

Warszawa, 10.09.2022 r.

Prof. Dr hab. inż. Tomasz Ciach
Politechnika Warszawska
Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej
Ul. Waryńskiego 1, 00-645 Warszawa

RECENZJA

**Rozprawy doktorskiej Pani mgr Julity Balcerek
pt. „Opracowanie innowacyjnej technologii do wyprowadzania
stabilnych linii komórkowych do ekspresji białek
rekombinowanych dla zastosowań biofarmaceutycznych”**

(Promotor: Dr hab. profesor uczelni Tadeusz Pietrucha)

Wprowadzenie

Poszukiwanie nowych leków i technologii medycznych jest tak stare jak sama ludzkość. Na początku poszukiwania te prowadzone były metodą prób i błędów, ale wraz z postępem wiedzy w dziedzinie biologii, chemii i nauk medycznych zaczęliśmy powoli rozumieć jak działa ten niezwykle skomplikowany system, jakim jest ludzki organizm. Choć trzeba przyznać, że do końca tej drogi jeszcze ciągle jest daleko. Rozwój chemii doprowadził najpierw do wyodrębnienia z roślin pierwszych substancji chemicznych o działaniu leczniczym – morfiny, a potem do otrzymania pierwszych syntetycznych związków leczniczych – chloroform. Obecnie syntetyzujemy miliony różnych związków chemicznych o działaniu leczniczym. Rezultaty wysiłków chemików, biologów i lekarzy są naprawdę imponujące, w ciągu ostatnich 100 lat średnia długość życia ludzi na ziemi uległa podwojeniu (Max Roser, 2018, "Life Expectancy").

Chcąc ingerować – usprawniać zaburzone chorobą chemiczne szlaki sygnałowe w organizmie ludzkim na początku stosowaliśmy proste a z czasem coraz bardziej złożone związki chemiczne – chemioterapeutyki. Niestety w bardzo wielu przypadkach, chcąc osiągnąć większą finezję w tych działaniach, większą skuteczność przy mniejszych

działaniach niepożądanych, musimy naśladować naturę i posiłkować się białkami, ogólniej biofarmaceutykami, związkami naturalnie stosowanymi przez nasz organizm do jego budowy, prowadzenia procesów metabolicznych i ich regulacji. Biofarmaceutyki mają nieporównywalnie bardziej złożoną strukturę, niż klasyczne chemioterapeutyki. Ich klasyczna, chemiczna synteza jest bardzo złożona, a często wręcz niemożliwa. Do otrzymywania biofarmaceutyków stosujemy odpowiednio zmodyfikowane organizmy żywe jak bakterie, drożdże czy komórki ssaków lub owadów. Technologie to pozwoliły na powstanie szczepionek i całego szeregu leków jak insulina, czynniki krzepnięcia krwi, leki hormonalne czy przeciwciała monoklonalne, a obecnie to leki oparte o kwasy nukleinowe czy komórki macierzyste. Prostsze białka otrzymywane są w genetycznie zmodyfikowanych bakteriach. Bardziej złożone białka, wymagające odpowiedniej obróbki po-translacyjnej pozwalającej im osiągnąć właściwą strukturę przestrzenną wymagają zastosowania modyfikowanych komórek organizmów bardziej złożonych, jak na przykład komórki chomika. Otrzymywanie takich stabilnych linii komórkowych wydajnie produkujących „zaprogramowane” substancje jest procesem trudnym. Rozprawa doktorska Pani mgr Julity Balcerek, pod tytułem “Opracowanie innowacyjnej technologii do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych do ekspresji białek rekombinowanych dla zastosowań biofarmaceutycznych” zajmuje się właśnie tym tematem.

Opis rozprawy

Rozprawa doktorska została napisana w języku Polskim i obejmuje ponad 100 stron tekstu pogrupowanego w poszczególne części i rozdziały. Forma pracy, strona edycyjna, jej podział na poszczególne części i rozdziały oraz ich zawartość jest zgodna z ogólnie przyjętym kanonem. Jednakże przedstawiona praca odbiega nieco od typowego - tradycyjnego układu rozpraw doktorskich. Przede wszystkim nie zawiera hipotez naukowych, stawianych zwykle na początku dysertacji doktorskich i udowadnianych na końcu procesu. Jest to zjawisko coraz częściej obserwowane w rozprawach doktorskich i wynikające z podejścia do rozprawy jak do sprawozdania z wykonania projektu badawczego. Zamiast postawienia tezy naukowej, autorka w sposób klarowny formułuje cel i zakres pracy. Wstęp zawiera opis znaczenia stabilnej linii komórkowej w produkcji leków biotechnologicznych stosowanych we współczesnej medycynie oraz opisy sposobów wprowadzania transgenów do genomu komórki gospodarza, stabilnej ekspresji

przeciwciał monoklonalnych oraz opis projektowania platform analitycznych do oceny stabilnej produkcji przeciwciał monoklonalnych. Kolejne, bardzo rozbudowane rozdziały dotyczą materiałów i metod wykorzystywanych w pracach doświadczalnych. Przedmiot ocenianej rozprawy, stanowi tematyka związana z uzyskaniem stabilnej integracji genów i szybkiej selekcji klonów z jednoczesną wysoką ekspresją transgenu. Zagadnienia te są obecnie niezwykle ważne przy opracowywaniu systemów biofarmaceutycznych do produkcji białek rekombinowanych. Autorka ukierunkowała zakres prowadzonych prac badawczo-rozwojowych nie tylko na aspekty naukowe i badania podstawowe, ale przede wszystkim na autonomiczny cel aplikacyjny. Jest to bardzo ważne, gdyż praktyczne zastosowanie odkryć naukowych, doprowadzenie wyników badań naukowych do rynku, stanowi swego rodzaju ukoronowanie dzieła naukowego. Jednocześnie z własnego doświadczenia wiem, że prowadzenie badań naukowych pod presją ich praktycznego zastosowania a więc uwzględnienia dodatkowo zagadnień ekonomicznych znacznie utrudnia proces poszukiwania rozwiązań naukowych. Opracowana w ramach niniejszej pracy technologia pozwala znacząco skrócić czas etapu wyprowadzania stabilnej linii komórkowej dla białek rekombinowanych, w tym przeciwciał monoklonalnych, przy wykorzystaniu stabilnej akceptorowej linii komórkowej. Klasyczne procesy uzyskiwania finalnego, stabilnego klonu komórkowego produkującego pożądane przeciwciało, zajmują zwykle ok. 3 - 5 miesięcy. W zaprezentowanym układzie ekspresyjnym proces ten może być skrócony nawet do 5 tygodni. Uzyskane w ramach recenzowanej rozprawy rezultaty mają pozytywny wpływ na ekonomikę procesu rozwoju i wdrażania leków biotechnologicznych, a także na zapewnienie ich biologicznej i terapeutycznej jakości. Rozwiązanie postawionego w pracy problemu badawczego oraz osiągnięcie założonych celów dysertacji wymagało od doktorantki rozwiązania wielu zaawansowanych zagadnień badawczych i metodologicznych z zakresu biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, immunologii oraz umiejętności uzyskiwania rekombinowanych białek w systemach eukariotycznych.

Warto też dodać, że na podstawie rozprawy doktorskiej powstała publikacja, w której autorka rozprawy jest również pierwszą autorką publikacji.

1. Balcerek J., Bednarek M., Sobieściak T.D., Pietrucha T., Jaros S. 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. 2020.

W przygotowaniu jest kolejna publikacja:

2. Balcerek J., Bartusik-Czubek E., Sobieściak T.D., Pietrucha T. Assessing the phenotypic drift of cell banks during monoclonal antibody bioprocessing through IgG. N-glycosylation analysis.

Podnoszą one wartość rozprawy, choć oczywiście można by oczekiwać większej ilości publikacji powstałych z okresu prowadzenia badań, ale trzeba zdawać sobie sprawę, że praca w jednostce przemysłowej cechuje się innymi priorytetami i innym podejściem do propagowania wyników badań.

Uwagi krytyczne

W dysertacji wszystkie modyfikacje genetyczne, wykonano są przy pomocy metody RMCE (wymiana kaset przeprowadzana za pośrednictwem rekombinazy). Jest to standardowa procedura wytwarzania prawidłowo zmodyfikowanych białek o znaczeniu farmaceutycznym. Metoda ta została wprowadzona w 1994 roku. Rozumiem, że wybór metody wynika z doświadczenia doktorantki. Obecnie coraz częściej stosowaną i bardziej precyzyjną metodą jest CRISPR Cas9. Istnieją prace, w których robi się hybrydę Cre/lox z CRISPR Cas9 w celu precyzyjnego wstawienia wybranej (pożądaney) sekwencji genu w genom. Co autorka sądzi o zastosowaniu tej techniki w wprowadzaniu linii komórkowych do zastosowań analogicznych jak w doktoracie?

Autorka zmieniła sekwencje lox poprzez odwrócenie ich kierunek na 3'>5' i to spowodowało większą stabilność linii. Podczas szeregu eksperymentów linie komórkowe zarówno RCB, WCB, RWCB zostały metodycznie sprawdzano pod względem stabilności. Natomiast w eksperymencie brakuje kontroli, czyli porównania uzyskanych przez autorkę stabilnych linii komórkowych ze zmienionymi ramionami lox do linii uzyskanych z wykorzystaniem oryginalnych (wyjściowych) sekwencji lox, które nie były zmieniane. Czy wykonywane były takie badania porównawcze? Jeśli nie to, dla czego? Warto by było pokazać, że wprowadzona modyfikacja daje lepsze wyniki. Wyniki nie pokazują do końca jasno i klarownie o ile lepiej działa nowy system (zmodyfikowany) w porównaniu od tego, z którego autorka wychodziła.

Ogólnie pomysł stworzenia na pierwszym etapie linii rodzicielskich (pre-modyfikowanych), które niosą stabilny plazmid z sekwencją GFP (green fluorescent protein) oflankowanych sekwencjami lox jest dobrym podejściem, ponieważ pozwala na wyselekcjonowanie linii z genem kodującym GFP, który jest wstawiony w tzw. hot point (aktywny transkrypcyjny), ponadto można na sorterze odsortować tylko te dobre linie. Ważne, że takie linie można pasażować i sprawdzać stabilność integracji GFP a potem (finalnie) to GFP będzie wymienione na pożądaną sekwencję, w tym przypadku kodującą FAB (region przeciwciała wiążący antygen). Podejście eksperymentalne jest dobre.

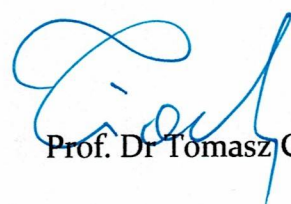
W dyskusji prawdopodobnie jest błąd: str.86 5 i 6 wiersz licząc od dołu. Jest napisane: "została również dołożona dodatkowa mutacja punktowa, wprowadzająca tyminę na miejsce cystyny w sekwencji ramienia charakterystycznej dla lox66 (C->T). Cystyna to aminokwas, chyba wymieniono tyminę na cytozynę?

Wnioski końcowe

Przedstawiona przez Panią mgr Julitę Balcerek rozprawa doktorska pod tytułem „Opracowanie innowacyjnej technologii do wyprowadzania stabilnych linii komórkowych do ekspresji białek rekombinowanych dla zastosowań biofarmaceutycznych” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia eksperymentalnej pracy badawczej. Wykazała się również umiejętnością krytycznej analizy otrzymywanych w laboratorium wyników oraz jej odpowiedniego przedstawiania. Pracę uważam za poprawnie napisaną a zamieszczone w recenzji uwagi krytyczne nieznacznie tylko umniejszają jej odbiór.

Stwierdzam, że całkowicie spełnione zostały wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w dziedzinie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), wobec czego wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Julity Balcerek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Bardzo przepraszam za opóźnienie w dostarczeniu recenzji.


Prof. Dr Tomasz Ciach