

5 Zusammenfassung

Der Komplementmodulator *Cobra Venom Factor* aus dem Gift einiger Kobra-Spezies bewirkt eine effektive Dekomplementierung humanen Serums. Dieser Effekt könnte therapeutisch von Interesse sein, würde nicht die starke Immunogenität des Moleküls eine repetitive Applikation verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher *Cobra Venom Factor* durch einen Kassettenaustausch gegen analoge Regionen des homologen Komplementproteins C3 humanisiert werden. Diese Humanisierung sollte auf der Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen des CVF-Moleküls basieren.

CVF, humanes C3 sowie mehrere Hybride wurden dargestellt und in Säugerzellen zur Expression gebracht. Durch die Fusion eines geeigneten Affinitätstags konnte zusätzlich eine spezifische Immobilisierung und eine Abtrennung interferierender Komponenten erzielt werden. In einem nachfolgenden Festphasen-Assay konnte die Analyse der Komplement-verbrauchenden Aktivität ermöglicht werden.

Mittels der *Phage Display*-Technologie wurden rekombinante Antikörper gegen CVF und humanes C3 selektiert. Durch die Expression dieser Antikörper-Fragmente in Prokaryonten und von scFv-F_C-Derivaten in Eukaryonten konnten erstmalig Reinigungen von CVF und einigen Hybriden über Immunpräzipitationen durchgeführt werden.

Die Charakterisierung der unterschiedlichen Hybride erlaubte die Identifizierung funktionell nicht relevanter Regionen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die CVF- α -Kette, die γ -Kette sowie die C3a- und C3d-homologen Regionen ohne einen Aktivitätsverlust gegen C3 ausgetauscht werden können. Ein Austausch des C-terminalen Bereiches hingegen resultiert in einem vollständigen Aktivitätsverlust. Die Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen erbrachte Hinweise, dass nicht homologe Bereiche des CVF- und humanen C3-Moleküls für die Faktor B-Bindung verantwortlich zeichnen. Die funktionelle Relevanz des C-terminalen Bereiches des CVF-Moleküls indiziert die Existenz einer entscheidenden Faktor B-Bindungsstelle in diesem Bereich.

Eines der Hybride verfügt über eine 90%ige Identität zu humanem C3 unter vollständigem Erhalt der Komplement-verbrauchenden Aktivität.

Auf der Grundlage dieser Informationen konnte eine weitere Reduzierung des nicht-humanen Anteils in einem Molekül realisiert werden, das über eine Identität von 96% zu humanem C3 verfügt und somit für eine repetitive therapeutische Applikation geeignet erscheint. Das Hybrid weist dabei eine Aktivität von 68% im Vergleich zu CVF auf.

Die in dieser Arbeit generierten, nahezu humanen Komplementmodulatoren könnten nicht nur bei der differenzierteren Analyse der Mechanismen der C3-Konvertasen Anwendung finden, sondern sich bei therapeutischen Applikationen im Bereich unterschiedlichster Komplement-assoziiierter Krankheiten als außerordentlich bedeutend erweisen.

Abstract

Cobra venom factor, the complement-modulating enzyme of the venom of various species of cobra, effects an efficient consumption of complement in human serum. This effect could be of therapeutical interest, despite a repetitive application is hindered by its high immunogenicity. Therefore, the aim of this study was the humanisation of the cobra venom factor by a cassette exchange for analogue regions of the human homologue complement component C3. The basis of this humanisation should be an analysis of the structure-function relationship.

CVF, human C3 and various hybrids were expressed in CHO cells. Additionally, the fusion of a suitable affinity-tag resulted in specific immobilisation and removal of interfering components. Subsequently the analysis of the complement consumption activity was performed as a solid phase assay.

Using phage display technology, recombinant antibodies were selected against CVF and human C3. Expression of these antibody-fragments in procaryotes and scFv-F_C-derivatives in eukaryotes yielded tools for purification of CVF and some hybrids, whose activity could be shown.

Characterising different hybrids led to the identification of functionally non-relevant regions in the CVF-molecule. Thereby evidence was provided that the CVF- α -chain, γ -chain, and also the C3a- and C3d-analogue regions can be substituted for human C3 without effecting activity. Exchanging the C-terminal region, however, results in a complete loss of activity. The analysis of the structure-function relationship indicates that non-homologous regions are involved in factor B-binding. Furthermore, the functional relevance of the C-terminal regions reveals that a factor B-binding site exist in this region. One of the generated hybrids shares an identity of 90% with human C3 and thereby fully retains CVF-activity. Based on these results a further reduction of the non-human region could be realised in a molecule, which shares a 96% identity to human C3 and therefore appears as a suitable candidate for a repetitive application. This molecule retains 68% of activity compared to CVF.

The almost human complement modulators generated in this study could not only contribute to a more detailed analysis of the mechanisms of the C3-convertases, but can be of relevance in the therapy of various complement-associated diseases.