

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ 的制备及 正常鼠体内生物分布

卿 晶^{1,2}, 陈宝军¹, 罗联哲², 阳国桂², 洪 业^{1,2},
韩振义^{2,3}, 胡 骥^{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;

3. 门头沟区食品药品监督管理局, 北京 102300

摘要: 制备了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$, 并进行体内外生物学评价。在 $\text{pH}=7$, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ 的标记率均大于 80%, 纯化后标记物的放射化学纯度大于 98%; 体外稳定性实验显示, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 标记物在生理盐水、胎牛血清及半胱氨酸溶液中具有很好的稳定性; 正常小鼠体内生物分布数据显示, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ 在血液中清除较快, 主要通过肝肾代谢。

关键词: RGD; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$; 整合素 $\alpha_v\beta_3$; 生物分布

中图分类号: O615.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2014)02-0086-06

doi: 10.7538/hhx.2014.36.02.0086

Preparation of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ and Biodistribution Evaluation in Normal Mice

QING Jing^{1,2}, CHEN Bao-jun¹, LUO Lian-zhe², YANG Guo-gui²,
HONG Ye^{1,2}, HAN Zhen-yi^{2,3}, HU Ji^{1,2,*}

1. China Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275(104), Beijing 102413, China;

2. Atom Hi-Tech Co., Ltd., Beijing 102413, China;

3. Mentougou Food and Drug Administration, Beijing 102300, China

Abstract: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ was prepared, and the *in vitro* and *in vivo* biological evaluations were completed. The labeling yield of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ is more than 80% under optimal conditions ($\text{pH}=7$, reacting at $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min), and the radiochemical purity is more than 98% after purified. Stability *in vitro* experiments show that the radiolabeled compound shows good stability in physiological saline, fetal bovine serum, and cysteine solution under $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The biodistribution of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ in normal mice shows that the metabolic pathways are mainly through liver and kidney with rapid clearance in blood.

Key words: RGD; $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$; integrin $\alpha_v\beta_3$; biodistribution

收稿日期: 2013-12-20; 修订日期: 2014-02-20

作者简介: 卿 晶(1985—), 男, 四川内江人, 博士研究生, 放射性同位素技术专业

* 通信联系人: 胡 骥(1966—), 男, 安徽休宁人, 博士生导师, 研究员, 放射性药物化学专业, E-mail: ji_hu@ciae.ac.cn

血管生成(angiogenesis)是恶性肿瘤生长和转移所必需的^[1-2]。没有足够的血管,肿瘤就会坏死或凋亡^[-3]。研究发现,整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤新生血管内皮细胞及多种肿瘤细胞表面有高度表达,而在成熟血管内皮细胞中表达很少^[3-5],这使得整合素 $\alpha_v\beta_3$ 已成为肿瘤诊断与治疗的一个重要靶点。RGD 肽是含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp)序列的一类短肽,能与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体特异性结合^[6],因此,放射性核素标记的含 RGD 肽的放射性药物备受关注,并应用于肿瘤的诊断与治疗^[7-12]。目前以 RGD 为核心的基础上衍生出多种形式,如环状 RGD、多价 RGD、糖基化或 PEG 修饰 RGD、螯合剂偶联的 RGD、纳米载体的 RGD 等。

利用⁹⁰Y、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、⁹⁹Tc^m 等核素标记多肽时,需要引入适当的双功能螯合剂,不同的双功能螯合剂会引起标记物体性质改变^[13]。⁹⁹Tc^m 有着优良的物理性质,在放射性药物在临床核医学诊断中占主导地位,其用量约占临床诊断用放射性药物的 85% 以上。

鉴于⁹⁹Tc^m 标记药物在临床应用中的优势,国内外多用⁹⁹Tc^m-HYNIC 标记 RGD 及其衍生物应用于肿瘤的诊断^[14-15]。本研究通过对目前研究较多的 c(RGDyK)(图 1)进行结构修饰,设计并合成 6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸-RGD(BPHRGD)(图 1),用 $[\text{}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 标记,拟得到⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD,并进行正常鼠

体内外生物学评价。另外,BPHRGD 中的 3N 结构同时也可以与 Cu 配位^[16],因此可制备⁶⁴Cu-BPHRGD 用于 PET 显像研究。

1 实验材料

1.1 实验动物

雌性昆明小白鼠,一级,约 25 g,由中国医学科学院肿瘤研究所提供。

1.2 试剂及仪器

2,3,5,6-四氟苯酚、N,N'-二环己基羰二亚胺(EDC)、2-氯甲基吡啶盐酸盐,均由美国阿尔法公司提供;半胱氨酸盐酸盐,上海康达氨基酸厂;NaBH₄,分析纯,美国百灵威公司;c(RGDyK),纯度 99.25%,吉尔生化(上海)有限公司;CO,纯度 99.99%,北京市亚南气体有限公司;Na⁹⁹Tc^mO₄ 淋洗液,原子高科股份有限公司;甲醇、乙腈,色谱纯,美国 Burdick&Jackson 公司;其他化学试剂,分析纯,北京化学试剂公司。

RE-52 型旋转蒸发仪,上海博通公司;高纯水器,美国 Millipore 公司;1470 自动伽玛计数器,芬兰 Perkin Elmer 公司;C-18 Sep-Pak 色谱柱,美国 Waters 公司;CRC-15R 放射性活度计,美国 Capintec 公司。ProStar 320 型 HPLC,美国 Varian 公司;C18 色谱柱, Hypersil ODS ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm;GABI 型高效液相色谱放射性监控仪,德国 Raytest 公司。

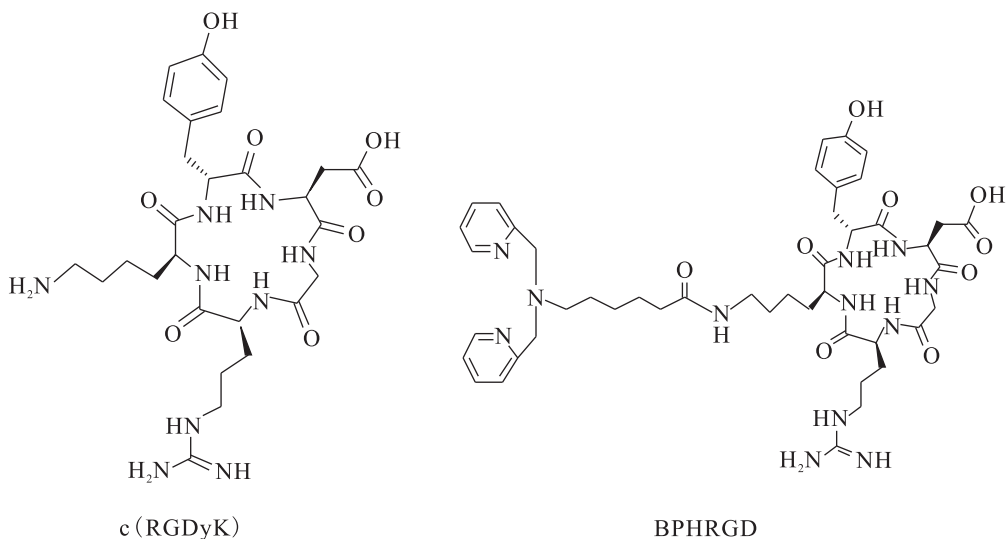


图 1 c(RGDyK)与 BPHRGD 的结构
Fig. 1 Structure of c(RGDyK) and BPHRGD

2 实验方法

2.1 质量控制方法

HPLC 法: 溶剂 A 为 0.1% 三氟乙酸 (TFA)/H₂O, 溶剂 B 为 0.1% TFA/乙腈, 流速 1 mL/min, 紫外检测器波长 220 nm。梯度洗脱程序为: 0—1 min, 0% 溶剂 B; 1—15 min, 0%~90% 溶剂 B; 15—16 min, 90% 溶剂 B; 16—18 min, 90%~0% 溶剂 B; 18—20 min, 0% 溶剂 B。

2.2 BPHRGD 的合成

BPHRGD 的合成路线示于图 2。

2.2.1 6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸 (6-(bis(pyridin-2-ylmethyl) amino) hexanoic acid) 的合成^[16] 取 2.624 0 g (0.02 mol) 6-氨基己酸溶于 30 mL 水中, 再加入 6.889 7 g (0.042 mol) 2-氯甲基吡啶盐酸盐和 3.2 g (0.08 mol) NaOH, 常温搅拌 1 d。反应结束后, 首先在碱性条件下用 20 mL

氯仿萃取 3 次, 再用 1 mol/L HCl 调节水层的 pH 值为 3, 再用 20 mL 氯仿萃取 3 次, 收集酸性萃取层, 旋蒸除去溶剂后, 得红色的油状物, 经柱色谱纯化后得黄色油状物, 真空干燥。

2.2.2 6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸-(2,3,5,6-四氟)苯酯 (2,3,5,6-tetrafluorophenyl 6-(bis(pyridin-2-ylmethyl) amino) hexanoate) 的合成^[17] 取 0.130 8 g (0.417 5 mmol) 6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸溶于 4 mL 二氯甲烷, 再加入 0.160 1 g (0.835 mmol) 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐 (EDC), 常温下震荡 30 min 后, 加入 0.104 0 g (0.626 3 mmol) 2,3,5,6-四氟苯酚, 常温下震荡 6 h。反应结束后, 旋蒸除去溶剂后, 用乙酸乙酯溶解产物, 再用饱和 Na₂CO₃ 洗乙酸乙酯 4 次, 经柱色谱纯化后得黄色油状物, 真空干燥。

2.2.3 BPHRGD 合成 取 5 mg RGD 溶于 1 mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和 30 μ L (0.24 mmol) 三

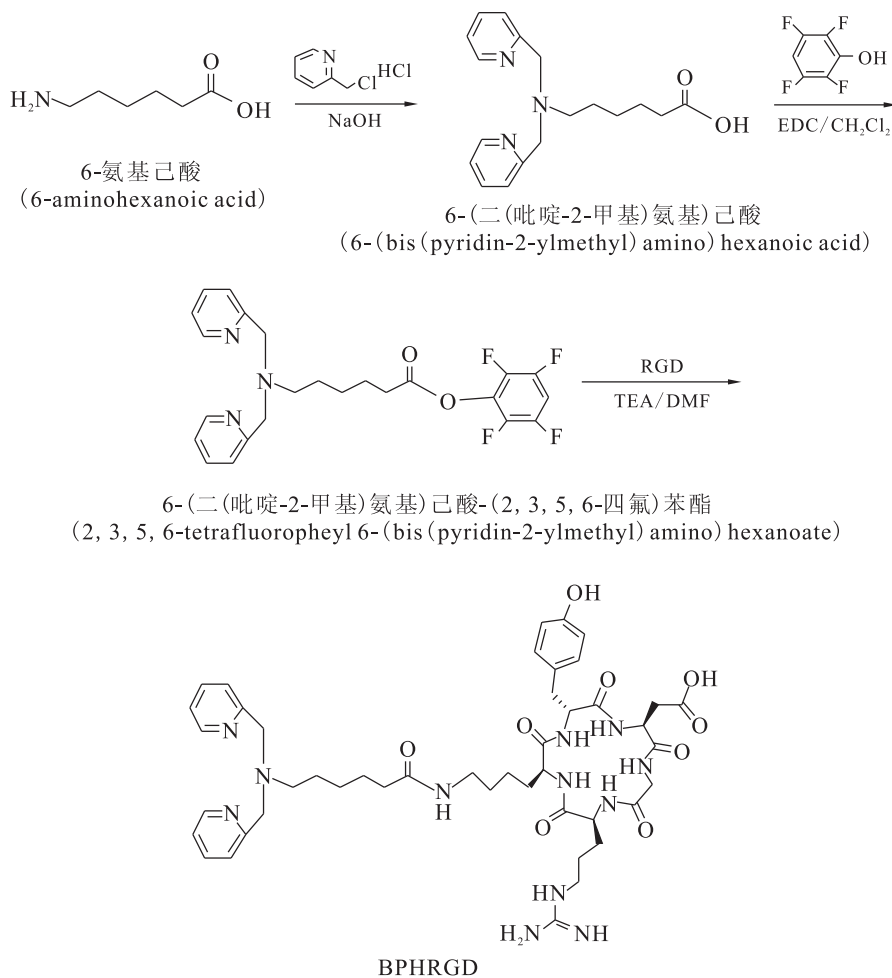


图 2 BPHRGD 的合成路线

Fig. 2 Synthesis of BPHRGD

乙胺中,然后加入 10 mg(0.021 7 mmol)6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸-(2,3,5,6-四氟)苯酯,室温振荡 2 h,用油泵抽去溶剂,残留物溶于 0.5 mL 水中,通过 HPLC 分离纯化,浓缩后,冻干,冷藏待用。

2.3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ 中间体的制备

在 10 mL 青霉素瓶中先加入 4 mg Na_2CO_3 , 5.5 mg NaBH_4 , 15 mg 酒石酸钾钠,然后加入 0.5 mL 去离子水溶解,密封后通入 CO 气体 15 min,将瓶中空气排净。然后用注射器加入 1 mL $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 洗脱液($1.85\times 10^8\sim 1.85\times 10^9$ Bq),在 75 °C 条件下加热反应 30 min(图 3),冷却至室温后,用 1 mol/L HCl 调 $\text{pH}=7$,用 HPLC 法分析其放化纯。

2.4 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ 的制备

取 3 mL 青霉素真空瓶,然后加入 30 μL BPHRGD 肽的溶液(1 g/L, $\text{pH}=7$)和 0.1 mL 新鲜制备的羰基锝溶液 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, 75 °C 下反应 30 min(图 3),待反应溶液冷却到室温后,用 HPLC 法分析标记物的标记率,再用 C18 Sep-Pak 反向萃取柱对标记物进行了纯化,用 HPLC 法分析标记物放化纯。

2.5 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ 的脂水分配系数测定

取 20 μL 纯化后的 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$, 加入到含 500 μL 正辛醇和 480 μL 磷酸盐缓冲溶液(PBS, $\text{pH}=7.4$, 0.05 mol/L)的 EP 管中,涡旋混匀 30 min 后在 2 000 r/min 条件下离心 15 min,分别取 100 μL 有机相和水相测量放射性计数,计算标记物的脂水分配系数 P (有机相计数/水相计数)及 $\lg P$ 。

2.6 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ 的体外稳定性

将标记物分别稀释于生理盐水、10% 胎牛血清、0.01 mol/L 半胱氨酸溶液中,于 37 °C 下放置 24 h,分别于 1、2、4、6、24 h 取样,用 HPLC 法检测标记物的放射化学纯度。

2.7 正常鼠体内生物学分布

取雌性昆明小白鼠 16 只,随机分组,每组 4 只。经尾静脉注射 0.1 mL 标记物(约 1.5 MBq,

含 BPHRGD 肽小于 1 μg),于注射后 10、30、60、240 min 断颈处死小鼠,取血、心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、肌肉、肾上腺等主要脏器,称重并测量其放射性计数,经衰变校正后,计算每克组织百分注射剂量率($\text{ID}\%/\text{g}$),获得标记物在正常小鼠体内生物学分布数据。

3 结果与讨论

3.1 6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸(6-(bis(pyr-idin-2-ylmethyl)amino)hexanoic acid)的合成表征

随着反应的进行,反应液由无色变为红褐色, TLC 展开剂为氯仿/甲醇(体积比为 9 : 1), $R_f=0.3$ 。此反应的副产物较多,纯化困难,经柱色谱纯化后得黄色油状物 1.13 g,产率为 18%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.55~8.53(d, 2H, $\text{H}_{\text{Py-6}}$, $J=4.9$ Hz); 7.68~7.64(t, 2H, $\text{H}_{\text{Py-4}}$, $J=7.6$ Hz); 7.56~7.54(d, 2H, $\text{H}_{\text{Py-3}}$, $J=7.8$ Hz); 7.19~7.15(t, 2H, $\text{H}_{\text{Py-5}}$, $J=6.1$ Hz); 3.88(s, 4H, $\text{H}_{\text{Py-}\alpha}$); 2.62~2.58(t, 2H, 1- CH_2 , $J=7.3$ Hz); 2.33~2.28(t, 2H, 5- CH_2 , $J=7.4$ Hz); 1.64~1.56(m, 4H, 2- CH_2 + 4- CH_2); 1.35~1.29(m, 2H, 3- CH_2)。MS (ESI): m/z [$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$] $^+$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 314.18; 实测值, 314.2。

3.2 6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸-(2,3,5,6-四氟)苯酯(2,3,5,6-tetrafluorophenyl 6-(bis(pyr-idin-2-ylmethyl)amino)hexanoate)的合成表征

反应通过紫外显色监测反应进程, TLC 展开剂为氯仿/甲醇(体积比 9 : 1), $R_f=0.5$ 。经柱色谱纯化后得黄色油状物,干燥称重得 0.077 g,产率为 40%。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ): 8.52~8.80(d, 2H, $\text{H}_{\text{Py-6}}$, $J=4.9$ Hz); 7.67~7.62(t, 2H, $\text{H}_{\text{Py-4}}$, $J=7.6$ Hz); 7.55~7.53(d, 2H, $\text{H}_{\text{Py-3}}$, $J=7.7$ Hz); 7.16~7.12(t, 2H, $\text{H}_{\text{Py-5}}$, $J=6.1$ Hz); 7.02~6.93(m, 1H, ArF_4H); 3.84(s, 4H, $\text{H}_{\text{Py-}\alpha}$); 2.62~2.58(t, 2H, 1- CH_2 , $J=7.3$ Hz); 2.61~

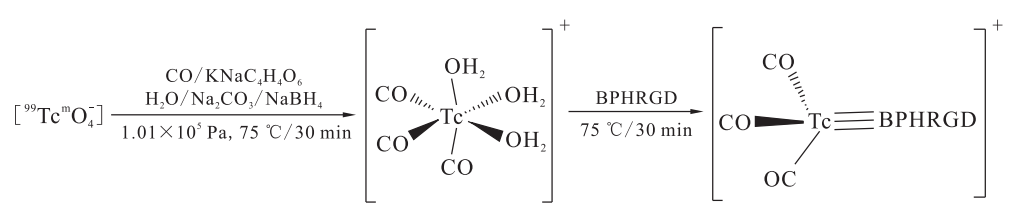


图 3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$ 制备路线图
Fig. 3 Preparation of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{CO})_3\text{-BPHRGD}$

2.56(t, 2H, 5-CH₂, $J=7.5$ Hz); 1.73~1.65(m, 2H, 4-CH₂); 1.64~1.56(m, 2H, 2-CH₂); 1.43~1.35(m, 2H, 3-CH₂)。MS(FAB): m/z [C₂₄H₂₄F₄N₃O₂]⁺ (M+H)⁺, 462.18; 实测值, 462.1。

3.3 BPHRGD 的合成表征

为使 RGD 反应完全, 6-(二(吡啶-2-甲基)氨基)己酸-(2,3,5,6-四氟)苯酯应适当过量。此偶联反应迅速, 在室温下振荡 1.5 h 即可反应完全。由于 DMF 在 HPLC 中有较强的吸收峰, 在用 HPLC 纯化产物时有很大的干扰, 因此应先除去 DMF 溶剂后再进行纯化。纯化后经冻干得纯度大于 99% 的白色粉末 3.77 mg, 产率约为 51%。MS(ESI): m/z [C₄₅H₆₃N₁₂O₉]⁺ (M+H)⁺, 915.48; 实测值, 915.1。

3.4 [⁹⁹Tc^m(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 和 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的制备

[⁹⁹Tc^m(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 的制备方法已经很成熟, 在通入足量 CO 和保证 NaBH₄ 不发生潮解的情况下可以高产率地制得。放化纯(RCP)可以达到 99% 以上。制备完成后将 pH 值调为中性, 常温下, [⁹⁹Tc^m(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 可稳定放置 24 h 以上。优化标记条件后, ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的标记率可稳定在 80% 以上, 经 C-18 Sep-Pak 柱纯化后, 标记物放射化学纯度大于 98% (图 4), 纯化后, ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的比活度为 3.29×10^{15} Bq/kg (比活度 = $A \cdot Y/m$, 其中 A 为总活度, Y 为标记率, m 为 BPHRGD 的投料质量)。

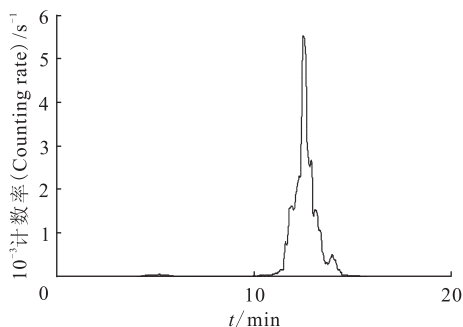


图 4 纯化后的 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD

Fig. 4 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD purified

3.5 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的脂水分配系数

⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的脂水分配系数 $P=0.227$, $\lg P=-0.644$, 脂溶性较好, 这可能是由于 BPHRGD 增长了 RGD 碳链的缘故, 这与它们在肝中有较高的摄取值一致。

3.6 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的体外稳定性结果

37 °C 下, ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 在生理盐水和胎牛血清中具有很高的稳定性 (图 5)。放置 24 h, 其稳定性无显著变化, 其放化纯始终高于 95%。⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的放化纯在半胱氨酸溶液中略有下降, 但始终高于 90%, 表明 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 基本不与巯基发生配体交换反应。由于生物体内含有一些游离的巯基化合物, 与 ⁹⁹Tc^m 标记物在体内竞争络合, 体外竞争稳定性实验结果可以间接反映 ⁹⁹Tc^m 标记物在生物体内的稳定性, 由此可推断 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 在生物体内比较稳定。

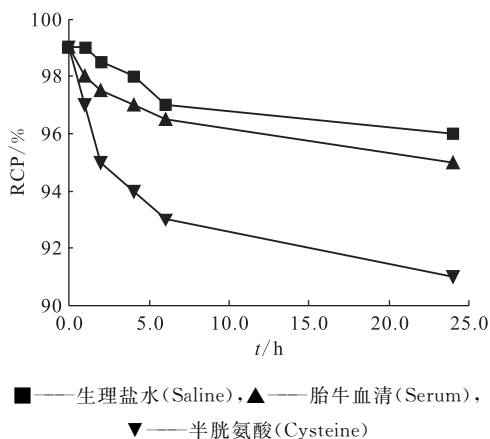


图 5 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的稳定性

Fig. 5 Stability of ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD

3.7 正常鼠体内生物分布

表 1 列出了 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 在正常小鼠体内的生物分布数据。由表 1 可知, ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 注入体内 10、30、60、240 min 后, 标记物在血液中的清除较快; 肝中的摄取值最高, 与标记物具有较高的脂水分配系数一致 ($\lg P=-0.644$), 说明标记物主要通过肝脏代谢; 肾作为药物的代谢产物的主要排泄器官, 也有较高的摄取; 因此可以判断标记物通过肝脏代谢、肾脏排泄。

4 结 论

本研究工作合成的 RGD 衍生物 BPHRGD 能很好地进行 [⁹⁹Tc^m(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 标记, 在体外具有很好的稳定性。在一系列标记条件优化实验基础上, ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 的标记率达到 80%, 纯化后标记物的放射化学纯度大于 98%, 标记物在正常鼠体内分布研究显示, ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 在血液中清除较快, 主要通过肝肾代

表 1 ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 在正常小鼠体内分布
Table 1 Biodistribution of ⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD in normal mice

组织 (Tissues)	每克组织百分注射剂量率 (Percentage injected dose per gram)/(ID% · g ⁻¹)			
	10 min	30 min	60 min	240 min
血 (Blood)	6.61±0.30	3.30±0.31	2.03±0.09	1.35±0.12
心 (Heart)	4.29±0.21	3.01±0.71	1.98±0.39	1.38±0.06
肝 (Liver)	32.86±0.89	32.49±0.44	26.05±1.12	23.58±0.82
脾 (Spleen)	2.60±0.28	1.95±0.33	1.22±0.27	0.91±0.07
肺 (Lung)	7.63±0.25	4.09±0.22	2.52±0.53	1.86±0.10
肾 (Kidney)	27.83±0.77	15.45±0.57	9.09±1.18	8.56±0.15
胃 (Stomach)	5.48±0.47	3.99±0.40	3.13±0.21	2.23±0.33
小肠 (Intestine)	15.89±0.77	9.37±0.83	3.50±0.33	3.78±0.01
肌肉 (Muscle)	1.82±0.23	1.37±0.09	1.04±0.13	0.83±0.20
肾上腺 (Adrenal)	4.91±0.36	6.52±0.72	4.58±0.08	3.38±0.11

注 (Note): n=4

谢。在下一步的研究工作中,将通过荷瘤裸鼠实验进一步对⁹⁹Tc^m(CO)₃-BPHRGD 进行评价,以期研制出适于肿瘤显像诊断的多肽放射性药物。

参考文献:

[1] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 653-660.

[2] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.

[3] Brooks P C, Clark R A, Cheresh D A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis[J]. Science, 1994, 264(5158): 569-571.

[4] Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2): 83-90.

[5] Zitzmann S, Ehemann V, Schwab M. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells *in vivo*[J]. Cancer Res, 2002, 62(18): 5139-5143.

[6] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(6): 542-546.

[7] Bianchini F, Cini N, Trabocchi A, et al. (125)I-radiolabeled morpholine-containing arginine-glycine-aspartate(RGD) ligand of alpha(v)beta(3) integrin as amolecular imaging probe for angiogenesis[J]. J Med Chem, 2012, 55(11): 5024-5033.

[8] 张春丽,王荣福,张丽,等. 靶向整合素 α_vβ₃ 受体的新型 RGD 肽二聚体的¹³¹I 标记与生物活性的初步评价[J]. 北京大学学报(医学版),2011,43(2):295-300.

[9] Liu Z, Huang J, Dong C, et al. ^{99m}Tc-labeled RGD-BBN peptide for small-animal SPECT/CT of lung carcinoma[J]. Mol Pharm, 2012, 9(5): 1409-1417.

[10] Liu Z, Shi J, Jia B, et al. Two ⁹⁰Y-labeled multim-

eric RGD peptides RGD4 and 3PRGD2 for integrin targeted radionuclide therapy[J]. Mol Pharm, 2011, 8(2): 591-599.

[11] Liu Z, Niu G, Wang F, et al. (68)Ga-labeled NO-TA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging[J]. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2009, 36(9): 1483-1494.

[12] Briat A, Wenk C H, Ahmadi M, et al. Reduction of renal uptake of ¹¹¹In-DOTA-labeled and A700-labeled RAFT-RGD during integrin alpha v beta 3 targeting using single photon emission computed tomography and optical imaging[J]. Cancer Sci, 2012, 103(6): 1105-1110.

[13] Liu S, Edwards D S. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals[J]. Bioconjug Chem, 2001, 12(1): 7-34.

[14] Zhou Y, Kim Y S, Chakraborty S, et al. ^{99m}Tc-labeled cyclic RGD peptides for noninvasive monitoring of tumor integrin alpha v beta 3 expression[J]. Mol Imaging, 2011, 10(5): 386-397.

[15] Bohn P, Modzelewski R, Rouvet J, et al. Biodistribution and imaging of [^{99m}Tc]-HYNIC-RGD in MDA-MB-231 and NTERA-2 cancer cell xenografts[J]. Nucl Med Commun, 2013, 34(7): 709-717.

[16] Kirin S I, Dubon P, Weyhermuller T, et al. Amino acid and peptide bioconjugates of copper (Ⅱ) and zinc (Ⅱ) complexes with a modified N, N-bis(2-picolyl) amine ligand[J]. Inorg Chem, 2005, 44(15): 5405-5415.

[17] Kim I S, Yoo T M, Kobayashi H, et al. Chemical modification to reduce renal uptake of disulfide-bonded variable region fragment of anti-Tac monoclonal antibody labeled with ^{99m}Tc [J]. Bioconjug Chem, 1999, 10(3): 447-453.