

Spersonalizowana, liposomowa terapia ostrych białaczek szpikowych (OBS/AML) oparta na małych, inhibitorowych RNA



Rzeczpospolita
Polska



Śląskie.

Unia Europejska
Europejskie Fundusze
Strukturalne i Inwestycyjne



Konsorcjum:

- **ACELLMED – Lider Projektu**
- **ŚLĄSKI PARK TECHNOLOGII MEDYCZNYCH KARDIO-MED SILESIA**

Eksperci w dziedzinie technologii liposomowych, onkologii i hematologii:

- prof. dr hab. Aleksander Franciszek Sikorski – biochemik, specjalista w nanotechnologiach i terapiach celowanych
- prof. dr hab. n. med. Kazimierz Kulickowski – specjalista chorób wewnętrznych, onkolog kliniczny, hematolog, transplantolog
- dr hab. Aleksander Czogalla – specjalista w zakresie biochemii i biofizyki lipidów i błon biologicznych

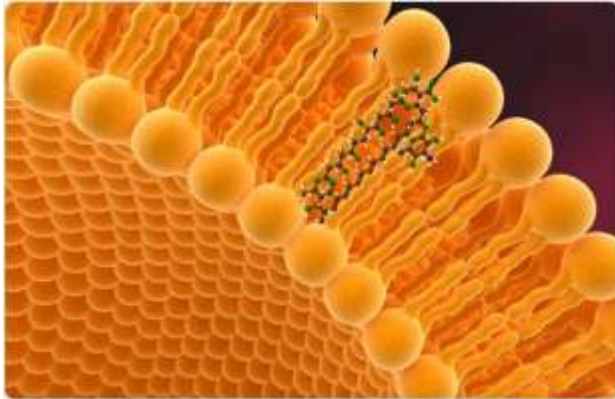
Firma ACELLMED Sp. z o.o. oraz Śląski Park Technologii Medycznych Kardio-Med Silesia nawiązały współpracę na rzecz realizacji projektu dofinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Śląskiego na lata 2014-2020 z działania Oś Priorytetowa I. Nowoczesna Gospodarka Działanie 1.2 Badania, Rozwój i Innowacje w Przedsiębiorstwach.

CEL PROJEKTU – Celem głównym projektu jest opracowanie innowacyjnego leku z zakresu spersonalizowanej, liposomowej terapii ostrej białaczki szpikowej, ostrej białaczki mieloblastycznej, opartego na małych, inhibitorowych RNA, a co za tym idzie wzrost konkurencyjności, dzięki rozwojowi działalności B+R w obszarze nowoczesnych terapii medycznych.

Celem naukowym jest opracowanie skutecznego systemu liposom – kwas nukleinowy – czynnik rozpoznający marker powierzchniowy docelowych komórek, który może być skuteczny w leczeniu nowotworów w monoterapii lub terapii mieszanej z cytostatykami lub inhibitorem BCL-2.

Cele szczególne projektu: Szczegółowym celem projektu jest opracowanie ukierunkowanej, liposomowej postaci miRNA hamującej proliferację komórek nowotworowych charakteryzującej się selektywnością działania, niską nieswoistą cytotoksycznością oraz wysoką wydajnością dostarczania kwasów nukleinowych do komórek nowotworowych, który osobno lub w połączeniu ze standardowo stosowanymi cytostatykami znacząco poprawi efektywność leczenia.

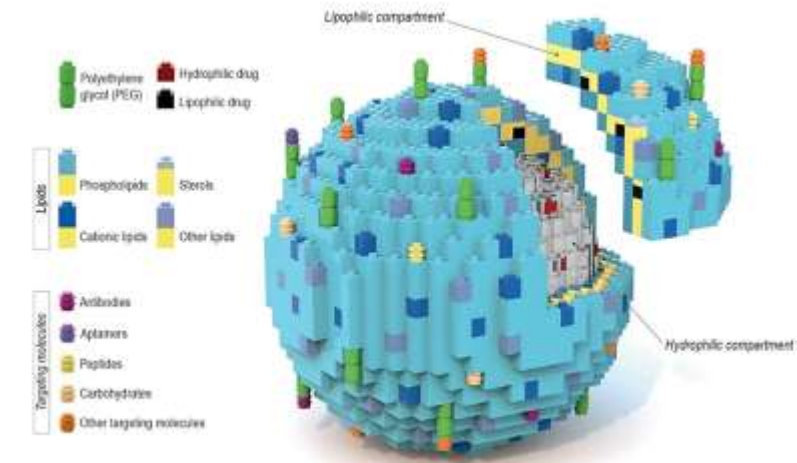
Liposomy jako nośniki leków



- Jedną z głównych zalet stosowania liposomów jako systemu dostarczania leków jest to, że zbudowane są z lipidów polarnych zasadniczo podobnych do naturalnych składników błon komórkowych i charakteryzują się znaczącym poziomem bezpieczeństwa. Ponadto, regulując stopień nasycenia fosfolipidów dwuwarstwy **można modyfikować stopień uwalniania substancji czynnej**. Co więcej, mogą one spełniać wiele funkcji, np. **ograniczając skutki uboczne** czy **zapewniać przedłużony czas przebywania w krążeniu** oraz **możliwość kierowania leków do określonych komórek organizmu**.

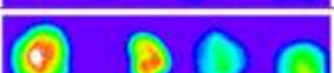
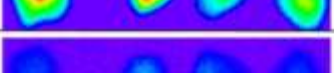
Postęp, w zakresie konstrukcji leku w odniesieniu do obecnego stanu techniki stanowi:

- zastosowanie małych hamujących RNA (m.in. miRNA)
- zastosowanie elementów kierujących w postaci aptamerów/przeciwciał rozpoznających markery powierzchniowe komórek białaczkowych,
- możliwość zastosowania preparatu lub mieszaniny preparatów, w zależności od indywidualnej postaci OBS



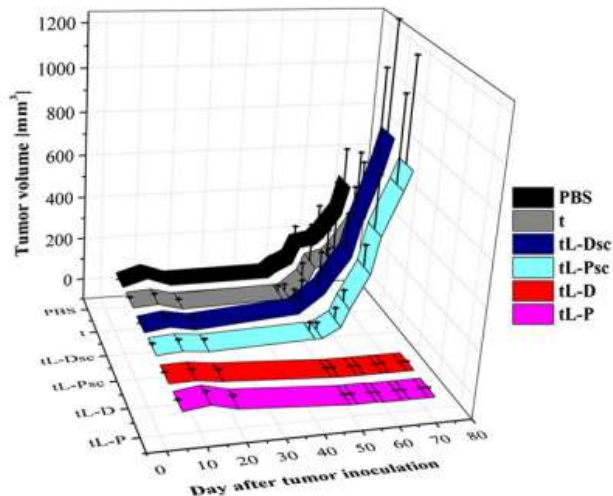
Juszkiewicz et al. IJMS 2020

- Meissner JM, Toporkiewicz M, Czogalla A, Matuszewicz L, Kuliczkowski K, Sikorski AF. Novel antisense therapeutics delivery systems: In vitro and in vivo studies of liposomes targeted with anti-CD20 antibody. J Control Release. 2015, 220, 515–528.
- Wyrozumska P, Meissner J, Toporkiewicz M, Szarawarska M, Kuliczkowski K, Ugorski M, Walasek MA, Sikorski AF. Liposome-coated lipoplex-based carrier for antisense oligonucleotides. Cancer Biol Ther. 2015, 16, 66-76.
- Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, Fiedler J, Schwarzer A, Rouhi A, Heuser M, Wingert S, Bothur S, Döhner K, Mätzig T, Ng M, Reinhardt D, Döhner H, Zwaan CM, van den Heuvel Eibrink M, Heckl D, Fornerod M, Thum T, Humphries RK, Rieger MA, Kuchenbauer F, Klusmann JH. Endogenous Tumor Suppressor microRNA-193b: Therapeutic and Prognostic Value in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2018, 10, 1007-1016.
- Issa H, Bhayadia R, Winkler R, Swart LE, Heckl D, Klusmann JH. Preclinical testing of miRNA-193b-3p mimic in acute myeloid leukemias. Leukemia. 2023, 37, 1583-1587.

Biodystrybucja tL-D i tL-P in vivo	Formulation	DiD fluorescence in tumors after injection	
		4h	24h
	L-D		
	tL-D		
	L-P		
	tL-P		

- Obecność lipidów modyfikowanych PEG poprawia farmakokinetykę i farmakodynamikę liposomów chroniąc preparat przed degradacją enzymatyczną lub działaniem układu immunologicznego.
- W eksperymentach wykazano dłuższy czas krążenia formacji liposomowych zawierających PEG, co wspiera efekt skutecznego i swobodnego wiązania do komórek docelowych (i akumulacji preparatu leku w indukowanym guzie nowotworowym)

Skuteczność preparatów
liposomowych tL-D i tL-P
in vivo



- Dane wskazują na silne działanie ukierunkowanych preparatów terapeutycznych, które zapobiegają rozwojowi nowotworu w warunkach in vivo (w odniesieniu do formacji kontrolnych)

J.M. Meissner et al. / Journal of Controlled Release (2015)

Uzyskane Wyniki w Projekcie

Strategia realizacji

Ocena aktywności inhibitorowej RNAi

miRNA:
-193b
-203a

siRNA:
-GAPDH
-KRAS(3)
-FLT3(3)
-C-KIT(3)

- lipofekcja
- elektroporacja
- nośnik (LNP)

Konstrukcje liposomowe

oparte na:

- kompleksie RNA-PEI
- lipidzie kationowy – DOTAP
- lipidzie jonizowalnym – DC-cholesterol

Czynnik kierujący

- aptamery
- przeciwciało

Aktywność transfekcyjna

- przyłączenie przeciwciała
- przyłączenie aptameru CD33
- selektywne wiązanie do komórek

Badania na zwierzętach

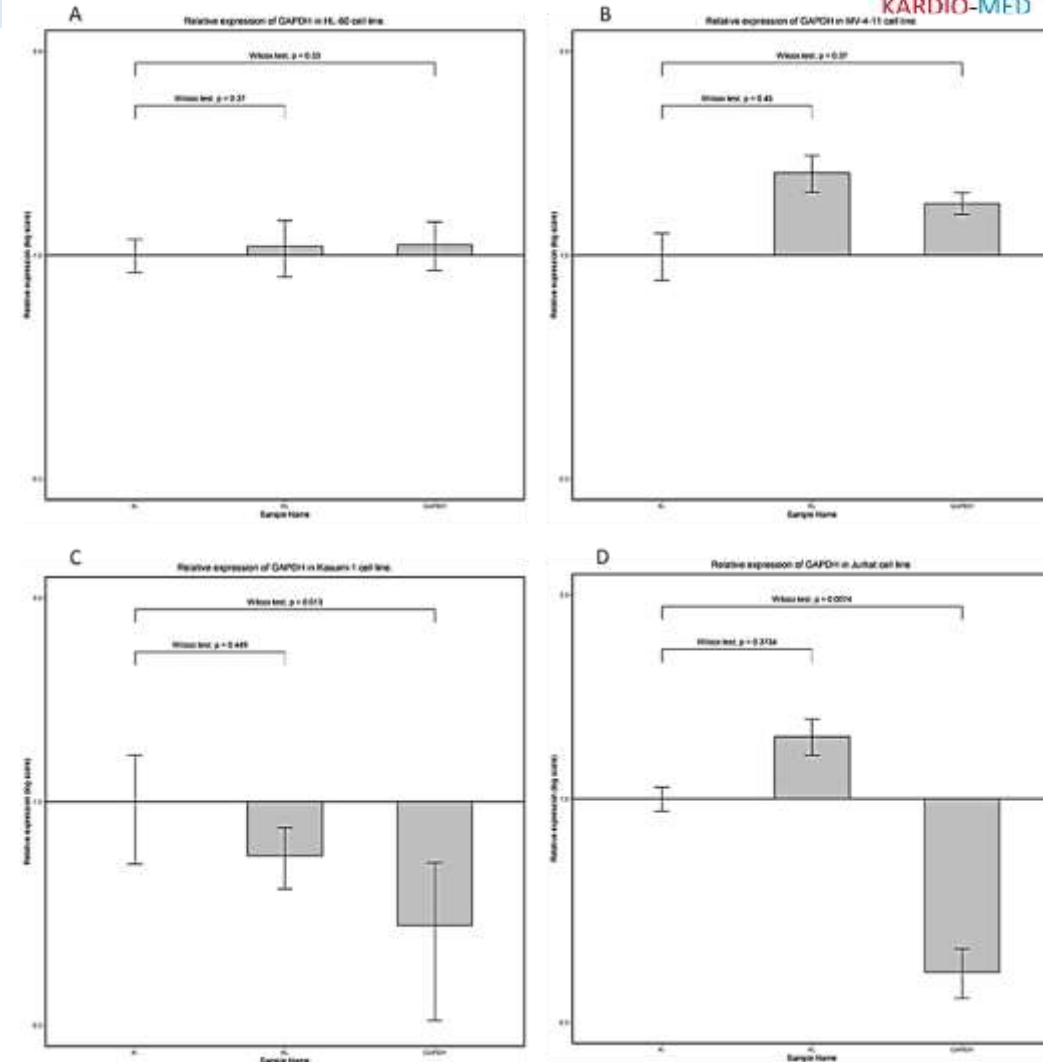
Przeprowadzono prace związane z transfekcją komórek linii białaczkowych cząsteczkami miRNA193b. Efekt lipofekcji określano na podstawie testów żywotności oraz morfologii komórek. Nie stwierdzono transfekcji.



potwierdzenie z wykorzystaniem kontroli pozytywnej

- Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (#13778075, Invitrogen)
- siRNA (Silencer™ Select GAPDH Positive Control siRNA, #4390849, Invitrogen)

Dla większości analizowanych linii OBS/AML stwierdzono niedostateczną transfekcję (lipofekcja), aby prawidłowo określić hamujący wpływ siRNA/miRNA na wzrost i proliferację komórek.



Ocena poziomu ekspresji GAPDH dla komórek linii HL60, MV4-11, Kasumi oraz Jurkat. K- - kontrola negatywna (brak czynnika transfekcyjnego oraz RNA); KL – kontrola transfekcji (czynnik transfekcyjny, brak RNA); GAPDH – próba badana (czynnik transfekcyjny oraz RNA). Do określenia zmian relatywnych zmian na poziomie ekspresji wykorzystano metodę $\Delta\Delta CT$

Elektroporacja z wykorzystaniem miRNA 193b-3P – brak efektu. Badania uzupełniono o badania ekspresji CCND1 oraz k-RAS. Nie stwierdzono transfekcji i zmian na poziomie transkryptomu.

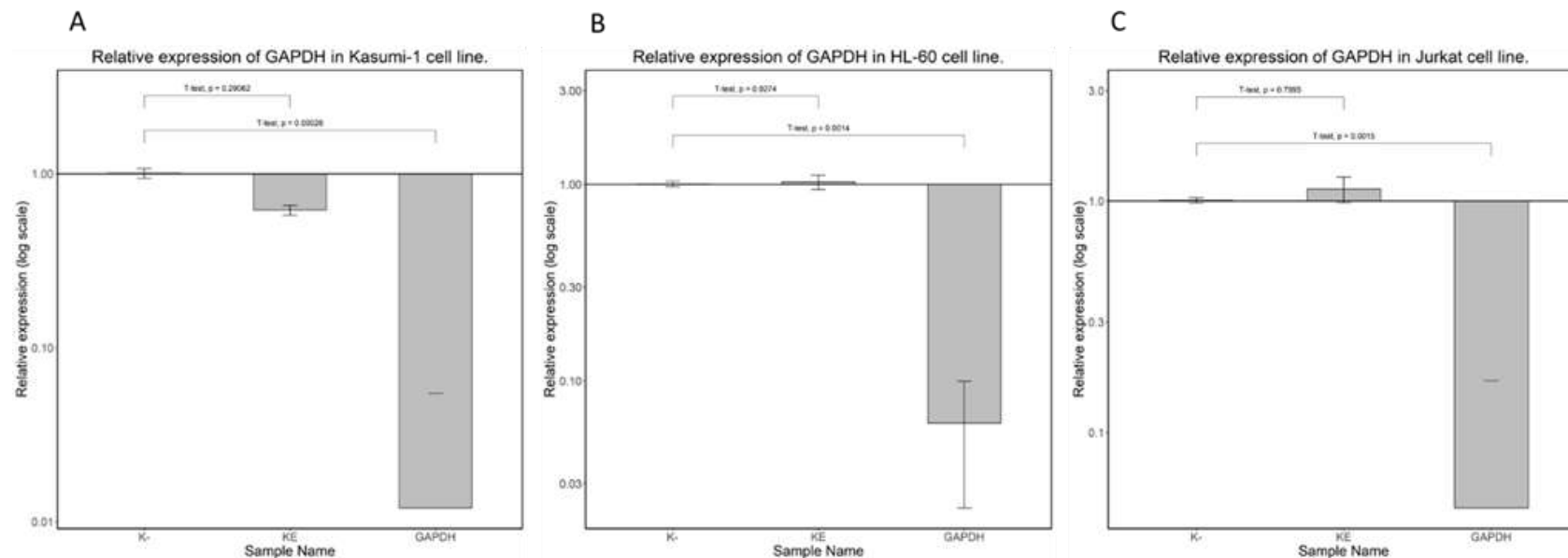


- System do elektroporacji (Neon™ Transfection System; nr kat. MPK5000; Invitrogen)
- siRNA (Silencer™ Select GAPDH Positive Control siRNA, #4390849, Invitrogen)

Na podstawie przedstawionych wyników należy stwierdzić, że we wszystkich testowanych liniach poddanych elektroporacji zaobserwowano spadek ekspresji GAPDH w wysokim stopniu, co wskazuje, że **jest to optymalny system do badania aktywności RNAi**.

Warunki elektroporacji dla poszczególnych linii komórkowych

Linia komórkowa	Napięcie	Czas trwania impulsu	Ilość impulsów
HL-60	1350	35	1
Jurkat	1325	10	3
Kasumi-1	1400	10	3



Ocena poziomu ekspresji GAPDH dla komórek linii (A) Kasumi-1, (B) HL60 oraz (C) Jurkat z wykorzystaniem elektroporacji. K- - kontrola negatywna (komórki nietraktowane); KE - kontrola elektroporacji GAPDH - próba badana. Do określenia zmian relatywnych zmian na poziomie ekspresji wykorzystano metodę $\Delta\Delta CT$. Jako grupę referencyjną wykorzystano kontrole negatywną, natomiast genem referencyjnym był gen β -aktyny.

Rodzaj RNAi	Przykład	Potwierdzenie aktywności	Sekwencja
miRNA	miR193b	-	Na podstawie literatury: Bhayadia R et al., J. Clin. Oncol. (2018)
	miR193b (modyfikacja 2'-O-metylo)	-	Na podstawie literatury: Bhayadia R et al., J. Clin. Oncol. (2018)
	miR203a	-	Na podstawie literatury: Zheng Z et al. Int J Clin Exp Pathol. (2019)
siRNA	GAPDH	elektroporacja	Sekwencja wystandaryzowana (#13778075, Invitrogen)
	k-RAS (3)	elektroporacja	Sekwencja zaprojektowana* (synteza w firmie zewnętrznej)
	FLT3 (3)	elektroporacja	Sekwencja zaprojektowana* (synteza w firmie zewnętrznej)
	c-KIT (3)	Nośnik (LNP)	Sekwencja zaprojektowana* (synteza w firmie zewnętrznej)

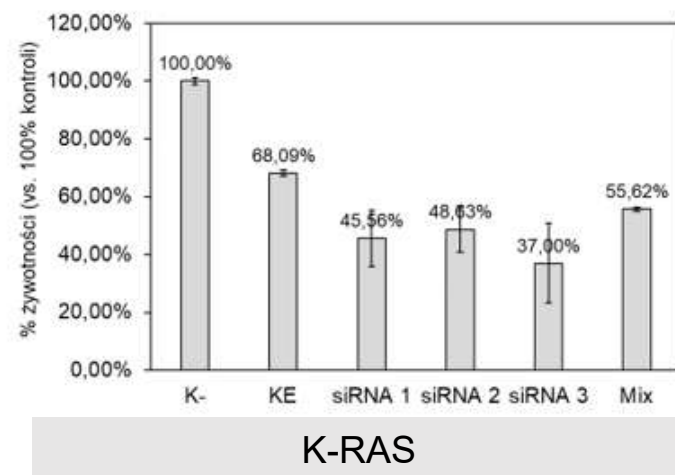
*Zaprojektowane siRNA zostało wykonane na podstawie założeń, zawartych w literaturze oraz z wykorzystaniem dostępnego narzędzia: siDirect. Proces polegał na określeniu sekwencji mRNA dla poszczególnych genów (m.in.: FLT3, k-RAS, c-KIT), a następnie wykorzystaniu sekwencji jako matrycy - na podstawie, której algorytm generuje sekwencje dupleksów siRNA (+ weryfikacja sekwencji pod kątem komplementarności dla różnych izoform mRNA).



Założenia:

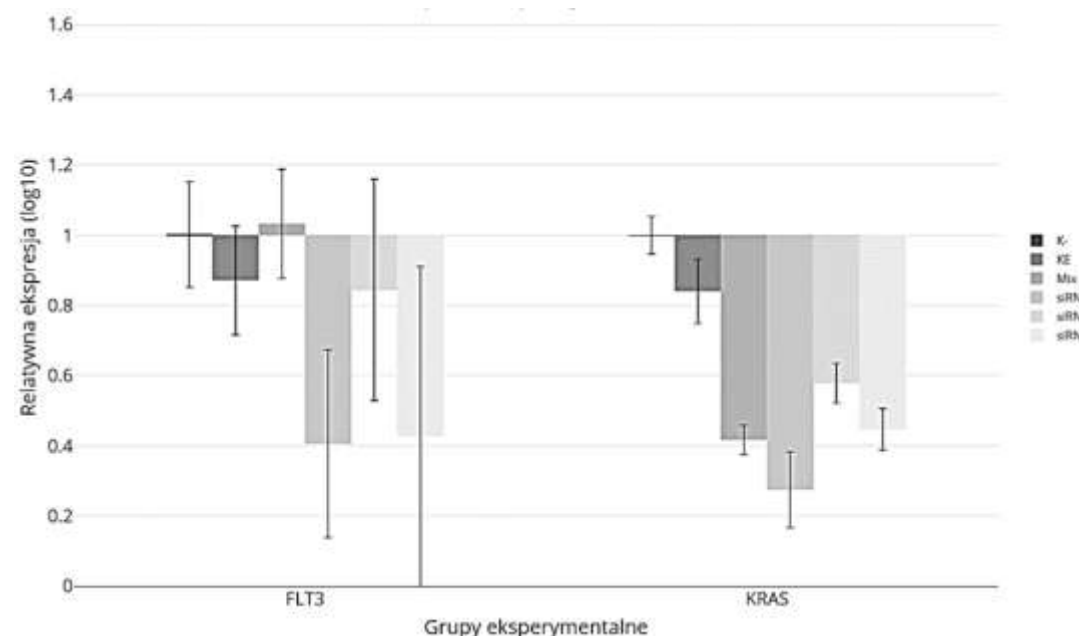
- sekwencja ok. 21 nt
- siRNA komplementarne do sekwencji 3' UTR poszczególnych genów
- zawartość par G/C 30-56%
- sekwencje posiadały 2-nt ogon na końcu 3'
- temperatura topnienia określona $< 20,5^{\circ}\text{C}$ (T_m nici „guide” $< T_m$ nici „passenger”)
- pozycjonowanie konkretnych nukleotydów w odpowiednich regionach

- RNAi (synteza sekwencji - MultiplexDX)
- System do elektroporacji (Neon™ Transfection System; nr kat. MPK5000; Invitrogen)



Warunki elektroporacji dla poszczególnych linii komórkowych

Linia komórkowa	Napięcie [V]	Czas trwania impulsu	Ilość impulsów
HL-60	1350	35	1
Jurkat	1325	10	3
Kasumi-1	1400	10	3



Ocena względnej ekspresji genu FLT3 oraz k-RAS dla komórek linii HL60 po przeprowadzeniu elektroporacji. K - kontrola negatywna (komórki nietraktowane); KE - kontrola elektroporacji; siRNA - próba badana (różne warianty). Do określenia względnych zmian na poziomie ekspresji wykorzystano metodę $\Delta\Delta CT$. Jako grupę referencyjną wykorzystano kontrolę negatywną, natomiast genem referencyjnym był gen GAPDH.

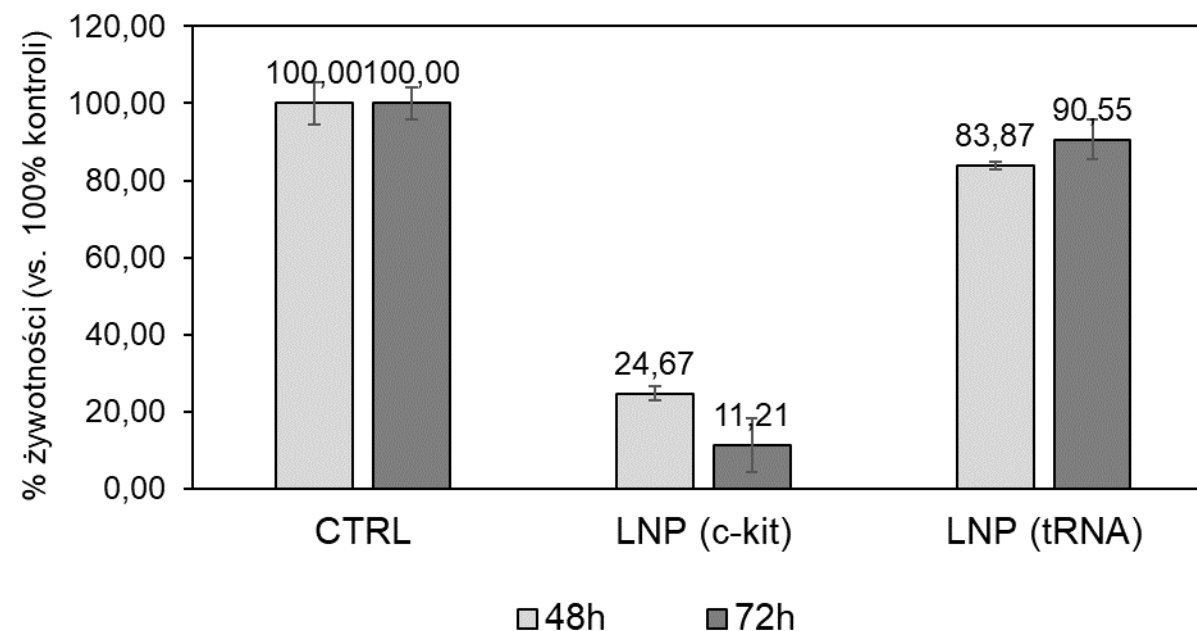
Uzyskane wyniki (m.in. zmieniona morfologia, obecność fragmentów komórkowych, potwierdzenie procesów apoptotycznych, obniżenie zdolności proliferacji i poziomu ekspresji poszczególnych genów) w przypadku siRNA ukierunkowanych na FLT3 oraz k-RAS (analizowanych z wykorzystaniem metody elektroporacji) wykazują efekt biologiczny na komórki linii białaczkowych, a tym samym mogą zostać wykorzystane w końcowym preparacie jako czynnik terapeutyczny.

- Aktywność zaprojektowanego RNAi ukierunkowanego na c-KIT w nieswoistym nośniku zawierającym mieszaninę lipidów odpowiednich do wytwarzania nanocząstek lipidowych na bazie jonizujących lipidów kationowych (GenVoy Training Kit Formulation; nr kat. NCN0001; Precision NanoSystem) kompleksujących kwasy nukleinowe.

Weryfikacja aktywności zastosowanego RNAi (c-KIT):

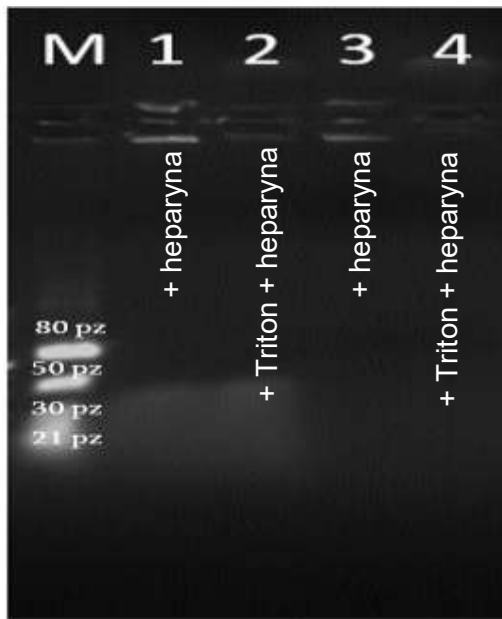
- ✓ testy żywotności (AlamarBlue) – obniżenie żywotności komórek po podaniu preparatu LNP (c-KIT) w odniesieniu do nieznacznych zmian dla formacji kontrolnej LNP (tRNA)
- ✓ analiza ekspresji markera CD117/c-KIT z wykorzystaniem cytometru przepływowego (obniżenie ekspresji markera CD117 na pow. komórek linii Kasumi-1 po podaniu formacji LNP (c-KIT).
- ✓ Ocena procesu apoptozy (spadek żywotności komórek i wzrost liczby komórek w stadium wczesnej apoptozy dla preparatu LNP (c-KIT)

	LNP (c-KIT)	LNP (tRNA)
Kwas nukleinowy	siRNA	tRNA
Stężenie RNA	232µg /1ml	232µg /1ml
Rozmiar [nm]	73,67	83,65
Zeta potencjał [mV]	+9	+7
PDI	0,097	0,077



oparte na kompleksie PEI-RNA

Rozmiar: 175 d.nm
ZP: -30,8mV

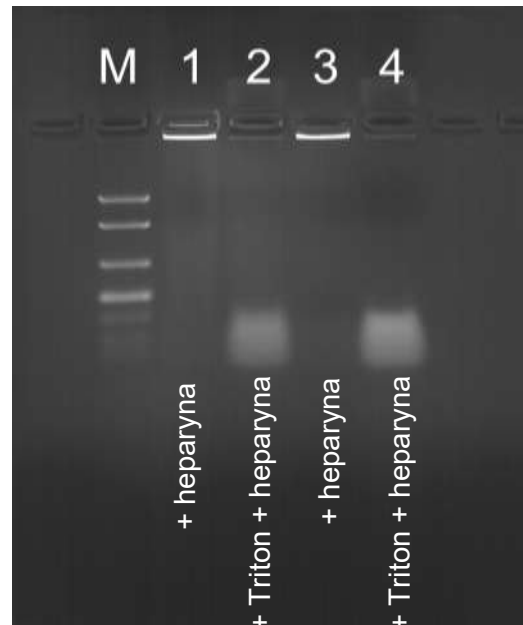


Przed kolumną Po kolumnie

Brak enkapsulacji RNA – PEI
do struktury liposomu

oparte na lipidzie kationowym DOTAP

Rozmiar: 146 - 190,1 d.nm
ZP: +22,5 - 28,1mV



Przed ekstruzją Po ekstruzji

Całkowita enkapsulacja RNA

Agregacja preparatu

oparte na lipidzie jonizowalnym DC-cholesterol

Rozmiar: 104,9 – 152,6 d.nm
ZP: + 20,4 – 44,2mV



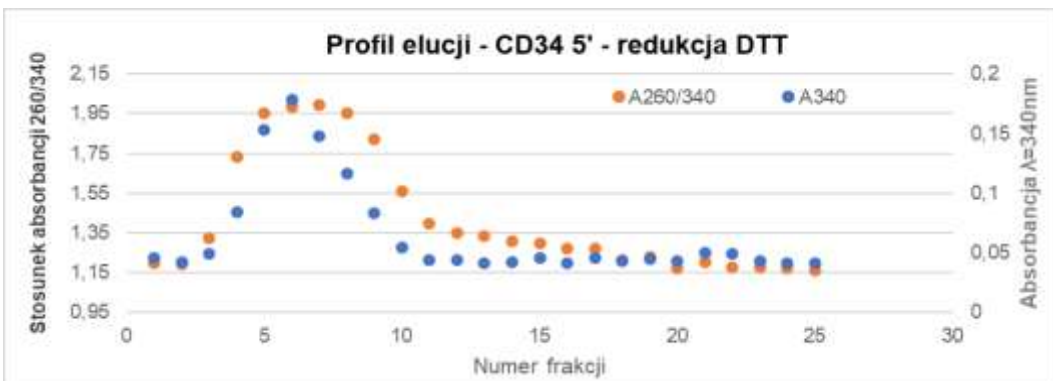
Po ekstruzji

Prawie całkowita enkapsulacja RNA

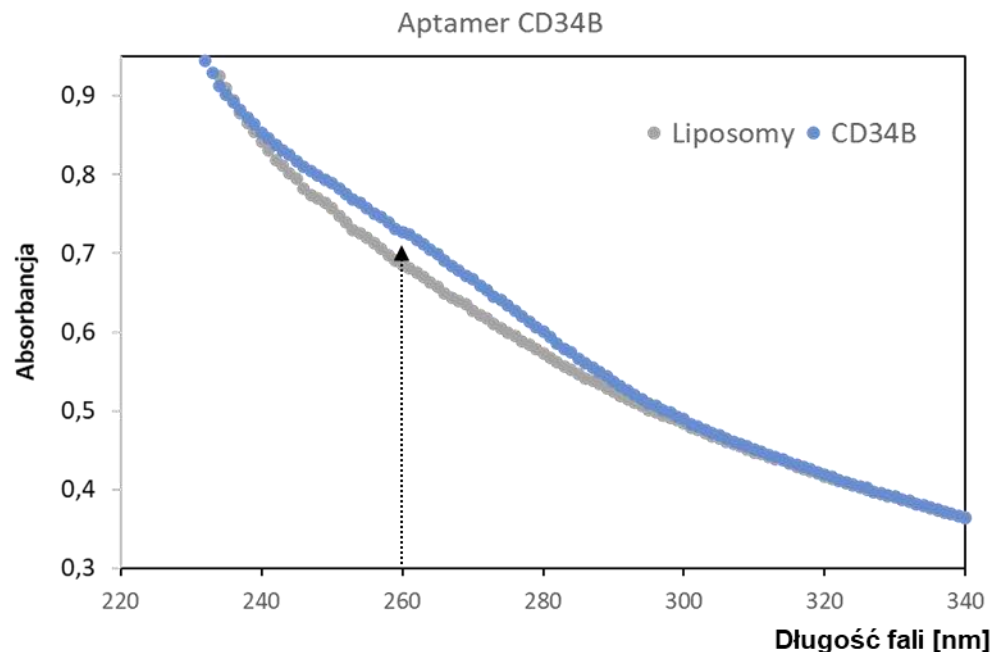
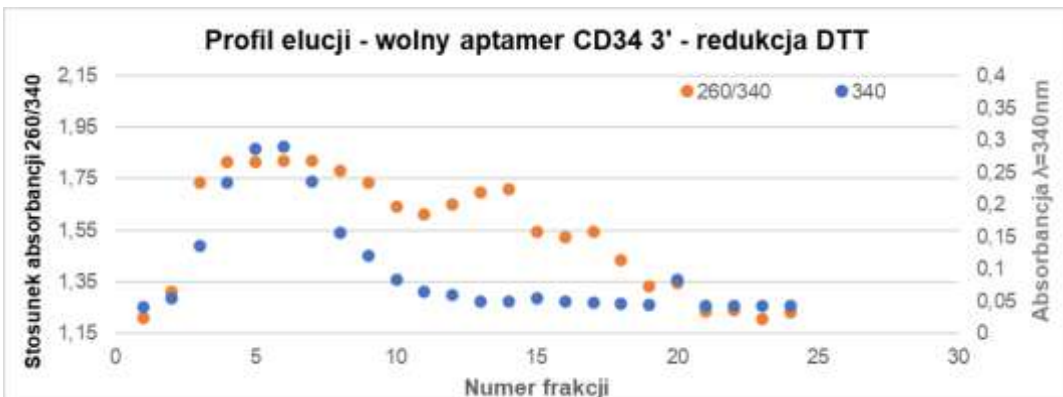
modyfikacje

DSPE-PEG-MAL 2K

DSPE-PEG-MAL 1K

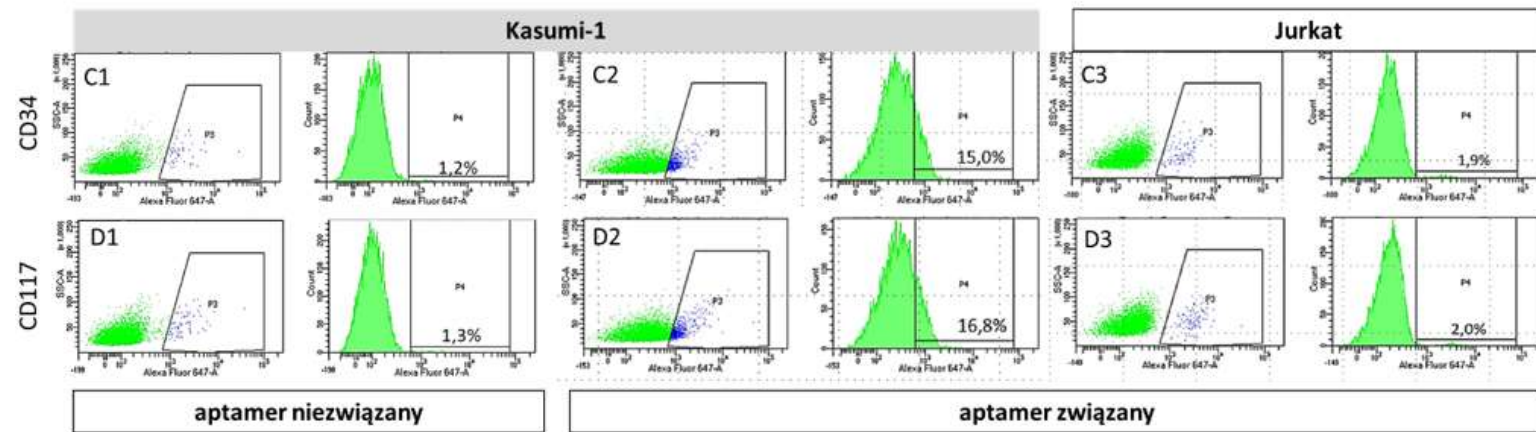


Profil elucji dla aptameru ukierunkowanego na CD34 (modyfikacja -SH przy 5'). A340 – absorbancja przy długości fali 340nm, A260 – absorbancja przy długości fali 260nm (dla kwasu nukleinowego), **Ratio 260/340** – stosunek absorbancji przy długości fali 260nm do długości fali 340nm. W przypadku związania aptameru do grup maleimidowych znajdujących się w formulacji liposomowej występuje skok absorbancji – szczyt przy wartości ratio 260/340, który pokrywa się z szczytem pików przy długości fali dla A340 wskazującym na zmętnienie próbki w poszczególnych frakcjach. Profil w panelu górnym: aptamer kowalencyjnie związany z liposomami; profil w panelu dolnym - aptamer CD34 niezwiązany z liposomami.



- Skład liposomu: **HSPC** (75 %mol), **DOPE** (5 %mol), **DSPE-PEG** (5 %mol), **DSPE-PEG-Mal** (0,08 %mol), **cholesterol** (14,82 %mol) oraz **barwnik fluorescencyjny DID** (0,1 %mol).
- Sposób wytwarzania:** ekstruzja ciśnieniowa

Wydajność wiązania liposom-aptamer i swobodnego rozpoznawania antygenów powierzchniowych



Analiza swoistości aptamerów ukierunkowanych na CD34 oraz CD117. Oznaczenia cytometryczne przeprowadzono z wykorzystaniem cytometru BD FACS Canto II. Zastosowano liposomy wyznakowane barwnikiem fluorescencyjnym (DID). Kompleks liposom-aptamer dodawano w objętości 50 µl/test. Podczas każdego oznaczenia zebrano 10 000 zdarzeń. Bramkowanie ustawiono w stosunku do kontroli (niebarwionej zawiesiny komórek), a analizę zmiany intensywności fluorescencji prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania FACS DIVA.

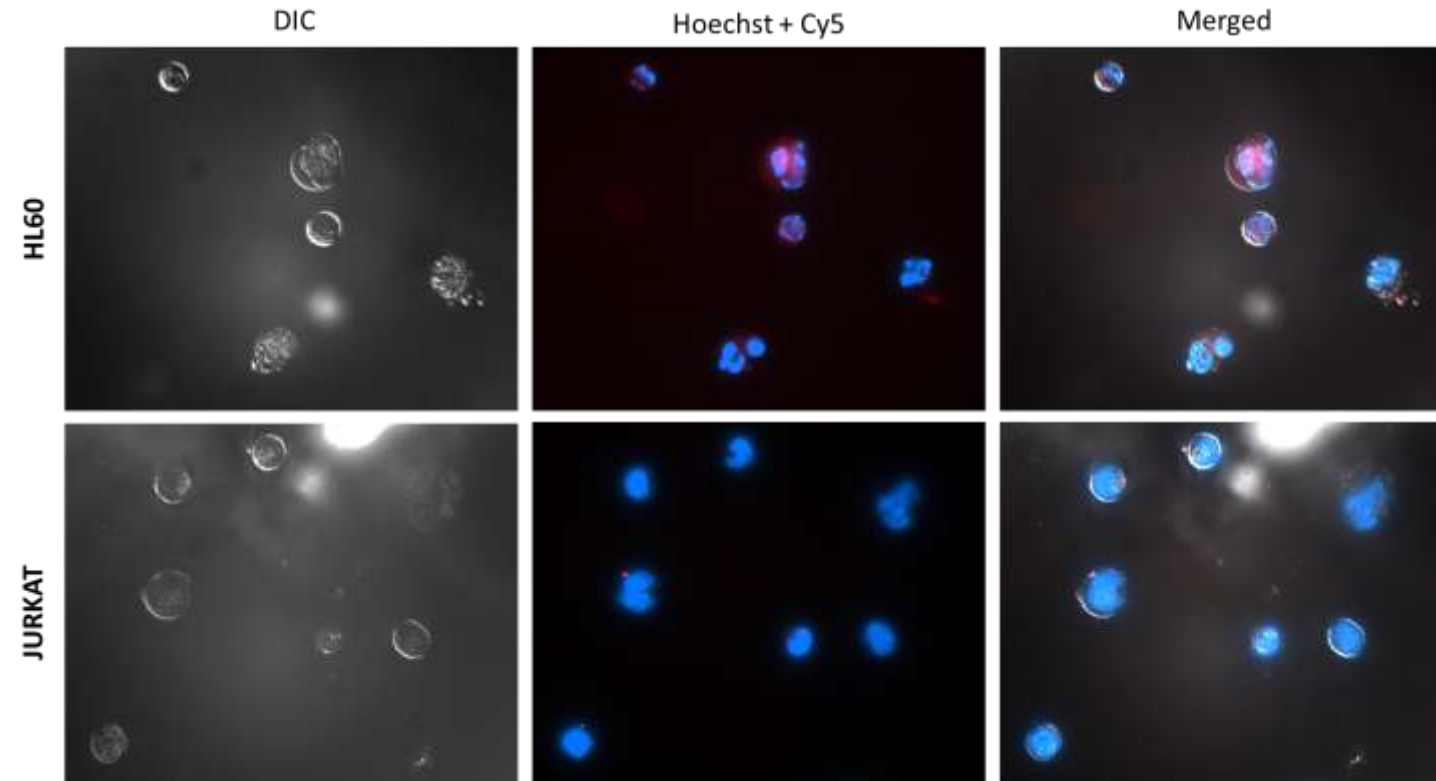
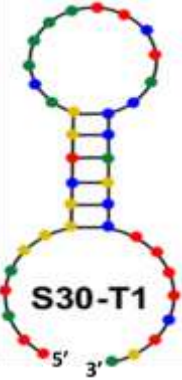
- Porównywano oddziaływania aptamerów, ukierunkowanych na CD34 oraz CD117, które uległy związaniu do liposomu oraz te, dla których nie zaobserwowano wskazanej zależności.
- W przypadku aptamerów niewykazujących wiązania do liposomu - przesunięcie sygnału fluorescencji jest znikome (poniżej 2%).
- W przypadku aptamerów, dla których potwierdzono wiązanie do grupy maleimidowej w przygotowanej formulacji liposomowej stwierdzono przesunięcie sygnału fluorescencji w prawo (średnio na poziomie 16%).
- Dla linii kontrolnej (Jurkat) – brak istotnych zmian.

Lp	Warunki:		% mol lipidu: DSPE-PEG-Mal			Błonowy barwnik fluorescencyjny	Oczyszczanie po inkubacji:	Aptamer:	
	Czynnik redukujący	Oczyszczanie aptameru	0,08	0,8	0,16			Przyłączony:	Nieprzyłączony:
1.	50mM DTT w H ₂ O, pH=7; 1h RT	precypitacja	X	-	-	DiD	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	CD34B, CD117Bx4	CD34A_red, CD34B_red, CD117A_red, CD117_red, CD34B_1x2, CD33A_1x2, CD33B_1x2, CD117B_MP, CD117B_FS,
2.	50mM DTT w H ₂ O, pH=7; 1h RT	precypitacja	X	-	-	-	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	CD34B	CD33A_1, CD33B_1, CD34B_1,
3.	50mM DTT w H ₂ O, pH=7; 1h RT	precypitacja	-	-	X	-	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	CD117B,	CD34B_1R, CD33B_1, CD34B_1, CD34B_1R, CD117A, CD117B_FS, CD33_-), CD34B_2FS,
4.	50mM DTT w H ₂ O, pH=7; 1h RT	precypitacja	-	-	X	DiD	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	CD117B,	CD34B_1R, CD117B_FS,
5.	100mM TCEP pH=7; 1h RT	precypitacja	-	-	X	-	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	-	CD34B_2FS
6.	500mM TCEP + 100mM TEAA 100ul pH=8,0; RT	precypitacja	-	X	-	-	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	-	CD117B_3MP, CD33A_1, CD117A
7.	500mM TCEP + 100mM TEAA 100ul pH=8,0; 4°C	precypitacja	-	X	-	-	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	-	CD117A
8.	500mM TCEP + 100mM TEAA 100ul pH=8,0; 3 min; 70°C; 1h RT	precypitacja	-	X	-	-	Filtracja żelowa: Sephacrose CL-4B	-	CD33A_1, CD33B_1, CD34B_1R, CD117B_3MP,

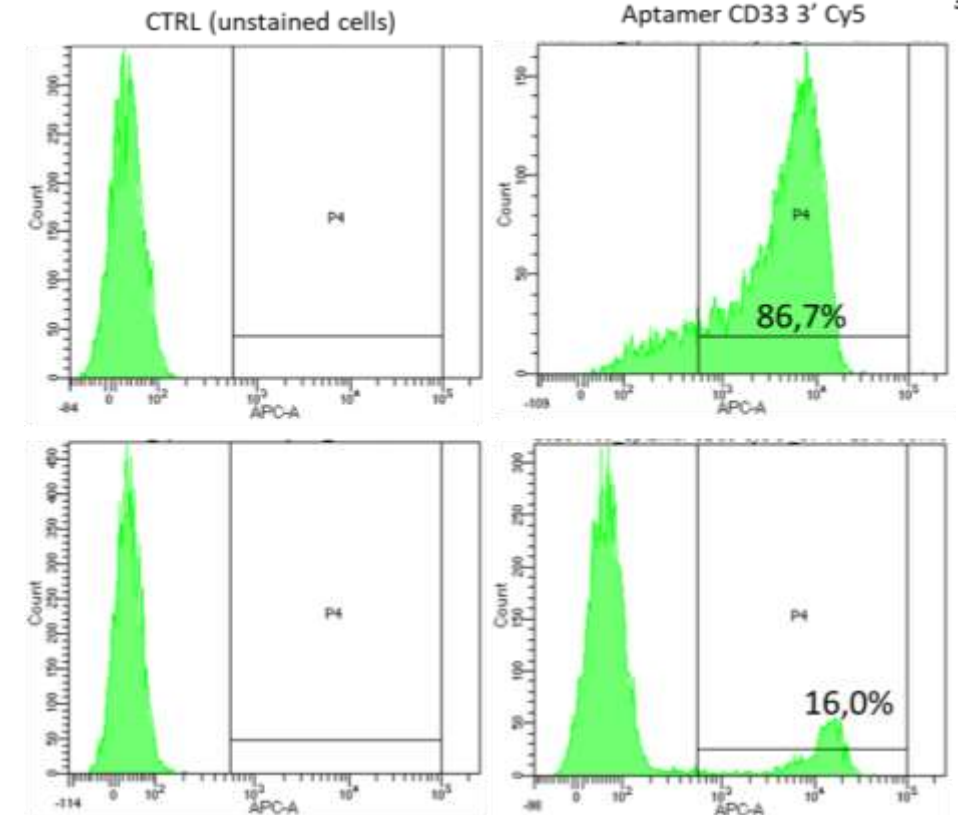
WYZWANIA

- Nie potwierdzono kowalencyjnego wiązania pomiędzy grupa – SH aptameru, a maleimidową pochodną DSPE-PEG.
- Trudności w uzyskaniu wysokiej powtarzalności związanej z wydajnym wiązaniem aptameru do powierzchni liposomu może wynikać również z dokładności syntezy/wydajności reakcji dla małych cząsteczek oraz braku aktywności aptameru.
- W związku z trudnościami w uzyskaniu liposomów z aktywnymi aptamerami swoiście rozpoznającymi antygeny powierzchniowe komórek ostrej białaczki szpikowej (zgodnie z pierwotnymi założeniami projektu) podjęto działania w kierunku wdrożenia alternatywnego rozwiązania (**zastosowanie przeciwciała, jako czynnika kierującego**).

Fluorescencyjne aptamery ukierunkowane na antygen CD33 3'-Cy5 (ocena swoistego wiązania do antygeny CD33)



W przypadku komórek linii HL60 (CD33+) barwnik zlokalizowany zarówno w błonie, jak i wewnątrz komórki (internalizacja). W przypadku komórek linii Jurkat (CD33-) pojedynczy punkt pochodzący z fluorochromu zlokalizowany przy błonie.



Na podstawie analizy z wykorzystaniem cytometru przepływowego stwierdzono wiązanie aptameru do antygeny CD33 obecnego na powierzchni komórek linii HL60. W przypadku komórek linii Jurkat niespecyficzne wiązanie średnio na poziomie 18%.

Formulacja:
2-1-24-Cy5 3'

20ul

Ilość komórek:
200 tys./test

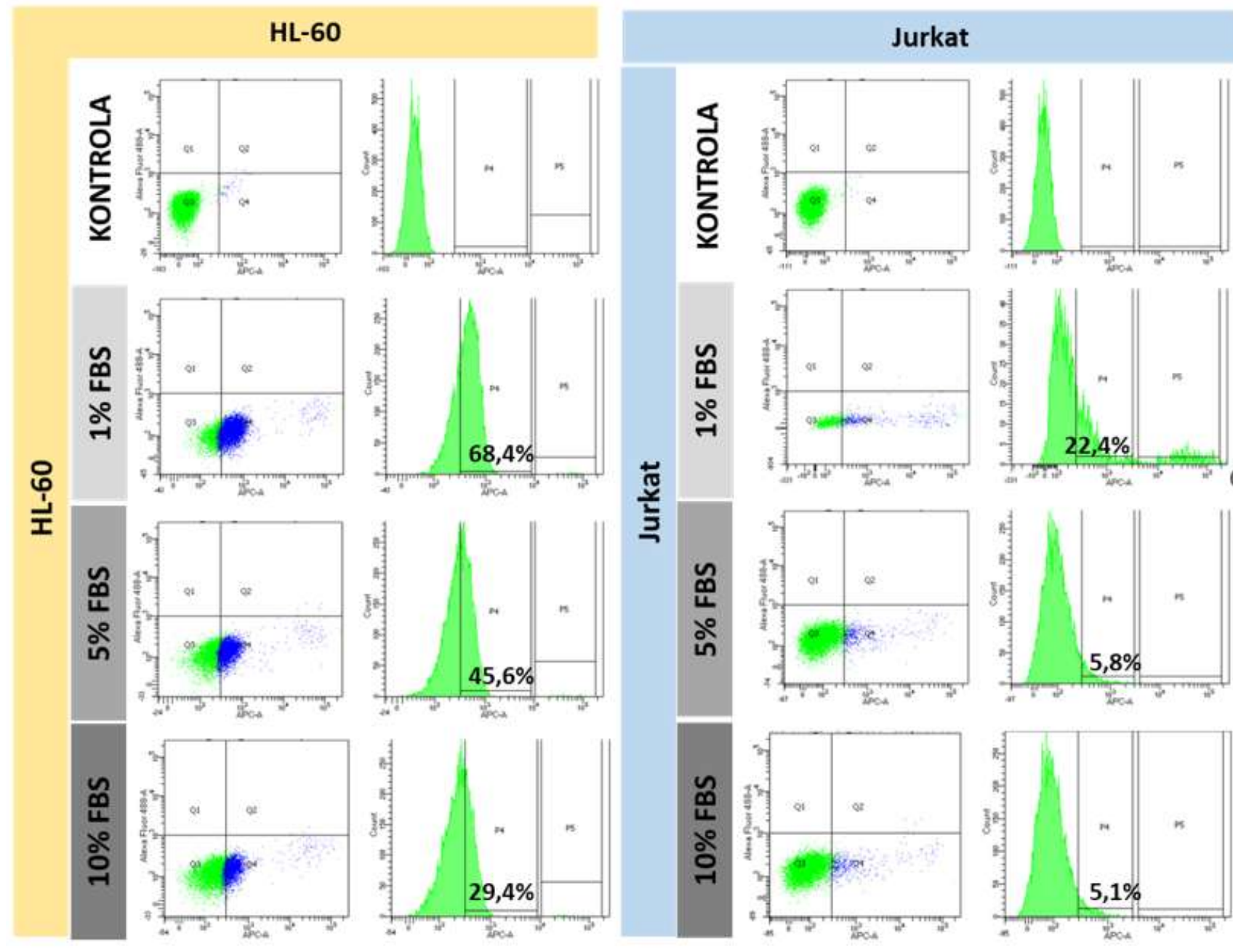
Bufor do płukania
(2x) komórek:
1xPBS + FBS:
-0%
-1%
-10%

Rozcieńczenie
komórek 100ul:
1xPBS +5mMMgCl₂
+FBS:
-0%
-1%
-10%

Bufor do płukania,
po inkubacji:
1xPBS + 5mM
MgCl₂
(3x płukanie)

Inkubacja:
1h 37°C

Ocena swoistego wiązania konstrukt liposom-aptamer (Cy5)



5. Ocena wiązania przeciwciała anty-CD33 do formulacji liposomowej

ETAP I – przygotowanie liposomów

**PRZYGOTOWANIE SUCHEGO FILMU
LIPIDOWEGO** - 10mg/ml



UWODNIENIE
bufor z RNA (siRNA, miRNA)



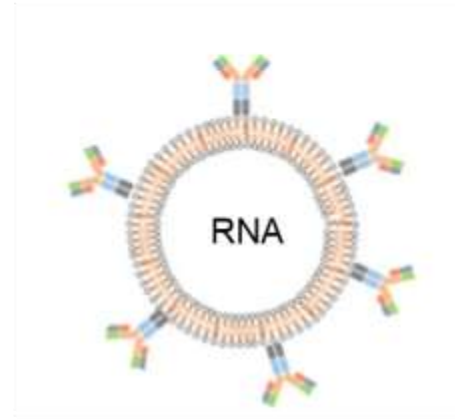
FAT



EKSTRUZJA
strzykawkowa/ciśnieniowa
400nm, 200nm, 100nm, 50nm

CHARAKTERYSTYKA PREPARATU

- pomiary Zeta Sizer
 - Rozmiar
 - Potencjał Zeta
- elektroforeza
ocena zamknięcia RNA wewnątrz liposomu



ETAP II - przyłączenie przeciwciała

TIOŁACJA PRZECIWCIAŁA
odczynnik Trauta



**PRZYŁĄCZENIE PRZECIWCIAŁA DO
FORMULACJI LIPOSOMOWEJ**
inkubacja nocna 4°C



KOLUMNA – Sepharose CL-4B
oddzielenie nieprzyłączonego
przeciwciała od immunoliposomów



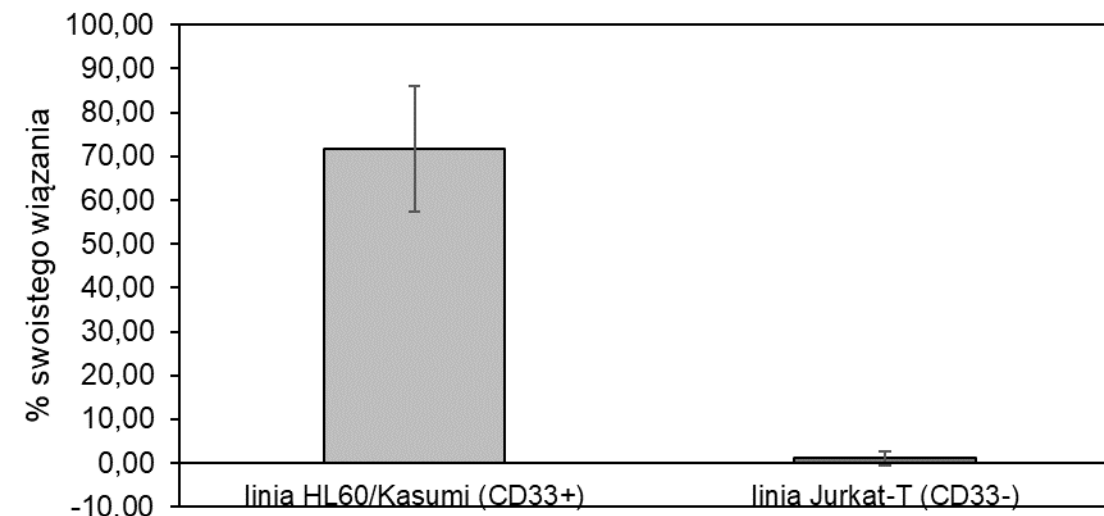
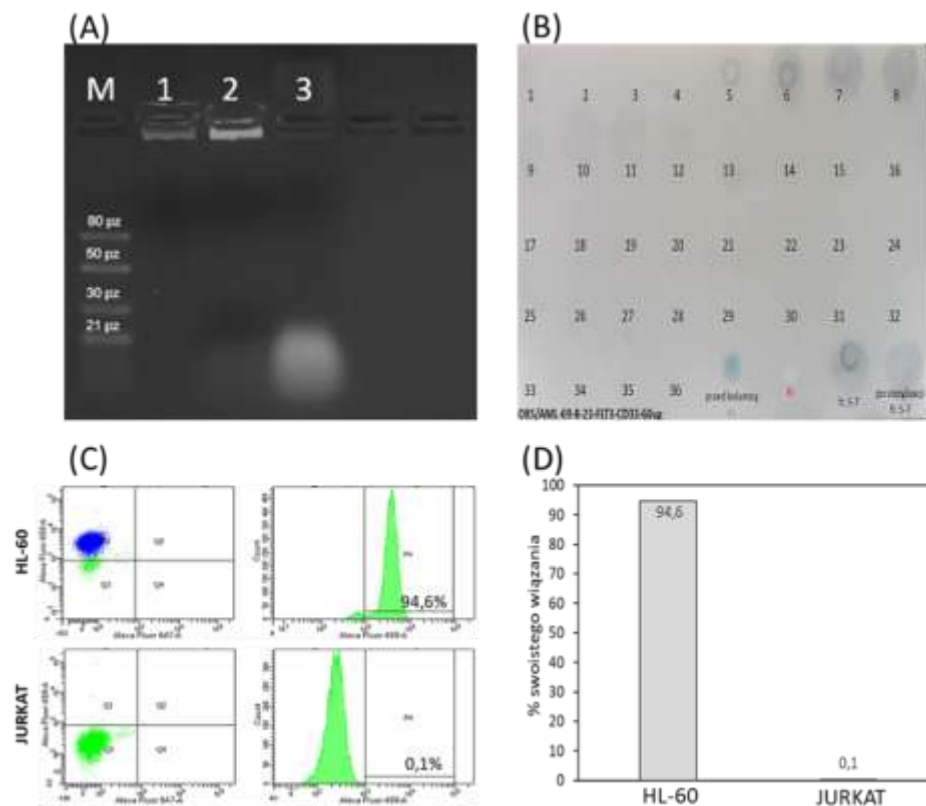
STERYLIZACJA PREPARATU
filtry strzykawkowe 0.2µm

CHARAKTERYSTYKA PREPARATU

- pomiary Zeta Sizer
 - Rozmiar
 - Potencjał Zeta
- dot-blot
potwierdzenie jakościowe obecności przeciwciała w mętnych frakcjach
- oznaczenie cytometryczne
ocena swoistości preparatu na wybranych liniach komórkowych

Selektywne wiązanie preparatu (spełniającego właściwości fizykochemiczne) do antygenu powierzchniowego obecnego na komórkach linii białaczkowych (marker CD33)

Lipid	[mol%]
DPPE	27,68
DOPE	20,00
DSPE-PEG ₁₀₀₀	5,00
DSPE-PEG-Mal	2,40
Cholesterol	14,92
18:1 TAP (DOTAP)	30,00



Ocena aktywności i swoistości formacji liposom-przeciwciała skierowanej przeciwko ludzkiemu antygenowi powierzchniowemu CD33. Dane zbiorcze uzyskane na podstawie oceny swoistości preparatów: 36-5-23; 37-6-23; 40-6-23; 42-7-23; 48-7-23; 52-8-23; 69-9-23; 72-9-23 oraz 80-11-23.

Reprezentatywne wyniki analizy preparatu liposomowego. **(A)** Enkapsulacja RNA – rozdział elektroforetyczny preparatu liposomowego; **M** - marker wielkości; **1.** preparat liposomowy; **2.** preparat potraktowany heparyną; **3.** preparat potraktowany Tritonem oraz heparyną. **(B)** Potwierdzenie obecności przeciwciała na powierzchni liposomów metodą „dot-blot”. Obraz profilu elucyjnego preparatu liposomowego po reakcji z przeciwciałem **(C)** Ocena aktywności i swoistości przeciwciała skierowanego przeciwko ludzkiemu antygenowi powierzchniowemu CD33. **(D)** Porównanie swoistości badanego preparatu. **(C,D)** dane uzyskane za pomocą cytometru przepływowego.

Potwierdzono swoiste wiązanie konstruktu liposom – przeciwciała do komórek linii CD33+ (HL60 oraz Kasumi) oraz brak jego niespecyficznego wiązania do komórek linii Jurkat (CD33-). Uzyskane wyniki wskazują na wdrożenie metody pozwalającej otrzymać formacje liposomowe z aktywnym przeciwciałem zdolnym rozpoznawać antygen CD33

DZIĘKUJEMY ZA UWAGĘ

