

## Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Vlastimila Krále:

### “Rekombinantní fragmenty protilátek“

Hybridomová technologie byla v České republice úspěšně zavedena před několika lety a monoklonální protilátky proti řadě různých proteinů se úspěšně používají k detekci odpovídajících proteinů a zjištění jejich funkce v buňkách v řadě výzkumných laboratořích, a dále též pro diagnostiku různých onemocnění v humánní i veterinární medicíně. Dalším krokem, který by vedl k jejich terapeutickému použití, je užití fragmentů protilátek, které by nebyly pro savčí organismus imunogenní.

Cílem předložené práce bylo zavedení technologie produkce rekombinantních scFv fragmentů protilátek, zahrnující molekulární klonování a konstrukci různých formátů scFv, jejich expresi v různých hostitelích, purifikaci a charakterizaci.

Práce je klasicky členěná na literární úvod, cíl práce, materiál a metody, výsledky, diskuse, závěr. Úvodní část pojednává obecně o protilátkách, dále je členěna na terapeutické protilátky, rekombinantní fragmenty protilátek a konečně pojednává o farmaceutickém využití protilátek a jejich fragmentů.

Cíl práce je jasně definován do čtyř částí:

- Ze čtyř vybraných hybridomových linií připravit pomocí metod molekulárního klonování funkční rekombinantní scFv fragmenty.
- Optimalizovat heterogenní expresi scFv fragmentů ve vhodných hostitelích.
- Jednotlivé scFv fragmenty purifikovat, testovat jejich vazebnou aktivitu pomocí vhodných metod a některé blíže charakterizovat pro budoucí výzkum a zavedení metod *in vitro* evoluce.
- Vybrané fragmenty protilátek předat jako výchozí materiál k dalšímu studiu partnerům spolupracujícím při řešení grantů Eureka a Centra cílených terapeutik.

Materiál a metody ukazují na velký rozsah metod, které Mgr. Král zvládl a použil ve své práci.

Výsledky jsou pečlivě popsány a dokumentovány řadou obrázků (celkem 63) na konci každého experimentu. Pro čtyři protilátky byly zkonstruovány rekombinantní fragmenty v různých formátech (monovalentní a bivalentní scFv fragmenty) a pro jejich heterologní expresi byly použity vektory umožňující expresi v *E. coli* a v hmyzích S2 buňkách. K charakterizaci fragmentů byly použity ELISA, Western-blot, průtoková cytometrie a isotermální titrační kalorimetrie (ITC) a diferenciatní skenovací kalorimetrie (DSC).

Závěr práce shrnuje dosažené výsledky – konstrukce rekombinantních fragmentů a jejich charakterizaci. Zajímavým konstruktem je tzv. intrabody formát scF fragmentu, který umožňuje intracelulární expresi a vazbu k antigenu uvnitř buňky a tím způsobovat pokles jeho koncentrace na povrchu buňky. Uvedená literatura je velice obsáhlá, autor cituje 241 prací.

Ing. Peter Šebo, CSc.  
pověřený řízením

Autor prokazuje svoje odborné schopnosti též ve třech publikacích (jednou je první autor).

Předložená práce je srozumitelná po odborné stránce, a je i velice úhledně členěná a upravená.

K práci předkládám pár otázek a námětů k diskusi:

1. Aktivita fragmentů byla testovaná řadou biochemických metod, byla testována aktivita i jiných fragmentů (kromě exprese scFv M75 na buňkách HT29) také v buňkách?
2. Značí např. fragment protilátky TU-20 cytoskelet (tubulin) u buněk?
3. V jakém časovém horizontu odhaduje autor praktické využití rekombinantních protilátek v terapeutickému použití v České republice?

Předložená práce má nejen značnou vědeckou úroveň, ale jasný dopad na rozvoj biotechnologii v České republice. Doporučuji proto přijmout předloženou práci pro obhajobu doktorské disertace.

Praze 27.4.2008

Doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc

Laboratoř diagnostiky pro reprodukční medicínu,

Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.



Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.

---

Ing. Peter Šebo, CSc.  
*pověřený řízením*