

$\alpha_v\beta_3$ 受体显像剂 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})$ (PNP6)(Cys-RGD)的制备及动物实验

陈宝军¹, 胡 骥¹, 梁积新¹, 李洪玉¹,
陈 阳², 罗联哲¹, 沈浪涛¹, 罗志福¹

(1. 中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413; 2. 中国核工业 北京 401 医院, 北京 102413)

摘要: 为探讨 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的小分子环形 Cys-RGD 肽用于 $\alpha_v\beta_3$ 受体阳性肿瘤显像的可行性, 以 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})$ 核联合协同配体二膦基胺类化合物二[二(乙氧基丙基膦)-乙基]-乙氧基乙基胺(PNP6)对环形 Cys-RGD 肽(c(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys)-Cys)进行了标记, 并考察了标记物的体外稳定性及正常小鼠和荷 FWK-1 胰腺癌裸鼠模型的体内生物分布和平面显像。标记条件经优化后, 标记率大于 92%, 且具有良好的体外稳定性。生物分布实验表明, $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在血液中清除较快, 主要通过肾脏排泄; 注药后 1 h 标记物在肿瘤中的摄取值为 $2.92 \pm 0.71\%/g$, 注药后 4 h 肿瘤与血和肿瘤与肌肉的放射性摄取比(T/NT)分别为 11.0 和 3.1; 注药后 1 h, 肿瘤显像清晰。以上结果提示, $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 有望成为 $\alpha_v\beta_3$ 受体阳性肿瘤显像剂。

关键词: $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})$ 核; Cys-RGD 肽; $\alpha_v\beta_3$ 受体; 肿瘤显像

中图分类号: TL92.3; R817.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7512(2007)01-0005-06

Preparation and Biological Study of $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})$ (PNP6)(Cys-RGD) for Integrin $\alpha_v\beta_3$ -positive Tumor Imaging

CHEN Bao-jun¹, HU Ji¹, LIANG Ji-xin¹, LI Hong-yu¹,
CHEN Yang², LUO Lian-zhe¹, SHEN Lang-tao¹, LUO Zhi-fu¹

(1. Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China;
2. China Nuclear Industry Beijing 401 Hospital, Beijing 102413, China)

Abstract: The Cys-RGD peptide is labelled with $^{99}\text{Tc}^m$ -nitrido core combined with PNP6 ligand (PNP6 = bis (diethoxypropylphosphino ethyl) ethoxy ethylamine) to investigate the possibility of radiolabelled RGD peptides for tumor $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor scintigraphy. The radiochemical purity is measured with HPLC, the in vitro stability is investigated at room temperature and at 37 °C incubated in the cystein and serum solution. Biodistribution studies and gamma camera imaging are performed in normal mice and nude mice bearing FWK-1

pancreatic tumor xenografts. More than 92% radiolabelling yield is achieved under optimized condition. The high in vitro stability is found for $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$. In vivo biodistribution studies indicate the radiolabelled peptide is cleared rapidly from blood and mainly excreted via urinary system. Tumor uptake is $2.92 \pm 0.71\%$ /g at 1 h after injection. The uptake ratios of tumor to blood and tumor to muscle (T/NT) are 11.0 and 3.1 at 4 h after injection, respectively. Scintigraphic imaging allows contrasting visualisation of $\alpha_v\beta_3$ -expressed tumors at 1 h after injection. The results suggest $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ may be the potential agent for $\alpha_v\beta_3$ -positive tumor imaging.

Key words: $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -nitrido core; Cys-RGD peptide; $\alpha_v\beta_3$ integrin; tumor imaging

整合素受体是由 α 和 β 两种亚基组成的跨膜糖蛋白分子,介导细胞与细胞,细胞与细胞基质之间的粘附^[1]。其中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是整合素受体家族中重要的一员,其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,而在成熟血管中表达很少,这使其成为对肿瘤进行显像的一个靶点^[2]。研究^[3]表明,含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)序列的多肽片段是整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体与多种蛋白的识别位点。近年来,关于用作 $\alpha_v\beta_3$ 受体阳性肿瘤显像或治疗的各种放射性标记的 RGD 肽类药物已有许多报道^[4~6]。在对不同结构的 RGD 肽进行标记时,发现环状结构 RGD 肽及其类似物的结果较好,如¹⁸F 标记的 $c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys}(\text{SAA})]$ 和¹¹¹In 标记的 $c(\text{Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys})\text{-DTPA}$ 等。由于 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 具有优良的核素性质及价廉易得等特点,因此, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 RGD 肽的研究工作引起人们广泛兴趣^[7,8]。本工作拟用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})$ 核联合协同配体二膦基胺类化合物 PNP6 标记环形 Cys-RGD 肽,并对其进行体外稳定性、正常小鼠及荷瘤裸鼠的体内生物分布以及显像研究,以考察其用于肿瘤显像的可行性。

1 实验材料

1.1 主要仪器

HPLC 系统:美国 Varian 公司;HPLC 放射性检测器:德国 Raytest 公司;超纯水制备装置:美国 Millipore 公司;RM-905 型放射性活度计:中国计量科学研究院;FH463A 型自动定标器和 FT2603 型井型电离室:北京综合仪器厂;HR-120 型电子天平:日本 A&D 公司;双探头 SPECT:德国西门子公司;恒温加热器:天津自动科学仪器公司。

1.2 主要试剂

Cys-RGD 肽 [$c[\text{Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys})\text{-Cys}]$ 和二膦基胺类化合物 PNP6 由国际原子能机构提供;丁二酰二酰肼(SDH)药盒:CIS Bio International 产品;乙腈(ACN):色谱纯,比利时 Acros 公司产品;三氟乙酸(TFA):生化级,比利时 Acros 公司产品; $^{99}\text{Mo-}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器;原子高科股份有限公司生产;其它试剂均为分析纯,北京化学试剂公司产品。

1.3 实验动物

昆明种小白鼠:12 只,雌性,18~22 g,中国医学科学院动物中心提供。

荷 FWK-1 胰腺癌裸鼠:由协和医科大学动物中心提供。采用瘤块接种方式,将 0.3 cm × 0.3 cm 的 FWK-1 胰腺癌肿瘤组织移植到 BALB/C-nu 裸鼠的背部左前方,然后将移植肿瘤的裸鼠培养两周,肿瘤直径长至约 1 cm 时备用。

2 实验方法

2.1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})^{2+}$ 中间体的制备

用注射器向 SDH 药盒中加入 2 mL 0.37~1.85 GBq 新鲜淋洗的 $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 洗脱液,在室温下反应 30 min。采用 HPLC 法分析 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})^{2+}$ 中间体的放化纯度。HPLC 色谱条件为: C_{18} 色谱柱 (Hypersil ODS2, φ 4.6 mm × 250 mm),紫外检测器波长 220 nm,体积流量为 1 mL/min;溶剂 A 为 0.1% TFA/ H_2O ,溶剂 B 为 0.1% TFA/ACN,梯度洗脱程序:0~5 min 30% 溶剂 B,5~25 min 30%~50% 溶剂 B,25~27 min 50%~80% 溶剂 B,27~35 min 80% 溶剂 B,35~37 min 80%~30% 溶剂 B。

2.2 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记 Cys-RGD

在充满氮气的西林瓶中加入 10 μL Cys-

RGD 肽水溶液(1 g/L)和 8 μL PNP6 的乙醇溶液(5 g/L),然后再加入 1 mL 新制备的 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 中间体,在 100 $^\circ\text{C}$ 下反应 1 h。待反应液冷却到室温后,用 2.1 的分析方法分析产物放化纯度。

2.3 标记物的纯化

用 Sep-Pak 反向萃取柱对标记物进行纯化。依次用 5 mL 乙醇、5 mL 水活化 Sep-Pak 柱。将标记溶液上柱,分别用 5 mL H_2O 、1 mL 20% 乙醇、0.5 mL 100% 乙醇依次淋洗。收集 100% 乙醇洗脱液,用 N_2 吹干溶剂,然后用适量的生理盐水溶解。

2.4 体外稳定性研究

2.4.1 室温下的稳定性 将新制备的标记物在室温下放置,分别于不同时间测量其放化纯度。

2.4.2 在血清中的稳定性 取 0.2 mL 新制备的标记物,加 1.8 mL 小牛血清,在 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 4 h,分别在 0.5、1、2、4 h 取出 0.1 mL 血清溶液加适量乙腈进行沉淀,4 000 r/min 离心 5 min,然后取上清样测其放化纯度。

2.4.3 与半胱氨酸的竞争性结合反应 在西林瓶中加入 0.25 mL 磷酸缓冲溶液(pH=7.4)、0.15 mL 水、50 μL 10 mmol/L 盐酸半胱氨酸溶液和 50 μL 新制备的标记物,37 $^\circ\text{C}$ 下温育 2 h,然后取样测量其放化纯度。

2.5 动物实验

2.5.1 正常小鼠的生物分布 取健康的雌性昆明小鼠 12 只,随机分为 3 组,每组 4 只,分别经尾静脉注射 0.1 mL (0.74 MBq) $^{99}\text{Tc}^m$ 标记的 Cys-RGD 肽溶液,于注药后 1、2 和 4 h,断头处死,取心、肝、肺、肾、脑、肌肉和血等组织,称其质量并测量放射性计数,计算每克组织的放射性摄取占注射剂量的百分比即摄取率(%/g)。

2.5.2 荷瘤裸鼠的生物分布及受体阻断实验 取荷瘤裸鼠 6 只,分成 2 组,每组 3 只,分别经尾静脉注射 0.1 mL 5 MBq $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ (Cys-RGD 含量 $<0.1 \mu\text{g}$)。分别于注药后 1、4 h 断头处死,取心、肝、肺、肾、脑、肌肉和血与肿瘤组织,称重并测量放射性计数,计算摄取率(%/g)。另取荷瘤裸鼠 3 只,预先经尾静脉注射 50 μL (0.1 mg)未标记的 RGD 肽,10 min 后再注射 0.1 mL $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ (5 MBq, Cys-RGD 含量 $<0.1 \mu\text{g}$),于注药后 4 h 断头处死,取肿瘤组织并测量放射性计

数,计算摄取率(%/g)。

2.5.3 平面显像 取“2.5.2”生物分布实验中的一组,分别于注药后 0.5、1 和 2 h,用 SPECT 显像仪作平面显像。显像条件为能峰 140 keV,矩阵 256 \times 256,放大倍数 1.0,每只小鼠采集放射性计数 100 000。

3 结果与讨论

3.1 Cys-RGD 肽的标记

采用 Adriano Duatti 等^[9,10]发展的 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 核标记技术,实现 $^{99}\text{Tc}^m$ 对 Cys-RGD 肽的标记。先通过 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 核与 PNP6 反应,形成稳定的前体化合物 $[^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})]^{2+}$,该前体再与含[N,S],[O,S],[S,S]等配位原子的化合物发生配体交换反应,得到以 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 核为中心的 $^{99}\text{Tc}^m$ 标记化合物。在之后改进的方法中,若通过控制加入的协同配体 PNP 和相应的被标记化合物的量,可以在得到 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 核前体后,进行“一步法”标记。本工作采用改进后的方法制备出 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$,其可能结构示于图 1。 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 中间体及 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的 HPLC 分析图谱示于图 2。HPLC 分析表明,制备的 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 中间体的标记率大于 99%,且具有较好的重现性;在分别对标记时间、Cys-RGD 肽用量及其与 PNP6 配体用量比等主要影响标记率的条件进行优化后, $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的标记率大于 92%,经过 Sep-Pak 柱纯化后,放化纯度 $>95\%$ 。另外,HPLC 分析显示 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的标记物中存在异构体,表现为双峰[图 2b]。这是因为相对于 $\text{Tc}\equiv\text{N}$ 的不同空间取向,连接到 RGD 肽的赖氨酸残基上的半胱氨酸[N,S]与 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})^{2+}$ 反应时,可以形成顺反异构的配合物^[10]。

3.2 标记物的体外稳定性

$^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的稳定性实验结果示于图 3。由图 3 可知,在室温下放置 20 h 和在血清中 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 4 h, $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的放化纯度基本没有变化, $>95\%$ 。在与半胱氨酸的竞争性结合反应中,在 10 mmol/L 半胱氨酸溶液中,37 $^\circ\text{C}$ 下温育 2 h 后,标记物的放化纯度也只有少量的下降,降为 94.8%。上述结果表明, $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的体外稳定性较好。

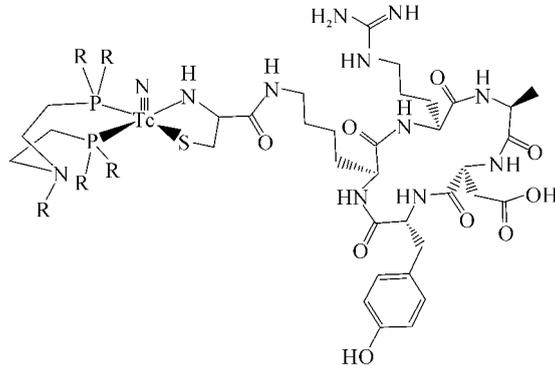


图 1 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的结构

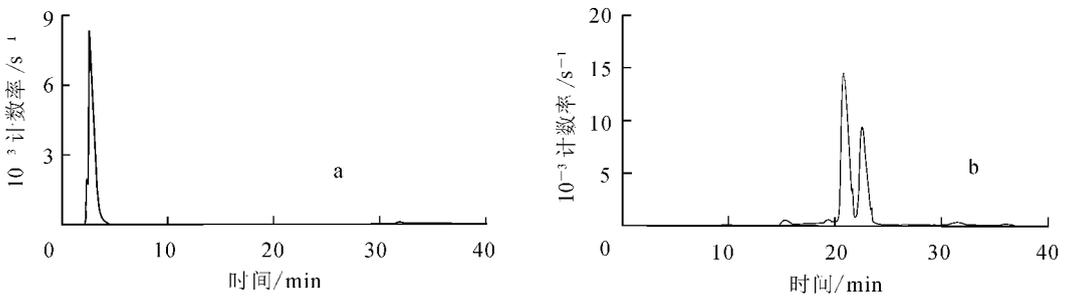


图 2 标记物的 HPLC 分析图谱

a—— $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})^{2+}$ 中间体；b—— $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$

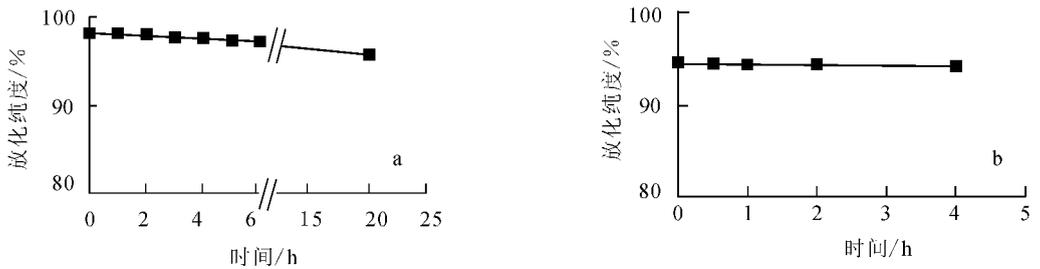


图 3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的稳定性实验结果

a——室温下；b—— $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 血清中

3.3 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 的体内生物分布

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在正常小鼠和荷瘤裸鼠体内的生物分布结果分别列于表 1 和表 2。

由表 1 可知,在正常小鼠体内,血液中放射性清除速度较快,注药后 2 h 降至 $0.59 \pm 0.07\%$ 。除在肝和胃、肠中有较多的摄取外,标记药物主要在肾中浓聚,且持续时间长,提示标记物在体内主要通过肾脏代谢,部分经过肝胆系统代谢。

表 2 结果显示,在荷 FWK-1 胰腺癌裸鼠体内,注药后 1 h,标记药物在肿瘤中的摄取量为 $2.92 \pm 0.71\%/g$ 。至 4 h 时,肿瘤中约有 63% 的放射性得以清除,显示药物在肿瘤中清除较快。肿瘤与血的放射性摄取比在注药后 1 h 和 4 h 分别为 1.4 和 11.0,而肿瘤与肌肉的 T/NT 则分别为 4.7 到 3.1。最近,Haubner 等^[8] 采用 Asp-Lys-Cys-Lys 结构对环状 RGD 肽 (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) 进行了 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 标记研究,并分别在荷黑色素瘤和骨肉瘤的裸鼠模型上进行了生物评价。标记药物在注药后 4 h 黑色素瘤

和骨肉瘤中的摄取分别为 $1.10 \pm 0.22\%/g$ 和 $2.24 \pm 0.35\%/g$ 。本工作制备的 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在肿瘤中的摄取情况与 Haubner 等的实验结果基本相似,但在肺、肝和胃肠中的放射性摄取略偏高。

表 1 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在正常小鼠体内的生物分布 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

器官	标记物在正常小鼠体内的摄取量/(%·g ⁻¹)		
	1 h	2 h	4 h
心	1.38±0.12	0.85±0.06	0.66±0.06
肝	4.84±0.48	4.52±0.45	4.64±0.39
脾	1.56±0.86	1.97±0.12	1.7±0.21
肺	2.93±0.21	1.36±0.12	1.02±0.19
肾	8.4±1.08	5.91±0.67	5.47±0.46
血	2.4±0.21	0.59±0.07	0.19±0.02
胃	2.8±0.35	2.39±0.40	2.16±0.43
肠	2.81±0.25	2.19±0.35	2.11±0.51
肌肉	0.89±0.12	0.69±0.06	0.53±0.11

由表 2 可知,在预先注射了未标记的 RGD 肽的受体阻断实验组中,注药后 4 h 标记物在肿瘤内的摄取仅有 $0.64 \pm 0.01\%/g$,放射性摄取值降低了 40.7%,显示未标记的 RGD 对 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在肿瘤中的摄取具有明显的抑制作用,即药物在肿瘤中的放射性摄取具有特异性。

3.4 平面显像

$^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在荷瘤裸鼠中的显像结果示于图 4。从图 4 可知,放射性主要浓集在泌尿系统。在注药后 0.5 h,即可以对肿瘤进行显像。随着血、肌肉等软组织的放射性

清除,延迟至 1 h,肿瘤显像较清晰。之后,由于在肿瘤中放射性的清除较快,不利于提高 T/NT,肿瘤显像效果逐渐变差,这与在荷瘤裸鼠的体内生物分布数据一致。

表 2 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在肿瘤模型小鼠体内的生物分布 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

器官	标记物在肿瘤模型小鼠体内的摄取量/(%·g ⁻¹)	
	1 h	4 h
心	1.35±0.42	0.53±0.07
肝	3.51±1.21	3.24±0.39
脾	2.24±0.53	1.33±0.29
肺	2.97±0.83	1.03±0.12
肾	7.97±1.43	4.96±0.51
血	2.09±0.84	0.09±0.01
胃	3.23±0.14	1.64±0.34
肠	3.41±0.49	3.06±1.06
肌肉	0.65±0.30	0.37±0.13
肿瘤	2.92±0.71	1.08±0.15
肿瘤/血	1.4±0.1	11.0±0.6
肿瘤/肌肉	4.7±1.1	3.1±0.9
阻断实验组的肿瘤摄取	0.64±0.01	

4 小结

通过 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})$ 核标记 Cys-RGD 肽,标记率高,标记物体外稳定性好,在血液中清除快,主要通过肾脏代谢;在肿瘤组织中有较高的特异性摄取。注药后 1 h,即可以对肿瘤进行清晰的显像,显示该标记物在整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体阳性肿瘤显像诊断方面具有潜在应用价值。另外,药物在胃、肠和肝脏等器官中的摄取较高及在肿瘤中滞留时间较短,提示其药代动力学性质还需要进一步改进。

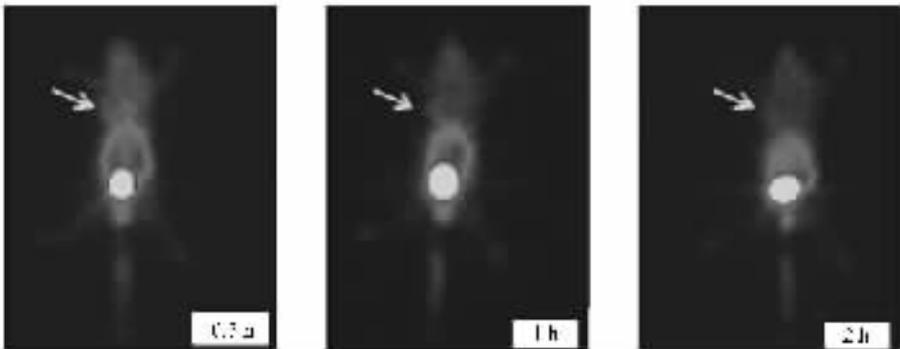


图 4 $^{99}\text{Tc}^m(\text{N})(\text{PNP6})(\text{Cys-RGD})$ 在荷瘤裸鼠体内的显像

(图中箭头所指的位置是肿瘤所在的部位)

参考文献:

- [1] RUOSLAHTI E, PIERSCHBACHER MD. New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins [J]. *Science*, 1987, 238: 491-497.
- [2] BBROOK PC, CLARK RAF, CHERERSH DA, et al. Requirement of Vascular Integrin $\alpha_v\beta_3$ for Angiogenesis [J]. *Science*, 1994, 264: 5 569-5 571.
- [3] RUOSLAHTI E, PIERSCHBACHER MD. Arg-Gly-Asp: a Versatile Cell Recognition [J]. *Cell*, 1986, 44: 517-518.
- [4] VAN HAGEN PM, BREEMAN WA, BERBARD HF, et al. Evaluation of a Radiolabelled Cyclic DTPA-RGD Analogue for Tumor Imaging and Radionuclide Therapy [J]. *Int J Cancer*, 2000, 90: 186-198.
- [5] HAUBNER R, WESTER HJ, REUNING U, et al. Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonists: a New Class of Tracers for Tumor Targeting [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40: 1 061-1 071.
- [6] HAUBNER R, KUHNAST B, MANG C, et al. [^{18}F] Galacto-RGD: Synthesis, Radiolabeling, Metabolic Stability, and Radiation Dose Estimates [J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15: 61-69.
- [7] SU ZF, LIU GZ, GUPTA S, et al. In Vitro and in Vivo Evaluation of a Technetium-99m Labeled Cyclic RGD Peptide as a Specific Marker of $\alpha_v\beta_3$ Integrin for Tumor Imaging [J]. *Bioconjugate Chem*, 2002, 13: 561-570.
- [8] HAUBNER R, BURKHAR F, BOCK M, et al. Synthesis and Biological Evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labelled Cyclic RGD Peptide for Imaging the $\alpha_v\beta_3$ Expression [J]. *Nuklearmedizin*, 2004, 43: 26-32.
- [9] BOSCHI A, BOLZATI C, BENINI E, et al. A Novel Approach to the High-Specific-Activity Labeling of Small Peptides With the Technetium-99m Fragment [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{N}(\text{PXP}))^{2+}$ (PXP = Diphosphine Ligand) [J]. *Bioconjugate Chem*, 2001, 12: 1 035-1 042.
- [10] BOLZATI C, BOSCHI A, UCCELLI L, et al. Chemistry of the Strong Electrophilic Metal Fragment [$^{99}\text{Tc}(\text{N}(\text{PXP}))^{2+}$ (PXP = Diphosphine Ligand)]. A Novel Tool for the Selective Labelling of Small Molecules [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 11 468-11 479.