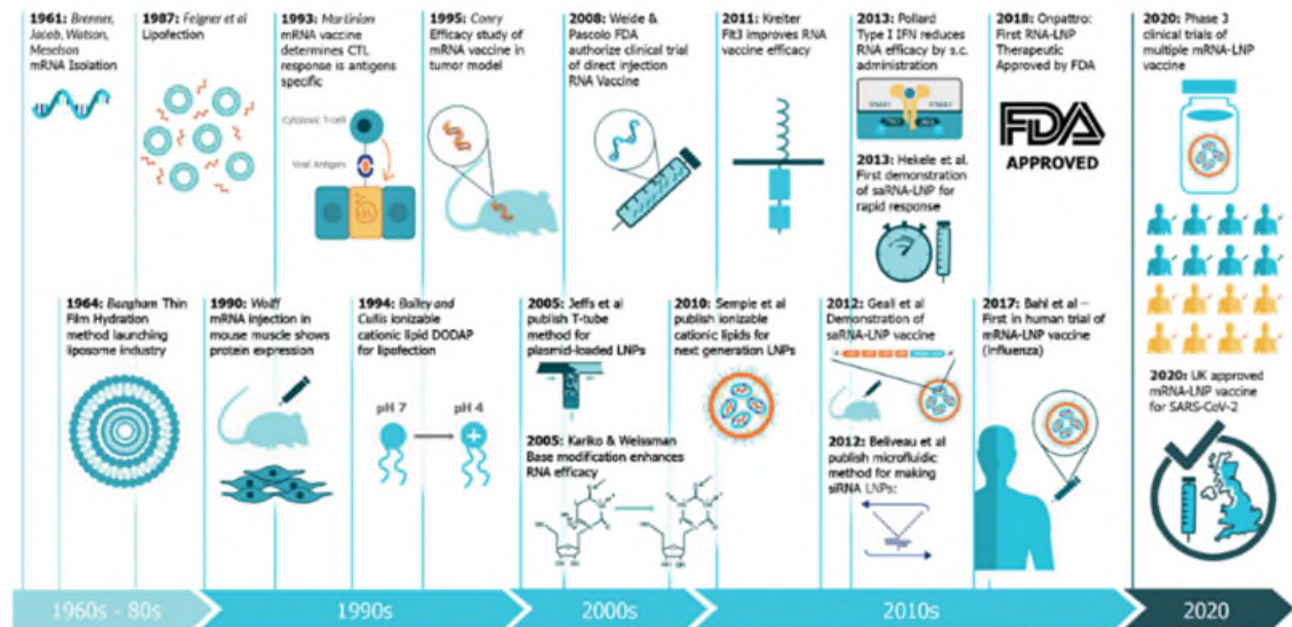
## Opbrengsten trendonderzoek

### Synthetisch boodschapper-RNA

Met deze trendalert signaleren we de ontwikkeling van nieuwe technieken: innovaties die door de noodzaak om coronavaccines te maken in een stroomversnelling zijn geraakt. Oorspronkelijk lag de focus op de (ondersteunende) technieken voor de productie van synthetisch boodschapper-RNA. In het vorige hoofdstuk staat achtergrondinformatie over natuurlijke RNA processen. Synthetisch

boodschapper-RNA technieken grijpen in op, en benutten, deze processen. De coronavaccines werken door de genetische code (boodschapper-RNA) voor bepaalde antigenen (in dit geval de spike-eiwit van SARS-CoV-2) direct in het celplasma te introduceren om de ribosomen (eiwitmachines) te instrueren (Figuren 1 en 3). Verschillende technische innovaties zijn nodig voor de synthese en toediening van boodschapper-RNA (Figuur 4). Sommige innovaties worden momenteel opgeschaald en met grote snelheid verder ontwikkeld, en daar gaat deze trendalert over.

In medische tijdschriften wordt veel geschreven over de nieuwe antigenen die met synthetisch boodschapper-RNA te maken zijn. Antigenen zijn de specifieke moleculen die zich aan het oppervlak van een bepaalde pathogeen bevinden, zoals het spike-eiwit van SARS-CoV-2 (Figuur 1). Inmiddels ontwikkelen onderzoekers boodschapper-RNA methoden voor productie van antigenen ter bescherming tegen bacteriële infecties, parasieten, en kanker. Klinische onderzoeken zijn ook al uitgevoerd met synthetisch boodschapper-RNA vaccins voor influenza, Zika, rabiës en het



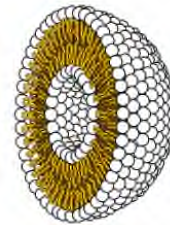
Figuur 4: Innovaties die aan de ontwikkeling van boodschapper-RNA vaccins hebben bijgedragen



cytomegalovirus.

Naast de talrijke artikelen over verschillende soorten antigenen wordt ook veel geschreven over de nieuwe technieken voor de toediening van synthetisch boodschapper-RNA. De belangrijkste recente doorbraken die synthetisch boodschapper-RNA van coronavaccines mogelijk maakten zijn op dit onderdeel van het proces (mRNA toepassingen zijn al ouder en worden in research al lang toegepast). Grote probleem voor toepassing in mensen was het ontbreken van een goede aanpak om de synthetisch boodschapper-RNA efficiënt en voldoende stabiel in lichaamscellen te krijgen. Bijvoorbeeld, kennis en innovaties voor de productie van liposomen ontwikkelden zich snel.

Liposomen zijn nanobolletjes gemaakt uit vetachtige moleculen die op menselijke celmembranen lijken waardoor onze lichamen ze verdragen. Liposomen hebben een wateraantrekkende kop en een waterafstotende staart (Figuur 5). Voor de coronavaccines worden ze als drager gebruikt, om de gemodificeerd boodschapper-RNA te beschermen en ervoor te zorgen dat deze moleculen op de juiste plek in de lichaamscellen kunnen binnendringen. Er wordt veel onderzoek gedaan naar toepassingen van liposomen, onder meer voor de behandeling van immuunrelateerde ziekten.

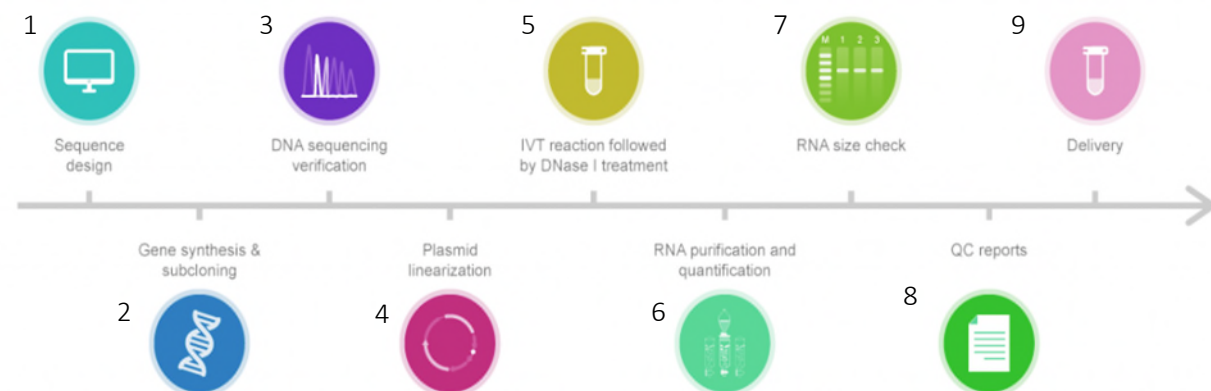


Figuur 5: Een dwarsdoorsnede van een liposoom<sup>10</sup>

Innovaties wat betreft technieken om RNA in lichaamscellen te krijgen zullen voor de watersector waarschijnlijk niet relevant zijn. Daarom beperken we de focus van deze trendalert tot innovaties op twee andere gebieden: RNA productietechnieken en de ondersteunende technologieën. De aanname is dat de ondersteunende technologieën voor RNA productie ook voor andere toepassingen bruikbaar

zijn. Bijvoorbeeld, polymerasekettingreactie (PCR) technieken worden gebruikt voor de productie van synthetisch boodschapper-RNA en hebben veel andere toepassingen, ook in waterlaboratoria.

Figuur 6 is een visualisatie van de stappen die nodig zijn voor de productie van synthetisch boodschapper-RNA vaccines. De volgende hoofdstukken zijn een verslag van de verkenning naar relevante innovaties bij ieder stap. Om een inschatting te kunnen maken of nieuwe technieken door de noodzaak om coronavaccines te maken in een stroomversnelling zijn geraakt, is gekeken naar de beschikbare informatie van de technologieleveranciers. Bijvoorbeeld, voor de BioNTech/Pfizer coronavaccines wordt het ontwerp



Figuur 6: Stappenplan voor RNA transcriptie

<sup>10</sup> <https://www.universiteitleiden.nl/nieuws/2020/09/nanobolletjes-en-het-immuunsysteem>



en de productie van de DNA-sjablonen (de eerste 4 stappen in Figuur 6) gedaan door een Oostenrijks biotech bedrijf, Biomay.

### Productietechnieken

Voor de productie van synthetisch boodschapper-RNA is In Vitro Transcriptie (IVT) onmisbaar (Figuur 6: stap 5). IVT technieken worden al sinds de jaren 1990 toegepast om DNA-sjablonen om te zetten in RNA. IVT is een celvrije enzymatische transcriptiereactie. Dit betekent dat het DNA in een vat (buiten een cel) in aanwezigheid van nucleotiden via een enzymatisch proces (transcriptie) in RNA wordt overgeschreven. Tijdens dit transcriptieproces schrijft een enkel DNA-afhankelijke enzym (RNA-polymerase) de volledige lengte van een DNA gen over in boodschapper-RNA. Bij lange genen kan dit veel tijd kosten. Afwijkende transcripties en bijproducten komen vaak voor en dit kan problematisch zijn. Er wordt daarom veel geïnvesteerd in innovaties om de kwaliteit te verhogen en kwetsbaarheid van het geproduceerde RNA te minimaliseren.

Voor de productie van coronavaccines met IVT worden DNA-sjablonen gebruikt (Figuur 6: stap 1-2). Deze DNA-sjablonen worden gemaakt in kunstmatige plasmiden. Dit zijn kleine cirkelvormige DNA-moleculen die samengesteld zijn uit de

gewenste stukken DNA. Vermeerdering van deze plasmiden vindt plaats in bacteriële cellen (*E. coli*). Een deel wordt met polymerasekettingreacties (PCR) vermenigvuldigd.

PCR is een voorbeeld van een ondersteunende techniek die onderdeel uitmaakt van diverse processen. Bijvoorbeeld, voor de meeste neustesten voor het SARS-CoV-2 virus wordt PCR ook gebruikt. De brede toepassingen van PCR, samen met de groeiende vraag en de stijging van gebruik aan aandacht voor deze techniek tijdens de coronacrisis, maakt het interessant voor deze trendalert. Komen innovaties op gebied van PCR technologieën wellicht in een stroomversnelling door de respons op de coronacrisis?

Onderzoekers gebruiken PCR in laboratoria om uit hele kleine hoeveelheden DNA er genoeg van te maken om te analyseren en als basis /input voor andere technieken. Deze methode wordt bijvoorbeeld gebruikt voor het onderzoeken van genexpressie. PCR is ook een techniek die relevant is voor (de laboratoria van) waterorganisaties. Een PCR-methode wordt bijvoorbeeld ontwikkeld en getest om binnen een paar uur te zien of drinkwater verontreinigd is met fecale bacteriën.<sup>11</sup> Naast normale PCR is de reverse transcriptie polymerasekettingreactie (RT-PCR) techniek ontwikkeld waarbij er dubbelstrengs DNA

geproduceerd wordt van een (synthetische) RNA-sjabloon. RT-PCR wordt vaak toegepast in combinatie met een techniek waarbij de amplificatiereacties met behulp van fluorescentie in real-time worden geanalyseerd.

De kwantitatieve polymerasekettingreactie techniek (qPCR) wordt al toegepast in de watersector. In een verkennend onderzoek van KWR (2021) is gekeken naar qPCR als een nieuwe diagnostische testsystemen voor het snel screenen van resistentiegenen, ziekteverwekkers of genactiviteiten.<sup>12</sup> Deze moleculaire methoden voor detectie en typering van micro-organismen ontwikkelen zich razendsnel. Met high-throughput qPCR is het mogelijk om met één analyse een screening uit te voeren op de aanwezigheid en concentratie van zeer veel genetische targets (DNA of RNA).

Voor de watersector is het echter nog niet praktisch haalbaar om de genetische targets voldoende te concentreren om ziekteverwekkers te detecteren met de nodige gevoeligheid. Dit komt doordat de concentraties van ziekteverwekkers in water heel laag zijn. Het is maar de vraag of er naar aanleiding van de technische innovaties tijdens de coronacrisis de huidige methoden voor het concentreren van genetische targets ingehaald worden met nieuwe technieken waarmee high-

<sup>11</sup> <https://www.drinkwaterplatform.nl/pcr-methode-drinkwater/>

<sup>12</sup> Heijnen, L., Hornstra, L. (2021) *High throughput (q)PCR screening: evaluatie van de toepassingsmogelijkheden*. BTO 2021.023





throughput qPCR wel bruikbaar wordt voor de detectie van ziekteverwekkers in water. Dat zou natuurlijk mooi zijn, maar de relatie tussen deze ontwikkelingen is diffuus en de verkenning leverde geen signalen op die dit direct aannemelijk maakt.

De verkenning van (ondersteunende) technieken voor de productie van synthetisch boodschapper-RNA leverde veel informatie op over nieuwe innovaties. Bijvoorbeeld, er zijn diverse innovaties die bijdragen aan optimalisatie van groeiomstandigheden voor efficiënte productie van plasmide-DNA van farmaceutische kwaliteit en op een commerciële schaal.<sup>13</sup> En door de vraag naar coronavaccines worden de technieken voor ontwerp en productie van plasmide DNA-sjablonen door steeds meer biotechnologie bedrijven aangeboden. Celvrije productie van DNA wordt ook steeds haalbaarder.<sup>14</sup> Maar omdat deze innovaties geen evidente waarde voor de watersector hebben besteden we in deze trendalert daar verder geen aandacht aan.

### Purificatietechnieken

Gestimuleerd door de coronacrisis bouwt het bedrijf Biomay momenteel een volledig geïntegreerde biotechfabriek in Wenen<sup>15</sup>. Biomay heeft onder meer een techniek ontwikkeld om het boodschapper-RNA beter en sneller te purificeren.

Voor de productie van vaccines is purificatie nodig om te voorkomen dat het immuunsysteem op de mengsel van RNA zelf reageert voordat het de ribosomen kan aanzetten de antigenen te maken. Biomay's purificatietechniek vervangt de klassieke vloeistofchromatografie methodes die hiervoor werden gebruikt.

Er zijn verschillende purificatietechnieken die momenteel doorontwikkeld worden: Size exclusionchromatografie (SEC), reversed-phase chromatografie (RPC), anionenuitwisseling chromatografie (AEX), hydrofobe interactie (HIC) en thiofiële adsorptiechromatografie (TOC). Deze technieken zijn verschillende manieren om mengsels van verschillende moleculen te scheiden in de componenten. In tegenstelling tot de productieprocessen zijn purificatietechnieken voor de coronavaccines niet gestandaardiseerd.<sup>16</sup> Er wordt aan veel verschillende innovaties gewerkt.

De SEC chromatografische instrumenten die Biomay gebruikt voor de productie van de BioNTech/Pfizer coronavaccines worden gebouwd door het bedrijf BIA Separations<sup>17</sup>. Deze instrumenten gebruiken convectie om verschillende moleculen door de poriën van een enkele monoliet te transporteren en ze zo te

scheiden. Volgens de producent resulteert deze techniek in kortere scheidingsstijden en betere purificatie van zowel de DNA sjablonen (Figuur 6: stap 2) als het boodschapper-RNA later (Figuur 6: stap 6).

Het isoleren van DNA uit watermonsters is moeilijk omdat de concentraties laag zijn. Bijvoorbeeld voor qPCR wordt het watermonster gefiltreerd over een polycarbonaat membraanfilter. Vervolgens wordt het DNA uit de cellen in de watermonster vrijgemaakt door een combinatie van mechanische en chemische lysis. En als laatste wordt het DNA gezuiverd met een affiniteitszuivering in spinfilters. De vraag is of de innovaties wat betreft de technieken voor de isolatie van DNA uit watermonsters ook in een stroomversnelling raken door de huidige ontwikkelingen, want dat zou nieuwe kansen kunnen bieden voor de watersector. Uit de trendanalyse blijkt dat dit onwaarschijnlijk is omdat de uitdagingen voor isolatie van DNA of RNA uit watermonsters anders zijn dan de industriële toepassing voor het isoleren van mRNA uit grootschalige mRNA productieprocessen.

### Modificatie

Voor de BioNTech/Pfizer coronavaccines worden de lineaire DNA-sequenties die Biomay levert als

<sup>13</sup> Carnes, A., Hodgson, C., & Williams, J. (2004). 818. Optimization of E. coli Fermentation for Plasmid DNA Production. *Molecular Therapy*, 9(S1), S310.

<sup>14</sup> Ipsen Biopharm Ltd. Novel Production Process for a Highly Potent Recombinant Protein Using Doggybone DNA (dbDNA) Vector

and Cell Free Expression Technology. 2020. Available online: <https://gtr.ukri.org/projects?ref=104201>

<sup>15</sup> <https://www.biomay.com/cdmo-service/plasmid-dna/>

<sup>16</sup> Schmidt, A., Helgers, H., Vetter, F. L., Juckers, A., & Strube, J. (2021). Digital Twin of mRNA-Based SARS-COVID-19 Vaccine Manufacturing towards Autonomous Operation for Improvements in Speed, Scale, Robustness, Flexibility and Real-Time Release Testing. *Processes*, 9(5), 748.

<sup>17</sup> <https://www.biaseparations.com/>



sjabloon gebruikt om boodschapper-RNA voor de coronavaccines te synthetiseren met IVT. De nieuwste innovaties voor wat betreft de IVT technieken zelf zijn op het gebied van chemische modificaties van het RNA en analysetechnieken.

Biomay heeft nieuwe chemische modificaties ontwikkeld (Figuur 5: stap 5-6) om de stabiliteit van het boodschapper-RNA te vergroten, de immunogeniciteit te verlagen, en de snelheid en efficiëntie van de transcriptie te maximaliseren. Uit het horizonscanningonderzoek blijkt dat deze technieken niet relevant zijn voor de watersector en daarom worden ze buiten beschouwing gelaten in deze trendalert. Dit geldt ook voor de nieuwe innovaties wat betreft zelfversterkend RNA (die meer kopieën van zichzelf kan maken als het eenmaal in cellen is afgeleverd). Door deze innovatie is er slechts een kleine startdosering van de vaccines nodig.

Voor de synthese van korte fragmenten RNA (5-120 bases) zijn afgelopen 5-10 jaar ook nieuwe biologische technieken ontwikkeld, waaronder CRISPR. Voor langere stukken RNA, zoals wat nodig is voor de coronavaccines, blijft IVT transcriptie wel nodig. Investerings in productietechnieken voor coronavaccines zal dus niet direct tot versnelde innovaties leiden voor deze technieken.

De CRISPR techniek is echter wel een van de grootste innovaties van de afgelopen eeuw. CRISPR technieken worden momenteel ontwikkeld om Covid-19 en andere infectieziekten snel te diagnosticeren, en op deze manier komen deze innovaties waarschijnlijk wel in een stroomversnelling door de coronacrisis.<sup>18</sup> In de volgende hoofdstuk maken we daarom een kleine uitstapje van innovaties omtrent (ondersteunende) technieken voor synthetisch boodschapper-RNA productie naar CRISPR gerelateerde diagnosetechnologieën voor Covid-19.

### CRISPR

CRISPR is een natuurlijk proces dat bacteriën hebben ontwikkeld om zich tegen bacteriofagen te beschermen. Met dit beschermingsmechanisme wordt het binnendringende DNA door een enzym herkend en in stukken geknipt. Afgelopen dertig jaar hebben verschillende onderzoekers over de hele wereld dit proces leren beheersen, waardoor het nu mogelijk is om in specifieke stukjes DNA van andere organismes (niet alleen bacteriofagen) heel gericht te knippen. Dit maakt genoombewerking (genome editing) mogelijk.

In 2020 werd de Nobelprijs voor chemie gewonnen door twee pioniers op het gebied van CRISPR-Cas9.<sup>19</sup> Het Cas9 (CRISPR associated proteïn 9) is een enzym dat door de streptococce bacterie

gemaakt wordt. Cas9 enzymen knippen bepaalde DNA sequenties. Van nature wordt het doelwit DNA van Cas9 bepaald door een complementaire RNA-kopie van DNA die eerder in het bacterie is binnengedrongen. Onderzoekers hebben ontdekt hoe ze het doelwit DNA van Cas9 gericht kunnen bepalen. Op deze manier kunnen onderzoekers:

- een gekozen gen deactiveren om te ontdekken welke functie die gen normaal vervult.
- een gekozen stuk genetisch materiaal invoegen daar waar de Cas9 enzym een knip heeft gemaakt.

Deze technieken zijn nog experimenteel, maar er is duidelijk veel potentie voor de gentechnologie. Denk bijvoorbeeld aan genterapie (het genezen van aandoeningen met een genetische oorzaak door specifiek genetisch materiaal in te brengen in het DNA van een ziek individu). Er wordt volop geïnvesteerd in deze innovaties, en door de ontwikkelingen omtrent nieuwe diagnose-technologieën voor Covid-19 wordt deze trend versterkt.

Het MIT, bijvoorbeeld, investeert in CRISPR technieken om snel test-strips voor Covid-19 te maken.<sup>20</sup> Steeds meer Cas enzymen worden ontdekt die onder meer de detectie van DNA mogelijk maken (bijv. Cas12 en Cas13 recentelijk). Dit biedt alternatieven voor de qRT-PCR technieken

<sup>18</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=NMwv73U0oyM>

<sup>19</sup> <https://www.agro-chemie.nl/nieuws/nobelprijs-voor-pioniers-op-het-gebied-van-genoombewerking/>

<sup>20</sup> <https://www.youtube.com/watch?v=NMwv73U0oyM>



(kleine hoeveelheden DNA exponentieel vermenigvuldigen en met fluorescentie analyseren) die al eerder in het hoofdstuk over vaccine productietechnieken staan beschreven.

De MIT sneltest-strip-techniek voor Covid-19 werkt als volgt: een Cas enzym (Cas12b) is ontdekt die met SARS-CoV-2 RNA kan worden geïnstrueerd om het virus DNA te knippen.<sup>21</sup> Vervolgens wordt met een single-stranded DNA (ssDNA) probe en een immunochromatografie strip (vergelijkbaar met de zwangerschapsteststrip) de gekipte Covid-19 RNA gedetecteerd.<sup>22</sup> Deze techniek van MIT is maar een voorbeeld. In Nederland heeft TNO ook een op fluorescentie gebaseerde Cas12 diagnostische techniek ontwikkeld.<sup>23</sup> En in Australië hebben onderzoekers laten zien hoe de Cas13b enzym de replicatie van een SARS-CoV-2-virus in geïnfecteerde menselijke cellen kan stoppen.<sup>24</sup> Dit is een grote stap in de ontwikkeling van antivirale geneesmiddelen. Of deze nieuwe innovaties kansen beiden voor de watersector is niet te verwachten. Mogelijke impacts zullen indirect zijn, bijvoorbeeld door vermindering van medicijnresten in water doordat de antivirale geneesmiddelen andere middelen vervangt.

CRISPR technologie wordt breder gebruikt voor

gentherapie. De oorzaak van de meeste erfelijke en aangeboren aandoeningen ligt aan afwijkingen in het DNA. Gentherapie is het genezen van deze aandoeningen door bepaalde genetisch materiaal uit te zetten/in te brengen in het DNA van de ziek individu. Er wordt veel onderzoek gedaan over synthetisch boodschapper-RNA als een middel om CRISPR producten te introduceren in het lichaam. Ook deze innovaties zouden indirecte gevolgen voor de watersector kunnen hebben op de lange termijn, bijvoorbeeld door de medicijngebruik te verminderen.

<sup>21</sup> <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0513-4>

<sup>22</sup> <https://www.forbes.com/sites/johncumbers/2020/03/14/with-its-coronavirus-rapid-paper-test-strip-this-crispr-startup-wants-to-help-halt-a-pandemic/>

<sup>23</sup> Bogers, J. F., Berghuis, N. F., Busker, R. W., van Booma, A., Paauw, A., & van Leeuwen, H. C. (2021). Bright fluorescent nucleic acid detection with CRISPR-Cas12a and poly (thymine) templated copper nanoparticles. *Biology Methods and Protocols*, 6(1), bpaa020

<sup>24</sup> <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24577-9>



## Meer informatie

- <https://www.technologyreview.com/2020/12/09/1013538/what-are-the-ingredients-of-pfizers-covid-19-vaccine/>
- <https://www.technologyreview.com/2021/02/05/1017366/messenger-rna-vaccines-covid-hiv/>
- <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00191-z>
- <https://lsi.ubc.ca/2020/11/13/lsi-spinoff-company-the-source-of-technology-pfizers-mrna-covid-19-vaccine-cant-work-without/>
- <https://www.labiotech.eu/best-biotech/biotech-companies-cambridge-uk/>
- Blakney, A. K., Ip, S., & Geall, A. J. (2021). An update on self-amplifying mRNA vaccine development. *Vaccines*, 9(2), 97.
- <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.628415/full>
- <https://theconversation.com/what-is-mrna-the-messenger-molecule-thats-been-in-every-living-cell-for-billions-of-years-is-the-key-ingredient-in-some-covid-19-vaccines-158511>
- CRISPR technologies to rapidly diagnose Covid-19: <https://www.youtube.com/watch?v=NMwv73U0yM>
- Heijnen, L. (2019). Verkenning van de toepassingsmogelijkheden van MinION sequencing. Rapport BTO 2019.057, KWR Water Research.
- <https://www.nature.com/articles/nrd.2017.243>
- <https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/rna-polymerase-function-and-definition-346823>
- <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/rna-synthesis>
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961217307639>
- <https://bioprocessintl.com/bioprocess-insider/upstream-downstream-processing/collaboration-aims-to-address-large-dna-plasmid-scale-up-issues/>
- <https://www.biaseparations.com/en/library/posters/423/convective-interaction-media-cimr-monolithic-columns-for-semi-preparative-and-preparative-separations-and-purification-of-biomolecules>
- <https://theconversation.com/4-things-about-mrna-covid-vaccines-researchers-still-want-to-find-out-154160>
- <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0513-4>
- Bogers, J. F., Berghuis, N. F., Busker, R. W., van Booma, A., Paauw, A., & van Leeuwen, H. C. (2021). Bright fluorescent nucleic acid detection with CRISPR-Cas12a and poly (thymine) templated copper nanoparticles. *Biology Methods and Protocols*, 6(1), bpaa020
- Ipsen Biopharm Ltd. Novel Production Process for a Highly Potent Recombinant Protein Using Doggybone DNA (dbDNA) Vector and Cell Free Expression Technology. 2020. Available online: <https://gtr.ukri.org/projects?ref=104201>
- <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24577-9>
- <https://www.agro-chemie.nl/nieuws/nobelprijs-voor-pioniers-op-het-gebied-van-genoombewerking/>
- <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24577-9>
- Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* **586**, 516–527 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>
- <https://biologielessen.nl/index.php/dna/638-translatie>. Zie ook: <https://www.youtube.com/watch?v=wtT4EgqbcGc&t=117s>
- <https://www.universiteitleiden.nl/nieuws/2020/09/nanobolletjes-en-het-immuunsysteem>
- <https://www.drinkwaterplatform.nl/pcr-methode-drinkwater/>
- Heijnen, L., Hornstra, L. (2021) *High throughput (q)PCR screening: evaluatie van de toepassingsmogelijkheden*. BTO 2021.023
- Carnes, A., Hodgson, C., & Williams, J. (2004). 818. Optimization of E. coli Fermentation for Plasmid DNA Production. *Molecular Therapy*, 9(S1), S310.
- Ipsen Biopharm Ltd. Novel Production Process for a Highly Potent Recombinant Protein Using Doggybone DNA (dbDNA) Vector and Cell Free Expression Technology. 2020. Available online: <https://gtr.ukri.org/projects?ref=104201>
- <https://www.biomay.com/cdmo-service/plasmid-dna/>
- Schmidt, A., Helgers, H., Vetter, F. L., Juckers, A., & Strube, J. (2021). Digital Twin of mRNA-Based SARS-COVID-19 Vaccine Manufacturing towards Autonomous Operation for Improvements in Speed, Scale, Robustness, Flexibility and Real-Time Release Testing. *Processes*, 9(5), 748.
- <https://www.biaseparations.com/>
- <https://www.youtube.com/watch?v=NMwv73U0yM>
- <https://www.agro-chemie.nl/nieuws/nobelprijs-voor-pioniers-op-het-gebied-van-genoombewerking/>
- <https://www.youtube.com/watch?v=NMwv73U0yM>
- <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0513-4>
- <https://www.forbes.com/sites/johncumbers/2020/03/14/with-its-coronavirus-rapid-paper-test-strip-this-crispr-startup-wants-to-help-halt-a-pandemic/>
- Bogers, J. F., Berghuis, N. F., Busker, R. W., van Booma, A., Paauw, A., & van Leeuwen, H. C. (2021). Bright fluorescent nucleic acid detection with CRISPR-Cas12a and poly (thymine) templated copper nanoparticles. *Biology Methods and Protocols*, 6(1), bpaa020
- <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24577-9>

## Keywords

Corona, RNA, technologie