

Prof. dr hab. Jolanta Bryjak
Katedra Inżynierii Procesowej i
Technologii Materiałów Polimerowych i Węglowych
Politechnika Wrocławska
50-370 Wrocław

Wrocław, 22.01.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Krystiana Barana, zatytułowanej
„Chromatografia przeciwciał monoklonalnych”,

zrealizowanej pod opieką prof. dr hab. inż. Dorotą Antos i dr inż. Wojciecha Marka z Katedry Inżynierii Chemicznej i Procesowej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.

Zagadnienia związane z oddziaływaniami białek z granicą faz ciecz/ciało stałe są ciągle nie do końca zrozumiałe, stanowiąc od 30 lat mocno eksploatowany obszar badań. Adsorpcja białek na powierzchni ciał stałych jest zwykle traktowana jako zjawisko dość oczywiste, ale jednocześnie bardzo skomplikowane. Przy czym bardzo duży poziom komplikacji należy wiązać przede wszystkim ze strukturą białek. Adsorpcja, jako proces sam w sobie lub proces poprzedzający tworzenie wiązań z powierzchnią, jest rezultatem interakcji pomiędzy daną powierzchnią a białkiem oraz cząsteczkami rozpuszczalnika i innych związków i jonów w roztworze. Są to interakcje takie same jak te, które tworzą i stabilizują strukturę III-rzędową białka. Od strony energetycznej są to wartości od 320 kJ/mol po 4 kJ/mol, reprezentując wiązania od poziomu wiązań disiarczkowych, po oddziaływania o charakterze hydrofobowym. Przejście białka od formy w pełni uwodnionej do zaadsorbowanej powoduje spadek entropii konfiguracji przestrzennej poprzez: zmianę stopnia uwodnienia określonych obszarów białka; relokację grup naładowanych; reorganizację konformacji. Te trzy zjawiska zawsze mają miejsce, natomiast ich udział w oddziaływaniach powierzchnia ciała stałego/powierzchnia białka zależy od struktury i materiału obu stron. To powoduje, że przewidywalność zachowania białka w roztworach i w kontakcie z różnymi materiałami jest bardzo mała i w takich dziedzinach jak np.: immobilizacja białek, implantologia, chromatografia, w których musi dojść do efektywnej adsorpcji, do tej pory w doborze materiału dominuje metoda prób i błędów. Słaba przewidywalność zmian konformacji białek w procesie adsorpcji pozwoliła jedynie wyłonić dwie grupy białek, tak zwane białka twarde i miękkie. W odróżnieniu od

białek miękkich, białka twarde charakteryzują się dobrą stabilnością struktury przestrzennej, dużą wrażliwością na zmiany stopnia uwodnienia, a sam proces adsorpcji dotyczy relatywnie niewielkiego obszaru powierzchni białka, zmniejszając ryzyko rozfałdowania łańcucha polipeptydowego. Koncepcja białek twardych i miękkich wydawała się szalenie atrakcyjna, gdyż znając właściwości powierzchniowe materiału i mając zmapowaną powierzchnię białka z danej kategorii, można z dużym prawdopodobieństwem oszacować ryzyko rozfałdowania w trakcie adsorpcji. Powyższe rozważania są niestety nadal bardzo teoretyczne, gdyż do tej pory niespełna 30 białek uzyskało ewidentne przyporządkowanie do którejś z grup, natomiast w pozostałych przypadkach, co dotyczy też immunoglobulin G, możemy się jedynie pokusić o przypuszczalną interpretację przyczyn określonej stabilności konformacyjnej białka. Ten przydługi wstęp ma za zadanie jedynie podkreślić, z jak słabo zdefiniowanymi powierzchniowo białkami przyszło się zmierzyć Doktorantowi.

Niejednorodność immunoglobulin G, otrzymywanych metodą nadekspresji w komórkach gospodarzy, wynika przede wszystkim z nieidealnej modyfikacji posttranslacyjnej ekspresjonowanych białek, co jest zjawiskiem typowym w nadprodukcji. Jeżeli białka gromadzą się w komórce w formie ciał inkluzyjnych i wymagają dodatkowego etapu przeprowadzenia białek z form rozfałdowanych do form o prawidłowej konformacji, różnorodność izoform wzrasta. Te przyczyny niejednorodności białek Doktorant bardzo dobrze przybliżył swe Wstępie, natomiast ja chciałabym dodać jeszcze jedną. Białka w komórce nie powstają w czasie nanosekundy i każde białko ma określony czas półtrwania. Nie ma dwóch białek o absolutnie identycznej konformacji i każda cząsteczka jest na innym etapie rozfałdowywania. Aby cokolwiek matematycznie sformalizować, musimy założyć, *a priori*, homogeniczność wyjściowych form białka (np.: badania kinetyki rozfałdowania) lub, skupiając się na mierzalnych różnicach, operować populacjami białek o uśrednionych właściwościach. Uwzględniając fakt, że często określone izoformy posiadają różne efekty terapeutyczne, stajemy przed wyjątkowo trudnym zadaniem rozdzielenia frakcji mniej i bardziej reaktywnych.

Przemysł tylko pod przymusem stosuje kosztowne techniki chromatograficzne, jakkolwiek dobrym przykładem może być rozdział glukozy i fruktozy metodą chromatografii jonowymiennej w skali wielkotonażowej. W pozostałych przypadkach, metody chromatograficzne są stosowane przede wszystkim w izolacji i oczyszczaniu białek terapeutycznych. Są one jednak słabo zdefiniowane i trzeba się posiłkować metodą prób i błędów w doborze źródeł chromatograficznych. To zagadnienie przewija się w dwóch publikacjach, będących przedmiotem rozprawy.

W świetle powyższych informacji, przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr inż. Krystiana Barana jest naukowo trudna i jak najbardziej aktualna. Posiada także walory praktyczne. W dużym skrócie, na wstępie Doktorant zajął się doborem złożeń do chromatograficznego oczyszczania immunoglobulin mAb2 i mAb3, co było wsparte badaniami stabilności konformacyjnej zaadsorbowanych przeciwciał poprzez pomiar temperatury topnienia białka. Autorzy zauważyli, że niestety metoda prób i błędów obowiązuje, ale na pewno wiemy więcej. Następnie, uwzględniając konieczność minimalizacji nakładów na badania przesiewowe, prowadzącą do minimalizacji wielkości złożeń chromatograficznych i objętości prób białek, elegancko udowodnili, że wielkość przestrzeni pozakolumnowych w stosunku do objętości kolumn oraz sposób iniekcji próbek ma istotny wpływ na kształt pików chromatograficznych podczas rozdziału związków wielkocząsteczkowych, w tym immunoglobuliny G4, co może prowadzić do nieprawidłowych wniosków. Dlatego też autorzy publikacji opracowali model matematyczny, uwzględniający ten efekt i pozwalający na prawidłowe projektowanie procesu chromatograficznego, co jest dużym osiągnięciem. Natomiast w bardzo ciekawej publikacji numer 3 podjęto próbę wzbogacenia preparatu immunoglobuliny mAb2 o warianty bardziej kwasowe lub zasadowe, przy czym opcja druga pozwala osiągnąć lepsze efekty terapeutyczne. Autorzy zaproponowali odpowiednie warunki procesowe, pozwalające osiągnąć w jednym etapie wymagania stawiane tym preparatom przed dopuszczeniem do obrotu handlowego jako leków. Dodatkowo wykazali, że zaproponowany model matematyczny w satysfakcjonujący sposób odzwierciedla dane eksperymentalne, jednocześnie wskazując na zjawisko słabej kooperatywnej adsorpcji, co oznacza dużo większą rolę populacji białek w oddziaływaniach międzycząsteczkowych zaadsorbowanych białek niż rodzaj zastosowanej żywicy.

Od strony formalnej, przedstawione do recenzji opracowanie liczy 96 stron. Publikacje znajdują się na Liście Filadelfijskiej, z łącznym IF około 14, co jest wartością więcej niż dobrą ogólnie, a bardzo dobrą w obszarze chromatografii. Zgodnie z oświadczeniami współautorów, udział mgr inż. Krystiana Barana wynosił średnio 45% i szacuję, na podstawie publikacji, że odnosi się to do etapu powstawania koncepcji, poprzez wykonanie badań i interpretację, po przygotowanie manuskryptu. Zatem Doktorant wykazał się znaczącym udziałem we wszystkich etapach naukowo-badawczych i podstawa publikacyjna dysertacji nie budzi zastrzeżeń. Natomiast bardzo proszę o zwracanie uwagi na czytelność załączników. Publikacje wyglądają ładnie, ale przydałoby się załączenie lupy. Uwzględniając powyższe informacje można stwierdzić, że poziom naukowy publikacji jest wysoki, z istotnym udziałem doktoranta w tworzeniu tych prac.

Dysertację otwiera Streszczenie w języku polskim i angielskim, po którym następuje Wstęp z nakreślonymi trzema celami badawczymi, które odpowiadają dokładnie 3 publikacjom, które są podstawą rozprawy doktorskiej. Po spisie tychże publikacji znajduje się 20-stronicowy Wstęp teoretyczny, jednostronicowe zestawienie koncepcji badań, praktycznie tożsame z wcześniejszą genezą badań, a następnie 19-stronicowe omówienie 3 publikacji. Część opisową pracy doktorskiej zamykają 3 generalne wnioski, po jednym na publikację, spisy rysunków i tabel, oraz 111 pozycji literaturowych. Łącznie ta część pracy liczy 62 strony, natomiast teksty publikacji i oświadczenia współautorów zamieszczono na końcu, jako załączniki.

W zasadzie Autor mógłby się ograniczyć do przygotowania bardzo krótkiego wstępu, gdyż każda publikacja zawiera stosowne wprowadzenie, i do kilkustronicowego przewodnika, jednak mgr inż. Krystian Baran opracował bardzo dobry i obszerny Wstęp. Doktorant zapewne chciał wykazać, w jakich obszarach badań znajdują się poszczególne publikacje. Zamysł bardzo dobry, a sam Wstęp napisany przejrzysto i pozwalający zgrabnie umiejscowić publikacje w poszczególnych obszarach badań. Część dotycząca omówienia 3 publikacji również jest napisana bardzo przejrzysto, a przewodnik kończą bardzo dobrze sformułowane wnioski, co dobitnie świadczy o dużych umiejętnościach analizy i syntezy. Tekst został starannie zredagowany, jakkolwiek dzięki publikacji trzeciej rozszyfrowałam informacje o złożach w Tabeli 4.

Czego nie znalazłam w opracowaniu: (i) informacji o finansowaniu badań, które znajdują się w publikacjach; (ii) udziałów w krajowych i międzynarodowych konferencjach, jeżeli takowe były (COVID); (iii) informacji o ewentualnym ukończeniu kursów lub szkoleń.

Podsumowując recenzję chciałabym podkreślić, że rolą recenzenta jest wskazanie wad i niedociągnięć ocenianej dysertacji, ale nie mam żadnych poważniejszych zastrzeżeń do części przedstawiającej osiągnięcia publikacyjne Doktoranta, a tym bardziej do samych publikacji, zamieszczonych w sztabularnym czasopiśmie chromatograficznym. Całościowo praca zawiera wiele interesujących wyników oraz opracowano modele matematyczne, pozwalające projektować i przenosić skalę procesu chromatograficznego.

Wnioski końcowe

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską oraz z publikacjami, które powstały w trakcie jej realizacji, stwierdzam, że dysertacja mgr inż. Krystiana Barana, zatytułowana „Chromatografia przeciwciał monoklonalnych” spełnia wymagania stawiane przez obowiązujące przepisy zamieszczone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z

dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. 2018 r., poz. 1669, ze zmianami) oraz Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 r. (Dz.U. 2018 r., poz. 1668 ze zmianami), a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję zatem o jej przyjęcie i dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania przed Radą Dyscypliny inżynieria chemiczna Politechniki Rzeszowskiej, w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

Yolente Brzyt