

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.1.3>

# Synthesis and *in vitro* evaluation of $^{99m}\text{Tc}$ -labeled tetraiodothyroacetic acid for tumor angiogenesis imaging

Hyunjung Kim<sup>1</sup> Hyun-Jung Koo,<sup>1</sup> and Yearn Seong Choe<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul 06351, Korea

<sup>2</sup>Department of Health Sciences and Technology, SAIHST, Sungkyunkwan University, Seoul 06351, Korea

## ABSTRACT

Tetraiodothyroacetic acid (tetrac) is a derivative of thyroid hormone  $\text{T}_4$  and causes anti-angiogenesis by blocking  $\text{T}_4$  binding to integrin  $\alpha_v\beta_3$ . In this study, we synthesized [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-Cys-Asp-Gly(CDG)-tetrac and evaluated it *in vitro* as a tumor angiogenesis imaging ligand. The CDG was conjugated to tetrac as a chelator for technetium-99m labeling. The cold vial containing CDG-tetrac, sodium glucoheptonate, and reducing agent was completed under nitrogen-filled atmospheric glove bag. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac was synthesized in quantitative yield by heating the cold vial with [ $^{99m}\text{Tc}$ ]TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> at 100°C for 30 min. *In vitro* serum stability of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac was measured by incubating the radioligand in 50% fetal bovine serum at 37°C and analyzing the incubation mixture by radio-TLC, which showed high stability over 6 h ( $\geq 98\%$ ). Cell binding study was carried out by incubating [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac with human umbilical vein endothelial (HUVE) cells at 37°C for 6 h. The cell binding of the radioligand increased from 100% at 0.5 h to 293.7% at 6 h in a time-dependent manner. For blocking study, the cells were incubated with the radioligand in the presence of either tetrac (20  $\mu\text{M}$ ) or cRGDyK (20  $\mu\text{M}$ ) at 37°C for 4 h. The results demonstrated that the cell binding of the radioligand was inhibited by tetrac (19.1%) or cRGDyK (35.6%), indicating specific binding of the radioligand to integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Thus, this study suggests that [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac may be a potential radioligand for tumor angiogenesis imaging.

**Key Word:** Tetraiodothyroacetic acid (tetrac), CDG-tetrac,  $^{99m}\text{Tc}$ , Tumor angiogenesis

## Introduction

혈관신생 (angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 생성되는 것으로, 종양의 성장 및 전이에 반드시 필요한 과정이다(1). 이러한 혈관신생은 혈관내피세포성장인자를 포함한 다양한 성장인자와 인테그린 등에 의해 활성화 된다(2-4). 인테그린은 세포를 세포외기질과 다른 세포 등에 부착시키는 결정적인 매개 역할을 하는 세포막 수용체로,

세포의 이동, 증식, 분화, 그리고 생존에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(5, 6). 인테그린 단백질 중  $\alpha_v\beta_3$ 는 혈관신생이 활발하게 진행되고 있는 종양의 내피세포에 과발현되는 것으로 알려져 있다(7). 특히 cyclic RGD (cRGD) 펩타이드는 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 의 선택적 길항제이므로 종양의 혈관신생을 영상화하기 위한 방사성리간드로 개발되어 보고된 바 있다(8-11). 이러한 종양 혈관신생의 바이오마커인 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 는 갑상선 호르몬  $\text{T}_4$  결합이 가능한 세포표면

Received : June 15, 2020 / Revised: June 24, 2020 / Accepted: June 26, 2020

**Corresponding Author :** Yearn Seong Choe, Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 81 Irwon-ro, Gangnam-gu, Seoul 06351, Korea. Tel: 82-2-3410-2623, Fax: 82-2-3410-2667, E-mail: yschoe@skku.edu

Copyright©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

수용체 부위를 함유하고 있어서,  $T_4$ 가 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 에 결합하면 mitogen-activated protein kinases (MAPK)의 인산화를 활성화하고 이를 통해 종양세포의 증식과 혈관신생을 유도하는 것으로 알려져 있다(12, 13). 또한 tetraiodothyroacetic acid (tetrac), cRGD 펩타이드, 또는  $\alpha_v\beta_3$  항체들이 이러한 MAPK 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다(12).

Tetrac은  $T_4$ 의 유도체로  $T_4$ 가 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 에 결합하는 것을 저해하여 MAPK의 활성화를 감소시키므로 종양의 혈관신생을 억제한다(12). 따라서 본 연구팀의 이전 연구에서는 tetrac을 copper-64로 표지하여 종양 혈관신생 PET 영상 리간드로서의 가능성을 보고한 바 있다(14). 먼저 tetrac/ $^{64}\text{Cu}$ Cu-DOTA-liposomes과  $^{64}\text{Cu}$ Cu-DOTA-liposomes을 각각 합성하여 U87MG 종양이 이식된 마우스에 주사한 후 microPET 영상과 체내분포 실험을 수행한 결과, 주사 후 22시간에 tetrac/ $^{64}\text{Cu}$ Cu-DOTA-liposomes이  $^{64}\text{Cu}$ Cu-DOTA-liposomes 보다 종양에서 4.9배 더 높은 섭취를 보여, 종양섭취 증가가 tetrac에 기인함을 알 수 있었다(14). 또한 tetrac에 킬레이터 또는 형광물질을 콘쥬게이션하여 Cu-DOTA-tetrac 또는 Cy5.5-tetrac을 합성한 후 수행한 내피세포 튜브 형성 실험에서는 이 리간드들이 tetrac에 비하여 내피세포 튜브 형성을 더 많이 억제하였다.  $^{64}\text{Cu}$ Cu-DOTA-tetrac또는 Cy5.5-tetrac을 U87MG 종양 마우스 모델에 미정맥 주사한 후 얻은 PET과 optical 영상에서는 종양에 대한  $^{64}\text{Cu}$ Cu-DOTA-tetrac과 Cy5.5-tetrac의 섭취가 시간에 따라 증가함을 보였다. 따라서 위 연구결과를 기반으로 tetrac이 종양 혈관신생 PET과 영상 리간드로서 가능성이 있음을 확인하였다(15).

Technetium-99m은 6시간의 반감기를 가지며 140 keV의 감마선을 방출하므로 감마카메라

영상을 얻기에 이상적인 방사성동위원소이다. 또한  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  generator로부터 쉽게 얻을 수 있고, PET에 비해 경제적인 검사비용으로 핵의학 분야에서 널리 사용되고 있다(16, 17). 표적 화합물에 technetium-99m을 표지하기 위하여 사용하는 킬레이터로는  $\text{N}_2\text{S}_2$ -킬레이터,  $\text{N}_3\text{S}$ -킬레이터 (mercaptoacetyl-Gly-Gly-Gly (MAG3)), 6-hydrazinonicotinyl (HYNIC), diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) 등이 있다(18). 또한 EC20 처럼 Cys, Asp와  $\beta$ -L-diaminopropionic acid 순서로 구성된 킬레이터를 folic acid에 콘쥬게이션한 후 technetium-99m으로 표지한 방사성의약품이 개발되었다(19). 유사하게  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Glu-Cys-Gly-ethylenediamine (ECG-EDA)-folate도 3개의 아미노산으로 구성된 펩타이드를 킬레이터로 사용한 방사성리간드로 보고되었다(20). Technetium-99m 표지반응에는 교환표지 방법을 자주 사용하는데, 교환 리간드로는 glucoheptonate, tartrate 등을 사용한다(19,20). Glucoheptonate처럼 technetium-99m에 약한 결합력을 가지는 리간드는 강한 결합력을 가지는 리간드보다 수용액에서 용해도가 높기 때문에, technetium-99m 표지시 생성되는 산화된 technetium-99m과 콜로이드를 형성하는  $\text{Sn}^{2+}$  이온 등이 가수분해된 후 함께 침전되는 것을 방지함으로써 표지 수율을 향상시키는데 기여하는 것으로 알려져 있다(19, 21, 22).

이 연구에서는 technetium-99m 킬레이터로 3개의 아미노산으로 구성된 펩타이드인 Cys-Asp-Gly (CDG)을 tetrac의 카복실 작용기에 콘쥬게이션한 후 technetium-99m으로 표지하여  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CDG-tetrac을 합성하였으며, 종양의 혈관신생 방사성리간드로서의 가능성을 평가하였다.

## Materials and Methods.

이 연구에 사용된 atmospheric glove bag, stannous chloride, sodium glucoheptonate 등을 포함한 모든 시약, 용매 및 TLC plate (F-254)는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-pertechnetate ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ )는  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  generator (Ultratechnekow FM, Dublin, Ireland)에서 용출하여 사용하였다. 방사성리간드의 분석은 Bioscan radio-TLC scanner (Washington, DC, USA)를 사용하여 확인하였다. 방사능은 dose calibrator를 사용하여 측정하였으며, 세포에 결합한 방사능은 감마카운터(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였다.

## Protocol

### 1. Synthesis of CDG-tetrac

Tetrac을 technetium-99m 으로 표지하기 위하여 CDG-tetrac을 디자인하였으며 Peptron (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였다. 합성방법을 정리하면, 일반적으로 사용되는 고체상 펩타이드 합성법(solid-phase peptide synthesis)을 사용하여 세 종류의 아미노산을 C-D-G 순서로 합성한 후, tetrac에 콘쥬게이션하였다. 합성된 화합물은 HPLC를 사용하여 정제하였으며 Shiseido Capcell Pak C18 컬럼과 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 각각 넣은 물과 아세트니트릴을 HPLC유출액으로 사용하였다(UV 검출기, 220 nm). 정제된 CDG-tetrac의 순도는 HPLC를 사용하여 위와 동일한 조건에서 측정하였으며, 분자량은 질량분석기 (HP 1100 series LC/MSD)를 사용하여 확인하였다(negative mode).

### 2. Synthesis of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac

Technetium-99m 표지를 위한 콜드바이알 충전은 공기 및 수분의 혼입을 방지하기 위하여 질소로 충전된 atmospheric glove bag 안에서 수행하였다; CDG-tetrac (0.1 mg)이 들어있는 바이알에 0.8 mL의 sodium glucoheptonate 수용액(12.5 mg/mL)을 넣은 후에 0.1 mL의  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1 mg/mL, 0.01 N HCl 용액)를 넣어 콜드바이알을 완성하였다. 이때 물과 0.01 N HCl 용액은 질소로 30분 이상 버블링하여 사용하였다. 이 콜드바이알을 hot cell로 옮긴 후 120 MBq의 [ $^{99m}\text{Tc}$ ]TcO $_4^-$ 를 넣고 약 20  $\mu\text{L}$ 의 0.01 N NaOH를 첨가하여 반응 용액을 pH 7로 조정하였다. 반응 혼합액을 100°C에서 30분 동안 교반한 후 radio-TLC를 사용하여 반응의 진행 정도를 분석하였다(이동상 2종류 : acetone 및 2:1:5 ethanol-NH $_4$ OH-H $_2$ O).

### 3. *In vitro* serum stability study

[ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac (67 MBq)을 pH 7 버퍼에 용해하여 50% 소태아혈청 (fetal bovine serum)에 넣고 37°C에서 배양하였다. 이후 0, 1, 2, 그리고 6시간에 각각 일정량을 취하여 TLC 플레이트의 원점에 점적하고, 이동상으로 acetone 및 ethanol-NH $_4$ OH-H $_2$ O (2:1:5) 혼합액을 사용하여 전개한 후 radio-TLC를 사용하여 분석하였다.

### 4. Cell binding study

Human umbilical vein endothelial cells (HUVE cell)는 2% FBS, hydrocortisone, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, hEGF, ascorbic acid, GA-1000 및 heparin이 보충된 endothelial cell growth medium-2 (Lonza, Walkersville, MD, USA)에서 배양하였으며, 5% CO $_2$  배양기에서 37°C로 유지하였다. HUVE cell을 24-well plate에

$1 \times 10^5$  cells/well로 seeding한 후 24시간 동안 배양하였다. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac (111 KBq/2.5  $\mu\text{L}$ )을 각각의 well에 넣고, 37°C에서 0.5, 1, 2, 4, 그리고 6시간 동안 배양하였다. 이후 PBS를 사용하여 각 well의 세포를 washing하고, 0.1 N NaOH를 사용하여 세포를 용해하였다. 얻어진 세포의 방사능은 감마카운터를 사용하여 계수하였다. 세포결합 억제 실험은 HUVE cell에 방사성리간드와 tetrac (20  $\mu\text{M}$ ) 또는 cRGDyK (20  $\mu\text{M}$ )를 함께 넣은 후 37°C에서 4시간 동안 배양하였고, 이후 위의 방법과 동일하게 처리하였다. Tetrac 은 DMSO에 용해하여 사용하였고, 실험 결과의 오차를 방지하기 위하여 다른 시료들도 모두 같은 농도의 DMSO를 첨가하였다. 각 well의 최종 DMSO 농도는 0.1%이었고 총 부피는 500  $\mu\text{L}$ 이었으며, 모든 실험은 세 번씩 수행하였다.

## Results

### 1. Synthesis of CDG-tetrac

합성된 CDG-tetrac (Fig. 1)의 순도는 HPLC 분석 결과 99% 이상이었고(Fig. 2A), 질량 분석기를 사용하여 분석한 결과, 예상 분자량은 1022 이었고 확인된 분자량은 1021([M-H]<sup>-</sup>)이었다(Fig. 2B). 따라서 CDG-tetrac이 고순도로 합성되었음을 확인하였다.

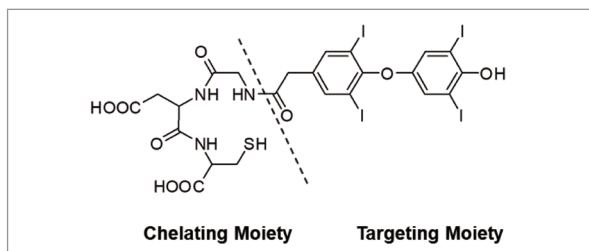


Figure 1. Chemical structure of CDG-tetrac

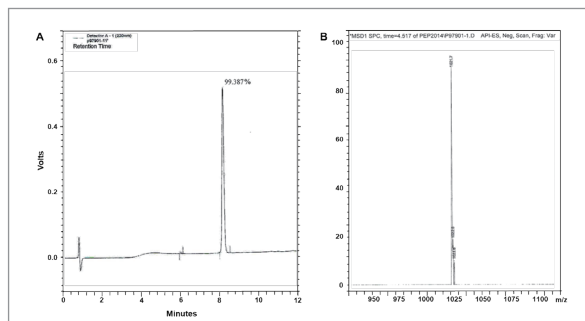


Figure 2. Analytical HPLC chromatogram of CDG-tetrac (retention time: 8.175 min; area %: 99.387) (A); ESI mass spectrum of CDG-tetrac (B)

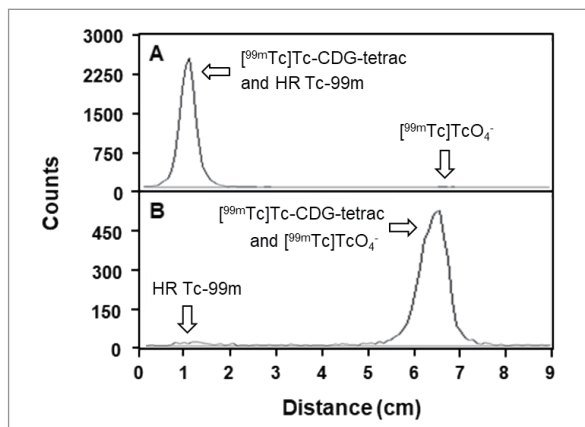
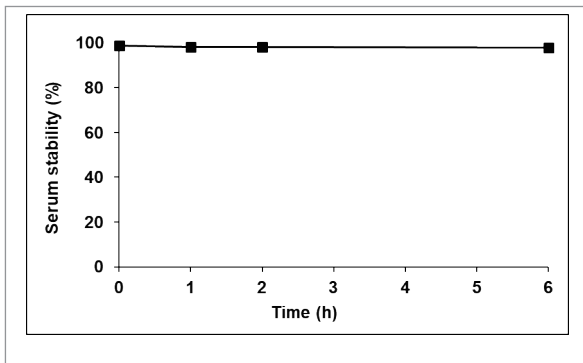


Figure 3. Radio-TLC chromatograms of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac. Mobile phase: acetone (A) and 2:1:5 ethanol- $\text{NH}_4\text{OH}$ - $\text{H}_2\text{O}$  (B). (TLC origin: 1 cm, solvent front: 7 cm)

### 2. Synthesis of [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac

CDG-tetrac의 technetium-99m 표지 반응혼합물을 radio-TLC로 분석한 결과, 전개 용매로 acetone을 사용한 경우에는 [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac은  $R_f = 0$ , hydrolyzed-reduced (HR) technetium-99m 은  $R_f = 0$ , [ $^{99m}\text{Tc}$ ]TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>는  $R_f = 1$ 에서 검출되었으며(Fig. 3A), TLC 전개 용매로 ethanol- $\text{NH}_4\text{OH}$ - $\text{H}_2\text{O}$  (2:1:5) 혼합액을 사용한 경우에는 [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac은  $R_f = 1$ , HR technetium-99m 은  $R_f = 0$ , [ $^{99m}\text{Tc}$ ]TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>는  $R_f = 1$ 에서 검출되었다(Fig. 3B). 이 결과로부터 [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac이 정량적 수율로 합성되었음을 확인하였다.

### 3. In vitro serum stability study



**Figure 4.** *In vitro* serum stability of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-CDG-tetrac}$  measured using radio-TLC

방사성리간드의 혈청안정성 실험 분석 결과, 0, 1, 2, 6 시간에 각각 98.7%, 98.2%, 98.1%, 98.0%의 방사능이 radio-TLC의 동일한  $R_f$ 에서 측정되었다(Fig. 4). 이 결과로부터  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-CDG-tetrac}$ 이 혈청에서 6시간 동안 안정하였음을 확인하였다.

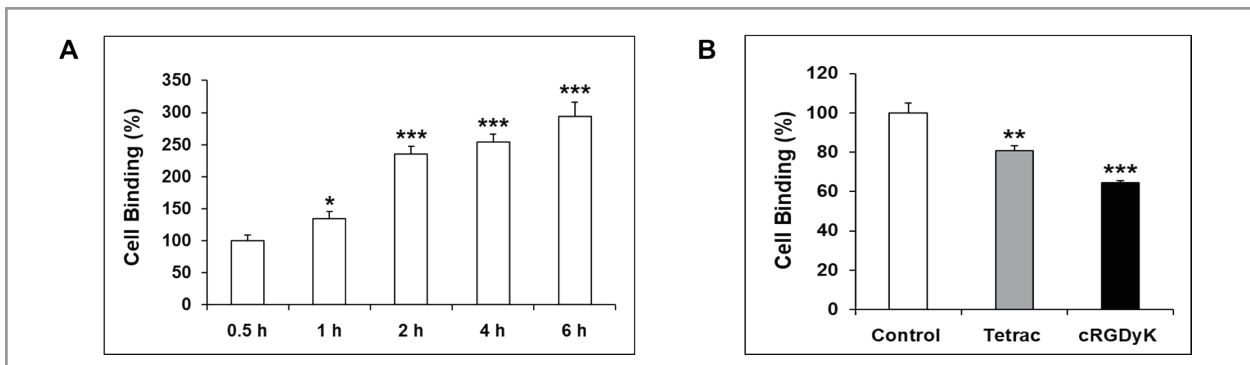
#### 4. Cell binding study

$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-CDG-tetrac}$ 의 세포결합 실험 결과, 시간에 따라 세포결합이 증가함을 보였다. 0.5시간에 100%를 기준으로 1시간에 134.2%, 2시간에 234.9%, 4시간에 253.6%, 그리고 6시간에 293.7%의 결합을 보였다(Fig. 5A). 방사성리간드와 tetrac (20  $\mu\text{M}$ ) 또는 cRGDyK (20  $\mu\text{M}$ )를 함께 배양한 세포결합 억제실험에서는 세포결합 정도가

배양 시작 후 4시간에 tetrac에 의하여 19.1% (\*\* $P < 0.01$ ), cRGDyK에 의하여 35.6% (\*\* $P < 0.001$ )만큼 감소되었음을 확인하였다(Fig. 5B). 따라서 방사성리간드가 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 의 갑상선 호르몬 수용체에 특이적으로 결합하는 것을 알 수 있었다.

## Discussion

이 연구에서  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-CDG-tetrac}$ 은 glucoheptonate를 교환 리간드로 사용하는 교환표지방법을 사용하여 효율적으로 합성하였다. 체외 안정성 실험에서 방사성리간드가 6시간 까지 약 98% 이상 안정한 것으로 보아(Fig. 4), technetium-99m은 tripeptide에 안정하게 킬레이션되었음을 알 수 있었다. 세포결합 실험은 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 의 발현 세포로 알려져 있는 HUVE cell (23)에  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-CDG-tetrac}$ 이 결합하는지 확인하기 위하여 수행하였다. 세포결합 실험 결과, 방사성리간드의 결합이 시간에 따라 증가하여 0.5시간에 100%에서 6시간에 293.7%로 약 3배 증가하였다(Fig. 5A). 세포결합 억제실험에서는 방사성리간드를 각각 tetrac 또는 cRGDyK와 함께 배양하였을 때 세포에 대한 방사성리간드의 결합 정도가 각각 19.1% 또는 35.6%만큼 감소하였다(Fig. 5B). 방사성리간드의 세포결합이 tetrac 또는 cRGDyK에 의하여 모두



**Figure 5.** HUVE cell binding of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-CDG-tetrac}$  (A); blocking of  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-CDG-tetrac}$  binding (white) by tetrac (grey) or cRGDyK (black) after a 4-h incubation (B). Data are mean  $\pm$  SD from triplicate experiments. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

억제된 것은 tetrac 과 cRGDyK의 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 에 대한 결합 위치가 매우 유사하다는 것을 의미한다. 그러나 방사성리간드의 세포결합 억제 효과가 동일한 농도의 tetrac에 비하여 cRGDyK가 더 높았으며, 이 결과에 대하여는 향후 조사가 더 필요하다. 또한 tetrac 또는 cRGDyK에 의한 세포결합 억제 정도가 비교적 낮은 것은 세포결합을 억제하는데 더 많은 양의 억제제를 사용하거나 또는 더 충분한 배양시간이 필요할 수도 있다는 것을 제시한다. 본 연구팀에서 보고한 [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-DOA-tetrac의 세포결합 억제실험에서는, U87MG cell에 방사성리간드와 tetrac 10  $\mu\text{M}$ 을 함께 넣은 후 4시간 배양하였을 때, 약 38%의 세포 결합 억제 효과를 보였고(15), 이 연구에서는 HUVE cell에 방사성리간드와 tetrac 20  $\mu\text{M}$ 을 사용하여 4시간 배양하였을 때 약 19%의 억제 효과를 보였다. 따라서 [ $^{64}\text{Cu}$ ]Cu-DOA-tetrac 실험 결과와 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 가 U87MG cell 표면에 과발현되는 것을 고려할 때(24), U87MG cell을 사용하여 [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac의 세포결합 실험 및 종양 동물모델 영상 실험을 수행한다면 더 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각한다. 또한 이 연구결과에서 고려하여야 할 점은 [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac에 CDG-tetrac이 함유되어 있으므로 세포결합 실험에서 CDG-tetrac에 의한 억제효과 때문에 [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac이 저평가되었을 것으로 생각한다. 따라서 HPLC를 사용하여 정제한 [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac의 평가 결과와도 비교해보는 것이 필요할 것으로 생각한다.

## Conclusion

이 연구에서는 tetrac을 technetium-99m으로 표지하기 위하여 [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac을

디자인하고 높은 수율로 합성하였으며, 소태아혈청 실험에서도 높은 안정성을 보였다. HUVE cell을 사용한 세포결합 실험에서는 방사성리간드의 시간에 따른 결합 증가를 보였으며, tetrac 또는 cRGDyK에 의한 방사성리간드의 결합억제를 보여 이 방사성리간드가 인테그린  $\alpha_v\beta_3$ 에 특이적으로 결합하는 것을 알 수 있었다. 따라서 [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc-CDG-tetrac은 종양 혈관신생 영상 방사성리간드로서 가능성을 보였으며, 향후 동물모델 평가를 수행하여 이 방사성리간드의 체내 특성을 조사하는 것이 필요할 것으로 생각한다.

## Acknowledgments

This research was supported by the National Research Foundation of Korea grant funded by the Korean government (NRF-2020R1A2C1008192), and a grant of the Korea Institute of Radiological and Medical Sciences (KIRAMS), funded by Ministry of Science and ICT (MSIT), Republic of Korea (No. 50536-2020).

## References

1. Bielenberg DR, Zetter BR. The Contribution of angiogenesis to the process of metastasis. *Cancer J* 2015;21:267-73.
2. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:213-9.
3. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32:2423-9.
4. Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* 2004;90:561-5.

5. Varner JA, Cheresch DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:724-30.
6. Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002;2:91-100.
7. Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA. Requirement of vascular integrin  $\alpha_v\beta_3$  for angiogenesis. *Science* 1994;264:569-71.
8. Choe YS, Lee KH. Targeted *in vivo* imaging of angiogenesis: present status and perspectives. *Curr Pharm Design* 2007;13:17-31.
9. Haubner R, Wester HJ, Reuning U, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, Stöcklin G, Schwaiger M. Raiolabeled  $\alpha_v\beta_3$  integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J Nucl Med* 1999;40:1061-71.
10. Haubner R, Wester HJ, Weber WA, Mang C, Ziegler SI, Goodman SL, Senekowitsch-Schmidtke R, Kessler H, Schwaiger M. Noninvasive imaging of  $\alpha_v\beta_3$  integrin expression using  $^{18}\text{F}$ -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* 2001; 61:1781-5.
11. Jung KH, Lee KH, Paik JY, Ko BH, Bae JS, Lee BC, Sung HJ, Kim DH, Choe YS, Chi DY. Favorable biokinetic and tumor-targeting properties of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled glucosamino RGD and effect of Paclitaxel therapy. *J Nucl Med* 2006;47:2000-7.
12. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa SA, Davis PJ. Integrin  $\alpha_v\beta_3$  contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 2005;146:2864-71.
13. Mousa SA, Bergh JJ, Dier E, Rebbaa A, O'Connor LJ, Yalcin M, Aljada A, Dyskin E, Davis FB, Lin HY, Davis PJ. Tetraiodothyroacetic acid, a small molecule integrin ligand, blocks angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Angiogenesis* 2008;11:183-90.
14. Kang CM, Koo HJ, Lee S, Lee KC, Oh YK, Choe YS.  $^{64}\text{Cu}$ -Labeled tetraiodothyroacetic acid-conjugated liposomes for PET imaging of tumor angiogenesis. *Nucl Med Biol* 2013;40:1018-24.
15. Kim H, Koo HJ, Ahn J, Kim JY, Choi JY, Lee KH, Kim BT, Choe YS. Synthesis and characterization of  $^{64}\text{Cu}$ - and  $^{67}\text{Cu}$ -labeled tetraiodothyroacetic acid derivatives for tumor angiogenesis imaging. *Bioorg Med Chem* 2020;28:115212.
16. Nunez R, Erwin WD, Wendt RE 3rd, Stachowiak A, Mar M, Stevens D, Madewell JE, Yeung HW, Macapinlac HA. Acquisition parameters for oncologic imaging with a new SPECT/multislice CT scanner. *Mol Imaging Biol* 2010;12:110-38.
17. Saha GB. Fundamentals of nuclear pharmacy. 5th ed. New York: Springer; 2004. p. 97.
18. Choe YS. Radiolabeling methods used for preparation of molecular probes. *Korean J Nucl Med* 2004;38:121-30.
19. Leamon CP, Parker MA, Vlahov IR, Xu LC, Reddy JA, Vetzal M, Douglas N. Synthesis and biological evaluation of EC20: a new folate-derived,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -based radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem* 2002;13:1200-10.
20. Kim MH, Kim WH, Kim CG, Kim DW. Synthesis and evaluation of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled folate-tripeptide conjugate as a folate receptor-targeted imaging agent in a tumor-bearing mouse model. *Nucl Med Mol Imaging* 2015;49:200-7.
21. Liu S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1347-70.
22. Saha GB. Fundamentals of nuclear pharmacy. 5th ed. New York: Springer; 2004. p. 111.
23. Turaga RC, Yin L, Yang JJ, Lee H, Lvanov L, Yan C, Yang H, Grossniklaus HE, Wang S, Ma C, Sun L, Liu ZR. Rational design of a protein that binds integrin  $\alpha_v\beta_3$  outside the ligand binding site. *Nat Commun* 2016;31:11675.
24. Zhang X, Xiong Z, Wu Y, Cai W, Tseng JR, Gambhir SS, Chen X. Quantitative PET imaging of tumor integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression with  $^{18}\text{F}$ -FRGD2. *J Nucl Med* 2006;47:113-21