

## OCENA ŚRÓDOKRESOWA –ZA OKRES OD 01.10.2020 DO 30.09.2022

**ELIZA KĘSY-SIWIK**

.....  
(imię / imiona i nazwisko doktoranta)  
(name/s and surname of PhD student)

**1. Tytuł rozprawy doktorskiej (w języku dysertacji) / Original title of doctoral dissertation**

Opracowanie innowacyjnych metod analitycznych do oceny immunogenności rekombinowanych białek terapeutycznych w technologii mikroprzepływowej Gyrolab.

Development of innovative analytical methods to assess the immunogenicity of recombinant therapeutic proteins in the Gyrolab microfluidic technology.

**2. Komisja Ewaluacyjna ds. Oceny Śródkresowej Doktoranta Międzynarodowej Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (UM) w dyscyplinie: NAUKI MEDYCZNE, w składzie:/ Evaluation Commission for Mid-term Assessment the PhD student at UM International Doctoral School in the discipline: MEDICAL SCIENCES, consists of:**

No.	Tytuł / stopień naukowy, imię, nazwisko / Scientific title / degree, Name, Surname	Rola / Role
1.	prof. dr hab. n. med. Anna Woźniacka	Przewodniczący Komisji / Head of the Commission
	<b>Uniwersytet, Wydział, Instytut/University, Faculty, Institute: UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI DYREKTOR MIĘDZYNARODOWEJ SZKOŁY DOKTORSKIEJ</b>	
2.	prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna	Członek z UM / Member from UM
	<b>Uniwersytet, Wydział, Instytut/University, Faculty, Institute: UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI WYDZIAŁ LEKARSKI, ZAKŁAD BIOCHEMII</b>	
3.	dr hab. n. med. Agnieszka Gach	Członek spoza UM / Member from outside UM
	<b>Uniwersytet, Wydział, Instytut / University, Faculty, Institute: INSTYTUT CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI</b>	
4.	mgr inż. Łukasz Duda	Obserwator – doktorant / Observer – PhD student
	<b>Uniwersytet, Wydział/University, Faculty: UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI</b>	

**Ocena końcowa doktoranta Eliza Kęsy-Siwik**  
**/ Final assessment of PhD student**

**Pozytywna / Positive**

**Uzasadnienie końcowej oceny Komisji,**  
**/ Justification of Commission's final assessment result**

Na podstawie przedłożonej do oceny dokumentacji dotyczącej działalności kształcenia w Międzynarodowej Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi komisja pozytywnie ocenia doktorantkę. Kluczowym elementem oceny bezpieczeństwa stosowanego leku biologicznego lub biopodobnego według wytycznych Agencji ds. Rejestracji Leków jest ocena jego immunogenności. Indukcja układu odpornościowego pacjenta poddanego terapii wiąże się z ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych oraz może znacząco obniżać aktywność biologiczną stosowanego środka farmakologicznego, wpływając tym samym na skuteczność leczenia. Odpowiedź immunologiczna pacjenta na zastosowane leczenie biologiczne przejawia się poprzez produkcję przeciwciał skierowanych przeciwko środkowi terapeutycznemu tzw. ADA (ang. Anti-drug Antibodies). Przeciwciała te poprzez zdolność do neutralizacji aktywności biologicznej leku określane są często jako przeciwciała neutralizujące (NAb z ang. Neutralizing Antibodies).

Firma MABION S.A. jest w chwili obecnej jedną z prężnie działających na rynku polskim firm biotechnologicznych, która zajmuje się opracowywaniem nowatorskich terapii opartych na produktach biologicznych i biopodobnych. Jednym z takich leków jest MabionCD20 (Rituximab); humanizowane przeciwciało monoklonalne anty CD20.

W surowicy pacjentów otrzymujących lek pojawiają się w niskich stężeniach przeciwciała ADA, jednak dotychczas stosowane metody analityczne nie są wystarczająco czułe aby zweryfikować prawdziwe miano przeciwciał z uwagi na: (1) ich śladowe stężenie oraz (2) obecność substancji biologicznie czynnej (leku) w materiale badanym, który pozostając w kompleksie z przeciwciałami ADA utrudnia ich wykrycie poprzez reakcję ADA z wprowadzanym w czasie procesu analitycznego swoistym dla wykrywanych przeciwciał znakowanym antygenem.

Celem pracy doktorskiej, Pani mgr Eliza Kęsy-Siwik jest opracowanie metody, która pozwoli na precyzyjne oszacowanie miana przeciwciał ADA w surowicy pacjentów otrzymujących lek MabionCD20. Opracowana w ramach pracy doktorskiej metoda będzie uniwersalna i możliwa do zastosowania w przypadku oceny bezpieczeństwa innych leków biologicznych lub biopodobnych które są lub będą opracowywane w przyszłości przez firmę MABION. Umożliwi to firmie MABION samodzielną weryfikację bezpieczeństwa własnych produktów farmaceutycznych co niewątpliwie przyczyni się do redukcji czasu oczekiwania na wynik oraz redukcji kosztów produkcji; dotychczas firma MABION zlecała ocenę bezpieczeństwa leku firmie zewnętrznej.

Proces walidacji metody pozwalającej na ocenę bezpieczeństwa MabionCD20 został podzielony na etapy (cele), które Doktorantka realizuje w trakcie poszczególnych semestrów studiów doktorskich: W czasie pierwszego roku studiów, prace Doktorantki skupione były na (1) zoptymalizowaniu koniugacji przeciwciała detekcyjnego za pomocą fluorochromu Alexa Fluor 647 bądź analogicznego oraz (2) stworzeniu procedury statystycznej definiującej podejście analityczne we wdrażanej metodzie. Procedura miała posłużyć do wyznaczenia punktu odcięcia (ang. Cut-Point) powyżej którego próby będą klasyfikowane jako immunogenne. Analiza miała zostać przeprowadzona na dostępnej w danym momencie puli danych historycznych od pacjentów negatywnych oraz kontroli pozytywnej. Cel 1 i 2 zostały zrealizowane w trakcie prac obejmujących pierwszy semestr studiów doktoranckich.

W czasie semestru drugiego, Doktorantka skupiła się na optymalizacji czułości i zakresu detekcji testu ADCC (ang. Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity) pozwalającego na ocenę działania neutralizującego przeciwciał ADA. W ramach prac wykorzystano komórki targetowe Raji i efektorowe

Jurkat w formie RTU (ang. Ready to Use) zakupione w firmie Promega. Zakupiono również linię komórkową Raji, a następnie wykonano bank macierzysty (MCB, z ang. Master Cell Bank) a następnie roboczy (WCB, z ang. Working Cell Bank) w celu zapewnienia odpowiedniej liczby komórek zarówno do walidacji metody jak i późniejszego badania prób od pacjentów.

Drugi rok szkoły doktorskiej posłużył na opracowanie metody izolacji przeciwciał ADA z badanego materiału biologicznego. Technika izolacji została oparta o technologie kulek magnetycznych opłaszczonych straptawidyną. Dodatkowo w czasie czwartego semestru studiów, Doktorantka zgodnie z założeniami pracy pozyskała kontrolę pozytywną na potrzeby testu ADA. Kontrola pozytywna – przeciwciała poliklonalne anty ADA pozyskane zostało ze zimmunizowanych królików. Ponadto, Doktorantka, poczyniła pierwsze kroki w celu opracowania szeregu testów służących do oceny immunogenności m.in. Screening, Confirmatory oraz Titer oraz podjęła próbę optymalizacji metody opartej o technologię Gyrolab pod kątem parametru Drug Tolerance, w celu otrzymania metody odpornej na obecny w surowicy pacjentów inhibitor reakcji immunologicznej – resztkowe ilości utrzymującego się leku MabionCD20. Poza tym opracowana w czasie realizacji pracy doktorskiej technika izolacji ADA w oparciu o kulki magnetyczne, została zautomatyzowana i przeniesiona ze skali pojedynczej próbki typu Eppendorf na salę wysokoprzepustową opartą o płytki głębokodołkowe. Ten etap znacznie wykraczał poza prace zaplanowane na etapie pisania projektu. Część wyników swojej pracy doktorskiej, Pani Eliza przedstawiła w czasie międzynarodowej konferencji poświęconej technologii Gyrolab która odbyła się w dniach 14-15 czerwca w Dublinie, w trakcie prezentacji o tytule „Immunogenicity assessment of biosimilar – from challenges to solutions”. Na podstawie przedłożonej dokumentacji poziom realizacji indywidualnego planu badawczego i zaawansowanie harmonogramu przygotowania rozprawy doktorskiej mgr Elizy Kęsa-Siwik komisja ocenia bardzo wysoko. Problem badawczy został sformułowany, metodyka właściwie dobrana i zastosowana. Jakość wykonywania zadań jest wysoka. Wyniki zostały zaprezentowane przez Doktorantkę na konferencji międzynarodowej, co potwierdza jej zaangażowanie i stanowi istotny element aktywności naukowej. Mimo, iż zakres przeprowadzonych badań wydaje się szerszy od pierwotnie zaplanowanego realizacja badania przebiega zgodnie z harmonogramem i rokuje złożeniem dysertacji w założonym terminie. Uzyskane dotychczas wyniki są nowatorskie i stanowią faktyczny wkład w rozwój reprezentowanej przez doktorantkę dziedziny naukowej.

On the basis of the documentation submitted for evaluation regarding the activity of education at the International Doctoral School of the Medical University of Lodz, the committee assess the doctoral student positively. The assessment of immunogenicity is a key element in evaluating the safety of an applied biologic or biosimilar medicine according to the FDA guidelines.

Induction of the immune system of a patient undergoing therapy is associated with the risk of adverse effects and may significantly reduce the biological activity of the applied pharmacological agent, thus affecting the efficacy of the treatment. The patient's immune response to the applied biological treatment manifests itself through the production of antibodies directed against the therapeutic agent, so-called ADA (Anti-drug Antibodies). These antibodies, through their ability to neutralise the biological activity of the drug, are often referred to as Neutralising Antibodies (NAb).

MABION S.A. is currently one of the more dynamic biotechnology companies active on the Polish market, developing innovative therapies based on biological and biosimilar products. One among such drugs is MabionCD20 (Rituximab); a humanised anti-CD20 monoclonal antibody.

ADA antibodies appear in low concentrations in the serum of patients receiving the drug, but analytical methods used to date are not sensitive enough to verify true antibody titres due to: (1) their trace concentration and (2) the presence of a biologically active substance (drug) in the test material, which, while remaining in complex with ADA antibodies, hinders their detection by reacting ADA with a labelled antigen specific for the detected antibodies introduced during the analytical process.

The aim of the doctoral thesis of Eliza Kęsa-Siwik, M.Sc., is to develop a method which will enable the precise estimation of ADA antibody titres in the sera of patients receiving the drug MabionCD20. The method developed as part of the dissertation will be universal and applicable to the safety assessment of other biological or biosimilar drugs that are or will be developed by MABION in the future. This will enable MABION to verify the safety of its own pharmaceutical products on its own, which will undoubtedly contribute to a reduction in waiting time for the result and production costs; until now, MABION has outsourced the safety assessment of the drug to an external company.

The validation process of the method allowing the safety assessment of MabionCD20 was divided into stages (objectives), which the Doctoral Student pursued during the individual semesters of her PhD studies:

During the first year, the PhD student's work focused on (1) optimising the conjugation of the detection antibody using Alexa Fluor 647 or an analogue, and (2) creating a statistical procedure to define the analytical approach in the implemented method. The procedure was to be used to determine the cut-off point (Cut-Point) above which samples would be classified as immunogenic. The analysis was to be performed on a pool of historical data from negative patients and positive controls available at the time. Objectives 1 and 2 were completed during the course of the work covering the first semester of the PhD programme.

During second semester, the PhD student focused on optimising the sensitivity and detection range of the Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC) assay to assess the neutralising effect of ADA antibodies. The work used Raji target cells and Jurkat effector cells in RTU (Ready to Use) format purchased from Promega. A Raji cell line was also purchased and a master cell bank (MCB) and then a working cell bank (WCB) were made to ensure an adequate number of cells for both method validation and subsequent testing of samples from patients.

The second year of the PhD study was used to develop a method for the isolation of ADA antibodies from the biological material studied. The isolation technique was based on streptavidin-coated magnetic bead technology. In addition, during the fourth semester of the study, the PhD student obtained a positive control for the ADA assay, according to the objectives of the thesis. The positive control, an anti-ADA polyclonal antibody, was obtained from cold-immunized rabbits. In addition, the PhD student took the first steps to develop a number of immunogenicity assays, including Screening, Confirmatory and Titer, and attempted to optimise the Gyrolab-based method for the Drug Tolerance parameter, in order to obtain a method that is resistant to the immune response inhibitor present in patients' sera - residual amounts of the persistent drug MabionCD20. In addition to this, the magnetic bead-based ADA isolation technique developed during the PhD thesis was automated and transferred from the scale of a single Eppendorf-type tube to a high-throughput room based on deep-well plates. This step went well beyond the work planned at the project writing stage.

Ms Eliza presented some of the results of her thesis at the International Gyrolab Technology Conference held on 14-15 June in Dublin, during a presentation entitled „Immunogenicity assessment of biosimilar – from challenges to solutions”.

On the basis of the documentation that has been provided, the committee rates the level of implementation of the individual research plan and the advancement of the schedule for the preparation of the dissertation of PhD student Eliza Kęsa-Siwik very highly. The research problem has been formulated, the methodology properly chosen and applied. The quality of implemented tasks is high. The results were presented by the PhD student at an international conference, which confirms her commitment and constitutes an important element of scientific activity. Despite the fact that the scope of the conducted research seems to be broader than originally planned, the implementation of the study is proceeding according to schedule and anticipates the submission of the dissertation within the assumed deadline. The results obtained so far are innovative and constitute a real contribution to the development of the scientific field represented by the doctoral student.

**Opinia dotycząca jakości opieki naukowej i wsparcia w prowadzeniu  
działalności naukowej**  
**/ Opinion concerning scientific guidance and support in conducting  
scientific activities**

Promotor / Supervisor <b>prof. dr hab. n. med. Agata Sakowicz</b>
<b>BARDZO DOBRA/VERY GOOD</b>

**Ocena prezentacji osiągnięć doktoranta i dyskusja naukowa**  
**/ Assessment of Presentation of Achievements and scientific discussion**

<b>ELIZA KĘSY-SIWIK</b> Prezentacja osiągnięć i dyskusja naukowa / Presentation of Achievements and scientific discussion	Ocena / Assesment
Prezentacja osiągnięć doktoranta / PhD student's Presentation of Achievements	<b>BARDZO DOBRA/<del>DOBRA/</del> <del>DOSTATECZNA/NEGATYWNA*</del> VERY GOOD/<del>GOOD/</del> SATISFACTORY/<del>UNSATISFACTORY</del> *</b>
Dyskusja naukowa / Scientific discussion	<b>BARDZO DOBRA/<del>DOBRA/</del> <del>DOSTATECZNA/NEGATYWNA*</del> VERY GOOD/<del>GOOD/</del> SATISFACTORY/<del>UNSATISFACTORY</del> *</b>

\* niepotrzebne skreślić/ delete as appropriate