

Sachbericht zum Verwendungsnachweis des BMBF- Projektes „reCOVer“

Teilprojekt Humboldt-Universität zu Berlin

AG Dr. Dallmann / wiss. Mitarbeiter Dr. Weißhoff

**„Charakterisierung des Humanserum-Antikörperprofils von
Long-Covid Patienten mit Hilfe des DNA Aptamers BC007“**

Zeitraum: März 2022 – August 2023

vertraulicher Inhalt ausgeblendet

Teil I

Kurzbericht

In unserem Teilprojekt des „reCOVer“-BMBF-Projektes haben wir uns vorwiegend mit der Frage beschäftigt, welche der aktiven funktionellen Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (fGPCR-AAKs) von BC007 gebunden werden und an welcher Region der Autoantikörper das Aptamer bindet? Die größte Schwierigkeit besteht dabei darin, dass (i) fGPCR-AAKs nur einen Bruchteil der gesamten IgG-Fraktion im Serum ausmachen, (ii) die GPCR-AAKs sehr heterogen und von Mensch zu Mensch unterschiedlich sind und (iii) bisher weltweit noch keine fGPCR-AAKs aus Serum isoliert werden konnten bzw. keinerlei Daten darüber vorliegen. Somit ist es nicht möglich wie bei Wechselwirkungsuntersuchungen üblich, zwei reine Stoffe, ein Protein und ein Aptamer in Kombination, isoliert zu untersuchen. Alle Untersuchungen finden in einer hochkomplexen Matrix (Blutserum bzw. IgG-Fällung) statt, wodurch sich unterschiedliche Effekte überlagern können. Dieser Tatsache Rechnung tragend sind wir verschiedene Kompromisse eingegangen.

Mittels eines kommerziell erhältlichen, affinitätsgereinigten anti-human-ETA-Antikörpers, spezifisch für die 2. extrazelluläre Schleife des Rezeptors und humanem Probenmaterial konnten wir die Bindung von BC007 an F(ab')₂-Fragmenten der Autoantikörper in der Gelelektrophorese nachweisen.

Mischungen der gespaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe von mit BC007 vorbeschichteten ELISA-Platten untersucht. Die Spaltprodukte konnten so um die Bindung an BC007 konkurrieren. Mittels Anti-F(ab')₂- und Anti-Fc spezifischer Sekundärantikörper wurde die Bindung analysiert. Dabei waren die Ergebnisse beim monoklonalen Antikörper (stärkere Bindung der F(ab')-Fraktion an BC007) eindeutiger als beim humanen Probenmaterial.

Unterschiedliche GPCR-AAK können durch den Rattenkardiomyozytentest und entsprechende Blocking-Protokolle nachgewiesen werden. Möglich ist auch die Anwendung von speziellen ELISA für je einen Typ GPCR-AAK. Wir haben beide Methoden an gleichen Proben angewendet, verglichen und teils erhebliche Unterschiede festgestellt. Die ELISA liefern deutlich positivere Ergebnisse, d.h. AAK werden in vielen Fällen nachgewiesen, in denen der Kardiomyozytenassay negative Ergebnisse liefert. Wir führen dies darauf zurück, dass es funktional aktive und funktional inaktive AAK gibt, was bereits durch unterschiedliche räumliche Faltung der Proteine verursacht werden kann. Insofern ist der Kardiomyozytenassay als Nachweis für funktionell aktive AAK in seiner Aussagekraft zu bevorzugen.

An BC007 bindende Proteine haben wir durch eine Kombination von Gelelektrophorese/nanoHPLC-ESI-MS/MS mit einem eigens dafür modifizierten Cy3-BC007 detektiert. Der Vergleich von Gelen, die mit Coomassie bzw. Cy3-BC007 gefärbt wurden, zeigte deutliche Unterschiede in den gefärbten Banden. Die Methode ist somit geeignet den Kreis der bindenden Proteine einzuschränken, allerdings verbergen sich unter jeder Bande auf den Gelen mehrere Proteine. Der Abgleich der MS-Daten mit

Proteindatenbanken führt zu einer großen Zahl an Proteinsequenzen, die sehr nützliche Informationen zu wahrscheinlichen Bindungsdomänen liefern. So konnten wir ermitteln, dass Arginin-reiche Sequenzen in allen Proteinen enthalten sind, die wir als potenzielle Bindungsstellen für BC007 halten. Ausgehend von den Arginin-reichen Proteinsequenzen haben wir Peptide untersucht, die diese Aminosäuresequenzen enthalten und in jedem Fall nachgewiesen, dass die Peptide in der Lage waren die Faltung von BC007 aus der Random-Coil- in die Quadruplexstruktur zu induzieren. Das Aminosäuremuster Arg-Xxx/Yyy-Arg geht dabei als bevorzugte Sequenz aus der Analyse der Primärsequenzen von Immunglobulinen (Gamma-1, schwere Kette; Gamma-3, schwere Kette; Kappa, leichte Kette) hervor.

Die extrem geringe Konzentration der Autoantikörper in humanem Serum hat es von vornherein unwahrscheinlich gemacht, Unterschiede in den Serum-NMR-Spektren von Long-Covid- und Referenzproben zu finden. Trotzdem wurde NMR-spektroskopisch untersucht, ob Long-Covid-Marker, jedweder Substanzklassen in den Proben nachweisbar sind. Diese konnten erwartungsgemäß weder in ^1H - noch in ^{31}P -Spektren gefunden werden.

Im Zentrum aller Untersuchungen stand das Aptamer BC007, welches künftig als Wirkstoff gegen Long Covid eingesetzt werden soll, aber auch im Bereich der Analytik von GPCR-Autoantikörpern Verwendung finden kann. So haben wir mit BC007 modifizierte Sepharose-Säulen genutzt, um Antikörper aus Blutserum zu isolieren und so die Konzentration der AAK in den Proben für ELISA zu erhöhen.

----- Vertraulich-----

Vertraulich - Ende



Teil II

Eingehende Darstellung

Wir haben uns in unserem Teilprojekt des „reCOVer“-BMBF-Projektes mit der Frage beschäftigt, welche Autoantikörper von BC007 gebunden werden und an welcher Region der Autoantikörper das Aptamer bindet?

Wir sind aufgrund von langjährigen und zahlreichen Untersuchungen davon ausgegangen, dass BC007 ein potentieller Breitbandspektrum-Neutralisierer von funktionell aktiven Autoantikörpern gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (fGPCR-AAKs) ist und daher in Long Covid Heilversuchen des Projektpartners Dr. Hohberger (UK Erlangen) zu teils erheblichen Verbesserungen des Gesundheitszustandes der Patienten geführt hat [1]. In der Vergangenheit konnte von Wissenschaftlern der Firma Berlin Cures das Autoantikörper-neutralisierende Potenzial und die damit einhergehende therapeutische Wirkung von BC007 bei fGPCR-AAK-positiven herzkranken Hunden und Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie bereits gezeigt werden [2]. fGPCR-AAKs sind bekanntermaßen essentielle pathogene Faktoren bei Kardiomyopathien, bei denen der β 1-Adrenozeptor das Ziel ist [3]. Auch im Zusammenhang mit Long Covid spielen fGPCR-AAKs eine wichtige Rolle [4].

Wenn Adrenozeptoren Ziel eines Angriffs durch Autoantikörper werden, sind verschiedene Organe wie das Herz und das Gefäßsystem betroffen [2]. Die Entfernung solcher Autoantikörper durch Immunadsorption bei Patienten mit Herzinsuffizienz hat bereits einen signifikanten therapeutischen Nutzen gezeigt [5, 6]. Trotz großer therapeutischer Erfolge ist die Immunadsorption allerdings keine Option für die routinemäßige therapeutische Anwendung. Die In-vivo-Anwendung des Wirkstoffes BC007, dem Neutralisierer solcher fGPCR-AAKs, könnte jedoch eine Alternative sein [7,8]. Eine europaweite klinische Studie dazu ist im Juli 2023 angelaufen.

Obwohl viel über die mechanistische Funktionsweise von BC007 bekannt ist, bleiben entscheidende Fragen offen. Tatsächlich ist die Bindung von BC007 an Autoantikörpern nicht ausreichend geklärt und bleibt Gegenstand laufender Untersuchungen. Wir zeigen hier u.a., dass BC007 unterschiedliche GPCR-Autoantikörper, die sehr häufig im Serum von Long Covid Patienten gefunden werden im ELISA bindet und fGPCR aus Long Covid Seren im Kardiomyozytentest (KM-Test, Auftragsvergabe an Berlin Cures GmbH) neutralisiert.

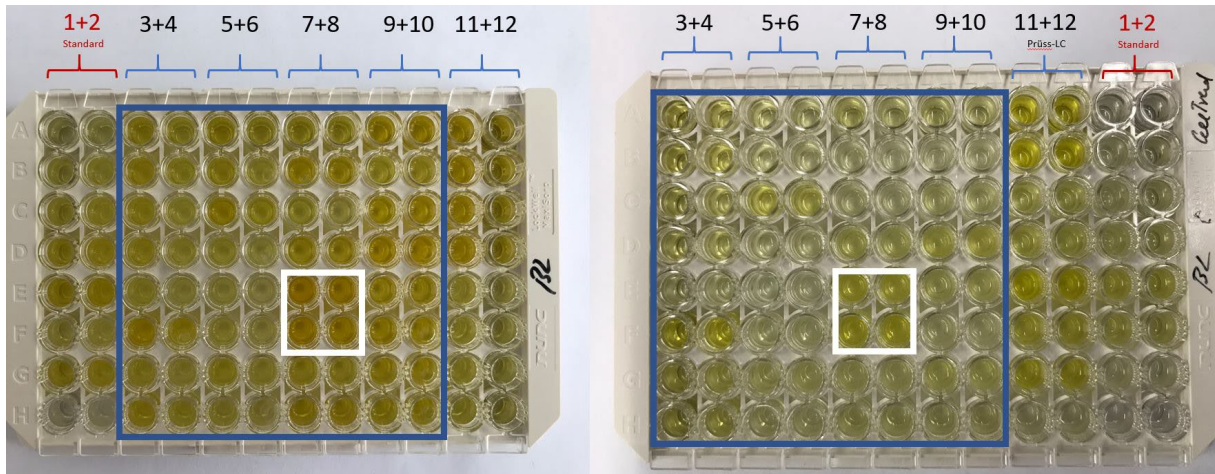
Als Methode zum Nachweis der Bindung kommt zusätzlich die Gelelektrophorese in Kombination mit einem im Rahmen dieses BMBF-Projektes hergestellten BC007-Fluoreszenzmarker (Cy3-BC007, 3'-Cy3-GGTTGGTGTGGTGG) zum Einsatz (beantragte Verbrauchsmaterialien – Fluoreszenzfarbstoffe Fisher

Scientific), welches die Bindung von BC007 an Autoantikörpern bzw. Proteinen im Allgemeinen verfolgbar macht.

Da GPCR-Autoantikörper nur in sehr geringen Konzentrationen im Blut vorhanden sind, wurden weitere kommerziell verfügbare Antikörper (beantragte Verbrauchsmaterialien – Vergleichsantikörper) wie der affinitätsgereinigte anti-human-Endothelin-Rezeptor-Antikörper (spezifisch für die 2. extrazelluläre Domäne, ETA-AB, Acris Antibodies GmbH, Deutschland), anti-ADRB1 Antikörper (Everest Biotech, UK), der Angiotensin II 1A Rezeptor-Antikörper (Bioss Antibodies, USA) und der anti-muscarinerge Acetylcholin Rezeptor-2-Antikörper (Abcam, UK) in die Untersuchungen einbezogen. Für den Nachweis von unterschiedlichen GPCR-Autoantikörpern wie β 1-, β 2-adrenerge Rezeptor-Antikörper und muscarinerge Cholin-M2 Rezeptor-Antikörper wurden ELISA-Testkits der CellTrend GmbH (beantragte Verbrauchsmaterialien – Celltrend ELISA) verwendet.

































Zusätzlich wurden Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten (beantragte Verbrauchsmaterialien Streptavidin coated plates von Thermo Fisher Scientific) mit biotinyliertem BC007 modifiziert, um die Möglichkeit des Einsatzes von BC007 in der Analytik der GPCR-Autoantikörper zu evaluieren.

----- Vertraulich-----



| | | | | | |
|---|--|--|--|--|--|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| ⋮ | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | | | |
|------------------------|----------|----------|----------|------------------------|------------------------|----------|----------|------------------------|---|---|---|---|
| Standard 1 2,5 U/ml | BH376_01 | BH376_02 | BH376_02 | Chari-LC 97+100+107 | Standard 1 2,5 U/ml | BH376_01 | BH376_02 | Chari-LC 97+100+107 |  |  |  |  |
| Standard 2 5 U/ml | BH378_01 | BH378_02 | BH378_02 | Chari-LC 97+100+107 | Standard 2 5 U/ml | BH378_01 | BH378_02 | Chari-LC 97+100+107 |  |  |  |  |
| Standard 3 10 U/ml | BH380_01 | BH380_02 | BH380_02 | Chari-LC 97 | Standard 3 10 U/ml | BH380_01 | BH380_02 | Chari-LC 97 |  |  |  |  |
| Standard 4 20 U/ml | BH384_01 | BH384_02 | BH384_02 | Chari-LC 97 | Standard 4 20 U/ml | BH384_01 | BH384_02 | Chari-LC 97 |  |  |  |  |
| Standard 5 40 U/ml | BH386_01 | BH386_02 | BH386_02 | Chari-LC 100 | Standard 5 40 U/ml | BH386_01 | BH386_02 | Chari-LC 100 |  |  |  |  |
| Negativ- Kontrolle | BH391_01 | BH391_02 | BH391_02 | Chari-LC 100 | Negativ- Kontrolle | BH391_01 | BH391_02 | Chari-LC 100 |  |  |  |  |
| Positiv- Kontrolle | FR051_01 | FR051_01 | FR051_01 | Chari-LC 107 | Positiv- Kontrolle | FR051_01 | FR051_01 | Chari-LC 107 |  |  |  |  |
| Verdün- Puffer | FR029_01 | FR029_01 | FR029_01 | Chari-LC 107 | Verdün.-Puffer | FR029_01 | FR029_01 | Chari-LC 107 |  |  |  |  |

Strips der Celltrend-Platte

Strips der BC007-Platte

Celltrend β 2-ELISA

BC007-ELISA

| Probe | Vorinkubation | Delta beats/min | Chronotropie | AAK- Befund | Celltrend |
|-------|---------------|--------------------|--------------|-------------------------------|------------------------|
| BH378 | Atropin | 25 | positiv | keine | β2, M2, β1(?) |
| | Atropin, A779 | 6 | keine | | |
| | Atropin, A779 | 3 | keine | | |
| BH380 | Atropin | 45 | positiv | β2 | β2, M2, β1 |
| | Atropin, A779 | 19 | positiv | | |
| | Atropin, A779 | 18 | positiv | | |
| BH381 | Atropin | 11 | positiv | keine | β2, M2, β1(?) |
| | Atropin, A779 | 7 | keine | | |
| | Atropin, A779 | 4 | keine | | |
| BH386 | Atropin | 27 | positiv | β2 | neg. für β2, M2, β1 |
| | Atropin, A779 | 34 | positiv | | |
| | Atropin, A779 | 21 | positiv | | |
| BH391 | Atropin | 38 | positiv | positiv, nicht blockbar | β2, M2, β1(?) |
| | Atropin, A779 | 16 | positiv | | |
| | Atropin, A779 | 4 | keine | | |
| FR29 | Atropin | -20 | negativ | positiv, nicht blockbar | β2, β1(?) |
| | Atropin, A779 | 29 | positiv | | |
| | Atropin, A779 | 16 | positiv | | |
| FR51 | Atropin | 18 | positiv | positiv, nicht blockbar | neg. für β2, M2, β1 |
| | Atropin, A779 | 8 | keine | | |
| | Atropin, A779 | 19 | positiv | | |

Vertraulich - Ende

NMR-spektroskopische Untersuchungen an Long-Covid-Patientenseren

Alle Serumproben aus Erlangen wurden sowohl hinsichtlich des AAK-Status mittels ELISA und zum Teil mittels Bioassay untersucht. Darüber hinaus wurden auch NMR-Spektren unterschiedlicher Atomkerne der Seren gemessen. Neben ^1H - sind dies ^{13}C - und ^{31}P -NMR Spektren. ^1H - und ^{31}P -NMR Spektren liegen von allen Serumproben vor. Offensichtliche Unterschiede zwischen Long-Covid Seren und den Referenzproben existieren nicht. Die Abbildungen 3a und 3b zeigen die starke Ähnlichkeit des Erscheinungsbildes der NMR-Spektren. Es sind alle Signale in allen Spektren vorhanden, lediglich die Intensität der Signale differiert von Spektrum zu Spektrum. Unabhängig von der Substanzklasse der Antikörper überrascht, dass obwohl die Patienten ganz unterschiedlicher Medikamentengabe unterliegen, die Medikamente bzw. Abbauprodukte nicht in den Spektren nachweisbar sind. Aus unserer Erfahrung wissen wir, dass sich dieser Befund nur über die geringe Konzentration von Medikamenten im Blutserum erklären lässt, wohingegen sich in zeitgleich genommenen und NMR-spektroskopisch gemessenen Urinproben oft Wirkstoffe bzw. deren Abbauprodukte nachweisen lassen.

Bisher unterscheiden sich die Spektren der Long-Covid-Proben nicht von den ^1H -NMR-Spektren von Referenzproben. In allen Spektren sind typische Serumbestandteile wie Lipide, Gruppen von Lipoproteinen, Lactat, Signale der Aminosäuren Leucin, Alanin, Valin, Prolin, Glutamin und Glutaminsäure, Citrat, Kreatin sowie Glukose und viele mehr identifizierbar. Bei den gezeigten Aufnahmen handelt es sich um Spektren, die mit der CPMG-Methode aufgenommen wurden, mit deren Hilfe sehr große Proteine weitestgehend unterdrückt werden. Insofern können mit dieser Methode auch theoretisch keine Antikörper detektiert werden, wovon man aber aufgrund der sehr geringen Konzentrationen bei gleichzeitig sehr hohem Molgewicht, verbunden mit einer entsprechenden Signalanzahl (rund 10.000 Protonensignale) ohnehin nicht ausgehen kann. Der Nachweis einzelner Antikörperspezies mittels NMR in Blutserum ist auch deshalb ausgeschlossen, da

die sehr hohe Molekülmasse der Proteine die Relaxationszeiten der Proteinprotonen stark beeinflusst und zu sehr großen Linienbreiten (Signalberge) führt.

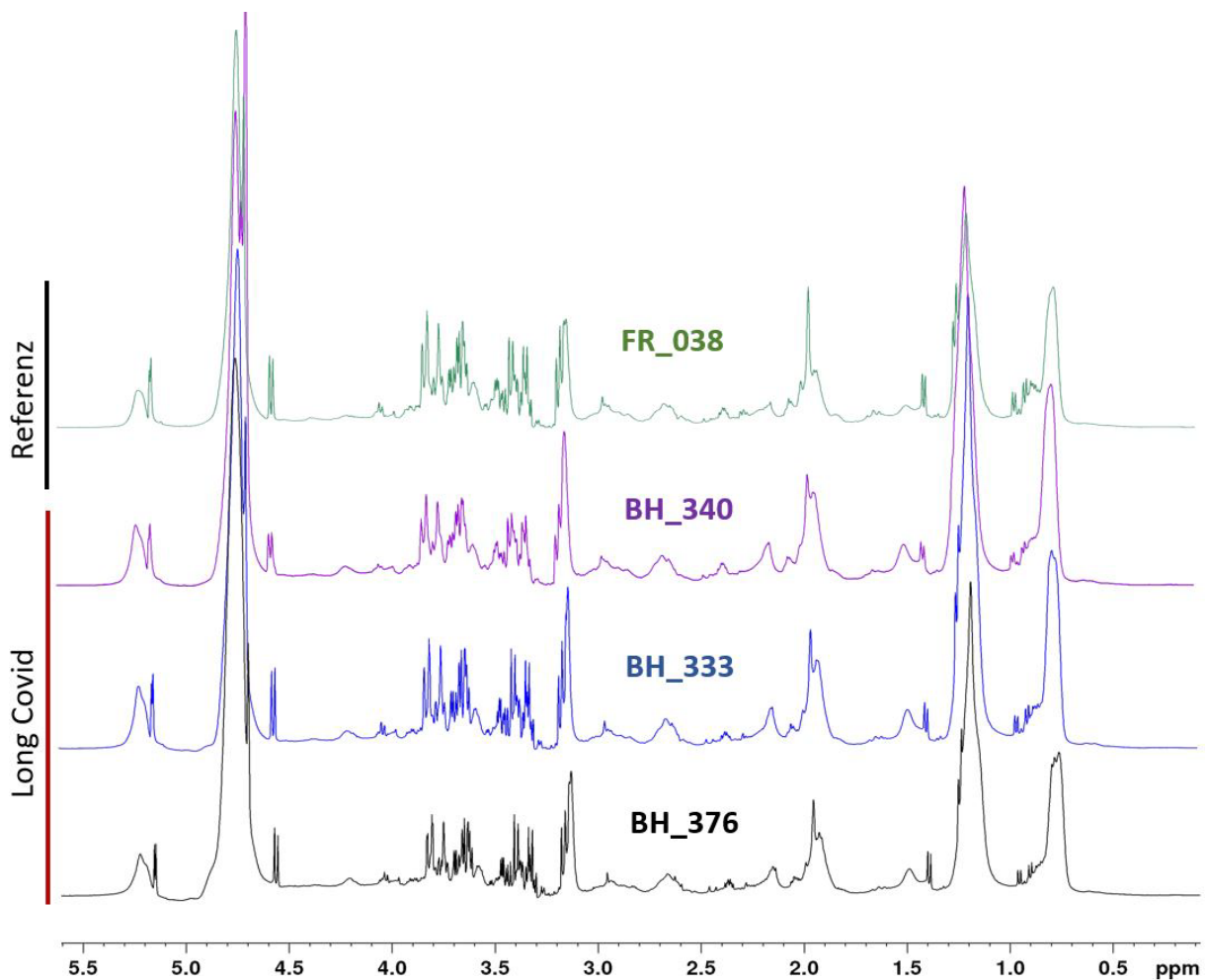


Abb. 3a: Ausschnitt aus 600 MHz ¹H-NMR Spektren von 3 Long-Covid Seren und einem Referenzserum bei 298K in 10% D₂O. Messequenz nach Carr-Purcel-Maiboom-Gill zur Messung von Blutproben.

Die Proben sind zudem schlicht zu komplex (Proteingemische), so dass wir uns auf niedermolekulare Verbindungen konzentrieren müssen. Es gibt viele Beispiele bei denen mittels NMR niedermolekulare Indikatoren für Krankheiten gefunden wurden. Als Beispiel sei das Vorhandensein von Cholin in Vollblut von Patienten mit akutem Koronarsyndrom genannt. Diese Untersuchungen wurden bereits vor Jahren in unserer Gruppe durchgeführt [10]. Ähnliche Beispiele waren die Motivation für unsere NMR-Messungen an Long-Covid Seren. Mittels Non-Target-Screening und Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis) könnten, wenn vorhanden, Long-Covid relevante, unbekannte Metaboliten detektiert und identifiziert werden (Abb. 3b). Nötig ist dafür, dass alle Proben auf gleiche Weise genommen, bearbeitet, präpariert, gemessen und ausgewertet wurden. Präparation, Messung und Auswertung lagen in unserer Hand und wurden nach definierten Protokollen durchgeführt. Die Auswertungen dauern an.

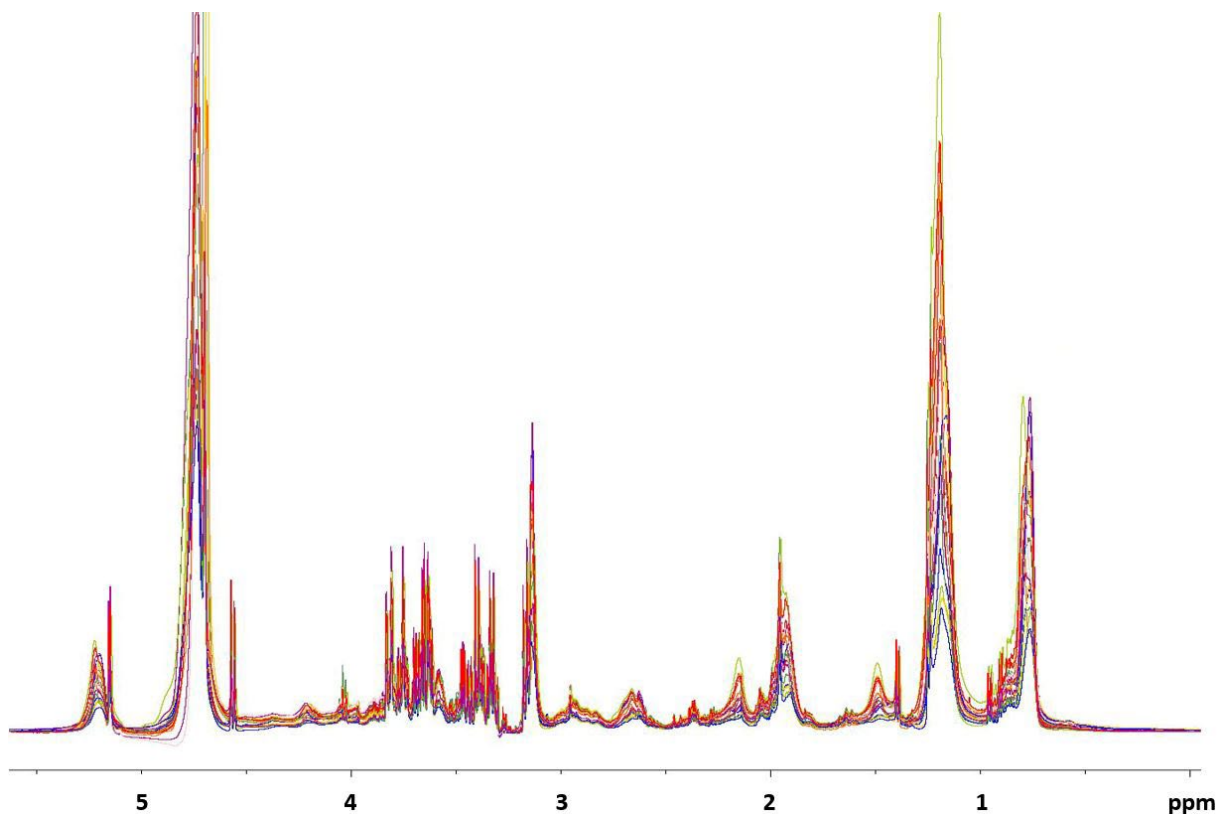


Abb. 3b: Ausschnitt aus 600 MHz ^1H -NMR Spektren von 10 Long-Covid Seren und 10 Referenzseren bei 298K in 10% D_2O .

Cy3-modifiziertes BC007 als Farbindikator in der Gelelektrophorese

BC007 mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu verbinden, sollte uns ermöglichen, einen Überblick über die Bindung von BC007 an Bestandteilen des Blutserums zu gewinnen. Dazu wurden Gele mit gleichen Proben hergestellt und anschließend mit dem Coomassie Standardfärbeverfahren und mit Cy3-BC007 gefärbt. Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für ein Long-Covid Serum, ein Eluat aus der Immunapherese eines Long-Covid Patienten und einzelne kommerziell verfügbare Antikörper. Wie üblich läuft ein Standardproteingemisch zu Vergleichszwecken mit. Die stärksten Banden gehören in beiden Fällen zum Albumin und zu den schweren und leichten Ketten der IgGs. Interessanter Weise fehlen im Falle der Cy3-BC007 Färbung die Banden des Standardproteingemisches, was darauf hindeutet, dass BC007 nicht prinzipiell an jedes Protein bindet, sondern konkrete Merkmale für die Wechselwirkung vorhanden sein müssen und auch sehr unterschiedliche Bindungsstärken auftreten. Auffällig sind des Weiteren, die starken Banden zum Eluat, während die Banden zu den Einzelantikörpern und zu der Erlanger Serumprobe nur schwach sind. Erwartungsgemäß werden im Eluat IgGs aufkonzentriert. Die Gele zeigen uns, dass Seren einzelner Patienten für diese Vorgehensweise weniger geeignet sind,

sondern eine Aufkonzentrierung der Antikörper durchgeführt werden sollte. Auch dafür eignet sich BC007 in hervorragender Weise, wie sich im bisherigen Verlauf des Projektes bereits zeigt.

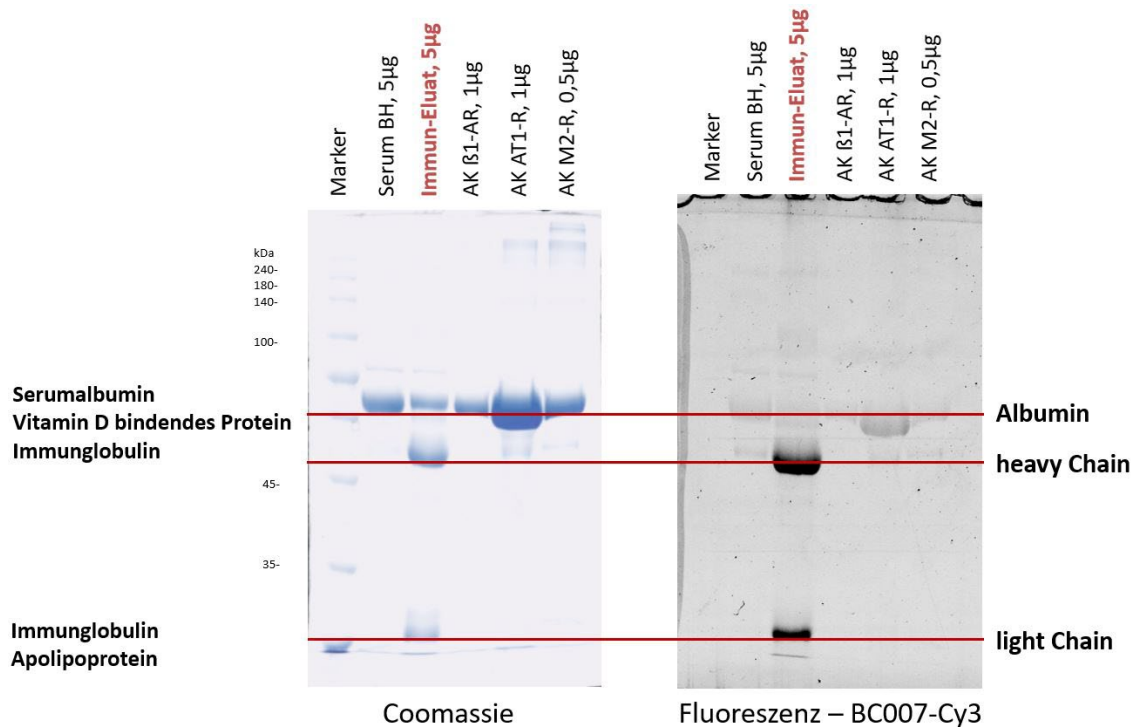


Abb. 4: SDS-Page mit 10% Acrylamid von Serum, Eluat und Einzelantikörpern. Die Banden wurden zum Vergleich mit Coomassie und einem BC007-modifizierten Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Die Charakterisierung der stärksten Banden erfolgte mittels Nano-HPLC-ESI-MS/MS.

Um bewerten zu können, ob die starken Banden in der Cy3-BC007 Färbung von der Wechselwirkung mit Antikörpern stammen, wurden die Banden mittels Nano-HPLC-ESI-MS/MS untersucht. Neben Serumalbumin und dem Vitamin D bindenden Protein, wurden Wechselwirkungen des Cy3-BC007-Farbstoffs mit leichten und schweren Ketten von IgG detektiert. Die HPLC liefert auch Aussagen zu den Aminosäuresequenzen der gefundenen Proteinfragmente, über welche auch die Zuordnung zu den Proteinen erfolgt. Aus den entsprechenden Datenbanken bekommen wir so auch wertvolle Informationen zu den möglichen Bindungsstellen von BC007.

Tabelle 3 zeigt die Peptidfragmente (rot hervorgehoben), die mittels MS/MS in den untersuchten Banden der Gelchromatografie gefunden wurden und mit deren Hilfe, entsprechende Proteine zugeordnet werden konnten. Die vollständigen Aminosäuresequenzen der Proteine, sowie soweit vorhandene Informationen über die dreidimensionale Struktur der Proteine in den Datenbanken lassen uns mögliche Bindungsstellen für BC007 identifizieren.

Tab. 3: Auswahl von in ESI-MSMS gefundene Peptidsequenzen und davon abgeleitete Proteine der stärksten Banden in der Gelelektrophorese von Seren und Eluat

Mascot – Vitamin-D-bindendes Protein

MKRVLVLLLLA VAFGHALERG RDYEKNKVCK EFSHLGKEDF TSLSLVLYSR
51 **KFPSGTFEQV** **SQLVKE**VVSL TEACCAEGAD PDCYDTRTSA LSAKSCESNS
101 PFPVHPGTAE CCTKEGLERK LCMAALKHQP QEFPTYVEPT NDEICEAFRK
151 DPKEYANQFM WEYSTNYGQA PLSLLVSYTK SYLSMVGSCC TSASPTVCFL
201 KERLQLK**HLS** **LLTTL**SNRVC **SQYAAYGEKK** **SRLSNLIKLA** QKVPTADLED
251 VLPLAEDITN ILSKCCESAS EDCMAKELPE HTVK**LCDNLS** **TKNSKFEDCC**
301 QEKTAMDFV CTFMPAAQL PELPDVELPT NKDVCDPGNT KVMDK**YTFEL**
351 **SRRTHLPEVF** **LSKVLEPTLK** SLGECCDVED STTCFNAKGP LLKK**ELSSFI**
401 **DKGQELCADY** **SENTFTEYK**K KLAERLKAKL PDATPTELAK LVNKHSDFAS
451 NCCSINSPPL YCDSEIDAEL KNIL

Mascot – Anti-Trypsin Inhibitor

1 MPSSVSWGIL LLAGLCCCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI
51 TPNLAEFAPS LYRQLAQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI
101 LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL
151 VDK**FLEDVVK** LYHSEAFVTN FGDTEEAKK**Q** **INDYVEKGTQ** GK**IVDLVKEL**
201 DRDTVFALVN YIFFKGKWER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV KVPMMKRLGM
251 FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGK**LQHLENE** **LTHDIITKFL**
301 **ENEDRRSASL** HLPKLSITGT YDLK**SVLGQL** **GITKVFSNGA** **DLSGVTEEAP**
351 **LKLSKAVHKA** **VLTIDEK**GTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE
401 QNTKSPLFMG KVVNPTQK

Mascot – Immunoglobulin domain-containing-like protein

1 MDLLHKNMKX LWFVLLLVAA PRWVLSQVQL QESGPGLVKP SETLSLTCVV
51 SGGSISSSNW WSWVRQPPGK GLEWIGEIYH SGSPNYNPSL KSR**VTISVDK**
101 SK**NQFS**LKLS **SVTAADTAVY** **YCAR**DTVRGG ECEPRHKPPC QEAEADAGA
151 AQDQQGARGP QSMRPGQEQG QGGRGFLICS VVLLLASTSA VPRAPLSLLF
201 VVLLPHILTA GKKEGRNFSV YH

In den stärksten Banden findet man erwartungsgemäß Proteine, die zu den Immunglobulinen zählen. Die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen liefern den bisher tiefsten Einblick in die Bindung des Autoantikörper-Neutralisierers. Mit jedem neuen, analysierten Serum verfestigt sich das Bild hinsichtlich der Bindungsstelle von BC007. Die bisherige Auswahl der Seren erfolgte nach Auswertung der Signalintensität in den ELISA sowie der bestimmten Autoantikörper im Bioassay. Wie der Abbildung 4 zu entnehmen ist, ist das Aufkonzentrieren der IgGs für die Gelelektrophorese/HPLS-ESI-MSMS deutlich vorteilhafter als die Originalseren zu nutzen. Im Folgenden wird dieser Schritt vorgestellt.

Mit GPCR-Autoantikörpern angereichertes Probenmaterial

Die GPCR-Autoantikörperanreicherung aus Probenmaterial von Long-Covid-Patienten erfolgte durch Modifikation von NHS-aktivierter Sepharose 4 Fast Flow (Cytiva Sweden AB, Schweden) mit Aminohexyl-BC007 in Anlehnung an Wallukat et al. [11], nachdem zuvor alle Proben NMR-spektroskopisch vermessen wurden (Abb. 3b).

Die Anreicherung erfolgte aus Long-Covid-Serum, Eluat aus einer Immunapheresebehandlung und Long-Covid-Immunglobulinfraktionen, die durch Ausfällen mit Ammoniumsulfat gewonnen wurden. Hier sind zwei Ziele zu unterscheiden. Einerseits soll die prinzipielle Frage beantwortet werden, ob BC007 ein universeller AAK-Neutralisierer ist und welche Bedingung mit dieser Eigenschaft verbunden ist. Für diese Aufgabe können und wurden Seren unterschiedlicher Herkunft vereint, um höhere IgG-Konzentrationen zu erreichen. Andererseits ist es das Ziel dieser Untersuchung Zusammenhänge zwischen Long-Covid Symptomen und den detektierten AAK herauszuarbeiten. Hierfür wurden die Einzelseren herangezogen. Dabei handelte es sich um Proben von Patienten mit Long-Covid-Symptomen und Referenzproben ohne Long-Covid Diagnose. Weitere Long-Covid-Proben wurden über Berlin Cures und die Charité bezogen. Experimentelle Daten zum Anreicherungsprozess mit Biotin-modifizierten Säulen sind beispielhaft in Tabelle 4 dargestellt.

Die Anreicherung von Autoantikörpern von Long-Covid-Patienten mittels Affinitätschromatografie an BC007-beschichteten Säulen erfolgte durch uns erstmalig, so dass keine Vergleiche zu Daten anderer Gruppen bzw. Literaturdaten für die Auswertung herangezogen werden konnten. Ein Vergleich bietet sich zu der Arbeit von Wenzel et al. [12] an, die das Aptamer 110-K3 für die Modifikation ihrer Säule genutzt haben und dabei hauptsächlich auf die Anreicherung von β 1-Adrenoceptor (ADRB1)-Autoantikörper abzielten.

Die Menge an IgG, die von der BC007-beschichteten Säule zurückgehalten wird, ist größer als die „Ausbeute“ bei der Säule mit dem Aptamer 110-K3. Beim Vergleich kann es aber nur um die Plausibilität der Methode gehen, denn die Blutproben stammen von unterschiedlichen Krankheitsbildern und das Aptamer 110-K3 wurde außerdem spezifisch für β 1-Adrenozeptoren selektiert. BC007 hingegen gilt als Breitbandspektrumneutralisierer von GPCR-Autoantikörpern, weshalb man erwarten durfte, dass mehr Immunglobuline gebunden werden als bei 110-K3. Genau diesen Effekt konnten wir beobachten. Diese Proben eignen sich für alle folgenden Untersuchungen (Gele, ESI-MSMS) besser als die herkömmlichen Serumproben.

Tab. 4: Antikörperanreicherung an BC007-Sepharose-Säulen aus Eluat einer Immunapherese und Serum

| Probenbezeichnung | IgG/Serum-Auftrag BC007-Säule [µg] bzw. [µl] | IgG Ausbeute [µg] | IgG Ausbeute [%] |
|--|---|-------------------|------------------|
| 1 Immun-Eluat | 10710 | 81 | 0.76 |
| 2 Immun-Eluat | 13513 | 123 | 0.91 |
| 3 Immun-Eluat | 14828 | 105 | 0.71 |
| 1-2 BH (S) – BH376, 378 | 1600 | 624 | - |
| 3-4 BH (S)- BH380, 384 | 1800 | 510 | - |
| 5-6 BH (S) – BH386, 391 | 1800 | 416 | - |
| 7-11 BH – BH392, 325, 333, 334, 335 | 4000 | 654 | - |
| 12-16 BH – BH340, 365, 367, 371, 373 | 4000 | 516 | - |
| 17-27 FR – FR051, 029, 038, 039, 040, 041, 043, 045, 049, 050 | 9000 | 1134 | - |

Der Proteingehalt einzelner Elutionsfraktionen wurde nach der Dialyse bei 280 nm mit dem Küvettenprogramm eines Nanodrop 2000c (Pepqlab) gemessen.

Bestimmung der BC007-Bindungsstelle an unterschiedlichen Autoantikörpern

Antikörper besitzen Molekülmassen von rund 150.000 Da, das entspricht ungefähr 1500 Aminosäuren. Die Bindungsstelle für BC007 kann nun entweder durch eine Reihe aufeinanderfolgender Aminosäuren definiert sein oder durch Aminosäuren, die durch die räumliche Faltung der Proteine das Bindungsepitop bilden. Es ist daher sinnvoll, die mögliche Bindung einzugrenzen.

Um zu analysieren, welcher Teil der GPCR-Autoantikörper immobilisiertes BC007 bindet, also der F(ab')₂- oder Fc-Teil, wurden unabhängig von den Long-Covid Proben, die zu Beginn des Projektes noch nicht zur Verfügung standen und darüber hinaus auch der geringen Konzentration von GPCR-Antikörpern in Patientenproben Rechnung tragend, verschiedene kommerziell-verfügbare Autoantikörper und eine mit Autoantikörpern angereicherte menschliche Probe verwendet und in ihre jeweiligen F(ab')₂- und Fc-Fraktionen gespalten.

Bindung von IgG-Fragmenten an immobilisiertes BC007

Mischungen der gespaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe der oben bereits beschriebenen BC007-beschichteten ELISA-Platten untersucht. Die Spaltprodukte konnten so um die Bindung an BC007 konkurrieren. Mittels anti-F(ab')₂-spezifischer und anti-Fc-spezifischer Sekundärantikörper konnte die Bindung analysiert werden. Die F(ab')₂/Fab-Fraktion eines gespaltenen anti-Human-Antikörpers bindet eindeutig an BC007.

Bei den Humanproben wurden jedoch beide Fraktionen gebunden, wobei die F(ab')₂-Fraktionen eine höhere Affinität zu BC007 aufweisen als die Fc-Fraktionen. Für die Fc-Bindung ist verbliebenes ungespaltenes Material verantwortlich. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Bindung von BC007 am F(ab')₂-Teil der Autoantikörper stattfindet. Wir sind von diesem Ergebnis insofern überrascht, da die Bindung am Fc-Teil eher zu einem universellen Antikörperneutralisierer passen würde.

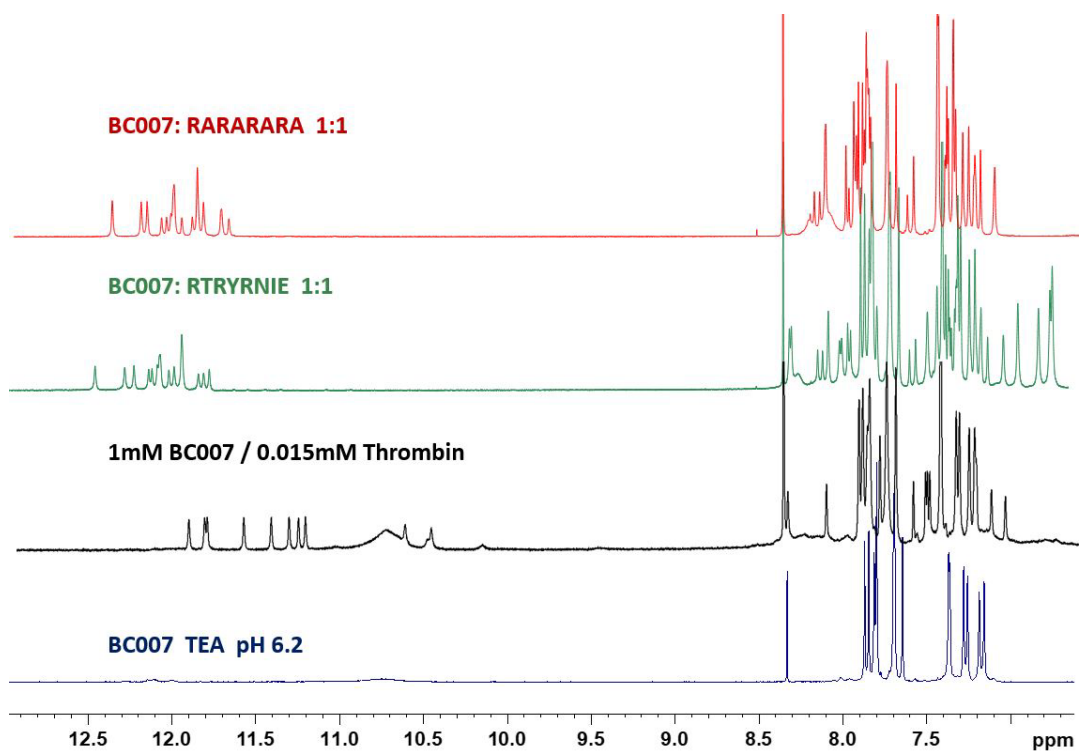
Einfluss der Deglykosylierung auf die Bindung von mit GPCR-Autoantikörper angereichertem Probenmaterial an immobilisiertes BC 007

Ein Teil der mit Autoantikörpern auf der BC007-Säule angereicherten Long-Covid Proben wurde unter Verwendung von PNGase F (BioLabs New England) deglykosyliert, um zu untersuchen, ob die Wechselwirkungen von BC007 mit dem Glykananteil der Antikörper zu tun haben oder durch Interaktion mit dem Proteinteil verursacht werden. Wichtig ist bei diesem Schritt, dass die Proteine nicht denaturiert werden, da anderenfalls die GPCR-Autoantikörperbestimmung nicht mehr funktioniert. Der Erhalt der biologischen Aktivität lässt sich mit Hilfe des Rattenkardiomyozytentests nachweisen, indem entsprechende Proben gemäß des Herstellerprotokolls behandelt werden und parallel die Kontrollproben ohne das Enzym PNGase F.

Der Einfluss von Glykanen auf die GPCR-Autoantikörperbindung an immobilisiertem BC007 wurde durch die Deglykosylierung von GPCR-Autoantikörper getestet (Abbildung 8). Um die Funktionalität des β 1-Autoantikörpers aufrechtzuerhalten, wurde die PNGase F-Behandlung bei Raumtemperatur statt der vorgeschlagenen Denaturierungstemperatur von 50 °C durchgeführt und die Inkubationszeit stark verlängert. Die vollständige Deglykosylierung kann unter diesen Bedingungen allerdings nicht garantiert werden. Dennoch verringerte dieses Deglykosylierungsverfahren die Bindung des β 1-Autoantikörper-angereicherten Probenmaterials an immobilisiertem BC007.

Unter den Bedingungen für die vollständige Deglykosylierung band sogar die native Kontrollprobe fast nicht mehr an BC007, ebenso wenig wie die deglykosylierte Probe. Eine unspezifische Bindung an unbeschichtetem BC007-Kunststoffmaterial trat nach dieser Behandlung ebenfalls nicht auf. Die unspezifische Bindung an unbeschichteten, aktivierten Wells war im Vergleich zu den spezifischen Bindungsergebnissen gering.

----- Vertraulich-----



Vertraulich - Ende

Schlussbemerkungen

Im Folgenden werden die Herausforderungen des Projektes diskutiert. Es zeigte sich, dass sich GPCR-Autoantikörpern trotz zahlreicher Versuche nicht ohne weiteres hochgereinigt aus dem Serum von Long Covid Patienten gewinnen lassen. Ganz generell gestaltet sich der Zugriff auf GPCR-Autoantikörpern schwierig. Dieser Mangel erschwert die Untersuchungen zur Wechselwirkung und Avidität von BC007 gegenüber diesen Autoantikörpern. Insbesondere wenn man wie wir die Wechselwirkungen auf atomarer Ebene beschreiben möchte, wie es durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie möglich wäre.

Bereits Du et al. berichteten darüber, dass sie versuchten, spezifische β 1-Autoantikörper von Patienten mit Herzinsuffizienz zu reinigen, aber die Konzentration von β 1-Autoantikörpern war so niedrig, dass es unmöglich war, in vitro-Experimente durchzuführen [13]. Sie bedienten sich daher der Hybridom-Technik, d.h. der Fusionierung von antikörperproduzierende B-Zellen mit Myelomzellen, die dann monoklonale Antikörper produzieren. Diese Technik stand uns allerdings nicht zur Verfügung. Letztlich gelang es ihnen durch die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die zweite extrazelluläre Schleife des β 1-Adrenorezeptors, den Einfluss von β 1-Autoantikörpern auf T-Lymphozyten zu untersuchen [13]. Strukturelle Aussagen wurden hingegen nicht getroffen. Es wird somit klar, dass im

Projekt zwischen der Bestimmung von Autoantikörpern in Seren einzelner Patienten mit Long-Covid Symptomen für die Diagnostik einerseits und dem Aufkonzentrieren von Autoantikörpern aus vereinten Seren mehrerer Long-Covid Patienten für die Charakterisierung der Wechselwirkung von BC007 mit GPCR-Autoantikörpern andererseits unterschieden werden musste. Als weitere Quelle für GPCR-Autoantikörper dienten Eluate von Long-Covid Patienten, die sich einer Immunapherese unterzogen haben. Solche Proben konnten wir über die Berlin Cures GmbH beziehen.

Es ist bekannt, dass die in Tieren hergestellten, kommerziell verfügbaren Autoantikörper Unterschiede zu den verwandten humanen Autoantikörpern zeigen [6]. Aufgrund dieser bekannten Unterschiede zwischen in Tieren erzeugten und natürlich vorkommenden Autoantikörpern [7] und auch wegen der niedrigen AAK-Konzentration beim Menschen [13] war es sinnvoll und notwendig die Wechselwirkungen zwischen BC007 und funktionellen GPCR-Autoantikörpern durch Kombination aus indirekten Messungen und den Einsatz von mit Autoantikörper-angereichertem Probenmaterial zu charakterisieren.

Neben der geringen Konzentration der Autoantikörper ist die Heterogenität des humanen Autoantikörpermaterials problematisch. In der frühen Immunantwort zielt eine Vielzahl von IgG-Antikörpern mit geringer Avidität auf eine Vielzahl unterschiedlicher Epitope eines Zielmoleküls ab. Erst die anschließende klonale Selektion erhöht die Avidität der Antikörper, die eine begrenzte Anzahl von Epitopen zeigen [14]. Da man nicht viel über den Krankheitszustand einzelner Patienten in Bezug auf den Immunstatus weiß, kann eine hohe Varianz des Autoantikörpermaterials sogar innerhalb von Individuen auftreten, wenn die Proben in verschiedenen Krankheitsstadien entnommen wurden.

Die Reinigung von AAKs gegen ein Epitop, wie es von Hagemann et al. für das β -Amyloid-Peptid berichtet wurde, kann mit polyklonalen menschlichen Autoantikörpern durch Chromatofokussierung erreicht werden [15]. Mittels 2D-Geltrennung wurde eine erstaunlich hohe Diversität spezifischer Autoantikörper sichtbar, ein Befund, der sich mit unseren 2D-Gelanalysen von Long Covid Seren deckt. Die Autoantikörper-Reinigung, die eine Vielzahl von präparativen Schritten umfasst, birgt das Risiko, die native Konformation zumindest von Teilen der Moleküle zu verlieren. Dieses Phänomen wurde intensiv an therapeutischen Antikörpern untersucht [16]. Dabei können Moleküle entstehen, die modifizierte Strukturen tragen und dadurch analytische Messungen stören bzw. verfälschen können. Um die biologische Wirksamkeit unserer Proben zu kontrollieren, haben wir den Einfluss auf die Schlagfrequenz im Kardiomyozytenassay vor und nach den Reinigungsschritten getestet (Vergabe von Aufträgen –Kardiomyozytenassay).

Auf der anderen Seite sind monoklonale Antikörper, falls verfügbar, ein gutes Werkzeug, um die Avidität zu untersuchen. Dies wurde ebenfalls in der Arbeit von Du et al. gezeigt, die die Avidität der Bindung der β 1-Autoantikörper an den β 1-Adrenozeptor untersuchten [13]. Dabei wurden Unterschiede in der Avidität zwischen den β 1-Autoantikörpern humanen Ursprungs und den in

Mäusen generierten monoklonalen β 1-Autoantikörper festgestellt. Die durchschnittliche Affinität des humanen Ursprungsmaterials, das wiederum aus einem großen Pool verschiedener Einzelantikörper bestand, war im Vergleich zu den monoklonalen Maus-anti- β 1-Autoantikörper um den Faktor 30 geringer [13]. Ob dies der Grund für Unterschiede in den ELISA-Ergebnissen bei der Analyse von GPCR-AAK tierischer oder menschlicher Herkunft ist, ist bisher nicht klar, wird aber für sehr wahrscheinlich gehalten [7].

Heterogene IgG-Fractionen aus Patientenmaterial, wie die polyklonalen Amyloid-Autoantikörper [15] und solche aus unseren Experimenten (β 1-AAK-Aktivität in verschiedenen Eluatfraktionen), könnten daher hochgereinigten bzw. monoklonalen AAK überlegen sein, auch wenn sie nur indirekte Aviditätsmessungen zulassen. Diese rohen Fraktionen sind näher an der Realität als das monoklonale Werkzeug. Es besteht jedoch die Gefahr, dass Autoantikörpermoleküle mit hoher Affinität, die in einem komplexen Pool von Bindern mit niedriger Affinität verborgen sind, nicht erkannt werden können. Obwohl mit geringerer Affinität bindet BC007 auch AAK-freie IgGs. Kommerziell erhältliche IgG-Subtypen binden an ELISA-Platten, die mit immobilisiertem BC007 beschichtet wurden. Diese Phänomene können spezifische Ergebnisse verfälschen.

Dennoch wurde die Bindung von gespaltenen Autoantikörperproben an immobilisiertem BC007 getestet. Fluoreszenzmarkiertes Cy3-BC007 zeigt in der Gelelektrophorese eine höhere Affinität zu den schweren Ketten der AAKs als zu den leichten Ketten. Dies trifft auch auf F(ab')₂-Fragmente von anti-Human-Antikörpern für immobilisiertes BC007 im Vergleich zu entsprechenden Fc-Fragmenten zu. Es wurde bereits gezeigt, dass BC007 bei der Messung von in Fab- und Fc-Fragmenten gespaltenen funktionalen GPCR-AAK und anschließend mit Anti-Fab-Antikörper-vermittelten rekonstituierten Antikörpern das Fab-Fragment stärker reagiert. Wir haben gespaltene Teile verschiedener funktionaler GPCR-AAK getestet, um festzustellen, welcher Teil am stärksten an immobilisiertes BC007 bindet. Ein polyklonaler Antikörper, der in Kaninchen gegen die zweite Schleife des humanen ETA-Rezeptors gezüchtet wurde und der im Bioassay eine hohe Aktivität und im 2D-Gel eine mäßige Proteinviefalt zeigte, wurde mit gereinigten humanen GPCR-AAK-Proben verglichen. Dabei zeigte sich, dass der F(ab')₂/Fab-Teil an BC007 bindet.

Da BC007 nicht ein spezifisches Molekül, sondern mehrere IgG-Moleküle eingefangen hat, wurde eine schrittweise Elution des eingefangenen IgG von der BC007-Säule durchgeführt. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, welche Elutionsfraktion funktionell aktive β 1-AAKs enthielt. Diese Experimente wurden analog zu Shimidzu et al. durchgeführt [12]. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden auf AAK-Aktivität getestet. Hier zeigte sich, dass bei den Eluatfraktionen mit 0,5 M KSCN die Aktivität wiedergewonnen wurde, die größtenteils durch den spezifischen β -Rezeptorblocker Bisoprolol (Tabelle 2) blockiert worden sein könnte.

Diese Experimente belegen die Inhomogenität der funktionellen GPCR-AAK-Proben in Bezug auf die β 1-AAK in der Probe. Die Untersuchungen wurden durch analog für β 2-AAK an Long-Covid Proben durchgeführte Experimente bestätigt. Weiterhin weist menschliches IgG-Material ein ausgeprägtes Glykosylierungsmuster auf, welches ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden darf. Es wurde sogar berichtet, dass Autoantikörper ein Glykosylierungsmuster zeigen, das sich von den übrigen IgGs unterscheidet, wie es bei anti-citrullinierten Protein-Antikörpern von Patienten mit rheumatoider Arthritis der Fall war [17]. Die Glykane sind zumindest teilweise an der Bindung von mit GPCR-AAK angereicherten Proben an BC007 beteiligt, wie aus unserem Bindungsexperiment ersichtlich ist, das deglykosyliertes mit nativem Probenmaterial vergleicht (Abb. 4). Die Deglykosylierung verringerte die Bindung von β 1-AAK-Probenmaterial an BC007. Monoklonale Antikörper zeigen andere Glykanprofile als menschliches Material [18, 19]. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass unterschiedliche Glykanprofile unterschiedliche Bindungsverhalten fördern. Zusammengenommen stützen insbesondere die Bindungsexperimente mit gespaltenem IgG/funktionalen AK die Hypothese, dass BC007 eine GPCR-AAK-neutralisierende Wirkung hat.

Wir haben alle im Projektantrag beschriebenen Aufgaben mit Ausnahme der Untersuchungen von Patientenproben nach BC007-Behandlung durchgeführt. Leider konnte die klinische Studie mit BC007 beim Erlanger Kooperationspartner nicht wie erwartet innerhalb des Bewilligungszeitraumes starten, so dass bis zum Ende der Projektlaufzeit keine Proben von mit BC007 behandelten Long Covid Patienten vorlagen. Für die nähere Zukunft konzentrieren wir uns auf die Entwicklung eines ELISA-Tests für Long Covid, der auf den berichteten Ergebnissen des reCOVer-BMBF Projektes beruht (vertrauliche Informationen in diesem Bericht). Die Finanzierung dafür steht, so dass wir im Laufe des nächsten Jahres, dann auch mit Proben von mit BC007 behandelten Long Covid Patienten der im Juli 2023 angelaufenen klinischen Studie, uns voll auf diesen Bereich fokussieren werden. Der Assay soll kommerziell vermarktet werden, die entsprechende Patentierung verhindert die Veröffentlichung der Ergebnisse gemäß NKBF/NABF.

Literatur

- [1] Hohberger, B., Harrer, T., Mardin, Ch., Kruse, F., Hoffmanns, J., Rogge, L., Heltmann, F., Moritz, M., Szewczykowski, Ch., Schottenhamml, J., Kräter, M., Bergua, A., Zenkel, M., Gießl, A., Schlötzer-Schrehardt, U., Lämmer, R., Herrmann, M., Haberland, A., Göttel, P., Müller, J., Wallukat, G. Neutralization of Autoantibodies Targeting G-Protein-Coupled Receptors Improves Capillary Impairment and Fatigue Symptoms After COVID-19 Infection. **2021**, *Frontiers in Medicine*, 8, <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.754667>
- [2] Wess, G., Wallukat, G., Fritscher, A., Becker, N.-P., Wenzel, K., Müller, J., et al. Doberman pinschers present autoimmunity associated with functional autoantibodies: A model to study the autoimmune background of human dilated cardiomyopathy. **2019**, *PLOS One*, 14(7): e0214263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214263>
- [3] Luft, F.C. Activating autoantibodies and cardiovascular disease. **2013**, *Physiol. Bethesda*, 28, 254–261. doi:10.1152/physiol.00014.2013
- [4] Wallukat, G., Hohberger, B., Wenzel, K., Fürst, J., Schulze-Rothe, S., Wallukat, A., Hönicke, A.-S., Müller, J. Functional autoantibodies against G-protein coupled receptors in patients with persistent Long-COVID-19 symptoms. **2021**, *J. Transl. Autoimmun.*, 4, doi: 10.1016/j.jtauto.2021.100100
- [5] Müller, J., Wallukat, G., Dandel, M., Bieda, H., Brandes, K., Spiegelsberger, S., Nissen, E., Kunze, R., Hetzer, R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. **2000**, *Circulation.*, 101, 385–391.
- [6] Dandel, M., Wallukat, G., Englert, A., Lehmkuhl, H.B., Knosalla, C., Hetzer R. Long-term benefits of immunoabsorption in $\beta(1)$ -adrenoceptor autoantibody-positive transplant candidates with dilated cardiomyopathy. **2012**, *Eur J Heart Fail.*, 14, 1374–1388. doi:10.1093/eurjhf/hfs123
- [7] Müller, J., Haberland, A., Becker, N.-P., Wenzel, K., Wallukat, G., Göttel, P., et al. The DNA-based therapeutic agent BC007 completely neutralizes agonistic autoantibodies directed against β 1-Adrenoceptors: results of a phase 1 trial. **2018**, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 71, A645. doi:10.1016/S0735-1097(18)31186-0
- [8] Müller, J. The DNA-Based Drug BC 007 Neutralizes Agonistically Acting Autoantibodies Directed Against G Protein–Coupled Receptors Successful Mode of Action Demonstrated in Clinical Phase 1 Trial. **2019**, *Chemistry today*, 37(2), 65-67.
- [9] Löbel, M.; Grabowski, P.; Heidecke, H.; Bauer, S.; Hanitsch, L.G.; Wittke, K.; Meisel, C.; Reinke, P.; Volk, H.D.; Fluge, Ø., Mela, O., Scheibenbogen, C. Antibodies to β adrenergic and muscarinic cholinergic receptors in patients with Chronic Fatigue Syndrome. **2016**, *Brain Behav. Immun.*, 52, 32–39.
- [10] Danne, O.; Möckel, M.; Lueders, C.; Mügge, C.; Zschunke, G. A.; Lufft, H.; Müller, C.; Frei, U.

Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes. **2003**, *Am. J. Cardiol.*, 91 (9), 1060-1067.

- [11] A: Wallukat, G.; Haberland, A.; Berg, S.; Schulz, A.; Freyse, E.-J.; Dahmen, C. et al.
The first aptamer-apheresis column specifically for clearing blood of β 1-receptor autoantibodies. **2012**, *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.*, 76, 2449–2455.
- [12] Wenzel, K.; Schulze-Rothe, S.; Müller, J.; Wallukat, G.; Haberland A.
Difference between beta1-adrenoceptor autoantibodies of human and animal origin-Limitations detecting beta1-adrenoceptor autoantibodies using peptide based ELISA technology. **2018**, *PLoS One.*, 13, e0192615. doi:10.1371/journal.pone.0192615.
- [13] Shimizu, F.; Mossmann, H.; Himmelspach, K.; Takamiya, H.; Vogt, A.
Separation of anti-dinitrophenyl antibodies according to affinity by fractionated elution from immunoadsorbent using thiocyanate. **1978**, *Res. Exp. Med. Z. Gesamte Exp. Med. Einschl. Exp. Chir.*, 173, 165–171.
- [14] Properties of human IgG subclasses. [cited 29 Nov 2018]. Available: Properties of human IgG subclasses. [cited 29 Nov **2018**].
Available: <https://ednieuw.home.xs4all.nl/IgGsubclasses/subkl23.htm>
- [15] Haberland, A.; Holtzhauer, M.; Schlichtiger, A.; Bartel, S.; Schimke, I.; Müller, J. et al.
Aptamer BC 007 - a broad spectrum neutralizer of pathogenic autoantibodies against G-protein-coupled receptors. **2016**, *Eur. J. Pharmacol.*, doi:10.1016/j.ejphar.2016.06.061
- [16] Wildner, S.; Huber, S.; Regl, C.; Huber, C.G.; Lohrig, U.; Gadermaier, G.
Aptamers as quality control tool for production, storage and biosimilarity of the anti-CD20 biopharmaceutical rituximab. **2019**, *Sci Rep.*, 9, 1111. doi:10.1038/s41598-018-37624-1
- [18.] Hafkenscheid, L.; Bondt, A.; Scherer, H.U.; Huizinga, T.W.J.; Wuhrer, M.; Toes, R.E.M.; et al.
Structural Analysis of Variable Domain Glycosylation of Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis Reveals the Presence of Highly Sialylated Glycans. **2017**, *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 16, 278–287. doi:10.1074/mcp.M116.062919
- [19.] Böhm, E.; Seyfried, B.K.; Dockal, M.; Graninger, M.; Hasslacher, M.; Neurath, M.; et al.
Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. **2015**, *BMC Biotechnol.*, 15, 87. doi:10.1186/s12896-015-0205-1