

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Jana Barczyńskiego pt.:
„Produkcja, oczyszczanie i analiza potencjału przeciwnowotworowego przeciwciał
bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezotelina x PD-L1”

*Recenzję opracowano w nawiązaniu do pisma Przewodniczącego Rady Dyscypliny
Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 13.12.2024*

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Bielawski

Nie ulega wątpliwości, że nowe rozwiązania umożliwiające skuteczną walkę z chorobami nowotworowymi wciąż stanowią dla przemysłu farmaceutycznego ogromne wyzwanie. Wspomniane przez Autora rozprawy, sukcesy przeciwciał monoklonalnych ukierunkowanych na immunologiczne punkty kontrolne nadal nie rozwiązują problemu. Choć dokonały przełomu w przypadku wielu chorób nowotworowych to wciąż znaczna część pacjentów nie odpowiada na tego typu terapie pozytywnie w perspektywie długoterminowej. Jedną z przyczyn tego stanu jest szeroka gama metod „ucieczki” nowotworu poprzez rozwój oporności. Rozwój oporności może w tym wypadku stanowić odpowiedź zarówno na bezpośrednią interakcję z cząsteczką leku jak i indukowany przez nią mechanizm - immunoterapię. Jednym z wielu lecz niezwykle ważnym mechanizmem rozwoju oporności tkanki nowotworowej na terapię przeciwciałami monoklonalnymi (mAb) jest zmiana profilu ekspresji krytycznych dla fizjologii tkanki nowotworowej receptorów błonowych. Jest to nie tylko mechanizm lecz również cecha tkanki nowotworowej, która w efekcie wpływa na zróżnicowanie ekspresji zarówno w obrębie jednej zmiany jak i w obrębie przerzutów u tego samego pacjenta. W praktyce oznacza to często bardzo dużą zmienność wyniku prowadzonej terapii, trudności w dostosowaniu metod diagnostyki towarzyszącej, oraz znaczny odsetek pacjentów odpowiadających pozytywnie tylko w początkowej fazie leczenia lub wcale.

Strategia tkanki nowotworowej polegająca na zmianie profilu ekspresji receptorów kluczowych dla fizjologii tkanki w kontekście interakcji z immunologicznymi punktami kontrolnymi może więc mieć kluczowy wpływ na powodzenie terapii.

W chwili obecnej wiemy coraz więcej o tym które cele w tkance nowotworowej mogą być krytyczne w sensie powodzenia terapii. Stąd próby tworzenia przeciwciał bispecyficznych ukierunkowanych na dwa cele są wyjątkowo trafnym odzwierciedleniem takiego podejścia. Należy przy tym zauważyć, że tworzenie projektów przeciwciał bispecyficznych wymaga dużego doświadczenia i umiejętności którymi wciąż może pochwalić się niewiele ośrodków. Dowodem tego jest nadal niewielka liczba publikacji dotyczących tego zagadnienia (NCBI 2025, słowa kluczowe „bispecific antibody” AND „cancer”). Należy również zauważyć, że zainteresowanie tematyką stosowania przeciwciał bispecyficznych w terapii chorób nowotworowych rośnie w ogromnym tempie. W ciągu ostatnich 12 lat liczba publikacji w tym zakresie wzrosła około 10 krotnie (NCBI, 2024).

Biorąc pod uwagę powyższe, wybór tematyki pracy doktorskiej dotyczący produkcji, oczyszczanie i analizy potencjału przeciwnowotworowego przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i mezotelina x PD-L1 uważam za uzasadniony. Zadania badawcze które zaplanował Autor są aktualne, nawiązują do najnowszych trendów i potrzeb. Efekt przeprowadzonych badań ma również niepodważalny potencjał aplikacyjny.

Oceniana rozprawa ma 138 stron maszynopisu w którym w kolejności, można wyróżnić stronę tytułową, podziękowania, spis treści, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, wykaz skrótów stosowanych w pracy, wstęp, cel, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, bibliografię, spis rycin oraz spis tabel. W tekście umieszczono również informację o tym, że rozprawa doktorska została przygotowana w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy, współfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr projektu DWD/4/54/2020).

Spis treści zawiera wszystkie elementy pracy i pozwala na odszukiwanie poszczególnych fragmentów opracowania. Wykaz skrótów zawiera większość stosowanych w pracy skrótów i akronimów, ułatwia zrozumienie tekstu. Większość wyjaśnień skrótów przywołano w języku angielskim, jednak część w języku polskim. Wykaz tabel i rycin umieszczono pod koniec rozprawy. Zawiera wszystkie niezbędne informacje, drobne potknięcia edycyjne nie umniejszają jego jakości (ryc. 31 aty-mezotelina zamiast „anty”, brak konsekwencji w stosowaniu znaków interpunkcyjnych).

Streszczenie w języku polskim oraz angielskim doskonale opisuje zakres przeprowadzonych prac ich cel oraz konkluzje. W kilku miejscach treści streszczenia zdania wymagają korekty np.: „został zidentyfikowany jako źródło ucieczki ” tu mowa jest o mechanizmie czyli raczej „zidentyfikowany jako element mechanizmu ucieczki” oporności etc.. Podobnie „Przeciwciała Mezetelina x PD-L1 promowały skuteczniejszą odpowiedź przeciwnowotworową” proponowałbym prościej „efekt działania przeciwciał prowadził do zwiększenia odpowiedzi” narastania odpowiedzi etc.. Drobne błędy stylistyczne nie wpływają jednak na wartość przekazu budowaną przez Autora rozprawy.

Wstęp stanowi obszerny element pracy. Tekst wstępu jest detaliczny i napisany z zastosowaniem fachowej terminologii. Umożliwia zaznajomienie się z obecnym stanem wiedzy na temat immunoterapii z zastosowaniem terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych. Autor rozprawy zwraca uwagę na to, że rozwój immunoterapii zmienił paradygmaty leczenia chorób nowotworowych. Oczekiwaniem wobec immunoterapii było stworzenie skutecznych i mniej toksycznych terapii. Trzeba tu jednak dodać, że znanych obecnie immunologicznych punktów kontrolnych jest co najmniej kilkadziesiąt. Wchodzą one w złożone interakcje ze znacznie większą liczbą ligandów których części nadal nie znamy. Białka te funkcjonują w większości w formach rozpuszczalnych i błonowych. Wpływają na wzór ekspresji również między sobą. Tylko ten poziom złożoności nadal nie zagwarantował pełnego sukcesu inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych (ICI). Wiemy też, że są to terapie „selektywne” ale wyłącznie w sensie interakcji z ściśle określonym celem molekularnym. Jednak zupełnie nieselektywne w sensie wywoływanego efektu farmakodynamicznego i idącego za tym bardzo szerokiego panelu działań niepożądanych (ADR). Niestety szeroki zakres ADR często wyklucza pacjentów z długoterminowej terapii ICI.

Pisząc o „tradycyjnych metodach”, takich jak chemioterapia i radioterapia, należałoby dodać, że trudno nadal mówić o powodzeniu jakichkolwiek monoterapii w farmakoterapii chorób nowotworowych. Dotyczy to również ICI i nie świadczy to bynajmniej o tym, że nie są one właściwym podejściem lecz o tym, że wciąż odkrywane są mechanizmy, które mogą być wykorzystywane w potencjalizowaniu odpowiedzi na ICI a związane są właśnie z „tradycyjnymi” metodami.

W pierwszych podrozdziałach wstępu Autor doskonale wprowadza w niezwykły świat potencjalnych rozwiązań w zakresie terapii nowotworów w kontekście roli immunologicznych punktów kontrolnych. Niezwykle cennym wkładem w tym elemencie opracowania są

wyjaśnienia dotyczące luk, źródeł niepowodzenia w terapii oraz mechanizmów wykluczających pacjenta z terapii. W zwarty interesujący sposób opisano również kwestie strukturalne dotyczące mAb oraz różnego typu przeciwciał bispecyficznych. Tekstem wstępu Autor jeszcze raz podkreślił swobodę z jaką porusza się w przedstawianych zagadnieniach. Nieco więcej miejsca poświęcono informacjom dotyczącym ROR-1, PD-1, PD-L1 oraz mezotelinie. Wprowadzając w temat Autor przywołuje szeroki panel publikacji z kilku ostatnich lat ponownie wskazując na dynamikę badań w zakresie związanym z badaniami które przeprowadził. W tekście Doktorant swobodnie porusza się w zagadnieniach stojących pomiędzy wiedzą związaną ze strukturą przeciwciała, biologią komórki, fizjologią tkanki nowotworowej i potencjałem klinicznym przywoływanych przykładów.

W kilku miejscach słusznie zwraca uwagę na to, że z uwagi na bardzo wysoką ekspresję niektórych białek w tkance nowotworowej i bardzo niską w pozostałych tkankach wybrano je na potencjalne cele terapii przeciwnowotworowej. Należałoby jednak przy tym dodać, że filozofia ta stosowana do mAb niestety kopiuje podejście do farmakokinetyki oraz farmakoterapii klasycznymi lekami niskocząsteczkowymi gdzie kluczowe są ilości i stężenia (SHAM – slopes highest amounts & moments). Dzisiaj wiadomo, że poziom (wysoki poziom) ekspresji nie jest związany liniowo z efektem farmakodynamicznym mAb. Mało tego, często właśnie niższa ekspresja celu może dawać większy efekt prowadzonej immunoterapii. Dotyczy to zarówno wartości takich jak liczba komórek wykazujących ekspresję celu w tkance nowotworowej ale nawet liczby cząsteczek białka na powierzchni komórki. Nieliniowość w stosunku do oczekiwanego efektu jest w tym wypadku znaczna.

We wstępie Doktorant przywołał grafiki w postaci schematów oraz tabel. Zastosowano także bardzo bogaty materiał referencyjny. Materiał wstępu zdecydowanie intryguje i zachęca do dalszych części lektury. Wprowadza w niezwykły świat, immunofarmakologii wyjaśniając podstawowe cele i kierunki immunoterapii nowotworów. Tekst dowodzi doskonałego zorientowania Autora w bieżących kierunkach badawczych oraz technologiach związanych z projektowaniem oraz wytwarzaniem terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych .

Cele rozprawy opisano w 8 podpunktach. Detalicznie lecz również w jednoznaczny i precyzyjny sposób opisano zakres proponowanych prac. Cele rozprawy zostały przedstawione w sposób zrozumiały umożliwiającą analizę dalszych części tekstu.

W rozdziale materiały i metody Autor przywołał informację o wszystkich materiałach zastosowanych do przeprowadzenia prac laboratoryjnych na różnych etapach badań. W

metodach Doktorant odniósł się w szczególności do kolejnych etapów prac. W detalach opisano projekt i format proponowanych przeciwciał. Co niezwykle istotne w pracy wielokrotnie zastosowano tabele, grafiki i ryciny które znakomicie ułatwiają poruszanie się w tekście rozprawy. Również w tym miejscu Autor detalicznie wyjaśnił różnice strukturalne projektowanych przeciwciał oraz schematy odpowiednich konstruktów genetycznych tworząc odpowiednie grafiki. Z uwagi na wcześniej wyznaczone cele metodyka rozprawy jest niezwykle obszerna. Wymagała opisu w 22 podrozdziałach opisujących kolejne kroki w prowadzonych pracach badawczych. Autor przywołał ogromną ilość informacji która w efekcie pozwala na prześledzenie krok po kroku zakres wykonanych prac. Cennym uzupełnieniem byłoby schematyczne przedstawienie kolejności poszczególnych kroków – procesu.

W tak szerokim panelu opisanych zadań nie trudno o drobne potknięcia edycyjne np.: „które te przeciwciała mają wiązać. Sekwencje aminokwasowe” prawdopodobnie „które to przeciwciała mają wiązać sekwencje ...”, „Komórki E. coli” nazwy łacińskie zawsze zapisujemy kursywą, „hodowlę prowadzono przez noc” w takim wypadku w pracy naukowej podajemy liczbę godzin, „Dzień przed planowanym eksperymentem”, podobnie jak w poprzednim zapisie, „bufor równoważący: 20 mM NaHPO₄” 4 w indeksie dolnym, Tabela 33 i 34, nagle zmieniono format tabel, „ACQUITY UPLC Protein BEH SEC” ten zapis nie pozwala na identyfikację kolumny brakuje wielu dodatkowych informacji, „genetycyna + 200 µg/mL higromycyna + 1 mM Sodium Pyruvate” zdecydowanie pirogronian sodu zamiast sodium pyruvate.

Podsumowując rozdział materiały i metody, w prawidłowy sposób opisuje zakres prac przeprowadzonych przez Doktoranta. W rozdziale podano niezbędne szczegóły metodyczne. Opis zastosowanych metod jest przejrzysty i zrozumiały. Świadczy o dużym doświadczeniu, oraz samodzielności Doktoranta w zakresie doboru odpowiednich technik i metod badawczych. Metody przedstawione w rozdziale wymagały bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego, oraz dużego zaangażowania ze strony Autora. Rozdział umożliwia prześledzenie kolejnych etapów badań.

W kolejnym rozdziale przytoczono wyniki poczynionych analiz i obserwacji zgodnie z postawionymi w dysertacji celami oraz opisaną wcześniej metodyką. Wyniki zaprezentowane przez Doktoranta przedstawiono w sposób syntetyczny i uporządkowany w dziewięciu podrozdziałach. W rozdziale 8.1 przedstawiono między innymi szczegółowe informacje dotyczące produkcji przejściowej, oczyszczania białek i przeciwciał referencyjnych. Przedstawiono „obrazy żelu” a dokładnie obraz rozdziału w żelu SDS-Page dla białka ROR-1, przeciwciała anty-ROR-1, mezoteliny oraz przeciwciała anty-mezotelina. Ryciny 8-11 ilustrują

również prawidłowe rozdziały chromatograficzne odpowiednich białek. Opis wyniku rozdziału chromatograficznego można uznać za zdawkowy, nie uwzględniono w nim informacji o różnicy w czasie retencji wzorca wobec próbek badanych, nie do końca wiadomo czemu służą umieszczone na chromatogramach linie integracji pików skoro nie przytoczono żadnych danych numerycznych. Dodatkowo kodowanie nazw np. R1_A8 zamiast wprost „anty-mezotelina” trudno uznać za intuicyjne. Przykładem jest rycina 16 na stronie 76 gdzie w opisie znajdujemy między innymi 1 – R2_8_1 warunki redukujące, 2 – R2_8_2 warunki redukujące, 3 – R2_8_1 warunki nieredukujące, 4 – R2_8_2 warunki nieredukujące. Trzeba jednak wrócić do tekstu rozprawy aby odkodować poszczególne nazwy. W podejściu do opisu rycin i stosowanych nazw białek brakuje konsekwencji, np.: na stronie 77 „Rycina 18. Wynik analizy chromatografii wykluczenia dla przeciwciał Mezotelina x PD-L1.” jednak na stronie 80 „Rycina 22. Wynik oczyszczania przeciwciała R2_8_2 na drodze chromatografii powinowactwa”. Wszelkie obiekty graficzne w publikacjach naukowych powinny być „self-explanatory”. Oznacza to że aby w pełni zrozumieć przekaz czytelnik wszelkie informacje wyjaśniające rycinę/tabelę lub wykres powinien znaleźć w tytule, treści oraz podpisie bez konieczności wyszukiwania ich w tekście.

Na stronie 77 tekst począwszy od „Na podstawie powyższych wyników można stwierdzić (...) wskazuje na brak degradacji przeciwciał.” to fragment w który powinien znaleźć się w sekcji wnioski. Kolejny fragment tekstu „W przemyśle farmaceutycznym standardem (...) przystąpiono do produkcji i następnie do oczyszczania z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa.” na tej samej stronie.” to fragment który powinien znaleźć się w sekcji metody. Tytuł podrozdziału 8.3 „Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne wiążą swoje cele molekularne z podobną skutecznością co przeciwciała monospecyficzne.” jest w swojej obecnej formie wnioskiem, nie wynikiem podobnie tytuł podrozdziału 8.4 gdzie wstęp stanowi element metod a nie wyników.

Na kolejnych stronach sekcji wyniki Autor przedstawił charakterystykę krzywych wiązania, oraz wartości EC50, wytworzonych przeciwciał wraz z przeciwciałami referencyjnymi. Przedstawione krzywe w pełni dowodzą oczekiwanej funkcjonalności białek wytworzonych przez Autora rozprawy. Analizy EC50 przeprowadzono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism. Opis modelu jaki opisał Autor w sekcji metody i jaki oferuje program to również cenna informacja i wartość której Autor nie umieścił jednak w rozprawie. Warto pamiętać o tym, że program umożliwia pobranie całej serii wartości numerycznych ilustrujących charakterystykę modelu dla poszczególnych analiz EC50 wraz cechami ilustrującymi poziom dopasowania takich jak AIC etc..

W kolejnych podrozdziałach przedstawiono wyniki inhibicji interakcji PD-1/PD-L1 przez przeciwciała bispecyficzne wyprodukowane w systemie przejściowym oraz wyniki inhibicji interakcji PD-1/PD-L1 przez przeciwciała bispecyficzne wyprodukowane w systemie przejściowym oraz w stabilnych liniach komórkowych, w odniesieniu do przeciwciała monospecyficznego anty-PD-L1. Potwierdzono poziom ekspresji celów molekularnych na nowotworowych liniach komórkowych wykorzystanych w pracach badawczych. Za niezwykle obiecujące należy uznać wyniki ilustrujące poziom lizy komórek nowotworowych trzustki w obecności komórek PBMC, w obecności zaprojektowanych przez Autora przeciwciał bispecyficznych i kombinacji przeciwciał monospecyficzných. Podobnie w przypadku wyników poziomu lizy komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i raka piersi (BT20). Potwierdzono również zależność między efektem wywoływanym przez zaprojektowane przeciwciała bispecyficzne a stężeniem. W rozprawie pojawia się termin „Skuteczność przeciwciał bispecyficznych ...” należy tu dodać że analiza zależności między efektem a stężeniem które przeprowadzono to typowe badanie farmakodynamiczne. Na takim etapie badań (*in vitro*, *ex vivo* etc.) można analizować jedynie „efekt” (ang.: effect) nie skuteczność (ang.: efficacy). Analiza skuteczności zarezerwowana jest raczej dla fazy klinicznej.

Na tym etapie prac potwierdzono typowe dla terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych nieliniowe zależności pomiędzy efektem a stężeniem. Wreszcie, potwierdzono istotne zmiany w produkcji cytokin prozapalnych w ko-kulturach komórek PBMC i komórek nowotworowych endometrium macicy (RL95-2) i trzustki (Panc1) z dodatkiem zaprojektowanych przeciwciał bispecyficznych. Przedstawiono również wyniki analizy wpływu wytworzonych przeciwciał na subpopulacje limfocytów CD4, CD25, CD127 i FoxP3

W bardzo wielu miejscach sekcji wyniki umieszczono w tekście wnioski płynące z poczynionych obserwacji. W sekcji wyniki znalazły się również elementy metodyczne które należałoby przenieść do wcześniejszych podrozdziałów. Mimo drobnych niedociągnięć natury formalnej bardzo wysoko oceniam ten fragment pracy. W pełni odpowiada założeniom i treści wcześniejszych równie rozbudowanych sekcji. Autor umiejętnie i w przekonujący sposób przywołał zebrane wyniki w postaci wielu tabel danych numerycznych, rozdziałów chromatograficznych oraz licznych wykresów.

W sekcji dyskusja nie dziwi swobodny styl i lekkie pióro Autora który biegle porusza się w tematyce rozprawy. Doktorant formą i zakresem dyskusji podobnie jak i całej rozprawy dowodzi, że nie jest jedynie „technikiem” wyspecjalizowanym w bardzo wąskim przedziale,

lecz naukowcem gotowym do rozwiązywania kompleksowych zadań. Już w pierwszych słowach dyskusji odnosi się do celu stworzonych kombinacji w perspektywie potrzeb klinicznych co dowodzi aplikacyjnego ukierunkowania prowadzonych badań. Przechodzi następnie do kwestii operacyjnych związanych z potencjalnymi zagrożeniami związanymi z wytwarzaniem w skali produkcyjnej i obecną wydajnością procesu. Wyciąga również daleko idące, lecz właściwe wnioski dotyczące ewentualnych ryzyk związanych ze stabilnością wytworzonych białek. W dyskusji ponownie dowodzi słuszności tezy o braku różnic w wiązaniu celów molekularnych: pomiędzy tymi samymi przeciwciałami różnych klas; pomiędzy przeciwciałami bispecyficznymi wyprodukowanymi w różnych systemach ekspresji; pomiędzy przeciwciałami bispecyficznymi i referencyjnymi przeciwciałami monospecyficznymi. Ponownie podnosi kwestię celowości doboru linii komórkowych do przeprowadzonych eksperymentów. Słusznie przytacza przykład nowotworów trzustki które nadal cechuje przeżywalność na poziomie jednocyfrowym. Trzeba tu dodać, że do tej pory ponad 30 różnych przeciwciał monoklonalnych testowanych w fazie badań klinicznych u chorych na nowotwory trzustki, nie dało żadnych pozytywnych rezultatów klinicznych (dane na rok 2024). Tylko ten jeden fakt potwierdza jak bardzo potrzebna jest całkowita zmiana podejścia, oraz zmiana filozofii terapii tak opornych form nowotworów. W ten najnowocześniejszy trend poszukiwań, rozprawa doktorska mgr Jana Barczyńskiego wpisuje się doskonale.

Autor podnosi w dyskusji kwestie przewagi jednoczesnej blokady ROR-1 i PD-L1 oraz mezoteliny i PD-L1 poprzez zastosowanie przeciwciał bispecyficznych nad kombinacją przeciwciał monospecyficznych. W jednym z akapitów podkreślono brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji wykorzystywanych celów molekularnych a efektem cytotoksycznym komórek PBMC w obecności przeciwciał. Dalej stwierdzono że pomimo wysokiej ekspresji ROR-1 na powierzchni komórek Panc1 liza tych komórek była na dość niskim poziomie. Jednocześnie efekt cytotoksyczny dla linii RL95-2 był stosunkowo silny, pomimo niewielkiej ilości zarówno ROR-1 jak i mezoteliny. Podobne zależności obserwowano dla przeciwciał monoklonalnych monospecyficznych stosowanych w terapii od wielu lat. Obserwacje poczynione przez Doktoranta są zdecydowanie zgodne z nieliniową, typową dla terapeutycznych przeciwciał monoklonalnych charakterystyką farmakodynamiczną, a dokładnie, chciałoby się rzec, immunofarmakodynamiczną. Dyskusja istotnego fragmentu badań która wiąże kwestie formatu, struktury IgG1 versus IgG4 oraz wpływu na produkcję cytokin oraz potencjału poszczególnych białek, jest niezwykle trafna. Po raz kolejny dowodzi biegłości Doktoranta w analizowanej tematyce. Należy tu dodać że w całej dyskusji z ogromną

swobodą, a przy tym celnie, posługuje się dobrze dobranym piśmiennictwem fachowym. Dyskusja wpływu wytworzonych białek w odniesieniu do poszczególnych subpopulacji komórek immunokompetentnych to niezwykle praktyczny odnośnik nie tylko do procesu immunoterapii *per se* ale również do kwestii wpływu na przemodelowanie mikro-środowiska tkanki nowotworowej *in vivo*. Zaprezentowana dyskusja zachęca do zgłębiania opisywanej tematyki. Autor trudne i złożone zależności komunikuje w sposób przejrzysty i jednoznaczny. Wyciąga właściwe wnioski. Zwraca również uwagę na potencjalne luki. Ostatni akapit dyskusji to podsumowanie które w zwięzły i rzeczowy sposób opisuje kluczowe wątki przeprowadzonych badań. Wnioski z wykonanych badań sprecyzowano w 10 osobnych punktach. Postawione stwierdzenia są przejrzyste i odpowiadają wyznaczonym wcześniej celom.

Ostatni rozdział dysertacji to bibliografia. Doktorant zestawil interesujące pozycje piśmiennictwa, do których umiejętnie odwołuje się w rozprawie. Poruszane w rozprawie zagadnienia zostały poparte odpowiednio dobranym piśmiennictwem, które koresponduje z podjętą tematyką badawczą. Spis piśmiennictwa został przygotowany z użyciem jednolitego stylu. Zawiera 205 pozycji z których znakomita większość, stanowią oryginalne prace badawcze. Zakres zebranego piśmiennictwa świadczy o tym, że Autor dokładnie zapoznał się z obecnym stanem wiedzy związanym z tematyką rozprawy.

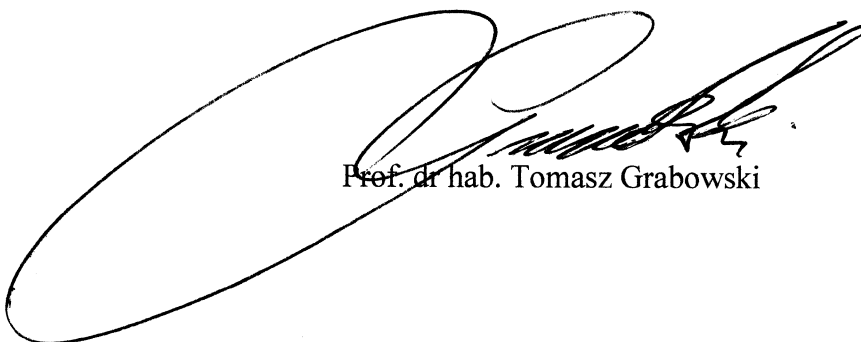
Przedłożona do recenzji rozprawa napisana jest fachowym językiem. Doktorant wykazał się samodzielnością i odpowiednim przygotowaniem merytorycznym. Dysertacja jest niezwykle inspirującym opracowaniem skłaniającym do postawienia kilku pytań:

1. Czy biorąc pod uwagę wpływ różnic struktury IgG1 oraz IgG4 wykorzystanych w projektowaniu przeciwciał bispecyficznych na obserwowane efekty, zasadne byłoby również zweryfikowanie potencjału elementów struktury IgA?
2. Jaka jest predykcyjność badań farmakodynamicznych na liniach komórkowych choćby w kontekście różnic profilu ekspresji immunologicznych punktów kontrolnych: linie *versus* profil ekspresji próbek pobranych od pacjentów (np. PDX *versus* TCGA).
3. Jakie są główne powody niskiej predykcyjności modeli przedklinicznych i w konsekwencji wciąż wyjątkowo niskiej wartości „succes rate” dla kandydatów na nowe terapeutyczne przeciwciała monoklonalne stosowane w chorobach nowotworowych.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa mgr Jana Barczyńskiego spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk. Wyniki przedstawionych badań stanowią nowatorskie osiągnięcie Doktoranta. Założone cele badawcze zostały w pełni osiągnięte. Wyniki prowadzonych prac poddano analizie porównawczej i statystycznej w sposób zgodny z zasadami. Zakres badań oraz podejście do rozwiązania problemu i realizacji celów podjętych przez Doktoranta jest kompleksowy, ma duże znaczenie poznawcze oraz wysoki potencjał aplikacyjny. Maszynopis pracy został przejrzyście, a tekst napisano fachowym językiem, z dbałością o detale. Doktorant wykazał się umiejętnością korzystania z literatury fachowej, opanował złożone techniki i metody badawcze. Efekt prowadzonych badań pozwala na implementację do wczesnej fazy przedklinicznej rozwoju kandydata na lek.

Przytoczone wyżej uwagi, głównie natury porządkującej lub redakcyjnej, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. Dlatego uważam, że przedłożona do recenzji **rozprawa doktorska, mgr Jana Barczyńskiego pt.: „Produkcja, oczyszczanie i analiza potencjału przeciwnowotworowego przeciwciał bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezotelina x PD-L1”** w pełni odpowiada warunkom ujętym w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz.742 z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę, przedkładam Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Jana Barczyńskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk.



Prof. dr hab. Tomasz Grabowski