

Mikronährstoffkombination hemmt zwei Schlüssel-Mechanismen der Coronavirus (SARS-CoV-2)-Infektion: die Bindung des Virus an den ACE2-Rezeptor und seine zelluläre Expression

A. Goc, Ph.D., W. Sumera, M.Sc., Vadim Ivanov, M.D., Ph.D.,
Aleksandra Niedzwiecki, Ph.D. and Matthias Rath, M.D.
Dr. Rath Research Institute, San Jose, CA

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Die Coronavirus-Pandemie stellt sowohl für die Gesundheit der Menschen weltweit als auch für die Weltwirtschaft eine beispiellose Herausforderung dar. Die Suche nach Impfstoffen und anderen Wegen, dieser Pandemie Einhalt zu gebieten, konzentriert sich bisher auf synthetische Moleküle, die – logischerweise – fast immer mit mehr oder weniger schweren Nebenwirkungen verbunden sind.

Ergebnisse: In dieser Studie zeigen wir, dass eine Kombination von spezifischen Mikronährstoffen die Bindungsstelle des Coronavirus mit seiner „Ankerstelle“ auf menschlichen Körperzellen, dem ACE2-Rezeptor, fast vollständig blockieren kann. Darüber hinaus war diese Mikronährstoffkombination in der Lage, die Bildung (Expression) dieses ACE2-Rezeptors auf der Oberfläche menschlicher Lungen-Epithelzellen um über 90 % zu verringern.

Schlussfolgerung: Diese Studie bildet die Grundlage für wirksame und sichere Strategien im Bereich der öffentlichen Gesundheit, die eine optimale Zufuhr von Mikronährstoffen zur Grundlage haben. Sie ermöglicht es Menschen weltweit, sich aktiv an der Prävention von Coronavirus-Infektionen zu beteiligen. Damit erweitert die hier vorgestellte Mikronährstoff-Strategie die bisherigen Präventions-Maßnahmen, wie das Tragen von Masken, Social Distancing und anderen Schritte, erheblich.

Korrespondenz:

Dr. Aleksandra Niedzwiecki,
Dr. Rath Research Institute,
5941 Optical Court,
San Jose, Ca 95138,
USA.

E-Mail: author@jcmnh.org

EINLEITUNG

Die rasche Ausbreitung der aktuellen Coronavirus-Pandemie (COVID-19) gefährdet die Gesundheit der Menschen weltweit, schwächt die Volkswirtschaften und bedroht den Wohlstand zukünftiger Generationen.¹ In der ersten Hälfte des Jahres 2020 waren weltweit bereits über 16 Millionen Menschen von einer COVID-19-Infektion betroffen und mehr als 660.000 daran gestorben.²

Durch Sequenzierung des vollständigen Genoms, isoliert aus Proben eines erkrankten Patienten³, wurde das Virus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2, deutsch Schweres akutes respiratorisches Syndrom-Coronavirus-2) identifiziert. In der Folge erhielt die durch dieses Virus verursachte Krankheit den Namen *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19), deutsch Coronavirus-Krankheit-2019.

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Eindämmung der Ausbreitung dieser Pandemie bestand darin, den Infektionsweg von SARS-CoV-2 in die Zellen des menschlichen Körpers zu identifizieren. Coronaviren binden zunächst an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen. Mit Hilfe dieser Rezeptoren gelangen sie auch ins Innere der Zellen und werden über Transportvesikel (Endosomen) weiter transportiert, bis sie schließlich den Zellkern erreichen, wo ihr genetisches Material in die DNS der menschlichen Körperzellen eingebaut wird.⁴

Von besonderer Bedeutung ist der erste Schritt des Infektionsweges, d. h. die Bindung des Virus an den Rezeptor auf der Zelloberfläche (Abbildung 1). Beim Coronavirus beruht dieser Bindungsmechanismus auf spezifischen „Spikes“ (Stachel)-Proteinen, die auf der Oberfläche des Virus verankert sind und eine rezeptorbindende Domäne (englisch *Receptor-Binding Domain*, RBD) enthalten. Diese spezifische Bindestelle des Virus erkennt präzisionsgenau ihre „Andockstelle“, einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Körperzellen. Dieser Rezeptor, Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) genannt, ist ein in der Zellmem-

bran verankertes Protein. Es wurde auf der Oberfläche zahlreicher Zellarten im gesamten menschlichen Körper nachgewiesen – insbesondere im Herz-Kreislaufsystem, Magen-Darm-Trakt, in den Nieren und der Lunge.^{5,6}

Dieser Bindungsmechanismus hat einen erheblichen Einfluss auf die Fähigkeit des Virus, Körperzellen zu infizieren sowie eine Coronavirus(COVID-19)-Erkrankung auszulösen. Daher spielt dieser Bindungsmechanismus auch bei der Entwicklung von Impfstoffen und anderen Therapieansätzen eine bedeutende Rolle.^{7,8}

Während die Suche nach einem solchen Impfstoff oder Medikament weitergeht, gibt es bereits jetzt einen viel direkteren – und vor allem sichereren – Weg, um diese verhängnisvolle Interaktion von Coronaviren mit dem ACE2-Rezeptor der Körperzellen zu verhindern: die Unterdrückung der Bildung (Expression) von ACE2-Rezeptoren auf der Oberfläche von menschlichen Körperzellen, die somit erst gar nicht mehr zum Andocken für die Coronaviren zur Verfügung stehen.

In einer kürzlich veröffentlichten bahnbrechenden Studie konnten wir zeigen, dass eine bestimmte Kombination von Mikronährstoffen, bestehend aus Vitamin C, bestimmten Mineralstoffen, Aminosäuren und Pflanzenextrakten, die zelluläre ACE2-Expression in den wichtigsten Zelltypen signifikant verringert, auf die das Virus abzielt. Besonders betroffen sind dabei die Epithelzellen der kleinen Atemwege (Alveolen), kurz „Lungen-Epithelzellen“, sowie die Endothelzellen der menschlichen Blutgefäße, die „Gefäß-Endothelzellen“. Unter Entzündungsbedingungen, wie sie bei der COVID-19-Infektion und bei anderen Infektionen auftreten, unterdrückten die Mikronährstoffe die Ausbildung der ACE2-Rezeptoren besonders ausgeprägt.⁹

Die bemerkenswerten Ergebnisse dieser Studie warfen die Frage auf, ob Mikronährstoffe auch in der Lage sind, einen anderen Mechanismus zu beeinflussen, der für Coronavirus-Infektionen entscheidend ist: die Bindung des Virus

an den ACE2-Rezeptor. Unsere Versuche zielten darauf ab, den Eintritt des Virus in die menschlichen Zellen zu hemmen – also exakt denselben Vorgang wie alle derzeit entwickelten Impfstoffe.

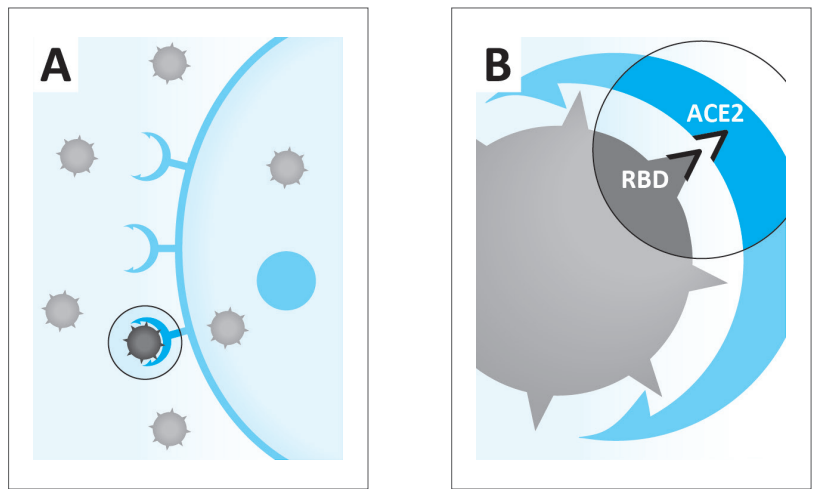
Sollten die Ergebnisse dieser Studie positiv ausfallen, stünde ein neuer, natürlicher und sicherer Ansatz zur Verfügung, um die aktuelle Pandemie wirksam zu bekämpfen.

In der vorliegenden Studie haben wir daher die Wirkung einer weiteren Mikronährstoffzusammensetzung, die Polyphenole und Pflanzenbestandteile enthielt, auf die zwei Schlüsselfaktoren einer Infektion mit SARS-CoV-2 untersucht: die Hemmung des ACE2-Rezeptors und – parallel dazu – die Blockierung der Bindung eines spezifischen SARS-CoV-2-Spike-Proteins an den ACE2-Rezeptor auf menschlichen Zellen (Abbildung 1).

Abbildung 1:

A: Coronaviren infizieren menschliche Körperzellen über den ACE2-Rezeptor.

B: Prinzip des kommerziell erhältlichen Testverfahrens, das in dieser Studie zur Messung der Interaktion zwischen dem rezeptorbindenden Protein (RBD) des Coronavirus (SARS-CoV-2) und dem ACE2-Rezeptor auf der Oberfläche von Körperzellen verwendet wird.



ERGEBNISSE

Wirksamkeit einer spezifischen Mikronährstoffkombination auf die Expression von ACE2-Rezeptoren in menschlichen Lungen-Epithelzellen.

Abbildung 2 zeigt die Wirkungen unterschiedlicher Konzentrationen einer spezifischen Kombination verschiedener aktiver Pflanzenstoffe und -extrakte auf die zelluläre Ausbildung (Expression) von ACE2-Rezeptoren in menschlichen Epithelzellen der kleinen Atemwege (Alveolen).

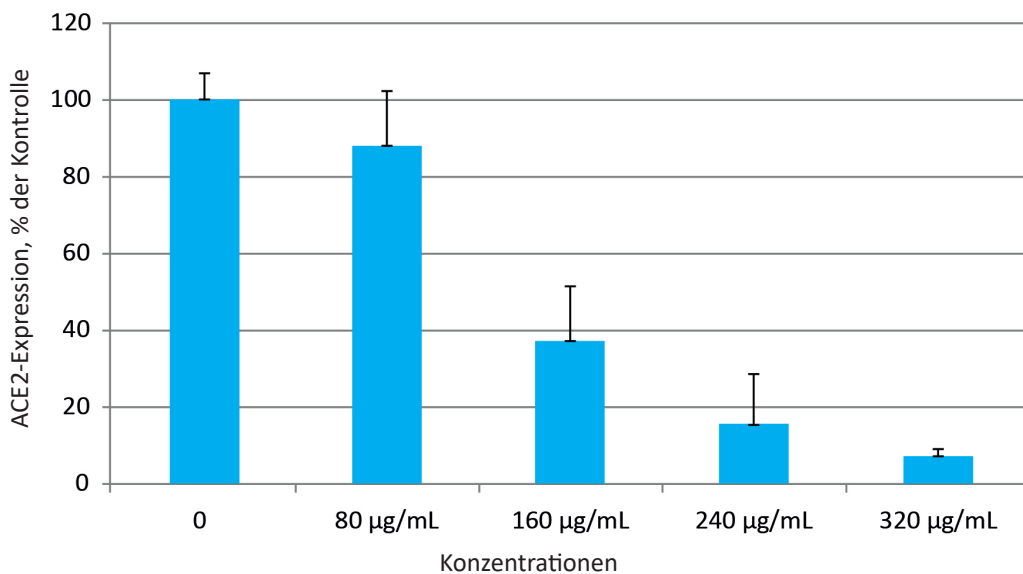


Abbildung 2: Wirksamkeit der Mikronährstoffkombination auf die Expression des ACE2-Rezeptors in menschlichen Lungenzellen (Alveolar-Epithelzellen). Veränderungen der ACE2-Expression werden in % der Kontrolle angegeben.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen eine Abnahme der ACE2-Rezeptorbildung, abhängig von der Konzentration der Mikronährstoff-Kombination. Bei der höchsten Mikronährstoffkonzentration (320 µg/mL) nahm die Expression der zellulären ACE2-Rezeptoren um 92 % ab. Dies deutet darauf hin, dass in Gegenwart dieser Mikronährstoffe die Bindung des Virus an die Rezeptoren der Körperzellen deutlich verringert werden kann, da diese Rezeptoren kaum noch ausgebildet werden.

Die direkte Wirksamkeit der Mikronährstoffkombination auf die Andockung des Virus an den ACE2-Rezeptor

Die Interaktion der Bindungsstelle des Virus (RBD-Sequenz des SARS-CoV-2 Spike-Proteins) an seinen Zell-

rezeptor ist der notwendige Schritt für das Eindringen des Virus in die Körperzellen und Voraussetzung für eine Infektion.

Wir untersuchten die Fähigkeit der beschriebenen Kombination aktiver Pflanzenstoffe, diese Interaktion zwischen der Bindungsstelle des SARS-CoV-2-Spike-Proteins mit dem menschlichen ACE2-Rezeptor zu hemmen. In unserer Studie verwendeten wir ein hochempfindliches Testsystem, das den neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen entsprach. Mit Hilfe dieses Systems können Moleküle nachgewiesen werden, die in der Lage sind, die Interaktion der rezeptorbindenden Domäne (RBD) des Virus-Spike-Proteins mit dem Zell-ACE2-Rezeptor zu blockieren.

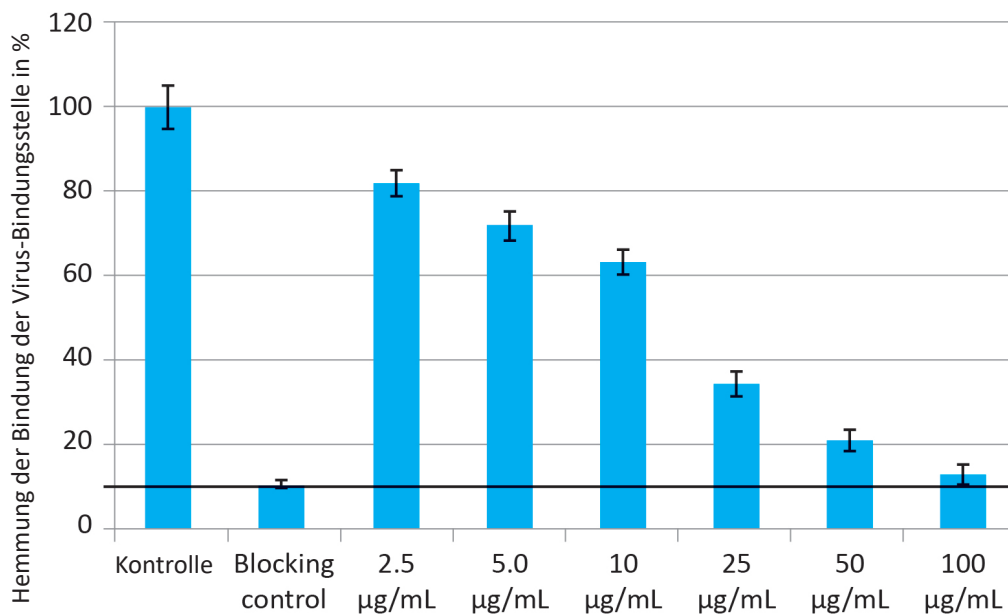


Abbildung 3:
Hemmung der Bindung der Virus-Bindungsstelle (Rezeptor-Bindungs-Domäne des SARS-CoV-2-Spike Proteins) an den Zell-ACE2-Rezeptor durch spezifische Mikronährstoffkombination. Angaben in % der Kontrolle, „Blocking Control“ = 100%ige Bindungshemmung.

Abbildung 3 zeigt, dass die Versuchskombination aus pflanzlichen Naturstoffen in der Lage war, die Bindung der RBD-Domäne auf dem Spike-Protein des SARS-CoV-2-Virus an seinen ACE2-Rezeptor zu blockieren. Diese hemmende Wirkung war konzentrationsabhängig und verursachte bei einer Mikronährstoff-Konzentration von 100 µg/mL eine Bindungshemmung von

97 %. Eine deutliche Wirkung der Mikronährstoff-Kombination auf die Hemmung der Virusbindung an den Zelloberflächen-Rezeptor wurde schon bei einer 40-fach niedrigeren Konzentration, d.h. 2,5 µg/mL, beobachtet, wobei bereits eine Bindungshemmung von etwa 20 % erreicht wurde.

DISKUSSION

Bedeutung unserer Ergebnisse

Die in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse belegen, dass Mikronährstoffe wichtige zelluläre Mechanismen der Coronavirus-Infektion wirksam hemmen können.

Diese Ergebnisse stehen in einem entscheidenden Moment zur Verfügung, da die Wissenschaft und die Medizin weltweit verzweifelt nach wirksamen Maßnahmen gegen die COVID-19-Pandemie suchen.

Mit Hilfe wissenschaftlicher Methoden und modernster Techniken, die im Rahmen der Coronavirus-Forschung zum Einsatz kommen, konnten wir zeigen, dass Mikronährstoffe die Interaktion der Virus-Bindungsstelle (RBD des Spike-Protein von SARS-CoV-2) und dem spezifischen Zell-Rezeptor (ACE2) um 97 % hemmen können. Dies bedeutet, dass Mikronährstoffe das Risiko einer Virusinfektion fast vollständig verhindern könnten. Darüber hinaus hemmte dieselbe Mikronährstoffzusammensetzung die Expression von ACE2-Rezeptoren auf menschlichen Lungenzellen (Alveolar-Epithelzellen) um bis zu 92 %.

In einer früheren Publikation hatten wir berichtet, dass eine weitere Kombination von Mikronährstoffen, darunter Vitamin C, Aminosäuren, Pflanzeninhaltsstoffe sowie Mineralstoffe, die Bildung von ACE2-Rezeptoren signifikant verringern konnten. Dieser Nachweis wurde an zwei Zellarten geführt, die bevorzugt vom Coronavirus angegriffen werden – menschlichen Lungen-Epithelzellen und menschlichen Gefäß-Endothelzellen.⁹

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser früheren Studie war, dass die Hemmung der ACE2-Bildung unter Entzündungsbedingungen, wie sie bei jeder Virusinfektion auftreten, noch ausgeprägter war. Dies würde bedeuten, dass die Wirksamkeit von Mikronährstoffen unter klinischen Bedingungen und in fortgeschrittenen Stadien von COVID-19, die durch eine generalisierte

Entzündung und einen sogenannten „Zytokin-Sturm“ (explosionsartiger Anstieg entzündlicher Signalstoffe) gekennzeichnet sind, noch ausgeprägter ist.

Die Ergebnisse dieser neuen Studie deuten darauf hin, dass spezifische Zusammensetzungen von biologisch aktiven Pflanzenstoffen zur gleichen Zeit zwei entscheidende Mechanismen kontrollieren können, die die Fähigkeit des Coronavirus bestimmen, eine Infektion zu verursachen.

In Anbetracht unserer Ergebnisse ist es besonders enttäuschend, dass die zahlreichen wissenschaftlichen und klinischen Beweise, die die Wirksamkeit von Mikronährstoffen bei vielen Aspekten von Virusinfektionen belegen, bislang weitgehend ignoriert wurden.^{10, 11, 12, 13}

Der Beweis, dass Mikronährstoffe die Antwort auf das Coronavirus und andere Pandemien sein könnten, sollte Wissenschaftler und Mediziner dazu ermutigen, sich weltweit um die Gewinnung neuer Kenntnisse über den therapeutischen Wert von Mikronährstoffen bei der Prävention von Infektionskrankheiten zu bemühen.

Konsequenzen dieser Erkenntnisse für die Gesundheitspolitik

Das Ausmaß der aktuellen Pandemie und die Dimension ihrer Auswirkungen auf die Gesundheit der Menschen ebenso wie die Wirtschaft macht diese Mikronährstoff-Studie zu einem entscheidenden Beitrag zur Kontrolle dieser Pandemie.

Dies ist besonders wichtig, da alle anderen Maßnahmen, die derzeit entwickelt werden, entweder mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sind oder es sich um neue und unerprobte Therapieansätze handelt. Die außerordentlich heftigen Reaktionen der internationalen Expertengemeinschaft auf die ersten registrierten Impfstoffe, die auf viralen Genen basieren, zeugen von dem Bewusstsein für die potenziellen Risiken, die

mit einer bevölkerungsweiten Einführung solch neuartiger Therapien verbunden sind.

Auf der Grundlage unserer Studienergebnisse steht nunmehr ein wissenschaftlich getesteter, auf Mikronährstoffen basierender Ansatz als wirksame – und sichere – Strategie zur Bekämpfung der aktuellen Pandemie zur Verfügung. Mit einer Blockierungsrate von nahezu 100 % stehen Mikronährstoffe der Wirksamkeit jedes Impfstoff-Konzepts in nichts nach – und das ohne unkalkulierbare Risiken. Darüber hinaus hat dieser Ansatz weitere entscheidende Vorteile im Bezug auf die

Kontrolle von Coronavirus-Infektionen, wie eine signifikante Abnahme der Verfügbarkeit von Virus-„Ankern“ auf der Oberfläche menschlicher Zellen sowie eine allgemeine Stärkung der Immunfunktion.

Ein auf Mikronährstoffen basierender Ansatz ermöglicht es auch der gesamten Bevölkerung, sich aktiv an der Prävention von Coronavirus-Infektionen zu beteiligen. Diese Mikronährstoff-basierte Strategie geht somit weit hinaus über das Tragen von Masken, Social Distancing und anderen passiven Maßnahmen.

REFERENZEN

1. Chakraborty I, Maity P. COVID-19 outbreak: Migration, effects on society, global environment and prevention. *Sci Total Environ.* 2020; 728: 138882. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.scitotenv.2020.138882>
2. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. Updated August 13, 2020. Accessed August 14, 2020.
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727-733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
4. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.* 2016; 3(1): 237-261. DOI:10.1146/annurev-virology-110615-042301.
5. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003; 426(6965): 450–454. DOI: 10.1038/nature02145.
6. Hofmann H, Pyrc K, van der Hoek L, Geier M, Berkhout B, Pohlmann S. Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005; 102(22):7988–7993. DOI: 10.1073/pnas.0409465102.
7. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV—A target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7, 226–236. DOI: 10.1038/nrmicro2090.
8. Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals. *Expert Opin Ther Targets.* 2017; 21(2): 131-143. DOI:10.1080/14728222.2017.1271415.
9. Ivanov V, Ivanova S, Niedzwiecki A, Rath M. Effective and save global public health strategy to fight the COVID-19 pandemic: Specific micronutrient combination inhibits Coronavirus cell-entry receptor (ACE2) expression, *J Cell Med & Nat. Health*, 2020.

10. Jariwalla RJ, Roomi MW, Gangapurkar B, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Suppression of influenza A virus nuclear antigen production and neuraminidase activity by a nutrient mixture containing ascorbic acid, green tea extract and amino acids. *Biofactors*. 2007; 31(1): 1-15.
DOI: 10.1002/biof.5520310101.
11. Jariwalla R, Gangapurkar B, Pandit A, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Micronutrient Cooperation in Suppression of HIV Production in Chronically and Latently Infected Cells. *Mol Med Rep*. 2010; 3(3): 377-85.
DOI: 10.3892/mmr_00000268.
12. Deryabin PG, Lvov DK, Botikov AG, et al. Effects of a nutrient mixture on infectious properties of the highly pathogenic strain of avian influenza virus A/H5N1. *Biofactors*. 2008; 33(2): 85-97.
DOI: 10.1002/biof.5520330201.
13. Barbour EK, Rayya EG, Shaib H, et al. Alleviation of histopathological effects of avian influenza virus by a specific nutrient synergy. *International J Appl Res Vet Med*. 2007; 5(1): 9-16.

MATERIAL UND METHODEN

Zellkulturen

Menschliche Epithelzellen der kleinen Atemwege (Alveolar-Epithelzellen, Small Airways Epithelial Cells, SAEC) von ATCC (American Type Culture Collection) wurden in einem Wachstumsmedium (ATCC) in Plastikkolben bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für das Experiment wurden die SAECs Passage 5-7 auf kollagenbehandelte 96-Well-Plastikplatten (Corning) in 100 µL Wachstumsmedium aufgetragen und 4-7 Tage lang zu einer konfluenten Zellschicht kultiviert.

Mikronährstoffzusammensetzung

Die verwendete Mikronährstoffkombination wurde am Dr. Rath Forschungsinstitut (San Jose, Kalifornien) entwickelt. Die Versuchsformulierung enthielt: 400 mg Quercetin, 400 mg Kreuzblütler(Cruciferae)-Extrakt, 300 mg Gelbwurzel(Curcuma)-Extrakt, 300 mg Grüntee-Extrakt (80 % Polyphenole) und 50 mg Resveratrol.

Supplementierung der Zellen

Die nach dem Protokoll der US-Pharmakopöe (USP 2040) in 0,1N HCl gelöste Mischung wurde als Stammlösung bezeichnet. Für die Versuche zur ACE2-Expres-

sion wurden die Zellen den angegebenen Konzentrationen der Mikronährstoff-Kombination in 100 µL/well im Wachstumsmedium für 3-7 Tage ausgesetzt. Die Anwendungskonzentrationen der Supplemente wurden als Millionstel Teile einer Stammkonzentration pro ml (µg/ml) angegeben.

ACE-2 ELISA assay

Die Kulturplatten-Wells (Vertiefungen) der Versuchsanordnung wurden zweimal mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und mit 3 % Formaldehyd/0,5% Triton X100/PBS-Lösung für 1 Stunde bei 4°C fixiert und dann viermal mit PBS gewaschen. 200 µL von 1 % Rinderserumalbumin (BSA, Sigma) in PBS wurde hinzugefügt. Die Platte wurde dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Zu 100 µl 1 %BSA/PBS wurden polyclonale Kaninchen-Anti-ACE-2-Antikörper (Sigma) für eine eineinhalbstündige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) hinzugefügt. Nach drei Waschzyklen mit 0,1 % BSA/PBS wurden die Vertiefungen (Wells) der Kulturplatten mit 100 µL Kaninchen-anti-IgG-Antikörpern, die mit Meerrettichperoxidase (HRP, Fa. Sigma) konjugiert waren, für 1 h bei Raumtemperatur (RT) versetzt. Nach

drei Waschzyklen mit 0,1%BSA/PBS wurde die verbleibende HRP-Aktivität durch Inkubation mit 100 µl TMB-Substratlösung (Fa. Sigma) für 20 min bei RT bestimmt, gefolgt von der Zugabe von 50 µl von 1N H₂SO₄ und optischer Dichtemessung bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Lesegerät (Molecular Devices). Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der experimentellen Kontrolle ohne Zusätze ausgedrückt (Mittelwert +/- SD, n=6). Der Mittelwert der nicht-spezifischen Kontrolle (Wells, die ohne Anti-ACE2-Antikörper inkubiert wurden) (n=6) wurde von allen Probenwerten abgezogen.

Blockierung von RBD (rezeptorbindende Domäne)

Dieser Assay wurde mit einem GenScript SARS-CoV-2 Surrogat-Virus-Neutralisierungs-Testkit durchgeführt, der entweder Antikörper oder Inhibitoren erkennen kann, die die Interaktion zwischen der rezeptorbindenden Domäne (RBD) des viralen Spike-Proteins und dem ACE2-Zelloberflächenrezeptor blockieren.

Alle Versuchsproben mit den angegebenen Konzentrationen und den Positiv- und Negativkontrollen (Teil des GenScript-Testkits) wurden mit dem Probenverdünnungspuffer mit einem Volumenverhältnis von 1:9 verdünnt. In getrennten Röhrchen wurde HRP-konjugierte RBD ebenfalls mit dem HRP-Verdünnungspuffer im Volumenverhältnis 1:99 verdünnt.

Die Bindungs-/Neutralisierungsreaktion wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Kurzzeitig wurden verdünnte Positiv- und Negativkontrollen sowie die Versuchsproben mit den angegebenen Konzentrationen mit der verdünnten HRP-RBD-Lösung im Volumenverhältnis 1:1 gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl der Positivkontrollmischung, der Negativkontrollmischung und der Mischungen der Testproben in die entsprechenden Wells mit immobilisiertem ACE2-Rezeptor gegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten viermal mit 260 µl/Well der 1 x Waschlösung gewaschen und TMB-Lösung in jede Vertiefung (100 µl/Well) gegeben. Die Platten wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zu 5 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden 50 µl/Well der Stammlösung zugegeben, um die Reaktion abzuschwächen, und die Absorption wurde sofort im Plattenleser bei 450 nm gemessen. Das Experiment wurde dreimal in Duplikaten durchgeführt. Die Werte werden in % der Kontrolle angegeben.