



(10) **DE 10 2020 209 412 B4** 2024.02.08

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2020 209 412.8**
(22) Anmeldetag: **24.07.2020**
(43) Offenlegungstag: **05.01.2022**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **08.02.2024**

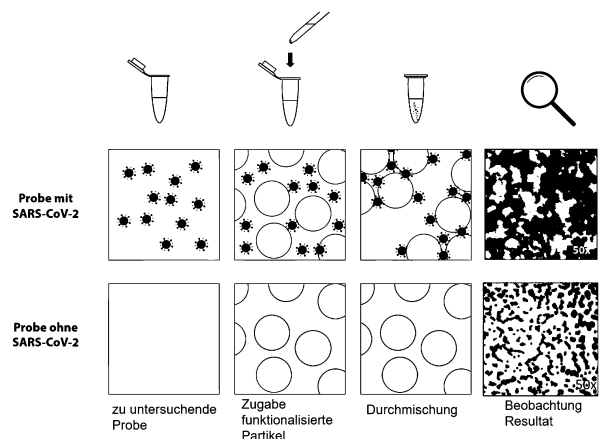
(51) Int Cl.: **G01N 33/569 (2006.01)**
C12Q 1/70 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität: 20183836.4 02.07.2020 EP	(72) Erfinder: Popp, Jürgen, 07751 Jena, DE; Ehricht, Ralf, 07749 Jena, DE; Pahlow, Susanne, 07743 Jena, DE; Silge, Anja, 07743 Jena, DE; Weber, Karina, 07751 Jena, DE; Löffler, Bettina, 07749 Jena, DE; Deinhardt-Emmer, Stefanie, 99423 Weimar, DE
(73) Patentinhaber: Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE; Leibniz-Institut für Photonische Technologien e.V. (Engl. Leibniz Institute of Photonic Technology), 07745 Jena, DE; Universitätsklinikum Jena, 07747 Jena, DE	(56) Ermittelter Stand der Technik: siehe Folgeseiten
(74) Vertreter: Maiwald GmbH, 80335 München, DE	

(54) Bezeichnung: **Mittel und Verfahren zur An- oder Abreicherung und zum Nachweis von Coronaviren**

(57) Hauptanspruch: Element zur Bindung eines Coronavirus, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV, wobei das Element einen festen Träger umfasst, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fängermolekül immobilisiert ist, und wobei das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist.



(56) Ermittelte Stand der Technik:

DE	10 2009 032 502	A1
US	2006 / 0 134 609	A1
US	2006 / 0 188 519	A1
US	2009 / 0 280 507	A1
CN	1 902 230	A
KR	10 1 593 641	B1

CHEN, Yun [u.a.]: Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. In: Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 525, 2020, No. 1, S. 135-140. - ISSN 0006-291X (P); 1090-2104 (E). DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.02.071. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X20303399/pdf?md5=b4cdca79a272d878ca69646a4c66b3-fa&pid=1-s2.0-S0006291X20303399-main.pdf> [abgerufen am 2020-08-24]

GILL, Pooria ; GHAEMI, Amir: Nucleic acid isothermal amplification Technologies - a review. In: Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Vol. 27, 2008, No. 3, S. 224-243. - ISSN 1525-7770 (P); 1532-2335 (E). DOI: 10.1080/15257770701845204. URL: https://www.researchgate.net/profile/Amir_Ghaemi/publication/5592233_Nucleic_acid_isothermal_amplification_technologies_-_A_review/links/09e4150770e5c009fb000000/Nucleic-acid-isothermal-amplification-technologies-A-review.pdf [abgerufen am 2020-08-25]

GREEN, Michael R. ; SAMBROOK, Joseph: Molecular cloning : a laboratory manual. Vol. 1. 4. ed. New York : Cold Spring Harbor, N.Y : CSH Press, 2012. Titelseite + Inhaltsverzeichnis. - ISBN 978-1-936113-42-2. URL: <http://www.cshpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>. [abgerufen am 21.10.2015]

LOTTSPREICH, Friedrich ; ENGELS, Joachim (Hrsg.): Bioanalytics: analytical methods and concepts in biochemistry and molecular biology. Weinheim : Wiley-VCH, 2018. Deckblatt u. Inhaltsverzeichnis. - ISBN 978-3-527-33919-8

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zur An- oder Abreicherung und zum Nachweis von Coronaviren.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Man unterscheidet sechs humanpathogene Coronaviren, die zum Genus Alpha-Coronavirus oder zum Genus Beta-Coronavirus gehören (Subfamilie Coronavirinae, Familie Coronaviridae). Humane Coronaviren verursachen akute respiratorische Erkrankungen, die meist problemlos verlaufen, gelegentlich jedoch zu schweren Pneumonien führen, insbesondere bei bestehender Komorbidität oder bei Infektionen mit spezifischen humanen Beta-Coronaviren.

[0003] Der Name der Viren leitet sich vom typischen elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild der Virusoberfläche ab, die an eine Krone (lat. „corona“) erinnert. Die Fortsätze dieser Krone werden von den viralen Glykoproteinen, sog. Spikes, gebildet, die in die Virushülle eingelagert sind. Coronaviren sind Plusstrang-RNA-Viren mit den größten Genomen (30 kb) unter allen bekannten RNA-Viren. Sie haben einen Durchmesser von etwa 120 nm. Das helikale Kapsid wird von einer Lipidhülle umgeben, in die mindestens 3 Strukturproteine (Spike-Glykoprotein S, Hüllprotein E, Membranprotein M) eingelagert sind.

[0004] Infektionen mit den humanen Coronaviren (HCoV) NL63, 229E, OC43 und HKU1 treten vor allem in den Wintermonaten auf und sind für etwa 5-30 % aller akuten respiratorischen Erkrankungen verantwortlich. Infektionen führen typischerweise zu Rhinitis, Konjunktivitis, Pharyngitis, gelegentlich auch zu einer Otitis media oder Laryngotracheitis.

[0005] Drei Beta-Coronaviren (SARS-Coronavirus, MERS-Coronavirus und SARS-CoV-2) haben in den letzten Jahren besonderes Interesse hervorgerufen, da sie zu akuten Erkrankungen der unteren Atemwege führen können, die mit einer für humane Coronaviren ungewöhnlich hohen Pathogenität und Letalität einhergehen.

[0006] Zu Beginn des Jahres 2003 löste das SARS-Coronavirus (SARS-CoV-1) eine weltweite Epidemie aus, die ihren Ausgang in Südchina nahm, sich innerhalb weniger Wochen weltweit ausbreitete, vor allem in China, Südostasien und Kanada, und in ihrem weiteren Verlauf zu etwa 8000 Infektionen führte, an denen mehr als 800 Menschen verstarben.

[0007] MERS-CoV wurde erstmals im Jahre 2012 bei einem Patienten in Saudi-Arabien nachgewiesen, der infolge einer schweren respiratorischen Erkrankung verstorben war. In den folgenden beiden Jahren wurden mehrere Hundert weitere Infektionen mit diesem Erreger nachgewiesen.

[0008] Das Virus SARS-CoV-2 wurde im Jahr 2019 erstmals entdeckt und löste weltweit die COVID-19-Pandemie aus. Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurde diese am 30. Januar 2020 als „gesundheitliche Notlage von internationaler Tragweite“ und am 11. März 2020 als Pandemie eingestuft. Das Virus SARS-CoV-2 wird in der Regel durch Tröpfchen übertragen. Unter bestimmten Umständen ist aber auch eine Übertragung über Aerosole möglich. Eine Übertragung durch Schmierinfektion ist nicht auszuschließen. Die Ausbreitung erfolgt insbesondere durch sogenanntes Superspreading.

[0009] Infektionen mit diesen Viren können zu einem schweren akuten respiratorischen Syndrom („acute respiratory distress syndrome“, ARDS) führen, welches im Falle des SARS-CoV die Namensgebung bestimmte („severe acute respiratory syndrome“, SARS). MERS-CoV führt zu einem ähnlichen Krankheitsbild. In diesem Fall verweist der Virusname auch auf die geografische Häufung dieser respiratorischen Erkrankung im Nahen und Mittleren Osten, insbesondere Saudi-Arabien, Katar und Jordanien („middle east respiratory syndrome“, MERS).

[0010] Die Diagnose einer akuten Infektion erfolgt üblicherweise mittels RT-PCR, z. B. aus Nasen-Rachen-Abstrichen, bronchoalveolärer Lavage (BAL) oder Stuhl. PCR-basierte Multiplex-Testverfahren zum Nachweis humaner Coronaviren und anderer respiratorischer Viren finden zunehmend Anwendung. SARS-CoV und MERS-CoV lassen sich in Zellkultur vermehren. Ebenso lassen sich Antikörper gegen Coronaviren in verschiedenen Verfahren nachweisen.

[0011] Es besteht weiterhin ein Bedarf an schnellen, kostengünstigen und zuverlässigen Verfahren zum Nachweis von Coronaviren, die u.a. die Planung von präventiven Maßnahmen erleichtern.

[0012] In CN 1 902 230 A werden monoklonale anti-SARS-Virus-Antikörper oder antigenbindende Fragmente davon, die gegen das Kernprotein eines Coronavirus gerichtet sind, beschrieben.

[0013] In KR 10 1 593 641 B1 werden monoklonale Antikörper oder antigenbindende Fragmente davon beschrieben, die spezifisch an bestimmte Epitope des Coronavirus des Respirationssyndroms des Mittleren Ostens (MERS-CoV) binden.

[0014] US 2006 / 0 188 519 A1 offenbart immunoreaktive Peptide aus dem SARS-CoV-Virus und Antikörper, die gegen diese Peptide gerichtet sind.

[0015] US 2009 / 0 280 507 A1 betrifft monoklonale Antikörper, die gegen das Nukleokapsidprotein des SARS-Virus (SARS-NP) gerichtet sind.

[0016] US 2006 / 0 134 609 A1 beschreibt Zusammensetzungen und Verfahren zur Verwendung bei der Bestimmung des Vorhandenseins von einer Nukleinsäure, die von einem neuen Coronavirus stammt, welches mit dem schweren akuten respiratorischen Syndrom (SARS) assoziiert ist, als Hinweis auf das Vorhandensein eines SARS-Coronavirus (SARS-CoV) in einer Testprobe.

[0017] DE 10 2009 032 502 A1 betrifft die Bereitstellung von einem auf Antikörpern basierendem Nachweisverfahren für die Detektion von Pathogenen und/oder Toxinen.

Zusammenfassung

[0018] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Element bzw. Mittel bzw. eine Vorrichtung zur Bindung eines Coronavirus bereitgestellt, wobei das Element einen festen Träger umfasst, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fängermolekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist. Der Coronavirus, der durch das Element bzw. das Mittel bzw. die Vorrichtung gebunden wird, ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV.

[0019] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Abtrennen von Coronaviren aus einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fängermolekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird; und
- b) Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe.

[0020] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fängermolekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird; und
- b) Detektieren der an das Element gebundenen Coronaviren.

[0021] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fänger-molekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird;
- b) Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe;
- c) Lösen der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element; und
- d) Detektieren von Nukleinsäuren der Coronaviren.

[0022] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für ein Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fänger-molekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, zur An- oder Abreicherung von Coronaviren in einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV.

[0023] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für ein Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fänger-molekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, zum Nachweis von Coronaviren in einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV.

Zeichnungen

Fig. 1 ist eine schematische Darstellung einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Eine SARS-CoV-2-enthaltende Zellkultur-Probe wird mit magnetischen Beads in Kontakt gebracht, die mit Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) funktionalisiert sind. Bei Anwesenheit von SARS-CoV-2 bilden die Partikel große Cluster, die entweder mit bloßem Auge oder durch einen einfachen optischen Nachweis detektiert werden können.

Fig. 2a ist eine Darstellung einer Versuchsreihe mit Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung und Negativkontrollen. Die Probe B1 beschreibt eine Zellkultur-Probe, in der SARS-CoV-2 und mit ACE2 funktionalisierte magnetische Partikel (MNP ACE2) enthalten sind. Die Probe B2 ist eine Negativkontrolle enthaltend mit ACE2 funktionalisierte magnetische Partikel (MNP ACE2), aber kein SARS-CoV-2. Die Probe B3 ist eine weitere Negativkontrolle enthaltend SARS-CoV-2 und nicht mit ACE2 funktionalisierte magnetische Partikel (MNP unmodifiziert). Die Probe B4 ist eine dritte Negativkontrolle, enthaltend nicht mit ACE2 funktionalisierte magnetische Partikel (MNP unmodifiziert) und kein SARS-CoV-2.

In **Fig. 2b** sind die Mikroskopaufnahmen der in **Fig. 2a** dargestellten Versuchsreihe gezeigt. Die Proben B1 und B2 können eindeutig unterschieden werden. Bei Anwesenheit des Virus (Probe B1) agglomerieren die Partikel deutlich, während die entsprechende Negativkontrolle (Probe B2) nur vereinzelte Beads zeigt. Die Proben B3 und B4 dienen als weitere Kontrollen und belegen, dass die beobachteten Unterschiede zwischen B1 und B2 auf eine spezifische Interaktion zwischen dem Virus und den mit ACE2 funktionalisierten Partikeln zurückzuführen sind.

In **Fig. 2c** sind die Raman-Spektren der in **Fig. 2a** dargestellten Versuchsreihe gezeigt. Anhand ihrer Raman-Spektren lassen sich Probe B1 und B2 ebenfalls unterscheiden, während die Kontrollen B3 und B4 nahezu identische Spektren liefern.

Fig. 3 zeigt die beteiligten Aminosäuren der Rezeptorbindungsdomäne (RBD) von SARS-CoV-2. Die Interaktion des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 mit dem ACE2-Rezeptor umfasst 17 Reste des Spike-Glykoproteins und 20 Reste des ACE2-Rezeptors. Für SARS-CoV tragen 16 Reste des Spike-Glykoproteins zu der Wechselwirkung mit 20 Resten des ACE2-Rezeptors bei. 17 der ACE2-Reste, die mit den jeweiligen RBDs des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 bzw. SARS-CoV wechselwirken, sind identisch. An der Interaktion beteiligte Aminosäuren finden sich in den Aminosäurebereichen 387 - 516 des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 und 374 - 502 des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV.

Fig. 4 zeigt ein Aminosäuresequenz-Alignment von ACE2-Molekülen aus sieben Tieren (siehe Chen et al, Biochemical and Biophysical Research Communications 525 (2020) 135-140). Es wird nur der Teil gezeigt, der Aminosäurereste (rot markiert) im menschlichen ACE2 enthält, die direkt mit der RBD von SARS-CoV interagieren. Entsprechende Aminosäuren für andere Tiere sind ebenfalls rot hervorgeho-

ben, wenn sie vom menschlichen ACE2 geteilt werden. Wichtige Sekundärstrukturen sind unterstrichen (Strichlinien für α -Helix und Doppellinien für β -Faltblatt). Die GenBank-Zugangsnummern sind AAX63775.1 für Zivetskatz (Civet, *Paguma larvata*), ADN93475.1 für Fledermaus (Bat, *Rhinolophus sinicus*), KFQ92425.1 für Vogel (Bird, *Nipponia nippon*), XP_029140508.1 für Schlange (Snake, *Protobothrops mucrosquamatus*), XP_018104311.1 für Frosch (Frog, *Xenopus laevis*) und XP_007889845.1 für Fisch (Fish, *Callorhinchus milii*).

Detaillierte Beschreibung

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren für einen Coronavirus-Nachweis, der unkompliziert und vor Ort durchführbar ist und kein spezielles Labor voraussetzt. Die erfindungsgemäßen Verfahren sind schnell, spezifisch und sensitiv. Die Verfahren umfassen unter anderem, aber nicht ausschließlich, eine spezifische Anreicherung von Coronaviren durch magnetische oder nicht-magnetische Partikel oder auf festen Phasen bzw. Oberflächen, welche mit Coronavirus-spezifischen Fängermolekülen funktionalisiert sind, nämlich dem ACE2 (Angiotensin Converting Enzyme 2)-Rezeptor sowie Teilen bzw. Fragmenten davon.

[0025] Die in der Beschreibung oder den Ansprüchen verwendeten Begriffe „umfasst“ oder „umfassend“ schließen nicht weitere Elemente, Merkmale oder Schritte aus. Im Kontext der vorliegenden Offenbarung ist ferner der Begriff „bestehend aus“ eine optionale Ausführungsform des Begriffs „umfassend“. Falls im Kontext der vorliegenden Offenbarung eine Gruppe definiert wird, die mindestens eine gewisse Anzahl an Ausführungsformen enthält, wird darunter auch eine Gruppe verstanden, die nur aus diesen Ausführungsformen besteht.

[0026] Wenn im Kontext der vorliegenden Erfindung ein unbestimmter oder bestimmter Artikel verwendet wird, um den Singular eines Gegenstands oder Verfahrens zu bezeichnen, z.B. „ein“, „eine“, „der“, „die“, oder „das“, schließt dies auch den Plural des Gegenstands oder Verfahrens ein. Beispielsweise wird, wenn ein für das Coronavirus spezifisches Fängermolekül genannt wird, auch eine Mehrzahl von für das Coronavirus spezifischen Fängermolekülen offenbart. Umgekehrt bezieht sich die Pluralform eines Gegenstands oder Verfahrens auch auf deren Singularform.

[0027] Ferner werden die Begriffe a), b), c) oder dergleichen im Kontext der vorliegenden Offenbarung dazu verwendet, um zwischen verschiedenen Merkmalen oder Verfahrensschritten zu unterscheiden, aber nicht notwendigerweise, um eine sequentielle oder chronologische Reihenfolge zu beschreiben. Die derart verwendeten Begriffe sind als unter geeigneten Umständen austauschbar zu verstehen und die hier offenbarten Ausführungsformen können auch in anderer Reihenfolge als hier beschrieben oder illustriert durchgeführt werden.

[0028] Ein „Subjekt“ oder „Proband“ oder „Patient“ kann ein menschlicher oder nicht menschlicher (z.B. tierischer) Organismus sein. Daher können die hier beschriebenen Verfahren sowohl bei Coronainfektionen beim Menschen als auch beim Tier anwendbar sein. Während ein Subjekt in der Regel ein lebender Organismus ist, können die hier beschriebenen Verfahren auch bei Post-mortem-Analysen angewendet werden. Typische Versuchspersonen sind Patienten, z.B. lebende Menschen oder Tiere, die wegen einer Krankheit oder wegen Symptomen medizinisch versorgt oder behandelt werden. Die Probanden umfassen auch Personen ohne definierte Krankheit, die auf Anzeichen einer Pathologie untersucht werden, sowie gesunde Probanden, die einem Screening wie oben beschrieben unterzogen werden.

[0029] Der Begriff „Probe“ umfasst jede Art von Probe, wie z.B. Körperproben, die mit den hier beschriebenen Verfahren analysiert werden können. Der Begriff „Körperprobe“ ist entsprechend seiner Bedeutung auf dem Gebiet der Medizin zu verstehen und bezeichnet jede mögliche Flüssigkeit, die von einem Subjekt, z.B. einem Menschen oder einem Tier, gewonnen werden kann. Die Begriffe „Entnahme“ oder „entnehmen“ sind entsprechend ihrer allgemeinen Bedeutung auf dem Gebiet der Medizin und medizinischen Diagnostik zu verstehen und bezeichnen die Entnahme einer Probe von einem Subjekt, wie z.B. die Entnahme einer Blutprobe von einem Subjekt oder einer Urin- oder Sputumprobe oder jede andere Art von z.B. Körperflüssigkeitsprobe eines Subjekts in Abhängigkeit von der zu entnehmenden Körperflüssigkeit.

[0030] Zu den typischen Körperproben gehören Körperflüssigkeiten. Körperflüssigkeiten sind beispielsweise Blut, Urin, Tränenflüssigkeit, Speichel, Nasenflüssigkeit, Sputum, Ohrenflüssigkeit, Genitalflüssigkeit, Brustflüssigkeit, Milch, Kolostrum, Plazentaflüssigkeit, Fruchtwasser, Schweißwasser, Synovialflüssigkeit, Aszitesflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis, Galle, Magenflüssigkeit, Kammerwasser, Glaskörperflüssigkeit, Magen-

Darm-Flüssigkeit, Exsudat, Transudat, Eiter, Pleuraflüssigkeit, bronchoalveoläre Lavage, Bronchialsekrete, Perikardflüssigkeit, Sperma, Flüssigkeit der oberen Atemwege, Peritonealflüssigkeit, flüssiger Stuhl, Flüssigkeit, die von einer Infektions- oder Immunreaktionsstelle entnommen wurde, oder gepoolte Flüssigkeiten, die von mehreren Entnahmestellen entnommen wurden. Bei einer Blutprobe kann es sich um eine Vollblutprobe, eine Plasma- oder Serumprobe oder um eine Blutprobe handeln, die nicht gerinnungsfähig ist oder mit einer die Gerinnung verhindernden Substanz versetzt wurde. Darüber hinaus wird ein Fachmann erkennen, dass eine Probe nach einem Fraktionierungs- oder Reinigungsverfahren, z.B. der Trennung von Vollblut in Serum- oder Plasmabestandteile, ggf. leichter analysiert werden kann. In anderen Ausführungsformen kann die Probe einer Körperflüssigkeit eine Sputumprobe sein.

[0031] Andere Körperproben können auch Abstriche von Wunden, von intakter Haut und Schleimhäuten einschließlich oropharyngealer, nasaler, rektaler und genitaler/vaginaler Abstriche umfassen. Darüber hinaus können Körperproben auch Stuhlproben, Kotproben, Gewebe aus Biopsien, Tupfer oder Materialien von synthetischen Implantaten wie Kathetern, Herzschrittmachern, Endoprothesen, chirurgischen Schrauben usw. sowie Gewebe aus Nekropsien, Organabstrichen und Proben aus Post-Mortem-Analysen umfassen.

[0032] Auch wenn dies für die hier beschriebenen Verfahren nicht als notwendig erachtet wird, können Körperproben auch zunächst in einem geeigneten Medium kultiviert werden. Solche Kulturen, Zellextrakte solcher Kulturen oder Kulturüberstände können ebenfalls als Proben verwendet werden. Wie erwähnt, können Körperproben jedoch auch ohne vorherige Kultivierung verwendet werden, z.B. entweder direkt oder nach Verdünnung oder bestimmten vorbereitenden Schritten wie Reinigung oder dergleichen.

[0033] In einer Ausführungsform werden die hier beschriebenen Nachweisverfahren nicht am menschlichen oder tierischen Körper durchgeführt. In diesen Ausführungsformen umfasst der Begriff „Bereitstellung einer Probe“ somit nicht den Schritt der aktiven Entnahme einer Probe aus dem menschlichen oder tierischen Körper. Vielmehr sind solche Proben zuvor, z.B. von einem Arzt oder einer Ärztin, entnommen worden und werden dann zur Durchführung der hier beschriebenen Verfahren zur Verfügung gestellt.

[0034] Die hier verwendete Leerwertbegrenzung (engl. limit of blank - LoB) ist die höchste scheinbare Analytkonzentration, die erwartet wird, wenn Replikate einer Leerwertprobe, die keinen Analyten enthält, getestet werden. Zum Beispiel ist die LoB der höchste Messwert, den eine Probe ohne Analyt wahrscheinlich liefern wird (mit angegebener Wahrscheinlichkeit alpha, typischerweise ist alpha = 0,05).

[0035] Die hier verwendete Nachweisgrenze (engl. limit of detection - LoD) ist die niedrigste Analytkonzentration, die wahrscheinlich zuverlässig von der LoB unterschieden werden kann und bei der ein Nachweis möglich ist. Die LoD wird bestimmt, indem sowohl die gemessene LoB als auch Testwiederholungen einer Probe verwendet werden, von der bekannt ist, dass sie eine niedrige Analytkonzentration enthält. Zum Beispiel ist die LoD die niedrigste Menge an Analyt in einer Probe, bei der die fälschlicherweise behauptete Abwesenheit des Analyten gleich Beta ist, wenn man eine Wahrscheinlichkeit alpha für die fälschlich behauptete Anwesenheit des Analyten annimmt (typischerweise ist beta = 0,05).

[0036] Die hier verwendete Bestimmungsgrenze (engl. limit of quantification - LoQ) ist die Konzentration, die zu einem Variationskoeffizienten (CV) von 20 % führt und ist somit ein Maß für die Präzision eines Assays bei niedrigen Analytenkonzentrationen. Die LoQ kann der LoD entsprechen.

[0037] Der Begriff „Spezifität“, wenn er im Zusammenhang mit der Auswertung der Ergebnisse der hier beschriebenen Verfahren verwendet wird, bezieht sich auf den Anteil der gesunden Probanden, von denen bekannt ist, dass sie keine Coronavirus-Infektion haben und die negativ auf eine solche Infektion testen werden. Mathematisch kann dies auch so beschrieben werden:

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{(Anzahl wahr negativer Ergebnisse)}}{\text{(Anzahl wahr negativer Ergebnisse)} + \text{(Anzahl falsch positiver Ergebnisse)}}$$

[0038] Ein Test mit 100% Spezifität zeigt bei allen gesunden Probanden ein negatives Ergebnis und schließt dort eine Infektion richtigerweise aus.

[0039] Der Begriff „Sensitivität“ im Zusammenhang mit der Auswertung der Ergebnisse der hier beschriebenen Verfahren bezieht sich auf den Anteil der Personen, von denen bekannt ist, dass sie eine Coronavirus-Infektion haben und die positiv darauf getestet werden. Mathematisch lässt sich dies wie folgt ausdrücken:

Sensitivität = $(\text{Anzahl wahr positiver Ergebnisse}) / ((\text{Anzahl wahr positiver Ergebnisse}) + (\text{Anzahl falsch negativer Ergebnisse}))$

[0040] Ein Test mit 100% Sensitivität erkennt somit alle Personen mit einer Coronavirus-Infektion als positiv.

[0041] Die hier beschriebenen Verfahren zum Nachweis von Coronaviren in einer Probe erlauben eine Spezifität von mindestens etwa 70%, mindestens etwa 75%, mindestens etwa 80%, mindestens etwa 85%, mindestens etwa 90%, mindestens etwa 95%, mindestens etwa 96%, mindestens etwa 97%, mindestens etwa 98% oder mindestens etwa 99%. Die hier beschriebenen Methoden erlauben darüber hinaus eine Sensitivität von mindestens etwa 70%, mindestens etwa 75%, mindestens etwa 80%, mindestens etwa 85%, mindestens etwa 90%, mindestens etwa 95%, mindestens etwa 96%, mindestens etwa 97%, mindestens etwa 98% oder mindestens etwa 99%. Die vorstehend genannten Werte für Spezifität und Sensitivität können in allen Variationen kombiniert werden.

[0042] Die im folgenden beschriebenen Nachweisverfahren können „schnell“ sein, was sich, wie im Kontext dieser Offenbarung verwendet, auf Nachweisverfahren bezieht, die es ermöglichen, ein Ergebnis oder einen Bericht innerhalb von etwa weniger als etwa 6 Stunden, weniger als etwa 4 Stunden, weniger als etwa 3 Stunden, weniger als etwa 2 Stunden, weniger als etwa 1 Stunde, weniger als etwa 50 Minuten, weniger als etwa 40 Minuten zu erhalten, weniger als etwa 30 min, weniger als etwa 20 min, weniger als etwa 10 min, weniger als etwa 9 min, weniger als etwa 8 min, weniger als etwa 7 min, weniger als etwa 6 min, weniger als etwa 5 min, weniger als etwa 4 min, weniger als etwa 3 min, weniger als etwa 2 min oder weniger als etwa 1 min zu erhalten.

[0043] Im Folgenden werden weitere Begriffe im Kontext ihrer Verwendung definiert.

[0044] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Element bzw. ein Mittel bzw. eine Vorrichtung zur Bindung eines Coronavirus bereitgestellt, wobei das Element einen festen Träger umfasst, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fängermolekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist. Der Coronavirus, der durch das Element bzw. das Mittel bzw. die Vorrichtung gebunden wird, ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV.

[0045] Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (engl. Angiotensin Converting Enzyme 2, kurz ACE2) ist eine Metalloprotease und ein Typ-1-Transmembranprotein mit Homologie zum Angiotensin-konvertierenden Enzym (ACE), das hauptsächlich in Eukaryoten, aber auch in Bakterien vorkommt. ACE2 spielt eine wichtige Rolle im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das den Volumenhaushalt des menschlichen Körpers steuert und den Blutdruck reguliert. Ferner ist ACE2 ein Rezeptor für verschiedene Coronaviren, einschließlich SARS-CoV, SARS-CoV-2 und MERS-CoV, um in Zellen zu gelangen. Die Begriffe „ACE2“ und „ACE2-Rezeptor“ werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung synonym verwendet.

[0046] ACE2 oder das für das Coronavirus spezifische Fragment von ACE2 können ausgewählt sein aus ACE2 oder für das Coronavirus spezifischen Fragmenten davon aus eukaryotischen oder bakteriellen Organismen, beispielsweise aus Säugetieren, Fischen, Reptilien und Vögeln.

[0047] Gemäß einer Ausführungsform ist ACE2 oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon humanes ACE2 (NCBI-Referenzsequenz: NP_068576.1), ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von humanem ACE2, ACE2 aus der Maus (NCBI-Referenzsequenz: NP_001123985.1) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von ACE2 aus der Maus.

[0048] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist ACE2 oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon ACE2 aus der Ziveterkatze (*Paguma larvata*, GenBank-Zugangsnummer AAX63775.1) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon, ACE2 aus der Fledermaus (*Rhinolophus sinicus*, GenBank-Zugangsnummer ADN93475.1) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon, ACE2 aus einem Vogel (*Nipponia nippon*, GenBank-Zugangsnummer KFQ92425.1) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon, ACE2 aus einer Schlange (*Protobothrops mucrosquamatus*, GenBank-Zugangsnummer XP_029140508.1) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon, ACE2 aus einem Frosch (*Xenopus laevis*, GenBank-Zugangsnummer XP_018104311.1) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon oder ACE2 aus einem Fisch (*Callorhin-*

chus milii, GenBank-Zugangsnummer XP_007889845.1) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon.

[0049] Rekombinantes ACE2 oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon, zum Beispiel rekombinantes humanes ACE2 oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment davon, ist ebenfalls als Fänger-molekül geeignet.

[0050] Für die Auswahl geeigneter Fragmente von ACE2 können ferner folgende Erwägungen herangezogen werden.

[0051] Coronaviren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV nutzen ihr jeweiliges Spike-Glykoprotein, um an spezifische Rezeptoren der Wirtszellen zu binden. Das Spike-Glykoprotein hat ein nelkenartiges Erscheinungsbild mit einer Krone aus drei Köpfen (S1) und einem trimeren Stiel (S2). Für das Eindringen in die Wirtszelle ist im Wesentlichen die Ektodomäne des Spike-Proteins relevant, wobei diese aus der rezeptorbindenden Einheit S1 und der Membranfusionseinheit S2 besteht. Die S1-Einheit bindet zum Beispiel über ihre rezeptorbindende Domäne (RBD) an den ACE2-Rezeptor, während die S2-Einheit die Wirtszelle mit der Virusmembran verschmilzt, wodurch das Eindringen von viralen Genomen in die Wirtszelle ermöglicht wird. Das S-Protein von SARS-CoV-2 hat insgesamt 22 N-Glycosylierungsstellen, während für SARS-CoV 23 entsprechende Positionen vorhanden sind. Es ist davon auszugehen, dass die Glykosylierung keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität zu ACE2 hat.

[0052] Die RBD von SARS-CoV-2 hat ein verdrilltes fünfsträngiges antiparalleles beta-Faltblatt mit kurzen Verbindungshelices und Schleifen. Zwischen zwei der Stränge im Kern befindet sich ein erweiterter Einschub, der die kurzen Stränge, alpha-Helices und Schleifen enthält. Diese erweiterte Insertion ist das rezeptorbindende Motiv (RBM), welches den Großteil der Bindungsstellen zwischen Virus und Rezeptor enthält. Die N-terminale Peptidasedomäne von ACE2 hat zwei Lappen, welche die Peptid-Substrat-Bindungsstelle ausbilden. Das RBM in der RBD von SARS-CoV-2 berührt die Unterseite des kleinen Lappens von ACE2 mit einer konkaven äußeren Struktur, die die N-terminale Helix des ACE2 aufnimmt.

[0053] Insgesamt ähneln sich die Strukturen der RBD von SARS-CoV-2 und SARS-CoV stark, wobei SARS-CoV-2 eine größere Affinität zum ACE2-Rezeptor hat. Die Dissoziationskonstanten für den Komplex mit dem ACE2-Rezeptor können in folgenden Bereichen liegen: 1,2 - 15 nM für SARS-CoV-2 und für SARS-CoV 5,0 - 31 nM.

[0054] Gemäß einer weiteren Ausführungsform weist Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) im Komplex mit dem Coronavirus eine Dissoziationskonstante von 35 nM oder weniger, von 25 nM oder weniger, von 15 nM oder weniger, von 10 nM oder weniger, von 5 nM oder weniger oder von 2 nM oder weniger auf. Beispielsweise weist ACE2 oder ein spezifisch an SARS-CoV bindenden Fragment von ACE2 im Komplex mit SARS-CoV eine Dissoziationskonstante von 35 nM oder weniger, von 25 nM oder weniger, von 15 nM oder weniger, von 10 nM oder weniger oder von 5 nM oder weniger auf. Ferner weist beispielsweise ACE2 oder ein spezifisch an SARS-CoV-2 bindenden Fragment von ACE2 im Komplex mit SARS-CoV-2 eine Dissoziationskonstante von 15 nM oder weniger, von 10 nM, von 5 nM oder weniger oder von 2 nM oder weniger auf.

[0055] Die Interaktion des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 mit dem ACE2-Rezeptor umfasst 17 Reste des Spike-Glykoproteins und 20 Reste des ACE2-Rezeptors. Für SARS-CoV tragen 16 Reste des Spike-Glykoproteins zu der Wechselwirkung mit 20 Resten des ACE2-Rezeptors bei. 17 der ACE2-Reste, die mit den jeweiligen RBDs des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 bzw. SARS-CoV wechselwirken, sind identisch. Eine Gegenüberstellung der beteiligten Aminosäuren der RBDs von SARS-CoV-2 und SARS-CoV ist in **Fig. 3** dargestellt. Die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren liegen in den Bereichen 387 - 516 des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 und 374 - 502 des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV. An acht Positionen befinden sich für beide Virusstämme identische Aminosäuren, die mit ACE2 wechselwirken. Darunter sind drei Tyrosinreste, die Wasserstoffbrückenbindungen mit der polaren Hydroxylgruppe von ACE2 ausbilden. An fünf weiteren Positionen sind Aminosäuren mit ähnlichen biochemischen Eigenschaften lokalisiert. Insgesamt gibt es für beide Virenstämme zahlreiche hydrophile Wechselwirkungen mit dem ACE2-Rezeptor, darunter je 13 Wasserstoffbrücken und 2 (SARS-CoV-2) bzw. 3 Salzbrücken (SARS-CoV). Außerhalb des RBM des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 befindet sich an Position 417 ein Lysin-Rest, welcher eine Salzbrücke zu einem Asparagin-Rest von ACE2 ausbildet. Dieser Rest scheint auch partiell für ein lokales positives Oberflächenpotential in dieser Region vorhanden zu sein, welches sich positiv auf die Bindung zwi-

schen Protein und Rezeptor auswirkt. Des Weiteren besitzt das Spike-Glykoprotein von SARS-CoV-2 an der Position 486 einen Phenylalaninrest, welcher mit einer hydrophoben Vertiefung von ACE2 wechselwirkt.

[0056] Die Struktur von ACE2 ist hoch konserviert. Ein Sequenzvergleich von humanem ACE2 mit ACE2 einer Zibetkatze (*Paguma larvata*, AAX63775.1), einer Fledermaus (*Rhinolophus sinicus*, ADN93475.1), eines Vogels (*Nipponia nippon*, KFQ92425.1), einer Schlange (*Protobothrops mucrosquamatus*, XP_029140508.1), eines Frosch (*Xenopus laevis*, XP_018104311.1) und eines Fisches (*Callorhinchus milii*, XP_007889845.1) zeigte eine Aminosäuresequenzidentität von 83%, 81%, 83%, 61%, 60% bzw. 59%.

[0057] Fig. 4 zeigt ein Sequenzalignment von ACE2-Sequenzen, die Interaktionsstellen in Kontakt mit der RBD von SARS-CoV enthalten (siehe Chen et al, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 525 (2020) 135-140). Die Interaktion involviert hauptsächlich zwei α -Helices von ACE2. Von 20 Aminosäureresten, die an der direkten Interaktion beteiligt sind, werden vier von ihnen von allen sieben in Fig. 4 gezeigten Tierarten geteilt, darunter F28, das wohl mit F486 des Spike-Glykoproteins von SARS-CoV-2 interagiert. Viele der verbleibenden Reste, die in die Bindung involviert sind, sind konserviert oder durch Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften ersetzt. ACE2 aus jedem der in Figur dargestellten Organismen und spezifisch an das Coronavirus bindende Fragmente davon können mit der RBD von SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV mit hoher Affinität binden und sind deshalb als das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

[0058] Gemäß einer Ausführungsform umfasst ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die N-terminale Peptidasedomäne von ACE2 bzw. besteht aus dieser.

[0059] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von humanem ACE2 umfassen bzw. besteht aus den Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von humanem ACE2.

[0060] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus der Zibetkatze (*Paguma larvata*, GenBank-Zugangsnummer AAX63775.1) umfassen bzw. besteht aus den Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus der Zibetkatze (*Paguma larvata*, GenBank-Zugangsnummer AAX63775.1).

[0061] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus der Fledermaus (*Rhinolophus sinicus*, GenBank-Zugangsnummer ADN93475.1) umfassen bzw. besteht aus den Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus der Fledermaus (*Rhinolophus sinicus*, GenBank-Zugangsnummer ADN93475.1).

[0062] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einem Vogel (*Nipponia nippon*, GenBank-Zugangsnummer KFQ92425.1) umfassen bzw. besteht aus den Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einem Vogel (*Nipponia nippon*, GenBank-Zugangsnummer KFQ92425.1).

[0063] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einer Schlange (*Protobothrops mucrosquamatus*, GenBank-Zugangsnummer XP_029140508.1) umfassen bzw. besteht aus den Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einer Schlange (*Protobothrops mucrosquamatus*, GenBank-Zugangsnummer XP_029140508.1).

[0064] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einem Frosch (*Xenopus laevis*, GenBank-Zugangsnummer XP_018104311.1) umfassen bzw. besteht aus den Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einem Frosch (*Xenopus laevis*, GenBank-Zugangsnummer XP_018104311.1).

[0065] Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann das das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einem Fisch

(Callorhinchus milii, GenBank-Zugangsnummer XP_007889845.1) umfassen bzw. besteht aus den Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 von ACE2 aus einem Fisch (Callorhinchus milii, GenBank-Zugangsnummer XP_007889845.1).

[0066] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der feste Träger ein synthetisches Partikel ist. Beispiele für synthetische Partikel sind magnetische Partikel, Siliciumdioxidpartikel oder Polymerpartikel. Derartige synthetische Partikel haben üblicherweise einen Durchmesser von 0,1 µm bis 10 µm, 1 µm bis 5 µm oder 2 µm bis 4 µm.

[0067] Magnetische Partikel, im Folgenden auch als Magnetpartikel oder Magnetic Beads bezeichnet, können entweder definiert aus Kern und Hülle bestehen oder die Magnetpartikel sind gleichförmig in dem Matrix- bzw. Trägermaterial verteilt.

[0068] Beispiele für das magnetische Material in Magnetpartikeln umfassen Kobalt hcp (hexagonal closest packing), Kobalt fcc (face-centered cubic), Eisen, Nickel, SmCo₅, Fe₃O₄ und γ-Fe₂O₃.

[0069] Bei Magnetpartikeln ohne Hülle kann der metallische Kern oxidiert bzw. passiviert sein.

[0070] Beispiele für die Hülle von Magnetpartikeln sind Silica (SiO₂)-Umhüllungen, Kohlenstoffbasierte Umhüllungen (z.B. Graphit, Graphen, activated carbon), Metalloxid-Umhüllungen wie Umhüllungen aus MnO₂ oder TiO₂ und Umhüllungen aus Polymeren wie z.B. PMMA-DVB (Polymethylmethacrylat-Divinylbenzen), Calcium-Alginat, Agarose bzw. Sepharose, PEI (Polyethylenimin), PVA (Polyvinylalkohol), PS (Polystyrol), Latex, Chitosan, Zellulose und Ammoniumzellulose.

[0071] Beispiele für Siliciumdioxidpartikel sind Partikel aus Silica (SiO₂) porös (zum Beispiel Blähglaspartikel) oder nicht porös, optional auch mit einer zusätzlichen Polymerumhüllung mit wie vorstehend genannten Polymeren.

[0072] Beispiele für Polymerpartikel sind Partikel aus PMMA-DVB (Polymethylmethacrylat-Divinylbenzen), Calcium-Alginat, Agarose bzw. Sepharose, PEI (Polyethylenimin), PVA (Polyvinylalkohol), PS (Polystyrol), Latex, Chitosan, Zellulose und Ammoniumzellulose.

[0073] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der feste Träger ein Microarray, wobei auf mindestens einem Spot des Microarrays das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül immobilisiert ist.

[0074] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der feste Träger eine Mikrotiterplatte, wobei in mindestens einem Well der Mikrotiterplatte das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül immobilisiert ist.

[0075] Gemäß einer weiteren Ausführungsform ist der feste Träger ein Filter, eine Küvette, eine Membran oder ein Gel.

[0076] Das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül kann auf dem festen Träger durch herkömmliche, dem Fachmann bekannte Methoden immobilisiert werden. In einer Ausführungsform ist das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül durch eine kovalente Bindung auf dem festen Träger immobilisiert.

[0077] Falls das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül ACE2 oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von ACE2 ist, erfolgt die kovalente Bindung des Fängermoleküls über dessen funktionelle Gruppen wie Aminogruppen, insbesondere primäre Aminogruppen, Thiolgruppen, Carboxygruppen und Hydroxidgruppen.

[0078] Der feste Träger ist für eine kovalente Bindung des für das Coronavirus spezifischen Fängermoleküls beispielsweise durch Carboxygruppen, Isothiocyanatgruppen, Aldehydgruppen, Bernsteinsäure-Anhydridgruppen, Carbonatgruppen, Iodoacetyl, Maleinimid, Pyridylsulfid, Amingruppen, Epoxidgruppen, Oxirangruppen funktionalisiert bzw. modifiziert.

[0079] Beispielhafte kovalente Bindungen zwischen ACE2 oder einem spezifisch an das Coronavirus bindenden Fragment von ACE2 und dem festen Träger und die jeweiligen funktionellen Gruppen von ACE2 oder einem spezifisch an das Coronavirus bindenden Fragment von ACE2 und des festen Trägers, die an dieser kovalenten Bindung beteiligt sind, sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

funktionelle Gruppe ACE2 oder ein an das Coronavirus bindendes Fragment davon	funktionelle Gruppe fester Träger (z.B. Partikel)	kovalente Bindung bzw. Reaktion zum
Amin (vor allem primäres Amin)	1. Carboxy (Aktivierung mittels Carbodiimid und ggf. Zwischenstufe mit N-Hydroxy-Succinimylester (NHS) nötig) 2. Isothiocyanat 3. Aldehyd 4. BernsteinsäureAnhydrid 5. Carbonat	1. Amid 2. Isothioharnstoff-Derivat 3. Imin, dann weiter zum sek. Amin reduzieren 4. Amid 5. Carbamat
Thiol	1. Iodoacetyl 2. Maleinimid 3. Pyridyldisulfid	1. Thioether 2. Thioether 3. Disulfid
Carboxy	1. Amin	1. Amid
Hydroxid	1. Epoxid, Oxiran 2. Amin, über N,N-Disuccinimidyl carbonate (DSC)-Zwischenstufe	1. Ether 2. Carbamat

[0080] Bei einer weiteren Ausführungsform ist das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül über eine Interaktion zwischen Biotin und einem Biotin-bindenden Protein wie Streptavidin, NeutrAvidin oder Avidin auf dem festen Träger immobilisiert. Beispielsweise ist das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül über eine Streptavidin-Biotin-Bindung auf dem festen Träger immobilisiert.

[0081] Dabei kann das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül mit einer Biotingruppe bzw. einem Biotintag versehen bzw. funktionalisiert bzw. modifiziert sein und der feste Träger mit einem Monolayer oder Multilayer von Streptavidin versehen bzw. funktionalisiert bzw. modifiziert sein. Bei einer solchen Biotinylierung kann nicht nur Biotin selbst, sondern auch ein Derivat von Biotin eingesetzt werden, z.B. Biocytin, pegyliertes Biotin (z.B. EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotin von Thermo Fisher), Iminobiotin und dergleichen.

[0082] In einer spezifischen Ausführungsform ist das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül biotinyliertes ACE2 oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes, biotinyliertes Fragment von ACE2 und der feste Träger ist mit Streptavidin, beispielsweise mit einem Monolayer oder Multilayer von Streptavidin versehen.

[0083] In einer weiteren spezifischen Ausführungsform ist das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül biotinyliertes ACE2 oder ein spezifisch an das Coronavirus bindendes, biotinyliertes Fragment von ACE2 und der feste Träger ist ein mit Streptavidin, beispielsweise mit einem Monolayer oder Multilayer von Streptavidin, versehener Magnetpartikel.

[0084] In einer weiteren speziellen Ausführungsform ist das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül biotinyliertes ACE2. Der feste Träger ist ein magnetischer, beispielsweise superparamagnetischer Bead mit einem Durchmesser von etwa 2,5 µm bis 3,5 µm, beispielsweise 2,8 µm und einem Monolayer von Streptavidin, kovalent an die Oberfläche gekoppelt und ggf. weiter blockiert mit BSA. Durch den Streptavidin-Monolayer bleibt der überwiegende Teil der Biotin-Bindungsstellen sterisch für die Bindung für biotinyliertes ACE2 verfügbar.

[0085] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft somit einen magnetischen Partikel, der eine kovalent an die Oberfläche gekoppelte Streptavidinschicht aufweist und über die Streptavidinschicht an biotinyliertes ACE2 gebunden ist.

[0086] Werden die mit ACE2 Fänger-molekülen funktionalisierten Partikel zu einer Probe gegeben, welche auf die Anwesenheit von Coronaviren geprüft werden soll, können die Magnetpartikel bei Anwesenheit von SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV agglomerieren und somit die optischen Eigenschaften der Proben ändern. Dies kann wie vorstehend beschrieben schnell und einfach, z.B. durch verschiedene optische Messmethoden nachgewiesen werden, z.B. durch Trübungs- oder Streuungsmessungen oder mikroskopisch.

[0087] Die vorstehend beschriebenen Elemente bzw. Mittel bzw. Vorrichtungen bzw. funktionalisierten Partikel zur Bindung eines Coronavirus, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV, können zur An- oder Abreicherung von Coronaviren in einer Probe -und/oder zum Nachweis von Coronaviren in einer Probe verwendet werden. Ferner können die vorstehend beschriebenen Elemente bzw. Mittel bzw. Vorrichtungen bzw. funktionalisierten Partikel zur Bindung eines Coronavirus, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV, zur Diagnose von SARS, Covid-19 und/oder MERS bei menschlichen oder tierischen Subjekten eingesetzt werden.

[0088] Ausführungsformen für derartige Verwendungen werden im Folgenden beschrieben.

[0089] Gemäß einem Aspekt wird ein Verfahren zum Abtrennen von Coronaviren aus einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fänger-molekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird; und
- b) Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe.

[0090] Das Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird, erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur von 20°C bis 37°C, z.B. bei 22°C bis 37°C oder bei Raumtemperatur.

[0091] Das Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe kann durch herkömmliche, dem Fachmann bekannte Methoden erfolgen. Beispielsweise erfolgt das Abtrennen durch Filtration, magnetische Abscheidung oder Waschen.

[0092] In einer weiteren Ausführungsform können die abgetrennten, an das Element gebundenen Coronaviren, z.B. Coronaviren, die an mit ACE2 Fänger-molekülen funktionalisierte Partikel gebunden sind, prozessiert werden. Beispielsweise können die Coronaviren im Komplex mit den Fänger-molekülen lysiert werden. Die so erhaltene Virus-RNA kann revers transkribiert werden und dann ggf. amplifiziert werden, beispielsweise mittels einer RT-PCR.

[0093] In einer weiteren Ausführungsform können die abgetrennten, an das Element gebundenen Coronaviren, z.B. Coronaviren, die an mit ACE2 Fänger-molekülen funktionalisierte Partikel gebunden sind, über Antigen-Antikörper Bindungen nachgewiesen werden.

[0094] Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren zum Abtrennen von Coronaviren aus einer Probe den folgenden Schritt:

- c) Lösen der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element.

[0095] Das Lösen der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element, z.B. dem funktionalisierten Partikel, kann in einer Ausführungsform durch Waschen mit einer Lösung von Fänger-molekülen erfolgen. Werden mit ACE2 funktionalisierte Partikel, an die Coronaviren gebunden sind, mit einer ACE2-Lösung gewaschen, binden die Coronaviren mit größerer Wahrscheinlichkeit an das im Überschuss vorliegende in Lösung befindliche ACE2.

[0096] Durch eine wie vorstehend beschriebene Abtrennung kann eine Anreicherung bzw. eine ein Abreicherung der Coronaviren in der Probe erreicht werden.

[0097] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fänger-molekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird; und
- b) Detektieren der an das Element gebundenen Coronaviren.

[0098] Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe erfolgt zwischen dem Schritt des Inkontaktbringens und dem Schritt des Detektierens eine Anreicherung der Coronaviren. Die Anreicherung kann durch Abtrennen der an das an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe, beispielsweise durch Filtration, magnetische Abscheidung oder Waschen, erfolgen.

[0099] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fänger-molekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird;
- b) Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe; und
- c) Detektieren von Nucleinsäuren der Coronaviren.

[0100] In einer Ausführungsform können die abgetrennten, an das Element gebundenen Coronaviren, z.B. Coronaviren, die an mit ACE2 Fänger-molekülen funktionalisierte Partikel gebunden sind, prozessiert werden. Beispielsweise können die Coronaviren im Komplex mit den Fänger-molekülen lysiert werden. Die so erhaltene Virus-RNA kann revers transkribiert werden und dann ggf. amplifiziert werden, beispielsweise mittels einer RT-PCR.

[0101] In einer weiteren Ausführungsform können die abgetrennten, an das Element gebundenen Coronaviren, z.B. Coronaviren, die an mit ACE2 Fänger-molekülen funktionalisierte Partikel gebunden sind, über Antigen-Antikörper Bindungen nachgewiesen werden.

[0102] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe bereitgestellt, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements mit einem festen Träger, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fänger-molekül immobilisiert ist und wobei das für das Coronavirus spezifische Fänger-molekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist, mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird;
- b) Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe;
- c) Lösen der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element; und
- d) Detektieren von Nucleinsäuren der Coronaviren.

[0103] Im Fall einer gewünschten Lösung der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element kann dieses Lösen der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element, z.B. dem funktionalisierten Partikel, wie vorstehend beschrieben durch Waschen mit einer Lösung von Fänger-molekülen erfolgen.

[0104] Gemäß einer Ausführungsform der vorstehend beschriebenen Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe werden die Nucleinsäuren der Coronaviren vor dem Detektieren amplifiziert.

[0105] Typischerweise wird die Nucleinsäure-Amplifikation durch eine zyklische Amplifikation erreicht. Die zyklische Amplifikation kann eine beliebige Anzahl von Amplifikationszyklen umfassen, die gleich oder größer

als zwei ist. In der Regel umfasst die zyklische Amplifikationsreaktion mindestens 10 oder mindestens 20 Zyklen.

[0106] Eine beispielhafte zyklische Amplifikation ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR ist eine etablierte Standardmethode in der Molekularbiologie, die z.B. in Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.; 4. Auflage, 1. Juli 2012 ausführlich beschrieben ist. Typischerweise wird die PCR für die Amplifikation von doppelsträngigen DNA-Molekülen unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase verwendet. In einigen Ausführungsformen hat die bei der zyklischen Amplifikation verwendete DNA-Polymerase eine Exonuklease-Aktivität, insbesondere eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität. Beispiele für solche DNA-Polymerasen sind u.a. die Taq-DNA-Polymerase oder die Tth-DNA-Polymerase.

[0107] Alternativ wird die Nukleinsäure-Amplifikation mit Hilfe einer isothermen Amplifikationsmethode erreicht. Die Amplifikation von Nukleinsäuren unter isothermen Bedingungen macht es möglich, die Verwendung einer Thermocycling-Apparatur zu vermeiden. Es gibt mehrere Arten isothermer Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden, die dem Fachmann bekannt sind, darunter die transkriptionsvermittelte Amplifikation, die auf der Nukleinsäuresequenz basierende Amplifikation (NASBA), die signalvermittelte Amplifikation der RNA-Technologie, die Strangverdrängungsamplifikation, die Rolling-Circle-Amplifikation, die schleifenvermittelte isotherme Amplifikation (LAMP), die isotherme Mehrfachverdrängungsamplifikation, die helicaseabhängige Amplifikation, die isotherme Einzelprimer-Amplifikation und die zirkuläre helicaseabhängige Amplifikation. Isotherme Nukleinsäure-Amplifikationstechnologien werden z.B. in P. Gill und A. Ghaemi, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 27(3): 224 243 (2008) beschrieben.

[0108] Eine beispielhafte isotherme Amplifikation zur Verwendung in den hier beschriebenen Methoden ist die Nicking-Enzym-Amplifikationsreaktion (NEAR), bei der eine strangverdrängende DNA-Polymerase eingesetzt werden kann, die an einem durch ein Nicking-Enzym erzeugten Nick beginnt und schnell viele kurze Nukleinsäuren aus der Zielsequenz produziert.

[0109] Die Detektion kann bei den vorstehend beschriebenen Verfahren zum Detektieren von Coronaviren beispielsweise auf der Agglutination der Partikel oder auf einer Änderung der Oberflächenstruktur des festen Trägers bei Anwesenheit des Coronavirus basieren. Die Agglutination der Partikel oder die Haftung des Coronavirus auf der Oberfläche des festen Trägers kann beispielsweise zu einer Änderung der optischen Eigenschaften der Probe führen. Diese können mit bloßem Auge oder mit Hilfe eines portablen Mikroskops, z.B. über einen entsprechenden Aufsatz für ein Smartphone, beobachtet werden oder über eine farbliche Änderung der Probe (kolorimetrische Detektion), die entweder ohne Hilfsmittel beobachtbar ist oder photometrisch ausgelesen werden kann. Des Weiteren ist eine Detektion beispielsweise über Streulicht-, Trübungs- und Transmissionsmessungen möglich.

[0110] Die Auswahl eines geeigneten Nachweissystems hängt von mehreren Parametern ab, wie z.B. der Art der durchgeführten Analyse. Verschiedene optische und nicht-optische Detektionssysteme sind in der Technik gut etabliert. Eine allgemeine Beschreibung von Detektionssystemen, die bei den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, findet sich z.B. in Lottspeich, F., und Engels, J.W., Wiley; 1. Auflage, 14. März 2018.

[0111] Typischerweise ist das Detektionssystem ein optisches Detektionssystem. In einigen Ausführungsformen umfasst die Durchführung der Verfahren einfache Detektionssysteme, die auf der Messung von Parametern wie Fluoreszenz, optische Absorption, Resonanzübertragung und dergleichen beruhen können.

[0112] Die erfindungsgemäßen Verfahren zum Detektieren von Coronaviren können ferner eine automatisierte Auswertung der Ergebnisse, beispielsweise mit Hilfe einer Smartphone-App, etwa durch eine Bilderkennungssoftware oder eine Spektralanalyse umfassen.

[0113] Gemäß einer speziellen Ausführungsform erfolgt das Detektieren kolorimetrisch, photometrisch, durch Messung von Streulicht, durch Messung von Trübung, durch Messung von Transmission oder durch Raman-Spektroskopie.

[0114] Bei einem Nachweis des Coronavirus durch Raman-Spektroskopie, d.h. durch inelastische Streuung, kann die Auswertung beispielsweise über Differenzspektren, den Abgleich mit einer Datenbank oder durch chemometrische Methoden erfolgen.

[0115] Die Elemente der vorliegenden Erfindung wie die vorstehend beschriebenen funktionalisierten Partikel bzw. Oberflächen können nicht nur für die optische Detektion von Coronaviren genutzt werden, sondern auch als Verfahren der Probenvorbereitung zur Anreicherung der Viren verwendet werden, zum Beispiel für einen PCR-basierten Nachweis. Gemäß einer weiteren Ausführungsform erfolgt das Detektieren durch eine quantitative PCR.

[0116] Die in den vorstehend genannten Proben können beliebige feste, flüssige oder gasförmige Proben sein, in denen das Vorliegen von Coronaviren vermutet wird. Beispiel hierfür sind Proben ausgewählt aus einer Rachenabstrichprobe, Rachenspülwasser, einer Nasenabstrichprobe, einer Speichelprobe, einer Stuhlprobe, einer Blutprobe, einer Urinprobe, einer Okularflüssigkeitsprobe, einer durch bronchoalveoläre Lavage erhaltene Probe, einer Abwasserprobe, einer Wasserprobe, einer Viren-Zellkultur, einem Überstand einer Viren-Zellkultur und einer Luftprobe (z.B. Atemluft). Die Proben sind unbehandelt oder behandelt. Üblicherweise werden die Proben unbehandelt bzw. unprozessiert in den vorstehend genannten Verfahren eingesetzt. Es ist jedoch auch die Verwendung von behandelten bzw. prozessierten Proben wie z.B. Blutplasma oder Blutserum denkbar.

[0117] Gemäß einer weiteren Ausführungsform der vorstehend beschriebenen Verfahren zum Abtrennen und/oder Detektieren von Coronaviren erfolgt das Inkontaktbringen in einem Reaktionsgefäß, in einer Kartusche, in einer Küvette, auf einem Filter, auf einem Microarray, auf einer Mikrotiterplatte, auf einem Gel oder auf einer Membran.

[0118] Ein Fachmann wird auch den Wert des Testens mehrerer Proben (z.B. zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten) desselben Individuums erkennen. Beispielsweise kann dasselbe Individuum nach einem Tag, nach drei Tagen, nach fünf Tagen und/oder nach sieben Tagen erneut getestet werden. Eine solche Prüfung von Serienproben ermöglicht es, Veränderungen des Vorhandenseins von SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV im Laufe der Zeit zu erkennen. Erhöhungen oder Verminderungen der Menge an SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 oder MERS-CoV sowie das Ausbleiben von Veränderungen dieser Werte können nützliche Informationen über den Krankheitsstatus und die Wirksamkeit der Behandlung liefern.

[0119] Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden nun anhand eines konkreten Beispiels beschrieben, das jedoch in keiner Weise als Einschränkung der Erfindung zu verstehen ist.

Beispiel

[0120] Im Folgenden wird ein Protokoll zur Isolation von SARS-CoV-2 mit magnetischen Beads für die nachfolgende Raman-spektroskopische/PCR-basierte Detektion beschrieben.

Teil A: Funktionalisierung der Magnetpartikel mit ACE2

[0121] Chemikalien, Puffer:

- Dynabeads M280 Streptavidin, 10 mg/ml,
- ACE2 Biotin-Tag, Konzentration = 310 µg/ml
- Eppendorf Tubes LoBind Protein 1,5 ml
- 1x PBS pH 7,4, sterilfiltriert

[0122] Geräte:

- Invitrogen HulaMixer oder vergleichbar
- Magnetpartikelabscheider

[0123] Die magnetischen Partikel wurden gemäß den folgenden Schritten mit ACE2 funktionalisiert bzw. modifiziert.

1. Beads für 30 s vortexen (hohe Intensität)
2. je 200 µL (2 mg) M-280 COOH Beads in zwei 1,5 ml Eppendorf-Tubes geben, Beschriftung der Tubes: ACE2, NK
3. 2x Waschen der Beads:

- a. Reaktionsgefäße mit Beads in Magnetabscheider stellen, 1 min warten
 - b. Überstand abnehmen
 - c. 1000 µL 1x PBS pH 7,4 zugeben
 - d. 5 s vortexen (hohe Intensität)
 - e. in den Magnetabscheider stellen, 1 min warten und Überstand abnehmen
 - f. Wiederholung b. - e.
4. Beads in 71 µL 1x PBS pH 7,4 aufnehmen
5. Protein hinzufügen
Tube ACE2: 129 µl (40 µg) ACE2 (biotinyliert) zugeben Tube NK: 129 µL 1× PBS pH 7,4 zugeben
6. Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min
Einstellung HulaMixer: Orbital: 12/05; Reciprocal: off; Vibro: off
7. 4x Waschen der Beads:
- a. Reaktionsgefäße mit Beads in Magnetabscheider stellen, 1 min warten
 - b. Überstand abnehmen
 - c. 1000 µL 1x PBS pH 7,4 zugeben
 - d. 5 s vortexen (geringe Intensität)
 - e. in den Magnetabscheider stellen, 1 min warten und Überstand abnehmen
 - f. 3x Wiederholung b. - e.
8. Beads in 200 µL 1x PBS pH 7,4 aufnehmen

Teil B: Isolation des Virus

[0124] Chemikalien, Puffer

- Dynabeads M280 Streptavidin, gemäß Teil A modifiziert mit ACE2
- Viren-Proben, in denen SARS-CoV-2 in einer Zellkultur (Nierenzellen, Ver76) vermehrt wurde. Die Proben enthielten ca. $1 \times 10^7,3$ Viren pro ml.
- Eppendorf Tubes LoBind Protein 1,5 ml
- 0,05 M PIPES pH 6,5 + 1 M NaCl, sterilfiltriert

[0125] Geräte

- Invitrogen HulaMixer
- Magnetpartikelabscheider

[0126] Das Virus wurde gemäß den folgenden Schritten aus den Proben isoliert:

1. Proben mit Beads (ACE2, NK) für 5 s vortexen (geringe Intensität)
2. 2x Waschen der Beads:
 - a. Reaktionsgefäße mit Beads in Magnetabscheider stellen, 1 min warten
 - b. Überstand abnehmen
 - c. 1000 µL 0,05 M PIPES pH 6,5 + 1 M NaCl zugeben
 - d. 5 s vortexen (geringe Intensität)
 - e. in den Magnetabscheider stellen, 1 min warten und Überstand abnehmen
 - f. Wiederholung b. - e.
3. Beads in 220 µL 0,05 M PIPES pH 6,5 + 1 M NaCl aufnehmen

4. Proben teilen

Tube ACE2: je 50 µl in 4 neue Tubes pipettieren,

Beschriftung ACE2_V, ACE2_V*, ACE2_NK, ACE2_NK* Tube NK (Negativkontrolle): je 50 µl in 4 neue Tubes pipettieren, Beschriftung NK_V, NK_V*, NK_NK, NK_NK*

Tabelle 2: Übersicht der Proben

Virus aktiv		Virus inaktiviert mit Formaldehyd	
ACE2_V = B1	MNP ACE2 modifiziert + Virus-Probe	ACE2_V* = C1	MNP ACE2 modifiziert + Virus-Probe
ACE2_NK = B2	MNP ACE2 modifiziert + Negativkontrolle z.B. Puffer oder negative Probe	ACE2_NK* = C2	MNP ACE2 modifiziert + Negativkontrolle z.B. Puffer oder negative Probe
NK_V = B3	MNP unmodifiziert + Virus-Probe	NK_V* = C3	MNP unmodifiziert + Virus-Probe
NK_NK = B4	MNP unmodifiziert + Negativkontrolle z.B. Puffer oder negative Probe	NK_NK* = C4	MNP unmodifiziert + Negativkontrolle z.B. Puffer oder negative Probe

5. für Schritt 10 acht zusätzliche Tubes (siehe 8 Proben in Tabelle oben) beschriften

6. Virus-Proben bzw. Puffer zu Negativkontrollen hinzugeben, z.B. V = 200 - 500 µl Negativkontrolle z.B. 0,05 M PIPES pH 6,5 + 1 M NaCl oder negative Probe

7. Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min Einstellung HulaMixer: Orbital: 12/05; Reciprocal: off; Vibro: off

8. 2x Waschen der Beads:

a. Reaktionsgefäße mit Beads in Magnetabscheider stellen, 1 min warten

b. Überstand abnehmen

c. 500 µL 0,05 M PIPES pH 6,5 + 1 M NaCl zugeben

d. 5 s vortexen (geringe Intensität)

e. in den Magnetabscheider stellen, 1 min warten und Überstand abnehmen

f. 2x Wiederholung b - e.

9. Beads jeweils in 55 µl 0,05 M PIPES pH 6,5 + 1 M NaCl aufnehmen und 5 s vortexen (geringe Intensität)

10. von jeder Probe 25 µL entnehmen und in ein neues beschriftetes Tube pipettieren, so dass nun von jeder Probe zwei Tubes vorhanden sind

ein Probensatz für PCR: weiter mit Schritt 11.

ein Probensatz für Raman: bei diesen Proben die Inaktivierung (nur für die nicht bereits inaktivierten Proben) durchführen

11. Prozessierung für nachfolgende PCR-basierte Detektion

a. Überstand abnehmen

b. 100 µL Lysepuffer nach Wahl zugeben

c. 5 s vortexen (geringe Intensität)

d. Inkubation/Erhitzen je nach verwendetem Lyseprotokoll

e. in den Magnetabscheider stellen, 1 min warten

f. ggf. Schritt b. bis d. noch einmal wiederholen

g. Aliquote der Überstände für die PCR verwenden, z.B. je 10 µL

12. Prozessierung für nachfolgende Raman-spektroskopische Detektion

a. Überstand abnehmen

b. 200 µL dH₂O zugeben

c. 5 s vortexen (geringe Intensität)

- d. in den Magnetabscheider stellen, 1 min warten
- e. Überstand abnehmen
- f. Schritt b. bis e. noch einmal wiederholen
- g. in 200 µL dH₂O aufnehmen
- h. je 1 µl auf Raman-Chip auftropfen
- i. trocknen lassen
- j. Raman-Messung: KAISER 808 nm, 5% 30s 1 Acc, 100x (0,75)

[0127] Die Ergebnisse der Raman-Messung sind in **Fig. 2c** gezeigt.

Patentansprüche

1. Element zur Bindung eines Coronavirus, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV, wobei das Element einen festen Träger umfasst, auf dem ein für das Coronavirus spezifisches Fängermolekül immobilisiert ist, und wobei das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül ein spezifisch an das Coronavirus bindendes Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) ist.
2. Element nach Anspruch 2, wobei das Coronavirus bindende Fragment von Angiotensin Converting Enzyme 2 die Aminosäuren 1-120 und/oder 295-420 umfasst.
3. Element nach Anspruch 1 oder 2, wobei der feste Träger ein synthetisches Partikel ist.
4. Element nach Anspruch 3, wobei das synthetische Partikel ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem magnetischen Partikel, einem Siliciumdioxidpartikel und einem Polymerpartikel.
5. Element nach Anspruch 1 oder 2, wobei der feste Träger ein Microarray ist und auf mindestens einem Spot des Microarrays das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül immobilisiert ist.
6. Element nach Anspruch 1 oder 2, wobei der feste Träger eine Mikrotiterplatte ist und in mindestens einem Well der Mikrotiterplatte das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül immobilisiert ist.
7. Element nach Anspruch 1 oder 2, wobei der feste Träger ein Filter, eine Küvette, eine Membran oder ein Gel ist.
8. Element nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das für das Coronavirus spezifische Fängermolekül auf dem festen Träger durch eine kovalente Bindung oder durch eine Streptavidin-Biotin-Bindung immobilisiert ist.
9. Verfahren zum Abtrennen von Coronaviren aus einer Probe, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
 - a) Inkontaktbringen eines Elements nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird; und
 - b) Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Abtrennen durch Filtration, magnetische Abscheidung oder Waschen erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei das Verfahren ferner den folgenden Schritt umfasst:
 - c) Lösen der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element.
12. Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
 - a) Inkontaktbringen eines Elements nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit der Probe, so dass eine Bindung

der Coronaviren an das Element erlaubt wird; und
b) Detektieren der an das Element gebundenen Coronaviren.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei zwischen dem Schritt des Inkontaktbringens und dem Schritt des Detektierens eine Anreicherung der Coronaviren erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Anreicherung durch Abtrennen der an das an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Abtrennen durch Filtration, magnetische Abscheidung oder Waschen erfolgt.

16. Verfahren zum Detektieren von Coronaviren in einer Probe, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV und wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Inkontaktbringen eines Elements nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit der Probe, so dass eine Bindung der Coronaviren an das Element erlaubt wird;
- b) Abtrennen der an das Element gebundenen Coronaviren von übriger Probe;
- c) ggf. Lösen der Bindung zwischen den Coronaviren und dem Element; und
- d) Detektieren von Nukleinsäuren der Coronaviren.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Nukleinsäuren vor dem Detektieren amplifiziert werden.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei das Detektieren durch eine quantitative PCR erfolgt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei das Detektieren optisch erfolgt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei das Detektieren kolorimetrisch, photometrisch, durch Messung von Streulicht, durch Messung von Trübung, durch Messung von Transmission oder durch Raman-Spektroskopie erfolgt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 20, wobei die Probe ausgewählt wird aus einer Rachenabstrichprobe, einer Nasenabstrichprobe, einer Speichelprobe, einer Stuhlprobe, einer Blutprobe, einer Urinprobe, einer Okularflüssigkeitsprobe, einer durch bronchoalveoläre Lavage erhaltene Probe, einer Abwasserprobe, einer Wasserprobe, einer Viren-Zellkultur, eines Überstands einer Viren-Zellkultur und einer Luftprobe.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 21, wobei das Inkontaktbringen in einem Reaktionsgefäß, in einer Kartusche, in einer Küvette, auf einem Filter, auf einem Microarray, auf einer Mikrotiterplatte, auf einem Gel oder auf einer Membran erfolgt.

23. Verwendung eines Elements nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur An- oder Abreicherung von Coronaviren in einer Probe, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV.

24. Verwendung eines Elements nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Nachweis von Coronaviren in einer Probe, wobei die Coronaviren ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und MERS-CoV.

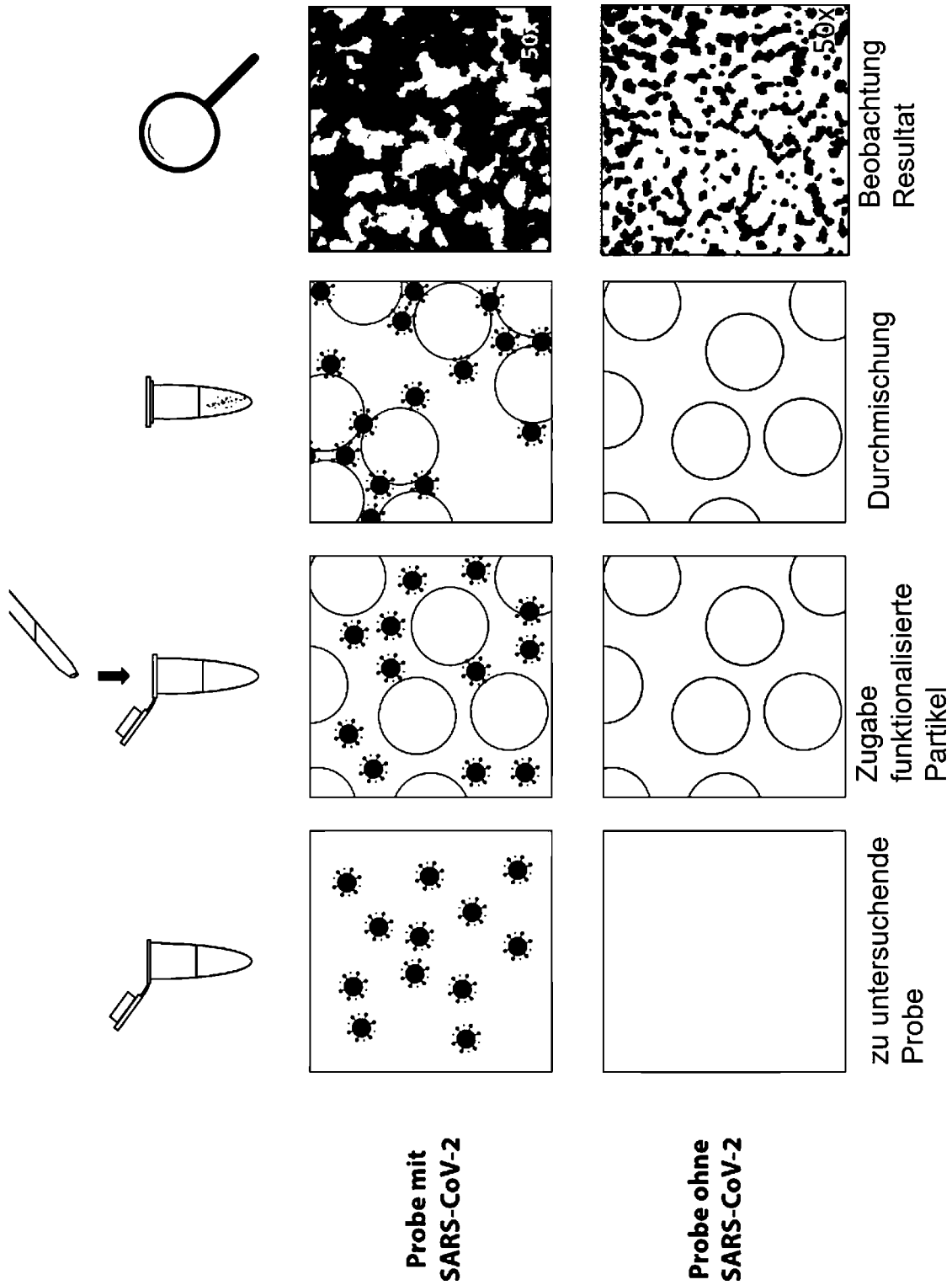
25. Verwendung nach Anspruch 23 oder 24, wobei die Probe ausgewählt wird aus einer Rachenabstrichprobe, einer Nasenabstrichprobe, einer Speichelprobe, einer Stuhlprobe, einer Blutprobe, einer Urinprobe, einer Okularflüssigkeitsprobe, einer durch bronchoalveoläre Lavage erhaltene Probe, einer Abwasserprobe, einer Wasserprobe, einer Viren-Zellkultur, eines Überstands einer Viren-Zellkultur und einer Luftprobe.

26. Verwendung eines Elements nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Diagnose von SARS, Covid-19 und/oder MERS bei einem Subjekt.

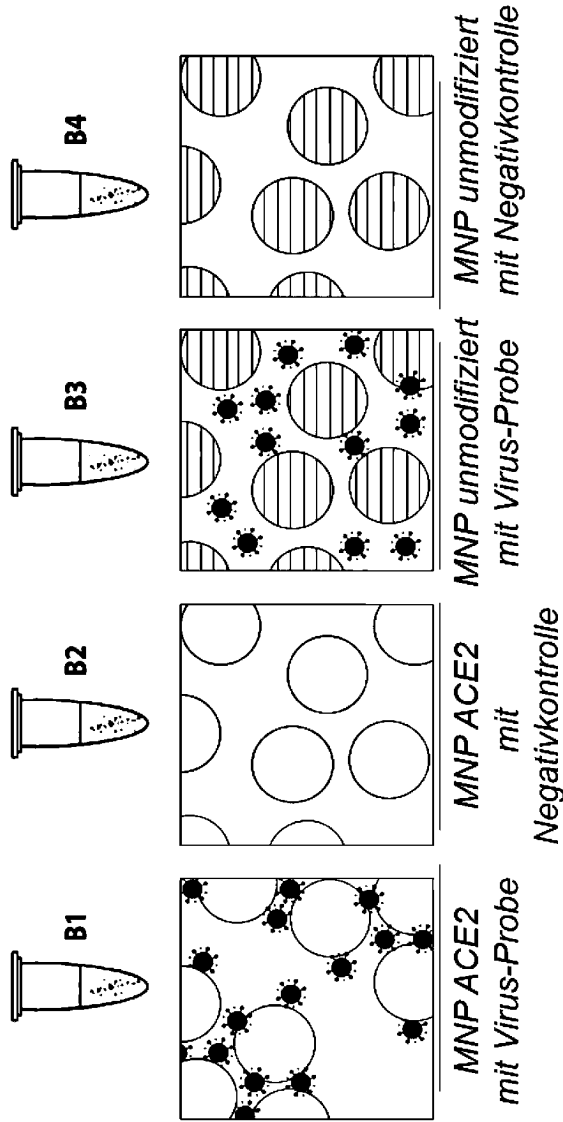
Es folgen 5 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

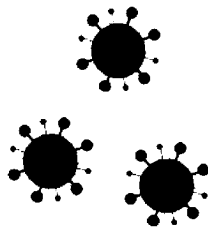
Figur 1:



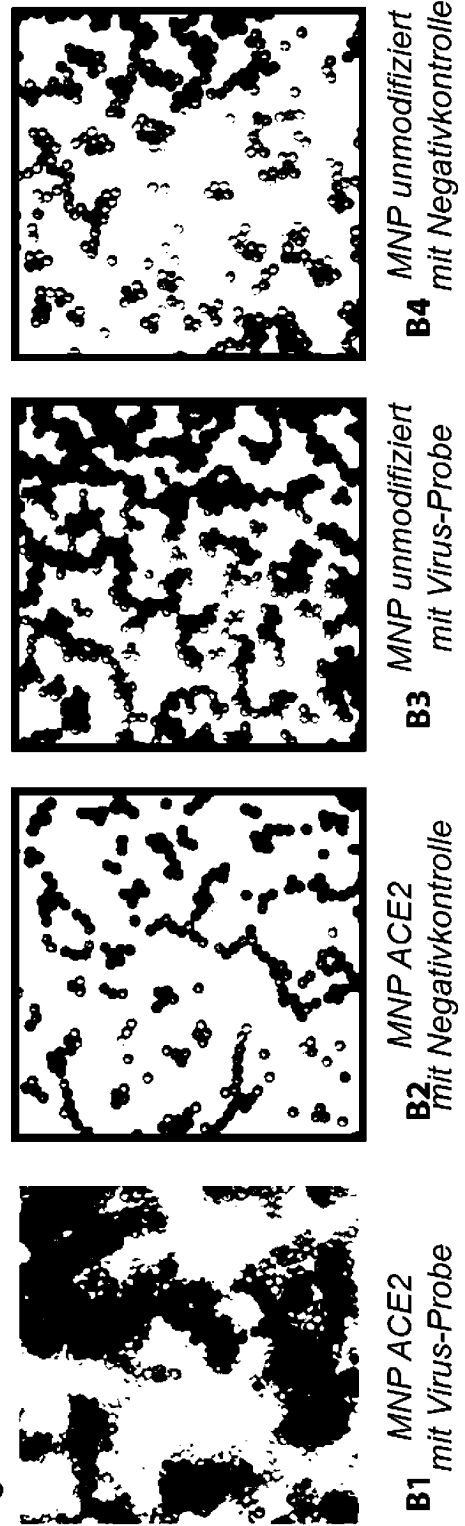
Figur 2



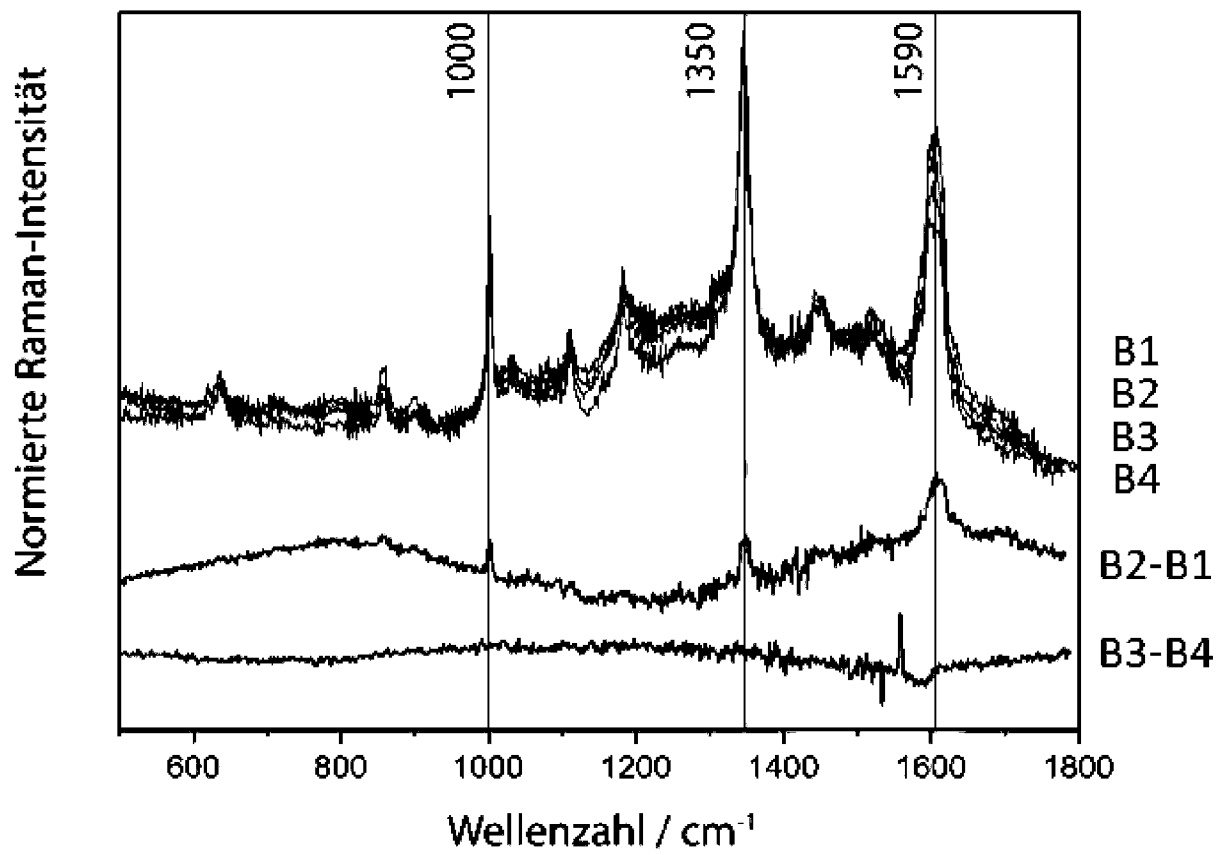
Figur 2a
 → Isolation aktive Viren



Figur 2b



Figur 2c:



Figur 3:

SARS-CoV-2
387 LNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWN 437
438 SNNLDSKVGGNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNC 488
489 YFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFE 516

SARS-CoV
374 LNDLCFSNVYADSFVVKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWN 424
425 TRNI DATSTGNYKYRYLKHGKLRPFERDISNVPFSPDGKPCTP-PALNC 474
475 YWPLNDYGFYTTTGIGYQPYRVVVLSFELLNAPATV 502

Figur 4:

