

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. inż. Krystiana BARANA pt. "Chromatografia przeciwciał monoklonalnych", wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. inż. Doroty Antos, oraz promotora pomocniczego dr. inż. Wojciecha Marka, w Katedrze Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Rzeszowskiej

1. Podstawa wykonania recenzji

Podstawę prawną wykonania poniższej recenzji stanowi pismo dr. hab. Łukasza Byczyńskiego, prof. PRz., Z-cy Przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna w Politechnice Rzeszowskiej, z dnia 6 grudnia 2022 r., zlecające mi jej wykonanie na podstawie decyzji w/w Rady. Informuję, że nie znane mi są przyczyny dla których przedstawiona recenzja mogłaby budzić wątpliwości odnośnie obiektywizmu.

2. Przedmiot oceny

Przedmiotem oceny jest treść zeszytu naukowego pt. „Chromatografia przeciwciał monoklonalnych”, sygnowanego przez Wydział Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej w serii prace doktorskie. Pierwsza część opracowania (licząca 62 str.) zawiera zwięzłe wprowadzenie do tematyki prowadzonych badań, specyfikację celów badawczych wraz z uzasadnieniem, następnie zwięzły opis zrealizowanego programu, który wieńczy podsumowanie i wnioski końcowe. Kończy ją spis cytowanej literatury, liczący 110 pozycji, głównie z ostatnich lat. W drugiej części zamieszczono kopie trzech artykułów, opublikowanych w prestiżowym czasopiśmie *Journal of Chromatography A* w latach 2019-2021, prezentujące szczegółowe opisy prowadzonych badań, uzyskanych wyników i ich podsumowania/wnioski.

Zeszyt kończą, autoryzowane oświadczenia Doktoranta oraz pozostałych współautorów publikacji, precyzujące procentowy udział poszczególnych autorów w ich powstaniu. Podane wielkości udziału doktoranta: 40%, 45% oraz 50% jednoznacznie wskazują na jego wiodącą rolę w powstaniu prezentowanych wyników.

3. Tematyka rozprawy, przeprowadzone badania oraz ich ocena

Tematem rozprawy doktorskiej pana Krystiana Barana jest rozdział ciał monoklonalnych metodą chromatograficzną, widziany z perspektywy dyscypliny inżynieria chemiczna. Z uwagi na stopień skomplikowania procesu, Doktorant skupił się na kilku zagadnieniach ważnych z technologiczno-procesowego punktu widzenia:

- Badań stabilności struktury przeciwciał monoklonalnych na złożach chromatograficznych, pod kątem opracowania efektywnej, szybkiej metody doboru stosownego wypełnienia kolumny chromatograficznej. Zważywszy, że dobór złoża chromatograficznego, nie powodującego zmianą konfiguracji białka po jego adsorpcji, warunkuje skuteczność procesu rozdziału, kwestia ta jest kluczowa dla całości procesu separacji.
- Odwzorowania matematycznego procesu rozdziału chromatograficznego przeciwciał monoklonalnych, jako narzędzia wspomagającego przeniesienie skali wielkości procesu ze *mikro* do skali *makro*. Wykorzystano tu istniejące matematyczne koncepcje opisu procesów rozdziału adsorpcyjnego – badania koncentrowały się na ocenie wpływu obecności przestrzeni martwych w instalacji rozdziału na wynikowe profile stężeniowe eluatów, a także uwzględnienia odstępstw od cylindrycznej geometrii instalacji,

- Opracowaniu metody rozdziału wariantów przeciwciała monoklonalnego immunoglobuliny (IgG₁), różniących się ładunkiem, a właściwie redukcji udziału frakcji kwasowej w mieszaninie.

Duża dynamika aplikacji przeciwciał monoklonalnych we współczesnym leczeniu i diagnostyce medycznej, oraz znaczenia terapeutycznego izolowanych rekombinowanych białek każą uznać tematykę rozprawy za niezwykle aktualną, potrzebną i ambitną.

Przeprowadzone badania stabilności dwóch modelowych monoklonalnych immunoglobulin (o wartościach punktu izoelektrycznego 8,8 i 7,9 oraz masach molowych 148 i 149 kDa) na pięciu złożach silnych kationowymiennych żywic, a w szczególności badania ich deformacji i agregacji w funkcji temperatury, z wykorzystaniem techniki różnicowej skaningowej fluorymetrii (DSF) zaowocowały opracowaniem szybkiej, wysokowydajnej metody oceny złoż chromatograficznych, którą można realizować wykorzystując szeroko dostępne aparaty RT-PCR. Opracowana metoda opiera się na pomiarze/określeniu temperatur przejścia fazowego (tzw. topienia) białek zaadsorbowanych na złożu, znamionujących deformację białka. W odróżnieniu od istniejących, metod badań struktury protein, opracowaną metodą cechują wysoka wydajność i niewysokie wymogi aparaturowe. Badania opublikowane zostały w *J. Chromatography A* 1634 (2020) 461488.

Z uwagi na zasadniczą różnicę wielkości przestrzeni martwych, a częściowo także geometrii, w aparatach chromatograficznych skali *mikro* oraz *makro*, istotnie wpływających na przebieg elucji adsorbentu, kluczowym zagadnieniem przeniesienia wyników badań chromatograficznego rozdziału w skali laboratoryjnej – mikro kolumn (objętość mL), do skali preparatywnej lub przemysłowej, jest matematyczna kwantyfikacja tego wpływu na profile stężeń na wylocie, dokonywana na drodze ich matematycznego odwzorowania dla kilku układów chromatograficznych. Sama metodyka postępowania jest już dość dobrze określona. W przeprowadzonych badaniach elucji adsorbentu wykorzystano uproszczony model dyspersyjny (Taylora-Arisa). Eksperymenty przeprowadzono dla substancji o zróżnicowanej masie cząsteczkowej w kilku układach chromatograficznych, w tym z kolumną i bez niej. Wykazały one silną deformację profili/pików stężeńowych dla związków wielocząsteczkowych, ale nie małowcząsteczkowych, a także istotny wpływ geometrii systemu dozowania/wtrysku na ich deformację. Zjawisko to przypisano nierównomiernym profilom prędkości w kierunku poprzecznym do kierunku przepływu, tj. promienia kapilar (tzw. dyfuzją promieniową). Deformacja profili stężeńowych zanikała dla związków małowcząsteczkowych, wskazując w tym przypadku na ważność klasycznego tłokowego modelu przepływu w aparacie. Badania potwierdziły wyraźny rozdział profili stężeńowych związków wielko- i małowcząsteczkowych na wylocie z kolumny i ich dobre (semi-ilościowe) odwzorowanie przez zastosowany model transportu w przypadku stosowania niewielkich (<150 cm/h) liniowych prędkości przepływu w małych kolumnach. Wskazały także na występowanie „ogonowania” pików przypadku małych nastrożków oraz ich asymetrię frontów przebiecia w przypadku dużych nastrożkiwań.

Przeprowadzone zostały także badania wpływu geometrii przestrzeni martwych na kształt profili stężeńowych z wykorzystaniem metody tzw. obliczeniowej dynamiki płynów (CFD), i jak mniemam oprogramowania *Fluent*. W dostarczonej (i ocenianej) rozprawie, badania te opisane są niezmiernie lapidarnie - odniesienie do publikacji w *J. Chromatography A* z 2021r (pozycja 19 w spisie literatury omówienia/cześć 1/, bez podanie kopii artykułu), a także wskazanie zalet/ograniczeń takiej drogi postępowania. Mimo, że dwoma pierwszymi wykonawcami tamtych badań były inne osoby, uważam że uzyskane wyniki powinny być omówione znacznie szerzej w przedstawionej rozprawie, ze wskazaniem głównych wykonawców badań. Nie ulega bowiem wątpliwości, że odwzorowanie przepływu w układzie trójwymiarowym, z uwzględnieniem specyficznej geometrii aparatu, nie tylko odpowiada dominującym tendencjom, ale korzystnie wpłynie na jakość odwzorowania, szczególnie

w przypadku większych, bardziej złożonych instalacji przemysłowych. Oczekiwałbym od Doktoranta odniesienia się do tej kwestii w trakcie obrony, w tym prezentacji ważniejszych wyników.

Trzecim zagadnieniem rozpatrywanym przez Doktoranta był rozdział (a właściwie wzbogacanie w preferowaną frakcję jonową) mieszaniny przeciwciał monoklonalnych tego samego typu, ale charakteryzującej się obecnością frakcji obdarzonych różnym ładunku elektrycznym powierzchni. Wykazano, że możliwe jest wzbogacanie mieszaniny prowadzące do znacznego udziału pożądanej frakcji (anionowej) zmieniając strategię separacji, a dokładniej zastępując standardową procedurę elucji z gradientem pH, dwoma etapami, pierwszym w warunkach łagodnego pH, podczas którego następuje izokratyczne załadowanie kolumny, a następnie jej przemyci (w tym usunięcie części białek), po której następowała skokowa zmiana pH, skutkującą desorpcją i wypłukaniem pozostałych protein. Wskazano także, że wydajność procesu rozdziału/wzbogacania w pożadaną frakcję anionową można znacząco zwiększyć zwracając strumień odpadowy.

Opracowany proces wzbogacania przeciwciał monoklonalnych w pożadaną frakcję anionową odwzorowany został także matematycznie. Zaprezentowany model cechuje bardzo dobra zgodność z eksperymentem, dająca solidne podstawy do jego wykorzystania jako wiarygodnego narzędzia predykcyjnego w projektowaniu i optymalizacji procesu. Całość badań dotyczących tego zagadnienia przedstawiona została w publikacji ogłoszonej w prestiżowym *Journal of Chromatography A*, 1658 (2021) 462607.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona rozprawa doktorska zawiera propozycje rozwiązań zagadnień istotnych dla rozwoju procesów rozdziału/wzbogacania ciał monoklonalnych metodą chromatograficzną, doboru wypełnień kolumn, oraz modelowania matematycznego umożliwiającego symulację, a w konsekwencji optymalizację procesów rozdziału. Odpowiada przeto, w całej rozciągłości, obszarowi zainteresowań współczesnej inżynierii chemicznej i procesowej.

Wykonując z dużym sukcesem złożony i zróżnicowany program badawczy, mgr inż. Krystian Baran wykazał znaczną wiedzę i umiejętności, a o wartości uzyskanych wyników dowodnie świadczą trzy publikacje ogłoszone w czołowym międzynarodowym czasopiśmie poświęconym tematyce chromatograficznej, oraz inżynierii procesów rozdziału.

Powyższe konstatacje upoważniają mnie do wyrażenia opinii, że recenzowana rozprawa pana Krystiana Barana spełnia bezwarunkowo wszystkie wymogi oryginalnego opracowania o wysokim poziomie naukowym, zwyczajowo wymaganego od rozpraw doktorskich.

Konkludując, zarówno recenzowana rozprawa doktorska, a także jej procedowanie przez Radę Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej spełniają wymogi stawiane rozprawom doktorskim przez zapisy Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018 r, poz.1669 z późn. zm.), oraz art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2020 r., poz. 85 ze zm.).

W obliczu powyższego, stawiam wniosek o przyjęcie rozprawy mgr. inż. Krystiana BARANA przez Radę Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej oraz dopuszczenie jej do publicznej obrony.

