

Der vorliegende Beitrag wurde beim Deutschen Studienpreis 2023 mit dem 2. Preis in der Sektion Natur- und Technikwissenschaften ausgezeichnet. Er beruht auf der 2022 an der Technischen Universität München eingereichten Dissertation „Programmable DNA Origami Shell Platform for Virus Neutralization“ von Dr. Christian Sigl.

Die Virusfalle – ein generisches antivirales Therapeutikum

Virusinfektionen

Viren stellen eine existenzielle Bedrohung für die Menschheit dar. Sie verursachen verschiedene Arten von Krankheiten – von kleinen, kaum wahrnehmbaren Infektionen bis hin zu tödlichen Erkrankungen. Für die meisten Viren gibt es keine wirksame Behandlung. Folglich sterben jedes Jahr Millionen von Menschen an viralen Infektionen. Die WHO zählte allein im Jahr 2021 650.000 Todesfälle aufgrund von HIV-Infektionen und mehr als 38 Millionen HIV-Infizierte.¹ Jährlich sterben 820.000 Menschen an den Folgen einer Infektion mit Hepatitis B Viren.² Neu auftretende Viren oder Mutationen stellen eine zusätzliche Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. Die SARS-CoV-2-Pandemie hatte bis heute 6,8 Millionen Todesfälle zur Folge.³ Neben den Auswirkungen auf die Gesundheit von Millionen von Menschen verursachen Viren enorme wirtschaftliche Schäden. Zum Beispiel werden die durch Influenzaviren verursachten jährlichen Kosten für das Gesundheitssystem und die Wirtschaft allein in den USA auf 11,2 Milliarden US-Dollar geschätzt.⁴

Zoonotische Viren – Viren, die durch Mutationen oder Anpassungen des Virus von Tieren auf den Menschen übertragen werden können – stellen eine weitere enorme Bedrohung für uns Menschen dar. Zoonotische Viren sind meist nicht auf den Menschen als Wirt angepasst und haben oft schwere Krankheitsverläufe mit hohen Sterberaten zur Folge. Sie bergen zusätzlich das große Risiko eines epidemischen Ausbruchs, weil es für diese Viren keine oder kaum eine Immunität in der Bevölkerung gibt. Der Klimawandel, die fortschreitende Globalisierung und eine zunehmende Urbanisierung machen den Ausbruch und eine schnelle weltweite Verbreitung eines neuen Virus wahrscheinlich. Zoonotische Viren werden mit großer Sicherheit weitere Pandemien in Zukunft verursachen.

¹ <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/strategic-information/hiv-data-and-statistics>

² <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

³ <https://covid19.who.int/>

⁴ <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X18306777>

Effektive antivirale Therapien gibt es nur für wenige virale **Krankheitserreger und müssen** derzeit für jedes Virus individuell entwickelt werden. Es gibt keine breit anwendbare antivirale Therapie, die – ähnlich wie ein Antibiotikum gegen Bakterien – gegen viele verschiedene Viren eingesetzt werden kann. Auch Impfungen stehen nur für einen kleinen Teil der Viren zur Verfügung. Für neu auftretende Viren oder Virenmutationen gibt es keine Garantie, dass schnell ein wirksames Medikament oder eine Impfung entwickelt werden kann. Neue Ansätze für breit anwendbare antivirale Therapien sind deshalb dringend notwendig.

Antivirale Therapien

Viren können sich nicht selbst vermehren und sind auf die Replikationsmaschinerie von lebenden Zellen angewiesen, um neue Viruspartikel zu produzieren. Dazu muss ein Virus seine genetische Information in eine Wirtszelle transportieren, in der die Information ausgelesen wird und neue Viren produziert werden. Die genauen Mechanismen der Verbreitung und Replikation von Viren unterscheiden sich zwischen den viralen Krankheitserregern. Dennoch gibt es einen wesentlichen und universellen Schritt im Lebenszyklus eines jeden Virus, die Bindung von Viruspartikeln an ihre Wirtszellen. Viren sind mit Proteinen auf ihrer Oberfläche ausgestattet, die an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden. Zum Beispiel besitzen Sars-CoV-2 Partikel Spikeproteine in ihren Hüllen, die an ACE2-Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen binden. Influenzaviren verfügen über Hämagglutinin-Glycoproteine, die an Sialinsäuren auf Zelloberflächen binden. Wird diese Interaktion blockiert, so kann der Virus seine genetische Information nicht in die Zelle transportieren, der virale Lebenszyklus wird unterbrochen und die Replikation des Virus gestoppt.

Viele existierende antivirale Medikamente und Mechanismen des Immunsystems zielen auf genau diesen Schritt des viralen Lebenszyklus ab. Zum Beispiel verhindern einige neutralisierende Antikörper, die ein Hauptbestandteil des menschlichen Abwehrmechanismus gegen virale Pathogene sind, die Bindung von Viren an ihre Wirtszellen. Neutralisierende Antikörper werden vom adaptiven Immunsystem produziert. Durch die Bindung an virale Proteine blockieren die Antikörper sterisch die Bindungsstellen von Virenproteinen und Zellrezeptoren und verhindern damit die Interaktion von Viren mit ihren Wirtszellen. Zum Beispiel können neutralisierende Antikörper gegen SARS-CoV-2 durch das Blockieren der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) der SARS-CoV-2-Spike-Proteine die Bindung von viralen Partikeln an ihre Wirtszellen verhindern. Neutralisierende Antikörper werden vom adaptiven Immunsystem produziert, wenn es einem viralen Pathogen ausgesetzt ist. Sie

existieren jedoch nicht, wenn ein Organismus zum ersten Mal von einem viralen Pathogen infiziert wird, und bieten daher keinen Schutz vor neu auftretenden Viren oder Virenmutationen.

Eine Möglichkeit, eine virale Infektion zu mildern, ist die Verabreichung von neutralisierenden Antikörpern, die aus anderen bereits genesenen Personen extrahiert wurden. Alternativ kann die Produktion von Antikörpern durch Impfstoffe initiiert werden, die das Immunsystem einem viralen Stimulus aussetzen und vor der Infektion des eigentlichen Virus verabreicht werden. Impfstoffe sind jedoch nicht für jedes Virus verfügbar, variieren in ihrer Effizienz und müssen für verschiedene Viren individuell entwickelt werden. Außerdem können Mutationen von Viren die Bindung bereits existierender Antikörper reduzieren oder verhindern. Es sind deshalb zwingend zusätzliche Maßnahmen notwendig, um virale Infektionen zu bekämpfen, insbesondere für neu auftretende Virenstämme oder Virusmutationen.

Die Virenfalle – eine neue Breitbandtherapie gegen Viren

In meiner Doktorarbeit habe ich ein neuartiges antivirales Konzept entwickelt, das gegen viele verschiedene Viren eingesetzt werden kann – die Virenfalle. Im Gegensatz zu den meisten existierenden antiviralen Wirkstoffen zielt unser Ansatz nicht auf einzelne virale Proteine oder Prozesse ab, sondern neutralisiert Viren, indem sie in Nanoschalen eingefangen werden (Abb. 1). Das Einschließen der Viren in den Schalen blockiert die Interaktion der Viren mit deren Wirtszellen, was ein essenzieller Bestandteil des Lebenszyklus eines jeden Virus ist. Folglich können viele verschiedene Viren durch das Einfangen in den Schalen neutralisiert werden.

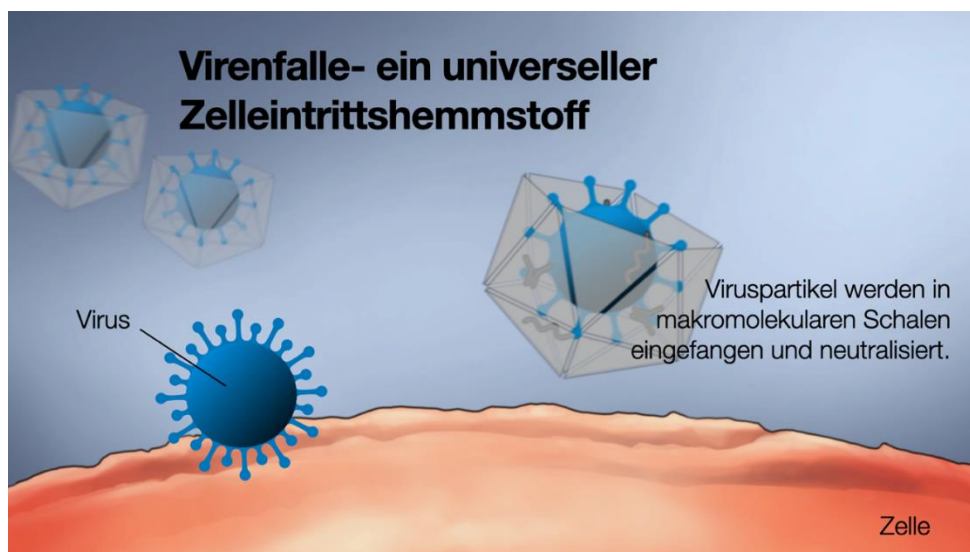


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Virenfalle als Zelleintrittshemmstoff.

Die Größe der meisten Viren, die gefährlich für Menschen sind, liegt im Bereich von 20 bis 200 Nanometer. Um all diese Viren einschließen zu können, müssen Schalen mit diesen Größen hergestellt werden, was eine große Herausforderung in der Nanotechnologie darstellt. In meiner Doktorarbeit habe ich ein generisches Designkonzept entwickelt, das es ermöglicht, Schalen mit ähnlicher Größe und Komplexität von Viren herzustellen. Die Schalen werden mit der Fabrikationsmethode der DANN-Origami-Technologie konstruiert und imitieren den Aufbau von Virus-Kapsiden. Das Innere der Schalen kann leicht mit verschiedenen virusbindenden Molekülen modifiziert und somit „klebrig“ für Viren gemacht werden. Durch die Modifizierung kann eine Vielzahl von Viren in den Schalen eingefangen werden. Ich habe das antivirale Konzept an zwei verschiedenen Viren – Hepatitis-B-Virus (HBV)-Kernkapsiden und Adeno-assoziierten Viren (AAV) – getestet. Beide Viren wurden erfolgreich von den Schalen eingeschlossen und neutralisiert. Die Grundlage unseres antiviralen Ansatzes wurde unter anderem in dem renommierten Journal *Nature Materials* veröffentlicht (<https://www.nature.com/articles/s41563-021-01020-4>).

Künstliche DNA-Origami-Schalen

Die Einkapselung ganzer Viren erfordert den Aufbau großer, massiver, makromolekularer Schalen. DNA-Origami ist eine neuartige Fabrikationsmethodik, die genau dies auf einzigartige Weise ermöglicht. Die Methode des DNA-Origami erlaubt es, mit rationalem Design nanoskalige Werkzeuge und Maschinen aus DNA-Molekülen systematisch aufzubauen. Dabei wird ein langer DNA-Einzelstrang („Gerüststrang“) durch mehrere kürzere DNA-Oligonukleotide („Klammerstränge“) in eine spezifische Form gebracht. Die Form des hergestellten Objekts wird dabei von der Sequenz der DNA-Klammerstränge definiert und kann je nach Anwendung und Zielobjekt benutzerdefiniert angepasst werden. Mithilfe der DNA-Origami-Technologie entwickelte ich eine Plattform, die es ermöglicht, Schalen zu konstruieren, die groß genug sind, um ganze Viren in ihrem Inneren einzuschließen. Der Aufbau der künstlichen DNA-Origami-Schalen beruht auf Designprinzipien ikosaedrischer Virenkapside. Die meisten kugelförmigen Viren nutzen eine ikosaedrische Symmetrie, um ihre Kapside zu formen. Ich ahmte dieses Designkonzept nach, um künstlichen Schalen aus DNA zu formen. Die Schalen bestehen aus dreieckigen Untereinheiten, die mit der Methode des DNA-Origami geformt werden. Durch Anpassung des Dreiecksdesigns konnte ich erfolgreich verschiedene oktaedrische und ikosaedrische Schalen mit Innendurchmessern von 40 bis zu 280 Nanometern konstruieren (Abb. 2A).

Die DNA-Origami-Schalen müssen über ausreichend große Öffnungen verfügen, um Viren innerhalb vorgefertigter Schalen einfangen und neutralisieren zu können. Die Größe der Öffnung kann durch das Design der dreieckigen Untereinheiten

beliebig definiert und verändert werden. Beispielsweise kann eine halbe Oktaeder-Schale, eine halbe Ikosaeder-Schale und eine Ikosaeder-Schale mit einer kleineren Öffnung konstruiert werden (Abb. 2B). Viren können somit in das Innere der Schalen gelangen.

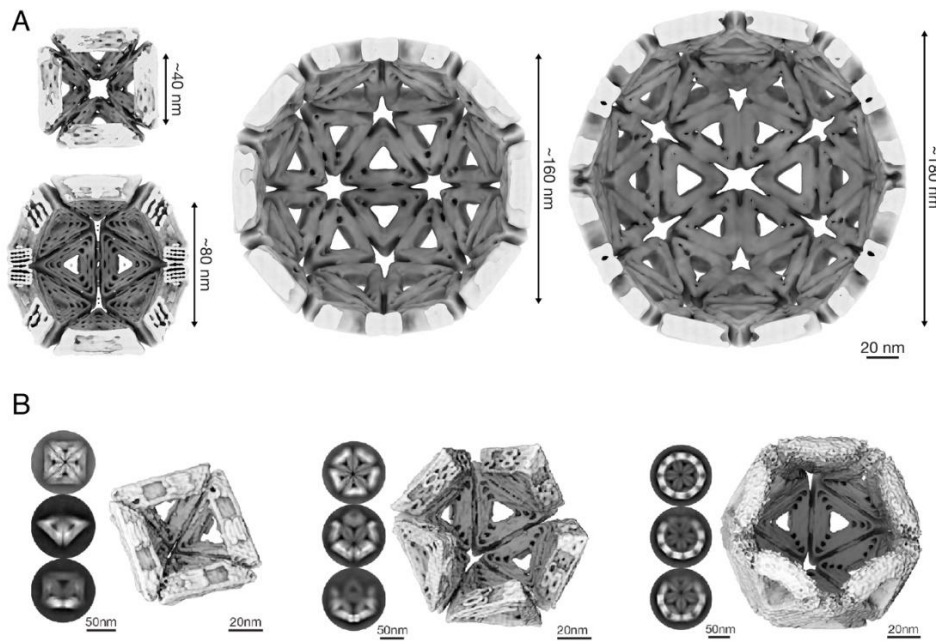


Abbildung 2: Designkonzept der ikosaedrischen Schalenplattform. (A) Schnitte durch die künstlichen DANN-Origami-Schalen, die mithilfe der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie rekonstruiert wurden. (B) Rekonstruktionen von drei verschiedenen Virusfallen-Prototypen mit 40 bis 85 nanometergroßen Öffnungen.

Einschließen von Viren in der Virenfalle

Um Viren innerhalb der Schalen einzufangen, muss das Innere der Schalen mit virusbindenden Molekülen ausgekleidet werden. Die Zahl und Positionierung der Virusbinder können dabei durch das Design der dreieckigen Untereinheiten genau festgelegt werden. Beispielsweise können bis zu 90 Antikörper in den Hohlraum einer halben Ikosaeder-Schale montiert werden (Abb. 3A). Mögliche Binder sind Antikörper, Peptide, Polymere, Aptamere oder jedes andere Molekül, das eine gewisse Affinität zu dem Zielvirus besitzt. An diese können Viren im Inneren der Schalen gleichzeitig binden. Mit diesem Ansatz können aufgrund der multivalenten Bindung auch Moleküle mit geringer Bindeaffinität verwendet werden, die Viren allein nicht neutralisieren können. Zudem können Moleküle in den Schalen befestigt werden, die eine Affinität zu verschiedenen Viren besitzen (z.B Heparansulfat). Dadurch

können in ein und derselben Schale unterschiedliche Viren gefangen werden – eine Breitbandfalle gegen Viren.⁵

Um die Machbarkeit unseres Konzepts zu demonstrieren, haben wir Antikörper an der Innenseite der Schalen angebracht und verschiedene Viren eingefangen. Beispielsweise konnten Hepatitis-B-Virus (HBV)-Kernkapside erfolgreich in Virenfallen eingeschlossen werden. Dies haben wir mithilfe der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (eine bildgebende tomografische Methode mit bis zu atomarer Auflösung) experimentell überprüft (Abb. 3B). Insbesondere konnten wir zeigen, dass zwei halbe Oktaeder ein HBV-Partikel in ihrer Mitte einfangen. Die Ikosaeder-Schalen weisen einen größeren Innenraum auf und können bis zu drei HBV-Partikel vollständig einschließen.

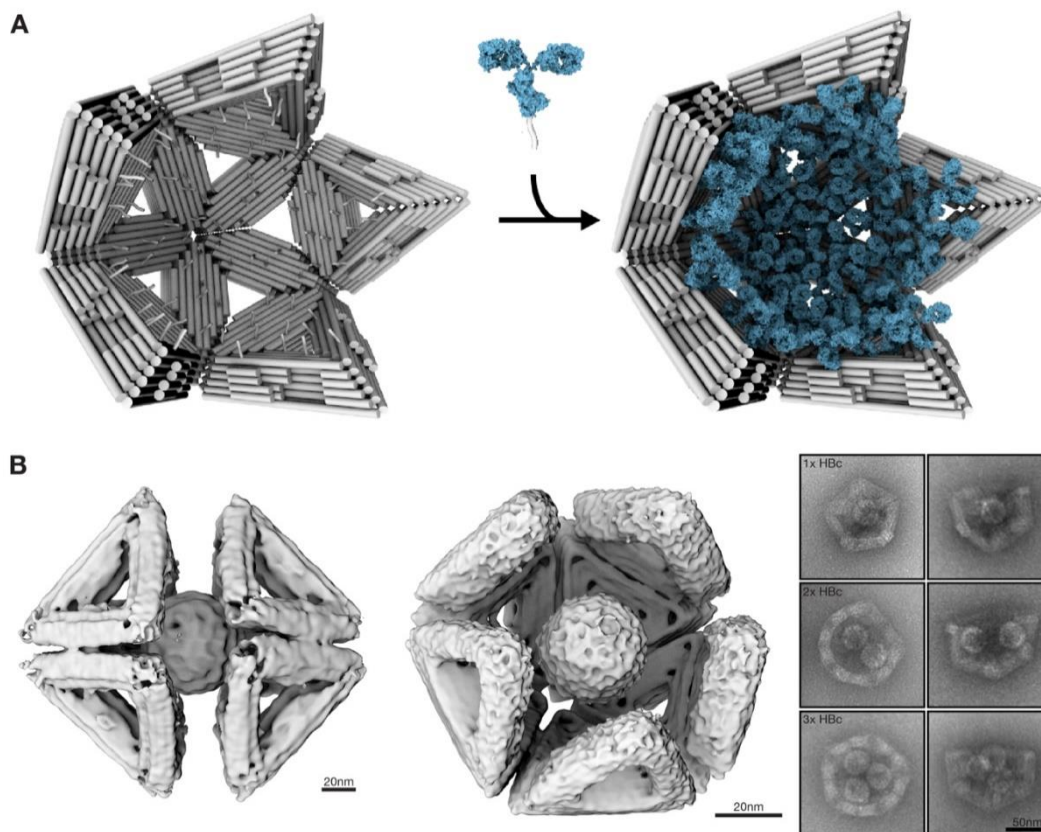


Abbildung 3: Fangen von Viren in der Virenfalle. (A) Schemata, die die Anbindung von Virenbindern (z.B. Antikörper) an die Innenseite der Virenfalle zeigt. (B) Links: Kryo-EM-Rekonstruktionen des Halboktaeders und der halben Ikosaeder-Schale, die ein Hepatitis-B-Partikel in ihrer Mitte einschließen. Rechts: Negativfärbungs-TEM-Bilder von Ikosaeder-Schalen, die bis zu drei Hepatitis-B-Partikel einfangen.

⁵ <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.1c11328>

Alle Schalen umgeben die viralen Partikel mit einer 15 Nanometer dicken Schicht aus DNA, die jede Interaktion zwischen Viren und Wirtszellen blockieren sollte. Um dies zu demonstrieren, haben wir HBV-Partikel und Adeno-assoziierte Viren (AAV) in DNA-Origami-Schalen eingeschlossen. Die Schalen blockierten bis zu 99% aller HBV-Partikel und neutralisierten effektiv infektiöse AAV in Zellkultur.

Kommerzialisierung der Virenfalle

Die Virenfalle bildet die Grundlage des EU-Forschungsprojekts VIROFIGT, in dem ich als Projektkoordinator tätig war. VIROFIGT umfasst Experten für DNA-Nanotechnologie, Proteindesigner und Virologen und wurde vor zwei Jahren auf der Grundlage der antiviralen Schalen-Plattform initiiert. Aufgrund der breiten Expertise des Konsortiums gelang es, zehn Viren verschiedener Virenfamilien in den DNA-Origami-Schalen zu fangen. Darüber hinaus haben wir die Neutralisationskapazität der Virenfalle für sechs verschiedene Viren erfolgreich in Zellkultur mit menschlichen Zellen getestet.

Aufgrund der hervorragenden Forschungsergebnisse haben wir im November 2021 die capsitec GmbH mit dem Ziel gegründet, die Virenfalle zu kommerzialisieren. Ich bin Mitgründer und seit Beginn Geschäftsführer der GmbH. capsitec erhält Förderung durch die Bundesagentur für Sprunginnovationen (SPRIND) und ist Teil einer Challenge mit dem Ziel, neue antivirale Therapien zu entwickeln. Wir sind eines der sechs Teams im Halbfinale der Challenge. Die Teilnahme an der SPRIND-Challenge ermöglicht es uns, Büro- und Laborflächen anzumieten, in denen wir derzeit unsere eigene Produktion der Virenfalle optimieren und die präklinische Validierung der Virenfalle vorantreiben.

Fazit

Die Virusfalle bietet einen vielversprechenden Ansatz, um viele verschiedene Virusinfektionen mit derselben Plattform zu therapieren. Durch Austausch der virenbindenden Moleküle oder den Einsatz von Breitband-Bindern kann dieselbe Schale für viele verschiedene Viren verwendet werden. Darüber hinaus können wir sie schnell an neue aufkommende Viren und Virusmutationen anpassen. Während meiner Promotion habe ich die Grundlage für eine generische antivirale Therapie gelegt. Unser antivirales Konzept hat das Potenzial, existierende Vireninfektionen zu behandeln und zukünftige virale Ausbrüche zu verhindern.