

超顺磁性氧化铁纳米粒子 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的 ^{64}Cu 标记、纯化及生物分布

史旭东^{1,2}, 王 晓^{1,2}, 申一鸣^{1,2}, 孙钰林², 梁积新¹,
陈玉清^{1,2}, 沈浪涛^{1,2,*}

1. 中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413; 2. 原子高科股份有限公司, 北京 102413

摘要:对 ^{64}Cu 标记超顺磁性氧化铁纳米粒子 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的标记及纯化条件进行探索,并根据其在小鼠体内的生物分布研究结果,揭示其主要的代谢方式。通过对标记过程中配体浓度、温度、时间等条件的改变,探究 ^{64}Cu 标记 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的最优条件;并采用二乙基三胺五乙酸(DTPA)螯合标记混合物中游离的 ^{64}Cu ,经 PD-10 柱纯化后得到放化纯较高的标记物;采用快速薄层层析法测定标记物的标记率和放化纯;分别测定了标记物的体外稳定性和脂水分配系数;将 ^{64}Cu 标记的氧化铁纳米粒子经尾静脉注射到正常鼠的体内,分别于注射后不同时间点取各脏器,称重、测定放射性计数率,计算每克组织的百分注射剂量率(%ID/g)。经条件优化后得到的 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的标记率为 63%,PD-10 柱纯化后放化纯大于 95%,水溶性良好,且放化纯在标记后 12 h 内在磷酸盐缓冲液和人血清白蛋白中表现出了较高的稳定性;动物体内生物分布实验显示,该标记物在小鼠体内主要经肝脏代谢,肾脏排泄,血液中放射性清除较快。该标记物可用于后续的 PET/MRI 双模态显像的研究。

关键词: ^{64}Cu ;超顺磁性氧化铁纳米粒子;放化纯;体外稳定性;生物分布

中图分类号:O615.4 **文献标志码:**A **文章编号:**0253-9950(2015)04-0250-07

doi:10.7538/hhx.2015.37.04.0250

Radiolabeling of SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD With ^{64}Cu and Biodistribution of the Radiolabel

SHI Xu-dong^{1,2}, WANG Xiao^{1,2}, SHEN Yi-ming^{1,2}, SUN Yu-lin², LIANG Ji-xin¹,
CHEN Yu-qing^{1,2}, SHEN Lang-tao^{1,2,*}

1. China Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275(58), Beijing 102413, China;

2. Atom High-Tech Co., Ltd, Beijing 102413, China

Abstract: To investigate the construction and purification of the superparamagnetic iron oxide nanoparticles radiolabeled with ^{64}Cu and its biodistribution in mice, ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD was prepared. To obtain a fair good radiolabeling yield and a high radio-

收稿日期:2014-06-15;修订日期:2014-09-17

作者简介:史旭东(1986—),男,山东聊城人,博士研究生,放射性同位素技术专业

* 通信联系人:沈浪涛(1963—),男,浙江永康人,博士生导师,研究员,研究方向为药物化学和有机合成化学,E-mail: 206376498@qq.com

粒子体系中,对 ^{64}Cu 的标记条件进行优化,从而获得较高的标记率,并选择适合于放射性纳米粒子纯化的手段,尽可能提高放化纯以满足体内研究的需要是急需解决的问题之一。

鉴于 ^{64}Cu 与双功能螯合剂 DOTA 的良好螯合性质及与纳米材料生物特性的匹配性,本工作拟使用 ^{64}Cu 对超顺磁性氧化铁纳米粒子 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 进行放射性标记,并对标记、纯化条件进行摸索,对其体外稳定性和脂水分配系数进行测定,还通过该标记物在正常小鼠体内生物分布的研究,揭示其主要的代谢方式。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

超顺磁性氧化铁纳米粒子 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 由本实验室制备^[5-6]; $^{64}\text{CuCl}_2$, 由原子高科股份有限公司提供;快速硅胶薄层层析纸(ITLC-SG),美国 Pall 公司;PD-10 (Sephadex G-25)柱,美国 GE 公司。人血清白蛋白(HSA,质量分数为 97%),上海莱士血液制品股份有限公司;二乙基三胺五乙酸(DTPA)、磷酸盐缓冲液(PBS)、醋酸铵($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)及其它化学试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。昆明小鼠 15 只,雌性,18~20 g,北京华阜康生物科技股份有限公司。

1470 自动 γ 计数器,美国 Perkin Elmer 公司;CRC-15 放射性活度计,美国 Capintec 公司;AR-2000 薄层扫描仪,德国 Eckert Ziegler 公司。

1.2 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的制备

取 100 μL SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 醋酸铵缓冲溶液($\text{pH}=6.5, 0.1 \text{ mol/L}$)加入 2 mL EP 管中,加入 10 μL (3.7 MBq) $^{64}\text{CuCl}_2$, 涡旋混匀,反应在一定温度条件下温育一段时间。

1.3 标记率和放化纯的测定方法

标记物的标记率(Y)及放化纯(RCP)均采用快速薄层层析法(ITLC)测定。取 2 μL 反应液点样于 ITLC-SG 纸(10 mm \times 100 mm)上,于 10% 醋酸铵/甲醇体积比为 1:1 的展开体系中上行展开,空气中自然晾干。用放射性薄层扫描仪进行扫描,计算标记率或放化纯。在展开体系中,游离的 $^{64}\text{Cu}^{2+}$ 或 ^{64}Cu -DTPA 随溶剂移到层析纸前沿,其 R_f 为 0.9~1.0。而标记物 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 停留在原点, R_f 为 0~0.1。

1.4 最佳标记条件的选择

1.4.1 配体浓度对标记率的影响 分别取 100 μL Fe 浓度为 1.78、3.56、7.12、14.2 mmol/L 的 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的醋酸铵缓冲溶液($\text{pH}=6.5, 0.1 \text{ mol/L}$)加入 2 mL EP 管中,加入 10 μL (3.7 MBq) $^{64}\text{CuCl}_2$, 涡旋混匀,50 $^\circ\text{C}$ 条件下温育 60 min,快速薄层层析法测定标记率。

1.4.2 反应时间对标记率的影响 取 100 μL Fe 浓度为 3.56 mmol/L 的 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 醋酸铵缓冲溶液($\text{pH}=6.5, 0.1 \text{ mol/L}$)加入 2 mL EP 管中,加入 10 μL (3.7 MBq) $^{64}\text{CuCl}_2$, 涡旋混匀,50 $^\circ\text{C}$ 条件下温育,分别在反应 40、50、60、70 min 后取样监测,快速薄层层析法测定标记率。

1.4.3 温度对标记率的影响 取 100 μL Fe 浓度为 3.56 mmol/L 的 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 醋酸铵缓冲溶液($\text{pH}=6.5, 0.1 \text{ mol/L}$)加入 2 mL EP 管中,加入 10 μL (3.7 MBq) $^{64}\text{CuCl}_2$, 涡旋混匀,分别在 40、50、60 $^\circ\text{C}$ 条件下温育 60 min,快速薄层层析法测定标记率。

1.5 标记物 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的纯化

取 500 μL Fe 浓度为 3.56 mmol/L 的 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 醋酸铵缓冲溶液($\text{pH}=6.5, 0.1 \text{ mol/L}$),加入 2 mL EP 管中,并加入 100 μL (18.5 MBq) $^{64}\text{CuCl}_2$, 涡旋混匀,在 50 $^\circ\text{C}$ 条件下温育 60 min。反应结束后待标记反应混合液冷却至室温,加入 100 μL 10 mmol/L DTPA 溶液,室温下温育 20 min,结合游离的 ^{64}Cu 。

标记物均采用 PD-10 柱排阻纯化:将 PD-10 柱用磷酸盐缓冲液(PBS, 0.1 mol/L, $\text{pH}=7.2$)淋洗平衡后,加入反应混合物,PBS 作为淋洗液,以每管 0.5 mL 收集洗脱液,用活度计测量每管中的放射性活度。

1.6 标记物的体外稳定性考察

PBS 体系:取 ^{64}Cu 标记的氧化铁纳米粒子约 $3.7 \times 10^5 \text{ Bq}$,置于 200 μL PBS 中($\text{pH}=7.2$),涡旋混匀,37 $^\circ\text{C}$ 条件下,温育 3、6、12 h 后分别采用快速薄层层析法测定放化纯,观察其体外稳定性。

HSA 体系:取 ^{64}Cu 标记的氧化铁纳米粒子约 $3.7 \times 10^5 \text{ Bq}$,置于 200 μL 10% 的人血清白蛋白 HSA 中,涡旋混匀,37 $^\circ\text{C}$ 条件下,温育 3、6、12 h 后,依次取 50 μL 混合液,加入 50 μL 乙腈,涡

旋 1 min, 常温下 5 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液, 快速薄层析法测定放化纯, 观察其体外稳定性。

1.7 脂水分配系数的测定

取 100 μ L 标记物的磷酸盐缓冲溶液, 加入到含 3 mL 正辛醇和 3 mL 磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.2, 0.01 mol/L) 的 10 mL 离心试管中, 盖好后充分震荡 5 min, 在离心机中离心分层 5 min, 转速为 4 000 r/min。分别取有机相和水相各 500 μ L 于干净测量管中, 在 γ 计数器中分别测量其放射性计数, 由有机相和水相的放射性计数的比值来计算脂水分配系数 P , 计算 $\lg P$ 。重复 3 次, 取平均值。

1.8 标记物在正常小鼠体内的生物分布

取 100 μ L ⁶⁴Cu-SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的磷酸盐缓冲溶液, 活度约为 5.6×10^5 Bq, 经尾静脉注射到 15 只昆明小鼠体内, 在注射后 0.5、1、3、6、12 h 眼眶取血, 处死并进行解剖, 取心脏、肝脏、脾、肺、肾、胃、小肠、肌肉、股骨、血等器官或组织称重, γ 计数器上测量其计数。经衰变校正后计算每克组织的百分注射剂量率 (%ID/g)。

2 结果与讨论

2.1 最佳标记条件的选择

通过分别改变反应体系的配体用量、反应时间和温度等因素, 确定 ⁶⁴Cu-SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的最佳标记条件。

2.1.1 配体 Fe 浓度对标记率的影响 在反应温度 50 $^{\circ}$ C、反应时间 60 min 的条件下, 考察配体 Fe 浓度 ($c(\text{Fe})$) 对标记率的影响, 结果示于图 2(a)。由图 2(a) 可知: 配体用量对 ⁶⁴Cu 的标记率的影响较大, 当配体中 Fe 浓度为 1.78 mmol/L 时, 标记率并不理想, 仅为 34%; 当配体中 Fe 浓

度增加到 3.56 mmol/L 时, 标记率得到了显著提高, 达到了 63%。然而, 在继续增大配体量时, 标记率没有呈现增大的趋势, 反而出现了大幅的下降。因此, 选择配体的 Fe 浓度为 3.56 mmol/L。

2.1.2 反应时间对标记率的影响 在配体 Fe 浓度 3.56 mmol/L、反应温度 50 $^{\circ}$ C 条件下, 考察反应时间对标记率的影响, 不同反应时间对标记率的影响示于图 2(b)。由图 2(b) 可知: 反应时间的增长有利于标记率的提升, 50 min 之后逐渐趋于稳定。因此, 选择反应时间为 60 min。

2.1.3 温度对标记率的影响 在配体 Fe 浓度 3.56 mmol/L、反应时间 60 min 条件下, 考察反应温度对标记率的影响, 不同温度条件下标记率的测定结果示于图 2(c)。根据文献[12], 将初始反应温度定在 40 $^{\circ}$ C, 标记率为 31%。反应温度提高到 50 $^{\circ}$ C 时, 标记率达到了 63%。由于氧化铁纳米粒子前体的稳定性受温度影响较大, 高温条件下容易发生团聚甚至出现沉淀的现象, 当温度升高到 60 $^{\circ}$ C 时已经出现标记率的下降, 因此, 没有进行更高温度条件下的标记实验, 反应温度定在 50 $^{\circ}$ C。文献[10-11]报道, 纳米材料的 ⁶⁴Cu 标记率在 20%~60% 之间。通过配体 Fe 浓度、反应时间和温度对标记率的影响研究发现, 在优化条件下, ⁶⁴Cu 的标记率可提高至 63%。虽然, 在文献中未见 ⁶⁴Cu 标记率较低的原因分析, 但我们推测, 在纳米材料体系中不能通过无限制地提高温度的方式来提高标记率, 因为附着在纳米材料表面的高分子随温度升高将脱落, 导致团聚乃至沉淀现象; 此外, 由于结合在纳米材料上的螯合基团 (DOTA) 是有限的, 并且这些螯合基团还可能被 PEG 覆盖, 处于不利于与 ⁶⁴Cu 结合的状态, 因此, 即使提高配体 Fe 的浓度也不能提高标记率。这些因素都

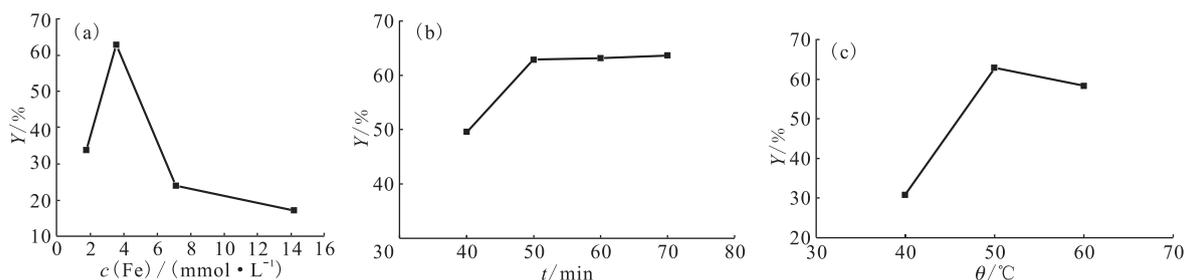


图2 配体 Fe 浓度(a)、反应时间(b)、反应温度(c)对标记率(Y)的影响

Fig. 2 Influences of ligand concentration(a), reaction time(b) and reaction temperature(c) on labeling efficiency

可能是导致纳米材料体系中 ^{64}Cu 标记率不高的原因。

2.2 标记化合物的纯化

标记物采用 PD-10 柱纯化。在标记反应混合溶液中加入过量的 DTPA, 结合游离的和非特异结合在纳米材料上的 ^{64}Cu [13-14], 而 ^{64}Cu -DTPA 与标记物 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 在 PD-10 柱中的保留时间存在明显差异, 通过收集不同时间点的洗脱液可以实现标记物的纯化。纯化后产物经薄层层析法检测后发现, 标记物基本全部集中在原点(图 3(b)), $R_f = 0 \sim 0.1$ 。这说明 ^{64}Cu 已成功标记至 SPION-dopa-PEG-DOTA/

RGD, 且放化纯大于 95%。在本研究的初始阶段, 参考 ^{64}Cu 标记 DOTA 及其衍生物的条件进行标记并直接采用排阻色谱进行分离, 但通过纸色谱最终放化纯的分析发现很难将标记物完全分离。在纯化过程中没有加入 DTPA, 直接将标记反应混合溶液在 PD-10 柱上洗脱, 但最终的标记物放化纯(图 3(a))并不理想, 只有 71%。这说明 DTPA 对游离铜的螯合作用对于该标记物的分离十分重要。DTPA 的作用可能与文献[13-14]的解释类似, 即通过 DTPA 与 PEG 的竞争, 除去在 PEG 上非特异结合的 ^{64}Cu , 使之转化为 ^{64}Cu -DTPA, 从而极大地改善了分离效果。

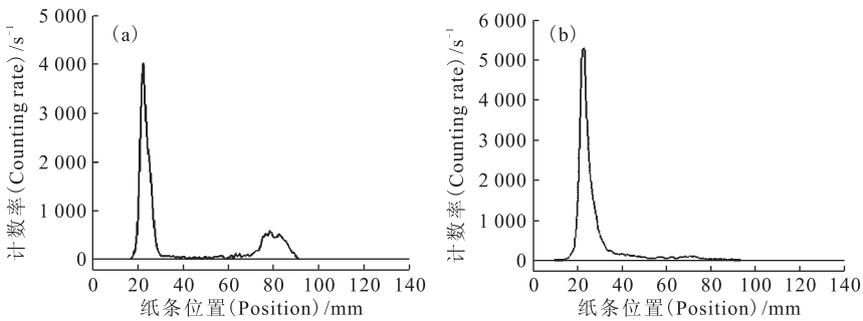


图 3 未加入 DTPA(a)及加入 DTPA(b)纯化后标记物 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的放化纯比较
 Fig. 3 Radiochemical purity after purification of ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD without DTPA(a) and with DTPA(b)

2.3 标记物的体外稳定性考察

放射性药物必须要有足够的体外稳定性。 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的体外稳定性检测结果示于图 4。由图 4 可知, 标记物在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下温育, 在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 和体积分数为 10% 的人血清白蛋白 (HSA) 溶液中均比较稳定, 放置 12 h 后, 放化纯 (RCP) 仅略有下降, 但仍大于 90%。说明该标记物的体外稳定性良好, 可以用于进一步的体内研究。

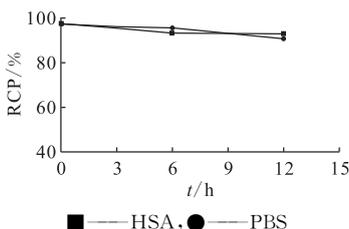


图 4 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 在 HSA 和 PBS 中的稳定性

Fig. 4 Stability of ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD in HSA and PBS

2.4 脂水分配系数的测定

^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 的脂水分配系数 P 为 $0.054\ 40$, $\lg P$ 值为 -1.27 , 药物表现出较高的水溶性, 这归结于 PEG 衍生物对纳米粒子的表面修饰, 从而有助于药物在体内的转运分布, 延长其体内的循环半衰期, 从而使该探针更有效地作用于靶点。

2.5 标记物在正常小鼠中的体内分布

正常小鼠体内 ^{64}Cu -SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 在各器官的生物分布结果列入表 1。由表 1 可知: 放射性标记物在肝脏($(8.42 \pm 0.32)\% \text{ID/g}$, 30 min)、脾脏($(3.55 \pm 0.51)\% \text{ID/g}$, 30 min)和肾($(5.99 \pm 0.61)\% \text{ID/g}$, 30 min)中的吸收最高, 而其他器官对药物的摄取相对较低, 表明该标记物主要通过肝、脾代谢, 肾脏排泄, 这与粒径小于 100 nm 的纳米粒子在体内的生物分布和代谢途径基本一致[15-16]。体内的网状内皮系统 (RES, 包括肝、脾、肺和骨髓等组织) 具有丰富的吞噬细胞, 可将一定大小的纳米颗粒作为异物而摄取, 较

大的颗粒由于不能滤过毛细血管,而被截留于某些部位。粒径 100~200 nm 的颗粒很快被网状内皮系统的巨噬细胞从血液中清除,最终到达

kupffer 细胞的溶酶体中;50~100 nm 的颗粒可以进入肝实质细胞,而小于 50 nm 的纳米粒子则通过淋巴系统传递到脾和骨髓中^[17]。

表1 ⁶⁴Cu-SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 在正常小鼠体内分布
Table 1 Biodistribution of ⁶⁴Cu-SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD in normal mice

组织(Tissues)	每克组织百分注射剂量率 (Percentage of the injected dose per gram of tissues mass)/(%ID · g ⁻¹)				
	30 min	1 h	3 h	6 h	12 h
血(Blood)	2.29±0.17	1.49±0.17	1.03±0.10	0.75±0.05	0.69±0.09
心(Heart)	1.69±0.14	1.69±0.13	1.75±0.11	1.60±0.22	1.61±0.41
肝(Liver)	8.42±0.32	7.63±0.97	5.22±0.60	3.97±0.79	3.03±1.07
脾((Spleen)	3.55±0.51	2.96±0.36	2.00±0.26	1.25±0.41	1.39±0.42
肺(Lung)	3.24±0.79	3.15±0.54	2.97±0.50	2.71±0.62	2.84±0.68
肾(Kindeg)	5.99±0.61	5.68±0.98	4.51±0.41	3.50±0.48	3.05±0.76
胃(Stomach)	2.67±0.33	2.47±0.48	3.03±0.11	2.51±1.16	1.59±0.29
小肠(Intestine)	3.29±0.33	3.21±0.39	2.90±0.16	2.26±0.38	1.95±0.68
肌肉(Muscle)	0.57±0.13	0.40±0.03	0.36±0.07	0.36±0.07	0.34±0.04
骨(Bone)	1.01±0.14	1.00±0.12	1.36±0.50	0.93±0.17	1.05±0.28

注(Note):n=3

3 结论

以超顺磁性氧化铁纳米粒子 SPION-dopa-PEG-DOTA/RGD 为前体,使用正电子核素⁶⁴Cu 对其进行了放射性标记。通过改变反应体系的配体用量、反应时间和温度等因素,得到优化后的标记条件为:配体中 Fe 浓度为 3.56 mmol/L,反应时间为 60 min,反应温度为 50 °C,经优化后的标记率可达到 63%。通过加入 DTPA 螯合游离和非特异结合在纳米材料上的⁶⁴Cu 并使用 PD-10 柱进行纯化后,得到了放化纯大于 95% 的标记物,解决了氧化铁纳米材料⁶⁴Cu 标记物不易纯化的难题。该标记物在 12 h 内表现出了较高的体外稳定性且具有良好的水溶性。正常小鼠体内的生物分布揭示了其主要的代谢方式,该标记物可用于后续的 PET/MRI 双模态显像的研究。

参考文献:

[1] Reddy L H, Arias J L, Nicolas J, et al. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical

applications[J]. Chem Rev, 2012, 112(11): 5818-5878.

- [2] Rafael T, Richard T, Philip J, et al. Synthesis of ⁶⁴Cu II -bis(dithiocarbamatebisphosphonate) and its conjugation with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: *in vivo* evaluation as dual-modality PET-MRI agent [J]. Angew Chem Int Ed, 2011, 50 (24): 5509-5513.
- [3] Xie J, Chen K, Huang J, et al. PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles[J]. Biomaterials, 2010, 31(22): 3016-3022.
- [4] Choi J, Park J, Cheon J, et al. A hybrid nanoparticle probe for dual-modality positron emission tomography and magnetic resonance imaging[J]. Angew Chem Int Ed, 2008, 47(33): 6259-6262.
- [5] Shi X D, Shen L T. The design and synthesis of potential PET/MRI dual-modal imaging agents based on MFe₂O₄ (M=Fe, Mn) nanoparticles[J]. J Nucl Med, 2014, 55(Suppl.): 1026.
- [6] 史旭东,沈浪涛.用于 PET/MRI 双模式显像剂的磁性氧化铁纳米粒子的合成和性质初步研究[G]//中国原子能科学研究院年报.北京:中国原子能科学研究院,2012:179-180.
- [7] Panizzi P, Nahrendorf M, Weissleder R, et al. *In*

- in vivo* detection of staphylococcus aureus endocarditis by targeting pathogen-specific prothrombin activation[J]. Nat Med, 2011, 17(9): 1142-1146.
- [8] Joanne E M, James R B, David M C. Functional imaging of human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer using ^{64}Cu -DOTA-trastuzumab PET[J]. J Nucl Med, 2014, 55(1): 23-29.
- [9] Elena R, Réjean L, Brigitte G, et al. ^{68}Ga /DOTA- and ^{64}Cu /NOTA-phthalocyanine conjugates as fluorescent/PET bimodal imaging probes[J]. Bioconjugate Chem, 2013, 24(9): 1624-1633.
- [10] Benjamin R, David L, Angelique Y. Synthesis of ^{64}Cu -labeled magnetic nanoparticles for multimodal imaging[J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19(7): 1496-1504.
- [11] Yang M, Cheng K, Cheng Z, et al. Affibody modified and radiolabeled gold-iron oxide hetero-nanostructures for tumor PET, optical and MR imaging[J]. Biomaterials, 2013, 34(11): 2796-2806.
- [12] Lee H Y, Li Z B, Chen X Y, et al. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles[J]. J Nucl Med, 2008, 49(8): 1371-1379.
- [13] Fukukawa K, Rossin R, Hagooley A, et al. Synthesis and characterization of core-shell star copolymers for *in vivo* PET imaging applications[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(4): 1329-1339.
- [14] Pressly E D, Rossin R, Hagooley A, et al. Structural effects on the biodistribution and positron emission tomography(PET) imaging of well-defined ^{64}Cu -labeled nanoparticles comprised of amphiphilic block graft copolymers [J]. Biomacromolecules, 2007, 8(10): 3126-3134.
- [15] Natarajan A, Gruettner C, Ivkov R, et al. Nanoferrite particle based radioimmuno nanoparticles: binding affinity and *in vivo* pharmacokinetics [J]. Bioconjugate Chem, 2008, 19(6): 1211-1218.
- [16] Glaus C, Rossin R, Bao G. *In vivo* evaluation of ^{64}Cu -labeled magnetic nanoparticles as a dual-modality PET/MR imaging agent[J]. Bioconjugate Chem, 2010, 21(4): 715-722.
- [17] Laurent S, Forge D, Muller R. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications [J]. Chem Rev, 2008, 108(6): 2064-2110.