

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin II

**Antikörper gegen den IL-1-Rezeptor Antagonisten  
Anakinra bei Autoinflammatorischen Syndromen und  
COVID-19**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls  
Universität zu Tübingen**

**vorgelegt von Bilandzic, Kristina**

**2025**

Dekan: Professor Dr. rer. nat. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Reinhild Klein

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Karina Althaus

Tag der Disputation: 24.11.2025

## **Widmung**

*Za Mamu, Tatu i Vanessu. Za Baku Mariju, Nadu i Renea.*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>10</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>13</b>
1.1 Einführung in den Begriff Autoinflammation .....	13
1.1.1 Klassifikation.....	14
1.2 Immunologische Grundlagen.....	17
1.2.1 Die Inflammasome.....	17
1.2.2 Die Interleukin-1 Familie .....	20
1.3 Das Familiäre Mittelmeerfieber.....	22
1.4 Das Cryopyrin-assoziierte Periodische Syndrom .....	23
1.5 Das Adulte Still-Syndrom.....	25
1.6 Coronavirus Disease 2019 .....	25
1.7 Der IL-1 Rezeptorantagonist .....	28
1.8 Antikörper gegen IL-1Ra .....	29
1.8.1 Antikörper gegen IL-1Ra unter Anakinra-Therapie.....	29
1.8.2 Antikörper gegen IL-1Ra bei Anakinra-naiven Patienten.....	29
1.9 Fragestellung.....	30
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.1 Patientengewinnung .....	31
2.1.1 Autoinflammations-Kohorte.....	31
2.1.2 COVID-19 Kohorte.....	31
2.2 Patientenkollektiv der Autoinflammatorischen Syndrome und COVID-19 .....	32

2.1	Patientenkollektiv für die Verlaufsuntersuchung unter Anakinra- Therapie .....	35
2.2	Kontrollkollektiv und Festlegung der Grenzwerte .....	35
2.3	Vergleichbarkeit der Kontroll- und Patientenkollektive .....	37
2.4	Datensammlung .....	37
2.5	Materialien .....	38
2.5.1	<i>Chemikalien und Reagenzien</i> .....	38
2.5.2	<i>Lösungen und Pufferansätze</i> .....	39
2.5.3	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	41
2.5.4	<i>Geräte</i> .....	41
2.5.5	<i>Programme</i> .....	42
2.6	Methoden.....	42
2.6.1	<i>Prinzip des Enzyme-linked-immunosorbent assays</i> .....	42
2.6.2	<i>Etablierung</i> .....	42
2.6.3	<i>Elisa Durchführung</i> .....	43
2.6.4	<i>Western Blot zum Nachweis von Anti-IL-1Ra Antikörpern</i> .....	45
2.7	Ethik.....	47
2.8	Statistik .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
3.1	Reaktivität von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei Patienten mit autoinflammatorischen Erkrankungen, COVID-19 Infektion und gesunden Probanden .....	48
3.2	Häufigkeit von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei Patienten mit autoinflammatorischen Erkrankungen, COVID-19 Infektion und gesunden Probanden .....	50
3.3	Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten mit FMF .....	52
3.3.1	<i>Korrelation mit der Schubfrequenz</i> .....	52
3.3.2	<i>Korrelation mit Calprotectin-Spiegeln</i> .....	54
3.3.3	<i>Korrelation mit Serumamyloid A</i> .....	55

3.3.4	<i>Korrelation mit der Medikamenteneinnahme</i> .....	56
3.4	Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten mit CAPS .....	56
3.4.1	<i>Korrelation der Anti-IL-1Ra Antikörper mit Calprotectin- und Serumamyloid-Spiegeln</i> .....	57
3.4.2	<i>Korrelation der Anti-IL-1Ra-Antikörper mit der Medikamenteneinnahme</i> .	57
3.5	Korrelation der Anti-IL-1Ra Antikörper mit klinischen Parametern bei Patienten mit TRAPS .....	58
3.6	Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS	59
3.7	Korrelation der Anti-IL1Ra Antikörper mit laborchemischen Parametern bei Patienten mit akutem COVID-19 .....	65
3.8	Korrelation der Anti-IL1Ra Antikörper mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten nach COVID-19 Infektion .....	68
3.9	Anti-IL1Ra Antikörper bei Patienten mit Post-Covid .....	71
3.10	Verlauf der Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen und Anakinra-Therapie .....	71
3.11	Nachweis von Anti-IL-1Ra-Antikörpern im Western Blot .....	79
3.12	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>85</b>
4.1	Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit Autoinflammatorischen Syndromen .....	85
4.2	Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit und nach COVID-19 .....	91
4.3	Limitationen .....	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>102</b>

<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>111</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Autoinflammation und Autoimmunität als Kontinuitätsmodell. ....	14
Abbildung 2: Altersverteilung der 367 Patienten mit autoinflammatorischen Erkrankungen und COVID-19 Infektion, die in der Studie analysiert wurden. ...	34
Abbildung 3: Anti-IL-1Ra Antikörperreaktivitäten bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen. ....	50
Abbildung 4: Reaktivitäten von IgG und IgM Anti-IL-1Ra Antikörpern bei FMF Patienten. ....	53
Abbildung 5: Calprotectin Spiegel bei 95 FMF Patienten in Relation zum Antikörperauftreten. ....	54
Abbildung 6: Serumamyloid A Spiegel bei 93 FMF Patienten in Relation zum Antikörperauftreten. ....	55
Abbildung 7: Reaktivität der Anti-IL-1Ra Antikörper bei 57 ARDS Patienten in Relation zum Exitus Letalis. ....	61
Abbildung 8: Dauer der Beatmung bei 47 invasiv beatmeten ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten. ....	62
Abbildung 9: ECMO-Dauer bei 47 invasiv beatmeten ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten. ....	63
Abbildung 10: Leukozytenwerte bei 57 ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten. ....	64
Abbildung 11: Laktatdehydrogenase bei 57 ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten. ....	65
Abbildung 12: Leukozytenzahl im Blut von 10 akuten COVID-19 Patienten. ....	67
Abbildung 13: Laktatdehydrogenase im Blut von 10 Patienten mit akutem COVID-19. ....	68
Abbildung 14: Reaktivität von Anti-IL-1Ra Antikörpern in 68 Seren von Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen und Anakinra-Therapie. ....	73
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf von Anti-IL-1Ra Antikörpern in 68 Seren von Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen unter Anakinra-Therapie. ....	78
Abbildung 16: Nachweis von Anti-IL-1Ra Antikörpern mittels Western Blot mit Anakinra als Antigen. ....	79

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl Autoinflammatorischer Syndrome nach ihrer Pathophysiologie.....	16
Tabelle 2: Überblick bekannter Inflammasome und assoziierter Erkrankungen. ....	19
Tabelle 3: Übersicht der Interleukin-1 Familie. ....	21
Tabelle 4: Diagnosen, Geschlecht und Alter von 367 Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden .....	32
Tabelle 5: Diagnosen, Geschlecht und Alter von 22 Anakinra-Patienten, die in die Verlaufsuntersuchung eingeschlossen wurden.....	35
Tabelle 6: Geschlechtsverteilung bei 70 gesunden Probanden, die in der Studie analysiert wurden .....	36
Tabelle 7: Alters- und Geschlechtsverteilung bei 35 gesunden Probanden, die in der Studie analysiert wurden .....	36
Tabelle 8: Reaktivität von Anti-IL-1Ra AK der 70 Kontrollseren und Berechnung der Grenzwerte .....	36
Tabelle 9: Vergleichbarkeit der Kontroll-und Patientenkollektive .....	37
Tabelle 10: Liste verwendeter Chemikalien und Reagenzien.....	38
Tabelle 11: Liste verwendeter Basispuffer und deren Zusammensetzung. ....	39
Tabelle 12: Liste weiterer verwendeter Puffer und Lösungen.....	40
Tabelle 13: Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien.....	41
Tabelle 14: Liste verwendeter Gerätschaften. ....	41
Tabelle 15: Liste verwendeter Programme. ....	42
Tabelle 16: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der Western Blot Sheets.....	45
Tabelle 17: Antikörperauftreten der AID und COVID-19 Gruppe verglichen mit Kontrollen.....	50
Tabelle 18: Häufigkeit von Anti-IL-1Ra-Antikörpern bei Patienten mit AID, COVID-19 Infektion und gesunden Probanden. ....	51
Tabelle 19: Häufigkeit von Schüben bei 95 Patienten mit FMF und Korrelation mit dem Nachweis von Anti-IL-1Ra-Antikörpern. ....	52

Tabelle 20: Häufigkeit von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei 97 Patienten mit FMF in Relation zur Medikamenteneinnahme. ....	56
Tabelle 21: Korrelation zwischen Anti-IL-1Ra Antikörpern und Calprotectin- und Serumamyloid-Spiegeln bei Patienten mit CAPS. ....	57
Tabelle 22: Häufigkeit von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei 21 Patienten mit CAPS in Relation zur Medikamenteneinnahme. ....	58
Tabelle 23: Häufigkeit von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei 4 Patienten mit TRAPS in Relation zur Medikamenteneinnahme.....	59
Tabelle 24: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen Parametern und deren Ausprägung bei Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS. ....	60
Tabelle 25: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit laborchemischen Parametern bei Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS. ....	60
Tabelle 26: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit laborchemischen Parametern bei 10 Patienten mit akutem COVID-19. ....	66
Tabelle 27: Auftreten der Anti-IL-1Ra-Antikörper zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach COVID-19 Infektion (entsprechend einem positiven PCR-Test) bei 127 Personen.....	69
Tabelle 28: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen Parametern und deren Ausprägung bei 127 Personen nach ausgeheilter COVID-19 Infektion. ....	70
Tabelle 29: Korrelation zwischen Körpertemperatur und Antikörperauftreten bei Personen nach ausgeheilter COVID-19 Infektion. ....	71
Tabelle 30: Häufigkeit von Anti-IL-1RA Antikörpern bei 22 Patienten und 68 Seren mit verschiedenen Erkrankungen unter Anakinra-Therapie. ....	72
Tabelle 31: Antikörperauftreten in der Anakinra-Gruppe. ....	72
Tabelle 32: Antikörperauftreten zu verschiedenen Therapiezeitpunkten in 62 Seren von Patienten, die mit Anakinra therapiert wurden.....	74
Tabelle 33: Häufigkeit von Krankheitsschüben bei 68 Seren von 22 Patienten mit AID zu verschiedenen Zeitpunkten der Anakinra-Therapie. ....	74
Tabelle 34: Anakinra-Antikörper im Verlauf bei 14 beispielhaften Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen. ....	75

## Abkürzungsverzeichnis

ACE2	<i>Angiotensin-Converting Enzyme II</i>
ADA	<i>Anti-Drug Antibodies</i>
AG	Antigen
AI	Autoimmunerkrankung
AID	Autoinflammatorische Erkrankung
AIM 2	<i>Absent in Melanoma 2</i>
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APECED	<i>Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dystrophy</i>
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck like protein containing a Card</i>
CAPS	Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom
CLP	Calprotectin
CLRs	C-type lectin Rezeptoren
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
COX-2	Cyclooxygenase Typ 2
DAMPs	<i>Damage-Associated-Molecular-Pattern</i>
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCAS	<i>Familial Cold Autoinflammatory Syndrome</i>
FMF	Familiäres Mittelmeerfieber

HIDS	Hyper-IgD Syndrom
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL-1-R1	Interleukin-1 Rezeptor 1
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1 $\beta$	Interleukin -1beta
IPEX	X-Chromosomales Immun-Dysregulation-Polyendokrinopathie-Enteropathie-Syndrom
kDa	Kilodalton
MAS	Makrophagenaktivierungssyndrom
MEFV	<i>Mediterranean fever-Gen</i>
Mg	Milligramm
Min	Minuten
MIS-C	Multisystemisches Entzündungssyndrom bei Kindern
MI	Milliliter
MWS	Muckle-Wells-Syndrom
NLRP	<i>NOD-like-receptor protein</i>
NLRs	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain Leucin Rich Repeats containing receptors</i>
Nm	Nanometer
NO	Stickoxid
NOMID	<i>Neonatal onset multisystem inflammatory disease</i>
OD	Optische Dichte

PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PGE2	Prostaglandin-E2
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
RhoGTPase	<i>Rho Guanine Triphosphatase</i>
RLRs	<i>Retinoic acid-inducible gene 1 like receptors</i>
SAA	Serum Amyloid A
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SD	Standardabweichung
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
TRAPS	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor assoziiertes Syndrom
Vgl.	Vergleich
Z.n.	Zustand nach
µg	Mikrogramm

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in den Begriff Autoinflammation

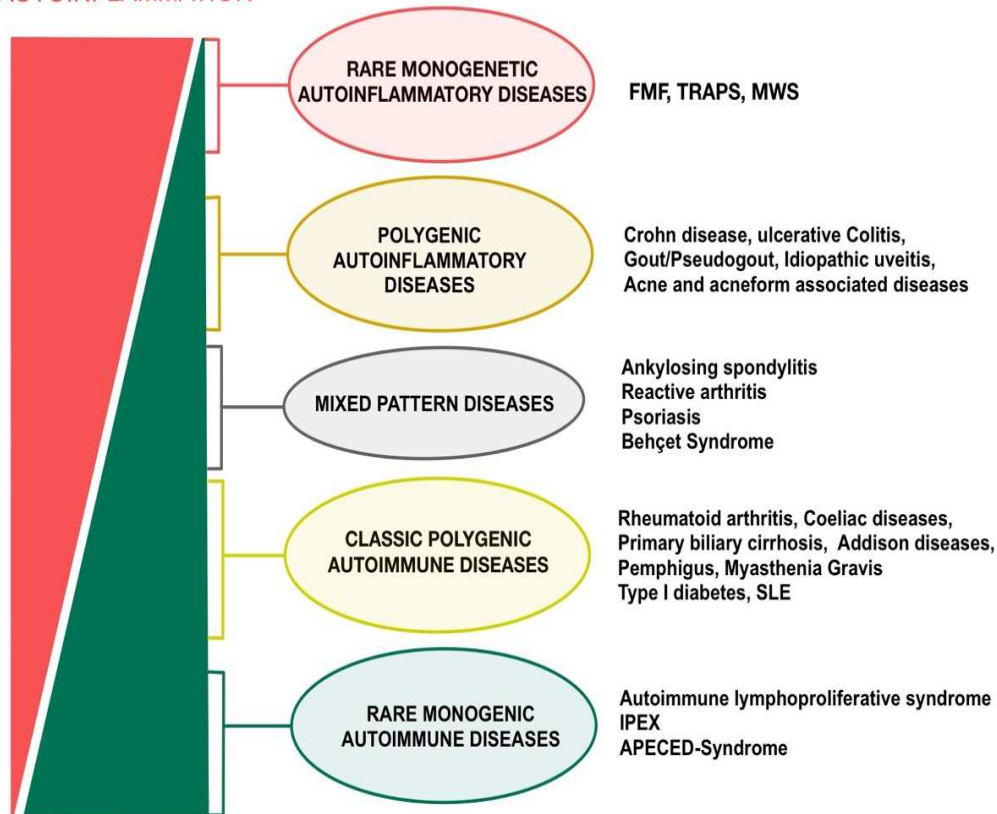
McDermott et al. prägten in den 1990er Jahren als erste den Begriff Autoinflammation, als sie Mutationen im Tumornekrosefaktor Rezeptor (TNFR1) als ursächlich für autosomal dominant vererbte periodische Fiebersyndrome befanden. <sup>[39]</sup> Als entscheidendes Charakteristikum für die Abgrenzung zur Autoimmunität beschrieben sie den fehlenden Einfluss von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Zellen.

Der Begriff Autoinflammatorische Erkrankung (AID) ist mit neuen Methoden, wie der Next-Generation-Sequenzierung, über die Jahre um einige Kenntnisse erweitert worden. <sup>[41]</sup> Moghaddas et al. beschreiben die monogenetischen autoinflammatorischen Syndrome als zunehmend heterogene Erkrankungen, die durch eine Dysregulation des angeborenen Immunsystems charakterisiert sind.

Heutzutage sind unter Autoinflammatorischen Syndromen eine Gruppe meist erblicher Erkrankungen zusammengefasst, die durch wiederkehrende Fieberepisoden sowie entzündlichen Manifestationen kutaner, muköser, seröser und osteo-artikulärer Art gekennzeichnet sind. Das Fehlen von hohen Titern an Autoantikörpern sowie autoreaktiven T-Zellen sind hierbei typisch. Die Entzündung wird hauptsächlich durch Zellen des angeborenen Immunsystems mediiert, und ihr liegt keine infektiöse oder autoimmune Ursache zugrunde. Stattdessen führt eine dysregulierte angeborene Immunantwort zu der Überaktivierung des Inflammasoms und einer exzessiven Zytokin Freisetzung <sup>[15, 40]</sup>.

### 1.1.1 Klassifikation

#### AUTOINFLAMMATION



#### AUTOIMMUNITY

Abbildung 1: Autoinflammation und Autoimmunität als Kontinuitätsmodell.

Angelehnt an McGonagle und McDermott <sup>[40]</sup>. Abkürzungen: FMF=Familiäres Mittelmeerfieber, TRAPS= Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom, MWS= Muckle-Wells-Syndrom, SLE=Systemischer Lupus Erythematoses, IPEX= X-Chromosomales Immun-Dysregulation-Polyendokrinoopathie-Enteropathie-Syndrom, APECED= *Autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dystrophy*.

McGonagle und McDermott definieren die Abgrenzung zwischen Autoinflammation und Autoimmunität als ein kontinuierliches Modell, wie in Abbildung 1 zu erkennen ist.<sup>[40]</sup> Sie stellen die monogenetischen autoinflammatorischen Erkrankungen, bestimmt durch ihre lokale Gewebefaktoren-medierte Entzündungsreaktion, als eine Seite des Kontinuums dar. Monogenetische Autoimmunerkrankungen werden dem, aufgrund primärer Störungen der adaptiven Immunantwort, entgegengesetzt. Betont wird die variable Expression von autoinflammatorischen und autoimmunen Faktoren in

der Krankheitsentstehung sowie die heterogene klinische Präsentation immunologischer Erkrankungen.

Die dichotome Trennung von Autoinflammation und Autoimmunität ist zunehmend in Frage zu stellen, da die Grenzen der Klassifikationen ineinandergreifen. Beispiele hierfür sind das erbliche Aicardi-Goutie'sres Syndrom<sup>[33]</sup> oder die systemische juvenile idiopathische Arthritis (Morbus Still).

Eine akkurate Klassifikation gestaltet sich entsprechend als schwierig und vielseitig. Intensiver Forschung ist es zu verdanken, dass die autoinflammatorischen Syndrome anhand ihrer gemeinsamen pathophysiologischen Mechanismen gruppiert werden können. Eine Übersicht monogener autoinflammatorischer Syndrome nach pathophysiologischen Mechanismen von Kallinich et al.<sup>[33]</sup> ist in Tabelle 1 zu sehen. Deutlich zu erkennen sind die Komplexität und Vielzahl der Erkrankungen.

Die Dysregulation von Interleukin 1 (IL-1) war der erste Pathomechanismus, der bei der Entstehung von Autoinflammatorischen Erkrankungen entdeckt wurde. Zu den IL-1 vermittelten Erkrankungen gehören unter anderem die klassischen periodischen Fiebersyndrome, zu denen auch das Familiäre Mittelmeerfieber (FMF) zählt.

Tabelle 1: Auswahl Autoinflammatorischer Syndrome nach ihrer Pathophysiologie.

Angelehnt an Kallinich et al.<sup>[33]</sup>

<b>Pathophysiologischer Mechanismus</b>	<b>Autoinflammatorische Erkrankung</b>
<b>IL-1 vermittelte Erkrankung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Familiäres Mittelmeerfieber (FMF)</li> <li>- Pyrin-assoziierte Autoinflammation mit neutrophiler Dermatose (PAAND)</li> <li>- Cryopyrin assoziiertes periodisches Syndrom (CAPS)</li> <li>- Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor assoziiertes periodisches Syndrom (TRAPS)</li> <li>- Hyper-IgD-Syndrom (HIDS) / Mevalonatkinase-Defizienz (MVK)</li> <li>- Defizienz des IL-1-Rezeptorantagonisten (DIRA)</li> </ul>
<b>Interferonopathien</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- STING-assoziierte Vaskulopathie mit Beginn in Kindesalter (SAVI)</li> <li>- Aicardi-Goutières-Syndrom (AGS 1–7)</li> </ul>
<b>NF-κB-vermittelte Erkrankungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blau-Syndrom</li> <li>- CARD15-vermittelte Psoriasis (CAMP5)</li> <li>- AP1S3-vermittelte Psoriasis (AMPS)</li> <li>- Defizienz des IL-36-Rezeptorantagonisten (DITRA)</li> <li>- Linear ubiquitin chain assembly complex (LUBAC)-Defizienz/HOIL-1 Defizienz/HOIP-Defizienz</li> </ul>
<b>Durch Makrophagenaktivierung verursachte AID</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NLRC4-Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS)</li> <li>- X-linked Inhibitor der Apoptose (XIAP)</li> <li>- Familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH)</li> </ul>
<b>Weitere autoinflammatorische Erkrankungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pyogene Arthritis,</li> <li>- Pyoderma gangraenosa Akne (PAPA),</li> <li>- Defizienz der Adenosindeaminase 2 (DADA2),</li> </ul>

## 1.2 Immunologische Grundlagen

Das Immunsystem wird grundsätzlich unterteilt in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem. Das erworbene Immunsystem nutzt ein komplexes System antigenspezifischer Zellen, um Erreger gezielt zu bekämpfen, und es kann zudem ein immunologisches Gedächtnis oder eine Immuntoleranz bilden [3, 15]

Das angeborene Immunsystem bietet als erste Verteidigungslinie Schutz vor Pathogenen und bedient sich physikalischer, chemischer, biologischer und zellulärer Mechanismen. Die Zellen der angeborenen Immunität sind nicht auf die Erkennung spezifischer Antigene angewiesen.

Schlüsselfunktion des angeborenen Immunsystems ist es, pathogene Erreger schnell zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen. Dies wird erreicht, indem spezielle Strukturen der Krankheitserreger, sogenannte *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), oder endogene Gefahrensignale, *Damage-Associated-Molecular-Pattern* (DAMPs), erkannt werden. Hierfür exprimieren die Zellen des unspezifischen Systems, hauptsächlich bestehend aus Makrophagen, Dendritischen Zellen und Neutrophilen Granulozyten, Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). [50]

### 1.2.1 Die Inflammasome

Binden PRRs an PAMPs, aktivieren diese intrazelluläre Inflammasome und setzen eine proinflammatorische Kaskade in Gang. [44] Inflammasome sind zytosolische Multiproteinkomplexe, die die Aktivierung der Caspase-1 bewirken. Diese wiederum prozessiert Vorstufen der potenten proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ) und IL-18, welche daraufhin aktiviert und sezerniert werden. [62] Außerdem führt die aktivierte Caspase-1 zur Pyroptose, einem entzündungs-mediertem Zelltod, welcher durch Schwellung und Lyse gekennzeichnet ist. [5] Nach der Aktivierung der Caspase-1 folgt die Spaltung von

Gadermin D, welches eine Translokation der Poren-formenden Domäne an die Zellmembran und der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine bedingt.<sup>[50]</sup>

Bisher wurden fünf Rezeptorproteine entdeckt, die Inflammasome bilden können (Tabelle 2). Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind das NLRP3 (Nod-like receptor protein 3) und das Pyrin Inflammasom.

Das NLRP3 (Cryopyrin) Inflammasom gehört zur NLR-Familie, einer Gruppe von zytosolischen PRRs, zu der auch die Inflammasome NLRP1 und NLRC4 zählen.<sup>[44]</sup> Es wird durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert und ist das einzige Inflammasom, das auch auf nicht-mikrobielle Stimuli reagiert.<sup>[25]</sup>

Die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms benötigt zwei verschiedene Schritte, zum einen ein *Priming Signal* der Makrophagen und dendritischen Zellen (durch Aktivierung von NFκB) und zum zweiten ein tatsächliches Aktivierungssignal. Erst durch das zweite Signal wird die Oligomerisierung des Inflammasoms ermöglicht, und über die Pyrin Domäne kann das Adapterprotein ASC (*apoptosis-associated speck like protein containing a Card*) mit der Caspase-1 interagieren.<sup>[14]</sup> Diese wiederum führt in ihrer aktivierten Form zur Freisetzung von IL-1β und einer Pyroptose.<sup>[57]</sup>

*Gain of Function* Mutationen im NLRP3 verursachen das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom (CAPS), eine dominant vererbte autoinflammatorische Erkrankung.

Tabelle 2: Überblick bekannter Inflammasome und assoziierter Erkrankungen.

Angelehnt an Schnappauf et al. [50]

<b>Inflammasom</b>	<b>Stimulation</b>	<b>Downstream Signal</b>	<b>Assoziierte monogenetische Erkrankungen</b>
<b>NLRP1</b>	Bakterientoxine, Intrazellulärer ATP-Mangel	Spaltung FIND-Domäne	Morbus Crohn, NLRP1-assoziierte Autoinflammation mit Arthritis und Dyskeratose
<b>NLRP3</b>	Toxine, Kristalline Partikel (Silica, Asbest, Amyloid- $\beta$ )	K <sup>+</sup> Efflux, Intrazelluläres Ca <sup>++</sup>	Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome, Neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID/CINCA)
<b>NLRC4</b>	Zytosolisches Flagellin (Salmonellen, E-Coli)	Phosphorylierung	Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS)
<b>Pyrin</b>	Inaktivierung der RhoA-GTPase	PKN $\frac{1}{2}$ Inaktivierung, verminderte Pyrin 14-3-3 Interaktion	Familiäres Mittelmeerfieber (FMF), Pyrin-assoziierte Autoinflammation mit neutrophiler Dermatose (PAAND), Hyperimmunglobulin-D-Syndrom (HIDS)
<b>AIM2</b>	Zytosolische DNA von Viren und Bakterien (Papillomaviren, Mykobakterien)	Direkte Erkennung der DNA, Pryoptose	

Das Pyrin Inflammasom gleicht einem angeborenen Immunsensor und detektiert eine (Bakterientoxin- vermittelte) Inaktivierung der Rho Guanosin Triphosphatase (Rho-GTPase). Die Rolle von Pyrin in der Regulierung und Freisetzung von IL-1 wurde erstmals 2003 von Chae et al. nachgewiesen. [9]

Die Rho-GTPasen fungieren als molekulare Schalter, um verschiedenste Signalkaskaden zu regulieren, unter anderem die Organisation des Zytoskeletts. Pathogene können die Rho-GTPase Aktivität so modulieren, dass die Phagozytose unterdrückt wird. Pyrin wird durch das MEFV-Gen auf Chromosom 16 codiert und wird hauptsächlich auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert, einschließlich Granulozyten, Eosinophilen, Monozyten und dendritischen Zellen. [50]

Üblicherweise aktiviert die Rho-GTPase die Serin-Threonin Kinasen PKN1 und PKN2, welche daraufhin Pyrin phosphorylieren. Das phosphorylierte Pyrin bindet an die regulatorischen Proteine 14-3-3, welche wiederum das Pyrin Inflammasom inhibieren. Wird das Inflammasom als Antwort auf eine Rho-GTPase Modifizierung oder Mutations-bedingte Dysregulierung aktiviert, führt das zu einer Überaktivierung von Pyrin und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine.[45] Die chronische Fehlaktivierung des Pyrin Inflammasoms ist essentieller Bestandteil der Pathogenese des FMF und weiteren AID.

### **1.2.2 Die Interleukin-1 Familie**

Die IL-1 Familie konstituiert eine ubiquitäre Gruppe pro-inflammatorischer Zytokine und fungiert als zentraler Mediator von Entzündung. Mit Ausnahme des IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) werden alle in einer inaktiven Form sekretiert. Diese Vorstufen kommen diffus im Zytoplasma vor.

Die zugehörigen zehn Rezeptoren und elf Zytokine können nach ihren Funktionen in drei Subgruppen unterschieden werden (Tabelle 3). [8]

Tabelle 3: Übersicht der Interleukin-1 Familie.

Einteilung nach Cavalli et al.<sup>[8]</sup>

<b>Sekretorische Zytokine mit Agonistenfunktion</b>	<b>IL-1<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math></b> IL-18 IL-33 IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$
<b>Rezeptor Antagonisten</b>	<b>IL-1Ra</b> IL-36Ra
<b>Anti-inflammatorische Zytokine</b>	IL-37 IL-38

Innerhalb dieser Familie sind die seit 1974 bekannten IL-1- $\alpha$  und IL-1- $\beta$  die Archetypen der pro-inflammatorischen Zytokine und für diese Arbeit hervorzuheben.

Ogleich sie sich im Hinblick auf isoelektrische Punkte, Molekulargewicht und genetischen Ursprung unterscheiden, binden IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch eine homologe Sequenz von weniger als 26% denselben IL-1 Rezeptor 1 (IL-1-R1).<sup>[8]</sup>

Folglich führen sie zu identischen pro-inflammatorischen Effekten, wie der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Rahmen autoinflammatorischer und Immunreaktionen. Beispiele hierfür sind die Stimulation der Synthese von Cyclooxygenase Typ 2 (COX-2), Phospholipase A, Prostaglandin-E2 (PGE2), *Platelet Activating Factor* und *Nitric oxide* (NO). Als Folge hiervon kommt es zu systemischen Reaktionen wie Fieber, erhöhtem Schmerzempfinden, Vasodilatation und Hypotonie.<sup>[18]</sup>

IL-1 $\alpha$  und  $\beta$  wirken synergistisch zu anderen Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$  oder Bradykinin. Die Aktivierung dieser löslichen und zellulären Mediatoren tragen neben systemischen Effekten auch zu lokal-entzündlichen Organdysfunktionen bei.<sup>[8]</sup> IL-1 $\alpha$  wird als bioaktiver Vorläufer bei Gewebsschaden freigesetzt und spielt eine zentrale Rolle bei Erkrankungen, die durch Gewebs- und Organentzündung, epitheliale Barrierschädigung, endothelialen Schaden oder thromboembolische Aktivierung gekennzeichnet

sind.<sup>[8]</sup> Diese Art von Gewebsschädigung ist auch bei der *Coronavirus Disease 19* (COVID-19) vorzufinden.

Neben der primären entzündungsfördernden Wirkung fungieren IL-1- $\alpha$  und IL-1- $\beta$  auch als Kostimulatoren der T-Zellfunktion.<sup>[18]</sup>

Um eine überschießende Immunreaktion zu unterbinden, verfügt das unspezifische Immunsystem über Feedback-Regulationssysteme. Innerhalb der IL-1 Familie blockiert der IL-1-Rezeptor Antagonist als Hauptakteur kompetitiv IL-1- $\alpha$  und  $\beta$ , indem er den IL-1R1 bindet. Klinische Relevanz wird unter anderem durch nicht-spezifische Inhibition mittels IL-1-Rezeptor-Antagonisten erzielt.

### 1.3 Das Familiäre Mittelmeerfieber

Das familiäre Mittelmeerfieber ist eine meist genetisch bedingte, autoinflammatorische Erkrankung, die durch rezidivierende Fieberepisoden und variable klinische Zeichen von Peritonitis, Pleuritis und Arthritis gekennzeichnet ist.<sup>[32]</sup> Sie zählt als Prototyp autoinflammatorischer Erkrankungen zu den periodischen Fiebersyndromen und ist weltweit die häufigste AID.

Die Prävalenz beträgt 1:10.000, kann jedoch im Mittelmeerraum bei bis zu 1:200 liegen.<sup>[19]</sup> Die Erstmanifestation erfolgt in der Regel im Kindes – und Jugendalter, rund zwei Drittel der Erkrankungen werden zwischen dem zweiten und 17. Lebensjahr erstmalig diagnostiziert.<sup>[52]</sup>

Mutationen im *Mediterranean Fever-Gen* (MEFV) sind mit der Erkrankung assoziiert und begünstigen eine Überaktivierung von Pyrin. Über 300 MEFV-Mutationen sind bis heute identifiziert.<sup>[63]</sup> Obwohl lange Zeit von einem klassischen Erbgang ausgegangen wurde, weisen neuere Erkenntnisse auf eine Gendosis-Wirkungs-Beziehung hin.<sup>[31]</sup> Das hyperaktive Pyrin-Inflammasom führt zu einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und bedingt eine akute granulozytäre Entzündung.

Die selbstlimitierten Fieberschübe dauern bis zu 72 Stunden an und gehen häufig mit einer Polyserositis und erhöhten Entzündungsparametern einher.<sup>[19, 28].</sup>

Unkontrolliert kann es durch die chronische Entzündungskonstellation zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie der Serum-Amyloid-A-Amyloidose und subsequentem Nierenversagen kommen.

Wenig ist bekannt über die Trigger eines Schubes. Verschiedene Faktoren wurden assoziiert, einschließlich Infektionen, Trauma, physischer und psychischer Stress, Menstruation und Kälteexposition. [50]

1976 veröffentlichten Sohar et al. die Tel-Hashomer Kriterien, die Amyloidose unklarer Genese, ein positives Ansprechen auf Colchicin-Therapie und rekurrentes Fieber mit peritonealer Reizung, Pleuritis oder Arthritis als Hauptkriterien definieren. [52] Ergänzt werden diese durch die Diagnose von FMF eines Angehörigen ersten Grades, rekurrente Fieberschübe unklarer Genese und ein Pseudoerysipel. Das entspricht dem heute gängigen Konsens einer primär klinischen Diagnosestellung. Genetische Befunde können hilfreich sein, müssen aber im Kontext aktueller Erkenntnisse vorsichtig interpretiert werden.

Primäre Therapieziele sind die Prophylaxe der Attacken und die Verminderung der chronischen subklinischen Entzündungsaktivität, insbesondere des Akut-Phase-Proteins Serum Amyloid A (SAA), da diese mit Organschäden assoziiert ist. [43] Die Standardtherapie besteht aus der prophylaktischen Gabe von Colchicin. Die Therapie wurde als sicher und, bis auf häufige gastrointestinale Nebenwirkungen, als gut verträglich eingestuft. [32, 43, 61] Als Zweitlinientherapie bei unzureichendem Ansprechen ist eine IL-1-Blockade empfohlen. [43] Diese kann durch sogenannte Biologika wie Canakinumab (humaner IL1-beta monoklonaler AK) und Anakinra (IL-1Ra Analogon) erzielt werden.

#### **1.4 Das Cryopyrin-assoziierte Periodische Syndrom**

Das CAPS umfasst eine Gruppe autoinflammatorischer Erkrankungen, die mit autosomal-dominanten Mutationen im NLRP3 – Gen assoziiert sind. Es schließt drei Syndrome unterschiedlicher Manifestationsgrade ein, dazu gehören die

familiäre Kälteurtikaria „*Familial Cold Autoinflammatory Syndrome*“ (FCAS), das Muckle-Wells-Syndrom (MWS) sowie das „*Neonatale Onset Multisystem Inflammatory Disease*“ (NOMID) oder „*Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular syndrome*“ (CINCA).

Die Prävalenz wird auf 1:1.000.000 geschätzt, wobei sich die Erstmanifestation fast ausschließlich auf das Kindesalter beschränkt. <sup>[19]</sup>

Ätiologisch bekannt sind *Gain of function* Mutationen im CIAS1-Gen, welches das Cryopyrin/NLRP3 Protein kodiert, die zu einer Überaktivierung des NLRP3 Inflammasoms und gesteigerten IL-1-mediierten Entzündungsantwort führen. Je nach Mutation führt CAPS zu variablen klinischen Schweregraden. Das FCAS hat die mildeste Krankheitsausprägung und ist durch wiederkehrende, selbstlimitierte Fieberepisoden, Urtikaria, Konjunktivitis und Arthralgien nach Kälteexposition charakterisiert. <sup>[34]</sup>

Das MWS entspricht einer intermediären Form und ergänzt die bereits erwähnte Symptomatik um sensorineuralen Hörverlust und Arthritis. Zusätzlich ist das Vorkommen einer sekundären SAA-Amyloidose mit Nierenschädigung möglich. <sup>[33]</sup> Die Trigger sind hierbei unspezifisch.

Der schwersten phänotypischen Ausprägung des CAPS entspricht das NOMID/CINCA. Kallinich et al. fassen die Klinik mit einer Trias aus neonatal auftretenden Exanthenen, zentralnervöser Manifestation und krankhafter Knochenbildung zusammen. Manifestationen im späteren Lebensalter wurden aufgrund von genetischen Mosaiken beschrieben. <sup>[49]</sup>

Die Diagnose wird primär klinisch gestellt, Mutationsanalysen können wegweisend sein. Aufgrund von überlappenden Symptomen und variabler phänotypischer Ausprägung gestaltet sich eine exakte Abgrenzung zwischen den einzelnen Syndromen als schwierig.

Die IL-1 Hemmung mittels IL-1-Ra (Anakinra) oder monoklonalen IL-1 Antikörpern (Canakinumab) ist die Therapie der Wahl. <sup>[65]</sup>

## 1.5 Das Adulte Still-Syndrom

1897 beschrieb Georg Still <sup>[56]</sup> als erster eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung bei 22 Kindern, welche er von der bereits bekannten rheumatoiden Arthritis abgrenzte. Eine ähnliche Symptomatik wurde in erwachsenen Patienten rund 100 Jahre später von Bywaters <sup>[6]</sup> als adulte Form des Morbus Still erkannt.

Das adulte Still-Syndrom ist eine seltene Erkrankung, die sich häufig im jungen Erwachsenenalter manifestiert.<sup>[42]</sup> Eine Studie aus Frankreich schätzte die Inzidenz auf 0,16 pro 100.000 Einwohner. <sup>[37]</sup>

Charakterisiert wird die Erkrankung durch intermittierende Fieberschübe, Arthralgien, Hautausschlag und eine Leukozytose. Die Yamaguchi Kriterien<sup>[69]</sup> erlauben mit den genannten Hauptkriterien die Diagnose des adulten Still-Syndroms mit einer hohen Spezifität und Sensitivität. Des Weiteren bilden Halsschmerz, Lymphadenopathie, Splenomegalie, Leberdysfunktion und das Fehlen von Rheumafaktor und Antinukleärer Antikörper (ANA) als Nebenkriterien ergänzende Hinweise in der Diagnosestellung des adulten Still-Syndroms.

Obwohl die genaue Ätiologie sowie Pathogenese des adulten Still-Syndroms unbekannt bleiben, wird eine überschießende Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms als Reaktion auf PAMPs und DAMPs mit folgender Überproduktion von IL-1 $\beta$  als Pathogenese vermutet.<sup>[11, 22]</sup> Diese Theorie wird durch die therapeutische Wirksamkeit einer IL-1 Blockade gestützt.<sup>[13]</sup> Die Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Rheumatologie empfiehlt für die Therapie des adulten Morbus Still unter anderem den Einsatz von IL-1 inhibierenden Biologika wie Anakinra und Canakinumab. <sup>[54]</sup>

## 1.6 Coronavirus Disease 2019

Neben Autoinflammatorischen Syndromen kann es im Rahmen von Entzündungen, beispielsweise bei COVID-19 Infektionen, zu einer hyperinflammatorischen Immunantwort kommen.

*Coronavirus Disease 2019*, ausgelöst durch das neuartige *Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Sars-CoV-2), wurde im März 2020 von der WHO als pandemisch deklariert und forderte weltweit bis zum 18. Februar 2024 insgesamt 7.033.430 Todesopfer. [66]

Die Transmission erfolgt über Tröpfchen und Aerosole, der Eintritt in die Wirtszelle wird über die Interaktion des viralen S-Glykoproteins mit *Angiotensin-Converting Enzyme II* (ACE2) ermöglicht, welches als Rezeptor fungiert. ACE2 wird überwiegend in Typ II Pneumozyten (Alveolarepithelzellen) exprimiert, ist jedoch auch in Zellen anderer Gewebe und Organe (wie Herz, Niere, Darm, Endothel) vorzufinden. [4] Daher sind insbesondere die Atemwege primärer Manifestationsort der Erkrankung.

Nach Eintritt in die Zelle wird die Sars-CoV-2 RNA von PRRs und TLR3 erkannt, was konsekutiv zu einer Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms führt. [58]

Die meisten Infektionen verlaufen asymptomatisch bis mild, mit Symptomen wie Husten und Fieber. Ein Viertel der Infektionen ist jedoch mit einem schweren Verlauf assoziiert. [26] COVID-19 kann in diesen Fällen zu Pneumonien sowie einem *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) mit Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und einer schwerwiegenden systemischen Entzündungsreaktion führen. Lebensbedrohliche Verläufe einer COVID-19 Infektion sind typischerweise durch eine überschießende Immunantwort gegen das Virus, einen Zytokinsturm sowie massive Freisetzung proinflammatorischer Zytokine charakterisiert. [46]

Die Produktion von Zytokinen spielt hierbei eine essentielle Rolle in der Entwicklung einer COVID-19 bedingten Hyperinflammation. Die Dysregulierung der Zytokinfreisetzung wurde als Schlüsselement einer schweren Erkrankung und schlechteren Prognose identifiziert [16, 58]

Dieser sogenannte Zytokinsturm (oder *Cytokine Release Syndrome*) ist ein lebensbedrohlicher Zustand, welcher definitionsgemäß mit einer exzessiven Produktion von Zyto- und Chemokinen durch eine derangierte, hyperinflammatorische Immunantwort einhergeht. [58] Zu Formen des

Zytokinsturms gehören die (Primäre und Sekundäre) Hämophagozytische Lymphohistiozytose und das Makrophagenaktivierungssyndrom (MAS).

Im Serum betroffener Patienten wurde eine Erhöhung verschiedener proinflammatorischen Zytokinen beschrieben, unter anderem IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF. Dieser Studie von Huang et al. entsprechend waren im Plasma IL-1- $\beta$  und IL-1Ra sowohl bei COVID-19 Nichtintensiv- als auch bei Intensivpatienten erhöht. [29] Thurner et al. beschreiben das Vorkommen von Antikörpern gegen IL-1Ra in jungen männlichen Myokarditis-Patienten nach stattgefundener SARS-CoV2-mRNA-Impfung. [60]

Eine Serokonversion findet bei über 90% der COVID-19 Patienten wenige Wochen nach Infektion statt. [58]

Langanhaltende Symptome sind nach einer akuten Erkrankung möglich. Unter Long-Covid oder Post-Covid sind persistierende COVID-19-assoziierte Symptome zwei Wochen nach Infektion zusammengefasst. [36]

Therapiestrategien beinhalten einerseits eine antivirale Therapie, die direkt auf den Replikationszyklus des Virus abzielt, und andererseits eine antiinflammatorische Therapie, um eine überschießende Immunantwort zu supprimieren.

Schon früh während der Pandemie kam der IL-1-Inhibitor Anakinra als sichere und mortalitätssenkende Therapie bei hospitalisierten Patienten mit mittelschwerer bis schwerer COVID-19 Pneumonie zum Einsatz, insbesondere bei gleichzeitiger Hyperinflammation. [7, 35] Als Mono- und auch Kombitherapie wurde der IL1-Ra Anakinra als wirksam in der Behandlung von COVID-19 und einem einhergehenden Zytokinsturm beschrieben. [21, 46]

AID, wie das FMF, wurden in ihrer Form als mildere Ausprägung eines Zytokinsturms beschrieben. [55]

Die zunehmenden Erkenntnisse zur Pathogenese autoinflammatorischer Erkrankungen haben sich als hilfreich im Verständnis der COVID-19 Pandemie erwiesen. Die experimentelle und klinische Evidenz von AID tragen durch

Kenntnisse über Hyperinflammation und Zytokinkaskaden zu der Entwicklung von Therapie- und Präventionsoptionen bei.

## **1.7 Der IL-1 Rezeptorantagonist**

1984 beschrieb Jean-Michel Dayer als erstes das Vorhandensein eines IL-1-Inhibitors. <sup>[17]</sup> Dieser Inhibitor unterdrückte die biologische Aktivität von IL-1a und IL-1-beta.

Im Verlauf konnte dieser Inhibitor als ein natürlich vorkommender, spezifischer IL-1-Rezeptorantagonist identifiziert werden.

Der IL-1Ra wird auf dem langen Arm von Chromosom 2 codiert und bindet den IL-1 Rezeptor mit ähnlicher Affinität wie IL-1 und IL-1-beta, jedoch ohne eine proinflammatorische Kaskade zu aktivieren. <sup>[17]</sup> Der IL-1Ra kann von Hepatozyten als Reaktion auf IL-6 bei systemischer Beteiligung sowie von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und Mikrogliazellen produziert werden. <sup>[27, 38, 48]</sup> Genetische Polymorphismen des IL-1-Ra wurden mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, einschließlich Psoriasis, Systemischer Lupus Erythematodes, Colitis Ulcerosa und der diabetischen Nephropathie. <sup>[68]</sup> Eine Defizienz des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (DIRA) wurde in Einzelfällen beschrieben und ist durch ein Genmutation-bedingtes Fehlen des natürlichen IL-1Ra und subsequenter Dauerstimulation des IL-1 Rezeptors charakterisiert. <sup>[33]</sup>

Die Relevanz des IL-1Ra in der Regulierung systemischer Entzündungsreaktionen spiegelt sich in der therapeutischen Verwendung als biologischer Interleukin-Inhibitor wider.

## **1.8 Antikörper gegen IL-1Ra**

### **1.8.1 Antikörper gegen IL-1Ra unter Anakinra-Therapie**

Anakinra (Kineret®) wurde als erstes Biologikum spezifisch als IL-1 Rezeptor-Antagonist entwickelt und gleicht maßgeblich dem physiologischen IL-1Ra. Anakinra besteht aus 153 Aminosäuren und weicht vom nativen menschlichen IL-1Ra nur um einen einzelnen Methionin-Rest am Amino-Terminus ab.<sup>[64]</sup> In der Europäischen Union ist es für die Therapie der rheumatoiden Arthritis, COVID-19, CAPS, FMF und des Still-Syndroms zugelassen.<sup>[20]</sup> Die Standarddosis bei Erwachsenen beträgt 100mg pro Tag und wird subkutan injiziert.

Anakinra ist als effektiv, sicher und gut verträglich eingestuft.<sup>[1, 2, 23, 53]</sup> Als häufigste Nebenwirkung treten kutane Reaktionen an der Applikationsstelle auf.<sup>[2]</sup>

Trotz guter Verträglichkeit und Entzündungskontrolle unter Anakinra-Therapie ist das Vorkommen von *Anti-Drug-Antibodies* (ADA) beschrieben.<sup>[24, 30, 67]</sup> Fleischmann et al. wiesen Antikörper gegen Anakinra in rund der Hälfte der untersuchten Patienten unter Anakinra-Therapie nach, in 2% konnte die Neutralisierungsfähigkeit der Anakinra-Antikörper bestätigt werden. Jedoch konnte nur bei 50% der Patienten mit neutralisierenden Anakinra-AK eine Krankheitsprogression beobachtet werden.<sup>[24]</sup> In einer anderen Studie erwiesen sich alle Patienten mit neutralisierenden Antikörpern als Non-Responder.<sup>[30]</sup> Andere Arbeiten beobachteten keinerlei Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ADA und der Wirksamkeit von Anakinra.<sup>[67]</sup> In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse bleibt die Bedeutung der Anakinra-Antikörper bisher unklar.

### **1.8.2 Antikörper gegen IL-1Ra bei Anakinra-naiven Patienten**

Vereinzelt wurden Anakinra-bindende Antikörper auch bei Anakinra-naiven, gesunden Personen vorgefunden.<sup>[30, 67]</sup>

Bei einem Patienten mit Rheumatoider Arthritis ohne vorangegangene Anakinra Therapie wurden neutralisierende Antikörper nachgewiesen.<sup>[30]</sup> Ein Großteil der

Patienten mit kritischem COVID-19 Verlauf in der Studie von Thurner et al. zeigten ebenso neutralisierende Anti-IL-1Ra Antikörper, ohne Anakinra erhalten zu haben. [59] Die Plasmalevel von zirkulierendem IL-1Ra zeigten sich bei COVID-19 Patienten mit IL-1Ra AK signifikant erniedrigt. Unklar bleibt, ob diese Anti-IL-1Ra Antikörper durch COVID-19 induziert werden, oder präexistieren und für einen schweren Verlauf prädisponieren.

## **1.9 Fragestellung**

Ziel dieser Arbeit ist es, explorativ das Vorkommen dieser Anti-IL-1Ra AK bzw. Anakinra AK bzw. ADA in Patientenseren verschiedenster autoinflammatorischer Erkrankungen sowie COVID-19 Patientenseren zu untersuchen. Zudem soll beleuchtet werden, ob das Vorkommen von Anti-IL-1Ra AK (oder Anakinra-bindender AK) mit einer stärkeren Krankheitsaktivität einhergeht, indem eine mögliche Korrelation zwischen Antikörperauftreten, klinischen Parametern und dem Krankheitsverlauf untersucht wird.

Darüber hinaus soll die Hypothese geprüft werden, ob bei Patienten mit dysregulierten Entzündungsprozessen bereits präexistente Autoantikörper gegen den physiologischen IL-1Ra bestehen und inwieweit diese potenziellen Antikörper Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen. Es wird zudem untersucht, ob Antikörper gegen den physiologischen IL-1Ra bei autoinflammatorischen Syndromen und COVID-19 Patienten vorkommen, welche den Entzündungsprozess und die Krankheitsentstehung unabhängig von einer vorangegangenen Anakinra-Therapie beeinflussen.

Zuletzt soll mit dieser Arbeit das Auftreten von IL-1Ra Antikörpern bzw. Anti-Drug-Antikörpern bei Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen, welche mit Anakinra therapiert wurden, im zeitlich-dynamischen Verlauf untersucht und dargestellt werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientengewinnung**

#### **2.1.1 Autoinflammations-Kohorte**

Für die Stichprobe der autoinflammatorischen- und Anakinra-Verlaufs-Kohorte wurden Seren von Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen aus der Rheumaambulanz der Medizinischen Klinik II in Tübingen auf das Vorhandensein von Anakinra-bindenden Antikörpern untersucht.

Für die Gewinnung einer Stichprobe der autoinflammatorischen Syndrome wurden die ambulanten Patienten zwischen den Jahren 2017 und 2022 mit entsprechender Diagnose und vorhandenem Blutserum in der Datenbank des Immunpathologischen Labors der Medizinischen Klinik II herausgesucht. In wenigen Fällen war die genaue autoinflammatorische Erkrankung nicht exakt bekannt, diese wurden daher als Verdachtsfälle zusammengefasst.

Die Stichprobe der Patienten unter Anakinra-Therapie zur Untersuchung des Antikörperverlaufs wurde digital aus der Datenbank ARDIS der rheumatologischen Ambulanz herausgefiltert.

#### **2.1.2 COVID-19 Kohorte**

Das Kollektiv der COVID-19 Seren entstammt dem Immunpathologischen Labor der Medizinischen Klinik.

Dieses gliedert sich in Patienten mit einem ARDS, welche im Zeitraum von 2020 bis 2021 in der medizinischen Klinik Tübingen intensivmedizinisch betreut wurden. Die COVID-akut Gruppe besteht aus akut erkrankten COVID-19 Patienten ohne ARDS, welche von 2020 bis 2021 normalstationär behandelt wurden.

Des Weiteren enthält die Kohorte eine Gruppe von vollständig genesenen Personen zu unterschiedlichen Wochenzeitpunkten nach COVID-19 Infektion. Ebenso untersucht wurde eine Gruppe aus Patienten mit Post-Covid-Syndrom,

definitionsgemäß mit persistierenden COVID-19 assoziierten Symptomen, welche länger als zwei Wochen nach Infektion andauern.

## 2.2 Patientenkollektiv der Autoinflammatorischen Syndrome und COVID-19

Das Kollektiv bestand aus einer Gruppe von Patienten mit Autoinflammatorischen Syndromen (n=146) und einer Gruppe von COVID-19 Patienten (n=221).

Es wurden daher insgesamt 367 Patienten auf Antikörper gegen den IL-1Ra untersucht. Die verschiedenen Diagnosen sowie Alter und Geschlecht der Patienten sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Diagnosen, Geschlecht und Alter von 367 Patienten, die in die Studie aufgenommen wurden.

Diagnose	Anzahl Patienten	Geschlecht Anzahl (%)		Alter (Jahre) Median
		Weiblich	Männlich	
<b>Autoinflammatorische Erkrankungen (n=146)</b>				
<b>FMF</b>	97	52 (54)	45 (46)	32
<b>CAPS</b>	21	9 (43)	12 (57)	47
<b>TRAPS</b>	4	4 (100)	0 (0)	46
<b>Verdacht auf AID</b>	24	18 (75)	6 (25)	34
<b>COVID-19 Infektion (n=221)</b>				
<b>ARDS</b>	57*	14 (24)	42 (74)	61
<b>COVID Akut</b>	11	6 (55)	5 (45)	65
<b>Z.n. COVID</b>	127	59 (47)	68 (53)	44
<b>Post-COVID</b>	26	20 (77)	6 (23)	53

\*bei einer Person blieb das Geschlecht unbekannt.

Das Durchschnittsalter der untersuchten AID und COVID-19 Patienten betrug 43 Jahre (Median 44, SD 17 Jahre) bei einer Altersspanne von 3 bis 92 Jahren. Die Geschlechter waren ausgeglichen vertreten mit 50% (182) weiblichen Patientinnen und 50% (184) männlichen Patienten (Tabelle 4). Dabei blieb das Geschlecht für einen ARDS-Fall unbekannt. Eine Übersicht der Altersverteilung in den verschiedenen Diagnosegruppen findet sich in der Abbildung 2.

Die FMF-Gruppe bestand aus 97 Patienten. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 54% (52) Frauen und 46% (45) Männer. Das Durchschnittsalter betrug 31 Jahre (Median 32, SD 13 Jahre) bei einer Altersspanne von 3-63 Jahren.

Die CAPS-Gruppe bestand aus 21 Patienten. Sie umfasste 20 MWS-Patienten und 1 FCAS-Patientin. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 43% (9) Frauen und 57% (12) Männer. Das Durchschnittsalter betrug 44 Jahre (Median 47, SD 19 Jahre) bei einer Altersspanne von 18 bis 81 Jahren.

Die TRAPS-Gruppe bestand aus 4 weiblichen Patientinnen, bei einem Durchschnittsalter von 46 Jahren (Median 46, SD 11 Jahre) bei einer Altersspanne von 33-59 Jahren.

Die ARDS-Gruppe bestand aus 57 Patienten. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 24% (14) weibliche und 74% (42) männlichen Patienten. In einem Fall war das Geschlecht unbekannt. Das Durchschnittsalter lag bei 60 Jahren (Median 61, SD 14 Jahre) bei einer Altersspanne von 28-92 Jahren.

Die Gruppe mit akutem COVID-19 bestand aus 11 Patienten, die aufgrund einer akuten COVID-19 Erkrankung hospitalisiert, jedoch nicht intensivmedizinisch betreut werden mussten. Die Geschlechter verteilten sich auf 55% (6) weibliche und 45% (5) männliche Patienten. Das Alter der 11 Patienten betrug im Schnitt 60 Jahre (Median 65, SD 18 Jahre) bei einer Altersspanne von 11-81 Jahren.

Die Gruppe Zustand nach COVID-19 bestand aus 127 Personen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (in Wochen) nach durchgestandener COVID-19 Infektion. Die Geschlechter verteilten sich auf 47% (59) weiblichen und 53% (68) männlichen Patienten. Das Durchschnittsalter lag bei 42 Jahren (Median 44, SD 12 Jahre) bei einer Altersspanne von 20-70 Jahren.

Die Post-Covid Gruppe bestand aus 26 Patienten mit Post-Covid Syndrom. Hiervon waren 77% (20) weiblich und 23% (6) männlich. Das Alter belief sich im Durchschnitt auf 53 Jahre (Median 53, SD 8 Jahre) bei einer Altersspanne von 33-64 Jahren.

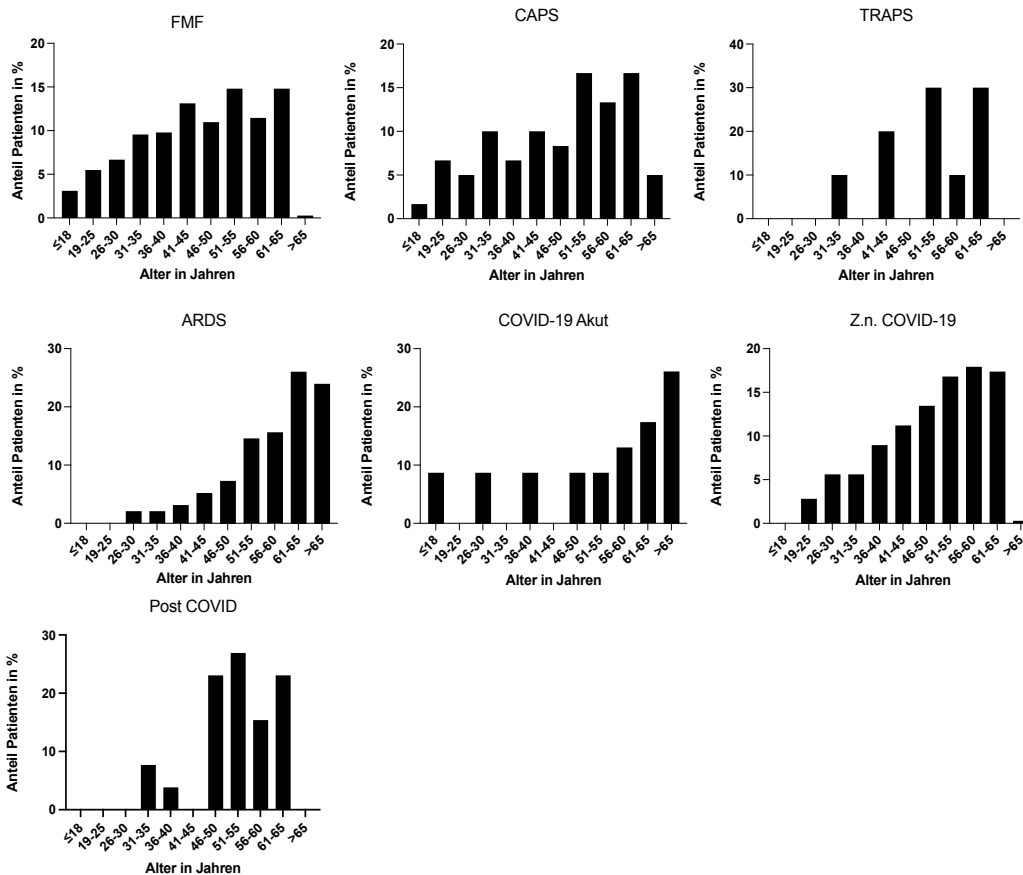


Abbildung 2: Altersverteilung der 367 Patienten mit autoinflammatorischen Erkrankungen und COVID-19 Infektion, die in der Studie analysiert wurden.

Abkürzungen: FMF= Familiäres Mittelmeerfieber (n=97); CAPS=Cryopyrin-assoziiertes Periodische Syndrom (n= 21); TRAPS= Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom (n=4); ARDS= Acute Respiratory Distress Syndrom, COVID-19 bedingt (n=57); COVID-19 Akut= akute COVID-19 Erkrankung, nicht intensivpflichtig (n=11); Z.n. COVID-19= Zustand nach COVID-19 Infektion, ausgeheilt (n=127); Post COVID= Post-COVID Syndrom (n=26).

## 2.1 Patientenkollektiv für die Verlaufsuntersuchung unter Anakinra-Therapie

Um den Einfluss einer Anakinra-Therapie auf die Bildung von Anti-IL-1RA Antikörper zu untersuchen, wurden zusätzlich 68 Seren von 22 Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen untersucht, bei denen eine Anakinra-Therapie geplant oder bereits durchgeführt wurde (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Diagnosen, Geschlecht und Alter von 22 Anakinra-Patienten, die in die Verlaufsuntersuchung eingeschlossen wurden.

Diagnose	Anzahl Patienten	Geschlecht Anzahl (%)		Alter (Jahre) Median
		Weiblich	Männlich	
<b>FMF</b>	5	2 (40)	3 (60)	46
<b>Adultes Still-Syndrom</b>	11	4 (37)	7 (73)	45
<b>TRAPS</b>	2	1 (50)	1 (50)	47
<b>MAS</b>	2	0 (0)	2 (100)	46,5
<b>MWS</b>	1	1 (100)	0 (0)	47
<b>Verdacht auf AID</b>	1	0 (0)	1 (100)	57
Gesamt	22	8 (36)	14 (64)	46,5

## 2.2 Kontrollkollektiv und Festlegung der Grenzwerte

Das Kontrollkollektiv bestand aus 70 Seren von Blutspenden gesunder Mitarbeiter des Klinikums. Diese stellte zum Großteil das Immunpathologische Labor Tübingen anonymisiert zur Verfügung. Aufgrund teilweise fehlender Alters- und Geschlechtsangaben wurden eigenständig 11 weitere Kontrollen rekrutiert. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 49% Frauen und 41% Männer, wobei das Geschlecht bei 10% der Kontrollen unbekannt blieb (Tabelle 6).

Tabelle 6: Geschlechtsverteilung bei 70 gesunden Probanden, die in der Studie analysiert wurden.

<b>Geschlecht</b>	<b>Anzahl (%)</b>
Weiblich	34 (49)
Männlich	29 (41)
Unbekannt	7 (10)
<b>Gesamt</b>	<b>70 (100)</b>

Altersangaben waren für die Hälfte der Kontrollen ermittelbar. Das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe betrug im Median 25 Jahre, mit Werten zwischen 21 und 58 Jahren (Tabelle 7).

Tabelle 7: Alters- und Geschlechtsverteilung bei 35 gesunden Probanden, die in der Studie analysiert wurden.

<b>Geschlecht</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Alter (Spannweite)</b>	<b>Median</b>
Weiblich	18	25 (37)	
Männlich	17	25 (28)	
<b>Gesamt</b>	<b>35</b>	<b>25 (37)</b>	

Die gemessene Reaktivität von Anti-IL-1Ra Antikörpern in den Seren der gesunden Blutspender und die darauf basierende Berechnung der Grenzwerte ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Reaktivität von Anti-IL-1Ra AK der 70 Kontrollseren und Berechnung der Grenzwerte.

<b>Kontrollseren; n=70</b>		
	<b>IgG ODx1000</b>	<b>IgM ODx1000</b>
<b>Mittelwert</b>	90	55
<b>Median</b>	71	45
Standardabweichung	69	42
Maximum	370	257
Minimum	8	7
<b>MW+2*SD</b>	<b>229</b>	<b>139</b>

### 2.3 Vergleichbarkeit der Kontroll- und Patientenkollektive

In Tabelle 9 sind die Patientenkollektive der AID, COVID-19 und Anakinra-Gruppen der Kontrollkohorte gegenübergestellt.

Tabelle 9: Vergleichbarkeit der Kontroll- und Patientenkollektive.

	<b>Kontrollen; n=70 (%)</b>	<b>AID und COVID- 19 Patienten; n=367 (%)</b>	<b>Anakinra- Patienten; n=22 (%)</b>
Alter (Median)	25 Jahre	44 Jahre	46 Jahre
Weiblich	34 (48)	182 (50)	8 (36)
Männlich	29 (41)	184 (50)	14 (64)
Unbekanntes Geschlecht	7 (1)	1 (<1)	0 (0)

### 2.4 Datensammlung

Folgende klinische Parameter wurden aus der digitalen Krankheitsgeschichte (Arztbrief) als Basisdaten entnommen:

Geburtsdatum, Geschlecht, Datum des Serumeingangs im Labor, Diagnose und Medikation (Immunsuppressiva).

Für die Kohorte der AID wurden zusätzlich die Schubfrequenz pro Jahr (Maximalwert 1 Schub pro Monat, somit 12 pro Jahr) und die Laborwerte Calprotectin (CLP) und Serumamyloid A (SAA) ergänzt. Für die Verlaufsdarstellung der Antikörper gegen Anakinra wurde ebenso der Beginn und das Ende der Anakinra-Einnahme festgehalten.

Für die Gruppe von ARDS Patienten und Covid-akut Patienten wurden neben den Basisdaten die Laborwerte Laktatdehydrogenase und Leukozyten mit dem Datum des Laboreingangs dokumentiert. Ergänzt wurden diese um die Dauer der Invasiven Beatmung, der Notwendigkeit einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) sowie eines Exitus Letalis.

Die Daten der Patienten nach COVID-19 Infektion wurden von Extern erhalten. Für diese Arbeit wurden folgende Parameter dankend übernommen: Antinukleäre Antikörper, Symptome während der Infektion, Stationäre Aufnahme, Immunsuppression, sowie der Zeitrahmen zwischen positivem Abstrich und Serumentnahme.

Ebenso von Extern stammen die Daten der Post-Covid Patienten, hier konnten lediglich die Basisdaten ermittelt werden.

## 2.5 Materialien

### 2.5.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: Liste verwendeter Chemikalien und Reagenzien.

Produktbeschreibung	Hersteller
30% Wasserstoffperoxide H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA; Darmstadt
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) Tabletten	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Anakinra 100 mg/0,67ml; Kineret®	Swedish Orphan Biovitrum AB (publ)
Antikörper gegen humanes IgG, Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG	Jackson Immuno Research, USA
Antikörper gegen humanes IgM; Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM	Jackson Immuno Research, USA
APS 10% (Ammonium persulfate electrophoresis grade)	SERVA-Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bovine Serum Albumin BSA 0,005%	PAN BIOTECH; Aidenbach
Dimethylformamide C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	SERVA-Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure 100%	MERCK; Darmstadt
Glycin PUFFERAN®	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Hanks' Balanced Salt Solution HBSS	Life Technologies Europe B.V; Bleiswijk, Niederlande
O-Phenylenediamin (Peroxidase Substrat)	SIGMA-ALDRICH®; Steinheim
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP Best.Nr. P0214	DakoCytomation; Glostrup Denmark
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/HRP Best.Nr. P0215	DakoCytomation; Glostrup Denmark
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH; Karlsruhe

Schwefelsäure 25%;	Merck KGaA; Darmstadt
SDS 10% (Sodium dodecyl sulfate)	SIGMA-ALDRICH®; Steinheim
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Tris 1,5M, pH 8,8 (Trizma base) Tris 3M	SIGMA-ALDRICH®; Steinheim
Triton; X-100 SERVA	Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Tween 20	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn

### 2.5.2 Lösungen und Pufferansätze

Tabelle 11: Liste verwendeter Basispuffer und deren Zusammensetzung.

Puffer	Konzentration	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS-Puffer);	60mM; pH 7,4 auf 5 l Aqua	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> – 6, 81 g; M=136,09 g/mol	VWR Prolabo® CHEMICALS; Leuven; Belgium
		NaCl – 43, 83 g; M=12,6 g/mol;	VWR Prolabo® CHEMICALS; Leuven; Belgium
		Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – 44,49g M=141,96 g/mol;	Bio Froxx GmbH; Einhausen
Bicarbonatpuffer	0,2M; pH 9,6 für 5 l Aqua	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> – 33, 9 g; M=105,99 g/mol;	MERCK Chemicals GmbH; Darmstadt
		NaHCO <sub>3</sub> –57,12 g; M=84,01 g/mol;	MERCK Chemicals GmbH; Darmstadt
Citratpuffer	0,1M; pH 5,0 für 4 l Aqua	Citronensäure-Monohydrat – 25, 20 g; M=210,14 g/mol	EMSURE®; VWR International; Wien; Österreich
		Natriumcitrat-Dihydrat – 82, 36 g; M=294,10 g/mol;	MERCK Chemicals GmbH; Darmstadt

Tabelle 12: Liste weiterer verwendeter Puffer und Lösungen.

<b>Puffer / Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Waschpuffer 1 (WP1)	5 l PBS-Puffer
	25 g BSA
Waschpuffer 2 (WP2)	5 l PBS-Puffer
	12,5 g BSA
	10 ml Triton
Serumverdünnungspuffer (SVP)	1,5 l PBS Puffer
	1-2 große Spatel BSA
	1,2 ml Triton X 100
Substratlösung	50 ml Citratpuffer, pH 5,0
	25 mg O-Phenylenediamine
	16,5 µl 30% Wasserstoffperoxid
Waschpuffer Western Blot	4,9 l PBS-Puffer
	2,5 g BSA
	2,5 ml Tween 20
Probenverdünnungspuffer Western Blot	100 ml PBS Puffer
	3 g BSA
Elektrodenpuffer für 5l Aqua dest.; pH 8,3	5 g SDS
	30,25 g Tris
	112,50 g Glycin
Transferpuffer für 4l Aqua dest., pH 8,3	2 g SDS
	12,12g Tris
	57,64g Glycin
Substratlösung WesternBlot	10 ml Dimethylformamid
	4 AEC-Tabletten
	190 ml Wasser
	100 µl Wasserstoffperoxid

### 2.5.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13: Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
ELISA-Platten; Maxi-Sorp 96 Well; Nunc	Nunc&Co; Wiesbaden
Deep-Wellen-Platten	SARSTEDT; Nümbrecht
Cellstar Tubes; 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsröhrchen mit und ohne Deckel; 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen
Misch und Messkolben	Duran Schott; Mainz
Pipettier Reservoir	Eppendorf, Sarstedt
Pipetten Spitzen	BIOHINT, Eppendorf, Sarstedt
Nitrozellulose Western-Blotting Membranen	MERCK Chemicals GmbH; Darmstadt
Röhrchen Ständer	

### 2.5.4 Geräte

Tabelle 14: Liste verwendeter Gerätschaften.

Gerätebeschreibung	Hersteller
12-Kanal-Pipette (10-100 µl); Brand Transferpette® S Multichannel Pipette	Merck KGaA; Darmstadt
Elektronische 8-Kanal-Pipette (50-1200µl)	Sartorius; Göttingen
Pipette Pipetboy 2	INTEGRA Biosciences GmbH; Biebertal
Einzelschritt-Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf Research plus; Hamburg
ELISA-Reader, PC LG FLATRON	TECAN, Männedorf; CHE
Elektrowaage	Sartorius; Göttingen
Feinwaage; ALT 220-5DAM	Kern & Sohn; Balingen
Magnetmischer: IKA C-MAG MS7, MR Hei-Standard	Heidolph Instruments; Schwabach
pH-Messer, pHenomenal	VWR International; USA

### 2.5.5 Programme

Folgende elektronische Programme wurden im Rahmen der Datensammlung und Datenauswertung verwendet:

Tabelle 15: Liste verwendeter Programme.

Programm	Hersteller
Magellan™	Tecan; Tecan Trading AG, SUI
SAP ISH.med	Oracle Cerner, DE
SwissLab	Nexus/Swisslab, Nexus AG, DE
Excel	Microsoft, USA
Prism 10	GraphPad, USA
SPSS Statistics 28.0.1.1	IBM Corporation, USA

## 2.6 Methoden

### 2.6.1 Prinzip des *Enzyme-linked-immunosorbent assays*

Der *Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)* wird verwendet, um Antigene oder Antikörper in biologischen Proben zu detektieren. Wie auch bei anderen Immunoassays ist das grundlegende Prinzip auf spezifische Antikörper-Antigen Interaktionen zurückzuführen.

Für diese Arbeit wurde als Antigen das Medikament Anakinra auf eine Testoberfläche getragen, daraufhin folgte das Patientenserum mit den eventuell vorhandenen Antikörpern. Eine Positivreaktion wurde nach der Zugabe eines sekundären Antikörpers und einer Substratlösung durch eine Farbreaktion sichtbar.

### 2.6.2 Etablierung

Zur orientierenden Festlegung der Grenz- und Normalwerte wurden 22 gesunde Blutspender auf Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) Antikörper gegen den IL-1-Ra Anakinra getestet. Die hierfür verwendete Antigen- und

Serumverdünnung wurde zunächst nach laborgängigem Standard auf eine Antigen (AG) Konzentration von 10 µg/ml und eine Serumverdünnung von 1:500 festgelegt. Die Mittelwerte der Absorptionen plus 2-fache Standardabweichung (SD) wurden als Grenzwerte bestimmt. Diese ergaben für IgG 229 und IgM 139.

Übereinstimmend wurden die IgG und IgM Werte von 25 Patienten mit AIDs unter Anakinra-Therapie explorativ untersucht.

Zur Bestimmung der optimalen Antigen- sowie Serumverdünnung wurde ein *Scatterboard* durchgeführt (siehe Anlage 1). Das Antigen wurde in Konzentrationen von 3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml, 12.5 µg/ml und 25 µg/ml eingesetzt, Seren wurden 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 verdünnt. Als sekundäre Antikörper wurden monovalente Peroxidase-konjugierte Anti-Human-IgG- und IgM-Antikörper verwendet. Zur Minimierung der Störanfälligkeit wurde ein Serum stets doppelt aufgetragen, aus denen der Mittelwert berechnet wurde.

Von den 25 bereits nach Standardverfahren explorativ getesteten Patientenseren wurden jeweils 4 Seren auf Antikörper gegen IL-1RA vom IgG- und IgM-Typ untersucht. Hierfür wurde jeweils ein stark positives (+++), zwei positive (+) und ein negatives Serum (-) ausgewählt.

Die in der Anlage 2 im Detail ersichtlichen Ergebnisse ergaben ein Kurvenoptimum bei einer AG-Konzentration zwischen 6,25 µg/ml und 12,5 µg/ml und einer Serumverdünnung zwischen 1:400 und 1:800.

Für die weiteren Analysen wurde daher eine Anakinra-Konzentration von 10 µg/ml und eine Serumverdünnung von 1:500 verwendet.

### **2.6.3 Elisa Durchführung**

Die Durchführung erfolgte nach dem im Routinelabor gängigen Elisa Verfahren. Jegliche Konzentrationen und Verdünnungen wurden in Vorversuchen etabliert.

## **Tag 1**

Die Nunc-Platten wurden mit 100 µl Antigenverdünnung beschichtet. Das Testantigen Anakinra wurde für eine Sollkonzentration von 10 µl pro 1 ml Bicarbonatpuffer zunächst in einer Konzentration von 1:100 mit HBSS verdünnt. Diese Verdünnung wurde in 25 ml Bicarbonatpuffer gelöst. Pro Well wurden 100 µl Antigenverdünnungslösung pipettiert und für 16-24 Stunden bei 4 Grad Celsius inkubiert.

Das Herstellen der Verdünnung der Patientenserum erfolgte für eine Sollverdünnung von 1:500 mit Serumverdünnungspuffer.

In jedem Assay wurden vier Kontrollen, sowohl stark positive als auch negative Kontrollen für eine qualitätsgesicherte und vergleichbare Durchführung eingesetzt.

Der Waschpuffer 1 wurde angesetzt und über Nacht kühl gelagert.

## **Tag 2**

Es erfolgte das Waschen der Nunc-Platten im Waschpuffer 1, daraufhin wurden die Platten mindestens 15 min inkubiert. Es erfolgte ein gründliches Ausklopfen der Platten auf Zellstoff sowie das Pipettieren von 100 µl der Serumverdünnung. Die Serumverdünnung wurde anschließend für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es erfolgte ein zweites Waschen der Platten im Waschpuffer 2 und eine darauffolgende mindestens 15-minütige Inkubation mit anschließendem gründlichem Ausklopfen der Platten auf Zellstoff. Die sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugierten Antihuman-AKs) wurden in einer Konzentration von 3,3 µl pro 10 ml Waschpuffer 2 für IgG und 5 µl pro 10 ml Waschpuffer 2 für IgM gemischt. Je 100 µl der Antikörperverdünnung wurde auf die jeweiligen Platten gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es erfolgte das dritte Waschen der Platten im Waschpuffer 2, daraufhin wurden die Platten für mindestens 15 min inkubiert und anschließend analog zu

vorherigen Waschungen ausgeklopft. Es wurde 150 µl Substrat pro Well hinzugegeben. Eine positive Reaktion wurde als gelber Farbumschlag sichtbar.

Sobald die in Vorversuchen von Frau Dr. Preuß evaluierten Absorptionswerte der vier Kontrollseren erreicht worden sind, wurde die Reaktion mit 50 µl 25% Schwefelsäure abgestoppt.

Die Auswertung der Platten erfolgte am ELISA-Reader bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Die gemessene optische Dichte (OD) wurde final mit Tausend multipliziert.

Zur Festlegung des Normbereiches wurden Seren von 70 gesunden Blutspendern und Mitarbeitern des Klinikums gegen Anakinra getestet und der Mittelwert der Absorptionen plus zweifache Standarddeviation als Toleranzgrenze (*cutoff*) festgelegt. (Tabelle 8).

#### **2.6.4 Western Blot zum Nachweis von Anti-IL-1Ra Antikörpern**

##### **Durchführung der Elektrophorese**

Anakinra hat ein Molekulargewicht von ca. 17 kDa. Daher wurde für die Herstellung des Trenngels eine Konzentration von 12% Acrylamid gewählt, das Sammelgel wies eine Konzentration von 5% auf.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der Western Blot Sheets.

<b>Menge</b>	<b>Substanz</b>
<b>Trenngel</b>	
13,8 ml	Wasser
16,8 ml	Rotiphorese 30
10,5 ml	Tris 1,5M
420 µl	10% SDS
420 µl	10% APS
42 µl	TEMED
<b>Sammelgel</b>	
13,2 ml	Wasser
3,3 ml	Rotiphorese 30

2,5 ml	Tris 1M
195 µl	10% SDS
195 µl	10% APS
19,5 µl	TEMED

Die Anakinra-Fertigspritze eine Dosis von 100 mg pro 0,67 ml Injektionslösung, dies entspricht einer Konzentration von 150 mg pro ml. Von dieser Lösung wurden 10 µl (1,5 mg) pro Spur auf das Sammelgel aufgetragen.

Die Herstellung des Elektroden- und Transferpuffers erfolgte nach Anleitung, Ersterer wurde für die Elektrophorese in die Kammern gegossen.

Insgesamt erfolgte ein Stromfluss von 50 Volt für 5 min, gefolgt von weiteren 30 min bei 150 Volt und einer weiteren Stunde bei 200 Volt. Sobald das Antigen etwa 1 cm vom Gelende entfernt war, war die Elektrophorese abgeschlossen.

### **Durchführung des Western Blot**

Es erfolgte der Antigentransfer vom Gel auf Nitrozellulose-Sheets im Transferpuffer. Die hergestellten Sheets wurden über Nacht in 3% BSA-Puffer auf dem Rüttler inkubiert und waren daraufhin einsatzbereit.

Der Wasch- und Probenverdünnungspuffer wurde nach Anleitung hergestellt. Für eine Probenendverdünnung von 1:50 wurden 60 µl Serum mit 3 ml Puffer in Plastikschaalen gegeben und für 45 min rüttelnd inkubiert. Daraufhin folgten drei 10-minütige Waschgänge.

Routinemäßig folgte nun die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten sekundären HRP Antihuman-IgG und IgM, diese wurden zwei Stunden inkubiert.

Nach fünf Waschgängen mit jeweils 7 Minuten wurde die Substratlösung für ungefähr 10-15min dazugegeben.

Sobald Banden zu erkennen waren (nach etwa 10-15 min), wurde die Reaktion mit 7% Essigsäure abgestoppt. Eine Determinante bei ca. 17 kDa wurde als IL-1 Ra-spezifische Reaktion gewertet.

## **2.7 Ethik**

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Tübingen unter der Nummer 647/2016BO2 begutachtet, es bestanden keine Bedenken.

## **2.8 Statistik**

Für die Zusammenfassung und Darstellung der Daten wurde Deskriptive Statistik verwendet. Das Auftreten von Antikörpern zwischen verschiedenen Gruppen wurde mithilfe des Fisher Exact Tests mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 0,05 mit SPSS (Version 28, siehe 42) verglichen. Die gemessenen Absorptionen zwischen verschiedenen Gruppen wurden durch den Mann Whitney Test mit einem zweiseitigen Signifikanzniveau vom 0,05 mit Prism 10 verglichen. Weitere diskrete Parameter (z.B. Temperatur) wurden aufgrund ihrer Normalverteilung mittels ungepaarten t-Test bei einem Signifikanzniveau von 0,05 mit SPSS verglichen. Jegliche graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurden mit Prism 10 erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reaktivität von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei Patienten mit autoinflammatorischen Erkrankungen, COVID-19 Infektion und gesunden Probanden

Die Reaktivität der Anti-IL-1Ra Antikörper in den verschiedenen Patientengruppen und den gesunden Probanden ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Untersuchung der 367 Seren der AID und COVID-19 Patienten auf Antikörper gegen den IL-1Ra Anakinra ergab für Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ einen durchschnittlichen Absorptionswert von 119 mit einem Maximum von 912, dies zeigte sich signifikant\* erhöht im Vergleich zu den Kontrollen (\* $p=0,04$  im Mann-U-Whitney Test; Median AID und COVID-19=90 vs. Median Kontrollen=70,5). Die durchschnittliche Absorption für IgM-Anti-IL-1Ra AK lag bei 101 bei einem Maximum von 1229 und zeigte sich signifikant \*\*\*\* erhöht im Vergleich zu gesunden Blutspendern (\*\*\*\* $p<0,0001$  im Mann-U-Whitney Test; Median AID und COVID-19=64 vs. Median Kontrollen=45).

Die Testung auf Normalverteilung der gemessenen Reaktivitäten für Anti-IL-1Ra AK vom IgG bzw. IgM-Typ bei den 367 Patienten ergab in allen Analysen ein  $p<0,0001$  und lässt bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  auf eine Nicht-Normalverteilung der gemessenen IgG und IgM Reaktivitäten schließen.

Die Reaktivität der Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ zeigte sich für Patienten nach ausgeheilter COVID-19 Infektion und Patienten mit akutem COVID-19 signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Für Patienten mit CAPS sowie Post-COVID Syndrom zeigten sich die Reaktivitäten der IgG-Anti-IL-1Ra AK signifikant erniedrigt im Vergleich zu gesunden Probanden (siehe Abbildung 3).

Die Reaktivität der Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ zeigte sich für Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS, akuter COVID-19 Infektion, sowie bei Patienten nach ausgeheilter COVID-19 Infektion signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Probanden. Erstmals in der Patientengruppe der autoinflammatorischen Syndrome zeigt sich die Reaktivität der IgM-Anti-IL-1Ra AK bei Patienten mit FMF signifikant erhöht im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

Es zeigten einzig die Patienten mit akutem COVID-19 und ausgeheilter COVID-19 Infektion signifikant erhöhte Reaktivitäten für Anti-IL-1Ra AK vom IgG und IgM-Typ gleichzeitig. Hierbei steht die überwiegende Reaktivität der IgG-Anti-IL-1Ra bei Patienten mit ausgeheilter COVID-19 Infektion der IgM-gewichteten Anti-IL-1Ra Reaktivität der Patienten mit akutem COVID-19 gegenüber.

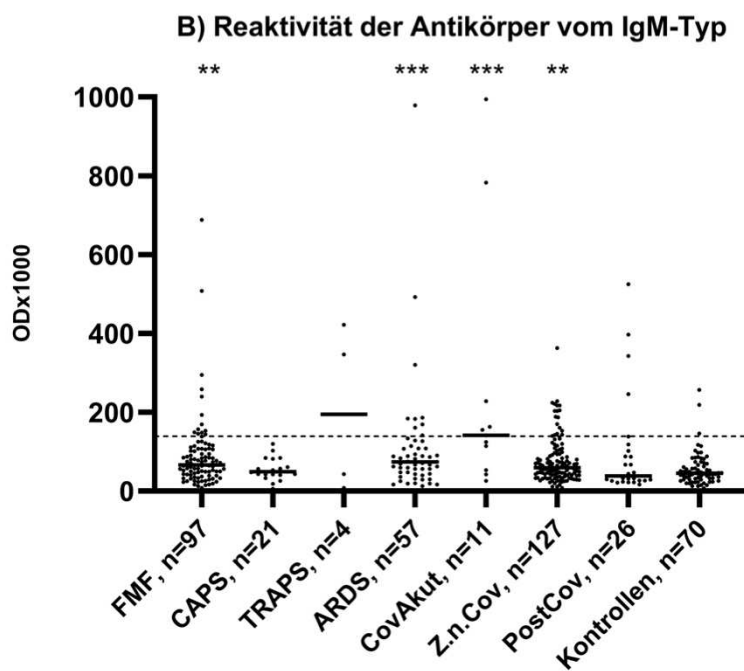
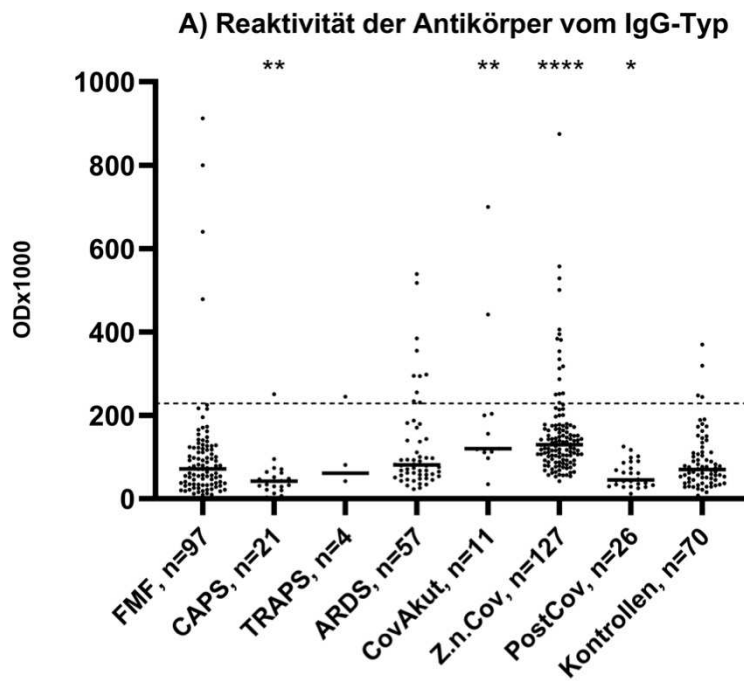


Abbildung 3: Anti-IL-1Ra Antikörperreaktivitäten bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen und gesunden Kontrollen.

Der durchgehende Strich stellt den Median, die gestrichelte Linie den *cutoff* (IgG=229, IgM=139) dar. Der Stern gibt die Signifikanz im Mann-U-Whitney Test gegenüber gesunden Kontrollen an, mit \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. FMF IgG p=0,06, IgM p=0,0011\*\*. CAPS IgG p=0,0012\*\* (signifikant erniedrigt), IgM p=0,3. TRAPS IgG p=0,75, IgM p=0,44. ARDS IgG p=0,07; IgM p=0,0001\*\*\*. CovAkut IgG p=0,0016\*\*; IgM p=0,003\*\*\*. Z.n. Cov IgG p<0,0001\*\*\*\*; IgM p=0,0019\*\*. PostCov IgG p=0,034\* (signifikant erniedrigt), IgM=0,7.

Abkürzungen: FMF= Familiäres Mittelmeerfieber; CAPS=Cryopyrin-assoziiertes Periodische Syndrom; TRAPS= Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes periodisches Syndrom; ARDS= Acute Respiratory Distress Syndrom, COVID-19 bedingt; CovAkut= akute COVID-19 Erkrankung, nicht intensivpflichtig; Z.n. Cov= Zustand nach COVID-19 Infektion, ausgeheilt; PostCov= Post-Covid Syndrom.

### 3.2 Häufigkeit von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei Patienten mit autoinflammatorischen Erkrankungen, COVID-19 Infektion und gesunden Probanden

Von den 367 Patienten mit AID oder COVID-19 waren bei 20 (5%) Anti-IL-1Ra AK vom IgG-, 23 (6%) vom IgM- und 11 (3%) sowohl vom IgG- als auch IgM-Typ (doppelt-positiv) nachweisbar.

Das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgG und IgM-Typ in der AID und COVID-19 Gruppen zusammengefasst ergab im Vergleich zu den Kontrollen keinen signifikanten Unterschied (Vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Antikörperauftreten der AID und COVID-19 Gruppe verglichen mit Kontrollen.

	<b>IgG AID+COVID Gruppe; n=367 (%)</b>	<b>IgG Kontrollen; n=70 (%)</b>	<b>IgM AID+COVID Gruppe (%) n=367</b>	<b>IgM Kontrollen; n=70 (%)</b>
Positiv	31 (8)	4 (6)	34 (9)	3 (4)
	<b>Fisher's Exact p=0,6</b>		<b>Fisher's Exact p=0,2</b>	

Die Häufigkeit der Anti-IL-1Ra-Antikörper in den verschiedenen Patientengruppen ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Häufigkeit von Anti-IL-1Ra-Antikörpern bei Patienten mit AID, COVID-19 Infektion und gesunden Probanden.

	Anzahl Patienten	Anti-IL-1Ra positiv (%)	
		IgG	IgM
<b>FMF</b>	97	4 (4)	13 (13)
<b>CAPS</b>	21	1 (5)	1 (5)
<b>TRAPS</b>	4	1 (25)	2 (50) *
<b>Verdacht auf AID</b>	24	0	3 (12)
<b>ARDS</b>	57	9 (16)	12 (21) **
<b>COVID-19 Akut</b>	11	2 (18)	6 (54) ***
<b>Z.n. COVID</b>	127	17 (13)	18 (14) *
<b>Post COVID</b>	26	0 (0)	3 (12)
<b>Gesunde Probanden</b>	70	4 (6)	3 (4)

Signifikant im Fisher's Exact Test im Vergleich zu gesunden Probanden: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Bei keiner der Patientengruppen waren Anti-IL-1Ra Antikörper vom IgG-Typ in signifikant unterschiedlicher Häufigkeit als bei den gesunden Probanden nachweisbar. Dagegen fanden sich IgM-Antikörper insbesondere bei Patienten mit akuter oder durchgemachter COVID-19 Infektion und ARDS signifikant häufiger als bei gesunden Probanden. Auch Patienten mit TRAPS hatten häufiger IgM-Antikörper als Gesunde, allerdings konnten hier nur 4 Patienten untersucht werden.

### 3.3 Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten mit FMF

#### 3.3.1 Korrelation mit der Schubfrequenz

Die Anzahl der Schübe pro Jahr konnte bei 95 der 97 Patienten ermittelt werden. Die Verteilung der jährlichen Schubfrequenz der FMF Patienten ist in Tabelle 19 zu sehen.

Bei etwa einem Drittel (36%) der Patienten trat im vergangenen Jahr kein Schub auf. Bei einem Drittel (29%) lag die Krankheitsaktivität zwischen einem und acht Schüben pro Jahr, darüber hinaus verzeichnete ein weiteres Drittel (32%) eine Schubfrequenz von über 10 Schüben pro Jahr.

Tabelle 19: Häufigkeit von Schüben bei 95 Patienten mit FMF und Korrelation mit dem Nachweis von Anti-IL-1Ra-Antikörpern.

Schübe pro Jahr	Anzahl (%) Patienten	Anti-IL-1Ra-Antikörper Anzahl (%)	
		IgG	IgM
0	35 (36)	2 (6)	4 (11)
1	7 (7)	2 (3)	9 (16)
2	8 (8)		
3	5 (5)		
4	4 (4)		
5	2 (2)		
6	1 (1)		
8	2 (2)		
10	3 (3)		
12	28 (29)		

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von Anti-IL-1Ra-Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ bei Patienten ohne Schub oder Patienten mit mehr als einem Schub.

Abbildung 4 zeigt, dass die durchschnittliche Absorption für IgG-Anti-IL-1Ra AK für Patienten ohne Schubaktivität bei einer OD=114 und für Patienten mit Schüben im vergangenen Jahr bei einer OD=100 lag. Für IgG konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Schub verzeichnet werden.

Die durchschnittlich gemessene Absorption für IgM-Anti-IL-1Ra AK lag bei Patienten ohne Schubaktivität bei einer OD=102 und bei Patienten mit Schüben im vergangenen Jahr bei einer OD=80. Beide Gruppen unterschieden sich in der IgM Absorption nicht signifikant voneinander.

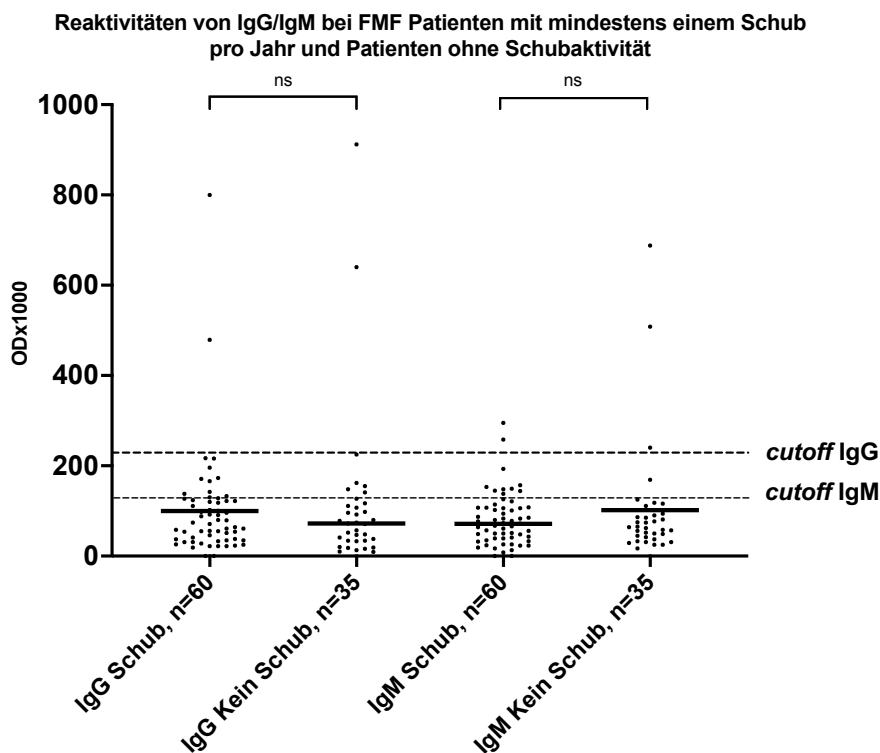


Abbildung 4: Reaktivitäten von IgG und IgM Anti-IL-1Ra Antikörpern bei FMF Patienten.

Inkludiert sind FMF Patienten mit mindestens einem Schub pro Jahr und Patienten ohne Schubaktivität im vergangenen Jahr. Der *cutoff* ist als gestrichelte Linie dargestellt (IgG=229; IgM=139). die durchgezogene Linie kennzeichnet den Mittelwert. Im Mann-Whitney Test zeigte sich der Unterschied in der Schubaktivität zwischen antikörperpositiven und negativen Patienten als nicht signifikant ( $p > 0,05$  mit IgG  $p = 0,6$ ; IgM  $p = 0,9$ ). Abkürzungen: OD=Optische Dichte; ns= nicht signifikant.

### 3.3.2 Korrelation mit Calprotectin-Spiegeln

Das Calprotectin (CLP) konnte für 95 der 97 FMF Patienten bestimmt werden. Der Mittelwert für das CLP der FMF Patienten betrug  $30\mu\text{g/ml}$  (*range* 1-480 $\mu\text{g/ml}$ ) bei einem Referenzbereich von  $<3\mu\text{g/ml}$ . Das CLP war bei 76% der Patienten erhöht. Ein signifikanter Unterschied des CLP konnte nicht zwischen antikörperpositiven und -negativen Patienten festgestellt werden (Abbildung 5), allerdings ist aufgrund der geringen Probandenzahl nur eine eingeschränkte statistische Auswertung möglich.

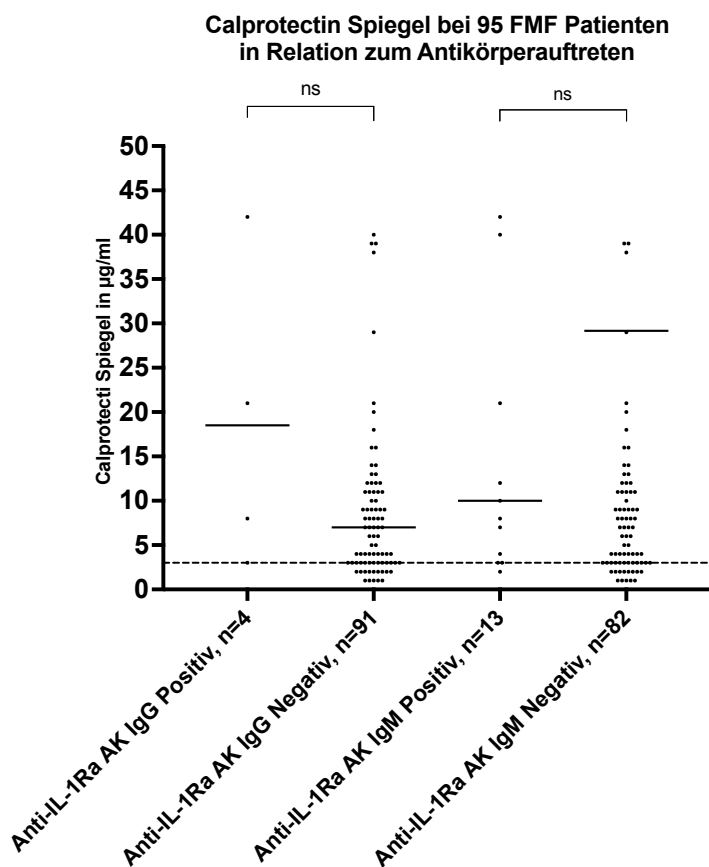


Abbildung 5: Calprotectin Spiegel bei 95 FMF Patienten in Relation zum Antikörperauftreten.

Die gestrichelte Linie stellt den Grenzwert des Calprotectin-Spiegels bei  $3\mu\text{g/ml}$  dar. Die Mittelwerte sind als durchgezogene Linien zu erkennen. Im Mann-Whitney Test zeigte sich der Unterschied zwischen den Calprotectin Spiegeln zwischen antikörperpositiven und negativen Patienten als nicht signifikant ( $p>0,05$  mit IgG  $p=0,4$ ; IgM  $p=0,2$ ). Abkürzungen: ns=nicht signifikant.

### 3.3.3 Korrelation mit Serumamyloid A

Das Serumamyloid A konnte für 93 der 97 FMF Patienten bestimmt werden. Das durchschnittliche SAA betrug im Mittelwert 55 mg/dl bei einem Referenzwert von <10 mg/dl (im Median 7mg/dl; range 1-976 mg/dl).

Ein signifikanter Unterschied des SAA konnte zwischen antikörperpositiven und negativen Patienten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 6), allerdings ist auch hier aufgrund der geringen Probandenzahl nur eine eingeschränkte statistische Auswertung möglich.

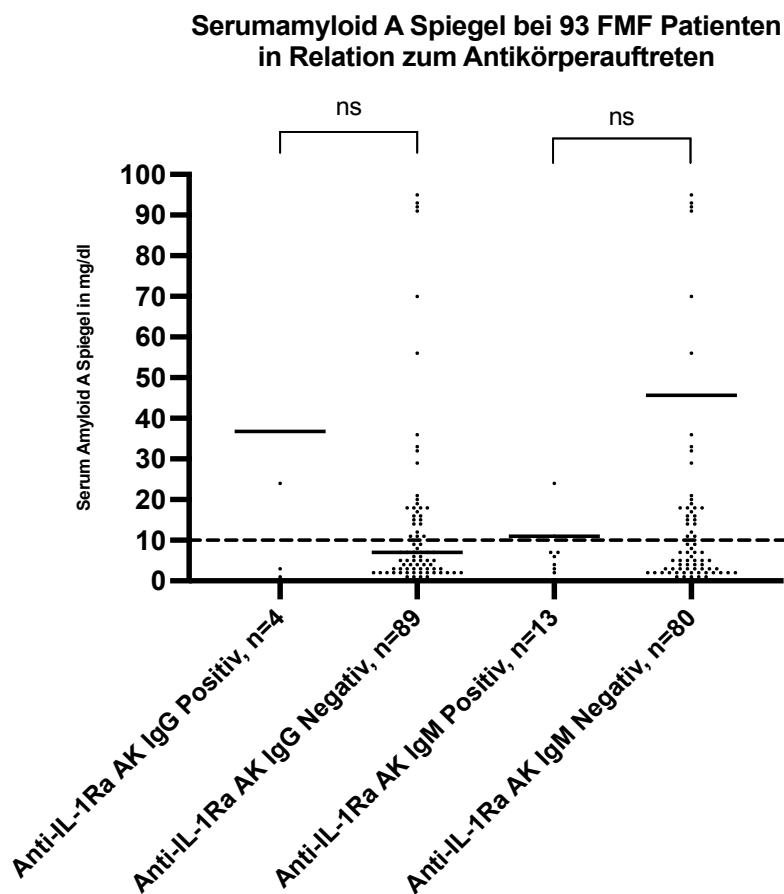


Abbildung 6: Serumamyloid A Spiegel bei 93 FMF Patienten in Relation zum Antikörperauftreten.

Die gestrichelte Linie stellt den Grenzwert des Serumamyloid A-Spiegels mit 10 mg/dl dar. Die Mittelwerte sind als durchgezogene Linien zu erkennen. Im Mann-Whitney Test zeigte sich der Unterschied zwischen den SAA Spiegeln zwischen antikörperpositiven und negativen Patienten als nicht signifikant (ns= $p>0,05$ ) mit IgG  $p=0,8$ ; IgM  $p=0,11$ . 28 Datapunkte befinden sich außerhalb des Fensters.

### 3.3.4 Korrelation mit der Medikamenteneinnahme

90% der FMF Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Serumentnahme eine antirheumatische, medikamentöse Therapie.

In Tabelle 20 ist die AK-Verteilung nach Medikamenteneinnahmen der FMF Patienten ersichtlich. Alle drei Patienten unter Anakinra-Therapie wurden positiv auf IgG-Anti-IL1Ra und IgM-Anti-IL-1Ra AK getestet. Es unterschied sich das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK bei FMF Patienten unter Anakinra-Therapie signifikant von den Patienten ohne Therapie. Zudem waren rund 30% der Patienten ohne medikamentöse Therapie IgM-Anti-IL1-Ra AK positiv, dies unterschied sich signifikant zu den Patienten ohne Therapie.

Tabelle 20: Häufigkeit von Anti-IL-Ra Antikörpern bei 97 Patienten mit FMF in Relation zur Medikamenteneinnahme.

Medikamente	Anzahl Patienten	Anti-IL1-Ra AK positive Anzahl (%)	
		IgG	IgM
Colchicin	80	1 (1)	6 (8)
Anakinra	3	3 (100)*	3 (100)
Canakinumab	3	0 (0)	1 (33)
Tocilizumab	1	0 (0)	0 (0)
Ohne Therapie	10	0 (0)	3 (30)

\* Signifikanz von  $p < 0,01$  im Fisher's Exact Test im Vergleich zu Patienten ohne Therapie.

### 3.4 Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten mit CAPS

Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ traten nur bei einer einzelnen MWS-Patientin auf (Vgl. Tabelle 18). Die Reaktivitäten der IgG-Anti-IL-1Ra AK zeigte sich im Vergleich zu unserer Kontrollkohorte signifikant erniedrigt.

### 3.4.1 Korrelation der Anti-IL-1Ra Antikörper mit Calprotectin- und Serumamyloid-Spiegeln

Das CLP war für 14 der 21 Patienten ermittelbar (Vgl. Tabelle 21). Der Mittelwert betrug 3,74 µg/ml (*range* 1-16 µg/ml). Von den 14 Patienten hatten 6 (43%) ein erhöhtes CLP ( $\geq 3$  µg/ml). Das CLP der Patientin mit Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ betrug 7µg/ml.

Das SAA konnte für 19 der 21 Patienten bestimmt werden. Das SAA betrug im Mittelwert 15 mg/dl (*range* 1-51 mg/dl) bei einem Referenzwert von <10mg/dl. Bei 7 (33%) war es erhöht. Das SAA der Patientin, die Anti-IL-1RA Antikörper vom IgG- und IgM-Typ hatte, betrug 5mg/dl.

Tabelle 21: Korrelation zwischen Anti-IL-1Ra Antikörpern und Calprotectin- und Serumamyloid-Spiegeln bei Patienten mit CAPS.

Laborparameter		Anzahl Patienten	Anzahl Anti-IL-1Ra IgG/IgM positiv
Calprotectin	> 3µg/ml	6	1
	< 3 µg/ml	8	0
Serumamyloid A	>10 mg/ml	3	0
	< 10 mg/ml	12	1

### 3.4.2 Korrelation der Anti-IL-1Ra-Antikörper mit der Medikamenteneinnahme

15 der 21 Patienten mit CAPS (71%) nahmen Canakinumab, zwei (10%) nahmen Anakinra ein. Drei Patienten (14%) erhielten keine medikamentöse Therapie.

Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ traten einmalig bei einer Patientin (7%) der Canakinumab Gruppe auf (siehe Tabelle 22). Für die zwei CAPS-Patienten unter Anakinra-Therapie konnten keine Anti-IL-1Ra AK nachgewiesen werden.

Tabelle 22: Häufigkeit von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei 21 Patienten mit CAPS in Relation zur Medikamenteneinnahme.

<b>Medikamente</b>	<b>Anzahl Patienten</b>	<b>Anti-IL-1Ra IgG/IgM positiv Anzahl (%)</b>
<b>Colchicin</b>	1	0 (0)
<b>Anakinra</b>	2	0 (0)
<b>Canakinumab</b>	15	1 (7)
<b>Keine Therapie</b>	3	0 (0)

### **3.5 Korrelation der Anti-IL-1Ra Antikörper mit klinischen Parametern bei Patienten mit TRAPS**

Bei einer der vier TRAPS-Patientinnen konnten IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ nachgewiesen werden (Vgl. Tabelle 18).

Diese Patientin wies mit 12 Schüben pro Jahr auch die höchste Schubfrequenz der TRAPS-Patienten auf. Die anderen drei Patienten hatten im vorangegangenen Jahr keine Schübe.

Zu der in Tabelle 23 dargestellten Medikamenteneinnahme muss erwähnt werden, dass sowohl die doppelt IgG/IgM-Anti-IL-1Ra AK positive Patientin, als auch die Patientin mit IgM-Anti-IL-1Ra AK, zu einem vorangegangenen Zeitpunkt mit Anakinra therapiert wurden. Die aktuelle Medikation der Patientin mit Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ bestand aus Canakinumab.

In dem Serum der Patientin unter aktueller Anakinra-Therapie konnten keine Anti-IL-1Ra AK nachgewiesen werden.

Tabelle 23: Häufigkeit von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei 4 Patienten mit TRAPS in Relation zur Medikamenteneinnahme.

Medikamente	Anzahl Patienten	Anti-IL-1Ra positiv Anzahl (%)	
		IgG	IgM
Anakinra	1	0	0 (0)
Canakinumab	2	1 (50)*	1 (50)*
Kein Medikament	1	0	1 (100)

\* diese Patienten erhielt zu einem früheren Zeitpunkt Anakinra.

### 3.6 Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS

Wie in Tabelle 18 aufgeführt, traten Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ bei 16% (9/57) und Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ bei 21% (12/57) der Patienten mit ARDS bei COVID-19 Infektion auf. Das Auftreten der IgG-Anti-IL-1Ra AK unterschied sich nicht im Vergleich zu den Kontrollen ( $p=0,08$ ). Das Auftreten von IgM-Anti-IL-1Ra AK hingegen unterschied sich signifikant von der Kontrollgruppe ( $p=0,0049$ ). 7% (4/57) der Patienten wiesen gleichzeitig Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ auf.

Die IgG-Anti-IL-1Ra Antikörperreaktivitäten zeigten keinen signifikanten Unterschied zu denen der gesunden Probanden (siehe Abbildung 3), während die IgM-Reaktivitäten signifikant höher lagen.

Bei 18 der 57 ARDS Patienten (32%) verlief das COVID-19 bedingte ARDS letal. Die meisten dieser Patienten wiesen keine Anti-IL-1Ra-Antikörper auf (Tabelle 24).

Tabelle 24: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen Parametern und deren Ausprägung bei Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS.

Klinische Parameter		Anzahl Patienten	Anzahl (%) Anti-IL-1Ra-Antikörper positiv	
			IgG	IgM
Exitus Letalis	Ja	18	1 (6)	3 (17)
	Nein	39	8 (20)	9 (23)
Invasive Beatmung	Ja	52	8 (15)	12 (23)
	Nein	5	1 (20)	0
ECMO	Ja	31	5 (16)	7 (23)
	Nein	26	4 (15)	5 (19)

Ein signifikanter Unterschied im Antikörperauftreten zwischen Patienten mit letalem und nicht-letalem Verlauf, invasiv und nicht-invasiv Beatmeten, und Patienten mit und ohne ECMO konnte nicht festgestellt werden.

Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS und quantitativ abweichenden Leukozyten wiesen häufiger IgM-Anti-IL-1Ra AK auf als Patienten mit normwertigen Leukozytenzahlen (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit laborchemischen Parametern bei Patienten mit COVID-19 bedingtem ARDS.

Laborchemische Parameter		Anzahl Patienten	Anzahl (%) Anti-IL-1Ra-Antikörper positiv	
			IgG	IgM
Leukozyten in 1/ $\mu$ l (3800-10300)	Normwertig	27	3 (11)	6 (22)
	Erhöht	26	6 (23)	20 (77) ***
	Erniedrigt	4	0	1 (25) ***
Laktatdehydrogenase U/l (<250)	Normwertig	0	0	0
	Erhöht	57	9 (16)	12 (21)

\*\*\* Signifikanz von  $p < 0,001$  im Chi-Square Test im Vergleich zum Antikörperauftreten bei gesunden Kontrollen.

Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ konnten signifikant häufiger bei ARDS Patienten mit abnormalen (erhöhten und erniedrigten zusammengenommen)

Leukozytenwerten (IgM  $p=0,0005$ , IgG  $p=0,4$ ) festgestellt werden als bei Patienten mit normwertigen Leukozytenwerten. Der Mittelwert der Leukozyten für die ARDS Patienten lag bei  $9913/\mu\text{l}$  (range 780-22840/ $\mu\text{l}$  Blut).

Die LDH konnte für alle ARDS Patienten bestimmt werden, durchschnittlich betrug sie 530 U/l (range 195-1768 U/l) und lag bei allen Patienten über dem Grenzwert von 250 U/l.

Die Reaktivitäten der IgG und IgM Anti-IL-1Ra AK in Relation zu verschiedenen klinisch erfassten Parametern sowie deren Ausprägungen sind in den Abbildung 7 bis Abbildung 9 dargestellt.

Es konnte eine signifikant höhere Reaktivität von IgG-Anti-IL-1Ra AK bei überlebenden als im Verlauf verstorbenen ARDS Patienten festgestellt werden (Abbildung 7).

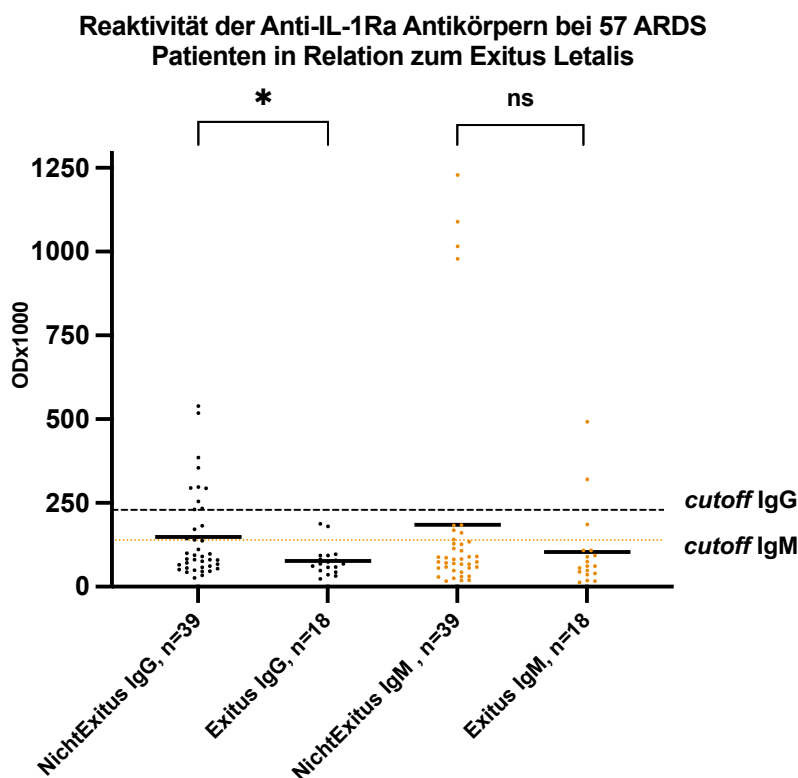


Abbildung 7: Reaktivität der Anti-IL-1Ra Antikörper bei 57 ARDS Patienten in Relation zum Exitus Letalis.

\*Signifikanz von  $p<0,05$  im Mann-Whitney Test im Vergleich der IgG-Anti-IL-1Ra Reaktivität zwischen verstorbenen und nicht verstorbenen ARDS Patienten ( $p=0,03$ ; MW Exitus=149, MW Nicht-Exitus=77). NS=nicht signifikant im Mann-Whitney Test im Vergleich der IgM-Anti-IL-1Ra AK Reaktivität zwischen verstorbenen und nicht verstorbenen ARDS Patienten ( $p=0,3$ ; MW Exitus=104; MW Kein-Exitus=184). Die durchgehenden Linien markieren die

Mittelwerte. Die gestrichelten Linien stellen den cutoff (IgG=229; IgM=139) dar. Abkürzung: OD=Optische Dichte.

Invasiv beatmet wurden 91% (52) der 57 ARDS Patienten. Die weiteren 9% der Patienten wurden nicht-invasiv beatmet.

Die Anzahl der Beatmungstage konnte für 47 Patienten bestimmt werden. Eine signifikante Korrelation zwischen der Dauer der invasiven Beatmung und dem Anti-IL-1Ra Antikörperstatus konnte nicht festgestellt werden (Vgl. Abbildung 8).

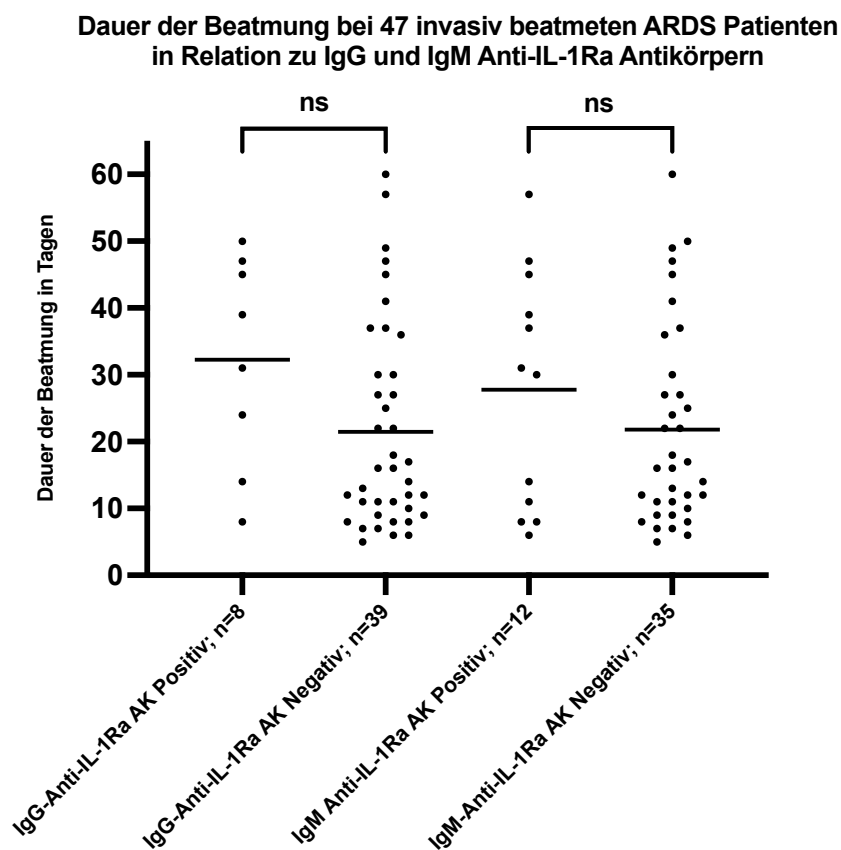


Abbildung 8: Dauer der Beatmung bei 47 invasiv beatmeten ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten.

Ns=nicht signifikant im Mann-Whitney Test (IgG  $p=0,07$ ; IgM  $p=0,4$ ) im Vergleich der Beatmungsdauer in Tagen zwischen Anti-IL-1Ra AK positiven und negativen invasiv beatmeten ARDS Patienten. Die durchgehenden Linien stellen die Mittelwerte dar. Die durchschnittliche Beatmungsdauer eines ARDS Patienten betrug 23 Tage (range 5-60).

Eine Kreislaufunterstützung im Rahmen einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) wurde bei über der Hälfte (54%, 31/57) der ARDS Patienten im Verlauf ihres Intensiv Aufenthaltes notwendig. Die Dauer der

ECMO konnte für 28 der 31 ECMO-Patienten bestimmt werden. Es fand sich kein signifikanter Unterschied für die Dauer der ECMO zwischen Anti-IL-1Ra AK positiven und negativen Patienten (Vgl. Abbildung 9).

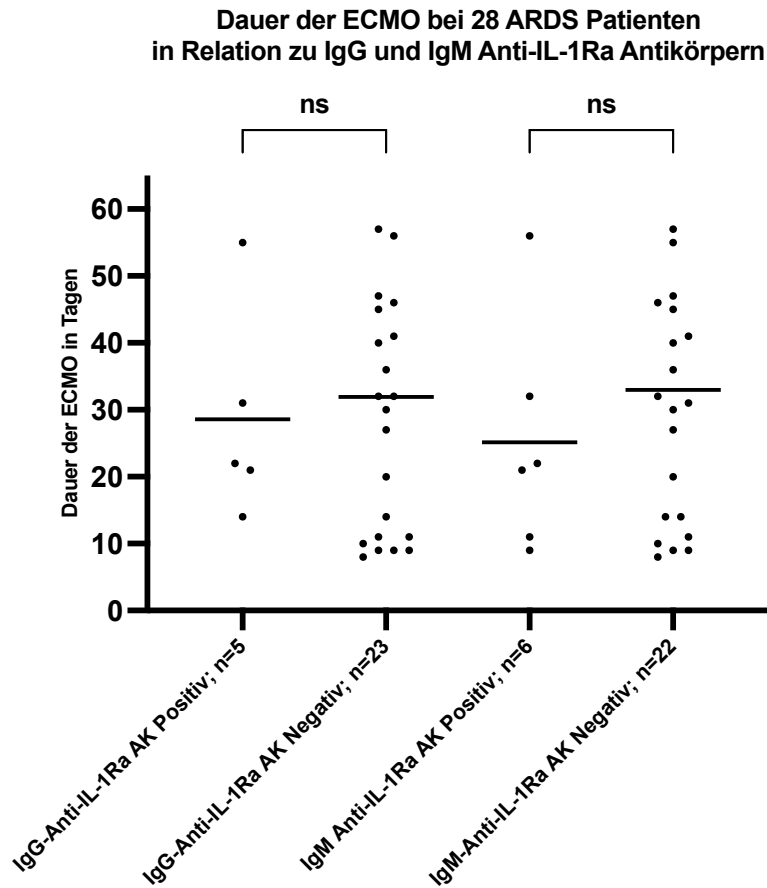


Abbildung 9: ECMO-Dauer bei 47 invasiv beatmeten ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten.

Ns=nicht signifikant im t-test (IgG  $p=0,7$ ; IgM  $p=0,3$ ) im Vergleich der ECMO-Dauer in Tagen zwischen Anti-IL-1Ra AK positiven und negativen ARDS Patienten. Die durchgehenden Linien stellen die Mittelwerte dar. Im Durchschnitt wurde eine ECMO 31 (range 8-74) Tage durchgeführt.

Das Auftreten von IgG und IgM Anti-IL-1Ra AK in unseren ARDS Patienten in Relation zu laborchemischen Parametern sind den Abbildungen Abbildung 10 und Abbildung 11 zu entnehmen.

Die Leukozytenzahl sowie die Laktatdehydrogenase konnten für jeden ARDS Patienten bestimmt werden. Ein signifikanter Unterschied der Leukozytenzahl

im Blutbild zwischen Anti-IL-1Ra AK positiven und negativen Patienten mit COVID-19 ARDS konnte nicht festgestellt werden (Vgl. Abbildung 10).

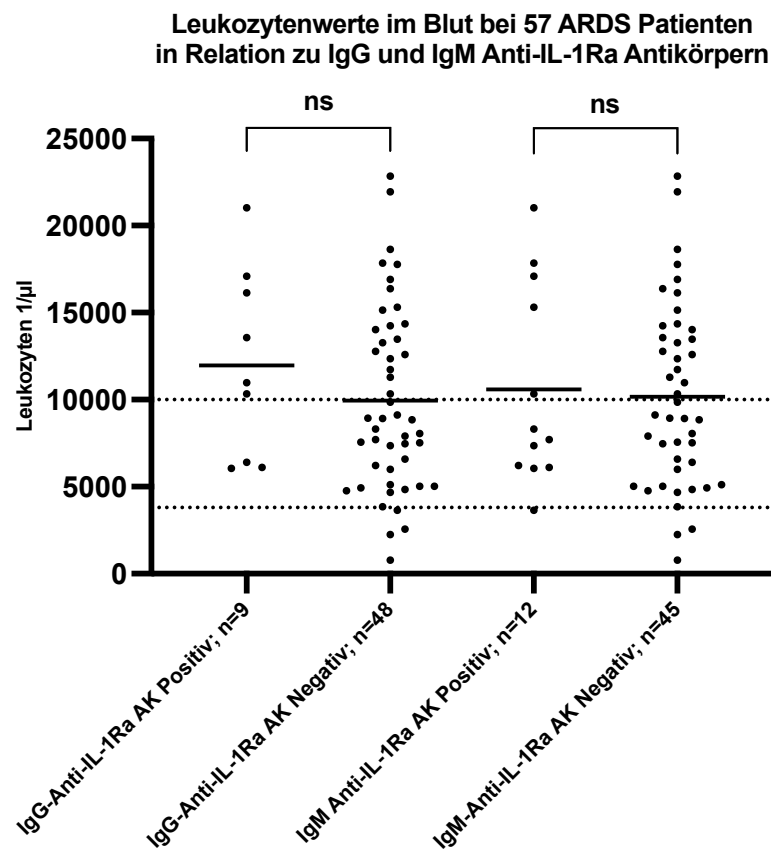


Abbildung 10: Leukozytenwerte bei 57 ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten.

Ns= nicht signifikant im t-Test (IgG  $p=0,29$ ; IgM  $p=0,81$ ) im Vergleich der Leukozytenwerte im Blut von antikörperpositiven und negativen ARDS Patienten. Die durchgehenden Linien entsprechen den Mittelwerten, die gepunkteten Linien zeigen den Normbereich für Leukozyten an.

Es konnte ebenso kein signifikanter Unterschied der LDH-Werte zwischen Anti-IL-1Ra AK positiven und negativen Patienten festgestellt werden (Vgl. Abbildung 11).

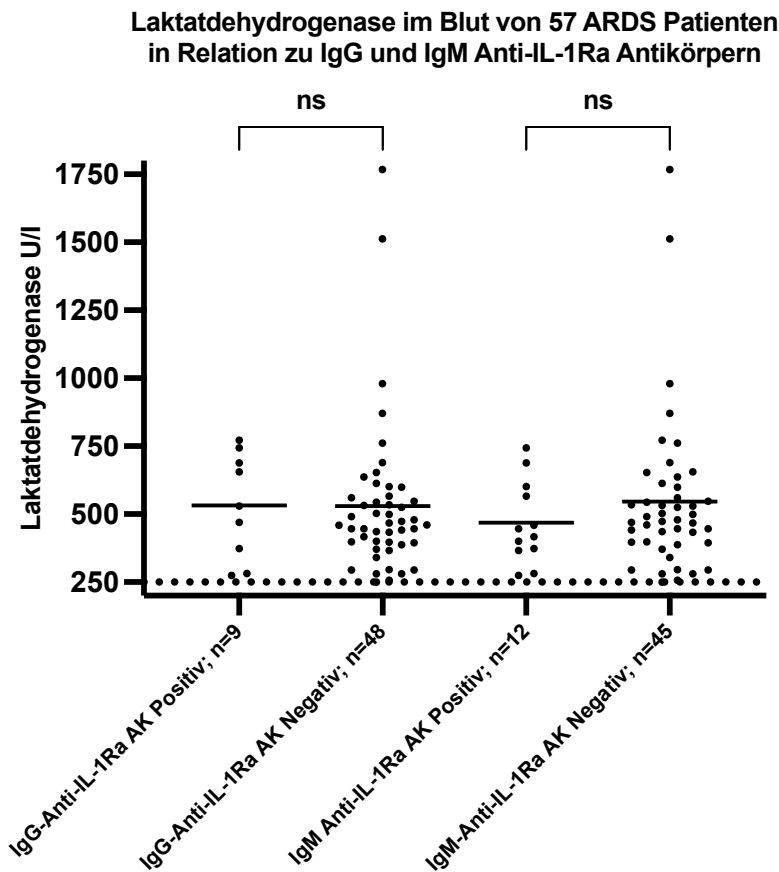


Abbildung 11: Laktatdehydrogenase bei 57 ARDS Patienten in Relation zum Antikörperauftreten.

Ns=nicht signifikant im Mann-Whitney Test (IgG  $p=0,5$ ; IgM  $p=0,4$ ) im Vergleich der Laktatdehydrogenase im Blut von antikörperpositiven und negativen ARDS Patienten. Die durchgehenden Linien entsprechen den Mittelwerten, die gepunkteten Linie zeigt den Grenzwert für die LDH an.

### 3.7 Korrelation der Anti-IL1Ra Antikörper mit laborchemischen Parametern bei Patienten mit akutem COVID-19

Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ traten bei 2, IgM-Antikörper bei 6 von 11 Patienten mit akuter COVID-19 Infektion auf (18% bzw. 54%). Die IgM-Antikörper waren damit signifikant häufiger bei COVID-19 Patienten als bei gesunden Kontrollen nachweisbar (Vgl. Tabelle 18). Hinsichtlich der Antikörperreaktivitäten fanden sich sowohl für IgG- wie für IgM-Antikörper signifikant höhere Werte als für gesunden Probanden (Abbildung 3).

Für keinen der stationär aufgenommenen, akuten COVID-19 Patienten war eine aktuelle oder vorangegangene Anakinra-Therapie in der digitalen Akte beschrieben. Der Vergleich der laborchemischen Parameter von COVID-19 Patienten mit und ohne Anti-IL1Ra Antikörpern ist in Tabelle 26 ersichtlich.

Tabelle 26: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit laborchemischen Parametern bei 10 Patienten mit akutem COVID-19.

Laborchemische Parameter		Anzahl Patienten	Anzahl (%) Anti-IL-1Ra-Antikörper positiv	
			IgG	IgM
Leukozyten in 1/ $\mu$ l (3800-10300)	Normwertig	5	1 (20)	4 (80)
	Erhöht	2	1 (50)	2 (100)
	Erniedrigt	3	0	0
Laktatdehydrogenase U/l (<250)	Normwertig	7	2 (28)	5 (71)
	Erhöht	3	0	1 (33)

Nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) im Chi-Square Test im Vergleich von Leukozyten- und LDH-Spiegeln zwischen antikörperpositiven und negativen akuten COVID-19 Patienten.

Die laborchemischen Parameter konnten für 10 der 11 Patienten ermittelt werden. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied im Auftreten von abnormen Leukozytenzahlen und abnormen Laktatdehydrogenase Werten zwischen IL-1Ra AK positiven und negativen Patienten feststellen.

In Abbildung 12 und Abbildung 13 ersichtlich sind die laborchemischen Parameter in Relation zum Anti-IL-1Ra Antikörperauftreten.

Hierbei zeigten sich signifikant höhere Leukozytenwerte bei akuten COVID-19 Patienten mit IgM-Anti-IL-1Ra Antikörpern als bei Patienten ohne IgM-Anti-IL-1Ra Antikörper (Abbildung 12). Eine signifikante Korrelation zwischen dem Anti-IL-1Ra Antikörperauftreten und der Laktatdehydrogenase als laborchemischen Parameter konnte nicht aufgezeigt werden (Vgl. Abbildung 13).

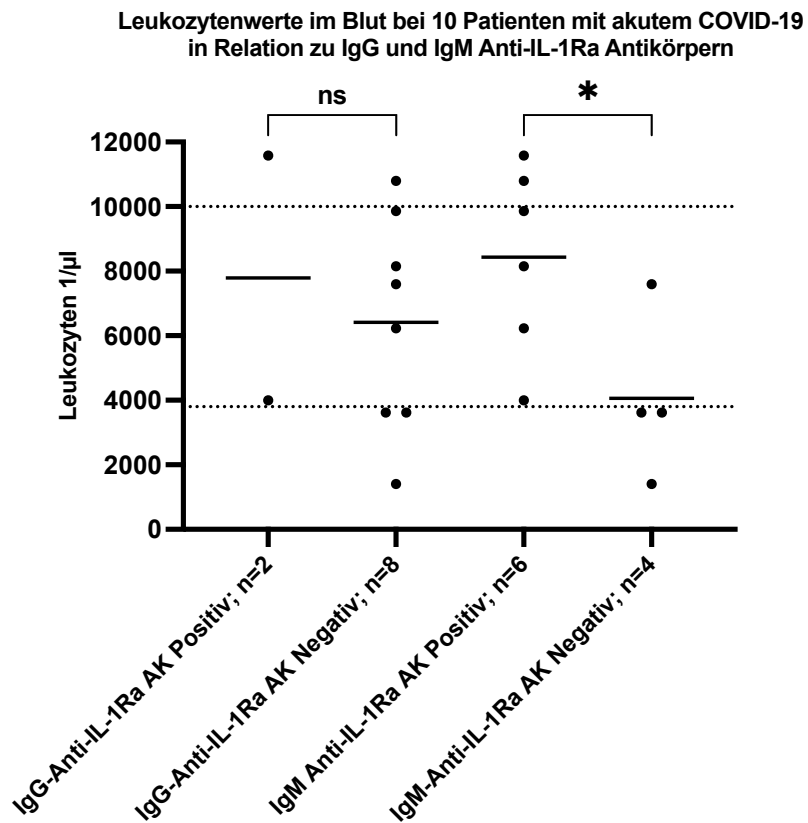


Abbildung 12: Leukozytenzahl im Blut von 10 akuten COVID-19 Patienten.

Dargestellt sind Leukozyten-Werte von 10 Patienten mit akutem COVID-19 in Relation zum Auftreten von IgG und IgM Anti-IL-1Ra Antikörpern. Ns=nicht signifikant im t-Test (IgG  $p=0,6$ ), \*Signifikanz im t-Test mit  $p<0,05$  (IgM  $p=0,04$ ) im Vergleich der Leukozyten zwischen IgM-Anti-IL-1Ra AK positiven zu negativen Patienten. Die durchgehenden Linien entsprechen den Mittelwerten, die gepunkteten Linien zeigen den Normbereich für Leukozyten an. Der MW der Leukozyten für alle Patienten lag bei 6687/ $\mu$ l Blut (range 3800-10300/ $\mu$ l Blut).

### Laktatdehydrogenase im Blut von 10 Patienten mit akutem COVID-19 in Relation zu IgG und IgM Anti-IL-1Ra Antikörpern

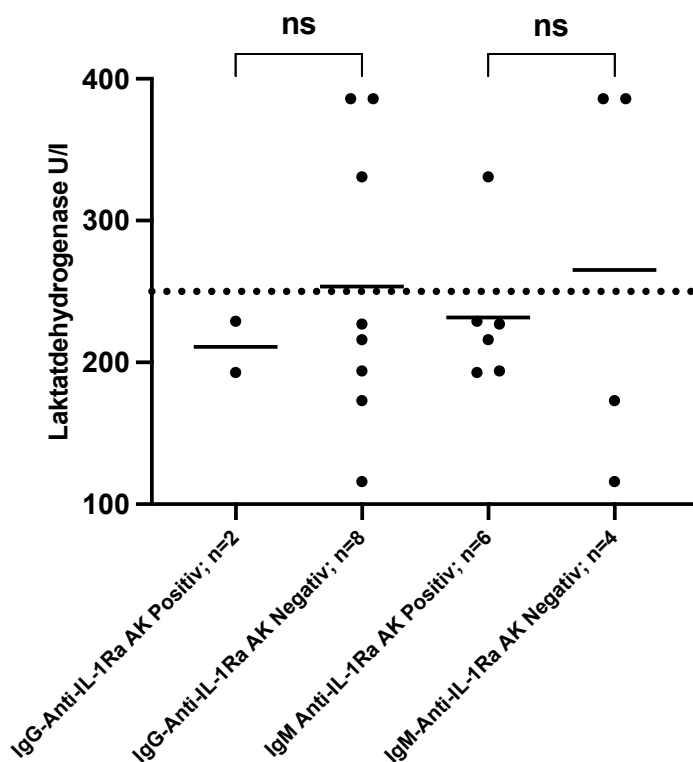


Abbildung 13: Laktatdehydrogenase im Blut von 10 Patienten mit akutem COVID-19.

Dargestellt sind die Werte der Laktatdehydrogenase von 10 Patienten mit akutem COVID-19 in Relation zum Auftreten von IgG und IgM Anti-IL-1Ra Antikörpern. *ns*=nicht signifikant im Mann-Whitney Test (IgG  $p=0,8$ ; IgM  $p>0,9$ ) im Vergleich der Laktatdehydrogenase im Blut von antikörperpositiven und negativen akuten COVID-19 Patienten. Die durchgehenden Linien entsprechen den Mittelwerten, die gepunktete Linie zeigt den Grenzwert für die LDH an. Die durchschnittliche LDH im Blut akuter COVID-19 Patienten betrug 245 U/l (*range* 116-386).

### 3.8 Korrelation der Anti-IL1Ra Antikörper mit klinischen und laborchemischen Parametern bei Patienten nach COVID-19 Infektion

In Tabelle 18 wird ersichtlich, dass für 17 der 127 Patienten nach vollständig ausgeheilter COVID-19 Infektion Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ nachweisbar waren (13%), 18 (14%) wiesen IgM-Antikörper auf.

Die Antikörperreaktivitäten sind in Abbildung 3 dargestellt.

Für die IgG-Anti-IL-1Ra Antikörper ergab sich im Vergleich zu den gesunden Probanden keine Unterschiede im Antikörperauftreten, jedoch konnten signifikant höhere IgG-Anti-IL-1Ra AK Reaktivitäten gemessen werden. Für Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ zeigten sich sowohl die Häufigkeit wie auch die Reaktivität der IgM-Antikörper signifikant höher bei Patienten nach ausgeheilter COVID-19 Infektion als bei den gesunden Probanden (Vgl. Tabelle 18 und Abbildung 3).

Eine Korrelation der Anti-IL-1Ra Antikörper mit den Wochenzeitpunkten nach positivem Abstrich für die 127 Personen ist in Tabelle 27 vorzufinden. Rund ein Viertel stammte von Personen 5 Wochen nach Infektion, ein weiteres Viertel stammte von Personen 6 Wochen nach Infektion.

5 Wochen nach Infektion gab es zwei Personen, die sowohl IgG-Anti-IL-1Ra AK als auch IgM-Anti-IL-1Ra AK aufwiesen. Auch in der 8. Woche nach Infektion hatte eine Person Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ. Insgesamt war zu den verschiedenen Zeiträumen nach COVID-19 Infektion keine signifikante Zu- oder Abnahme der IL-1Ra Antikörper zu beobachten. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Anti-IL-1Ra Antikörpern zwischen den Wochen nach Infektion festgestellt werden.

Tabelle 27: Auftreten der Anti-IL-1Ra-Antikörper zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach COVID-19 Infektion (entsprechend einem positiven PCR-Test) bei 127 Personen.

Wochen nach positivem PCR-Test	Anzahl Personen	Anzahl (%) Anti-IL-1Ra-Antikörper positiv	
		IgG	IgM
3-4	17	2 (12)	2 (12)
5	34	5 (15)	5 (15)
6	32	3 (9)	4 (12)
7	24	4 (17)	2 (8)
8	20	3 (15)	5 (25)

Aus Tabelle 28 zu entnehmen ist die Korrelation zwischen dem Antikörperauftreten und klinischen Parametern bei Personen nach COVID-19 Infektion. Personen mit starkem Krankheitsgefühl sowie mäßigem bis hohem Fieber während der COVID-19 Infektion wiesen signifikant häufiger Anti-IL-1Ra

AK vom IgG-Typ auf als Personen ohne Krankheitsgefühl und Personen ohne Fieber.

Tabelle 28: Korrelation von Anti-IL-1Ra Antikörpern mit klinischen Parametern und deren Ausprägung bei 127 Personen nach ausgeheilter COVID-19 Infektion.

Klinische Parameter		Anzahl Personen	Anzahl (%) Anti-IL-1Ra-Antikörper positiv	
			IgG	IgM
Symptome	Ja	119	16 (13)	17 (14)
	Nein	8	1 (12)	1 (12)
Krankheitsgefühl	Nein/Wenig	38	1 (3)	3 (8)
	Mäßig	61	9 (15)	10 (16)
	Stark	28	7 (25)**	5 (18)
Fieber	Nein	56	3 (5)	6 (10)
	Wenig	23	4 (17)	6 (26)
	Mäßig/Hoch	48	10 (21)*	6 (13)
Luftnot	Keine	91	12 (13)	14 (15)
	Wenig	19	2 (10)	3 (16)
	Mäßig/Stark	17	3 (18)	1 (6)
Stationäre Aufnahme erforderlich	Ja	3	0	0
	Nein	122	17 (14)	16 (13)
Immunsuppressive Therapie	Ja	7	1 (14)	1 (14)
	nein	120	16 (13)	17 (14)

\*Signifikanz von  $p=0,03$  im Fishers Exact Test im Vergleich zu Personen ohne Fieber.

\*\*Signifikanz von  $p<0,01$  im Fishers Exact Test im Vergleich zu Personen ohne Krankheitsgefühl.

Die Mehrheit der Personen nach COVID-19 berichtete über Fieber während ihrer Erkrankung (Vgl. Tabelle 29). Hierbei unterschied sich die maximal gemessene Temperatur signifikant zwischen Personen mit Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ und seronegativen Personen.

Tabelle 29: Korrelation zwischen Körpertemperatur und Antikörperauftreten bei Personen nach ausgeheilter COVID-19 Infektion.

	<b>IgG Positiv n=17</b>	<b>IgG Negativ n=110</b>
Temperatur Mittelwert in °C (SD)	38,5* (0,70)	38,1 (0,75)
	<b>IgM Positiv n=18</b>	<b>IgM Negativ n=109</b>
Temperatur Mittelwert in °C (SD)	38,1 (0,63)	38,2 (0,78)

\* Signifikanz von  $p=0,023$  im t-Test im Vergleich zu Patienten ohne IgG-Anti-IL-1Ra AK.

### **3.9 Anti-IL1Ra Antikörper bei Patienten mit Post-Covid**

Bei 4 der 26 Patienten mit Post-Covid (15 %) konnten Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ nachgewiesen werden (siehe Tabelle 18). Das Auftreten von IgM-Anti-IL-1Ra AK im Vergleich zu den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,08$ ). Keiner der Post-Covid Patienten wies Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ auf.

Die Antikörperreaktivitäten der Post-Covid Patienten sind in Abbildung 3 ersichtlich; die IgG-Antikörperreaktivitäten waren hierbei signifikant erniedrigt im Vergleich zu gesunden Probanden.

### **3.10 Verlauf der Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen und Anakinra-Therapie**

Bei allen Patienten, welche auf Anti-IL-1Ra AK untersucht wurden, war eine autoinflammatorische Erkrankung bekannt (bzw. bei einem Patienten im Verdacht, Vgl. Tabelle 30). Bei der Hälfte der untersuchten Patienten unter Anakinra-Therapie wurde ein adultes Still-Syndrom diagnostiziert. Die meisten Anti-IL-1Ra AK konnten in den Seren von Patienten mit Adultem Still-Syndrom und FMF nachgewiesen werden.

Tabelle 30: Häufigkeit von Anti-IL-1RA Antikörpern bei 22 Patienten und 68 Seren mit verschiedenen Erkrankungen unter Anakinra-Therapie.

Diagnose	Anzahl Patienten	Anzahl Seren getestet	Anzahl (%) Anti-IL-1Ra positiv von den jeweils getesteten Seren	
			IgG	IgM
Adultes Still-Syndrom	11	31	11 (35) <sup>***</sup>	8 (25) <sup>**</sup>
FMF	5	20	12 (60) <sup>****</sup>	10 (50) <sup>****</sup>
TRAPS	2	5	0	0
MAS	2	5	3 (60) <sup>**</sup>	1 (20)
MWS	1	4	3 (75) <sup>**</sup>	1 (25)
Unklare AID	1	3	0	0

Signifikanz im Fishers Exact Test im Vergleich zu gesunden Probanden mit \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Von den 22 Patienten, die mit Anakinra behandelt wurden, konnten 68 Seren getestet werden. In 29 (43%) der Seren waren zu mindestens einem Zeitpunkt Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ und in 20 (30%) Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ nachweisbar. In 18 Seren waren sowohl Antikörper vom IgG- als auch vom IgM-Typ nachweisbar (doppelt-positiv). Das Vorkommen von Anti-IL-1Ra vom IgG- und IgM-Typ wies bei Patienten unter Anakinra-Therapie einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf (Vgl. Tabelle 31).

Tabelle 31: Antikörperraufreten in der Anakinra-Gruppe.

Seren n=68	Positiv (%)	Fisher's Exact vs. Kontrollen
IgG	29 (43)	$p < 0,0001$ <sup>****</sup>
IgM	20 (29)	$p < 0,0001$ <sup>****</sup>

Die gemessenen Reaktivitäten der Patienten unter Anakinra-Therapie unterschieden sich für Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ signifikant von den Reaktivitäten der Anti-IL-1Ra AK gesunder Kontrollen (Vgl. Abbildung 14).

**Reaktivität von Anti-IL-1Ra Antikörpern bei Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen und Anakinra-Therapie**

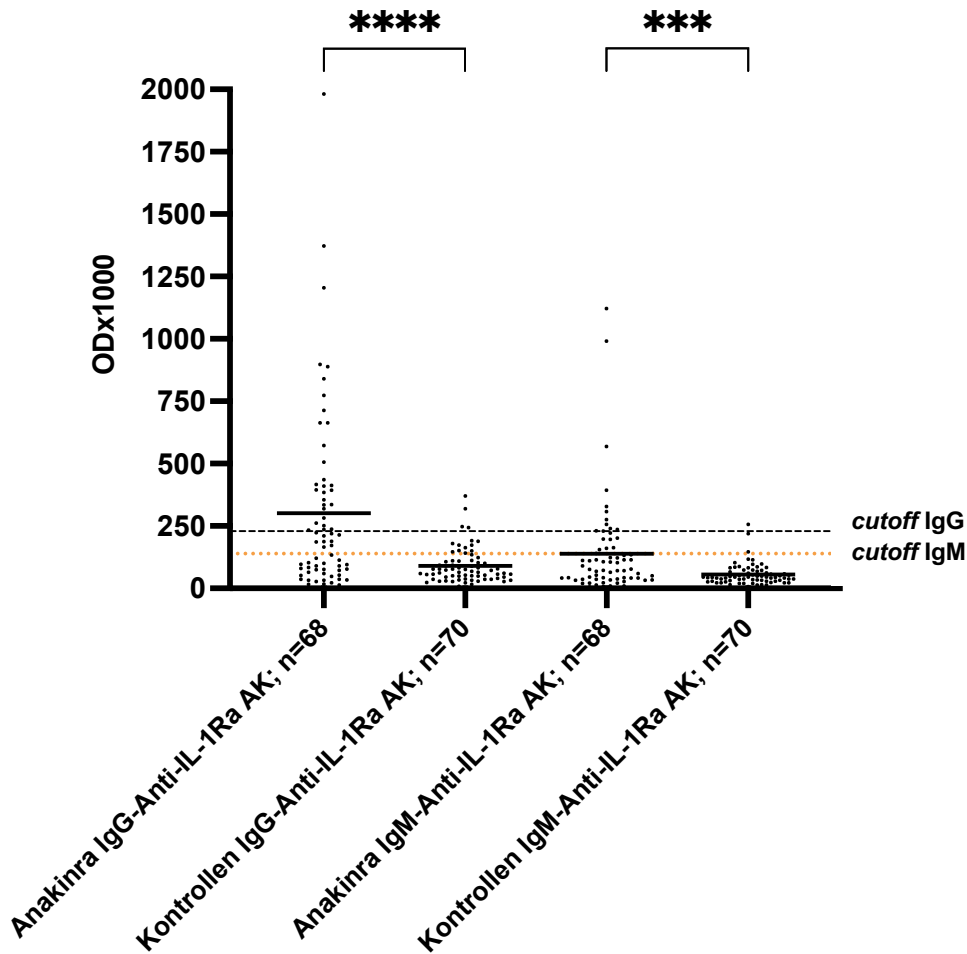


Abbildung 14: Reaktivität von Anti-IL-1Ra Antikörpern in 68 Seren von Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen und Anakinra-Therapie.

\*\*\*\*Signifikanz von  $p < 0,0001$  im Mann-Whitney Test im Vergleich der IgG Reaktivität von Anakinra-Patienten (MW 301, Median 188 ODx1000) zu gesunden Kontrollen.

\*\*\* Signifikanz von  $p < 0,0006$  im Mann-Whitney Test im Vergleich der IgM Reaktivität von Anakinra-Patienten (MW 139, Median 76) zu gesunden Kontrollen. Die durchgezogene Linie stellt den Mittelwert dar. Die gestrichelten Linien stellen den *cutoff* dar (IgG=229; IgM 129). Abkürzung: OD=Optische Dichte.

Zudem wurde das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten untersucht (Vgl. Tabelle 32 und Abbildung 15). Hierbei konnten in den Seren unter Anakinra-Therapie signifikant häufigere Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM- Typ verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch zeigten die Seren vor Therapiebeginn mit Anakinra ein signifikant

häufigeres Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ im Vergleich zu den Kontrollen.

Tabelle 32: Antikörperauftreten zu verschiedenen Therapiezeitpunkten in 62 Seren von Patienten, die mit Anakinra therapiert wurden.

Status Anakinra-Therapie	Anzahl Seren	Anzahl (%) Anti-IL-1Ra Antikörper positiv	
		IgG	IgM
Vor Therapie	19	7 (37)**	4 (21)*
Während Therapie	46	21 (46)***	15 (32)***
Nach Therapie	3	1 (33)	1 (33)

Signifikanz im Fisher Exact Test gegenüber gesunden Kontrollen mit \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Die Häufigkeit der Anti-IL-1Ra Antikörper unterschied sich während oder nach der Anakinra-Therapie nicht signifikant von der Häufigkeit vor Therapie.

Die Krankheitsaktivität in Form von Krankheitsschüben pro Jahr ist in Tabelle 33 dargestellt. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Krankheitsschübe zwischen Seren mit Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ (p=0,87) oder IgM-Typ (p=0,6) im Vergleich zu Seren ohne Anti-IL-1Ra AK Nachweis.

Tabelle 33: Häufigkeit von Krankheitsschüben bei 68 Seren von 22 Patienten mit AID zu verschiedenen Zeitpunkten der Anakinra-Therapie.

Schübe pro Jahr	Anzahl (%) Seren von Patienten mit Schüben		
	Vor Therapie; n=19	Während Therapie; n=46	Nach Therapie; n=3
0	0	33 (72)	0
1	7 (37)	5 (11)	0
2	1 (5)	0	0
3	2 (11)	0	0
4	0 (0)	1 (2)	0
5	0 (0)	1 (2)	0
6	1 (5)	2 (4)	0
12	4 (21)	1 (2)	1 (33)
<b>Gesamt &gt; 1 Schub</b>	15 (79)	10 (22)*	1 (33)

<i>Fehlende Angaben</i>	4 (21)	3 (7)	1 (67)
-------------------------	--------	-------	--------

\* unter Therapie war die Schubhäufigkeit signifikant niedriger als vor der Therapie.

In Tabelle 34 ersichtlich ist eine Verlaufsübersicht der Anakinra-Antikörper verschiedener, mindestens einmalig Anti-IL-1Ra AK seropositiver Patienten.

Tabelle 34: Anakinra-Antikörper im Verlauf bei 14 beispielhaften Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen.

ID	Geschlecht	Diagnose	Beginn Anakinra	Follow-Up (Monate)	Reaktivität Anti-IL-1Ra AK (ODx1000)	
					IgG	IgM
151	m	Adultes Still-Syndrom	Mär 19	+2	395*	569*
				+15	210	42
				+25	166	42
152	w	Adultes Still-Syndrom	Jun 21	0	1205*	196*
				+3	1982*	1122*
				+6	773*	222*
153	m	Adultes Still-Syndrom	Okt 20	-2	48	64
				+6	393*	114
				+16	186	115
20	w	FMF	Mär 21	-4	36	43
				+3	506*	236*
				+9	385*	135
155	w	FMF	Mai 21	-40	714*	105
				+4	889*	328*
				+9	840*	140
156	w	Adultes Still-Syndrom	Okt 13	+1	238	257*
				+14	80	107
				+38	75	112
157	m	Adultes Still-Syndrom	Mai 21	0	90	34
				+4	1373*	122

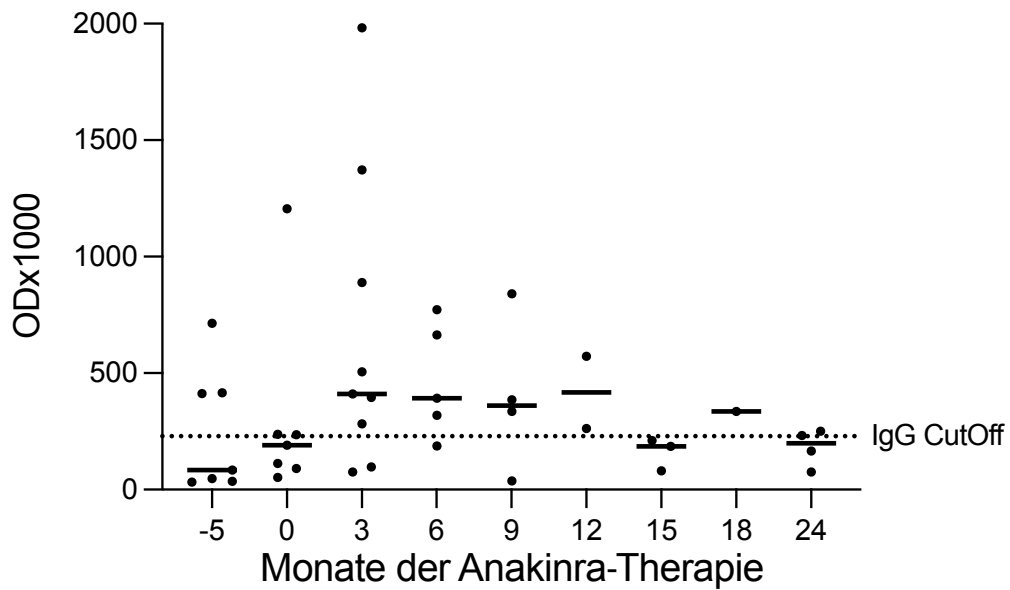
				+10	336*	76
159	w	Adultes Still-Syndrom	Feb 13	+7	188	123
				+13	262*	111
				+92	251*	163*
161	m	Rheumatoide Arthritis / Adultes Still-Syndrom	Mär 21	-2	32	27
				0	113	133
				+2	76	240*
				+10	37	0
163	m	FMF	Dez 20	-3	413*	72
				+7	319*	393*
			Nov 21	0	189	198*
				+4	282*	201*
10	m	FMF	Jul 19	-13	84	10
				0	53	6
				+9	664*	308*
				+11	573*	276*
				+18	335*	231*
				+24	233	161
				+32	172	115
164	m	MAS / RA / SLE / T-NHL	Jan 21	-24	416*	7
				-4	897*	230*
				+1	410*	38
165	m	Adultes Still-Syndrom	Nov 19	0	236*	991*
				+1	97	60
166	w	MWS	Okt 06-	-1	664*	156*
			April 07	+6	436*	32
			nach Therapie	++3	223	9
			nach Therapie	++9	355*	13

\*als positiv gewertete Antikörperreaktivität. Basis hierfür bilden die Mittelwerte der gemessenen Anti-IL-1Ra AK Reaktivität 70 gesunder Kontrollen plus die zweifache

Standardabweichung. Der daraus berechnete *cutoff* beträgt für IgG 229 und IgM 139 (ODx1000). - = vor Therapie; + = während Therapie; ++ = nach Therapie.

In Abbildung 15 ist der zeitlich-dynamische Verlauf der Anakinra-Antikörperreaktivitäten zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten dargestellt.

### Verlauf von IgG-Anti-IL-1Ra Antikörpern in 68 Seren von Patienten unter Anakinra-Therapie



### Verlauf von IgM-Anti-IL-1Ra Antikörpern in 68 Seren von Patienten unter Anakinra-Therapie

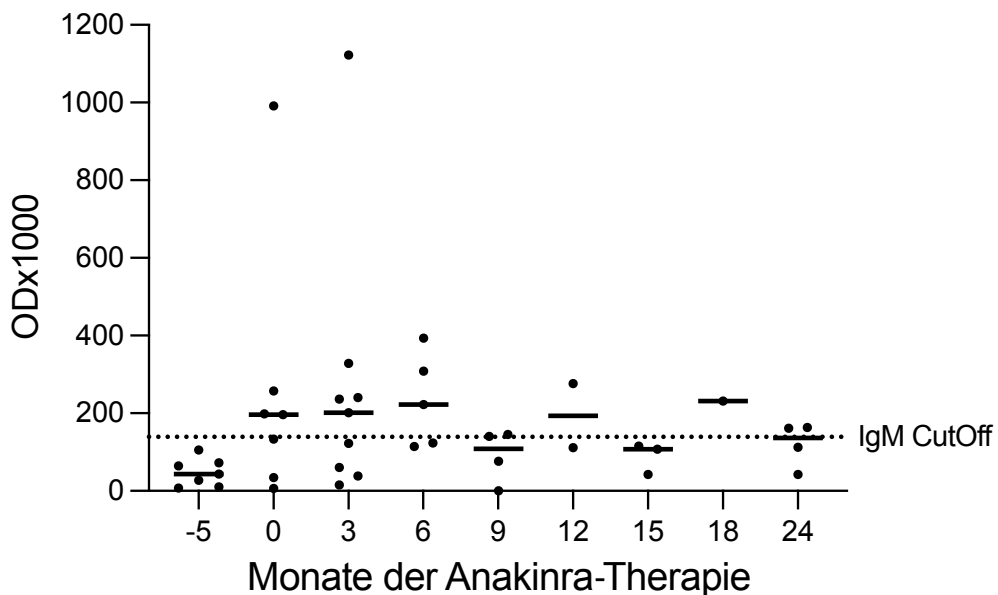


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf von Anti-IL-1Ra Antikörpern in 68 Seren von Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen unter Anakinra-Therapie.

Die gestrichelte Linie stellt den *cutoff*, die durchgehende Linie den Median dar. Der *cutoff* beträgt für IgG 229 und IgM 139 (ODx1000). Abkürzungen: OD= Optische Dichte.

### 3.11 Nachweis von Anti-IL-1Ra-Antikörpern im Western Blot

Die im ELISA nachweisbaren Anti-IL-1Ra Antikörper ließen sich auch mittels Western Blot verifizieren; mit Anti-IL-1Ra positiven Seren war bei Verwendung von Anakinra als Antigen eine spezifische Determinante bei 17 kD nachweisbar (Abbildung 16).



Abbildung 16: Nachweis von Anti-IL-1Ra Antikörpern mittels Western Blot mit Anakinra als Antigen.

- Spalte 1: IgG positives Serum (ODx1000= 700);
- Spalte 2: IgG positives Serum (ODx1000= 539);
- Spalte 3: IgG und IgM positives Serum (ODx1000= 518, 979) ;
- Spalte 4: IgG negatives Serum (ODx1000=59) ;
- Spalte 5: Negativkontrolle ohne Serum, nur mit Anti-IgG AK ;
- Spalte 6: IgM positives Serum (ODx1000=579) ;
- Spalte 7: IgM positives Serum (ODx1000=1089) ;
- Spalte 8: IgM negatives Serum (ODx1000=49) ;
- Spalte 9: Negativkontrolle ohne Serum, nur mit Anti-IgM AK.

Mit Stern sind die als spezifisch interpretierten Banden auf der Höhe bei ca. 17kD markiert. BioRad Precision Plus Protein Dual-Xtra Standards, Criterion 4-20% Tris HCL.

### 3.12 Zusammenfassung der Ergebnisse

#### ***Vorkommen der Anti-IL-1Ra Antikörper***

Das Auftreten von IgM- und IgG-Anti-IL-1Ra AK, definiert als die Mittelwerte plus die zweifache Standardabweichung der Anti-IL-1Ra Antikörperreaktivität 70 gesunder Kontrollen, unterschied sich für die AID und COVID-19 Gruppe zusammengefasst nicht signifikant im Vergleich zu den Kontrollen (Für IgG-Anti-IL-1Ra AK 8% positive Patienten vs. 6% positive Kontrollseren, für IgM-Anti-IL-1Ra AK 9% positive Patienten vs. 4% positive Kontrollseren). Betrachtet man jedoch die Patientengruppen im Einzelnen, so konnte ein signifikant häufigeres Auftreten von IgM-Anti-IL-1Ra AK bei Patienten mit TRAPS, ARDS und akuter sowie durchgemachter COVID-19 Infektion, verglichen mit gesunden Blutspendern, festgestellt werden. Keine der Patientengruppen wies ein signifikant häufigeres Auftreten von IgG-Anti-IL-1Ra AK im Vergleich zu gesunden Blutspendern auf.

Die gemessenen Absorptionswerte der 367 AID und COVID-19 Patienten unterschieden sich zusammengefasst sowohl für Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ ( $p=0,04$ ), als auch für Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ ( $p<0,001$ ) signifikant zu den Absorptionswerten der Kontrollgruppe.

In der Anakinra-Verlaufsgruppe wiesen 43% ( $n=68$ , 29) der Seren Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ und 29% ( $n=68$ , 20) Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ auf und zeigten hiermit einen signifikanten Unterschied zu gesunden Kontrollen ( $p<0,0001$ ). Ebenso signifikant erhöht waren die gemessenen Reaktivitäten für IgG Anti-IL-1Ra AK ( $p<0,0001$ ) und IgM Anti-IL-1Ra AK ( $p=0,0006$ ) in der Anakinra-Verlaufsgruppe.

#### ***Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit Autoinflammatorischen Erkrankungen***

In der FMF-Gruppe unterschieden sich die gemessenen Reaktivitäten von IgM-Anti-IL-1Ra AK signifikant zu den Kontrollen ( $p=0,0011$ ). Kein signifikanter Unterschied konnte für klinische und laborchemische Parameter der

Krankheitsaktivität (Schubfrequenz pro Jahr, CLP und SAA) zwischen Anti-IL-1Ra AK positiven Patienten und seronegativen Patienten festgestellt werden. Bei den 97 FMF Patienten konnte zusammengefasst kein häufigeres Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ als bei gesunden Blutspendern beobachtet werden, jedoch traten bei 100% (n=3) der FMF Patienten unter bestehender Anakinra-Therapie IgG-Anti-IL-1Ra AK auf, was sich signifikant zu den gesunden Kontrollen unterscheidet.

CAPS-Patienten wiesen kein vermehrtes Auftreten von Anti-IL-1Ra AK im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Krankheitsaktivität (CLP, SAA) oder Medikamenteneinnahme und AK-Auftreten festgestellt werden. Die gemessene Reaktivität von IgG war signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Reaktivitäten gesunder Kontrollen.

Von den vier untersuchten TRAPS Patientinnen wies eine Patientin Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ auf; diese doppelt-positive Patientin wies gleichzeitig auch die höchste Krankheitsintensität mit 12 Schüben pro Jahr auf. Eine der vier TRAPS Patientinnen erhielt Anakinra als Medikation und wies keine Anti-IL-1Ra Antikörper auf. Eine weitere TRAPS Patientin wurde positiv auf IgM-Anti-IL-1Ra AK getestet. In der Summe unterschied sich lediglich das Auftreten von IgM-Anti-IL-1Ra AK signifikant zu den Kontrollen. Die gemessenen Antikörperreaktivitäten unterschieden sich nicht signifikant zu den Kontrollen.

### ***Anti-IL-1Ra Antikörper bei COVID-19 Patienten***

Für die von uns untersuchten ARDS Patienten unterschied sich das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ signifikant im Vergleich zu den Kontrollen (21% vs. 4%,  $p=0,0049$ ). Auch die Reaktivitäten für IgM-Anti-IL-1Ra AK unterschieden sich signifikant zu den Kontrollen (MW ODx1000 IgM 159 vs. 55,  $p=0,0001$ ). Das Auftreten sowie die Reaktivität von IgG-Antikörpern unterschieden sich nicht signifikant zu gesunden Kontrollen. 7% (4/57) der Patienten wurden sowohl auf Anti-IL-1Ra AK vom IgG- als auch vom IgM-Typ getestet und waren somit doppelt-positiv.

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Anti-IL-1Ra Antikörpern zwischen Patienten mit letalem und nicht-letalem Verlauf, invasiv und nicht-invasiv Beatmeten sowie Patienten mit und ohne Notwendigkeit einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) festgestellt werden. Die laborchemischen Parameter betreffend, zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Anti-IL-1Ra AK und der Laktatdehydrogenase im Blut. Jedoch konnten Anti-IL-1Ra Antikörper vom IgM-Typ signifikant häufiger bei Patienten mit erhöhten oder erniedrigten (abnormen) Leukozytenwerten im Blut als bei Patienten mit normwertigen Leukozyten beobachtet werden.

Bezüglich der Korrelation der Anti-IL-1Ra Antikörperreaktivitäten in Relation zu klinisch erfassten Parametern konnte lediglich eine erhöhte IgG-Anti-IL-1Ra Reaktivität bei Patienten, die das COVID-19-bedingte ARDS überlebten, als bei im Verlauf verstorbenen Patienten beobachtet werden. Eine weitere Korrelation der Antikörperreaktivität mit Parametern der invasiven Beatmung, ECMO sowie Leukozytenwerten im Blut konnte für ARDS Patienten nicht festgestellt werden.

In der Gruppe von Patienten mit akuter, stationär behandlungsbedürftiger COVID-19 Infektion unterschied sich das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ signifikant im Vergleich zu den Kontrollen ( $p=0,0001$ ). Die Reaktivität der Anti-IL-1Ra Antikörper unterschied sich sowohl für IgG-Antikörper (MW ODx1000=208,  $p=0,001$ ), als auch für IgM-Antikörper (MW ODx1000=257,  $p=0,0003$ ), signifikant von gesunden Blutspendern.

Es zeigten sich signifikant höhere Leukozytenwerte im Blut akuter COVID-19 Patienten, die IgM-Anti-IL-1Ra Antikörper aufwiesen, als bei seronegativen Patienten. Eine Korrelation des Antikörperauftretens mit dem laborchemischen Parameter der LDH konnte nicht beobachtet werden.

In der Patientengruppe nach ausgeheilter COVID-19 Infektion unterschied sich das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ signifikant zu den Kontrollen ( $p=0,03$ ). Die Reaktivitäten für IgG-Anti-IL-1Ra AK (MW ODx1000=165,  $p<0,001$ ) und IgM-Anti-IL-1Ra AK (MW ODx1000=91,  $p=0,0019$ ) unterschieden sich beide

signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Ein signifikanter Unterschied im Auftreten der Anti-IL-1Ra Antikörper zwischen den Wochenzeitpunkten nach positivem Abstrich konnte nicht verzeichnet werden. Bei Patienten nach COVID-19 Infektion, die während ihrer symptomatischen Phase ein subjektiv starkes Krankheitsgefühl angaben, konnten signifikant häufiger IgG-Anti-IL-1Ra AK vorgefunden werden als bei Patienten ohne Krankheitsgefühl. Ähnlich dazu konnte bei Patienten nach COVID-19 Infektion, die mäßiges bzw. hohes Fieber während der symptomatischen Phase angaben, signifikant häufiger IgG-Anti-IL-1Ra AK nachgewiesen werden als bei Patienten ohne Fieber. Bei Patienten mit nachgewiesenen IgG-Anti-IL-1Ra AK ließ sich eine signifikante höhere maximale Fiebertemperatur ( $38,5^{\circ}\text{C}$  vs.  $38,1^{\circ}\text{C}$ ,  $p=0,023$ ) während des symptomatischen Intervalls feststellen.

Bei Post-Covid Patienten konnte im Vergleich zu den Kontrollen kein signifikantes Auftreten von Anti-IL-1Ra AK beobachtet werden (IgM-Anti-IL-1Ra 15%,  $p=0,08$ ; IgG-Anti-IL-1Ra AK nicht vorhanden). Die Reaktivitäten von Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht erhöht.

### ***Anti-IL-1Ra Antikörper in der Anakinra-Patientengruppe***

In der Gruppe mit Patienten unter Anakinra-Therapie konnte in 43% der Seren Anti-IL-1Ra (Anakinra) AK vom IgG-Typ und in 29% der Seren Anti-IL-1Ra (Anakinra) AK vom IgM-Typ nachgewiesen werden. Somit unterschied sich das Auftreten von Anakinra AK sowohl für IgG-Anti-IL-1Ra AK ( $p<0,0001$ ), als auch für IgM-Anti-IL-1Ra AK ( $p<0,0001$ ) signifikant zu gesunden Kontrollen. Prozentual die meisten Anti-IL-1Ra AK konnten bei Patienten mit adultem Still-Syndrom (38% der IgG-Anti-IL-1Ra AK und 40% der IgM-Anti-IL-1Ra AK) und FMF Patienten (42% der IgG-Anti-IL-1Ra AK und 50% IgM-Anti-IL-1Ra AK) nachgewiesen werden.

Zudem unterschieden sich die Antikörperreaktivitäten für die Patienten der Anakinra-Verlaufgruppe signifikant für IgG-Anti-IL-1Ra AK ( $p < 0,0001$ ) und für IgM-Anti-IL-1Ra AK ( $p = 0,0006$ ) zu gesunden Kontrollen.

Das Vorkommen von Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ unterschied sich sowohl für Seren vor Anakinra-Therapiebeginn (37% IgG-Anti-IL-1Ra AK positiv,  $p = 0,0014$ ; 21% IgM-Anti-IL-1Ra AK positiv,  $p = 0,0352$ ), als auch für Seren während der Therapie (46% IgG-Anti-IL-1Ra AK positiv,  $p < 0,0001$ ; 32% IgM-Anti-IL-1Ra AK positiv,  $p < 0,0001$ ), signifikant zu den gesunden Probanden.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Anti-IL-1Ra AK und einer vermehrten Krankheitsaktivität in Form von Schüben pro Jahr festgestellt werden.

In der Verlaufsuntersuchung der Antikörperreaktivitäten konnte beobachtet werden, dass Anti-IL-1Ra Antikörper unter Anakinra-Therapie tendenziell anfangs stärker auftreten und im zeitlichen Verlauf abnehmen.

### ***Western Blot***

Im Western Blot konnte das Vorhandensein von Anti-IL-1Ra AK mit einer zweiten Methode bestätigt werden. Zudem war eine Abgrenzung zu Anti-IL-1Ra AK negativen Seren möglich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit Autoinflammatorischen Syndromen

Antikörper gegen den rekombinanten IL-1-Rezeptorantagonisten Anakinra wurden bei verschiedenen autoinflammatorischen Erkrankungen (AID) beschrieben. Es zeigen sich hierbei widersprüchliche Ergebnisse.

Wikén et al.<sup>[67]</sup> untersuchten *Anti-Drug-Antibodies* (ADA) gegen Anakinra bei 43 CAPS Patienten, wovon der Großteil (83%) mindestens einmal positiv auf ADA getestet wurde, davon die meisten innerhalb der ersten drei Monaten (79%). Dabei gab es keinen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von ADA und unerwünschten Nebenwirkungen oder therapeutischer Effektivität. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Illowite et al.<sup>[30]</sup> bei der Juvenilen Idiopathischen Arthritis; sie beschrieben bei rund drei Viertel der Patienten nicht-neutralisierende Anti-IL-1Ra AK. 6% der Patienten mit neutralisierenden AK zeigten in dieser Studie kein Ansprechen auf die Anakinra-Therapie. Neutralisierende AK sind auch in einem Patienten ohne Anakinra-Therapie nachgewiesen worden.

Fleischmann et al.<sup>[24]</sup> wiesen bei der Hälfte der Patienten unter Anakinra-Therapie Anakinra-bindende AKs nach, davon waren knapp 2% neutralisierend. Die Hälfte der Patienten mit neutralisierenden AKs berichteten von einem Krankheitsprogress.

Dem entgegen steht ein deutlich selteneres Auftreten von AK in der Studie von Cohen et al.<sup>[12]</sup>, bei der 2,7% der Patienten mit Rheumatoider Arthritis unter Methotrexat und Anakinra-Therapie einmalig seropositiv waren. Auch hier zeigte sich ein Patient (1,8%) ohne Therapie seropositiv. Es konnte keine Korrelation zwischen der Klinik und dem Auftreten von neutralisierenden AK gezeigt werden.

Das beobachtete Auftreten von IgG- oder IgM-Anti-IL-1Ra AK in unseren Seren der Patienten aus der Anakinra-Gruppe ist mit 44% Seropositivität ähnlich den Ergebnissen von Fleischmann et al. einzuordnen. In unserer Studie waren 43% der Seren IgG-Anti-IL-1Ra AK und 30% IgM-Anti-IL-1Ra AK positiv, eine

Unterscheidung zwischen den Typen von Immunglobulinen war in der genannten Literatur nicht ersichtlich. Die niedrige Antikörperprävalenz in der Studie von Cohen et al. könnte einen Zusammenhang mit der Methotrexat Ko-Therapie vermuten lassen.

Entgegen der Studie von Wikén et al. konnte ein vermehrtes Anti-IL-1Ra AK Auftreten auch über mehrere Monate hinaus beobachtet werden. Interessant ist zudem, dass bei einem Patienten mit Muckle-Wells-Syndrom (MWS) Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ auch 9 Monate nach Beendigung der Therapie mit Anakinra vorgefunden wurden. Für unsere Patienten konnte sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Anti-IL-1Ra AK bzw. ADA und einer vermehrten Krankheitsaktivität feststellen lassen. Dies könnte durch eine fehlende Neutralisierungsfähigkeit der vorgefundenen Anti-IL-1Ra AK erklärt werden.

In der Studie von Wikén et al.<sup>[67]</sup> wird erwähnt, dass gelegentlich ADA gegen Anakinra auch in Seren Anakinra-naiver, gesunder Blutspender vorgefunden wurden. Auch dies entspricht unseren Beobachtungen von rund 10% gesunder Kontrollen mit Anti-IL-1Ra AK.

In diesem Maße bisher unbeschrieben war das Auftreten von Anakinra-bindenden AK bzw. AK gegen den physiologischen IL-1-Ra bei Autoinflammatorischen Syndromen und COVID-19, unabhängig von einer bestehenden Therapie mit Anakinra. Hier konnten wir mit einem Gesamtaufreten von 9% IgM-Anti-IL-1Ra AK und 8% IgG-Anti-IL-1Ra AK keinen statistisch signifikanten Unterschied zu der Kontrollgruppe zeigen. Im Detail zeigte sich jedoch bei Patienten aus den TRAPS, ARDS, akute COVID-19, sowie Zustand nach COVID-19 Gruppen ein statistisch häufigeres Auftreten von Anakinra-bindenden AK, jedoch nur den IgM Subtyp betreffend. Das Auftreten von IgG-Typ Anti-IL-1Ra Antikörpern spielte in keiner Patientengruppe eine signifikante Rolle.

Erwähnenswert ist zudem, dass sich das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK in der FMF-Gruppe (IgM 13%), in der ARDS-Gruppe (IgG 16%), akuten COVID-19-Gruppe (IgG 18%) und Post-COVID-Gruppe (IgM 12%) zwar nicht statistisch signifikant zeigte, jedoch eine deutliche Differenz zu dem Antikörperaufreten der Kontrollen (IgG 6%, IgM 4%) erkennen ließ.

Obwohl sich das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK für die COVID-19 und AID Patienten zusammengefasst nicht signifikant zu den gesunden Kontrollen unterschied, zeigten sich die gemessenen Reaktivitäten der AID und COVID-19 Patientenseren relevant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Aus keiner der bisher erwähnten Studien konnten Daten zu den gemessenen Reaktivitäten entnommen werden.

Im Gegensatz zum reinen Auftreten der IgG-Anti-IL-1Ra Antikörper, zeigten sich die gemessenen Reaktivitäten der IgG-Anti-IL-1Ra AK in zwei der sechs Patientengruppen signifikant erhöht. Dies gilt insbesondere für die Patienten nach ausgeheilter COVID-19 Infektion und für Patienten während einer akuten COVID-19 Infektion. Aus der Kohorte der autoinflammatorischen Syndrome zeigte keine Gruppe ein signifikant häufigeres IgG-Anti-IL-1Ra Auftreten.

Die Diskrepanz in der Signifikanz zwischen dem Auftreten der IgG-Anti-IL-1Ra AK und der Reaktivität der IgG-AK kann teilweise durch den höheren Grenzwert (*cutoff*) für IgG Antikörper erklärt werden. Dieser wiederum basiert auf den Mittelwerten 70 gesunder Kontrollen, die allesamt höhere IgG als IgM Reaktivitäten aufwiesen (weitere Details siehe Limitationen).

Die Reaktivität für IgM-Anti-IL-1Ra AK war, ähnlich der IgG-Reaktivität, bei Patienten nach ausgeheilter sowie während einer akuten COVID-19 Infektion signifikant erhöht. Zusätzlich zeigte sich die Reaktivität der Anti-IL-1Ra AK vom IgM Subtyp auch bei COVID-19 bedingten ARDS Patienten sowie bei Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber signifikant erhöht. Somit zeigte sich aus der Gruppe der autoinflammatorischen Syndrome lediglich für FMF Patienten ein signifikant höheres Auftreten von Anti-IL-1Ra AK, jedoch ausschließlich den IgM-Subtyp betreffend.

Die Korrelation mit klinischen und laborchemischen Parametern und dem Auftreten von Anti-IL-1Ra AK ergab vereinzelte Zusammenhänge, jedoch konnte zusammenfassend das Auftreten von Anti-IL-1Ra Antikörpern nicht mit einer vermehrten Krankheitsaktivität oder erhöhten Entzündungsaktivität in Verbindung gebracht werden.

Ein Auftreten von Anti-IL-1Ra AK im Zusammenhang mit der aktuellen Medikation in den AID und COVID-19 Gruppen konnte lediglich in der FMF-Gruppe beobachtet werden. Hier zeigte jeder der drei FMF Patienten unter Anakinra-Therapie sowohl Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ, als auch Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ. Selbst bei dieser kleinen Stichprobe konnte ein statistischer Unterschied ( $p=0,0006$  für IgG und  $p=0,0003$  für IgM) im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden. Dies könnte als Vorhandensein von Anti-IL-1Ra AK in Form von ADA gegen Anakinra bei Patienten mit FMF gedeutet werden. Das Vorhandensein dieser ADAs konnte auch in unseren longitudinalen Antikörperuntersuchungen bei Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen unter Anakinra-Therapie beobachtet werden: hier zeigten FMF Patienten unter Anakinra-Therapie das absolut und relativ höchste Vorkommen von Anti-IL-1Ra Antikörpern (sowohl für den IgG-, als auch IgM-Subtyp).

Das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK der restlichen FMF Patienten unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe und spricht somit gegen ein Vorliegen von Anti-IL-1Ra AK gegen den physiologischen IL-1Ra in unserer FMF-Gruppe. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in den von uns untersuchten FMF Patienten Anakinra-Antikörper in bedeutender Häufigkeit vorkommen, diese jedoch am ehesten Medikamenten-induziert auftreten und keinen direkten Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausüben.

Aus den genannten Studien war nach Rückfragen keine genaue Trennung zwischen Antikörpern gegen den physiologischen IL-1Ra Antagonisten und medikamentös-induzierten Antikörpern gegen Anakinra ersichtlich. Darüber hinaus bleibt es fraglich, ob eine Unterscheidung zwischen AK gegen den physiologischen IL-1Ra und Anakinra-AK aufgrund der molekularen Ähnlichkeit überhaupt möglich ist. Daher liegt es nahe, einen Antikörpernachweis in Verbindung mit einer aktuellen bzw. vorangegangenen Anakinra-Therapie als ADA zu interpretieren. In unserer Anakinra-Verlaufsuntersuchung hatten jedoch 37% ( $n=7/19$ ) bereits vor Therapiebeginn Anakinra-bindende AK. Diese müssten, bei fehlender Antigenexposition (Anakinra), als AK gegen den physiologischen IL-1Ra gewertet werden. Einen klinischen Einfluss dieser prä-existenten IL-1Ra konnten wir in Bezug auf die Krankheitsaktivität in unserer Gruppe jedoch nicht

feststellen, daher scheint ein pathogenetischer Zusammenhang diesbezüglich unwahrscheinlich. Der Ursprung dieser präexistenten Anti-IL-1Ra Antikörper bleibt fraglich, die Bildung auf Boden einer Aktivierung des natürlichen Immunsystems ist naheliegend.

Unsere longitudinalen Ergebnisse zeigten bei Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen unter Anakinra-Therapie ein zum Teil ähnlich hohes Antikörperauftreten (IgM- und IgG-Typ) wie es bereits beschrieben wurde. Im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Diagnosegruppen spielte hier auch erstmalig das Auftreten der Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ eine Rolle. Sowohl die Präsenz der IgG-Anti-IL-1Ra AK bei 43% der Patienten, als auch die Reaktivität ( $OD \times 1000 = 301$ ) waren signifikant erhöht und übertrafen sogar die IgM-Anti-IL-1Ra AK (Auftreten bei 30% der Patienten bei einer durchschnittlichen Reaktivität von  $OD \times 1000 = 139$ ). Dies könnte als Zeichen einer längerfristigen Immunstimulation bei Patienten unter Anakinra-Therapie gedeutet werden und grenzt sich mit der IgG-gewichteten Immunantwort von anderen Patienten ohne Anakinra-Therapie ab.

Longitudinale Daten zur Untersuchung von Anti-IL-1Ra Antikörper im zeitlichen Verlauf sind bisher spärlich. Pfeiffer et al. <sup>[47]</sup> zeigten die longitudinalen Ergebnisse zweier Patienten mit einem Multisystemischen-Entzündungssyndrom bei Kindern (MIS-C) auf, einer schwerwiegenden COVID-19 Komplikation bei Kindern (siehe auch Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit und nach COVID-19). Einer davon wies initial und nach drei Monaten IgG-Anti-IL-1Ra AK auf, nach 7 Monaten waren keine Anti-IL-1Ra AK mehr nachweisbar. Ein weiterer wies initial IgG-Anti-IL-1Ra AK auf, welche nach fünf Wochen nicht mehr nachweisbar waren. Knapp dreiviertel der untersuchten Kinder in dieser Studie wurden mit Anakinra behandelt, wobei unklar bleibt, ob die Patienten aus dem *Follow-Up* Anakinra erhielten. Daher ist eine Unterscheidung zwischen Antikörpern gegen den physiologischen Anti-IL-1Ra und ADA gegen Anakinra nicht möglich. Der ausschließliche Nachweis von Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ entspräche jedoch auch den Beobachtungen einer IgG-gewichteten Immunantwort in unseren Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen unter Anakinra-Therapie, wobei hier die unterschiedlichen Ätiologien bedacht werden sollten. Wenngleich die

*Follow-Up* Daten sowohl zeitlich als auch in ihrer Anzahl begrenzt sind, sprechen sie für ein initial stärkeres und im Verlauf abnehmendes Anti-IL-1Ra AK Vorkommen. Ähnliches ist aus der oben erwähnten Studie von Wikén et al. über Anakinra-Antikörper bei CAPS Patienten unter Anakinra-Therapie abzuleiten, die ein Auftreten von Anakinra-Antikörpern insbesondere in den ersten drei Monaten verzeichnete.

Die Tendenz zeigte sich auch in unseren Patienten unter Anakinra-Therapie, jedoch konnten bei einigen Patienten Anti-IL-1Ra AK auch noch Monate bis Jahre nach Therapiebeginn nachgewiesen werden. Dies könnte als Zeichen einer längerfristigen Immunstimulation als Reaktion auf Anakinra gewertet werden. Insbesondere da sich das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgG- und IgM-Typ in der Anakinra-Gruppe auch im Vergleich zu der AID und COVID-19 Kohorte deutlich erhöht zeigte. Diese Beobachtung weist auf einen klaren Zusammenhang mit der Anakinra-Therapie hin, denkbar wäre die Entstehung von ADAs auf dem Boden einer überstimulierten Immunantwort und gestörten Immuntoleranz.

Eine Korrelation mit einer erhöhten Krankheitsaktivität konnte für die Anakinra-Patienten, entsprechend den Studienergebnissen von Wikén et al.<sup>[67]</sup> und Fleischmann et al. <sup>[24]</sup>, nicht festgestellt werden. Daher ist eine Auswirkung der Anti-IL-1Ra Antikörper bzw. Anakinra-Antikörper auf den Krankheitsprogress bzw. die therapeutische Wirksamkeit von Anakinra unwahrscheinlich.

Im Kontrast zu dem IgG-gewichteten Auftreten von Anti-IL-1Ra AK der Anakinra-Patienten steht das ausschließlich relevante Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vom IgM Subtyp bei TRAPS, ARDS, akuten COVID-19, sowie Zustand nach COVID-19 Patienten. In diesen Gruppen konnten die AK unabhängig von einer Anakinra-Therapie nachgewiesen werden. Das Überwiegen von Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ bei ausbleibender Anakinra-Therapie spricht hierbei eher für eine akute und gegebenenfalls passagere Immunstimulierung mit Bildung von natürlich vorkommenden Antikörpern gegen den physiologischen IL-1Ra ohne größere Auswirkung auf den Krankheitsverlauf, als für die Bildung von ADA gegen Anakinra.

## 4.2 Anti-IL-1Ra Antikörper bei Patienten mit und nach COVID-19

Erst kürzlich beschrieben Thurner et al. [60] in einer Studie zur Prävalenz von AK gegen den IL-1Ra in Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Myokarditis nach einer SARS-CoV-2 Impfung das Vorhandensein von Anti-IL-Ra AK in 75% der jungen (unter 21-jährigen) Patienten mit einer histologisch gesicherten Myokarditis. Seropositive Patienten hatten eine früher einsetzende, jedoch mildere Symptomatik. AK wurden zudem in 1% der Kontrollen und 2% der Teilnehmer nach einer durchgestandenen Myokarditis gefunden. Als möglichen pathophysiologischen Mechanismus wurde ein transient hyperphosphorylierter IL-1Ra zugrunde gelegt, der zu einer gestörten Immuntoleranz und Bildung von AK führen könnte. Es wurde keine Hyperphosphorylierung des IL-1Ra in Kontrollpatienten nachgewiesen. Die gefundenen AK beeinträchtigten die IL-1Ra Aktivität in vitro und waren zudem mit erniedrigten IL-1Ra Plasmaspiegeln assoziiert. Zudem wiesen seropositive Patienten Biomarker einer Herzschiädigung sowie Entzündung auf.

Pfeifer et al. [47] wiesen neutralisierende AK gegen IL-1Ra beim Multisystemischen Entzündungssyndrom bei Kindern (MIS-C) nach, einer schwerwiegenden COVID-19 Komplikation. Bei 62% (n=13) der Kinder wurden Anti-IL-1Ra AK gefunden – davon gehörten alle zu der IgG Subgruppe. Nur ein Patient hatte zusätzlich IgM-Anti-IL-1Ra AK. 71% der Kinder erhielten eine Therapie mit Anakinra. Es wurde in der Studie nicht zwischen ADA und AK gegen den physiologischen IL-1Ra unterschieden. Bei Patienten mit Anti-IL-1Ra AK wurde die Hyperphosphorylierung des IL-1Ra hier erstmalig nachgewiesen. Bei zwei MIS-C Patienten wurden *Follow-Up* Daten erhoben: Einer wies initial und nach drei Monaten ein an IgG gebundenen IL-1Ra auf, nach 7 Monaten war dieser seronegativ für Anti-IL-1Ra AK. Ein anderer wies initial Anti-IL-1Ra AK und einen hyperphosphorylierten IL-1Ra auf, die im 5 Wochen-*Follow-Up* nicht mehr nachweisbar waren. Das Verschwinden von hyperphosphorylierten IL-1Ra ging dem Verschwinden von Anti-IL-1Ra AK voraus.

Andere Daten von Thurner et al. [59] von erwachsenen Patienten mit schwerem COVID-19 Verlauf haben gezeigt, dass die Hyperphosphorylierung von IL-1Ra

der Bildung von entsprechenden Autoantikörpern vorausging. Neutralisierende IL-1Ra AK wurden hier bei 47% der schweren COVID-19 Fälle vorgefunden, hier waren sowohl die Subtypen IgG als auch IgM vertreten. In Patienten mit leichten COVID-19 Verläufen wurden deutlich weniger AK vorgefunden, in gesunden Kontrollen wies kein Patient AK auf. Der hyperphosphorylierte IL-1Ra wurde nur in Patienten mit hohen Titern an Anti-IL-1-Ra AK vorgefunden.

Die Daten der COVID-19 und MIS-C Studien deuten darauf hin, dass die beobachteten posttranslationalen Modifikationen entweder aus der SARS-CoV-2 Infektion selbst oder inflammatorischen Folgereaktionen resultieren und diese wahrscheinlich immunogen sind. Es wird vermutet, dass die Bildung pathogenetisch bedeutsamer Autoantikörper zu einem hyperinflammatorischen Zustand beiträgt. Tatsächlich suggerieren einige Studien, wie auch die von Chang. et al.<sup>[10]</sup>, dass Sars-CoV-2 Infektionen die Bildung neuer Autoantikörper triggern und zu einem Bruch in der Immuntoleranz führen können.

Schultheiß et al. <sup>[51]</sup> veröffentlichten einen Artikel über die Dysregulation von Zytokinen bei Patienten mit Post-Covid Syndrom. Es wurde eine signifikante Assoziation zwischen IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF und dem Post-Covid Syndrom aufgezeigt. Zwar konnte keine Korrelation zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern wie dem Rheumafaktor, ANAs oder Antiphospholipid-AK gezeigt werden, jedoch wies man selbst 8-10 Monate nach akuter Infektion eine persistierende Erhöhung der inflammatorischen Zytokin-Trias, bestehend aus IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF, bei Patienten mit Post-Covid Syndrom nach. Dies ließe die Überlegung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einem erhöhten IL-1 $\beta$  Plasmaspiegel und dem Auftreten von Anti-IL-1Ra AK bei Post-Covid Patienten zu.

In Konkordanz mit den Ergebnissen von Thurner et al. <sup>[59]</sup> fanden wir bei 32% der Patienten mit schweren COVID-19 Verläufen im Rahmen eines ARDS AK gegen den IL-1Ra vor. Im Gegensatz zu Pfeiffer et al. <sup>[47]</sup> waren bei uns ausschließlich die IgM-Anti-IL-1Ra AK statistisch (21% der Patienten) bedeutsam. Wichtig zu erwähnen ist, dass für keinen der von uns untersuchten COVID-19 Patienten eine

Einnahme von Anakinra in der digitalen Akte vermerkt war, wohingegen bei den IgG-gewichteten Ergebnissen von Pfeiffer et al. 71% der Patienten Anakinra erhielten. Ein Zusammenhang mit der Anakinra-Therapie scheint in dieser Studie wahrscheinlich, insbesondere im Hinblick der IgG-gewichteten Ergebnissen unserer Patienten unter Anakinra-Therapie.

Ein signifikant gehäuftes Auftreten von IgG-Anti-IL1Ra AK konnten wir bei ARDS Patienten nicht beobachten (16% vs. 6% Kontrollen), es gab lediglich mehr IgG-Anti-IL-1Ra AK positive Patienten in der Gruppe, die ein COVID-19 bedingtes ARDS überlebt haben, als in der Gruppe von verstorbenen Patienten. Eine Korrelation des Antikörperauftretens und des klinischen Verlaufs bei Patienten mit ARDS konnte in unseren Patienten nicht beobachtet werden. Lediglich konnte bei ARDS Patienten mit abnormen (erhöhten oder erniedrigten) Leukozytenwerten häufiger IgM-Anti-IL-1Ra AK nachgewiesen werden als bei seronegativen Patienten. Eine Korrelation mit den Laktatdehydrogenase-Werten im Blut konnte nicht beobachtet werden.

Wir konnten somit im Vergleich zu der Studie über IL-1Ra AK bei Patienten mit einer Myokarditis nach SARS-CoV-2 Impfung nur einen vereinzelt Zusammenhang mit einem Laborparameter, den Leukozyten, und keinen Zusammenhang mit der LDH oder dem klinischen Verlauf zeigen.

Interessanterweise wiesen wir bei Patienten mit moderaten, akuten COVID-19 Verläufen, die lediglich normalstationär behandelt wurden, häufiger Anti-IL-1Ra AK (IgG 18%, IgM 54%) nach als bei ARDS Patienten (IgG 16%, IgM 21%). Dies steht im Kontrast zu der Studie von Thurner et al. <sup>[59]</sup>, in welcher die leichten Verläufe mit weniger AK assoziiert waren. Hauptsächlich zeigte sich auch hier wieder ein maßgeblich erhöhtes Auftreten von IgM-Anti-IL-1Ra AK, jedoch waren die Reaktivitäten für IgG und IgM im Vergleich zu den Kontrollen bedeutsam erhöht. Klinisch imponierten die Leukozyten als einziger Parameter substantiell erhöht bei Patienten mit Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ als für seronegative Patienten, jedoch ist hier die Stichprobe klein und die Leukozyten immer noch im Normbereich. Auch bei den milden Verläufen konnten wir keinen Zusammenhang

zwischen der klinischen Präsentation und dem Auftreten von Anti-IL-1Ra AK zeigen.

Bisher unbeschrieben war das Auftreten von IL-1Ra AK bei Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer durchgestandenen, vollständig ausgeheilten COVID-19 Infektion. Alle Zeitpunkte einbezogen wiesen 14% der Patienten IgM-Anti-IL-1Ra AK auf, welche sich im Vergleich zu den Kontrollen wesentlich gehäuft zeigten. IgG-Anti-IL-1Ra AK waren bei 13% der Patienten vorzufinden, waren jedoch verglichen mit unserer Kontrollgruppe nicht signifikant gehäuft. Die Reaktivitäten hingegen waren für Anti-IL-1Ra AK vom IgG und IgM Subtyp erhöht. Bei fehlender Exposition von Anakinra ist auch hier von Antikörpern gegen den natürlich vorkommenden IL-1Ra auszugehen. Tendenziell konnte eine Zunahme des absoluten Auftretens von IgG-Anti-IL-1Ra AK bis zur 5. Woche beobachtet werden (5 positive Seren). In der 5. und 8. Woche wiesen die meisten Patienten IgM-Anti-IL-1Ra AK (jeweils 5 positive Seren) auf. Das Auftreten von Anti-IL-1Ra AK unterschied sich nicht zwischen den unterschiedlichen Wochenzeitpunkten nach Infektion.

Für Patienten mit einem subjektiv starken Krankheitsgefühl während der Infektion konnten häufiger Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ nachgewiesen werden als bei Patienten ohne Krankheitsgefühl. Da für Patienten mit wenig bzw. keinem Krankheitsgefühl kein essenzielles Auftreten von Anti-IL-1Ra AK beobachtet werden konnte, ließe dies einen Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsempfinden (und somit subjektiver Krankheitsintensität) und dem Auftreten von Anti-IL-1Ra AK vermuten, wobei hier die Angaben zur Krankheitsaktivität subjektiv und nicht unabhängig prüfbar sind. Neben dem Krankheitsempfinden zeigte sich auch das von den Patienten angegebene Fieberempfinden entsprechend. Patienten mit mäßigem/hohem Fieber während ihrer Infektion wiesen häufiger Anti-IL-1Ra AK vom IgG-Typ auf als Patienten ohne Fieber. Die höchste gemessene Temperatur von Patienten mit IgG-Anti-IL-1Ra AK war erhöht im Vergleich zu seronegativen Patienten. Abgesehen davon gab es keine Korrelation mit anderen klinischen Parametern.

Die klinischen Parameter unserer Patienten nach COVID-19 sind also, durch das Auftreten von IgG-Anti-IL-1Ra AK bei Patienten mit mäßigem und starkem Krankheitsgefühl sowie ein stärkeres Fieberempfinden bei ebendiesen Patienten, vereinzelt mit dem Auftreten von Anti-IL-1Ra AK assoziierbar. Dem entgegen steht eine scheinbar ausbleibende Korrelation der Anti-IL-1Ra AK auf das grundsätzliche Vorhandensein von Symptomen. Die Anti-IL-1Ra AK scheinen also eher ein immunologisches Epiphänomen bei Patienten nach COVID-19 zu sein.

Unsere Untersuchungen zu Anti-IL-1Ra AK bei Patienten mit Post-Covid Syndrom entsprechen dem von Schultheiß et al.<sup>[51]</sup> beschriebenen Ausbleiben von Autoantikörpern bei Post-Covid Patienten, da auch wir kein wichtiges Auftreten von AK gegen den physiologischen IL-1Ra vorfinden konnten. Hieraus ließe sich ein fehlender Einfluss von Autoantikörpern gegen den IL-1Ra bei Patienten mit Post-Covid Syndrom schlussfolgern.

Zusammenfassend haben wir Anakinra-bindende AK in rund ein Drittel der Fälle mit COVID-19 bedingtem ARDS gefunden sowie in über der Hälfte der akuten, stationären COVID-19 Fälle (ohne ARDS) vorgefunden. Diese Häufigkeiten entsprechen in etwa der beschriebenen Daten von Patienten mit akuter COVID-19 Symptomatik, mit Schwankungen innerhalb von 10%.

Die Natur sowie die klinische Relevanz der gefundenen Anakinra-bindenden Autoantikörper bleibt debattierbar. Zumindest in den verschiedenen COVID-19 Kohorten kann das Vorhandensein von ADAs bei fehlender Anakinra-Therapie ausgeschlossen werden.

Das gehäufte Auftreten von Anakinra-bindenden AKs bei ARDS- und akuten COVID-19 Patienten könnte ein Hinweis darauf sein, dass COVID-19 tatsächlich die Bildung neuer Autoantikörper induziert und zu einem Bruch in der Immuntoleranz führen könnte, wie bereits von einigen Studien suggeriert wurde. Eine Kreuzreaktivität im Rahmen einer unspezifischen post-infektiösen Immunstimulierung kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Interessant

wäre zudem, Seren von Patienten mit anderen Infektionskrankheiten auf Anakinra-bindende Antikörper zu untersuchen. So könnte untersucht werden, ob die Anakinra-Antikörper SARS-spezifischen Ursprungs sind oder auch durch andere Viren oder Immunstimulanzen induziert werden können.

Die Daten der Patienten nach durchgestandener COVID-19 Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten sprechen gegen eine ausschließlich akute Stimulierung, da Anti-IL-1Ra AK auch bis zu 8 Wochen nach positivem PCR-Abstrich nachweisbar waren. Dem entgegen steht die ausbleibende Relevanz von Anakinra-bindenden AK in unseren 26 Post-Covid Patienten.

Es wurde gezeigt, dass Anakinra-bindende AK in unseren COVID-19 Patienten sowie nach durchgestandener Sars-CoV-2 Infektionen gehäuft auftreten. Einen Zusammenhang mit klinischen Parametern oder dem Krankheitsverlauf konnte jedoch nur in Einzelfällen festgestellt werden. Es bedarf weiteren Untersuchungen, die das immunologische Geschehen während und nach COVID-19 beleuchten. Erkenntnisreich wären, vor allem für einen Vergleich mit den bereits genannten Studien, Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des IL-1Ra sowie Serumplasmaspiegel zirkulierender Anti-IL-1Ra AK und deren Neutralisierungsfähigkeit.

### **4.3 Limitationen**

Klare Limitation weist diese Arbeit durch zum Teil kleine Patientengruppen, bedingt durch die Seltenheit vieler autoinflammatorischer Erkrankungen (v.a. MWS, TRAPS) auf. In diesen kleinen Stichproben sind statistische Aussagen begrenzt valide.

Limitiert wird die Interpretation unserer Ergebnisse darüber hinaus durch die fehlende Klassifikation der Anakinra-bindenden AK, sodass eine Aussage über die Natur der Anti-IL-1Ra AK nicht getroffen werden kann. Es wurde zwar zwischen IgG und IgM Globulinen differenziert, jedoch bleibt unklar, ob es sich bei den nachgewiesenen Antikörpern um tatsächliche ADA gegen Anakinra, AK gegen den physiologischen IL-1Ra oder eine unspezifische Stimulierung mit

Kreuzreaktivität im Rahmen von Autoantikörpern handelt. In Bezug auf die aktuelle Literatur wäre eine weitere Charakterisierung notwendig, besonders die Neutralisierungsfähigkeit und der Phosphorylierungs-Status der Anti-IL-1Ra AK wären hier von Interesse. Zudem aufklärend wären Bestimmungen der Plasmaspiegel von zirkulierendem IL-1Ra.

Eine weitere Beschränkung ergibt sich durch die relativ kleine Anzahl gesunder Kontrollen im Vergleich zu dem gesamten Patientenkollektiv. Die Grenzwerte für IgG (ODx1000=229) und IgM (ODx1000=139) müssen deshalb im Kontext einer kleinen Kontrollstichprobe interpretiert werden und bei der Interpretation der Ergebnisse sollte der deutlich geringere Grenzwert für IgM bedacht werden. Nicht außer Acht gelassen werden sollte die Altersdifferenz von rund 20 Jahren zwischen der Kontroll- und Patientengruppe. Mögliche Einflüsse des jüngeren Alters der Kontrollen auf das Vorhandensein von Auto-AK können diskutiert werden. Zudem war für den Großteil der Kontrollen über den sonstigen gesundheitlichen Status, besonders im Hinblick auf eine mögliche, erst kürzlich zurückliegende Sars-CoV-2 Infektion, die potenziell die Bildung von Auto-AK stimulieren könnte, keine Aussage möglich. Erwähnenswert an dieser Stelle ist, dass zwei selbstständig rekrutierte gesunde Blutspender für die Kontrollgruppe, welche wenige Wochen zuvor eine asymptomatische Sars-CoV-2 Infektion durchlebten (serologisch bewiesen), über dem Grenzwert erhöhte IgG-Anti-IL-1Ra AK Absorptionen aufwiesen. Diese beeinflussten durch die erhöhten IgG-Reaktivitäten den IgG *cutoff* maßstäblich.

Wichtig ist zudem, dass in unseren Kontrollen das Auftreten von Anakinra-bindenden AK höher war als in der genannten Literatur (10% vs. maximal 1%). Dies könnte an der rekrutierten Kontroll-Stichprobe oder dem Nachweisverfahren liegen. Darüber hinaus könnten die Unterschiede im Antikörpernachweis ebenso durch zirkulierende biologische Serumspiegel sowie nicht einheitliche Zeitpunkte der Serumentnahme zu den beobachteten Schwankungen beigetragen haben.

Für Patienten mit Post-Covid Syndrom können aufgrund von fehlenden Daten keine Aussagen über den zeitlichen Verlauf oder die klinische Symptomatik getroffen werden. Im Weiteren müssen die Aussagen über die klinischen

Parameter der Patienten nach COVID-19 Infektion im Kontext dessen betrachtet werden, dass alle Daten zum akuten Krankheitsgeschehen auf subjektiven Angaben basieren. Diese Daten unterliegen interindividuellen Schwankungen und können schwer unabhängig geprüft werden und bedingen daher eine geringere Objektivität und Reliabilität.

Grundsätzlich unterliegen auch die Daten unserer übrigen AID und COVID-19 Patienten dem Einfluss anderer Faktoren wie Merkmale der Studienpopulation, der Einnahme von Begleitmedikamenten und unterschiedlichen Behandlungsmodalitäten, welche in ihrer Gänze schwer zu erfassen sind.

Die Durchführung des ELISA-Nachweisverfahrens durch eine einzelne Person bringt die Gefahr menschlicher Fehler mit sich, da das Verfahren eine präzise Handhabung der Reagenzien, Inkubationszeiten und Waschschriffe erfordert. Zwar wurde durch die Verwendung von Kontrollseren und durch eine gründliche Einarbeitung eine gewisse Vergleichbarkeit ermöglicht und die Fehleranfälligkeit reduziert, jedoch könnten versehentliche Versäumnisse die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Testergebnisse beeinträchtigen. Darüber hinaus bestehen auch gewisse Einschränkungen, die die gewählte Nachweismethode (ELISA) betreffen. Eine wesentliche Einschränkung liegt in der Spezifität der im Test verwendeten Antikörper. ELISA hängt von der Verfügbarkeit hochaffiner Antikörper ab, die das Zielantigen spezifisch erkennen. Nicht Verfügbarkeit geeigneter AK oder geringe Immunogenität der Antigene kann zu Verzerrungen führen. Ergänzende Techniken sollten daher für eine umfassende Bewertung in Betracht gezogen werden, um eine umfassende und genaue Analyse der Seren sicherzustellen.

## 5 Zusammenfassung

Antikörper gegen den Interleukin 1 Rezeptor Antagonisten (IL-1Ra) wurden bereits vereinzelt im Zusammenhang mit einer medikamentösen Anakinra-Therapie bei autoinflammatorischen Syndromen und immunologischen Phänomenen bei SARS-CoV-2 Infektionen untersucht. Diese Antikörper könnten einen potenziellen Mechanismus unkontrollierter Entzündungen darstellen sowie zu einem therapeutischen Versagen der IL-1 Blockade führen. Die bisherigen Studienergebnisse sind uneindeutig und es mangelt an Kenntnissen über Prävalenz sowie klinischen Einfluss der Anti-IL-1Ra Antikörper. Ziel dieser Arbeit war es, explorativ das Vorkommen sowie die klinische Bedeutung dieser Anakinra-bindenden Antikörper in Patientenseren mit autoinflammatorischen Erkrankungen sowie COVID-19 zu beleuchten.

Hierfür untersuchten wir 367 Patientenseren aus der medizinischen Klinik II in Tübingen zwischen den Jahren 2017 bis 2022 mit verschiedenen autoinflammatorischen Erkrankungen (AID, n=146) und COVID-19 (n=221) auf IgG und IgM Antikörper gegen den IL-1Ra mittels ELISA. Als Cut-Off wurden die Mittelwerte plus zweifache Standardabweichung 70 gesunder Blutspender definiert. Um den Einfluss einer Anakinra-Therapie sowie den zeitlich-dynamischen Verlauf der IL-1Ra Antikörper zu analysieren, wurden zusätzlich 68 Seren von 22 Patienten mit autoinflammatorischen Syndromen und Anakinra-Therapie auf Anti-IL-1Ra Antikörper untersucht.

Die Datenanalyse mittels SPSS Statistics sowie Prism zeigte für die 367 AID und COVID-19 Patienten zusammengefasst signifikant höhere Reaktivitäten der IgG ( $p=0,04$ ) und IgM ( $p<0,001$ ) Anti-IL-1Ra Antikörper verglichen mit gesunden Kontrollen, ohne dass ein größerer Effekt auf den klinischen Verlauf beobachtet werden konnte. Vor allem für Patienten mit akuter und ausgeheilte COVID-19 Infektion konnte eine erhöhte Reaktivität für IgG und IgM beobachtet werden, wohingegen dies bei Patienten mit Familiärem Mittelmeerfieber und COVID-19 bedingtem ARDS lediglich für IgM-Anti-IL-1Ra AK verzeichnet werden konnte.

Unter der Anwendung des vordefinierten *cutoffs* konnte kein signifikant häufigeres Auftreten der Antikörper bei AID und COVID-19 Patienten im Vergleich zu gesunden Blutspendern beobachtet werden (8% IgG und 9% IgM Antikörperauftreten bei AID und COVID-19 Patienten versus 6% IgG und 4% IgM Antikörperauftreten bei gesunden Kontrollen). Bei genauerer Betrachtung der Patientengruppen war die Prävalenz der IgM Anti-IL-1Ra AK bei Patienten mit akuter und ausgeheilter COVID-19 Infektion, ARDS, Morbus Still und TRAPS signifikant höher als bei gesunden Probanden. AK gegen den IL-1Ra wurden bei 32% der Patienten mit schweren COVID-19 Verläufen im Sinne eines ARDS vorgefunden, jedoch zeigte sich nur der IgM Subtyp statistisch relevant. Interessanterweise haben wir Anti-IL-1Ra AK vom IgM-Typ häufiger bei Patienten mit moderaten, akuten COVID-19 Verläufen (54%) als bei ARDS Patienten (21%) nachgewiesen. Ein klinischer Einfluss der Anti-IL-1Ra Antikörper auf den Krankheitsverlauf von COVID-19 scheint hierbei unwahrscheinlich. Das Auftreten der Anakinra-Antikörper vom IgG Subtyp bleibt ohne statistische Signifikanz, zudem konnte ebenso keine direkte Korrelation zu klinischen Parametern und dem Antikörperauftreten hergestellt werden.

Von den 22 AID Patienten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Anakinra-Therapie untersucht wurden (vor/während/danach), waren 43% der im Verlauf getesteten 68 Seren Anti-IL-1Ra IgG- und 30% IgM positiv, was einen signifikanten Unterschied darstellte ( $p < 0,0001$ ). Auch die gemessenen Absorptionen zeigten sich für IgG Anti-IL-1Ra AK ( $p < 0,0001$ ) und IgM Anti-IL-1Ra AK ( $p = 0,0006$ ) deutlich erhöht. Wir beobachteten keinen Unterschied in der Häufigkeit der Anti-IL-1Ra Antikörper, wenn wir Patienten vor der Therapie mit Patienten während der Therapie mit Anakinra verglichen.

Zusammengefasst gab es keine Korrelation zwischen Anti-IL-1Ra Antikörpern und der Krankheitsaktivität bzw. der Schwere der Erkrankung sowie laborchemischen Parametern. Daher ist es unwahrscheinlich, dass ein Effekt von Anti-IL-1Ra Antikörpern oder Anakinra-Antikörpern auf den Krankheitsverlauf oder die therapeutische Wirksamkeit von Anakinra besteht. Obwohl wir bei einigen Anakinra-naiven Patienten in bisher unbeschriebenem Ausmaß präexistente Antikörper gegen den physiologischen IL-1Ra nachweisen konnten,

gab es keine Hinweise auf Beeinflussung des Krankheitsverlaufes. Schwere Infektionen und überstimulierte Immunantworten können zu einem Bruch in der Immuntoleranz führen. Dazu passt, dass die IL-1Ra Antikörper in der COVID-19 Gruppe überwiegend vom IgM-Typ, die Antikörper bei AID-Patienten unter Anakinra-Therapie vor allem vom IgG-Typ waren. Letztere könnten daher als Anti-Drug-Antikörper im Rahmen einer gestörten Immuntoleranz interpretiert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Bedaiwi MK, Almaghlouth I, Omair MA. Effectiveness and adverse effects of anakinra in treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021;25(24):7833-9.
2. Bettiol A, Lopalco G, Emmi G, Cantarini L, Urban ML, Vitale A, et al. Unveiling the Efficacy, Safety, and Tolerability of Anti-Interleukin-1 Treatment in Monogenic and Multifactorial Autoinflammatory Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(8):1898.
3. Bluestone JA, Anderson M. Tolerance in the Age of Immunotherapy. *New England Journal of Medicine.* 2020;383(12):1156-66.
4. Bordallo B, Bellas M, Cortez AF, Vieira M, Pinheiro M. Severe COVID-19: what have we learned with the immunopathogenesis? *Adv Rheumatol.* 2020;60(1):50.
5. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2016;16(7):407-20.
6. Bywaters EG. Still's disease in the adult. *Ann Rheum Dis.* 1971;30(2):121-33.
7. Cavalli G, De Luca G, Campochiaro C, Della-Torre E, Ripa M, Canetti D, et al. Interleukin-1 blockade with high-dose anakinra in patients with COVID-19, acute respiratory distress syndrome, and hyperinflammation: a retrospective cohort study. *Lancet Rheumatol.* 2020;2(6):e325-e31.
8. Cavalli G, Colafrancesco S, Emmi G, Imazio M, Lopalco G, Maggio MC, et al. Interleukin 1 $\alpha$ : a comprehensive review on the role of IL-1 $\alpha$  in the pathogenesis and treatment of autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev.* 2021;20(3):102763.
9. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell.* 2003;11(3):591-604.
10. Chang SE, Feng A, Meng W, Apostolidis SA, Mack E, Artandi M, et al. New-onset IgG autoantibodies in hospitalized patients with COVID-19. *Nature Communications.* 2021;12(1):5417.
11. Church LD, Cook GP, McDermott MF. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008;4(1):34-42.
12. Cohen S, Hurd E, Cush J, Schiff M, Weinblatt ME, Moreland LW, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: Results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism.* 2002;46(3):614-24.
13. Colafrancesco S, Manara M, Bortoluzzi A, Serban T, Bianchi G, Cantarini L, et al. Management of adult-onset Still's disease with interleukin-1 inhibitors: evidence- and consensus-based statements by a panel of Italian experts. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):275.
14. Coll RC, O'Neill LAJ, Schroder K. Questions and controversies in innate immune research: what is the physiological role of NLRP3? *Cell Death Discovery.* 2016;2(1):16019.

15. Cush JJ. Autoinflammatory syndromes. *Dermatol Clin.* 2013;31(3):471-80.
16. de la Rica R, Borges M, Gonzalez-Freire M. COVID-19: In the Eye of the Cytokine Storm. *Front Immunol.* 2020;11:558898.
17. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb j.* 1994;8(15):1314-25.
18. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:519-50.
19. e.V DGfR. Skriptum Rheumatologie - Autoinflammatorische Syndrome 2020 [Available from: [https://dgrh.de/dam/jcr:29498ad0-470e-459f-b60a-69a65e114315/anakinra\\_il\\_1beta\\_blocker\\_2009.pdf](https://dgrh.de/dam/jcr:29498ad0-470e-459f-b60a-69a65e114315/anakinra_il_1beta_blocker_2009.pdf)].
20. Europa E. Kineret: EPAR - Medicine Overview 2009 [updated 20/07/2022. Available from: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kineret-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kineret-epar-product-information_en.pdf)].
21. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med.* 2020;383(23):2255-73.
22. Feist E, Mitrovic S, Fautrel B. Mechanisms, biomarkers and targets for adult-onset Still's disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(10):603-18.
23. Fleischmann RM, Schechtman J, Bennett R, Handel ML, Burmester GR, Tesser J, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2003;48(4):927-34.
24. Fleischmann RM, Tesser J, Schiff MH, Schechtman J, Burmester GR, Bennett R, et al. Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(8):1006-12.
25. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol.* 2009;10(3):241-7.
26. Freeman TL, Swartz TH. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front Immunol.* 2020;11:1518.
27. Gabay C, Gigley J, Sipe J, Arend WP, Fantuzzi G. Production of IL-1 receptor antagonist by hepatocytes is regulated as an acute-phase protein in vivo. *Eur J Immunol.* 2001;31(2):490-9.
28. Group TFS. Familial Mediterranean Fever (FMF) in Turkey: Results of a Nationwide Multicenter Study. *Medicine.* 2005;84(1):1-11.
29. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497-506.
30. Ilowite N, Porras O, Reiff A, Rudge S, Punaro M, Martin A, et al. Anakinra in the treatment of polyarticular-course juvenile rheumatoid arthritis: safety and preliminary efficacy results of a randomized multicenter study. *Clin Rheumatol.* 2009;28(2):129-37.
31. Kallinich T, Orak B, Wittkowski H. [Role of genetics in familial Mediterranean fever]. *Z Rheumatol.* 2017;76(4):303-12.
32. Kallinich T, Blank N, Braun T, Feist E, Kiltz U, Neudorf U, et al. Evidenzbasierte Therapieempfehlungen für das familiäre Mittelmeerfieber. *Zeitschrift für Rheumatologie.* 2019;78(1):91-101.

33. Kallinich T, Hinze C, Wittkowski H. Klassifikation autoinflammatorischer Erkrankungen anhand pathophysiologischer Mechanismen. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2020;79(7):624-38.
34. Keddie S, Parker T, Lachmann HJ, Ginsberg L. Cryopyrin-Associated Periodic Fever Syndrome and the Nervous System. *Curr Treat Options Neurol*. 2018;20(10):43.
35. Kyriazopoulou E, Huet T, Cavalli G, Gori A, Kyprianou M, Pickkers P, et al. Effect of anakinra on mortality in patients with COVID-19: a systematic review and patient-level meta-analysis. *The Lancet Rheumatology*. 2021;3(10):e690-e7.
36. Lopez-Leon S, Wegman-Ostrosky T, Perelman C, Sepulveda R, Rebolledo PA, Cuapio A, et al. More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2021;11(1):16144.
37. Magadur-Joly G, Billaud E, Barrier JH, Pennec YL, Masson C, Renou P, et al. Epidemiology of adult Still's disease: estimate of the incidence by a retrospective study in west France. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1995;54(7):587-90.
38. Malyak M, Smith MF, Jr., Abel AA, Arend WP. Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta. *J Clin Immunol*. 1994;14(1):20-30.
39. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline Mutations in the Extracellular Domains of the 55 kDa TNF Receptor, TNFR1, Define a Family of Dominantly Inherited Autoinflammatory Syndromes. *Cell*. 1999;97(1):133-44.
40. McGonagle D, McDermott MF. A Proposed Classification of the Immunological Diseases. *PLOS Medicine*. 2006;3(8):e297.
41. Moghaddas F, Masters Seth L. The classification, genetic diagnosis and modelling of monogenic autoinflammatory disorders. *Clinical Science*. 2018;132(17):1901-24.
42. Ohta A, Yamaguchi M, Kaneoka H, Nagayoshi T, Hiida M. Adult Still's disease: review of 228 cases from the literature. *J Rheumatol*. 1987;14(6):1139-46.
43. Ozen S, Demirkaya E, Erer B, Livneh A, Ben-Chetrit E, Giancane G, et al. EULAR recommendations for the management of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(4):644-51.
44. Ozkurede VU, Franchi L. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(3):382-90.
45. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nature Immunology*. 2016;17(8):914-21.
46. Pasin L, Cavalli G, Navalesi P, Sella N, Landoni G, Yavorovskiy AG, et al. Anakinra for patients with COVID-19: a meta-analysis of non-randomized cohort studies. *European Journal of Internal Medicine*. 2021;86:34-40.
47. Pfeifer J, Thurner B, Kessel C, Fadle N, Kheiroddin P, Regitz E, et al. Autoantibodies against interleukin-1 receptor antagonist in multisystem inflammatory syndrome in children: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Rheumatol*. 2022;4(5):e329-e37.

48. Rehani K, Wang H, Garcia CA, Kinane DF, Martin M. Toll-like receptor-mediated production of IL-1Ra is negatively regulated by GSK3 via the MAPK ERK1/2. *J Immunol.* 2009;182(1):547-53.
49. Rowczenio DM, Gomes SM, Aróstegui JI, Mensa-Vilaro A, Omoyinmi E, Trojer H, et al. Late-Onset Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes Caused by Somatic NLRP3 Mosaicism—UK Single Center Experience. *Frontiers in Immunology.* 2017;8.
50. Schnappauf O, Chae JJ, Kastner DL, Aksentijevich I. The Pyrin Inflammasome in Health and Disease. *Frontiers in Immunology.* 2019;10.
51. Schultheiß C, Willscher E, Paschold L, Gottschick C, Klee B, Henkes SS, et al. The IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF cytokine triad is associated with post-acute sequelae of COVID-19. *Cell Rep Med.* 2022;3(6):100663.
52. Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med.* 1967;43(2):227-53.
53. Somagutta MKR, Lourdes Pormento MK, Hamid P, Hamdan A, Khan MA, Desir R, et al. The Safety and Efficacy of Anakinra, an Interleukin-1 Antagonist in Severe Cases of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Infect Chemother.* 2021;53(2):221-37.
54. Stefan Vordenbäumen EF, Jürgen Rech, Martin Fleck et. al. . DGRh-S2e-Leitlinie: Diagnostik und Therapie des adulten Still-Syndroms (AOSD) AWMF online2022 []. Available from: [https://register.awmf.org/assets/guidelines/060-011l\\_S2e\\_Diagnostik-Therapie-des-adulten-Still-Syndroms-AOSD\\_2022-08\\_1.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/060-011l_S2e_Diagnostik-Therapie-des-adulten-Still-Syndroms-AOSD_2022-08_1.pdf).
55. Stella A, Lamkanfi M, Portincasa P. Familial Mediterranean Fever and COVID-19: Friends or Foes? *Front Immunol.* 2020;11:574593.
56. Still GF. On a Form of Chronic Joint Disease in Children. *Med Chir Trans.* 1897;80:47-60.9.
57. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology.* 2019;19(8):477-89.
58. Tan LY, Komarasamy TV, Rmt Balasubramaniam V. Hyperinflammatory Immune Response and COVID-19: A Double Edged Sword. *Front Immunol.* 2021;12:742941.
59. Thurner L, Fadle N, Bewarder M, Kos I, Regitz E, Cetin O, et al. Autoantibodies against Progranulin and IL-1 receptor antagonist in critically ill COVID-19. *bioRxiv.* 2021:2021.04.23.441188.
60. Thurner L, Kessel C, Fadle N, Regitz E, Seidel F, Kindermann I, et al. IL-1RA Antibodies in Myocarditis after SARS-CoV-2 Vaccination. *N Engl J Med.* 2022;387(16):1524-7.
61. Tufan A, Lachmann HJ. Familial Mediterranean fever, from pathogenesis to treatment: a contemporary review. *Turk J Med Sci.* 2020;50(Si-2):1591-610.
62. Uchima L. Inflammasom Signaling und chronische Entzündungsreaktionen 2021 [updated January 2021. Available from: <https://www.trillium.de/zeitschriften/trillium-immunologie/archiv/heft-1/2021-signalwege/inflammasom-signaling-und-chronische-entzuendungsreaktionen.html>.
63. Van Gijn ME, Ceccherini I, Shinar Y, Carbo EC, Slofstra M, Arostegui JI, et al. New workflow for classification of genetic variants' pathogenicity applied to hereditary recurrent fevers by the International Study Group for Systemic

- Autoinflammatory Diseases (INSAID). *J Med Genet*. 2018;55(8):530-7.
64. Waugh J, Perry CM. Anakinra. *BioDrugs*. 2005;19(3):189-202.
65. Welzel T, Kuemmerle-Deschner JB. Diagnosis and Management of the Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes (CAPS): What Do We Know Today? *J Clin Med*. 2021;10(1).
66. WHO. WHO Coronavirus Diseases, COVID-19 Dashboard 2022  
[Available from: <https://covid19.who.int>.
67. Wikén M, Hallén B, Kullenberg T, Koskinen LO. Development and effect of antibodies to anakinra during treatment of severe CAPS: sub-analysis of a long-term safety and efficacy study. *Clinical Rheumatology*. 2018;37(12):3381-6.
68. William P. Arend, Mark Malyak, Carla J. Guthridge a, Gabay C. INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. *Annual Review of Immunology*. 1998;16(1):27-55.
69. Yamaguchi M, Ohta A, Tsunematsu T, Kasukawa R, Mizushima Y, Kashiwagi H, et al. Preliminary criteria for classification of adult Still's disease. *J Rheumatol*. 1992;19(3):424-30.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der medizinischen Universitätsklinik Tübingen, Abteilung der Inneren Medizin II, unter Betreuung von Prof. Dr. med. Reinhild Klein durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Ann-Christin Pecher.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Beate Preuß von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 28.11.2024

---

Kristina Bilandzic

## 8 Danksagung

Zu aller erst gilt mein herzlichster Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Klein.

Ihre herausragende Expertise, Unterstützung und Geduld waren während der gesamten Promotionsarbeit beständige Pfeiler und inspirierten ein motivierendes, wissenschaftliches Umfeld. Sie förderten nicht nur mein wissenschaftliches Denken, sondern standen mir darüber hinaus stets mit Ihrem Wissen und Ihrer Herzlichkeit zur Seite. Ihre Leidenschaft für die Wissenschaft und Ihr Engagement für Ihre Kolleg/innen und Doktorand/innen sind gleichvoll beeindruckend sowie inspirierend.

Die wertvollen Diskussionen und konstruktiven Rückmeldungen, die Sie mir während des Entstehungsprozesses gaben, trugen entscheidend zu dieser Arbeit bei und formten schärfere Ideen und kräftigere Argumente. Ihre Fähigkeit, komplexe Themen sinnvoll darzustellen und neue Perspektiven aufzuzeigen schufen aus einer datenbesetzten, wissenschaftlichen Roharbeit diese prägnante, strukturierte Arbeit.

Ich bedanke mich für Ihre Unterstützung, Anleitung und Vertrauen in mich und werde die Erfahrungen, die ich unter Ihrer Leitung sammeln durfte, hochachtungsvoll weitertragen.

An dieser Stelle möchte ich meiner Betreuerin Frau Dr. med. Pecher meinen unermesslichen Dank aussprechen. Ihre herausragende fachliche sowie persönliche Betreuung und Ihr unermüdliches Engagement haben diese Arbeit sowie meinen Werdegang entscheidend beeinflusst. Von Beginn an war Ihre Motivation sowie Ihr Enthusiasmus für die Medizin greifbar und ansteckend. Besonders möchte ich mich für die intensive Betreuung und die Zugänglichkeit für alle Anliegen bedanken. Die kurzen Kommunikationswege führten zu schnellen Lösungen und ermöglichten gemeinsam mit Ihrer Empathie und wissenschaftlichen Expertise eine hohe Arbeitsqualität und Effizienz. Dank Ihrer Unterstützung konnte ich meine Ziele erreichen und im gleichen Maße persönlich

wachsen. Ich bin zutiefst dankbar für all die Zeit und Energie, die Sie in meine Betreuung investiert haben. Ihre fachliche Expertise und Empathie werden mir stets ein Vorbild sein.

Mein weiterer Dank gilt meiner naturwissenschaftlichen Betreuerin, die mich an die experimentelle Arbeit im Labor mit höchster Motivation und Präzision herangeführt hat: Frau Dr. rer. nat. Preuß. Ich bedanke mich zu tiefst für die wertvolle Anleitung und Unterstützung. Ihre Geduld und Ihr Engagement haben mir nicht nur die Grundlagen der Laborarbeit vermittelt, sondern auch meine Begeisterung für die Wissenschaft gefestigt. Von den ersten Schritten bis hin zu komplexeren Experimenten waren Sie stets an meiner Seite und haben mir mit Ihrem Wissen und Ihrer Erfahrung zu Seite gestanden und mir geholfen, ein tiefgreifendes Verständnis für die Arbeit im Labor zu entwickeln.

Ferner möchte ich mich auch bei den weiteren wissenschaftlichen Kolleginnen des Immunpathologischen Labors der medizinische Klinik II für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung bedanken.

Zudem richte ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Henes, der sich bereit erklärte, diese Arbeit als wissenschaftliche Begleitperson zu betreuen.

Mein aufrichtigster Dank gilt meiner Kollegin Frau Dr. med. Bux für das gewissenhafte Korrekturlesen mit erfahrenen Augen und die weisen Anmerkungen.

Als letztes möchte ich mich bei den Personen in meinem Umfeld bedanken, die all dies überhaupt ermöglicht haben. Eure Liebe und Unterstützung haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich heute hier stehe.

Meine unendliche Dankbarkeit gilt meinen Eltern Romana und Ivica, die mich mit Ihrer Offenherzigkeit und Ihrem bedingungslosen Vertrauen früh prägten und auf meinen Weg brachten. Ich danke euch für eure kompromisslose Unterstützung, die mir das Vertrauen und die Freiheit gegeben haben, meine Ziele zu verfolgen. Zugleich möchte ich meiner Schwester Vanessa danken, deren Unterstützung jegliches zu erwartende schwesterliche Maß übertraf. Vielen Dank für deine unendliche Positivität, dein unerschütterliches Vertrauen und all die Mühen, die du auf dich genommen hast, um mir dies zu ermöglichen.

Mein herzlichster Dank gilt zu allerletzt meinem Partner Anton für deinen grenzenlosen Rückhalt, deinen klugen Geist und deine wertvollen Ideen.