6. ZÁVĚR

Cílem této disertace bylo rozvinout v tuzemských podmínkách technologii přípravy rekombinantních fragmentů protilátek a ověřit celý postup na několika modelových monoklonálních protilátkách potenciálně využitelných v diagnostice a terapii.

Pro čtyři protilátky, mAb TU-20, M75, MEM97 a F11.2.32, byly zkonstruovány rekombinantní fragmenty v různých formátech (scFv fragmenty monovalentní i bivalentní, tzv. diabody; intrabody pro intracelulární expresi) a pro jejich heterologní expresi byly použity vektory umožňující expresi v *E. coli* (ve formě cytoplasmatických inkluzí, periplasmatických inkluzí a v rozpustné formě) a v hmyzích S2 buňkách (exprese glykosylovaných forem scFv fragmentů do média). V případě exprese proteinů v nerozpustné formě byly vyvinuty renaturační postupy pro získání aktivních forem scFv fragmentů.

Byl testován vliv délky linkeru $-(Gly_4Ser)_x-$ (kde x je 1 až 4) spojujícího variabilní doménu lehkého a těžkého řetězce na vznik různých multimerních forem scFv. Jako optimální pro vznik pouze monomerního scFv fragmentu se ukázala délka 20 aminokyselin. ScFv s linkerem 15 aminokyselin dlouhým je směsí mono-, di- a trimerních forem scFv, jejichž zastoupení je závislé na koncentraci scFv v roztoku (se vzrůstající koncentrací vzrůstá množství násobných forem scFv, hlavně dimeru). Při délce linkeru 10 a 5 aminokyselin je rovnováha výrazně posunuta ve prospěch dimerní formy. Bylo ukázáno, že významnou roli při vzniku oligomerních forem hraje i sekvence variabilních domén.

K charakterizaci scFv fragmentů byly vedle „běžných" postupů jako jsou ELISA, Western Blot nebo průtoková cytometrie použity i pokročilejší fyzikálně-chemické metody ITC a DSC.

Jedním ze studovaných konstruktů byl i tzv. intrabody formát scFv fragmentu, který umožňuje intracelulární expresi a vazbu k antigenu uvnitř buňky a tím způsobovat pokles jeho koncentrace na povrchu buněk.

U scFv fragmentu odvozeného od monoklonální protilátky M75 byl testován i vliv vzájmené orientace V_H a V_L domén v scFv polypeptidu na stabilitu a vazebnou aktivitu. Bylo zjištěno, že orientace V_H-V_L vykazovala vyšší stabilitu, což se zejména projevovalo v průběhu purifikace, nicméně vazebná aktivita stanovená metodou ITC v optimálních podmínkách byla pro obě orientace velmi podobná.