

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. April 2010 (01.04.2010)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2010/034514 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

A61K 38/00 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2009/006963

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. September 2009 (28.09.2009)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2008 049 136.5
26. September 2008 (26.09.2008) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **LEIBNIZ-INSTITUT FÜR NATURSTOFFFORSCHUNG UND INFEKTIONS BIOLOGIE E.V. - HANS-KNÖLL-INSTITUT** - [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ZIPFEL, Peter** [DE/DE]; Schillbachstrasse 34, 07734 Jena (DE). **SKERKA, Christina** [DE/DE]; Schillbachstrasse 34, 07734 Jena (DE). **WALLICH, Reinhard** [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 52, 69118 Heidelberg (DE).

(74) Anwalt: **KRÖNCKE, Rolf**; Gramm, Lins & Partner GbR, Freundallee 13a, 30173 Hannover (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)
- Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe g)
- mit Angaben bezüglich hinterlegtem biologischen Material, eingereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung (Regel 13bis Absatz 4 Buchstabe d Ziffer i und Regel 48 Absatz 2 Buchstabe a Ziffer viii)

(54) Title: NOVEL REGULATORS OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM

(54) Bezeichnung : NEUE REGULATOREN DES ANGEBORENEN IMMUNSYSTEMS

(57) Abstract: The invention relates to the identification of new regulators of the innate immune system, in particular the complement system. More particularly, the invention relates to specific C5 convertase inhibitors. Said novel inhibitors are particularly useful for treating inflammatory diseases in which the complement system is involved. In a first embodiment, the invention is directed to the use of CFHR proteins and functional fragments or functional derivatives thereof for preventing inflammatory reactions. In another embodiment, the invention is directed to the use of said CFHR proteins for preventing complement activation during transplantations and dialyses and for coating devices that enter in contact with blood or body fluids, especially implants. According to the invention, a pharmaceutical composition comprising functional CFHR protein in combination with functional factor H is also prepared. In yet another embodiment, the invention is directed to the preparation of monoclonal antibodies which specifically detect CFHR proteins, and the use thereof in methods for determining CFHR in body fluids. Said methods are particularly suitable for diagnosing inflammatory diseases.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung von neuen Regulatoren des angeborenen Immunsystems, insbesondere des Komplementsystems. Genauer betrifft die vorliegende Erfindung spezifische Inhibitoren der C5-Konvertase. Diese neuen Inhibitoren sind insbesondere nützlich zur Behandlung von Entzündungserkrankungen, in die das Komplementsystem involviert ist. In einem ersten Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von CFHR-Proteinen und funktionalen Fragmenten oder funktionalen Derivaten davon zur Prophylaxe von Entzündungsreaktionen. In einem weiteren Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung der CFHR-Proteine zur Inaktivierung der Komplementaktivierung bei Transplantation, Dialyse sowie zur Beschichtung von Vorrichtungen, die in Kontakt mit Blut oder Körperflüssigkeiten kommen, insbesondere Implantaten. Erfindungsgemäß wird weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend funktionales CFHR-Protein in Kombination mit funktionalem Faktor H bereitgestellt. In einem weiteren Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Bereitstellung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch CFHR-Proteine detektieren und deren Verwendung in Verfahren zur Bestimmung von CFHR in Körperflüssigkeiten. Diese Verfahren eignen sich insbesondere zur Diagnose von entzündlichen Erkrankungen.



WO 2010/034514 A2

Neue Regulatoren des angeborenen Immunsystems

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung von neuen Regulatoren des angeborenen Immunsystems, insbesondere des Komplementsystems. Genauer
5 betrifft die vorliegende Erfindung spezifische Inhibitoren der C5-Konvertase. Diese neuen Inhibitoren sind insbesondere nützlich zur Behandlung von Entzündungserkrankungen, in die das Komplementsystem involviert ist. In einem ersten Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von CFHR-Proteinen und funktionalen Fragmenten oder funktionalen Derivaten davon zur
10 Prophylaxe von Entzündungsreaktionen. In einem weiteren Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung der CFHR-Proteine zur Inaktivierung der Komplementaktivierung bei Transplantation, Dialyse sowie zur Beschichtung von Vorrichtungen, die in Kontakt mit Blut oder Körperflüssigkeiten kommen, insbesondere Implantaten. Erfindungsgemäß wird weiterhin eine pharmazeutische
15 Zusammensetzung umfassend funktionales CFHR-Protein in Kombination mit funktionalem Faktor H bereitgestellt. In einem weiteren Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Bereitstellung von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch CFHR-Proteine detektieren und deren Verwendung in Verfahren zur Bestimmung von CFHR in Körperflüssigkeiten. Diese Verfahren eignen sich
20 insbesondere zur Diagnose von entzündlichen Erkrankungen.

Stand der Technik

Das Komplementsystem stellt ein für die angeborene und erworbene Immunität wichtiges Element dar und ist essentiell um eine schützende
25 Immunantwort gegenüber einem fremden Eindringling hervorzurufen. Der alternative Weg des Komplementsystems wird spontan aktiviert und umfasst die Bildung der C3-Konvertase (C3bBb), das die zentrale Komponente des Komplementsystems, C3, spaltet. Diese Spaltung generiert das anaphylaktische Peptid C3a und das aktive Protein oder Aktivierungsprodukt C3b, das sich an einer Oberfläche anlagern kann.
30 C3b, das an fremden oder veränderten Oberflächen angeheftet vorliegt, bindet den Faktor B und daraus wird die C3-Konvertase (C3bBb) ausgebildet. Diese verstärkt die weitere Komplementaktivierung, die schließlich zur Opsonisierung und Phagozytose der eindringenden Gegenstände, wie Mikroben, führen. Das Binden eines zweiten C3b-Moleküls an die C3-Konvertase führt zur Ausbildung der C5-

Konvertase (C3bBbC3b) des alternativen Weges. Die C5 Konvertase spaltet C5 und generiert den potenten Chemoattraktor C5a und das Peptid C5b. Dieses Peptid C5b initiiert die Ausbildung des terminalen Membran-angreifenden Komplexes (MAC). C5b bindet sofort an C6 und C7 in enzymunabhängiger Weise aufgrund von Konformationsänderungen. Dieser ausgebildete C5b67-Komplex löst sich von der Konvertase und haftet an Lipiddoppelschichten an. Nach Binden von C8 und C9 wird der vollständige terminale Membran-angreifende Komplex ausgebildet, der zu einer Lyse des Pathogen und Zellen führt.

Einmal aktiviert wird dieses Abwehrsystem an der Oberfläche von Wirtszellen durch sowohl Membran-verankerte als auch lösliche Regulatoren, die sowohl in der Flüssigphase als auch an der Oberfläche anheften, streng reguliert. Um keine negativen Wirkungen gegen eigenes Gewebe und eigene Zellen sicherzustellen, ist diese strenge Regulierung notwendig. Einzelne Mutationen in Genen, die für die entsprechenden Regulatoren der Wirtszellen kodieren und zu defekten Proteinfunktionen führen, sind prädispositiv für verschiedene Immundefekt- und Autoimmunerkrankungen sowie renale und Retina-Erkrankungen, z.B. hämolytisches urämisches Syndrom (HUS), membranproliferative Glomerulonephritis Typ II (MPGN II) oder altersbedingte Makuladegeneration (AMD).

Es ist bekannt, dass diese unterschiedlichen Erkrankungen durch defekte lokale Komplementregulationen hervorgerufen werden und mit Genvariationen und Mutationen in Komplementkomponenten und Regulatoren, wie dem CFH (Komplementfaktor H), assoziiert sind. So wurde gezeigt, dass eine Deletion eines 84 kb genomischen Fragments auf dem humanen Chromosomen 1, das zu einem Verlust der Komplementfaktor H verwandten Gene 1 und 3 (Komplementfaktor H related genes 1 and 3 (CFHR1, CFHR3)) führt, mit sowohl HUS als AMD assoziiert sind (Zipfel PF. et al., PLoS .3:E41 (2007), Hughes A. E. et al.; Nat. Genet. 38, 1173-1177 (2006)). Allerdings zeigten diese chromosomalen Deletionen gegensätzliche Effekte, so führte bei HUS die Deletion zu einem erhöhten Risiko für die Erkrankung, während bei der AMD eine protektive Wirkung beschrieben wird.

Die Abwesenheit dieser beiden Plasmaproteine CFHR1 und CFHR3 korrelieren des Weiteren mit dem Vorhandensein von Autoantikörpern gegenüber CFH (Jozsi, M. et al., Blood, 111, 1512-1514 (2008)). Diese identifizierten Autoantikörper binden an das C-terminale Ende von CFH. Dieser Bereich bildet ein Schwerpunkt der HUS-Mutationen und führt zu einer reduzierten Anheftung von CFH an die Oberfläche.

Eine entsprechende Autoantikörperbindung an CFH führt somit zur Hemmung der Anhaftung von CFH an die Oberfläche und daraus resultieren Schädigungen von Endothelzellen, genauso wie von Blutplättchen.

Die Familie der CFHR-Proteine umfasst derzeit beim Menschen fünf Mitglieder, CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 und CFHR5. Auch in anderen Spezies kommen CFHR Gene und Proteine vor. Bei der Maus und bei der Ratte werden diese z.B. als CFHR-A, CFHR-B, CFHR-C etc bezeichnet.

Diese Mitglieder der CFHR-Protein Familie zeichnen sich alle durch eine sehr ähnliche Struktur, im Aufbau ähnliche Module und eine hohe Sequenzhomologie zwischen den einzelnen Modulen zu einander aus. Allerdings wird jedes CFHR Protein von einem spezifischen eigenständigen Gen kodiert. Die Funktion der einzelnen CFHR Proteine ist nicht bekannt. Es ist lediglich gezeigt, dass die CFHR Proteine keine Kofaktoraktivität and Decay Aktivität aufweisen.

Die CFHR-Proteine weisen auch zum Komplementfaktor H (CFH) eine hohe Sequenzhomologie auf. Insbesondere im C-terminalen Bereich zeigt z.B. CFHR1 mit seinen drei SCR (short complement regulator)-Domainen eine hohe Homologie, die von einer fast 100%igen bis zu einer geringen, ca. 65 %igen Identität variiert, mit den entsprechenden SCR-Domänen am C-terminalen Ende des Komplementfaktors H auf.

Das CFHR1-Plasmaprotein setzt sich aus 5 dieser SCR-Domänen zusammen und wurde in zwei glykosylierten Formen im menschlichen Plasma identifiziert. CFHR1-beta hat zwei und CFHR1-alpha hat eine angeheftete Zuckerseitenkette.

Die Funktion von CFHR-1 und den verwandten Molekülen CFHR2, CFHR3, CFHR4 und CFHR5 ist unbekannt. Bisher wurde spekuliert, dass die Moleküle die folgenden Funktionen haben könnten: Bindung an C3b und an Heparin und einen modulierenden Einfluss auf die regulative Funktion von Faktor H.

Wie oben ausgeführt, stellt die C5-Konvertase ein wesentliches Ziel für die Hemmung der Komplementaktivierung dar, da sowohl das aus dem C5 entstehende Anaphylatoxin C5a für das Auslösen einer lokalen Entzündungsantwort bei einer Infektion notwendig ist, als auch das entstehende Peptid C5b, das zusammen mit C6 den Ausgangskomplex für die Ausbildung des terminalen Membran-angreifenden Komplexes ausbildet.

Inhibitoren, die dieses Enzym spezifisch hemmen, sind bisher nicht bekannt und sind daher besonders geeignet, die entsprechende sich anschließende alternative Komplementaktivierung zu hemmen.

Ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von spezifischen
5 Inhibitoren der C5-Konvertase, um so den alternativen Weg, d.h. die Komplementaktivierung einschließlich der Ausbildung von terminalen Membran angreifenden Komplexen zu hemmen, sowie ein Hemmen der Ausbildung von wirksamen anaphylaktischen, und möglicherweise antimikrobiellen Peptiden, nämlich C5a. Diese spezifische Hemmung der C5 Konvertase sollte bevorzugt nicht den
10 klassischen Weg oder den Lektinweg der Komplementaktivierung beeinflussen.

Zusätzlich ist eine Inhibierung der terminalen Komplementaktivierung in Form der Bildung und Assemblierung des terminalen Komplement Komplexes (MAC, Membranangriffskomplex oder TCC) und dessen Einlagerung in die Lipidbilayer Membran von großem Interesse. Gegenwärtig sind zwei Inhibitoren des terminalen
15 Komplementweges bekannt, Clusterin und Vitronektin. Allerdings ist die Spezifität dieser Regulatoren nicht sehr hoch, so dass es sinnvoll ist, weitere spezifischere Inhibitoren einzusetzen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Detektionsmitteln, insbesondere Antikörpern, die spezifisch den Nachweis von
20 CFHR-Molekülen erlauben. Schließlich ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Mitteln zur Behandlung von Entzündungen sowie Verfahren hierfür.

Zusammenfassung der vorliegenden Erfindung

25 Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung von CFHR-Proteinen, insbesondere von CFHR1-Proteinen, oder funktionalen Fragmenten oder funktionalen Derivaten hiervon zur Behandlung oder Prophylaxe von Autoimmunerkrankungen oder Entzündungsreaktionen bereit.

Es wurde vorliegend festgestellt, dass CFHR-Proteine spezifische Inhibitoren
30 der C5-Konvertase sind. Durch spezifisches Hemmen der C5-Konvertase können sowohl die Bildung des Anaphylatoxins C5a als auch die Ausbildung des terminalen Membran-angreifenden Komplexes gehemmt werden. Dabei handelt es sich bei den CFHR-Proteinen um spezifische C5-Konvertase-Inhibitoren, die nicht die C3-Konvertase, im Gegensatz zu bekannten C3/C5-Konvertase-Inhibitoren wie CFH,

hemmen. D.h. vorliegend wird zum ersten Mal ein C5-Konvertase spezifischer Inhibitor beschrieben. Diese spezifischen Inhibitoren erlauben eine Modulation des alternativen Wegs der Komplementaktivierung ohne den klassischen Weg signifikant zu beeinflussen, z.B. zu blockieren.

5 In einem Aspekt richtet sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung dieser funktionalen CFHR-Proteine und deren funktionalen Fragmente und Derivate zur Inaktivierung der Komplementaktivierung, insbesondere bei Transplantation oder Dialyse. In einem weiteren Aspekt können diese funktionalen CFHR-Proteine zur Beschichtung von Oberflächen, die in Kontakt mit Blut und Körperflüssigkeit
10 gelangen können, wie Implantatoberflächen, verwendet werden.

In einem weiteren Aspekt werden entsprechende Beschichtungen und Vorrichtungen bereitgestellt.

Des Weiteren richtet sich die vorliegende Erfindung auf eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend funktionales CFHR-Protein in Kombination mit
15 funktionalem Faktor H.

Schließlich wird ein monoklonaler Antikörper bereitgestellt, der spezifisch CFHR-Proteine erkennt. Insbesondere erlaubt dieser monoklonale Antikörper die spezifische Erkennung von CFHR-Protein, wie CFHR1-Protein im Vergleich zum Komplementfaktor H.

20 Schließlich werden Verfahren zur Bestimmung von CFHR in Körperflüssigkeiten, insbesondere im Blut und Blutplasma, bereitgestellt, umfassend die Verwendung des erfindungsgemäßen Antikörpers, insbesondere zur Diagnose von hämolytisch-urämischem Syndrom, altersabhängige Makuladegeneration oder membranoproliferativer Glomerulonephritis aber auch Atherosklerose und andere
25 Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythomatosus.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Figur 1: Figur 1 zeigt die Fähigkeit von CFHR1 an C3b, C3d, Heparin und an humane Zellen zu binden. Figur 1a zeigt den Aufbau von CFHR1 im Vergleich zum
30 Komplementfaktor H. Dabei zeigen die ersten beiden SCRs von CFHR1 42 bzw. 34 %ige Sequenzidentität mit den SCRs 6 und 7 von CFH. Die drei C-terminalen SCRs des CFHR1 zeigen eine 100, 100 bzw. 98%ige Sequenzidentität zu den SCRs 18 bis 20 von CFH. Figur 1b zeigt, dass äquimolare Konzentrationen von CFHR1 und CFH an immobilisiertes C3b binden. Die Daten zeigen die Durchschnittswerte plus minus

Standardabweichungen von einem von drei unabhängigen Experimenten. A490: Absorption bei 490 nm. Co: Kontrolle. Figur 1c zeigt die Bindung von CFHR1 bzw. CFH an immobilisiertes Heparin. Die Kontrolle stellt die Hintergrundbindung der Antikörper in Anwesenheit des Puffers dar. Figur 1d zeigt die CFHR1-Bindung an HUVEC-Zellen, wobei das CFHR1-Protein aus Plasma erhalten wurde. Die Zellen wurden im humanen Plasma inkubiert und gebundenes CFHR1 wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers JHD10 mit der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Kontrollzellen wurden mit sekundären Antikörpern alleine behandelt. Figur 1e zeigt die Bindung (10 µg/ml) von rekombinantem CFHR1 an HUVEC-Zellen und an retinale Pigmentepithelzellen; die Linie bedeutet dabei eine Größe von 20 µm. In ähnlicher Weise wurde die CFHR1-Bindung bei Kaninchenerythrozyten vorbehandelt mit C3b untersucht .

Die Figur 2 zeigt die CFHR1-Färbung an Gewebeschnitten der Niere und der Choroidea. I zeigt die Färbung in der Niere, II im Auge. Die Gegenfärbung ist mit Propidiumiodid.

In der Figur 3 wird die Spezifität des hierin beschriebenen monoklonalen Antikörpers JHD10, der spezifisch CFHR1 in humanem Serum erkennt und nicht mit CFH kreuzreagiert, dargestellt. In Figur 3a wird die Spezifität des monoklonalen Antikörpers gezeigt. Spur 1 normales Humanserum, Spur 2 CFH, Spur 3 normales Humanserum, Spur 4 CFH. Während der CFH-spezifische Antikörper CFH detektiert zeigt der monoklonale Antikörper JHD10 nur gegenüber den CFHR1-Molekülen eine Reaktivität. In der Figur 3b ist eine Silberfärbung vom aufgereinigten rekombinanten CFHR1 (Spur 1) und CFHR-Fragmenten CFHR1/1-2 (Spur 2) und CFHR1/3-5 (Spur 3) gezeigt. In der Figur 3c werden rekombinantes CFHR1 und aus Plasma erhaltenes natives CFHR1 (Spuren 1 und 3 bzw. 2 und 4) dargestellt. Die rechte Seite zeigt einen Immunoblot unter Verwendung des spezifischen CFHR1-Antikörpers, die linke Seite zeigte eine Silberfärbung.

In der Figur 4 wird dargelegt, dass CFHR1 mit Faktor H um die Bindung an die Bindungspartner konkurriert. Figur 4a zeigt Immunfluoreszenzaufnahmen, aus denen deutlich wird, dass CFH und CFHR1 kolokalisieren (gelbes Signal, ergebend aus der grünen Fluoreszenz für CFH und roter Fluoreszenz für CFHR1). Figur 4b zeigt die Konkurrenz von CFHR1 mit Faktor H um die C3-Bindung. Die Daten stellen Durchschnittswerte aus drei separaten Experimenten plus minus Standardabweichungen dar. A490: Absorption bei 490 nm; *p<0,05 gegenüber

Bindung von CFHR1: CFH (0:1). Figur 4c zeigt die kompetitive Bindung von CFHR1 mit Faktor H bei Heparin. Dargestellt wird die Mobilität der alpha' und beta-Kette sowie der Degradationsfragmente.

Die Figur 5 zeigt die Ergebnisse zur Regulation des alternativen Komplementweges durch CFHR1. In der Figur 5a ist die Hämolyse von Schaferythrozyten in Anwesenheit von CFHR1 und CFH depletiertem normalen Humanserum (HPΔCFH-CFHR1) dargestellt. Zum Vergleich die Ergebnisse mit Vitronectin, CFH und HSA. Eine Dosis-abhängige Reduktion der Lyse konnte durch Zugabe von CFHR1 gezeigt werden. In der Figur 5b wird die Hemmung des alternativen Komplementweges durch CFHR1 dargestellt. Unter Zuhilfenahme eines ELISA's wurde jeder der drei Komplementwege separat induziert. AP alternativer Weg, CP klassischer Weg, LP Lectinweg; A440: Absorption bei 440 nm. Für den alternativen Weg konnte für CFHR1 eine Dosis-abhängige Wirkung dargestellt werden (Quadrate). Figur 5c zeigt, dass CFHR1 nicht die Bildung von C3a beeinflusst, im Gegensatz zu CFH. In der Figur 5d wird die protektive Wirkung von CFHR1 sowie die Hemmung der C5bC6-Generierung dargestellt. Dazu wurden Kaninchenerythrozyten mit humanem Komplement aktiven, C7 depletierten CFHR1/CFHR3 defizienten humanen Plasma inkubiert. CFHR1 wurde dann in entsprechender Konzentration hinzugefügt. Die Lyse wurde mit Hilfe von Huhnerythrozyten, zu denen sublytische Mengen an humanem Plasma als Quelle für C7 hinzugegeben wurden. Die Erythrozytenlyse wurde nach 15 Minuten Inkubation bestimmt.

In der Figur 6 wird dargestellt, dass CFHR1 die C5-Konvertaseaktivität reguliert und an C5 und C5b6 binden kann sowie die Bindung von C5b6 an Zelloberflächen und somit die Bildung des MAC und die enzymatische Aktivität des MAC hemmt. In der Figur 6a ist die Wirkung von CFHR1 auf die Lyse von Schaferythrozyten sowie die Bildung von C3a und C5a im Überstand der Probe dargestellt. Die Daten stellen Durchschnittswerte von drei getrennten Experimenten und deren Standardabweichungen dar. *:p<0,05, **:p<0,005 im Vergleich zur Kontrolle. In der Figur 6b wird die Wirkung von CFHR1 auf die Ablagerung von C3b und C5b auf die Oberfläche von Schaferythrozyten bestimmt. In der Figur 6c sind Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt, aus denen deutlich wird, dass CFHR1 die Anlagerung von C5b auf Zelloberflächen hemmt, während CFH die Anlagerung von sowohl C3b als auch C5b hemmt.

In der Figur 7 wird die Bindung von CFHR1 an C5 bzw. C5b6 und die Hemmung des terminalen Komplementweges aufgezeigt. In der Figur 7a wird die Bindung von CFHR1 an immobilisiertes C5 bzw. C5b6 dargelegt. Als Kontrolle wurde die Bindung des Antikörpers JHD10 an C5 oder C5b6 alleine bestimmt. Figur 7b zeigt, dass die Bindung von C5 bzw. C5b6 über den N-terminalen Bereich von CFHR1 erfolgt. **p<0,001 gegenüber der Bindung von C5 oder C5b6 an C18 vermittelter CFHR1-Immobilisierung. In der Figur 7c wurden Huhnerythrozyten mit C5b6-Komplexen (5 ng/ml) inkubiert, zunehmende Konzentrationen von CFHR1 und nicht lytischem HP wurden hinzugefügt. Es ist eine Dosis-abhängige Hemmung der Lyse bei Zugabe von CFHR1 zu erkennen, während CFH und HSA als Kontrollen die Lyse nicht einschränken. Figur 7d zeigt die Hemmung der Lyse durch CFHR1 von Schaferythrozyten im Vergleich zu CFH und BSA. Ähnliche Werte wurden für den bekannten Inhibitor Vitronectin (Vitro) gefunden. Die Daten stellen Durchschnittswerte plus minus Standardabweichungen von 2 separaten Experimenten dar.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft in einem ersten Aspekt die Verwendung von funktionalen CFHR-Proteinen zur Behandlung oder Prophylaxe von Autoimmunerkrankungen und Entzündungsreaktionen.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Ausdruck „funktionale CFHR-Proteine“ sowohl das CFHR-Protein selbst als auch funktionale Fragmente dieses Proteins und auch funktionale Derivate des CFHR-Proteins, die in ihrer Funktion der Hemmung der C5-Konvertase, wie hierin gezeigt, dem Gesamt-CFHR-Protein gleichen. Der Ausdruck CFHR-Protein schließt hierbei die humanen CFHR-Proteine CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 und CFHR5 ein, wobei die einzelnen Proteine, die folgenden Hinterlegungsnummern haben: CFHR1 NM 002113 gi 118442838, CFHR2 NM 005666 gi49574530, CFHR3 NM 021023 gi 118421081, CFHR4 NM 006684 gi 117320517, CFHR5 NM 030787 gi 164607154.

Im Folgenden wird unter dem Ausdruck „funktionales CFHR-Protein“ sowohl das Protein als auch die funktionalen Derivate und funktionalen Fragmente verstanden, soweit anders ausgeführt. Bevorzugt ist aber die Verwendung des reifen CFHR-Proteins.

„Funktional“ bedeutet hierbei, dass die CFHR-Moleküle, insbesondere die CFHR-Proteine aber auch die Fragmente oder Derivate der CFHR-Proteine inhibitorisch auf die C5-Konvertase wirken und gegebenenfalls die Bildung und Aktivität des MAC hemmt ohne die C3 Konvertase des Komplementsystems zu hemmen, wie vorliegend für CFHR-1 gezeigt. Bevorzugt weist dabei das funktionale Fragment eine mindestens 60%ige, wie 70%ige, insbesondere 80%ige, bevorzugt 90%ige Aktivität bezüglich der hemmenden Wirkung gegenüber der C5-Konvertase im Vergleich zum Gesamt-CFHR-Protein, insbesondere dem CFHR1-Protein, auf.

Fragmente schließen dabei solche von dem CFHR-Protein abgeleitete Polypeptide ein, die wenigstens eine Deletion, Mutation oder Addition einer Aminosäure aufweisen.

Derivate des CFHR-Proteins sind Polypeptide, die durch posttranslationaler Modifikation des CFHR-Proteins bzw CFHR-Fragments, wie z.B. Glykosilierung, Acetylierung, Phosphorylierung und dergleichen, verändert wurden. Diese Derivate schließen weiterhin solche Polypeptide ein, in denen ein oder mehrere Analoga von Aminosäuren einschließlich nicht natürlich vorkommender Aminosäuren, Polypeptide mit substituierten Verknüpfungen, wie PNA-Polypeptide sowie weiterer Modifikation, wie sie natürlich oder nicht natürlich vorkommen.

Soweit nicht anders ausgeführt, wird unter dem Ausdruck „Komplementaktivierung“ einerseits die Ausbildung des terminalen Membranangreifenden Komplexes, im Folgenden auch MAC (membrane attacking complex) verstanden. Andererseits umfasst der Ausdruck „Komplementaktivierung“ die Generierung von entzündungsvermittelnden Peptiden, insbesondere Anaphylatoxinen, wie C5a.

Unter dem Ausdruck „Körperflüssigkeiten“ werden Flüssigkeiten des Körpers verstanden einschließlich Blut, Blutplasma, Lymphe, Cerebrospinal Flüssigkeit, Liquor, Synovial Flüssigkeit etc.

Bevorzugt handelt es sich erfindungsgemäß bei dem CFHR-Protein um das CFHR1-Protein.

Es zeigte sich, dass funktionale CFHR-Proteine eine hemmende Wirkung spezifisch auf die C5-Konvertase aufzeigen. Die C5-Konvertase spaltet das Komplement C5 in die Peptidbestandteile C5a und C5b. C5a wirkt als entzündungsvermittelndes Anaphylatoxin, die lokal die Entzündungsreaktionen induzieren bzw. verstärken. Ein C5b-Molekül bindet an ein C6-Molekül und dieser

C5b,6-Komplex lagert sich dann an einem Moleküle von C7 an. Diese Reaktion führt zu einer Konfirmationsänderung bei den beteiligten Molekülen, wobei eine hydrobe Stelle auf C7 zugänglich wird. Diese hydrophobe Domaine von C7 schiebt sich in die Lipiddoppelschicht. Hydrophobe Stellen werden auf ähnliche Weise bei den späteren
5 Komponenten C8 und C9 exponiert, wenn sie sich an den Komplex binden; diese erlaubt es ihnen ebenfalls in die Lipiddoppelschicht einzudringen. Der nächste Schritt ist die Anlagerung eines C8-Moleküls an dem Membran assoziierten C5b67-Komplex. C8 ist ein Komplex aus zwei Proteinen: C8beta, das an C5b bindet, und C8alpha-gamma, das in die Lipiddoppelschicht eindringt. Schließlich induziert
10 C8alpha-gamma die Polymerisierung von 10 bis 16 C9-Molekülen zu einer ringförmigen Struktur, die als terminaler Membran-angreifender Komplex bezeichnet wird. So kann die Zelle bzw. das Pathogen schließlich zerstört werden.

Vorliegend zeigt sich nun, dass CFHR-Protein, insbesondere das CFHR1-Protein, die Aktivität der C5-Konvertase und des Weiteren die Bildung von C5a und
15 C5b inhibieren kann. Weiterhin zeigte es sich, daß das CFHD-Protein erfindungsgemäß nicht die Aktivität der C3 Konvertase hemmt. Schließlich ermöglicht das CFHR-Protein eine Hemmung der Bildung des C5Bb6(7) Komplexes und somit der Ausbildung des MAC. Diese Eigenschaft erlaubt die Verwendung des funktionalen CFHR-Proteins zur Behandlung oder Prophylaxe von
20 Entzündungsreaktionen. Bevorzugt handelt es sich bei den Entzündungsreaktionen um Entzündungsreaktionen im Rahmen einer Autoimmunerkrankung

Bei diesen Autoimmunerkrankungen, bei denen gegebenenfalls Autoantikörper vorliegen, handelt es sich insbesondere um solche, wie rheumatoide Arthritis, Lupus Erythematosus, hämolytisch-urämische Syndrom, Atherosklerose,
25 Nierenerkrankungen, wie Glomerulonephritis und andere.

Des Weiteren können mit Proteinurie in Verbindung stehende Krankheitsbilder behandelt werden, wie Proteinurie bei Nierenerkrankungen.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei den zu behandelnden Entzündungsreaktionen um solche im Rahmen einer Sepsis, rheumatoider Arthritis,
30 Alzheimer-Erkrankung, Atherosklerose, Lupus Erythematosus, Antiphospholipid-Syndrom, Preclampsie, Multiple Sklerose, Myocarditis, Asthma, rekurrendes Schwangerschaftsverlust Syndrom.

In einem weiteren Aspekt eignen sich die CFHR-Proteine zur Inaktivierung der Komplementaktivierung und hier insbesondere zur Inaktivierung der

Komplementaktivierung bei Transplantation oder Dialyse. Da die Defizienz von CFHR1 zu Schädigungen der Niere führt und bei einer Transplantation das aktivierte Komplementsystem eine wesentliche Rolle bei der Annahme des Transplantats spielt sind spezifische Inhibitoren, die eine spezifische Inhibition der Komplementaktivierung ermöglichen, therapeutisch wünschenswert.

Schließlich betrifft eine weitere Verwendung des CFHR-Proteins die Beschichtung von Vorrichtungen und Oberflächen, die mit Körperflüssigkeiten und insbesondere Blut oder Blutplasma in Verbindung kommen. Durch Beschichtung der Vorrichtungen kann eine Komplementaktivierung in der Körperflüssigkeit durch diese Vorrichtungen verhindert werden.

Daher richtet sich ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung auf eine Beschichtung einer Vorrichtung, die in Kontakt mit Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut oder Blutplasma, kommt, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche mit funktionalen CFHR-Proteinen beschichtet ist.

Diese Beschichtung eignet sich insbesondere für implantierbare Vorrichtungen, wobei diese implantierbare Vorrichtung zur Verwendung am Körper eines Individuums vorgesehen ist.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung richtet sich auf solche Vorrichtungen, die in Kontakt mit Körperflüssigkeiten, wie insbesondere Blut oder Blutplasma, kommen. Diese Vorrichtung, bei der es sich um insbesondere um implantierbare Vorrichtungen handelt, zeichnet sich dadurch aus, dass auf der Oberfläche funktionales CFHR-Protein aufgebracht wurde.

CFHR1 als Beispiel für CFHR-Proteine zeigt eine hemmende Wirkung auf die Komplementaktivierung des alternativen Wegs. Dabei stellte sich heraus, dass diese Wirkung nicht darauf beruht, dass die C3-Konvertase gehemmt wird, obwohl CFHR1 mit dem Komplementfaktor H (CFH) um die Bindung an C3b konkurriert und CFH teilweise ersetzen kann. Im Gegenteil, eine Hemmung der C3 Konvertase wird nicht beobachtet. Versuche zeigten, dass CFHR1 im wesentlichen spezifisch die Aktivierung des alternativen Komplementweges regulieren kann.

Es konnte ein CFHR1-Dosis-abhängiger inhibierender Effekt auf die Komplement vermittelte Lyse durch Ausbildung des terminalen Komplexes und MAC-Bildung aus gezeigt werden. D.h. das erfindungsgemäße CFHR-Molekül kann die Bildung und die Aktivität von MAC hemmen.

Schließlich zeigte sich, dass CFHR1 über die C5-Konvertase und dem MAC vor allem den alternativen Weg aber gegebenenfalls auch den klassischen und den Lektin Weg hemmen kann.

Die Gabe von CFHR1 führte zu einer Herunterregulierung der Entstehung von C5a- Peptiden und C5b-Proteinen, die Generierung von C3a und C3b wurde dagegen nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu die Wirkung von CFH, das sowohl die C3-Konvertase als auch die C5-Konvertase hemmt und damit sowohl die Generierung von C3a und C3b als auch von C5a und C5b hemmt. Das heißt, die CFHR-Proteine zeigen ein sich vom CFH unterscheidenes Aktivitätsprofil, indem sie nur hemmend auf die C5 Konvertase wirken, während CFH auf die in der Kaskade vorstehende C3 Konvertase und auf die C5 Konvertase einwirkt.

Tatsächlich kann CFHR1 an C5 und an den C5b6-Komplex binden. Dadurch wird das Ausbilden des MAC's gehemmt und eine Lyse von Zellen bzw. Mikroben verhindert.

Es zeigte sich somit, dass CFHR1 den alternativen Weg durch Hemmung der C5-Konvertase-Aktivität, des Zusammengehens des MAC und durch Verhindern der Oberflächenbindung reguliert.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung richtet sich auf die Ergänzung einer CFH-Therapie mit CFHR-Proteinen. Die beiden Proteine stellen wichtige Regulatoren der Komplementkaskade dar, die zu unterschiedlichen Eingriffen in das Komplementsystem führen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung richtet sich somit auf eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend funktionales CFHR-Protein. Bevorzugt umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung weiterhin den funktionalen Komplementfaktor H, d.h. in einer bevorzugten Ausführungsform ist die pharmazeutische Zusammensetzung eine umfassend funktionales CFHR-Protein in Kombination mit funktionalem Komplementfaktor H. Die pharmazeutische Zusammensetzung enthält weiterhin gegebenenfalls übliche pharmazeutisch annehmbare Diluenten, Träger und Excipienten, wie sie dem Fachmann wohl bekannt sind.

Im Gegensatz zu der bisherigen Auffassung haben CFH und CFHR-Protein unterschiedliche Wirkungen und entsprechend ist eine Kombination dieser beiden Klassen von Proteine in einer pharmazeutischen Zusammensetzung sinnvoll, um die hierin beschriebenen unterschiedlichen Effekte dieser Moleküle zu nutzen. Somit

kann im Gegensatz zu der Lehre in der WO2006/088950 CFH nicht durch CFHR ersetzt werden, da sich angeblich gleichwirkend seien, vielmehr führt eine Kombination dieser beiden Molekülklassen zu einer verbesserten Wirkung, da sie unterschiedliche Wirkungen auf das Komplementsystem zeigen.

5 Die pharmazeutischen Formulierungen können weiterhin übliche pharmazeutisch annehmbare Hilfsmittel umfassen, wie sie dem Fachmann wohl bekannt sind. Diese pharmazeutischen Formulierungen können über die üblichen Wege verabreicht werden und umfassen wirksame Mengen der aktiven Inhaltsstoffe, nämlich funktionalem CFHR-Protein gegebenenfalls in Kombination mit funktionalem
10 Komplementfaktor H.

Funktionale CFHR-Proteine und funktionaler Komplementfaktor H können aus natürlichen Quellen, wie humanem Plasma oder Serum oder rekombinant erhalten werden. Dem Fachmann sind Verfahren zur Isolierung von natürlichem CFHR-Protein bzw. Faktor H-Protein und gentechnischen Verfahren zur rekombinanten
15 Herstellung der funktionalen CFHR-Proteine und funktionalen Faktor H-Proteine bekannt.

Annehmbare pharmazeutische Träger und Excipienten, genauso wie geeignete pharmazeutische Formulierungen sind allgemein bekannt, siehe z.B. pharmaceutical formulation development of peptides or proteins, Frokjaer et al.
20 Taylor & Francis (2000) or Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000).

Zum Beispiel können die pharmazeutischen Formulierungen als in lysierter oder stabilisierter löslicher Form bereitgestellt werden.

Die Verabreichungswege umfassen systemische Verabreichungswege, wie
25 parenterale Verabreichungswege, z.B. intravenöse, subkutane, intramuskuläre, intraperitoneale, intercerebrale, intrapulmonale, intranasale oder transdermale Wege oder enterale Wege, wie orale, vaginale oder rektale Wege.

Die therapeutisch wirksame Menge an funktionalem CFHR-Protein bzw. funktionalen Faktor H-Protein kann von vielen Faktoren abhängen einschließlich der
30 Indikation, der Formulierung, dem Verabreichungsweg und dem Alter und Zustand des Individuums. Der Fachmann kann unter Berücksichtigung dieser Parameter die wirksame Dosis bestimmen.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung können alleine oder in Verbindung mit anderen therapeutischen Mitteln

verabreicht werden, die gegebenenfalls in eine pharmazeutische Formulierung eingefügt werden können.

Schließlich richtet sich in einem weiteren Aspekt die vorliegende Erfindung auf monoklonale Antikörper, die spezifisch CFHR-Protein immunhistologisch und immunbiochemisch nachweisen. Insbesondere erlauben diese monoklonalen Antikörper eine Unterscheidung zwischen CFHR-Protein und CFH-Protein.

Dieser monoklonale Antikörper ist insbesondere einer, der spezifisch eine Bindung an humanem CFHR, insbesondere CFHR1-Protein aufzeigt, wobei der monoklonale Antikörper gegebenenfalls die gleichen Eigenschaften wie der monoklonale Antikörper der Hybridomzelllinie JHD-7.10.1 hinterlegt gemäß Budapester Vertrag bei der DSMZ, Braunschweig aufzeigt. Dieser monoklonale Antikörper bindet im N-terminalen Bereich des CFHR-1 Proteins.

In einer bevorzugten Ausführungsform richtet sich die vorliegende Erfindung daher auf einen monoklonalen Antikörper, der zu einer spezifischen Bindung an menschlichem CFHR-Protein fähig ist, wobei der monoklonale Antikörper mit dem selben Epitop vom menschlichen CFHR-Protein reagiert, wie der monoklonale Antikörper, der von der Hybridomzelllinie JHD-7.10.1 hinterlegt gemäß Budapester Vertrag bei der DSMZ, Braunschweig erhältlich ist, DSM ACC 2978.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine Hybridomzelllinie, die einen erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper exprimiert. Besonders bevorzugt handelt es sich bei dieser Hybridomzelllinie um die Hybridomzelllinie JHD-7.10.1 hinterlegt gemäß Budapester Vertrag bei der DSMZ, Braunschweig, DSM ACC 2978.

Diese monoklonalen Antikörper ermöglichen Verfahren zur spezifischen Bestimmung von CFHR-Protein, insbesondere CFHR1-Protein, in Körperflüssigkeiten, wie Blut, insbesondere Plasma oder Serum ohne daß CFH Proteine bestimmt werden. Dieses erfindungsgemäße Verfahren umfasst dabei den Schritt des Inkubierens einer zu testenden Probe mit einem erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper und Bestimmen der monoklonalen Antikörper gebunden an CFHR, insbesondere CFHR1-Protein. Dieses Verfahren kann dabei ein qualitatives oder (semi)-quantitatives Verfahren sein.

Solche diagnostischen Verfahren sind insbesondere geeignet, den Gehalt an CFHR1-Protein in Körperflüssigkeiten, wie dem Blut und insbesondere dem Plasma von Individuen zu bestimmen, die auf hämolytisch-urämisches Syndrom,

altersabhängige Makuladegeneration oder auf membranproliferative Glomerulonephritis und anderen entzündungsbasierten Nierenerkrankungen, sowie weiteren Autoimmunerkrankungen untersucht werden. Die Defizienz von CFHR1 aber auch CFHR3 im Plasma stellt ein Risikofaktor zur Entwicklung von z.B. HUS dar. Deshalb ist ein erfindungsgemäßer Antikörper zur Detektion von CFHR1 im Plasma geeignet, dieses Risiko zu bestimmen und bei Feststellung der Defizienz und vor allem jugendlichen Patienten mit HUS ist von therapeutischem Nutzen, da die Defizienz mit dem Vorkommen von Autoantikörpern korreliert, die eine andere Art der Behandlung dieses Patienten initiiert, nämlich die Reduktion der Antikörper und die Komplementierung der CFHR-Proteine.

In einer bevorzugten Ausführungsform richtet sich daher die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Diagnose von HUS umfassend die Schritte der Bestimmung von CFHR-Protein mit Hilfe des erfindungsgemäßen Antikörpers in Kombination mit der Bestimmung von Autoantikörpern.

Die erfindungsgemäßen Diagnoseverfahren können dabei übliche Verfahren beinhalten, wie z.B. ELISA, Western Blot Verfahren, immunologische Schnelltests, und proteinbasierende Microarrays,

Auch bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) ist die Anwesenheit von CFHR1 im Plasma von Bedeutung und die Entwicklung von AMD korreliert mit dem Vorhandensein von CFHR1-Protein. Ein entsprechendes diagnostisches Verfahren erleichtert daher die Erkennung und Prognose von AMD.

Weitere Aspekte der Erfindung richten sich auf Verfahren zur Behandlung von Entzündungsreaktionen mit funktionalen CFHR-Proteinen aber auch mit dafür codierende Nukleinsäuren.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen unter Verwendung von CFHR1-Protein weiter dargestellt. Die Erfindung ist aber nicht auf die folgenden Beispiele eingeschränkt.

Verfahren

30 Proteine und Antikörper

Rekombinantes CFHR1 und Deletionsmutanten von CFHR1 SCRS1 - 2 (CFHR1/1-2) und CFHR1SCR3-5 (CFHR1/3-5) wurden gemäß bekannten Verfahren exprimiert. Die Proteine wurden dabei in *Pichia pastoris* exprimiert und mit Hilfe der Nickel-Chelat Affinitätschromatographie aufgereinigt. Vitronectin wurde von BD

Biosciences (Belgien) erhalten. C3b, C3d, C5, C5bC6, Faktor H und Faktor I wurden von Merck Biosciences (Schwalbach, Germany) und C7, C8 und C9 von Comptech (Taylor, USA) erhalten.

Aufreinigung von natürlichem CFHR1

5 CFHR1-Protein wurde mit Hilfe von Heparinchromatographie (HiTrap Heparin HP-Säule, GE Healthcare, München, Deutschland) verdünnt mit Sterofundin (Braun Melsungen, Deutschland) aufgereinigt. Die Proteine wurden mit einem 3-Schritt-Gradienten von NaCl (100, 200 und 300 mM) gelöst in Sterofundin eluiert. Die gepoolten Eluatfraktionen von 100 und 200 mM NaCl-Gradienten wurden
10 einkonzentriert (Superdex 2000, Satorius, Deutschland), und die Proteine wurden mit 1 x PBS auf einen pH-Wert von 4,7 eingestellt. Die Proben wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt und die CFHR1 enthaltende Bande wurde aufgrund der Mobilität der Größenmarker identifiziert, die entsprechende Region wurde ausgeschnitten und CFHR1 wurde eluiert, konzentriert und 6x gegenüber PBS pH 4,7 dialysiert.

15 Der Maus-monoklonale Antikörper C18 (Alexis, Lausen, Schweiz) wurde zum Nachweis des C-Terminus von CFH und CFHR1 eingesetzt. Zum spezifischen Nachweis von CFHR1 wurde der monoklonale Antikörper JHD10 aus der Hybridomzelllinie JHD-7.10.1 hinterlegt gemäß Budapester Vertrag bei der DSMZ, Braunschweig, DSM ACC 2978, eingesetzt. Dieser Antikörper richtet sich gegen
20 aufgereinigtes CFHR1-SCR1-2 Fragment, bindet also im N-terminalen Bereich von CFHR1. Bei höherer Konzentration dieses Antikörpers werden ebenfalls CFHR5 und CFHR2 nachgewiesen. Anti C5, anti C6, anti C7 wurden von Comptech (USA) erhalten.

Sekundäre Antikörper wurden von Dako (Glostrup, Dänemark) erhalten.

25 Serumproben

Humanes Normalserum wurde von gesunden Freiwilligen erhalten. Blut wurde von den gesunden Freiwilligen abgenommen und bei -80°C bis zur Nutzung gelagert. Sechs Patienten mit atypischer HUS wurden ebenfalls untersucht. Die Defizienz an CFHR1 wurde mit Hilfe der Westernblot-Analyse bestimmt und durch genetische
30 Analyse, wie bekannt, verifiziert. CFH-Autoantikörper wurden mittels ELISA gegen CFH-spezifische Antikörper, wie beschrieben, identifiziert. Für die CFH-Depletion wurden 150 µl Protein-A-Sepharose als Matrix verwendet (GE-HealthCare, Freiburg, Deutschland). Diese wurde über Nacht bei 4°C mit 300 µg/ml monoklonaler Antikörper C18 (Alexis, USA) und 150 µg/ml monoklonaler Antikörper B22, aus der

eigenen Arbeitsgruppe, inkubiert. Die Depletion des Serums wurde mit Hilfe von Westerblot-Analyse verifiziert. Für die C7-Depletion wurden 150 µl polyklonaler Ziege-anti-C7 (Quidel, USA) verwendet, und die Depletion wurde durchgeführt wie für CFH beschrieben.

5 Die folgenden Seren wurden verwendet: humanes Komplement aktives Plasma (HP), Komplement aktives HP, worin CFH und CFHR1 entfernt wurden (HP_{ΔCFH}), Komplement aktives HP, wobei CFH, CFHR1 und C7 entfernt wurden (HP_{ΔCFHΔC7}), Komplement aktives Plasma von CFHR1/CFHR3-Defizienten gesunder
10 Personen (defHP), Komplement aktives defHP, in denen CFH und C7 entfernt wurden (defHP_{ΔCFHΔC7}),

Zellkultur und Confocalmikroskopie

Endothelzellen von humaner Nabelschnur (HUVEC, ATCCF, CRL-1730) und retinale Pigmentepithelzellen (ARPE-19, ATCC CRL-2302) wurden gemäß bekannten Verfahren kultiviert. Für die Bindungsexperimente wurden die Zellen für
15 24 Stunden im serumfreien Medium inkubiert, mittels Kurzinkubation in 0,02 % Accutase (PAA, Parching, Deutschland) bei 37 °C abgelöst und in PBS versetzt mit 1 % BSA resuspendiert. Schaf-, Kaninchen- und Huhn-Erythrozyten wurden von Rockland (USA) erhalten. Für die Confocalmikroskopie wuchsen die HUVEC und ARPE-18-Zellen auf Deckgläschen (Nunc) und wurden mit PBS gewaschen und
20 unspezifische Bindungsstellen wurden mit PBS versetzt mit 1 % BSA blockiert. Die Zellen wurden dann für 60 Minuten mit CFHR1 oder CFH (100 µg/ml) oder normalem humanen Plasma (NHP, 5 %) inkubiert. Die Bindung von CFHR1 wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers JHD10 mit einem sekundären anti-Maus-Antikörper markiert mit Alexa 647 und CFH mit einem polyklonalen Antiserum spezifisch für die
25 N-terminale Domäne von CFH (anti SCR1-4) (Alexis, USA) zusammen mit einem sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper markiert mit Alexa 488 visualisiert. Die Proben wurde mit 1 % BSA/PBS gewaschen, mit DAPI und Weizenkeim-Agglutinin Texas rot-595 gegengefärbt und mit Hilfe eines Lasers-Scanning-Mikroskop LSM 510 META (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Die Kaninchenerythrozyten
30 wurden mit 3b (10 µg/ml) vor Zugabe von CFHR1 (100 µg/ml) inkubiert, auf einem Deckgläschen immobilisiert und mit dem monoklonalen Antikörper JHD10 gefärbt. Unspezifische Bindung der Antikörper an die Zellen wurde ausgeschlossen und keine Signale wurden in Abwesenheit von CFHR1 oder CFH detektiert.

Immunhistochemie

Immunhistochemie wurde mit zwei humanen Spenderaugen, bei denen keine klinischen Dokumentationen für frühe AMD und keine Dokumentation für morphologische Beweise von Augenerkrankungen vorlag, durchgeführt. Die Spenderaugen wurden bei der Autopsie erhalten und wurden innerhalb von 15 Stunden nach dem Tod bearbeitet. Weiterhin wurde normales Nierengewebe von zwei humanen erwachsenen Spendernieren erhalten, die nicht zur Transplantation verwendet wurden. Posteriore Augenpräparate und Teile der entkapselten Niere wurden in OCT-Verbindung eingebettet und in Isopentan-gekühltem, flüssigen Stickstoff eingefroren. Cryostat-Schnitte (6 µm) wurden im kalten Aceton fixiert, mit 10 % normalem Ziegen Serum blockiert und mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen CFHR1 (JHD10), verdünnt 1:100 in PBS, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Antikörperbindung wurde mit Hilfe eines Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpers (Molecular Probes, Eugene, USA) nachgewiesen. Die nukleare Gegenfärbung wurde mit Propidiumiodid durchgeführt. Für die Preabsorptionsexperimente wurde der primäre Antikörper für eine Stunde entweder mit CFHR1 oder CFH behandelt.

Bindung von CFHR1 an Heparin, C3b, C5 und C5bC6

MaxiSorp Plastikplatten (Nunc) wurden mit Heparin (Heparinnatriumsalz; Sigma, Deutschland) 500 Einheiten/Platte oder C3b, C3d (Merck Biosciences, Deutschland) (10 µg/ml), C5 oder C5bC6 (Merck Biosciences, Deutschland) (5 µg/ml) beschichtet und unspezifische Bindungsstellen wurden mit 2 % BSA in PBS blockiert. CFHR1 (bei verschiedenen Konzentrationen von 10 bis 90 µg/ml) oder CFH (75 µg/ml) wurden im Bindungspuffer B (10 mM Na₂HP₄, 27 mM KCl, 1,4 M NaCl, 2 % BSA, pH 7,4) gelöst, zu jeder Platte hinzugefügt und gebundenes CFHR1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper C18 und gebundenes CFH mit dem Antiserum der SCRs 1-4 in Kombination mit den entsprechenden sekundären HRP-konjugierten Kaninchen-anti-Ziege bzw. anti-Maus IgG (Dako, Dänemark, 1:4000 Verdünnung) detektiert. Als Kontrolle wurde der Puffer B direkt in Abwesenheit des primären Proteins hinzugefügt. Parallel wurden JHD10 oder mAk C18 (15 µg/ml) in einer Mikrotiterplatte inkubiert und zum Fangen von CFHR1 (30 µg/ml) verwendet. Nach Waschen wurde C5 oder C5bC6 (5 µg/ml) in Gelatine Veronalpuffer (Sigma, Deutschland) hinzugegeben und gebundene Proteine wurden unter Verwendung eines monoklonalen C5-Antikörpers (Merck Biosciences, Deutschland) identifiziert.

CFHR1 spezifisches Antiserum wurde zur Bestätigung der Bindung von CFHR1 an die immobilisierten monoklonalen Antikörper eingesetzt. Für die Konkurrenzexperimente wurde C3b (10 µg/ml) in einer Mikrotiterplatte (Nunc, Deutschland) immobilisiert und konstante Mengen an CFH (5 µg/ml) wurden hinzugefügt. Weiterhin wurden zunehmende Mengen an CFHR1 (1,3 bis 26,6 µg/ml), gelöst in Puffer B, hinzugefügt und gebundenes CFHR1 und CFH wurden mit monoklonalen Antikörpern JHD10 oder polyklonalem Antiserum gegen die SCRs 1-4 von CFH, detektiert.

Cofaktorassays

Die Cofaktoraktivität von Heparin gebundenem CFH wurde durch Messung des durch Faktor I vermittelten Abbaus von C3b mit Hilfe von Westernblot-Analyse gemessen. In kurz: Heparin (Fluka, Buchs, Schweiz) (5 µg/ml) wurde in einer Mikrotiterplatte (EpraxTM, Plasso) über Nacht bei Raumtemperatur immobilisiert und eine unspezifische Bindung wurde mit 1 % BSA in Blockingpuffer (20 mMol HEPES, 130 mMol NaCl, 0,05 % Tween) für zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Für die Konkurrenzanalysen wurde immobilisiertes CFH mit ansteigenden Mengen an CFHR1 (0,13 µg bis 13,3 µg) inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten mit 2 µg C3b und 0,28 µg CFI in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die Proben wurden aus den Mikrotiterplatten entfernt und mit Probenpuffer inkubiert, enthaltend beta-2-Mercaptoethanol und für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Die Proteine wurden auf eine 10 % SDS-Page aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit Hilfe von Ziege-anti-human C3 (Calbiochem, 1:1000) und HRP-konjugiertem Kaninchen-anti-Ziege Ig (Dako, 1:1000) gemäß allgemeinen Verfahren entwickelt. Das Vorhandensein der α'43-Abbaubande von C3b wurde mit Hilfe der Densitometrie bestimmt.

ELISA

Um zu bestimmen, ob CFHR1 Effekte auf die Komplementaktivierung hat, wurde die Aktivität von CFHR1 auf jede der drei Komplementwege mit Hilfe von WiELISA (Wieslab, Lund, Schweden) untersucht. CFH und CFHR1 depletiertes NHS (1 % klassisch und Lectin und 20 % alternativer Weg) wurden mit ansteigenden Konzentrationen an CFHR1 (20 bis 80 µg/ml) für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Gleiche Mengen an DPBS wurden zu jeder Probe hinzugefügt, um Puffereffekte auszuschließen. Nach der Inkubation wurden die Proben gemäß den Anweisungen des Herstellers behandelt.

Um die CFHR1-Regulation der C3-Konvertase zu untersuchen, wurde die C3-Konvertase durch Inkubation von C3b (2 µg/ml) und C3 (80 µg/ml) mit Faktor D (4 µg/ml) und Faktor B (40 µg/ml) in Aktivierungspuffer (20 mM Hepes, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 7,4) generiert. Die Aktivität der C3-Konvertase wurde nach Inkubation von konstanten Mengen an C3 (18 µg/ml) und zunehmenden Mengen an CFHR1 (25 und 50 µg/ml) oder CFH (50 µg/ml) oder 25 µg/ml humanes Serumalbumin (HSA) durch C3a-Bildung bestimmt. C3a-Konzentrationen wurden mit Hilfe von ELISA (Quidel, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt.

Erythrozytenlysis-Assay

Schaferythrozyten wurden mit 30 % v/v CFH und CFHR1 depletierten humanem Plasma in AP-Puffer (20 mM Hepes, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 7,4) inkubiert. Das depletierte Plasma wurde auf Hämolyse der Schaferythrozyten vor dem Experiment getestet. Hämolytische Experimente wurden in HEPES/EGTA-Puffer (20 mM Hepes, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 7,4) getestet. Zunehmende Konzentrationen an CFHR1 (5 bis 160 µg/ml) wurden zu dem Plasma hinzugefügt und bei 37 °C für 15 Minuten mit ca. 2×10^7 Schaferythrozyten inkubiert. Nach Inkubation wurde die Mischung durch Zentrifugation geklärt und die Absorption wurde bei 415 nm im Überstand gemessen. Weiterhin wurden depletierte Plasmaproben mit gleichen Mengen an CFH, Vitronectin oder BSA inkubiert. In einem Experiment wurde die Bildung von Komplementaktivierungsprodukten C3a und C5a mit Hilfe von ELISA bestimmt. Ein Aliquot jeder Probe wurde aus dem Hämolyseassay genommen und sofort in eiskaltem Hepes/EGTA-Puffer verdünnt (C3a: 1:4000, C5a: 1:100) und auf Eis gelagert. Die C3a- und C5a-Konzentrationen wurden mit kommerziell erhältlichen ELISAs gemäß den Anweisungen des Herstellers (C3a: Quidel, USA, C5a: DRG Diagnostics, Marburg, Deutschland) gemessen.

HP defizient an CFHR1 und CFHR3 wurde von der Komplementkomponenten C7 depletiert, um die Ausbildung der terminalen Membran angreifenden Komplexes (MAC) zu hemmen. Polyklonales C7-Antiserum (Comtech, USA) wurde in 1 ml Protein-A-Sepharose-Säule gekoppelt und mit CFHR1 und CFHR3-Defizientplasma inkubiert. Zu diesem Depletionsserum wurden 25 µg/ml oder 50 µg/ml rekombinantes CFHR1 hinzugefügt und für einen Zeitraum von 5 bis 30 Minuten mit 2×10^7 Kaninchenerthrozyten in Hepes/EGTA-Puffer inkubiert, um den alternativen Komplementweg zu aktivieren. Alle 2,5 Minuten wurden Aliquots aus diesem

aktivierten Plasma genommen, die Komplementaktivierung wurde mit Hilfe eines Protease-Inhibitors (Complete, Roche, Deutschland) gestoppt und auf die hämolytische Aktivität durch Inkubation mit einer kleiner Menge an defizientem HP (1 %) als Quelle für C7-C9 und 2×10^7 Huhnerythrozyten bestimmt. Hämolyse wurde für jeden Aktivierungszeitpunkt durch Messung der Absorption bei 415 nm bestimmt.

Die Hämolyse der Huhnerythrozyten wurde in CFHR1/CFHR3-Defizienten, Komplement inaktivierten (20 mM Hepes, 144 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) HP mit konstanten Konzentrationen an C5b6 (5 ng/ml) Proteinkomplexen und zunehmenden Mengen an CFHR1 (25 bis 100 µg/ml) bestimmt. Das defiziente Plasma wurde mit C5b6 und CFHR1 für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Lyse der Huhnerythrozyten wurde durch Untersuchen des Überstandes bei 415 nm bestimmt. Um die Spezifität der CFHR1-Funktion zu zeigen, wurde defizientes Serum in parallel mit gleichen Mengen an CFH oder BSA in Anwesenheit von C5b6 inkubiert. Die Aktivität vom Plasma stammenden CFHR1 wurde in dem gleichen hämolytischen Test untersucht. C5b6-Komplexe (5 ng/ml) wurden entweder mit vom Plasma stammenden CFHR1 (0,75 µg/ml) oder rekombinantem CFHR1 (5 µg/ml) in 20 mM Hepes, 144 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4 für 5 Minuten bei 20 °C vorinkubiert. Schaferythrozyten (2×10^7) wurden hinzugefügt und nach 10 Minuten bei 20 °C wurden die terminalen Komponenten C7 (Endkonzentration 1 µg/ml), C8 (0,2 µg/ml) und C9 (1 µg/ml) hinzugefügt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C wurde die Freisetzung von Hämoglobin bei 415 nm gemessen. In gleicher Weise wurde die Wirkung des Inhibitors des terminalen Weges, Vitronectin (1,25 µg/ml) und von BSA (1,25 µg/ml) untersucht.

Durchflusscytometrie

Die Durchflusscytometrie wurde verwendet, um die Wirkung von CFHR1 auf die C5-Ablagerung auf Erythrozyten während der Komplementaktivierung zu untersuchen. Um die Komplementaktivierung zu ermöglichen, aber die Hämolyse zu verhindern wurde CFHR1/CFHR3 defizientes Plasma zur Entfernung von CFH und C7 (defHP_{ΔCFHΔC7}) durch Immunaффinitätschromatographie behandelt. Für jeden Zeitpunkt wurden Schaf- und Kaninchenerothrozyten in 30 % v/v defHP_{ΔCFHΔC7} in Anwesen- oder Abwesenheit von 50 µg/ml CFHR1 inkubiert. Um einen zu schnellen Abbau des C3/C5-Konvertasekomplexes zu verhindern, wurde Natriumchlorid im Puffer mittels Manitol ersetzt (20 mM Hepes, 250 mM Manitol, 8 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 7,4) substituiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Probe in eiskaltem

modifiziertem Puffer mit 1 % w/v BSA transferiert. Um Komplementaktivierung zu hemmen, enthielt der Puffer eine Protease-Inhibitormischung (Complete Inhibitor Mix, Roche, Deutschland). C5 wurde unter Verwendung eines monoklonalen Maus-anti-C5-Antikörper (Quidel, USA) detektiert. Die Erythrozyten wurden mittels eines B&D LSR II mit geeigneten Laser- und Filtereinstellungen gemessen. 50000 Ereignisse wurden routinemäßig gezählt. Das Binden des vom Serum stammenden CFHR1 an HUVEC-Zellen wurde durch Inkubation der HUVEC-Zellen untersucht, diese wurden serumfrei für 3 Tage gehalten, in 25 % normalem Humanserum für 30 Minuten. Die Zellen wurden gewaschen und Bindung von CFHR1 wurde mit dem monoklonalen Antikörper JHD10 bestimmt.

Beschichtung von Oberflächen mit CFHR1

CFHR1 kann entweder als rekombinantes Protein oder nach Aufreinigung aus Plasma an Oberflächen nach Standardverfahren, wie z.B. in ELISA Ansätzen, gebunden werden. Dazu wird CFHR1 in einer Pufferlösung mit dem Material inkubiert und anschließend intensiv mit einem physiologischen Puffer gewaschen. Alternativ ist eine gerichtete Immobilisierung über monoklonale Antikörper, wie z.B. der CFHR1 spezifische mAB JHD 10 oder auch C18 oder polyklonale Antiseren möglich. Ein weiterer Weg der Anheftung ist die Beschichtung der Oberfläche mit CFHR1 Liganden, wie z.B. mit Heparin. Da CFHR1 an Heparin und weitere Liganden bindet, ist so eine Beschichtung der Oberfläche mit CFHR1 möglich.

Statistische Analyse

Die Statistik wurde mit Hilfe des Studenten-T-Testes durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Die Experimente zeigten, dass CFHR1 an C3b, C3d, Heparin an humanen Zellen bindet, wie in der Figur 1 dargestellt.

CFHR1 nutzt dabei den C-Terminus für sowohl die C3b als auch die Heparin-Bindung, da nur die SCRs3-5-Deletionsmutanten nicht aber die SCRs1-2 Deletionsmutanten an immobilisiertem C3b und Heparin binden. Des Weiteren zeigte sich, dass CFHR1 an Zelloberflächen bindet, siehe Figuren 1d bis e.

In der Figur 2 wird die CFHR1-Färbung an Gewebeschnitten von Niere und Retinalgewebe dargestellt und hierbei wurde der hierin offenbarte neue monoklonale

Antikörper JHD10 eingesetzt, der ein N-terminales Epitop von CFHR1-Protein erkennt, siehe Figur 2. Die Spezifität des Antikörpers wird in der Figur 3 dargelegt.

CFHR1 steht mit CFH im Wettbewerb um die gleichen Bindungsstellen. Wie in der Figur 4 dargelegt, kompetieren die beiden Moleküle um die Bindung an C3b und
5 CFHR1 kann CFH ersetzen und die CFH vermittelte Aktivität reduzieren.

In der Figur 4 wird die Eigenschaft von CFHR1 dargelegt, die Aktivierung des alternativen Komplementweges zu regulieren. CFHR1 und der bekannte Komplementinhibitor Vitronectin zeigten ähnliche inhibitorische Wirkungen. Im Gegensatz zu CFH. Eine Wirkung auf den klassischen oder den Lektinweg zeigte
10 sich dagegen nicht. CFHR1 wirkt dabei nicht auf die C3-Konvertase, siehe Abbildung 5. Hingegen wurde für CFHR1 eine Dosis abhängige inhibitorische Wirkung auf die Komplement vermittelte Lysis gefunden. D.h., CFHR1 hat einen Einfluss auf die Ausbildung und die Aktivität des MAC.

Wie in der Figur 6 dargelegt, reguliert die CFHR1 die C5-Konvertase des alternativen Weges. Das Molekül hat eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung
15 von C5b, aber nicht auf C3b und kann ebenfalls in Dosis abhängiger Art und Weise die C5a-Generierung hemmen, siehe Figur 6a.

In der Figur 7 ist dargelegt, dass CFHR1 an C5 und C5b6 bindet, und zwar mit dem N-terminalen Bereich des Moleküls. CFHR1 verhindert dabei die Ausbildung
20 des MAC, siehe Figur 7c. Um zu bestätigen, dass diese Wirkung nicht auf rekombinante Artefakte zurückgeführt werden kann, wurde natives aufgereinigtes CFHR1-Protein eingesetzt, um die Effekte zu bestätigen, siehe Figur 7d.

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 4557-001 PCT-1	Internationales Aktenzeichen PCT/EP2009/006963
---	---

**ANGABEN ZU EINEM HINTERLEGTEM MIKROORGANISMUS
ODER ANDEREM BIOLOGISCHEN MATERIAL**

(Regel 13bis PCT)

A. Die nachstehenden Angaben betreffen den hinterlegten Mikroorganismus oder anderes biologisches Material, das in der Beschreibung genannt ist auf Seite <u>16</u> Zeile <u>15-23</u>	
B. KENNZEICHNUNG DER HINTERLEGUNG Weitere Hinterlegungen sind auf einem zusätzlichen Blatt gekennzeichnet <input type="checkbox"/>	
Name der Hinterlegungsstelle DSMZ	
Anschrift der Hinterlegungsstelle (einschließlich Postleitzahl und Land) Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig	
Datum der Hinterlegung 23. September 2008	Eingangsnummer DSM ACC2978
C. WEITERE ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte frei lassen) Die Angaben werden auf einem gesonderten Blatt fortgesetzt <input type="checkbox"/>	
D. BESTIMMUNGSSTAATEN, FÜR DIE ANGABEN GEMACHT WERDEN (falls die Angaben nicht für alle Bestimmungsstaaten gelten)	
E. NACHREICHUNG VON ANGABEN (falls nicht zutreffend, bitte freilassen)	
Die nachstehenden Angaben werden später beim Internationalen Büro eingereicht (bitte Art der Angaben nennen, z.B. „Eingangsnummer der Hinterlegung“)	

<input checked="" type="checkbox"/> Vom Anmeldeamt auszufüllen
<input checked="" type="checkbox"/> Dieses Blatt ist eingegangen mit der internationalen Anmeldung
Bevollmächtigter Bediensteter Wallentin, Marko

<input type="checkbox"/> Vom Internationalen Büro auszufüllen
<input type="checkbox"/> Dieses Blatt ist beim Internationalen Büro eingegangen am:
Bevollmächtigter Bediensteter

Patentansprüche

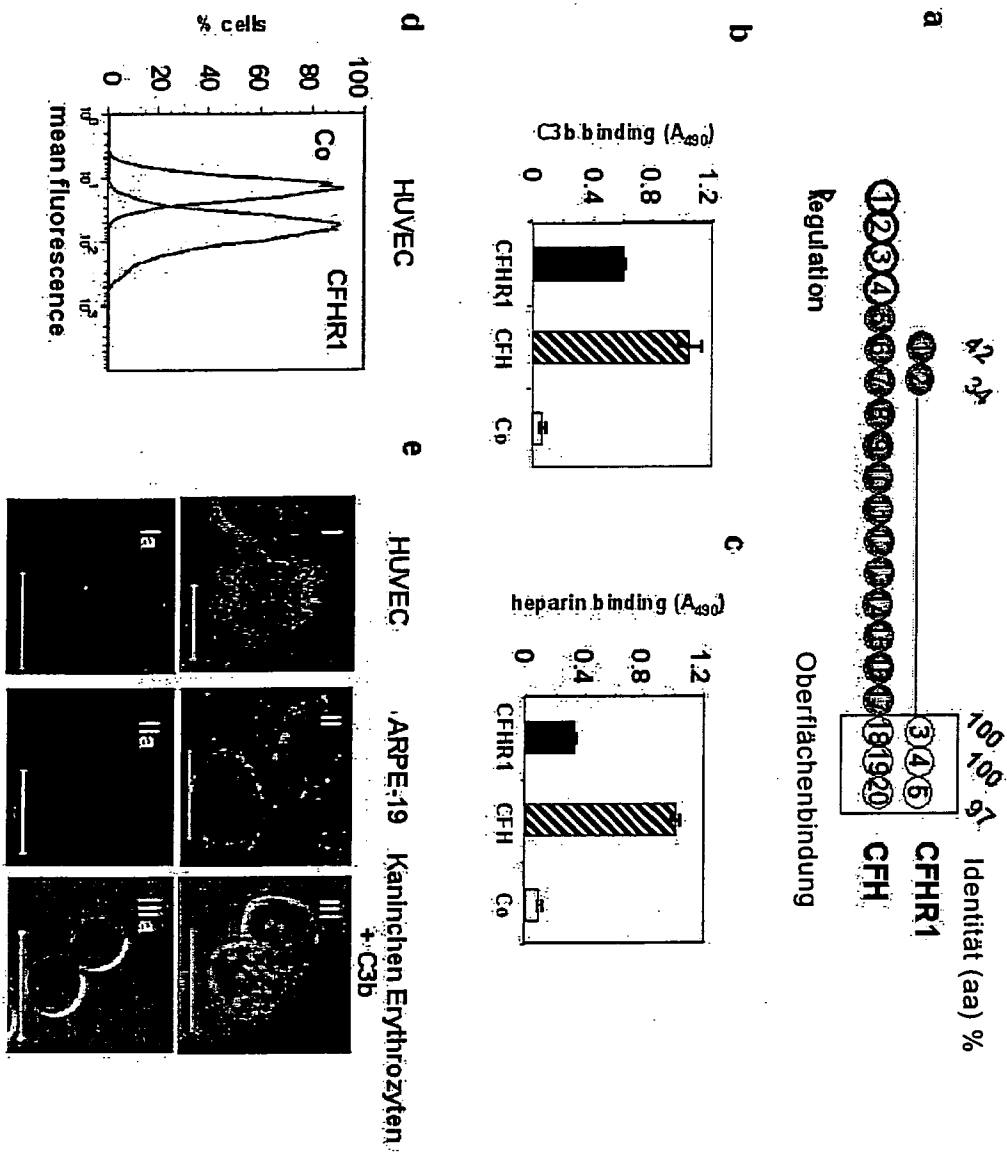
1. Verwendung eines CFHR-Moleküles, insbesondere eines CFHR-Proteins, oder eines funktionalen Fragments oder funktionalen Derivats hiervon, wobei dieses das Enzym C5-Konvertase hemmt, zur Behandlung oder Prophylaxe von Autoimmunerkrankungen und Entzündungsreaktionen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Entzündungsreaktion eine Entzündungsreaktion im Rahmen einer Autoimmunerkrankung ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Entzündungsreaktion eine im Rahmen einer Sepsis, rheumatoider Arthritis, Alzheimer-Erkrankung, Atherosklerose, Lupus Erythematosus oder Antiphospholipid Syndrom induzierte Reaktion darstellt.
4. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das CFHR-Protein oder ein funktionales Fragment oder ein funktionales Derivat hiervon das Ausbilden des terminalen Membran-angreifenden Komplexes verhindert.
5. Verwendung nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der alternative Weg der Komplementaktivierung beeinflusst, insbesondere gehemmt wird.
6. Verwendung eines CFHR-Proteins oder eines funktionalen Derivats oder eines funktionalen Fragments davon zur Inaktivierung der Komplementaktivierung, insbesondere bei einer Transplantation oder Dialyse.
7. Verwendung von CFHR-Protein oder eines funktionalen Fragments oder eines funktionalen Derivats hiervon zur Beschichtung von Implantaten und Oberflächen, die in Kontakt mit Körperflüssigkeiten kommen können.
8. Verwendung nach einen der vorherigen Ansprüche, wobei das CFHR-Protein das CFHR1-Protein ist.

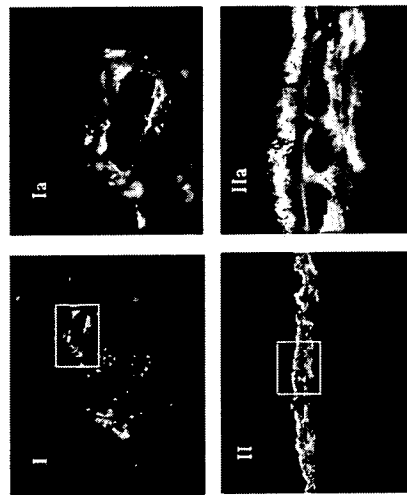
9. Beschichtung für Vorrichtungen, die in Kontakt mit Körperflüssigkeiten, insbesondere Plasma oder Blut kommen, dadurch gekennzeichnet, dass diese an der Oberfläche CFHR-Protein, funktionales Fragment oder funktionales Derivat hiervon aufweist.
- 5
10. Beschichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass diese eine für eine implantierbare Vorrichtung ist, wobei diese implantierbare Vorrichtung zur Verwendung im Körper eines Individuums vorgesehen ist.
- 10 11. Vorrichtung, die in Kontakt mit Körperflüssigkeiten und insbesondere Blut kommt, insbesondere implantierbare Vorrichtung, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Oberfläche CFHR-Protein, funktionales Derivat oder funktionales Fragment hiervon aufgebracht wurde.
- 15 12. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend funktionales CFHR-Protein in Kombination mit funktionalem Faktor H und gegebenenfalls mit weiteren pharmazeutisch annehmbaren Diluenten, Trägern und Exzipienten.
- 20 13. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 12 umfassend funktionales CFHR1-Protein.
- 25 14. Monoklonaler Antikörper, der spezifisch ein CFHR-Protein immunhistologisch und immunbiochemisch nachweist und zu einer spezifischen Bindung an humanen CFHR, insbesondere CFHR1-Protein fähig ist, wobei der monoklonale Antikörper die gleichen Eigenschaften wie der monoklonale Antikörper der Hybridomzelllinie JHD-7.10.1 hinterlegt gemäß Budapester Vertrag bei der DSMZ, Braunschweig, Deutschland, DSM ACC 2978, aufweist.
- 30 15. Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 14, der zu einer spezifischen Bindung an menschlichen CFHR-Protein fähig ist, wobei der monoklonale Antikörper mit demselben Epitop vom menschlichen CFHR-Protein reagiert, wie der monoklonale Antikörper, der von der Hybridomzelllinie JHD-7.10.1

hinterlegt gemäß Budapester Vertrag bei der DSMZ, Braunschweig, DSM ACC 2978, erhältlich ist.

- 5
16. Monoklonaler Antikörper nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass dieser nicht mit dem Komplementfaktor H reagiert.
17. Hybridomzelllinie, die einen monoklonalen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16 exprimiert.
- 10
18. Verfahren zur Bestimmung von CFHR-Molekülen, insbesondere von CFHR1-Protein, in Körperflüssigkeiten, umfassend den Schritt des Inkubierens einer zu testenden Probe mit einem monoklonalen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16 und Bestimmung von an den Antikörper gebundenen CFHR-Molekülen.
- 15
19. Verfahren nach Anspruch 18 zur Bestimmung des Gehalts an CFHR1 in einer Körperflüssigkeit eines Individuums zur Diagnose von hämolytischen urämischen Syndrom, einer altersbedingten Makuladegeneration oder auf membranproliferative Glomerulonephritis und anderer entzündungsbasierten Nierenerkrankungen.
- 20
20. Verfahren nach Anspruch 20 zur Diagnose von hämolytisch urämischen Syndrom weiterhin umfassend den Schritt der Bestimmung von Autoantikörpern in einer Körperflüssigkeit des Individuums.
- 25
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Körperflüssigkeit Blut, Plasma oder Serum ist.

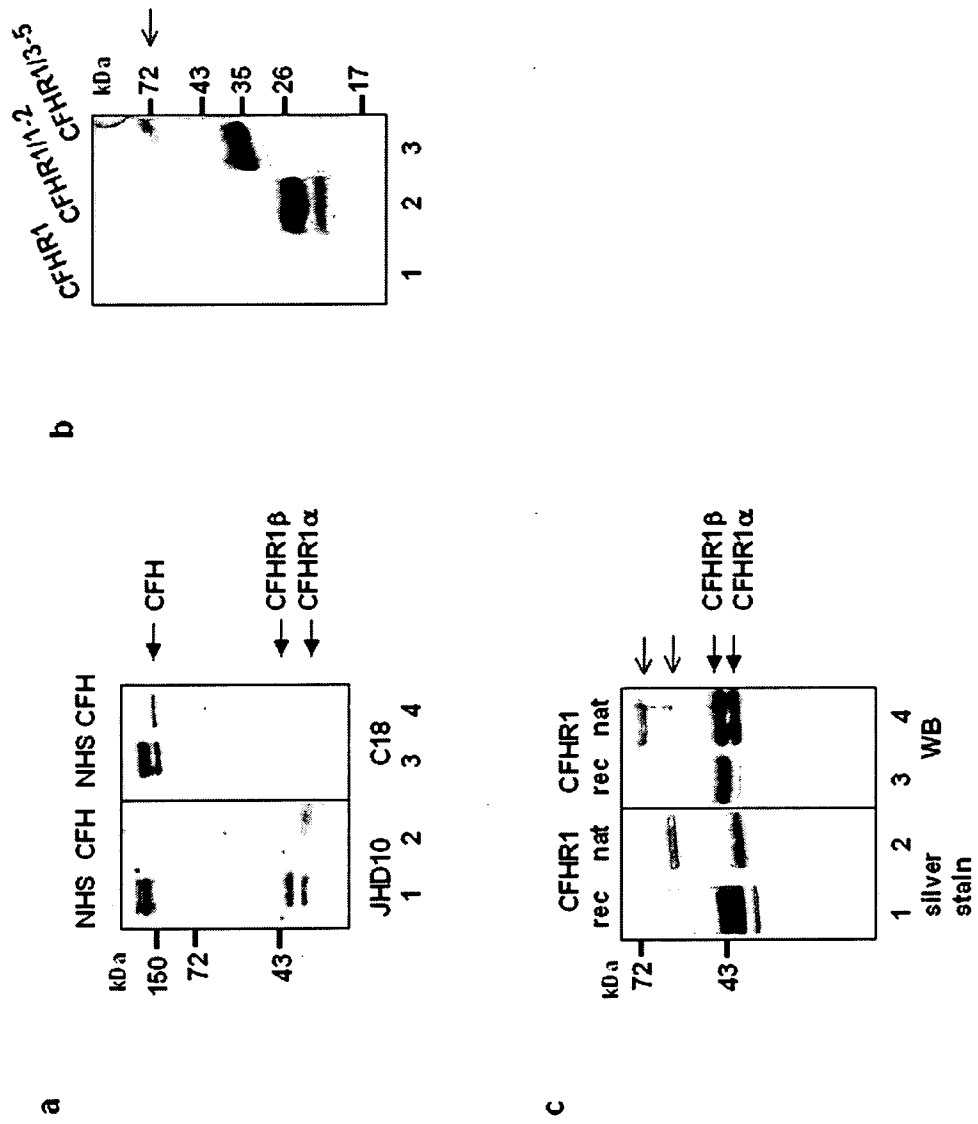
Figur 1



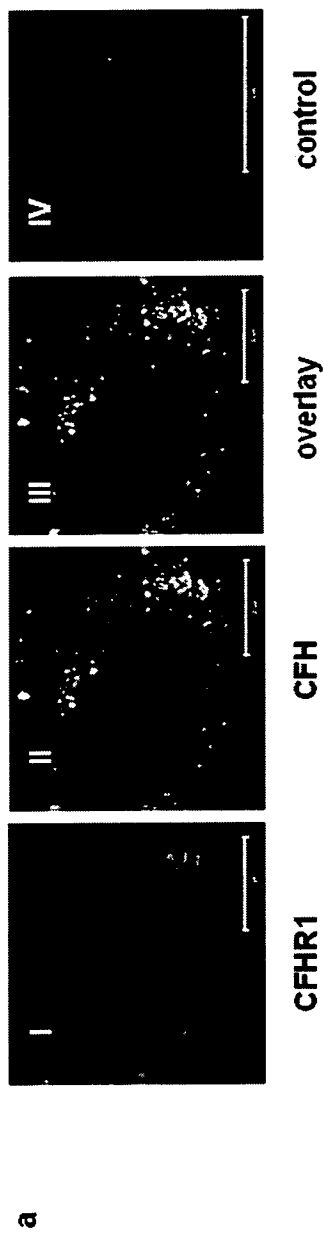


Figur 2

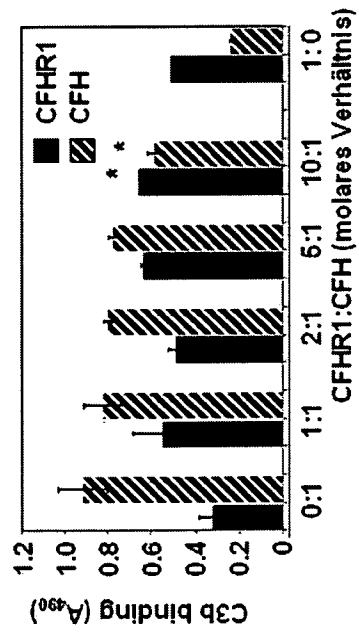
Figur 3



Figur 4



b



c

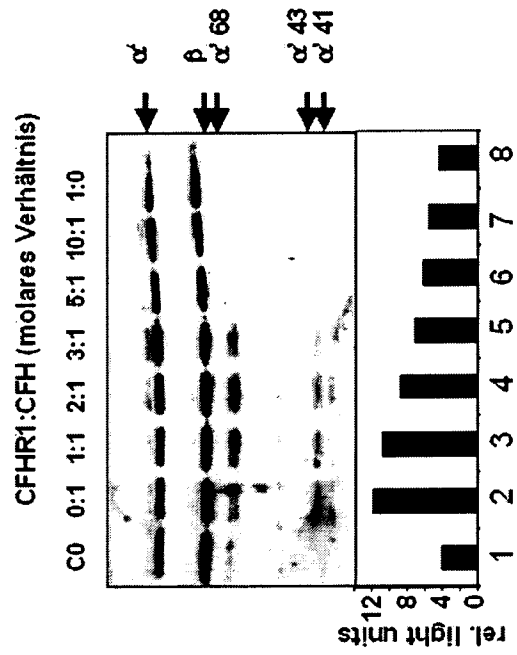


Figure 5

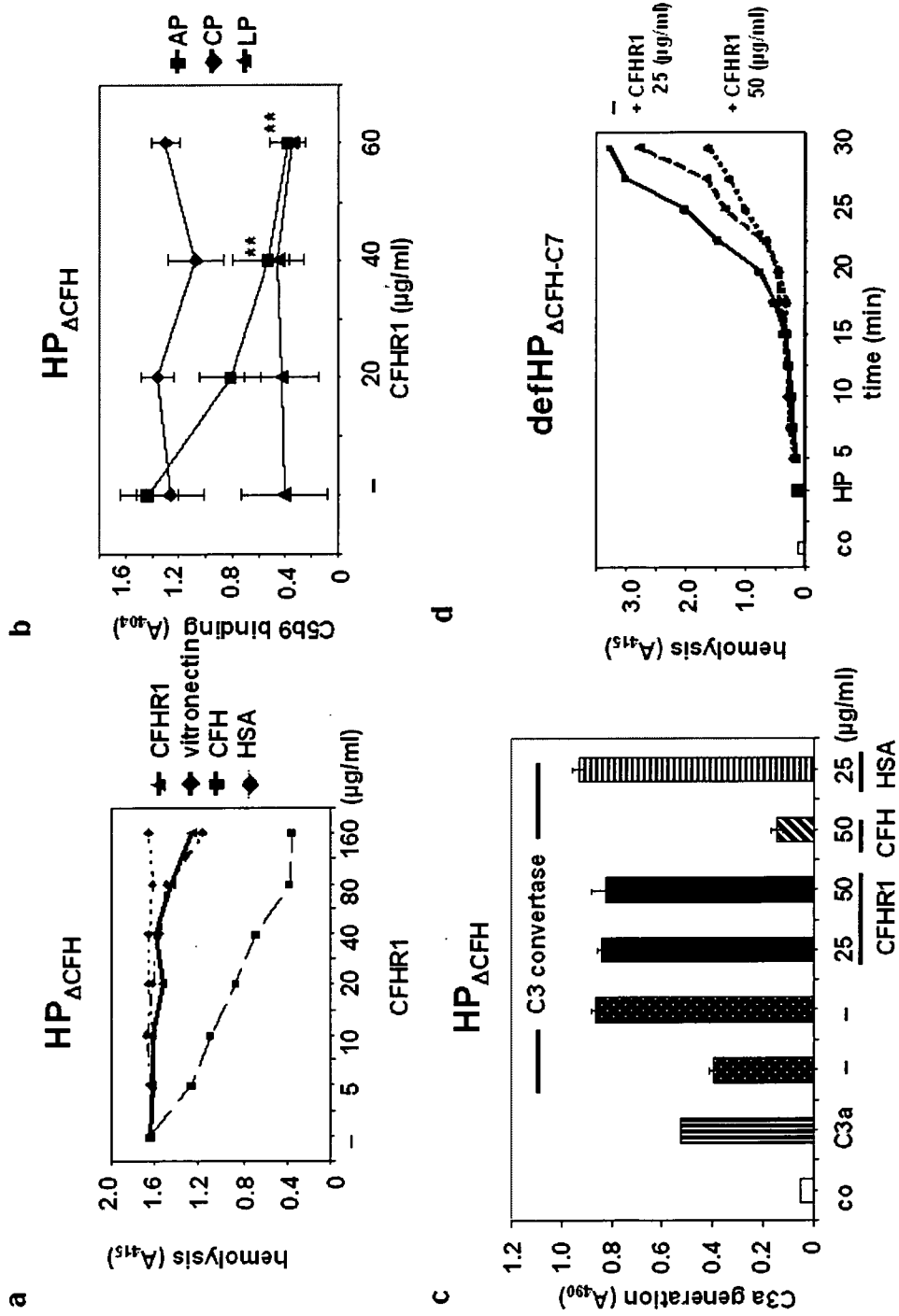


Figure 6

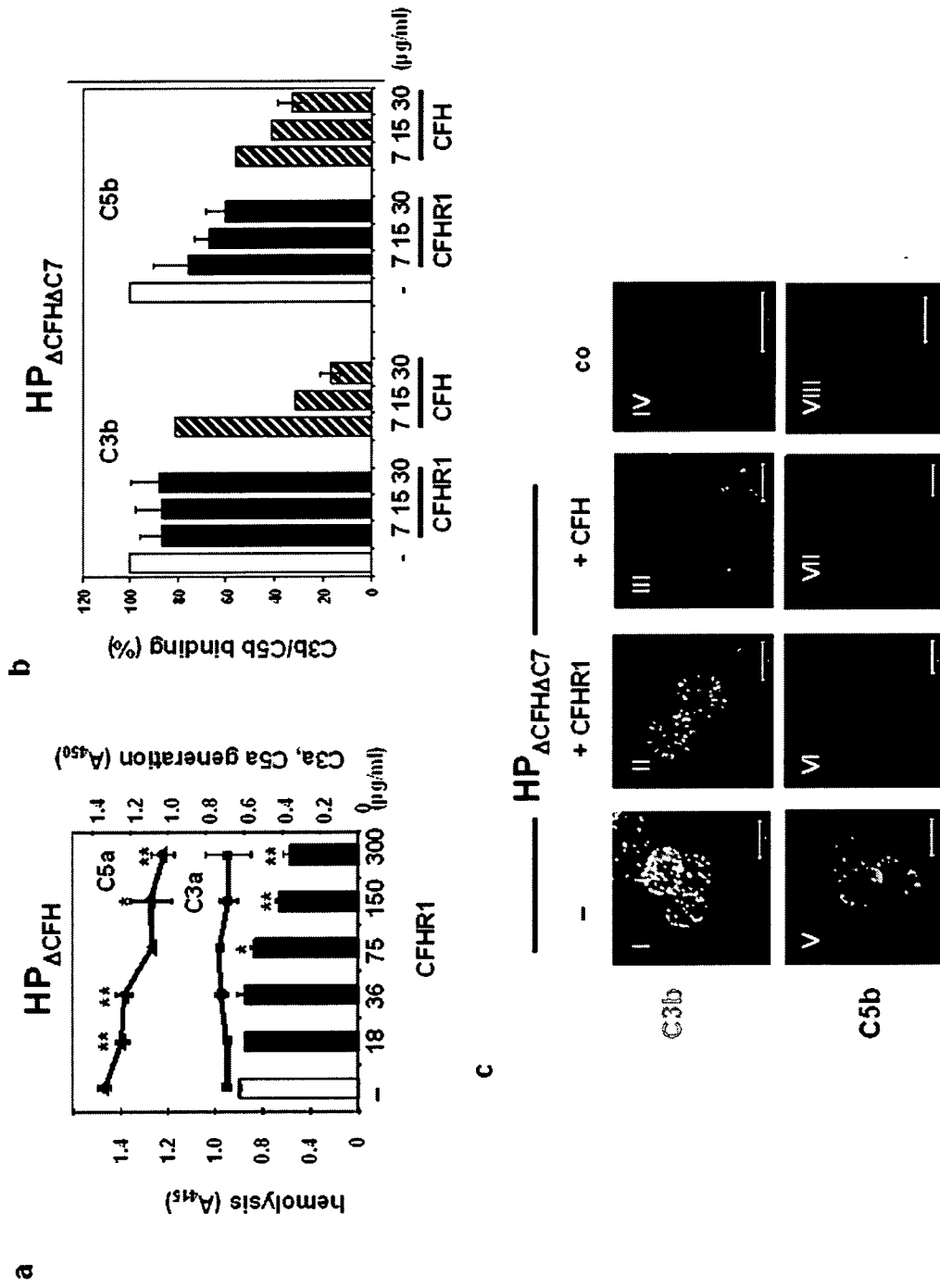


Figure 7

