



UNIwersytet Warszawski  
Wydział Biologii  
Instytut Mikrobiologii  
Miecznikowa 1, 02-945 Warszawa



Prof. dr hab. Jacek Bielecki

Warszawa, 12. 01. 2017.

Zakład Mikrobiologii Stosowanej

**Ocena pracy doktorskiej mgr Anny Mazurkiewicz-Pisarek pt. „Biotechnologiczna metoda otrzymywania rekombinowanego VIII ludzkiego czynnika krzepnięcia krwi”**

Praca doktorska Pani mgr Anny Mazurkiewicz-Pisarek została w większości zrealizowana w pracowniach Zakładu Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków oraz Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcza PAN w Warszawie pod kierunkiem Pana dr hab. inż. Tomasza Ciacha, prof. PW, Kierownika Zakładu Biotechnologii i Inżynierii Bioprocessowej Politechniki Warszawskiej. Uzyskiwanie białek o znaczeniu terapeutycznym to jedno z zadań badawczych realizowanych w pracowni biochemicznej Zakładu Bioinżynierii. Zrealizowanie postawionego celu przez doktorantkę, tj. doprowadzenie do produkcji rekombinowanego VIII ludzkiego czynnika krzepnięcia krwi na skalę przemysłową przez drobnoustroje było tylko możliwe dzięki wykorzystaniu wieloletniego doświadczenia wspomnianych powyżej ośrodków badawczych w zakresie inżynierii genetycznej, bioinżynierii i biotechnologii bioprocessowej. Przed podjęciem się realizacji założeń przedstawionej rozprawy doktorskiej, Doktorantka przeszła wieloletnią praktykę doświadczalną w Zakładzie Bioinżynierii IBiA, biorąc udział w licznych projektach badawczych realizowanych w Zakładzie. W tym czasie Doktorantka była współautorem kilku publikacji i patentów związanych z możliwością produkcji białkowych hormonów hybrydowych przez szczepy *Escherichia coli*. Doświadczenie eksperymentalne pozwoliło jej na podjęcie się bardzo trudnego zadania, jakim jest zaproponowanie i skuteczna realizacja zadania badawczego w postaci biotechnologicznej metody otrzymywania rekombinowanego VIII ludzkiego czynnika krzepnięcia krwi. Praca doktorska ma więc charakter eksperymentalny i obciążona jest wielkim ryzykiem dotyczącym osiągnięcia celu

końcowego. Składanie dużego genu, a potem jego ekspresja i oczyszczanie produktu to długa droga, która przy odrobinie szczęścia teoretycznie zawsze jest możliwa, ale wykonanie zadania wymaga precyzji, konsekwencji i dużych umiejętności badawczych wykonawcy. Chciałbym też dodać, że zaplanowane przez Doktorantkę cele badawcze są niezwykle ważne w sensie aplikacyjnym. Dotychczas podstawowym lekiem stosowanym w przypadku leczenia hemofilii typu A są koncentraty uzyskane z ludzkiego osocza, a ostatnio rekombinowany czynnik VIII krzepnięcia krwi. Jednak wszystkie dostępne preparaty rekombinowanego czynnika VIII były uzyskiwane w komórkach ssaczych, czyli w systemie eukariotycznym, co związane było z ograniczonymi możliwościami produkcyjnymi oraz bardzo wysokimi kosztami wytwarzania. Dlatego podjęcie przez Doktorantkę próby produkcji czynnika VII w pierwszym etapie doktoratu przez stabilną linię komórkową CHO było zadaniem przewidywalnym. Późniejsza próba produkcji tego samego białka przez bakterie było zadaniem znacznie trudniejszym i na pewno bardzo ryzykownym pod względem badawczym.

We wczesnej fazie projektu skonstruowano syntetyczny gen ludzkiego czynnika VIII krzepnięcia krwi oraz uzyskano stabilną linię komórkową komórek CHO, produkujących aktywne białko. Jednak wysokie koszty prowadzenia długotrwałych hodowli tkankowych i niewielkie ilości uzyskiwanych tą drogą białek skłoniły doktorantkę do próby skonstruowania szczepu bakteryjnego *E.coli*, wytwarzającego rekombinowany ludzki czynnik krzepnięcia krwi. Potwierdzona spektrometrycznie ekskrymacja pożądanego produktu przez *E. coli* pozwoliła na ostateczne opracowanie biotechnologicznej metody otrzymywania aktywnej substancji z komórek bakteryjnych, co niewątpliwie jest związane ze znacznym obniżeniem kosztów produkcji oraz uzyskania dużo większych ilości białka w dużo krótszym czasie w stosunku do produkcji tego białka w systemie eukariotycznym czy na drodze syntezy. Kolejnym wielkim osiągnięciem realizowanych badań było udane przeniesienie hodowli ze skali laboratoryjnej do ćwierćtechnicznej, co pozwoliło na uzyskanie stosunkowo wysokiej wydajności produkcji białka przy zachowanej aktywności biologicznej. Niewątpliwie wprowadzenie oczyszczania uzyskanego preparatu prowadziło do podwyższenia jego aktywności. Trzeba jednak w tym miejscu podkreślić, że realizowane przez Doktorantkę eksperymenty w laboratorium są dopiero wstępnym etapem w badaniach nad stworzeniem leku. Uzyskane preparaty wymagają jeszcze szczegółowych badań przedklinicznych, ale na pewno stanowią

kolejne cenne osiągnięcie biotechnologiczne w skali międzynarodowej. Osiągnięte efekty badawcze pozwalają z całą pewnością na stwierdzenie, iż wszystkie postawione cele w pracy zostały zrealizowane, a zastosowana metodyka i droga badawcza były słuszne.

Przedstawiona praca doktorska odbiega nieco od typowego układu dla prac eksperymentalnych. Zawiera krótki wstęp pod postacią zwięzłej charakterystyki biochemicznej czynnika VIII krzepnięcia, następnie bardzo rozbudowanej charakterystyki materiałów doświadczalnych, stosowanych metod i procedur pracy. Po opisie procedur pracy z białkami Autorka przechodzi do projektowania konstrukcji własnych oraz opisu uzyskiwania konstrukcji. Kolejne równorzędne dwa punkty to uzyskanie ekspresji genu kodującego VIII czynnik krzepnięcia w systemie eukariotycznym i prokariotycznym. Podsumowanie i wnioski nie spełniają funkcji dyskusji wyników, której oczekiwałbym chociażby ze względu na podkreślenie wyjątkowego osiągnięcia tej pracy w porównaniu z podobnymi próbami podejmowanymi w innych laboratoriach. Bardzo obszerne w pracy części: metodyczna oraz wynikowa wynikają między innymi z faktu, iż dla rozwiązania problemów z konieczności zastosowano szereg wypróbowanych i znanych metod z zakresu biologii molekularnej inżynierii genetycznej. Dane eksperymentalne udokumentowane są za pomocą 52 rysunków i 29 tabel. Spis literatury jest także obszerny, obejmuje 142 pozycje. Oceniana rozprawa doktorska nie zawiera błędów merytorycznych. Jestem przekonany, że wyniki uzyskane w tej pracy będą podstawą patentu, a następnie publikacji w jednym z renomowanych czasopism biotechnologicznych. Zaprojektowanie eksperymentów i uzyskanie w wyniku ich realizacji tak wielu wartościowych rezultatów na pewno świadczy o dojrzałości badawczej doktorantki. Wykonanie większości eksperymentów wymagało stworzenia wielu układów badawczych oraz dobrego przygotowania w zakresie inżynierii genetycznej i mikrobiologii. Część eksperymentalna rozprawy pozwoliła na weryfikację wcześniej zakładanych i wielce ryzykownych hipotez badawczych. Do największych osiągnięć naukowych pracy, o dużym znaczeniu aplikacyjnym w zakresie opracowania podstaw do produkcji leku na skalę ćwierćtechniczną należy zaliczyć udowodnienie, że możliwe jest wklonowanie ludzkiego genu czynnika VIII krzepnięcia krwi do prokariotycznego wektora ekspresyjnego oraz jego ekspresja w prokariotycznym systemie ekspresyjnym. Uzyskanie aktywnego biologicznie białka to niewątpliwie kolejny sukces. Opracowanie metody izolacji czynnika VIII z

bakteryjnych ciałek inkluzyjnych to także ważne osiągnięcie. Dobór odpowiednich warunków rozpuszczania oraz renaturacji białka przy zachowaniu jego aktywności to też jest osiągnięcie aplikacyjne. Izolacja produktu końcowego z ciałek inkluzyjnych to niewątpliwie jeden z ważniejszych końcowych etapów produkcji. Zabrakło mi w tym momencie dyskusji nad innymi możliwościami odzyskiwania produktu końcowego, chociażby po wprowadzeniu zmian w systemie sekrecji prowadzącymi do pozakomórkowego wydzielania białka przez szczep producenta. Ciekawe jest jak wyglądałaby produkcja tego złożonego białka przez producentów z grupy bakterii G+. Niezależnie od tego jestem pełen uznania dla Doktorantki za jej konsekwentną realizację postawionych celów pracy i nienaganną realizację przeprowadzanych eksperymentów. Jedno nieudane doświadczenie w całym cyklu eksperymentów mogłoby obrócić założenia pracy w niepowodzenie i doprowadzić do wniosków negatywnych. Stworzenie metody, która pozwala na produkcję skutecznego i taniego leku w przypadku choroby genetycznej otwiera nowe możliwości badawcze i wyznacza nowe kierunki badań w zakresie biotechnologii leków. Mocną stroną ocenianej rozprawy jest dobrze i przejrzysto przeprowadzony opis kolejnych eksperymentów wraz ze schematami ilustrującymi tok postępowania. Umiejętny opis wielu skomplikowanych procedur, a także proste i logiczne wyjaśnienia, oczywiście w miarę możliwości stosowanych skrótów i procedur, także przyczyniają się do pozytywnej oceny przedstawionej pracy doktorskiej.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę, uważam że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Mazurkiewicz-Pisarek spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej in. M. Nałęcz PAN w Warszawie o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK**  
ZAKŁADU MIKROBIOLOGII STOSOWANEJ INSTYTUTU MIKROBIOLOGII  
Wydziału Biologii  
Uniwersytetu Warszawskiego  
*prof. dr hab. Jacek Bielecki*