

Abschlussbericht

zum Verbundprojekt

„Schnell-Hinweisgeber zum Nachweis von Corona Infektionen“ (Rapid-Corona)	
Förderkennzeichen	100484346
Laufzeit des Vorhabens	01.02.2021 bis 30.06.2023
Berichtsdatum	01.12.23
Ausführende Stelle	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg Am Hubland, 97074 Würzburg
Projektleitung	
Verbundpartner	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen (HNO) Josef-Schneider-Str. 11, 97080 Würzburg Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie (MKG) Pleicherwall 2, 97070 Würzburg 3a-diagnostics GmbH Benzstraße 2, 72636 Frickenhausen
Korrespondierender Autor des Berichts	Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg Am Hubland, 97074 Würzburg Lorenz.meinel@uni-wuerzburg.de

Teil I: Kurzbericht

Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das gemeinsame Ziel dieses Projekts besteht darin, einen hochwirksamen COVID-19-Sensor zu entwickeln, der als schneller Indikator für eine SARS-CoV-2-Infektion dient. Dieser innovative Sensor reagiert auf spezifische Proteasen im menschlichen Speichel und zeigt eine nachweisbare Veränderung des Geschmacks oder der Farbe an.¹ Der zentrale Bestandteil des Sensors ist eine Peptidsequenz, die auf den ausgewählten Proteasen basiert und selektiv von SARS-CoV-2-Viren gespalten wird, was zu einer eindeutigen Reaktion führt.²⁻⁵ Im Verlauf des Projekts wurden verschiedene Proteasen umfassend untersucht, entsprechende Peptidsequenzen entwickelt und ihre Anwendung als COVID-19-Sensor sorgfältig überprüft. Um eine weitreichende Anwendung zu ermöglichen, ist die geplante Darreichungsform des Sensors ein oral einnehmbarer Dünnsfilm oder ein Kaugummi. Der Prototyp wird abschließend an SARS-CoV-2-Kulturen sowie ex-vivo an Speichelproben getestet, um die Effektivität zu validieren.

Die erforderlichen Technologien für dieses vielversprechende Projekt sind bereits im Rahmen der Kooperation zwischen dem Universitätsklinikum Würzburg, der 3a-diagnostics GmbH und der Universität Würzburg etabliert und patentiert. Das Fachpersonal des Universitätsklinikums Würzburg ist speziell geschult in der Probensammlung und Identifizierung durch PCR, und es steht eine kompetente Gruppe von Virologen und medizinischem Fachpersonal zur Verfügung. Die Julius-Maximilian-Universität Würzburg, insbesondere der Arbeitskreis von Prof. Meinel, bringt umfassende Erfahrung in der Synthese verschiedener Sensoren für unterschiedliche Erkrankungen mit^{1, 6}. Die 3a-diagnostics GmbH ist bereits im Bereich der Herstellung von oralen Dünnsfilmen und Kaugummis unter GMP-Qualitätsstandards tätig.

Ablauf des Vorhabens

Zum Zeitpunkt der Antragsstellung wurden Furin und die transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2) als potenzielle Zielproteasen für spätere Protease-Sensoren auf Grundlage von Literaturdaten identifiziert und im Verlauf des Projekts als Grundlage für die Entwicklung eines Sensors herangezogen.^{4, 5, 7} Im Verlauf des Projekts wurden auf Basis neu veröffentlichter Literaturdaten sowie Protease-Arrays drei weitere Zielproteasen identifiziert: Proteinase 3 (PRTN3, PR3), die SARS-CoV-2 Hauptprotease (Mpro) sowie die Papain-ähnliche Protease (PLpro).³ Um dieser Erweiterung gerecht zu werden, wurden die ursprünglich geplanten Arbeitspakete AP ID 9-13 erneut überarbeitet und erfolgreich durchgeführt.

AP ID 1-4 Proteom Analyse des Speichels

Die Arbeitspakete AP ID 1-4 umfassen das Training und den Aufbau der Arbeitsabläufe von der Probensammlung bis zur abschließenden Proteomanalyse. In diesem Rahmen wurden die zuvor gesammelten und katalogisierten Proben hinsichtlich ihrer Menge, des Gesamtproteingehalts sowie der Probenaufarbeitung und Handhabung umfassend getestet. Dabei wurden diverse Protokolle zur Probenvorbereitung evaluiert. Aufgrund der starken Heterogenität der Proben sowie

unterschiedlicher Lagerung konnte jedoch keine spezifische Zielprotease bestätigt werden. Daher wurde auf Literaturdaten zurückgegriffen.^{2, 4, 5, 7-9}

Der Meilenstein 1, die Entscheidung über die Zielproteasen, wurde erreicht, indem TMPRSS2 und Furin aufgrund von Literaturdaten als geeignete Zielproteasen ausgewählt wurden.

Im weiteren Verlauf des Projekts wurden zusätzliche Speichelproben gesammelt, analysiert und ergänzend auf Protease-Arrays getestet. Aufgrund der Heterogenität der Proben konnte bisher keine spezifische Zielprotease mittels Proteomanalyse bestätigt werden. Jedoch ermöglichte der Einsatz des Protease-Arrays, das das Level 34 humaner Proteasen in Speichelproben untersuchte, die Identifikation der Zielprotease PR3. Parallel zu diesen Entwicklungen wurden auf Grundlage neuer Literaturdaten auch die Proteasen Mpro sowie die Protease PLpro für die Entwicklung von Sensoren in Betracht gezogen.³

Der Meilenstein 1, wurde um die Zielproteasen PR3, die Protease Mpro sowie die Protease PLpro erweitert.

AP ID 5-8 Rekombinante Herstellung

Die Arbeitspakete AP ID 5-8 umfassen die Klonierung, Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der in Meilenstein 1 definierten Proteasen. Hierbei wurde sich auf die nicht kommerziell erhältliche Protease TMPRSS2 fokussiert.

Die Expression von TMPRSS2 wurde in verschiedenen Systemen durchgeführt, darunter *Escherichia coli* (Bakterienzellen), *High Five cells* (Insektenzellen) und *Chinese hamster ovary* (Säugetierzellen). Nach erfolgreicher Expression von TMPRSS2 erfolgte die Aufreinigung mittels immobilisierter Metallaffinitätschromatographie, gefolgt von einer Analyse mittels SDS-Page. Anschließend wurde ein Testpeptid für TMPRSS2 erstellt, um dessen Aktivität zu überprüfen. Zusätzlich wurde erfolgreich ein Scale-up der Expression durchgeführt.

AP ID 9-13 Sensorentwicklung

Die Arbeitspakete AP ID 9-13 umfassen erfolgreich die Entwicklung von Sensoren, basierend auf den in Meilenstein 1 definierten Proteasen. Ein zentraler Fokus lag dabei auf dem Aufbau verschiedener Peptidbibliotheken sowie der anschließenden Identifizierung von Leitsequenzen mittels Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites (PICS).¹⁰

Unter Verwendung der in Meilenstein 1 definierten Proteasen wurden mittels PICS verschiedene Leitsequenzen identifiziert und charakterisiert. Diese Sequenzen wurden anschließend im Vergleich zu natürlichen und in der Literatur gefundenen Sequenzen getestet.¹¹⁻¹⁴ Basierend auf den Ergebnissen wurden, die am besten geeigneten Leitsequenzen formuliert und ex vivo getestet.

Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit den anderen Forschungseinrichtungen

Die in Meilenstein 1 festgelegte Auswahl von Zielproteasen wurde erfolgreich erreicht. Ursprünglich wurde auf Literaturproteasen (Furin, TMPRSS2) zurückgegriffen, um der Heterogenität im Speichel Rechnung zu tragen. Im Verlauf des Projekts wurden drei weitere Zielproteasen identifiziert und hinzugefügt. Somit konnten abschließend die Zielproteasen (i) Furin, (ii) TMPRSS2, (iii) Mpro, (iv) PLpro sowie (v) PR3 für ihre Eignung als Sensor charakterisiert werden.

Die geplante Sensorsynthese und Integration in einen Prototyp gemäß Meilenstein 2 wurde teilweise realisiert. Im Zuge der Anpassung der Zielproteasen aus Meilenstein 1 wurden verschiedene Leitsequenzen sorgfältig evaluiert, getestet und erfolgreich in Leitsensoren umgesetzt. Dabei wurde für jede der drei identifizierten Proteasen ein entsprechender Leitsensor entwickelt. Allerdings wies einer der Leitsensoren möglicherweise eine zu geringe Selektivität auf. Auf Basis der beiden verbleibenden Leitsensoren wurde ein Multiplexing-System etabliert und dieses anschließend ex-vivo auf seine Wirksamkeit gegen SARS-CoV-2 Viren getestet.

- Erfolgreicher Aufbau des PICS-Arbeitsablaufes
- Erfolgreiche Auswahl von Leitsequenzen basierend auf PICS
- Erfolgreiche Synthese und Charakterisierung der Leitsequenzen
- Erfolgreiche Synthese dreier Sensoren
- Erfolgreiche Analytik beider Sensoren
- ex-vivo Testung anhand von SARS-CoV-2 Viren und -überständen
- Einarbeitung eines bereits vorhanden Sensor-peptides in einen oralen Dünnsfilm

Literatur

1. Ritzer, J.; Luhmann, T.; Rode, C.; Pein-Hackelbusch, M.; Immohr, I.; Schedler, U.; Thiele, T.; Stubinger, S.; Rechenberg, B. V.; Waser-Althaus, J.; Schlottig, F.; Merli, M.; Dawe, H.; Karpisek, M.; Wyrwa, R.; Schnabelrauch, M.; Meinel, L., Diagnosing peri-implant disease using the tongue as a 24/7 detector. *Nat Commun* **2017**, 8 (1), 264.
2. Essalmani, R.; Jain, J.; Susan-Resiga, D.; Andréo, U.; Evagelidis, A.; Derbali, R. M.; Huynh, D. N.; Dallaire, F.; Laporte, M.; Delpal, A.; Sutto-Ortiz, P.; Coutard, B.; Mapa, C.; Wilcoxon, K.; Decroly, E.; Nq Pham, T.; Cohen É, A.; Seidah, N. G., Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity. *Journal of virology* **2022**, 96 (8), e0012822.
3. Mukherjee, R.; Dikic, I., Proteases of SARS Coronaviruses. **2023**, 930-941.
4. Jackson, C. B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H., Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2022**, 23 (1), 3-20.
5. Iwata-Yoshikawa, N.; Kakizaki, M.; Shiwa-Sudo, N.; Okura, T.; Tahara, M.; Fukushima, S.; Maeda, K.; Kawase, M.; Asanuma, H.; Tomita, Y.; Takayama, I.; Matsuyama, S.; Shirato, K.; Suzuki, T.; Nagata, N.; Takeda, M., Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways. *Nature Communications* **2022**, 13 (1), 6100.
6. ter Mors, B.; Driessen, M. D.; Seher, A.; Haubitz, I. R.; Raschig, M.; Nowak, M.; Jockel-Schneider, Y.; Linz, C.; Meinel, L., The development of matrix-metalloproteinase responsive sensors for the machine-independent detection of oral inflammation. *Sensors & Diagnostics* **2023**.
7. Peacock, T. P.; Goldhill, D. H.; Zhou, J.; Baillon, L.; Frise, R.; Swann, O. C.; Kugathasan, R.; Penn, R.; Brown, J. C.; Sanchez-David, R. Y.; Braga, L.; Williamson, M. K.; Hassard, J. A.; Staller, E.; Hanley, B.; Osborn, M.; Giacca, M.; Davidson, A.

D.; Matthews, D. A.; Barclay, W. S., The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nature Microbiology* **2021**, 6 (7), 899-909.

8. Xia, S.; Lan, Q.; Su, S.; Wang, X.; Xu, W.; Liu, Z.; Zhu, Y.; Wang, Q.; Lu, L.; Jiang, S., The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, 5 (1), 92.

9. Zhang, Y.; Zhang, L.; Wu, J.; Yu, Y.; Liu, S.; Li, T.; Li, Q.; Ding, R.; Wang, H.; Nie, J.; Cui, Z.; Wang, Y.; Huang, W.; Wang, Y., A second functional furin site in the SARS-CoV-2 spike protein. *Emerging Microbes & Infections* **2022**, 11 (1), 182-194.

10. Ter Mors, B.; Driessen, M. D.; Seher, A.; Haubitz, I. R.; Raschig, M.; Nowak, M.; Jockel-Schneider, Y.; Linz, C.; Meinel, L. *The development of matrix-metalloproteinase responsive sensors for the machine-independent detection of oral inflammation*; 2635-0998; Royal Society of Chemistry (RSC): 2023-01-01, 2023; pp 867-877.

11. Xia, S.; Lan, Q.; Su, S.; Wang, X.; Xu, W.; Liu, Z.; Zhu, Y.; Wang, Q.; Lu, L.; Jiang, S., The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2020**, 5 (1), 92.

12. Mustafa, Z.; Zhanapiya, A.; Kalbacher, H.; Burster, T., Neutrophil Elastase and Proteinase 3 Cleavage Sites Are Adjacent to the Polybasic Sequence within the Proteolytic Sensitive Activation Loop of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Omega* **2021**, 6 (10), 7181-7185.

13. Hajjar, E.; Korkmaz, B.; Gauthier, F.; Brandsdal, B. O.; Witko-Sarsat, V.; Reuter, N., Inspection of the Binding Sites of Proteinase3 for the Design of a Highly Specific Substrate. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (4), 1248-1260.

14. Moustaqil, M.; Ollivier, E.; Chiu, H.-P.; Van Tol, S.; Rudolffi-Soto, P.; Stevens, C.; Bhumkar, A.; Hunter, D. J. B.; Freiberg, A. N.; Jacques, D.; Lee, B.; Sierecki, E.; Gambin, Y., SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species. *Emerging Microbes & Infections* **2021**, 10 (1), 178-195.

Abschlussbericht

zum Verbundprojekt

„Schnell-Hinweisgeber zum Nachweis von Corona Infektionen“ (Rapid-Corona)	
Förderkennzeichen	100484346
Laufzeit des Vorhabens	01.02.2021 bis 30.06.2023
Berichtsdatum	01.12.23
Ausführende Stelle	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg Am Hubland, 97074 Würzburg
Projektleitung	
Verbundpartner	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen (HNO) Josef-Schneider-Str. 11, 97080 Würzburg Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie (MKG) Pleicherwall 2, 97070 Würzburg 3a-diagnostics GmbH Benzstraße 2, 72636 Frickenhausen
Korrespondierender Autor des Berichts	Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg Am Hubland, 97074 Würzburg Lorenz.meinel@uni-wuerzburg.de

Teil II: Eingehende Darstellung

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Die ursprüngliche Herausforderung bestand darin, einen Sensor als schnellen Indikator für SARS-CoV-2 zu entwickeln. Hierzu wurden anhand von Literaturdaten und Protease-Arrays Zielproteasen identifiziert, und mittels PICS-Assays wurden Leitsequenzen ermittelt. Diese Leitsequenzen sollten dann in Sensoren umgewandelt werden, die als rascher Indikator für eine SARS-CoV-2-Infektion dienen. Dieser innovative Sensor reagiert auf spezifische Proteasen im infizierten menschlichen Speichel und zeigt eine nachweisbare Veränderung des Geschmacks oder der Farbe an. Die finale Darreichungsform des Sensors soll in einen oralen Dünnsfilm oder diagnostischen Kaugummi integriert werden. Durch die endgültige Darreichungsform wird ein klar erkennbarer Geschmack (bitter, ätherisch, etc.) oder eine Farbveränderung erzeugt, wenn es während des Kauens des Kaugummis oder des Auftragens des oralen Dünnsfilms zum Kontakt mit SARS-CoV-2-Viren kommt.

Der Arbeitskreis Prof. Meinel an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg spielte eine maßgebliche Rolle bei der Synthese, Aufreinigung und Analytik des Sensors sowie bei der *ex vivo* Testung des Sensors sowohl mit kommerziellen Proteasen als auch mit SARS-CoV-2-Viren. Das finale Ziel setzte sich aus Meilenstein 1, der die Auswahl von drei Zielproteasen beinhaltet, sowie Meilenstein 2, der die Erstellung von bis zu drei Sensoren umfasst, die in Prototypen integriert werden können.

Darstellung des Ablaufs und der Inhalte des Projekts

Zu Beginn des Projekts wurden verschiedene Speichelproben analysiert, um potenzielle Zielproteasen für nachfolgende Sensoren zu identifizieren. Aufgrund der Heterogenität der Speichelproben wurden basierend auf Literaturdaten zwei Zielproteasen (Furin, TMPRSS2) identifiziert und für weitere Untersuchungen ausgewählt. Während Furin kommerziell erworben wurde, erfolgte die Herstellung von TMPRSS2 durch Insektenzellenexpression. Obwohl TMPRSS2 erfolgreich hergestellt wurde, erwies es sich aufgrund des unspezifischen Schnittmusters nicht als geeignete Zielprotease. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung von Furin als Ausgangspunkt zur Identifikation erfolgreicher Leitsequenzen und zur Entwicklung von Sensoren, die sich als effektiv bei Kopf-Hals-Karzinomen erwiesen. Die Anwendbarkeit bei SARS-CoV-2 bleibt noch zu untersuchen, da hier möglicherweise ein Spezifitätsproblem auftreten könnte. Zusätzlich zu den beiden identifizierten Zielproteasen wurde eine weitere Protease auf Basis der durch das Universitätsklinikum gesammelten Speichelproben identifiziert (PRTN3). Darüber hinaus wurden nach neueren Erkenntnissen zwei weitere Proteasen (Mpro, Plpro) auf ihre mögliche Eignung für einen Sensor untersucht. Die Sensoren für die Proteasen PRTN3 und Mpro wurden erfolgreich synthetisiert. Dabei wurde das Design der Sensoren so gewählt, dass ein Multiplexing-Ansatz möglich ist. Beide Sensoren wurden im Anschluss *ex vivo* auf ihre Wirksamkeit gegenüber SARS-CoV-2-Viren getestet.

Rahmenbedingungen der Projektabwicklung

Die Projektleitung dieses Teilprojekts lag über den gesamten Bearbeitungszeitraum bei Prof. Dr. Dr. L. Meinel.

Voraussichtlicher Nutzen

Der heutige Markt bietet eine Fülle an Schnelltests, die jedoch alle auf die Verwendung von Nasen- oder (Nasen-)Rachensekret angewiesen sind. Diese Tests erfordern eine standardisierte Probenentnahme durch geschultes Fachpersonal, um eine konsistente Qualität zu gewährleisten. Andernfalls können erhebliche Qualitätsunterschiede aufgrund variierender Methoden bei der Entnahme des Abstrichs durch die getestete Person auftreten. Im Gegensatz dazu spielen bei der Verwendung von Speichel oder der Zunge als Sensor die Techniken zur Probenentnahme oder -verarbeitung keine Rolle. Dadurch wird das gesamte Testverfahren deutlich besser standardisiert. Der Test kann problemlos an jedem Ort durchgeführt werden, ohne dass spezielles Fachpersonal erforderlich ist, und die Testergebnisse liegen äußerst schnell vor.

Zukünftig könnte aufgrund der einfachen Handhabung der geplante Hinweisgeber beispielsweise vor Besuchen in Pflegeeinrichtungen zur Anwendung kommen. Die einfache und zügige Anwendung des vorgestellten SARS-CoV-2-Schnellhinweisgebers ermöglicht eine frühzeitige Identifizierung von erkrankten Personen. Dadurch können normale Abläufe beispielsweise in der Industrie ohne größere Unterbrechungen aufrechterhalten werden. Des Weiteren könnte dieser neuartige Hinweisgeber das Einschleusen von Krankheiten in sensible Umgebungen wie Kliniken und Altenheime effektiv verhindern. Insbesondere im Bildungsbereich, also Kindergärten und Schulen, bietet der vorgestellte Schnellhinweisgeber eine deutlich einfachere Anwendung im Vergleich zu den momentan verwendeten Tests während der COVID-19-Pandemie. Diese Tests erfordern in der Regel einen Abstrich im Nasen-Rachen-Raum und könnten durch den Kaugummi-Ansatz komfortabler gestaltet werden

Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Verlauf der Projektarbeiten sind keine Ergebnisse Dritter bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind.

Geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Daten für eine Veröffentlichung auf dem Gebiet der Füllsensoren für Kopf- und Halskrebs werden derzeit fertiggestellt. Darüber hinaus sind Veröffentlichungen im Bereich SARS-COV-2 geplant. Diese werden sowohl die Methodik als auch die aktuellen Ergebnisse der PRTN3- und MPro-Sensoren zusammenfassen

Abschlussbericht

zum Verbundprojekt

„Schnell-Hinweisgeber zum Nachweis von Corona Infektionen“ (Rapid-Corona)	
Förderkennzeichen	100484346
Laufzeit des Vorhabens	01.02.2021 bis 30.06.2023
Berichtsdatum	01.12.23
Ausführende Stelle	Julius-Maximilians-Universität Würzburg Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg Am Hubland, 97074 Würzburg
Projektleitung	
Verbundpartner	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen (HNO) Josef-Schneider-Str. 11, 97080 Würzburg Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie (MKG) Pleicherwall 2, 97070 Würzburg 3a-diagnostics GmbH Benzstraße 2, 72636 Frickenhausen
Korrespondierender Autor des Berichts	Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg Am Hubland, 97074 Würzburg Lorenz.meinel@uni-wuerzburg.de

Teil III: Erfolgskontrollbericht

Wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhabens

Im Rahmen des Projekts "Rapid Corona" haben wir erfolgreich unterschiedliche Sensoren zur Detektion von COVID-19 auf Basis ausgewählter Proteasen (Meilenstein 1) entwickelt. Es wurden mehrere Chargen dieser Sensoren hergestellt und umfassend analysiert.

Beginnend mit einem umfassenden Training und den Aufbau der Arbeitsabläufe von der Probensammlung bis zur abschließenden Proteomanalyse von Patientenspeichel, wurde versucht geeignete Zielproteasen für einen anschließenden COVID-19 Sensor zu identifizieren. Aufgrund der starken Heterogenität der Proben sowie unterschiedlicher Lagerung konnte jedoch keine spezifische Zielprotease bestätigt werden. Daher wurde auf Literaturdaten zurückgegriffen und die Protease Furin und die transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2) als potenzielle Zielproteasen ausgewählt.^{2, 4, 5, 7-9}

Im weiteren Verlauf des Projekts ermöglichte der Einsatz eines Protease-Arrays, die Identifikation der Zielprotease Proteinase 3 (PRTN3). Hierbei wurden die gesammelten Speichelproben (Gesund n=10, Covid-19 n= 21) mit dem Human Protease Array Kit (R&D Systems) analysiert. Der Speichel wurde dabei auf das Vorhandensein von 34 menschlichen Proteasen untersucht. Für die Auswertung wurde die durchschnittliche Pixeldichte einer Protease berechnet und in Relation zu den Referenzsignalen gesetzt. Als Schwellenwert für infizierte Proben wurde dabei ein CT-Wert <30 festgelegt (CT>30 n=14; CT<30 n=7), wodurch sieben Proben für die weiteren Analysen ausgeschlossen wurden (**Abbildung 1**)(**Tabelle 1**).

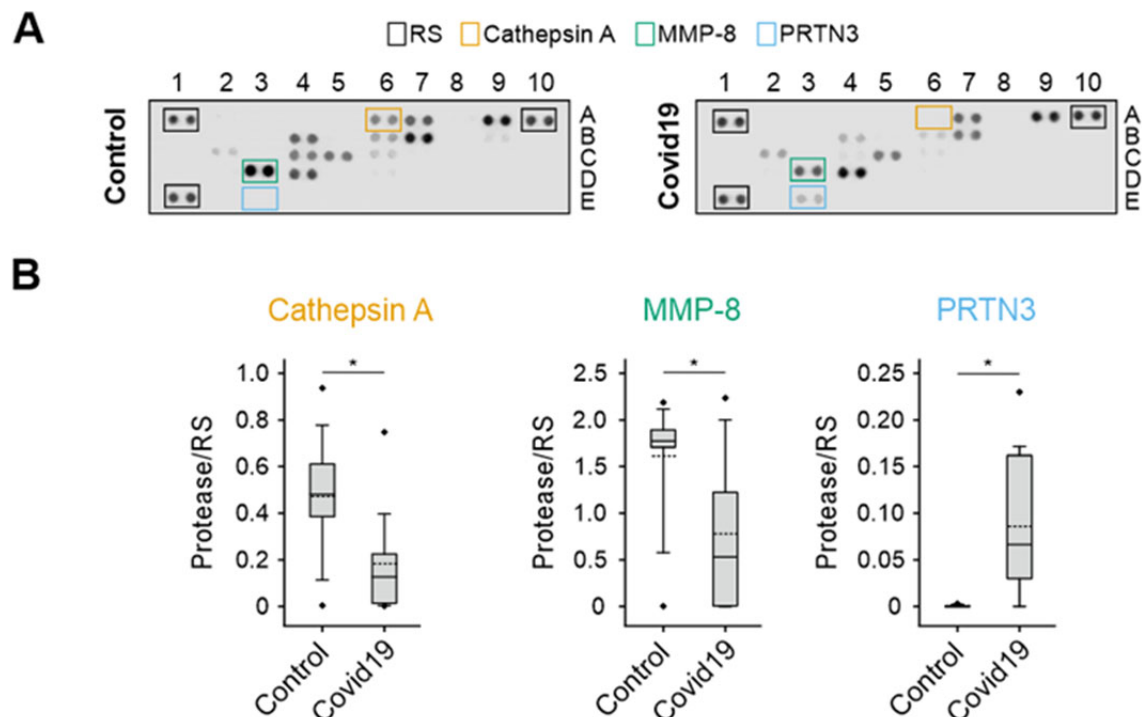


Abbildung 1: Analyse der Speichelproteasen von Covid19-negativen (CT>37; Kontrolle) und Covid19-positiven (CT<30) Patienten mittels Humanprotease-Arrays. A) Exemplarische Dot-Blots. B) Die Pixeldichten wurden mit

Image J quantifiziert und auf die Referenzspots (RS) der einzelnen Membranen bezogen. Das Box-and-Whisker-Diagramm zeigt den Median (durchgezogene Linie) und den Mittelwert (gestrichelte Linie). Die Box stellt die mittleren 50 % der Daten dar und die Skalen zeigen den Bereich von 10 bis 90 %. Paarweise Vergleiche der Mittelwerte wurden mittels eines ungepaarten t-Tests bewertet. $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen und durch Sternchen hervorgehoben.

12 Proben zeigen ein deutlich erhöhtes Proteinase 3 (PR3) Level im Vergleich zu gesunden Proben. Ebenfalls wurde bei diesen Proben eine Reduktion des Matrix-Metalloproteinase-8 (MMP8) Levels beobachtet (**Abbildung 2**). Bei den zwei abweichenden Proben bezüglich MMP8 und PR3 handelt es sich um die gleichen Proben (s71, s73).

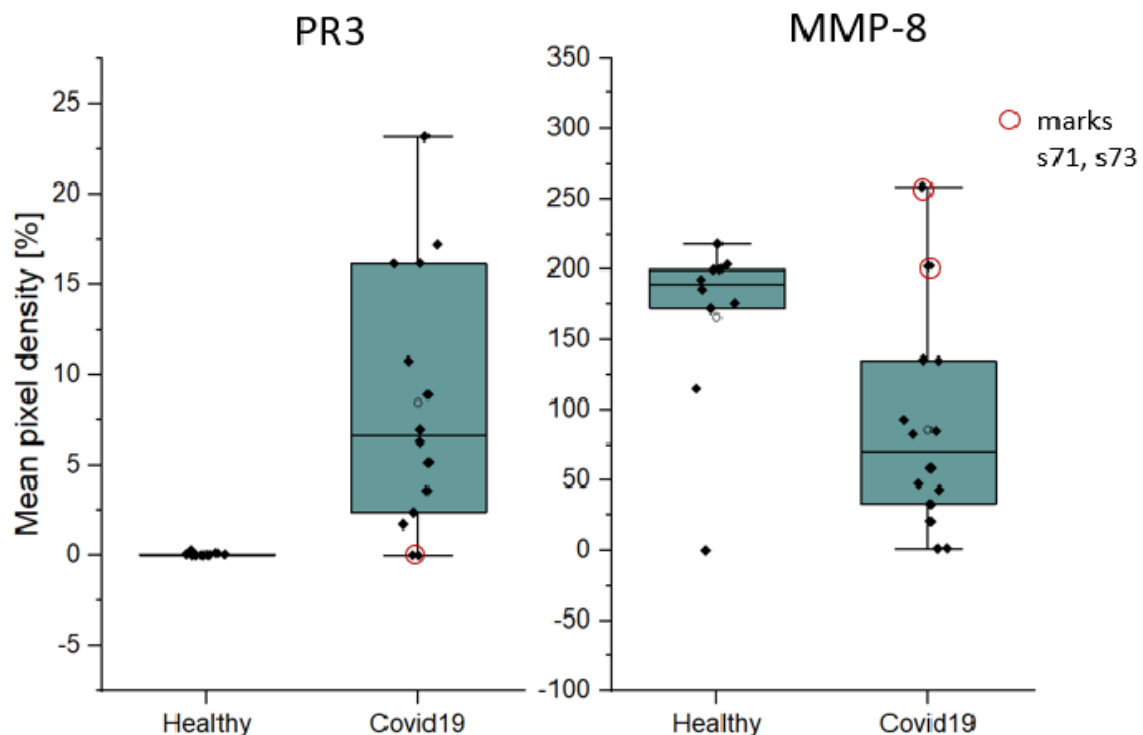


Abbildung 2: Durchschnittliche Pixeldichte für die beiden Proteasen, Proteinase 3 (PR3) und Matrix-Metalloproteinase 8 (MMP-8). Die beiden Abweichenden Proben s71 und s73, wurden rot markiert.

Tabelle 1: Auswertung des Human Protease Array. Durchschnittliche Pixeldichte (MPD). Cathepsin (Cat), Kallikrein (Kal), Gesund (grau), Erkrankt (gelb). Probanden mit einem CT>30 (rot)

ID	Age	Gender	CT	PR3 MPD [%]	MMP8 MPD [%]	MMP7 MPD [%]	MMP9 MPD [%]	Cat A MPD [%]	Cat B MPD [%]	Cat D MPD [%]	Cat S MPD [%]	Cat V MPD [%]	Kal 5 MPD [%]	Kal 6 MPD [%]	Kal 10 MPD [%]	Kal 13 MPD [%]
x9 / 73	1963	F		0	185	0	67	55	71	115	84	3	39	152		8
x8 / 74	1995	F		0	171	0	49	56	87	95	56	0	0	44		11
x10 / 75	1940	F		0	0	0	0	0	102	93	0	0	0	109		15
x7 / 76	1955	M		0	175	0	83	62	79	93	73	7	26	147		9
x17	1949	M		0	115	0	124	23	52	95	42	0	0	132		10
x11 / 410	1961	M		0	201	9	110	41	70	123	81	11	100	131		25
x1 / 411	1986	M		0	200	1	98	41	91	125	80	3	5	57		20
x4	1963	M		0	193	6	94	94	118	155	84	7	28	136	105	35
x3	1997	F		0	218	0	110	62	96	149	93	1	9	15	69	16
x14	1951	M		0	203	3	67	39	115	101	134	4	16	134	112	23
s77	1979	M	18	2	82	0	146	11	69	100	123	0	0	9		2
s61	1947	F	13,4	16	93	6	118	22	127	127	50	10	33	118	82	34
s55	1957	M	17	23	85	1	146	0	81	124	23	0	0	31	6	3
s72	1986	M	25,1/25,6	9	135	0	132	14	72	117	50	6	4	49		38
s67	1993	F	25,6	11	47	0	152	7	69	115	21	0	0	126		17
s71	1950	F	23,2	0	202	85	63	40	39	13	14	11	33	155	105	9
s73	1947	F	21,2	0	259	222	101	75	96	59	259	96	113	164	146	15
s66	1958	M	21,5	7	59	197	121	39	97	105	68	41	69	152	171	21
s57	1991	M	22,5	16	20	0	171	0	109	134	15	0	0	11	32	19
s53	1966	M	25,9/26,8	4	1	3	67	21	50	70	55	7	11	147		16
s70	2003	M	30,4	0	213	1	57	72	74	57	86	7	4	93		24
s80 G8	1982	M	28	2	136	0	219	20	68	127	46	0	0	117		37
s69	1950	F	30,0/31,2	0	189	23	77	47	55	68	70	0	0	82		12
s64	1964	M	30,3/31,9	12	59	0	144	10	81	123	26	0	0	42		34
s99 s54	2000	F	27,4	6	33	0	121	1	83	99	33	0	0	0	10	11
s52	1983	M	25,9	5	43	0	153	3	91	125	41	0	0	5	50	18
s62	1952	M	27,6	17	2	0	181	1	74	133	28	0	0	75	15	14
s79	1972	F	30,7/31,9	0	119	0	92	33	61	88	113	0	0	53		14
s56	1958	F	35,5	0	246	5	175	88	103	109	150	52	121	175	169	25
s59	1959	F	32,7	3	1	0	82	2	80	83	147	0	0	34	30	12
s58	1957	M	34,2	20	52	2	90	12	100	102	130	5	5	74	37	28

Die zu Beginn des Projekts ausgewählten Proteasen, Furin und TMPRSS2, wurden im Anschluss für eine mögliche Expression in Betracht gezogen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf TMPRSS2, das zu diesem Zeitpunkt nicht kommerziell erhältlich war. Die Expression von TMPRSS2 wurde in verschiedenen Systemen evaluiert (*Escherichia coli* (Bakterienzellen), *High Five cells* (Insektenzellen) und *Chinese hamster ovary* (Säugetierzellen)). Nach einer umfassenden Bewertung der verschiedenen Expressionssysteme wurde schließlich die Entscheidung getroffen, auf *High Five cells* (Insektenzellen) zurückzugreifen. Dies erfolgte aufgrund ihres optimalen Verhältnisses zwischen Kosten- und Expressionseffizienz sowie ihrer Eignung für ein unkompliziertes Upscaling.

Nach erfolgreicher Expression von TMPRSS2 in Insektenzellen wurde die Aktivität des rekombinant hergestellten TMPRSS2 der ersten Testexpression gegen die putative TMPRSS2-Spaltstelle in SARS-CoV-2 (S2' PSKPSKRSFIEDL) überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Peptidsequenz PSKRSFIE synthetisiert und die Spaltung durch TMPRSS2 im Zeitverlauf mittels HPLC analysiert (**Abbildung 3**).

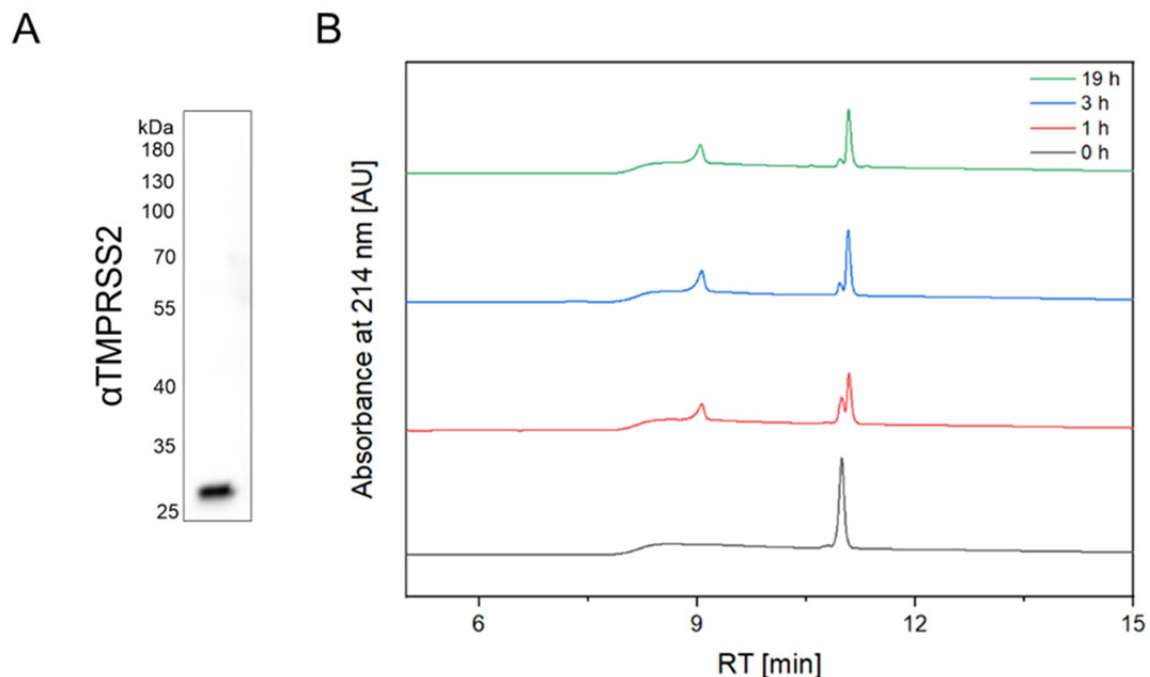


Abbildung 3: (A) Westernblot gegen TMPRSS2 nach Expression und Aufreinigung (B) Zeitlicher Verlauf der Spaltung des SARS-CoV-2 S2' Peptid durch TMPRSS2.

Während der Durchführung mehrerer PICS-Studien (siehe unten), konnte keine erfolgreiche Identifikation von Leitsensoren für TMPRSS2 erzielt werden. Aufgrund dieses Umstands wurden die weiteren Studien mit TMPRSS2 eingestellt. Stattdessen wurden die zuvor identifizierte Furin-Protease sowie neue Proteasen, basierend auf den Ergebnissen aus AP ID 1-4 (Proteinase 3) sowie aus der Literatur (PLpro und Mpro), in den Fokus genommen.³

transmembrane Serinprotease 2 (TMPRSS2)

TMPRSS2 wurde auf der Grundlage von Literaturdaten als Zielprotease ausgewählt. Da die Protease nicht kommerziell erhältlich ist, erfolgte ihre Expression und Charakterisierung mithilfe von *High Five* Insektenzellen, wie bereits oben

beschrieben. Basierend auf den Ergebnissen wurde ein PICS-Assay durchgeführt, um erste Leitsequenzen für einen zukünftigen Sensor zu identifizieren. TMPRSS2 wurde anhand von zwei verschiedenen Peptidbibliotheken analysiert, die zuvor durch Trypsin- oder GluC-Verdau generiert worden waren (**Abbildung 4**).

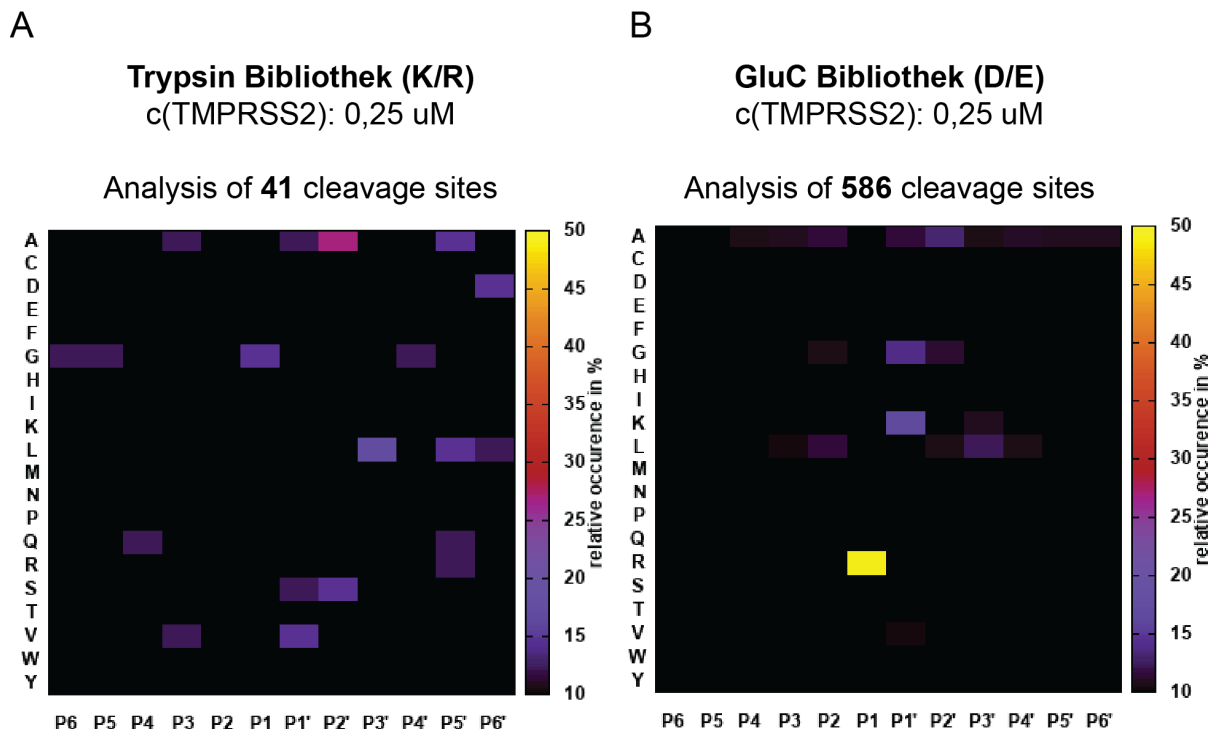


Abbildung 4: PICS-Analysen mittels TMPRSS2 auf (A) Trypsin und (B) GluC prozessierten Bibliotheken (n=3).

Die Trypsin-Bibliothek zeigte weder eine ausreichende Anzahl noch spezifische Spaltstellen, wodurch keine geeigneten Leitsequenzen aus dieser Bibliothek identifiziert werden konnten. Hingegen wies die GluC-Bibliothek eine ausreichende Anzahl von Spaltstellen auf, wobei diese hauptsächlich auf die Anwesenheit von Arginin in Position 1 (P1) zurückzuführen war. Aufgrund der fehlenden Spezifität von P1-Arginin bzw. Lysin-Sensoren, die durch eine Vielzahl von Proteasen gespalten werden können, konnten hier keine geeigneten Leitsequenzen identifiziert werden. Daher wurde die weitere Arbeit an TMPRSS2 zugunsten weiterer Zielproteasen eingestellt.

Furin

Furin wurde aufgrund von Literaturdaten als Zielprotease ausgewählt. Um den Prozess zu vereinfachen und eine mögliche Skalierung zu umgehen, wurde auf eine aufwendige Expression verzichtet, und Furin wurde stattdessen kommerziell erworben. Hierbei wurden verschiedene PICS-Assays durchgeführt, um erste Leitsequenzen für einen zukünftigen Sensor zu identifizieren. Furin wurde dabei mithilfe von zwei verschiedenen Peptidbibliotheken analysiert, die zuvor durch Trypsin- oder GluC-Verdau generiert worden waren (**Abbildung 5**).

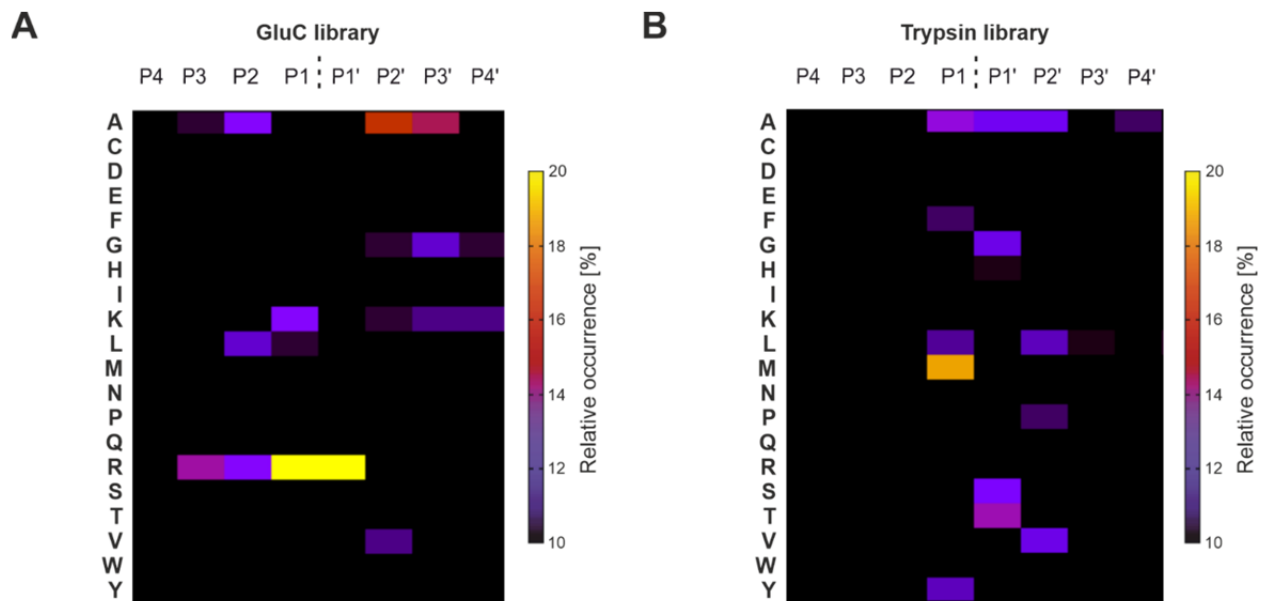


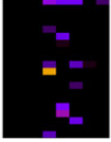
Abbildung 5: PICS-Analysen mittels Furin auf (A) Trypsin und (B) GluC prozessierten Bibliotheken (n=3).

Sowohl die Trypsin- als auch die GluC-Bibliothek zeigten eine ausreichende Anzahl an Spaltstellen. Trotzdem wurde erneut ein übermäßiges Auftreten von Arginin in Position 1 (P1) in der GluC-Bibliothek festgestellt. Daher wurde für die Identifizierung von Leitsensoren auf die Trypsin-Bibliothek sowie auf eine kombinierte Analyse beider Bibliotheken zurückgegriffen (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Furin Leitsequenzen auf Basis von Literatursequenzen, der Trypsin PICS Ergebnisse sowie der Trypsin+GluC PICS Ergebnisse.¹¹

	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	Code
SARS-CoV-2	R	R	A	R	S	V	A	S	a
	S	S	A	R	S	V	A	S	b
Trypsin PICS	G	T	A	M	T	A	G	A	1
	G	T	A	M	G	A	G	A	2
	R	T	A	M	T	A	G	A	3
	R	T	A	M	G	A	G	A	4
	R	T	A	M	S	A	G	A	5
	R	T	A	G	S	A	G	A	6
Trypsin + GluC PICS	R	T	A	M	R	A	G	A	7

Auf der Grundlage der verschiedenen Leitsequenzen wurden daraufhin Spaltungsexperimente mit Furin durchgeführt, um die Spaltungseffizienz der einzelnen Sequenzen zu charakterisieren und eine geeignete Auswahl von Sequenzen für die Sensorsynthese zu identifizieren (**Abbildung 6**).

		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Bio-derived sequences	a	R	R	A	R	S	V	A	S
	b	S	S	A	R	S	V	A	S
	1	R	T	A	M	T	A	G	A
	2	G	T	A	M	G	A	G	A
	3	G	T	A	M	T	A	G	A
	4	R	T	A	M	G	A	G	A
	5	R	T	A	M	S	A	G	A
	6	R	T	A	M	R	A	G	A
	7	R	T	A	G	S	A	G	A

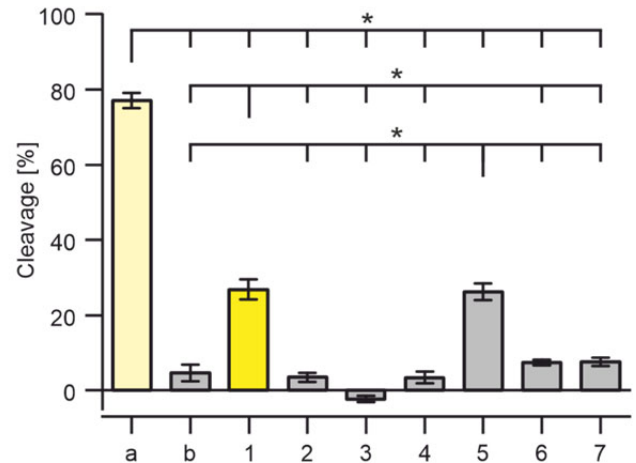


Abbildung 6: Spaltungseffizienz der Furin Leitsequenzen (n=3). Die Daten wurden mittels einseitiger ANOVA und Post-Hoc-Tukey-Tests analysiert; Mittelwerte \pm Standardabweichung; die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen (*).

Auf der Grundlage der Leitsequenzen (**Abbildung 6 Sequenz a und 1**) wurden Sensoren entwickelt, die einen fluoreszierenden Farbstoff (EDANS; (5-((2-Aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid)) und einen Fluoreszenzlöcher (DABCYL; (4-((4-(dimethylamino)phenyl)azo)benzoic acid)) (Quencher) enthalten. Der Quencher wird durch Spaltung vom Farbstoff getrennt und ein Fluoreszenzsignal wird erzeugt (**Abbildung 7**).

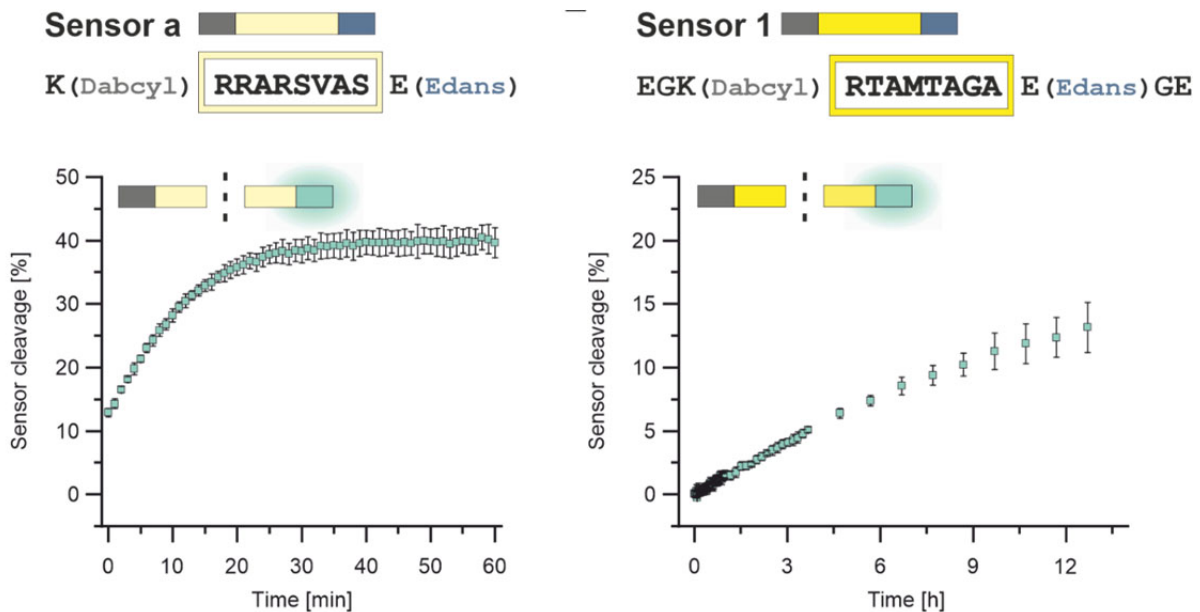


Abbildung 7: Die Effizienz der Furinspaltung für Sensor a und Sensor 1.

Bei Untersuchungen mit Kopf-Hals-Karzinome (HNSCC) und Aufgrund des kurzfristigen Engpasses von SARS-CoV-2 Viren und Patientenproben hatte sich Herausgestellt, dass Furin-Sensoren ein geeigneter Nachweis für eine mögliche Erkrankung darstellt (**Abbildung 8 A,B**). Hierzu wurde die Leistung des Sensors anhand von Patientenbiopsien bewertet. Tumorgewebe von HNSCC-Patienten - nicht aber Proben von gesundem Gewebe - waren Furin-positiv (**Abbildung 8 E,F**). Gesundes Gewebe und die Diagnose HNSCC wurden dabei durch eine pathologische Untersuchung bestätigt (**Abbildung 8 C,D**), wobei das Tumorgewebe

durch unregelmäßige Plattenepithelproliferation mit variabler und unregelmäßiger Keratinisierung gekennzeichnet war.

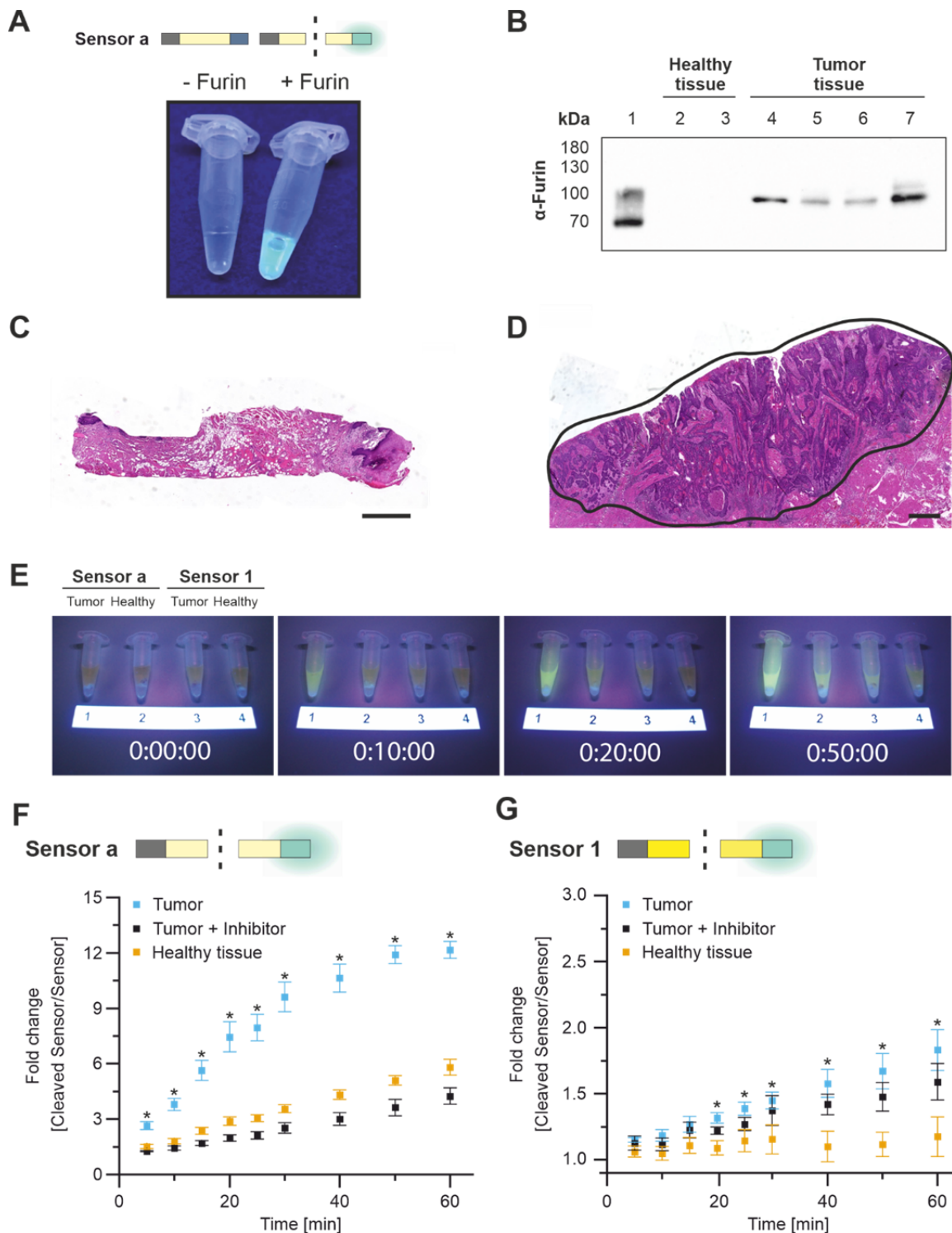


Abbildung 8: Furin-Sensor-Aktivität. (A) Sensor a ohne Furin (links) und mit Furin-Inkubation unter UV-Licht (rechts). (B) Furin-Westernblots auf HNSCC-Gewebelysaten (Spur 1: rekombinantes Furin; Spuren 2 + 3: Lysate von gesundem Gewebe; Spuren 4-7: Lysate von HNSCC-Gewebe). (C) Gesundes Gewebe (D) HNSCC-Gewebe (schwarz umrandeter Bereich, Maßstabsleiste = 1 mm). (E) Sensorspaltung im Zeitverlauf (Inkubation mit dem Tumor in den Lanes 1 und 3 und mit gesundem Gewebe in den Lanes 2 und 4). (F) Zeitabhängige Spaltung von Sensor a und (G) Sensor 1 mit Tumorgewebe, Tumorgewebe mit Furin-Inhibitor und in gesundem Gewebe. Paarweise Vergleiche wurden mittels Student t-Test durchgeführt; Mittelwerte \pm Standardabweichung mit $p \leq 0,05$ (*) für Signifikanz.

Die Unterscheidung zwischen Tumor und gesundem Gewebe ist zu komplex und erfordert Gewebeschnitte, Färbungen und pathologische Untersuchungen. Unsere Forschung vereinfacht diesen Entscheidungsprozess durch die Bereitstellung von Fluoreszenzsensoren, die die Aktivität der HNSCC-assoziierten Protease Furin nachweisen. Der schnellste Sensor gibt innerhalb von zehn Minuten nach der Inkubation in einem Tumor, nicht aber in gesundem Gewebe, eine visuell erkennbare Fluoreszenz ab. Diese auf Furin reagierenden Sensoren sind in der Lage die heutigen komplexen Arbeitsabläufe bei Operationen zu rationalisieren und können Pathologen und Chirurgen in die Lage versetzen, schnell und objektiv zwischen gesundem Gewebe und Tumorgewebe zu unterscheiden.

Papain-ähnliche Protease (PLpro)

PLpro wurde in der zweiten Runde als Zielprotease aufgrund von Literaturdaten ausgewählt.³ In einem ersten Schritt wurde versucht, mithilfe kommerziell erworbener PLpro eine geeignete Leitsequenz zu identifizieren, bevor eine aufwendige Expression und mögliche Skalierung in Erwägung gezogen wurde. Trotz Anpassungen der verwendeten Puffer und verschiedener Dosis Eskalationen zeigten sich innerhalb eines PICS-Assays keine Spaltstellen für PLpro. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die weitere Arbeit an PLpro zugunsten weiterer Zielproteasen eingestellt.

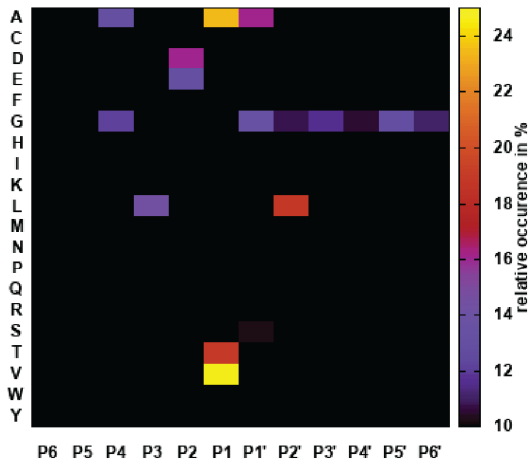
Proteinase 3 (PRTN3, PR3)

PRTN3 wurde als Zielprotease aufgrund von Ergebnissen aus einem Human Protease Array Kit mit SARS-CoV-2 Speichelproben identifiziert. Um den Prozess zu vereinfachen und eine mögliche Skalierung zu umgehen, wurde auf eine aufwendige Expression verzichtet, und PRTN3 wurde stattdessen kommerziell erworben. Verschiedene PICS-Assays wurden durchgeführt, um erste Leitsequenzen für einen zukünftigen Sensor zu identifizieren. Die Analyse von PRTN3 erfolgte mithilfe von zwei verschiedenen Peptidbibliotheken, die zuvor durch Trypsin- oder GluC-Verdau generiert worden waren (**Abbildung 9**).

A

Trypsin Bibliothek (K/R)

Analysis of **892** cleavage sites



B

GluC Bibliothek (D/E)

Analysis of **361** cleavage sites

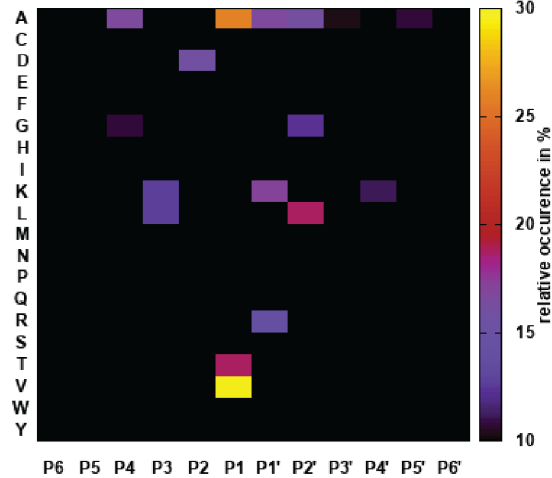


Abbildung 9: PICS-Analysen mittels PRTN3 auf (A) Trypsin und (B) GluC prozessierten Bibliotheken (n=3).

Sowohl die Trypsin- als auch die GluC-Bibliothek zeigten eine ausreichende Anzahl an Spaltstellen auf Basis derer verschiedene Leitsequenzen identifiziert werden konnten (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: PRTN3 Leitsequenzen auf Basis von Literatursequenzen, der Trypsin PICS Ergebnisse sowie der GluC PICS Ergebnisse.^{12, 13}

	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	Code
Molekulardynamik	V	A	D	V	K	D	R	G	P27
SARS-CoV-2	A	R	S	V	A	S	Q	S	P26
Trypsin PICS	A	L	D	V	A	L	G	G	P20
	A	L	D	T	A	L	G	G	P22
	A	L	D	A	G	L	G	G	P25
GluC PICS	A	L	D	V	K	L	A	K	P21
	A	L	D	A	K	L	A	K	P23
	A	L	D	T	K	L	A	K	P24

Auf der Grundlage der verschiedenen Leitsequenzen wurden daraufhin Spaltungsexperimente mit PRTN3 durchgeführt, um die Spaltungseffizienz der einzelnen Sequenzen zu charakterisieren und eine geeignete Auswahl von Sequenzen für die Sensorsynthese zu identifizieren (**Abbildung 10**).

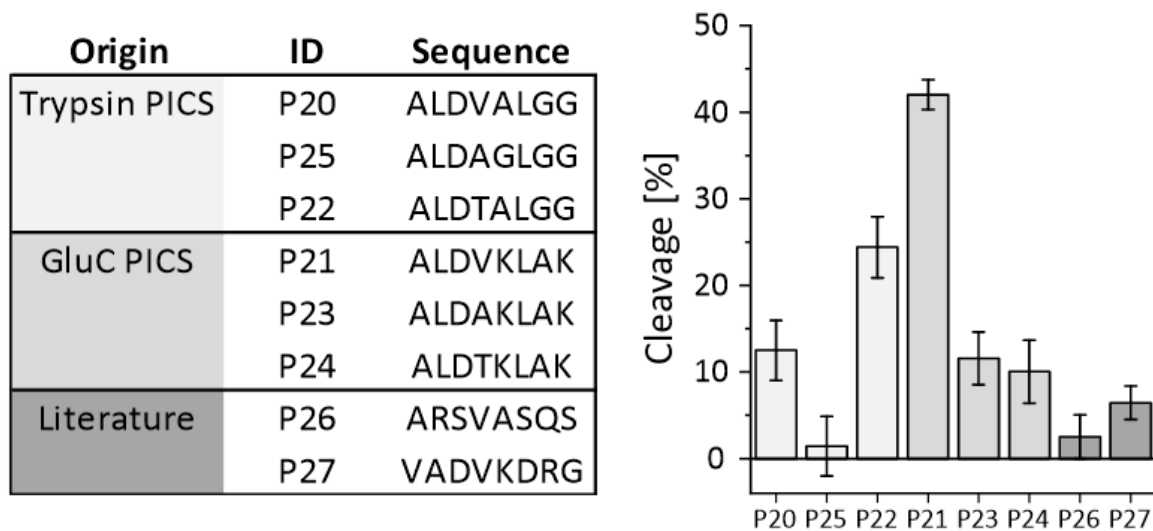


Abbildung 10: Spaltungseffizient der PRTN3 Leitsequenzen (n=3).

Auf der Grundlage der Leitsequenzen (**Abbildung 10 P21**) wurde ein Sensoren entwickelt, der einen fluoreszierenden Farbstoff (EDANS; (5-((2-Aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid)) und einen Fluoreszenzlöcher (DABCYL; (4-((4-(dimethylamino)phenyl)azo)benzoic acid)) (Quencher) enthält. Der Quencher wird durch Spaltung vom Farbstoff getrennt und ein Fluoreszenzsignal wird erzeugt (**Abbildung 7**).

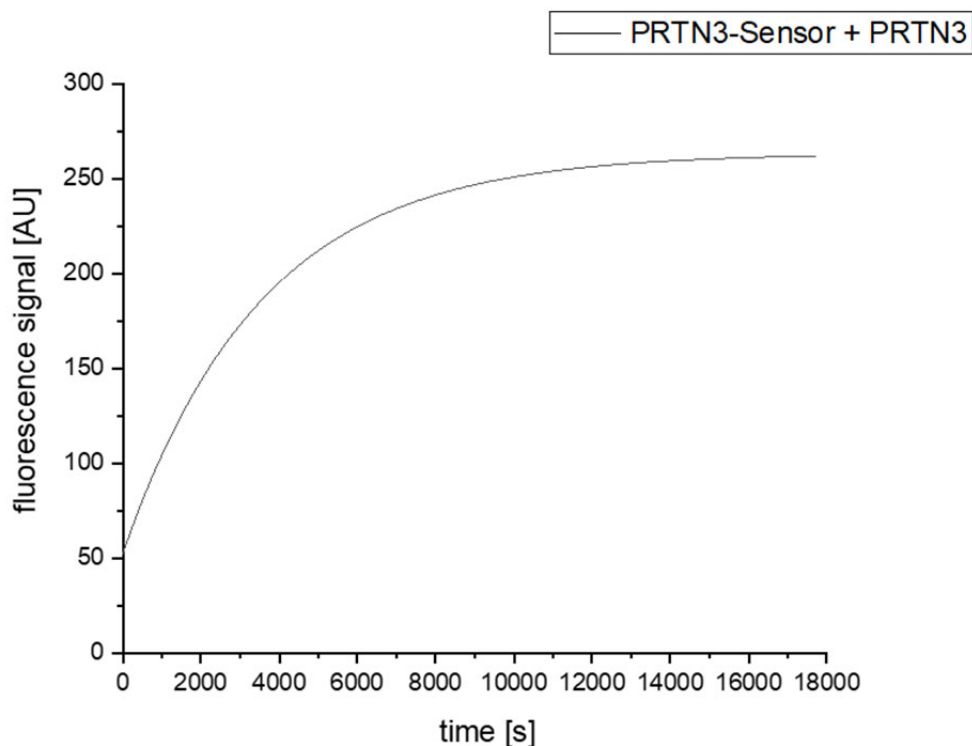


Abbildung 11: Die Effizienz der PRTN3-Spaltung für Sensor P21.

Der PRTN3 Sensor wurde anschließend zusammen mit dem Mpro Sensor in Kombination, als Multiplexing Ansatz, auf SARS-CoV-2 Viren getestet (siehe unten).

SARS-CoV-2 Hauptprotease (Mpro)

Mpro wurde in der zweiten Runde aufgrund von Literaturdaten als Zielprotease ausgewählt.³ In einem ersten Schritt wurde versucht, mithilfe kommerziell erworbener Mpro eine geeignete Leitsequenz zu identifizieren, bevor eine aufwendige Expression und mögliche Skalierung in Erwägung gezogen wurde. Trotz Anpassungen der verwendeten Puffer und verschiedener Dosis Eskalationen konnten lediglich 32 Spaltstellen für den PICS-Assay erstellt werden (**Abbildung 12**).

Trypsin Bibliothek (K/R)

Analysis of **32** cleavage sites

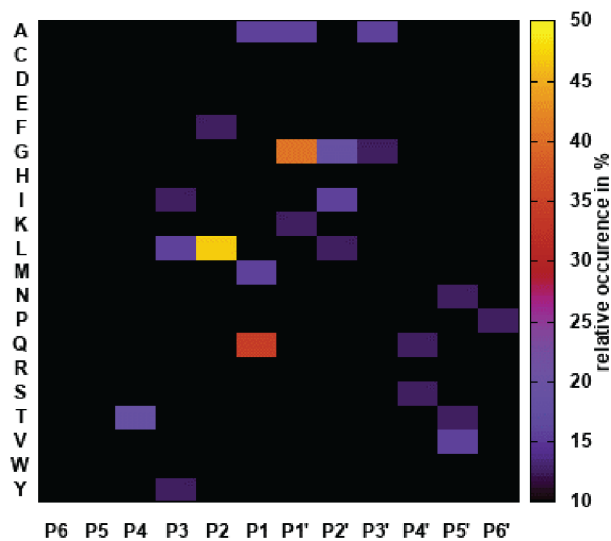


Abbildung 12: PICS-Analyse mittels Mpro auf Trypsin prozessierten Bibliotheken (n=3).

Obwohl die Anzahl der Spaltstellen begrenzt war, ähnelte dieser Ansatz einer in der Literatur gefundenen Sequenz. Daher wurde beschlossen, einen Sensor basierend auf dieser identifizierten Sequenz zu entwickeln (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Mpro Leitsequenz auf Basis der Literatursequenzen sowie den Trypsin PICS Ergebnissen.¹⁴

	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	Code
SARS-CoV-2	L	T	L	Q	S	T	N	T	X

Auf der Grundlage der Leitsequenzen **X** wurde ein Sensor entwickelt, der einen fluoreszierenden Farbstoff (MCA; 7-methoxycoumarin-4-acetyl) und einen Fluoreszenzlöcher (DNP; 2,4-dinitrophenyl) (Quencher) enthält. Der Quencher wird durch Spaltung vom Farbstoff getrennt und ein Fluoreszenzsignal wird erzeugt (**Abbildung 13**).

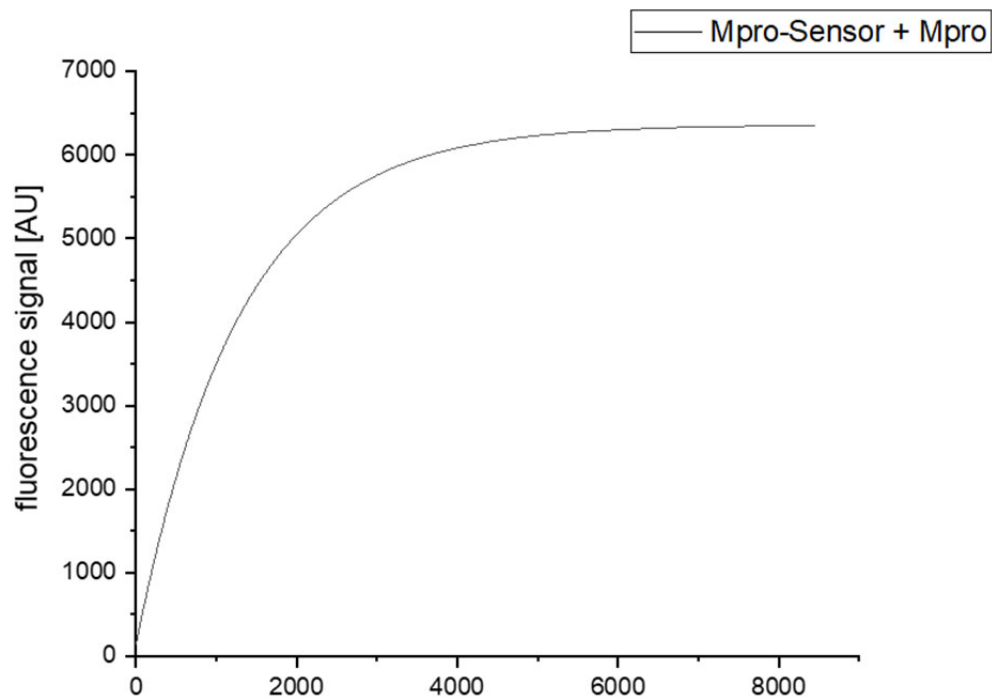


Abbildung 13: Die Effizienz der Mpro-Spaltung für Sensor X.

Die entwickelten Sensoren für PRTN3 und Mpro wurden anschließend auf ihre Fähigkeit zum Multiplex-Readout hin untersucht. Hierbei wurden beide Sensoren miteinander kombiniert und dann entweder mit PRTN3 oder Mpro inkubiert. Anschließend erfolgte ein Ex-vivo-Test der Sensoren auf SARS-CoV-2-Kulturen (**Abbildung 13**).

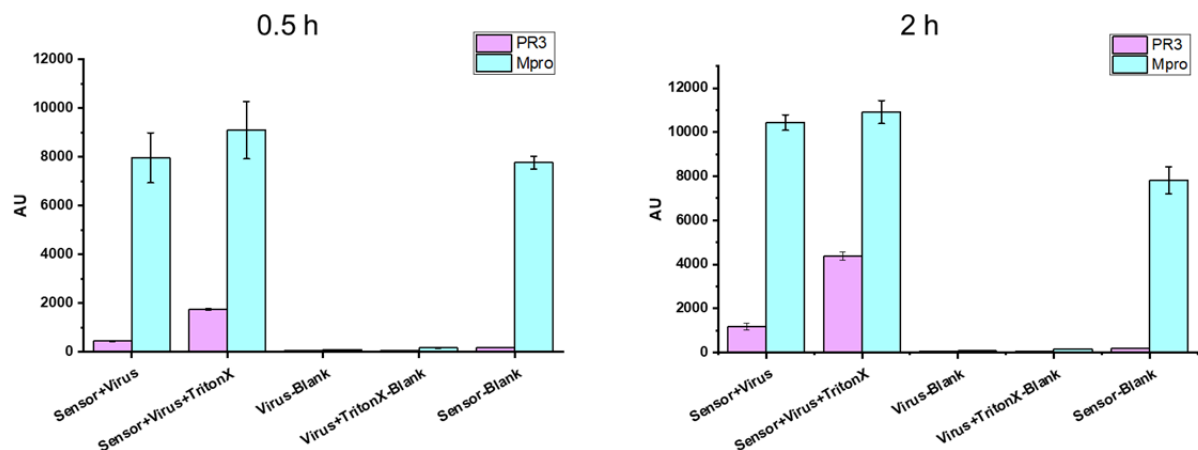


Abbildung 14: Inkubation des PRTN3 und Mpro Sensors mit SARS-CoV-2 Kulturen nach 30 min sowie 2 h.

Geplanter Projektabschluss

30.06.2023

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Im Rahmen der COVID-19-Pandemie hat die Bedeutung von Schnelltestverfahren sowohl in der Wissenschaft als auch in der Industrie erheblich zugenommen. Trotz der Vielfalt an Schnelltests für SARS-CoV-2 existiert bisher keine Methode, die den Speichel oder die Zunge als sensorisches Werkzeug einsetzt. Die Anwendung eines diagnostischen Kaugummis oder Dünnsfilms stellt hierbei eine vielversprechende Alternative dar. Diese innovative Herangehensweise verringert die Abhängigkeit von der Präzision der Probenentnahme und -verarbeitung im Vergleich zu etablierten Methoden erheblich.

Im Verlauf unserer Projektarbeit haben wir erfolgreich einen Sensor entwickelt, der gezielt von SARS-CoV-2-Proteasen aktiviert wird. Dies führt zur Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffs, der bei einer schnellen Testung mittels UV-Licht erkannt werden kann. Wir haben intensiv an der Auswahl geeigneter Sensorsequenzen basierend auf verschiedenen Proteasen gearbeitet und so einen Multiplexing-Ansatz geschaffen. Das System muss noch auf SARS-CoV-2-Speichelproben validiert werden und gegebenenfalls für einen einfacheren Nachweis an einen Geschmacksstoff gebunden werden. Mit diesen Fortschritten ist das System anschließend bereit für die Übertragung in eine orale Darreichungsform.

Geplanter Projektabschluss

Der Projektabschlussbericht ist für den 31.12.2023 geplant.

Erfindungen und Schutzrechtsanmeldungen

Die Technologie für den Influenza-Sensor ist bereits durch die Universität Würzburg geschützt. Für die hierbei relevanten Patente wurden bereits Lizenzen an den Verbundpartner 3A-Diagnostics vergeben. Die Patentlage ist **Tabelle 5** zu entnehmen.

Tabelle 5: Patentlage

Patent Nr.	Anmelde datum	Titel	Anmelder	Bezug zum Antrag
EP13710333.9	03/13	Diagnostic chewing gum for phatogens	JMU-Würzburg	Grundprinzip
EP17758824.1	08/17	Bitter principle derivatives	JMU-Würzburg	Modifizierung von Bitterstoffen
EP17762078.8	08/17	Diagnostic sensor and chewing gum comprising such a diagnostic sensor for the taste-based detection of viruses	JMU-Würzburg	Influenza-Sensor
EP19708959.2A	02/19	Aminomethyl-functionalized Denatonium derivatives, their	JMU-Würzburg	Zusätzliche Bitterstoff Derivate

		preparation and use		
--	--	---------------------	--	--

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Der im Rahmen dieses gemeinschaftlichen Verbundprojekts entwickelte Schnellhinweisgeber für SARS-CoV-2 präsentiert einen innovativen Ansatz zur Virenerkennung, der sich von bisherigen Verfahren deutlich abhebt. Im Gegensatz zu den gängigen Schnell- und PCR-Tests, die in der Corona-Pandemie verwendet werden, nutzt der hier beschriebene SARS-CoV-2-Schnellhinweisgeber die im Speichel vorhandenen Proteasen für eine schnelle und effektive Signalgebung in Form von Fluoreszenz. Dieses Signal kann jedoch durch eine Erweiterung auf Geschmacksrezeptoren der Zunge in Form eines Bitterstoffs oder Ähnlichem verbessert werden. Dadurch wird die teils umständliche und zeitaufwendige Probenvorbereitung, die bei anderen Ansätzen erforderlich ist, vermieden.

Ein besonderer Vorteil dieses Hinweisgebers liegt in seiner Unabhängigkeit von Laboreinrichtungen, da er praktisch überall durchgeführt werden kann. Dieser wegweisende Ansatz eröffnet eine breite Palette von Anwendungsmöglichkeiten. In der ambulanten Versorgung könnte der geplante Schnellhinweisgeber beispielsweise zur Bewertung der Erforderlichkeit einer Therapie dienen oder zur Prävention von Infektionen bei anderen Patienten eingesetzt werden. Die Innovativität dieses Ansatzes spiegelt sich in mehreren Aspekten wider: Er ermöglicht Tests nahezu überall, seine Herstellung und Anwendung sind im Vergleich zu anderen Hinweisgebern kosteneffizient, er erfordert kein spezialisiertes Fachpersonal, und die Testergebnisse liegen schnell vor.

Die mühelose und zügige Handhabung des hier präsentierten SARS-CoV-2-Schnellhinweisgebers ermöglicht eine frühzeitige Identifikation erkrankter Personen. Dadurch können alltägliche Abläufe, wie sie in der Industrie üblich sind, ohne größere Störungen fortgeführt werden. Dieser neuartige Hinweisgeber könnte ebenso wirksam verhindern, dass Krankheiten in sensible Bereiche wie Kliniken und Altenheime eingeschleppt werden. Besonders im Bildungsbereich, insbesondere in Kindergärten und Schulen, stellt der Schnellhinweisgeber im Vergleich zu den derzeit, während der COVID-19-Pandemie verwendeten Tests, die oft einen Nasen-Rachen-Abstrich erfordern, eine wesentlich unkompliziertere Alternative dar.

Wissenschaftliche Erfolgsaussichten

Wenn es möglich ist, SARS-CoV-2 mit Hilfe eines Indikators zu erkennen, der Krankheitsspezifische Proteasen verwendet, sollte es in Zukunft auch möglich sein, solche Indikatoren für andere Atemwegserkrankungen zu entwickeln. Auch eine Ausweitung auf andere Krankheiten wie Tumorerkrankungen oder entzündliche Grunderkrankungen sowie zielgerichtete Therapien ist denkbar.

Nach momentanem Sachstand werden die aktuellen Daten für eine Publikation vervollständigt. Dabei ist eine Publikation (i) in dem Feld der „Darstellung der Technologieplattform zur Identifizierung von SARS-CoV-2 mittels oralem Schnelltestsystem möglich“ und (ii) in dem Feld der „Visuelle Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe“ möglich.

Anschlussfähigkeit

-

Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Alle Arbeiten haben zu Lösungen geführt, lediglich im Bereich der Herstellung zur Prototyp-Testung gibt es Verzögerungen, welche Aufgrund der COVID-19 Pandemie entstanden sind.

Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung

Die Projektdauer wurde mit Zustimmung des ZG bis zum 30.06.2023 verlängert. Durch die im Folgenden aufgeführten Optimierungen des Zeitplanes, liegt das Vorhaben innerhalb der neuen Arbeits- und Zeitplanung. Durch die kostenneutrale Verlängerung sind keine Zusatzkosten entstanden

Literatur

1. Ritzer, J.; Luhmann, T.; Rode, C.; Pein-Hackelbusch, M.; Immohr, I.; Schedler, U.; Thiele, T.; Stübinger, S.; Rechenberg, B. V.; Waser-Althaus, J.; Schlottig, F.; Merli, M.; Dawe, H.; Karpisek, M.; Wyrwa, R.; Schnabelrauch, M.; Meinel, L., Diagnosing peri-implant disease using the tongue as a 24/7 detector. *Nat Commun* **2017**, 8 (1), 264.
2. Essalmani, R.; Jain, J.; Susan-Resiga, D.; Andréo, U.; Evagelidis, A.; Derbali, R. M.; Huynh, D. N.; Dallaire, F.; Laporte, M.; Delpal, A.; Sutto-Ortiz, P.; Coutard, B.; Mapa, C.; Wilcoxon, K.; Decroly, E.; Nq Pham, T.; Cohen É, A.; Seidah, N. G., Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity. *Journal of virology* **2022**, 96 (8), e0012822.
3. Mukherjee, R.; Dikic, I., Proteases of SARS Coronaviruses. **2023**, 930-941.
4. Jackson, C. B.; Farzan, M.; Chen, B.; Choe, H., Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2022**, 23 (1), 3-20.
5. Iwata-Yoshikawa, N.; Kakizaki, M.; Shiwa-Sudo, N.; Okura, T.; Tahara, M.; Fukushi, S.; Maeda, K.; Kawase, M.; Asanuma, H.; Tomita, Y.; Takayama, I.; Matsuyama, S.; Shirato, K.; Suzuki, T.; Nagata, N.; Takeda, M., Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways. *Nature Communications* **2022**, 13 (1), 6100.
6. ter Mors, B.; Driessen, M. D.; Seher, A.; Haubitz, I. R.; Raschig, M.; Nowak, M.; Jockel-Schneider, Y.; Linz, C.; Meinel, L., The development of matrix-metalloproteinase responsive sensors for the machine-independent detection of oral inflammation. *Sensors & Diagnostics* **2023**.
7. Peacock, T. P.; Goldhill, D. H.; Zhou, J.; Baillon, L.; Frise, R.; Swann, O. C.; Kugathasan, R.; Penn, R.; Brown, J. C.; Sanchez-David, R. Y.; Braga, L.; Williamson, M. K.; Hassard, J. A.; Staller, E.; Hanley, B.; Osborn, M.; Giacca, M.; Davidson, A. D.; Matthews, D. A.; Barclay, W. S., The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nature Microbiology* **2021**, 6 (7), 899-909.
8. Xia, S.; Lan, Q.; Su, S.; Wang, X.; Xu, W.; Liu, Z.; Zhu, Y.; Wang, Q.; Lu, L.; Jiang, S., The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated

membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, 5 (1), 92.

9. Zhang, Y.; Zhang, L.; Wu, J.; Yu, Y.; Liu, S.; Li, T.; Li, Q.; Ding, R.; Wang, H.; Nie, J.; Cui, Z.; Wang, Y.; Huang, W.; Wang, Y., A second functional furin site in the SARS-CoV-2 spike protein. *Emerging Microbes & Infections* **2022**, 11 (1), 182-194.

10. Ter Mors, B.; Driessen, M. D.; Seher, A.; Haubitz, I. R.; Raschig, M.; Nowak, M.; Jockel-Schneider, Y.; Linz, C.; Meinel, L. *The development of matrix-metalloproteinase responsive sensors for the machine-independent detection of oral inflammation*; 2635-0998; Royal Society of Chemistry (RSC): 2023-01-01, 2023; pp 867-877.

11. Xia, S.; Lan, Q.; Su, S.; Wang, X.; Xu, W.; Liu, Z.; Zhu, Y.; Wang, Q.; Lu, L.; Jiang, S., The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2020**, 5 (1), 92.

12. Mustafa, Z.; Zhanapiya, A.; Kalbacher, H.; Burster, T., Neutrophil Elastase and Proteinase 3 Cleavage Sites Are Adjacent to the Polybasic Sequence within the Proteolytic Sensitive Activation Loop of the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Omega* **2021**, 6 (10), 7181-7185.

13. Hajjar, E.; Korkmaz, B.; Gauthier, F.; Brandsdal, B. O.; Witko-Sarsat, V.; Reuter, N., Inspection of the Binding Sites of Proteinase3 for the Design of a Highly Specific Substrate. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (4), 1248-1260.

14. Moustaqil, M.; Ollivier, E.; Chiu, H.-P.; Van Tol, S.; Rudolffi-Soto, P.; Stevens, C.; Bhumkar, A.; Hunter, D. J. B.; Freiberg, A. N.; Jacques, D.; Lee, B.; Sieracki, E.; Gambin, Y., SARS-CoV-2 proteases PLpro and 3CLpro cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species. *Emerging Microbes & Infections* **2021**, 10 (1), 178-195.