

Polysulfate hemmen durch elektrostatische Wechselwirkungen die SARS-CoV-2-Infektion**

Chuanxiong Nie,* Paria Pouyan, Daniel Lauster, Jakob Trimpert, Yannic Kerkhoff, Gergo Peter Szekeres,* Matthias Wallert, Stephan Block, Anil Kumar Sahoo,* Jens Dervedde, Kevin Pagel, Benedikt B. Kaufer, Roland R. Netz, Matthias Ballauff und Rainer Haag*

In memoriam Professor Klaus Hafner

Abstract: Wir zeigen, dass negativ geladene Polysulfate durch elektrostatische Wechselwirkungen an das Spike-Protein von SARS-CoV-2 binden. Durch einen Plaquereduktionstest verglichen wir die hemmende Wirkung von Heparin, Pentosanpolysulfat, linearem Polyglycerolsulfat (LPGS) und hyperverzweigtem Polyglycerolsulfat (HPGS) gegenüber SARS-CoV-2. Dabei ist das synthetische LPGS der vielversprechendste Inhibitor mit $IC_{50} = 67 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ca. $1,6 \mu\text{M}$) und zeigt eine 60-fach höhere virushemmende Aktivität als Heparin ($IC_{50} = 4084 \mu\text{g mL}^{-1}$) bei zugleich deutlich geringerer gerinnungshemmender Aktivität. Außerdem konnten wir durch Moleküldynamiksimulationen bestätigen, dass LPGS stärker an das Spike-Protein bindet als Heparin selbst und dass LPGS sogar noch stärker an die Spike-Proteine der neuen N501Y- und E484K-Varianten bindet. Unsere Studien belegen, dass die Aufnahme von SARS-CoV-2 in Wirtszellen über elektrostatische Wechselwirkungen blockiert werden kann. Deshalb kann LPGS als vielversprechender Prototyp für das Design weiterer neuartiger viraler Inhibitoren von SARS-CoV-2 herangezogen werden.

Einleitung

Das schwere akute respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) stellt weltweit ein anhaltend bedeutendes Gesundheitsproblem dar.^[1] Das Verständnis des Mechanismus der Virusanlagerung und des Eintritts in die Wirtszelle ist entscheidend für die Entwicklung von geeigneten Hemmstoffen. Bei einer Reihe von Viren sind elektrostatische Wechselwirkungen für die Anheftung des Virions an die Zelloberfläche verantwortlich.^[2,3] Cagno et al.^[2] haben kürzlich experimentelle Beweise für die Bedeutung dieses Prozesses bei einer großen Anzahl von Viren zusammengetragen und diskutiert (siehe Tabelle 1 in Lit. [2]). Abbildung 1 zeigt schematisch die ersten Schritte der Virusaufnahme in die Zellen. Virionen lagern sich zunächst an Syndecane und Glypicane (= Heparansulfatproteoglykane (HSPGs)) an, welche auf der Zelloberfläche der meisten Körperzellen in hoher Dichte exprimiert sind.^[3] Jedes HSPG besteht aus einem Protein und einer hochgeladenen Glykosaminoglykan(GAG)-Kette. Die negativ geladenen Heparansulfat(HS)-Ketten des HSPG interagieren mit basischen Protein-domänen der viralen Kapsidproteine. Wie in Abbildung 1

[*] Dr. C. Nie, P. Pouyan, Dr. D. Lauster, Dr. G. P. Szekeres, Prof. Dr. K. Pagel, Prof. Dr. M. Ballauff, Prof. Dr. R. Haag
 Institut für Chemie und Biochemie
 Freie Universität Berlin
 Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
 E-Mail: chuanxnie@zedat.fu-berlin.de
 Haag@zedat.fu-berlin.de

Dr. C. Nie, Dr. J. Trimpert, Prof. Dr. B. B. Kaufer
 Institut für Virologie
 Freie Universität Berlin
 Robert-von-Ostertag-Straße 7–13, 14163 Berlin (Deutschland)

Y. Kerkhoff, Dr. M. Wallert, Dr. S. Block
 Department of Chemistry and Biochemistry
 Emmy-Noether Group „Bionanointerfaces“
 Freie Universität Berlin
 Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)

Dr. G. P. Szekeres, Prof. Dr. K. Pagel
 Department of Molecular Physics
 Fritz Haber Institute of the Max Planck Society
 Faradayweg 4–6, 14195 Berlin (Deutschland)
 E-Mail: gpszekeres@fhi-berlin.mpg.de


Dr. A. K. Sahoo, Prof. Dr. R. R. Netz
 Fachbereich Physik
 Freie Universität Berlin
 Arnimallee 14, 14195 Berlin (Deutschland)

E-Mail: 201992kumarsahoo@gmail.com

Dr. A. K. Sahoo
 Max Planck Institute of Colloids and Interfaces
 Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam (Deutschland)

Dr. J. Dervedde
 Institut für Laboratoriumsmedizin
 Klinische Chemie und Pathobiochemie
 Charité-Universitätsmedizin Berlin
 Augustenburgerplatz 1, 13353 Berlin (Deutschland)

[**] Eine frühere Version dieses Manuskripts ist auf einem Preprint-Server hinterlegt worden (<https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14074070>).

 Hintergrundinformationen und Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202102717> zu finden.


 © 2021 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Tabelle 1: Zusammenfassung der antiviralen Wirksamkeit von Polysulfaten.

Probe	Hydrodynamischer Durchmesser [nm] ^[b]	ζ-Potential [mV]	IC ₅₀ [μg mL ⁻¹] ^[c]	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [mM -SO ₄ ⁻]
LPG ₂₀ S _{0,94} ^[a]	6.7 ± 3.3	-26.1 ± 0.7	66.9 ± 32.0	1.6 ± 0.8	0.4 ± 0.2
LPG ₂₀ S _{0,47}	6.5 ± 3.8	-18.3 ± 0.6	679.7 ± 175.7	22.7 ± 5.9	4.0 ± 1.0
LPG ₆ S _{0,81}	n.d. ^[d]	-29.1 ± 0.7	> 10000	–	–
HPG ₁₀ S _{0,91}	5.1 ± 2.3	-24.9 ± 3.5	1909.0 ± 342.3	95.4 ± 17.2	11.3 ± 2.0
HPG ₅₀₀ S _{0,85}	14.3 ± 7.7	-21.2 ± 2.3	658.5 ± 492.5	0.7 ± 0.5	3.9 ± 2.9
HPG ₂₆₀₀ S _{0,82}	34.8 ± 12.2	-17.0 ± 1.8	> 10000	–	–
Heparin	10.9 ± 5.3	-31.2 ± 1.9	4084.0 ± 396.3	272.3 ± 26.4	2.2 ± 0.6
Pentosansulfat	n.d. ^[d]	-29.8 ± 2.3	1310.0 ± 292.8	–	2.1 ± 0.5

[a] Sulfatierungsgrad aus Elementaranalysen. [b] durch DLS. [c] Plaque-Reduktionsassay. [d] Nicht nachweisbar.

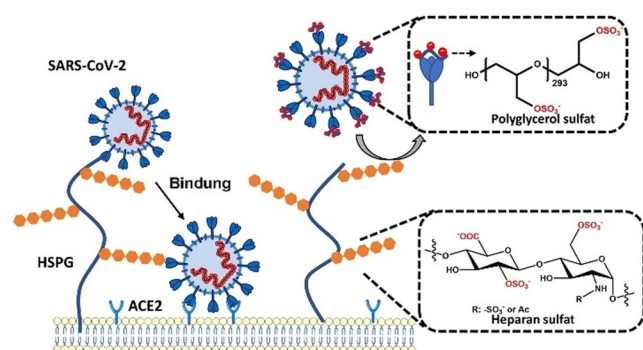


Abbildung 1. Links: Die Bindung von SARS-CoV-2 an oberflächenexponiertes Heparansulfat erleichtert das Eindringen des Virus. Rechts: Kompetitive Bindung an lösliche synthetische Polyglycerolsulfate schirmt die virale Oberfläche ab und reduziert damit die Infektivität.

dargestellt, nutzt SARS-CoV-2 diese unspezifische elektrostatische Wechselwirkung aus, um seine Konzentration auf der Zelloberfläche zu erhöhen und um sich letztendlich an einen spezifischeren Rezeptor zu binden, nämlich das Angiotensin-konvertierende Enzym 2 (ACE2, Angiotensin Converting Enzyme).

Aktuelle Studien bestätigen, dass elektrostatische Wechselwirkungen wichtig für die Infektion von Zellen durch SARS-CoV-2 sind.^[4] So führten Kim et al. zum Beispiel eine Reihe von systematischen Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Studien zur Bindung des SARS-CoV-2-Spike-Proteins an Heparin durch.^[5] Diese Untersuchungen ergaben Bindungskonstanten von bis zu 40 pM, die auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Außerdem fanden Kwon et al. heraus, dass die Zugabe von löslichem HS die Infektiosität von SARS-CoV-2-Zellen hemmt, was die Bedeutung von HS für die Aufnahme des Virus in die Wirtszelle nochmals unterstreicht.^[6] Kürzlich veröffentlichte Studien von Clausen et al. zeigten, dass der Bereich der positiven Ladungen auf der Oberfläche der Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD) von SARS-CoV-2 wesentlich größer ist als der von SARS-CoV.^[7] Wie in Abbildung 1 dargestellt, haben weitere Untersuchungen gezeigt, dass das Eindringen des Virus in die Wirtszelle primär durch die Bindung des Spike-Proteins an das HSPG ausgelöst wird.^[8] Im zweiten Schritt interagiert das angehängte Virion mit ACE2, dem eigentlichen Rezeptor für

die Aufnahme von SARS-CoV-2.^[9,10] Die essentielle Rolle elektrostatischer Wechselwirkungen beim Viruseintritt stellt den Hauptwirkungsmechanismus für hochgeladene anionische Inhibitoren dar. Sowohl Heparin als auch synthetische Virusinhibitoren auf der Basis hochgeladener anionischer Dendrimere wurden in dieser Hinsicht intensiv untersucht.^[11–15]

Die hier vorgestellte Arbeit folgt unserer Hypothese, dass Wechselwirkungen zwischen Ladungsträgern von zentraler Bedeutung sind, um die Aufnahme von SARS-CoV-2 in die Zelle zu verhindern. Wie bereits kürzlich diskutiert^[16–18] wurde, wirken elektrostatische Wechselwirkungen hauptsächlich durch die Freisetzung von Gegenionen.^[19,20] Positiv geladene Bereiche auf der Oberfläche von Proteinen stellen multivalente Gegenionen zu stark negativ geladenen Polyelektrolyten dar, wie zum Beispiel Heparin, wodurch eine beträchtliche Menge an Gegenionen, die an den Polyelektrolyten assoziiert sind, in die Flüssigkeit freigesetzt wird.^[16,17] Positiv geladene Bereiche sollten daher bei der Entwicklung neuer viraler Entry-Inhibitoren als zielgerichtete Andockstellen berücksichtigt werden. In Anbetracht dieser Tatsache, dass sich diese positiv geladenen Bereiche in unmittelbarer Nähe der ACE2-Bindungsstelle des Spike-Proteins befinden,^[7] ist es sehr wahrscheinlich, dass Inhibitoren, welche an diese positiv geladenen Reste gebunden sind, die ACE2-Bindung unterbrechen und daher die Aufnahme des Virus verhindern.^[21]

Eine systematische Untersuchung der Interaktionen des SARS-CoV-2-Virions mit der Zelloberfläche erfordert eine detaillierte Erforschung der lokalen Wechselwirkung von HS mit Spike-Proteinen. Die detaillierte Aufklärung dieser Wechselwirkung ist gerade zum Ende des vergangenen Jahres mit dem Auftreten neuer Virusmutanten von noch dringlicherer Bedeutung geworden. Es scheint, dass diese Mutanten eine viel höhere Infektiosität aufweisen.^[22] Die Variante N501Y ist infektiöser als der Wildtyp-Virus, und ein Virus, welches diese Mutation trägt, wurde so angepasst, dass er Mäuse infiziert, die vom Wildtyp-SARS-CoV-2 allerdings nicht infiziert wurden.^[22] Die E484K-Substitution ermöglicht es dem Virus, neutralisierenden Antikörpern zu entgehen.^[23] Docking-Studien und MD-Simulationen erfordern nur die einfach zugänglichen Daten des Spike-Proteins und bieten ein leistungsfähiges und zugängliches Tool zur Bewertung dieser Mutationen durch quantitative Computersimulationen.

In dieser Studie haben wir das Potential verschiedener Polysulfate als so genannte Entry-Inhibitoren gegenüber SARS-CoV-2 systemisch untersucht. Die experimentellen Studien wurden durch MD-Simulationen gestützt. Mittels eines Plaquereduktionstests wurde jeweils der IC_{50} -Wert von verschiedenen hoch sulfatierten Polyelektrolyten bestimmt.^[24,25] Dabei haben wir die beiden natürlich vorkommenden Polysulfate, nämlich Heparin und Pentosansulfat, mit den hoch sulfatierten Polyglycerinen, die eine neue Klasse synthetischer Inhibitoren darstellen, miteinander verglichen. Durch den direkten Vergleich von linearem (LPGS) und hyperverzweigtem Polyglycerolsulfat (HPGS) haben wir den Einfluss des Molekulargewichts wie auch der Molekülarchitektur auf die inhibitorische Wechselwirkung untersucht. Mittels MD-Simulationen wurde die Bindung von mutierten Spike-Proteinen an LPGS untersucht. Wir analysierten detailliert die Wechselwirkung von HS mit dem Spike-Protein, um unsere experimentellen Ergebnisse zur Inhibition zu erklären. Darüber hinaus untersuchten wir auch die N501Y- und E484K-Mutanten hinsichtlich ihrer Virusbindung an HS. Das Ziel unserer Untersuchungen war es in erster Linie, ein vollständig quantitatives Verständnis der Hemmung von SARS-CoV-2 durch Polyanionen zu erlangen, aber auch die Veränderungen der Inhibition durch die neuartigen Mutationen des Virusgenoms zu erforschen.

Ergebnisse und Diskussion

Elektrostatische Wechselwirkungen von SARS-CoV-2 mit Wirtszellen. Frühere Studien zeigten die Bedeutung elektrostatischer Wechselwirkungen im Zusammenhang mit einer SARS-CoV-2-Infektion. In der RBD von SARS-CoV-2 befinden sich fünf positiv geladene Aminosäuren direkt neben der ACE2-Bindungsstelle: R346, R355, K444, R466 und R509. Diese Aminosäuren bilden einen positiv geladenen Bereich, welcher an der Außenseite der RBD (in Abbildung 2b blau dargestellt) lokalisiert ist und die Bindungsaf-

finität des Virus an den ACE2-Rezeptor erhöht.^[26,27] Im Falle der E484K-Mutante kommen eine weitere Aminosäure (K484) und damit einhergehend eine weitere positive Ladung im RBD hinzu, welche die virale Bindung an HS noch weiter verstärken dürfte.^[23] Jüngste Studien haben gezeigt, dass der positiv geladene Bereich zur Virusbindung an HS auf der Zelloberfläche beiträgt, indem er das Andocken des Virus an die Zelloberfläche erleichtert.^[3,5] Basierend auf dieser Erkenntnis, dass die Spaltung von HS von der Zelloberfläche die Infektion mit SARS-CoV-2 hemmt, wurde ein zweistufiger Prozess von SARS-CoV-2 angenommen, der in Abbildung 1 dargestellt ist.^[7,8] Die Bindung von HS ist gewissermaßen die Eintrittskarte für die Interaktion zwischen der RBD mit den Bindungsstellen des ACE2-Rezeptors.^[7]

Die Tatsache, dass die Aufnahme von SARS-CoV-2 in Wirtszellen über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Zelloberflächen HS und Spike-Protein blockiert werden kann, inspirierte uns, die in Abbildung 2c gezeigten Polysulfate bezüglich ihrer hemmenden Wirksamkeit gegenüber SARS-CoV-2 zu testen. Heparin wurde verwendet, um die durch COVID-19 induzierte Blutgerinnung zu verhindern.^[28–30] Es konnte nachgewiesen werden, dass die ACE2-Bindung durch Heparin gestört werden kann, was das Potential von Heparin als SARS-CoV-2-Inhibitor bestätigt,^[21] jedoch kann die starke gerinnungshemmende Aktivität von Heparin das Risiko von Blutungen für Patienten erhöhen.^[31] Daher sind Heparin-mimetische Polymere mit höherer Virushemmung und vergleichsweise geringer gerinnungshemmender Aktivität als Heparin von großer Bedeutung für die frühzeitige COVID-Behandlung.

In den vergangenen Jahren haben wir mehrere synthetische Polyglycerolsulfate (LPGS und HPGS) als Heparin-Mimetika entwickelt.^[32,33] Bei ähnlicher Ladungsdichte zeigen die Polyglycerolsulfate eine geringere gerinnungshemmende Aktivität als Heparin.^[32] Die Hemmaktivität dieser Polysulfate gegenüber SARS-CoV-2 wurde eingehend untersucht und mit der von Heparin verglichen, um einen Ansatzpunkt für das Design zukünftiger Inhibitoren zu erhalten. Die Details der Synthese sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Ein vielversprechendes Polysulfat wird im Folgenden mit $LPG_{20}S_{0,94}$ abgekürzt. Es basiert auf einem linearen Polyglycerol (20 kDa), dessen Hydroxygruppen zu 94 % sulfatiert sind.

Hemmung von SARS-CoV-2. Die Hemmung der Virusbindung wurde durch Plaquereduktionstests mit natürlichem SARS-CoV-2 (SARS-CoV2M; BetaCoV/Deutschland/Bav-Pat1/2020) untersucht.^[34] Für unsere Studien wurde das SARS-CoV-2-Virus mit den Inhibitoren vorbehandelt und dann mit Vero-E6-Zellen inkubiert, um die Virusbindung zu untersuchen. Die Zellen wurden mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, um ungebundene Virionen zu entfernen. Danach wurden die Zellen für 48 Stunden kultiviert und mit Überlagerungsmedium zur Plaquebildung kultiviert (siehe auch Hintergrundinformationen Abbildung S3). Da die Bindung und die Aufnahme des Virus in die Zelle Voraussetzungen für die Plaque-Bildung sind, ist ein Plaque-Reduktionsassay ein aussagekräftiger Nachweis, um die Hemmung der Virusbindung und der Aufnahme zu berechnen.

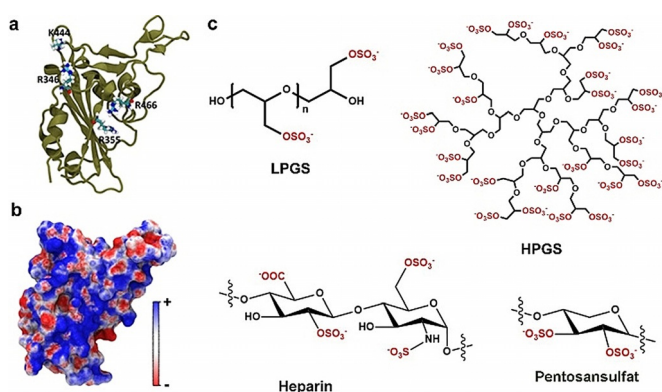


Abbildung 2. a) Kristallstruktur der SARS-CoV-2-Spike-Protein-Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD) (PDB-ID: 6M0J)^[27,27] mit einigen wichtigen kationischen Resten, welche mit polyanionischen Liganden interagieren können. b) Elektrostatische Ladungsverteilung der Bindungsdomäne. c) Schematische Darstellungen von linearen und hyperverzweigten Polyglycerolsulfaten und natürlich vorkommenden Polysulfaten. Die negativ geladenen Gruppen sind rot markiert.

Abbildung 3a und Tabelle 1 zeigen dosisabhängige Virusinhibitionskurven für die verschiedenen Proben. Zunächst haben wir die Virushemmung der natürlichen (Heparin und Pentosansulfat) und synthetischen Polysulfate miteinander verglichen. Wie erwartet, hemmen Heparin und Pentosansulfat zwar die Infektion, aber die beobachtete Hemmaktivität ist eher gering. Die halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}) für Heparin und Pentosansulfat liegt bei $4084,0 \pm 396,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, beziehungsweise bei $1310 \pm 292,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Heparin kann die Blutgerinnung bereits ab einer Konzentration von $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ vollständig hemmen. LPG₂₀S_{0,94} zeigt eine IC_{50} von $66,9 \pm 32,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ca. $1,6 \mu\text{M}$) und damit eine deutlich höhere virushemmende Aktivität als Heparin und Pentosansulfat.

Wir verglichen auch die Wirksamkeit von LPG₂₀S mit zwei verschiedenen Sulfatierungsgraden (94% und 47%) in Bezug auf die Virushemmung. Eine Erhöhung des Sulfatierungsgrades erhöht die hemmende Aktivität von LPGS in einem bemerkenswerten Ausmaß: LPG₂₀S_{0,47} mit 47% Sulfatierung zeigt eine IC_{50} von $679,7 \pm 175,7 \mu\text{g mL}^{-1}$, die 10-fach höher ist als die IC_{50} von fast vollständig sulfatiertem LPG₂₀S_{0,94}. Es überrascht, dass eine Verdopplung des Sulfatierungsgrades eine zehnfache Verbesserung der Hemmaktivität bewirkt. Von einer ähnlichen ladungsabhängigen Virushemmungsaktivität wurde von Clausen et al. bei der Untersuchung von Heparin zur Hemmung von SARS-CoV-2 berichtet.^[7] Dieser starke Einfluss der Sulfatierung auf die Inhibition unterstreicht die Bedeutung der Ladungsdichte des Inhibitors für die Virusbindung. Um die strukturell bedingten Unterschiede und deren Einfluss auf die virushemmende Aktivität zu verdeutlichen, haben wir LPGS und HPGS mit jeweils unterschiedlichen Molekulargewichten einander gegenübergestellt. Dabei verglichen wir fast vollständig sulfatierte Inhibitoren (> 80%) und stellten fest, dass LPGS nur dann Viren effektiv hemmen konnte, wenn dessen Basispolymer Polyglycerol 20 kDa besaß. LPGS mit geringerem Molekulargewicht zeigte keinerlei Hemmwirkung, was die Bedeutung der Größe des Inhibitors für die Bindung an das Spike-Protein bestätigt.

Vergleicht man die Aktivität von LPGS und HPGS mit dem gleichem Molekulargewicht, kommen wir zu dem Schluss, dass LPGS die SARS-CoV-2-Infektion effektiver hemmen kann als das hyperververzweigte Polymer. Von allen getesteten Polysulfaten zeigt LPG₂₀S_{0,94} die höchste inhibito-

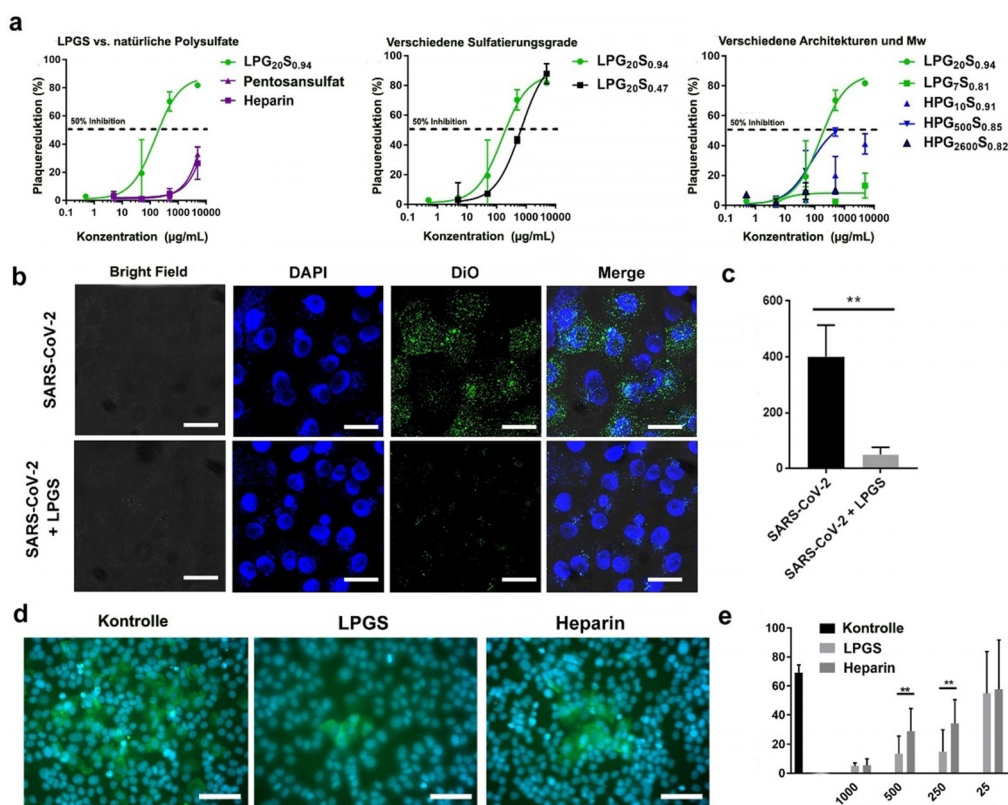


Abbildung 3. a) Ergebnisse der Plaquereduktionstests für die Proben bei unterschiedlichen Inhibitor-Dosen. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD angegeben, $n=4$. Das gezeigte Mw bezieht sich hier auf die LPG- und HPG-Vorstufen. b) Konfokales Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)-Bild der Virusbindung an Vero-E6-Zellen in Gegenwart von LPGS. Maßstabsleiste: $10 \mu\text{m}$. c) Analyse der Virusbindung an Vero-E6-Zellen für die Anzahl der Virionen pro Zelle anhand von CLSM-Bildern. Detailliertere Bilder sind in Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen dargestellt. d) Immunfluoreszenz-Aufnahmen, die die infizierten Zellen im Post-Infektions-Inhibitionsassay abbilden. Die Zellkerne sind blau gefärbt, während die infizierten Zellen durch Antikörper gegen das Nukleokapsidprotein (N) von SARS-CoV-2 grün gefärbt sind. Maßstabsleiste: $50 \mu\text{m}$. Weitere Bilder sind in Abbildung S6 zu finden, siehe Hintergrundinformationen. e) Verhältnisse der infizierten Zellen in jeder Gruppe. „LPGS“ in (b)–(e) bezieht sich jeweils auf LPG₂₀S_{0,94}. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD, $n=4$ $**p < 0,01$ angegeben, aus t-Test-Analyse.

rische Aktivität. Interessanterweise zeigt $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.47}$ mit ca. 137 sulfatierten Gruppen pro Molekül eine zweifach höhere virushemmende Aktivität als $\text{HPG}_{10}\text{S}_{0.91}$ (ca. 123 sulfatierte Gruppen/Molekül). Beide Moleküle haben vergleichbare Größen. Zeta-Potential-Messungen zeigen, dass $\text{HPG}_{10}\text{S}_{0.91}$ mehr negative Ladungen trägt als $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.47}$. Dieser Vergleich zeigt, dass die molekulare Architektur der Schlüsselparameter für die Bindung und Hemmung von SARS-CoV-2 ist und dass, wie in unserem Fall, LPGS effektiver als HPGS ist.

HPGS mit verschiedenen Molekulargewichten (10, 500 und 2600 kDa) wurden miteinander verglichen, wovon HPGS mit 500 kDa die höchste Hemmwirkung zeigte. Die Virus-Hemmung von niedrigerem und höherem Molekulargewicht ist dagegen vergleichsweise gering, was die Bedeutung des Molekulargewichts für die Virusbindung und Hemmung unterstreicht. Auch wenn $\text{HPG}_{500}\text{S}_{0.85}$ einen niedrigeren IC_{50} -Wert in Bezug auf die molare Konzentration als $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ aufweist, hat $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ einen niedrigeren IC_{50} -Wert in Bezug auf die Massenkonzentration. Durch Normierung auf die Anzahl der Sulfatgruppen ist der IC_{50} -Wert für $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ ebenfalls 10-fach niedriger als für $\text{HPG}_{500}\text{S}_{0.85}$ (0,4 mM und 3,9 mM für $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ bzw. $\text{HPG}_{500}\text{S}_{0.85}$). Daraus schließen wir, dass $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ ein besserer SARS-CoV-2-Inhibitor als $\text{HPG}_{500}\text{S}_{0.85}$ ist.

In wässriger Lösung kann man sich die Struktur von HPGS annähernd als eine Art Kugel mit negativer Oberflächenladung vorstellen.^[16] LPGS ist ein lineares Polymer, welches mehrere Konformationen einnehmen und größere Distanzen überbrücken kann und sich dadurch an größere basische Bereiche auf der Oberfläche von Proteinen anpassen kann. Aufgrund der größeren Flexibilität des Rückgrats kann LPGS seine Konformation leichter an die positiv geladenen Taschen anpassen, was zu einer stärkeren Bindung führt. HPGS hingegen hat eine eher starre, kugelförmige Struktur und kann seine Konformation wenig an die Bindungstasche anpassen. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Influenza- und Herpes-Simplex-Virus-Inhibitoren beobachtet, bei denen die linearen Konstrukte besser abschnitten als hyperververzweigte Konstrukte bei gleichem Molekulargewicht.^[32,35]

Ein Viruziditätsassay zeigte, dass SARS-CoV-2 nicht irreversibel durch $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ und Heparin gehemmt wurde (siehe auch Hintergrundinformationen Abbildung S5). Verdünnt man die Lösung, lösen sich die Virionen aus der Bindung, was unsere Behauptung stützt, dass das $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ SARS-CoV-2 durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Spike-Protein hemmt. Wie in einer unserer jüngsten Studien gezeigt wurde,^[36] ist es denkbar, dass eine Kombination mit hydrophoben, aliphatischen Ketten auch viruzid wirkende Polymere erzeugen kann.^[2,37]

Konkurrenz um die virale Bindung mit der Wirtszelle.

Nachdem wir $\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.94}$ im Rahmen unserer Studien als vielversprechendsten und effektivsten Inhibitor identifiziert haben, haben wir diese Substanz noch detaillierter untersucht. Im Folgenden bezeichnen wir diese Verbindung als LPGS. Um zu zeigen, dass lineare Polysulfate mit Zellen um die virale Bindung konkurrieren können, haben wir Fluoreszenzaufnahmen von Virionen, die an Vero-E6-Zellen

binden, in Gegenwart von LPGS aufgenommen (Abbildung 3b,c). Ohne Inhibitoren binden die Viren an Zellen (Abbildung 3b). LPGS blockiert effektiv die Bindung von SARS-CoV-2 an Vero-E6-Zellen. Die automatische Bildanalyse mit ImageJ (Abbildung 3c) zeigt, dass LPGS eine > 87,5-prozentige Hemmung der Virusbindung bewirkt. Diese Ergebnisse spiegeln die Ergebnisse der Plaque-Reduktionstests wider, dass LPGS die Bindungsdomäne für die virale Bindung vollständig beansprucht und somit als bindender Köder SARS-CoV-2 hemmen kann.

Post-Infektions-Studien. Um das therapeutische Potenzial von LPGS zu demonstrieren, wurde eine Behandlung nach Infektion durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit SARS-CoV-2 bei einer Multiplizität der Infektion (MOI, multiplicity of infection) von 0,01 für 1 h infiziert und dann schließlich für 24 h in LPGS- und heparinhaltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das Virus angefärbt (Abbildung 3d,e und Hintergrundinformationen Abbildung S6). Bei einer bestimmten Dosierung reduzieren LPGS und Heparin die Übertragung von SARS-CoV-2, da sie den Wiedereintritt von freigesetzten Virionen in Zellen blockieren. LPGS zeigt in diesem Test eine höhere Aktivität als Heparin, was in qualitativer Übereinstimmung mit den Assays zur Plaquereduktion steht.

Die Tatsache, dass LPGS die Virusinfektion hemmen kann und sogar nachträglich einer vorausgegangenen Infektion wirksam ist, bestätigt das therapeutische Potential gegenüber COVID-19. Allerdings ist eine umfassende präklinische Evaluierung noch erforderlich.

Bindung von SARS-CoV-2 an die RBD. Um die direkte Interaktion der Inhibitoren LPGS und HPGS mit dem Spike-Protein zu bestätigen, haben wir Affinitätsmessungen mit der Bindungsdomäne mittels mikroskaliger Thermophorese (MST) durchgeführt (Abbildung 4a und Tabelle 2). In Titrationsexperimenten gegen das humane ACE2 haben wir eine Dissoziationskonstante (K_d) von 359 nM ermittelt. Für die synthetischen Polysulfate LPGS und HPGS ermittelten wir K_d -Werte von 5 μM und 141 μM gegenüber der RBD von SARS-CoV-2. Heparin zeigte eine Affinität von 191 μM . Im Vergleich zu den abweichenden IC_{50} -Werten von LPGS und Heparin deuten die ähnlichen K_d -Werte darauf hin, dass die Besetzung der HS-Bindungsstelle der RBD der hemmende Mechanismus ist. Eine dreifach niedrigere Affinität von HPGS im Vergleich zum IC_{50} -Wert lässt sich durch eine zusätzliche sterische Hinderung der eher unflexiblen HPGS-Sphäre erklären.

Es ist zu beachten, dass LPGS an die RBD in unmittelbarer Nähe zur ACE2-Bindungsstelle bindet. Auch wenn einige positiv geladene Aminosäuren an der ACE2-Bindungs-

Tabelle 2: Zusammenfassung der einzelnen Dissoziationskonstanten (K_d) mit Konfidenzintervallen (\pm), die mit 68 % Zuverlässigkeit den Bereich anzeigen, in den K_d fällt.

Probe	K_d
ACE2	359 \pm 49 nM
$\text{HPG}_{10}\text{S}_{0.91}$	141.9 \pm 33.3 μM
$\text{LPG}_{20}\text{S}_{0.47}$	5.2 \pm 3.6 μM
Heparin	191.5 \pm 57.7 μM

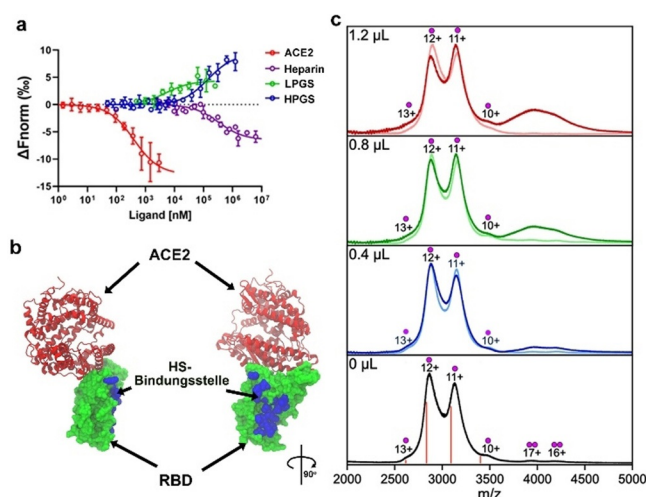


Abbildung 4. a) Affinitätsmessungen der RBD von Wildtyp-SARS-CoV-2 gegenüber LPGA, HPGS, Heparin und ACE2 mittels MST. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Mittelwert aus $N \geq 4$ durchgeführten Messungen, und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Datenpunkte wurden gemäß dem Massenwirkungsgesetz angepasst, um Werte für die Dissoziationskonstante K_d zu erhalten (siehe Tabelle 1). Die Unterschiede in den Steigungen der Dosis-Wirkungs-Kurven sind abhängig von der Hydratationsschale und den effektiven Ladungen, aber sie haben keinen Einfluss auf die Wendepunkte der Kurven zur Bestimmung der K_d -Werte. b) Kristallstruktur von RBD (grün) gebunden an ACE2 (rot, PDB-ID: 6MOJ). Die Aminosäurereste von RBD (R346, A348, A352, N354, R355, K356, R357, S359, Y396, K444, N450, R466, I468), die anhand von MD-Simulationen Bindungen mit Polysulfaten eingehen, sind in der VDW-Darstellung (blau) hervorgehoben, was die mutmaßliche HS-Bindungsstelle kennzeichnet. Detailliertere Abbildungen sind in den Hintergrundinformationen Abbildung S7 dargestellt. c) Massenspektren von 4.0 μL RBD-Lösung gemischt mit 0, 0.4, 0.8 und 1.2 μL Heparin (hell) oder LPGA (dunkel). Die Ladungszustände sind mit einem einzelnen Punkt für das RBD-Monomer und mit einem doppelten Punkt für das RBD-Dimer markiert, während die berechneten m/z für die (10–13 +)-Ladungszustände des 34 kDa RBD mit orangefarbenen Linien markiert sind.

stelle festgestellt wurden, zeigt unsere Simulation, dass LPGA hauptsächlich an die stark positiv geladenen Taschen an der RBD, d. h. an der HS-Bindungsstelle, bindet (Abbildung 4b und siehe auch Hintergrundinformationen Abbildung S7).

Von den hier getesteten Polysulfaten stellte sich LPGA als der effektivste Ligand heraus, und daher wurde dessen Bindung zur RBD eingehender mittels nativer Massenspektrometrie analysiert, einer gängigen Technik zur Untersuchung nicht-kovalenter Proteinkomplexe.^[38,39] Abbildung 4c zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse einer RBD-Lösung, welcher unterschiedliche Mengen von Heparin oder LPGA hinzugefügt wurden.

Das Massenspektrum der reinen RBD zeigt zwei unterschiedliche Gruppen von Peaks: die erste Gruppe im Bereich von 2500–3600 m/z entspricht dem Proteinmonomer mit Ladungszuständen 10–13+, während die Gruppe im Bereich von 3600–4600 m/z dem RBD-Dimer mit Ladungszuständen 16–17+ zuzuordnen ist. Die Dimer-Signale weisen im Allgemeinen eine viel geringere Intensität auf als der Bereich, welcher dem RBD-Monomer zugeordnet ist (Abbildung 4c,

unteres Spektrum). Außerdem sind alle Peaks breit und schlecht aufgelöst, was auf eine Heterogenität hindeutet, welche höchstwahrscheinlich das Ergebnis einer posttranslationalen Modifikation ist. Das Molekulargewicht der reinen RBD wurde auf ca. 34 kDa bestimmt.

Im Vergleich zum reinen RBD-Protein hat sich das Massenspektrum durch die Zugabe von unfraktioniertem Heparin zur RBD-Lösung nicht wesentlich verändert. In einer früheren nativen Massenspektrometrie-Studie wurde eine Heparin-RBD-Bindung beobachtet, allerdings wurde in dieser Studie kein unfraktioniertes Heparin wie hier verwendet, sondern ein viel weniger heterogenes, isoliertes 20mer-Heparin.^[21] Durch Zugabe von LPGA zu der RBD-Lösung erhöhte sich die Gesamtintensität im 3600–4600- m/z -Bereich mit zunehmendem LPGA:RBD-Verhältnis (Abbildung 4c; dunkelblaue, grüne und rote Spuren). Angesichts der Tatsache, dass durch Zugabe der LPGA-Lösung die absolute Konzentration von RBD in der Probe gesenkt wird, ist die erhöhte Signalintensität im Bereich 3600–4600 m/z wahrscheinlich nicht das Ergebnis einer erhöhten RBD-Dimerisierung. Außerdem erhielten wir nur ein großes und schlecht aufgelöstes Signal anstatt mehrerer zumindest teilweise aufgelöster Peaks, wie es für Oligomere zu erwarten wäre. Dies deutet auf eine hohe molekulare Heterogenität in den Spezies hin, die demselben Spektralbereich zugeordnet sind. Die mittleren Molekulargewichte von LPGA und RBD betragen etwa 40 kDa bzw. 34 kDa, und beide sind sehr heterogen im Gewicht. Die zunehmende Signalintensität im 3600–4600- m/z -Bereich einhergehend mit zunehmendem RBD:LPGA-Verhältnis resultiert daher wahrscheinlich durch die Bindung der RBD an LPGA-Moleküle.

MD-Simulationen zur Untersuchung der Wechselwirkungen von LPGA und Heparin mit Wildtyp-RBD. Um die Hypothese zu verifizieren, dass Polysulfate die virale Infektion durch elektrostatisch vermittelte Bindung an das SARS-CoV-2-Spike-Protein hemmen, haben wir All-Atom-MD-Simulationen vom RGB des Spike-Proteins und LPGA/Heparin mit explizitem Wasser durchgeführt (siehe Abbildung 5; weitere Details bzgl. der Methode sind in den Hintergrundinformationen enthalten). Wir fanden heraus, dass sowohl LPGA als auch Heparin Komplexe mit der RBD bilden (Abbildung 5a,b). LPGA bindet dabei vollständig an die RBD, wohingegen ein Teil des Heparins ungebunden in Lösung bleibt. Trägt man die Anzahl der Kontakte jeweils gegen die Aminosäurereste auf, wird deutlich, dass beide anionischen Polymere fast ausschließlich nur mit den kationischen Resten der RBD interagieren: nämlich R355, K356, R357 und R466 (Abbildung 5c). Weiterhin fanden wir heraus, dass für LPGA die Gesamtzahl der Kontakte mit RBD/Molekulargewicht des Polymers 1,6-fach höher als die von Heparin liegt (Abbildung 5c Ausschnitt). Normiert auf die Ladungseinheit ist die Kontaktanzahl für LPGA 3,2-fach so hoch wie die von Heparin. Der Absolutwert der gesamten Protein-Polymer-Wechselwirkungsenergie ist für LPGA im Vergleich zu Heparin ebenfalls größer (Abbildung 5e). Diese stärkere Bindung von LPGA an RBD korreliert gut mit seiner überlegenen Hemmwirkung, welche auch experimentell beobachtet wurde. Es sollte jedoch beachtet werden, dass aufgrund der bekannten Einschränkungen von atomistischen Simulationen

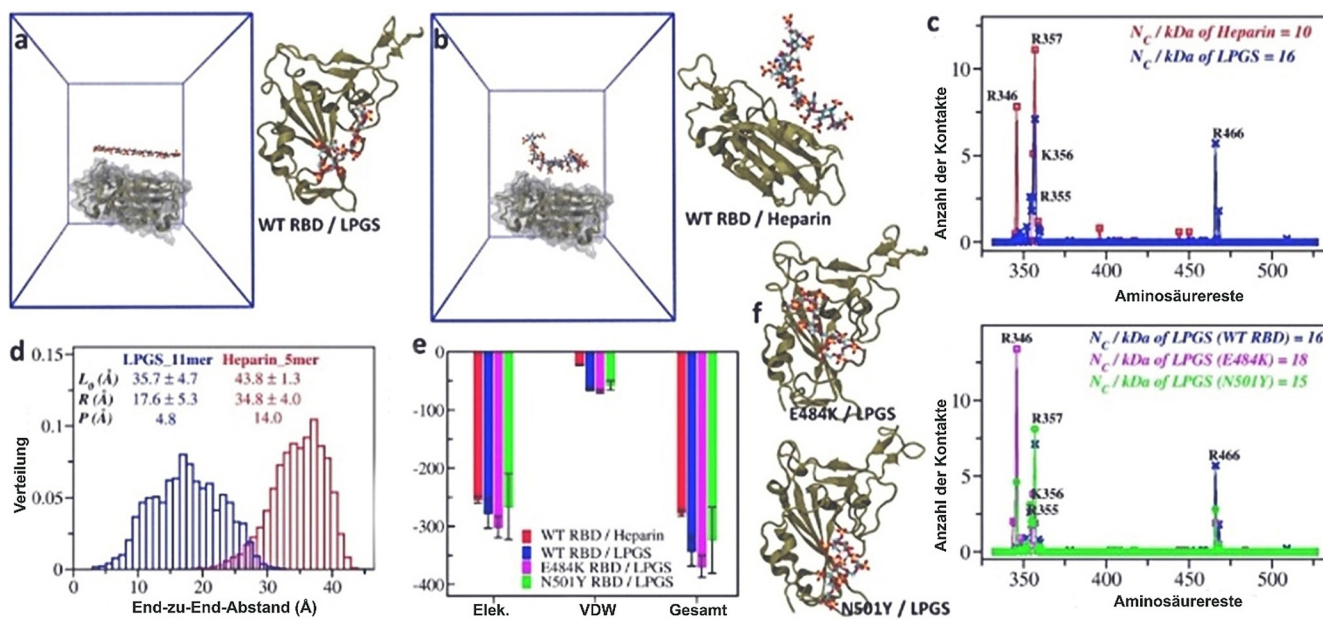


Abbildung 5. Simulationsaufbau zur Untersuchung der Wechselwirkungen von RBD gegenüber Wildtyp-SARS-CoV-2 mit einem einzelnen a) LPGS-Undecamer und b) Heparin-Pentamer. Das Protein ist in der Sekundärstruktur (tan) und die Polymere sind im Stäbchenmodell dargestellt, wobei die einzelnen Atomtypen unterschiedlich gefärbt sind (Wasserstoff in Weiß, Kohlenstoff in Blau, Sauerstoff in Rot und Schwefel in Gelb). Wassermoleküle und Ionen sind nicht dargestellt. Auf der rechten Seite sind Schnappschüsse nach 500 ns MD-Simulationen für a) RBD-LPGS und b) RBD-Heparin-Komplexe gezeigt. c) Die Anzahl der Kontakte, die LPGS und Heparin mit jedem Rest von Wildtyp-RBD bilden, gemittelt über die letzten 100 ns Simulationszeit. d) End-zu-End-Abstandsverteilungen von LPGS und Heparin in wässriger Lösung, die unterschiedliche Flexibilität der Polymere zeigen. Relevante Parameter der Polymere sind im Ausschnitt angegeben; für Details siehe Text. e) Vergleich der Wechselwirkungsenergien für die verschiedenen Polymere und RBD-Varianten. Die elektrostatischen (Elek.) und Van-der-Waals (VDW)-Wechselwirkungen in Bezug auf die Gesamtwechselwirkungsenergie für jeden Protein-Polymer-Komplex sind angegeben. f) Anzahl der Kontakte, die LPGS mit jedem Rest der verschiedenen RBD-Mutanten bildet. Auf der linken Seite sind Schnappschüsse nach 500 ns MD-Simulationen dargestellt, die die Komplexbildung von LPGS mit jeder RBD-Mutante repräsentieren.

kürzeres LPGS (Undecamer) und Heparin (Pentamer) in den Simulationen verwendet wurden verglichen mit den experimentellen Plaque-Reduktionstests (293 und 24 Wiederholungseinheiten für LPGS bzw. Heparin). Dennoch erlauben die simulierten Systeme einen sinnvollen Vergleich mit den Experimenten, wenn man sie in Bezug auf die Bindungsstärke pro Monomer interpretiert.

Um diese überraschende, stärkere Bindungsaffinität von LPGS trotz seiner geringeren linearen Ladungsdichte im Vergleich zu Heparin zu verstehen, charakterisierten wir die Flexibilität beider Polymere in Bezug auf deren End-zu-End-Abstand (R) und deren Persistenzlängen (P). Wie in Abbildung 5 d gezeigt, ist die R -Verteilung für LPGS breiter als die für Heparin, was eine höhere Flexibilität von LPGS impliziert. Aus den Werten von R und der Konturlänge (L_0) der Polymere schätzten wir P von LPGS als 3-mal kleiner als die von Heparin (siehe Ausschnitt in Abbildung 5 d für alle Werte und die Hintergrundinformationen für weitere Details). Durch die hohe Flexibilität von LPGS kann sich die Konformation an die heterogene Oberflächentopographie der RBD anpassen, was wiederum zu seiner verbesserten Bindung führt. Sowohl die Flexibilität des Rückgrats als auch die Ladungsdichte der Polymere sollten beim Design neuer Inhibitoren gleichermaßen berücksichtigt werden, um die Voraussetzung für eine effektive Bindung an Spike-Proteine zu erfüllen.

MD-Simulationen der Wechselwirkungen von LPGS mit RBD-Mutanten. Der erfolgreiche Vergleich zwischen experimentellen und simulierten Ergebnissen für die Wildtyp RBD-LPGS-Wechselwirkungen ermutigte uns, die Hemmwirkung von SARS-CoV-2-Mutanten von LPGS indirekt mittels Simulationen zu testen, insbesondere die E484K- und N501Y-Mutanten, die ebenfalls über eine RBD verfügen.^[22] Tatsächlich konnten wir sehen, dass LPGS Komplexe auch mit beiden RBD-Mutanten bildet (Abbildung 5 f). Wie im Fall der Wildtyp-RBD interagiert LPGS hauptsächlich mit deren kationischen Resten, wie im Diagramm durch die Auftragung von Kontakten gegenüber Resten dargestellt ist (Abbildung 5 f). Aus der Gesamtzahl der Kontakte (Abbildung 5 f, Ausschnitt) und den Interaktionsenergien (Abbildung 5 e) haben wir herausgefunden, dass LPGS an N501Y-RBD genauso effektiv bindet wie an die Wildtyp-RBD, aber noch stärker an E484K-RBD, weil sie einen zusätzlichen kationischen Rest auf der mutierten Oberfläche trägt. Die Ergebnisse unserer MD-Simulationen deuten darauf hin, dass LPGS auch erfolgreich an die SARS-CoV-2-Mutanten binden sollte.

Zelltoxizitätsstudien. Um die Nebenwirkungen der zellulären Toxizität durch die Virusinhibition weiter auszuschließen, wurden die Inhibitoren mit drei verschiedenen Zelllinien getestet: Vero E6, A549 und humane bronchiale Epithelzellen (HBE). Wie in Abbildung S8 (Hintergrundinformationen) dargestellt, wies LPGS keinerlei zelluläre To-

xizität bis zu einer Dosis von 10 mg mL^{-1} auf, was eine halbmaximale Zytotoxizitätskonzentration (CC_{50}) von 10 mg mL^{-1} ergibt. Der Selektivitätsindex wurde berechnet, indem der IC_{50} -Wert mit dem CC_{50} -Wert verglichen wurde. LPGS ergab einen Selektivitätsindex von mehr als 150, was das Potential von LPGS für präklinische Studien bestätigt.

Weiterhin wurde die Antikoagulationsaktivität von LPGS mittels eines aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (PTT)-Tests untersucht und in Abbildung S9 (Hintergrundinformationen) dargestellt. Bei vergleichbarer Ladungsdichte zeigt LPGS eine deutlich geringere Antikoagulationsaktivität als Heparin. Bei einer Konzentration von $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ führt Heparin zu einer vollständigen Antikoagulation des Plasmas, während eine Konzentration von $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ von LPGS erforderlich ist, um eine ähnliche Wirkung zu erzielen. Diese Varianz wird verursacht durch unterschiedliche Kernstrukturen. Heparin kann spezifisch und stark an Antithrombin binden und die Blutgerinnung hemmen.^[40,41] Frühere Studien über Polymer-basierte Heparin-Mimetika wiesen auf die wichtige Rolle der Saccharid-Einheiten bei der Antikoagulation hin.^[42,43] Glycerin-basierte Polymere haben daher eine schwächere gerinnungshemmende Wirkung als Heparin.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend haben wir im Rahmen dieser Studie die Hemmung von SARS-CoV-2 durch Polysulfate mit unterschiedlicher Herkunft (natürlicher und synthetischer), unterschiedlicher Architektur (lineare und hyperverzweigte), unterschiedlichen Molekulargewichten (7 kDa bis 2,6 MDa) und mit unterschiedlichen Sulfatierungsgraden (ca. 100% und 50%) mittels SARS-CoV-2-Plaque-Reduktionassays untersucht. Mithilfe von MD-Simulationen konnten wir zeigen, dass der positiv geladene Bereich in der Nähe der Rezeptor-Bindungsdomäne von SARS-CoV-2 für die Bindung des Spike-Proteins an das HSPG der Zelloberfläche verantwortlich ist. Der vielversprechendste Inhibitor, LPGS, zeigte einen IC_{50} -Wert von $67 \pm 32 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ im Plaque-Reduktionassay. Seine hemmende Aktivität ist etwa 61-fach höher als die von Heparin.

Wir konnten außerdem zeigen, dass Architektur, Molekulargewicht, molekulare Flexibilität und Sulfatierungsgrad die Bindung und Hemmung von SARS-CoV-2 beeinflussen können. Bei der zukünftigen Entwicklung von SARS-CoV-2-Inhibitoren sollten diese Faktoren berücksichtigt und zweckmäßig umgesetzt werden. Mittels der MD-Simulationen haben wir beobachtet, dass LPGS auch an die RBD der Virusmutanten binden kann, und schließen daraus, dass es auch die durch die beiden Mutanten E484K und N501Y hervorgerufenen Infektionen hemmt. Weitere Experimente sind allerdings erforderlich, um die strukturellen Unterschiede der RBD-Mutanten und ihre Auswirkungen auf die Infektiosität und die Inhibitorbindung aufzuklären.

Die wichtigste Information unserer Studie ist, dass synthetische Polysulfate SARS-CoV-2 durch elektrostatische Wechselwirkung hemmen können. Sowohl unsere MST- und MS-Analysen als auch MD-Simulationen zeigen eine starke

Wechselwirkung von Polysulfaten mit dem Spike-Protein. Unserer Ansicht nach ist die Anwendung von Polysulfaten im Kampf gegen SARS-CoV-2 aber vielfältiger. Sowohl die Entwicklung eines neuartigen Arzneimittels zur SARS-CoV-2-Hemmung als auch deren Verwendung für viruzide Oberflächenbeschichtungen wären denkbar. Auch wenn wir die In-vitro-Aktivität von LPGS bereits gezeigt haben, muss dessen biologische Sicherheit und Wirksamkeit im Tiermodell sichergestellt werden, bevor es als Medikament Anwendung findet. In früheren Studien wurde die Sicherheit von HPGS in Mäusen bereits bestätigt, aber LPGS wurde bislang noch nicht bei systemischer Gabe untersucht.^[44]

Es besteht ein zunehmender Bedarf an antiviralen Oberflächen. Es ist durchaus vorstellbar, dass die LPGS-Beschichtung die Aufnahme von SARS-CoV-2 über die Zelloberfläche reduziert. Ein Substrat kann durch ein so genanntes Layer-by-Layer-Verfahren aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen mit LPGS beschichtet werden. Dieses Verfahren hat sich u. a. auch bei der Modifikation von biomedizinischen Geräten bewährt.^[45] Eine Muschel-inspirierte Materialbeschichtung wäre auch denkbar. Muschel-inspirierte dendritische Polyglycerolbeschichtungen wurden in unserer Gruppe entwickelt und sind auf diverse Oberflächen anwendbar.^[46,47] LPGS kann in ähnlicher Weise modifiziert werden, um universell als Beschichtungsmaterial eingesetzt zu werden.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Berliner Universitätsallianz (BUA) und von der Focus Area NanoScale (Freie Universität Berlin) unterstützt. Die Autoren danken der Core Facility BioSupraMol für die Nutzung ihrer Forschungseinrichtungen. Elisa Quaas, Cathleen Hudziak und Marleen Selent wird für die Unterstützung bei biologischen Assays, GPC- bzw. HPLC-Messungen gedankt. R.H. dankt für die Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). A.K.S. und R.N. bedanken sich für die Unterstützung durch die Max-Planck MaxWater Initiative. K.P., R.N., M.B. und R.H. danken für die Unterstützung durch die International Research Training Group (IRTG)-2262. Wir danken auch Prof. Heberle und Dr. Schlesinger (Freie Universität Berlin) für den Zugang zum Monolith-NT.115-Instrument. Wir danken für die Bereitstellung der SARS-CoV-2-RBD aus dem Labor von Dr. Coskun (TU Dresden) und von ACE2-Protein von Prof. Bader am MDC Berlin. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Elektrostatische Wechselwirkung · Inhibition · Polysulfate · SARS-CoV-2 · Virusbindung

- [1] N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G. F. Gao, W. Tan, *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733.
- [2] V. Cagno, E. D. Tseligka, S. T. Jones, C. Tapparel, *Viruses* **2019**, *11*, 596.
- [3] M. Koehler, M. Delguste, C. Sieben, L. Gillet, D. Alsteens, *Annu. Rev. Virol.* **2020**, *7*, 143–165.
- [4] J. A. Tree, J. E. Turnbull, K. R. Buttigieg, M. J. Elmore, N. Coombes, J. Hogwood, C. J. Mycroft-West, M. A. Lima, M. A. Skidmore, R. Karlsson, Y.-H. Chen, Z. Yang, C. M. Spalluto, K. J. Staples, E. A. Yates, E. Gray, D. Singh, T. Wilkinson, C. P. Page, M. W. Carroll, *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178*, 626–635.
- [5] S. Y. Kim, W. Jin, A. Sood, D. W. Montgomery, O. C. Grant, M. M. Fuster, L. Fu, J. S. Dordick, R. J. Woods, F. Zhang, R. J. Linhardt, *Antiviral Res.* **2020**, *181*, 104873.
- [6] P. S. Kwon, H. Oh, S.-J. Kwon, W. Jin, F. Zhang, K. Fraser, J. J. Hong, R. J. Linhardt, J. S. Dordick, *Cell Discovery* **2020**, *6*, 50.
- [7] T. M. Clausen, D. R. Sandoval, C. B. Spliid, J. Pihl, H. R. Perrett, C. D. Painter, A. Narayanan, S. A. Majowicz, E. M. Kwong, R. N. McVicar, B. E. Thacker, C. A. Glass, Z. Yang, J. L. Torres, G. J. Golden, P. L. Bartels, R. N. Porell, A. F. Garretson, L. Laubach, J. Feldman, X. Yin, Y. Pu, B. M. Hauser, T. M. Caradonna, B. P. Kellman, C. Martino, P. L. S. M. Gordts, S. K. Chanda, A. G. Schmidt, K. Godula, S. L. Leibel, J. Jose, K. D. Corbett, A. B. Ward, A. F. Carlin, J. D. Esko, *Cell* **2020**, *183*, 1043–1057.
- [8] H. Chu, B. Hu, X. Huang, Y. Chai, D. Zhou, Y. Wang, H. Shuai, D. Yang, Y. Hou, X. Zhang, T. T.-T. Yuen, J.-P. Cai, A. J. Zhang, J. Zhou, S. Yuan, K. K.-W. To, I. H.-Y. Chan, K.-Y. Sit, D. C.-C. Foo, I. Y.-H. Wong, A. T.-L. Ng, T. T. Cheung, S. Y.-K. Law, W.-K. Au, M. A. Brindley, Z. Chen, K.-H. Kok, J. F.-W. Chan, K.-Y. Yuen, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 134.
- [9] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N.-H. Wu, A. Nitsche, M. A. Müller, C. Drosten, S. Pöhlmann, *Cell* **2020**, *181*, 271–280.
- [10] J. Shang, Y. Wan, C. Luo, G. Ye, Q. Geng, A. Auerbach, F. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 11727–11734.
- [11] A. J. Nahmias, S. Kibrick, *J. Bacteriol.* **1964**, *87*, 1060–1066.
- [12] M. Baba, R. Pauwels, J. Balzarini, J. Arnout, J. Desmyter, E. De Clercq, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6132–6136.
- [13] I. Donskyi, M. Drüke, K. Silberreis, D. Lauster, K. Ludwig, C. Kühne, W. Unger, C. Böttcher, A. Herrmann, J. Dervedde, M. Adeli, R. Haag, *Small* **2018**, *14*, 1800189.
- [14] X. Xu, Q. Ran, P. Dey, R. Nikam, R. Haag, M. Ballauff, J. Dzubiella, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 409–416.
- [15] B. Ziem, J. Rahn, I. Donskyi, K. Silberreis, L. Cuellar, J. Dervedde, G. Keil, T. C. Mettenleiter, R. Haag, *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1600499.
- [16] K. Achazi, R. Haag, M. Ballauff, J. Dervedde, J. N. Kizhakkedathu, D. Maysinger, G. Multhaup, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 3882–3904; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 3926–3950.
- [17] X. Xu, S. Angioletti-Uberti, Y. Lu, J. Dzubiella, M. Ballauff, *Langmuir* **2019**, *35*, 5373–5391.
- [18] X. Xu, M. Ballauff, *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 8222–8231.
- [19] M. T. Record Jr, C. F. Anderson, T. M. Lohman, *Q. Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 103–178.
- [20] G. S. Manning, *Q. Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 179–246.
- [21] Y. Yang, Y. Du, I. A. Kaltashov, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 10930–10934.
- [22] H. Gu, Q. Chen, G. Yang, L. He, H. Fan, Y.-Q. Deng, Y. Wang, Y. Teng, Z. Zhao, Y. Cui, Y. Li, X.-F. Li, J. Li, N.-N. Zhang, X. Yang, S. Chen, Y. Guo, G. Zhao, X. Wang, D.-Y. Luo, H. Wang, X. Yang, Y. Li, G. Han, Y. He, X. Zhou, S. Geng, X. Sheng, S. Jiang, S. Sun, C.-F. Qin, Y. Zhou, *Science* **2020**, *369*, 1603–1607.
- [23] E. Andreano, G. Piccini, D. Licastro, L. Casalino, N. V. Johnson, I. Paciello, S. D. Monego, E. Pantano, N. Manganaro, A. Manenti, R. Manna, E. Casa, I. Hyseni, L. Benincasa, E. Montomoli, R. E. Amaro, J. S. McLellan, R. Rappuoli, *bioRxiv* **2020**, <https://doi.org/10.1101/2020.12.28.424451>.
- [24] Y. Cao, B. Su, X. Guo, W. Sun, Y. Deng, L. Bao, Q. Zhu, X. Zhang, Y. Zheng, C. Geng, X. Chai, R. He, X. Li, Q. Lv, H. Zhu, W. Deng, Y. Xu, Y. Wang, L. Qiao, Y. Tan, L. Song, G. Wang, X. Du, N. Gao, J. Liu, J. Xiao, X.-d. Su, Z. Du, Y. Feng, C. Qin, C. Qin, R. Jin, X. S. Xie, *Cell* **2020**, *182*, 73–84.
- [25] C. Wang, W. Li, D. Drabek, N. M. A. Okba, R. van Haperen, A. D. M. E. Osterhaus, F. J. M. van Kuppeveld, B. L. Haagmans, F. Grosveld, B.-J. Bosch, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2251.
- [26] M. Amin, M. K. Sorour, A. Kasry, *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 4897–4900.
- [27] J. Lan, J. Ge, J. Yu, S. Shan, H. Zhou, S. Fan, Q. Zhang, X. Shi, Q. Wang, L. B. Agra, A. Pazin-Filho, C. H. Miranda, *Thromb. Res.* **2020**, *196*, 359–366.
- [28] J. Thachil, *J. Thromb. Haemostasis* **2020**, *18*, 1020–1022.
- [29] P. Paolisso, L. Bergamaschi, E. C. D'Angelo, F. Donati, M. Giannella, S. Tedeschi, R. Pascale, M. Bartoletti, G. Tesini, M. Biffi, B. Cosmi, C. Pizzi, P. Viale, N. Galié, *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 1124.
- [30] A. C. B. Lemos, D. A. do Espírito Santo, M. C. Salvetti, R. N. Gilio, L. B. Agra, A. Pazin-Filho, C. H. Miranda, *Thromb. Res.* **2020**, *196*, 359–366.
- [31] E. I. Oduah, R. J. Linhardt, S. T. Sharfstein, *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 38.
- [32] P. Pouyan, C. Nie, S. Bhatia, S. Wedepohl, K. Achazi, N. Osterrieder, R. Haag, *Biomacromolecules* **2021**, *22*, 1545–1554.
- [33] M. Wallert, C. Nie, P. Anilkumar, S. Abbina, S. Bhatia, K. Ludwig, J. N. Kizhakkedathu, R. Haag, S. Block, *Small* **2020**, *16*, 2004635.
- [34] R. Wölfel, V. M. Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, M. A. Müller, D. Niemeyer, T. C. Jones, P. Vollmar, C. Rothe, M. Hoelscher, T. Bleicker, S. Brünink, J. Schneider, R. Ehmann, K. Zwirgmaier, C. Drosten, C. Wendtner, *Nature* **2020**, *581*, 465–469.
- [35] S. Bhatia, D. Lauster, M. Bardua, K. Ludwig, S. Angioletti-Uberti, N. Popp, U. Hoffmann, F. Paulus, M. Budt, M. Stadtmüller, T. Wolff, A. Hamann, C. Böttcher, A. Herrmann, R. Haag, *Biomaterials* **2017**, *138*, 22–34.
- [36] I. S. Donskyi, C. Nie, K. Ludwig, J. Trimpert, R. Ahmed, E. Quaas, K. Achazi, J. Radnik, M. Adeli, R. Haag, K. Osterrieder, *Small* **2021**, *17*, 2007091.
- [37] S. T. Jones, V. Cagno, M. Janeček, D. Ortiz, N. Gasilova, J. Piret, M. Gasbarri, D. A. Constant, Y. Han, L. Vuković, P. Král, L. Kaiser, S. Huang, S. Constant, K. Kirkegaard, G. Boivin, F. Stellacci, C. Tapparel, *Adv. Sci.* **2020**, *6*, eaax9318.
- [38] G. Wang, L. Chaihu, M. Tian, X. Shao, R. Dai, R. N. de Jong, D. Ugurlar, P. Gros, A. J. R. Heck, *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 15799–15805.
- [39] J. L. P. Benesch, B. T. Ruotolo, D. A. Simmons, C. V. Robinson, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3544–3567.
- [40] R. D. Rosenberg, *N. Engl. J. Med.* **1975**, *292*, 146–151.
- [41] L. Jin, J. P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R. N. Pike, R. W. Carrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14683.
- [42] H. Türk, R. Haag, S. Alban, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 162–167.
- [43] L. Ma, J. Huang, X. Zhu, B. Zhu, L. Wang, W. Zhao, L. Qiu, B. Song, C. Zhao, F. Yan, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *122*, 784–792.
- [44] J. Dervedde, A. Rausch, M. Weinhart, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zügel, A. von Bonin, R. Haag, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19679.
- [45] Z. Tang, Y. Wang, P. Podsiadlo, N. A. Kotov, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3203–3224.

- [46] Q. Wei, K. Achazi, H. Liebe, A. Schulz, P.-L. M. Noeske, I. Grunwald, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11650–11655; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11834–11840.
- [47] Q. Wei, R. Haag, *Mater. Horiz.* **2015**, *2*, 567–577.

Manuskript erhalten: 23. Februar 2021
Veränderte Fassung erhalten: 29. März 2021
Endgültige Fassung online: 9. Juni 2021
