

# Anti-HER2 免疫脂质体的制备及其 靶向特异性的检测<sup>1</sup>

崔 潇,马亚平,张亚柯,李 英,张芳霞,王 瑞

(聊城大学 药学院, 山东 聊城 252059)

**摘要** 目的 将靶向 HER2 过表达细胞的 HER2 抗体偶联在纳米脂质体上,探索抗体偶联脂质体的方法。方法 通过乙醇注入法制备脂质体,表面修饰 HER2 抗体,成功制备 Anti-HER2 免疫脂质体;由 SDS-PAGE 电泳检测抗体偶联脂质体的连接效率;通过 MTT 检测免疫脂质体对乳腺癌细胞的细胞毒性;采用共聚焦显微镜和流式细胞技术检测免疫脂质体对乳腺癌细胞的靶向特异性。结果 粒径分析表明制备的空白脂质体与 Anti-HER2 免疫脂质体粒径均在 100-135 nm 之间;SDS-PAGE 电泳显示 HER2 抗体与脂质体的连接效率为 40%左右;MTT 检测表明制备的免疫脂质体具有低细胞毒性;共聚焦显微镜和流式细胞仪检测结果均显示, Anti-HER2 免疫脂质体对 HER2 阳性细胞具有明显的靶向特异性。结论 通过两种聚乙二醇连接方法成功制备了 Anti-HER2 免疫脂质体,数据表明 DSPE-PEG2000-NHS(二硬脂酰磷脂酰乙酰胺-聚乙二醇 2000-N-羟基丁二酰亚胺)连接方式效率更高。

**关键词** 免疫脂质体;HER2 抗体;特异性靶向

**中图分类号** R943;R96

**文献标识码** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Prototype HER2 Immunoliposome and Characterization of Its Targeting Specificity

CUI Xiao, MA Yaping, ZHANG Yake, LI Ying, ZHANG Fangxia, WANG Rui

(School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

**Abstract Objective:** HER2 antibodies targeting HER2 overexpression cells were coupled to nano-liposomes to explore the method of antibody coupling liposomes. **Methods:** Liposomes were prepared by ethanol injection. HER2 antibody was modified on the surface of liposomes, and Anti-HER2 immunoliposomes were successfully prepared. The connection efficiency of antibody-coupled liposomes was detected by SDS-PAGE electrophoresis, the cytotoxicity of immunoliposomes to breast cancer cells was detected by MTT, and the targeting specificity of immune liposomes to breast cancer cells was detected by confocal microscope and flow cytometry. **Result:** Particle size analysis showed that the average particle sizes of blank liposomes and Anti-HER2 immunoliposomes were between 100-135 nm. SDS-PAGE electrophoresis showed that the binding efficiency of HER2 antibody to liposome was about 40%. MTT detection showed that the prepared

收稿日期:2020-08-02

基金项目:国家自然科学基金项目(31401217,81402512);大学生创新创业训练计划(201910447910)资助

通讯作者:王瑞,女,汉族,博士,副教授,研究方向:药物制剂与肿瘤免疫微环境, E-mail: wrbest43@163.com.

immunoliposomes had low cytotoxicity. Confocal microscopy and flow cytometry showed that Anti-HER2 modified immunoliposomes had obvious targeting specificity to HER2 positive cells. Conclusion: Anti-HER2 immunoliposomes were successfully prepared by two polyethylene glycol linking methods. The data showed that N-hydroxysuccinimide modified PEGylated liposomes was more efficient.

**Key words** immunoliposome; anti-HER2; targeting specificity

## 0 引言

纳米医学具有提高药物功效、降低毒性、优化药物特性、递送生物大分子药物和克服肿瘤驱动的免疫抑制信号等独特特征<sup>[1]</sup>,在解决诸如单克隆抗体等生物制剂的缺点方面具有巨大潜力<sup>[2]</sup>。脂质体作为第一类获得临床批准用于癌症治疗的治疗性纳米粒,因其良好的生物相容性、高效的给药途径和保护抗体不被降解的能力而备受关注。脂质体已被证明是能使多种药物有效传递到靶细胞的载体<sup>[3]</sup>,药物与脂质体结合可以显著改善药物的药代动力学,使药物毒性降低和治疗效果提高<sup>[4,5]</sup>,因此脂质体制剂在抗肿瘤药物传递方面具有广阔的发展前景。据报道,聚乙二醇(PEG)通过被动靶向机制以及增强的渗透性和保留 EPR 效应自发积累在实体肿瘤中<sup>[6]</sup>,因此脂质体的表面可以用柔性的亲水性聚合物如聚乙二醇(PEG)进行改性,从而克服传统脂质体在网状内皮系统(RES)中被快速清除的缺点。

在纳米医学领域,主动靶向是克服低选择性和全身毒性,提高治疗效果的重要策略<sup>[7,8]</sup>。具有可控和靶向功能的药物传递装置可以理想地将高剂量的治疗剂特异性地传递给病变细胞,减少对健康细胞的干扰,从而产生预期的药代动力学和生物分布,达到更高的治疗效果和更少的副作用。人们对各种先进的靶向策略的开发有持续的兴趣,其中配体偶联的纳米颗粒<sup>[9]</sup>(包括软纳米颗粒如胶束和脂质体,固体纳米颗粒如可生物降解聚合物)可能是各种靶向中最有前景的聚合物纳米粒子,能够将疏水性药物溶解在聚合物基体中<sup>[10,11]</sup>,解决药物溶解性问题,同时具有稳定性高、药物负载效率高、药物持续释放、血液循环时间延长、癌细胞靶向空间活跃等优点<sup>[12]</sup>。

HER2(人表皮生长因子受体-2)是一种 185 KD 跨膜糖蛋白,具有胞内酪氨酸激酶结构域和胞外配体结合域,参与细胞分化等重要阶段。HER2 作为一个细胞存活的关键基因,过表达可导致恶性肿瘤进展与乳腺癌、卵巢癌、胃癌、前列腺癌的预后不良<sup>[13]</sup>。大约 25% 的乳腺癌中存在 HER2 的过度表达,由于其具有耐药性,导致曲妥珠抗体直接使用临床疗效不佳<sup>[14]</sup>,而空间稳定的脂质体可以增加血液循环时间,通过抗体修饰可以选择性地将胶囊药物输送到 HER2 过度表达的癌细胞<sup>[15]</sup>,因此 Anti-HER2 免疫脂质体是一种靶向给药治疗 HER2 过度表达癌症很有前途的策略。本文主要优化并对比了两种不同的聚乙二醇连接方法,相较之前常见的 DSPE-PEG2000-Mal 连接方法,DSPE-PEG2000-NHS 连接方法更为简单、高效,为今后靶向药物的研究提供一种更简单、高效的免疫脂质体的制备方法。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 材料

MCF-7 细胞(HER2 表达阴性细胞系,HER2<sup>-</sup> cell)和 SKOV-3 细胞(HER2 表达阳性细胞系,HER2<sup>+</sup> cell)购买于美国标准生物制品收藏中心(ATCC),细胞培养基 RPMI-1640、DMEM 培养基、胎牛血清购买于美国 Thermo Fisher Scientific(GIBCO)公司;氢化卵磷脂、DSPE-mPEG2000(二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000)、DSPE-PEG2000-Mal(磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺)、DSPE-PEG2000-NHS(二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-N-羟基丁二酰亚胺)、Cy5-PEG2000-DSPE(近红外染料 Cy5-聚乙二醇-磷脂)购买于西安瑞禧公司;胆固醇、2-IT(2-Iminothiolane HCL)购买于 Sigma 公司;HER2 单克隆抗体由张江生物科技有限公司赠送;PBS、无水乙醇等试剂购自 J.T.Baker 公司;50、100、200 nm 孔径聚碳酸酯膜购买

于 Whatman 公司; Zetasizer Nano ZS 是由英国 Malvern 公司制造, 脂质体挤出器 LF-1 由美国 Avestin 公司制造; 超微量天平为德国梅特勒-托利多 XP6 百万分之一超微量天平; OLYMPUS 共聚焦显微镜; 流式细胞仪为 Millipore Guava 8HT; 多功能微孔板检测仪为 Synergy H1。

## 1.2 实验方法

1.2.1 NHS/Mal 脂质体(NHS/Mal LP)以及空白脂质体(LP)的制备——乙醇注入法。取 3 mL PBS 于圆底玻璃离心管中, 65℃ 水浴预热, 磁力搅拌使 PBS 形成漩涡。0.5 mL 无水乙醇溶液 65℃ 水浴预热, 精确称取 28.74 mg 氢化卵磷脂、7.3 mg DSPE-mPEG2000、9.57 mg 胆固醇、2.394 mg DSPE-PEG2000-Mal / DSPE-PEG2000-NHS 溶解于预热无水乙醇中, 涡旋均匀, 吸取至 1 mL 注射器中, 将注射器悬空放置于水相圆底玻璃离心管中, 待乙醇脂溶液温浴充分后, 快速将油相注入水相中, 65℃ 涡旋 30 min, 形成脂质体。将制备好的脂质体溶液通过脂质体挤出器, 聚碳酸酯膜的粒径为 200, 100, 50 nm, 反复挤出 21 次, 获得粒径均一的 NHS/Mal 脂质体。空白脂质体(LP)制备时未加入 Mal-DSPE-PEG2000 / NHS-DSPE-PEG2000, 其制备方法与上述方法相同。

1.2.2 Anti-HER2 免疫脂质体(Anti HER2-NHS/Mal LP)的制备。DSPE-PEG2000-NHS 连接法: 将 HER2 抗体溶液加入至透析袋(截留分子量为 100 ku), 放置于透析液(50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mM EDTA、0.15 M NaCl, pH 7.4)中, 4℃, 6 h, 每 2 h 换一次透析液。透析后抗体与 NHS 脂质体混匀, 摩尔比为 1:50, 室温震荡孵育 3 h, PBS 透析(透析袋截留分子量为 300 ku)除去未与脂质体连接的 HER2 抗体。

DSPE-PEG2000-Mal 连接法: 将 HER2 抗体溶液加入至透析袋(截留分子量为 100 ku), 放置于透析液(50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mM EDTA、0.15 M NaCl, pH 8.0)中, 4℃, 6 h, 每 2 h 换一次透析液。将透析后的抗体与 2-IT 混匀, 摩尔比为 1:10, 室温震荡孵育 1 h, 放置于 PB 溶液(50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4)中透析 0.5 h, 去除未连接 2-IT。将 2IT-Anti HER2 与 Mal 脂质体混匀, 摩尔比为 1:50, 室温震荡孵育 3 h。PBS 透析(透析袋截留分子量为 300 ku)除去未与脂质体连接的 2IT-Anti HER2。

空白脂质体对照: 将空白脂质体与 HER2 抗体混匀, 摩尔比为 1:50, 室温震荡孵育 3 h, PBS 透析除去未与脂质体连接 HER2 抗体。

荧光免疫脂质体的制备: 将 0.2  $\mu\text{g}$  Cy5-PEG2000-DSPE(645 nm 激发红光荧光染料)与 100  $\mu\text{L}$  空白脂质体混合均匀, 65℃ 水浴 1 h 后连接 HER2 抗体, 连接方法同上, 制备插入 Cy5-PEG2000-DSPE 的空白荧光免疫脂质体、NHS/Mal 荧光免疫脂质体。透析去除未连接的抗体和游离的荧光染料, 成功获得 Lip(空白荧光免疫脂质体)、NLip(Anti HER2-NHS-Cy5 荧光免疫脂质体)和 MLip(Anti HER2-Mal-Cy5 荧光免疫脂质体)。

1.2.3 细胞培养。SKOV-3 细胞(HER2<sup>+</sup> cell)用 RPMI-1640 培养基, 含 10% 胎牛血清(FBS), 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  培养; MCF-7 细胞(HER2<sup>-</sup> cell)用 DMEM 培养基, 含 10% 胎牛血清(FBS), 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  培养。显微镜下观察细胞, 选择生长状态良好的细胞, 密度达到 80-90% 即可传代, 传代时用 0.25% 胰酶消化细胞, 制备单细胞悬液进行细胞计数。根据细胞计数的结果, 将适当数量的细胞悬液按照实验需要接入含有新鲜培养液的培养瓶、培养皿或细胞培养板中, 补足培养基, 放入 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养, 以备实验所需。

1.2.4 粒径测定。用英国 Malvern 公司的 Zetasizer Nano ZS 分析仪测定样品的粒径, 每份样品重复 3 次。

1.2.5 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 HER2 抗体与脂质体的连接效率。将样品移至新的 EP 管中, 按比例加入 4×SDS Loading buffer。恒温加热器 100℃ 煮沸 30 min 破乳, 12000 rpm 离心 5 min 后, 15% 分离胶进行 SDS-PAGE 变性电泳。每泳道按相同体积上样, 常规电泳。注: 由于透析后抗体浓度较低, 为方便检测, 透析后样品上样体积为透析前的两倍, 计算连接效率时透析后蛋白条带灰度值除以 2。

1.2.6 细胞毒性分析。本研究中, 用 MTT 比色法检测各种脂质体对 SKOV-3 和 MCF-7 细胞增殖的影响。将 SKOV-3 和 MCF-7 细胞以  $5 \times 10^3$  /孔接种于 96 孔培养板, 实验每组设计 4 个复孔。37℃, 5%  $\text{CO}_2$  培

养 24 h。每孔分别加入 0.02、0.2、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LP、Anti HER2-NHS LP、Anti HER2-Mal LP。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h。加 MTT 处理 4 h 后,去掉培养基,每孔加入 120  $\mu\text{L}$  DMSO,轻微震荡 10 min,在 490 nm 的波长下测定 OD 值读数,同时设置调零孔,对照孔,重复试验 3 次。计算相对细胞存活率  $\text{RCV}(\%) = \text{测试组 OD 值}/\text{对照组 OD 值} \times 100\%$ 。

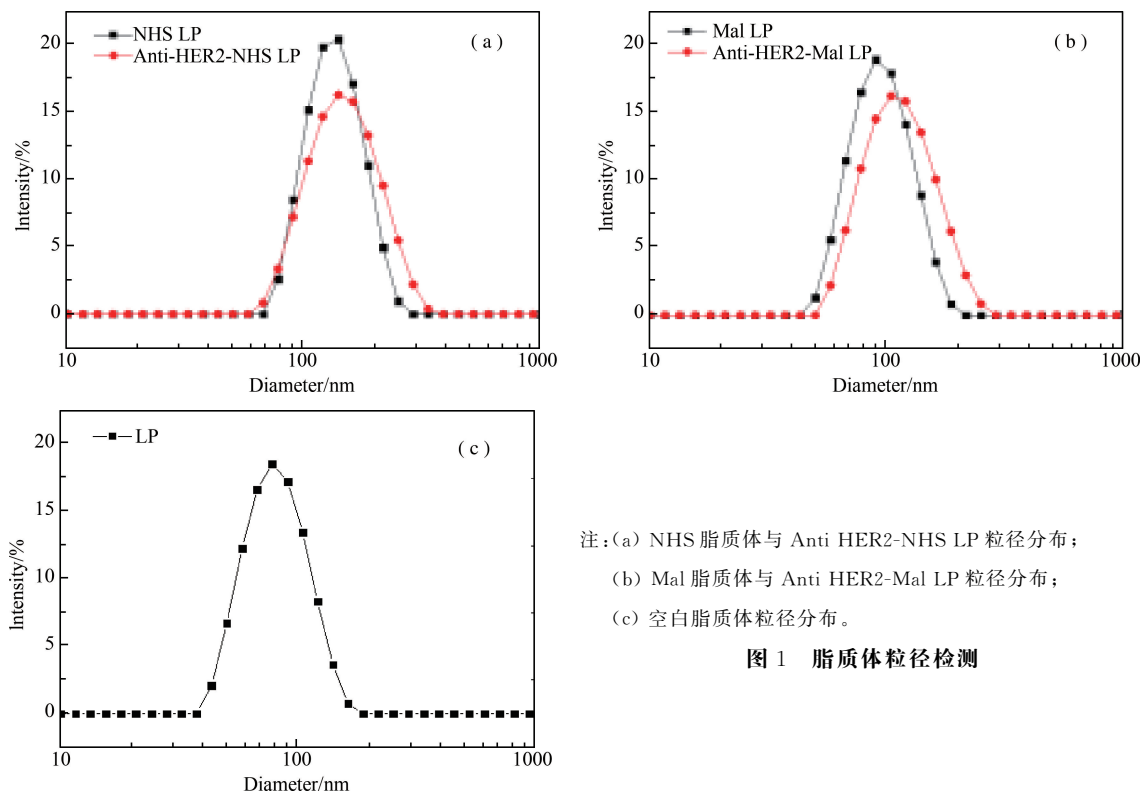
1.2.7 免疫脂质体的靶向特异性检测。将 SKOV-3 和 MCF-7 细胞以  $5 \times 10^4$ /皿接种于  $\phi 15$  mm TC 共聚焦培养皿中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h。将荧光免疫脂质体 NLip、MLip 和 Lip 分别与 SKOV-3 和 MCF-7 细胞 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后,4% 多聚甲醛固定 5 min,DAPI(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )染色 15 min,激光共聚焦显微镜拍照。将 NLip、MLip 和 Lip 分别与 SKOV-3 和 MCF-7 细胞 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,使用密理博 guava easy Cyte 8HT 微流式细胞分析仪进行荧光检测。

1.2.8 统计学分析。实验所得数据均以平均值(Mean  $\pm$  SD)表示,各组数据差异性比较采用  $t$ -test(非参数检验)方法进行分析, $p > 0.05$  表示差异性不显著; $0.01 < *p < 0.05$  表示差异性显著;  $**p < 0.01$  表示差异性极显著;  $***p < 0.001$  表示差异具极其显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脂质体的粒径检测

众所周知,粒径大小通过影响组织分布和清除率对药物动力学的变化起着重要的作用。应用英国 Malvern 公司的 zeta 电位仪 Zetasizer Nano ZS 分别检测 NHS 脂质体(NHS LP)、Mal 脂质体(Mal LP)、Anti HER2-NHS/Mal 免疫脂质体(Anti HER2-NHS/Mal LP)、空白脂质体(LP)粒径。本研究制备的脂质体平均粒径约为 100-135 nm,分布均匀,成正态性。



注:(a) NHS 脂质体与 Anti HER2-NHS LP 粒径分布;  
(b) Mal 脂质体与 Anti HER2-Mal LP 粒径分布;  
(c) 空白脂质体粒径分布。

图 1 脂质体粒径检测

### 2.2 SDS-PAGE 检测 HER2 抗体与脂质体的连接效率

空白脂质体与 Anti-HER2 反应透析前后对比可得出,若 Anti-HER2 未与脂质体连接,样品分子量  $< 300$  ku,经透析袋(截留分子量为 300 ku)透析后样品中检测不到抗体条带。若 Anti-HER2 成功与脂质体连接,样品分子量  $> 300$  ku,经透析袋(截留分子量为 300 ku)透析后样品中能够检测到抗体条带。HER2 抗体经巯基化处理,条带上移,图 2(a)电泳结果表明脂质体与 HER2 抗体成功连接,制备了免疫脂质体。通

过 ImageJ 对蛋白条带灰度值进行相对定量,计算出 3-6 各泳道的条带灰度值比,连接效率=透析后灰度值比/透析前灰度值比 $\times 100\%$ 。图 2(b)显示,DSPE-PEG2000-NHS 连接法的连接效率为 44.24%,DSPE-PEG2000-Mal 连接法的连接效率为 36.56%。由此得出结论,DSPE-PEG2000-NHS 连接法的连接效率更高。

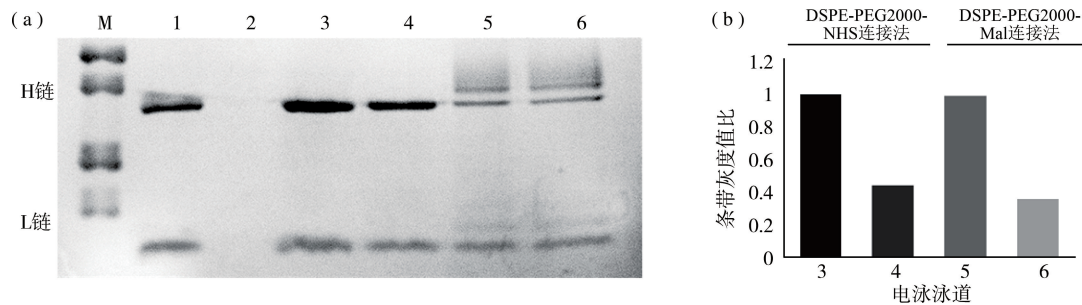


图 2 SDS-PAGE 检测 HER2 抗体与脂质体的连接效率

注:(a) 1:空白 LP 与 Anti-HER2 反应透析前;2:空白 LP 与 Anti-HER2 反应透析后 3:NHS-LP 与 Anti-HER2 反应透析前;4:NHS-LP 与 Anti-HER2 反应透析后;5:Mal-LP 与 Anti-HER2 反应透析前;6:Mal-LP 与 Anti-HER2 反应透析后;(b) 数据统计

### 2.3 细胞毒性分析

将 SKOV-3 和 MCF-7 细胞以  $5 \times 10^3$ /孔接种于 96 孔培养板,实验每组设计 4 个复孔。37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。每孔分别加入 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LP、Anti-HER2-NHS LP、Anti-HER2-Mal LP。37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,MTT 法测定不同脂质体的细胞毒性。不同浓度的脂质体在 SKOV-3 细胞(图 3(b))、MCF-7 细胞(图 3(a))中均显示出较高的细胞活力,与对照相比无明显差异。因此推测制备的脂质体具有良好的生物相容性和低的细胞毒性。因此,本研究中成功制备的免疫脂质体在体外实验中是相对安全的。

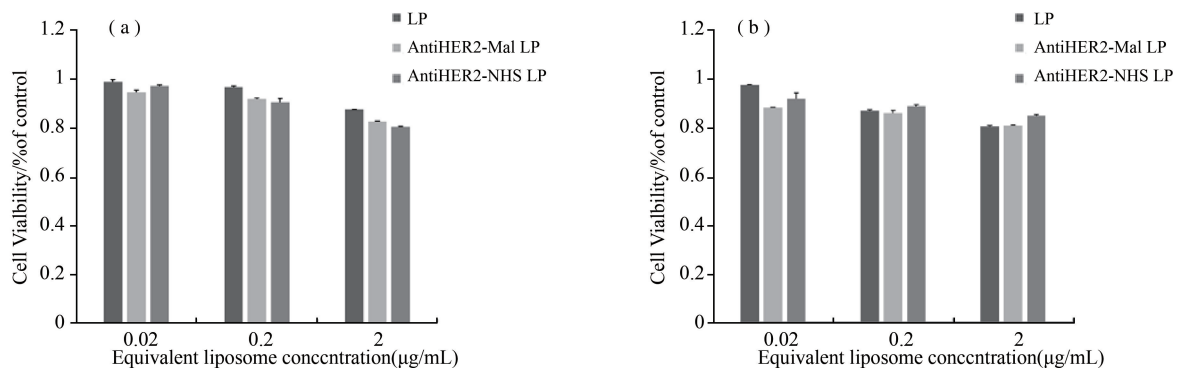


图 3 脂质体细胞毒性实验分析 (a) 脂质体处理 MCF-7 细胞 24 h 后的细胞活性;

(b) 脂质体处理 SKOV-3 细胞 24 h 后的细胞活性

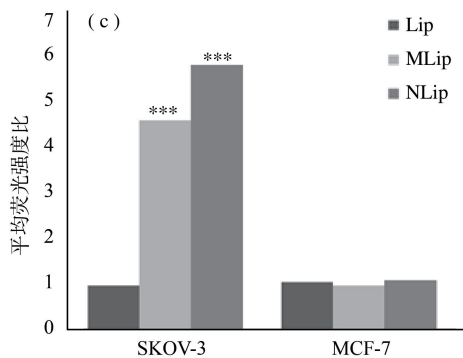
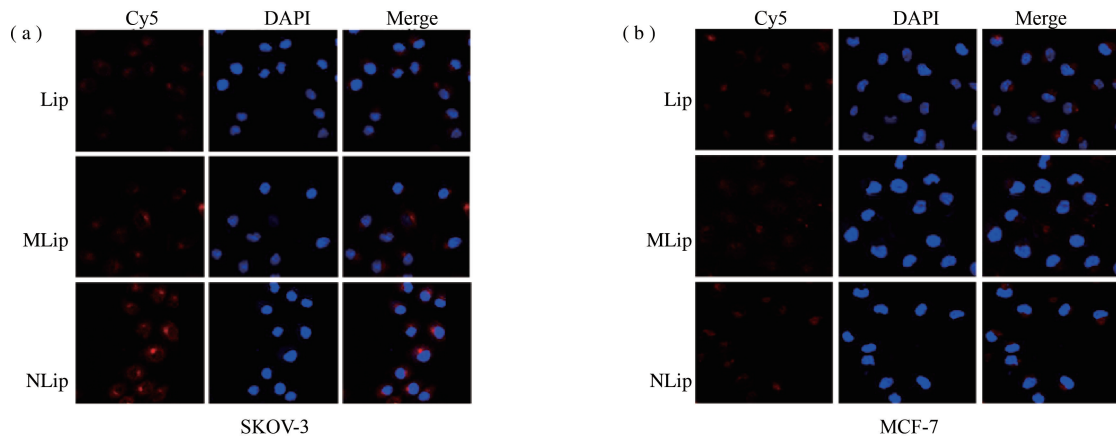
### 2.4 共聚焦显微镜检测免疫脂质体的靶向特异性

将荧光免疫脂质体 NLip、MLip 和 Lip 分别与 SKOV-3 和 MCF-7 细胞 37 °C 孵育 2 h 后,4% 多聚甲醛固定 5 min,DAPI(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )染色 15 min,激光共聚焦显微镜拍照。图 4(a)结果表明,NLip、MLip 可与 SKOV-3 细胞表面的 HER2 受体结合,较空白荧光免疫脂质体(Lip)荧光明显增强。由于 MCF-7 细胞表面不表达 HER2 受体,将 NLip、MLip 与 MCF-7 细胞孵育后,与空白荧光免疫脂质体(Lip)相比,并未显示出荧光强度的差异,如图 4(b)。结果表明 NHS/Mal 荧光免疫脂质体可与 HER2 受体特异性结合,并通过 HER2 受体介导的内吞作用增强内化。

### 2.5 流式细胞仪检测免疫脂质体的靶向特异性

将荧光免疫脂质体 Lip、NLip、MLip,分别与 MCF-7 细胞、SKOV-3 细胞孵育,流式细胞仪检测脂质体与 HER2 受体表达差异细胞的结合特异性。由于 NLip 和 MLip 可以与 SKOV-3 细胞表面的 HER2 受体特异性结合,因此流式细胞仪检测 NLip 和 MLip 与细胞孵育后,荧光强度的峰较 Lip 明显偏移,与空白荧光免

疫脂质体(Lip)相比,荧光明显增强(图 5(a));由于 MCF-7 细胞表面不表达 HER2 受体,将 NLip、MLip 与 MCF-7 细胞孵育后,与 Lip 相比,荧光强度的峰未见偏移,并未显示出荧光强度的差异(图 5(b)),这与共聚焦显微镜分析结果一致。



注:\*\*\* $p < 0.001$  vs control;(a) 荧光免疫脂质体与 SKOV-3 细胞结合的荧光强度;(b) 荧光免疫脂质体与 MCF-7 细胞结合的荧光强度;(c) 数据统计。

图 4 免疫脂质体共聚焦显微镜分析

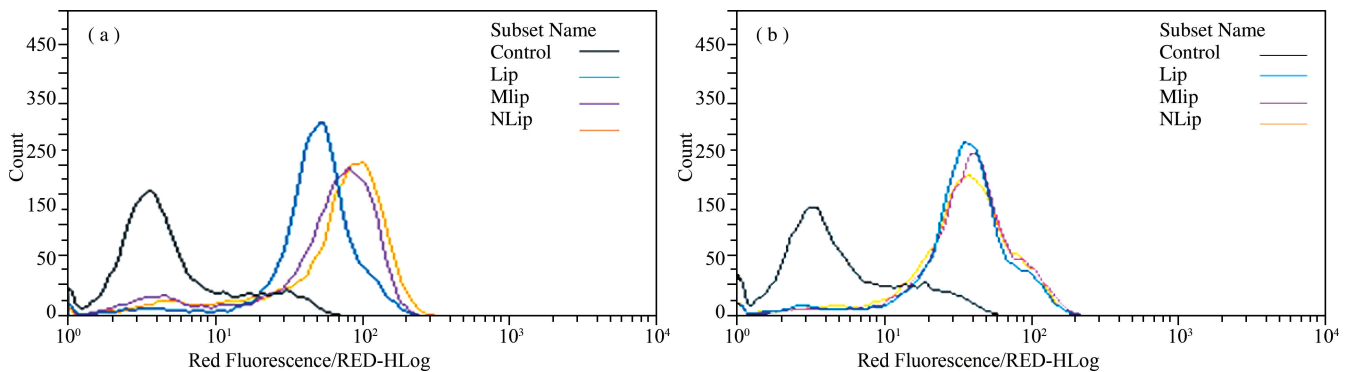


图 5 流式检测免疫脂质体的靶向特异性

### 3 结论

采用聚乙二醇连接法成功制备了具有较小粒径的 HER2 抗体免疫脂质体。通过细胞毒性分析,本研究所制备的免疫脂质体毒性小,具有较高安全性,可保证体外实验的顺利进行。SDS-PAGE 检测表明 NHS-PEG2000-DSPE 的连接效率更高。共聚焦显微镜观察与流式检测显示,HER2 过度表达的 SKOV-3 细胞中 HER2 抗体免疫脂质体较空白脂质体组的荧光强,这表明制备的免疫脂质体具有较好的靶向特异性。综上所述,本文主要研究了 HER2 抗体连接脂质体的方法,为今后靶向药物的研究提供一种更简单、高效的免疫脂质体的制备方法。

### 参 考 文 献

[1] REDDY K R. Controlled-release, pegylation, liposomal formulation; new mechanisms in the delivery of injectable drugs[J]. Drug Deliv, 2000, 34: 915-923.

- [2] HYNES N E, STERN D F. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1198: 165-184.
- [3] BALLY M B, LIM H, CULLIS P R, et al. Controlling the drug delivery attributes of lipid-based drug formulations[J]. *J Liposome Res*, 1998, 8: 299-335.
- [4] LUNDBERG B. The solubilization of lipophilic derivatives of podophyllo-toxins in sub-micron sized lipid emulsions and their cytotoxic activity against cancer cells in culture[J]. *Int J Pharm*, 1994, 109: 73-81.
- [5] 张亚柯, 黄玉娇, 李英, 等. 长春新碱抗 CD20 免疫脂质体的制备及其对人 B 细胞淋巴瘤的靶向特异性杀伤作用研究[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2020, 33(1): 92-97.
- [6] LUNDBERG B, GRIFFITHS G, HANSEN H J. Cellular association and cytotoxicity of anti-CD74-targeted lipid drug-carriers in B lymphoma cells[J]. *J Control Release*, 2004, 94: 155-161.
- [7] TORCHILIN V P, TRUBETSKOY V S. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating? [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, 16: 141-155.
- [8] YUAN F, DELLIAN M, FUKUMURA D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size[J]. *Cancer Res*, 1995, 55: 3752-3756.
- [9] LAGINHA K, MUMBENEGEWI D, ALLEN T. Liposomes targeted via two different antibodies: assay, B-cell binding and cytotoxicity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1711: 25-32.
- [10] SUZUKI S, WATANABE S, MASUKO T, et al. Preparation of long circulating immunoliposomes containing adriamycin by a novel method to coat immunoliposomes with polyethylene glycol[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1995, 1245: 22-29.
- [11] NAM S M, KIM H S, AHN W S, et al. Sterically stabilized anti-G(M3), anti-Le(x) immunoliposomes; targeting to B16BL6, HRT-18 cancer cells[J]. *Oncol Res*, 1999, 11: 9-16.
- [12] PAGNAN G, MONTALDO P G, PASTORINO F, et al. Allen, GD2-mediated melanoma cell targeting and cytotoxicity of liposome-entrapped fenretinide[J]. *Int J Cancer*, 1999, 81: 268-274.
- [13] ITO A, KUGA Y, HONDA H, et al. Magnetic nanoparticle-loaded anti-immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia[J]. *Cancer Lett*, 2004, 212: 167-175.
- [14] TAI W, MAHAT R, CHENG K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery[J]. *J Control Rel*, 2010, 146: 264-275.
- [15] ENGEL R H, KAKLAMANI V G. HER2-positive breast cancer: Current and future treatment strategies[J]. *Drugs*, 2007, 67: 1329-1341.