



Politechnika Łódzka

Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej

Dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni
Instytut Biotechnologii Molekularnej i Przemysłowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka

Łódź, dnia 24.11.2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Julity Balcerek
„Opracowanie innowacyjnej technologii do wyprowadzania stabilnych linii
komórkowych do ekspresji białek rekombinowanych dla zastosowań
biofarmaceutycznych”**

wykonanej w firmie Mabion S.A. pod kierunkiem dr hab. prof. nadzw. Tadeusza Pietruchy
(Zakład Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi).

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Prodziekana ds. Nauki Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi prof. dr hab. n.med. Moniki Łukomskiej-Szymańskiej z dnia 20 października 2021 r.

Zasadność podjętej tematyki

W przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jej autorka, mgr Julita Balcerek podejmuje zadanie opracowania innowacyjnej strategii pozwalającej na długoterminową stabilną ekspresję transgenu w komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) przy zastosowaniu systemu rekombinacyjnego Cre-lox. Doktorantka zaproponowała także kształt platformy analitycznej do kontroli i analizy stabilności klonu komórkowego, a tym samym wytwarzanych przez niego przeciwciał monoklonalnych. Platforma taka może być z powodzeniem wykorzystywana podczas wdrażania nowego produktu i jego procesu produkcyjnego.

Komórki CHO są najszerzej stosowanym gospodarzem do bioprodukcji złożonych białek terapeutycznych, w tym przeciwciał monoklonalnych. Mimo że substancja czynna w gotowym leku biologicznym może cechować się pewnym stopniem zmienności, to mikroheterogenność musi mieścić się w dopuszczalnym zakresie. Osiąga się to głównie poprzez opracowanie odpowiedniego procesu wytwarzania białka w stabilnych liniach komórkowych. Stworzenie szybkiej ścieżki rozwoju wysokowydajnych klonów powstałych z tej samej linii komórkowej, które są stabilne nie tylko w skali laboratoryjnej, ale i wytórczej, ma zasadnicze znaczenie dla procesu rozwoju leku. Niemniej jednak, generowanie takich klonów zasadniczo opiera się na losowej integracji plazmidu ekspresyjnego kodującego gen białka terapeutycznego do genomu gospodarza. Dalsza selekcja klonów oparta na badaniach empirycznych i charakterystyce linii komórkowej jest w tym wypadku obszerna i czasochłonna.

Zastosowanie przez mgr Julitę Balcerek narzędzia opartego o wymianę kaset za pośrednictwem rekombinazy Cre (RMCE) stanowi zaawansowaną alternatywę

dla rozwoju konwencjonalnej linii komórkowej CHO, prowadząc do wygenerowania bardziej spójnych i stabilnych klonów. W konsekwencji strategia ta może ostatecznie skrócić czas potrzebny do rozpoczęcia badań klinicznych, a ostatecznie rejestracji i wprowadzenia do obrotu leku biologicznego. Wybranie takiego celu badań jest znakomitą tematem pracy doktorskiej, który doskonale wpisuje się w najnowszy nurt biotechnologii medycznej. Do osiągnięcia założonych celów Doktorantka zastosowała podejście oparte na wykorzystaniu hodowli komórek CHO w połączeniu z szerokim spektrum analiz biochemicznych oraz technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej.

Charakterystyka i uwagi do pracy

Przedstawiona do recenzji dysertacja została przygotowana w sposób klasyczny dla doktorskich prac eksperymentalnych i zawiera 12 podstawowych rozdziałów. Praca składa się ze 116 stron tekstu wzbogaconego o 30 rysunków i 9 tabel. Po spisie treści pojawia się angielskie i polskie streszczenie, wykaz skrótów oraz cel i zakres pracy, w którym mgr Julita Balcerek przedstawia powody podjętej tematyki oraz etapy mające doprowadzić do osiągnięcia założonego celu. W części literaturowej omówione zostały zasadnicze zagadnienia związane z rozwojem leków biopodobnych, a zwłaszcza znaczeniem stabilnych linii komórkowych, metodami wprowadzenia transgenów do komórek gospodarza, w tym rekombinacji miejscowo specyficznej opartej na systemie Cre-lox. Trzecia część tego rozdziału to opis problemów związanych ze stabilną ekspresją przeciwciał monoklonalnych, natomiast ostatnia uzasadnia potrzebę stworzenia platformy analitycznej do oceny stabilnej produkcji przeciwciał monoklonalnych. Według mnie w części teoretycznej zabrakło szerszego opisu mechanizmu działania i zastosowania miejscowo specyficznych rekombinaz w celu umożliwienia integracji transgenów terapeutycznych. Oprócz wspomnianych w pracy rekombinaz Cre, Flp oraz ϕ C31, integraza serynowa Bxb1 pochodząca z mykobakteriofagów jest także wysoce skuteczna w katalizowaniu rekombinacji i stanowi ważny element zestawu narzędzi RMCE. Interesujące byłoby także przybliżenie wykorzystania technologii CRISPR/Cas9 w połączeniu z systemem RMCE. Wprawdzie Doktorantka w Dyskusji podejmuje temat możliwości wykorzystania CRISPR/Cas9, jednakże głównie w aspekcie prawnym i ochrony patentowej. Tymczasem firma Pfizer połączyła wykorzystanie technologii CRISPR/Cas9 i integrazy Bxb1 w celu wygenerowania nowego klonu linii komórkowej CHO (Inniss *et al.* Biotechnol Bioeng. 2017;114(8):1837–1846). Niemniej jednak zaprezentowane treści są dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy, w tym metodyki i podsumowującej pracę dyskusji wyników.

W kolejnych rozdziałach Materiały oraz Metody opisane zostały odczynniki, materiał biologiczny oraz procedury poszczególnych eksperymentów. Brak jest natomiast spisu wykorzystywanej aparatury, a w kolejnym rozdziale nie zawsze taka informacja została zawarta. Z kolei w przypadku systemu LightCycler 480 nazwa producenta pojawia się przy kolejnym użyciu jego nazwy w tekście. W kilku miejscach stosowane procedury zostały opisane dość ogólnie, np. brak jest opisu mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia PCR czy trawień enzymami restrykcyjnymi. Czasami Doktorantka opisuje przebieg analizy stosując stwierdzenie, że stosowano zalecenia producenta. Nie zawsze jest to jednoznaczne. Np. na stronie 44 Autorka dysertacji pisze, iż mieszaninę komórka-DNA poddano elektroporacji zgodnie z instrukcją obsługi nukleofektora. Niestety w pracy nie znalazłam informacji o producencie tego aparatu. Niemożliwe jest więc odtworzenie stosowanej w pracy procedury elektroporacji. Podobnie na stronie 52 znajdujemy informację, iż do analizy metabolitów próby rozmrażano i analizowano zgodnie z instrukcją producenta OM– E7245–0A. Brak jest jednak danych o pochodzeniu analizatora CuBiAn HT270. Część metodyki dotyczącej analityki (rozdziały 7.22-7.27) również uważam za zbyt ogólnikową. Brak jest m.in. składu buforów (wymienione zostały jedynie stosowane odczynniki),

mieszanin reakcyjnych czy sekwencji starterów używanych w reakcji RT-PCR (analiza 16S rRNA *Cricetulus griseus*).

Część Wyniki stanowi najmocniejszy według mnie element pracy doktorskiej Pani Julity Balcerek, mimo że w pewnych kwestiach rezultaty badań zostały także opisane dość ogólnikowo. W kilku miejscach Autorka wręcz zaznacza, że szczegółowe wyniki nie zostały opisane. Czy mogę prosić o wyjaśnienie powodów takiego ujęcia opisu wyników?

Należy jednak podkreślić, że umiejętne zaplanowanie badań i konsekwentne ich realizowanie dostarczyły szeregu oryginalnych wyników istotnych pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Na uwagę zasługuje nie tylko osiągnięcie ostatecznego celu, czyli wyprowadzenie stabilnej akceptorowej linii komórkowej CHO wraz z opracowaniem warunków jej transfekcji wektorem donorowym zawierającym cDNA przeciwciała monoklonalnego Fab wraz z wektorem kodującym rekombinazę Cre/TAT-Cre, ale również ilość analizowanych parametrów jakościowych przeciwciał i samej hodowli komórek. Autorka dysertacji zastosowała dwuetapowe podejście, w którym kasetka *lox*, zawierająca gen fuzyjny zielonego białka fluorescencyjnego (GFP) i gen kodujący reduktazę dihydrofolianu (DHFR), była najpierw transfekowana do komórek CHO. Kolonie następnie przeszukiwano w oparciu o selekcję w obecności MTX oraz intensywność fluorescencji. Wytypowany klon (147') charakteryzujący się najwyższą stabilnością ekspresji genu *gfp* oraz osiągający najwyższą średnią gęstość hodowli, został poddany rekombinacji z udziałem wektora donorowego zawierającymi transgeny *hcFab* i *lcFab* oflankowane przez sekwencje *lox* z odwróconymi sekwencjami rdzenia (podobnie jak w wytypowanym wcześniej wektorze akceptorowym). Przeprowadzone analizy wykazały, że kasetka reporterowa z *gfp* została zastąpiona przez kasetę ekspresyjną *Fab*. Kolejne eksperymenty dowiodły, że zmodyfikowanie wzajemnej konfiguracji sekwencji *lox* gwarantuje osiągnięcie długoterminowej stabilnej ekspresji transgeny *Fab*. Doktorantka wykazała, że kluczowym elementem jest połączenie specyficznym dobranych mutacji (ramion i rdzenia), nadanie odpowiedniego kierunku sekwencji rdzenia oraz właściwy układ mutantów ramion flankujących transgeny, które ulegają wymianie podczas rekombinacji.

Należy zaznaczyć, że materiał przedstawiony w części eksperymentalnej został opublikowany w artykule „Toward Shortened Time-to-Market for Biopharmaceutical Proteins Development: Tuning of Fab Protein Long-Term Expression Stability by Cre/*lox* System in a Multi-Use Clonal Cell Line (*J Pharm Sci.* 2021 Feb;110(2):946-951). Pani Balcerek jest pierwszym autorem tej pracy.

Spośród niezwykle cennych, z mojego punktu widzenia, wielu osiągnięć Pani mgr Julity Balcerek wymienionych we wnioskach i podsumowaniu moim zdaniem na szczególne wyróżnienie zasługuje:

1. Zaprojektowanie wektorów niezbędnych do wymiany kaset za pośrednictwem rekombinazy Cre, w tym dobór odpowiednich konfiguracji mutacji sekwencji *lox*
2. Otrzymanie uniwersalnej i stabilnej akceptorowej linii komórkowej (CHO_pMlml_2_GFP);
3. Opracowanie optymalnych warunków transfekcji linii komórkowej CHO_pMlml_2_GFP wektorem donorowym zawierającymi transgeny *hcFab* i *lcFab* oraz wektorem zawierającym cDNA rekombinazy Cre/TAT-Cre
4. Opracowanie platformy analitycznej dedykowanej ocenie stabilności produkcji białkowych leków biologicznych

Podsumowując, nakreślone na początku cele pracy, które stanowią złożone problemy badawcze zostały zrealizowane w sposób skrupulatny i przemyślany. Nie oznacza to jednak, że tematyka badawcza została w tym obszarze wyczerpana. Wręcz przeciwnie - otwiera nowe pola do dyskusji, a otrzymane wyniki stanowią punkt wyjścia do dalszych badań. Dlatego prosilibym Doktorantkę o kilka zdań na temat możliwości podjęcia kolejnych kroków badawczych w oparciu o uzyskane dotychczas wyniki.

Ponadto, podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się pytania i komentarze. Prosiłabym o ich skomentowanie

1. Dlaczego Doktoranta wybrała system *Cre-lox*, a nie systemy z zastosowaniem innych rekombinaz?
2. System selekcyjny oparty na ekspresji genu kodującego GFP lub inne białka fluorescencyjne cechują pewne niedoskonałości. Oprócz toksyczności GFP i fundamentalnych różnic w fałdowaniu i wymaganiach sekrecyjnych między białkami fluorescencyjnymi a przeciwciałami należy wziąć pod uwagę fakt, że wysoki poziom ekspresji GFP może również powodować nieprawidłowe fałdowanie. Problemem może też być tzw. fotowysbielenie/fotoblaknięcie (*photobleaching*), zwłaszcza gdy pomiar jest czasochłonny lub wymaga dłuższej ekspozycji. Czy doktorantka może zaproponować potencjalne narzędzia eliminujące powyższe ograniczenia?

W pracy nie znajduję poważniejszych błędów edytorskich czy też istotnych niedociągnięć. Kilka z nich zamieszczam poniżej

- strona 28: brak referencji do informacji, iż linia komórkowa CHO DG44 z niedoborem reduktazy dihydrofolianu (DHFR) umożliwia skuteczne przeszukiwanie klonów w obecności metotreksatu
- zamiennie stosowana nazwa o-fenylodiamina i O-fenylodiamina
- strona 44: „Komórki dodatkowo wyselekcjonowano w pożywce, zawierającej standardowe stężenie metotreksatu” – nie podano tego stężenia
- strona 49: brak informacji jakie płytki stosowano do opłaszczania (producent, ilość dołków)
- strona 50: jaką objętość kwasu siarkowego wykorzystano do zatrzymania reakcji
- w skrótach pojawia się 'rpm' mimo braku użycia w tekście
- Część nazw odczynników pisana z wielkiej, a część z małej litery
- Zamiennie stosowane skróty: HC DNA, HCDNA
- Galactozylacja zamiast galaktozylacja
- Co przedstawiają dane na wykresach: czy średnia i sd (np. Ryciny 8 i 11)
- Podpis osi y w języku polskim (żywołność lub gęstość), a osi x w języku angielskim (days) na Rycinach 9 i 12
- Niepoprawny podpis Ryciny 14 i 16
- Proponuję używanie słowa utlenianie zamiast oksydacja

Niemniej jednak moje uwagi krytyczne i komentarze nie podważają bardzo pozytywnej oceny wartości naukowej pracy, a są jedynie uwagami do dyskusji.

Podsumowanie

Po zapoznaniu się z dysertacją doktorską Pani Julity Balcerek stwierdzam, że Doktorantka bardzo trafnie wybrała tematykę badań, jasno sformułowała cel pracy, dobrze zaplanowała i wykonała doświadczenia, wykazała się umiejętnością interpretacji i dyskusji oraz wyciągania właściwych wniosków, a także umiejętnie sformułowała podsumowanie pracy. Przedłożona do recenzji praca doktorska jest więc kompleksowym opracowaniem stanowiącym wartościowy przyczynek do istniejącego stanu

wiedzy, zawiera również elementy nowatorskie i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 593 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnioskuję więc do Rady Nauk Medycznych Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy „Opracowanie innowacyjnej technologii do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych do ekspresji białek rekombinowanych dla zastosowań biofarmaceutycznych” i dopuszczenie mgr Julity Balcerek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Edyta Gendraszewska - Damm