

Ein fruktosyliertes Peptid, abgeleitet von  
einem Kollagen II T-Zell-Epitop zur  
Langzeitbehandlung von Arthritis (FIA-CIA) in  
Mäusen

von Clara Wenhart

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

Ein fruktosyliertes Peptid abgeleitet von einem  
Kollagen II T-Zell-Epitop zur Langzeitbehandlung von  
Arthritis (FIA-CIA) in Mäusen

von Clara Wenhart  
aus München

München 2023



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt bei: advanceCOR GmbH, Martinsried

Mentor: Prof. Dr. Götz Münch



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Susanne K. Lauer

Tag der Promotion: 22. Juli 2023



*Für die Tiere dieser Studie*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
1.	RHEUMATOIDE ARTHRITIS BEIM MENSCHEN .....	3
1.1.	<i>Epidemiologie und Risikofaktoren .....</i>	3
1.1.1.	<i>Risikofaktor Genetik .....</i>	3
1.1.2.	<i>Risikofaktor Umwelteinflüsse .....</i>	6
1.1.3.	<i>Risikofaktoren Alter und Geschlecht .....</i>	8
1.2.	<i>Pathologie und Pathophysiologie der RA .....</i>	9
1.2.1.	<i>Gelenkentzündung .....</i>	10
1.2.2.	<i>Ausprägungen der RA in verschiedenen Organsystemen .....</i>	12
1.2.3.	<i>Antikörper in der RA .....</i>	15
1.3.	<i>Therapie der RA .....</i>	17
2.	ANTIGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS-MODELLE IN DER MAUS .....	21
2.1.	<i>Kollagen induzierte Arthritis (Collagen induced arthritis, CIA) .....</i>	21
2.2.	<i>Fibrinogen induzierte Arthritis (FIA) .....</i>	23
2.3.	<i>Weitere Antigen-induzierte Arthritismodelle .....</i>	24
3.	PEPTIDE ALS THERAPIEANSATZ IN DER RHEUMATOIDEN ARTHRITIS .....	27
3.1.	<i>Wirkungsweise von Peptiden .....</i>	27
3.2.	<i>Peptide als Therapeutika .....</i>	28
3.2.1.	<i>Vor- und Nachteile von Peptiden als Therapeutika .....</i>	28
3.2.2.	<i>Modifizierung von Peptiden für die Nutzung als Therapeutika .....</i>	30
3.2.3.	<i>Antigen-spezifische Peptide als Therapeutikum bei autoimmunen Erkrankungen – Wiederherstellung der Anergie .....</i>	31
<b>III.</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>35</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>
1.	DAS MODELL DER FIA-CIA ALS KRANKHEITSMODELL FÜR DIE RA .....	59
2.	PEPTID 90578 ALS THERAPIEMÖGLICHKEIT FÜR DIE RA .....	65
3.	AUSBLICK .....	71
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>75</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>77</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>

<b>IX. ANHANG .....</b>	<b>93</b>
<b>X. DANKSAGUNG.....</b>	<b>95</b>

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ACPA	Anti-citrullinierte Peptid Antikörper
ASIT	Allergen spezifische Immuntherapie
CCP	cyclic citrullinated peptide
CIA	collagen-induced arthritis
CII	Kollagen Typ II
CFA	Complete Freund's Adjuvans
CVD	Cardiovascular disease, Kardiovaskuläre Erkrankung
DMARD	Disease-modifying anti-rheumatic drug, unterteilt in cs=konventionell synthetisch, b=biologisch und ts=targeted synthetisch
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EULAR	European League against Rheumatism
Fc	Fragment crystalline
FIA-CIA	Fibrinogen und Kollagen induzierte Arthritis
HLA	Human Leucocyte Antigen (synonyme Bezeichnung des MHC beim Menschen)
IFA	Incomplete Freund's Adjuvans
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILD	Interstitial lung disease
i.p.	intraperitoneal
JAK	Janus Kinase
KCS	Keratokonjunktivitis sicca
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MTX	Methotrexat
NETose	Spezielle Form des programmierten Zelltodes bei Granulozyten
PAD	Peptidyl Arginin Deaminase
PTPN22	Protein tyrosin phosphatase non-receptor type 22
PUK	periphere ulzerative Keratitis
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Rezeptor Aktivator des Nuklear Faktors $\kappa$ B Ligand
RF	Rheumatoider Faktor (IgM oder IgG Antikörper gegen Fc-Teil anderer Antikörper)
SE	Shared Epitope
Th-xx-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle



## I. EINLEITUNG

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine weltweit vorkommende Autoimmunerkrankung. Sie ist in allen Bevölkerungsgruppen verteilt und führt zu einer massiven Beeinträchtigung der Betroffenen. Neben den typischen Symptomen einer Arthritis wie Gelenksteifigkeit und -schwellungen, beinhaltet das Krankheitsbild der RA auch extraartikuläre Manifestationen mit Einflüssen auf das Herz-Kreislauf-System, die Lunge, die Haut und die Augen. Auch tumoröse Entartungen können die Folge einer Erkrankung mit RA sein.

Die Ätiologie der RA ist auch heutzutage noch Gegenstand intensiver Forschung. Da die RA ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen ist, gibt es nicht einen einzigen Auslöser, sondern viele kleine Faktoren, die in ihrer Gesamtheit schlussendlich zur Ausprägung des Krankheitsbildes führen. Genetik, Umwelteinflüsse oder auch das Geschlecht und das Alter tragen hierzu bei. Die bei der RA entstehenden Autoantikörper, die zur Diagnostik und Prognose des Krankheitsverlaufs verwendet werden, sind nicht gegen ein einzelnes Antigen gerichtet, sondern gegen vielerlei unterschiedliche Proteine. Der Rheumafaktor (RF), ein Antikörper, der gegen den Fc-Teil von IgM und IgG-Antikörpern gerichtet ist, und die anti-citrullinierte Peptid Antikörper (ACPAs), spielen hier die Hauptrollen. Es gibt jedoch auch eine Vielzahl von Antikörpern gegen andere Proteine, wie zum Beispiel Kollagen, die auf die Krankheitsentwicklung und -ausprägung einen Einfluss haben.

Therapeutisch werden bei der rheumatoiden Arthritis sogenannte „Disease modifying anti-rheumatic-Drugs“, DMARDs, angewendet. Wie der Name bereits verrät, können diese die Krankheit nur „modifizieren“, aber nicht ihre Ursache bekämpfen oder sie dauerhaft heilen. Trotz vieler Bemühungen gibt es immer noch Patienten, die nicht oder nur schlecht auf Therapieversuche ansprechen.

Aus diesem Grund wird weiterhin intensiv nach neuen Therapiemethoden für die RA gesucht. Ein Augenmerk wird hierbei auch auf Peptide als Therapeutika gesetzt. Bei manchen Autoimmunerkrankungen, vor allem allergischen Erkrankungen, werden diese bereits erfolgreich eingesetzt. Das Wirkprinzip basiert hierbei auf einer Induktion einer Anergie. Dies bedeutet, dass die bei der Autoimmunerkrankung vorherrschende fehlgeleitete Immunantwort normalisiert wird. Insofern kann die Induktion einer Anergie mittels Peptiden eine ursächliche Behandlung von Autoimmunerkrankungen bedeuten.

Daneben besitzen Peptide einige Vorteile gegenüber Proteinen und monoklonalen Antikörpern als Therapeutika. Dies sind unter anderem ihre gute Verträglichkeit und die geringeren Herstellungskosten.

Zur Untersuchung neuer Therapieansätze eignen sich insbesondere bei komplexen Erkrankungen wie der RA vor allem Tierversuche. Es existiert bis dato kein Tiermodell, das die RA in all ihren Facetten abbilden kann, doch es gibt unterschiedliche Modelle, die jeweils einzelne Aspekte der Pathophysiologie nachstellen. In der Literatur stark vertreten ist das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) in der Maus. Vorherrschende Autoantikörper sind hier allerdings im Gegensatz zur humanen RA, anti-Kollagen-Antikörper, die dort nur bei einem Teil der Patienten eine Rolle spielen.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Mausmodell der RA zu testen und zu etablieren, welches durch die Ausprägung verschiedener Antikörper, wie zum Beispiel auch ACPAs (Anti-citrullinierte Peptid Antikörper), eine Immunantwort ähnlich der im Menschen vorweist. Gleichzeitig soll die Möglichkeit der Schmerzmittelapplikation im Tiermodell gegeben sein – sowohl im Sinne des Tierwohls, als auch zur Annäherung an die Situation im Menschen.

Ein weiteres Ziel ist dann, im etablierten Krankheitsmodell, verschiedene Peptide zu testen, die eventuell geeignet sind, die Arthritis-Symptome zu verbessern. Diese Peptide sollen im Sinne einer Antigen-spezifischen Therapie die Immunantwort regulieren und im besten Fall wieder normalisieren.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Rheumatoide Arthritis beim Menschen

#### 1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren

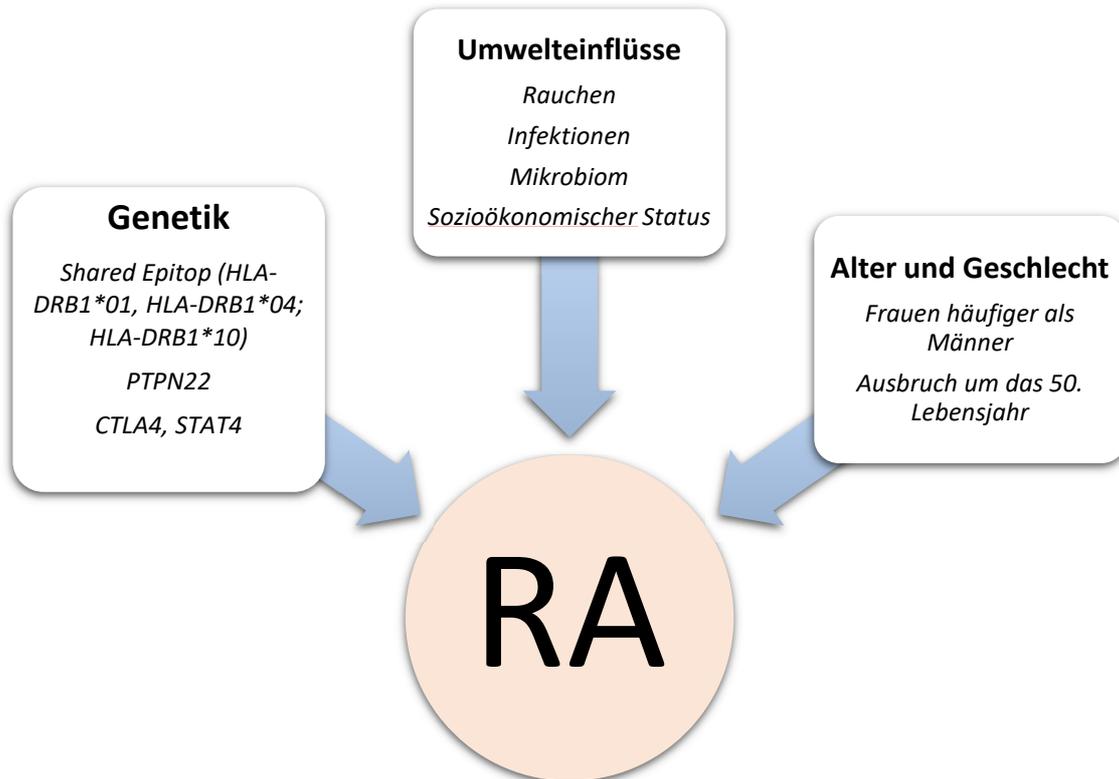
Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der am häufigsten vorkommenden Autoimmunerkrankungen beim Menschen. Die Verbreitung dieser Erkrankung ist populationsabhängig. So wird für die meisten Populationen Europas und Nordamerikas eine Prävalenz zwischen 0,5% und 1% der Gesamtbevölkerung geschätzt. Dagegen stehen Länder wie China oder Japan, in denen mit 0,2 - 0,3% ein recht niedriges Vorkommen der RA verzeichnet ist. Andererseits gibt es aber auch Populationen, wie zum Beispiel die der amerikanischen Ureinwohner, bei denen eine deutlich höhere Prävalenz von fünf bis fast sieben Prozent vorherrscht (SILMAN & PEARSON, 2002; FERUCCI et al., 2005).

Die Lebenserwartung von RA-Patienten ist gegenüber der Gesamtpopulation verringert. So sterben diese 3-10 Jahre früher als der Durchschnitt der generellen Population, abhängig vom Schweregrad und Lebensalter in dem die Erkrankung zuerst aufgetreten ist (ALAMANOS & DROSOS, 2005).

Die RA ist ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen. Verschiedene Faktoren wie Genetik, Alter und Geschlecht, aber auch Umwelteinflüsse wie das Rauchen oder ein niedriger sozioökonomischer Status können im Zusammenspiel zur Entwicklung einer RA führen (ALAMANOS & DROSOS, 2005) (vgl. **Abbildung 1**).

##### 1.1.1. Risikofaktor Genetik

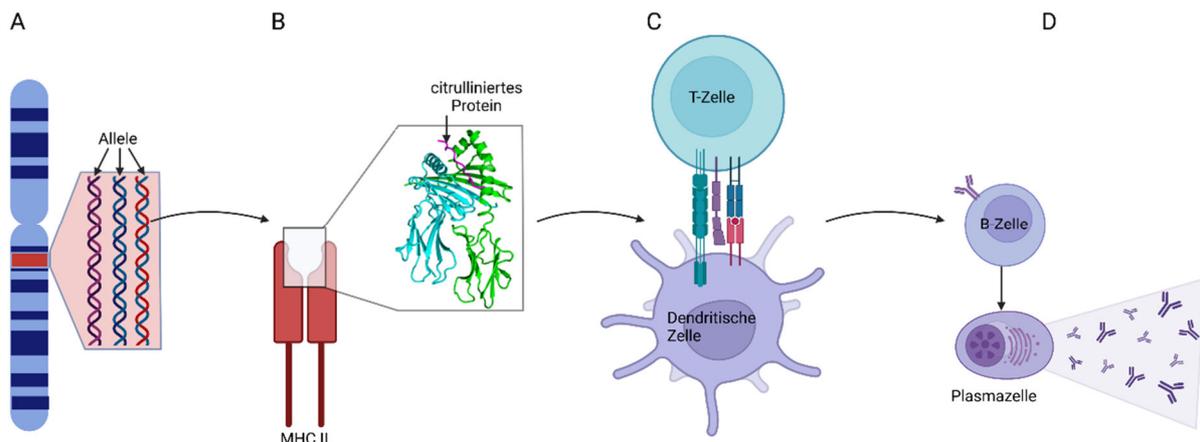
Mehrere epidemiologische Studien in verschiedenen Ländern berichten von einer familiären Häufung von RA-Fällen. Zwillingsstudien bestätigen einen genetischen Zusammenhang der Entwicklung von RA (SILMAN et al., 1993; MACGREGOR et al., 2000). Die Erblichkeit schwankt von 20% für seronegative (kein Rheumatoider Faktor, RF) bis zu 40-65% bei seropositiver (mit Bildung von RF) Erkrankung (FRISELL et al., 2016).



**Abbildung 1, Risikofaktoren der RA**

Ein Zusammenspiel aus genetischen Faktoren, Umwelteinflüssen, Alter und Geschlecht führt letztendlich zur Entstehung einer rheumatoiden Arthritis

Es sind bereits über 100 Gen-Loci identifiziert worden, die auf die eine oder andere Weise Einfluss auf die Entwicklung und Ausprägung der RA haben können (SMOLEN et al., 2016). Der wichtigste genetische Faktor ist dabei vermutlich das sogenannte Shared Epitope (SE) (GREGERSEN et al., 1987). Als SE wird eine Reihe von Allelen innerhalb des Gens für den Major Histocompatibility Complex (MHC) bezeichnet, welche zufolge haben, dass in der Peptidbindungstasche dieses Komplexes strukturelle Ähnlichkeiten zu finden sind (RAYCHAUDHURI et al., 2012; DEANE et al., 2017). Diese als HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*04 und HLA-DRB1\*10 benannten Allele (HLA steht für Human Leucocyte Antigen; diese Bezeichnung wird beim Menschen synonymhaft für den MHC verwendet) bedingen - nach Translation in Proteine - Ähnlichkeiten in der Aminosäure-Sequenz der Antigen-Bindungstasche, welche die Bindung von citrullinierten Peptiden und Proteinen ermöglichen. Die Präsentation von an den MHC-II-Rezeptor von Antigen-präsentierenden Zellen gebundenen citrullinierten Peptiden an T-Zellen führt wiederum zu einer Protein-spezifischen T-Zell-Antwort, in deren Folge auch B-Zellen aktiviert werden und die für die Entwicklung von RA mitverantwortlichen anti-citrullinierte Peptid Antikörper (ACPAs) gebildet werden (KURKO et al., 2013) (vgl. **Abbildung 2**).



**Abbildung 2, Shared Epitop Hypothese**

**A** Verschiedene Allele (HLA-DRB1\*01, HLA-DRB1\*04, HLA-DRB\*10) innerhalb des Gens (rot) für den MHC-Komplex.

**B** Nach Translation in Proteinen führen diese zu einer Expression von MHC-II-Molekülen, welche strukturelle Ähnlichkeiten in der Bindungstasche haben, die eine Bindung von citrullinierten Peptiden/Proteinen ermöglichen.

**C** Spezifische T-Zellen binden an das citrullinierte Protein in der Bindungstasche des MHC-II und werden hierdurch aktiviert.

**D** Es kommt außerdem zu einer Aktivierung von B-Zellen, die sich zu Plasmazellen differenzieren und anti-citrullinierte Peptid-Antikörper (ACPAs) ausschütten

Fortschritte in der Genom-Sequenzierung konnten neben dem SE weitere genetische Risikofaktoren für die Entwicklung einer RA definieren. PTPN22 (Protein tyrosin phosphatase non-receptor type 22) zum Beispiel ist ein negativer Regulator für die T- und B-Zell-Aktivierung. Ein Polymorphismus in dem Gen, das dieses Enzym codiert, führt zu einer Verschlechterung der negativen Rückkopplung auf diese Zellen und damit zu einer niedrigeren Schwelle für die T- und B-Zell Aktivierung (RIECK et al., 2007; ZHANG et al., 2011). Gleichzeitig wird durch das dysfunktionale PTPN22 die Funktion von regulatorischen T-Zellen gestört (VANG et al., 2013).

Neben diesem konnten mittels Meta-Analysen Zusammenhänge von genetischen Variationen von entzündlichen Faktoren wie CTLA4, STAT4, verschiedenen Interleukinen und einigen anderen zur Entwicklung von rheumatoider Arthritis hergestellt werden (CHATZIKYRIAKIDOU et al., 2013).

### 1.1.2. Risikofaktor Umwelteinflüsse

Neben der Genetik spielen auch äußere Einflüsse eine Rolle in der Pathogenese der RA. Rauchen, Infektionen aber auch die Ernährung und der sozioökonomische Status können eine Entstehung von RA begünstigen (s. **Abbildung 1**).

Das Rauchen kann zum Beispiel eine Ursache für vermehrte Produktion von ACPAs sein, insbesondere in Verbindung mit dem Allel HLA-DR1. In Verbindung mit HLA-DR4 erhöht das Rauchen das Risiko, an RA zu erkranken. Der zugrunde liegende Mechanismus ist eine durch die Umwelt-Stressfaktoren induzierte post-translationale Modifizierung von mukosalen Proteinen durch das Enzym Peptidyl Arginin Deaminase (PAD) (MCINNES & SCHETT, 2011). Das PAD führt zu einer Desaminierung der Aminosäure Arginin zu Citrullin. Durch das Rauchen wird die Expression von PAD in der Lunge erhöht, was zu einem erhöhten Vorkommen an citrullinierten Peptiden in Bronchoalveolar-Lavage-Zellen von Rauchern führt (MAKRYGIANNAKIS et al., 2008). Diese durch die Citrullinierung „fremd“ gewordenen Peptide/Proteine werden von Antigen-präsentierenden Zellen erkannt und das Immunsystem reagiert mit der Ausbildung von Antikörpern (ACPs) gegen diese Proteine.

Bestimmte Infektionen können ebenfalls mitverantwortlich für den Ausbruch der RA sein. Epstein-Barr-Virus, Parvoviren, Cytomegalovirus, aber auch Borrelien und *Escherichia coli* werden eine Verbindung zu RA zugeschrieben (ALAMANOS & DROSOS, 2005; MCINNES & SCHETT, 2011). Die Mechanismen davon sind noch nicht eindeutig geklärt, eine Rolle wird der Entwicklung von Immunkomplexen durch die (teilweise persistierenden) Infektionen zugeschrieben (BALANDRAUD et al., 2004). Auch eine dysfunktionale Toll-like Rezeptor (TLR)-vermittelte Immunantwort kann an der Verbindung von Infektionen und RA beteiligt sein (ARLEEVSKAYA et al., 2020). Ein besonderes Augenmerk wird in dieser Hinsicht auch auf Infektionen mit *Porphyromonas gingivalis* gerichtet. *P. gingivalis* exprimiert PAD und ist somit direkt an der Citrullinierung von Peptiden beteiligt. Versuche mit Mäusen konnten zeigen, dass eine orale Infektion mit *P.gingivalis* die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) verschlimmert und die Expression von citrullinierten Peptiden im Synovium erhöht (JUNG et al., 2017). Andere Mechanismen wie die Induktion von NETose, Osteoklastenentwicklung und einer proinflammatorischen Th17-Zell Antwort sind ebenfalls an der Rolle von *P. gingivalis* in der Entstehung und Progression der RA beteiligt (PERRICONE et al., 2019).

Neben pathogenen Mikroorganismen kann auch die Gesamtheit der Mikroorganismen im Körper – das sogenannte Mikrobiom - insbesondere bei Autoimmunerkrankungen wie der RA

Auswirkungen auf Erkrankungen haben (KISHIKAWA et al., 2020). So konnte gezeigt werden, dass es nennenswerte Unterschiede im Darm- und Mund-Mikrobiom zwischen RA-Patienten und Kontroll-Personen gibt (ZHANG et al., 2015). Außerdem haben RA-Patienten offenbar eine geringere Diversität an Mikroorganismen (ZHONG et al., 2018) und ein geringeres Vorkommen von *Bacteroides spp.* und *Bifidobacterium spp.* (VAAHTOVUO et al., 2008). Das Mikrobiom wird beeinflusst durch die Ernährung, sodass es sich lohnen kann, sowohl bei der Entstehung als auch bei der Therapie der RA einen Blick auf diese zu werfen (SINGH et al., 2017). Manche Lebensmittel haben einen pro- oder anti-inflammatorischen Einfluss durch die entstehenden Metaboliten beim mikrobiellen Abbau (CORAS et al., 2020). In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass RA-Patienten im Gegensatz zu Gesunden weniger Obst, Gemüse und Vollkornprodukte, dafür aber mehr zugesetzte Zucker und gesättigte Fettsäuren konsumierten (BERUBE et al., 2017; BAREBRING et al., 2018; COMEE et al., 2019). Die sogenannte „Kreta-Diät“, oder auch „Mittelmeerküche“ (Mediterranean Diet, MedDiet), die aus der regelmäßigen Aufnahme von frischem Gemüse und Obst, Nüssen, Samen und der eher geringen Aufnahme an rotem Fleisch, Süßigkeiten und Milchprodukten besteht, ist assoziiert mit einer Schmerzreduktion und besseren physischen Funktion in RA-Patienten (JOHANSSON et al., 2018)

Zuletzt ist auch ein niedriger sozioökonomischer Status als Umweltfaktor mit der Entwicklung der RA assoziiert und geht oft mit einer schlechteren Prognose einher (ALAMANOS & DROSOS, 2005). Der Grund hierfür liegt einerseits darin, dass Personen aus einem sozial schwachen Hintergrund häufiger rauchen, weniger Zugang zu hochwertigen Lebensmitteln haben und damit eher eine Mangelernährung bestimmter Mikronährstoffe entwickeln und öfter an chronischen Krankheiten, wie Asthma oder Diabetes leiden. Dies sind Faktoren, die bei der Entstehung von RA eine Rolle spielen können. Andererseits haben RA-Patienten mit niedrigem sozioökonomischem Status eher eine spätere Diagnosestellung, begrenzten Zugang zu ärztlicher Versorgung und können sich im schlimmsten Fall die oft teuren Medikamente nicht leisten, insbesondere wenn sie keine Krankenversicherung haben (VERSTAPPEN, 2017).

### 1.1.3. Risikofaktoren Alter und Geschlecht

Nach Genetik und Umweltfaktoren sind auch Alter und Geschlecht Risikofaktoren für die Entstehung einer RA. Die meisten epidemiologischen Studien beschreiben eine Häufung von Krankheitsausbrüchen um das 50. Lebensjahr herum. Frauen sind zudem bis zu viermal anfälliger für RA, als Männer (LINOS et al., 1980; SYMMONS et al., 1994; ALAMANOS & DROSOS, 2005).

Der Verdacht liegt nahe, dass die Prädisposition für RA in Frauen durch die Geschlechtshormone vermittelt ist. Östrogen und Prolaktin gelten als proinflammatorische Hormone, während Androgene wie Testosteron eher anti-inflammatorisch wirken (CUTOLO et al., 2002). So erklärt sich auch, dass eine frühe Entwicklung der Monatsblutung und unregelmäßige Monatszyklen (welche meist ein Symptom von starker Hormonproduktion sind) mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von RA assoziiert sind (KARLSON et al., 2004; OLIVER & SILMAN, 2009). Eine Schwangerschaft scheint dagegen einen gewissen therapeutischen Effekt auf eine bestehende RA zu haben, sodass es zu einer Verbesserung der Symptome, oder in einzelnen Fällen sogar zu einer Remission kommt. Allerdings wird dieser Effekt nach der Geburt wieder aufgehoben, und es kommt in der postpartalen Phase sogar zu vermehrtem Wiederaufflammen der RA (INCE-ASKAN & DOLHAIN, 2015).

Das Stillen, insbesondere über längere Zeit (KARLSON et al., 2004; PIKWER et al., 2009) und die Nutzung von oralen Kontrazeptiva (HAZES et al., 1990; BRENNAN et al., 1997) sollen ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Entstehung einer RA haben. Hier gibt es jedoch auch gegenteilige Meinungen, die den Nutzen von oralen Kontrazeptiva als Schutz gegen RA anzweifeln (DEL JUNCO et al., 1985; HANNAFORD et al., 1990).

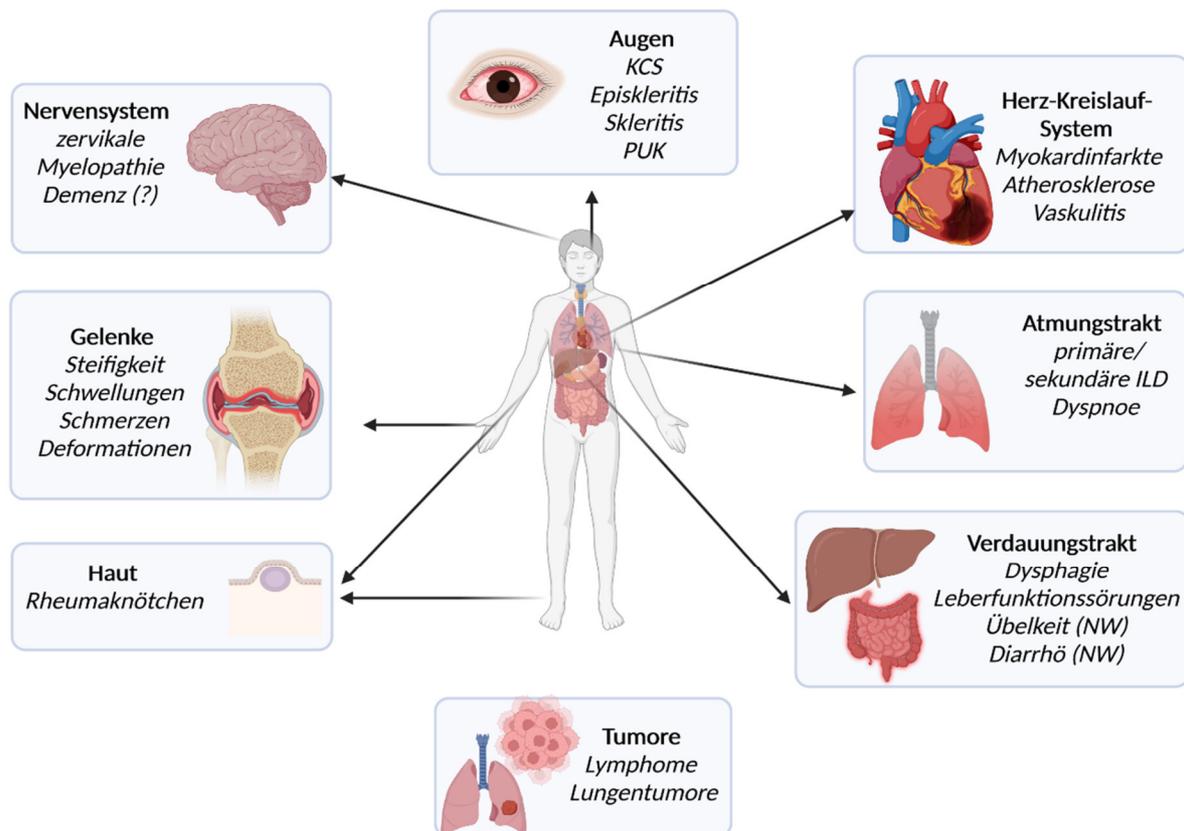
Östrogen scheint auch nicht der einzige Einflussfaktor zu sein, der Frauen anfälliger für RA macht. Die Gabe von exogenem Östrogen als therapeutischem Ansatz für post-menopausale Frauen konnte das Risiko, an RA zu erkranken, oder den Schweregrad einer bestehenden RA nicht signifikant beeinflussen (KARLSON et al., 2004; WALITT et al., 2008). Es bleibt also weiterhin unklar, inwiefern der weibliche Zyklus und die zugehörigen Hormone Einfluss auf die Entwicklung und die Ausprägung von rheumatoider Arthritis nehmen.

Die Geschlechterprädisposition bei Frauen nimmt mit zunehmendem Alter der Arthritis-Patienten ab und tendiert dann zu einer fast 1:1-Rate (YAZICI & PAGET, 2000). Warum sich die RA größtenteils in Patienten ab dem 50. Lebensjahr zeigt und die Prävalenz mit fortschreitendem Alter zunimmt, ist nicht abschließend geklärt. Bei Frauen spielt vermutlich

das Einsetzen der Menopause und die damit verbundene Änderung der Hormonspiegel eine Rolle in der Entwicklung der RA (WLUKA et al., 2000). Die Zunahme an Arthritis-Fällen mit steigendem Alter könnte ein Symptom der sogenannten Immunoseneszenz sein. Das Immunsystem unterliegt im Alter einem Wandel. Die Involution des Thymus, Defekte bei der Apoptose oder Zytokin-Imbalancen sind die Folge dieses Wandels, der es anfällig für Autoimmunkrankheiten macht (YAZICI & PAGET, 2000).

### 1.2. Pathologie und Pathophysiologie der RA

Im Vordergrund der Pathologie der RA steht die Entzündung von Gelenken, die mit Schmerzen und Bewegungseinschränkungen verbunden ist. Es gibt aber auch einige extraartikuläre Manifestationen der Krankheit, insbesondere im kardiovaskulären System, in der Lunge und im Nervensystem (**Abbildung 3**). Serologisch zeichnet sich die RA durch die Entwicklung von Autoantikörpern gegen verschiedene Proteine aus, die sowohl als diagnostisches, als auch als prognostisches Mittel verwendet werden.



**Abbildung 3, Pathologie der Rheumatoiden Arthritis**

Neben den Gelenken sind durch die RA auch Herz-Kreislauf-System, Atmungs- und Verdauungstrakt, das Nervensystem, die Augen und die Haut betroffen und Tumore können entstehen. NW=Nebenwirkung von Medikamenten; ILD=Interstitielle Lungenerkrankung; KCS=Keratokonjunktivitis sicca; PUK=periphere ulzerative Keratitis

### 1.2.1. Gelenkentzündung

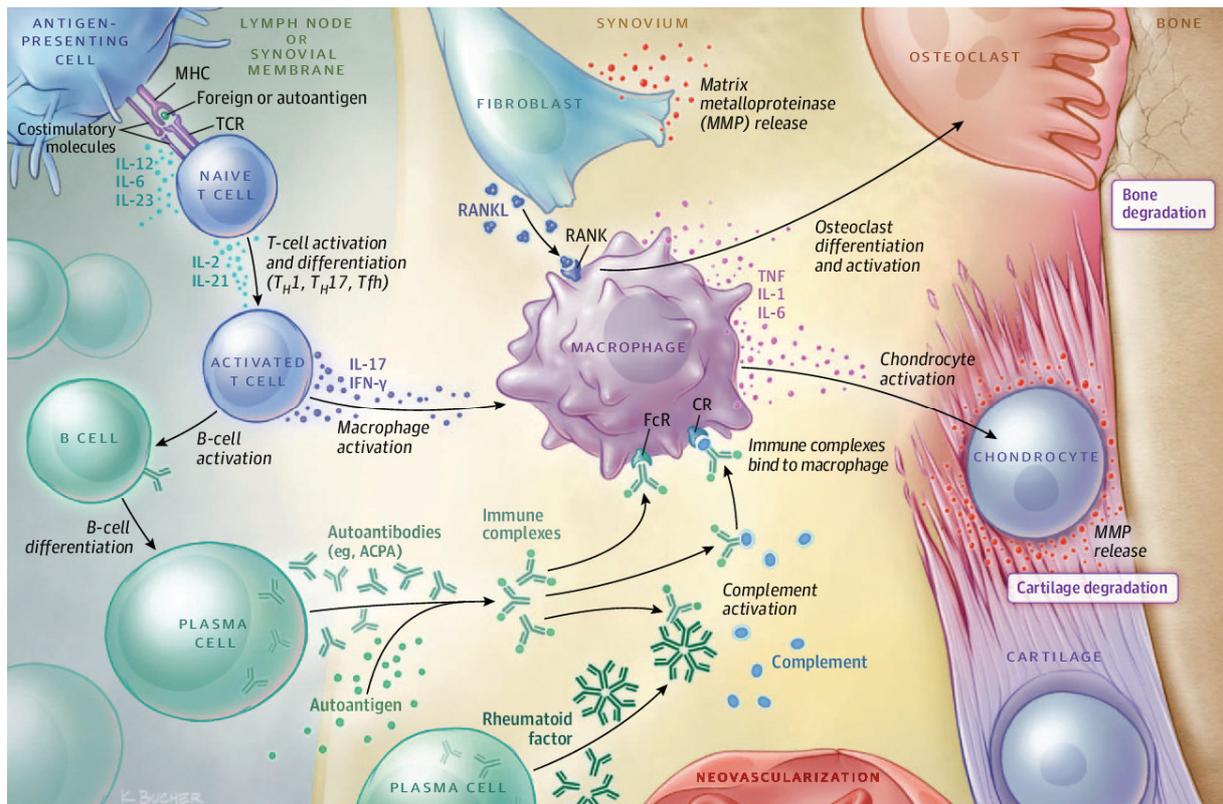
Die Gelenkentzündung in der RA fängt als eine bilateral symmetrische Erkrankung der Hand- und Fußgelenke an. Schmerzen, Schwellungen und Morgensteifigkeit der Gelenke sind ein typisches Symptom (ALETAHA & SMOLEN, 2018). Neben den Gelenken der Extremitäten können auch Gelenke der Halswirbelsäule, insbesondere die Gelenke zwischen Hinterhauptbein und erstem Halswirbel sowie zwischen erstem und zweitem Halswirbel von der RA betroffen sein (KIM et al., 2015).

Durch das Übergreifen der Entzündung an der synovialen Membran auf angrenzende Strukturen kommt es zu Schwächen und nachfolgenden Rupturen von Bändern und Sehnen (HASELWOOD & CASTLES, 1977; KIM & JUNG, 2007). Die oft beobachtete Deformation von rheumatoiden Gelenken (wie z.B. die Schwanenhals-Deformation an den Fingern), ist eine Folge von Kontraktionen einzelner Muskeln, Sehnenschwächen und Zerstörung von Knochen- und Knorpelstrukturen (SHARIF et al., 2018). Insbesondere bei Beteiligung der Halswirbelsäule können auch neurologische Symptome auftreten, da Subluxationen, Erosionen und Pannus-Entstehung das Rückenmark einengen können (MUKERJI & TODD, 2011).

Die pathophysiologischen Mechanismen der Gelenkentzündung in der RA sind Gegenstand aktueller Forschung, viele kleinere und größere Faktoren spielen hier eine Rolle. Wichtig für die Initiierung der RA-assoziierten Synovitis scheinen dendritische Zellen zu sein (RODRIGUEZ-FERNANDEZ, 2013). Wenn diese aktiviert werden, schütten sie eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin(IL)-1, IL-6, IL-23, Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) aus, die dann wiederum die Differenzierung von T-Zellen anstoßen (MCINNES & SCHETT, 2011). Hierdurch entstehen auch Th-17 Zellen, welche durch die Produktion von IL-17 und IFN- $\gamma$  Makrophagen, Chondrozyten und Fibroblasten aktivieren und zur Sekretion von weiteren Zytokinen stimulieren können. Die Folge sind die vermehrte Produktion von Interleukinen, Prostaglandin E2, Metalloproteinasen und RANKL (Rezeptor Aktivator des Nuklear Faktors  $\kappa$ B Ligand)(SATO et al., 2006; LUNDY et al., 2007; ALETAHA & SMOLEN, 2018) (**Abbildung 4**).

Infolge der Entzündung vermehren sich auch synoviale Fibroblasten übermäßig und nehmen einen aggressiven Phänotyp an, der die Entzündung durch die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (Matrix-Metallo-Proteinasen(MMP), RANKL) weiter befeuert (SMOLEN et al., 2016). Der Gelenkknorpel wird im Laufe der Erkrankung immer mehr abgebaut, da viele Chondrozyten Zytokin-vermittelt apoptotisch werden und die Knorpelmatrix aufgrund von MMP, die von den synovialen Fibroblasten synthetisiert werden,

ihre Integrität verliert. Andere synoviale Zytokine, vor allem Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor und RANKL, sind für die Osteoklasten-Differenzierung verantwortlich. Diese differenzierten Osteoklasten zerstören dann mineralisierten Knorpel und subchondralen Knochen und die entstehenden Krater werden mit Entzündungsgewebe gefüllt (**Abbildung 4**). Der erodierte Knochen von RA-Patienten zeigt wenig bis gar keine Reparaturmechanismen, vermutlich, da einige Zytokin-induzierte Mediatoren die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Chondroblasten und Osteoblasten verhindern (MCINNES & SCHETT, 2011).



**Abbildung 4, Pathophysiologie der Gelenkentzündung in der RA**

Die Präsentation von bestimmten Antigenen an naive T-Zellen über den MHC-Rezeptor auf dendritischen Zellen führt zu einer antigen-spezifischen Immunantwort, in deren Folge T-Zellen differenzieren und B-Zellen und Makrophagen aktivieren. Aktivierete Makrophagen schütten Zytokine aus, die wiederum Chondrozyten aktivieren und über MMP-Freisetzung Knorpel abbauen. Über RANKL-Aktivierung durch Fibroblasten differenzieren Makrophagen zu Osteoklasten und zerstören Knochen. Zu Plasmazellen differenzierte B-Zellen schütten Antikörper (z.B.: auch ACPAs) aus und es kommt zur vermehrten Bildung von Immunkomplexen, welche ebenfalls Makrophagen aktivieren.

### 1.2.2. Ausprägungen der RA in verschiedenen Organsystemen

In ungefähr 40% der Patienten mit RA gibt es außer der Gelenkentzündung noch zusätzliche extraartikuläre Manifestationen der Krankheit. Das Herz-Kreislauf-System kann dabei ebenso betroffen sein wie die Lunge, die Haut, die Augen, das Gehirn oder der Gastrointestinaltrakt (COJOCARU et al., 2010; MARCUCCI et al., 2018) (**Abbildung 3**).

Kardiovaskuläre Erkrankungen (cardiovascular disease, CVD) sind die häufigste Todesursache in RA-Patienten. Im Vergleich zur generellen Population haben RA-Patienten ein doppelt so hohes Risiko für Myokardinfarkte und ein um 50% erhöhtes Risiko, an einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben (MARADIT-KREMERS et al., 2005; CHOY et al., 2014). Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. RA und CVD teilen sich viele Risikofaktoren wie Diabetes, Rauchen oder auch genetische Faktoren wie das HLA-DRB1\*04-Allel (SE) die zur Dysfunktion des Endotheliums führen können (FIGUS et al., 2021). Die in der Pathogenese der RA vorherrschenden Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-6) tragen auch zur Aktivierung von Endothelzellen bei und initiieren den atherosklerotischen Prozess (FRAGOULIS et al., 2020) Zudem ist das bei der RA vorherrschende generalisierte Entzündungsgeschehen mitverantwortlich für die infolge von der Ablagerung von Immunkomplexen entstehende Vaskulitis (hierzu trägt beispielsweise auch der RF bei) (KISHORE et al., 2017).

Der Atmungstrakt ist bei 30-40% der RA-Patienten in Mitleidenschaft gezogen, teilweise äußern sich pulmonäre Symptome bereits vor den Gelenksymptomen (ALUNNO et al., 2017). Die Pathophysiologie von Lungenerkrankungen in der RA ist noch nicht vollständig erforscht, es wird aber ein Zusammenhang mit genetischer Prädisposition, Rauchen, chronischer Immunaktivierung, Infektionen und Toxizität der zur Therapie eingesetzten DMARDs vermutet (SHAW et al., 2015; FARQUHAR et al., 2019). Am häufigsten bei RA-Patienten ist die interstitielle Lungenerkrankung (interstitial lung disease, ILD), wobei hier zwischen primärer ILD (durch die RA verursacht) und sekundären Formen (die durch Nebenwirkungen von DMARDs, Infektionen oder Neoplasien zustande kommen) unterschieden wird (KELLY et al., 2016). Auch die oberen Atemwege können von RA betroffen sein, so gibt es Evidenz zur Beteiligung des Kehlkopfes bei RA. Das Cricoarytenoid-Gelenk kann genauso wie andere synoviale Gelenke arthritisch werden und infolgedessen Erosionen des Gelenkknorpels oder sogar Subluxation des Gelenkes aufweisen, was wiederum zu Dysphagie, Dyspnoe oder sogar zu akuter respiratorischer Insuffizienz führen kann (FERACO et al., 2009; ALUNNO et al., 2017).

Solche Beeinträchtigungen von kleinen Gelenken durch die RA kommen auch im oberen Verdauungstrakt vor. Das Kiefergelenk ist hierbei ebenso ein Angriffspunkt wie das Atlantoaxialgelenk, bei dessen Subluxation es zu einer Nervenkompression und darauffolgender Dysphagie kommen kann (GOW & GIBSON, 1977; EKBERG et al., 1987; GILHEANEY et al., 2017).

Auch die Leber kann durch die RA in Mitleidenschaft gezogen werden, was durch erhöhte Leberfunktionswerte in teilweise bis zu 50% der RA-Patienten gezeigt wird (MALNICK et al., 2008). Meist sind gastrointestinale Beschwerden in RA-Patienten jedoch nicht direkt auf die Krankheit zurückzuführen, sondern eher Nebenwirkungen von Medikamenten, die zur Therapie der Erkrankung eingesetzt werden (WEST, 1997; CRAIG & CAPPELLI, 2018).

Wie bereits oben beschrieben kann die RA auch Gelenke der Wirbelsäule betreffen, wobei insbesondere das Atlantoaxial-Gelenk häufig betroffen ist (YURUBE et al., 2012). Die RA führt zur Zerstörung der Knochen, Schwäche des *Ligamentum transversum* und Instabilität zwischen den Wirbeln. Die darauf folgende Subluxation des Gelenkes führt zu einer zervikalen Myelopathie aufgrund der Kompression des Rückenmarks (ZHANG & POPE, 2015). Eine solche kann sowohl symptomfrei sein, als auch Symptome wie Kopfschmerzen, Schwindel, Lähmungen oder visuelle, sensorische oder propriozeptive Defizite haben (ULUTATAR et al., 2019). Wenn der Hirnstamm komprimiert wird, liegt die Sterberate bei 50% innerhalb eines Jahres (ZHANG & POPE, 2015).

Gegenstand intensiver Forschung zu neurologischen Symptomen ist auch die Beteiligung von RA an der Alzheimer Erkrankung. Es gibt Studien, die die Rolle von chronischen Entzündungen bei der Entwicklung von mikrovaskulären Hirnschäden und Demenz diskutieren (MASON et al., 2018). Auch ist auffällig, dass Alzheimer Patienten ebenso erhöhte Serum-Level von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) wie RA-Patienten vorweisen (SWARDFAGER et al., 2010).

Weitere extraartikuläre Manifestationen der RA sind die Beteiligung der Haut und der Augen. Typisch für die RA sind sogenannte Rheumknötchen unter der Haut. Diese 2 – 5cm großen Knötchen entstehen meist an Körperoberflächen, die Druck oder wiederholten Traumata ausgesetzt sind. Sie sind im Allgemeinen fest, nicht schmerzhaft und unter der Haut beweglich. Typische Stellen sind das Olekranon oder die dorsale Handfläche, aber auch die Achilles-Sehne oder die Stimmbänder können betroffen sein. Die Prävalenz von Rheumknötchen bei RA-Patienten beträgt zwischen 10 und 30 % (TILSTRA & LIENESCH, 2015). Radiologisch sind

Rheumaknötchen strahlendurchlässig, histologisch bestehen sie aus einer zentralen Nekrose, die von Makrophagen abgegrenzt wird, welche wiederum von Granulationsgewebe, das Lymphozyten und Histozyten enthält, umschlossen ist (HEDFORS et al., 1983). Die Pathogenese der Rheumaknötchen ist nicht genau geklärt, es wird jedoch vermutet, dass der Rheumafaktor eine Rolle spielt, dessen Anhäufung im Gewebe bei Vaskulitis oder Gefäßtraumata eine Entzündungsreaktion mit Aktivierung des Immunsystems auslöst, die in der Folge zur Fibrinablagerung und Nekrose durch zytolytische und enzymatische Degradation führt (ZIFF, 1990). Neben der Haut können Rheumaknötchen auch in der Lunge und im Herzen vorkommen, diese sind jedoch trotz ihrer Häufigkeit von bis zu 30% in Autopsiebefunden, selten klinisch auffällig. Die größte Aufgabe besteht hier meist darin, Rheumaknötchen in der Lunge von Infektionen und Neoplasien zu unterscheiden (TILSTRA & LIENESCH, 2015).

An den Augen entwickeln zwischen 15 und 65% der RA-Patienten eine Keratokonjunktivitis sicca (KCS). Diese – teilweise auch als sekundäres Sjögren Syndrom benannte – Entzündung der Hornhaut und Konjunktiven entsteht durch eine zu geringe Bildung von Tränenflüssigkeit durch die Tränendrüsen (ARTIFONI et al., 2014). Brennende Augen, Lichtempfindlichkeit, Juckreiz und schlechte Sicht sind die Folge (UHLIG et al., 1999). Unbehandelt kann die KCS zu einer perforierenden Keratitis und kornealen Ulzera führen (ARTIFONI et al., 2014). Zu den selteneren okularen Symptomen der RA zählen die Episkleritis, Skleritis und periphere ulzerative Keratitis (PUK) mit einer Prävalenz von 3-6 % in RA-Patienten. Insbesondere nekrotisierende Skleritis und PUK können die okuläre Prognose verschlechtern und führen zu erhöhter Mortalität, da sie mit systemischer Vaskulitis assoziiert sind (ARTIFONI et al., 2014). Neoplasien sind ebenfalls Begleiterscheinungen der RA. Das Risiko für die Entwicklung von Lymphomen und Lungenkrebs ist in Patienten mit RA im Vergleich zur normalen Bevölkerung erhöht. Andere Tumore haben dagegen kein erhöhtes Vorkommen in der RA (SMITTEN et al., 2008). Erklärungen für das vermehrte Vorkommen von Lymphomen sind die übermäßige Immunstimulation, die zu einer klonalen Expansion von B-Zellen führt (KLEIN et al., 2018) oder eine verminderte Anzahl an T-Suppressor-Zellen (FIGUS et al., 2021). Für die erhöhte Prävalenz von Lungenkrebs in RA-Patienten gibt es ebenfalls verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Einerseits teilen sich RA und Lungenkrebs den Risikofaktor Rauchen, andererseits könnte auch die bei der RA teilweise entstehende ILD oder der allgemeine Entzündungsprozess zu einer Aktivierung von karzinogenen Mechanismen führen (FRAGOULIS & CHATZIDIONYSIOU, 2020).

### 1.2.3. Antikörper in der RA

Die RA ist eine Autoimmunerkrankung, bei der nicht ein einziger Antikörper bzw. ein einziges Antigen für das Krankheitsgeschehen verantwortlich ist. Meist besteht die Immunantwort von Patienten aus einer Vielzahl verschiedener Antikörper. Dennoch werden Antikörper-Untersuchungen für die Diagnose und Charakterisierung der Erkrankung verwendet.

Der Rheumafaktor (RF) wird klassischerweise zur Diagnose von RA herangezogen. Erstmals 1937 durch Erik Waaler als Antikörper im Serum von RA Patienten, der Schafs-Erythrozyten agglutinierte, beschrieben, gibt es heutzutage moderne Tests auf ELISA-Basis, die Rheumafaktoren verschiedener Subtypen detektieren können (DORNER et al., 2004). RF sind Antikörper, die sich gegen den Fc-Teil anderer Antikörper richten und damit Immunkomplexe ausbilden können. Sie scheinen nicht alleine für die Entstehung einer RA verantwortlich zu sein, da RF mit bis zu 20% Prävalenz in der allgemeinen Bevölkerung nachweisbar sind (NEWKIRK, 2002; MOLL et al., 2019). RF werden auch in anderen Erkrankungen, z.B. auch bei bestimmten Infektionen, gefunden, sind hier aber normalerweise transient und dienen offenbar der Aktivierung von B-Zellen und der Stimulierung von Toll-like-Rezeptoren (FEHR et al., 1997; NEWKIRK, 2002). In der RA scheinbar einzigartig ist die abnorme Proliferation und der Klassenwechsel der RF von IgM zu IgG (SCHERER et al., 2020). Interessant ist ebenso, dass RF nicht an natives IgG in Lösung bindet, sondern erst, sobald die entsprechenden Antikörper an ein Antigen gebunden sind, was eine Konformationsänderung nach sich zieht, und somit offenbar die Bindungsstelle für den RF exponiert (MAIBOM-THOMSEN et al., 2019).

Neben dem bereits lange bekannten RF gibt es andere Antikörper, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen haben. An vorderster Stelle stehen hier Anticitrullinierte Peptid-Antikörper (ACPAs). ACPAs sind Antikörper, die meist eine sehr starke Kreuzreaktivität gegenüber Peptiden und Proteinen zeigen, deren einzige Gemeinsamkeit eine Umwandlung der Aminosäure Arginin in Citrullin ist. Bekannte und bedeutsame citrullinierte Proteine in der RA sind zum Beispiel Fibrinogen, Kollagen Typ II, Filaggrin und Vimentin (STEINER, 2007). Sie sind oft auch bereits vor der Entwicklung einer Entzündung nachweisbar und persistieren in RA-Patienten auch während Remissionsphasen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht das reine Vorhandensein dieser Antikörper, sondern deren Qualität (z.B. deren Glykosylierung, Isotyp-Verwendung oder Avidität) ausschlaggebend für die Beteiligung an der Entzündung in der RA ist (SCHERER et al., 2020). Bestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass Patienten mit verschiedenen ACPA-Erkennungsmustern

unterschiedlich auf Behandlungen reagieren (DERGANOVA et al., 2014; LINDENBERG et al., 2015). Die Entstehung von citrullinierten Proteinen wird durch Entzündungsreaktionen begünstigt. Arginin wird durch Desaminierung in Citrullin umgewandelt. Hierzu wird das Enzym Peptidyl-Arginin-Deaminase (PAD) verwendet, welches zum Beispiel durch aktivierte und sterbende neutrophile Granulozyten oder bestimmte Bakterienspezies ausgeschüttet wird (DARRAH & ANDRADE, 2018). Die genaue Funktionsweise von ACPAs in der RA ist noch nicht genau geklärt, Hinweise gibt es allerdings, dass ACPAs an citrullinierte Proteine binden, die auf Effektor-Zellen wie Osteoklasten und Fibroblasten exprimiert sind, was zu einer Aktivierung dieser Zellen führt (HARRE et al., 2012; SUN et al., 2019). Daneben führt eine Bindung von ACPAs an citrullinierte Antigene zur Formierung von Immunkomplexen, welche wiederum entzündliche Reaktionen triggern und verstärken können (SOKOLOVE et al., 2011). Neben dem Einfluss auf das Krankheitsgeschehen sind ACPAs auch von diagnostischer Bedeutung in der RA. Hier gibt es verschiedene Assays, die synthetisch hergestellte zyklische citrullinierte Peptide (CCP) oder mutierte Versionen von citrulliniertem Vimentin verwenden und eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen (VAN DER LINDEN et al., 2009).

Zwischen 50% und 80% der Patienten mit RA haben entweder RF oder ACPA oder sogar beide Antikörper im Serum. Es gibt allerdings auch die sogenannte Autoantikörper-negative RA, die von keinem der beiden Antikörper begleitet wird. Sie unterscheidet sich auch in der Ausprägung und dem Schweregrad der Erkrankung von der Autoantikörper-positiven RA. Insbesondere ACPAs scheinen erhöhte Gelenksveränderungen und niedrigere Remissionsraten nach sich zu ziehen (SCOTT et al., 2010) und eine frühe Entwicklung einer erosiven Arthritis vorherzusagen (MIMORI, 2005; VAN VENROOIJ et al., 2006). IgM-RF-Antikörper und anti-CCP-Antikörper (welche zur Diagnose von ACPAs dienen) können bei nahezu der Hälfte von RA-Patienten bereits einige Jahre vor dem Ausbruch der Krankheit festgestellt werden, und implizieren ein hohes Risiko, eine RA zu entwickeln (RANTAPAA-DAHLQVIST et al., 2003; NIELEN et al., 2004).

Neben den beiden Antikörpern RF und ACPA werden auch immer wieder Antikörper gegen Kollagen Typ II (CII) in RA-Patienten gefunden (COOK et al., 1994; RONNELID et al., 1994). In manchen Studien konnten in bis zu 70% der Fälle Serum-Antikörper gegen CII in RA-Patienten gefunden werden (FUJII et al., 1992; COOK et al., 2004). Diese sinken jedoch ungefähr nach einem Jahr wieder ab (PEREIRA et al., 1985; MULLAZEHI et al., 2007). Antikörper gegen CII werden assoziiert mit früher entzündlicher/destruktiver RA und einem akuten

Krankheitsbeginn (MULLAZEHI et al., 2012). Vermutlich liegt der Grund hierfür in der Ablagerung von Immunkomplexen, die Antikörper gegen CII enthalten, im Gelenk (JASIN, 1985; MULLAZEHI et al., 2007). Solche Immunkomplexe stimulieren die Produktion von inflammatorischen Zytokinen in peripheren Blutmonozyten (MATHSSON et al., 2006; MULLAZEHI et al., 2006). Des Weiteren können anti-CII-Antikörper auch direkte Antikörpermedierte Effekte auf das Kollagen des Gelenksknorpels haben. Studien haben gezeigt, dass verschiedene monoklonale Antikörper gegen bestimmte Epitope von CII in vitro zu einem Verlust von Proteoglykan und Kollagen und sogar zu einer kompletten Zerstörung der Knorpelmatrix führen kann (CROMBIE et al., 2005; NANDAKUMAR et al., 2008). Auch die Produktion der Matrix und die Morphologie der Chondrozyten selbst kann durch bestimmte CII-Antikörper negativ beeinflusst werden (AMIRAHMADI et al., 2004; AMIRAHMADI et al., 2005; NANDAKUMAR et al., 2008).

### 1.3. Therapie der RA

Die Therapie der RA basiert auf den sogenannten „disease modifying anti-rheumatic drugs“ (DMARDs). Die „European League Against Rheumatism“ (EULAR) gibt regelmäßig aktualisierte Empfehlungen heraus, wie bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis vorgegangen werden soll. Als Therapieziel wird dabei eine Remission oder zumindest eine „Low Disease Activity“ angestrebt. Aktuell wird initial eine Therapie mit Methotrexat (MTX) in Verbindung mit einem Glukokortikoid (das nur zur Überbrückung der Anfangsphase verwendet werden soll) empfohlen. Bei Unverträglichkeiten oder anderen Kontraindikationen kann MTX gegen Sulfasalazin, Leflunomid oder Hydroxychloroquin ausgetauscht werden. Nach einigen Monaten wird die Therapie evaluiert und neu entschieden, wie weiter verfahren wird. Bei Versagen der initialen Therapie werden meist Kombinationen aus verschiedenen DMARDs verwendet (SMOLEN et al., 2020).

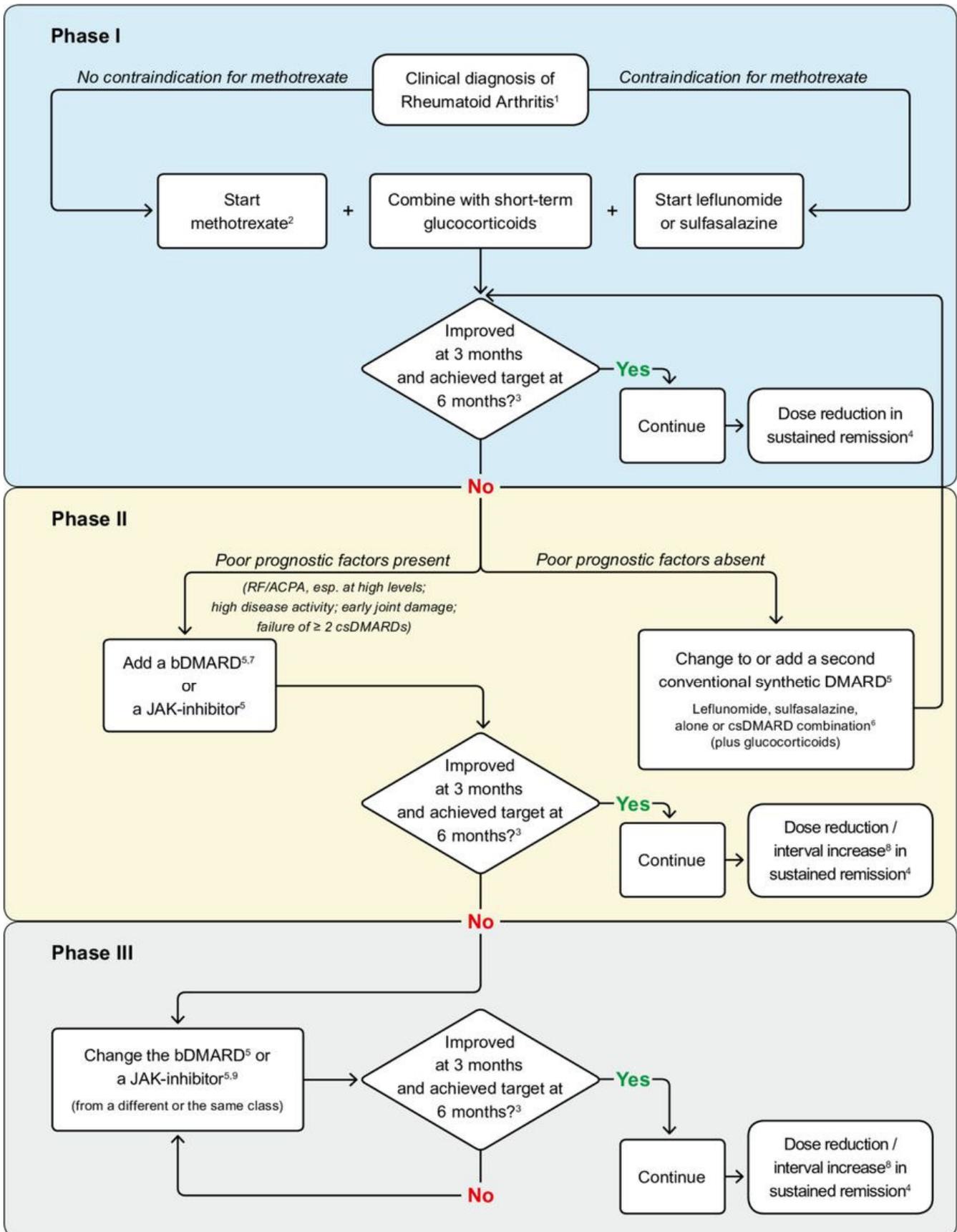
DMARDs werden in verschiedene Gruppen eingeteilt, die konventionell synthetischen (cs) DMARDs, gezielt synthetische (targeted synthetic, ts) DMARDs, biologische (b) DMARDs und Biosimilars (nachgemachte biologische DMARDs) (SMOLEN et al., 2020).

Wie bereits oben beschrieben ist das csDMARD Methotrexat das Mittel der ersten Wahl bei RA und wird beispielsweise in den USA seit über 20 Jahren als vorrangige Therapie eingesetzt (CRONSTEIN, 2005). MTX hat Einfluss auf den Folsäurestoffwechsel und kann beispielsweise die Proliferation von Immunzellen beeinflussen (QUEMENEUR et al., 2003), Gewebeschäden

vorbeugen (HAWKES et al., 1994; CRONSTEIN, 2005) und Entzündungen reduzieren (CRONSTEIN et al., 1993; MONTESINOS et al., 2003). Doch auch die Nebenwirkungen von MTX sind vielerlei, sie reichen von gastrointestinalen Effekten (Übelkeit, Diarrhö, Anorexie, orale Ulzera) über Hepato- und Nephrotoxizität bis hin zu Veränderungen des Blutbildes (Panzytopenie, Thrombozytopenie, Leukopenie, megaloblastische Anämie). Auch ein erhöhtes Risiko für Lymphome und opportunistische Infektionen ist mit Methotrexat-Behandlung assoziiert (SALLIOT & VAN DER HEIJDE, 2009; ALBRECHT & MULLER-LADNER, 2010; WANG et al., 2018). Zudem ist MTX hoch teratogen, was einer Nutzung durch Frauen im gebärfähigen Alter und auch Männern, wenn Kinderwunsch besteht, entgegensteht (FLINT et al., 2016).

Die „Ersatztherapien“ bei Unverträglichkeiten, Therapieversagen oder Gegenanzeigen von MTX fallen ebenfalls unter die csDMARDs. Sulfasalazin ist ein Prodrug, das im Darm in 5-Aminosalicylsäure und Sulfapyridin gespalten wird. Es kann den Immunglobulinspiegel senken, die Funktion von Neutrophilen einschränken und die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verhindern (CARLIN et al., 1992; BONDESON, 1997). Leflunomid interferiert mit der Pyrimidinsynthese, wodurch die Lymphozyten-Aktivierung gestört wird (KREMER, 1999; OLSEN & STEIN, 2004). Hydroxychloroquin ist eigentlich für die Malaria-Therapie und - Prophylaxe entwickelt worden, hat aber milde immunsuppressive Eigenschaften – vermutlich durch die Hemmung des Desoxyribonukleotid-Stoffwechsels, die Beeinträchtigung der Antigen-Präsentation und die Stabilisierung von lysosomalen Membranen (FOX, 1993; WEBER & LEVITZ, 2000). Auch diese drei csDMARDs besitzen Nebenwirkungen, die den Gastrointestinaltrakt, die Leber und das Blutbild betreffen (ABBASI et al., 2019).

Als tsDMARDs bezeichnet man die Janus-Kinase (JAK)-Inhibitoren Tofacitinib, Baricitinib und Upadacitinib. JAK-Inhibitoren beeinflussen einen Signalweg, der bei der Produktion vieler Interleukine und Zytokine eine Rolle spielt (HEINRICH et al., 1998). Sie sind allerdings assoziiert mit erhöhtem Infektionsrisiko und Lungenembolien (CURTIS et al., 2016; COHEN et al., 2017; SCOTT et al., 2018).



1. 2010 ACR-EULAR classification criteria can support early diagnosis.  
 2. "Methotrexate should be part of the first treatment strategy". While combination therapy of csDMARDs is not preferred by the Task Force, starting with methotrexate does not exclude its use in combination with other csDMARDs although more adverse events without added benefit are to be expected, especially if MTX is combined with glucocorticoids.  
 3. The treatment target is clinical remission according to ACR-EULAR definitions or, if remission is unlikely to be achievable, at least low disease activity; the target should be reached after 6 months, but therapy should be adapted or changed if insufficient improvement (less than 50% of disease activity) is seen after 3 months.  
 4. Sustained remission: ≥ 6 months ACR/EULAR index based or Boolean remission.  
 5. Consider contraindications and risks.  
 6. The most frequently used combination comprises methotrexate, sulfasalazine and hydroxychloroquine.  
 7. TNF-inhibitors (adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab, including EMA/FDA approved bDMARDs), abatacept, IL-6R inhibitors, or rituximab (under certain conditions); in patients who cannot use csDMARDs as comedication, IL6-inhibitors and tsDMARDs have some advantages.  
 8. Dose reduction or interval increase can be safely done with all bDMARDs and tsDMARDs with little risk of flares; stopping is associated with high flare rates; most but not all patients can recapture their good state upon re-institution of the same bDMARD/tsDMARD.  
 9. Efficacy and safety of bDMARDs after JAK-inhibitor failure is not fully known; also, efficacy and safety of an IL-6 pathway inhibitor after another one has failed is currently unknown. Efficacy and safety of a JAK-inhibitor after insufficient response to a previous JAK-inhibitor is unknown.

Abbildung 5, EULAR Empfehlung zum Management der RA

**Abbildung 5 (Fortsetzung):** Nach klinischer Diagnosestellung soll initial MTX oder ein anderes csDMARD als Therapie verwendet werden. Nach Ablauf einiger Monate wird dann evaluiert, ob das Therapieziel mit dieser Methode erreicht wurde. Ist dies nicht der Fall, wird je nach Prognose das csDMARD gewechselt oder ein zusätzliches cs/b/tsDMARD gegeben. Sollte auch hier nach 6 Monaten das Therapieziel nicht erreicht worden sein, wird das b/tsDMARD wiederum gewechselt. Dies wird so lange durchgeführt bis das Therapieziel erreicht wird. Sobald in einer der drei Phasen eine andauernde Remission erreicht ist, können die Dosis reduziert bzw. das Applikationsintervall verlängert werden.

Als biologische Arzneimittel bezeichnet man Substanzen, die aus monoklonalen Antikörpern bzw. Fusions-Antikörpern bestehen und spezifische Angriffsstellen, wie zum Beispiel bestimmte Oberflächenrezeptoren haben (WEDDELL & HIDER, 2021). Auch die sogenannten biologischen DMARDs fallen unter diese Kategorie. TNF-Inhibitoren wie Infliximab, Etanercept und Adalimumab binden an TNF- $\alpha$  Rezeptoren und interferieren hierdurch mit der Entzündungskaskade (ELLIOTT et al., 1993; MAINI et al., 1993). Abatacept hingegen ist ein Kostimulations-Blocker, der an Antigen-präsentierende Zellen bindet und dort mit dem kostimulatorischen Signalweg, der zur Aktivierung von T-Zellen nötig ist, interferiert (CRON, 2005; WEDDELL & HIDER, 2021). Rituximab, welches auch in der Tumorthherapie bei der Behandlung von Lymphomen verwendet wird, hat auch in der RA-Therapie eine Bedeutung. Als Antikörper gegen CD20 – einem Kalzium-Kanal in der Zellmembran von normalen und malignen B-Zellen, jedoch nicht auf Plasmazellen – depletiert es selektiv B-Zellen (CROSS et al., 2006). Auch die bDMARDs sind nicht frei von Nebenwirkungen, deren häufigste Ausprägung eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen ist (ABBASI et al., 2019; WEDDELL & HIDER, 2021). Daneben gibt es auch Berichte über Perforationen des Intestinaltrakts und erhöhte Risiken für venöse Thrombembolien und Lungenembolien (REIN & MUELLER, 2017; SEPRIANO et al., 2020).

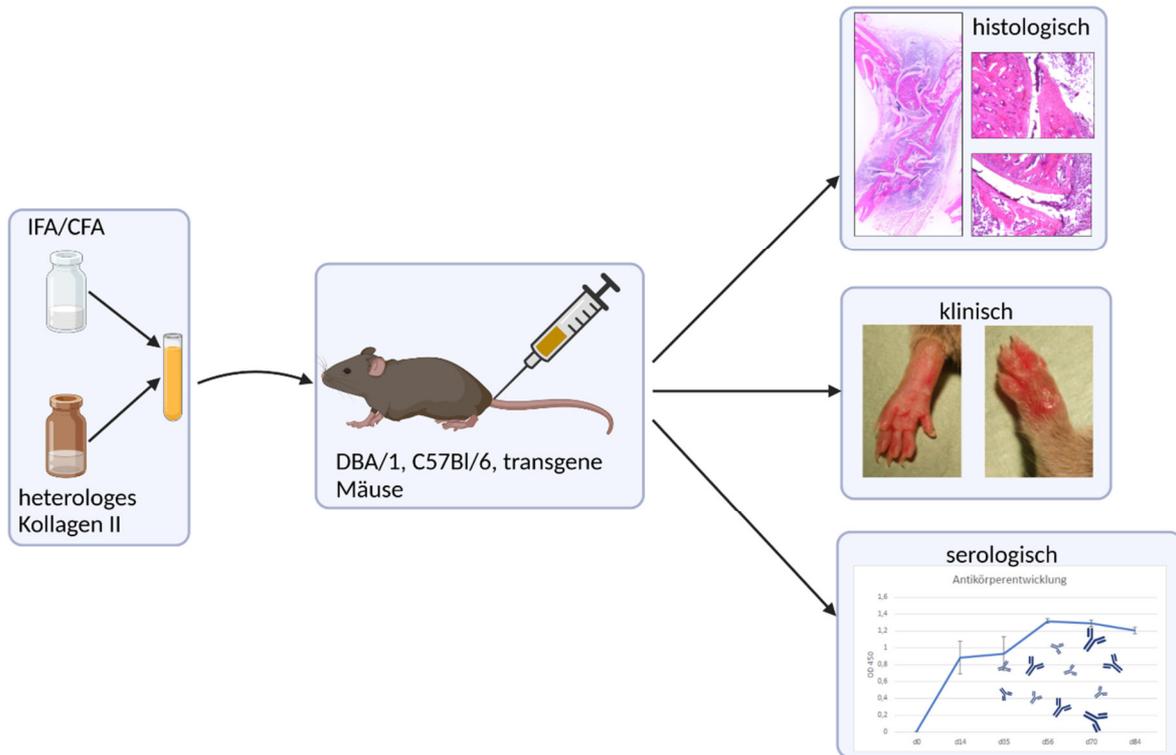
Trotz der mittlerweile vielen therapeutischen Möglichkeiten erreichen nicht alle Patienten die angestrebte Remission, oder sprechen nach einer Weile nicht mehr auf manche Medikamente an (SMOLEN et al., 2016). Deshalb und auch aufgrund der teils massiven Nebenwirkungen der aktuell auf dem Markt befindlichen DMARDs geht die Suche nach besseren Therapiemöglichkeiten für die rheumatoide Arthritis weiter.

## 2. Antigen-induzierte Arthritis-Modelle in der Maus

Es existieren eine Vielzahl an Arthritis-Modellen in der Maus und anderen Tierarten wie Ratten, Kaninchen und Affen. Sie dienen dazu, verschiedene Aspekte der humanen RA zu beleuchten und mögliche neue Therapien zu testen. Die Art der Induktion der Arthritis dabei ist vielfältig. Arthritis im Tiermodell kann durch verschiedene Antigene – die systemisch gegeben oder lokal ins Gelenk injiziert werden –, die Übertragung von Antikörpern oder auch durch genetische Manipulation ausgelöst werden (ASQUITH et al., 2009; BEVAART et al., 2010; CAPLAZI et al., 2015; BESSIS et al., 2017; FISCHER et al., 2017; BENSON et al., 2018; JONES et al., 2018). Um das Feld enger zu fassen wird sich im Folgenden nur auf die Beschreibung der Antigen-induzierten Arthritis-Modelle in der Maus konzentriert.

### 2.1. Kollagen induzierte Arthritis (Collagen induced arthritis, CIA)

Die CIA ist vermutlich das am häufigsten beschriebene und verwendete Tiermodell in der Forschung über die rheumatoide Arthritis. Sie funktioniert in Ratten (TRENTHAM et al., 1977), Mäusen und sogar Affen (RUBIN et al., 1987). Eine erste Beschreibung der Durchführung dieses Modells in der Maus fand 1980 durch Courtenay et al. (COURTENAY et al., 1980) statt. Seitdem finden sich diverse Berichte und Protokolle, die die Induktion der CIA in DBA/1J und C57Bl/6 Mausstämmen beschreiben (CAMPBELL et al., 2000; BRAND et al., 2007; INGLIS et al., 2008; PIETROSIMONE et al., 2015). Die CIA beruht auf einer Immunisierung der Mäuse mit einer Emulsion aus heterologem (Rinder-, Hühner-, Schweine-) Kollagen Typ II und Complete Freund's Adjuvant (CFA). Infolgedessen entwickelt sich eine der humanen RA ähnliche Arthritis an den Pfoten der Mäuse, die charakterisiert ist durch Synovitis, Infiltration mit mononukleären Zellen, Knorpel- und Knochenerosionen, Pannus-Entstehung, Erythem und Ödemen (BRAND et al., 2007; BEVAART et al., 2010). Auch die genetische Prädisposition über bestimmte MHC-Klassen ist in der CIA ausgeprägt (WOOLEY et al., 1983). (vgl. **Abbildung 6**)



**Abbildung 6, Schema Kollagen induzierte Arthritis**

Die CIA wird durch eine Emulsion aus CFA oder IFA mit einem heterologen Kollagen II induziert. Diese wird an die Schwanzbasis von empfänglichen Mausstämmen (z.B.: DBA/1 oder C57Bl/6) appliziert. In der Folge entwickeln sich klinische Anzeichen einer Arthritis, die sich histologisch bestätigen. Serologisch zeichnet sich die CIA durch die Entstehung von Antikörpern gegen das Immunisierungsgagens Kollagen aus.

Im Unterschied zur RA sind jedoch die vorherrschenden Antikörper in der CIA gegen Kollagen II gerichtet. Sie scheinen hier der zugrundeliegende Mechanismus der Erkrankung zu sein, da eine Übertragung der Sera von arthritischen Mäusen auf naive Mäuse zu Entzündung der Gelenke in letzteren führt (BRAND et al., 2003; BRAND et al., 2007). Ebenfalls im Unterschied zur humanen Erkrankung wird in der CIA kein Rheumafaktor gebildet, es gibt keine Geschlechterprädisposition für weibliche Tiere (meist wird eher von einer Prädisposition bei männlichen Tieren berichtet (BEVAART et al., 2010)) und die Erkrankung verläuft monophasisch, ohne das für die RA typische „Wiederaufflammen“ der Entzündung (HOLMDAHL et al., 1986a; BOISSIER et al., 1987). Geteilte Meinungen und gegensätzliche Ergebnisse gibt es über die Entstehung von Antikörpern gegen citrullinierte Peptide (ACPAs) in der CIA. Kuhn et al. beschreibt das Vorhandensein von Antikörpern gegen CCP und citrulliniertes Fibrinogen in Maus-Seren von CIA-immunisierten DBA/1 Mäusen (KUHN et al., 2006). Dagegen konnten Cantaert et al. nach Immunisierung von DBA/1 Mäusen mit Kollagen keine solchen Antikörper gegen citrulliniertes Fibrinogen nachweisen, eine Immunisierung

mittels citrulliniertem Kollagen brachte in 1 von 15 Tieren nachweisbare Antikörper gegen citrulliniertes Fibrinogen hervor (CANTAERT et al., 2013). Auch Vossenaar et al. konnte keine systemische Entstehung von ACPAs im Mausmodell der CIA nachweisen, obwohl während der Entzündungsreaktion im Gelenk offenbar citrullinierte Antigene entstehen (VOSSENAAR et al., 2003; VOSSENAAR et al., 2004).

Es gibt einige Abwandlungen des Immunisierungsprotokolls der CIA, die spezifische Eigenschaften der humanen RA nachbilden sollen. So kann eine Immunisierung von Mäusen mit citrulliniertem autologen Kollagen II ohne die zusätzliche Gabe von Adjuvanz zu einem Verlust von Knochendichte und -volumen ähnlich der RA führen (DUSAD et al., 2014) und sogar eine Arthritis induzieren (THIELE et al., 2012). Die zusätzliche Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) führt in der CIA zu einer früheren und stärkeren Ausprägung der Arthritis, die zur Untersuchung der akuten Phase der RA verwendet werden kann (TANAKA et al., 2013). Eine Variation in der Gabe von CII, CFA, Incomplete Freund's Adjuvans (IFA) und LPS und eventuellen zusätzlichen Injektionszeitpunkten ergibt verschiedene Arthritis-Schweregrade (THORNTON & STRAIT, 2016). Eine Immunisierung von transgenen Mäusen, die anstatt des endogenen Maus-MHC-II-Gens das HLA-DRB1\*0401 Allel tragen, mit Kollagen II ergab eine Arthritis, die durch eine Geschlechterprädisposition in weiblichen Tieren und der Produktion von RF charakterisiert ist (TANEJA et al., 2007).

## 2.2. Fibrinogen induzierte Arthritis (FIA)

Neben der CIA gibt es noch andere Antigen-induzierte Modelle der Arthritis im Mausmodell. Eine ebenfalls häufig verwendete Methode der Immunisierung ist mittels Fibrinogens. Citrulliniertes Fibrinogen spielt als Teil der ACPAs eine große Rolle in der Ausprägung der humanen RA (MASSON-BESSIERE et al., 2001) und ist somit auch im Tiermodell ein Faktor, der bei der Erforschung neuer Therapiemethoden der RA mit einbezogen werden sollte.

Hill et al. entwickelten ein Mausmodell, das auf der Immunisierung von HLA-DR4-transgenen Mäusen mittels citrulliniertem humanen Fibrinogen in Freund'schem Adjuvans basiert. Hierbei entwickeln rund 50% der Tiere das klinische Krankheitsbild einer Arthritis (HILL et al., 2008; YUE et al., 2010). Die niedrige Inzidenz verglichen zur CIA (80-100% Inzidenz bei DBA/1 Mäusen (BRAND et al., 2007)) kann bei diesem Modell auch durch den der transgenen Mauslinie zugrunde liegenden C57Bl/6 Mausstamm begründet sein, welche bei der

Immunisierung mit Kollagen allgemein schlechtere Ergebnisse als Mäuse des DBA/1 Stammes erzielen (INGLIS et al., 2008; PIETROSIMONE et al., 2015).

Eine andere Immunisierungsmethode zur Induktion einer Arthritis mit Antikörpern gegen citrulliniertes Fibrinogen wird von Ho et al. beschrieben. Durch Immunisierung von SJL/J oder DBA/1 Mäusen mittels humanem Fibrinogen kann eine RA-ähnliche Arthritis erzeugt werden, welche serologisch durch Antikörper gegen citrulliniertes Fibrinogen, ACPAs und RF gekennzeichnet ist und darüber hinaus auch autoreaktive T-Zellen gegen Fibrinogen aufweist (HO et al., 2010).

Andere Autoren konnten den Effekt dieser Immunisierungsart nur teilweise nachvollziehen. Cantaert et al. berichten, dass es zwar eine Induktion von Antikörpern gegen citrulliniertes Fibrinogen durch die Immunisierung von DBA/1 Mäusen mit nativem Fibrinogen gibt, diese allerdings offenbar nicht zum Ausbruch einer Arthritis führt. Für SJL/J-Mäuse konnten nur nach Immunisierung mit citrulliniertem Fibrinogen, nicht aber mit nativem Fibrinogen Antikörper gegen citrulliniertes Fibrinogen nachgewiesen werden. Auch hier wurde keine Arthritis-Entwicklung beobachtet (CANTAERT et al., 2013).

Die Co-Immunisierung von Mäusen mit Kollagen und Fibrinogen (FIA-CIA) führt offenbar zu einer gegenüber der reinen CIA verstärkten Arthritis, die neben Antikörpern gegen Kollagen auch Antikörper gegen Fibrinogen und citrulliniertes Fibrinogen, sowie gegen CCP und RF aufweist (HO et al., 2010). Diese Ergebnisse wurden bisher jedoch weder bestätigt noch widerlegt.

### 2.3. Weitere Antigen-induzierte Arthritismodelle

Neben den beiden oben beschriebenen Modellen gibt es noch eine Reihe weiterer Antigen-induzierter Mausmodelle für die RA. Die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Pristan, einem Terpenoid-Alkan, führt zum Beispiel in manchen Mausstämmen zu einer bis zu 100%-igen Inzidenz von Arthritis und zur Ausbildung von RF und anti-Kollagen-II-Antikörpern (WOOLEY et al., 1989). Auch durch i.p. Injektion von humanem Proteoglykan (Proteoglycan-induced Arthritis; PGIA) oder der rekombinanten G1 Domäne des humanen Proteoglykans Aggrecan in Verbindung mit einem Adjuvans kann in Balb/c Mäusen eine Arthritis ausgelöst werden. Hier können anti-CCP-Antikörper und RF im Serum nachgewiesen werden (GLANT et al., 2011).

Andere Antigen-induzierte Modelle der RA bedienen sich der intraartikulären Injektion von Substanzen. Eine Zymosan-Injektion (ein Polysaccharid der Zellwand von *Saccharomyces*

*cerevisiae*) in das Kniegelenk von Mäusen führt zu einer Infiltration des Gelenks mit Entzündungszellen, Hypertrophie der Synovialis und Pannus-Entstehung (KEYSTONE et al., 1977). Diese Entzündung ist ein zweiphasiges Geschehen mit einer frühen (bis 7 Tage nach Injektion) und einer späten (über 25 Tage nach Injektion) Phase, in dem vor allem der TLR-2 eine Rolle zu spielen scheint (FRASNELLI et al., 2005).

Auch die Arthritis-Induktion mittels intraartikulärer Injektion eines Antigens (z.B. methyliertes bovines Serumalbumin), gegen das das Tier vorher sensibilisiert wurde, bietet eine Möglichkeit. Hier ist die folgende Entzündung Immunkomplex-vermittelt (BRACKERTZ et al., 1977). Eine Weiterentwicklung dieses Modells stellt der Transfer von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mit nachfolgender Sensibilisierung gegen Ovalbumin und einer darauffolgenden intraartikulären Injektion von Ovalbumin dar. Hier entwickeln sich auch Antikörper gegen Kollagen (MAFFIA et al., 2004).



### 3. Peptide als Therapieansatz in der rheumatoiden Arthritis

Peptide bestehen aus einer Abfolge von Aminosäuren, die über eine Peptidbindung zu einer Kette verbunden sind (JAKUBKE, 1982). Die Grenze zwischen einem Peptid und einem Protein ist nicht klar definiert. Sie liegt zwischen 30-50, bei manchen Autoren auch bis zu 100 Aminosäuren. Sie können mit Zuckerresten zu Glykopeptiden oder mit Lipiden zu Lipopeptiden verbunden sein.

#### 3.1. Wirkungsweise von Peptiden

Peptide können auf verschiedene Weise Einfluss auf Erkrankungen haben. Basis einer Funktion von Peptiden ist die Fähigkeit, an Oberflächenrezeptoren auf Zellen zu binden und so bestimmte Signale zu aktivieren, zu hemmen oder auch die Bindung von anderen Molekülen zu verhindern (FOSGERAU & HOFFMANN, 2015). Die sogenannte Protein-Protein-Interaktion (PPI) ist eine transiente und reversible Bindung zweier Proteine aneinander, bei der durch die Länge und Stärke der Interaktion das transduzierte Signal moduliert wird. Die Bindung zweier Proteine aneinander wird durch Epitope - kurzkettige Aminosäuresequenzen innerhalb des Proteins, die für die Bindung zuständig sind - vermittelt. Die treibenden Kräfte hinter der PPI sind elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen (WAUGH, 1954; CHOTHIA & JANIN, 1975; JONES & THORNTON, 1996).

Peptide können eine der beiden Protein-Epitope imitieren und somit in der PPI interferieren und das transduzierte Signal modulieren (GOKHALE & SATYANARAYANAJOIS, 2014). Durch die Vielzahl an PPI-Oberflächen im Körper gibt es große Mengen an Zielstrukturen, an die Peptide binden können. Da die PPI Oberfläche meist nicht aus einer einzigen Tasche besteht, sondern einer Ansammlung kleinerer Bindungstaschen, die über die Oberfläche verteilt sind, ist es dennoch nicht einfach, Peptide so zu kreieren, dass sie an die Zielrezeptoren binden (TSOMAIA, 2015).

### 3.2. Peptide als Therapeutika

Seit den 1920er Jahren wurden Peptid-basierte Medikamente zur hormonellen Therapie eingesetzt. Neben Insulin kamen später auch ACTH, Oxytocin und Vasopressin zum therapeutischen Einsatz (LAU & DUNN, 2018). Diese Peptide ersetzen normalerweise natürlich vorkommende Peptide, die im Körper der erkrankten Personen nicht vorhanden oder abnormal geformt sind. Neben dem einfachen Ersatz natürlich vorkommender Peptide, können aber auch Teile von Proteinen mittels Peptiden imitiert werden oder durch Abänderung der Sequenz, Hinzufügen von bestimmten Aminosäure-Sequenzen oder anderen Signal-Molekülen komplett neue Peptide hergestellt werden, die zum Einsatz in verschiedenen Gebieten der Medizin kommen.

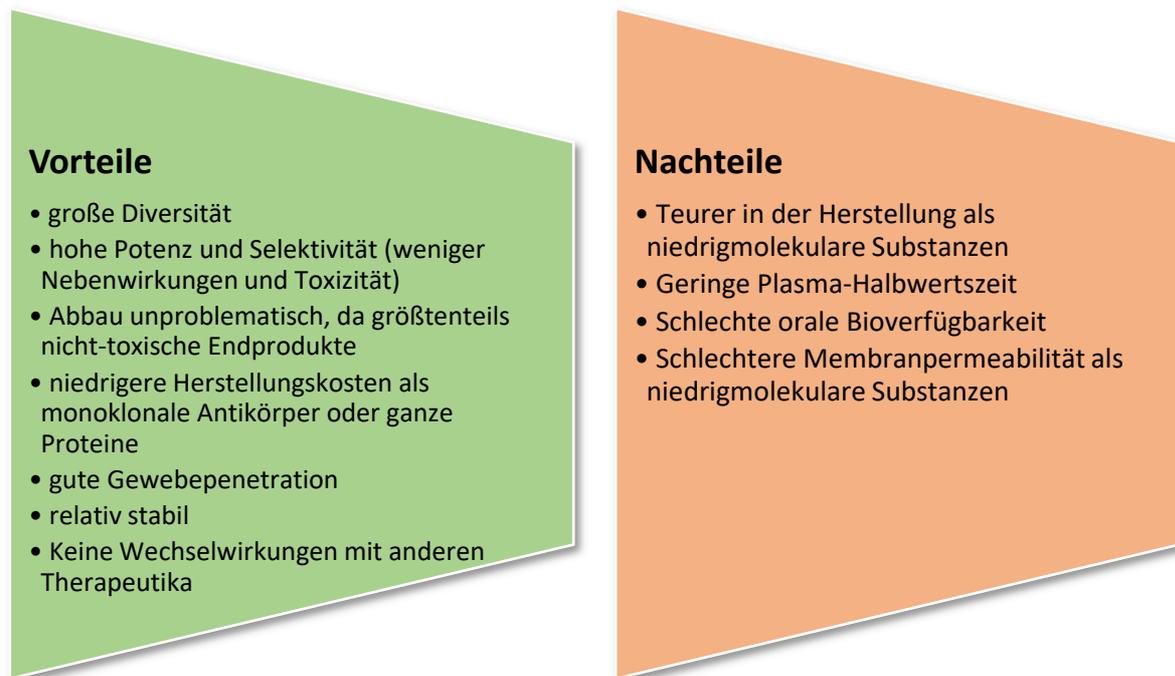
In den vergangenen Jahren ist es gelungen, einige vielversprechende Substanzen zu generieren, die in den unterschiedlichsten Erkrankungen eingesetzt werden. Neben der Krebsforschung werden Peptide auch in der Diabetes-Forschung, bei neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen, sowie zur Behandlung von viralen und bakteriellen Erkrankungen und nicht zuletzt auch bei entzündlichen und autoimmunen Krankheitsbildern erforscht und bereits in verschiedenen klinischen Phasen getestet (TSOMAIA, 2015; LAU & DUNN, 2018; CABRI et al., 2021).

#### 3.2.1. Vor- und Nachteile von Peptiden als Therapeutika

Peptiden wird immer mehr Beachtung als mögliches Therapeutikum für diverse Erkrankungen geschenkt (AHRENS et al., 2012; TSOMAIA, 2015). Durch die verschiedene Anordnung der 20 proteinogenen Aminosäuren und einer Vielzahl von Aminosäuren, die nicht-natürlichen Ursprungs sind, können Peptide eine große Diversität entwickeln.

Gegenüber anderen niedrigmolekularen Substanzen haben Peptide den Vorteil, ihr Ziel mit hoher Potenz und Selektivität zu binden, woraus weniger Nebenwirkungen und Toxizität resultieren (CRAIK et al., 2013). Insbesondere der Abbau der Substanzen ist bei Peptiden unproblematisch, da sie hydrolytisch in die einzelnen Aminosäuren gespalten werden und damit hauptsächlich nicht toxische Endprodukte formen. Im Vergleich zu rekombinanten Antikörpern und proteinbasierten Arzneimitteln haben Peptide aufgrund ihrer geringen Größe und Komplexität niedrigere Herstellungskosten, sind stabiler bei Raumtemperatur und können Gewebe besser penetrieren (VLIEGHE et al., 2010). Noch dazu neigen Antikörper-basierte Therapeutika dazu, allergische Reaktionen auszulösen, was bei den deutlich kleineren

Molekülen der Peptide nicht der Fall ist (MCGREGOR, 2008). Peptide können zwar in Leber und Niere akkumulieren, lösen dort aber normalerweise keine unbeabsichtigten Funktionen aus, sondern werden hier metabolisiert und abgebaut (AHRENS et al., 2012). Auch eine zeitgleiche Applikation von weiteren Therapeutika stellt mit Peptiden kein Problem dar, da sie nicht dazu neigen, mit diesen zu interagieren (MARX, 2005).



**Abbildung 7, Vor- und Nachteile von Peptiden als Therapeutika**

Neben den diversen Vorteilen, die Peptide als Therapeutika darstellen, gibt es allerdings auch einige Nachteile, die nicht ungenannt bleiben sollen. Trotz vieler Fortschritte in der Technik ist die Peptid-Synthese immer noch eine - im Vergleich zur Herstellung von niedrigmolekularen Substanzen – teure Methode (BRAY, 2003). Des Weiteren sind eine geringe Plasma-Halbwertszeit (FOSGERAU & HOFFMANN, 2015), die schlechte orale Bioverfügbarkeit (CRAIK et al., 2013) und die im Vergleich zu niedrigmolekularen Strukturen schlechtere Membran-Permeabilität (AHRENS et al., 2012) von Peptiden ein Hindernis bei der Verbreitung dieser Substanzen als Therapeutikum, da häufige Medikamentengaben und eventuell nötige Injektionen die Compliance der Patienten bei der Akzeptanz neuer Therapien negativ beeinflussen kann.

### 3.2.2. Modifizierung von Peptiden für die Nutzung als Therapeutika

Für diese Probleme gibt es jedoch bereits verschiedene Lösungsansätze, die dabei helfen sollen, Peptide als potenten Mittel bei vielerlei Erkrankungen einsetzen zu können.

Eine Makrozyklisierung und N-Methylierung von Peptiden könnte demnach die Membranpermeabilität erhöhen und zugleich orale Bioverfügbarkeit erreichen, da sie zu einem gewissen Grad vor proteolytischer Degradation schützen soll (CHATTERJEE et al., 2008). Polyethylenglykol (PEG) in Verbindung mit einem Peptid kann ebenfalls den Abbau durch Proteasen verhindern, und erhöht gleichzeitig die Wasserlöslichkeit des Produkts (PASUT & VERONESE, 2009). Außerdem erhöht es das Molekulargewicht des Peptids, was zu einer geringeren renalen Filtration führt und die Halbwertszeit verlängert (AHRENS et al., 2012).

Durch Lipidierung wird ein Peptid mit Fettsäuren verbunden, was zu einer höheren Affinität an das Transportprotein Albumin im Blut führt und zu einer längeren Verweildauer im System (KURTZHALS et al., 1995). Auch der Austausch einiger L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren – welche durch körpereigene Proteasen nicht erkannt werden – kann synthetische Peptide stabilisieren (TUGYI et al., 2005).

Eine recht neue Methode ist die PASylierung, bei der an das Peptid eine mindestens 100 Aminosäuren lange Sequenz aus Prolin, Alanin und Serin konjugiert wird. Die so verlängerten Peptide haben eine höhere Resistenz gegen Proteasen im Serum, können aber noch durch die renale Proteasen abgebaut werden (AHRENS et al., 2012).

Neben diesen recht „einfachen“ Möglichkeiten der Peptid-Stabilisierung gibt es noch andere Strategien, die deutlich komplexer in der Herstellung sind. Basierend auf der Erkenntnis, dass viele Rezeptoren nicht nur Primärstrukturen, sondern auch Sekundärstrukturen erkennen, gibt es verschiedene Ansätze, um diese Sekundärstrukturen auszubilden und zu stabilisieren.  $\alpha$ -Helix Strukturen können beispielsweise über Laktam-Brücken (CHOREV et al., 1991; SHEPHERD et al., 2005), Hydrocarbon-Ketten (SCHAFMEISTER et al., 2000; SHIM et al., 2013) oder Verbindungen, die die Wasserstoffbrücken in einer Helix imitieren (CABEZAS & SATTERTHWAIT, 1999; CHAPMAN et al., 2004), stabilisiert werden. Für  $\beta$ -Haarnadelstrukturen gibt es eine Technologie, die sich Protein-Epitop Mimetic (PEM) nennt. Hier wird ein aktives Peptid in ein synthetisches Gebilde integriert, sodass sich daraus eine deutlich stabilere Haarnadelstruktur ergibt (ROBINSON, 2008). Daneben können Peptide auch in andere Strukturen integriert werden, die diesen sozusagen als „Gerüst“ dienen (FAIRLIE et al., 1998;

LOUGHLIN et al., 2004). Geeignet hierfür scheinen Miniatur-Proteine (KRITZER et al., 2006), Disulfid-reiche Peptide (NORTHFIELD et al., 2014) und tierische Toxine (LI et al., 2008) zu sein.

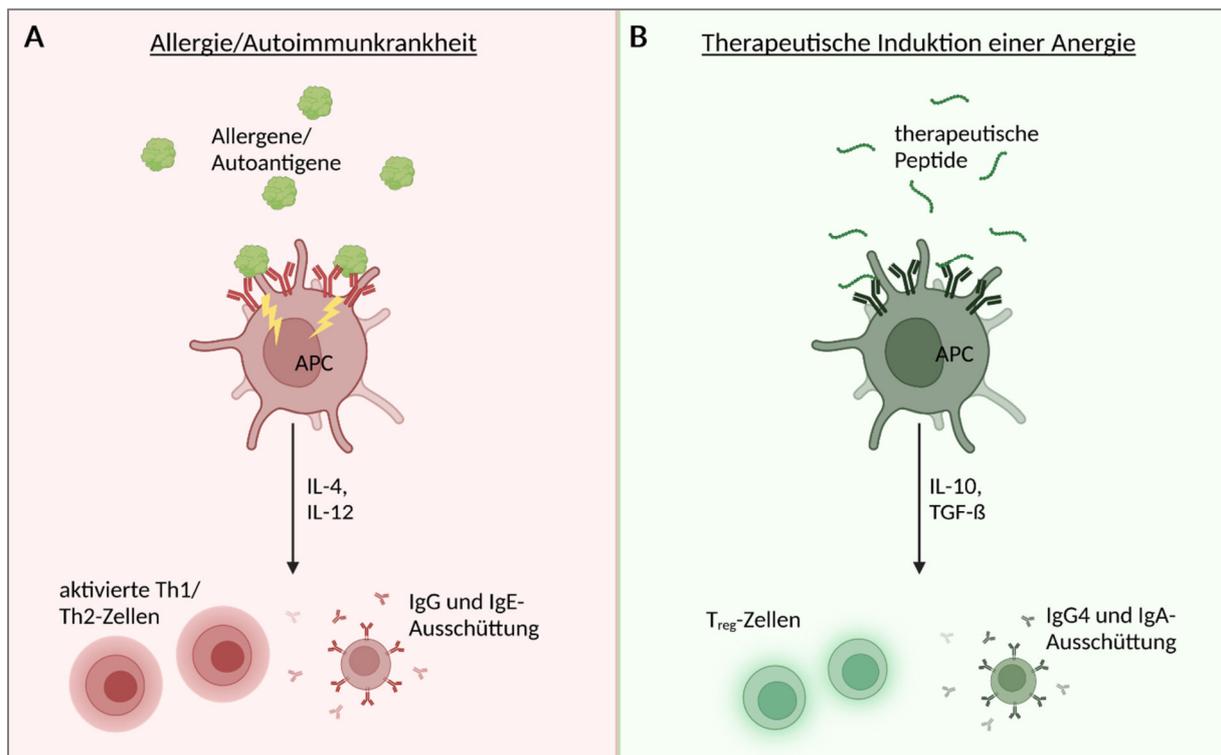
### 3.2.3. Antigen-spezifische Peptide als Therapeutikum bei autoimmunen Erkrankungen – Wiederherstellung der Anergie

Das Immunsystem schützt den Organismus vor schädlichen Einflüssen durch Krankheitserreger. Durch bestimmte äußere und innere Einflussfaktoren kann dieses entgleisen, sich gegen körpereigene Strukturen richten und somit eine Autoimmunerkrankung auslösen. Eine Unterdrückung des Immunsystems bringt zwar in manchen Erkrankungen Linderung, behebt aber nicht die Ursache des Problems und führt oft zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber Infektionserkrankungen und Tumoren, da die normale Funktion des Immunsystems gestört wird. Eine Behandlung von autoimmunen Erkrankungen sollte deshalb möglichst auf eine langanhaltende Toleranz gegenüber den Autoantigenen abzielen (MILLER et al., 2007; SABATOS-PEYTON et al., 2010).

Die Wirkung der Applikation von Peptiden bei Erkrankungen des Immunsystems wird seit Langem erforscht. Bereits Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts gelang es Noon et. al., die Sensibilität von Heuschnupfenpatienten gegenüber verschiedenen Gräsern mittels subkutaner Injektion von Pollenextrakt herabzusetzen (NOON, 1953). Bei der Therapie von allergischen Erkrankungen wird die sogenannte „Allergen-spezifische Immuntherapie (ASIT)“ bereits über längere Zeit erfolgreich angewendet. Gerade für allergische Rhinitis, bronchiales Asthma und auch Allergien bei Insektenstichen konnten in diversen Studien die Effizienz dieser Methode bestätigt werden (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Laut WHO-Positionspapier bedeutet die ASIT eine Praxis, bei der durch die Applikation von graduell erhöhten Mengen an Allergen-Extrakt die Symptome, die das zugrundeliegende Allergen in einem Individuum auslöst, verbessert werden (BOUSQUET et al., 1998). Als wichtiger Schritt in der ASIT wird die Induktion einer peripheren T-Zell-Toleranz gesehen. Allergen spezifische regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) schütten anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) aus, die wiederum die Th1 und TH2-vermittelte allergen-spezifische Immunantwort drosseln. Zusätzlich wird die allergen-spezifische IgE und IgG-Antwort moduliert, indem sogenannte IgG4-Moleküle gebildet werden und offenbar in die IgE-Bindung an Allergene interferieren. Neben T- und B-Zellen werden auch Effektor-Zellen (eosinophile

Granulozyten, Mastzellen) durch die ASIT beeinflusst und ihre Reaktionen supprimiert (LARCHE et al., 2006; AKDIS & AKDIS, 2011) (vgl. **Abbildung 8**)

Der Vorteil an der Behandlung von allergischen Erkrankungen mittels ASIT liegt auf der Hand: Sie behandelt nicht symptomatisch, sondern ursächlich die Krankheit. Es wird eine sogenannte Anergie erzeugt, bei der das Immunsystem wieder in seinen ursprünglichen nicht-reaktiven Zustand zurückgesetzt wird.



**Abbildung 8, Darstellung der Immunreaktion bei einer Allergie/Autoimmunkrankheit vs. bei der therapeutischen Induktion einer Anergie**

**A** Bei einer Allergie oder Autoimmunkrankheit führt eine Kreuzverlinkung von membranständigen Antikörpern über das Allergen/Autoantigen zu einer Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zelle, die dann IL4 und IL12 ausschüttet und hierdurch T-Helferzellen aktiviert und B-Zellen zur Ausschüttung von IgG und IgE bringt.

**B** Die therapeutische Wirkung von Peptiden zielt auf die Induktion von T<sub>reg</sub>-Zellen und IgG4 und IgA-produzierenden B-Zellen ab. Durch die relativ kurzen Aminosäureketten der Proteine werden die membranständigen Antikörper nicht kreuzverlinkt und somit die Antigen-präsentierende Zelle auch nicht aktiviert, sondern in einer Art „Schlafzustand“ gehalten, das sie IL-10 und TGF-β ausschütten lässt.

Da eine solche ursächliche Therapie auch bei Autoimmunerkrankungen wünschenswert wäre, wurde intensive Forschung zur Anwendbarkeit und den Mechanismen hinter der Applikation von Peptiden zur Behandlung dieser Erkrankungen betrieben (LARCHE & WRAITH, 2005; GOKHALE & SATYANARAYANAJAIS, 2014).

Peptide, die Krankheits-assoziierte T-Zell-Epitope imitieren, aber so modifiziert sind, dass sie eine Toleranz induzieren, konnten in verschiedenen Krankheitsmodellen (KANG et al., 2005; SATPUTE et al., 2009) und sogar in klinischen Untersuchungen (WARREN et al., 2006;

KOFFEMAN et al., 2009) bereits erste Erfolge in der Verhinderung der Immunpathologie erzielen. Ein zugrunde liegender Mechanismus ist auch hier – wie bei der ASIT - wohl die Ausschüttung des immunmodulatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-10 (IL-10) durch T<sub>regs</sub> und dendritische Zellen (TARZI et al., 2006; GABRYSOVA & WRAITH, 2010). Bei der sogenannten therapeutischen Vakzinierung mittels Peptiden wird ein kurzkettiges (bis zu 20 Aminosäuren) Peptid, das ein MHC-II-T-Zell-Epitop abbildet, appliziert (LARCHE & WRAITH, 2005). Durch die kurze Aminosäurekette, die keine Tertiärstruktur ausbilden kann und durch ihre geringe Größe auch keine Verbindung von membranständigen Antikörpern untereinander induziert, wird bei der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) kein aktivierendes Signal ausgesendet, sondern durch die Ausschüttung von IL-10 und TGF- $\beta$  die Entwicklung von T<sub>regs</sub> gefördert (MOLDAVER & LARCHE, 2011) (siehe **Abbildung 8**). In den vergangenen Jahren wurden bereits einige solcher Therapeutika für diverse autoimmun bedingte Erkrankungen (z.B.: für Multiple Sklerose und Morbus Basedow) in Tieren und teilweise sogar auch schon in klinischen Studien getestet (STREETER & WRAITH, 2021). Einige Fragen bleiben bisher bei dieser Therapiemethode jedoch noch offen, insbesondere die Frage nach der richtigen Dosis, dem Applikationsweg und vor allem danach, wie lange die induzierte Toleranz anhält (LARCHE & WRAITH, 2005).

Ein weiterer Weg, wie spezifische Peptide bei Autoimmunerkrankungen als Therapeutikum dienen können, ist die Blockade von bestimmten Bindungsstellen, die für die Zell-Zell-Interaktion wichtig sind. So können Signale, die zur Aktivierung von verschiedenen Immunzellen oder zur Ausschüttung bestimmter Chemokine führen, moduliert oder blockiert werden. Beispielsweise konnte durch ein Peptid, das die Bindungsdomäne von CD2 imitiert, die Interaktion von CD2-CD58/CD48 - ein kostimulatorisches Signal für die Erkennung von Antigenen - zwischen T-Zellen und APCs insofern moduliert werden, dass das Fortschreiten der Arthritis im CIA-Maus-Modell verhindert wurde (GOKHALE et al., 2013). Auch in der Therapie von systemischem Lupus erythematosus und Multipler Sklerose wurden bereits Fortschritte in der Erforschung neuer Therapiemethoden mittels Peptiden gemacht, indem bestimmte Signalwege der Immunzell-Aktivierung blockiert oder moduliert wurden (BLOOM et al., 2011; SRINIVASAN & JANARDHANAM, 2011). Lupuzor™ (ImmuPharma, London, UK), ein Phosphopeptid, das die Immunantwort von CD4-exprimierenden T-Zellen moduliert, wurde sogar bereits in der Klinik getestet und als wirksam bewertet (MULLER et al., 2008; ZIMMER et al., 2013).



### III. ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Mausmodell der RA zu testen und zu etablieren, welches durch die Ausprägung verschiedener Antikörper, wie zum Beispiel auch ACPAs (Anti-citrullinierte Peptid Antikörper), der Pathophysiologie im Menschen möglichst nahekommt. Es soll gut reproduzierbar sein und sich für die Erprobung von verschiedenen Peptid-basierten Therapieansätzen eignen. Gleichzeitig soll die Möglichkeit der Schmerzmittelapplikation gegeben sein – sowohl im Sinne des Tierwohls, als auch zur Annäherung an die Situation im Menschen.

Ein weiteres Ziel ist dann, im etablierten Krankheitsmodell, verschiedene Peptide zu testen, die eventuell geeignet sind, die Arthritis-Symptome zu verbessern. Diese Peptide sollen im Sinne einer Antigen-spezifischen Therapie die Immunantwort regulieren und im besten Fall wieder normalisieren.



## IV. ERGEBNISSE

Das Manuskript wird in der veröffentlichten Form vorgelegt (WENHART et al., 2021) in *Scientific Reports (Nature)*.

### **A fructosylated peptide derived from collagen II T cell epitope for long-term treatment of arthritis (FIA-CIA) in mice**

Clara Wenhart<sup>1</sup>, Hans-Peter Holthoff<sup>2</sup>, Andreas Reimann<sup>1</sup>, Zhongmin Li<sup>1</sup>, Julia Faßbender<sup>1</sup> & Martin Ungerer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Advancecor, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

<sup>2</sup>ISAR Bioscience, Semmelweisstr. 5, 82152 Planegg-Martinsried, Germany

*Scientific reports*, 2021 Vol. 11 Issue 1 Pages 17345

DOI: 10.1038/s41598-021-95193-2

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory autoimmune disease which affects primarily the joints. Peptides of several proteins have shown an effect in some experimental animal models of RA. We investigated arthritis development in male DBA/1 mice which were injected with bovine collagen II (bCII) and human fibrinogen (hFib) on day 0 and 21, leading to stable and reproducible disease induction in 100% of immunized mice (FIA-CIA). In a second study, two bCII – derived peptides were given three times in the course of six weeks after FIA-CIA induction to test for impact on arthritis. Mice were scored weekly for arthritis and anti-citrullinated peptide antibodies (ACPAs) were determined in the sera taken on days 0, 14, 35, 56 and 84. Histology of the hind paws was performed at the end of the experiment. Intravenous administration of peptide 90578, a novel fructosylated peptide derived from the immunodominant T-cell epitope of bCII, at a dosage of 1mg/kg resulted in significant beneficial effects on clinical outcome parameters and on the arthritis histology scores which was sustained over 12 weeks. Survival tended to be improved in peptide 90578-treated mice. Intravenous administration of pure soluble peptide 90578 without adjuvants is a promising approach to treat RA, with treatment starting at a time when ACPAs are already present. The results complement existing data on peptide “vaccination” of healthy animals, or on treatment using recombinant peptide expressing virus or complex biological compounds.

### Abbreviations

ACPAs	Anti-citrullinated peptide antibodies
AIA	Adjuvant-induced arthritis
bCII	Bovine collagen II
BSA	Bovine serum albumin
CFA	Complete Freund’s adjuvant
CCP	Cyclic citrullinated peptides
DMARDs	Disease modifying anti-rheumatic drugs
FIA-CIA	bCII- and hFib-immunized mice which develop RA-like arthritis
FMOC	Fluorenylmethoxycarbonyl
hFib	Human fibrinogen
IFA	Incomplete Freund’s adjuvant

IL6R	Interleukin-6 receptor
MHC II	Major histocompatibility complex class II
PBS	Phosphate-buffered saline
RA	Rheumatoid arthritis
RF	Rheumatoid factor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor

## Introduction

Rheumatoid Arthritis (RA) is one of the most common systemic autoimmune diseases with a prevalence of 0.5-1% in the overall population (SILMAN & PEARSON, 2002). Several risk factors contribute to the development of RA, including genetic factors, age and gender, smoking, socioeconomic status and infections (ALAMANOS & DROSOS, 2005). Pathophysiology includes inflammatory arthritis, but also extraarticular manifestation of disease with cardiovascular, pulmonary, psychological and skeletal disorders (MCINNES & SCHETT, 2011). Rheumatoid factor (RF), anti-citrullinated peptide antibodies (ACPAs) (AGGARWAL et al., 2009) and anti-collagen-II-antibodies (MULLAZEHI et al., 2012) are commonly found in sera of patients with RA.

Therapy of rheumatoid arthritis mainly relies on disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) such as the conventional synthetic methotrexate, biological drugs (TNF-, T-cell, B-cell or IL-6R-inhibitors) or the targeted synthetic janus kinase inhibitor tofacitinib. Although there are many therapeutic approaches, remission or low disease activity is not achieved in all patients, or the patients lose responsiveness over time (SMOLEN et al., 2016). In addition, some of those therapeutics result in nonspecific immunosuppression, which can lead to complications such as infections or cancer (ALBRECHT & MULLER-LADNER, 2010; WANG et al., 2018; SEPRIANO et al., 2020). Thus, further study of RA and search for therapies is needed.

Peptides can regulate the immune response to induce tolerance of certain antigens and are a promising approach in mitigating or even curing autoimmune diseases and other immunological disorders (LARCHE & WRAITH, 2005; GOKHALE & SATYANARAYANAJOIS, 2014). The immunodominant T-cell epitope of bovine collagen II (bCII) has been shown to be a peptide with only eight amino acids at positions 260-267 of the collagen  $\alpha$ -chain (BRAND et al., 1994; ROSLONIEC et al., 1996). Several studies which investigated the effects of this

peptide on the outcome of collagen-induced arthritis (CIA) in mice have been conducted and evaluated. Coimmunization with CII and peptide CII 245-270 [s260,261,263] leads to a dose-dependent effect on the incidence of arthritis in the mouse CIA model in DBA/1 mice. When the peptide was mixed together with collagen at a dose which exceeded the amount of collagen II molecules by 480-fold on a molar basis, this mixture succeeded in completely preventing the development of arthritis in CIA mice (MYERS et al., 1993). Intravenous or intranasal administration of a galactosylated CII 259-273 in complex with the MHC-II-molecule A<sup>q</sup> reduced the incidence and severity of CIA in B10.Q mice and ameliorated chronic relapsing disease (DZHAMBASOV et al., 2006). Gene therapy with hematopoietic stem cells which had been infected with lentiviral particles expressing the CII 259-270 peptide on MHC-A<sup>q</sup>-complex several weeks before the immunization reduced the rate and the severity of CIA in DBA/1 mice (TENGVALL et al., 2016). In a rat model of adjuvant-induced arthritis (AIA), s.c. injections of a multi-epitope peptide reduced disease severity (GERTEL et al., 2015).

With the exception of the multi-epitope peptide tested in AIA rats (GERTEL et al., 2015), these peptide administrations relied on cofactors or recombinant viral gene transfer (DZHAMBASOV et al., 2006; TENGVALL et al., 2016) or were only effective if given before or simultaneously with the immunization (MYERS et al., 1993; TENGVALL et al., 2016). Since we wanted to study a disease model which should be closer to the condition of human RA patients, we investigated the administration of peptides derived from the immunodominant epitope of CII in CIA without an additional MHC complex in a long-term mouse model of RA when they were given after the induction of arthritis. We investigated the effects of a novel fructosylated modification of the epitope peptide and compared them to those of non-fructosylated peptide variant.

First, we established a mouse model of combined human fibrinogen (hFib)/bCII injection in our laboratory. The CIA mouse model has long been established in rheumatoid arthritis research and is well described (COURTENAY et al., 1980; BRAND et al., 1994; BRAND et al., 2007; PIETROSIMONE et al., 2015). However, there are contradictory reports on the formation of anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) in this model (VOSSENAAR et al., 2003; VOSSENAAR et al., 2004; KUHN et al., 2006; CANTAERT et al., 2013). ACPAs, commonly detected by anti-cyclic citrullinated peptide antibody (anti-CCP)-ELISAs are the most important diagnostic serologic factor of human RA and are predictive for the severity of the disease (AVOUAC et al., 2006; KOURILOVITCH et al., 2014). To better reproduce the features

of human RA in the mice, we used a modified immunization method based on the publication by Ho et al. (HO et al., 2010) with a combined bCII/hFib basal injection and hFib boosting (referred to as FIA-CIA). Here, we report the resulting stable disease model which developed in 100% of treated mice, and which is characterized by anti-citrullinated-fibrinogen antibodies. We then investigated the effects of the fructosylated and non-fructosylated bCII-derived peptides on arthritis development which were given three times in the course of six weeks after establishment of the disease phenotype.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Male DBA/1 mice were purchased from Janvier (Janvier Labs, France). The mice were housed under standard housing conditions in individual ventilated cages (IVC) and were fed a high-fat diet (JL Maus 5K20mod.; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). To minimize the risk of fighting, mice were housed in groups of three per cage. Enrichment material contained nestlets (NES3600-NESTLETS, Ancare, Bellmore, NY), other nesting material (Bed r´ Nest, The Andresons, Maumee, Ohio) and cellulose (Covetrus). After arthritis onset the litter was upped so that the mice could reach food and water standing on four paws. Mice were 8 weeks of age at the time of the first immunization. A total of 47 mice were used in the experiments. In the pilot study 10 mice were immunized according to the protocol which is outlined below and 2 mice served as native control without immunization. For acclimatization, mice were obtained at an age of 6 weeks and housed for 2 weeks before the start of the experiment. In the therapy study 30 mice were immunized and randomly distributed to the three treatment groups. 5 mice were investigated in the Complete Freund´s Adjuvant (CFA) control group, in which no therapeutic peptide was added. Sample size calculation was done a priori based on other RA mouse model effect sizes and a power of 80%.

Personnel which handled or investigated these mice were blinded to the treatment. All animal experiments were performed in accordance to Directive 2010/63/EU and approved of by the Government of Upper Bavaria, reference number: 55.2Vet-2532.Vet\_02-17-94, based on prior evaluation of animal study plan design and group sizes by the certified bio-statistician Dr. Peter Klein. The description of all procedures involving animals was done according to the ARRIVE Guidelines in reporting in-vivo experiments (KILKENNY et al., 2010).

## Immunization

Bovine collagen II (bCII; Chondrex, Inc.) and human fibrinogen (hFib; Millipore/Calbiochem) were dissolved according to the manufacturers' instructions to a final concentration of 4mg/ml for bCII and 8mg/ml for hFib. Then each solution was emulgated separately in a 1:1 ratio with Complete Freund's Adjuvant (CFA; Chondrex, Inc.) containing 2mg/ml *M. tuberculosis* H-37 RA. For emulgation, two luer lock glass syringes were linked via a micro-emulsifying needle (Sigma-Aldrich) and the substances mixed until there was a stabile emulsion.

Mice were anesthetized with isoflurane (CP-Pharma) at a concentration of 1,5-2%. For analgesia Novaminsulfon (metamizol; bela-pharm) was given subcutaneously (s.c.). Then 50µl of bCII-CFA emulsion was administered s.c. at the base of the tail and 50µl of hFib-CFA emulsion was administered s.c. at the left flank. On day 21 after the first immunization, mice were boosted with 50µl hFib in incomplete Freund's Adjuvant (IFA) s.c. at the left flank. CFA-control mice were administered the equivalent doses of CFA and IFA emulgated with 0.9% NaCl to reach equal injection volumes. Native control mice did not receive any immunization. Both CFA- and native control mice served as negative control in the experiments.

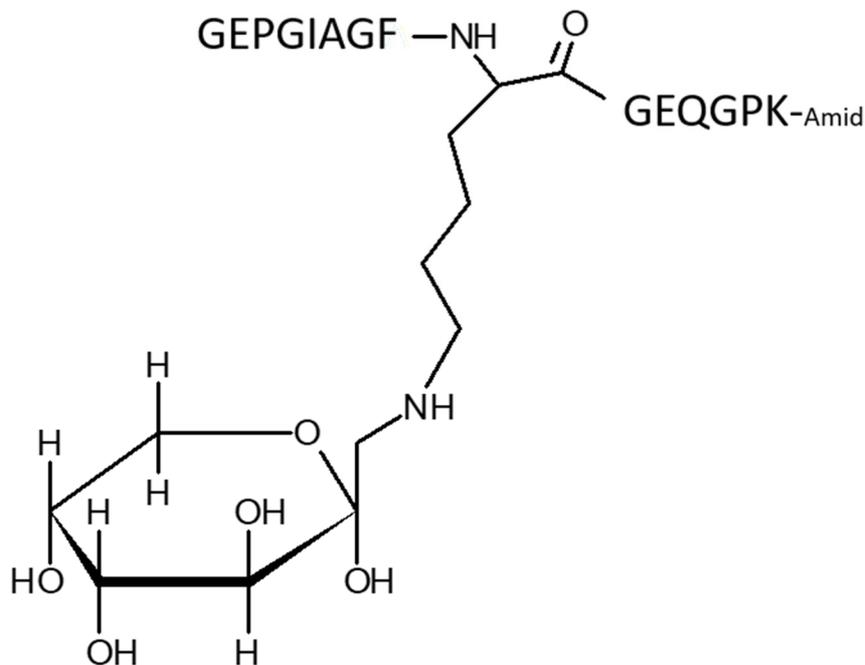
For treatment of pain in arthritic animals, Metacam (meloxicam; Boehringer Ingelheim) was used at a dosage of 1mg/kg. For treatment of severe local reactions to the first immunization, afflicted animals were treated with 10mg/kg Baytril (enrofloxacin; Bayer) for 5 days per os.

## Clinical Investigation

Paws were measured weekly. For that purpose, the mice were anesthetized shortly with isoflurane and the carpal and tarsal joints were measured via a caliper (Käfer Messuhren, Germany) (BRAND et al., 2007). In addition, each paw was scored according to an arthritis scoring system (score 0= normal paw; score 1= 1 toe inflamed and swollen; score 2= >1 toe swollen or carpal/tarsal joint swollen; score 3= entire paw inflamed and swollen; score 4= very inflamed and swollen paw or ankylosis of the paw). Scores were added up to a total score of 0-16 per mouse. Upon development of arthritis, mice were examined daily. If an animal did not put weight on or use a paw anymore, it was euthanized immediately.

## Synthesis of peptides

Peptides represented the immunodominant T-cell determinant of bCII, peptides 256-270 of the  $\alpha$ -chain (BRAND et al., 1994). Peptide 90091 was synthesized with the amino sequence GEPGIAGFKGEQGPK. Peptide 90578 was based on the same amino acid sequence, but posttranslationally modified by adding a fructosyl residue to the lysine at position 264, thus creating a novel chemical structure core (see **Figure 1**). Both were synthesized by Biosyntan Berlin according to described protocols of fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) resin-based amino acid chain elongation. Both peptides were purified up to 95% ( $\leq 95\%$ ) by means of HPLC and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.



**Figure 1** Novel fructosyl structure of peptide 90578. The peptide structure was modified by adding a cyclic fructosyl structure to the lysine residue. To enhance legibility, this lysine residue is shown as chemical structure, whereas the other amino acids of the peptide are just indicated as single letter codes.

## Serum collection and peptide treatment application

Serum was collected on days 0, 14, 35 and 56 of the experiment via bleeding of the tail vein. Treatment with peptides 90091, 90578 (at a concentration of 1mg/kg body weight) or 0.9% NaCl was applied intravenously on day 14, 35 and 56. Mice were randomly distributed to the three treatment groups. Treatment compounds were numbered 1, 2 and 3. To minimize confounders, each of the three mice per cage received a different treatment. All clinical and

histological investigators were blinded to the treatment until data analysis was finished. For comparability between the therapy groups, all mice, including the CFA control mice, received a daily dose of 1mg/kg Metacam (meloxicam) from day 14 after the first immunization on until the end of the experiment. Mice were killed on day 84 of the experiments via intracardiac puncture and blood withdrawal under ketamine/xylazine anaesthesia.

### **Measurement of mouse antibodies by ELISA**

ELISA plates were coated with 100µl per well of either 1µg/ml bCII (Chondrex, Inc.) or 1µg/ml hFib (Millipore/Calbiochem) or 1µg/ml citrullinated hFib (Cayman) or CCP-peptide at a concentration of 10 µg/ml in coating solution for 1 h. The CCP peptide we used for the selected CCP assay had the following sequence: HQCHQEST(cit)GRSRGRCGRSGS, with disulphide bonds spanning C3 –C16.

All subsequent procedures were performed at room temperature (RT) and incubations were done on a microtiter plate shaker. The coated plates were washed three times with PBST (PBS, 0,1% Tween-20), blocked with 100 µl/ well of blocking solution (PBST, 1% BSA) for 1 h, and washed again. Blood serum samples from mice were diluted 1:100 in PBST + 1% BSA and 100µl were transferred to the blocked ELISA plates and incubated 2 h at RT. After washing with PBST, the ELISA plates were incubated with 100 µl/well of the detection anti-mouse antibody labelled with POD (Jackson ImmunoResearch, #715-035-151, 1:10,000 dilution in PBST + 1% BSA), for 1 h. After washing, the POD was detected by incubation with 100 µl/ well of TMB substrate (Thermo Scientific, #34029) until a maximal optical density (OD) of about 1 to 2 was reached. Finally, the colorimetric reaction was stopped with 100 µl/ well stopping solution (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and the OD determined at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 595 nm with the Tecan Infinite F 200 plate reader.

### **Histology**

Mice were examined postmortem for macro-anatomical pathology. Then, the right hind paws of the mice were amputated at the level immediately above the external malleolus. The skin was removed and the skinless paws were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C overnight. Decalcification was performed in a mixture solution of 14% EDTA and 4% paraformaldehyde

at a ratio of 1:1 for one day and subsequently in fresh 14% EDTA alone for 2 more weeks at RT under constant agitation. After this the paws were incubated overnight in a mixture medium of 30% sucrose dissolved in PBS and finally embedded in OCT compound (Tissue-Tek O.C.T. compound; VWR Chemicals, Leuven, Belgium).

Frozen sagittal sections (7µm) were cut in series with an interval of 500 µm using a cryostat (temperature, -19°C; Leica Biosystems, Nussloch, Germany, and Buffalo Grove, IL) and mounted on Trubond microslides (Trubond 380, Catalog no: 63700-W1; Electron Microscopy Sciences; Hatfield, PA 19440; USA). The sections were kept in a freezer at – 80°C until use. There was a total of five sections in each paw to cover the distance from the external to internal malleolus.

Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) using standard protocols and were assessed for pathologic changes in the joints under the bright field illumination on a Zeiss upright microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) by a blinded investigator.

A histological score was determined using a 0 to 3 scale based on the intensity and extent of change to the ankle and tarsal joints compared to native mice of the same age for each of five categories (score 0= no changes; score 1= slight change; score 2= moderate change; score 3: marked change). The categories consisted of: inflammation, synovial alterations, cartilage degeneration, pannus formation and bony changes. The histological scores were expressed as the sum of the five categories for each section with a highest score of 15 per slide. The average of the scores of the middle three of five sections represents the histological score of one animal.

### **Statistical evaluation**

Results were compared by analysis of variance (ANOVA) after testing for normal distribution by Kolmogorov-Smirnov's test using SPSS v19. If normal distribution was not present, Mann-Whitney-Test was used. Kaplan Meier plots were compared by log-rank testing.

### **Ethics approval and consent to participate**

All animal experiments were performed in accordance to Directive 2010/53/EU and approved of by the Government of Upper Bavaria, reference number: 55.2Vet-2532.Vet\_02-17-94

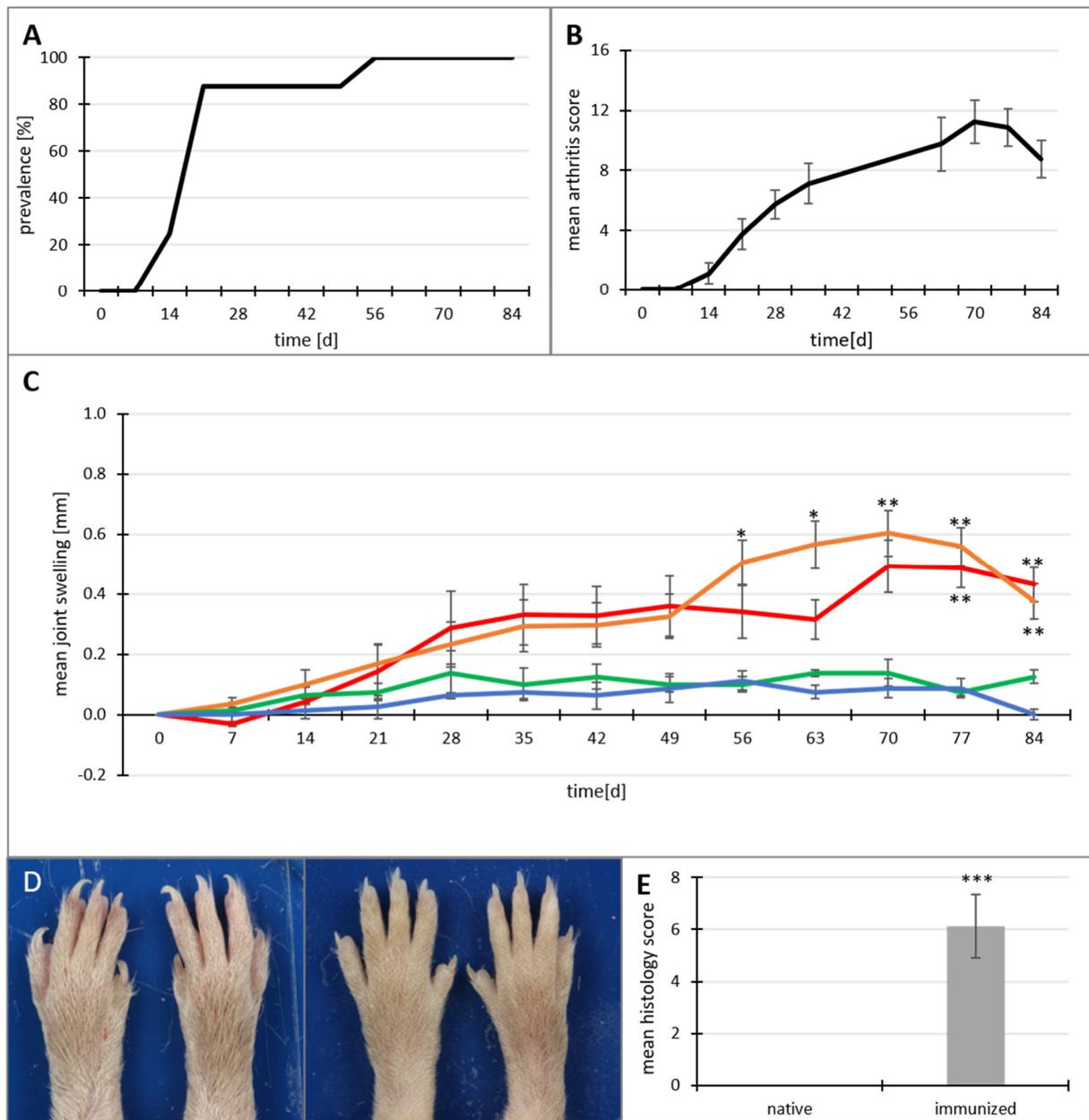
## Results

### *Immunization of DBA/1 mice with human Fibrinogen (hFib) and bovine Collagen (bCII) leads to arthritis in all immunized animals*

In a pilot study, 10 DBA/1 mice were immunized according to the immunization scheme described above. Two additional mice which did not receive any immunization but were measured and scored according to the protocol served as native controls. Due to severe affection at the immunization sites, two of the immunized mice had to be euthanized soon after the first injection and were excluded from analysis so that in the end, a total of 8 immunized mice and 2 native controls were used for evaluation of the experimental model. As shown in **Figure 2 A** the mice began to develop signs of arthritis on day 14 of the experiment. On day 56 the prevalence of arthritis reached 100%. The arthritis score was also severe with a maximum mean score of 11.25 on day 70 (**Figure 2 B**). None of the native control mice developed clinical signs of arthritis.

Paw measurements via a caliper showed significant differences between immunized and native mice (**Figure 2 C**). The measured joints, especially the tarsal joints, showed swelling starting on day 28, which was significantly increased between day 56 and 70 until the end of experiment. These results occurred in parallel to the respective arthritis scores.

Pathology and histology confirmed the clinical findings. The paws showed severe inflammation and ankylosis on all limbs. **Figure 2 D** shows the marked difference between the hind paws of immunized and native mice. The whole paws of the immunized mice showed severe swelling including tarsal joints and metatarsus. The digits were swollen and ankylosed and the claws are prolonged due to a lack of use and thus, less abrasion. The HE-stained sections of the right hind paws were investigated histologically. The mean histology score of the immunized animals ranged at 6.1 whereas the native mice showed no signs of arthritis (**Figure 2 E**). Main findings were inflammation, cartilage erosion, bone alterations and pannus formation. Representative histological images can be seen in **Figure 4** – CFA control and CFA + NaCl groups.



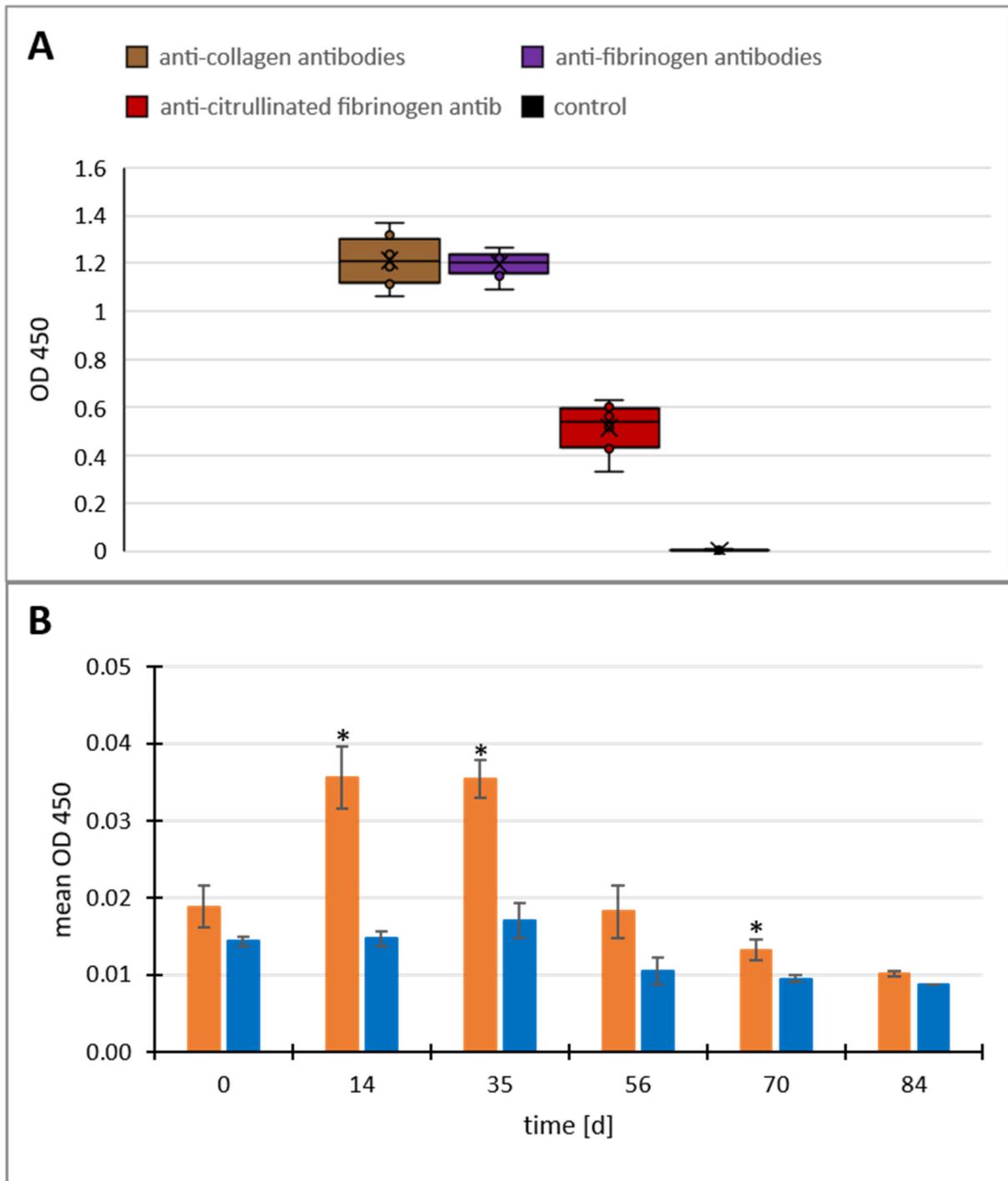
**Figure 2** Clinical and histological results of the pilot study for FIA-CIA. **(A)** Arthritis prevalence in immunized mice, **(B)** mean arthritis score of immunized mice, **(C)** mean swelling of joints of immunized (red: carpal; orange: tarsal) vs native control (green: carpal; blue: tarsal) mice, **(D)** Paws of immunized (left) and native (right) mice in comparison. Swelling and ankylosis of joints, toes thickened and the claws prolonged in immunized mice. **(E)** Mean histology scores of immunized and native mice. Results for 8 immunized mice and 2 native controls are shown. Histology score of FIA-CIA mice was significantly increased compared to that of native (not immunized) controls: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p = 0.002$ ; error bars indicate standard errors of the mean (SEM).

*The mice developed a strong antibody response to collagen and fibrinogen as well as citrullinated fibrinogen*

For assessment of antibodies, various antigens were coated on ELISA plates, and the sera of the mice were added. Binding of antibodies to the antigens was then measured by adding anti-mouse antibody labelled with POD.

The mice developed a strong antibody response to the immunizing antigens bCII and hFib - the OD-450-values ranged between 1 and 1.4. The mice also developed an immune reaction to citrullinated fibrinogen, though to a lesser extent (OD about 0.5). The native control mice did not develop any of those antibodies (see **Figure 3 A**). Repeated measurements were carried out for all antibodies, and showed rapid increases of anti-fibrinogen, anti-collagen and anti-citrullinated fibrinogen antibodies to high values after 14-35 days, which did not change thereafter. For reasons of clarity we only show the values obtained at the final blood sampling at day 84 upon sacrifice.

We then tested the sera on ELISA plates that had been coated with one selected CCP peptide. **Figure 3 B** shows that the antibody levels of the immunized animals reached low, but significantly higher levels than the native mice on day 14, 35 and 70. After that the OD values subsided to the same level as the native mice.



**Figure 3** ELISA studies of the sera in FIA-CIA **(A)** Antibody titers against the immunizing antigens bCII (brown), hFib (violet) and citrullinated fibrinogen (dark red) on day 84, at the end of the experiment. Repeated measurements were carried out for all antibodies, and showed rapid increases of anti-fibrinogen, anti-collagen and anti-citrullinated fibrinogen antibodies to high values after 14-35 days, which did not change thereafter. For reasons of clarity we only show the values obtained at the final blood sampling upon sacrifice. Antibody titers of native control animals are shown in black, and were negative (zero values) for all three investigated antibodies. **(B)** Antibodies against CCP, orange: immunized; blue: native control; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; error bars indicate SEM. Repeated measurements are shown for anti-CCP antibodies due to their variation over time.

*Administration of peptide 90578 to immunized animals leads to reduced histological signs of arthritis*

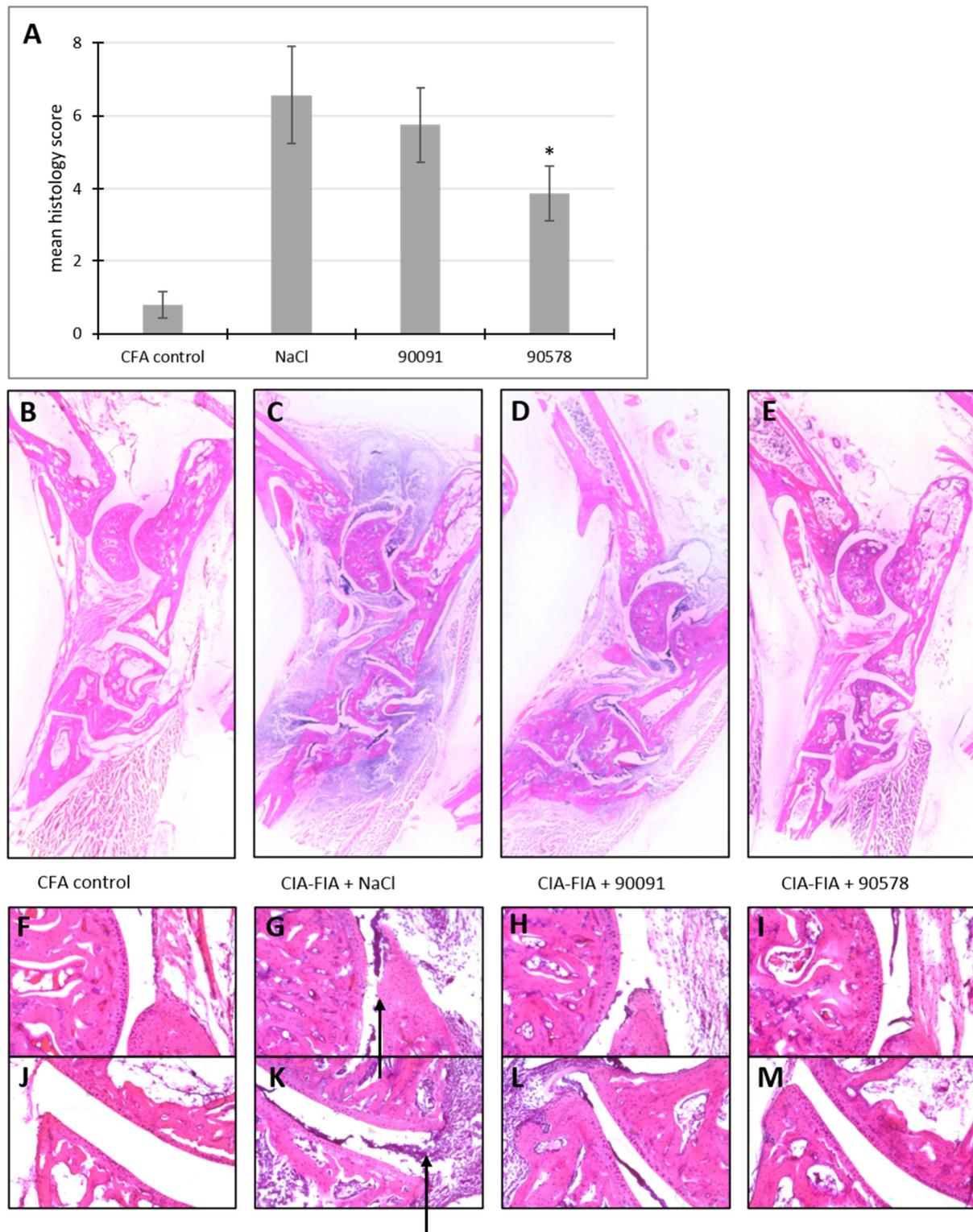
In a second experiment, FIA-CIA immunized mice were given either peptide 90091 or peptide 90578 at a concentration of 1mg/kg i.v. into the tail vein on days 14, 35 and 56 after the first immunization. As positive controls, one group of mice received 0.9% NaCl as treatment. In addition, five mice were immunized with CFA/IFA alone at the two injection sites to serve as negative control animals (further referred to as CFA-control mice). They did not receive any treatment.

Of the overall 30 FIA-CIA immunized mice, one had to be killed due to severe reaction at the injection site before treatment started and was excluded to the experiment. The remaining 29 mice were randomly distributed to the three treatment groups. Investigators were blinded to the treatments. Of those 29 mice, 6 had to be killed in the course of the experiment and were excluded to the analysis. For data analysis at the end of the experiment the remaining 23 mice were distributed as follows to the three treatment groups: 8 mice each received either peptide 90578 or 90091 and 7 mice received NaCl.

The following figures show data from three different groups. Nearly all immunized animals developed arthritis, most starting between day 21 and 28. There was a significant decrease in the histology score of the 90578-treated group in comparison to the NaCl-treated group. The mice which had been given the peptide 90578 had an average histology score of 3.9, whereas the mice only treated with NaCl had a score of 6.6 (**Figure 4 A**).

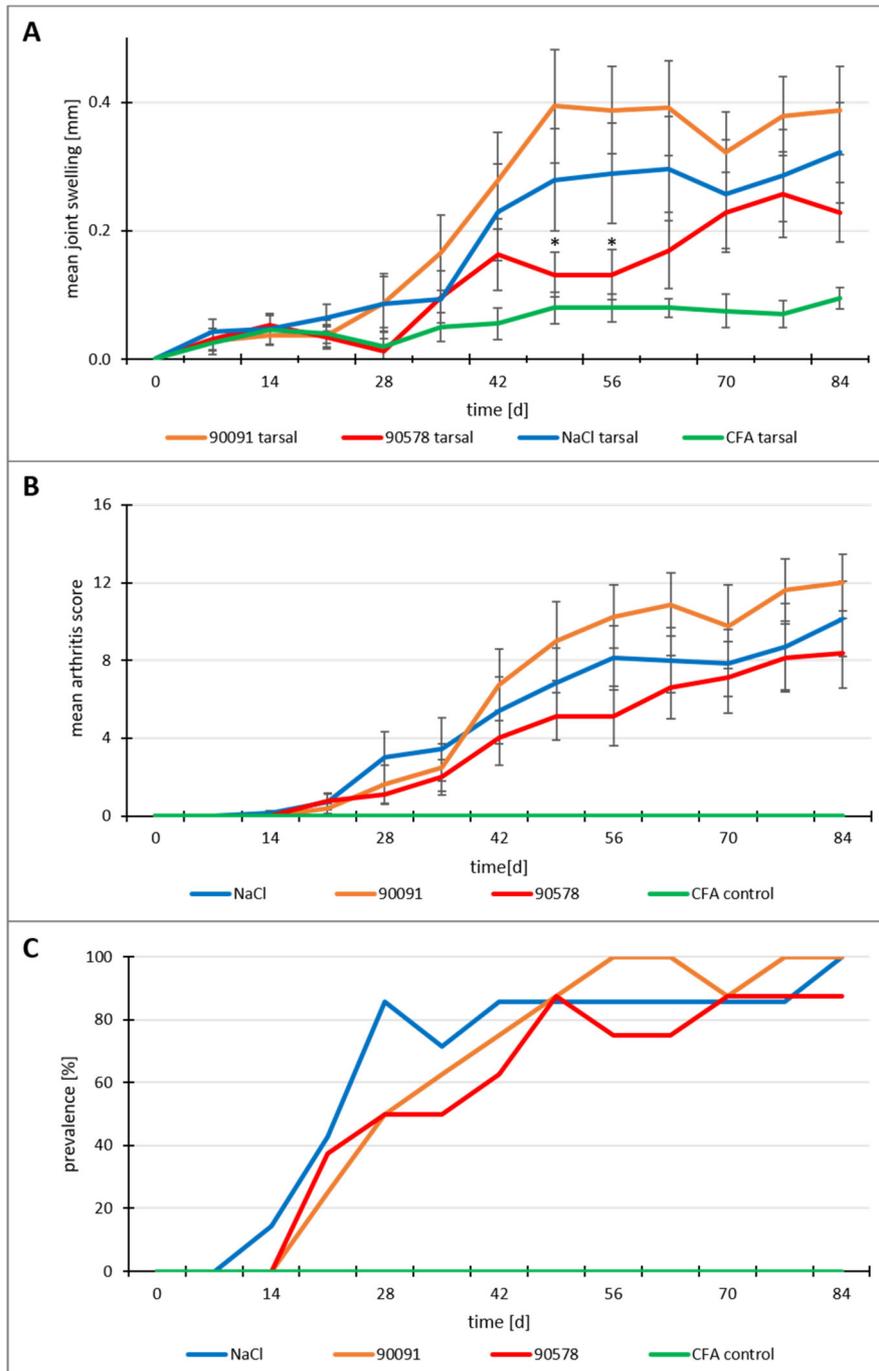
**Figure 5 B-M** show the difference between the HE-stained sections of the right hind paw. In the overview of the paws the differences between CFA control animals and NaCl- and 90091-treated animals are apparent. The soft tissues around the ankle and metatarsus were severely enhanced in the NaCl-treated mice (**Figure 4 C**) and in the 90091-treated mice (**Figure 4 D**). In addition, the darker blue staining of the pictures of NaCl and 90091 mice is due to a massive accumulation of lymphocytes in this region. In contrast to this, the 90578-treated mice showed less tissue enhancement and lymphocyte infiltration (**Figure 4 E**).

Ankle and tarsal joints were investigated in detail (**Figure 4 F-M**). The NaCl mice showed signs of severe inflammation with lymphocyte infiltrates, cartilage and bone erosion. Pannus formation is also evident. 90091-treated animals, the cartilage was intact and there were only a few lymphocyte infiltrates in the subchondral bone. CFA-immunized control mice showed no significant joint alteration.



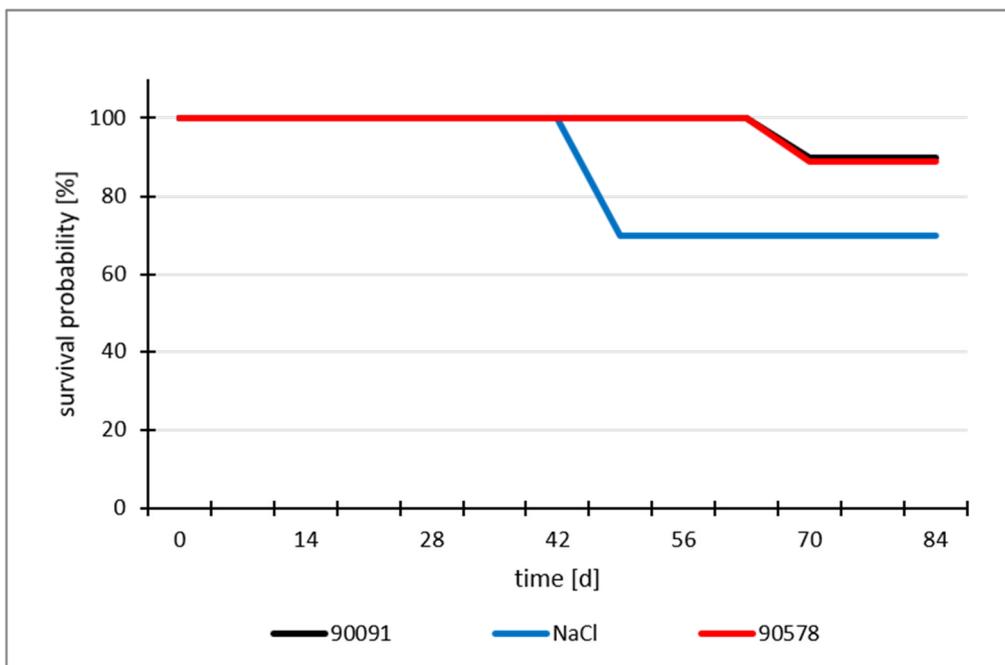
**Figure 4** Histological findings in the therapy study with peptides 90091 and 90578 or NaCl. **(A)** Mean histology scores of CFA-immunized control mice and FIA-CIA mice treated with peptides 90091 (N = 8 independent animals), 90578 (N = 8) or NaCl (N = 7). Error bars indicate SEM; \* $p < 0.05$  (all values compared to NaCl control mice). **(B-E)** Overview of the tarsus, **(F-I)** ankle joint, **(J-M)** tarsal joint. **(B,F,J)** Mice immunized with CFA alone, **(C,G,K)** FIA-CIA immunized mice treated with NaCl, **(D,H,L)** FIA-CIA immunized mice treated with peptide 90091, **(E,I,M)** FIA-CIA immunized mice treated with peptide 90578. Arrows indicate histological changes in the FIA-CIA group.

**Figure 5** shows that tarsal joints of mice receiving peptide 90578 had significantly lower swelling on days 49 and 56. The arthritis scores of the group treated with the 90578 peptide tended to be less severe than in mice treated with 90091 or NaCl. Peptide 90091 even seemed to enhance arthritis, but not significantly. None of the CFA control mice showed any clinical signs of arthritis, paw measurements were significantly lower than in FIA-CIA immunized NaCl treated mice.



**Figure 5** Clinical results of the therapy study with peptides 90091 and 90578 or NaCl. **(A)** Mean paw swelling of tarsal joints, **(B)** mean arthritis score, **(C)** prevalence of arthritis. Treatments: red: peptide 90578 (N = 8 independent animals); orange: peptide 90091 (N = 8); blue: NaCl (N = 7); green: CFA-immunized negative controls (N = 2); \* $p < 0.05$  (all values compared to NaCl control mice); error bars indicate SEM.

Several animals had to be killed before the end of the experiment due to severe arthritis. As soon as an animal did not put weight on a paw anymore, it was euthanized immediately. The survival probability which is shown in the Kaplan-Meier-Chart in **Figure 6** shows the resulting survival rates of each group. In the NaCl-treated group, more and earlier drop outs were observed than in the groups that received peptide 90091 or 90578 as treatments. Statistical analysis based on log-rank testing did not reveal a significant difference between groups, which may be due to low number of cases. None of the CFA- control mice had to be killed.



**Figure 6** Kaplan-Meier-Chart of the survival probability in different treatment groups. Mice were killed prior to the end of experiment when arthritis was too severe. Treatments: red: peptide 90578; black: peptide 90091; blue: NaCl.

*Antibody levels of peptide 90091- and peptide 90578- treated animals were not affected by treatment*

Although histological and clinical findings support an effectiveness of peptide 90578 in FIA-CIA mice, this effect could not be found in the antibody levels. In the ELISAs of the sera taken on days 35 and 84 there was no difference in anti-bCII or anti-hFib antibody titers between the three treatment groups. The antibody titers increased to the same levels regardless of treatment (data not shown).

## Discussion

In this paper we describe a mouse RA model in which the administration of a fructosylated peptide derived from bCII reduced clinical disease severity and damage to the joints seen in histology sections of the paws, when administered IV after disease had been established. These effects were not observed with the non-fructosylated homologous peptide.

The mouse model described here was modified on the FIA-CIA model published by Ho et al. (HO et al., 2010), is highly reproducible and leads to severe arthritis of the paws in up to 100% of the animals. The mice established an immune reaction and developed antibodies directed to citrullinated fibrinogen as well as to the immunizing antigens. The presence of anti-citrullinated fibrinogen antibodies can be explained by two theories: One is that human fibrinogen gets citrullinated in the course of the preparation, so that the administered fibrinogen already contains citrulline residues, another theory is that the protein arginine deiminase 4 (PAD-4) enzyme that exists in polynuclear cells can citrullinate the peptides in the joint when those cells die and the PAD-4 is set free (VOSSENAAR et al., 2003). Mass spectrometry showed that human fibrinogen (hFib) derived from Sigma-Aldrich or Calbiochem already contains certain citrulline residues (HO et al., 2010). However, the theory that PAD-4 can contribute to the arthritis in citrullinating peptides and proteins cannot be dismissed. It has been shown that NETotic and necrotic granulocytes can citrullinate fibrinogen via PAD-enzymes (ARNOUX et al., 2017). Upon immunization with PAD, some mice even developed antibodies against citrullinated fibrinogen (ARNOUX et al., 2017). Thus, the presence of anti-citrullinated fibrinogen antibodies is likely due to a mix of both those reasons.

Compared to the immunisation method described by Ho et al. (HO et al., 2010), we used only a tenth of the *Mycobacterium tuberculosis* dosage (0.05 mg instead of 0.5 mg per injection site) for the first immunization and half of the bCII dosage (0.1 mg per mouse compared to 0.2 mg). Despite the lower doses, we were able to induce the arthritis with sufficient severity in 100% of the immunized animals. The injection volume of only 50µl per injection site also differs from the description of the CIA model in some publications. Most use an injection volume of 100 µl (CAMPBELL et al., 2000; BRAND et al., 2007) or a lower volume and instead a higher concentration of mycobacteria in the emulsion (COURTENAY et al., 1980). Here we present that in FIA-CIA, injection volumes of 50 µl and a *M.tuberculosis*-concentration of 2 mg/ml in CFA is enough to induce a severe arthritis. A reduction of *M.tuberculosis* in CFA incurs lower risks of severe ulcers or granulomas at the injection sites of the mice (CAMPBELL et al.,

2000) , which otherwise can lead to termination of the experiment before arthritis development and a need for more mice due to drop-outs.

Although the mice received a daily administration of the COX-2-blocker meloxicam upon development of arthritis, the severity of the arthritis increased even under this treatment. The dose was apparently not sufficient to have an unwanted impact on the joint inflammation, but visibly reduced the pain of the animals. Even the administration of meloxicam before the development of signs of arthritis in the therapy study did not prevent the onset of arthritis and the animals did not develop any adverse effects over the course of the experiment. Meloxicam has the advantage over other recommended analgesics in animal arthritis studies such as buprenorphin or paracetamol (acetaminophen) (HAWKINS et al., 2015) that it has to be given only once a day, is orally available and has less side effects. Thus, we propose it is possible to use meloxicam in the pain treatment of rheumatic animals in therapy studies. With regard to the 3Rs in laboratory animal welfare, reduction of the immunization dose and volume as well as application of pain killers should be considered in the refinement of mouse arthritis models.

Contrary to the findings of other groups (KUHN et al., 2006; HO et al., 2010), we were not able to find relevant CCP2 antibody levels, as determined with the commercially available assay in the sera of our mice. These tests showed no difference between immunized and native mice. Anti-CCP assays are used to detect the presence of ACPAs. As seen in the anti-citrullinated fibrinogen ELISA, our mice developed antibodies against at least one citrullinated protein. However, those antibodies could not be detected by the commercial anti-CCP2 tests. Also, using an assay with one single CCP coated on ELISA plates we found slight differences in antibody levels at three of six measurement days. Whether this result is due to a low antibody presence against citrullinated peptides in the sera or a difference in anti-CCP antibodies between mice and humans and thus, a low suitability of the tests for mouse studies remains to be elucidated.

The peptide 90578 had a significant effect on the histological outcome of the FIA-CIA in DBA/1 mice. When administered intravenously on three different time points after the first immunization, this peptide led to significantly reduced histological signs of arthritis in the treated animals compared to the control group. Peptides that mimic epitopes of collagen II have been shown to reduce or prevent the development of CIA in mice and rats, when administered before (MYERS et al., 1989; KU et al., 1993; MYERS et al., 1995; HONDA et al.,

2004) or in parallel to the immunization (MYERS et al., 1993; SAKURAI et al., 2006; MYERS et al., 2007), with an additional MHC-II-molecule (DZHAMBASOV et al., 2006; TENGVALL et al., 2016) or by attaching the peptide to an immune or T-cell binding peptide (ZIMMERMAN et al., 2010). Some authors described oral or nasal administrations of peptides to induce mucosal tolerance (STAINES et al., 1996; ZHU et al., 2007; HASSELBERG et al., 2009). But they also either applied the peptide before the induction of the arthritis (STAINES et al., 1996; ZHU et al., 2007) or used additional immune modulators like a cholera toxin derived fusion protein (HASSELBERG et al., 2009). Administration of peptides before the induction of arthritis does not replicate the situation found in human RA patients and this may be a critical point in finding new treatment strategies for RA. Also, the use of additional molecules like MHC or cholera toxin-derived proteins to the peptide increases the risk of severe adverse reactions which can be another reason, why new treatment strategies subsequently failed in clinical studies in humans.

There are already some descriptions of CIA models in which the administration of modified peptides of collagen with two or three amino acid substitutions after the immunization or even after development of arthritis symptoms resulted in a therapeutic effect in rat (YAO et al., 2007) or HLA-DR1 transgenic mice (MYERS et al., 2002). In a rat model of adjuvant-induced arthritis (AIA), s.c. injections of a multi-epitope peptide reduced disease severity (GERTEL et al., 2015). This peptide also modulated T cell subsets in RA patients' peripheral blood cells (GERTEL et al., 2017). Also nanoparticles coated with peptides improved disease symptoms in HLA-DR4-IE-transgenic mice or depleted patient-specific B cells (CLEMENTE-CASARES et al., 2016; POZSGAY et al., 2017). Moreover, it has been shown, that cyclic peptides can target RA patients' ACPAs ex vivo (FERNANDES-CERQUEIRA et al., 2015).

We now show that giving the fructosylated peptide 256-270 of bCII intravenously alone and two weeks after the induction of arthritis can lead to a long term effect in FIA-CIA in mice which is characterized by a significant reduction of histological signs of arthritis in mice. At the time of the first treatment application on day 14, the antibodies against bCII, hFib and citrullinated fibrinogen were already established, while arthritis was not yet prevalent. In human RA, development of autoantibodies against CCP often precedes the onset of arthritis for years (RANTAPAA-DAHLQVIST et al., 2003; NIELEN et al., 2004) and antibodies against collagen II are predictive for an early severe course of disease (MULLAZEHI et al., 2012). It

would be desirable to intervene in the development of the disease so that symptoms can be attenuated or in the best case completely prevented.

An interesting aspect of our results is that the application of certain peptides or proteins works to switch the immune response to tolerance of certain antigens. There is some evidence that the application of peptides that mimic T cell epitopes can induce regulatory T cells that secrete anti-inflammatory cytokines like IL-10 and TGF- $\beta$  and thus lead to a suppression of antigen presenting cells (CLEMENTE-CASARES et al., 2016). The only difference between the two peptides in this study is the fructosylation of the lysin at position 264 of the 90578 peptide, whereas peptide 90091 is not modified. It has been shown that T-cell recognition of collagen epitopes depends on glycosylation (DZHAMBAZOV et al., 2006) and native collagen II is also highly glycosylated (BÄCHINGER HP, 2010). The glycosylation of Lys 264 is oriented to the T cell receptor (TCR) and has the potential to be a major regulator of T cell tolerance. It may be that the glycosylation at lysin 264 of the peptide 90578 leads to a better recognition by T-cells and thus to the secretion of more anti-inflammatory cytokines like IL-10, which then ameliorate the outcome of the arthritis in mice. Interestingly, glycosylation of the specific collagen epitope (aa 256-270) does not only play a role in CIA in mouse strains with the arthritis-susceptible A<sup>g</sup> class II gene, but also in transgenic mice expressing human class II molecules associated with RA and in humans with RA (BACKLUND et al., 2002).

Also for the observed beneficial effects a reduction in T cell infiltration, differences in the migration of different subsets of T cells responding to or producing different cytokines may contribute. We will investigate these parameters in future studies. Further studies will also evaluate the reproducibility of the results in different mouse strains and other lab conditions.

## **Conclusion**

hCII-derived fructosylated peptide 90578 is a promising novel therapeutic approach to treat disease symptoms in FIA-CIA mice and potentially also in humans with RA. Further study of the compound is warranted.



## V. DISKUSSION

### 1. Das Modell der FIA-CIA als Krankheitsmodell für die RA

Die Arbeit beschreibt die Etablierung eines Modells der rheumatoiden Arthritis in der Maus, welche durch die subkutane Injektion von Collagen II und humanem Fibrinogen in Emulsion mit Freund'schem Adjuvanz (CFA) erreicht wurde. Ein solches Modell wurde bereits von Ho et al. beschrieben (HO et al., 2010). Das Modell der FIA-CIA führt in bis zu 100% der immunisierten Tiere zu einer mittel- bis hochgradigen Arthritis, und ist gut reproduzierbar. Die Arthritis-Entwicklung beginnt ab dem 14. Versuchstag und wird durch die „Booster“-Injektion von Fibrinogen an Tag 21 verstärkt. Der Höhepunkt der Arthritis ist gegen den 70. Versuchstag erreicht, wonach die Schwellung der Pfoten wieder abflaut, und eine Ankylose der zuvor entzündeten Gelenke zurückbleibt. Ein Wiederaufflammen der Entzündung wurde während der Beobachtungszeit von 12 Wochen nicht beobachtet. Dieser monophasische Verlauf ist typisch für die CIA (HOLMDAHL et al., 1986a; BOISSIER et al., 1987) und offenbar auch für die FIA-CIA. Die bei Ho et al. beschriebene Immunisierungsmethode wurde im hier durchgeführten Versuch geringgradig abgewandelt. Statt der dort verwendeten Dosis von 0,5mg *M.tuberculosis* wurde in unserem Versuch nur 0,05mg *M.tuberculosis* in CFA pro Injektionsstelle appliziert. Auch die Kollagen-Dosis war mit 0,1 mg pro Maus um die Hälfte geringer, als die bei Ho et al. verwendeten 0,2 mg (HO et al., 2010). In einigen Anleitungen, die die Induzierung einer CIA in Mäusen beschreiben, werden als Injektionsvolumina für die Emulsion 100µl veranschlagt (CAMPBELL et al., 2000; BRAND et al., 2007), oder zur Herstellung der Emulsion ein CFA mit höherer Konzentration an Mykobakterien verwendet (COURTENAY et al., 1980). Da die Immunisierung mit CFA zu starken Reaktionen an der Einstichstelle führen kann, die bis zu Ulzerationen führen und zur Folge haben, dass einige Tiere aufgrund der Immunisierung bereits aus dem Versuch ausscheiden bevor sich eine Arthritis entwickelt, ist es wünschenswert, die Dosis und das injizierte Volumen von CFA so klein wie möglich zu halten.

Eine weitere Verbesserungsmaßnahme bei der Durchführung von Arthritis-Studien in Tieren ist die Gabe von Schmerzmitteln. Bei Arthritiden entstehen Schmerzen, die durchaus länger anhalten und dazu führen, dass derartige Tierversuche als schwer belastend eingestuft werden müssen und bei der Genehmigung von Tierversuchsvorhaben dementsprechend große Hürden entstehen. Es wird oft von den Forschenden angegeben, dass Schmerzen

unvermeidbar sind und die Gabe von Schmerzmitteln den Versuch gefährden würden, da viele gängige Schmerzmittel auf die Entzündungskaskade wirken und hierdurch die Entwicklung der Entzündung verhindern. Die Wirksamkeit insbesondere von den gerne als Schmerzmittel verwendeten Nichtsteroidalen Entzündungshemmern (NSAIDs) auf die Entzündungskaskade ist bewiesen, jedoch konnten wir in unseren Studien trotz dieses Einflusses eine Arthritis induzieren. Alle unsere Tiere bekamen ab dem 14. Versuchstag täglich eine Dosis des COX-2 Hemmers Meloxicam per os, und entwickelten trotz dieser - bereits vor der Ausprägung einer Arthritis begonnenen - Behandlung eine Arthritis, die in Inzidenz und Schweregrad ausreichend für therapeutische Studien war. Die Schmerzmittelgabe trug jedoch sichtbar dazu bei, die Schmerzen der Tiere durch die Arthritis zu vermindern. Andere vorgeschlagene Schmerzmittel für Arthritis- Studien, wie Paracetamol (Acetaminophen) oder Buprenorphin (HAWKINS et al., 2015) können eventuell auch eingesetzt werden. Gegenüber diesen hat Meloxicam jedoch den Vorteil, dass es oral verfügbar ist, nur einmal täglich gegeben werden muss (sodass sich der Stress der Tiere durch Herausnehmen aus dem Käfig reduziert) und wenig Nebenwirkungen hat. Selbst die Dauermedikation aller Tiere im Versuch über 70 Tage hinweg ergab keine sichtbaren Nebenwirkungen. Da alle Tiere ungeachtet einer Arthritis-Entwicklung Schmerzmittel bekamen, schätzen wir die Gefahr einer Fehlinterpretation der Versuchsergebnisse als gering ein. Es ist deshalb von unserem Standpunkt aus vertretbar und angezeigt, Meloxicam als Schmerzmittel in Versuchen zur rheumatoiden Arthritis in der Maus zu verwenden.

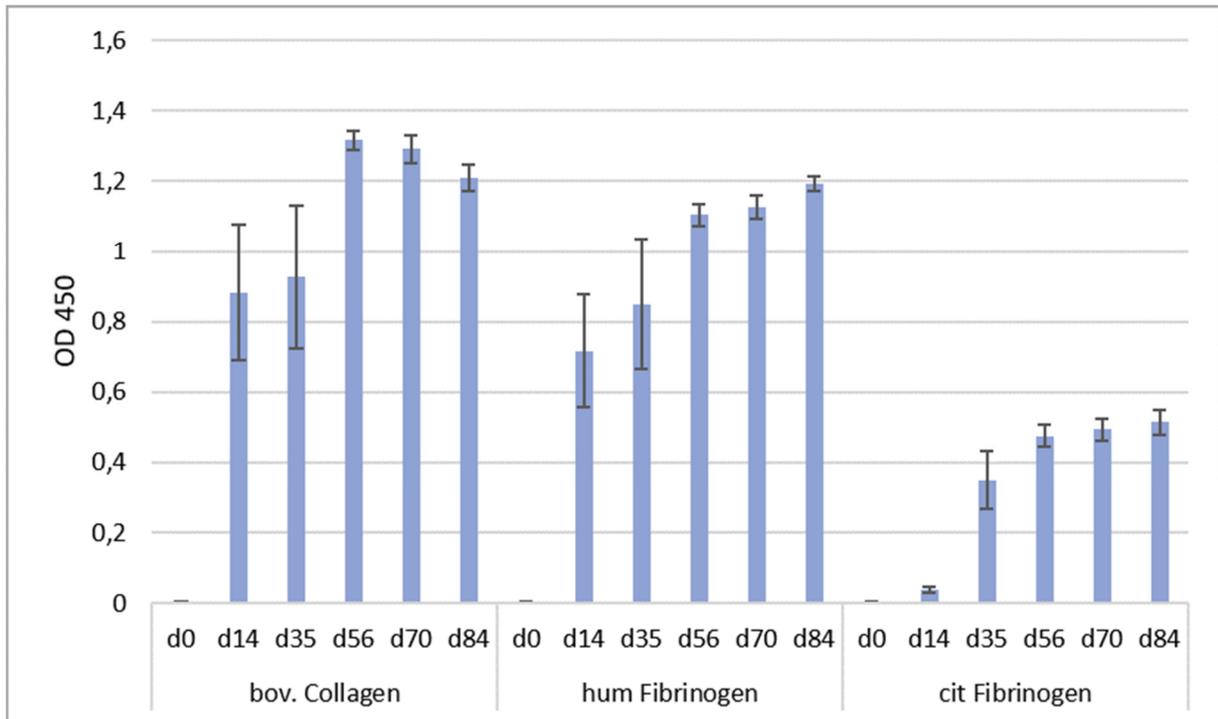
Ein Kritikpunkt bei Studien zu therapeutischen Wirksamkeit von Substanzen in Tiermodellen ist die übermäßig häufige Verwendung von männlichen Tieren in diesen Studien (BEERY & ZUCKER, 2011). Dies ist auch in Studien von CIA in Mäusen nicht selten. Viele Autoren verwenden nur männliche Tiere (INGLIS et al., 2008; THIELE et al., 2012; PIETROSIMONE et al., 2015) oder berichten nicht, welches Geschlecht verwendet wurde. Insbesondere bei der RA ist dies aber auch ein zu beleuchtender Gesichtspunkt, da diese bis zu viermal häufiger bei Frauen als bei Männern auftritt (LINOS et al., 1980; SYMMONS et al., 1994). Auch in unserem Versuch und in der durch Ho et al. beschriebenen Studie (HO et al., 2010) wurden für die FIA-CIA in DBA1/J Mäusen nur männliche Tiere verwendet. Für die reine CIA und ähnliche Arthritis-Modelle existieren gegensätzliche Berichte zur Durchführbarkeit des Modells in männlichen und weiblichen Tieren. Einige Autoren beschreiben eine geringere Inzidenz der Arthritis in weiblichen Tieren (COURTENAY et al., 1980; HOLMDAHL et al., 1985; HO et al., 2010). Als

Erklärung hierfür wird die suppressive Wirkung von weiblichen Geschlechtshormonen angegeben, da kastrierte weibliche Mäuse eine Arthritis-Häufigkeit ähnlich der in männlichen Tieren entwickelten (HOLMDAHL et al., 1986b). Andere Berichte beschreiben eine gleiche Verteilung der Arthritis-Häufigkeit in weiblichen und männlichen Tieren (CAMPBELL et al., 2000), eine stärkere Arthritis-Ausprägung in Weibchen (DING et al., 2015) oder eine Geschlechtsverteilung ähnlich der im Menschen (TANEJA et al., 2007). Um die Vergleichbarkeit des Modells mit der Situation im Menschen zu gewährleisten und die Wirksamkeit von Substanzen auch im weiblichen Organismus zu testen, wäre ein Modell wünschenswert, das sich sowohl in weiblichen als auch in männlichen Tieren etablieren lässt. Ob dies bei der FIA-CIA möglich ist, wurde bisher noch nicht getestet.

Nachweisbare Antikörper-Spiegel konnten in allen immunisierten Tieren sowohl gegen die Immunisierungsantigenen bovines Kollagen II und humanes Fibrinogen als auch gegen citrulliniertes Fibrinogen nachgewiesen werden. Antikörper gegen Kollagen werden auch im weithin bekannten Modell der CIA entwickelt, Antikörper gegen Fibrinogen jedoch nicht. Da die humane RA aber nicht nur ein Antigen kennt, sondern eine Vielzahl von Antigenen – worunter auch citrulliniertes Fibrinogen fällt - hier eine Rolle spielen, kann das Modell der FIA-CIA als Annäherung an die Situation im Menschen verstanden werden.

Das Vorkommen von Antikörpern gegen citrulliniertes Fibrinogen, welches nicht Teil der Immunisierung ist, kann durch zwei verschiedene Mechanismen erklärt werden. Einerseits kann es sein, dass es während der Präparation von humanem Fibrinogen zur Citrullinierung von Arginin-Resten kommt und deshalb das applizierte humane Fibrinogen bereits citrulliniertes Fibrinogen enthält. Untersuchungen mittels Massenspektrometrie konnten zeigen, dass humanes Fibrinogen von Sigma-Aldrich und Calbiochem bereits Citrullin-Reste besitzt (HO et al., 2010). Andererseits kann das Fibrinogen auch nach der Injektion durch das körpereigene Enzym Peptidyl-Arginin-Deaminase 4 (PAD-4), welches in polymorphnuklearen Zellen (PMN, z.B. neutrophile Granulozyten) vorkommt, citrulliniert werden (VOSSENAAR et al., 2003). Diese Umwandlung kann entweder die bei der Immunisierung mit CFA entstehenden Entzündungsreaktion stattfinden, wofür spricht, dass die Immunisierung mittels PAD bei Mäusen bestimmter MHC-Typen zu einer Entwicklung von Antikörpern gegen citrulliniertes Fibrinogen führt (ARNOUX et al., 2017). Die Citrullinierung von Fibrinogen kann aber ebenso erst in den Gelenken stattfinden nachdem die Entzündung dort begonnen hat (VOSSENAAR et al., 2003). Hierfür spricht, dass die Antikörper gegen citrulliniertes Fibrinogen

erst ab dem 35. Versuchstag messbar sind, wohingegen Antikörper gegen hFib und bCII bereits ab dem 14. Versuchstag vorliegen (**Abbildung 9**). Bei einer Entzündung werden Granulozyten nekrotisch oder NETotisch und bei ihrer Zerstörung wird PAD frei, welches wiederum Fibrinogen und andere Proteine citrulliniert (ARNOUX et al., 2017). Welche der beschriebenen Mechanismen dafür verantwortlich ist, dass in unserem Modell Antikörper gegen citrulliniertes Fibrinogen entstehen, ist nicht untersucht worden, es ist jedoch gut möglich, dass diese aufgrund von mehreren der oben genannten Faktoren entstehen.

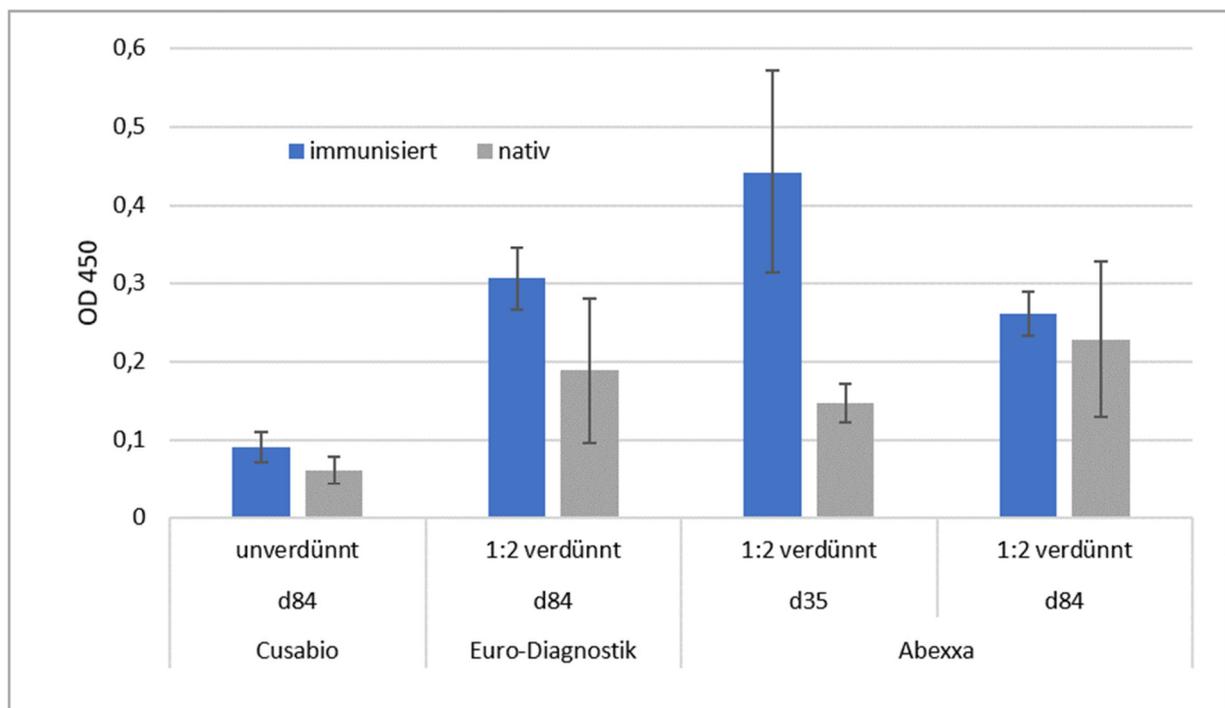


**Abbildung 9, Antikörpermessung Vorstudie**

Dargestellt sind die Mittelwerte der OD450-Werte aller Tiere. Fehlerindikatoren zeigen den SEM. d=day (Versuchstag). Antikörper gegen bovines Kollagen und humanes Fibrinogen liegen bereits an d14 des Versuches vor, wohingegen Antikörper gegen citrulliniertes Fibrinogen erst an d35 vorliegen.

Im Gegensatz zu den Berichten anderer Forschungsgruppen (KUHN et al., 2006; HO et al., 2010) konnten wir in unserem Modell keine relevanten Anti-CCP Antikörper-Level messen. Der Test von Maus-Seren in verschiedenen kommerziell erhältlichen Anti-CCP Test-Kits (Cusabio, #CSB-EQ027743MO; Euro Diagnostics (mittlerweile Svar Lifesciences, #RA-96PLUS), Abexxa #abx254658) zeigte keine signifikanten Unterschiede in den anti-CCP2-Antikörperspiegeln zwischen immunisierten und nativen Mäusen (**Abbildung 10**). Aufgrund der hohen benötigten Mengen an Serum für die kommerziellen CCP-Assays konnten diese Tests leider größtenteils nur nach Tötung der Tiere an Versuchstag 84 durchgeführt werden.

Anti-CCP-Assays werden in der Humanmedizin zur Analyse von Patientenseren auf ACPAs verwendet. ACPAs geben Hinweise auf einen möglicherweise schwereren Verlauf der RA. Wie in den Daten zum Antikörper-Test auf citrulliniertes Fibrinogen gezeigt, wurden in unserem Modell zumindest gegen ein citrulliniertes Peptid Antikörper gebildet. Diese konnten jedoch nicht mit kommerziellen Test-Kits gemessen werden. Eventuell ist diese niedrige anti-CCP-Antikörper-Reaktion bedingt durch ein tatsächlich niedriges Vorkommen von diesen Antikörpern im Serum von FIA-CIA-immunisierten Mäusen. Es könnte andererseits aber auch aufgrund einer Diskrepanz von anti-CCP-Antikörpern zwischen Mäusen und Menschen und einer dementsprechend geringen Eignung der anti-CCP-Assays für Maus-Studien liegen. Hierfür spricht, dass bei der Durchführung eines ELISAs mittels selbst gecoatetem CCP eine Differenz der Reaktion von immunisierten und nativen Mäusen auf dieses Peptid gezeigt werden konnte. Immunisierte Tiere zeigten deutlich höhere Spiegel an anti-CCP-Antikörpern an Tag 14 und Tag 35 des Versuchs, die Spiegel sanken aber danach wieder auf das Niveau der nativen Tiere ab. Interessant ist, dass auch die Testung von Maus-Seren mittels des ELISAs von Abexxa an d35 einen Unterschied zwischen immunisierten und nativen Tieren zeigt (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10, Tests von Maus-Seren in kommerziellen anti-CCP-ELISA Test-Kits**

Dargestellt sind Mittelwerte der OD450-Werte. Werte von immunisierten Tieren in blau, von nativen Kontrolltieren in grau; Fehlerbalken zeigen den SEM. d=day (Versuchstag). Die Seren wurden teilweise verdünnt, um eine Mehrfachmessung möglich zu machen. Da für die Analytik sehr viel Serum verwendet werden musste, wurde meist nur d84 als Messpunkt verwendet, da von den anderen Zeitpunkten nur wenig Serum verfügbar war. Der ELISA von Abexxa mit Serum von d35 zeigte Unterschiede zwischen immunisierten und nativen Tieren, diese sind jedoch nicht statistisch signifikant ( $P = 0.2$ ).

Diese Schwankung könnte durch die Abfolge der Immunisierungen erklärt werden. Die Blutentnahmen an Tag 14 und 35 erfolgten jeweils zwei Wochen nach einer Immunisierung mittels Fibrinogens. Wie oben beschrieben, können durch die ausgelöste Entzündungsreaktion nach der Immunisierung Proteine durch das aus Granulozyten freigesetzte PAD-4-Enzym citrulliniert werden (VOSSENAAR et al., 2003; ARNOUX et al., 2017). Dies kann zu einer vermehrten Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Proteine führen, welche in unserem CCP-Assay messbar sind. Da nach der zweiten Immunisierung keine weitere erfolgt, werden die entstandenen Antikörper wieder abgebaut und gehen auf das vorherige Level zurück. Es wäre eventuell möglich, die anti-CCP-Antikörper durch weitere Immunisierungen auf ihrem erhöhten Stand zu halten oder sogar noch zu verstärken.

## 2. Peptid 90578 als Therapiemöglichkeit für die RA

Peptid 90578 zeigte in der durchgeführten Studie eine Reduktion der Arthritis-Anzeichen sowohl in der klinischen Untersuchung (Figure 5), als auch in der histologischen Untersuchung (Figure 4). Gelenksschwellung und der Schweregrad der Arthritis waren weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. In den HE-gefärbten Gewebsschnitten zeigte sich, dass Peptid 90578 einen signifikanten Effekt auf die Arthritis, die in der FIA-CIA ausgebildet wird, besitzt. Die histologischen Anzeichen von Arthritis – Entzündung, Veränderung der synovialen Membran, Knorpeldegeneration, Pannus-Entstehung und Veränderung des umgebenden Knochengewebes – waren in den Tieren, die mit Peptid 90578 behandelt wurden signifikant geringer, als in der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe.

Das Peptid 90578 besteht aus den Aminosäuren 256 bis 270 der  $\alpha$ -Kette des Kollagens und einem zusätzlichen Fructosyl-Rest am Lysin an Position 264. Die in dem Peptid verwendete Aminosäuresequenz aus den Aminosäuren 260 bis 267 der Kollagen II  $\alpha$ -Kette stellen ein für die Arthritis-Ausprägung in Mäusen mit dem I-A<sup>q</sup>-MHC-Typ - zu denen auch die in unseren Versuchen verwendeten DBA/1-Mäuse zählen - wichtiges T-Zell-Epitop dar (BRAND et al., 1994). Auch das für die genetische Prädisposition zur RA in Menschen mitverantwortliche MHC-Molekül HLA-DRB\*0401 bindet offenbar an Positionen 263 bis 270 des bovinen Kollagen II-Moleküls (FUGGER et al., 1996; BACKLUND et al., 2002). Wie in **Tabelle 1** gezeigt, bildet Peptid 90578 sowohl das T-Zell Epitop des murinen I-A<sup>q</sup>-Moleküls als auch des humanen HLA-DRB1\*0401-Moleküls ab.

Durch die starke Homologie zwischen humanem und bovinem Kollagen II an dieser Stelle (BRAND et al., 1994) und die Ähnlichkeit der Rezeptoren I-A<sup>q</sup> der Maus und HLA-DRB\*0401 des Menschen in ihrer Bindungspräferenz (ANDERSSON et al., 1998) ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Studien an Mäusen auf den Menschen denkbar.

Aminosäure-Position	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273
Kollagen II-Bindung HLA-DRB1*0401																		
					A	G	F	K	G	E	Q	G	P	K	G	E	P	
Kollagen II-Bindung I-A <sup>q</sup>																		
			I	A	G	F	K	G	E	Q	G	P	K	G	E	P		
Peptid 90578																		
G	E	P	G	I	A	G	F	K*	G	E	Q	G	P	K				

\*Fructosyliert

**Tabelle 1, Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der T-Zell-Epitope von HLA-DRB1\*0401 und I-A<sup>q</sup> mit Peptid 90578**

Gelb markiert die T-Zell-Epitope. HLA-DRB1\*0401 bindet Aminosäuren 263-270, wohingegen I-A<sup>q</sup> Aminosäuren 260-267 des bovinen Kollagen-I-Moleküls bindet. Peptid 90578 bildet beide T-Zell-Epitope ab, indem es Aminosäuren 256-270 umspannt.

Es gibt bereits einige Berichte zur Anwendung von Peptiden, die Kollagen-II-Epitope abbilden, in Mäusen mit CIA. Diese Peptide wurden jedoch meist bereits vor (MYERS et al., 1989; KU et al., 1993; MYERS et al., 1995; HONDA et al., 2004) oder spätestens zusammen mit der Immunisierung appliziert (MYERS et al., 1993; SAKURAI et al., 2006; MYERS et al., 2007). Eine solche experimentelle Verwendung kann zwar interessante Erkenntnisse über die Immunmechanismen in der CIA hervorbringen, bildet aber nicht die Situation im Menschen ab, bei dem bei Therapie-Beginn bereits Arthritis-Symptome vorliegen. Einige Autoren berichten auch über die Wirksamkeit von Kollagen-II-Epitop-Peptiden, die an zusätzliche Strukturen gebunden sind. Dabei handelt es sich um MHC-Moleküle (DZHAMBASOV et al., 2006; TENGVALL et al., 2016) oder Peptide, die Immunzellen oder T-Zellen spezifisch binden können (ZIMMERMAN et al., 2010). Alternative Applikationsmethoden (oral, intranasal) zur Induktion einer mukosalen Toleranz wurden ebenfalls bereits teilweise untersucht. Auch hier jedoch erfolgte die Applikation zumeist vor der Induktion der Arthritis (STAINES et al., 1996; ZHU et al., 2007) oder aber es wurden zusätzliche Immunmodulatoren, wie ein vom Cholera-Toxin abgeleitetes Fusionsprotein verwendet (HASSELBERG et al., 2009).

Die frühzeitige Applikation von Substanzen bereits vor der Induktion der Arthritis birgt eher den Charakter einer therapeutischen „Vakzinierung“, da in vollkommener Abwesenheit aller Krankheitsanzeichen bereits interveniert wird. Die Therapie der RA wird aber grundsätzlich erst eingeleitet, sobald eine Diagnose feststeht, welche immer auf einer klinischen sowie serologischen Untersuchung beruht. Krankheitszeichen sind hier also bereits vorhanden. Solche Differenzen zwischen Tiermodell und Situation im Menschen könnten kritische Punkte sein, wenn es darum geht, neue Therapieansätze für die RA zu entwickeln. Der Einsatz von

Fusionsproteinen (HASSELBERG et al., 2009), MHC-Molekülen (DZHAMBASOV et al., 2006; TENGVALL et al., 2016) oder zusätzlichen Peptiden (ZIMMERMAN et al., 2010) zur Stimulation der gewünschten Fraktion an Immunzellen kann zu einer besseren Effektivität von Peptiden oder zumindest zu einer längeren Verfügbarkeit im Körper führen, da Peptide anderweitig sehr schnell abgebaut werden. Allerdings birgt jedweder Einsatz von zusätzlichen Immunmodulatoren, gerade bei Verwendung von MHC-Molekülen oder Proteinen aus Cholera-Toxinen ein erhöhtes Risiko von schweren Nebenwirkungen. Dies könnte ein weiterer Grund sein, weshalb neue Therapieansätze, die im Tiermodell Erfolg zeigten, in nachfolgenden klinischen Studien erfolglos blieben oder nicht weiter verfolgt wurden.

Auch für nur geringgradig durch Aminosäure-Substitution veränderte Peptide gibt es bereits Berichte zur therapeutischen Effektivität in Ratten (YAO et al., 2007) und HLA-DR1-transgenen Mäusen (MYERS et al., 2002). Diese konnten sogar eine Wirkung zeigen, wenn sie nach Arthritis-Entstehung gegeben wurden. Weitere Modifikationen sind zum Beispiel die Applikation eines Multi-Epitop-Peptides, welches durch die Abbildung mehrerer Epitope eine differenziertere Wirkung ausbildet. Ein solches führte in einem Ratten-Modell der Adjuvanz-induzierten Arthritis zu einer Reduktion des Schweregrades der Arthritis (GERTEL et al., 2015). Neuere Methoden setzen auf Nanopartikel, die mit Peptiden gecoatet sind und sowohl in HLA-DR4-IE-transgenen Mäusen und in Patienten-spezifischen B-Zellen eine Wirkung über eine Reduktion von Krankheitssymptomen bzw. Depletion der spezifischen B-Zellen zeigten (CLEMENTE-CASARES et al., 2016; POZSGAY et al., 2017). Auch eine Zyklisierung von Peptiden ist zumindest in vitro wirksam, um ACPAs in Seren von RA Patienten gezielt zu treffen (FERNANDES-CERQUEIRA et al., 2015).

In der vorliegenden Studie zeigen wir, dass die Langzeit-Behandlung mit einem vom bovinen Kollagen II abgeleiteten fruktosylierten Peptid, welches ohne zusätzliche Modifizierungen oder Immunmodulatoren gegeben wurde, in Mäusen mit FIA-CIA zu einer anhaltenden Reduktion der Arthritis führt, welche auch histologisch bestätigt wird. Das Peptid wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten über den Verlauf des Versuches hinweg intravenös in eine der Schwanzvenen appliziert. Als Beginn der Behandlung wurde der 14. Versuchstag ausgewählt. Dieser liegt weit genug von der ersten Immunisierung entfernt, dass bereits eine Immunreaktion ausgebildet wurde, wie man an der Messung der Antikörper an Tag 14 sieht (**Abbildung 9**), aber noch keine sichtbare Arthritis entstanden ist (vgl. Figure 5). Autoantikörper gegen CCP entstehen in der humanen RA oft bereits Jahre vor der tatsächlichen klinisch

apparenten RA (RANTAPAA-DAHLQVIST et al., 2003; NIELEN et al., 2004) und Antikörper gegen Kollagen II können einen schweren frühen Verlauf der RA ankündigen (MULLAZEHI et al., 2012). Eine Intervention mit therapeutischen Peptiden vor der Entstehung von klinischen Anzeichen von Arthritis wäre für RA-Patienten wünschenswert, damit die Beeinträchtigung durch die Krankheit so gering wie möglich gehalten werden kann oder Arthritis-Entwicklung vielleicht sogar komplett verhindert werden kann.

Das Ziel der Applikation von Peptiden, die T-Zell-Epitope abbilden, ist, das Immunsystem im Sinne einer Desensibilisierung, wie sie zum Beispiel auch bei einigen allergischen Erkrankungen erfolgreich durchgeführt wird (NORMAN et al., 1996; JACOBSEN et al., 2007), zu einer Toleranz von bestimmten Autoantigenen zu bringen. Zielzellen sind hier sogenannte regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ).  $T_{regs}$  sind eine Unterkategorie von  $CD4^+$  T-Lymphozyten, die durch ihre spezifische Ausstattung mit besonderen Rezeptoren und Zytokinen die Immunantwort unterdrücken können. Durch die Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  können sie eine Unterdrückung von antigen-präsentierenden Zellen hervorrufen (CLEMENTE-CASARES et al., 2016). Zusätzlich besitzen sie den Rezeptor CD25, der das proinflammatorische Zytokin Interleukin 2 (IL-2) binden kann und so zur Reduktion dieses Zytokins im Gewebe beiträgt. Außerdem können  $T_{regs}$  inflammatorische Zellen wie B-Zellen oder „normale“ T-Zellen durch die Ausschüttung von Granzymen und Perforinen direkt abtöten (EGGENHUIZEN et al., 2020). Wie alle anderen T-Zellen besitzen  $T_{regs}$  einen T-Zell-Rezeptor (TCR), der mit MHC-Molekülen auf antigen-präsentierenden Zellen interagiert. Dieser TCR erkennt an das MHC gebundene Autoantigene und führt nach einer Reihe von kostimulierenden Signalen zu einer Ausschüttung von anti-inflammatorischen Zytokinen und einer Dämpfung der Immunantwort gegen diese. Peptid 90578 bindet offenbar an solche spezifischen T-Zellen, und führt zu einer Reduktion der durch Kollagen und Fibrinogen induzierten Arthritis in Mäusen.

Der Unterschied zwischen den beiden in unserer Studie applizierten Peptiden besteht nur in dem zusätzlichen Fructosyl-Rest am Lysin 264, welcher nur bei Peptid 90578 vorhanden ist und bei Peptid 90091 fehlt. Dennoch unterscheiden sich die beiden Peptide in ihrer Wirkung auf die Arthritis-Ausprägung. Peptid 90091 führte im Gegensatz zu Peptid 90578 nur zu einer leichten Reduktion des Arthritis-Scores in der histologischen Auswertung. In der klinischen Betrachtung zeigte es sogar eine im Vergleich zur Kontrollgruppe stärkere Arthritis (vgl. Figure 5). Die Glykosylierung von Peptiden spielt bei der Erkennung von Kollagen Epitopen durch T-

Zellen eine große Rolle (CORTHAY et al., 1998; DZHAMBASOV et al., 2006), was nicht verwunderlich ist, da auch Kollagen ein stark glykosyliertes Protein ist (BÄCHINGER HP, 2010). Der Fructosyl-Rest am Lysin 264 des Peptids 90578 ist bei Bindung des Peptids an den MHC-Rezeptor zum T-Zell-Rezeptor hin ausgerichtet. Die hierdurch vermutlich veränderte Stärke der Bindung des Peptids an den TCR kann das in der Zelle transduzierte Signal modulieren. Der Fructosyl-Rest könnte eine bessere Erkennung des Peptids durch T<sub>regs</sub> bedingen, wodurch mehr anti-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden und die Immunantwort gegen Kollagen abgeschwächt wird, was die Arthritis-Entwicklung beeinflusst.

Zur Bestätigung dieser Theorien des Wirkmechanismus von Peptid 90578 müssen jedoch noch weiterführende Studien durchgeführt werden.



### 3. Ausblick

Das Mausmodell der FIA-CIA wird von uns als Annäherung an die Situation im Menschen verstanden, da hier nicht nur Antikörper gegen Kollagen gebildet werden, sondern auch gegen Fibrinogen und citrullinierte Proteine. Es ist gut reproduzierbar, und führt in bis zu 100% der immunisierten Tiere zu einer Arthritis. Dennoch sollten auch bei etablierten Tiermodellen, insbesondere bei stärker belastenden Versuchen wie Modellen der rheumatoiden Arthritis, Refinement-Maßnahmen erwägt werden (HAWKINS et al., 2015). Die Immunisierung mittels CFA steht in großer Kritik, und auch wir konnten nach der Immunisierung mittelgradige Entzündungsreaktionen an der Einstichstelle beobachten, die höchstwahrscheinlich auf das Adjuvanz zurückzuführen sind. Es wäre auch im Modell der FIA-CIA denkbar, dass auf den Einsatz von CFA zugunsten von IFA verzichtet werden kann, oder sogar komplett auf Freund's Adjuvanz für die Immunisierung verzichtet werden kann. Die Verwendung von reinem IFA (welches im Vergleich zu CFA keine Mykobakterien enthält) sowohl bei der ersten Immunisierung, als auch bei der zweiten („Booster“) Immunisierung mittels Kollagen führt offenbar immer noch in bis zu 80% der Tiere zu einer Arthritis (THORNTON & STRAIT, 2016), jedoch wurde in diesem Modell zusätzlich Kollagen II zusammen mit Lipopolysaccharid (LPS) injiziert. Auf LPS sollte jedoch wenn möglich verzichtet werden, da es die Freisetzung von Zytokinen stimuliert und schwere Nebenwirkungen wie Schock oder Diarrhö nach sich ziehen kann (HAWKINS et al., 2015). Ein interessanter Ansatz ist das komplette Weglassen von Adjuvanzen bei der Immunisierung mittels Kollagen. Thiele et. al. (THIELE et al., 2012) konnte durch die Immunisierung von Mäusen mittels citrulliniertem Maus-Kollagen eine Arthritis in Mäusen induzieren, die ähnlich im Verlauf ist, wie die Arthritis, die durch die Immunisierung mittels CFA und Kollagen entsteht. Ob eine solche Reduktion der Adjuvanz-Menge in unserem Modell der FIA-CIA zu einer Arthritis führt, die für die Forschung an neuen Therapiemöglichkeiten für die humane RA geeignet ist, müsste in weiterführenden Studien getestet werden.

Um eine objektivere Bewertung und eine eventuelle Früherkennung von klinischen Arthritis-Anzeichen in der Maus zu erreichen, wären bildgebende Verfahren eine Option. Die Messung von Gelenksdicken ist teilweise untersucherabhängig und auch das Arthritis-Scoring ist eine tendenziell subjektive Einschätzung. Bildgebende Verfahren sind in den vergangenen Jahren auch in kleinen Organismen wie der Maus in ausreichender Qualität verfügbar, und können einen wertvollen Beitrag zur Evaluierung von Arthritis-Symptomen leisten. Der Einsatz von

Ultraschall-Geräten, die durch hohe Frequenzen eine Darstellung von kleinen Strukturen ermöglichen, wurde bereits bei einem Modell der CIA in Mäusen getestet. In Knie- und Fußgelenken konnten hier arthritische Läsionen im Weichteilgewebe dargestellt werden (CLAVEL et al., 2008). Für die Darstellung von Knochenläsionen eignen sich eher Röntgensysteme wie das normale Röntgen oder auch CT-Analysen. Auch diese Systeme sind mittlerweile so weit fortgeschritten, dass auch kleinste Strukturen deutlich dargestellt werden können und Veränderungen an Knochenoberflächen, aber auch in Knochendichte und -volumen messbar sind (SEEUWS et al., 2010; THIELE et al., 2012; DUSAD et al., 2014). Nachteile dieser bildgebenden Verfahren sind allerdings die hohen Kosten der jeweiligen Geräte, sowie bei Geräten, die mit Röntgenstrahlen arbeiten, auch die nötigen Sicherheitsvorkehrungen für den Anwender.

Das vom Kollagen II abgeleitete Peptid 90578 ist ein vielversprechender Ansatz für neue Therapiemethoden in der rheumatoiden Arthritis. Weitere Studien zur Wirksamkeit und Funktionsweise dieses Peptids sind angedacht, hier können beispielsweise verschiedene Dosierungen, Applikationsarten oder Kombinationen mit anderen Peptiden getestet werden. Aktuell wird das Peptid intravenös gegeben, denkbar wären aber auch subkutane oder intraperitoneale Gaben. Letztere wird zwar in der Humanmedizin nicht als Applikationsmethode verwendet, aber in der Versuchstierkunde als Ersatzmethode zur intravenösen Gabe gesehen. Gerade bei Applikationsschemata, die eine häufigere Gabe von Peptiden vorsehen, ist die i.p.-Applikation einer i.v. Applikation vorzuziehen, da es durch zu häufige Applikationen zu Reizungen der Venen kommen kann. Da kurzkettige Peptide im Körper sehr schnell abgebaut werden, wäre eine häufigere Gabe des Peptids eventuell sinnvoll. Peptidgaben im Abstand von 2-4 Tagen haben sich in einigen Studien bereits als wirksam erwiesen (CHOI et al., 2017; KIM et al., 2020). Eine Änderung der Applikationsart würde auch andere Immunzellen in Erstkontakt mit dem Peptid bringen, was eventuell eine Änderung der Wirksamkeit zur Folge hätte und Aufschluss über das Wirkprinzip von Peptid 90578 geben kann. Neben den gängigen Methoden der s.c. und i.p.-Applikation wären auch intranasale Gaben (STAINES et al., 1996) oder epikutane Applikationen (TUTAJ & SZCZEPANIK, 2007; MARCINSKA et al., 2015) denkbar, um andere Zielzellen mit dem Peptid zu erreichen. Zusätzlich hätten solche nicht-invasiven Methoden den Vorteil einer besseren Patienten-Compliance im Menschen.

Die Immunisierung der Mäuse in der FIA-CIA erfolgt mittels Kollagen II und Fibrinogen, entstehende Antikörper sind nicht nur gegen Kollagen, sondern auch gegen Fibrinogen und citrulliniertes Fibrinogen gerichtet. Peptid 90578 ist ein vom Kollagen II T-Zell-Epitop abgeleitetes Peptid. Es wirkt vermutlich nur auf die T-Zellen, die gegen Kollagen gerichtet sind. Dies könnte erklären, warum Peptid 90578 in der FIA-CIA nicht zu einer vollständigen Reduktion der Arthritis führt, sondern die Symptome nur zurückdrängt. Um auch die für die verbleibende Arthritis verantwortliche Immunreaktion gegen Fibrinogen und citrulliniertes Fibrinogen zu dämpfen, müssten andere Peptide, die Fibrinogen-Epitope abbilden (FERNANDES-CERQUEIRA et al., 2015) zusammen mit Peptid 90578 gegeben werden. Dies würde wiederum Aufschluss geben, ob dies in der humanen RA ebenfalls ein Therapieansatz ist, da auch hier verschiedene Antikörper eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Peptid 90578 ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für die Reduktion von Arthritis-Symptomen im FIA-CIA-Modell und ein potentieller neuer Kandidat für die Behandlung der RA im Menschen ist. Sowohl für das Modell der FIA-CIA als auch für das Peptid 90578 besteht jedoch noch weiterer Forschungsbedarf.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine schwere Autoimmunerkrankung. Ungefähr 1% der Weltbevölkerung entwickelt Zeit ihres Lebens diese Erkrankung, die nicht nur mit der namensgebenden Gelenkentzündung, sondern auch mit verschiedenen anderen Begleiterscheinungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Lungenerkrankungen und einer generell geringeren Lebenserwartung einhergeht. Frauen erkranken bis zu viermal häufiger als Männer, daneben gibt es noch einige andere Risikofaktoren wie die Genetik oder Umwelteinflüsse durch Infektionen oder das Rauchen, die zur Entwicklung einer RA beitragen können. Kern der RA ist eine entgleiste Immunantwort, die auf körpereigene Proteinstrukturen im Gelenk reagiert und zur Zerstörung des Gelenkknorpels und der umliegenden Strukturen führt. Serologisch ist die RA durch Antikörper gegen den Fc-Teil anderer Antikörper (den sogenannten Rheumafaktor (RF)), Antikörper gegen citrullinierte Proteine (ACPAs), wie auch gegen Kollagen II gekennzeichnet. Eine ursächliche Therapie für diese Erkrankung ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gefunden. RA Patienten werden mit einer Reihe von „Disease modifying anti-rheumatic Drugs“ (DMARD) behandelt, welche Teile des Immunsystems beeinflussen und hierdurch bedingt oft auch starke Nebenwirkungen beinhalten.

Um komplexe Krankheiten wie die RA darzustellen eignen sich vor allem Tiermodelle. Für die RA existiert seit langer Zeit das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) in Mäusen. Die CIA wirkt über die Immunisierung von Mäusen gegen heterologes Kollagen II mithilfe eines Adjuvanz. Innerhalb weniger Wochen entsteht eine Arthritis, die der RA in vielen Aspekten ähnlich ist. Jedoch fehlen in der CIA die Ausprägung von RF und ACPAs. Eine Weiterentwicklung der CIA stellt das Modell der FIA-CIA dar. Hier wird zur Immunisierung nicht nur Kollagen, sondern auch Fibrinogen verwendet, infolgedessen nicht nur Antikörper gegen Kollagen, sondern auch gegen Fibrinogen und citrullinierte Peptide gebildet werden.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde dieses erstmals durch Ho 2010 (HO et al., 2010) publizierte Modell in unserem Labor mit einigen wenigen Abwandlungen, deren größte Veränderung sicher die Schmerzmittelapplikation für die Tiere ist, etabliert. Trotz der täglichen Behandlung mit einem nicht-steroidalen Entzündungshemmer entwickelte sich in 100% der Tiere eine deutliche Arthritis. Auch die Entwicklung von Antikörpern gegen Kollagen II, Fibrinogen und gegen citrullinierte Peptide konnte gezeigt werden.

Mit dem etablierten Mausmodell wurde dann in der Folge eine Therapiestudie mit Peptiden gestartet. Peptide sind in der Therapie von Autoimmunerkrankungen ein vielversprechender Ansatz, um eine sogenannte Anergie zu erreichen - ein Status, bei dem das Immunsystem wieder zurück in die Balance gebracht wird, und eine weitere Reaktion auf körpereigene Strukturen verhindert wird. Eine solche Antigen-spezifische Therapie mit Peptiden basiert darauf, dass dem Patienten Teile eines krankheitsverursachenden Moleküls gegeben werden und im Immunsystem durch die unvollständige Aktivierung eine Toleranz-induzierende-Wirkung erzielt wird.

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Therapiestudie wurden zwei strukturell sehr ähnliche vom Kollagen II T-Zell Epitop abgeleitete Peptide mit einer Kontrollgruppe verglichen und die klinischen, histologischen und serologischen Parameter der entstehenden Arthritis bestimmt. Eines der beiden Peptide zeigte hierbei eine gute Wirkung auf die in der Histologie bestimmten Werte und teilweise auch in der klinischen Betrachtung. Die Unterschiede zwischen der Wirkung der beiden gegebenen Peptide sind auf einen Fructosyl-Rest an einem Lysin des Peptids zurückzuführen, der nur in dem wirksamen Peptid vorhanden ist und in dem Peptid, das keine Wirkung zeigte, fehlt. Die Vorstellung ist, dass dieser Fructosyl-Rest die Bindungsfähigkeit des Peptids verändert, da er zur Bindungstasche des T-Zell Rezeptors gerichtet ist, und so eventuell durch die veränderte Bindungsstärke das an die T-Zelle transduzierte Signal moduliert. Ein solch moduliertes Signal könnte dann das Immunsystem zu einer tolerogenen Immunantwort im Sinne der Erzeugung einer Anergie neigen.

Das durch die Schmerzmittelgabe und die Reduktion von Immunisierungssubstanzen verbesserte und durch die zusätzliche Fibrinogen-Immunisierung besser an die Situation im Menschen angepasste Mausmodell zeigt, dass auch bei lange existierenden Tiermodellen noch Möglichkeiten zur Optimierung bestehen. Diese sind sowohl im Sinne des Tierwohls, als auch im Sinne der Forschung, da eine Übertragbarkeit von Studienergebnissen auf den Menschen durch angepasste Tiermodelle verbessert wird.

Die Applikation eines fruktosylierten Peptids, das vom Kollagen II T-Zell-Epitop abgeleitet ist, zeigte im Mausmodell der Arthritis vielversprechende Ergebnisse, die eine weitere Untersuchung der Substanz empfehlen.

Sowohl für das Tiermodell, als auch für das Peptid besteht somit noch Forschungsbedarf.

## VII. SUMMARY

Rheumatoid arthritis (RA) is a severe autoimmune disease. Approximately 1% of the world's population develops this disease during their lifetime, which is associated not only with the eponymous joint inflammation, but also with various other accompanying symptoms such as cardiovascular disease, lung disease and a generally lower life expectancy. Women are up to four times more likely to develop RA than men, and there are several other risk factors, such as genetics or environmental influences from infections or smoking, that can contribute to the development of RA. At the core of RA is a derailed immune response that reacts to the body's own protein structures in the joint, leading to destruction of the articular cartilage and surrounding structures. Serologically, RA is characterized by antibodies against the Fc part of other antibodies (the so-called rheumatoid factor (RF)), antibodies against citrullinated proteins (ACPAs), as well as against collagen II. A causative therapy for RA has not been found to date. Patients are treated with a number of disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs), which affect parts of the immune system and often have severe side effects.

To represent complex diseases such as RA, animal models are particularly suitable. For RA, the model of collagen-induced arthritis (CIA) in mice has existed for a long time. CIA works by immunizing mice against heterologous collagen II using an adjuvant. Within a few weeks, arthritis develops that is similar to RA in many aspects. However, CIA lacks the expression of RF and ACPAs. An advancement of the CIA is the FIA-CIA model. Here, not only collagen but also fibrinogen is used for immunization, and as a result, antibodies are formed not only against collagen but also against fibrinogen and citrullinated peptides.

In the course of the present work, this model, first published by Ho in 2010 (HO et al., 2010), was established in our laboratory with a few modifications, the biggest of which is certainly the analgesic application for the animals. Despite daily treatment with a non-steroidal anti-inflammatory drug, significant arthritis developed in 100% of the animals. The development of antibodies against collagen II, fibrinogen, and against citrullinated peptides was also demonstrated.

Using the established mouse model, a therapy study with peptides could then be initiated. Peptides are a promising approach in the therapy of autoimmune diseases to achieve a so-called anergy - a state in which the immune system is brought back into balance and a further reaction to the body's own structures is prevented. Such antigen-specific therapy with

peptides is based on giving the patient parts of a disease-causing molecule and achieving a tolerance-inducing effect in the immune system through incomplete activation.

For the therapeutic study described in the present paper, two structurally very similar peptides derived from the collagen II T-cell epitope were compared with a control group and the clinical, histological, and serological parameters of the developing arthritis were determined. One of the two peptides showed a good effect on the values determined in the histology and partly also in the clinical observation. The differences between the effects of the two given peptides are due to a fructosyl residue on a lysine of the peptide, which is present only in the effective peptide and absent in the peptide that showed no effect. The idea is that this fructosyl residue alters the binding ability of the peptide because it is directed toward the binding pocket of the T-cell receptor, and so possibly modulates the signal transduced to the T-cell by altering the binding strength. Such a modulated signal could then predispose the immune system to a tolerogenic immune response in the sense of generating anergy.

The mouse model, improved by analgesic administration and reduction of immunizing substances and better adapted to the situation in humans by the addition of fibrinogen immunization, shows that there is room for improvement even in long-standing animal models. These are both in the interest of animal welfare and in the interest of research, since transferability of study results to humans is improved by adapted animal models.

Application of a fructosylated peptide derived from the collagen II T-cell epitope showed promising results in the mouse model of arthritis, recommending further investigation of the compound.

Thus, research is still needed for both the animal model and the peptide.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzei S, Alimohammadi R, Bezvan MH, Mohammadi H, Aslani S. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol* 2019; 234: 10018-31.
- Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1472-83.
- Ahrens VM, Bellmann-Sickert K, Beck-Sickinge AG. Peptides and peptide conjugates: therapeutics on the upward path. *Future Med Chem* 2012; 4: 1567-86.
- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 18-27; quiz 8-9.
- Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 130-6.
- Albrecht K, Muller-Ladner U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: S95-101.
- Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA* 2018; 320: 1360-72.
- Alunno A, Gerli R, Giacomelli R, Carubbi F. Clinical, Epidemiological, and Histopathological Features of Respiratory Involvement in Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 7915340.
- Amirahmadi SF, Pho MH, Gray RE, Crombie DE, Whittingham SF, Zuasti BB, Van Damme MP, Rowley MJ. An arthritogenic monoclonal antibody to type II collagen, CII-C1, impairs cartilage formation by cultured chondrocytes. *Immunol Cell Biol* 2004; 82: 427-34.
- Amirahmadi SF, Whittingham S, Crombie DE, Nandakumar KS, Holmdahl R, Mackay IR, van Damme MP, Rowley MJ. Arthritogenic anti-type II collagen antibodies are pathogenic for cartilage-derived chondrocytes independent of inflammatory cells. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1897-906.
- Andersson EC, Hansen BE, Jacobsen H, Madsen LS, Andersen CB, Engberg J, Rothbard JB, McDevitt GS, Malmstrom V, Holmdahl R, Svejgaard A, Fugger L. Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4-restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 7574-9.
- Arleevskaya MI, Larionova RV, Brooks WH, Bettacchioli E, Renaudineau Y. Toll-Like Receptors, Infections, and Rheumatoid Arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2020; 58: 172-81.
- Arnoux F, Mariot C, Peen E, Lambert NC, Balandraud N, Roudier J, Auger I. Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E10169-E77.
- Artifoni M, Rothschild PR, Brezin A, Guillevin L, Puechal X. Ocular inflammatory diseases associated with rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10: 108-16.
- Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2040-4.
- Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 845-51.
- Bächinger HP MK, Vranka JA, Boudko SP (2010) Collagen Formation and Structure. In: *Comprehensive natural products II: Chemistry and biology*. Ed L M. Elsevier, Amsterdam. p. 469-530
- Backlund J, Carlsen S, Hoger T, Holm B, Fugger L, Kihlberg J, Burkhardt H, Holmdahl R. Predominant selection of T cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263-270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9960-5.
- Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 362-7.
- Barebring L, Winkvist A, Gjertsson I, Lindqvist HM. Poor Dietary Quality Is Associated with Increased Inflammation in Swedish Patients with Rheumatoid Arthritis. *Nutrients* 2018; 10
- Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35: 565-72.

- Benson RA, McInnes IB, Garside P, Brewer JM. Model answers: Rational application of murine models in arthritis research. *Eur J Immunol* 2018; 48: 32-8.
- Berube LT, Kiely M, Yazici Y, Woolf K. Diet quality of individuals with rheumatoid arthritis using the Healthy Eating Index (HEI)-2010. *Nutr Health* 2017; 23: 17-24.
- Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol* 2017; 39: 469-86.
- Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2192-205.
- Bloom O, Cheng KF, He M, Papatheodorou A, Volpe BT, Diamond B, Al-Abed Y. Generation of a unique small molecule peptidomimetic that neutralizes lupus autoantibody activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 10255-9.
- Boissier MC, Feng XZ, Carlioz A, Roudier R, Fournier C. Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 691-700.
- Bondeson J. The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 127-50.
- Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 558-62.
- Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 841-50.
- Brand DD, Myers LK, Terato K, Whittington KB, Stuart JM, Kang AH, Rosloniec EF. Characterization of the T cell determinants in the induction of autoimmune arthritis by bovine alpha 1(II)-CB11 in H-2q mice. *J Immunol* 1994; 152: 3088-97.
- Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25: 3-18.
- Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2007; 2: 1269-75.
- Bray BL. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 587-93.
- Brennan P, Bankhead C, Silman A, Symmons D. Oral contraceptives and rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26: 817-23.
- Cabezas E, Satterthwait AC. The Hydrogen Bond Mimic Approach: Solid-Phase Synthesis of a Peptide Stabilized as an  $\alpha$ -Helix with a Hydrazone Link. *Journal of the American Chemical Society* 1999; 121: 3862-75.
- Cabri W, Cantelmi P, Corbisiero D, Fantoni T, Ferrazzano L, Martelli G, Mattellone A, Tolomelli A. Therapeutic Peptides Targeting PPI in Clinical Development: Overview, Mechanism of Action and Perspectives. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 697586.
- Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1568-75.
- Cantaert T, Teitsma C, Tak PP, Baeten D. Presence and role of anti-citrullinated protein antibodies in experimental arthritis models. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 939-48.
- Caplazi P, Baca M, Barck K, Carano RA, DeVoss J, Lee WP, Bolon B, Diehl L. Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. *Vet Pathol* 2015; 52: 819-26.
- Carlin G, Djursater R, Smedegard G. Sulphasalazine inhibition of human granulocyte activation by inhibition of second messenger compounds. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1230-6.
- Chapman RN, Dimartino G, Arora PS. A highly stable short alpha-helix constrained by a main-chain hydrogen-bond surrogate. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 12252-3.
- Chatterjee J, Gilon C, Hoffman A, Kessler H. N-methylation of peptides: a new perspective in medicinal chemistry. *Acc Chem Res* 2008; 41: 1331-42.
- Chatzikiyriakidou A, Voulgari PV, Lambropoulos A, Drosos AA. Genetics in rheumatoid arthritis beyond HLA genes: what meta-analyses have shown? *Semin Arthritis Rheum* 2013; 43: 29-38.

- Choi IA, Choi JY, Jung S, Basri F, Park S, Lee EY. GV1001 immunotherapy ameliorates joint inflammation in a murine model of rheumatoid arthritis by modifying collagen-specific T-cell responses and downregulating antigen-presenting cells. *Int Immunopharmacol* 2017; 46: 186-93.
- Chorev M, Roubini E, McKee RL, Gibbons SW, Goldman ME, Caulfield MP, Rosenblatt M. Cyclic parathyroid hormone related protein antagonists: lysine 13 to aspartic acid 17 [i to (i + 4)] side chain to side chain lactamization. *Biochemistry* 1991; 30: 5968-74.
- Chothia C, Janin J. Principles of protein-protein recognition. *Nature* 1975; 256: 705-8.
- Choy E, Ganeshalingam K, Semb AG, Szekanecz Z, Nurmohamed M. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: recent advances in the understanding of the pivotal role of inflammation, risk predictors and the impact of treatment. *Rheumatology (Oxford)* 2014; 53: 2143-54.
- Clavel G, Marchiol-Fournigault C, Renault G, Boissier MC, Fradelizi D, Bessis N. Ultrasound and Doppler micro-imaging in a model of rheumatoid arthritis in mice. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1765-72.
- Clemente-Casares X, Blanco J, Ambalavanan P, Yamanouchi J, Singha S, Fandos C, Tsai S, Wang J, Garabatos N, Izquierdo C, Agrawal S, Keough MB, Yong VW, James E, Moore A, Yang Y, Stratmann T, Serra P, Santamaria P. Expanding antigen-specific regulatory networks to treat autoimmunity. *Nature* 2016; 530: 434-40.
- Cohen SB, Tanaka Y, Mariette X, Curtis JR, Lee EB, Nash P, Winthrop KL, Charles-Schoeman C, Thirunavukkarasu K, DeMasi R, Geier J, Kwok K, Wang L, Riese R, Wollenhaupt J. Long-term safety of tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis up to 8.5 years: integrated analysis of data from the global clinical trials. *Ann Rheum Dis* 2017; 76: 1253-62.
- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Maedica (Bucur)* 2010; 5: 286-91.
- Comee L, Taylor CA, Nahikian-Nelms M, Ganesan LP, Krok-Schoen JL. Dietary patterns and nutrient intake of individuals with rheumatoid arthritis and osteoarthritis in the United States. *Nutrition* 2019; 67-68: 110533.
- Cook AD, Rowley MJ, Stockman A, Muirden KD, Mackay IR. Specificity of antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1186-91.
- Cook AD, Gray R, Ramshaw J, Mackay IR, Rowley MJ. Antibodies against the CB10 fragment of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R477-83.
- Coras R, Murillo-Saich JD, Guma M. Circulating Pro- and Anti-Inflammatory Metabolites and Its Potential Role in Rheumatoid Arthritis Pathogenesis. *Cells* 2020; 9
- Corthay A, Backlund J, Broddefalk J, Michaelsson E, Goldschmidt TJ, Kihlberg J, Holmdahl R. Epitope glycosylation plays a critical role for T cell recognition of type II collagen in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2580-90.
- Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980; 283: 666-8.
- Craig E, Cappelli LC. Gastrointestinal and Hepatic Disease in Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2018; 44: 89-111.
- Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des* 2013; 81: 136-47.
- Crombie DE, Turer M, Zuasti BB, Wood B, McNaughton D, Nandakumar KS, Holmdahl R, Van Damme MP, Rowley MJ. Destructive effects of murine arthritogenic antibodies to type II collagen on cartilage explants in vitro. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R927-37.
- Cron RQ. A signal achievement in the treatment of arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2229-32.
- Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 1993; 92: 2675-82.
- Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 163-72.
- Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ, Lyons JA. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2006; 180: 63-70.

- Curtis JR, Xie F, Yun H, Bernatsky S, Winthrop KL. Real-world comparative risks of herpes virus infections in tofacitinib and biologic-treated patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 1843-7.
- Cutolo M, Serio B, Villaggio B, Pizzorni C, Cravio C, Sulli A. Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 131-42.
- Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr Opin Rheumatol* 2018; 30: 72-8.
- Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017; 31: 3-18.
- del Junco DJ, Annegers JF, Luthra HS, Coulam CB, Kurland LT. Do oral contraceptives prevent rheumatoid arthritis? *JAMA* 1985; 254: 1938-41.
- Derganova O, Martinez-Gamboa L, Egerer K, Bang H, Fredenhagen G, Roggenbuck D, Esaulenko I, Burmester GR, Chernykh T, Feist E. Selected cyclic citrullinated peptides derived from the sequence of mutated and citrullinated vimentin (MCV) are targeted by different antibodies subclasses in patients with rheumatoid arthritis in Russian patients. *Clin Exp Rheumatol* 2014; 32: 622-9.
- Ding Z, Wang Q, Pan X, Zhu Q, Lu H, Wang K, Ni X, Lu Y, Gu J. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand is related to sex differences in collagen-induced arthritis. *Int Immunopharmacol* 2015; 28: 892-6.
- Dorner T, Egerer K, Feist E, Burmester GR. Rheumatoid factor revisited. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 246-53.
- Dusad A, Duryee MJ, Shaw AT, Klassen LW, Anderson DR, Wang D, Ren K, Gravalles EM, O'Dell JR, Mikuls TR, Thiele GM. Induction of bone loss in DBA/1J mice immunized with citrullinated autologous mouse type II collagen in the absence of adjuvant. *Immunol Res* 2014; 58: 51-60.
- Dzhambazov B, Nandakumar KS, Kihlberg J, Fugger L, Holmdahl R, Vestberg M. Therapeutic vaccination of active arthritis with a glycosylated collagen type II peptide in complex with MHC class II molecules. *J Immunol* 2006; 176: 1525-33.
- Eggenhuizen PJ, Ng BH, Ooi JD. Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci* 2020; 21
- Ekberg O, Redlund-Johnell I, Sjoblom KG. Pharyngeal function in patients with rheumatoid arthritis of the cervical spine and temporomandibular joint. *Acta Radiol* 1987; 28: 35-9.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghrayeb J, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1681-90.
- Fairlie DP, West ML, Wong AK. Towards protein surface mimetics. *Curr Med Chem* 1998; 5: 29-62.
- Farquhar H, Vassallo R, Edwards AL, Matteson EL. Pulmonary Complications of Rheumatoid Arthritis. *Semin Respir Crit Care Med* 2019; 40: 194-207.
- Fehr T, Bachmann MF, Bucher E, Kalinke U, Di Padova FE, Lang AB, Hengartner H, Zinkernagel RM. Role of repetitive antigen patterns for induction of antibodies against antibodies. *J Exp Med* 1997; 185: 1785-92.
- Feraco P, Bazzocchi A, Righi S, Zampogna G, Savastio G, Salizzoni E. Involvement of cricoarytenoid joints in rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 2009; 15: 264.
- Fernandes-Cerqueira C, Ossipova E, Gunasekera S, Hansson M, Mathsson L, Catrina AI, Sommarin Y, Klareskog L, Lundberg K, Ronnelid J, Goransson U, Jakobsson PJ. Targeting of anti-citrullinated protein/peptide antibodies in rheumatoid arthritis using peptides mimicking endogenously citrullinated fibrinogen antigens. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 155.
- Ferucci ED, Templin DW, Lanier AP. Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34: 662-7.
- Figus FA, Piga M, Azzolin I, McConnell R, Iagnocco A. Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. *Autoimmun Rev* 2021; 20: 102776.
- Fischer BD, Adeyemo A, O'Leary ME, Bottaro A. Animal models of rheumatoid pain: experimental systems and insights. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 146.

- Flint J, Panchal S, Hurrell A, van de Venne M, Gayed M, Schreiber K, Arthanari S, Cunningham J, Flanders L, Moore L, Crossley A, Purushotham N, Desai A, Piper M, Nisar M, Khamashta M, Williams D, Gordon C, Giles I, Bsr, Bhpr Standards G, Audit Working G. BSR and BHPR guideline on prescribing drugs in pregnancy and breastfeeding-Part I: standard and biologic disease modifying anti-rheumatic drugs and corticosteroids. *Rheumatology (Oxford)* 2016; 55: 1693-7.
- Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today* 2015; 20: 122-8.
- Fox RI. Mechanism of action of hydroxychloroquine as an antirheumatic drug. *Semin Arthritis Rheum* 1993; 23: 82-91.
- Fragoulis GE, Chatzidionysiou K. Lung cancer in rheumatoid arthritis. Is there a need for better risk assessment and screening? *Clin Rheumatol* 2020; 39: 957-61.
- Fragoulis GE, Panayotidis I, Nikiphorou E. Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis and Mechanistic Links: From Pathophysiology to Treatment. *Curr Vasc Pharmacol* 2020; 18: 431-46.
- Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Peclat V, Busso N, So A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R370-9.
- Frisell T, Hellgren K, Alfredsson L, Raychaudhuri S, Klareskog L, Askling J. Familial aggregation of arthritis-related diseases in seropositive and seronegative rheumatoid arthritis: a register-based case-control study in Sweden. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 183-9.
- Fugger L, Rothbard JB, Sonderstrup-McDevitt G. Specificity of an HLA-DRB1\*0401-restricted T cell response to type II collagen. *Eur J Immunol* 1996; 26: 928-33.
- Fujii K, Tsuji M, Kitamura A, Murota K. The diagnostic significance of anti-type II collagen antibody assay in rheumatoid arthritis. *Int Orthop* 1992; 16: 272-6.
- Gabrysova L, Wraith DC. Antigenic strength controls the generation of antigen-specific IL-10-secreting T regulatory cells. *Eur J Immunol* 2010; 40: 1386-95.
- Gertel S, Serre G, Shoenfeld Y, Amital H. Immune tolerance induction with multiepitope peptide derived from citrullinated autoantigens attenuates arthritis manifestations in adjuvant arthritis rats. *J Immunol* 2015; 194: 5674-80.
- Gertel S, Karmon G, Vainer S, Shovman O, Cornillet M, Serre G, Shoenfeld Y, Amital H. Immunomodulation of RA Patients' PBMC with a Multiepitope Peptide Derived from Citrullinated Autoantigens. *Mediators Inflamm* 2017; 2017: 3916519.
- Gilheaney O, Zgaga L, Harpur I, Sheaf G, Kiefer L, Bechet S, Walshe M. The Prevalence of Oropharyngeal Dysphagia in Adults Presenting with Temporomandibular Disorders Associated with Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dysphagia* 2017; 32: 587-600.
- Glant TT, Radacs M, Nagyeri G, Olasz K, Laszlo A, Boldizsar F, Hegyi A, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1312-21.
- Gokhale A, Kanthala S, Latendresse J, Taneja V, Satyanarayanajois S. Immunosuppression by co-stimulatory molecules: inhibition of CD2-CD48/CD58 interaction by peptides from CD2 to suppress progression of collagen-induced arthritis in mice. *Chem Biol Drug Des* 2013; 82: 106-18.
- Gokhale AS, Satyanarayanajois S. Peptides and peptidomimetics as immunomodulators. *Immunotherapy* 2014; 6: 755-74.
- Gow PJ, Gibson T. Dysphagia due to vertical subluxation of the axis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Rehabil* 1977; 16: 155-7.
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-13.
- Hannaford PC, Kay CR, Hirsch S. Oral contraceptives and rheumatoid arthritis: new data from the Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 744-6.
- Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L,

- Jurdic P, Schett G. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest* 2012; 122: 1791-802.
- Haselwood DM, Castles JJ. The biology of the rheumatoid synovial cell. *West J Med* 1977; 127: 204-14.
- Hasselberg A, Schon K, Tarkowski A, Lycke N. Role of CTA1R7K-COL-DD as a novel therapeutic mucosal tolerance-inducing vector for treatment of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1672-82.
- Hawkes JS, Cleland LG, Proudman SM, James MJ. The effect of methotrexate on ex vivo lipoxygenase metabolism in neutrophils from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 55-8.
- Hawkins P, Armstrong R, Boden T, Garside P, Knight K, Lilley E, Seed M, Wilkinson M, Williams RO. Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research. *Inflammopharmacology* 2015; 23: 131-50.
- Hazes JM, Dijkmans BC, Vandenbroucke JP, de Vries RR, Cats A. Reduction of the risk of rheumatoid arthritis among women who take oral contraceptives. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 173-9.
- Hedfors E, Klareskog L, Lindblad S, Forsum U, Lindahl G. Phenotypic characterization of cells within subcutaneous rheumatoid nodules. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 1333-9.
- Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334 ( Pt 2): 297-314.
- Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrli B, Jevnikar AM, Lee DM, Hueber W, Robinson WH, Cairns E. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* 2008; 205: 967-79.
- Ho PP, Lee LY, Zhao X, Tomooka BH, Paniagua RT, Sharpe O, BenBarak MJ, Chandra PE, Hueber W, Steinman L, Robinson WH. Autoimmunity against fibrinogen mediates inflammatory arthritis in mice. *J Immunol* 2010; 184: 379-90.
- Holmdahl R, Jansson L, Gullberg D, Rubin K, Forsberg PO, Klareskog L. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 639-46.
- Holmdahl R, Jansson L, Larsson E, Rubin K, Klareskog L. Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 1986a; 29: 106-13.
- Holmdahl R, Jansson L, Andersson M. Female sex hormones suppress development of collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 1986b; 29: 1501-9.
- Honda A, Ametani A, Matsumoto T, Iwaya A, Kano H, Hachimura S, Ohkawa K, Kaminogawa S, Suzuki K, Sercarz EE, Kumar V. Vaccination with an immunodominant peptide of bovine type II collagen induces an anti-TCR response, and modulates the onset and severity of collagen-induced arthritis. *Int Immunol* 2004; 16: 737-45.
- Ince-Askan H, Dolhain RJ. Pregnancy and rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2015; 29: 580-96.
- Inglis JJ, Simelyte E, McCann FE, Criado G, Williams RO. Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. *Nat Protoc* 2008; 3: 612-8.
- Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halcken S, Host A, Koivikko A, Norberg LA, Valovirta E, Wahn U, Moller C. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-year follow-up on the PAT study. *Allergy* 2007; 62: 943-8.
- Jakubke H-DJ, Hans (1982) Aminosäuren, Peptide, Proteine
- Jasin HE. Autoantibody specificities of immune complexes sequestered in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 241-8.
- Johansson K, Askling J, Alfredsson L, Di Giuseppe D, group Es. Mediterranean diet and risk of rheumatoid arthritis: a population-based case-control study. *Arthritis Res Ther* 2018; 20: 175.
- Jones GW, Hill DG, Sime K, Williams AS. In Vivo Models for Inflammatory Arthritis. *Methods Mol Biol* 2018; 1725: 101-18.
- Jones S, Thornton JM. Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13-20.

- Jung H, Jung SM, Rim YA, Park N, Nam Y, Lee J, Park SH, Ju JH. Arthritic role of *Porphyromonas gingivalis* in collagen-induced arthritis mice. *PLoS One* 2017; 12: e0188698.
- Kang HK, Michaels MA, Berner BR, Datta SK. Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subsets. *J Immunol* 2005; 174: 3247-55.
- Karlson EW, Mandl LA, Hankinson SE, Grodstein F. Do breast-feeding and other reproductive factors influence future risk of rheumatoid arthritis? Results from the Nurses' Health Study. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3458-67.
- Kelly C, Iqbal K, Iman-Gutierrez L, Evans P, Manchegowda K. Lung involvement in inflammatory rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2016; 30: 870-88.
- Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 1396-401.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000412.
- Kim HJ, Nemani VM, Riew KD, Brasington R. Cervical spine disease in rheumatoid arthritis: incidence, manifestations, and therapy. *Curr Rheumatol Rep* 2015; 17: 9.
- Kim KE, Jeon S, Song J, Kim TS, Jung MK, Kim MS, Park S, Park SB, Park JM, Park HJ, Cho D. The Novel Synthetic Peptide AESIS-1 Exerts a Preventive Effect on Collagen-Induced Arthritis Mouse Model via STAT3 Suppression. *Int J Mol Sci* 2020; 21
- Kim SJ, Jung KA. Arthroscopic synovectomy in rheumatoid arthritis of wrist. *Clin Med Res* 2007; 5: 244-50.
- Kishikawa T, Maeda Y, Nii T, Motooka D, Matsumoto Y, Matsushita M, Matsuoka H, Yoshimura M, Kawada S, Teshigawara S, Oguro E, Okita Y, Kawamoto K, Higa S, Hirano T, Narazaki M, Ogata A, Saeki Y, Nakamura S, Inohara H, Kumanogoh A, Takeda K, Okada Y. Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 103-11.
- Kishore S, Maher L, Majithia V. Rheumatoid Vasculitis: A Diminishing Yet Devastating Menace. *Curr Rheumatol Rep* 2017; 19: 39.
- Klein A, Polliack A, Gafter-Gvili A. Rheumatoid arthritis and lymphoma: Incidence, pathogenesis, biology, and outcome. *Hematol Oncol* 2018; 36: 733-9.
- Koffeman EC, Genovese M, Amox D, Keogh E, Santana E, Matteson EL, Kavanaugh A, Molitor JA, Schiff MH, Posever JO, Bathon JM, Kivitz AJ, Samodal R, Belardi F, Dennehey C, van den Broek T, van Wijk F, Zhang X, Zieseniss P, Le T, Prakken BA, Cutter GC, Albani S. Epitope-specific immunotherapy of rheumatoid arthritis: clinical responsiveness occurs with immune deviation and relies on the expression of a cluster of molecules associated with T cell tolerance in a double-blind, placebo-controlled, pilot phase II trial. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3207-16.
- Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2014; 48-49: 26-30.
- Kremer JM. Methotrexate and leflunomide: biochemical basis for combination therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1999; 29: 14-26.
- Kritzer JA, Zutshi R, Cheah M, Ran FA, Webman R, Wongjirad TM, Schepartz A. Miniature protein inhibitors of the p53-hDM2 interaction. *Chembiochem* 2006; 7: 29-31.
- Ku G, Kronenberg M, Peacock DJ, Tempst P, Banquerigo ML, Braun BS, Reeve JR, Jr., Brahn E. Prevention of experimental autoimmune arthritis with a peptide fragment of type II collagen. *Eur J Immunol* 1993; 23: 591-9.
- Kuhn KA, Kulik L, Tomooka B, Braschler KJ, Arend WP, Robinson WH, Holers VM. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *J Clin Invest* 2006; 116: 961-73.
- Kurko J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013; 45: 170-9.
- Kurtzhals P, Havelund S, Jonassen I, Kiehr B, Larsen UD, Ribel U, Markussen J. Albumin binding of insulins acylated with fatty acids: characterization of the ligand-protein interaction and

- correlation between binding affinity and timing of the insulin effect in vivo. *Biochem J* 1995; 312 ( Pt 3): 725-31.
- Larche M, Wraith DC. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med* 2005; 11: S69-76.
- Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 761-71.
- Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem* 2018; 26: 2700-7.
- Li C, Liu M, Monbo J, Zou G, Li C, Yuan W, Zella D, Lu WY, Lu W. Turning a scorpion toxin into an antitumor miniprotein. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 13546-8.
- Lindenberg L, Spengler L, Bang H, Dorner T, Maslyanskiy AL, Lapin SV, Ilivanova EI, Martinez-Gamboa L, Bastian H, Wittenborn E, Egerer K, Burmester GR, Feist E. Restrictive IgG antibody response against mutated citrullinated vimentin predicts response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 206.
- Linos A, Worthington JW, O'Fallon WM, Kurland LT. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of incidence, prevalence, and mortality. *Am J Epidemiol* 1980; 111: 87-98.
- Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet Dermatol* 2009; 20: 84-98.
- Loughlin WA, Tyndall JD, Glenn MP, Fairlie DP. Beta-strand mimetics. *Chem Rev* 2004; 104: 6085-117.
- Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 202.
- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 30-7.
- Maffia P, Brewer JM, Gracie JA, Ianaro A, Leung BP, Mitchell PJ, Smith KM, McInnes IB, Garside P. Inducing experimental arthritis and breaking self-tolerance to joint-specific antigens with trackable, ovalbumin-specific T cells. *J Immunol* 2004; 173: 151-6.
- Maibom-Thomsen SL, Trier NH, Holm BE, Hansen KB, Rasmussen MI, Chailyan A, Marcatili P, Hojrup P, Houen G. Immunoglobulin G structure and rheumatoid factor epitopes. *PLoS One* 2019; 14: e0217624.
- Maini RN, Brennan FM, Williams R, Chu CQ, Cope AP, Gibbons D, Elliott M, Feldmann M. TNF-alpha in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11 Suppl 8: S173-5.
- Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L, Catrina AI. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1488-92.
- Malnick S, Melzer E, Sokolowski N, Basevitz A. The involvement of the liver in systemic diseases. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 69-80.
- Maradit-Kremers H, Nicola PJ, Crowson CS, Ballman KV, Gabriel SE. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 722-32.
- Marcinska K, Majewska-Szczepanik M, Maresz KZ, Szczepanik M. Epicutaneous Immunization with Collagen Induces TCRalpha-beta Suppressor T Cells That Inhibit Collagen-Induced Arthritis. *Int Arch Allergy Immunol* 2015; 166: 121-34.
- Marcucci E, Bartoloni E, Alunno A, Leone MC, Cafaro G, Luccioli F, Valentini V, Valentini E, La Paglia GMC, Bonifacio AF, Gerli R. Extra-articular rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 2018; 70: 212-24.
- Marx V. Watching peptide drugs grow up. *Chemical and Engineering News* 2005; 83: 17-24.
- Mason A, Holmes C, Edwards CJ. Inflammation and dementia: Using rheumatoid arthritis as a model to develop treatments? *Autoimmun Rev* 2018; 17: 919-25.

- Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166: 4177-84.
- Mathsson L, Lampa J, Mullazehi M, Ronnelid J. Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce Fc $\gamma$ RIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor- $\alpha$  by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R64.
- McGregor DP. Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 616-9.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365: 2205-19.
- Miller SD, Turley DM, Podojil JR. Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 665-77.
- Mimori T. Clinical significance of anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis. *Intern Med* 2005; 44: 1122-6.
- Moldaver D, Larche M. Immunotherapy with peptides. *Allergy* 2011; 66: 784-91.
- Moll J, Isailovic N, De Santis M, Selmi C. Rheumatoid Factors in Hepatitis B and C Infections: Connecting Viruses, Autoimmunity, and Cancer. *Isr Med Assoc J* 2019; 21: 480-6.
- Montesinos MC, Desai A, Delano D, Chen JF, Fink JS, Jacobson MA, Cronstein BN. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 240-7.
- Mukerji N, Todd NV. Cervical myelopathy in rheumatoid arthritis. *Neurol Res Int* 2011; 2011: 153628.
- Mullazehi M, Mathsson L, Lampa J, Ronnelid J. Surface-bound anti-type II collagen-containing immune complexes induce production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 from peripheral blood monocytes via Fc gamma receptor IIA: a potential pathophysiologic mechanism for humoral anti-type II collagen immunity in arthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1759-71.
- Mullazehi M, Mathsson L, Lampa J, Ronnelid J. High anti-collagen type-II antibody levels and induction of proinflammatory cytokines by anti-collagen antibody-containing immune complexes in vitro characterise a distinct rheumatoid arthritis phenotype associated with acute inflammation at the time of disease onset. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 537-41.
- Mullazehi M, Wick MC, Klareskog L, van Vollenhoven R, Ronnelid J. Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14: R100.
- Muller S, Monneaux F, Schall N, Rashkov RK, Oparanov BA, Wiesel P, Geiger JM, Zimmer R. Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus: results of an early phase II clinical trial. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 3873-83.
- Myers LK, Stuart JM, Seyer JM, Kang AH. Identification of an immunosuppressive epitope of type II collagen that confers protection against collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 1989; 170: 1999-2010.
- Myers LK, Rosloniec EF, Seyer JM, Stuart JM, Kang AH. A synthetic peptide analogue of a determinant of type II collagen prevents the onset of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1993; 150: 4652-8.
- Myers LK, Cooper SW, Terato K, Seyer JM, Stuart JM, Kang AH. Identification and characterization of a tolerogenic T cell determinant within residues 181-209 of chick type II collagen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 75: 33-8.
- Myers LK, Sakurai Y, Tang B, He X, Rosloniec EF, Stuart JM, Kang AH. Peptide-induced suppression of collagen-induced arthritis in HLA-DR1 transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3369-77.
- Myers LK, Tang B, Rosloniec EF, Stuart JM, Kang AH. An altered peptide ligand of type II collagen suppresses autoimmune arthritis. *Crit Rev Immunol* 2007; 27: 345-56.
- Nandakumar KS, Bajtner E, Hill L, Bohm B, Rowley MJ, Burkhardt H, Holmdahl R. Arthritogenic antibodies specific for a major type II collagen triple-helical epitope bind and destabilize cartilage independent of inflammation. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 184-96.
- Newkirk MM. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? *Clin Immunol* 2002; 104: 1-13.

- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 380-6.
- Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1953; 4: 285-8.
- Norman PS, Ohman JL, Jr., Long AA, Creticos PS, Gefter MA, Shaked Z, Wood RA, Eggleston PA, Hafner KB, Rao P, Lichtenstein LM, Jones NH, Nicodemus CF. Treatment of cat allergy with T-cell reactive peptides. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1623-8.
- Northfield SE, Wang CK, Schroeder CI, Durek T, Kan MW, Swedberg JE, Craik DJ. Disulfide-rich macrocyclic peptides as templates in drug design. *Eur J Med Chem* 2014; 77: 248-57.
- Oliver JE, Silman AJ. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 252.
- Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350: 2167-79.
- Pasut G, Veronese FM. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 1177-88.
- Pereira RS, Black CM, Duance VC, Jones VE, Jacoby RK, Welsh KI. Disappearing collagen antibodies in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1985; 2: 501-2.
- Perricone C, Ceccarelli F, Saccucci M, Di Carlo G, Bogdanos DP, Lucchetti R, Piloni A, Valesini G, Polimeni A, Conti F. *Porphyromonas gingivalis* and rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2019; 31: 517-24.
- Pietrosimone KM, Jin M, Poston B, Liu P. Collagen-Induced Arthritis: A model for Murine Autoimmune Arthritis. *Bio Protoc* 2015; 5
- Pikwer M, Bergstrom U, Nilsson JA, Jacobsson L, Berglund G, Turesson C. Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 526-30.
- Pozsgay J, Szekanecz Z, Sarmay G. Antigen-specific immunotherapies in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13: 525-37.
- Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol* 2003; 170: 4986-95.
- Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2741-9.
- Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J, Siminovitch KA, Bae SC, Plenge RM, Gregersen PK, de Bakker PI. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012; 44: 291-6.
- Rein P, Mueller RB. Treatment with Biologicals in Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Rheumatol Ther* 2017; 4: 247-61.
- Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J Immunol* 2007; 179: 4704-10.
- Robinson JA. Beta-hairpin peptidomimetics: design, structures and biological activities. *Acc Chem Res* 2008; 41: 1278-88.
- Rodriguez-Fernandez JL. Antigen presentation by dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Curr Top Med Chem* 2013; 13: 712-9.
- Ronneld J, Lysholm J, Engstrom-Laurent A, Klareskog L, Heyman B. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1023-9.
- Rosloniec EF, Whittington KB, Brand DD, Myers LK, Stuart JM. Identification of MHC class II and TCR binding residues in the type II collagen immunodominant determinant mediating collagen-induced arthritis. *Cell Immunol* 1996; 172: 21-8.

- Rubin AS, Healy CT, Martin LN, Baskin GB, Roberts ED. Experimental arthropathy induced in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) by intradermal immunization with native bovine type II collagen. *Lab Invest* 1987; 57: 524-34.
- Sabatos-Peyton CA, Verhagen J, Wraith DC. Antigen-specific immunotherapy of autoimmune and allergic diseases. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 609-15.
- Sakurai Y, Brand DD, Tang B, Rosloniec EF, Stuart JM, Kang AH, Myers LK. Analog peptides of type II collagen can suppress arthritis in HLA-DR4 (DRB1\*0401) transgenic mice. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R150.
- Salliot C, van der Heijde D. Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1100-4.
- Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 2006; 203: 2673-82.
- Satpute SR, Rajaiah R, Polumuri SK, Moudgil KD. Tolerization with Hsp65 induces protection against adjuvant-induced arthritis by modulating the antigen-directed interferon-gamma, interleukin-17, and antibody responses. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 103-13.
- Schafmeister CE, Po J, Verdine GL. An All-Hydrocarbon Cross-Linking System for Enhancing the Helicity and Metabolic Stability of Peptides. *Journal of the American Chemical Society* 2000; 122: 5891-2.
- Scherer HU, Haupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2020; 110: 102400.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376: 1094-108.
- Scott IC, Hider SL, Scott DL. Thromboembolism with Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Rheumatoid Arthritis: How Real is the Risk? *Drug Saf* 2018; 41: 645-53.
- Seeuws S, Jacques P, Van Praet J, Drennan M, Coudenys J, Decruy T, Deschepper E, Lepescheux L, Pujuguet P, Oste L, Vandeghinste N, Brys R, Verbruggen G, Elewaut D. A multiparameter approach to monitor disease activity in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: R160.
- Sepriano A, Kerschbaumer A, Smolen JS, van der Heijde D, Dougados M, van Vollenhoven R, McInnes IB, Bijlsma JW, Burmester GR, de Wit M, Falzon L, Landewe R. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2019 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 760-70.
- Sharif K, Sharif A, Jumah F, Oskouian R, Tubbs RS. Rheumatoid arthritis in review: Clinical, anatomical, cellular and molecular points of view. *Clin Anat* 2018; 31: 216-23.
- Shaw M, Collins BF, Ho LA, Raghu G. Rheumatoid arthritis-associated lung disease. *Eur Respir Rev* 2015; 24: 1-16.
- Shepherd NE, Hoang HN, Abbenante G, Fairlie DP. Single turn peptide alpha helices with exceptional stability in water. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 2974-83.
- Shim SY, Kim YW, Verdine GL. A new i, i + 3 peptide stapling system for alpha-helix stabilization. *Chem Biol Drug Des* 2013; 82: 635-42.
- Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 903-7.
- Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: S265-72.
- Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, Abrouk M, Farahnik B, Nakamura M, Zhu TH, Bhutani T, Liao W. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* 2017; 15: 73.
- Smitten AL, Simon TA, Hochberg MC, Suissa S. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R45.
- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016; 388: 2023-38.

- Smolen JS, Landewe RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, McInnes IB, Sepriano A, van Vollenhoven RF, de Wit M, Aletaha D, Aringer M, Askling J, Balsa A, Boers M, den Broeder AA, Buch MH, Buttgerit F, Caporali R, Cardiel MH, De Cock D, Codreanu C, Cutolo M, Edwards CJ, van Eijk-Hustings Y, Emery P, Finckh A, Gossec L, Gottenberg JE, Hetland ML, Huizinga TWJ, Koloumas M, Li Z, Mariette X, Muller-Ladner U, Mysler EF, da Silva JAP, Poor G, Pope JE, Rubbert-Roth A, Ruysen-Witrand A, Saag KG, Strangfeld A, Takeuchi T, Voshaar M, Westhovens R, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis* 2020; 79: 685-99.
- Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH. Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 53-62.
- Srinivasan M, Janardhanam S. Novel p65 binding glucocorticoid-induced leucine zipper peptide suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem* 2011; 286: 44799-810.
- Staines NA, Harper N, Ward FJ, Malmstrom V, Holmdahl R, Bansal S. Mucosal tolerance and suppression of collagen-induced arthritis (CIA) induced by nasal inhalation of synthetic peptide 184-198 of bovine type II collagen (CII) expressing a dominant T cell epitope. *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 368-75.
- Steiner G. Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 32: 23-36.
- Streeter HB, Wraith DC. Manipulating antigen presentation for antigen-specific immunotherapy of autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2021; 70: 75-81.
- Sun M, Rethi B, Krishnamurthy A, Joshua V, Circiumaru A, Hensvold AH, Ossipova E, Gronwall C, Liu Y, Engstrom M, Catrina SB, Steen J, Malmstrom V, Klareskog L, Svensson C, Ospelt C, Wahamoa H, Catrina AI. Anticitrullinated protein antibodies facilitate migration of synovial tissue-derived fibroblasts. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 1621-31.
- Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010; 68: 930-41.
- Symmons DP, Barrett EM, Bankhead CR, Scott DG, Silman AJ. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol* 1994; 33: 735-9.
- Tanaka S, Toki T, Akimoto T, Morishita K. Lipopolysaccharide accelerates collagen-induced arthritis in association with rapid and continuous production of inflammatory mediators and anti-type II collagen antibody. *Microbiol Immunol* 2013; 57: 445-54.
- Taneja V, Behrens M, Mangalam A, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. New humanized HLA-DR4-transgenic mice that mimic the sex bias of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 69-78.
- Tarzi M, Klunker S, Texier C, Verhoef A, Stapel SO, Akdis CA, Maillere B, Kay AB, Larche M. Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 465-74.
- Tengvall S, Eneljung T, Jirholt P, Turesson O, Wing K, Holmdahl R, Kihlberg J, Stern A, Martensson IL, Henningsson L, Gustafsson K, Gjertsson I. Gene Therapy Induces Antigen-Specific Tolerance in Experimental Collagen-Induced Arthritis. *PLoS One* 2016; 11: e0154630.
- Thiele GM, Duryee MJ, Dusad A, Hunter CD, Lacy JP, Anderson DR, Wang D, O'Dell JR, Mikuls TR, Klassen LW. Citrullinated mouse collagen administered to DBA/1J mice in the absence of adjuvant initiates arthritis. *Int Immunopharmacol* 2012; 13: 424-31.
- Thornton S, Strait RT. Head-to-head comparison of protocol modifications for the generation of collagen-induced arthritis in a specific-pathogen free facility using DBA/1 mice. *Biotechniques* 2016; 60: 119-28.
- Tilstra JS, Lienesch DW. Rheumatoid Nodules. *Dermatol Clin* 2015; 33: 361-71.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146: 857-68.

- Tsomaia N. Peptide therapeutics: targeting the undruggable space. *Eur J Med Chem* 2015; 94: 459-70.
- Tugyi R, Uray K, Ivan D, Fellingner E, Perkins A, Hudecz F. Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 413-8.
- Tutaj M, Szczepanik M. Epicutaneous (EC) immunization with myelin basic protein (MBP) induces TCRalpha<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> double positive suppressor cells that protect from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Autoimmun* 2007; 28: 208-15.
- Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL, Axell T. Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 415-22.
- Ulutatar F, Unal-Ulutatar C, Duruoz MT. Cervical proprioceptive impairment in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2019; 39: 2043-51.
- Vahtovuori J, Munukka E, Korkeamäki M, Luukkainen R, Toivanen P. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35: 1500-5.
- van der Linden MP, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TW, Toes RE, van der Helm-van Mil AH. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2232-41.
- van Venrooij WJ, Zendman AJ, Pruijn GJ. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2006; 6: 37-41.
- Vang T, Landskron J, Viken MK, Oberprieler N, Torgersen KM, Mustelin T, Tasken K, Tautz L, Rickert RC, Lie BA. The autoimmune-predisposing variant of lymphoid tyrosine phosphatase favors T helper 1 responses. *Hum Immunol* 2013; 74: 574-85.
- Verstappen SMM. The impact of socio-economic status in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2017; 56: 1051-2.
- Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* 2010; 15: 40-56.
- Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, van Venrooij WJ, Joosten LA. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2489-500.
- Vossenaar ER, van Boekel MA, van Venrooij WJ, Lopez-Hoyos M, Merino J, Merino R, Joosten LA. Absence of citrulline-specific autoantibodies in animal models of autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2370-2.
- Walitt B, Pettinger M, Weinstein A, Katz J, Torner J, Wasko MC, Howard BV, Women's Health Initiative I. Effects of postmenopausal hormone therapy on rheumatoid arthritis: the women's health initiative randomized controlled trials. *Arthritis Rheum* 2008; 59: 302-10.
- Wang W, Zhou H, Liu L. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur J Med Chem* 2018; 158: 502-16.
- Warren KG, Catz I, Ferenczi LZ, Krantz MJ. Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment. *Eur J Neurol* 2006; 13: 887-95.
- Waugh DF. Protein-protein interactions. *Adv Protein Chem* 1954; 9: 325-437.
- Weber SM, Levitz SM. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J Immunol* 2000; 165: 1534-40.
- Weddell J, Hider S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Prescriber* 2021; 32: 15-20.
- Wenhardt C, Holthoff HP, Reimann A, Li Z, Fassbender J, Ungerer M. A fructosylated peptide derived from a collagen II T cell epitope for long-term treatment of arthritis (FIA-CIA) in mice. *Sci Rep* 2021; 11: 17345.
- West SG. Methotrexate hepatotoxicity. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 883-915.
- Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD. Menopause, oestrogens and arthritis. *Maturitas* 2000; 35: 183-99.

- Wooley PH, Dillon A, Luthra HS, Stuart JM, David C (1983) Genetic control of type ii collagen-induced arthritis in mice: factors influencing disease susceptibility and evidence for multiple mhc-associated gene control
- Wooley PH, Seibold JR, Whalen JD, Chapdelaine JM. Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1022-30.
- Yao ZQ, Li R, Li ZG. A triple altered collagen II peptide with consecutive substitutions of TCR contacting residues inhibits collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 423-4.
- Yazici Y, Paget SA. Elderly-onset rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26: 517-26.
- Yue D, Brintnell W, Mannik LA, Christie DA, Haeryfar SM, Madrenas J, Chakrabarti S, Bell DA, Cairns E. CTLA-4Ig blocks the development and progression of citrullinated fibrinogen-induced arthritis in DR4-transgenic mice. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 2941-52.
- Yurube T, Sumi M, Nishida K, Miyamoto H, Kohyama K, Matsubara T, Miura Y, Sugiyama D, Doita M, Kobe Spine C. Incidence and aggravation of cervical spine instabilities in rheumatoid arthritis: a prospective minimum 5-year follow-up study of patients initially without cervical involvement. *Spine (Phila Pa 1976)* 2012; 37: 2136-44.
- Zhang J, Zahir N, Jiang Q, Miliotis H, Heyraud S, Meng X, Dong B, Xie G, Qiu F, Hao Z, McCulloch CA, Keystone EC, Peterson AC, Siminovitch KA. The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness. *Nat Genet* 2011; 43: 902-7.
- Zhang T, Pope J. Cervical spine involvement in rheumatoid arthritis over time: results from a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 148.
- Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, Wu X, Li J, Tang L, Li Y, Lan Z, Chen B, Li Y, Zhong H, Xie H, Jie Z, Chen W, Tang S, Xu X, Wang X, Cai X, Liu S, Xia Y, Li J, Qiao X, Al-Aama JY, Chen H, Wang L, Wu QJ, Zhang F, Zheng W, Li Y, Zhang M, Luo G, Xue W, Xiao L, Li J, Chen W, Xu X, Yin Y, Yang H, Wang J, Kristiansen K, Liu L, Li T, Huang Q, Li Y, Wang J. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat Med* 2015; 21: 895-905.
- Zhong D, Wu C, Zeng X, Wang Q. The role of gut microbiota in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Clin Rheumatol* 2018; 37: 25-34.
- Zhu P, Li XY, Wang HK, Jia JF, Zheng ZH, Ding J, Fan CM. Oral administration of type-II collagen peptide 250-270 suppresses specific cellular and humoral immune response in collagen-induced arthritis. *Clin Immunol* 2007; 122: 75-84.
- Ziff M. The rheumatoid nodule. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 761-7.
- Zimmer R, Scherbarth HR, Rillo OL, Gomez-Reino JJ, Muller S. Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial. *Ann Rheum Dis* 2013; 72: 1830-5.
- Zimmerman DH, Taylor P, Bendele A, Carambula R, Duzant Y, Lowe V, O'Neill SP, Talor E, Rosenthal KS. CEL-2000: A therapeutic vaccine for rheumatoid arthritis arrests disease development and alters serum cytokine/chemokine patterns in the bovine collagen type II induced arthritis in the DBA mouse model. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 412-21.

## IX. ANHANG

**Abbildungsverzeichnis und Quellen**

<b>Abbildung Nr. und Bezeichnung</b>	<b>Seite</b>	<b>Quellen und Lizenzen</b>
<b>Abbildung 1</b> , Risikofaktoren der RA	4	Eigene Darstellung
<b>Abbildung 2</b> , Shared Epitop Hypothese	5	Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com; Quelle Bild Protein Struktur MHC: Wikimedia Commons
<b>Abbildung 3</b> , Pathologie der Rheumatoiden Arthritis	9	Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com
<b>Abbildung 4</b> , Pathophysiologie der Gelenkentzündung in der RA	11	Aus: (ALETAHA & SMOLEN, 2018), Copyright von American Medical Association, Lizenz: 5507580480069
<b>Abbildung 5</b> , EULAR Empfehlung zum Management der RA	19	Aus: (SMOLEN et al., 2020), Copyright von BMJ Publishing Group Ltd., Lizenz: 550751477617
<b>Abbildung 6</b> , Schema Kollagen induzierte Arthritis	22	Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com
<b>Abbildung 7</b> , Vor- und Nachteile von Peptiden als Therapeutika	29	Eigene Darstellung
<b>Abbildung 8</b> , Darstellung der Immunreaktion bei einer Allergie/Autoimmunkrankheit vs. bei der therapeutischen Induktion einer <b>Anergie</b>	32	Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com
<b>Abbildung 9</b> , Antikörpermessung Vorstudie	62	Eigene Daten
<b>Abbildung 10</b> , Tests von Maus-Seren in kommerziellen anti-CCP-ELISA Test-Kits	63	Eigene Daten
<b>Tabelle 1</b> , Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der T-Zell-Epitope von HLA-DRB1*0401 und I-Aq mit Peptid 90578	66	Eigene Darstellung



## X. DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Reese für Möglichkeit danken, diese Arbeit über den Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie einreichen zu können. Außerdem vielen Dank für das Durchlesen des Manuskripts, ich hoffe, ich bin Ihnen mit meinen häufigen Nachfragen nicht zu sehr auf die Nerven gegangen.

Daneben möchte ich meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Götz Münch danken, dass ich diese Arbeit während meiner Tätigkeit bei advanceCOR anfertigen durfte. Danke auch für die häufigen Nachfragen, wie es denn mit meiner Doktorarbeit steht. Sie haben mich immer motiviert, diese Arbeit trotz vieler Hürden weiterzuführen. Und vielen Dank für die Durchsicht und das Feedback zu dem Manuskript dieser Arbeit.

Danke auch an Martin Ungerer, Hans-Peter Holthoff und Zhongmin Li für die Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung des in dieser Arbeit verwendeten Papers.

Auch allen anderen Mitarbeitern bei advanceCOR möchte ich herzlichst für die Unterstützung danken, dafür dass ihr mir den Rücken freigehalten habt, und euch meine Sorgen und Probleme angehört habt. Ein besonderer Dank auch an Andreas Reimann, Silvia Goebel und Isabel Fodor für die Einführung in die Versuchstierkunde und die Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.

Danke auch meinen Eltern, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben und mich bei allen meinen Entscheidungen unterstützt haben. Und auch, wenn ich manchmal gereizt reagiert habe, danke für das Erkundigen nach meiner Arbeit, ohne die ich vermutlich nie den Hintern hochgekriegt hätte, sie endlich einmal abzuschließen.

Lieber Michi, dir gebührt vermutlich der größte Dank, denn du musstest dir die vergangenen fünf Jahre das meiste Gejammere über Probleme bei meinen Versuchen und bei der Erstellung des Papers und dieser Arbeit anhören. Danke, dass du da warst und dir alles angehört hast, mir mit deiner Sichtweise auch andere Wege aufgezeigt hast, und mich immer wieder ermutigt hast und an mich glaubst. Ich wünsche dir auch viel Erfolg bei deiner Doktorarbeit!