

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-97-112>
УДК 577.352.26



Обзорная статья / Review article

Конструкция иммунолипосом (обзор)

М. В. Дмитриева¹, И. В. Ярош², Е. В. Санарова¹, А. В. Ланцова¹, О. Л. Орлова¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина) 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

² АО «Р-Фарм», Россия, 119421, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 111, к. 1

✉ Контактное лицо: Дмитриева Мария Вячеславовна. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: М. В. Дмитриева – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; И. В. Ярош – <https://orcid.org/0000-0002-3347-9674>; Е. В. Санарова – <https://orcid.org/0000-0002-5592-5137>; А. В. Ланцова – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>.

Статья поступила: 14.01.2022

Статья принята в печать: 00.00.2022

Статья опубликована: 25.08.2022

Резюме

Введение. Благодаря открытию антител (АТ), нацеливающей молекулы с высокой специфичностью к лиганду, концепция «волшебная пуля» была успешно реализована с различными иммуноконъюгированными лекарственными средствами (ЛС). С 1980 г. для повышения специфичности и эффективности лекарственной терапии стали широко исследоваться конъюгаты АТ с липосомами, т. е. иммунолипосомы (ИЛ). Данный обзор посвящен характеристике основных структурных единиц ИЛ на основе анализа данных оригинальных и обзорных статей по теме исследования из баз PubMed, ResearchGate и КиберЛенинка.

Текст. ИЛ представляют собой липосомы, к которым обычно посредством специального линкера прикреплены АТ, их фрагменты или иные лиганды. ИЛ используются для доставки противоопухолевых, сердечно-сосудистых, противовирусных, противопаразитарных ЛС, генетического материала, визуализирующих молекул и др. ИЛ могут быть получены из различных фосфолипидов как природного, так и синтетического происхождения, заряженных или нейтральных. Наиболее широко используемыми фосфолипидами в иммунолипосомальной конструкции являются фосфатидилхолины. Для повышения механической устойчивости бислоя в липидную композицию вводят стероиды. Для селективной доставки липосом нацеливающие лиганды должны быть прикреплены к наноносителю через спейсерное плечо ПЭГ. Для этой цели используют несколько типов функционализированных концевыми группами липополимеров обычно общей формулы X-PEG-LI, где X представляет собой фрагмент, содержащий реакционноспособную функциональную группу, – малеимид, биотин, цианур, амин и др. Эти липидные ПЭГ-конъюгаты демонстрируют превосходные амфифильные свойства и предлагают превосходные преимущества для модификации, формулирования и доставки различных ЛС. Используемое АТ должно усиливать накопление липосомального ЛС в целевых областях с минимальной перекрестной реактивностью со здоровыми тканями. При приговлении ИЛ используют готовые лекарственные препараты на основе моноклональных АТ, например трастузумаб, цетуксимаб, панитумумаб, бевацизумаб, также применяют коммерческие АТ, предназначенные для исследовательских целей, и синтезированные в лабораторных условиях АТ и их фрагменты. АТ могут быть прикреплены к липосомам двумя основными способами: прямой ковалентной конъюгации и постинсерционным методом.

Заключение. Результаты проведенного исследования позволили обобщить многообразие литературных данных о составе ИЛ и возможности использования вспомогательных компонентов для достижения поставленной цели при разработке препарата.

Ключевые слова: иммунолипосомы, пегилированные липосомы, липиды, антитело, антиген, линкер

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. В. Дмитриева осуществила написание текста статьи, сбор и обработку литературных данных. И. В. Ярош, Е. В. Санарова, А. В. Ланцова сделали сбор и обработку литературных данных, перевод. О. Л. Орлова осуществила дизайн исследования, проверку окончательной версии статьи.

Для цитирования: Дмитриева М. В., Ярош И. В., Санарова Е. В., Ланцова А. В., Орлова О. Л. Конструкция иммунолипосом. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):97–112. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-97-112>

The Construction of Immunoliposomes (Review)

Maria V. Dmitrieva¹, Ilya V. Yarosh², Ekaterina V. Sanarova¹, Anna V. Lantsova¹, Olga L. Orlova¹

¹ FSBI "National Medical Research Center of Oncology. N. N. Blokhin", 24, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

² JSC "R-Pharm", 111/1, Leninsky pr-t, Moscow, 119421, Russia

✉ Corresponding author: Maria V. Dmitrieva. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

ORCID: Maria V. Dmitrieva – <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>; Ilya V. Yarosh – <https://orcid.org/0000-0002-3347-9674>; Ekaterina V. Sanarova – <https://orcid.org/0000-0002-5592-5137>; Anna V. Lantsova – <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>; Olga L. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>.

Received: 14.01.2022

Revised: 00.00.2022

Published: 25.08.2022

Abstract

Introduction. Due to the discovery of antibodies (Ab) targeting molecule with high specificity to the ligand, the "magic bullet" concept has been successfully implemented with various immunoconjugated drugs. Since 1980, Ab conjugates with liposomes, i.e., immunoliposomes (ILs), have been widely investigated to improve the specificity and efficacy of drug therapy. This review is devoted to the characteristic of the basic structural units of ILs on the basis of data analysis of original and review articles on the topic from PubMed, ResearchGate and CyberLeninck databases.

© Дмитриева М. В., Ярош И. В., Санарова Е. В., Ланцова А. В., Орлова О. Л., 2022

© Dmitrieva M. V., Yarosh I. V., Sanarova E. V., Lantsova A. V., Orlova O. L., 2022

Text. ILs are liposomes to which Ab, their fragments or other ligands are usually attached by a special linker. ILs are used to deliver antitumor, cardiovascular, antiviral, antiprotozoal drugs, genetic material, imaging molecules, etc. ILs can be derived from various phospholipids of both natural and synthetic origin, charged or neutral. The most widely used phospholipids in immunoliposomal construction are phosphatidylcholines. To increase the mechanical stability of the bilayer, sterols are introduced into the lipid composition. For selective liposome delivery, targeting ligands must be attached to the nanocarrier via the spacer arm of the PEG. Several types of end-group functionalized lipopolymers are used for this purpose, usually of the general formula X-PEG-LI, where X represents a fragment containing a reactive functional group – maleimide, biotin, cyanur, amine, etc. These lipid PEG-conjugates exhibit excellent amphiphilic properties and offer excellent advantages for the modification, formulation, and delivery of various drugs. The Ab used should enhance the accumulation of the liposomal drug in the target areas with minimal cross-reactivity with healthy tissues. Ready-made drugs based on monoclonal Ab, such as trastuzumab, cetuximab, panitumumab, bevacizumab; commercial Ab intended for research purposes, and laboratory synthesized Ab and their fragments are used in the preparation of ILs. Ab can be attached to liposomes by two main methods: direct covalent conjugation and postinsertion.

Conclusion. The results of this study allowed us to summarize the variety of literature data on the composition of ILs and the possibility of using auxiliary components to achieve the goal in the development of the drug.

Keywords: immunoliposomes, pegylated liposomes, lipids, antibody, antigen, linker

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Maria V. Dmitrieva wrote the text of the article, collection and processing of literary data. Ilya V. Yarosh, Ekaterina V. Sanarova, Anna V. Lantsova made the collection and processing of literary data, translation. Olga L. Orlova carried out the research design, verification of the final version of the article.

For citation: Dmitrieva M. V., Yarosh I. V., Sanarova E. V., Lantsova A. V., Orlova O. L. The construction of immunoliposomes. *Drug development & registration*. 2022;11(3):97–112. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-97-112>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТ	антитело
ИЛ	иммунолипосома
ЛВ	лекарственное вещество
ЛС	лекарственное средство
ПЭГ	полиэтиленгликоль
Сульфо-NHS	N-гидроксисульфосукцинимид
ФЛ	фосфолипид
BS3	бис[сульфосукцинимидил]суберат
EDC	N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимид
ДТТ	дитиотреитол
Mal-PEG-Chol	малеими́до-ПЭГ-холестерин
MCS-4	O-(3-холестерил-оксикарбонил)пропионил-O'-m-малеими́добензоилтетраэтиленгликоль
PDP	пиридилдитиолпропионат
pNP-PEG-PE	n-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-фосфоэтаноламин
SATA	N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат
SMPB	N-сукцинимидил-4-(n-малеими́дофенил)-бутират
SPDP	N-гидроксисулцинимидный эфир 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты

ВВЕДЕНИЕ

В начале XX века химик и биолог Пауль Эрлих представил научную концепцию о создании «волшебной пули» – препарата, который при введении в организм больного сам найдет и убьет возбудителя болезни, не нанося ущерба пациенту. Идея подобного препарата предполагает, что одна часть молекулы должна состоять из фрагмента, распознающего и связывающего цель, а вторая должна обеспечивать терапевтическое действие на эту цель. С открытием антител (АТ), нацеливающей молекулы с высокой специфичностью к лиганду, концепция «волшебная пуля» была успешно реализована с различными иммуноцелевыми лекарственными веществами (ЛВ) – иммуноконъюгатами, включающих иммунотоксины, иммуноизотопы, АТ-химиотерапевтические конъюгаты и иммунонацеленные системы доставки ЛВ. И в последнее время достигнут значительный прогресс в области иммуноконъюгированных лекарственных средств (ЛС). Иммуномодификация ЛС оказалась очень многообещающим подходом, который значительно улучшил его целевое накопление в патологических участках, уменьшив при этом нежелательные побочные эффекты в здоровых тканях [1, 2].

С 1980 г. для повышения специфичности и эффективности лекарственной терапии стали широко исследоваться конъюгаты АТ с липосомами, т. е. иммунолипосомы (ИЛ). Доставка ЛВ с помощью ИЛ применяется для нацеливания на определенные участки

действия препарата, такие как мозг, легкие, раковые клетки или клетки иммунной системы; предотвращения клеточных механизмов лекарственной устойчивости, облегчения внутриклеточного проникновения и, следовательно, достижения более высоких уровней ЛВ в клетках-мишенях [3–5].

По сравнению с классическими иммуноконъюгатами ИЛ имеют несколько несомненных преимуществ. Во-первых, для избирательной доставки большого количества ЛВ к клеткам-мишеням посредством механизма рецепторопосредованной интернализации необходимо малое количество молекул лиганда на липосому – 10–20. В отличие от других иммуноконъюгатов, которые доставляют менее 10 молекул ЛВ или токсина на 1 молекулу АТ, ИЛ могут использоваться для переноса тысяч молекул ЛВ. Кроме того, предоставление множества нацеленных молекул на поверхности отдельных липосом может восстанавливать поливалентное связывание фрагментов моновалентных АТ и, следовательно, увеличивать их авидность связывания с антигенами-мишенями. Это может устранить необходимость в обширном реинжиниринге, например фрагментов scFv, для увеличения их валентности. Во-вторых, преимущество ИЛ заключается в возможности аддитивности или синергизма между сигнальными АТ, присутствующими на поверхности липосом, и ЛС, заключенным внутри липосомы. В-третьих, доставка ИЛ в опухолевые клетки облегчается не только за счет специфического распознавания антигена-мишени, но также за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза, который может дополнительно повышать внутриклеточные уровни ЛС и обходить механизмы лекарственной устойчивости, такие как внутриклеточные насосы оттока ЛС и изменения внутриклеточного перемещения ЛС [4, 6].

Данный обзор посвящен характеристике основных структурных единиц ИЛ на основе анализа данных оригинальных и обзорных статей по теме исследования из баз PubMed, ResearchGate и КиберЛенинка.

СТРУКТУРА ИММУНОЛИПОСОМ

ИЛ представляют собой липосомы, к которым обычно посредством специального линкера прикреплены АТ, их фрагменты или иные лиганды (рисунок 1). Различают 3 типа ИЛ [7, 8]:

- тип А – АТ непосредственно конъюгировано с обычной липосомой;
- тип В – АТ конъюгируется с пегелированной липосомой посредством линкера;
- тип С – АТ непосредственно прикреплено к дистальному терминальному концу полиэтиленгликоля (ПЭГ), который находится на поверхности липосомы.

Первоначально ИЛ были получены путем гидрофобного взаимодействия АТ, специфически модифицированных гидрофобными остатками на поверхности простой непегелированной липосомы. Однако,

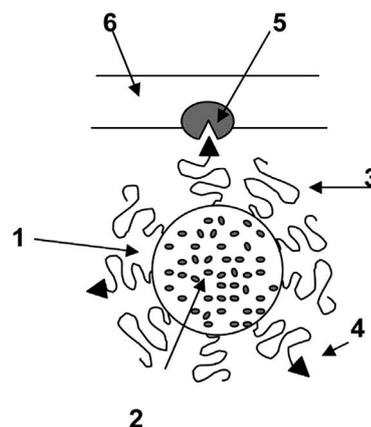


Рисунок 1. Схематическая структура ИЛ:

1 – липосома; 2 – ЛС; 3 – стерически защищающий полимер (обычно ПЭГ); 4 – нацеливающий лиганд, химически связанный с удаленными концами некоторых цепей привитого защитного полимера; 5 – специфический рецептор; 6 – клеточная мембрана (адаптировано по [9])

Figure 1. Schematic structure of immunoliposome:

1 – liposome; 2 – drug; 3 – sterically protecting polymer (usually PEG); 4 – targeting ligand chemically bound to the deleted ends of some chains with grafted protective polymer; 5 – specific receptor; 6 – cell membrane (adapted from [9])

несмотря на повышение эффективности нацеливания, ИЛ данного типа быстро выводились из крови и захватывались макрофагами, в первую очередь в печени. Более ранние попытки увеличить продолжительность циркуляции ИЛ были выполнены путем простой совместной иммобилизации АТ и ПЭГ на поверхности одной и той же липосомальной мембраны. Хотя молекулы ПЭГ могут стерически влиять на способность АТ распознавать антиген, было достигнуто значительное увеличение времени их циркуляции. Были разработаны многочисленные процедуры конъюгирования для прикрепления АТ к поверхности слоя ПЭГ в пегелированных липосомах так, что лиганд выходит за пределы плотного слоя ПЭГ, чтобы исключить стерические препятствия для связывания АТ с мишенью [1].

Вещества, доставляемые посредством иммунолипосом

В липосомы могут быть включены вещества различного происхождения – от низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот, и их комбинации, что позволяет применять их иммуноконъюгаты в диагностических, терапевтических и исследовательских целях. ИЛ используются в качестве носителей:

- противоопухолевых ЛВ, например, 5-фторурацила [10], рапамицина [11], панобиностата [12], оксалиплатина [13], паклитаксела [14], этопозиды [15], винорелбина [16];

- сердечно-сосудистых ЛВ — морруата натрия [17], изорбида мононитрата [18], антитромбина [19], окиси азота [20];
- противопротозойных препаратов – пиронаридина и атоваквона [21];
- генетического материала – миРНК [22], плазмидной ДНК [23], антисмыслового олигонуклеотида [24];
- визуализирующих молекул – кальцеина [25], гашеных флуорофоров [26], радионуклеидов [27];
- препаратов других групп – допамина [28], цитиколина [29], мочевины [30], индинавира [31].

На диаграмме (рисунок 2) представлено соотношение групп препаратов, доставляемых с помощью ИЛ.

ИЛ широко изучались при лечении опухолей. В доклинических исследованиях ИЛ, направленные на EGFR, HER2, GD2 и CD19, продемонстрировали способность повышать активность нецелевых липосомальных составов. Сравнительные исследования тканевого распределения ИЛ и нецелевых липосом в опухолевых ксенотрансплантатах мышей показали сходное интратуморальное накопление полезной нагрузки препарата и отсутствие существенных различий в фармакокинетике и биораспределении. Однако детальный анализ образцов опухоли выявил значительное поглощение ИЛ опухолевыми клетками, тогда как нецелевые липосомы накапливались преимущественно в резидентных макрофагах опухоли. В клинических условиях ИЛ показали значительные преимущества. Во-первых, с точки зрения обеспечения эффектов препарата ИЛ не только снижают дозировку лекарств, но также могут уменьшать или предотвращать побочные эффекты у пациента. Во-вторых, ИЛ могут быть использованы для разработки новых медицинских подходов и повышения эффективности используемых гидрофильных (с низкой способностью проникать через мембрану) макромолекул. В-третьих, могут воздействовать на опухоли и легко контролировать дозировку ЛВ. В настоящее время на клинических исследованиях находятся несколько иммунолипосомальных форм доксорубина, наце-

ленных на HER2 (MM-302), EGFR (anti-EGFR-IL-dox), на GAN-положительные раковые клетки желудка (MCC-465) и пролекарства доцетаксела, нацеленной на EphA2 (MM-310) (таблица 1) [18, 32–36].

Липиды, образующие липосомальный бислой

ИЛ могут быть получены из различных липидов. В липосомальных препаратах большую часть липидной композиции составляют фосфолипиды (ФЛ), которые могут происходить либо из природных источников (растительных и животных), либо могут быть синтезированы искусственно (таблица 2). Наиболее широко используемыми ФЛ в иммунолипосомальной конструкции являются фосфатидилхолины, поскольку являются основным компонентом клеточных мембран, что свидетельствует об их высокой биосовместимости. Фосфатидилхолины обладают большей гибкостью благодаря различным температурам плавления и содержат цвиттерсионные (при физиологическом pH) головные группы [37, 38].

Для получения заряженных ИЛ в состав включают катионный липид, например, 1,2-диолеоилокси-3-триметиламмоний-пропан хлорид (DOTAP) [39], O,O'-димиристил-N-лизил глутамат DMKE [40], который необходим для эффективной конденсации нуклеиновых кислот, и его ассоциации с липосомами. Различия в структуре катионных липидов сильно влияют на их эффективность трансфекции и токсичность. Так сложноэфирная связь в молекуле DOTAP легко метаболизируется, поэтому его токсичность ниже, чем у других катионных липидов, и что, вероятно, обуславливает наиболее частое использование данного липида при получении липосом [37].

Большинство липосомальных препаратов содержат *холестерин* из-за его уникальных свойств влиять на поведение других липидов, входящих в состав бислоя. В редких случаях применяют производные холестерина (таблица 2). Данный липид показывает более высокое сродство и, следовательно, большую тенденцию к конденсации и образованию упорядо-

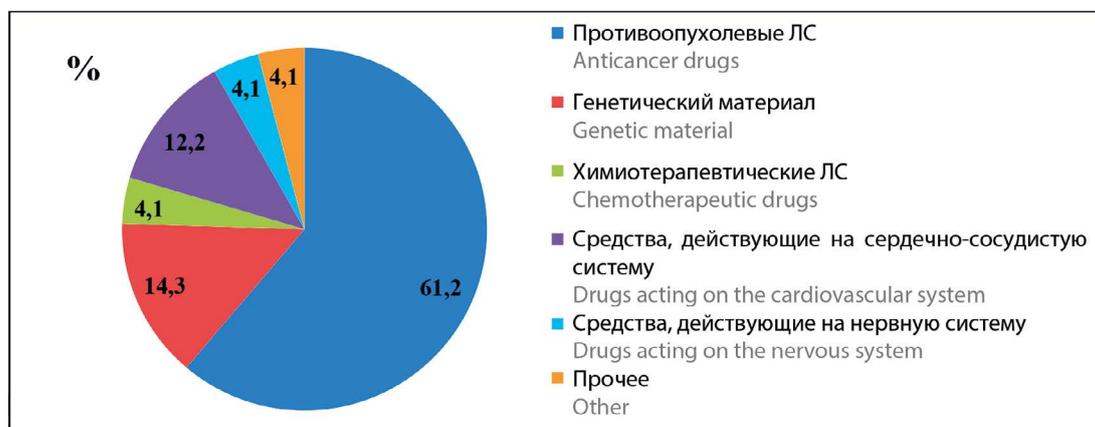


Рисунок 2. Распределение включаемых в ИЛ веществ по процентам

Figure 2. Percentage distribution of substances included in immunoliposomes

Таблица 1. Иммунолипосомальные препараты на клинических исследованиях

Table 1. Immunoliposomal preparations in clinical trials

Препарат The drug	Действующее вещество Active ingredient	Липидный состав Lipid composition	Антитело Antibody	Фаза Phase	Нозология Nosology	Локализация Localization
MCC-465	Доксорубицин Doxorubicin	<ul style="list-style-type: none"> 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин; холестерин; 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид(ПЭГ-2000)] 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; cholesterol; 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(PEG-2000)] 	Фрагмент F(ab') ₂ человеческого моноклонального антитела GAN F(ab') ₂ fragment of the human monoclonal antibody GAN	1	Рак желудка Stomach cancer	Япония Japan
MM-302	Доксорубицин Doxorubicin	<ul style="list-style-type: none"> гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин; холестерин; 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси-(ПЭГ-2000)] hydrogenated soybean phosphatidylcholine; cholesterol; 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy-(PEG-2000)] 	Трастузумаб Trastuzumab	2	Рак молочной железы Breast cancer	США USA
Anti-EGFR-ILs-dox (C225-ILs-dox)	Доксорубицин Doxorubicin	<ul style="list-style-type: none"> 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин; холестерин; 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(ПЭГ-2000)]; 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид(ПЭГ-2000)] 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, cholesterol, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(PEG-2000), 1,2-distearoil-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(PEG-2000)] 	Цетуксимаб Cetuximab	2	Рак молочной железы Breast cancer	Швейцария Switzerland
MM-310	Пролекарство доцетаксела Prodrug docetaxel	<ul style="list-style-type: none"> яичный сфингомиелин, холестерин, ПЭГ-дистеароилглицерин (PEG-DSG) egg sphingomyelin, cholesterol, PEG-distearoylglycerol (PEG-DSG) 	Одноцепочечный фрагмент антиэфрина A2 (scFv EphA2) Single-chain fragment of anti-efrin A2 (scFv EphA2)	1	Солидные опухоли Solid tumors	США USA

ченных бислоев к насыщенным ФЛ (например, DSPC), чем к ненасыщенным (DOPC). Холестерин повышает стабильность состава и снижает проницаемость бислоя для водорастворимых молекул, поскольку образует прочные водородные связи с соседними ФЛ и увеличивает общую конденсацию липидов [22, 37, 41, 42].

Липидный бислой ИЛ может быть образован одним или несколькими ФЛ как нейтрального, так и катионного типа. На основании анализа многообразия рецептов можно выделить несколько моделей липидной композиции липосом, которые отличаются числом используемых липидов и их соотношением:

- «ФЛ», например, ИЛ доцетаксела на основе SPC [43];
- «ФЛ + стерин» – DPPC : холестерин (13:5) [2], HSPC : холестерин (2:1) [44];

- «ФЛ1 + ФЛ2» – POPC : DMKE (91 : 5) [40], DPPC : DPPG (10:3) [31];
- «ФЛ1 + ФЛ2 + стерин» – DOPC : сфингомиелин : холестерин (31,67 : 31,67 : 3) [45], HSPC : DSPC : холестерин (4,37 : 1 : 0,3) [46];
- «ФЛ1 + ФЛ2 + ФЛ3 + стерин» – EPC : DPPC : DPPG : холестерин (27 : 42 : 8 : 15) [47].

Линкеры

Линкеры или якоря представляют собой ключевой компонент иммуноконъюгатов. «Идеальный» линкер должен не только обеспечивать стабильность во время циркуляции в крови, но также обеспечивать быстрое высвобождение эффекторной молекулы в зоне нацеливания. Различают 2 типа линкеров – не-

Таблица 2. Структурообразующие и стабилизирующие липиды бислоя ИЛ

Table 2. Structure-forming and stabilizing lipids of the immunoliposome bilayer

Класс Class	Группа Group	Примеры Examples	Концентрация в бислое, моль % Concentration in bilayer, mol %
Фосфолипиды Phospholipids	Природные, в том числе гидрогенизированные Natural, including hydrogenated	ЕРС – яичный фосфатидилхолин Egg phosphatidylcholine	27–75
		СПС – соевый фосфатидилхолин Soy phosphatidylcholine	37–100
		НСРС – гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин Hydrogenated soybean phosphatidylcholine	55–66
	Синтетические Synthetic	ДРРС – 1,2-дипальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	42–75
		ДОРС – 1,2-диолеоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	31–75
		ДСРС – 1,2-дистеароил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	15–70
		РОРС – 1-пальмитоил-2-олеоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine	5–93
		ДОРЕ – 1,2-диолеоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфоэтаноламин 1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine	48–50
		ДРРС – 1,2-дипальмитоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфо- <i>rac</i> -глицерол 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho- <i>rac</i> -glycerol	8–22
		ДСРС – 1,2-дистеароил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфо- <i>rac</i> -глицерол 1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho- <i>rac</i> -glycerol	4–5
	Катионные Cationic	ДОТАР – 1,2-диолеоилокси-3-триметиламмоний-пропан хлорид 1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium propane chloride	40–50
		ДМКЕ – О,О'-димиристил-N-лизил глутамат O,O'-dimyristyl-N-lysyl glutamate	5–48
	Сфинголипиды Sphingolipids	Сфингомиелин – N-ацил-сфингозин-1-фосфохолин N-acyl-sphingosine-1-phosphocholine	31–58
	Стерины Sterines	Холестерин Cholesterol	4–48
		Холестерилгемисукцинат Cholesterylhemisuccinate	48–49
3β-[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил] холестерин 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol		48–49	

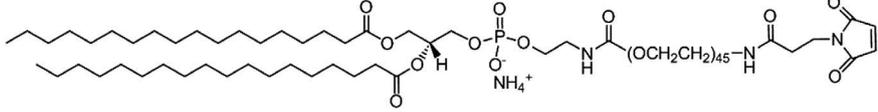
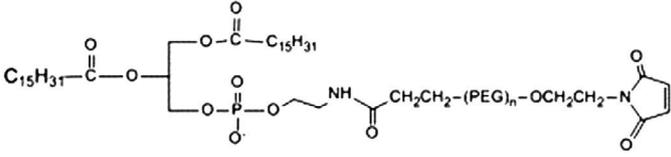
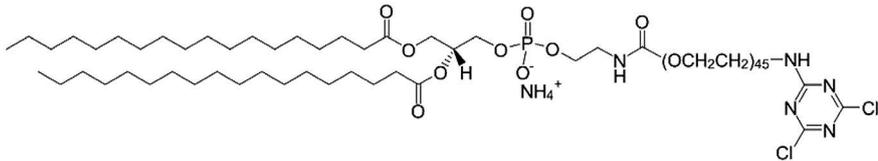
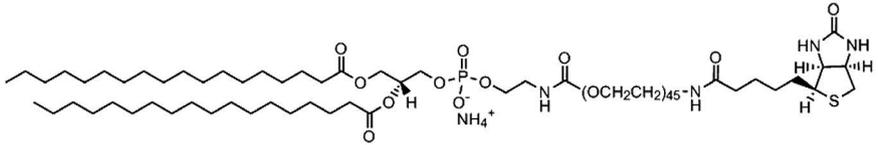
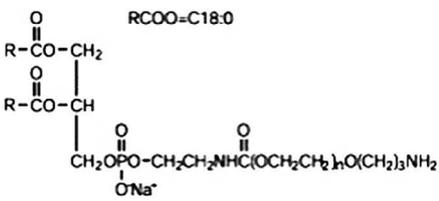
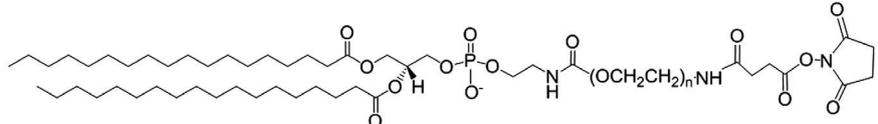
восстанавливаемые и восстанавливаемые. Невосстанавливаемые линкеры, такие как тиоэфир, стабильны в химической или ферментативной среде и высвобождают терапевтическую молекулу только после полной деградации АТ в лизосоме. Гидразоновые, пептидные и дисульфидные связи являются примерами восстанавливаемых линкеров, которые могут расщепляться внутриклеточно или внеклеточно в условиях пониженного рН или под действием гидролитических ферментов. Линкеры обычно составляют в липосомах 5–10 % от общего количества липидов [1, 48]. Примеры типов связывания липосом с линкером представлены на рисунке 3.

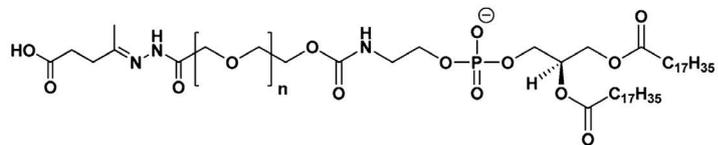
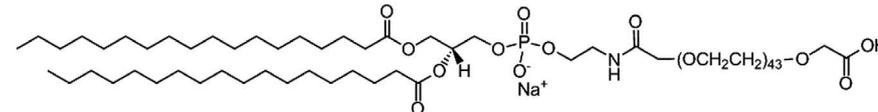
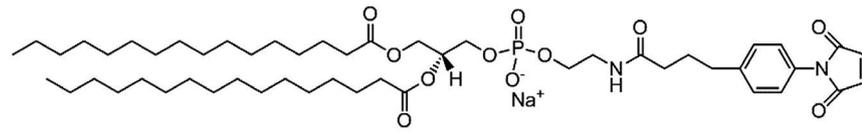
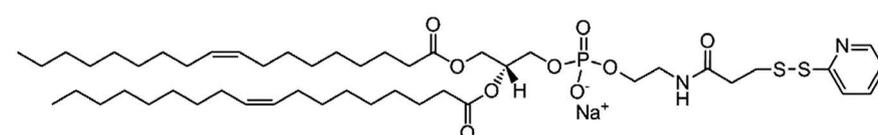
Для достижения селективной доставки с помощью пегелированных липосом нацеливающие лиганды должны быть прикреплены к нанонесителю через спейсерное плечо ПЭГ, так что лиганд выходит за пределы плотной оболочки ПЭГ, благодаря чему может беспрепятственно связываться с целевыми

рецепторами. Лиганды прикрепляются к активированному, контактирующему с водой концом привитой липосомой полимерной цепи. Для этой цели используют несколько типов функционализированных концевыми группами липополимеров обычно общей формулы X-PEG-LI, где X представляет собой фрагмент, содержащий реакционноспособную функциональную группу; LI – липид. Большинство функционализированных концевыми группами ПЭГ-липидов было синтезировано из гетеробифункциональных производных ПЭГ, содержащих гидроксильные и карбоксильные или аминогруппы (таблица 3). Пегелированные ФЛ имеют более длительное время циркуляции крови и более высокую стабильность для инкапсулированных лекарств. Эти липидные ПЭГ-конъюгаты демонстрируют превосходные амфифильные свойства и предлагают превосходные преимущества для модификации, формулирования и доставки ЛС с малыми и большими молекулами [49].

Таблица 3. Наиболее используемые линкеры при получении ИЛ

Table 3. The most used linkers in obtaining immunoliposomes

Линкер Linker	Формула Formula	Концентрация в липосоме, мол% Liposome concentration, mol%
Mal-PEG-DSPE	 <p>1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(PEG)-2000] (ammonium salt)</p>	0,01–20
Mal-PEG-DPPE	 <p>1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеимид (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(PEG)-2000] (ammonium salt)</p>	1,7–6,3
Cya-PEG-DSPE	 <p>1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[цианур (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[cyanur(PEG)-2000] (ammonium salt)</p>	5
Biotin-PEG-DSPE	 <p>1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[биотирил (ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(PEG)-2000] (ammonium salt)</p>	0,01
NH2-PEG-DSPE	 <p>1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(PEG)-2000] (ammonium salt)</p>	0,6–4,4
NHS-PEG-DSPE	 <p>1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[сукцинимидил (ПЭГ)-2000] 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[succinimidyl(PEG)-2000]</p>	-

Линкер Linker	Формула Formula	Концентрация в липосоме, мол% Liposome concentration, mol%
Hz-PEG-DSPE	 <p>1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[гидразид(ПЭГ)-2000] (соль аммония) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[hydrazide(PEG)-2000] (ammonium salt)</p>	1,7–2,5
Carboxylic Acid- PEG-DSPE	 <p>1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[карбоксы(ПЭГ)-2000] (натриевая соль) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy(PEG)-2000] (sodium salt)</p>	0,2–24,2
MPB-PE	 <p>1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[4-(п-малеими́дофенил)бутирамид] (натриевая соль) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl)butyramide] (sodium salt)</p>	1,75–8
PDP-PE	 <p>1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[3-(2-пиридилдитио)пропионат] (натриевая соль) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[3-(2-pyridyldithio)propionate] (sodium salt)</p>	5,26

Mal-PEG-DSPE¹ и **Mal-PEG-DPPE²** являются одними из реактивных производных пегилированного ФЛ, способных реагировать с сульфгидрильными группами (тиол, -SH). DSPE (1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин) – 18-углеродный ФЛ и DPPE – 16-ти углеродный насыщенный ФЛ обладают высокой гидрофобностью, а ПЭГ, с другой стороны, обеспечивает хорошую гидрофильность и растворимость

¹ DSPE PEG Maleimide, DSPE-PEG-MAL. DataSheet. Available at: <http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/Maleimide-PEG/Maleimide-PEG-DSPE/DSPE-PEG2000-Maleimide-2k.htm>. Accessed: 26.12.2021.

² DPPE PEG Maleimide, DPPE-PEG-Mal. DataSheet. Available at: <http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/Maleimide-PEG/DPPE-PEG-Maleimide/DPPE-PEG2000-Maleimide.htm>. Accessed: 26.12.2021.

в воде. Функционализированные малеимидом линкеры обладают превосходной реакционной способностью по отношению к сульфгидрильным/тиоловым группам, полученным из различных молекул, поскольку малеимидная группа более специфична для остатков SH, чем другие реактивные группы. Реакция между тиолом и малеимидными группами является одной из наиболее полезных и эффективных реакций в химии биоконъюгатов. Она протекает при pH, близком к нейтральному, при температуре окружающей среды, в течение короткого периода времени и часто приводит к удовлетворительному выходу конъюгатов, даже при относительно низких концентрациях реагирующих веществ. Хорошо известно, что частота встречаемости SH-групп в АТ или белках ограничена по сравнению с другими функциональ-

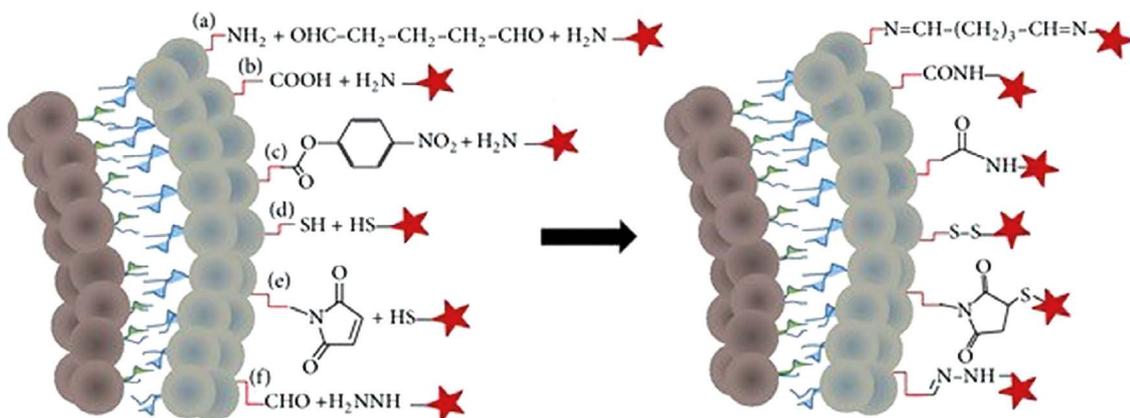


Рисунок 3. Схематическое изображение поперечного сечения липосомального бислоя, содержащего функциональные группы, для иллюстрации сшивания первичных аминов глутаральдегидом (а), образования карбониламинной связи (b), образования амидной связи в результате реакции *p*-нитрофенилкарбонила с первичным амином (с), образование дисульфидной связи (d), образование тиоэфирной связи в результате реакции присоединения малеимида к тиолу (е) и образование гидразоновой связи (f). Связанные лиганды обозначены красными звездочками (адаптировано по [48])

Figure 3. Schematic representation of the cross section of a liposomal bilayer containing functional groups to illustrate (a) glutaraldehyde crosslinking of primary amines, (b) carbonylamine bond formation, (c) amide bond formation resulting from the reaction of *p*-nitrophenylcarbonyl with primary amine, (d) disulfide bond formation, (e) thioether bond formation resulting from the attachment of maleimide to thiol, and (f) hydrazone bond formation. Binding ligands are indicated by red asterisks (adapted from [48])

ными группами, такими как амины или карбоксилаты. Использование SH-групп может модифицировать определенные участки в молекуле-мишени и такая модификация значительно повышает способность поддерживать активность после конъюгации, особенно в чувствительных белках, таких как ферменты. Таким образом, малеимид представляется особенно подходящим соединением для смешивания двух макромолекулярных образований. Mal-PEG-DSPE является наиболее часто используемым линкером (около 60–65 % рецептов) для конъюгирования АТ, пептидов или других лигандов к поверхности липосом и других липидных наночастиц. Однако стоит отметить, что использование модифицированного малеимидом липида, включенного в липосомы, мешает процедуре загрузки ЛВ. Также известно, что малеимид подвергается постепенной деградации в условиях, используемых во время приготовления липосом, определения размера и загрузки ЛВ. Поскольку малеимидная группа медленно гидролизует в водном растворе, важно выполнить конъюгацию АТ сразу после приготовления липосом, не давая ему возможности подвергнуться каким-либо побочным реакциям. Для блокирования свободных малеимидных групп ИЛ инкубируют с 0,5–1,0 мМ L-цистеином [14, 50–53].

Альтернативным линкером с малеимидной группой является **MPB-PE**, который в качестве фосфолипидной части содержит фосфоэтаноламин двух видов, различающихся жирными кислотами – пальмитиновой (16:0 MPB-PE) или олеиновой (18:1 MPB-PE), соединенный с малеимидной группой через короткий бутириловый спейсер. Для облегчения конъюгации

с MPB-липосомами АТ активируют, например, N-гидрокси-сукцинимидным эфиром 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты (SPDP) и затем восстанавливают дитиотреитолом (DTT). Также некоторые авторы указывают на использование производных янтарной кислоты для введения экзогенных тиоловых групп. Таким образом, необходимо спровоцировать реакцию донора группы -SH донора, такого как N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA) с АТ, который является более специфичным SH-реактивом. В этом случае атом серы вводится в виде тиоэфира, который легко разблокируется с помощью гидроксилamina. Эфирная терминальная группа NHS SATA вступает в реакцию с аминогруппами АТ с образованием стабильной амидной связи. Модифицированное АТ содержит защищенную SH-группу, благодаря чему не подвергается деградации и может длительно храниться. Поскольку присутствие этого амина не мешает последующему образованию дисульфидных и тиоэфирных связей, эти две реакции можно проводить в одном и том же сосуде без необходимости удаления гидроксилamina перед добавлением белка в липосому. Деацетилированный комплекс инкубируется с липосомами и, таким образом, функционализируется для распознавания и присоединения к мишени [25, 53–57].

PDP-PEG-DSPE¹ – производное пиридилдитиолпропионата (PDP), соединенного с пегилированным DSPE и способное с высокой эффективностью реагировать со свободными тиоловыми группами с обра-

¹ DSPE PEG PDP. DataSheet. Available at: <http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/DSPE-PEG/DSPE-PEG-PDP.htm>. Accessed: 26.12.2021.

зованием дисульфидной связи, которая может быть расщеплена восстановительными реагентами. PDP-PEG-DSPE легко включают в липосомы во время их формирования и пиридилдитиогруппы восстанавливают добавлением ДТТ. Для присоединения АТ к полученным липосомам их также тиолируют путем инкубирования при комнатной температуре с SPDP или N-сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)-бутиратом (SMPB). Таким образом, при использовании в качестве линкера соединения PDP-PEG-PE малеимидная группа прикрепляется к АТ, а не к поверхности липосомы, как в методах получения ИЛ с MPB-PE или Mal-PEG-DSPE. Инкубация везикул с малеимид-АТ приводит к эффективной конъюгации, даже когда содержание PDP-PEG-DSPE в липосомах ниже 1 моль%. Этот метод реализует многие из критериев, которые были желательны для идеальных ИЛ, включая простоту, высокую эффективность конъюгации, возможность достижения большого диапазона плотностей АТ на поверхности липосомы, эффективную загрузку ЛВ и медленную скорость его высвобождения, сохранение связывания с мишенью. Недостатком этого метода является то, что свободные тиоловые группы могут реагировать между собой с образованием дисульфидных связей, приводящих к перекрестному сшиванию молекул АТ или ИЛ, дополнительно способствуя их агрегации и более быстрому выведению из кровотока. Хотя присутствие ПЭГ служит для ингибирования агрегации в значительной степени. Кроме того, случайное введение тиоловых групп в молекулу АТ может влиять на биологические свойства молекулы, что приводит к нарушению связывания АТ с его рецептором, активации рецептора и/или эндоцитозу [6, 52, 58].

Cyanur-PEG-DSPE представляет собой функционализированный конъюгированным цианурхлоридом конъюгат «ПЭГ-ФЛ», используемый для присоединения пептидов, АТ и т. д. в мягких основных условиях. Белки могут быть связаны с этим мембранным якорем без необходимости предварительной дериватизации. Цианурхлорид представляет собой трехфункциональный реагент с четкой градацией реакционной способности. Первые два хлоридных замещения могут быть достигнуты при реакции с нуклеофилами в слабощелочных условиях, в следующих состояниях реакционная способность третьего хлорида сильно снижена. Хлорид циануровой кислоты подходит для связывания концевых гидроксильных групп ПЭГ с аминокруппами белков для получения систем нацеливания липосомальных ЛС, при этом результаты связывания сильно зависят от pH. При нейтральном pH 7 способность связывания АТ практически отсутствует. Повышение основных условий до pH 8,8 приводит к резкому увеличению эффективности связывания. pH 8,8 является оптимальным для реакции, поскольку более сильные щелочные условия показывают резко сниженные результаты связывания, что следует отнести к гидролитическому

разложению хлорида циануровой кислоты в сильно-щелочной среде [45, 59, 60].

Biotin-PEG-DSPE¹ является одним из функциональных фосфолипидных ПЭГ-производных, содержащий биотин и DSPE. Биотин – это биологически активная молекула, обладающая высокой аффинностью к авидину или стрептавидину. Система «биотин-стрептавидин» широко используется для обнаружения и очистки белков, нуклеиновых кислот и многих других биомолекул. Модифицированный биотин-линкер PEG-DSPE может быть включен в липосомы и другие наночастицы и, таким образом, использован для нацеливания и обнаружения авидина или стрептавидина, а также конъюгированных с ними субстратов. Для конъюгации АТ связывают с биотиновым линкером через стрептавидин, например, из *Streptomyces avidinii*. В нековалентном биотин-авидиновом методе авидин с его четырьмя сайтами связывания выполняет функцию перекрестного связывания биотинилированных АТ и биотинилированных липидов в липосомальной мембране [50, 60].

Амин-PEG-DSPE (NH₂-PEG-DSPE)² является производным пегилированного ФЛ, содержащий реактивную первичную аминокгруппу на конце ПЭГ. Для прикрепления АТ предварительно аминокгруппу линкера активируют по методу Курниса посредством обработки липосом гомобифункциональным сшивающим агентом бис[сульфосукцинимидил] субератом (BS3) и последующей очистки полученного конъюгата от не вступившего в реакцию BS3 с помощью гель-фильтрационной хроматографии. В альтернативном методе повышения реактивности АТ к группе -NH₂ к АТ добавляют 0,1 М раствор периодата натрия и инкубируют в защищенном от света месте для образования реактивных групп, например альдегидных [12, 61].

Hydrazide-PEG-DSPE³ – производное ПЭГ-ФЛ с карбонильной группой, которое может реагировать с альдегидными или кетонными группами, полученными из полисахаридов или гликопротеинов. ПЭГ между DSPE и гидразидом обеспечивает лучшую растворимость в воде, гибкую структуру линкера и повышенную стабильность. Гидразид легко вступает в реакцию с альдегидной группой, образуя стабильную гидрозонную связь, которая более стабильна, чем основание Шиффа, образующееся между альдегидом и аминокгруппой. Гидразидные связи – одна из эффективных кислотно-расщепляемых связей, используемых для связывания ЛВ с целевыми АТ в медицинской биотехнологии. Гидразидные связи стабильны

¹ DSPE PEG Biotin. DataSheet. Available at: http://www.nanocs.net/DSPE-PEG-Biotin-2k.htm?keyword=DSPE%20PEG%20Biotin&category_id=109&model=1. Accessed: 26.12.2021.

² DSPE PEG Amine, DSPE-PEG-NH₂. DataSheet. Available at: <http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/DSPE-PEG/DSPE-PEG-NH2.htm>. Accessed: 26.12.2021.

³ Hydrazide PEG DSPE. DataSheet. Available at: <http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/Hydrazide-PEG/DSPE-PEG-Hydrazide/Hydrazide-PEG-DSPE-2k.htm>. Accessed: 26.12.2021.

в физиологической среде, но быстро диссоциируют в кислой среде (например, лизосомах) клетки. Триггерное высвобождение лекарств в кислой среде полезно, поскольку эта среда хорошо коррелирует с окружающей средой раковых тканей, а применение чувствительных к кислоте липосом (pH-липосомы) оказалось эффективным при лечении рака. Реакция между гидразидом и альдегидом обеспечивает быструю и эффективную конъюгацию фосфолипидов с углеводами, гликопротеинами, АТ и ферментами. Конъюгирование иммуноглобулинов с использованием специфической реакционной способности их окисленных (периодатом натрия) углеводных остатков, как известно, дает активные аддукты. Это объясняется тем, что конъюгация происходит сайт-специфично через олигосахаридные фрагменты, расположенные на Fc-части молекулы гликопротеина, далеко от сайтов связывания антигена [54, 62–64].

COOH-PEG-DSPE¹ является одним из конъюгатов ПЭГ с ФЛ, которые могут реагировать с первичными аминогруппами. Процедура сочетания включает двухстадийную карбоимидную реакцию: после очистки липосом карбоксильную группу активируют добавлением N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (EDC) и N-гидроксисульфосукцинимидом (сульфо-NHS), смесь инкубируют при комнатной температуре и затем ультрацентрифугируют или хроматографируют для удаления избытка сшивающих реагентов. Промежуточный продукт на основе сложного эфира сульфо-NHS, реагирующего с амином, обладает достаточной стабильностью, чтобы обеспечить связывание с АТ [65, 66].

Также было введено другое амфифильное реакционноспособное производное ПЭГ **pNP-PEG-PE**, который легко адсорбируется на гидрофобных наночастицах или встраивается в липосомы и мицеллы через свой фосфолипидный остаток, и легко связывает соединение, содержащее аминогруппу, через свою подвергающуюся воздействию воды группу pNP [49].

Кроме фосфолипидсодержащих линкеров для конъюгирования АТ с липосомальной поверхностью также используют соединения из семейства связывающих липидов на основе холестеринавого якоря, различающихся полярностью, длиной цепи спейсерной единицы и составом (таблица 4). Холестерин, являясь основным компонентом биологических мембран, дешевле липидов, используемых для синтеза линкеров на основе ПЭГ, поэтому является привлекательной альтернативой DSPE или DPPE в качестве эффективного липидного якоря для получения ИЛ. Например, Kley et al. для прикрепления АТ против рецептора, содержащий домен вставки киназы, использовали O-(3-холестерил-оксикарбонил)пропионил-O'-m-малеимидобензоилтетраэтилен-гликоль

(**MCS-4**), который легко включается в бислои липосом и не влияет на их размер. При этом исследования по оптимизации процесса соединения показали, что тиолирование белков с помощью SATA или иминотиолана приводит к одинаковой эффективности конъюгации, и реакция протекает не более 2–4 ч. В другом исследовании для прикрепления цетуксимаба (C225) к липосомам использовали производное малеимидо-ПЭГ-холестерин (Mal-PEG-Chol). Синтез Mal-PEG-Chol из легкодоступных исходных материалов прост и эффективен. Группа малеимида в производном холестерина оказалась особенно полезной для конъюгации с фрагментами Fab, которые содержат свободную тиольную группу. Также, было установлено, что как АТ, так и их фрагменты могут быть легко связаны с Mal-PEG-Chol, а полученные биоконъюгаты АТ- или Fab-PEG-Chol эффективно включены в предварительно сформированные липосомы с получением ИЛ по стинсерционному методу [57, 67–69].

Антитела в иммунолипосомальной конструкции

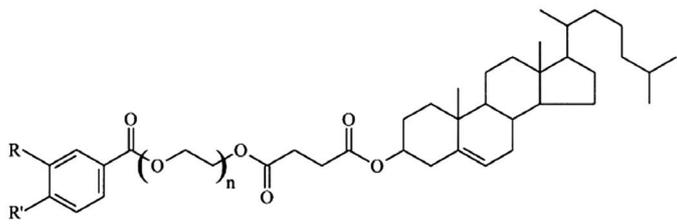
Несомненно, наиболее важным компонентом иммуноконъюгатов являются **АТ**. Используемое АТ должно усиливать накопление липосомального ЛС в целевых областях с минимальной перекрестной реактивностью со здоровыми тканями. Также может наблюдаться синергическая активность при сочетании сигнальных АТ с комбинациями противоопухолевых препаратов. На сегодняшний день большинством мишеней, вовлеченных в клинические испытания, являются антигены, ассоциированные с опухолью. Сюда входят антигены, сверхэкспрессированные в В-клетках (например, CD20, CD22, CD40, CD79), Т-клетках (CD25, CD30), клетках карциномы (HER2, EGFR, EpCAM, EphB2, PSMA, Cripto), эндотелиальных клетках (эндоглин), клетках стромы (белок, активированный фибробластами) и антигены сосудистой сети опухоли [1]. При приготовлении ИЛ используют готовые лекарственные препараты на основе моноклональных АТ, например, Трастузумаб®/Герцептин® [46, 70, 71], Цетуксимаб®/Эрбитукс® [10, 40, 72], панитумумаб [27], бевацизумаб [27]; коммерческие АТ, предназначенные для исследовательских целей [17, 23, 73], и синтезированные в лабораторных условиях АТ и их фрагменты [14, 18, 41].

Наряду с АТ для адресной доставки ЛВ используются нацеливающие пептиды, которые связываются со своим опухолевым антигеном-мишенью с высокой специфичностью. Аффинность связывания целевого пептида может быть такой же сильной, как и у АТ, и определяется последовательностью пептида. Нацеливающий пептид относительно стабилен и имеет более низкую иммуногенность в отличие от АТ, а также его легко конъюгировать с липосомами, поскольку является небольшой молекулой. Кроме того, производство АТ и их фрагментов, которые требуют экспрессии и очистки в биологических системах,

¹ DSPE PEG Acid, DSPE-PEG-COOH. DataSheet. Available at: <http://www.nanocs.net/Pegylation-reagents/DSPE-PEG/DSPE-PEG-COOH/DSPE-PEG2000-COOH.htm>. Accessed: 26.12.2021.

Таблица 4. Общая формула и примеры соединений из семейства связывающих липидов на основе холестеринавого якоря (адаптировано по [57, 69])

Table 4. General formula and examples of compounds from the cholesterol anchor lipid binding family (adapted from [57, 69])

				
Название соединения Name	Вставка Spacer	n	R	R'
m-MCS-1	Этиленгликоль Ethylene glycol	1	Малеимид Maleimido	H
m-MCS-4	Тетраэтиленгликоль Tetraethylene glycol	4	малеимид Maleimido	H
p-MCS-4	Тетраэтиленгликоль Tetraethylene glycol	4	H	Малеимид Maleimido
m-MCS-9	ПЭГ-400 PEG-400	9 (8–10)	Малеимид Maleimido	H
m-MCS-22	ПЭГ-1000 PEG-1000	22 (20–25)	Малеимид Maleimido	H

намного дороже, чем производство небольших лигандов и пептидов, которые могут быть синтезированы химическим путем, например, наиболее часто используемым методом твердофазного пептидного синтеза [74].

При разработке системы доставки необходимо учитывать некоторые вопросы [9]:

1. Лиганд (АТ, пептид или углевод), прикрепленный к поверхности носителя, может увеличивать скорость его поглощения ретикулоэндотелиальной системой, несмотря на присутствие стерически защищающих веществ (ПЭГ).
2. Несущие лиганд долго циркулирующие наноносители могут способствовать развитию нежелательного иммунного ответа (как было показано с повышением уровня антилипосомальных АТ), степень которого зависит от типа лиганда (небольшие пептиды или фрагменты АТ менее иммуногенны, чем целая молекула IgG) и липосомального состава.
3. Количество лиганда, прикрепленного к носителю, может иметь решающее значение для обеспечения успешного связывания с мишенью при сохранении расширенной циркуляции носителя.

АТ могут быть прикреплены к липосомам двумя основными способами – ковалентной конъюгации и постинсерционным методом.

Постинсерционный метод (метод «после вставки») включает связывание лигандов с концом ПЭГ-липидных производных в мицеллярной фазе с последующим зависящим от времени и температуры переносом связанных с лигандом ПЭГ-липидов в бислои, предварительно сформированных липосом с ЛС, посредством простой инкубации (рисунок 4). Это привлекательно с точки зрения производства, поскольку в уже готовые липосомы можно вставить ши-

рокий спектр лигандов, включая АТ, фрагменты АТ, пептиды, углеводы и т. д. Также это привлекательно с клинической точки зрения, потому что липосомы после вставки могут быть адаптированы с учетом как лекарственной чувствительности конкретного злокачественного новообразования, так и его рецептора или экспрессии антигена, что приводит к улучшению терапевтического эффекта. Получаемые конструкции удовлетворяют многим установленным критериям «идеальных иммунолипосом». Техника проста, может быть достигнут соответствующий уровень включения стабильного лиганда и метод не влияет на характеристики нагрузки или высвобождения ЛС из липосом [75].

Ковалентное конъюгирование АТ и конца ПЭГ, входящего в состав линкера, осуществляется за счет образования стабильной ковалентной связи, например через тиоэфир, амид, гидразон или другие. При этом АТ должно быть дериватизировано, чтобы быть связанным с липидными фрагментами. В одном из наиболее часто используемых методов дериватизации используется реагент Траута (2-иминотиолан), который генерирует тиоловые группы в АТ, обеспечивая ковалентную связь посредством реакции с малеимидом в линкере, включенного в липосомальный бислой (рисунок 5). Количество связавшихся АТ с липосомами зависит в основном от трех факторов: молярного процента линкера, включенного в липосомы; концентрации АТ и соотношения концентраций линкера и АТ в инкубационной смеси. Доказано, что количество АТ, связанного с липосомами, повышается с увеличением количества реактивных групп на поверхности везикул и концентрации АТ [76, 77].

Кроме того для прикрепления АТ могут быть использованы и другие подходы. Например, некоторые

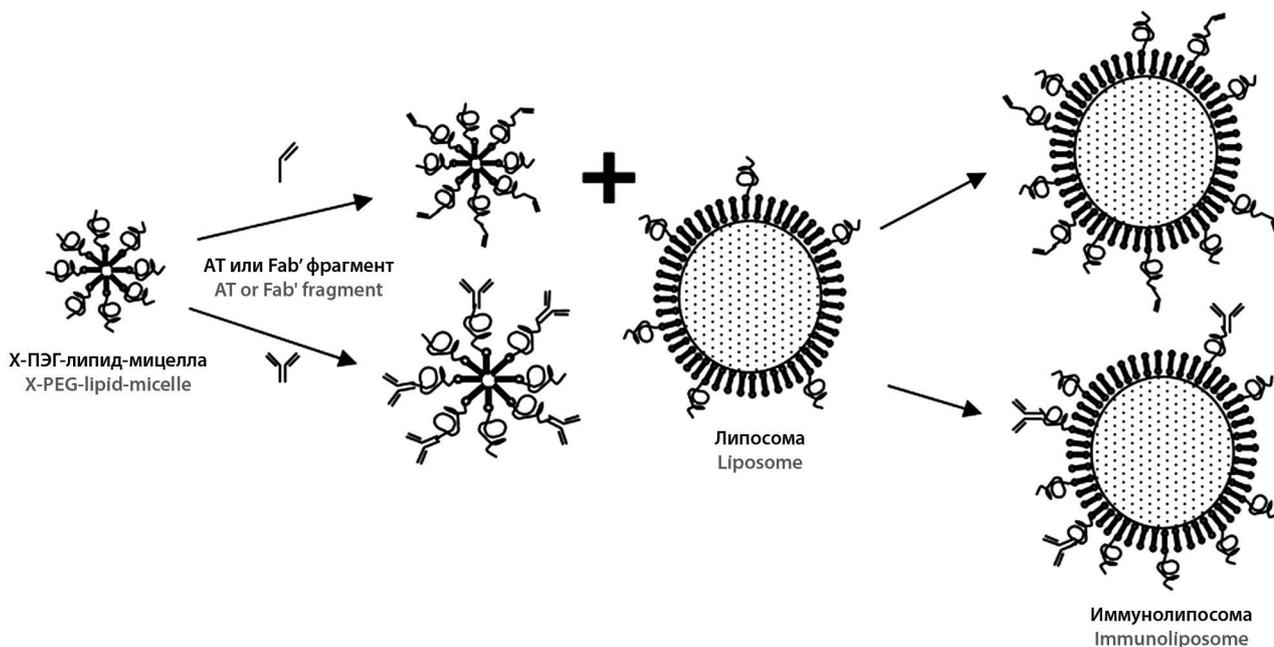


Рисунок 4. Схема получения ИЛ при использовании постинсерционного метода прикрепления АТ (адаптировано по [68])

Figure 4. Scheme of obtaining immunoliposomes using postinsertion method of antibody attachment (adapted from [68])

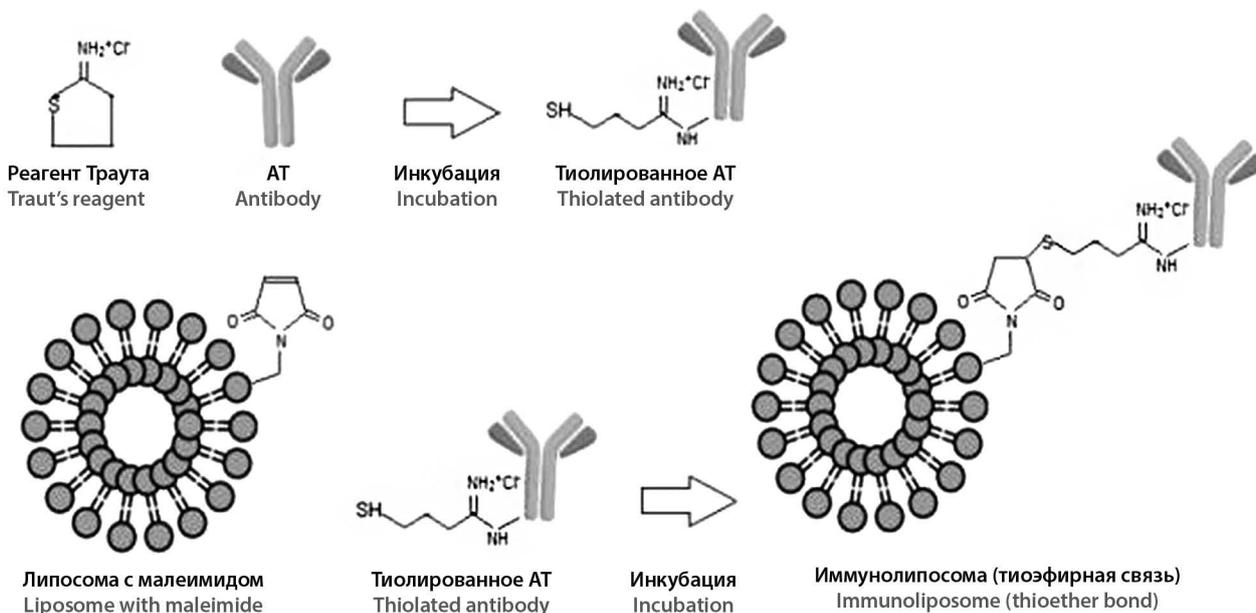


Рисунок 5. Тиолирование АТ и схема получения ИЛ методом конъюгирования (адаптировано по [76])

Figure 5. Thiolation of antibody and scheme of obtaining immunoliposomes by conjugation (adapted from [76])

авторы предложили инкубировать липосомальную дисперсию с АТ в среде 25 % раствора глутарового альдегида при температуре 20–25 °С в течение 10 мин. Затем избыток глутаральдегида удаляют диализом соевым раствором. Либо отдельно проводят инкубацию липосом с глутаральдегидом и после очистки в дисперсию вводят АТ [18, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модификация поверхности липосом путем прикрепления АТ или его фрагментов является рациональным подходом для улучшения целевого накопления ЛВ в патологических очагах с одновременной минимизацией его нежелательных побочных эффектов в здоровых тканях. ИЛ представляют уникаль-

ный класс системы доставки ЛВ, в структуре которого можно выделить нескольких основных частей – собственно липосома, линкер и нацеливающий лиганд или АТ. Именно выбор данных составляющих определяет фармацевтические и фармакокинетические характеристики и эффективность применения иммунолипосомального препарата. Результаты проведенного исследования позволили обобщить многообразие литературных данных о составе вспомогательных компонентов ИЛ и возможности их использования для достижения поставленной цели при разработке препарата.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Koshkaryev A., Sawant R., Deshpande M., Torchilin V. Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(1):24–35. DOI: 10.1016/j.addr.2012.08.009.
2. Opimah I. V. The Magic Bullet, or the birth of chemotherapy. *Medical Technologies. Assessment and Choice.* 2014;1:88–91. (In Russ.)
3. Cho H., Stuart J. M., Magid R., Danila D. C., Hunsaker T., Pinkhassik E., Hasty K. A. Theranostic immunoliposomes for osteoarthritis. *Nano-medicine.* 2014;10(3):619–627. DOI: 10.1016/j.nano.2013.09.004.
4. Janthur W. D., Cantoni N., Mamot C. Drug conjugates such as Antibody Drug Conjugates (ADCs), immunotoxins and immunoliposomes challenge daily clinical practice. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):16020–16045. DOI: 10.3390/ijms131216020.
5. Ng H. L., Lu A., Lin G., Qin L., Yang Z. The potential of liposomes with carbonic anhydrase IX to deliver anticancer ingredients to cancer cells in vivo. *Int J Mol Sci.* 2014;16(1):230–255. DOI: 10.3390/ijms16010230.
6. Sapra P., Allen T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res.* 2003;42(5):439–462. DOI: 10.1016/s0163-7827(03)00032-8.
7. Shapira J., Budman D., Bradley T., Gralla R. Evolving lipid-based delivery systems in the management of neoplastic disease. *Oncol. Rev.* 2009;3:113–124.
8. Riaz M. K., Riaz M. A., Zhang X., Lin C., Wong K. H., Chen X., Zhang G., Lu A., Yang Z. Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: a review. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):195. DOI: 10.3390/ijms19010195.
9. Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(3):431–444. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.09.026.
10. Petrilli R., Eloy J. O., Lopez R. F., Lee R. J. Cetuximab immunoliposomes enhance delivery of 5-FU to skin squamous carcinoma cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2017;17(2):301–308. DOI: 10.2174/1871520616666160526110913.
11. Gholizadeh S., Visweswaran G. R. R., Storm G., Hennink W. E., Kamps J. A. A. M., Kok R. J. E-selectin targeted immunoliposomes for rapamycin delivery to activated endothelial cells. *Int J Pharm.* 2018;548(2):759–770. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.027.
12. Jose G., Lu Y. J., Hung J. T., Yu A. L., Chen J. P. Co-delivery of CPT-11 and panobinostat with anti-GD2 antibody conjugated immunoliposomes for targeted combination chemotherapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3211. DOI: 10.3390/cancers12113211.
13. Wang F., Sun Y., Shi J. Programmed death-ligand 1 monoclonal antibody-linked immunoliposomes for synergistic efficacy of miR-130a and oxaliplatin in gastric cancers. *Nanomedicine (Lond).* 2019;14(13):1729–1744. DOI: 10.2217/nnm-2019-0073.
14. Khayrani A. C., Mahmud H., Oo A. K. K., Zahra M. H., Oze M., Du J., Alam M. J., Afify S. M., Quora H. A. A., Shigehiro T., Calle A. S., Okada N., Seno A., Fujita K., Hamada H., Seno Y., Mandai T., Seno M. Targeting ovarian cancer cells overexpressing CD44 with immunoliposomes encapsulating glycosylated paclitaxel. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1042. DOI: 10.3390/ijms20051042.
15. Brown B. S., Patanam T., Mobli K., Celia C., Zage P. E., Bean A. J., Tasciotti E. Etoposide-loaded immunoliposomes as active targeting agents for GD2-positive malignancies. *Cancer Biol Ther.* 2014;15(7):851–861. DOI: 10.4161/cbt.28875.
16. Mamot C., Drummond D. C., Noble C. O., Kallab V., Guo Z., Hong K., Kirpotin D. B., Park J. W. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs in vivo. *Cancer Res.* 2005;65(24):11631–11638. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1093.
17. Li X., Ren X., Liang J., Ma W., Wang Z., Yang Z. Delivery of sodium morrhuate to hemangioma endothelial cells using immunoliposomes conjugated with anti-VEGFR2/KDR antibody. *Int J Nano-medicine.* 2017;12:6963–6972. DOI: 10.2147/IJN.S144056.
18. Zhang Y., Zhao Y., Dong D., Li X., Li Z., Li S., Wang J. Effects of isosorbide mononitrate loaded nanoparticles conjugated with anti-*Staphylococcus aureus* α -toxin on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Exp Ther Med.* 2020;19(2):1267–1274. DOI: 10.3892/etm.2019.8344.
19. Asmal M., Whitney J. B., Luedemann C., Carville A., Steen R., Letvin N. L., Geiben-Lynn R. In vivo anti-HIV activity of the heparin-activated serine protease inhibitor antithrombin III encapsulated in lymph-targeting immunoliposomes. *PLoS One.* 2012;7(11):e48234. DOI: 10.1371/journal.pone.0048234.
20. Kim H., Kee P. H., Rim Y., Moody M. R., Klegerman M. E., Vela D., Huang S. L., McPherson D. D., Laing S. T. Nitric oxide improves molecular imaging of inflammatory atheroma using targeted echogenic immunoliposomes. *Atherosclerosis.* 2013;231(2):252–260. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.09.026.
21. Biosca A., Dirscherl L., Moles E., Imperial S., Fernández-Busquets X. An immunoPEGliposome for targeted antimalarial combination therapy at the nanoscale. *Pharmaceutics.* 2019;11(7):341. DOI: 10.3390/pharmaceutics11070341.
22. Khan A., Aljarbou A. N., Aldebari Y. H., Allemmailm K. S., Al-sahl M. A., Khan S., Alruwetei A. M., Khan M. A. Fatty acid synthase (FASN) siRNA-encapsulated-Her-2 targeted Fab'-immunoliposomes for gene silencing in breast cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:5575–5589. DOI: 10.2147/IJN.S256022.
23. Zhuo H., Zheng B., Liu J., Huang Y., Wang H., Zheng D., Mao N., Meng J., Zhou S., Zhong L., Zhao Y. Efficient targeted tumor imaging and secreted endostatin gene delivery by anti-CD105 immunoliposomes. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):42. DOI: 10.1186/s13046-018-0712-8.
24. Sicard G., Paris C., Giacometti S., Rodallec A., Ciccolini J., Rocchi P., Fanciullino R. Enhanced antisense oligonucleotide delivery using cationic liposomes grafted with trastuzumab: a proof-of-concept study in prostate cancer. *Pharmaceutics.* 2020;12(12):1166. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121166.
25. Laing S. T., Kim H., Kopechek J. A., Parikh D., Huang S., Klegerman M. E., Holland C. K., McPherson D. D. Ultrasound-mediated delivery of echogenic immunoliposomes to porcine vascular smooth muscle cells in vivo. *J Liposome Res.* 2010;20(2):160–167. DOI: 10.3109/08982100903218918.
26. Burks S. R., Macedo L. F., Barth E. D., Tkaczuk K. H., Martin S. S., Rosen G. M., Halpern H. J., Brodie A. M., Kao J. P. Anti-HER2 immunoliposomes for selective delivery of electron paramagnetic resonance imaging probes to HER2-overexpressing breast tumor cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;124(1):121–131. DOI: 10.1007/s10549-009-0715-4.
27. Li S., Goins B., Hrycushko B. A., Phillips W. T., Bao A. Feasibility of eradication of breast cancer cells remaining in postlumpectomy cavity and draining lymph nodes following intracavitary injection of radioactive immunoliposomes. *Mol Pharm.* 2012;9(9):2513–2522. DOI: 10.1021/mp300132f.
28. Kang Y. S., Jung H. J., Oh J. S., Song D. Y. Use of PEGylated immunoliposomes to deliver dopamine across the blood-brain barrier in a rat model of parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther.* 2016;22(10):817–823. DOI: 10.1111/cns.12580.
29. Agulla J., Brea D., Campos F., Sobrino T., Argibay B., Al-Soufi W., Blanco M., Castillo J., Ramos-Cabrer P. In vivo theranostics at the peri-infarct region in cerebral ischemia. *Theranostics.* 2013;4(1):90–105. DOI: 10.7150/thno.7088.

30. Wang Z., Li J., Xu X., Duan X., Cao G. Urea immunoliposome inhibits human vascular endothelial cell proliferation for hemangioma treatment. *World J Surg Oncol.* 2013;11:300. DOI: 10.1186/1477-7819-11-300.
31. Gagné J. F., Désormeaux A., Perron S., Tremblay M. J., Bergeron M. G. Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1558(2):198–210. DOI: 10.1016/s0005-2736(01)00432-1.
32. Matsumura Y., Gotoh M., Muro K., Yamada Y., Shirao K., Shimada Y., Okuwa M., Matsumoto S., Miyata Y., Ohkura H., Chin K., Baba S., Yamao T., Kannami A., Takamatsu Y., Ito K., Takahashi K. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(3):517–525. DOI: 10.1093/annonc/mdh092.
33. Miller K., Cortes J., Hurvitz S. A., Krop I. E., Tripathy D., Verma S., Riahi K., Reynolds J. G., Wickham T. J., Molnar I., Yardley D. A. HERMIONE: a randomized Phase 2 trial of MM-302 plus trastuzumab versus chemotherapy of physician's choice plus trastuzumab in patients with previously treated, anthracycline-naïve, HER2-positive, locally advanced/metastatic breast cancer. *BMC Cancer.* 2016;16:352. DOI: 10.1186/s12885-016-2385-z.
34. Mamot C., Ritschard R., Wicki A., Stehle G., Dieterle T., Bubendorf L., Hilker C., Deuster S., Herrmann R., Rochlitz C. Tolerability, safety, pharmacokinetics, and efficacy of doxorubicin-loaded anti-EGFR immunoliposomes in advanced solid tumours: a phase 1 dose-escalation study. *Lancet Oncol.* 2012;13(12):1234–1241. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70476-X.
35. Damelin M., editor. Innovations for next-generation antibody-drug conjugates. Switzerland: Humana Press; 2018. 357 p. DOI: 10.1007/978-3-319-78154-9.
36. Ernstoff M. S., Ma W. W., Yung-Chin T. F., Munster P. N., Zhang T., Kamoun W., Pipas J. M., Chen S., Santillana S., Askoxylakis V. A phase 1 study evaluating the safety, pharmacology and preliminary activity of MM-310 in patients with solid tumors. *Journal of clinical oncology.* 2018;36(15):TPS2604–TPS2604.
37. Juskiewicz K., Sikorski A. F., Czogalla A. Building blocks to design liposomal delivery systems. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9559. DOI: 10.3390/ijms21249559.
38. van Hoogevest P., Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014;116(9):1088–1107. DOI: 10.1002/ejlt.201400219.
39. Yang F., Zheng Z., Zheng L., Qin J., Li H., Xue X., Gao J., Fang G. SATB1 siRNA-encapsulated immunoliposomes conjugated with CD44 antibodies target and eliminate gastric cancer-initiating cells. *Onco Targets Ther.* 2018;11:6811–6825. DOI: 10.2147/OTT.S182437.
40. Kim J. S., Kim M. W., Kang S. J., Jeong H. Y., Park S. I., Lee Y. K., Kim H. S., Kim K. S., Park Y. S. Tumor-specific delivery of therapeutic siRNAs by anti-EGFR immunonanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:4817–4830. DOI: 10.2147/IJN.S161932.
41. Khantasup K., Kopermsub P., Chaichoun K., Dharakul T. Targeted small interfering RNA-immunoliposomes as a promising therapeutic agent against highly pathogenic Avian Influenza A (H5N1) virus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(5):2816–2824. DOI: 10.1128/AAC.02768-13.
42. Ruwizhi N., Aderibigbe B. A. The efficacy of cholesterol-based carriers in drug delivery. *Molecules.* 2020;25(18):4330. DOI: 10.3390/molecules25184330.
43. Wong B. C., Zhang H., Qin L., Chen H., Fang C., Lu A., Yang Z. Carbonic anhydrase IX-directed immunoliposomes for targeted drug delivery to human lung cancer cells in vitro. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8:993–1001. DOI: 10.2147/DDDT.S63235.
44. Zheng Z., Ji H., Zong W., Ran Q., Wang X., Yang X., Zhao Z., Yang C., Xiao Y. Construction and characterization of immunoliposomes targeting fibroblast growth factor receptor 3. *AMB Express.* 2019;9(1):150. DOI: 10.1186/s13568-019-0875-5.
45. Kheradmandi M., Ackers I., Burdick M. M., Malgor R., Farnoud A. M. Targeting dysfunctional vascular endothelial cells using immunoliposomes under flow conditions. *Cell Mol Bioeng.* 2020;13(3):189–199. DOI: 10.1007/s12195-020-00616-1.
46. Matuszewicz L., Podkalicka J., Sikorski A. F. Immunoliposomes with simvastatin as a potential therapeutic in treatment of breast cancer cells overexpressing HER2-An in vitro study. *Cancers (Basel).* 2018;10(11):418. DOI: 10.3390/cancers10110418.
47. Kim H., Kee P. H., Rim Y., Moody M. R., Klegerman M. E., Vela D., Huang S. L., McPherson D. D., Laing S. T. Nitric oxide-enhanced molecular imaging of atheroma using vascular cellular adhesion molecule 1-targeted echogenic immunoliposomes. *Ultrasound Med Biol.* 2015;41(6):1701–1710. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.02.002.
48. Marqués-Gallego P., de Kroon A. I. Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. *Biomed Res Int.* 2014;2014:129458. DOI: 10.1155/2014/129458.
49. Torchilin V. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(3):431–444. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.09.026.
50. Loureiro J. A., Gomes B., Coelho M. A., do Carmo Pereira M., Rocha S. Immunoliposomes doubly targeted to transferrin receptor and to α -synuclein. *Future Sci OA.* 2015;1(4):FSO71. DOI: 10.4155/fso.15.71.
51. Merino M., Lozano T., Casares N., Lana H., Troconiz I. F., Ten Hagen T. L. M., Kochan G., Berraondo P., Zalba S., Garrido M. J. Dual activity of PD-L1 targeted Doxorubicin immunoliposomes promoted an enhanced efficacy of the antitumor immune response in melanoma murine model. *J Nanobiotechnology.* 2021;19(1):102. DOI: 10.1186/s12951-021-00846-z.
52. Allen T. M., Brandeis E., Hansen C. B., Kao G. Y., Zalipsky S. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1237(2):99–108. DOI: 10.1016/0005-2736(95)00085-h.
53. Cózar-Bernal M. J., García-Esteban E., Sánchez-Soto P. J., Rabasco A. M., González-Rodríguez M. L. Surface functionalizing of a lipid nanosystem to promote brain targeting: step-by-step design and physico-chemical characterization. *Pharm Dev Technol.* 2016;21(7):823–831. DOI: 10.3109/10837450.2015.1063651.
54. Koning G. A., Morselt H. W., Velinova M. J., Donga J., Gorter A., Allen T. M., Zalipsky S., Kamps J. A., Scherphof G. L. Selective transfer of a lipophilic prodrug of 5-fluorodeoxyuridine from immunoliposomes to colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1420(1–2):153–167. DOI: 10.1016/s0005-2736(99)00091-7.
55. Xu L., Huang C. C., Huang W., Tang W. H., Rait A., Yin Y. Z., Cruz I., Xiang L. M., Pirolo K. F., Chang E. H. Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(5):337–346.
56. Kim H., Moody M. R., Laing S. T., Kee P. H., Huang S. L., Klegerman M. E., McPherson D. D. In vivo volumetric intravascular ultrasound visualization of early/inflammatory arterial atheroma using targeted echogenic immunoliposomes. *Invest Radiol.* 2010;45(10):685–691. DOI: 10.1097/RLI.0b013e3181ee5b5d.
57. Fleiner M., Benzinger P., Fichert T., Massing U. Studies on protein-liposome coupling using novel thiol-reactive coupling lipids: influence of spacer length and polarity. *Bioconjug Chem.* 2001;12(4):470–475. DOI: 10.1021/bc000101m.
58. Mercadal M., Carrion C., Domingo J. C., Petriz J., Garcia J., de Madariaga M. A. Preparation of immunoliposomes directed against CD34 antigen as target. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1371(1):17–23. DOI: 10.1016/s0005-2736(98)00021-2.
59. Gosk S., Moos T., Gottstein C., Bendas G. VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(4):854–863. DOI: 10.1016/j.bbmem.2007.12.021.
60. Bendas G., Krause A., Bakowsky U., Vogel J., Rothe U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *International journal of pharmaceuticals.* 1999;181:79–93. DOI: 10.1016/s0378-5173(99)00002-2.
61. Liang B., Shahbaz M., Wang Y., Gao H., Fang R., Niu Z., Liu S., Wang B., Sun Q., Niu W., Liu E., Wang J., Niu J. Integrin β 6-targeted immunoliposomes mediate tumor-specific drug delivery and enhance therapeutic efficacy in colon carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):1183–1195. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1194.
62. Harding J. A., Engbers C. M., Newman M. S., Goldstein N. I., Zalipsky S. Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1327(2):181–192. DOI: 10.1016/s0005-2736(97)00056-4.

63. Koren E., Apte A., Jani A., Torchilin V.P. Multifunctional PEGylated 2C5-immunoliposomes containing pH-sensitive bonds and TAT peptide for enhanced tumor cell internalization and cytotoxicity. *J Control Release*. 2012;160(2):264–273. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.12.002.
64. Kumar P., Huo P., Liu B. Formulation strategies for folate-targeted liposomes and their biomedical applications. *Pharmaceutics*. 2019;11(8):381. DOI: 10.3390/pharmaceutics11080381.
65. Viswanathan S., Rani C., Delerue-Matos C. Ultrasensitive detection of ovarian cancer marker using immunoliposomes and gold nanoelectrodes. *Anal Chim Acta*. 2012;726:79–84. DOI: 10.1016/j.aca.2012.03.025.
66. Scavo M. P., Cutrignelli A., Depalo N., Fanizza E., Laquintana V., Gasparini G., Giannelli G., Denora N. Effectiveness of a controlled 5-FU delivery based on FZD10 antibody-conjugated liposomes in colorectal cancer in vitro models. *Pharmaceutics*. 2020;12(7):650. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070650.
67. Benzinger P., Martiny-Baron G., Reusch P., Siemeister G., Kley J. T., Marmé D., Unger C., Massing U. Targeting of endothelial KDR receptors with 3G2 immunoliposomes in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1466(1–2):71–78. DOI: 10.1016/s0005-2736(00)00172-3.
68. Pan X., Wu G., Yang W., Barth R. F., Tjarks W., Lee R. J. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR. *Bioconjug Chem*. 2007;18(1):101–108. DOI: 10.1021/bc060174r.
69. Kley J., Fichert T., Massing U. Synthesis of novel thiol-reactive amphiphilic lipids based on cholesterol for protein-liposome coupling. *Monatshefte fuer Chemie*. 1998;129:319–327. <https://doi.org/10.1007/PL000000090>.
70. Asadpour O., Rahbarizadeh F. Phospholipase-Cy1 signaling protein down-regulation by oligoclonal-VHHs based immuno-liposome: a potent metastasis deterrent in HER2 positive breast cancer cells. *Cell J*. 2020;22(1):30–39. DOI: 10.22074/cellj.2020.6704.
71. Shigehiro T., Kasai T., Murakami M., Sekhar S. C., Tominaga Y., Okada M., Kudoh T., Mizutani A., Murakami H., Salomon D. S., Mikuni K., Mandai T., Hamada H., Seno M. Efficient drug delivery of Paclitaxel glycoside: a novel solubility gradient encapsulation into liposomes coupled with immunoliposomes preparation. *PLoS One*. 2014;9(9):e107976. DOI: 10.1371/journal.pone.0107976.
72. Cortese K., Marconi S., Aiello C., Gagliani M. C., Pilato S., Zappacosta R., Fontana A., Castagnola P. Liposomes loaded with the proteasome inhibitor Z-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal are effective in inducing apoptosis in colorectal cancer cell lines. *Membranes (Basel)*. 2020;10(5):91. DOI: 10.3390/membranes10050091.
73. Gholizadeh S., Dolman E. M., Wieriks R., Sparidans R. W., Heninck W. E., Kok R. J. Anti-GD2 immunoliposomes for targeted delivery of the survivin inhibitor sepantronium bromide (YM155) to neuroblastoma tumor cells. *Pharm Res*. 2018;35(4):85. DOI: 10.1007/s11095-018-2373-x.
74. Ueno S., Kim M. W., Lee G., Park Y. I., Niidome T., Lee R. Development of ErbB2-targeting liposomes for enhancing drug delivery to ErbB2-positive breast cancer. *Pharmaceutics*. 2020;12(6):585. DOI: 10.3390/pharmaceutics12060585.
75. Iden D. L., Allen T. M. In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1513(2):207–216. DOI: 10.1016/s0005-2736(01)00357-1.
76. Eloy J. O., Petrilli R., Brueggemeier R. W., Marchetti J. M., Lee R. J. Rapamycin-loaded immunoliposomes functionalized with trastuzumab: a strategy to enhance cytotoxicity to HER2-positive breast cancer cells. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(1):48–56.
77. Mercadal M., Domingo J. C., Petriz J., Garcia J., de Madariaga M. A. Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glycol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1509(1–2):299–310. DOI: 10.1016/s0005-2736(00)00305-9.