

Prof. dr hab. inż. Beata Cwalina
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Gliwice, 23.01.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Krystiana BARANA
pt. „**Chromatografia przeciwciał monoklonalnych**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Doroty ANTOS i dr inż. Wojciecha MARKA
jako promotora pomocniczego
w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej

1. Podstawa opracowania recenzji

Recenzja została opracowana w nawiązaniu do zlecenia w imieniu Rady Dyscypliny inżynieria chemiczna Politechniki Rzeszowskiej, zgodnie z pismem z dnia 6 grudnia 2022 r. podpisanym przez Zastępcę Przewodniczącego Rady Dyscypliny, dr hab. inż. Łukasza BYCZYŃSKIEGO, prof. PRz. Oświadczam, że nigdy nie realizowałam z Doktorantem badań naukowych, a także — że nie jestem współautorką żadnej z Jego publikacji naukowych.

2. Celowość podjęcia tematu

Rekombinowane przeciwciała monoklonalne (**mAbs** — *ang. monoclonal antibodies*) znajdują różnorodne zastosowania w naukach biomedycznych, w tym w wykrywaniu biomolekuł w komórkach, tkankach i płynach biologicznych, pozyskiwaniu białek z komórek i ekstraktów komórkowych, oczyszczaniu białek, a także diagnostyce medycznej i medycynie terapeutycznej. Mgr inż. Krystian BARAN jako autor rozprawy zwraca uwagę na fakt, że **jednym z istotnych problemów technologicznych w produkcji przeciwciał monoklonalnych jest znaczna niejednorodność strukturalna otrzymanywanego białka**, związana z jego mikroheterogenicznością. Może ona wpływać na aktywność biologiczną produktu i jego stabilność, a także właściwości biofizyczne. Biorąc pod uwagę wysoki koszt produkcji mAbs oraz bardzo rygorystyczne wymagania dotyczące czystości wytwarzanych z nich leków — uzasadnione jest **poszukiwanie nowych, lepszych metod oczyszczania mAbs, a także możliwości wpływania na ich skład.**

Duże znaczenie w tych procesach ma powstawanie wariantów mAbs o różnej masie cząsteczkowej oraz ładunku lub też hydrofobowości cząsteczki. Szczególnie niekorzystne jest powstawanie tzw. wariantów ładunkowych, różniących się punktem izoelektrycznym (**pI**) — przy czym warianty ładunkowe o niższej wartości pI (tzw. warianty kwasowe) wykazują zwykle niższą aktywność biologiczną względem celu molekularnego niż warianty zasadowe przeciwciał. Autor podkreśla, że **znaczne podobieństwo struktury chemicznej i ładunku wariantów są przyczyną poważnych trudności w ich rozdzielaniu.**

Mając na uwadze, że technologia produkcji mAbs stanowi bardzo ważny element w przemysłowym sektorze biofarmaceutycznym i jednocześnie należy do technologii skomplikowanych — a praca doktorska mgr inż. Krystiana BARANA pt. „Chromatografia przeciwciał monoklonalnych” dotyczy procesu oczyszczania i możliwości regulacji zawartości wariantów kwasowych rekombinowanych przeciwciał monoklonalnych stosowanych jako leki biologiczne — **uważam recenzowaną pracę za aktualną i ważną zarówno dla nauki, w szczególności dla chemii i inżynierii chemicznej oraz nauk medycznych (z punktu widzenia korzyści dla zdrowia i życia ludzi), jak również dla przemysłu biofarmaceutycznego oraz chemicznego.**

3. Ogólna charakterystyka rozprawy

Recenzowaną rozprawę doktorską mgr inż. Krystiana BARANA tworzy **cykl trzech prac naukowych** opublikowanych w wysoko notowanym, specjalistycznym czasopiśmie naukowym *Journal of Chromatography A* (IF 4,601). Cykl publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej uzupełnia 62-stronicowe opracowanie, które stanowi wprowadzenie i komentarz pozwalający usystematyzować treści zawarte w publikacjach. Bibliografia w tym opracowaniu zawiera 111 cytowanych prac w j. angielskim (z wyjątkiem trzech w j. polskim). Doktorant jest współautorem 5 spośród przywołanych prac: 4 anglo-języcznych (pozycje 17-20 w wykazie literatury) i jednej polskojęzycznej pt. „Badania nad oczyszczaniem białek za pomocą chromatografii powinowactwa” (pozycja 37), będącej pracą magisterską Doktoranta wykonaną w Rzeszowie w 2018 r.

W rozprawie przedstawiono na początku komunikatywne *Streszczenie* w języku polskim i *Summary* w języku angielskim. Po nich podano spis treści. W zasadniczej części opracowania wydzielono 12 części głównych: Wstęp; Publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej; Część teoretyczną; Część doświadczalną; Wnioski ogólne z pracy; Spis rysunków; Spis tabel; Literaturę; Załączniki 1-3 (3 publikacje stanowiące cykl prac składających się na rozprawę doktorską) oraz Oświadczenia autora. Informacje podane w częściach: teoretycznej i doświadczalnej (obejmujących wiele rozdziałów i podrozdziałów)

pochodzą z dobrze dobranych i aktualnych źródeł literaturowych z zakresu omawianej tematyki i stanowią wyczerpujące wprowadzenie do problematyki będącej przedmiotem poszczególnych rozdziałów części eksperymentalnej pracy.

W ramach pracy doktorskiej zrealizowano **trzy cele badawcze**, które sformułowano jasno i poprawnie na str. 11 opracowania. Obejmują one:

1. Opracowanie kryteriów doboru żywic do układu chromatografii jonowymiennej **IEX** oraz warunków prowadzenia procesu oczyszczania przeciwciał monoklonalnych.
2. Określenie wpływu przestrzeni pozakomórkowych (ang. *Extra Column Volume*, ECV) na interpretację danych doświadczalnych.
3. Opracowanie chromatograficznej metody rozdzielania i regulacji składu wariantów przeciwciała monoklonalnego.

Przyjęcie takich celów wskazuje na bardzo szeroki zakres problemów, jakie Doktorant postanowił rozwiązać w trakcie realizacji pracy. Sposób przedstawienia zagadnień będących przedmiotem pracy wskazuje na szeroką **wiedzę teoretyczną i praktyczną** autora rozprawy zarówno w zakresie biologii, biochemii i biofizyki, jak i chemii oraz biotechnologii.

Realizacja tak sformułowanych celów wymagała przeprowadzenia licznych badań specjalistycznych, realizowanych w trzech etapach obejmujących:

1. **Badania stabilności struktury** przeciwciał monoklonalnych zaadsorbowanych na wybranych złożach do chromatografii jonowymiennej oraz **opracowanie kryteriów** szybkiego doboru złoża do procesu ich oczyszczania;
2. **Opracowanie adekwatnego modelu dynamiki procesu** opisującego retencję przeciwciał w kolumnie chromatograficznej z uwzględnieniem efektu ECV;
3. **Opracowanie metody rozdzielania wariantów przeciwciała monoklonalnego IgG1** na złożach do chromatografii jonowymiennej.

Efektom tych badań są cztery publikacje naukowe (pozycje 17-20 w wykazie literatury), których współautorem jest mgr inż. Krystian BARAN. Trzy z nich (17, 18 i 20) wchodzi w skład cyklu 3 publikacji, stanowiącego ocenianą rozprawę doktorską, przy czym w dwóch Doktorant jest pierwszym autorem.

4. Ocena merytoryczna rozprawy

Lektura rozprawy doktorskiej mgr inż. Krystiana BARANA pozwala uznać, że **praca ma charakter interdyscyplinarny i w sposób twórczy rozwija szereg zagadnień związanych z oczyszczaniem** białek terapeutycznych produkowanych w procesach biofarmaceutycznych, w szczególności z wykorzystaniem metod chromatograficznych.

Praca jest napisana jasno i poprawnie pod względem merytorycznym, ma poprawną strukturę, zachowuje prawidłowy podział na logicznie ułożone rozdziały i zawiera uzasadnione wnioski. Autor zrealizował ambitny, szeroki program badań z wykorzystaniem dobrze dobranych, w dużej mierze nowoczesnych technik badawczych. Materiał ilustracyjny obejmuje 6 schematów w części teoretycznej oraz 14 rysunków i 6 tabel zawierających uzyskane wyniki badań, które przedstawiono już w publikacjach włączonych do ocenianego cyklu. Wykorzystanie narzędzi obliczeniowych w postaci równań przebiegu izoterm adsorpcji oraz estymacji eksperymentalnych profili stężenia białka umożliwiły Doktorantowi wyznaczenie parametrów zastosowanych modeli matematycznych, prowadzenie wnikliwej analizy danych uzyskanych z wykorzystaniem chromatografii kationowymiennej (CEX) i anionowymiennej (AEX) oraz wyciągnięcie trafnych wniosków.

Zarówno ukierunkowanie badań, jak i ich zakres determinują wkład mgr inż. Krystiana BARANA w uzupełnienie stanu wiedzy w zakresie możliwości oczyszczania przeciwciał monoklonalnych, a zaproponowane metody mogą być z powodzeniem wykorzystane w przemyśle biofarmaceutycznym do regulacji zawartości poszczególnych wariantów wielu innych białek o różnych właściwościach kinetycznych i termodynamicznych.

Do zasadniczych atutów pracy zaliczam: zaproponowanie własnych modyfikacji przy stosowaniu metod chromatograficznych w procesach oczyszczania białek — opracowanie oraz zastosowanie własnych kryteriów doboru żywic do układu chromatograficznego i warunków prowadzenia procesu oczyszczania przeciwciał monoklonalnych; użycie nowoczesnych metod badawczych, w tym różnicowej fluorymetrii skaningowej (**DSF**, *Differential Scanning Fluorimetry*), dokładny opis przebiegu badań i sposobu wykonywania doświadczeń, a także wnikliwe omówienie wyników badań.

W ocenie całości rozprawy doktorskiej mgr inż. Krystiana BARANA — jako główne jej osiągnięcia uznaję:

1. Opracowanie własnej metody przesiewowej **oceny stabilności przeciwciał na złożach chromatograficznych z użyciem różnicowej fluorymetrii skaningowej i badań PCR** (*ang. Polymerase Chain Reaction*), wykazanie, że spadek temperatury topnienia przeciwciała poniżej wartości krytycznej (ok. 30⁰C) jest **kryterium określającym niską stabilność jego struktury na wybranej żywicy**; Praca [17] z 2020 r. — Załącznik 1;
2. Opracowanie uproszczonego modelu matematycznego dynamiki kolumny chromatograficznej **dla niskich natężeń przepływu fazy ruchomej** (retencji wariantów ładunku przeciwciał w kolumnie), uwzględniającego wpływ przestrzeni pozakolumnowej ECV na elucję białek i innych makromolekuł w układzie chromatograficznym, co może być

konieczne w procesach projektowania chromatografii białek i przeniesienia skali procesu z laboratoryjnej na przemysłową; Praca [18] z 2019 r. — Załącznik 2.

2a. Zastosowanie metody numerycznej mechaniki płynów (*ang. Computational Fluid Dynamics, CFD*) w celu uwzględnienia wpływu geometrii ECV na przepływ oraz modelowania elucji białek **przy wyższych wartościach natężeń przepływu**. Jako uzupełnienie — została tu przywołana praca [19] z 2021 r., w której Doktorant jest współautorem uczestniczącym w wykonaniu badań i opracowaniu ich metodologii.

3. Opracowanie metody **rozdziálu i regulacji/optymalizacji zawartości poszczególnych wariantów przeciwciał monoklonalnych** na złożach do chromatografii jonowymiennej (kationo- i anionowymiennej), która może być stosowana do regulacji zawartości wariantów leków biologicznych nawet po jednoetapowym rozdziale (w przypadku chromatografii anionowymiennej); istotna jest przy tym możliwość zwiększenia wydajności procesu do 70-80 % przez zawrócenie materiału o niezadawalającym składzie na kolumnę kationo- i/lub anionowymienną. Praca [20] z 2021 r. — Załącznik 3.

5. Uwagi dyskusyjne i wątpliwości

Podczas lektury ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań i wątpliwości, które przedstawiam poniżej i proszę o wyjaśnienia.

- 1) Proszę o wyjaśnienie, o jakie właściwości chodzi w zdaniu: „wpływ obecności wariantu kwasowego przeciwciał *av* na właściwości całej puli mAb jest często nieistotny w zakresie jego zawartości wynoszącej około 25 + 5% wag. lub niższych” (Str. 10)?
- 2) Jak podano na str. 23 — wyróżnia się trzy typy izoform białek (wariantów): kwasowe (*av*), obojętne (*mv*) i zasadowe (*bv*), wykazujące różnice w wartości pI. Dlaczego w badaniach nie uwzględnia się wariantu obojętnego, który często wykazuje właściwości odmienne od wariantów kwasowego i zasadowego (Str. 24)?

6. Uwagi szczegółowe i redakcyjne

- 1) Zwykle doktoranci dołączają w załącznikach do rozprawy w formie cyklu publikacji **oświadczenia współautorów, dotyczące ich indywidualnego wkładu do pracy i potwierdzające wkład Doktoranta**, czego brakuje w ocenianej rozprawie. Szczęśliwie, w dwóch publikacjach ten wkład jest określony i obejmuje także koncepcję pracy.
- 2) W treści pracy występują nieliczne błędy edycyjne, w tym interpunkcyjne — także w zapisie jednostek (np. pod wzorami matematycznymi) i tzw. literówki; nie przytaczam ich tu z powodu małego znaczenia, jednak proszę na nie zwracać w przyszłości.

3) Podczas przygotowywania publikacji do druku — uwagi wymaga też cytowanie literatury oraz opracowanie spisu literatury, czego zabrakło w opracowaniu/komentarzu do rozprawy (brak ujednoczenia cytacji, zgodnie z wymogami wybranego systemu cytowania).

Uwagi przedstawione powyżej nie mają wpływu na moją wysoką ocenę wartości recenzowanej pracy i osiągniętych przez Doktoranta rezultatów o charakterze poznawczym oraz aplikacyjnym. Mogą natomiast być pomocne w Jego dalszym rozwoju naukowym.

Uważam, że metodyka przeprowadzonych badań oraz analiza i dyskusja uzyskanych wyników są prawidłowe, a moje zastrzeżenia dotyczą jedynie zauważonych niedostatków redakcyjnych i formalnych, które nie umniejszają wartości naukowej ocenianej pracy.

7. Podsumowanie i wnioski końcowe

Podsumowując recenzję pracy doktorskiej mgr inż. Krystiana BARANA pragnę podkreślić, że wysoko **oceniam wkład Autora w rozwój metod oczyszczania przeciwciał monoklonalnych i możliwości ich wykorzystania w badaniach realizowanych w zakresie zarówno inżynierii chemicznej, jak i biochemicznej, a także w technologiach produkcji różnych białek metodami stosowanymi w przemyśle biofarmaceutycznym.** Pragnę przy tym zwrócić szczególną uwagę na znaczenie aplikacyjne badań prowadzonych przez Doktoranta. Ponadto — wyniki badań prezentowane w recenzowanej rozprawie doktorskiej zostały już zweryfikowane przez środowisko naukowe, gdyż są przedmiotem czterech publikacji (w tym trzech stanowiących oceniany cykl) w renomowanym czasopiśmie naukowym Journal of Chromatography A, notowanym w bazie JCR.

Uważam, że treści podane w rozprawie wskazują na szerokie spektrum ogólnej wiedzy teoretycznej Autora i potwierdzają Jego umiejętność prowadzenia badań naukowych.

W moim przekonaniu, przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Krystiana BARANA pt. „Chromatografia przeciwciał monoklonalnych”, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Doroty ANTOS i dr inż. Wojciecha MARKA jako promotora pomocniczego w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej **spełnia wszystkie warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim** określone w ustawie z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669, z późn. zm.) i ustawie z 20 lipca 2018 r. — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1 668 z późn. Zm.). Wnioskuje o **przyjęcie rozprawy** przez Radę Dyscypliny inżynieria chemiczna Politechniki Rzeszowskiej i **dopuszczenie mgr inż. Krystiana BARANA do jej publicznej obrony** i dalszych etapów postępowania doktorskiego.

B. Cwelina