

Vielversprechender Wirkstoff gegen das Coronavirus: ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein

Das Schwere-Akute-Respiratorische-Syndrom-Coronavirus Typ 2 (SARS-CoV-2) dockt mit seinem Spike-Protein an das sogenannte ACE2-Protein an, um in seine Wirtszellen einzudringen. Die lösliche extrazelluläre Domäne des ACE2-Proteins bindet ebenfalls an das Spike-Protein und kann das Virus neutralisieren. Allerdings ist der therapeutische Einsatz des löslichen ACE2-Proteins beschränkt, da es relativ schnell wieder aus dem Körper ausgeschieden wird. Ein Forschungsteam in München hat nun durch die Verknüpfung der extrazellulären Domäne des ACE2-Proteins mit dem Fc-Fragment eines IgG4 Antikörpers ein Fusionsprotein mit verbesserter Pharmakokinetik erzeugt. Das ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein neutralisiert Coronaviren mit hoher Wirksamkeit und schützt Zellen in Kultur vor einer Infektion mit dem Virus. Dieses Fusionsprotein inhibiert auch die als besorgniserregend eingestuften alpha-, beta- und delta-Varianten des Coronavirus mit 50%igen Hemmkonzentrationen im pikomolaren Bereich.

Das für die COVID-19-Pandemie verantwortlich SARS-CoV-2 infiziert seine Wirtszellen, indem es mit seinem Oberfläche-Spike-Protein an das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2) bindet (Abb. 1a). ACE2 kommt auf der Plasmamembran von Epithelzellen der Atemwege und der Lunge vor, aber auch auf Zellen des Verdauungstraktes, der Leber, der Nieren, des Gehirns und des kardiovaskulären Systems. ACE2 ist ein Transmembranprotein und besteht aus einer extrazellulären, membranüberspannenden und cytosolischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne besitzt enzymatische Aktivität und spaltet Angiotensin-2 in Angiotensin-(1-7). Während Angiotensin-2 gefäßverengende Eigenschaften hat, ist Angiotensin-(1-7) ein gefäßerweiterndes Agens und schützt dadurch Lunge, Herz, Nieren und andere Organe vor Beschädigungen.

Gegenwärtig wird zur Eindämmung der Coronapandemie auf Impfstoffe gegen das Spike-Protein des Coronavirus gesetzt: Die bisher eingesetzten Impfstoffe bewirken die Bildung von spezifischen Antikörpern, die an das Spike-Protein binden. Dadurch wird dieses Spike-Protein blockiert und das Coronavirus kann nicht mehr an Wirtszellen binden und sie infizieren (Abb.

1b). Allerdings kann das Coronavirus sein Spike-Protein durch Mutation verändern, mit der Folge, dass die gebildeten Antikörper nicht mehr binden und das Virus damit der Immunabwehr entkommen kann. Da das Coronavirus mit seinem Spike-Protein an das ACE2-Protein auf der Plasmamembran menschlicher Zellen bindet, um in diese einzudringen, sollten lösliche Versionen des ACE2-Proteins mit dem zellgebundenen ACE2-Protein um die Bindung an das Spike-Protein konkurrieren und eine Infektion der Zelle verhindern (Abb. 1c). Mit anderen Worten, ein auf ACE2 basierendes Medikament würde das Problem mit mutierten Spike-Proteinen umgehen, denn selbst ein verändertes Spike-Protein muss sich immer noch an das ACE2-Protein binden, damit das Virus Wirtszellen infizieren kann. Die Effektivität solcher auf ACE2 basierende Wirkstoffe wurde bereits nachgewiesen: So konnte die Viruslast in Organoiden durch Gabe einer löslichen Form des menschlichen ACE2-Proteins um den Faktor 1000-5000 gesenkt werden [1]. Da ACE2 das gefäßverengende Angiotensin-2 in gefäßerweiterndes Angiotensin-(1-7) spaltet, könnten Medikamente auf ACE2 Basis zudem die auf COVID-19 zurückzuführenden pathophysiologischen Folgen, unter anderen hervorgerufen durch erhöhte Angiotensin-2-Blutspiegel, mildern. Allerdings ist die therapeutische Einsetzbarkeit löslicher ACE2-Proteine begrenzt, da deren Halbwertszeit im menschlichen Körper bei etwa 10 Stunden liegt.

Um die Pharmakokinetik des ACE2-Proteins zu verbessern, hat nun ein Team aus Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern der Technischen Universität München, der Ludwig-Maximilians-Universität München und der Münchner Formycon AG die extrazelluläre Domäne des ACE2-Proteins mit dem Fc-Fragment eines menschlichen IgG Antikörpers fusioniert (Abb. 1d) [2]. Als Fusionspartner wurde das Fc-Fragment eines IgG4 Antikörpers verwendet, weil diese im Gegensatz zu IgG1 Fc-Fragmenten eine viel geringere Fc-vermittelte Komplementaktivierung und zelluläre Zytotoxizität zeigen. Dagegen zeigen IgG4 Fc-Fragmente im Vergleich zu IgG1 Fc-Fragmenten eine geringere Stabilität, weil sie zur Bildung von Halbantikörpern neigen. Um ein stabiles ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein zu erzeugen, wurde das Fc-Fragment eines IgG4 Antikörpers mit einer S228P Mutation in der Gelenkregion verwendet. Somit hatte das verwendete IgG4 Fc-Fragment einen identischen Kernbereich der Gelenkregion wie ein IgG1 Fc-Fragment (CPPC anstatt CPSC) (Abb. 2).

Mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass das ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein an das Spike-Protein des Coronavirus konzentrationsabhängig mit hoher Affinität bindet. Dabei wurde eine Dissoziationskonstante von 4 nM für die Bindung zwischen dem Fusionsprotein und dem Spike-Protein ermittelt. Die Neutralisierungsaktivität des ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein gegenüber dem Corona-Spike-Proteine wurde mithilfe eines kompetitiven Immunassay getestet. Eine 50%ige inhibitorische Konzentration (IC_{50} = die Konzentration des Fusionsproteins, bei der eine halbmaximale Hemmung der Bindung an das Spikeprotein beobachtet wird) von 3 nM für die Inhibierungsreaktion bestätigte die hohe Affinität des ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein für das Spike-Protein.

Das ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein war auch in der Lage, Coronaviren zu neutralisieren. So zeigten Verozellen, die mit Coronaviren behandelt wurden, die grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimieren und zuvor mit dem Fusionsprotein inkubiert worden waren, keine grüne Fluoreszenz. Wenn sie jedoch mit nicht vorbehandelten GFP-exprimierenden Coronaviren zusammengebracht wurden, leuchteten diese Verozellen grün unter dem Fluoreszenzmikroskope auf. Auch konnte das ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein aus Patienten isolierte Coronavirusvarianten neutralisieren. Das erste aus einem deutschen Patienten im Januar 2020 isolierte Coronavirus, das in direkter Verbindung zum COVID-19-Ausbruch im chinesischen Wuhan stand, wurde von dem Fusionsprotein mit einem IC_{50} -Wert von etwa 9 nM neutralisiert. Gegenüber einer zweiten Coronavirusvariante mit der D615G Mutation im Spike-Protein, die im April 2020 aus einem deutschen Patienten isoliert wurde, zeigte das Fusionsprotein sogar eine erhöhte Neutralisierungsaktivität mit einem IC_{50} -Wert von 0.4 nM. Auch Infektionen mit den als besorgniserregend eingestuften alpha-, beta- und delta-Varianten konnte das ACE2-IgG4-Fc Fusionsprotein in der Zellkultur mit IC_{50} -Werten von 0.4-0.6 nM verhindern.

Die Ergebnisse der Studie haben gezeigt, dass das ACE2-IgG4-Fc-Konstrukt ein hervorragender Wirkstoff zur Neutralisation von verschiedenen Coronavirusvarianten ist. Ob das Fusionsprotein auch gegen die hoch infektiöse omikron-Variante wirksam ist, müssen Versuche zeigen. Allerdings wird es auch noch eine Zeitlang dauern, bis der Wirkstoff als Medikament zugelassen werden kann. Zunächst muss der Wirkstoff noch in klinischen Studien

auf seine Wirksamkeit beim Menschen geprüft werden. Immerhin lässt sich das Fusionsprotein biotechnologisch einfach herstellen und mit der Auswahl eines IgG4-Fc-Fragments sollten Nebenwirkungen hervorgerufen durch eine Fc-vermittelte Komplementaktivierung oder zelluläre Zytotoxizität eher gering sein.

[1] V. Monteil et al., Cell **181**, 905 (2020). – [2] H.L. Svilenov et al., Antiviral Res. **196**, 105197 (2021).

PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England

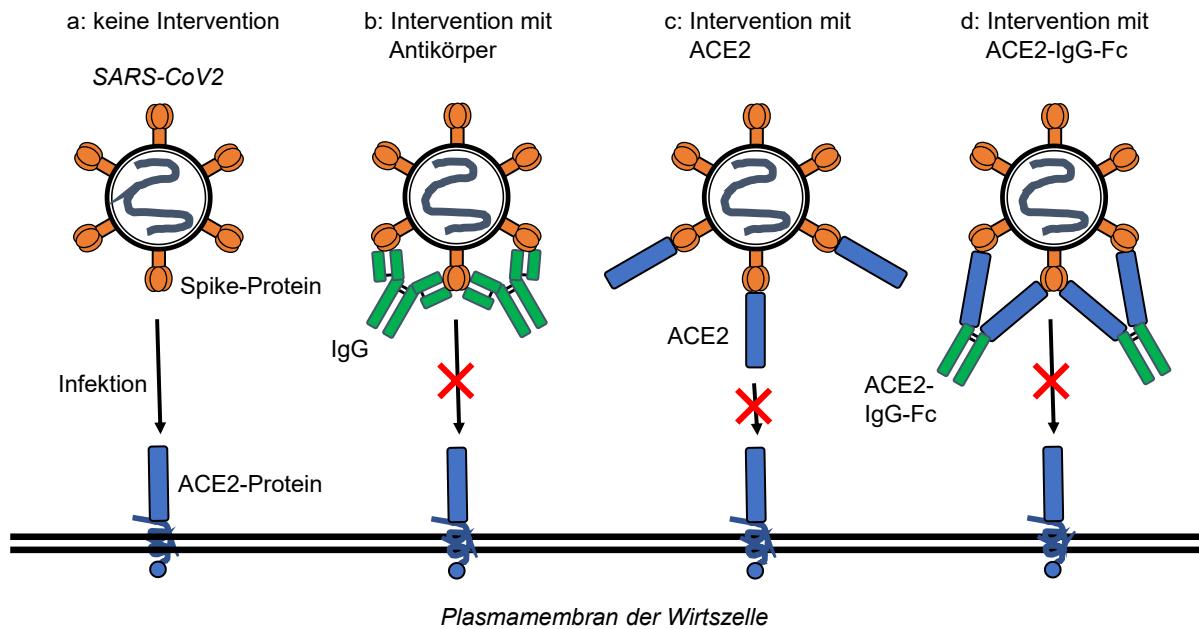


Abb. 1. Strategien zur Verhinderung einer Infektion von Zellen mit dem Coronavirus.

- **a.** Ohne intervenierenden Abwehrstoff bindet das Coronavirus mit seinem Spike-Protein an das ACE2-Protein und infiziert die Zelle.
- **b.** Anti-Spike-Protein Antikörper blockieren das Spike-Protein, sodass das Virus die Zelle nicht mehr infizieren kann.
- **c.** Die extrazelluläre ACE2-Domäne kann ebenfalls die Bindung des Spike-Proteins an das ACE-Protein verhindern.
- **d.** Auch ACE2-IgG-Fc Fusionsproteine binden mit ihrem ACE2-Bestandteil an das Spike-Protein und stoppen eine Infektion.

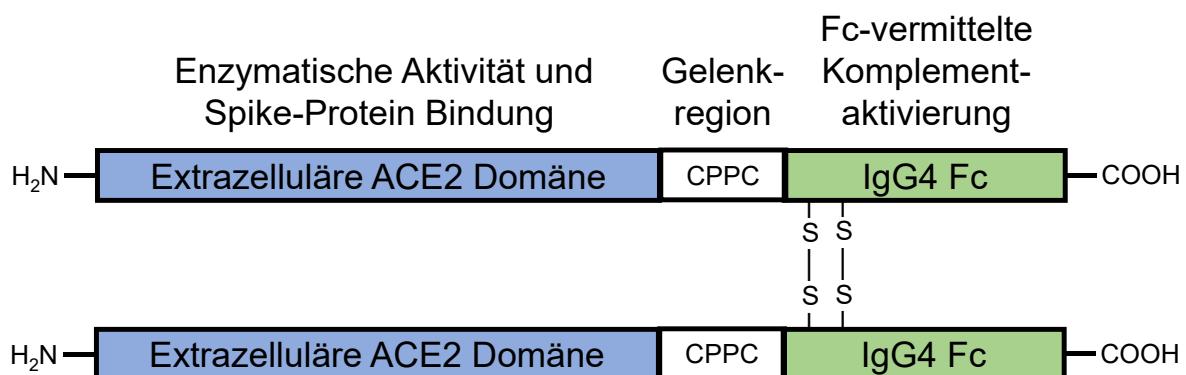


Abb. 2. Schematische Darstellung des ACE2-IgG4-Fc Fusionsproteins mit seinen funktionalen Eigenschaften. Nach [2]