

## 유전자 영상용 HSV1-TK 기질의 합성

원자력병원 싸이클로트론 응용연구실<sup>1</sup>, 연세대학교 임상병리학과<sup>2</sup>

최태현<sup>1,2</sup>, 안순혁<sup>1</sup>, 최창운<sup>1</sup>, 임상무<sup>1</sup>, 오옥두<sup>2</sup>

### Synthesis of Substrates for Gene Therapy Monitoring of HSV1-TK System

Tae Hyun Choi<sup>1,2</sup>, Soon Hyuk Ahn<sup>1</sup>, Chang Woon Choi<sup>1</sup>, Sang Moo Lim<sup>1</sup>, Ok Doo Awh<sup>2</sup>

Laboratory of Cyclotron Application<sup>1</sup>, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea

College of Health Science, Yonsei University<sup>2</sup>, Wonju, Korea

#### Abstract

**Purpose** : In gene therapy, tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase are sensitive to prodrugs. Potential prodrugs IVDU and IVFRU were synthesized and radiolabeled with radioiodine for noninvasive imaging of herpes simplex virus type 1 gene expression. **Material and Methods** : 5-(2-trimethylsilyl)vinyl-2'-deoxyuridine and 5-(2-trimethylsilyl)vinyl-2'-fluoro-2'-deoxyuridine, precursors of 5-(2-iodo)vinyl-2'-deoxyuridine(IVDU) and 5-(2-iodo)-2'-vinyl-2'-deoxy-2'-fluororibofuranosyl uracil(IVFRU), were synthesized from reaction of trans-1-trimethylsilyl-2-tri-n-butylstannylethylene with 5-iodo-2'-deoxyuridine and 5-iodo-2'-fluoro-2'-deoxyuridine, respectively, on the condition of Pd catalyst. These precursors were separated from reaction mixture by silica gel column chromatography method. Each precursor was radioiodinated with radioiodine by mixing with ICI oxidizing agent. These radioiodinated compounds were purified with HPLC. Radiohalogen exchange has been shown to be effective for the synthesis of products with lower specific activity. Similarly, carrier-added and high specific activity products have been isolated in respectable radiochemical yields using ICI method. **Results** : Synthetic yield of precursors, IVDU and IVFRU were 43% and 18%, respectively. Radiochemical purity of both compounds was over 98%. **Conclusion** : We synthesized precursors of IVDU and IVFRU for monitoring of HSV1-tk gene expression. Radiotracers were radioiodinated with high radiolabeling yield by ICI method. (Korean J Nucl Med 2002;36:102-109)

**key words** : Gene therapy, herpes simplex virus thymidine kinase, radioiodination

## 서 론

유전자 삽입을 이용한 암의 유전자 치료법 중에서, 약제 감수성 유전자 요법이 상당한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>1-5</sup>. 이 방법은 herpes simplex virus type-1 thymidine kinase(HSV1-TK) 유전자를 치료하고자 하는 종양세포에 전달하여 발현된 조직에 HSV1-TK에 특이적으로 작용하는 항바이러스제인 ganciclovir(GCV)를 투여하여 HSV1-TK가 발

Received Dec. 18, 2001; accepted Mar. 29, 2002

Corresponding Author: Sang Moo Lim, M.D.

Laboratory of Cyclotron Application<sup>1</sup>, Korea Cancer Center Hospital, Seoul 139-706, Korea

Tel: 02-970-1341

Fax: 02-970-1341

E-mail : cylab2@kcchsun.kcch.re.kr

현된 조직만을 죽이는 방법이다<sup>6)</sup>. 여기서 HSV1-TK는 GCV를 선택적으로 인산화하여, 인산화된 GCV의 형태가 종양세포의 DNA 합성에 참여하는 등의 방법으로 세포를 죽음에 이르게 한다<sup>7)</sup>. 이러한 전략체계 방법은 자살 유전자 치료(suicide gene therapy)라 하며, 이 HSV1-TK 전략이 이용되는 경우에는 적절한 nucleosides 유도체에 방사성동위원소를 표지한 방사성 추적자를 제조하여 유전자 치료시 HSV1-TK 발현 정도를 영상화 할 수 있다<sup>8-11)</sup>. 이렇게 특정 바이러스에 존재하는 효소는 그 특이 기능에 따라 항바이러스 제제 개발의 목표가 된다. 개발된 방사성 추적자가 실제로 적용되기 위해서는 다음과 같은 기본적인 조건들이 충족되어야 한다. 먼저, 영상을 획득하고자 하는 조직에 HSV1-TK 유전자가 전달되어 충분한 HSV1-TK가 발현되어야 한다. 다음으로 선택성이 강하고, 민감한 기질(substrate)로서의 nucleoside 변형체들이 사용되어야 한다. 마지막으로 사용되는 nucleoside 변형체인 기질이 투여되는 양과 혈액 내 반감기가 적당하여야 한다. 이러한 조건에 충족되는 방사성 추적자들은 대부분 종양 발생과 바이러스 감염 여부를 비침습적으로 평가하기 위해 연구된 nucleoside 변형체들에서 유래하였다<sup>12-14)</sup>.

예를 들면, 5-fluorouracil(5-FU), 5-iodo-2'-deoxyuridine(IUDR)<sup>15)</sup>의 경우는 종양치료와 영상을 목적으로, acyclovir(ACV), GCV, 5-bromovinyl deoxyuridine(BVDU)등은 바이러스 감염시 치료 약제로 개발되어진 물질들이다<sup>16-19)</sup>.

앞서 말한 바와 같이 종양에 대한 유전자 치료 전략에서 특히 중요한 것은 HSV1-TK의 선택적 기질이 될 수 있는 특이성이 높은 nucleoside 변형체들의 개발이다.

위의 조건을 충족할 수 있는 HSV1-TK 효소의 기질로서 GCV와 같은 purine계 변형체가 널리 사용되었으며, 이어서 pyrimidine계열들이 사용되어 졌다<sup>20, 21)</sup>.

방사성추적자용 변형체로는 uracil nucleosides계통이 많이 이용되었다. 이 들중 5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine(IVDU), 5-(2-iodovinyl)-2'-fluoro-2'-deoxyuridine(IVFRU)는 최근 들어 HSV1-TK 효소에 의

한 높은 기질효율과 선택성 그리고 방사옥소표지의 용이함으로 기대되는 방사성 추적자이다<sup>22, 23)</sup>. 본 연구에서는 HSV1-TK 체계를 이용한 유전자 모니터링용 기질인 IVDU와 IVFRU의 전구체 합성과 방사옥소 표지를 실험하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### HSV-thymidine kinase substrate 합성

Morin의 방법<sup>22)</sup>에 따라 합성하였으며 각 단계에서 얻어진 화합물들은 200 MHz 1H-NMR 스펙트로스코피로 구조를 확인하였다.

#### 1. (E)-1-trimethylsilyl-2-tri-n-

#### butylstannylethylene 합성

tri-n-butyl-tin hydride 5.39 ml와, trimethylsilyl acetylene 3.8 ml의 혼합액을, 100℃에서 83 시간동안 argon 기류 하에서 반응시켰다. 반응이 종료된 후 short path vaccum 증류 장치로 감압 하에서 증류하여, 110℃에서 나오는 boiling range가 110-115℃인 생성물을 수집하였다.

#### 2. 5-(2-(trimethylsilyl)vinyl)-2'-

#### deoxyuridine (IVDU 전구체) 합성

5-iodo-2'-deoxyuridine 200 mg의 아세트니트릴 용액(20 ml)에 위에서 얻어진 (E)-1-trimethylsilyl-2-tri-n-butylstannylethylene(440 mg, 1.12 mmol)과 (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pd(II)Cl<sub>2</sub>(40 mg, 0.056 mmole)을 넣고 argon 기류 하에 50℃에서 20 시간동안 교반 하였다. TLC로 반응의 종료를 확인하고 반응혼합액을 celite pad를 통과시켜 여과한 후 감압증류하여 용매를 제거하였다. 얻어진 잔사를 silca gel column chromatography(eluent : ethanol/chloroform = 3/20)하여 목적물을 분리하고 ethyl acetate로 재결정하여 방사표지 전구체인 5-(2-(trimethylsilyl) vinyl)-2'-deoxyuridine을 얻었다.

#### 3. (E)-5-(2-(trimethylsilyl)vinyl)-2'-

#### fluoro-2'-deoxyuridine(IVFRU 전구체) 합성

5-iodo-2'-fluoro-2'-deoxyuridine 197 mg(0.53 mmole)을 무수 tetrahydrofuran 5 ml에 녹인 후

dichloro- ditriphenylphosphine palladium(II)((PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PdCl<sub>2</sub>) 37 mg (0.05 mmole)과 E-1-trimethylsilyl-2-tri-n-butylstannylethylene(412 mg, 1.06 mmole)을 넣고 50°C에서 15 시간 교반하였다. 감압증류로 용매를 제거한 다음 silica gel column chromatography로 정제하여 목적물 132 mg(72%)을 얻었다.

4. 5-(2'-iodovinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU)와 5-(2'-iodovinyl)-2'-deoxy-2'-fluororibofuranosyl uracil (IVFRU)의 합성과 방사옥소 표지

Reaction vial에 acetonitrile에 20% acetic acid가 든 용액에 ICl(0.154 mmole) 20 μl을 넣고, 곧이어 Na<sup>125</sup>I 370 MBq, 30 μl을 넣는다. 역시 같은 용액에 녹인 전구체 5-(2-(trimethylsilyl)vinyl)-2'-deoxyuridine (0.73 mmole) 20 μl을 넣고, 실온에서 20 분간 반응시킨다. HPLC를 사용하여 분리 정제하였다. 컬럼은 μ bondapak C18(3.9×300 mm, waters, USA)을 사용하였고, 전개용액은 물과 acetonitrile의 gradient를 사용하였다. 전개액(A=acetonitrile, B=DW)

을 1분에서 5분은 10%-A, 90%-B의 등속으로 전개하고, 5 분에서 10 분까지는 40%-A, 60%-B의 구배로 전개하였다. 10 분에서 25 분까지는 40%-A, 60%-B의 등배로 전개하고, 254 nm의 파장으로 흡광도를 측정하고, GABI(raytest, Germany)를 사용하여 flow-through 모니터링하여 방사능을 측정하였다.

결 과

1. 전구체 및 표준물질의 합성

IVDU의 전구체인 trimethylsilylvinyl deoxyuridine (SiMe<sub>3</sub>-VDU)은 수율 약 43%를 얻었으며(Fig. 1a), IVFRU의 전구체인 trimethylsilyl vinyl fluoro-deoxyuridine(SiMe<sub>3</sub>-VFRU)은 약 72%의 수율로 얻었다(Fig. 1b). 합성의 모든 과정은 NMR을 사용하여 확인하였으며, cold iodine인 ICl을 동일 물비로 사용하여 최종 합성물인 IVDU와 IVFRU를 합성하였고, μ bondapak C18 컬럼을 사용한 HPLC 분석으로 확인, 분리하였다.

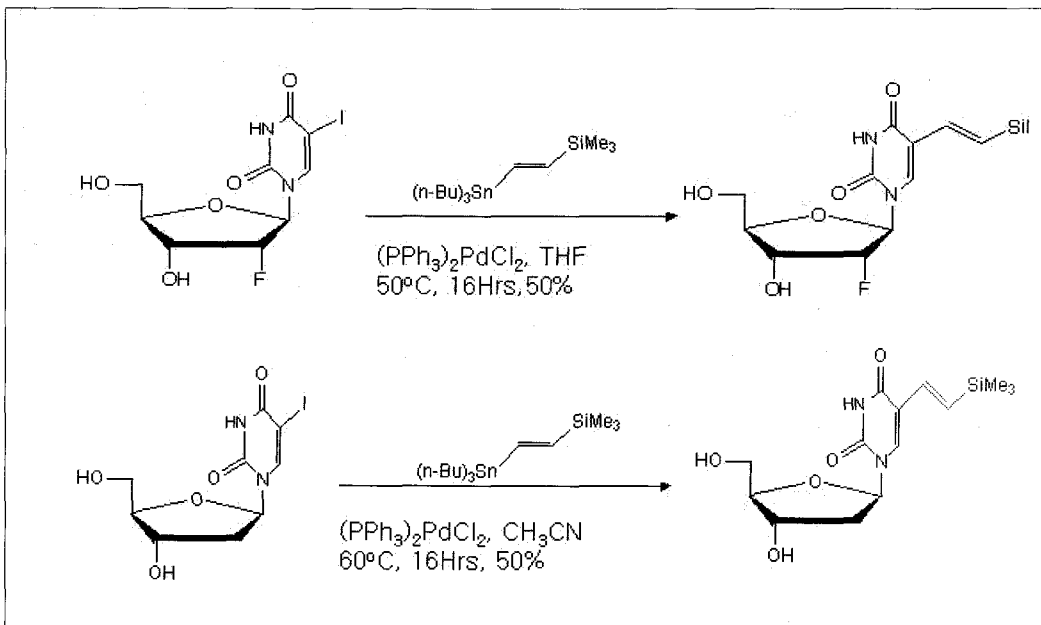


Fig 1. Synthesis of organo silane nucleoside precursors for radioiodination.  
 a) scheme of 5-(2-trimethylsilyl)-2'-fluoro-2'-deoxyuridine(IVFRU)  
 b) scheme of 5-(2-(trimethylsilyl)vinyl)-2'-deoxyuridine (IVDU)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d6)

(E)-5-(2-trimethylsilylvinyl)-2'-deoxyuridine (TMS-VDU)

δ 11.4(s, 1H, N-H), 8.18(s, 1H, H-6), 6.59(s, 2H, CH=CH-Si), 7.2(d, J=14.3Hz, 1H, CH=CHI), 6.16(t, 1H, 1'-H), 5.27(d, 1H, 3'-OH), 5.17(t, 1H, 5'-OH), 4.22(m, 1H, 3'-H), 3.78(m, 1H, 4'H), 3.64(m, 2H, 5'-H), 2.1(m, 2H, 2'-H)

(E)-5-(2-trimethylsilylvinyl)-2'-fluoro-2'-deoxyuridine (TMS-VFRU)

δ 11.46(s, 1H, N-H), 8.30(s, 1H, 6-H), 6.59(d, J=19.4Hz, 1H, -CH=CH-Si), 6.53(d, J=19.5Hz, 1H, -CH=CH-I), 5.95(d, JH-F'=10.0Hz, 1H, 1'-H), 5.58(t, J=5.4Hz, 1H, 3'-OH), 5.36(t, J=4.7Hz, 1H, 5'-OH), 5.04(dd, J=53.0Hz, 3.5Hz, 1H, 2'-H), 4.21(dd, J=23.2 8.0Hz, 1H, 3'-H), 3.90(d, J=8.1Hz, 1H), 3.84 and 3.64(2ddd, J=12.4, 4.7, 2.3, 2H, 5'-H)

2 .표지와 분리

표지 전구체인 SiMe<sub>3</sub>-VDU와 SiMe<sub>3</sub>-VFRU의 방

사성동위원소 표지실험은 <sup>125</sup>I를 사용하여 수행하였다. 표지시 최적 조건은 ICl과 전구체의 몰비가 동일한 조건에서 <sup>125</sup>I를 담체와 함께 넣어 표지하였다 (Fig 2). 앞의 방법을 이용한 표지 반응에서 표지수율 98%를 확인하였다. 표지 물질의 정제 분리는 waters사의 HPLC system을 사용하여 IVDU와 IVFRU를 순수하게 분리하였다. 이렇게 분리된 두 물질의 용출 시간은 IVDU가 약 17 분, IVFRU가 약 18 분경에 용출되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

고 찰

본 연구는 기존의 자살 유전자 요법의 일반적인 형태인 marker gene과 marker substrate의 선택에 따라 유전자 핵영상의 도입이 가능한가를 시도한 것이다. 대표적으로 HSV1-TK 유전자와 GCV 형태가 가장 널리 사용되는 형태이다. 실제로 GCV는 일반 조직과 유전자 도입 조직과의 선택성이 좋은 것으로 알려져 있고, 부작용이 적다. 현재 항바이러스 제재로 사용되는 물질이기 때문에 물질의 성격 또한 잘 알려져 있다. 그러나 in vitro상에서 HSV1의 억제 약물로 개발되었던 여러 가지 nucleosides 유도체

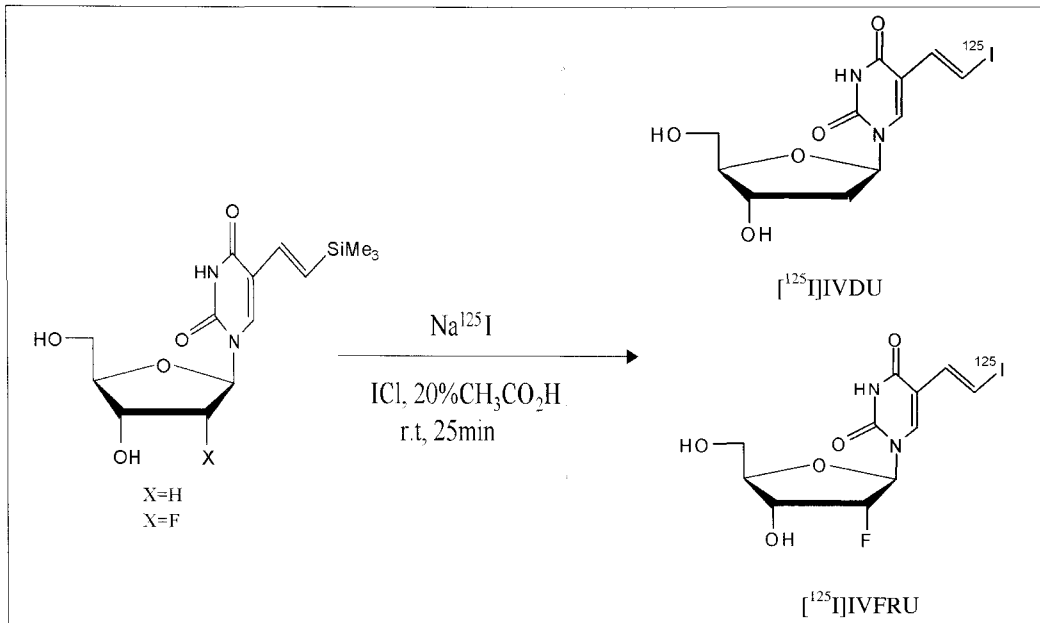


Fig 2. Synthesis of radiiodinated IVDU and IVFRU. (The radiiodination reaction was completed within 25 min for the carrier-added synthesis using ICl in acetonitrile of 20% acetic acid)

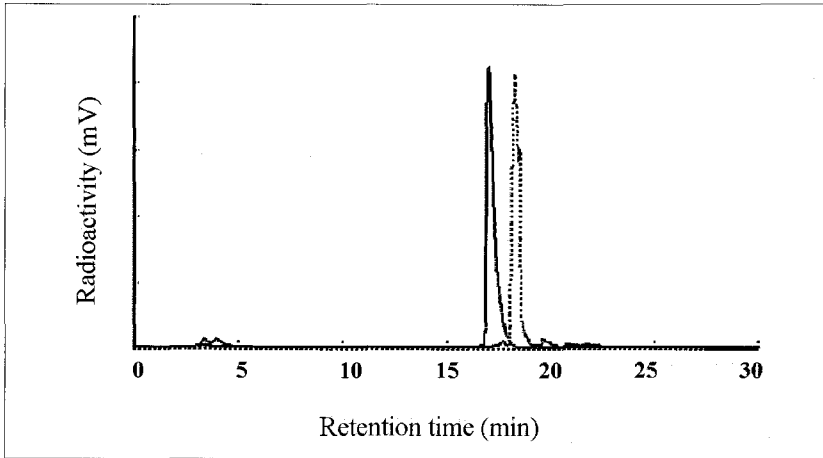


Fig 3. HPLC radiochromatogram of [<sup>125</sup>I]IVDU and [<sup>125</sup>I]IVFRU using RI detector. (following the reaction of SiMe<sub>3</sub>-VDU and SiMe<sub>3</sub>-VFRU in acetonitrile of 20% acetic acid with Na<sup>125</sup>I and ICl for 25 min at room temperature. Reverse phase HPLC ;  $\mu$  bondapak C18 column, mobile phase : from 1:9(v/v) acetonitrile-distilled water(DW) to 4:6(v/v). A(line): [<sup>125</sup>I]IVDU, B(dot): [<sup>125</sup>I]VFRU.)

들 중에는 HSV1-TK 와의 높은 친화성에도 불구하고, 생체 내에서의 대사 과정에서 약물로서 효용이 떨어지기 때문에 억제화 되지 않은 것들이 많다<sup>15, 24, 25</sup>. 실제로 IUdR의 경우 정상 세포의 DNA 합성 과정에서도 섭취되고, 대사의 비례적 증가에 의한 종양 영상화에 이용되고 있다. 초기 바이러스와 종양을 억제하는 약물로 arabinonucleosides와 arabinonucleotides의 개발이 시도되었으며, 여러 바이러스 중에서도 herpes virus의 약물로 BVDU가 HSV1에 한해서 적은 양으로도 높은 억제를 나타내는 것을 확인하였다<sup>15</sup>. 이와 비슷한 시기에 Wiebe 등에 의해 BVDU 합성과정에서 유도된 BVDU, IVDU 등에 방사성 동위원소 표지를 이용하여 바이러스 감염된 세포에서의 영상화 기술을 시도하였다<sup>9, 10, 22</sup>. 이 중에서 IVDU는 방사옥소의 사용이 가능하고, 방사표지가 용이하여 지속적인 연구가 이어졌다. 개에서의 생체 내 대사 실험에서 IVDU의 생체 내 안정성이 떨어진다고 보고하였으나, 이는 곧 nucleosides의 당 부분에 fluorine의 도입으로 그 안정성을 높이는 시도가 시작되게 되었다. 5-iodo-2'-fluoro-2'-deoxy-1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl uracil(FIAU)를 사용한 유전자 영상 실험에서 가능성을 보였고, 이를 모델로 새로운 기질이 개발되었

다. 특히 nucleosides 형태에서 2'-fluoro-substituted nucleosides의 도입을 이용한 FIAU보다 IVFRU와 IVFAU가 추천되어졌다. 이러한 5-substituted uracil nucleoside들이 HSV1-TK에 효과적인 양상을 나타냈다. 이는 세포내 phosphorylase에 의한 nucleoside 유도체들의 분해를 억제하는 구조로서 2'-position 위치에 변화를 준 형태의 가능성을 보였다. 이 세포 내 섭취 실험에서 sugar의 2' 위치에 fluorine이나 hydroxyl 기 도입간은 2'-position 구조의 변형이 2' 위치의 hydrogen 만 있는 deoxy형태에 비해 세포 내 섭취를 저하시키고, uracil의 5 위치의 vinyl 기의 도입이 HSV1-TK에 의해 더 높은 인산화 되어 지기 때문으로 생각되어진다. 다른 시도로는 ribose형태의 당 보다는 arabinose형태로의 변화를 주어 안정성을 높이고자 하였으며, 또한, 염기 부분의 변형과 더불어 다양한 유도체들이 개발되었다<sup>24-26</sup>.

이러한 항바이러스성 약제개발과 이에 따른 핵의학 영상기법의 시도는 현대에 들어 종양 영상과 종양치료의 발달과 더불어 유전자 치료가 시도됨에 따라 이에 맞는 용도로 맞추어지게 되었다. 실제 herpes virus 약제로 개발되어졌던 BVDU와 IVDU 그리고, 생체 내 안정성을 유도하고자 하였던 IVFRU 등이 방사성동위원소에 맞추어 방사성 추적

자로 개발되었다<sup>22)</sup>. 또한 GCV 등의 약제들은 HSV1-TK 전략을 이용한 자살 유전자 치료기법의 개발과 맞추어 사용되어졌다. 유전자 영상기술에 적합한 HSV1-TK의 marker substrate로서는 GCV보다 표지와 효소 반응성이 훨씬 높은 IVDU가 유리하며, 생체 내 대사 안정성을 증가시키는 형태로 IVFRU의 가능성도 크다고 할 수 있다.

본 실험은 유전자 영상기법을 실제적으로 적용하기 위해서 필요한 기반 연구로 HSV1-TK 유전자의 발현 조직에 보다 높은 반응성을 보이는 marker substrates들의 개발과 더불어 이 방사성 추적자들의 표지방법을 개발하고자 하였다.

방사옥소표지 추적자는 유전자 영상을 SPECT에서 실시하기 위해 개발되었으나, 현재는 PET 영상용 방사성 핵종으로 표지가 가능한 기질이 개발되고 있다.

IVDU, IVFRU를 이용, PET 핵종인 <sup>124</sup>I를 이용한 방법들도 시도되고 있기는 하나, 이러 저러한 이유로 <sup>18</sup>F를 이용한 방사성 추적자의 개발이 주류를 이루고 있다<sup>8, 27, 28)</sup>. 방사옥소의 화학적 표지방법으로는 친전자성 치환반응, 친핵성 치환반응이 있으며, 이 원리를 이용하여 산화제를 사용하는 방법이 가장 널리 사용된다<sup>29)</sup>. 산화제로는 chloramine T, iodogen, iodobead, 과산화수소 등이 있다. 본 실험에서의 전구체는 비닐 치환체로 친전자성 치환반응이 일반적이다. 이에 가장 적합한 산화제는 과산화수소가 널리 사용되나, 이 방법은 표지 전구체의 물성에 따라 조금씩 차이가 나기는 하지만 일반적으로 표지수율이 60% 정도로 낮은 편이다. 본 실험에서는 실제적인 생체내 투여를 위한 비방사능을 높이기 위한 표지법 보다는 표준물질의 합성과 표지방법이 동일한 것을 사용 일정한 수율을 얻기 위한 방법으로 담체를 사용하였다. 이 방법은 합성과 표지는 높은 수율로 얻을 수 있지만, 비방사능이 낮기 때문에 생체에 투여하여 영상을 얻기에는 제한이 많이 따르게 된다.

앞서 실험에서 IVDU, IVFRU의 표지 방법은 표준물질 합성과 높은 표지 수율 획득을 위하여 담체가 사용되었으며, 이는 생체 내 적용에 있어서는 감

마카메라의 감도를 떨어뜨릴 수 있을 것이다. 앞으로는 합성 표지된 두 물질의 HSV1-TK 발현세포에서의 섭취와 자살 유전자 치료법을 적용한 동물에서의 핵의학적 유전자 영상이 가능한지를 시도하여야 할 것이다.

## 요 약

**목적:** 유전자 치료에서, 종양세포에 herpes simplex virus thymidine kinase 유전자를 발현시키고 이에 민감한 prodrug을 전신투여하여 발현된 종양세포에 특이적으로 집적되는 방법은 매우 효율적인 방법이다. 대표적인 prodrug인, IVDU, IVFRU는 herpes simplex virus type 1의 비침습적 영상화 방법에 응용되는 방사옥소 표지가능 화합물이다. **재료 및 방법:** Trans-1-trimethylsilyl-2-tri-n-butylstannylethylene과 uridine 변형체상의 iodo-uracil을 Pd촉매하에서 반응시켜 표지전구체인 5-trimethylvinyl-deoxy-uridine과 5-trimethylsilylvinyl-deoxy-fluororibofuranosyl uracil을 합성하였다. 이것을 column chromatography의 방법으로 분리 정제하였다. 합성한 각 전구체를 ICI 담체를 이용하여 높은 수율로 표지하였고, HPLC를 사용하여 분리하였다. Radiohalogen exchange 방법은 비방사능을 낮게 할수록 표지에 효율적으로 알려져 있다. 이 방법으로 ICI 방법을 사용하여 담체를 포함하는 높은 방사능의 화합물을 얻을 수 있다. **결과:** IVDU와 IVFRU 표지를 위한 전구체 합성수율은 각각 43, 72% 였다. ICI로 담체를 이용한 표지방법을 사용하여 IVDU와 IVFRU 표지수율은 98% 이상이었다. **결론:** HSV1-tk를 이용한 유전자 영상용 기질의 전구체를 성공적으로 합성하였고, 95% 이상의 높은 표지수율의 유전자 영상용 방사성 추적자를 성공적으로 제조하였다.

## 참 고 문 헌

1. Ichiro K, Yoshihiro S, Akihiro M, Fumitaka S, Yuji M. cAMP stimulates the bystander effect in suicide gene therapy of human choriocarcinoma. *Anticancer Res* 1998;18:3411-20

2. Svend F, Kenneth R, Dell P, Jeff G, Kim J. A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectivity: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Human gene therapy* 1998;9:1323-33.
3. Toda M, Martuza L, Rabkin D. Combination suicide/cytokine gene therapy as adjuvants to a defective herpes simplex virus-based cancer. *Gene Therapy* 2001;8:332-9.
4. Kokoris S, Sabo P, Black E. In vitro evaluation of mutant HSV1 thymidine kinases for suicide gene therapy. *Anticancer Res* 2000;20:959-63.
5. Ramesh R, Munshi A, Marrogi J, Freeman M. Enhancement of tumor killing using a combination of tumor immunization and HSV-tk suicide gene therapy. *Int J Cancer* 1999;80:380-6.
6. Thust R, Tomicic M, Klocking R, Wutzler P, Kaina B. Cytogenetic genotoxicity of anti-herpes purine nucleoside analogues in CHO cells expressing the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type1: comparison of ganciclovir, penciclovir and aciclovir. *Mutagenesis* 2000;15: 177-84.
7. Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Uckert W, Debatin M. Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Research* 2000;60:3212-17.
8. Ilonka G, Leo W, Ronald F, Jacek K, Regin W. Radiosynthesis and quality assurance of 5-[<sup>124</sup>I] Iodo-2'-deoxyuridine for functional PET imaging of cell proliferation. *Nucl Med Biol* 1998 ; 25 : 350-65.
9. Juri T, Ronald F, Kyoichi W, Revathi J, Takamitsu O, John K, et al. Noninvasive imaging of herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method. *Cancer Res* 1996;56:4087-95.
10. Juri T, Gunher S, Revanti D, Hisao U, Kyoichi W, Bernd G, et al. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res* 1995;55: 6126-32.
11. Kurt Z, Tandra C, Donald B, James M, Buck R. Simultaneous evaluation of dual gene transfer to adherent cells by gamma-ray imaging. *Nucl Med Biol* 2001;28:135-44.
12. Tokumi M, Kunihiko U, Yoshiko S, Douglas R. Synthesis and anti-HIV activity of 6-substituted purine 2'-deoxy-2'-fluororibosides. *Nucleosides & Nucleotides* 1994;13:527-37
13. Tokumi M, Kunihiko U, Yoshiko S, Douglas R. Synthesis and anti-HIV activity of 6-substituted purine 2'-deoxy-2'-fluoroadenosines. *Nucleosides & Nucleotides* 1994;13:1219-30,
14. Erik C, Claude D, Piet H, Iain S, Stanley J, Michael. Synthesis and anti viral activity of (E)-5-(2-bromovinyl)uracil and (E)-5-(2-bromovinyl) uridine. *J Med Chem* 1986;29:213-17.
15. Erik C. Biochemical aspects of the selective antiherpes activity of nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol* 1984;33:2159-69.
16. Hayes D, John H, Jeffrey W, Donald L. Synthesis and radioiodination of a stannyl oligodeoxyribonucleotide. *Nucl Acids Res* 1997; 25:2897-901.
17. Robert M, Anna S, Johanna B, Blanka R, Maria K, Manfred M, et al. Transcription and activity of 5-fluorouracil converting enzymes in fluoropyrimidine resistance in colon cancer in vitro. *Biochem Pharmacol* 1997;54:1233-42.
18. James S, Kassis A, Amin K. Instantaneous preparation of radiolabeled 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Appl Radiat Isot* 1994;46:1039-46.
19. Knaus E, Leonard W, Tyrrell D. Synthesis of <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I and <sup>82</sup>Br labelled (E)-5-(2-halovinyl)-2'-deoxyuridines. *Int J Apl Radiat Isot* 1984;35: 1049-52.
20. Moris R, Stefano M, Steven W, James W, Bruce R, Stephan S. Nucleic acid related compounds. 65 . New syntheses of 1-(β -D-arabinofuranosyl)

- 5(E)- (2-iodovinyl)uracil(IVaraU) from vinylsilane precursors. Radioiodine uptake as a marker for thymidine kinase positive herpes viral infections. *J Med Chem* 1991;34:2275-80.
21. Haberkorn U, Bellmann M, Gerlach L, Morr I, Trojan H, Brix G, et al. Uncoupling of 2-fluoro-2-deoxyglucose transport and phosphorylation in rat hepatoma during gene therapy with HSV thymidine kinase. *Gene Therapy* 1998;5:880-87.
22. Kevin M, Morin A, Edward K, Leonard W. Synthesis and cellular uptake of 2'-substituted analogues of (E)-5-(2-[<sup>125</sup>I]iodovinyl)-2'-deoxyuridine in tumor cells transduced with the herpes simplex type-1. *J Med Chem* 1997;40:2184-92.
23. John S, Gill G, Takashi I, Dorothy T, Tyrrell D, Edward K et al. Pharmacokinetics and metabolism of E-5-(2-[<sup>131</sup>I]iodovinyl)-2'-deoxyuridine in dogs. *Antimicrob Agents & chemother* 1986;29:320-4.
24. Kelvin O, Danny M, Suzanne B, Gholam H, Zbigniew D. The preparation of protected arabinonucleosides. *Can J Chem* 1983;61:1204-12.
25. Kelvin O, Gholam H, Zbigniew P, Danny M. Silylated derivatives of arabinonucleosides. *Tetrahedron Letters* 1982;23:1997-2000.
26. Hayes D, Bruce R, Donal L, Stephan S. No-carrier-added [<sup>123</sup>I]1-(β-D-arabinofuranosyl)-5(E)-(2-iodovinyl)uracil(IVaraU): high yielding radiolabeling via organotin and exchange reactions. *Appl Radiat Isot* 1994;45:795-801.
27. Roland H, Chyng-Yann S, Abass A, Douglas M, Grace G, Hongming Z, et al. Kinase gene transfer to tumour-bearing rodents using positron emission tomography and [<sup>18</sup>F]FHPG. *Eur J Nucl Med* 2001;28:5-12.
28. Olafur G, Mats B, Stefan K, Feng W, Gunnar N, Karl-Johan F, et al. PET study does not support its use as a proliferation marker. *Nucl Med Biol* 2001;28:59-65.
-