

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

醣質肝膽磁振造影劑之研究
Application Research of Glyco MRI Agent

計畫編號：1002001INER086

受委託機關(構)：國立交通大學

計畫主持人：王雲銘

聯絡電話：03-5712121 #56972

E-mail address：ymwang@mail.nctu.edu.tw

核研所聯絡人員：王美惠

報告日期：100 年 12 月 15 日

目錄

中文摘要	1
Abstract.....	2
壹、計畫緣起與目的	3
貳、研究方法與過程	7
一、 $MnFe_2O_4$ 之合成製備	7
二、奈米氧化鐵粒子之表面修飾	8
三、奈米氧化鐵接上有功能性標定之半乳糖類胜肽衍生物(G-ah-GalNAc)	8
四、 $MnFe_2O_4$ -G-ah-GalNAc 之體外細胞實驗(<i>In vitro</i>).....	9
參、主要發現與結論	9
一、 氧化鐵奈米材料之鑑定	10
(一)掃描式電子顯微鏡(SEM)與穿透式電子顯微鏡(TEM)之表面分析	10
(二) Energy-dispersive spectrometer (EDS)鑑定	10
(三)Relaxivity(r_2 , 弛緩率)之鑑定分析	11
二、氧化鐵奈米粒子表面修飾之分析.....	11
三、氧化鐵之表面修飾半乳糖類胜肽衍生物之分析.....	11
(一)氧化鐵之醣質奈米粒子粒徑分析(DLS)	11
(二)奈米氧化鐵表面電價之測定(Zeta potential).....	12
四、 $MnFe_2O_4$ -G-ah-GalNAc 之體外細胞實驗(<i>In vitro</i>)測定	13
(一)共軛焦顯微鏡之細胞影像分析	13
(二)流式細胞儀(Flow cytometry)之受器結合分析	13
(三)細胞之體外(<i>in vitro</i>)磁振造影分析	13
肆、參考文獻	15

中文摘要

根據衛生署的統計，國人十大死亡原因中，慢性肝病、肝硬化為第六位，而肝癌更是國內十大癌症死亡原因的第一位，若能早期診斷，應有助於預防肝癌的發生。新近文獻報導聚合型半乳胺醣胜肽對肝細胞有特異性之結合。本計劃預計建立可用於診斷肝癌之醣質氧化鐵藥物之動物造影技術平台，利用肝癌鼠動物模式，藉由磁振造影結果評估核研醣質氧化鐵對比劑作為肝癌早期診斷的可行性。

中文關鍵字：醣質藥物，肝膽磁振造影劑，氧化鐵

Abstract

Asialoglycoprotein receptors(ASGP-R), situated on the hepatocyte membrane, can recognize galactose or N-acetylgalactosamine terminal of desialylated glycoprotein or glycopeptide. Sawamura et al. reported that a decrease in the number of ASGP-R led to an accumulation of asialoglycoprotein in the sera of galactosamine-treated rats, and the number of these receptors decreases in patients with chronic liver diseases.

In this study, the hepatoma animal model will established by treating the animal with proper chemicals. Glyco-drug will be used to evaluate its potential for diagnosis of liver disease with MRI imaging technique.

Key words : Glyco , MRI , ASGP-R

壹、計畫緣起與目的

磁振造影 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 自發明以來，目前已經成為醫學臨床診斷上繼斷層掃描 (CT)、超音波及X-Ray 照相等影像診斷儀器以外，另一相當具代表性的影像醫學技術。磁振造影之成像原理，是根據核磁共振的基本原理 (故早期又稱作Nuclear Magnetic Resonance Imaging, NMRI)。依據給予的能量在激發原子核後所放出的電磁波訊號在體內衰變的速率，而衰變速率則隨著體內環境的不同會有所區別。如同內視鏡以外的其它影像診斷儀器，MRI 具備不需侵入人體的優勢，而且所需照射能量低，不會產生游離輻射，所以對人體掃描不會造成任何副作用。MRI 在軟組織的成像上表現優秀，對於膀胱、直腸、子宮、陰道、骨、關節、肌肉等部位的檢查都較斷層掃描優秀。因此可診斷下列組織與器官如中樞神經系統、腦部、心臟、脊椎、腹部檢查，及骨骼肌肉系統。和斷層掃描相比，MRI 在影像擷取的部分除了可以自由選擇，更精確獲得所需的影像，最大優勢是在於它能夠任意觀察立體的影像，此一優勢為醫生提供一種更容易診斷病情，尋找病因的方式。目前MRI已經成為現代醫學不可或缺的影像診斷工具，許多相關的研究為了使得影像診斷可以更好、更靈敏、更準確而進行著，以求在醫學臨床的診斷、醫療及後續工作，能提供更完善的協助^[1-8]。

由於MRI 是藉由組織器官型態改變作為主要的影像診斷依據，而MRI對比劑的使用可加強型態改變之對比訊號強度，可於組織病變之早期即時發現，提升疾病早期治療的診斷效率。因此若要提升MRI的檢查效果，除了儀器本身的改良進步之外，開發具有高度對比效果的對比劑，便是另一個努力的方向。早在核磁共振發展的初期，Bolch等人^[9] 在1964年指出，若在水中加入順磁性的物質(paramagnetic materials) 可提高水中質子的弛緩速率。1955年，Solomon^[10]也曾描述在溶液中加入過渡金屬離子 (transition metal ions)，可以縮短氫質子的弛緩時間。到1973年，Lauterbur^[11]才將順磁離子加入組織液中，進而縮短氫離子的弛緩時間。而利用釷金屬離子錯合物 {gadolinium-diethylenetri-aminepentaacetic acid, [Gd(DTPA)]²⁻} 作為MRI的對比劑，則是在1980年後才開始的。若是根據顯影劑的特性分類，可以分成正相顯影劑 (positive contrast agent) 和反相顯影劑 (negative contrast agent) 兩種，正相顯影劑是以減少縱向弛緩時間 (spin-lattice relaxation time, T1) 為主的磁振造影對比劑，也稱為T1對比劑，其功能是用來增加組織訊號，使得影像比正常狀態下更為明亮。釷金屬離子錯合物即為其中一種，但釷金屬離子離子本身具有高毒性，因此必需合成無毒性之釷金屬離子錯化合物對比劑。另外由於釷金屬離子錯化合物對比劑市場價格高昂，因此近年來，一直不斷嘗試

發展新的對比劑，其中尤以超順磁性的反相對比劑發展最為突出，此類是以減少橫向弛緩時間（spin-spin relaxation time, T_2 ）的對比劑，也稱為 T_2 對比劑，其目的是用以減少組織訊號，使得影像轉為較灰暗或黑色。此即超順磁氧化鐵奈米粒子（superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIO）。

超順磁氧化鐵奈米粒子生物毒性較小但需增加其水溶性以及生物相容性。原因在於生物體內水分占了極大比例，若材料是非水溶性則會造成排斥或堵塞，而生物相容也極為重要性，以人為例，人體內存在著巨噬細胞(macrophages)，當異物或細菌侵入人體時，體內各處的巨噬細胞可吞噬清除異物此一機制系統，稱為單核球吞噬細胞系統(Mononuclear Phagocyte System, MPS)。由於氧化鐵奈米粒子有較大的表面積比，使得氧化鐵奈米粒子容易產生聚集及吸附血漿蛋白(plasma proteins)。因此，當氧化鐵奈米粒子注射到人體後，一旦氧化鐵奈米粒子有聚集或吸附現象產生，會迅速被單核球吞噬細胞系統之巨噬細胞吞噬，將氧化鐵奈米粒子從血液中快速排除，而無法到達組織細胞。因此為了滿足這三項考量，使用高分子來做為包覆在奈米粒子的薄膜是最常用的方法，此薄膜的材料必須具備高度的生物相容性(biocompatible)、非免疫性(nonimmunogenic)非抗原性 (nonantigenic)和抗蛋白質吸附

(protein-resistant)^[12]。常見的高分子有二氧化矽(silica)、聚二乙醇(PEG)、聚醯醯亞胺(PEI)、聚離氨酸(poly-lysine)、葡萄聚糖(dextran)等。經修飾之氧化鐵奈米粒子，即可避免其聚集與吸附，使氧化鐵奈米粒子減少被單核球吞噬細胞系統吞噬，而能順利到達組織細胞[13-18]。

Asialoglycoprotein receptors (ASGP-R) 是一種肝臟細胞膜上的受體，在各種肝病變的過程中，ASGP-R 的數量會有所變化，開發可與 ASGPR 相結合的藥劑，可以作為肝功能之預測^[20-26]。

目前國際間上市的肝受體造影劑只有 Tc-99m 半乳糖白蛋白造影劑，Tc-99m 半乳糖白蛋白造影劑屬於生物製劑，法規要求遠比一般診斷造影劑來得繁複；其白蛋白上所接螯合基與糖基數總和可能為 2-50，不但很難確定所接糖基總數，糖基接在那一位置也很難由任一品管技術獲得，品管相當不易控制。相較於 Tc-99m 半乳糖白蛋白造影劑，核研所所發展之半乳糖類胜肽衍生物，由分子量分析可以推知螯合基與糖基數，品管容易控制，有助提升檢測再現性。核研 ASGP-R imaging biomarker 已知對正常肝細胞具有肝標靶特性，但在肝癌的動物模式中，核研糖質藥物並沒有被吸收。由於 MRI 擁有比 SPECT 較佳的解析度，因此本研究目的將核研所之半乳糖類胜肽衍生物與 MRI 對比劑結合應用於 in vitro 和 in vivo 之實驗設計，並作為 ASGPR MRI

biomarker 的建立。

貳、研究方法與過程

利用熱裂解法合成，以減少粒子聚集並得到形狀一致良好的氧化鐵奈米粒子，並在超順磁氧化鐵中參雜 Mn 以求得更高的弛緩率，使之在 MRI 影像上有更好的顯影效果。為了將 SPIO 轉換為水溶性，並作為雙功能之生物探針，利用 Michael addition 合成 mPEG-NH₂-silane 包覆在 SPIO 之上，藉由末端胺基鍵結 FITC 以做為光學影像上之探針，並將剩餘之末端胺基與 divinyl sulfone (DVS) 作鍵結，使 DVS 能與 G-ah-GalNAc 之 NH₂ 端一對一接合，形成半乳糖類胜肽衍生物之 MRI 對比劑，並進一步進行水合直徑及弛緩率等物性討論。

一、MnFe₂O₄ 之合成製備

將 Iron acetylacetonate、Manganese chloride、Oleic acid、Oleylamine 和 Benzyl ether 混合置於高溫爐(如 Figure 1.所示)。緩慢升溫至 200°C 後持續加熱二小時使其融解並混合均勻，並加熱至 300°C，到達指定溫度並持續加熱一小時後降溫至室溫。產物加入丙酮後以 12000rpm 離心，並利用丙酮清洗，移除多餘的界面活性劑，離心後之沉澱物即為油酸包覆之 MnFe₂O₄ 奈米粒子，可溶於 chloroform 保存。可藉由調整 benzyl ether 的量改變金屬前驅物的濃度，藉以控制奈米粒徑，其穿透式電子顯微鏡之粒徑分析為 8.8 nm。除此之外，本研究也針對奈米粒子之組成成分與晶體結構進行 Energy-dispersive X-ray(EDX) 與 X-ray 之分析。

二、奈米氧化鐵粒子之表面修飾^[19]

由於油酸包覆之氧化鐵奈米粒子無法應用於生物實驗上，因此在本計畫之前期已經合成出具有胺基之聚合物分子，並且成功的修飾到氧化鐵奈米表面，其中裸露出的胺基能與抗體鍵結，或是鍵結其他應用於生物體內之發光團。其修飾的方式是將油酸包覆之氧化鐵奈米粒子(30mg/ml)溶於 20ml 的甲苯(Toluene)中，加入 1.5 倍當量之 mPEG-modified 粉末聚合物分子，經超音波震盪 8 小時，高濃度的 mPEG-modified 粉末聚合物分子會與油酸進行互換^[17]，隨後形成具有胺基修飾的水溶性氧化鐵奈米粒子，其粒徑經由動態光散射儀測出其平均粒徑為 35.1 nm，而之後將會探討表面電位(Zeta potential)之分析結果，對於表面修飾之官能基也會以傅立葉轉換紅外光光譜儀作為鑑定。

三、奈米氧化鐵接上有功能性標定之半乳糖類胜肽衍生物 (G-ah-GalNAc)

其半乳糖類胜肽衍生物是針對具有 anasialoglycoprotein receptor (ASGPr)受器過度表現之肝細胞進行標靶與診斷，其合成方式(如 Scheme 1.所示)為將氧化鐵水溶性奈米粒子(50mg/ml)融入水溶液中並加入 200 μ l 之 DVS，攪拌半小時後，再加入 G-ah-GalNAc100mg/ml(H₂O) 500 μ l，在常溫下震盪 12 hr，接著拿透析

膜過濾多餘的半乳糖類胜肽衍生物，將透析完後的溶液保存到 4°C 冰箱供實驗使用。

四、 $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-G-ah-GaINAc}$ 之體外細胞實驗(*In vitro*)

合成好的 $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-G-ah-GaINAc}$ 修飾上 FITC 發光團，作為流氏細胞儀之偵測基團，其發光團以 $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ 官能基與奈米粒子表面多餘的胺基進行鍵結，其反應 pH 值須調至 10 以上才能有效的反應，最後以 MW. 1000 之透析膜過濾多餘的發光團。準備有 anasialoglycoprotein receptor 表現之肝細胞(BNL)以及無表現之細胞株(KB)進行對照。將 5×10^5 之細胞總數轉移到 2ml 的微量離心管中，經由 PBS buffer 清洗三次後，加入 $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-G-ah-GaINAc-FITC}$ 奈米粒子(0.3mM)在冰中培養 1 小時，其目的在測試細胞對奈米粒子吞噬的情形，隨後以 PBS buffer 再清洗三次後即可以流氏細胞儀進行觀察。

參、主要發現與結論

此研究已經成功合成出多功能性的氧化鐵奈米粒子，應用於細胞之相關研究，其半乳糖類胜肽衍生物標定於肝細胞之研究結果顯示，半乳糖類胜肽衍生物擁有較佳的鍵結能力，可以快速並準確的辨識肝細胞中過度表現的 anasialoglycoprotein receptor (ASGPr)受器，而肝細胞的 ASGPr 數量在有肝病變的個體是會改變的，開發可與 ASGPr 相結合的藥劑，可以作為肝病變的預測，因此，本研究目的將核研所之

半乳糖類胜肽衍生物與 MRI 對比劑結合應用於 *in vitro* 和 *in vivo* 之實驗設計，並作為 ASGPR MRI biomarker 的建立

一、 氧化鐵奈米材料之鑑定

(一) 掃描式電子顯微鏡(SEM)與穿透式電子顯微鏡(TEM)之表面分析

本研究利用熱裂解的方式在高溫下合成出了超順磁氧化鐵參雜錳的SPIO (MnFe_2O_4)，其SEM及TEM 影像如Figure 2. 所示。從SEM 影像巨觀來看，合成之奈米粒子分散均勻，更進一步由TEM 影像可知，所有的粒子邊界都相都明顯可辨，呈現單分散 (monodisperse)現象沒有粒子之聚集，平均粒徑為 $8.2 \pm 0.7 \text{ nm}$ ，且粒子之粒徑都相近粒徑分佈範圍窄，粒子外觀皆為圓形或是多邊形，大小形狀一致。

(二) Energy-dispersive spectrometer (EDS)鑑定

以Energy-dispersive spectrometer (EDS)分析其微量元素，以電子束激發氧化鐵-錳奈米粒子而放射出來之X光穿過偵測器，再轉換成電流經放大器及脈衝處理器處理後，將X光能量訊號存入其對應之元素頻道位置，所得知結果如Figure 3.所示，可發現在油酸包覆之下的氧化鐵-錳奈米粒子能可偵測到鐵錳比率接近2比1，此結果說明以高溫裂解法合成之氧化鐵-錳奈米粒子，可藉由前驅物之濃度的調整欲合成之比例的氧化鐵-錳奈米粒子，也證實了合成結果符合預期設計。

(三)Relaxivity(r_2 , 弛緩率)之鑑定分析

目前已用熱裂解方式合成參雜錳之氧化鐵奈米粒子，並以生物相容性之高分子聚合物mPEG-NH₂-silane包覆，以增加其水溶性及生物相容性，並於其上之胺基端修飾上divinyl sulfone以利用其雙鍵與醣質上之胺基做鍵結，以20MHz relaxometer 測量其橫向弛緩率(r_2)得280.87 mM⁻¹s⁻¹，而弛緩率越高便能獲得越好的影像對比度，故本研究所合成之SPIO-mPEG-DVS-GalNac，可預期比市售用藥Resovist®更佳之顯影效果。

二、氧化鐵奈米粒子表面修飾之分析

為鑑定氧化鐵奈米粒子上是否有接合上 DVS，因此以傅利葉轉換紅外線光譜儀做進一步的測定，以透析方式純化 SPIOmPEG-NH₂-DVS 後，將其凍乾成粉末與 KBr 混合壓片測量後，可發現在 SPIOmPEG-NH₂-DVS 之圖譜中，約於 1200cm⁻¹ 以及 1400 cm⁻¹ 位置處可見 sulfone 之訊號。

三、氧化鐵之表面修飾半乳糖類胜肽衍生物之分析

(一)氧化鐵之醣質奈米粒子粒徑分析(DLS)

動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS)的原理是利用

使用單一波長的雷射光照射在分散在液相中的懸浮粒子表面，量測在幾個反射角的反射光強度，或者固定在某一個角度量測反射光強度的衰變情形，再配合理論分析模式，便可以得到粒子的平均大小及分布。氧化鐵奈米粒子經 DLS 測量粒徑為 31.3 nm，接上螢光基團(FITC)增加至 35.85 nm，再接上 G-ah-GalNAc 粒徑增加至 57.92 nm。

(二)奈米氧化鐵表面電價之測定(Zeta potential)

表面電位(Zeta potential)的測定可以了解粒子在溶液中的外層電荷分布的情形，通常大於+20 mV 或是小於-20 mV 都可以說明粒子在溶液中的排斥性極佳，相對的粒子比較不會產生沉澱或聚集的現象，由 Figure 7.所示，尚未鍵結的水溶性氧化鐵奈米粒子為+29.4 mV，而接上 FITC 後的氧化鐵奈米粒子其表面電價會下降至+26 mV，再接上 G-ah-GalNAc 表面電價會下降至-5.81 mV，此結果說明半乳糖類胜肽衍生物會影響奈米粒子表面電價之分佈，即便如此，奈米粒子還是能穩定的存在溶液中，其次的原因為奈米粒子表面的 mPEG 聚合物分子為中性水溶性物質，奈米間會形成立體阻礙而不至於聚集，且能維持較長的時間。

四、 MnFe_2O_4 -G-ah-GalNAc 之體外細胞實驗(*In vitro*)測定

(一)共軛焦顯微鏡之細胞影像分析

雷射共軛交顯微鏡(Confocal Microscope)之細胞影像分析，將細胞植入 6 well 孔盤中培養 12 小時，加入 4% 固定液 (paraformaldehyde solution) 後，細胞會貼附在蓋玻片上，隨後用 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue) 以及 HiLyte Fluor™ 594 acid (red) 各別染細胞質及細胞核，如 Figure 8. 所示，實驗組的細胞 (BNL) 在 4 小時有明顯的螢光，而對照組的細胞 (KB) 則無螢光，證實本實驗設計的 SPIO-mPEG-DVS-GalNAc 有與 BNL 上的 ASGP-R 受體結合。

(二)流式細胞儀(Flow cytometry)之受器結合分析

流式細胞儀可針對細胞對 MnFe_2O_4 -G-ah-GalNAc 的吞嚥或是接收的能力而進行探討及研究，Figure 9. 可看見實驗組的細胞 (BNL) 有明顯的位移，而對照組的細胞 (KB) 則無位移。

(三)細胞之體外(*in vitro*)磁振造影分析

SPIO-mPEG-DVS-GalNAc 對細胞之磁振造影分析 (MR imaging)，為了應用於醫學診斷之研究，在體外實驗利用兩株細胞株，對照組細胞

為 KB，及 ASGP-R 有表現之實驗組細胞 BNL，分別與 SPIO-mPEG-DVS-GalNac 培養，再利用 3.0 T MRI 進行造影，如 Figure 9.所示，SPIO-mPEG-DVS-GalNac 會目標化到過度表現 ASGP-R 的細胞 (BNL)，由磁性奈米粒子培養前後，訊號值有明顯差異，經磁性奈米粒子培養後的細胞影像變黑，訊號值下降；而不表現 ASGP-R 的細胞(KB) 磁性奈米粒子培養前後的影像則無明顯變化，因此本實驗設計的 SPIO-mPEG-DVS-GalNac 確實有達到預期的效果。

肆、參考文獻

1. Kidwell, C. S.; Chalela, J. A.; Saver, J. L.; Starkman, S.; Hill, M. D.; Demchuk, A. M.; Butman, J. A.; Patronas, N.; Alger, J. R.; Latour, L.L.; Marie L. Luby, M.; Baird, A. E.; Leary, M. C.; Tremwel, M.; Ovbiagele, B.; Fredieu, A.; Suzuki, S.; Villablanca, J. P.; Davis, S.; Dunn, B.; Todd, J. W.; Ezzeddine, M. A.; Haymore, J.; Lynch, J. K.; Davis, L.; Warach, S. *J. Am. Med. Assoc.* **2004**, *292*, 1823-1830.
2. Sun, C.; Veiseh, O.; Gunn, J.; Fang, C.; Hansen, S.; Lee, D.; Sze, R.; Ellenbogen, R. G.; Olson, J.; Zhang, M., *small* **2008**, *4*, 372-379.
3. Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P., *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 2209-2211.
4. Schellenberger, E.; Schnorr, J.; Reutelingsperger, C.; Ungeth, L.; Meyer, W.; Taupitz, M.; Hamm, B., *small* **2008**, *4*, 225-230.
5. Li, Z.; Tan, B.; Allix, M.; Cooper, A. I.; Rosseinsky, M. J., *small* **2008**, *4*, 231-239.
6. Kalambur, V. S.; Longmire, E. K.; Bischof, J. C., *Langmuir* **2007**, *23*, 12329-12336.
7. Zabow, G.; Dodd, S.; Moreland, J.; Koretsky, A., *Nature* **2008**, *453*, 1058-1064.
8. Gallagher, F. A.; Kettunen, M. I.; Day, S. E.; Hu, D. E.; Ardenkjær-Larsen, J. H.; Zandt, R. i. t.; Jensen, P. R.; Karlsson, M.; Golman, K.; Lerche, M. H.; Brindle, K. M., *Nature* **2008**, *453*, 940-944.
9. Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M., *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127-135.
10. Solomon, I., *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559-565.
11. Lauterbur, P. C., *Nature* **1973**, *242*, 190-201.
12. Lee, H.; Lee, E.; Kim, D. K.; Jang, N. K.; Jeong, Y. Y.; Jon, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7383-7389.
13. Horák, D.; Babič, M.; Jendelová, P.; Herynek, V.; Trchova, M.; Pientka, Z.; Pollert, E.; Hájek, M.; Syková, E., *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 635-644.
14. Wan, S.; Huang, J.; Guo, M.; Zhang, H.; Cao, Y.; Yan, H.; Liu, K., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *80*, 946-954.
15. Sun, B.; Ranganathan, B.; Feng, S. S., *Biomaterials* **2008**, *29*,

- 475-486.
16. Zhang, Y.; Kohler, N.; Zhang, M., *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553-1561.
 17. Kohler, N.; Fryxell, G. E.; Zhang, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7206-7211.
 18. Gupta, A. K.; Gupta, M., *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021.
 19. Randy, D. P.; Sara P., Margriet J. V.-B., Heidi V.-d. R. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 1821-1831.
 20. Kim E.M.; Jeong H.J; Moon M.H., *J.Controlled.Release.* **2005**, *108*, 557-567.
 21. S.Ghiamkazemi ; M.Hajiabedin ; .Amanzadeh ; Amini ; R.Dinarvand ; M.Amini ; M.Rafiee-Tehrani, *IJPR.* **2011**, *3(2)*, 20-26
 22. McCann T. E.; Kosaka N. ; Mitsunaga M. ; Choyke P. L. ; Gildersleeve J. C.; Kobayashi H., *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1925–1932
 23. Lai C. H. ; Lin C. Y. ; Wu H. T. ; Chan H. S. ; Chuang Y. J. ; Chen C. T. ; Lin C. C., *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 3948–3958
 24. Ashwell, G. and Harford, J, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 531-554
 25. Lee, Y. C, *FASEB J.* **1982**, *6*, 3193-3200.
 26. Hangeland, J. J.; Levis, J. T; Lee, Y. C and Ts' o, P.O.P, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 695-701.