

Projektabschlussbericht - Teil I Kurzbericht

Projektpartner: **Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und
Infektionsbiologie**
– Hans-Knöll-Institut

FKZ: **03COV17D**

Laufzeit des Vorhabens: **01.01.2021 – 30.06.2024**

Während der SARS-CoV-2 Pandemie rückte der Fokus der Forschung in vielen Gebieten zu viralen Infektionen durch das neubeschriebene Coronavirus, sowie dessen assoziierten Erkrankung Covid-19. International wurde die Fachliteratur als auch die täglichen Medien von der Pandemie dominiert. Neben intensiven Anstrengungen zur Erforschung der auftretenden Virusvarianten, der Transmissionswege und der Pathophysiologie der Infektion, wurde schnell auch die Notwendigkeit innovativer Therapie- und Diagnostikansätze deutlich. Basierend auf dieser Fragestellung wurde das Verbundvorhaben ViKon als Kooperation des dem Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut (TV1), dem Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (TV2), der Julius-Maximilian-Universität Würzburg (TV3) sowie dem Leibniz Institut für Virologie in Hamburg (TV4) durchgeführt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Expertisen wurde in enger Zusammenarbeit und interdisziplinär das Projekt „Zielgesteuerte Elimination von SARS-CoV-2 durch Mikropartikel-basierte hochaffine Virus-Binde-Konjugate“ bearbeitet. Wissenschaftlicher Ausgangspunkt für das Vorhaben war die hochspezifische Virus-Wirt-Interaktion in Form vom viralen Oberflächenprotein (Spike-Protein) mit dem Angiotensin-konvertierenden Enzym 2 (ACE2) humaner Zellen. Viren werden auf Grund ihrer geringen Größe mittels Endozytose oder Makropinozytose in Immunzellen aufgenommen und nutzen diese anschließend für ihre eigene Replikation. Eine Eliminierung von SARS-CoV-2 mittels Phagozytose und anschließender Prozessierung in einem Phagolysosomen wird somit umgangen. Durch die Verwendung hochaffiner Bindekonjugate sollten größere Virus-Aggregate gebildet werden und durch die Größenzunahme die aktive Nutzung des Phagozytose-Mechanismus forciert. Zur Umsetzung dieser Problematik wurden Nanopartikel aus PLGA formuliert, welche anschließend mit einem hochaffinen ACE2-homologen Peptid funktionalisiert werden sollten. Für PLGA wurde sich entschieden, da es zum einen bioabbaubar ist und somit eine Anreicherung von Mikroplastik vermieden wird und zum anderen da es als Biopolymer bereits durch die FDA in der medizinischen Verwendung zugelassen ist. Auf der anderen Seite gestaltete sich die Peptidsynthese als herausfordernd und letztendlich wurde ein von einer Forschungsgruppe um David Baker bereits veröffentlichter Mini-protein-Inhibitor (im folgenden Minibinder) verwendet. Funktionalisierte Nanopartikel zeigten eine Bindung der SARS-CoV-2-RBD und deren therapeutischer Einsatz erzielte

eine signifikante Virusneutralisierung *in vitro*. Durch die ständige Optimierung der Partikel selbst als auch des Minibinders wurde unter Verwendung von Click-Cemie ein modulares System geschaffen. Diese Module können im späteren Verlauf einzeln modifiziert werden um folglich schnell und effektiv auf „Variants of Concern“ zu reagieren. Des Weiteren ermöglicht das etablierte Baukastenprinzip eine Anpassung an weitere respiratorische Viren wie RSV und/oder Influenza. Neben der Neutralisation wurden die Partikel sowohl von chemisch-physikalischer Seite hinsichtlich ihrer Stabilität oder Größenhomogenität als auch von biologischer Seite umfassend charakterisiert. Insbesondere die Verwendung zahlreicher Zellmodelle, welche simple Zellkulturen (Calu-3, THP-1 und RAW264.7), komplexe Liquid-Air Interfaces als auch primäre humane Zellen (PBMCs) umfassten wurden verwendet. Dabei wurden die Fragestellungen der Zytotoxizität, Fähigkeit zur Phagozytose und intrazellulärer Prozessierung, sowie Immunmodulation adressiert. Neben der Virus-Partikel-Komplex Bildung und der daraus resultierenden Virusneutralisation, waren diese Aspekte entscheidend für den Erfolg des Projektes und die letztendlich geplante *in vivo* Translation. Die Phagozytose bildet die Grundlage für die effektive Eliminierung der Viruskomplexe im Phagolysosom, sowie in Konsequenz eine verbesserte und schnellere Antigenpräsentation und Initialisierung der T- und B-Zellantwort. Im Projektzeitraum konnte eine effiziente Aufnahme der Virus-Partikel-Komplexe durch Immunzellen und die anschließende intrazelluläre Ansäuerung und Rekrutierung Phagolysosomaler-Marker belegt werden.

Im Anschluss an die *in vitro* Arbeiten und unter einer Laufzeitverlängerung des Projektes wurde in Kooperation mit den Verbundpartnern aus Jena und Hamburg ein Konzept erarbeitet, um das therapeutische Potential der funktionalisierten Nanopartikel („best hit“ VBKs) in dem Tiermodell „Syrischer Goldhamster“ zu validieren. Dieses Modell spiegelt wesentliche Aspekte der SARS-CoV-2 Pathogenese wieder und wurde zu vor im Detail am LIV, Hamburg etabliert und charakterisiert. Im Rahmen dieser Versuche wurde zunächst ein pharmakokinetisches Profil der Verbindungen aufgenommen, um eine geeignete Dosis für die Wirksamkeitsstudie zu identifizieren. Leider konnte zum jetzigen Zeitpunkt noch kein protektiver Effekt der VBKs in den SARS-CoV-2 infizierten Goldhamstern erzielt werden.

Schlussendlich konnten wir als Verbundprojekt ViKon im Rahmen von InfectControl das geplante Projektvorhaben in Form einer „Zielgesteuerte Elimination von SARS-CoV-2 durch Mikropartikel-basierte hochaffine Virus-Binde-Konjugate“ erfolgreich bearbeiten. Es ist uns gelungen ein innovatives, modulares Therapiekonzept zu etablieren und auf Grund der bewilligten Laufzeitverlängerung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu charakterisieren. Die enge Zusammenarbeit und der stetige Austausch der Projektpartner, insbesondere aus Jena und Hamburg, ermöglichten die Lösung zahlreicher Herausforderungen und den Ausbau einer umfassenden methodischen Expertise. Diese Bemühungen ermöglichten die Anmeldung eines Patentes am 14. November, 2023.