

文章编号:0253-9950(2007)04-0231-07

MAG₃-Folate 的合成及⁹⁹Tc^m 标记

胡春林¹, 崔海平¹, 杜 进^{1, 2, *}

1. 中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413; 2. 中国同位素公司, 北京 100045

摘要:合成了双功能螯合剂 *S*-乙酰基-巯基乙酸-三甘氨酸-*N*-羟基丁二酰亚胺酯(*S*-Acetyl-MAG₃-NHS), 并以叶酸(folic acid, FA)、乙二胺(ethylenediamine, EDA)和 *S*-Acetyl-MAG₃-NHS 为原料, 合成叶酸配体化合物 MAG₃-FA; 利用酒石酸钠转换配合进行 MAG₃-FA 的⁹⁹Tc^m 标记, 重点探讨⁹⁹Tc^m 标记条件及标记物体外稳定性。结果表明, 合成的双功能螯合剂 *S*-Acetyl-MAG₃ 及配体化合物 MAG₃-FA 可成功用于⁹⁹Tc^m 的放射性标记, 在最佳标记条件下, 其标记效率大于 70%, 经分离纯化后, ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 的放射化学纯度大于 95%, 标记物体外稳定, 为进一步研究⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 的体内外生物学特性奠定了基础。

关键词: 叶酸; MAG₃; ⁹⁹Tc^m; 标记

中图分类号: R817.1 文献标识码: A

Synthesis of MAG₃-Folate and Its ⁹⁹Tc^m Radiolabeling

HU Chun-lin¹, CUI Hai-ping¹, DU Jin^{1, 2, *}

1. Department of Isotopes, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;

2. China Isotope Corporation, Beijing 100045, China

Abstract: A bifunctional chelator *S*-Acetyl-mercaptoacetyl-glycyl-glycyl-glycine *N*-hydroxysuccinimide ester (*S*-Acetyl-MAG₃-NHS) was synthesized. Folic acid (FA), ethylenediamine (EDA) and *S*-Acetyl-MAG₃-NHS were used to prepare MAG₃-FA conjugate. The FA-MAG₃ was radiolabeled with ⁹⁹Tc^m by using sodium tartrate as a transchelator. The ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA radiolabeling conditions and its *in vitro* stability were studied. The MAG₃-FA conjugate was radiolabeled with ⁹⁹Tc^m successfully. Under optimum conditions, the labeling efficiency of ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA exceeds 70% and the radiochemical purity is more than 95% after purification. The *in vitro* stability of the radiolabeled conjugate is satisfied. The successful preparation of ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA will lay the foundation for further study of its *in vivo* biological properties.

Key words: folic acid (FA); MAG₃; ⁹⁹Tc^m; labeling

叶酸(FA, 也称维生素 M, 维生素 BC, 蝶酰谷氨酸), 是细胞增殖不可缺少的一种物质, 而大量增生的细胞需要消耗大量的 FA, 这些 FA 通过连

接在细胞膜上的还原型 FA 载体(RFC)或者叶酸受体(FR)穿过质膜来运输到细胞内。RFC 在所有的细胞中都有发现, 为正常细胞转运必需的叶

收稿日期:2006-12-11; 修订日期:2007-06-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370421);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(2004)

作者简介:胡春林(1981—),男,四川达州渠县人,硕士研究生,分析化学专业。

* 为通讯联系人

酸;FR 主要存在于极化的上皮细胞和活化的巨噬细胞^[1],在很多肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、直肠癌、肾癌和鼻咽癌等细胞上有过度表达^[2-4],并随着肿瘤病情恶化而增加^[5]。由于叶酸与 FR 高亲和力($K_d=10^{-9}\sim 10^{-10}$),而 FR 在肿瘤细胞上的表达远远高于正常细胞^[6-8],因此肿瘤细胞上高表达 FR 可作为 FA 及其类似药物的作用靶点,采用放射性核素¹¹¹In、⁹⁹Tc^m 标记的 FA 及其类似物可对 FR 阳性肿瘤进行显像诊断。由于⁹⁹Tc^m 优越的核性质,国内外的研究者进行了⁹⁹Tc^m 标记叶酸及其类似物的研究,如:⁹⁹Tc^m-HYNIC-Folate^[9],⁹⁹Tc^m-EC20^[10],⁹⁹Tc^m-DTPA-Folate^[11],⁹⁹Tc^m-MAG₃-Folate^[12]等,实验结果显示,这些放射性标记物在动物体内外的生物化学性质稳定,在荷叶酸受体阳性肿瘤的裸鼠生物分布及显像研究中,取得了较高的 T/NT 值和较好的显像效果。

S-乙酰基-巯基乙酸-三甘氨酸(S-Acetyl-MAG₃)由 Winnard 等^[13]于 1997 年合成并用于 DNA 的⁹⁹Tc^m 标记的螯合剂。与苯基保护的 MAG₃(Benzoyl-MAG₃)相比,⁹⁹Tc^m 的标记条件温和,适用于抗体^[14]、核酸^[13,15]、多肽^[16]的⁹⁹Tc^m 放射性标记。本工作拟以 S-乙酰基-巯基乙酸-三甘氨酸-N-羟基丁二酰亚胺酯(S-Acetyl-MAG₃-NHS)为双功能螯合剂,通过乙二胺上的氨基将 S-Acetyl-MAG₃ 与叶酸连接,合成叶酸受体配体化合物 MAG₃-FA,并进行⁹⁹Tc^m 标记条件及标记物体外稳定性的研究,以期得到体内稳定的⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA,为进一步研究其体内生物学特性、开发叶酸受体阳性肿瘤显像的放射性标记药物提供实验依据。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

叶酸,分析纯,TCI 东京化成公司产品;N-羟基琥珀酰亚胺、N,N'-二环己基碳二亚胺,分析纯,瑞士 ACROS 公司产品;三甘氨酸、巯基乙酸,分析纯,德国 Fluka 公司产品;N-甲基-2-吡咯烷酮、二甲基亚砜(DMSO),色谱纯,美国 SIGMA 公司产品;乙二胺,分析纯,北京化工厂产品;⁹⁹Tc^mO₄⁻淋洗液,北京原子高科股份有限公司产品。

HEWLETT PACKARD 高效液相色谱仪,美国惠普公司产品;GILSON 806 高效液相仪,法

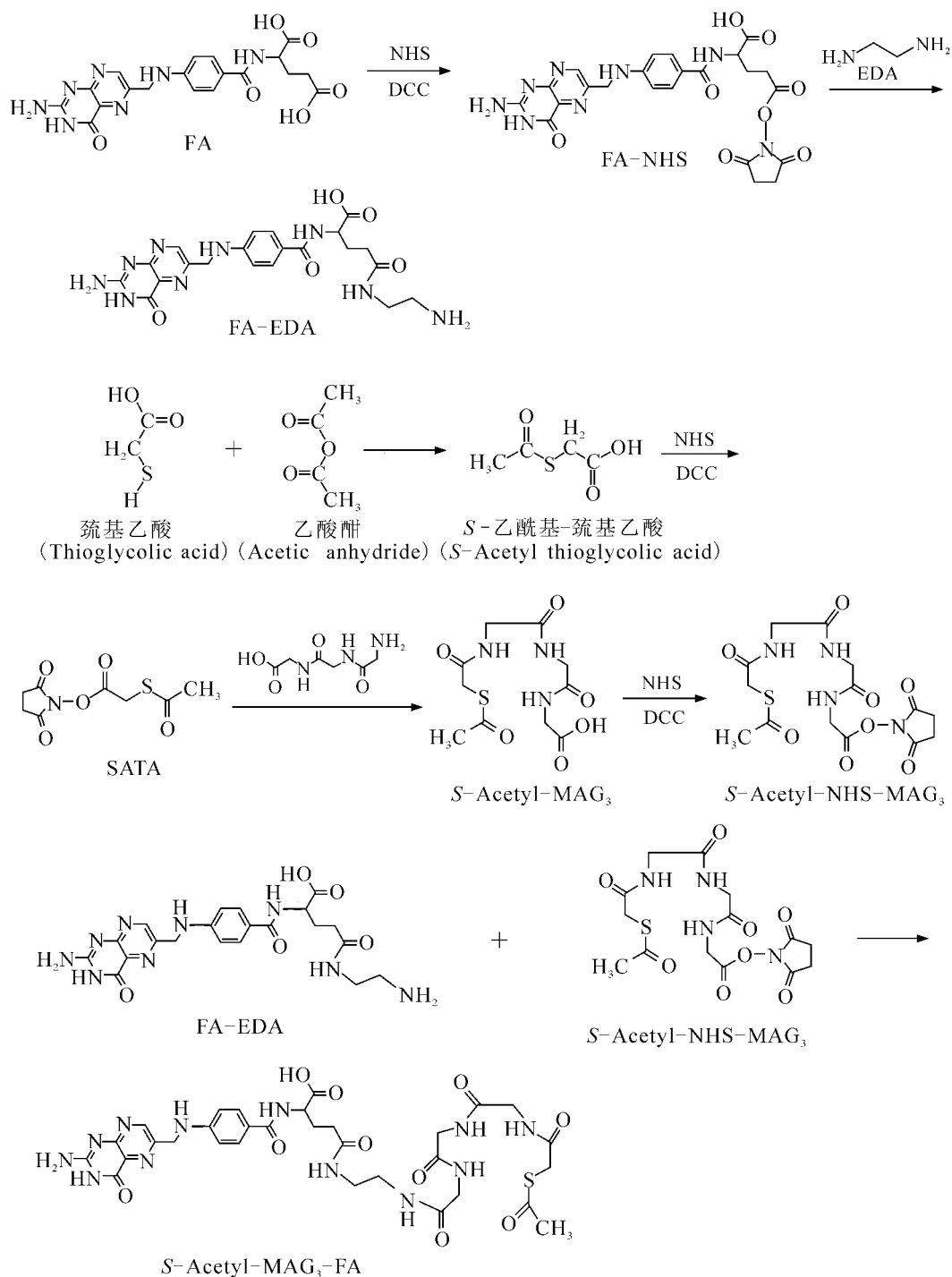
国 Gilson 公司产品;Pro-Star 高效液相色谱仪,美国 Varian 公司产品;Raytest Gabi 放射性探测仪,瑞士 CAMAG 公司产品;1470 自动伽马计数器,芬兰 Perkin Elmer 公司产品;Sep-Pak C18 色谱柱,美国 Waters 公司产品;CRC-15R 放射性活度计,美国 Capintec 公司产品。

1.2 MAG₃-FA 的合成

从叶酸开始经 3 步反应合成 MAG₃-FA,其反应线路示于图 1。

1.2.1 S-乙酰基-巯基乙酸-三甘氨酸-N-羟基丁二酰亚胺酯(S-Acetyl-MAG₃-NHS)的合成 按文献^[13]方法合成 S-Acetyl-MAG₃,将 1.6 g (5.24 mmol) S-Acetyl-MAG₃ 和 0.604 g (5.24 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于 5 mL N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP),常温搅拌 20 min 后,使用冰水浴冷却至 0 °C,将 1.26 g (6.026 mmol) N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)溶解于 2.0 mL NMP 中,并将该溶液缓慢滴加到 S-Acetyl-MAG₃ 和 NHS 的混合溶液中,在冰水浴中搅拌 2 h 后,有大量白色沉淀生成,再升至室温,继续反应 16 h。减压过滤除去沉淀,搅拌下向滤液加入无水乙醚,直至不再产生沉淀,减压过滤,将所得固体真空干燥,装瓶封口后于 -20 °C 下保存。得产物 NHS-MAG₃ 1.6 g,产率 76.2%。¹H NMR (500 MHz, DMSO, δ): 8.22~8.53 (t, -OC-NH-CH₂-, 3H), 4.26, 3.76 (d, -NH-CH₂-, 6H), 3.66 (s, -S-CH₂-, 2H), 2.82 (s, -CO-CH₂-CH₂-CO-, 4H), 2.36 (s, -CO-CH₃, 3H); ESI-MS(m/z): 403.08(M + H⁺)。

1.2.2 FA-EDA 的合成 将 2.5 g FA (5.65 mmol) 缓慢溶解于 50 mL DMSO,加入 1.176 g (6.215 mmol) DCC 和 0.715 g (6.215 mmol) NHS 在室温避光反应 4 h。过滤除去不溶物,滤液即 FA-NHS,装瓶,避光于 -20 °C 下保存待用^[9]。取 7.0 mL 上述 FA-NHS 液体缓慢滴加到 0.4 mL 乙二胺(EDA)中,室温下搅拌反应 5 h,加入 28 mL 乙腈,沉淀出 FA-EDA 粗产品,离心,沉淀物用乙醚洗涤 3 次后,真空干燥^[17]。得到橙黄色粉末约 300 mg。取 188 mg 产物使用 HPLC (GILSON 806) 在制备型 C18 反相柱 (21.2 mm×250 mm, ZORBAX) 上分离纯化。流动相组成:A 为 0.05% 三氟乙酸(TFA)水溶液, pH=3.5; B 为乙腈;流速为 5 mL/min。洗脱条

图 1 MAG₃-FA 的合成Fig. 1 Synthesis of MAG₃-FA

件: 0→15% B 梯度淋洗 20 min, 15%→10% B 梯度淋洗 20 min, 洗脱分离纯化得到 FA-EDA。FA-EDA (γ) 和 FA-EDA (α) 的保留时间分别为 27 和 31 min。分别收集 FA-EDA (γ) 和 FA-EDA (α) 组分溶液, 减压蒸馏至干, 真空干燥。得到 FA-EDA (γ) 红黄固体粉末产物 46 mg, 产率

19%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ): 8.66 (s, 1H, C7-H), 7.65~7.68 (d, 2H, Ar), 6.64~6.67 (d, 2H, Ar), 4.51 (s, 1H, C9-2H), 4.30 (dd, 1H, C19-H), 3.13~3.28 (m, 2H, C25-2H), 2.84~2.86 (m, 2H, C26-2H), 2.28 (m, 2H, C22-2H), 1.91~2.02 (m, 2H,

C21-2H); FAB 质谱分析 (m/z): 484. 3 ($M + H^+$)。

1. 2. 3 MAG₃-FA 的合成 将 5 mg (0. 01 mmol)FA-EDA 和 41 mg (0. 1 mmol) S-Acetyl-MAG₃-NHS 混合溶于 2. 0 mL DMSO, 室温避光搅拌 12 h, 过滤除去不溶物, 向滤液中搅拌加入乙醚-乙腈(体积比为 2 : 1)溶液, 直至不再产生沉淀。常温下离心, 收集沉淀物, 分别用乙腈和乙醚洗涤 2 到 3 次, 真空干燥。得到黄色固体粉末约 6 mg。样品进一步用 HPLC 在 SB-C18 柱 (5 μ m, 4. 6 mm \times 250 mm, ZORBAX) 上分离纯化, 流动相组成: A 为 0. 01 mol/L 磷酸缓冲溶液, pH=6. 0; B 为乙腈; 流速为 1 mL/min。洗脱条件: 5% \rightarrow 15% B 梯度淋洗 20 min, 15% \rightarrow 5% B 梯度淋洗 5 min。MAG₃-FA 的保留时间为 15. 5 min。收集 MAG₃-FA 样品溶液, 减压蒸馏至干, 真空干燥, 得深黄色固体产物 9 mg, 产率 70%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ): 8. 63 (s, 1H, C7-H), 8. 24~8. 40(m, C[30, 33, 36]-3H), 7. 61~7. 64 (d, 2H, Ar), 6. 61~6. 64 (d, 2H, Ar), 4. 48 (d, 1H, C9-H), 4. 03 (dd, 1H, C19-H), 3. 65~3. 74(m, C[28, 31, 34, 37]-8H), 3. 07 (m, 2H, C25-2H), 2. 71 (m, 1H, C26-H), 2. 34(s, 3H, C40-3H), 2. 15 (m, 2H, C22-2H), 1. 85~2. 06 (m, 2H, C21-2H); MS (MALDI-TOF) 质谱分析 (m/z): 770. 93 [$M + H$]⁺。

1. 3 ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 的制备

采用酒石酸钠转换配合法对 MAG₃-FA 进行 ⁹⁹Tc^m 标记。将 200 μ g MAG₃-FA 溶于 100 μ L pH=7. 2 的磷酸盐缓冲溶液, 取出 10 μ L 上述溶液于 1. 5 mL Eppendorf 管中, 先后加入 10 μ L 酒石酸钠溶液 (50 g/L 溶于 0. 5 mol/L 碳酸氢钠、0. 25 mol/L 醋酸铵、0. 18 mol/L 氨水, pH=9. 2) 和 30 μ L 新鲜淋洗的 ⁹⁹Tc^mO₄⁻ 淋洗液 (约 111 MBq), 再加 20 μ L 新配制的氯化亚锡溶液 (1. 0 g/L, 溶于 10 mmol/L 的盐酸溶液中), 混匀, 90 $^{\circ}$ C 下加热反应 20 min, 冷却至室温。采用 Sep-Pak C18 色谱小柱分离纯化标记物并检测标记效率^[18]。分别用 10 mL 1. 0 mmol/L 盐酸溶液和 10 mL 无水乙醇洗涤活化 Sep-Pak C18 小柱, 将标记混合液上柱, 先用 10 mL 1 mmol/L 盐酸溶

液淋洗 Sep-Pak C18 柱, 除去 ⁹⁹Tc^m-酒石酸钠及高锝酸 (⁹⁹Tc^mO₄⁻), 收集淋洗液于 10 mL 玻璃瓶中; 再用 10 mL 50% 的乙醇/生理盐水淋洗 Sep-Pak C18 柱, 即得到标记物, 收集淋洗液于 10 mL 玻璃瓶中。分别用活度计测量 10 mL 盐酸溶液、50% 的乙醇/生理盐水淋洗液及 Sep-Pak C18 柱的放射性活度, 计算 ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 的标记率。

用 HPLC 检测标记物放化纯度 (RCP): 采用 C18 反相柱 (5 μ m, 4. 6 mm \times 250 mm, 依华特, 大连)。流动相组成: A 为 0. 1% TFA 水溶液; 流动相 B, 乙腈; 流速为 1 mL/min。洗脱条件: 5% \rightarrow 15% B 梯度淋洗 20 min, 15% \rightarrow 5% B 梯度淋洗 5 min。

1. 4 ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 的体外稳定性实验

将 0. 1 mL ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 标记物 (约 32 MBq) 加入至 0. 9 mL 生理盐水, 在室温和 37 $^{\circ}$ C 下温浴, 经 HPLC 检测标记物在 1, 4, 20, 24 h 的放化纯度, 分析条件如上。

将 0. 1 mL ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 标记物 (约 37 MBq) 加入至 0. 9 mL 5% 人血清中, 37 $^{\circ}$ C 下温浴, 分别于 1, 4, 20, 24 h 取出 0. 2 mL 混合液加入至 0. 8 mL 乙腈-乙醇 (体积比为 1 : 1) 溶液中, 室温静置, 让血清蛋白沉淀, 离心并取出上清液, 并分别测量上清液和蛋白沉淀的放射性活度, 计算蛋白结合 ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 的量, 并用 HPLC 分析上清液的放化纯度。

分别取 100 μ L ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 标记物 (22. 2 MBq, 约 0. 65 nmol/L) 加入 400 μ L 不同浓度的半胱氨酸 (于 0. 1 mol/L, pH=7. 2 磷酸盐缓冲溶液) 溶液中, 进行半胱氨酸竞争实验 (溶液中 ⁹⁹Tc^m-MAG₃-FA 与半胱氨酸摩尔比分别为 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1 000), 于 37 $^{\circ}$ C 下温浴 1 h 后, 采用 Sep-Pak C18 色谱小柱分析放化纯度^[17]。

2 结果和讨论

2. 1 FA-MAG₃ 的合成

叶酸分子上有 2 个羧基 (α 及 γ -羧基), 可以通过控制 NHS 和 EDA 的用量活化其中的 1 个羧基, 生成 FA-EDA 化合物。产物的质谱分析结果显示: 合成产物的相对分子质量为 484. 3 (占 99%), 说明每个叶酸分子上连接 1 个 EDA 分

子,即 FA-EDA(α)或 FA-EDA(γ),仅含不足 1% 的 FA-EDA (bis) 二聚体,与文献结果一致^[17]。叶酸通过连接的 EDA 上另外 1 个游离的氨基与双功能螯合剂 S-Acetyl- MAG_3 -NHS 偶联,形成 MAG_3 -FA,合成反应须在室温避光条件和比较温和的条件下进行,以免 S-Acetyl- MAG_3 分子中保护巯基的乙酰基脱落,从而使巯基氧化形成双硫键, MAG_3 -FA 分子间发生交联,形成聚合物,影响 $^{99}\text{Tc}^m$ 的标记及配体化合物的生物活性。通过 HPLC 可检测反应溶液中 FA-EDA 的含量,当反应进行 12 h 后,反应基本完成,经 HPLC 分离纯化后,结构分析表征确认产物 MAG_3 -FA 与所设计的结构符合。

2.2 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 的制备及分析

采用酒石酸钠转换配合法对 MAG_3 -FA 进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记,在最佳标记反应条件为: SnCl_2 质量浓度为 0.3 g/L, MAG_3 -FA 质量浓度为 0.3 g/L, pH=9.5, 90 °C 下加热反应 20 min, $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 的标记率大于 70%。标记物经 Sep-Pak C18 柱纯化后,其放射化学纯度大于 95%。在常温和中性 pH 条件下,标记时间长达 3 h,标记率也不超过 50%,和文献^[18]结果基本一致。标记物纯化后典型的 HPLC 分析谱图示于图 2,显示标记物中具有 4 个放射化学组分,与文献^[10, 18]结果基本一致。经过与对照物的 HPLC 色谱分析确认:峰 A 为游离 $^{99}\text{Tc}^m\text{O}_4^-$ ($t_R = 5.1$ min, 质量分数小于 1.0%);峰 B 可能为含叶酸和螯合剂的未知结构物 ($t_R = 9.9$ min, 质量分数小于 4%);峰 C 和 D 为主要标记物 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA (t_R 分别为 12.5 和 19.5 min, 质量分数大于 95%),推测可能为 MAG_3 螯合环上 Tc-O 异构体^[10]。组分 C 及 D 可采用质谱进行分析,进一步确定^[10]。

从 Hnatowich 等^[18]对乙酰基、苯基保护的 2 种 MAG_3 的标记条件实验的 HPLC 图谱来看,在常温溶液介质 pH=7.5、常温溶液介质 pH=11 及 95 °C 溶液介质 pH=7.5 等 3 种标记条件下,2 种 MAG_3 均会出现类似图 2 的 B 和 C 峰,但是在 95 °C 下, B 和 C 峰相对 D 峰小得多,这种现象在 MAG_3 -FA 的标记中也有类似出现。Okarvi 等^[12]采用苯基保护的 S-Benzoyl- MAG_3 与叶酸偶联并进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记,其标记物的 HPLC 分析

结果同样出现类似本实验中的 B 和 C 峰。

总之,适当提高标记反应温度及反应介质的 pH 值,能提高反应标记率,其原因可能是高 pH 值及高温能促进 MAG_3 上的氨基去质子,有利于标记^[19]。

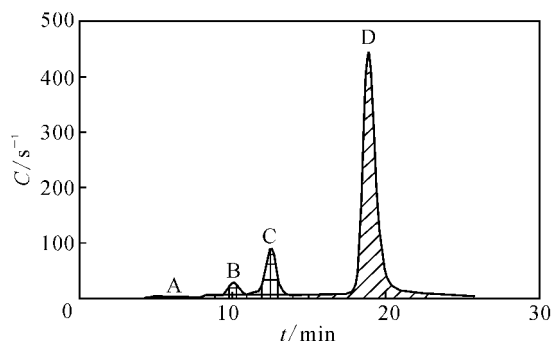


图 2 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 的 HPLC 放射性图谱

Fig. 2 HPLC radiochromatogram of $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA

2.3 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 的体外稳定性

$^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 在生理盐水中稳定性较好,结果示于图 3。由图 3 看出,室温和 37 °C 下放置 24 h,其放射化学纯度仍大于 90%。 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 在人血清中蛋白结合实验显示, $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 对蛋白的结合小,24 h 后,其蛋白结合小于 14.6%,上清液 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 的放射化学纯度仍大于 90%。

$^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 在半胱氨酸溶液中 37 °C 温浴 1 h 的稳定性结果示于图 4。由图 4 可知,当半胱氨酸与 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 的浓度比为 1 000 : 1 时, $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 的放射化学纯度仍大于 60%,与 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 在半胱氨酸溶液中实验结果一致^[13],说明 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 体外非常稳定。由于生物体内含有一些游离的巯基化合物,与 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记物在体内竞争配合,体外半胱氨酸竞争实验结果可以间接反映 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记物在生物体内的稳定性^[19],由此可推断 $^{99}\text{Tc}^m$ - MAG_3 -FA 在生物体内可能比较稳定。

3 结 论

合成了叶酸配体化合物 MAG_3 -FA,并利用 ^1H NMR, MS 等手段对其进行了表征,通过酒石酸钠转换配合法对 MAG_3 -FA 进行 $^{99}\text{Tc}^m$ 的标

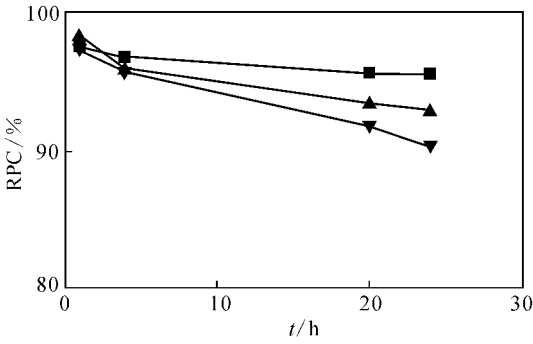


图 3 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MAG}_3\text{-FA}$ 在生理盐水和人血清中的稳定性

Fig. 3 Stability of $^{99}\text{Tc}^m\text{-MAG}_3\text{-FA}$ in saline and human serum

■——室温 (Room temperature), 生理盐水 (Saline);
 ▲——37 °C, 生理盐水 (Saline);
 ▼——37 °C, 人血清 (Human serum)

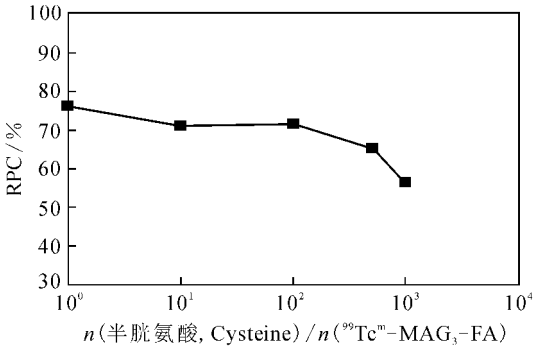


图 4 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MAG}_3\text{-FA}$ 在半胱氨酸溶液中的稳定性

Fig. 4 Stability of $^{99}\text{Tc}^m\text{-MAG}_3\text{-FA}$ in cysteine solution

记,在最佳标记条件下, $^{99}\text{Tc}^m\text{-MAG}_3\text{-FA}$ 的标记效率大于 70%,经分离纯化后,其放射化学纯度大于 95%,标记物体外稳定,为进一步研究 $^{99}\text{Tc}^m\text{-MAG}_3\text{-FA}$ 体内生物学特性奠定了基础。

致谢:本工作得到了中国原子能科学研究院胡骥老师以及翟士桢、何川、沈亦佳、赵磊等同学的热情帮助和支持,在此表示真挚的谢意。

参考文献:

[1] Kukowska-Latallo J F, Candido K A, Cao Z, et al. Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Im-

proves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer[J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (12): 5 317-5 324.

[2] Weitman S D, Weinberg A G, Coney L R, et al. Cellular Localization of the Folate Receptor: Potential Role in Drug Toxicity and Folate Homeostasis [J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 6 708-6 711.

[3] Toffoli G, Russo A, Gallo A, et al. Expression of Folate Binding Protein as a Prognostic Factor for Response to Platinum-Containing Chemotherapy and Survival in Human Ovarian Cancer[J]. *Int J Cancer*, 1998, 79: 121-126.

[4] Ward C M, Acheson N, Seymour L W. Folic Acid Targeting of Protein Conjugates Into Ascites Tumor Cells From Ovarian Cancer Patients [J]. *J Drug Target*, 2000, 8: 119-123.

[5] Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, et al. Overexpression of Folate Binding Protein in Ovarian Cancers [J]. *Int J Cancer*, 1997, 74:193-198.

[6] Weitman S D, Lark R H, Coney L R, et al. Distribution of the Folate Receptor GP38 in Normal and Malignant Cell Lines and Tissues[J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 3 396-3 401.

[7] Gates S B, Mendelsohn L G, Shackelford K A, et al. Characterization of Folate Receptor From Normal and Neoplastic Murine Tissue: Influence of Dietary Folate on Folate Receptor Expression[J]. *Clin Cancer Res*, 1996, 2: 1 135-1 141.

[8] Lee R J, Low P S. Delivery of Liposomes Into Cultured KB Cells via Folate Receptor Mediated Endocytosis[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (5): 3 198-3 204.

[9] Guo W, Hinkle G H, Lee R J. $^{99}\text{Tc}^m\text{-HYNIC-Folate}$: A Novel Receptor-Based Targeted Radiopharmaceutical for Tumor Imaging [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40(9): 1 563-1 569.

[10] Leamon C P, Parker M A, Vlahov I R, et al. Synthesis and Biological Evaluation of EC20: A New Folate-Derived, $^{99}\text{Tc}^m$ -Based Radiopharmaceutical [J]. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13: 1 200-1 210.

[11] Mathias C J, Hubers D, Low P S, et al. Synthesis of [$^{99}\text{Tc}^m$] DTPA-Folate and Its Evaluation as a Folate-Receptor-Targeted Radiopharmaceutical [J]. *Bioconjugate Chem*, 2000, 11 (2): 253-257.

[12] Okarvi S M, Jammaz I A. Preparation and *in Vitro* and *in Vivo* Evaluation of Technetium-99m-Labeled

- Folate and Methotrexate Conjugates as Tumor Imaging Agents[J]. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 2006, 21(1): 49-61.
- [13] Winnard Jr P, Chang F, Rusckowski M, et al. Preparation and Use of NHS-MAG₃ for Technetium-99m Labeling of DNA[J]. *Nuclear Medicine & Biology*, 1997, 24: 425-432.
- [14] Lei K, Rusckowski M, Chang F, et al. Technetium-99m Antibodies Labeled With MAG₃ and SHNH-an *in Vitro* and Animal *in Vivo* Comparison [J]. *Nuclear Medicine and Biology*, 1996, 23: 917-922.
- [15] Mardirossian G, Lei K, Rusckowski M, et al. *In Vivo* Hybridization of Technetium-99m-Labeled Peptide Nucleic Acid (PNA) [J]. *J Nucl Med*, 1997, 38: 907-913.
- [16] Hnatowich D J, Qu T, Chang F, et al. Labeling Peptides With ⁹⁹Tc^m Using NHS-MAG₃ Bifunctional Chelator[J]. *J Nucl Med*, 1998, 39: 56-64.
- [17] Wang S, Luo J, Lantrip D A, et al. Design and Synthesis of [¹¹¹In] DTPA-Folate for Use as a Tumor-Targeted Radiopharmaceutical[J]. *Bioconjugate Chem*, 1997, 8(5): 673-679.
- [18] Hnatowich D J, Chang F, Qu T, et al. The Influence of Temperature and Alkaline pH on the Labeling of Free and Conjugated MAG₃ With Technetium-99m[J]. *Appl Radiat Isot*, 1997, 48(5): 587-594.
- [19] Bormans G, Cleynhens N, Adriaens P, et al. Investigation of the Labeling Characteristic of ⁹⁹Tc^m-Mercaptoacetyltriglycine[J]. *Nucl Med Biol*, 1995, 22: 339-349.
- [20] Hnatowich D J, Virzi F, Fogarasi M, et al. Can a Cysteine Challenge Assay Predict the *in Vivo* Behavior of ⁹⁹Tc^m Labeled to Antibodies? [J]. *Nucl Med Biol*, 1994, 21: 1 035-1 044.