

# 9-(4-[<sup>18</sup>F]Fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG)의 합성과 헤르페스 단순 바이러스 티미딘 키나아제 이입 간암 세포주에서의 기초 연구

원자력의학원 RI 및 방사성의약품개발실<sup>1</sup>, 핵의학연구소<sup>2</sup>, 핵의학과<sup>3</sup>, 연세대학교 임상병리학과<sup>4</sup>,  
인하대학교 화학과<sup>5</sup>  
문병석<sup>1</sup> · 이태섭<sup>2</sup> · 이명근<sup>4</sup> · 이교철<sup>1</sup> · 안광일<sup>1</sup> · 전권수<sup>1</sup> · 오옥두<sup>4</sup> · 지대운<sup>5</sup> · 최창운<sup>2,3</sup>  
임상무<sup>2,3</sup> · 천기정<sup>1,2,3</sup>

## Synthesis and Preliminary Evaluation of 9-(4-[<sup>18</sup>F]Fluoro-3-hydroxymethylbutyl)Guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG) in HSV1-tk Gene Transduced Hepatoma Cell

Byung Seok Moon, M.S.<sup>1</sup>, Tae Sup Lee, Ph.D.<sup>2</sup>, Myoung Keun Lee, M.S.<sup>4</sup>, Kyo Chul Lee, Ph.D.<sup>1</sup>,  
Gwang Il An, Ph.D.<sup>1</sup>, Kwon Soo Chun, Ph.D.<sup>1</sup>, Ok Doo Awh, Ph.D.<sup>4</sup>, Dae Yoon Chi, Ph.D.<sup>5</sup>,  
Chang Woon Choi, M.D. & Ph.D.<sup>2,3</sup>, Sang Moo Lim, M.D. & Ph.D.<sup>2,3</sup>, and Gi Jeong Cheon, M.D. & Ph.D.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Radiopharmaceuticals, <sup>2</sup>Laboratory of Nuclear Medicine, <sup>3</sup>Department of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea; <sup>4</sup>Department of Medical Laboratory Science, Yonsei University, Wonju, Korea; <sup>5</sup>Department of Chemistry, Inha University, Incheon, Korea

**Purpose:** The HSV1-tk reporter gene system is the most widely used system because of its advantage that direct monitoring is possible without the introduction of a separate reporter gene in case of HSV1-tk suicide gene therapy. In this study, we investigate the usefulness of the reporter probe (substrate), 9-(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG) for non-invasive reporter gene imaging using PET in HSV1-tk expressing hepatoma model. **Materials and Methods:** Radiolabeled FHBG was prepared in 8 steps from a commercially available triester. The labeling reaction was carried out by NCA nucleophilic substitution with K[<sup>18</sup>F]/K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> in acetonitrile using N<sub>2</sub>-monomethoxytrityl-9-[4-(tosyl)-3-monomethoxytritylmethylbutyl]guanine as a precursor, followed by deprotection with 1 N HCl. Preliminary biological properties of the probe were evaluated with MCA cells and MCA-tk cells transduced with HSV1-tk reporter gene. In vitro uptake and release-out studies of [<sup>18</sup>F]FHBG were performed, and was analyzed correlation between [<sup>18</sup>F]FHBG uptake ratio according to increasing numeric count of MCA-tk cells and degree of gene expression. MicroPET scan image was obtained with MCA and MCA-tk tumor bearing Balb/c-nude mouse model. **Results:** [<sup>18</sup>F]FHBG was purified by reverse phase semi-HPLC system and collected at around 16-18 min. Radiochemical yield was about 20-25% (corrected for decay), radiochemical purity was >95% and specific activity was around >55.5 GBq/μmol. Specific accumulation of [<sup>18</sup>F]FHBG was observed in HSV1-tk gene transduced MCA-tk cells but not in MCA cells, and consecutive 1 hour release-out results showed more than 86% of uptaked [<sup>18</sup>F]FHBG was retained inside of cells. The uptake of [<sup>18</sup>F]FHBG was showed a highly significant linear correlation (R<sup>2</sup>=0.995) with increasing percentage of MCA-tk numeric cell count. In microPET scan images, remarkable difference of accumulation was observed for the two type of tumors. **Conclusion:** [<sup>18</sup>F]FHBG appears to be a useful as non-invasive PET imaging substrate in HSV1-tk expressing hepatoma model. (Nucl Med Mol Imaging 2006;40(4):218-227)

**Key Words:** [<sup>18</sup>F]FHBG, thymidine kinase, gene therapy, PET

• Received: 2006. 7. 20. • Accepted: 2006. 8. 17.  
• Address for reprints: Gi Jeong Cheon M.D. & Ph.D., Laboratory of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, 215-4 Gongleung-Dong, Nowon-Gu, Seoul, 139-706, Korea  
Tel: 82-2-970-1273, Fax: 82-2-970-1341, E-mail: larry@kcch.re.kr  
\* 본 연구는 과학기술부 원자력 중장기 연구사업의 연구비 보조로 이루어졌음

## 서론

동물 세포의 티미딘 키나아제(thymidine kinase, TK)는 세포 내에서 디옥시티미딘(deoxythymidine: dT) 당구조 5'-위치의 OH기에 인산 한 분자를 붙여주어 DNA 합성에 필요

한 dT-monophosphate를 생성하는 효소이다. 이에 반해 헤르페스 심플렉스 바이러스 herpes simplex virus: HSV)의 헤르페스 심플렉스 바이러스 1형 티미딘 키나제(Herpes simplex virus type-1 thymidine kinase: HSV1-tk) 효소는 기질 특이성이 낮아서 dT 뿐만 아니라 이와 유사한 구조를 가진 물질을 인산화 할 수 있는 특성이 있다.<sup>1)</sup> 이러한 특성 때문에 유전자 전달에 의해 HSV1-TK 효소가 생성된 세포에 dT와 유사한 기질이 섭취되면 비 특이적으로 인산화되어 세포 밖으로 빠져 나오지 못하고 세포 내에 축적되며, 축적된 기질의 양은 HSV1-TK 효소 단백질의 상대량을 반영하여 이를 통하여 간접적으로 HSV1-tk 유전자의 발현량을 예측할 수 있다.

지금까지 보고된 기질은 크게 두 가지로 구분할 수 있다. 첫번째는 8-fluoro-9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy-methyl)guanine (FGCV),<sup>2)</sup> 8-fluoro-9-[(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl)]guanine (FPCV),<sup>2,3)</sup> 9-[3-(fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine (FHPG),<sup>4)</sup> 9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine (FHBG)<sup>5-7)</sup> 등의 acycloguanosine 유도체들이고, 두번째는 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabino-furanosyl-5-iodouracil (FIAU),<sup>8-10)</sup> 2'-fluoro-2'-deoxy-5-iodo-1-β-D-ribofuranosyluracil (FIRU),<sup>11)</sup> 2'-fluoro-2'-deoxy-5-methyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil (FMAU),<sup>12)</sup> 2'-fluoro-2'-deoxy-5-iodovinyl-1-β-D-ribofuranosyluracil (IVFRU)<sup>13)</sup> 등의 uracil nucleoside 유도체들이다.

Uracil nucleoside 유도체의 경우 <sup>131</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C 등의 다양한 동위원소로 높은 수율로 쉽게 표지가 가능하여 감마카메라, 단일광자방출전산화단층촬영(single-photon emission computed tomography: SPECT)등의 다양한 영상장비를 이용할 수 있지만 5-[<sup>124</sup>I]iodo-2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuranosyl-5-iodouracil ([<sup>124</sup>I]FIAU) 외에는 PET 영상에 이용할 수 없다. 따라서 acycloguanosine 유도체는 GCV의 결사슬을 PET 영상이 가능한 fluorine-18으로 표지한 9-[(3-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([<sup>18</sup>F]FHPG), 9-(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG, 1) 등이 주로 연구 되고 있다. HSV1-tk 보고 유전자를 위한 이상적인 기질은 HSV1-tk에 대한 친화력이 동물세포의 thymidine에 비해 좋아야 하고, 동시에 동물세포의 TK에 대한 친화력이 낮을수록 좋다고 할 수 있다. Uracil nucleoside 유도체는 acycloguanosine 유도체에 비해 HSV1-tk에 대한 효소 친화력이 높아서 세포내에 보다 많이 집적되는 특징을 갖지만 동물세포의 티미딘 키나제에 대한 친화력 역시 acycloguanosine보다 높은 것으로 나타나 실제

영상에 있어서는 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보고되었다. 또한 지금까지 발표된 연구 결과로는 어떤 것이 보다 이상적인 기질인가에 대한 결론을 내리기 어렵다.<sup>14)</sup>

[<sup>18</sup>F]FHBG는 지금까지 합성된 acycloguanosine 계열 유도체 중에서 HSV1-tk 유전자가 이입된 세포내에서의 섭취율이 가장 좋은 것으로 알려져 있고 최근에는 영상류에 대한 전임상 연구가 보고된 바 있다.<sup>15)</sup>

본 연구에서는 Morris 간암 세포주에서 HSV1-tk 보고 유전자의 기질로서 [<sup>18</sup>F]FHBG의 사용 가능성을 확인하고자 하였다. 이에 [<sup>18</sup>F]FHBG의 제조 조건을 확립하고 retroviral 벡터를 사용하여 HSV1-tk 유전자를 이입한 세포주인 Morris hepatoma 세포(MCA-tk)에서 종양 형성 동물모델을 이용하여 실험을 진행하였다. 시간변화에 따른 [<sup>18</sup>F]FHBG의 실험관내 섭취율을 평가하기 위하여 MCA 세포와 MCA-tk 세포에서의 섭취율을 측정하여 비교하였으며, 세포 수 증가에 따른 [<sup>18</sup>F]FHBG의 섭취율 시험을 통하여 발현량과 섭취율을 상관성을 평가해 보았다. 최종적으로 microPET 생체영상을 통하여 HSV1-tk 보고 유전자의 기질로서 [<sup>18</sup>F]FHBG 유용성 여부를 확인하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재료

Kryptofix 2.2.2., potassium carbonate, acetonitrile, Celite<sup>TM</sup>, reaction flask, Silica gel 60, methanol, chloroform, tetrahydrofuran, ethanol, HCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution, NaHSO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>는 Aldrich사의 제품을 구입하여 사용하였다. 방사성동위원소인 F-18은 KIRAMS MC-50 가속기로부터 생산하여 사용하였다. Trypan blue solution, formamide, formaldehyde dipyrindamole, nitrobenzylthioinosine (NBTI), TdR, uracil, adenine, 2-chloroadenosine 10 mM phosphate buffer, dimethylsulfoxide (DMSO)는 미국의 Sigma사의 제품을 사용하였다. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), Trypsin-EDTA, Nylon membrane, nitrocellulose membrane, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)은 미국의 Gibco사 제품을 사용하였으며, 세포배양 접시는 미국의 Corning사 제품을 사용하고, fetal bovine serum은 미국의 Biowhittaker사 제품을 사용하였다. Agarose는 FML Bio-product사의 seakem LE agarose를 사용하였고 Neubauer chamber는 독일의 Superior사의 것을 사용하였다. MCA-RH777 (MCA) 세포주는 ATCC에서 구입하여 사용하였고, 이 세포에 retroviral 벡터를 이용하여 Neo 유전자와 HSV1-tk 유전자가 이입된 MCA-tk 세포는 제공받아 사용

하였다. 세포배양을 위한 항온 항습기는 미국의 Formascientific사의 water jacket 3250 모델을 사용하였다. Total RNA 추출 시약으로 미국의 iNtRON Biotechnology사의 easy-spin™ (DNA free) Total RNA Extraction Kit을 사용하였으며, RT-PCR 시약으로 미국 QIAGEN사의 OneStep RT-PCR kit을 사용하였다. Internal control인 G3PDH는 미국의 Clontech사의 제품을 이용하였다. 고성능액체크로마토그래피(HPLC)는 미국의 Waters사의 제품을 이용하였으며, 컬럼은 Waters Xterra C18을 사용하였고 흡광도 측정은 Waters 2487 absorbance detector를 사용하고, 방사능 측정은 독일의 Raytest사의 GABI RI detector를 이용하여 방사능을 계속하였다. PET 생체영상은 취득을 위해서 Concorde Microsystems Inc.사의 microPET R4 장비를 이용하였다. 실험동물로 사용한 Balb/c nude mice는 Japan SLC사로부터 구입하여 사용하였다.

## 2. MCA 간암 세포주에서의 HSV1-tk 유전자 발현 확인

### 1) 세포주의 배양

America type cell culture (ATCC)로부터 분양받은 Buffalo 랫드의 간암 세포주인 MCARH-7777 (MCA) 과 이 세포에 retroviral 벡터를 이용해 HSV1-tk 유전자를 이입한 MCA-tk 세포주를 20% horse serum과 5% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium에 75 mm<sup>2</sup> culture flask를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하였다. 배양한 후 48시간 간격으로 세포의 밀도가 전체 flask 면적의 80%가 넘지 않도록 유지하며 계대를 실시하였고 세포 내에 이입된 유전자에 selection marker로서 NEO gene이 삽입되어 있기 때문에 HSV1-tk 유전자가 이입된 세포만 선택적으로 배양이 가능하도록 G418을 800 μg/mL 농도로 매 3회, 계대 시 1회 첨가하여 배양 하였다. 계대 시 flask 바닥에 붙어있는 세포를 떼어내기 위해서 1× trypsin-EDTA를 사용하여 가볍게 한번 헝구어 낸 후 다시 1× trypsin-EDTA 3 mL를 첨가하여 5-10분 실온에 방치한 후 세포손상을 막기 위해 10 mL의 세포배양액으로 중화시켜 1000 rpm에 5분 원심하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포는 3 mL의 세포배양액으로 재 부유한 후 세포 수 확인과 생존율 확인을 위해 trypan blue로 염색하여 neubaure chamber에서 계측하였다.

### 2) RNA 분리

MCA와 MCA-tk 세포 각각 5×10<sup>6</sup>개를 total RNA 분리에 이용하였다. RNA 분리는 iNtRON Biotechnology사의

easy-spin™ (DNA free) Total RNA Extraction Kit을 사용하여 제품의 manual 상에 명시된 방법으로 다음과 같이 진행하였다.

5×10<sup>6</sup>개의 세포를 lysis buffer 1 mL와 섞어서 세포가 다 녹을 때 까지 진탕한 후 클로로포름 400 μL를 넣고 다시 진탕하여 실온에 2분간 방치하였다. 4°C, 13000 rpm에서 15분간 원심 하여 상층액 400 μL를 취한 후 동량의 precipitation buffer와 섞어 실온에 2분 방치한 후 400 μL씩 2 회에 걸쳐 membrane filter에 옮겨 13000 rpm에서 2분간 원심하여 여액을 제거하였다. Washing buffer 1 mL를 membrane filter에 넣어 2 회 세척한 후 최종적으로 elution buffer 50 μL를 이용하여 RNA를 용출시켰다. 분리한 RNA를 UV photometer를 이용하여 정량한 후 다음 검사에 이용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

### 3) RT-PCR

MCA-tk 세포에서 HSV1-tk 유전자가 잘 발현되고 있는지를 확인하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)을 이용하여 HSV1-tk 유전자 발현에 의해 생성된 mRNA를 검출 하였다. QIAGEN사의 One Step RT-PCR Kit을 사용하여 HSV1-tk 유전자에 특이적인 Primer쌍, sense (5'-CTCACCTCATCTTCGACCG-3'), antisense (5'-CCTGCAGATACCGCACCGTA-3')를 사용하여 PCR을 시행하였고, Rat Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH)에 특이적인 primer쌍, sense (5'-TGAAGGTGGTGTGAA CGGATTTGGC-3'), antisense (5'-CATGTAGGCCATGAGGT CCACCAC-3')을 이용하여 internal control로 사용하였다. RT-PCR 조건은 total RNA 1 μg/μL, primer 각 0.6 μM, Enzyme mix 2.0 μL, dNTP mix 2.0 μL, 5×RT-PCR buffer 10.0 μL, RNase-free water 31 μL를 master mix로 만들어 사용했으며 50°C 30분, 95°C 15분 각 1 cycle, 94°C 30초, 59°C 45초, 72°C 45초를 35 cycle, 72°C 10분 1 cycle로 PCR을 진행하였다. 생성된 PCR product는 2% agarose에서 100 V, 40분간 전기영동한 후 Etidium Bromide로 stain하여 UV 상에서 관찰하였다.

## 3. 방사성 플루오린-18 표지 핵산 유도체인 FHBG 제조

### 1) 전구체인 penciclovir tosylate의 제조

[<sup>18</sup>F]FHBG의 전구체와 표준물질을 합성하기 위해 보고된 방법을 조금 변형하여 Fig. 1에 따라 합성하였다.<sup>5,16-20)</sup> Triester(2)를 t-butanol 용매 하에서 sodium borohydride와

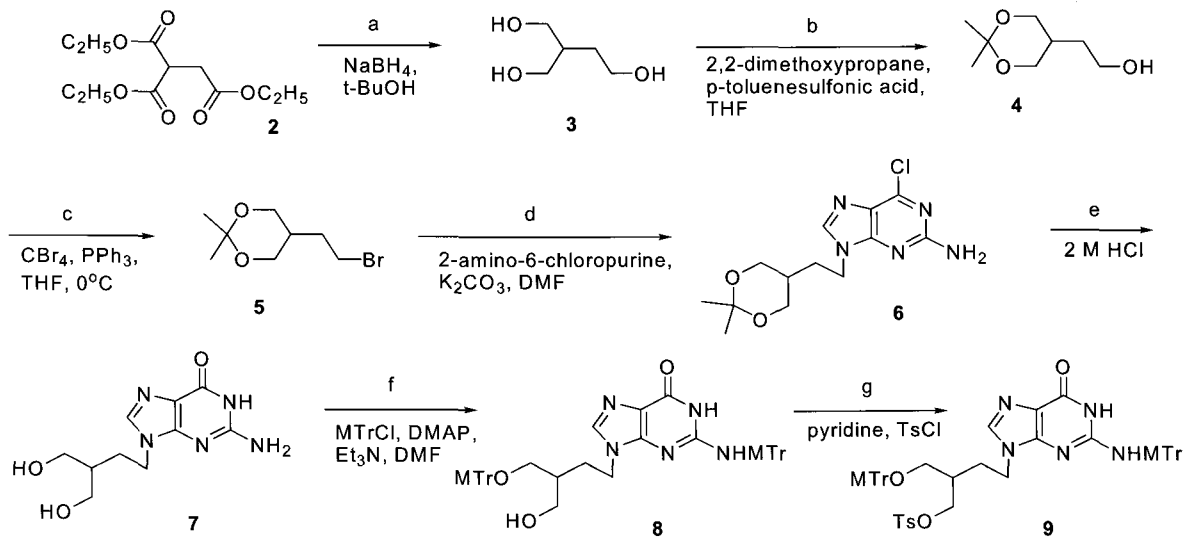


Fig. 1. Synthetic route of N2-monomethoxytrityl-9-(4-(tosyl)-3-monomethoxytritylmethylbutyl)guanine as a [<sup>18</sup>F]FHBG precursor.

MeOH을 넣고 교반하여 triol(3)을 합성하였다. 얻어진 triol(3)에 2,2-dimethoxypropane과 *p*-toluenesulfonic acid을 처리하여 acetonide(4)를 합성하였으며, triphenylphosphine과 *N,N*-dimethylformamide에 녹여져 있는 carbon tetrabromide를 이용하여 bromide(5)를 합성하였다. 합성된 bromide(5)와 2-amino-6-chloropurine, potassium carbonate를 *N,N*-dimethylformamide 용매에 녹인 후 실온에서 교반하여 9-isomer(6)를 합성하였으며, 얻어진 9-isomer(6)에 2 M hydrochloric acid를 가하고 교반하여 6-chloro기를 6-oxo기로 변환시키고 acetonide의 보호기를 제거함으로써 penciclovir(7)를 얻을 수 있었다. 방사성동위원소를 도입하기에 안정한 형태의 전구체를 만들기 위해 penciclovir(7)을 *N,N*-dimethylformamide에 녹이고 dimethylaminopyridine (DMAP)와 methoxytrityl chloride, triethylamine을 가하여 50°C에서 2시간 동안 교반함으로써 MTr로 보호된 penciclovir(8)를 얻었으며, 이탈기를 도입하기 위해 *p*-toluenesulfonyl chloride를 사용하여 최종 전구체인 penciclovir tosylate(9)를 합성하였다(analysis data of penciclovir tosylate(9): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz), 7.19 -7.32 (m, 19H), 7.07-7.10 (m, 8H), 6.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.99-4.02 (m, 1H), 3.88-3.90 (m, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.36-3.38 (m, 2H), 3.00-3.02 (m, 1H), 2.88-2.89 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 1.38-1.43 (m, 1H), 1.35-1.31 (m, 2H); Anal. calcd for C<sub>57</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>S: C, 71.90; H, 5.61; N, 7.39; S, 3.37).

2) FHBG 전구체를 이용한 [<sup>18</sup>F]FHBG의 합성 및 분리정제 KIRAMS MC-50 가속기로부터 얻은 F-18 용액 약 500 mCi (18.5 GBq)과 kryptofix 2.2.2. (7-9 mg), 1.6 M potassium carbonate (100 μL)을 azeotropic distillation으로 potassium fluoride-kryptofix complex를 만들었다. 얻어진 혼합물에 전구체인 penciclovir tosylate (9) (4 mg)을 acetonitrile (500 μL) 녹인 용액을 가하고 120°C에서 20분 간 교반하였다. 혼합물을 실온으로 식히고 sep-pak cartridge (silica)로 kryptofix 2.2.2.와 반응하지 않은 F-18을 제거한 후 15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액으로 추출하였다. 추출된 용액에 1 N HCl (400 μL)를 가하고 90°C에서 10분 교반하여 보호기를 제거하였으며, phosphate buffer (1 mL) 용액으로 희석하였다. 혼합물을 HPLC filter (0.45 μm)로 여과한 후에 semi-preparative HPLC (Waters Xterra C18, mobile phase: 5-15% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O gradient condition, flow rate: 2 mL/min)로 분리함으로써 [<sup>18</sup>F]FHBG(1)를 최종적으로 합성하였다.

#### 4. [<sup>18</sup>F]FHBG의 세포내 섭취기전

##### 1) 간암세포주에서의 [<sup>18</sup>F]FHBG 섭취율 실험

*HSV1-tk* 유전자가 발현된 세포내에만 특이적으로 [<sup>18</sup>F]FHBG가 집적되는지 평가하기 위하여 Morris hepatoma 세포주인 MCA-RH-7777 (MCA) 세포주와 *HSV1-tk* 유전자를 retrovirus 벡터로 이입한 MCA-tk 세포주에서 [<sup>18</sup>F]FHBG의 시간경과에 따른 섭취율을 비교하였다. 6 well plate에 각 세포주를 well당 1×10<sup>6</sup> cell (n=3)이 되도록 seeding 하고 20% horse serum과 5% FBS가 포함된 Dulbecco's

modified eagle medium (DMEM) 상에서 24 시간 배양한 후 각 well 당 20  $\mu$  Ci (740 KBq)의 [<sup>18</sup>F]FHBG를 넣고 10 분, 30분, 60분, 120분, 180분 동안 추가로 배양한 뒤 배지를 흡입하여 제거하고 각각의 세포를 trypsin-EDTA 300  $\mu$  L 로 처리하여 떼어내었다. 떼어낸 세포를 cold PBS 1 mL로 3 회 세척하여 세포에 섭취되지 않은 여분의 방사능을 제거 하였다. 최종적으로 각 세포에 섭취된 방사능을 감마카운터를 이용하여 계측하여 평가하였다. 섭취율은 투입된 방사능의 백분율(% ID: percentage of injected dose)로 나타내었다.

2) 섭취된 [<sup>18</sup>F]FHBG의 방출 실험

섭취된 [<sup>18</sup>F]FHBG가 세포내에 남아있는지 방출되는지를 평가하기 위하여 MCA 세포주와 MCA-tk 세포주를 6 well plate에 세포수가 2 $\times$ 10<sup>5</sup>개(n=3)가 되도록 seeding하고 DMEM에서 24시간 배양하였다. 각각의 well에 [<sup>18</sup>F]FHBG 40  $\mu$  Ci (1.48 MBq)를 넣고 2시간 동안 배양하여 섭취시킨 후 각각의 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 떼어내고 cold PBS 1 mL를 이용하여 3 회 세척하였다. 여기에 2 mL의 DMEM을 넣고 배양한 후 0분, 10분, 20분, 30분, 60분 후에 원침하여 배지 여액을 제거하고 세포내에 방출되지 않고 남아있는 방사능을 감마카운터를 이용하여 계측한 후 평가하였다. 0분에서 측정된 방사능을 100%로 하고 이에 따른 각각의 시간대별 세포의 상대적 방사능을 백분율(% retention radioactivity)로 나타내었다.

3) HSV1-tk 발현 세포의 백분율에 따른 섭취율 상관도 실험

MCA 세포와 HSV1-tk 유전자가 이입된 MCA-tk 세포에서 MCA-tk 세포의 백분율 증가에 따른 [<sup>18</sup>F]FHBG 섭취량의 상관관계를 평가하기 위하여 MCA-tk 세포를 전체 세포수의 0%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%가 되도록 혼합하고 6 well plate의 각 well 당 2 $\times$ 10<sup>5</sup>개(n=3)의 세포를 seeding 하였다. DMEM 상에서 24시간 배양하고 [<sup>18</sup>F]FHBG 40  $\mu$  Ci (1.48 MBq)를 첨가하여 2시간 동안 추가로 배양하여 섭취시킨 뒤 배지를 흡입하여 제거하였다. Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어내고 1 mL의 cold PBS로 3회 세척하여 여액의 방사능을 제거하였다. 세포내에 섭취된 방사능을 감마카운터를 이용하여 계측한 후 평가하였다.

5) 종양 동물모델에서 [<sup>18</sup>F]FHBG의 microPET 생체영상

종양 동물모델에서의 영상 평가를 위해서 [<sup>18</sup>F]FHBG에 의한 연속 생체영상을 얻어 이를 평가하였다. 종양 동물모델

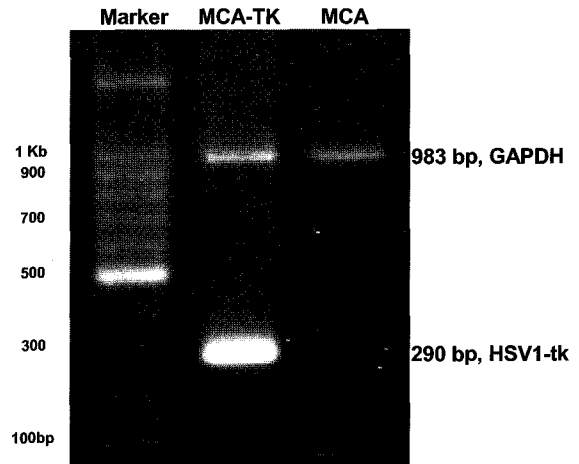


Fig. 2. RT-PCR analysis of HSV1-tk mRNA expression in MCA-tk and MCA cells. Electrophoresis was performed with 2% agarose gel at 100 V for 40 min. 290 bp fragment corresponding to HSV1-tk gene was observed in MCA-tk lane only. The GAPDH was used as internal control.

을 만들기 위해 MCA 세포와 HSV1-tk 유전자 이입 세포주인 MCA-tk 세포를 배양하여 trypsin-EDTA로 떼어낸 뒤 1000 rpm, 5분간 원침하여 상층의 배양액을 제거하였다. PBS로 재 부유한 후 100  $\mu$  L 당 각 세포가 1 $\times$ 10<sup>7</sup>개가 되도록 희석하고 Balb/c nude mice의 좌측 옆구리에는 MCA 세포를, 우측 옆구리에는 MCA-tk 세포를 피하로 주사하여 3주간 breeding하면서 종양의 성장을 관찰하였다. 형성된 종양의 직경이 10 mm 정도인 마우스 한 마리를 선별하여 microPET 영상 획득에 사용하였다. [<sup>18</sup>F]FHBG 300  $\mu$  Ci (11.1 MBq)를 꼬리 정맥을 통해 주사한 후 2시간에서 10분간 방출 스캔을 실시한 것을 재구성하여 영상을 획득하였다. 영상의 재구성은 microPET R4의 제조사인 Concorde Microsystems Inc.에서 제공된 소프트웨어를 이용하였다.

결 과

1. MCA 간암세포주에서의 HSV1-tk 유전자 발현 확인

MCA 세포주와 MCA-tk 세포주에서 각각 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행 하였다. Internal control로 사용한 rat glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)의 경우 MCA와 MCA-tk 세포 모두에서 983 bp의 PCR product가 검출되어 RNA 분리 및 역전사 과정이 잘 이루어졌음을 확인할 수 있었다.(Fig. 2) HSV1-tk 유전자에 특이적인 primer를 사용한 경우 MCA 세포에서는 PCR product가 생성되지 않았지만 MCA-tk 세포에서는 290 bp에서

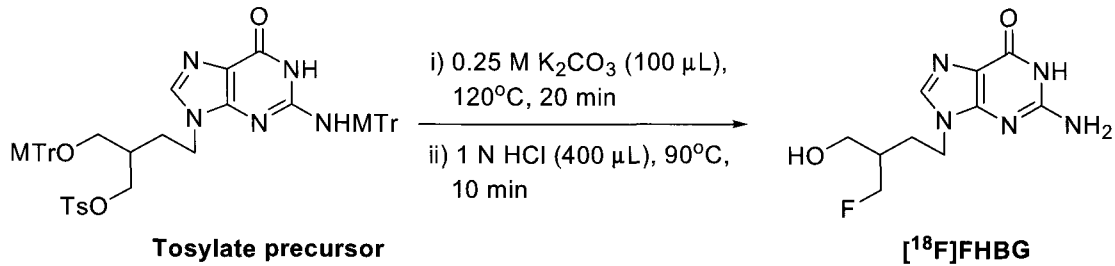


Fig. 3. Scheme and condition of F-18 labeled (<sup>18</sup>F)FHBG.

band를 관찰할 수가 있어서 MCA-tk 세포에서만 이입된 *HSV1-tk* 유전자가 발현되고 있음을 확인하였다.

## 2. 방사성 플루오린-18 표지 핵산 유도체인 FHBG 제조

### 1) 전구체인 penciclovir tosylate의 제조

전구체인 penciclovir tosylate의 제조과정에서 acetone(4)는 47%의 수율로 합성하였으며 bromide(5)는 87%의 수율로 합성하였다. 9-isomer(6)는 70% 수율로 합성하였으며, penciclovir(7)는 72%의 수율로 합성하였다. MTr로 보호된 penciclovir(8)를 40%의 수율로 얻었으며, 최종 전구체인 penciclovir tosylate (9)는 34%의 수율로 합성하였다.

2) FHBG 전구체를 이용한 [<sup>18</sup>F]FHBG의 합성 및 분리정제 KIRAMS MC-50 가속기로부터 생산된 F-18 용액과 FHBG 전구체인 *N*2-(*p*-anisyl)diphenylmethyl)-9-[(4-tosyl)-3-*p*-anisyl)diphenylmethoxymethylbutyl]guanine를 이용하고 반응 용액과 전구체의 양을 변화시키면서 Fig. 3의 조건에서 [<sup>18</sup>F]FHBG 표지수율을 최적화하였다.(Table 1)

표지 반응을 수행한 결과 반응용매의 변화에 따른 표지수율은 acetonitrile을 사용하였을 경우 32%로 가장 높았으며, 전구체의 양의 변화는 4 mg을 사용하였을 때 43%로 가장 높았다. 하지만 전구체의 양을 늘려도 표지수율의 변화는 거의 없었으며 전구체의 양을 4 mg 초과 사용할 경우 비방사능이 약 2-4배 감소하여 최적화된 entry 5의 조건으로

Table 1. Optimization of [<sup>18</sup>F]FHBG Radiolabeling Condition

Entry	Precursor	Reaction solvent	Yield <sup>a</sup>
1	2 mg	CH <sub>3</sub> CN (500 μL)	32%
2	2 mg	DMSO (500 μL)	24%
3	2 mg	DMF (500 μL)	12%
4	2 mg	CH <sub>3</sub> CN/DMF (250:250 μL)	16%
5	4 mg	CH <sub>3</sub> CN (500 μL)	43%
6	8 mg	CH <sub>3</sub> CN (500 μL)	44%

<sup>a</sup>Radiolabeling yield (%) by TLC, bn=3.

[<sup>18</sup>F]FHBG를 합성하여 사용하였다. 이때의 방사화학적 수율은 20-25%(corrected for decay)이었고 방사화학적 순도는 95% 이상이었다. 비방사능은 55.0 GBq/μmol 이상이었다. 역상 HPLC 정제시 머무름 시간은 약 16-18분이었으며 얻어진 [<sup>18</sup>F]FHBG를 기준 authentic FHBG와 동일 주입함으로써 같은 물질임을 확인하였다.(Fig. 4)

## 3. [<sup>18</sup>F]FHBG의 세포내 섭취기전

### 1) 세포주에서의 [<sup>18</sup>F]FHBG 섭취율 실험

*HSV1-tk* 유전자가 이입되지 않은 MCA 세포주의 경우 [<sup>18</sup>F]FHBG의 최대 섭취율이 0.05% ID로서 세포내로의 FHBG 집적이 아주 적은 것으로 나타나 동물세포의 thymidine kinase에 의한 [<sup>18</sup>F]FHBG 비특이적 인산화가 거의 발생하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이에 반해 *HSV1-tk* 유전자가 이입된 MCA-tk 세포주의 경우에는 상대적으로 증가된 섭취율을 보임으로써 이입된 *HSV1-tk* 유전자로 인해 생성된 HSV1-TK효소에 의해 FHBG가 인산화되어 세포 밖으로 빠져나가지 못하고 집적되는 것을 확인할 수 있었다.

MCA-tk 세포주에서의 [<sup>18</sup>F]FHBG 섭취율은 10분, 30분, 60분, 120분, 180분에서 각각 0.36% ID, 1.04% ID, 2.32% ID, 4.21% ID, 6.30% ID 이었으며,(Fig. 5A) 같은 시간대의 MCA 세포주의 섭취율에 비하여 각각 13배, 20배, 50배, 107배, 134배의 증가된 섭취율을 보였다.(Fig. 5B)

### 2) 섭취된 [<sup>18</sup>F]FHBG의 방출 실험

세포에 섭취된 [<sup>18</sup>F]FHBG가 시간이 경과함에 어느 정도 세포내에 잔류 하는지를 평가하기 위해 방출실험을 실시하였다. MCA 세포주의 경우에는 [<sup>18</sup>F]FHBG에 의한 섭취율 차체가 평가를 할 수 없을 만큼 미미하였기 때문에 방출실험이 분석대상에서는 제외하였다. [<sup>18</sup>F]FHBG를 2시간 동안 섭취시킨 MCA-tk 세포주를 PBS로 세척하여 배지에 남아 있는 [<sup>18</sup>F]FHBG를 제거하고 DMEM에서 시간대 별로 추가로 배양하여 방출되지 않고 잔류하는 방사능을 측정된 결과 0분, 10분, 20분, 30분, 60분에서 각각 0.784% ID, 0.713% ID,

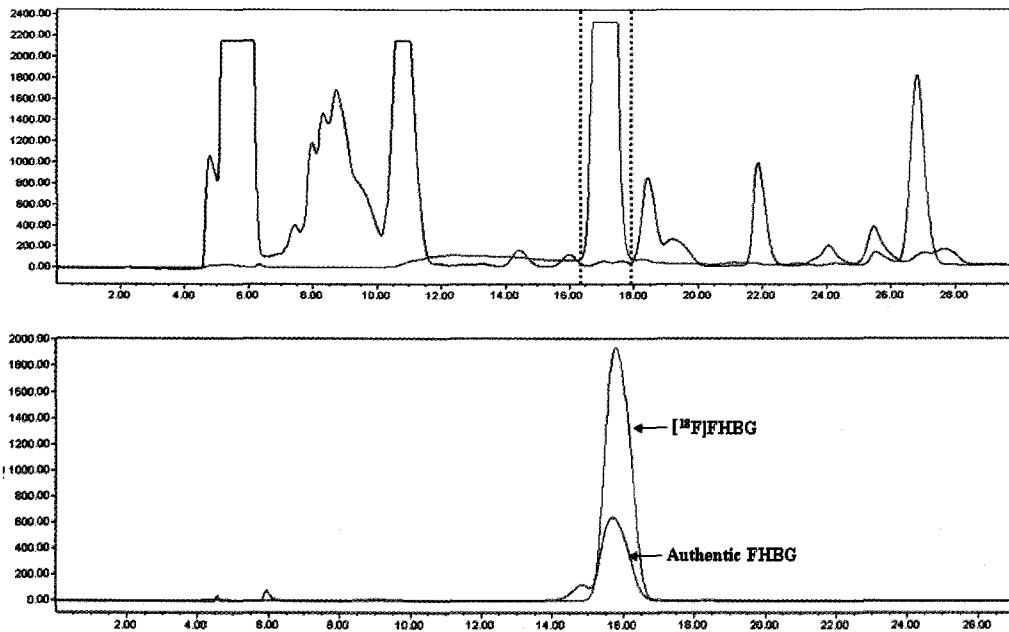


Fig. 4. HPLC profile of [<sup>18</sup>F]FHBG (up: HPLC purification of reaction mixture, Waters Xterra C18, flow rate: 2.0 mL/min, eluant: 0 min (5%) to 25 min (15%) CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O; down: co-injection of [<sup>18</sup>F]FHBG and authentic FHBG).

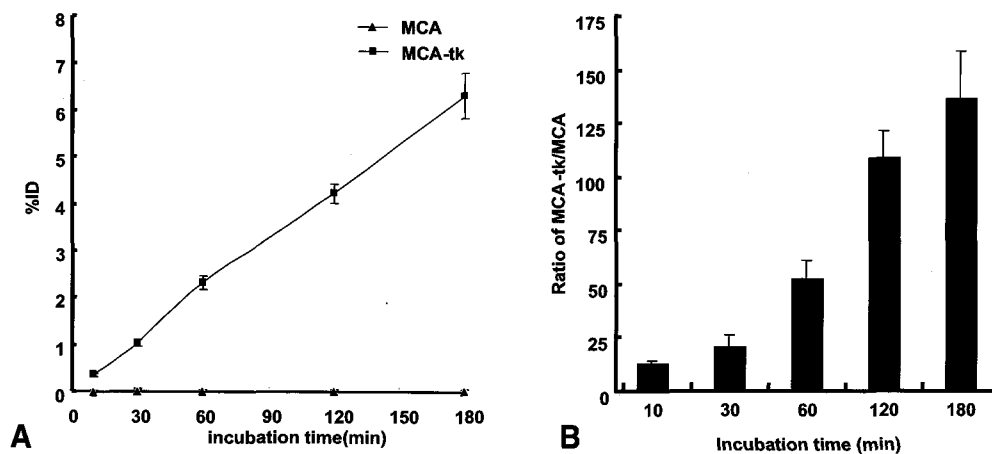


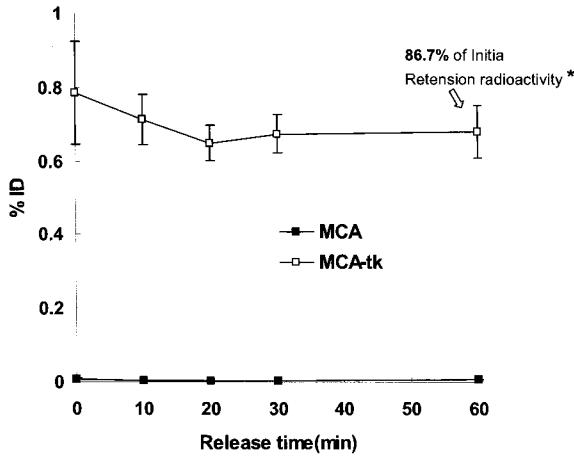
Fig. 5. *In vitro* cellular uptake results (A) *In vitro* cellular uptake of [<sup>18</sup>F]FHBG versus incubation time in MCA and MCA-tk cells. (B) Ratio of MCA-tk and MCA. Specific accumulation of [<sup>18</sup>F]FHBG showed in MCA-tk cell.

0.650% ID, 0.675% ID, 0.681% ID로 나타났고, 0분과 60분 배양의 결과를 비교했을 때 섭취된 방사능의 86% 이상이 잔류하는 것으로 확인되었다.(Fig. 6)

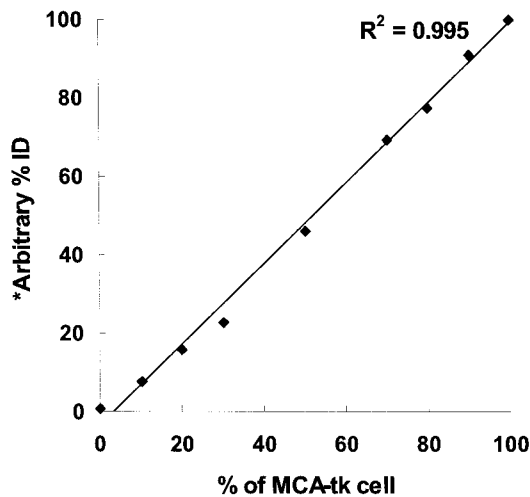
3) *HSV1-tk* 발현 세포의 백분율에 따른 섭취율 상관도 실험  
 생체 영상에 있어서 *HSV1-tk* 유전자의 발현량과 취득 영상의 강도 간에 직선적인 상관관계를 보이는지를 평가하기 위한 간접적인 방법으로 전체 세포 수에서 *HSV1-tk* 유전자가 발현된 MCA-tk 세포수의 백분율 증가에 따른

[<sup>18</sup>F]FHBG 섭취율과의 상관관계를 시험관 실험으로 확인하였다. *HSV1-tk* 유전자가 이입된 세포수의 증가에 따라서 [<sup>18</sup>F]FHBG 섭취율의 증가를 관찰하였으며 이때의 상관관계는 직선성( $R^2=0.995$ )을 보였다.(Fig. 7)

4. 종양 동물모델에서 [<sup>18</sup>F]FHBG의 microPET 영상  
 생체모델에서 [<sup>18</sup>F]FHBG를 기질로 이용하여 목적부위의 *HSV1-tk* 유전자 발현을 영상으로 평가할 수 있는지 확인하기 위하여 시험관 세포주 실험상에서 *HSV1-tk* 유전자가 발



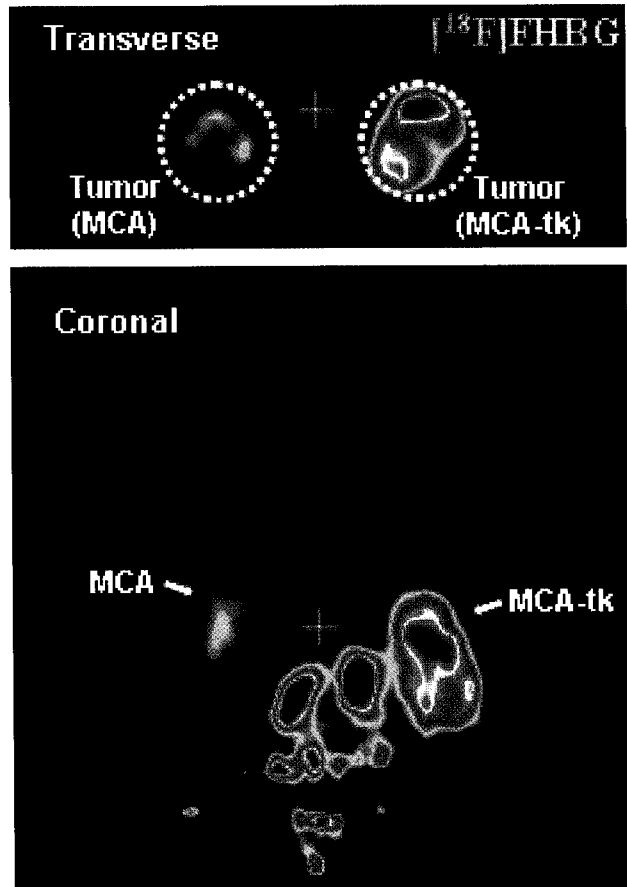
**Fig. 6.** Release out rate of [<sup>18</sup>F]FHBG after specific accumulation in MCA-tk cells. \**P*>0.05 for difference of retention radioactivity between 0 min (initial) and 60 min release-out.



**Fig. 7.** Correlation between MCA-tk cell number percentage and total cellular uptake of [<sup>18</sup>F]FHBG. \*Arbitrary % ID unit was calculated by (the cellular uptake of [<sup>18</sup>F]FHBG in each MCA-tk %/cellular uptake of [<sup>18</sup>F]FHBG in MCA-tk 100%) × 100.

현된 세포에서만 특이적으로 섭취되는 결과를 보인 [<sup>18</sup>F]FHBG를 기질로 이용하고 좌우 측부에 각각 MCA 세포와 MCA-tk 세포를 피하로 주사하여 종양을 형성시킨 한 마리의 Balb/c nude mouse 동물모델에서 microPET 생체영상을 평가하였다.

[<sup>18</sup>F]FHBG 300 μ Ci를 꼬리정맥을 통해 주사 후 120분에서의 횡단면 영상을 재구성하여 확인한 결과 *HSV1-tk* 유전자가 발현된 MCA-tk 종양의 경우에서 [<sup>18</sup>F]FHBG 특이적 섭취가 이루어진 것을 확인하였다. 관상면 영상에서 역시 MCA-tk 종양에 [<sup>18</sup>F]FHBG의 특이적인 집적이 관찰되었



**Fig. 8.** MicroPET image of [<sup>18</sup>F]FHBG at 120 min in a nude mouse bearing both MCA and MCA-TK tumors. Transverse (up) and coronal (down) microPET imaging showed *HSV1-tk* reporter gene specific [<sup>18</sup>F]FHBG accumulation.

으며, (Fig. 8) 배출경로가 되는 위장관부위에서 열소(hot spot)가 관찰되었으며 신장으로의 배출을 확인할 수 있었다.

이러한 결과로서 생체에서 *HSV1-tk* 유전자 발현을 확인하기 위하여 비침습적 microPET을 이용한 생체영상을 취득하고자 할 때 [<sup>18</sup>F]FHBG가 충분히 유용한 기질로 이용될 수 있음을 확인하였다.

## 고 찰

본 연구에서는 9-(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG)를 합성하고 Morris hepatoma 세포주인 MCA 세포와 이 세포주에 *HSV1-tk*를 보고 유전자로 이입한 MCA-tk 세포를 이용하여 세포내의 섭취율 실험과 방출실험, 세포수 백분율 증가에 따른 섭취율 변화실험 등을 진행하였다. 또한 생체 내에서의 유용성 평가를 위해 실험종양 형성 Balb/c nude mice 동물모델을 통한 microPET 생체



영상을 시도함으로써 보고 유전자 기질로서의 [<sup>18</sup>F]FHBG의 유용성을 평가하고자 하였다.

본 연구에 사용된 보고유전자 발현의 영상기법은 HSV1-tk 유전자가 보고 유전자 또는 직접 치료 유전자로 사용되었을 때 이것이 생성하는 viral TK 효소가 동물세포의 TK와는 다르게 넓은 기질 특이성을 보이는 점에 착안하여 티미딘과 유사한 구조를 가지는 물질을 기질로 이용하고 여기에 방사성동위원소를 표지하여 생체에 투여하면 유전자 발현에 의해 생성된 HSV1-tk가 방사성동위원소가 표지된 기질을 인산화하여 세포내에 축적시킴으로써 이를 영상화한다는 원리를 이용한 것이다.

본 연구에 사용된 [<sup>18</sup>F]FHBG는 triester로부터 7 단계의 과정의 과정을 거쳐 penciclovir tosylate (9) 전구체를 합성하였으며, F-18 용액과 전구체를 이용한 [<sup>18</sup>F]FHBG의 방사화학적 수율은 약 20-25%이었고 분리 정제된 [<sup>18</sup>F]FHBG의 방사화학적 순도는 95% 이상, 비방사능은 >55.0 GBq/ $\mu$ mol이었다.

유전자 발현을 확인하기 위한 RT-PCR에서 MCA 세포주와 MCA-tk 세포주 모두에서 internal control로 사용된 GAPDH 증폭산물인 983 bp의 검출되었고 MCA-tk 세포주에서는 HSV1-tk 특이적인 primer에 의한 290 bp의 증폭산물이 검출되어 유전자 발현이 안정적으로 이루어지고 있음을 확인하였다.

MCA 세포주에서의 [<sup>18</sup>F]FHBG 섭취율은 MCA-tk 세포주에 비해 매우 낮았으며 시간대별 섭취율은 10분, 30분, 60분, 120분에서 각각 13, 20, 51, 107로 나타나 HSV1-tk 유전자가 이입되어 viral TK가 생성된 MCA-tk 세포 주에서만 [<sup>18</sup>F]FHBG가 인산화되어 세포내에 특이적으로 집적되는 것으로 확인되었다.

MCA와 MCA-tk 세포주를 이용한 [<sup>18</sup>F]FHBG의 섭취율 비교 실험에서 2 시간 섭취 후의 결과에서 MCA-tk가 MCA 세포에 비해 107 배나 높은 섭취율을 보였다. 이러한 결과는 HT-29 사람 대장암 세포주와 HSV1-tk 유전자를 이입한 세포에서 같은 시간대의 섭취율을 비교했을 때 5 배의 차이를 보인 결과<sup>15)</sup>와 랫드의 신경교종세포에서 40 배의 섭취율 차이를 보인 연구결과<sup>14)</sup>에 비하여 상당히 높은 수준이었는 데 이러한 차이는 실험에 사용된 세포주의 특이성 때문으로 생각된다.

MCA-tk 세포주 백분율 증가에 따른 섭취율 평가에서는 세포수의 증가에 따라 [<sup>18</sup>F]FHBG의 섭취율이 직선성 ( $R^2=0.995$ )을 보이며 증가하는 것으로 나타나 세포내 섭취율 증가가 보고 유전자의 발현량을 잘 반영할 수 있을 것으로 생각된다.

FHBG는 uracil nucleoside 계열의 유도체인 FIAU(2'-fluoro-2'-deoxy-1- $\beta$ -D-arabino-furanosyl-5-iodouracil)와 함께 최초로 임상에 적용될 가능성이 많은 물질이다<sup>21)</sup>. 최근의 여러 연구에서 FHBG와 FIAU의 비교를 통하여 어떤 기질이 더 우수한가를 평가하려는 시도가 있었는데 주로 [<sup>14</sup>C]FIAU, [<sup>124</sup>I]FIAU등의 기질이 [<sup>18</sup>F]FHBG 보다 세포내의 섭취율이 보다 좋은 것으로 나타났다<sup>6)</sup>. 그러나 FIAU의 경우 동물세포의 thymidine kinase에 대한 친화력 역시 FHBG 보다 좋은 것으로 나타나 실제 영상에서는 HSV1-tk 유전자 발현부위와 대조부위의 영상이 큰 차이를 보이지 않는다는 보고가 있었으며, acycloguanosine에 좀더 친화력을 강하게 하고 동물세포의 thymidine에는 친화력을 약화시킨 변형 유전자인 HSV1-sr39tk를 사용함으로써 FHBG의 섭취율을 더욱 높일 수 있는 방법이 보고 되었고<sup>3)</sup>, HSV1-tk 유전자가 전달되는 방식에 따라 세포주에 이미 유전자가 안정적으로 이입되어 있는 경우에는 FIAU가 더 섭취율이 높지만 실제 유전자 치료시에 사용하게 되는 조건인 아데노 바이러스 벡터를 이용하여 유전자를 전달한 경우에는 FHBG의 섭취율이 더욱 높았다는 결과가 보고되었다<sup>7)</sup>.

[<sup>18</sup>F]FHBG의 microPET 생체영상 결과 MCA 종양은 방사능의 집적이 관찰되지 않는 반면 MCA-tk 종양은 국소적인 집적을 보여주어 microPET을 이용한 반복적이며 비침습적 생체영상에서도 유용하게 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로서 간암 세포 주에서 HSV1-tk 보고 유전자의 발현을 비침습적이며 반복적으로 PET 영상을 획득하기 위한 동위원소 표지 기질로서 [<sup>18</sup>F]FHBG가 매우 유용할 것으로 기대된다.

## 요 약

**목적:** 헤르페스 심플렉스 1형 바이러스 티미딘 키나제 (Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: HSV1-tk) 유전자는 보고 유전자로서 필요한 조건뿐만 아니라 별도의 치료 유전자를 따로 이입할 필요가 없다는 장점을 가지고 있어 유전자 영상과 치료에서 가장 널리 사용되는 유전자이다. 본 연구에서는 간암세포주에서 HSV1-tk 보고 유전자 발현을 비침습적 PET 영상으로 평가하는데 있어서 9-(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG)의 유용성을 평가하고자 하였다. **대상 및 방법:** [<sup>18</sup>F]FHBG는 triester로부터 8 단계를 거쳐 합성하였다. [<sup>18</sup>F]FHBG는 전구체로 N2-monomethoxytrityl-9-[4-(tosyl)-3-monomethoxytritylmethylbutyl]guanine를 사용하고 kryptofix

[2.2.2.]를 이용한 친핵성 반응으로 120°C에서 20분 동안 반응한 후에 1 N HCl로 보호기를 제거함으로써 합성하였다. HSV1-tk 보고 유전자가 이입되어 있는 세포주인 MCA-tk와 이입되지 않은 MCA 세포주를 이용하여 *in vitro* 상에서의 [<sup>18</sup>F]FHBG의 섭취 및 방출 실험을 실시하였으며 섭취량과 방출량의 상관성 평가를 위해 세포수 백분율에 따른 섭취 실험을 실시하였다. *In vivo* 상에서의 평가를 위하여 피하 종양 형성 동물모델을 이용하여 microPET 생체영상을 획득하였다. **결과:** 합성된 [<sup>18</sup>F]FHBG를 역상 HPLC를 사용하여, 머무름 시간 16-18분에서 분리하였다. 반감기를 고려한 방사화학적 수율은 20-25%, 방사화학적 순도는 95% 이상이었으며 비방사능은 55.0 GBq/ $\mu$  mol 이상이었다. HSV1-tk 유전자가 이입된 MCA-tk 세포에서는 특이적인 [<sup>18</sup>F]FHBG의 집적이 발생하였으며 대조군인 MCA에서는 거의 집적이 이루어지지 않았다. 또한, 방출 실험에서 방출 후 1시간 경과까지 86% 이상의 [<sup>18</sup>F]FHBG가 세포내에 잔류하였다. MCA-tk 세포주의 비율이 증가함에 따라 [<sup>18</sup>F]FHBG의 섭취량도 직선적 상관관계 ( $R^2=0.995$ )에 따라 증가하여 기질의 섭취량이 유전자 발현량을 잘 반영하고 있음이 확인되었다. MicroPET을 이용한 생체영상에서도 MCA와 MCA-tk에서 확인한 집적의 차이를 보여주었다. **결론:** 간암세포주에서 HSV1-tk 유전자의 발현 정도와 지속성 그리고 위치를 확인하기 위한 비침습적 PET 영상을 위한 기질로서 [<sup>18</sup>F]FHBG는 매우 유용할 것으로 기대된다.

## References

- Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR, Phelps ME. Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. *Nucl Med Biol* 1999;26:481-90.
- Iyer M, Barrio JR, Namavari M, Bauer E, Satyamurthy N, Nguyen K. et al. 8-[<sup>18</sup>F]Fluoropenciclovir: an improved reporter probe for imaging HSV1-tk reporter gene expression in vivo using PET. *J Nucl Med* 2001;42:96-105.
- Gambhir SS, Bauer E, Black ME, Liang Q, Kokoris MS, Barrio JR. et al. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2785-90.
- Alauddin MM, Conti PS, Mazza SM, Hamzeh FM, Lever JR. 9-[(3-[<sup>18</sup>F]Fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([<sup>18</sup>F]FHPG): a potential imaging agent of viral infection and gene therapy using PET. *Nucl Med Biol* 1996;23:787-92.
- Alauddin MM and Conti PS. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG): A new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET. *Nucl Med Biol* 1998;25:175-80.
- Tjuvajev JG, Doubrovin M, Akhurst T, Cai S, Balatoni J, Alauddin MM, Finn R, Bornmann W, Thaler H, Conti PS, Blasberg RG. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG and FHPG) for PET imaging of HSV1-tk gene expression. *J Nucl Med* 2002;43:1072-83.
- Min JJ, Iyer M, Gambhir SS. Comparison of [<sup>18</sup>F]FHBG and [<sup>14</sup>C]FIAU for imaging of HSV1-tk reporter gene expression: adenoviral infection vs stable transfection. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:1547-60.
- Tjuvajev JG, Finn R, Watanabe K, Joshi R, Oku T, Kennedy J. et al. Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy. *Cancer Res* 1996;56:4087-95.
- Tjuvajev JG, Avril N, Oku T, Sasajima T, Miyagawa T, Joshi R. et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. *Cancer Res* 1998; 58:4333-41.
- Tjuvajev JG, Chen SH, Joshi A, Joshi R, Guo ZS, Balatoni J. et al. Imaging adenoviral-mediated herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression in vivo. *Cancer Res* 1999;59:5186-93.
- Tovell DR, Samuel J, Mercer JR, Misra HK, Xu L, Wiebe LI. et al. The *in vitro* evaluation of nucleoside analogues as probes for use in the noninvasive diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Drug Des Deliv* 1988;3:213-21.
- Bading JR, Shahinian AH, Bathija P, Conti PS. Pharmacokinetics of the thymidine analog 2-fluoro-5-[<sup>14</sup>C]methyl-1-beta-D-arabino-furanosyluracil ([<sup>14</sup>C]FMAU) in rat prostate tumor cells. *Nucl Med Biol* 2000;27:361-8.
- Morin KW, Atrazheva ED, Knaus EE, Wiebe LI. 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 thymidine kinase gene: evaluation as probes for monitoring gene therapy. *J Med Chem* 1997;40:2184-90.
- Buursma AR, Rutgers V, Hospers GA, Mulder NH, Vaalburg W, de Vries EF. <sup>18</sup>F-FEAU as a radiotracer for herpes simplex virus thymidine kinase gene expression: in-vitro comparison with other PET tracers. *Nucl Med Commun* 2006;27:25-30.
- Alauddin MM, Shahinian A, Gordon EM, Bading JR, Conti PS. Preclinical evaluation of the penciclovir analog 9-(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine for in vivo measurement of suicide gene expression with PET. *J Nucl Med* 2001;42:1682-90.
- Harden MR, Jarvest RL. An improved synthesis of the antiviral acyclonucleoside 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine. *Tetrahedron Lett* 1985;26:4265-8.
- Harden MR, Jarvest RL, Bacon TH, Boyd MR. Synthesis and antiviral activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)purines. *J Med Chem* 1987;30:1636-42.
- Wang JW, Zheng QH, Fei X, Mock BH, Hutchins GD. Novel radiosynthesis of PET HSV-tk gene reporter probes [<sup>18</sup>F]FHPG and [<sup>18</sup>F]FHBG employing dual sep-pak SPE techniques. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:3933-8.
- Shiue GG, Shiue CY, Lee RL, MacDonald D, Hustinx R, Eck SL, Alavi AA. A simplified one-pot synthesis of 9-[(3-[<sup>18</sup>F]fluoro-1-hydroxy-2-propoxy)methyl]guanine ([<sup>18</sup>F]FHPG and 9-(4-[<sup>18</sup>F]fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([<sup>18</sup>F]FHBG) for gene therapy. *Nucl Med Biol* 2001;28:875-83.
- Ponde DE, Dence CS, Schuster DP, Welch MJ. Rapid and reproducible radiosynthesis of [<sup>18</sup>F]FHBG. *Nucl Med Biol* 2004;31: 133-8.
- Yaghoubi S, Barrio JR, Dahlbom M, Iyer M, Namavari M, Satyamurthy N, et al. Human pharmacokinetic and dosimetry studies of [<sup>18</sup>F]FHBG: a reporter probe for imaging herpes simplex virus type-1 thymidine kinase reporter gene expression. *J Nucl Med* 2001;42:1225-34.