



Warszawa, dn. 10 luty 2025 r.

dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. uczelni  
Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Warszawska

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Jana Barczyńskiego zatytułowanej  
„Produkcja, oczyszczanie i analiza potencjału przeciwnowotworowego przeciwciał  
bispecyficznych ROR-1 x PD-L1 i Mezetelina x PD-L1”**

Recenzowana rozprawa doktorska mgr Jana Barczyńskiego została przygotowana pod opieką promotora prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego z Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, a zrealizowana w firmie Recepton Sp. z o.o. pod opieką naukową dr Tomasza Sitara, w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy, współfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr projektu DWD/4/54/2020).

Nadrzędnym celem pracy było otrzymanie w dwóch różnych formatach czterech symetrycznych bispecyficznych przeciwciał ROR-1 x PD-L1 i mezetelina x PD-L1 zarówno w liniach komórkowych służących ich produkcji przejściowej, jak też w stabilnych liniach komórkowych oraz zbadanie ich właściwości. Celem dodatkowym było m.in. otrzymanie trzech białek niezbędnych do badań w/w przeciwciał bispecyficznych i trzech przeciwciał monospecyficznych do testów porównawczych. Ponadto za cel postawione zostało określenie wpływu przeciwciał bispecyficznych na indukcję lizy czterech różnych linii nowotworowych przez ludzkie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC), analiza w obecności w/w przeciwciał zmian produkcji cytokin przez kokulturę komórek nowotworowych z komórkami PBMC i



subpopulacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> w kokulturze z komórkami nowotworowymi. Nie mam wątpliwości, że zakres tematyczny niniejszej pracy i jej cele są niezwykle ważne i wartościowe.

Choroby nowotworowe to jedno z największych wyzwań zdrowotnych na świecie. Każdego roku diagnozuje się miliony nowych przypadków, a rak pozostaje jedną z głównych przyczyn zgonów, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Przyczyny zachorowań są różnorodne – obejmują czynniki genetyczne, środowiskowe, styl życia oraz starzenie się populacji. Postęp w diagnostyce i leczeniu, w tym terapie celowane i immunoterapia, daje coraz większe szanse na skuteczne leczenie. Immunoterapia jest nowoczesną metodą leczenia nowotworów wykorzystującą układ odpornościowy do ich zwalczania. W odróżnieniu od chemioterapii czy radioterapii, immunoterapia nie niszczy bezpośrednio komórek nowotworowych, lecz stymuluje organizm do ich zwalczania. Jednym z najnowszych osiągnięć immunoterapii są przeciwciała bispecyficzne, które potrafią jednocześnie wiązać dwa różne antygeny, skutecznie stymulując układ odpornościowy do walki z nowotworem. Tematyka badawcza niniejszej dysertacji dotyczy otrzymania i gruntowego zbadania *in vitro* czterech przeciwciał bispecyficznych, wpisując się w najnowsze trendy współczesnych badań, a jej owoce mogą stanowić cenny wkład w rozwój nauki i przyczynić się do powstania skutecznych biofarmaceutyków przeciwnowotworowych.

Rozprawa doktorska mgr Jana Barczyńskiego, napisana w języku polskim, obejmuje 136 stron maszynopisu, podzielonych na 13 ponumerowanych rozdziałów, wśród których znajdują się elementy typowe dla tego typu utworów m.in.: spis treści (3 strony), streszczenie w języku polskim i angielskim (2 strony), wykaz stosowanych skrótów (3 strony), wstęp (22 strony), cel pracy (1 strona), opis zastosowanych w pracy materiałów i metod badawczych (34 strony), wyniki badań własnych (32 strony), dyskusję (10 stron). Ponadto praca zawiera wnioski (1 strona), bibliografię zawierającą aż 204 pozycje literaturowe, spis rycin (3 strony) oraz spis tabel (2 strony). Tekst rozprawy doktorskiej został napisany zrozumiałym i poprawnym językiem, jednakże nie jest on wolny od błędów, szczegóły znajdują się w dalszej części recenzji.

Prace eksperymentalne zostały podzielone na dziewięć powiązanych ze sobą tematycznie części. Wszystkie doświadczenia zostały zaplanowane w przemyślany i staranny sposób, a kolejne etapy badań stanowią logiczną konsekwencję uzyskanych wcześniej wyników. Dobór zarówno



metod nadprodukcji, dwustopniowego oczyszczania i charakterystyki molekularnej mono- i bispecyficznych przeciwciał, dokonano w adekwatny do zrealizowania założonych celów sposób, zresztą podobnie jak i pozostałych rekombinowanych białek otrzymanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. W początkowej fazie prac badawczych wyprodukowano białka i przeciwciała referencyjne oraz bispecyficzne w systemie eukariotycznym komórek ludzkich HEK293, wykorzystując w tym celu m.in. chromatografię powinowactwa. Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE uzyskanych preparatów wykazała ich wysoką czystość, a dodatkowe zastosowanie warunków redukcyjnych i nieredukcyjnych w przedmiotowej analizie pozwoliło na potwierdzenie uzyskania funkcjonalnych biomakromolekuł. Zastosowano też chromatografię SEC, która umożliwiła oszacowanie właściwej masy molekularnej i uzyskanie jeszcze wyższej czystości preparatów. Następnie przeprowadzono testy ELISA z wykorzystaniem przeciwciał bispecyficznych, wykazując zdolność wiązania ich celów molekularnych z siłą zbliżoną do parametrów charakterystycznych dla przeciwciał monospecyficznych. W kolejnym eksperymencie dowiedziono, iż przeciwciała bispecyficzne są w stanie hamować ścieżkę sygnalizacyjną PD-1/PD-L1 z podobną intensywnością jak przeciwciała anti-PD-L1. Przed przeprowadzeniem dalszej serii badań z wykorzystaniem czterech różnych nowotworowych linii komórkowych określono poziom ekspresji celów molekularnych (ROR-1, mezotelina, PD-L1), jakie mogą być obecne na ich powierzchni. W innym eksperymencie w celu wstępnej oceny właściwości przeciwnowotworowych otrzymanych biomakromolekuł wykorzystano kokultury komórek linii nowotworowych z komórkami PBMC. Z powodzeniem wykazano wyższą skuteczność lizy komórek nowotworowych w przypadku zastosowania przeciwciał bispecyficznych niż ich podstawowych odpowiedników. Wraz ze wzrostem ich stężenia zwiększał się poziom lizy i w niektórych przypadkach wynosił ponad 80%, jak w przypadku nowotworu trzustki (Panc-1), czy blisko 100% w przypadku nowotworu piersi (BT20). W końcowej części pracy przeprowadzono szczegółową analizę wpływu przeciwciał bispecyficznych na wzrost produkcji cytokin prozapalnych w ludzkich jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej w kokulturze komórek linii nowotworowych zarówno o niskiej (linia RL95-2) jak i wysokiej (linia Panc-1) odporności na immunoterapię. Oznaczono poziom pięciu cytokin (IL-2, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  i Granzym B) produkowanych przez komórki PBMC. Badania wykazały korelację



pomiędzy skutecznością terapii przeciwnowotworowej w warunkach *in vitro* z użyciem przeciwciał bispecyficznych w stosunku do monospecyficznych i zwiększoną produkcją czterech z pięciu cytokin (IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  i Granzym B), przy jednocześnie niższej produkcji interleukiny 2. W ostatnich eksperymentach określono wpływ przeciwciał bispecyficznych na zmiany w subpopulacjach limfocytów T CD4<sup>+</sup> dowodząc, iż dzięki ich obecności następuje istotne zmniejszenie wielkości subpopulacji immunosupresyjnych limfocytów T-regulatorowych (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup> i CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>). Ponadto obecność przeciwciał mezotelina x PD-L1 doprowadza do zwiększenia potencjalnie silnie antynowotworowej subpopulacji limfocytów T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>.

Na zakończenie pracy eksperymentalnej Pan mgr Jan Barczyński podjął się skomentowania uzyskanych wyników w bardzo przemyślanej i dojrzałej naukowej dyskusji. Tę część pracy czyta się z przyjemnością, przy czym można zauważyć rozwój pisarski autora, ponieważ w poprzednich częściach pracy pojawia się wiele błędów językowych, edytorskich i stylistycznych, natomiast w dyskusji są one obecne w minimalnym stopniu. Konstrukcji zdań i ich logice niewiele można zarzucić. Zwykle to dyskusja sprawia najwięcej trudności w pracach naukowych, ale w tym przypadku jest odwrotnie. Doktorant pracę spuentował 10-ciomą najbardziej istotnymi, a zarazem trafnymi wnioskami, prezentującymi esencję jego dokonań.

Podsumowując, Pan mgr Jan Barczyński podjął się dużego wyzwania jakim było otrzymanie trzech rekombinowanych białek referencyjnych i aż siedmiu przeciwciał, w tym czterech bispecyficznych o niespotykanej konfiguracji, które uzyskał w dwóch różnych ssaczyc systemach ekspresyjnych. Określenie ich właściwości fizykochemicznych oraz zbadane aktywności biologicznej było praco- i czasochłonne, zwłaszcza biorąc pod uwagę testowanie ich na tak złożonych układach biologicznych jakimi są ludzkie linie komórkowe, wymagające szczególnej dbałości i wielu pasażów. Zastosowanie bispecyficznych przeciwciał jednocześnie blokujących białka ROR-1 i PD-L1 lub mezotelinę i PD-L1 w celu niszczenia komórek nowotworowych, aż czterech różnych linii, w tym bardzo trudnych terapeutycznie dwóch linii nowotworów trzustki, to niespotykane wręcz bardzo nowatorskie podejście. Zaowocowało ono uzyskaniem niezmiernie obiecujących wyników badań *in*



*vitro*, co pozwoli zapewne firmie Recepton Sp. z o.o. podjąć słuszną decyzję kontynuacji badań na modelach zwierzęcych.

Zamierzone cele zostały osiągnięte, wzbogacając świat nauki w cenne informacje. Uzyskane przez Pana mgr Jana Barczyńskiego wyniki mają dużą wartość poznawczą, ale także aplikacyjną. Z pewnością będą stanowić podwaliny pod dalsze badania *in vivo* polskiego przedsiębiorstwa biotechnologicznego i być może innych grup naukowych, o ile zaprezentowane w recenzowanej pracy wyniki zostaną upublicznione w czasopismach naukowych.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła też wiele pytań i uwag, do których ustosunkowanie się proszę autora:

- a. Nazwy podrozdziałów 8.3-8.9 (włącznie z 8.9.1 i 8.9.2) w spisie treści jak i części eksperymentalnej pracy sformułowano w niefortunny sposób. Przedstawiają one dość obszerne jednozdaniowe wnioski podsumowujące przeprowadzone w nich eksperymenty, zamiast w sposób zwarty sugerować co jest jego zawartością. Np. nazwa podrozdziału 8.3 brzmi „*Wyprodukowane przeciwciała bispecyficzne wiążą swoje cele molekularne z podobną skutecznością co przeciwciała monospecyficzne*”.
- b. W wykazie skrótów większą część z nich wyjaśniono tylko w języku angielskim. Zważyć należy, iż praca napisana jest w języku polskim i dodatkowo należało przetłumaczyć je też na rodzimy język. Ewentualnie dla ujednoczenia wszystkie skrócone nazwy należało zaprezentować w j. angielskim np. IL-2 jako interleukin 2 a nie interleukina 2. Przy okazji warto wspomnieć, że zastosowano pełną dowolność sposobu zapisu nazw: niektóre wyjaśnienia przedstawiano rozpoczynając wszystkie wyrazy wielkimi literami, w innych przypadkach tylko pierwszy wyraz wielką literą, a w jeszcze innych wszystkie wyrazy pisano małymi literami.
- c. Na pierwszej stronie wstępu teoretycznego (s.12) obecnych jest kilka zdań, których styl i zastosowane sformułowania pozostawiają wiele do życzenia. Na szczęście w dalszej części pracy takie sytuacje zdarzają się rzadko. Np. „Skomplikowana sieć komórek i sygnałów układu odpornościowego jest naturalnie zaprojektowana do ochrony organizmu przed infekcjami i nowotworami, ale komórki nowotworowe mogą



*rozwickać zaawansowane metody ukrywania się przed odpowiedzią immunologiczną lub jej tłumienia.”; „Dynamiczny rozwój immunoterapii oznaczał znaczną zmianę paradygmatów leczenia nowotworów, oferując nadzieję na bardziej skuteczne i mniej toksyczne terapie.” W przypadku innych podrozdziałów (s.27) pozwolę przytoczyć choćby następujące zdanie rozpoczynające ostatni akapit: „Wydaje się, że biologiczna istotność białka ROR-1 skupiona jest w fazie rozwoju embrionalnego.” Poprzez zastosowanie podkreślenia recenzent zaznaczył niefortunne sformułowania.*

- d. W przypadku tabeli nr 29 (s.50) ewidentnie przydałaby się dodatkowa kolumna z pełnymi alternatywnymi nazwami przeciwciał stosowanych w pracy, a nie jedynie skrócone ich nazwy, których etiologia jest zupełnie nieznaną. Np. obok nazwy R2\_7\_1 warto byłoby zamieścić nazwę anty-ROR-1/anty-PD-L1 IgG1, co znakomicie ułatwiłoby orientację czytelnikowi związaną z nazewnictwem. Dodatkowo pod tytułem tabeli przydałaby się legenda wyjaśniająca skróty poszczególnych składowych białek i przeciwciał. Np. nigdzie w pracy nie wyjaśniono co oznacza IEGR czy HHHHHH, można jedynie domyślać się.
- e. W tabeli 31 (s.53) nie podano stężeń stosowanych do reakcji trawienia enzymów BamHI, XhoI i DNA plazmidowego. W opisie doświadczenia zamieszczonego pod w/w tabelą zamieszczono jedynie nie do końca jasne zdanie: „*W przypadku rutynowego trawienia restrykcyjnego stosowano 1-2 U/ $\mu$ g DNA.*” Prawdopodobnie autor zastosował od 1 do 2 jednostek enzymu restrykcyjnego (jednego lub obu naraz) na 1  $\mu$ g DNA, ale nie ma pewności. Przy okazji użyto żargonu stosując zwrot pn. „rutynowego trawienia”. Żargonów i niepoprawnych sformułowań w rozdziale dot. Metodyki pracy użyto nad wyraz dużo. Przytoczę jeszcze 2 zdania znajdujące się na tej samej stronie (s.53) stylistycznie wątpliwe i zawierające żargon laboratoryjny: „*Konstrukty genetyczne wycięte z dostarczonych plazmidów do klonowania lub przygotowane poprzez ligację elementów pozyskanych z biblioteki elementów genetycznych (...)*”, czy w innym: „*(...) końcowe stężenie buforu na poziomie 1x*”.
- f. W tabeli 32 (s.54) nie podano stężeń polimerazy i mieszaniny nukleotydów.



- g. W podrozdziale 7.2.10. dot. określania stężenia białek posiadających fragment Fc z wykorzystaniem ultra wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej nie opisano jak przeprowadzono eksperyment i wyliczenia dla krzywej kalibracyjnej i czy dotyczyła ona białek referencyjnych tzw. kalibracyjnych markerów białkowych o znanej masie. Należy też wyjaśnić jak dokonano pomiaru stężeń stosowanych w pracy białek nie zawierających fragmentu Fc.
- h. W podrozdziale 7.2.22 (s.68) nie przedstawiono wszystkich wykorzystywanych programów do prowadzonych badań, a można przypuszczać, że były one stosowane, jak chociażby program do obrazowania i analizy żeli SDS-PAGE, czy stosowany do analizy powierzchni pików w chromatografii cieczowej.
- i. Zastanawiające jest dlaczego w tabeli nr 41 (s.69) nie podano danych dla białka PD-L1 i przeciwciała PD-L1.
- j. Na rycinach nr 6, 7, 12, 15, 16, 23, 24 przedstawiających elektroforezę SDS-PAGE znajdują się 2 różne markery białkowe, o których informacji próżno szukać w opisie żeli, ale i rozdziale dotyczącym Materiałów i Metod. Nie wskazano też jaką procentowość posiadają żele poliakrylamidowe, w w/w rozdziale wskazano, że mogą to być żele 10 lub 12%.
- k. Ryciny 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18 przedstawiają chromatogramy w postaci tzw. zrzutów ekranu, niestety mało czytelnych – użyto czcionki rozmiaru 1 lub 2 i bez oznaczonych osi X i Y. Kolorowe i czarne krzywe nie są w żaden sposób opisane co oznaczają. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku rycin 19, 20, 21, 22, 25, 26 przy czym czcionka jest mniejsza niż 1 i nawet użycie lupy nie pozwala na rozszyfrowanie cyfr i tekstu zamieszczonego na wykresach.
- l. Przy tak dużej ilości otrzymanych białek i przeciwciał warto byłoby sporządzić tabelę zbiorczą z informacjami nt. obliczeniowych (teoretycznych) mas molekularnych białek i rzeczywistych uzyskanych w chromatografii SEC.



- m. W tekście części wynikowej bardzo trudno znaleźć odniesienie do numerów wielu rycin, w tym do zdjęć żeli SDS-PAGE i konkretnych numerów ścieżek jakie powinny być zinterpretowane.
- n. Wyraźnie odczuwalny jest notoryczny brak powoływania się w rozdziale dot. Wyników na zastosowane Materiały i Metody. Jako przykład można wskazać np. jednozdaniowe stwierdzenie przeprowadzenie testu ELISA (s.82), bez odniesienia się do fragmentu pracy, gdzie sposób jego przeprowadzenia został szczegółowo opisany.
- o. Na licznych wykresach (zwłaszcza ryciny 27-32) w większości punktów nie widać odchyień standardowych. Z czego to wynika? W ilu i jakich powtórzeniach wykonano eksperymenty?

Praca doktorska została napisana w sposób zrozumiały i logiczny, niemniej jednak nie uniknięto błędów edycyjnych, stylistycznych i językowych, takich jak brak lub nadmiar spacji (np. s.7, s.28., s.82) czy przecinków (s.14, s.28, s.29) – w kilkudziesięciu miejscach, „literówki” (s.17, s.31, s.77), błędów składniowych i fleksyjnych itp. Zdarzają się też inne drobne niedoskonałości, które przedstawiono poniżej.

- a. Niepoprawne sformułowania:
  - „badania przed-kliniczne” (s. 30) zamiast „badania przedkliniczne”,
  - „nie drobnokomórkowego” (s.30) zamiast „niedrobnokomórkowego”,
  - „badania *in-vitro*” (s.30) zamiast „badania *in vitro*” – pojawia się wielokrotnie,
  - „znacząco podniesiony poziom cytokin” (s.7) zamiast „znacząco podwyższony poziom cytokin”,
  - „ekspresji białek” (s.20) zamiast „ekspresji genów” – pojawia się wielokrotnie,
  - „aminokwasów” (s.27) zamiast „reszt aminokwasowych” – pojawia się wielokrotnie.
  - „gibco” (s.40) zamiast „Gibco”
  - „SDS-Page” (s.55) zamiast „SDS-PAGE” – pojawia się wielokrotnie,
  - „1 mM Sodium Pyruvate” (s.63) zamiast „1 mM pirogronian sodu”





- b. W tabeli 36 i 37 (s.55) zastosowano nazwy anglojęzyczne odczynników „*Acrylamide/N,N'-methylene-bis-acrylamide mix*”
- c. W rozdziale „Materiały i Metody” w wielu kolumnach zamiast słowa „Przedmiot” lepiej byłoby zastosować „Materiał” tak jak ujęto to w tytule rozdziału, zwłaszcza, że takie elementy jak chociażby membrana PVDF, bibuła Western blot, płytki czy folia do płytek, to są typowe materiały, które *de facto* są oczywiście przedmiotami, niemniej jednak w naukowej literaturze określa się je właśnie materiałami.
- d. W tabeli nr 15 (s.41) użyto sformułowania „Płytki 96-dołkowe nietraktowane”, co oznacza słowo „nietraktowane”? Na stronie producenta recenzent nie znalazł takiego określenia, raczej powinno być użyte słowo „hodowlane”.
- e. W kilku miejscach odniesiono się do niewłaściwych numerów podrozdziałów jak chociażby na s.75 powinno być podrozdział 7.2.1 a nie 6.2.1
- f. Niektóre nazwy tabeli, jak chociażby tabeli nr 28, powinny być sformułowane w poprawny sposób, zamiast: „*Źródłowe sekwencje aminokwasowe z których projektowane były konstrukty genetyczne*” powinno być np.: „*Sekwencje aminokwasowe wykorzystane do zaprojektowania konstruktyw genetycznych*”.
- g. Dlaczego w przypadku ryciny nr 32 (s.85) wartości  $EC_{50}$  przedstawiono w wartościach stężeń wagowych, a nie molowych tak jak na pozostałych wykresach?
- h. Co oznacza sformułowanie „stopień wzbudzenia” na osiach Y wykresów zamieszczonych na rycinie nr 34 (s.87)?
- i. Na s. 92 wskazano: „*We wszystkich przypadkach utrzymany został trend wyższej wydajności przeciwciał klasy IgG1 niż IgG4.*” Czy faktycznie słowo „wydajności” jest właściwe?

Powyższe uwagi nie przeczą mojej pozytywnej opinii nt. recenzowanej pracy. Kandydat do stopnia naukowego doktora potrafi umiejętnie sformułować cele badawcze i zaplanować doświadczenia, by je osiągnąć. Ponadto bardzo dobrze umie dobrać i wykorzystać zasoby literaturowe, czego dowodem są cytowania najważniejszych prac w zakresie jego tematyki. Potrafi też posługiwać się we właściwy sposób szeregiem metod eksperymentalnych, uzyskując wymierne



rezultaty, co dowodzi jego dojrzałości naukowej i zasługuje na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Reasumując, doktorant podczas realizacji prac badawczych przedstawionych w dysertacji uzyskał bogaty materiał doświadczalny, a jego praca doktorska wykazuje istotną wartość pod względem poznawczym i aplikacyjnym, a tym samym posiada elementy nowości naukowej.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr Jana Barczyńskiego spełnia wymogi ustawowe (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. **Jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana mgr Jana Barczyńskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego w celu nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.**

dr hab. inż. Marcin Olszewski, prof. uczelni