

## 간암 동물 모델에서

# 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuranosyl-5-[<sup>124</sup>I]iodo-uracil ([<sup>124</sup>I]FIAU) 소동물 PET 영상 연구

원자력의학원 핵의학과<sup>1</sup>, 분자영상연구부<sup>2</sup>, 울산의과대학교 서울아산병원 핵의학과<sup>3</sup>  
채민정<sup>1,3</sup> · 이태섭<sup>2</sup> · 김준엽<sup>2</sup> · 우광선<sup>2</sup> · 정위섭<sup>2</sup> · 전권수<sup>2</sup> · 김재홍<sup>2</sup> · 이지섭<sup>2</sup> · 류진숙<sup>3</sup>  
천기정<sup>1,2</sup> · 최창운<sup>1,2</sup> · 임상무<sup>1,2</sup>

## Small Animal PET Imaging with [<sup>124</sup>I]FIAU for Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase Gene Expression in a Hepatoma Model

Min Jeong Chae, M.D.<sup>1</sup>, Tae Sup Lee, Ph.D.<sup>2</sup>, June Youp Kim, M.S.<sup>2</sup>, Gwang Sun Woo, BA<sup>2</sup>,  
Wee Sup Jung<sup>2</sup>, Kwon Soo Chun, Ph.D.<sup>2</sup>, Jae Hong Kim<sup>2</sup>, Ji Sup Lee<sup>2</sup>, Jin-Sook Ryu, M.D. & Ph.D.<sup>3</sup>,  
Gi Jeong Cheon, M.D. & Ph.D.<sup>1,2</sup>, Chang Woon Choi, M.D. & Ph.D.<sup>1,2</sup> and Sang Moo Lim, M.D. & Ph.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Nuclear Medicine and <sup>2</sup>Molecular Imaging Research Center, Korea Institute of Radiological and Medical Sciences, Seoul, Korea; <sup>3</sup>Department of Nuclear Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea.

**Purpose:** The HSV1-tk gene has been extensively studied as a type of reporter gene. In hepatocellular carcinoma (HCC), only a small proportion of patients are eligible for surgical resection and there is limitation in palliative options. Therefore, there is a need for the development of new treatment modalities and gene therapy is a leading candidate. In the present study, we investigated the usefulness of substrate, 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabino-furanosyl-5-[<sup>124/125</sup>I]iodo-uracil ([<sup>124/125</sup>I]FIAU) as a non-invasive imaging agent for HSV1-tk gene therapy in hepatoma model using small animal PET. **Material and Methods:** With the Morris hepatoma MCA cell line and MCA-tk cell line which was transduced with the HSV1-tk gene, in vitro uptake and correlation study between [<sup>125</sup>I]FIAU uptake according to increasing numeric count of percentage of MCA-tk cell were performed. The biodistribution data and small animal PET images with [<sup>124</sup>I]FIAU were obtained with Balb/c-nude mice bearing both MCA and MCA-tk tumors. **Results:** Specific accumulation of [<sup>125</sup>I]FIAU was observed in MCA-tk cells but uptake was low in MCA cells. Uptake in MCA-tk cells was 15 times higher than that of MCA cells at 480 min. [<sup>125</sup>I]FIAU uptake was linearly correlated (R<sup>2</sup>=0.964, p=0.01) with increasing percentage of MCA-tk numeric cell count. Biodistribution results showed that [<sup>125</sup>I]FIAU was mainly excreted via the renal system in the early phase. Ratios of MCA-tk tumor to blood acting were 10, 41, and 641 at 1 h, 4 h, and 24 h post-injection, respectively. The maximum ratio of MCA-tk to MCA tumor was 192.7 at 24 h. Ratios of MCA-tk tumor to liver were 13.8, 66.8, and 588.3 at 1 h, 4 h, and 24 h, respectively. On small animal PET, [<sup>124</sup>I]FIAU accumulated in substantial higher levels in MCA-tk tumor and liver than MCA tumor. **Conclusion:** FIAU shows selective accumulation to HSV1-tk expressing hepatoma cell tumors with minimal uptake in normal liver. Therefore, radiolabelled FIAU is expected to be a useful substrate for non-invasive imaging of HSV1-tk gene therapy and therapeutic response monitoring of HCC. (Nucl Med Mol Imaging 2008;42(3):235-245)

**Key Words:** FIAU, HSV1-tk, Small animal PET, HCC

- Received: 2007. 11. 28. • Accepted: 2008. 2. 8.
- Address for reprints: Gi Jeong Cheon M.D. & Ph.D., Molecular Imaging Research Center, 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 연구 개발 사업의 연구비 지원으로 이루어졌음. (과제번호: M20702010000-07N0201-0000)

## 서 론

간암(hepatocellular carcinoma)은 세계적으로 우리나라를 포함한 아시아와 아프리카의 일부 지역에 대다수가 분포하고 있으며 B, C형간염이 진행된 간경화와 연관되어 있고 서구에서도 증가하는 추세에 있다. 간암은 그 진단과 치료에

많은 어려움을 겪고 있으며 치사율 또한 매우 높다.<sup>1)</sup> 간암의 치료는 근치적 절제술이 가장 중요한 치료법으로 알려져 있으나 수술이 가능한 경우는 작은 크기의 암으로 원격전이가 없는 환자에서 간 기능이 정상이어야 한다. 그러나 대개의 간암의 경우 간경화 등 간 실질내의 미만성 질환이 동반되어 소수에서만 근치적 치료를 받을 수 있다. 수술적 절제가 어려운 경우 보존적 치료인 국소적 항암제나 에탄올을 주입법, 고주파 절제술 등은 잦은 재발로 치료에 한계를 보여 새로운 근치적 치료의 개발이 요구된다. 그러나 이러한 보존적 치료는 잦은 재발이라는 한계점을 갖고 있어 보다 근본적인 대체적 치료법이 강구되어야 하는 실정이다. 이러한 근치적 대체 치료로써 유전자 치료가 기대되고 있다.

이에 *HSV1-tk*를 비롯한 자살 유전자 치료가 여러 간암 동물 모델에서 수행되어 그 효능이 입증 되었고,<sup>1-4)</sup> 인간에서도 *HSV1-tk*를 이용한 자살 유전자 치료가 시도 되어 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 유전자 치료에 있어 치료 유전자가 잘 이입되어 발현하고 있는지 평가할 수 있는 보고 유전자 시스템이 필요불가결한 요소이다.

*HSV1-tk*는 자살 유전자인 치료유전자 뿐 아니라 보고 유전자로 가장 널리 연구되고 있는 유전자이다. 그것은 이 유전자가 기질의 다양성을 보여 pyrimidine 유도체 뿐만 아니라 purine 유도체들도 인산화 할 수 있기 때문이다.<sup>5-7)</sup> 바로 이 기질의 다양성이 *HSV1-tk*를 이용한 자살 유전자 치료의 가장 중요한 분자적 기초가 된다. 이러한 특성 때문에 암의 유전자 치료뿐만 아니라 보고 유전자와 항바이러스 치료에서 다양하게 응용되고 있다.<sup>8-10)</sup> *HSV1-tk*를 이용한 유전자 치료에서 유전자 치료제의 표적화, 전달된 유전자의 발현 정도, 범위 등에 대한 핵의학적 영상을 통하여 보다 효과적인 유전자 치료가 가능하므로 최근에는 다양한 핵의학 영상기법을 위하여 각 기기들에 적용 가능한 기질들이 개발되고 있다.

*HSV1-tk* 보고 유전자 시스템에서 사용되는 기질로서 지금까지 보고된 것들을 크게 두 가지로 구분 할 수 있다. 첫 번째 그룹에는 pyrimidine (uracil) nucleoside 유도체로서, 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabino-furanosyl-5-iodouracil (FIAU),<sup>11)</sup> 2'-Fluoro-2'-deoxy- 5-iodo-1-β-D-ribofuranosyl uracil (FIRU),<sup>12)</sup> 2'-fluoro-2'-deoxy-5-methyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil (FMAU),<sup>13)</sup> 2'-fluoro-2'-deoxy-5-iodo-vinyl-1-β-D-ribofuranosyluracil (IVFRU)<sup>14)</sup> 등과, 두 번째 그룹인 purine (acycloguanosine) 유도체에는 8-fluoro-9-[(2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-ethoxymethyl)guanine (FGCV),<sup>15)</sup> 8-fluoro-9-[(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl) buthyl)] guanine (FPCV),<sup>16)</sup> 9-[3-fluoro-1-hydroxy-2-propoxy-

methyl]guanine (FHPG),<sup>17)</sup> 와 9-[4- fluoro-3-(hydromethyl)butyl]guanine (FHBG)<sup>18)</sup> 등이 있다. 이 두 그룹의 물질들에 모두 보고 표식자가 인산화되어 세포내에 저류시킨다는 공통점을 가지고 있다.

많은 연구결과에서 다양한 형태의 pyrimidine 유도체인 FIAU, FIRU 그리고 FMAU 등과 purine 유도체인 FGCV, FHPG, 그리고 FHBG 등이 *HSV1-tk* 유전자 핵의학 영상에 높은 특이도와 민감도를 보인다고 하였다. 그러나 최근의 연구결과에서는 pyrimidine nucleoside 유도체인 FIAU와 FMAU등이 *HSV1-tk* 유전자가 안정적으로 유전자가 이입되어 발현하는 세포의 시험관 섭취율 시험과 생체영상에서 purine 유도체인 FHBG와 FHPG보다 훨씬 더 높은 특이적인 방사능의 집적이 확인되는 것으로 보고되었다.<sup>13,19)</sup> 또한, 기존의 보고에서<sup>20,21)</sup> purine (acycloguanosine) 유도체인 FHBG는 소동물 양전자 방출 단층 촬영(positron emission tomography, PET) 영상에서 간과 주변 위장관부위에 열소가 관찰되어 간암 및 위장관계 종양의 유전자 치료를 위한 영상에는 제한점이 있을 것으로 사료된다. 이에 반해 FIAU는 주로 신장은 통해 배설되므로 간질환을 관찰하기에 유리할 것이다. 초기의 연구에서 Beck 등은<sup>22)</sup> 보고 기질인 GCV가 *HSV1-tk*를 발현정도가 비슷한 여러 세포주에서 매우 다른 감수성을 보임을 발견하면서 세포주마다 그 세포주에 특이적인 기질 전달체계를 가지고 있음을 발견하였다.<sup>23-25)</sup> 지금까지의 연구에서 간암 세포주를 이용한 세포실험은 드물게 있었으나 동물모델은 매우 드문 상황이어서 간암 세포주에서 FIAU의 섭취율과 동물 모델을 이용한 생체분포의 평가 및 검증이 요구되는 실정이었다.

따라서, 저자들은 간암 동물 모델에서 *HSV1-tk* 보고 유전자 발현을 평가하는 핵의학 영상법을 확립하고자 FIAU를 보고기질로 사용하여 Buffalo 랫트의 간암세포에 *HSV1-tk* 유전자가 안정적으로 발현하게 하여 소동물 PET 영상을 이용한 보고 유전자의 발현영상을 구현하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재료

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution과 NaHSO<sub>3</sub>는 Aldrich사의 제품을, trypan blue solution, 10 mM phosphate buffer은 미국 Sigma사의 제품을, diethyl ether는 미국 Tedia사의 제품을 사용하였다.

Na<sup>125</sup>I는 미국 Perkin-Elmer사로부터 구입하였으며, Na<sup>124</sup>I은 한국 원자력의학원의 50 MeV 싸이클로트론으로 생산한 것을 사용하였다. 5-Tributylstannyl-1-(2-deoxy-2-fluoro-β-d-arabinofuranosyl) uracil (FTAU) 전구체는 Futurechem

사로부터 구입하여 사용하였다.

고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 미국 Waters사의 제품을 이용하였으며, 컬럼은 μ-Bondapak C-18을 사용하였고 흡광도를 측정은 Waters 486 absorbance detector를 사용하고, 방사능 측정은 독일 Raytest사의 GABI RI detector를 이용하여 방사능을 계측하였다.

Trypsin-EDTA, Dulbecco's modified eagle medium은 미국 Gibco사 제품을 사용하였으며, 세포배양 접시는 미국 Corning사 제품을 사용하였고, fetal bovine serum은 미국 Biowhittaker사 제품을 사용하였다.

MCA-RH7777 (MCA) 세포주는 미국 American type culture collection로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위한 항온 항습기는 미국 Forma scientific사의 water jacket 3250 모델을 사용하였다.

실험동물로는 specific pathogen free (SPF) grade의 Balb/c-nu/nu를 Japan SLC Inc.사로부터 구입하여 사용하였다

방사능을 측정하기 위하여 우물 형태의 NaI crystal을 가진 감마카운터를 미국 Wallac Wizard사 제품을 사용하였으며, 핵 영상은 소동물 전용 PET을 이용하여 획득하였으며 Concorde Microsystems Inc.사의 microPET R4 장비를 이용하였다. 생체영상과 해부학적인 위치를 비교 평가하기 위하여 사용한 전신 동결 박절기(Autocryotome)는 일본의 Nakagawa Seisakusho사 제품을 사용하였다.

## 2. 방사성 요오드 표지 핵산 유도체인 FIAU의 제조

5-Tributylstannyl-1-(2-deoxy-2-fluoro-β-d-arabinofuranosyl) uracil (FTAU) 전구체로부터 5-<sup>125/124</sup>I-iodo-1-(2'-deoxy-2-fluoro-β-D-arabino-furanosyl) uracil ([<sup>125/124</sup>I]FIAU)가 제조되었다 (Fig. 1). 5-Tributylstannyl-1-(2-deoxy-2-fluoro-β-d-arabinofuranosyl) uracil (FTAU) 15 μg을 20 μl의 ethanol에 녹여서 eppendorf tube에 넣고 Na<sup>125</sup>I (Perkin-Elmer, UK) 또는 Na<sup>124</sup>I (50 MeV cyclotron, KIRAMS, South Korea)를 18.5~185 MBq를 넣은 후 산화제로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:1N HCl:H<sub>2</sub>O=4:1:95 용액을 0.1 ml 첨가하고 15 분간의 반응시간동안 3 분 간격으로 vortex를 시행하여 표지반응을 수행하였다. 반응을 종료하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 중화하기 위하여 포화 NaHSO<sub>3</sub>를 0.1 ml 첨가하였다.

정제과정은 C-18 Sep-pak 카트리지(Waters, co., USA)를 사용하였다. 카트리지를 10 ml의 100% EtOH과 10 ml의 증류수를 이용하여 순차적으로 세척한 후 반응 혼합액을 증류수 1 ml을 이용하여 희석하고 이를 카트리지에 흘려준 후 10 ml의 증류수로 세척하여 반응 잔여물을 제거하고 1 ml의

100% EtOH를 이용하여 용출하고 argon 기체 하에서 건조시키고 이를 멸균 식염수로 재건하여 0.22 μm의 주사기 필터를 이용하여 여과한 후에 다음 실험에 사용하였다.

방사성 요오드가 표지된 5-[<sup>125/124</sup>I]iodo-1-(2'-deoxy-2-fluoro-β-D-arabino-furanosyl) uracil ([<sup>125/124</sup>I]FIAU)의 방사화학적 순도를 평가하기 위하여 고성능액체크로마토그래피법을 사용하였다. 컬럼은 μ-Bondapak C-18을 사용하였고, 전개용액은 증류수(용매 A)과 methanol(용매 B)를 사용하였다. 전개액을 0 분에서 5 분은 A = 100%, B = 0% 의 등속으로 전개하였고, 5 분에서 25 분은 A = 0%, B = 100%의 구배로, 25 분에서 30 분은 A = 100%, B = 0%의 구배로 전개하여 순도를 평가하였다. 물질의 분석에는 254 nm에서 흡광도를 측정하고 방사능 측정장치인 GABI RI detector를 이용하여 방사능을 계측하였다.

## 3. HSV1-tk 발현 간암세포주에서 방사성 요오드 표지 FIAU의 섭취 실험

### 1) 간암세포주에서의 섭취율 실험

HSV1-tk 유전자가 발현된 세포내에 특이적으로 방사표지 FIAU가 섭취되는지를 평가하기 위하여 시험관 섭취율 실험을 수행하였다. Morris hepatoma 세포주인 MCA와 HSV1-tk 유전자가 retrovirus에 의해서 유입된 세포주인 MCA-tk<sup>25</sup>)를 6 well plate에 well당 1×10<sup>6</sup> cell(n=3)이 되도록 seeding하고 18 시간 배양하였다. 각각의 세포에 [<sup>125</sup>I]FIAU 185 KBq을 넣은 DMEM 3 ml을 각각의 세포에 넣고 15 분, 30 분, 60 분, 120 분, 240 분, 480 분에서 각각의 세포를 trypsin-EDTA를 처리하여 떼어내었다. Cold PBS 1 ml을 이용하여 ×1,000 rpm으로 원심분리하고, 추가로 2 회 세척하여 세포내에 섭취된 방사능을 감마카운터를 이용하여 계측하여 평가하였다. 방사표지 FIAU의 섭취율은 투입된 방사능의 백분율(% ID: percentage of injected dose)로 나타내었다.

### 2) 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>125</sup>I]FIAU 섭취량의 상관관계를 평가하기 위하여 MCA-tk 세포를 전체 세포수의 0%, 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%가 되도록 MCA 세포와 혼합하고 6 well plate의 각 well 당 2×10<sup>5</sup> 개 (n=3)의 세포를 seeding 하여 DMEM 상에서 24 시간 배양하고 [<sup>125</sup>I]FIAU 1.48 MBq을 첨가하여 2 시간 동안 추가로 배양하여 섭취시킨 뒤 배지를 흡입하여 제거하였다. Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어내고 1 ml의

cold PBS로 3 회 세척하여 여액의 방사능을 제거하였다. 세포내에 섭취된 방사능을 감마카운터를 이용하여 측정 후 평가하였다.

#### 4. HSV1-tk 발현 간암세포주의 피하종양 모델에서 생체분포

종양 동물모델을 만들기 위해 MCA 세포와 HSV1-tk 유전자 이입 세포주인 MCA-tk 세포를 배양하여 trypsin-EDTA로 떼어낸 뒤 1000 rpm, 5 분간 원침 하여 상층의 배양액을 제거한 뒤 PBS로 재부유한 후 100 μl 당 각 세포가 1×10<sup>7</sup>개가 되도록 희석하여 Balb/c-nude 마우스의 좌측 옆구리에는 MCA 세포를, 우측 옆구리에는 MCA-tk 세포를 피하로 주사하고 2 주간 식이를 하면서 종양의 성장을 관찰하였다. 형성된 종양의 직경이 7 ~ 10 mm 정도인 마우스를 선별하여 ethyl ether로 마취시킨 뒤 [<sup>125</sup>I]FIAU 370 KBq (n=3)을 정맥주사하고 주사 후 1 시간, 4 시간, 24 시간 경과 후 마우스를 희생하여 혈액, 간, 폐, 비장, 신장, 위, 소장, 대장, 갑상선, 근육, 대퇴골 등의 장기와 MCA 종양, MCA-tk 종양을 적출하여 무게를 측정하고 감마카운터를 이용하여 방사능을 측정하였다. 방사능 측정 시 기기에 설정된 방사성동위원소의 에너지 창에서 측정하고 측정된 방사능을 투입된 방사능의 백분율 (% ID)로 환산하고 다시 장기 및 종양의 단위 무게 당 방사능(percentage of injected dose per gram of tissues; % ID/g)으로 환산하여 평가하였다.

#### 5. HSV1-tk 발현 피하 종양 모델에서의 소동물 PET 생체영상

종양 동물모델을 만들기 위해 MCA 세포와 HSV1-tk 유전자 이입 세포주인 MCA-tk 세포를 배양하여 trypsin-EDTA로 떼어낸 뒤 1000 rpm, 5 분간 원침 하여 상층의 배양액을 제거한 뒤 PBS로 재부유한 후 100 μl 당 각 세포가 1×10<sup>7</sup>개가 되도록 희석하여 Balb/c-nude mice의 좌측 옆구리에는 MCA 세포를, 우측 옆구리에는 MCA-tk 세포를 피하로 주사하고 2 주간 식이를 하면서 종양의 성장을 관찰하였다. 형성된 종양의 직경이 10 mm 정도인 동물 모델을 선별하여 소동물 PET 영상 평가에 이용하였다. 생체에서 deiodinase에 의한 유리 방사성요오드의 갑상선 섭취와 위로의 배출을 방지하기 위하여 [<sup>125</sup>I]FIAU를 주사하기 30 분 전에 sodium perchlorate를 25 mg/kg의 용량으로 복강내 주입하였다. 첫째 날 누드 마우스를 ethyl ether로 마취시킨 뒤 [<sup>125</sup>I]FIAU 11.1 MBq을 꼬리 정맥을 통하여 주사 후부터 2 시간 동안 연속 방출스캔을 실시한 뒤 10 분 간격으로 재구성하여 영상을 획득하였고, 4 시간과 24 시간에 각각 60 분

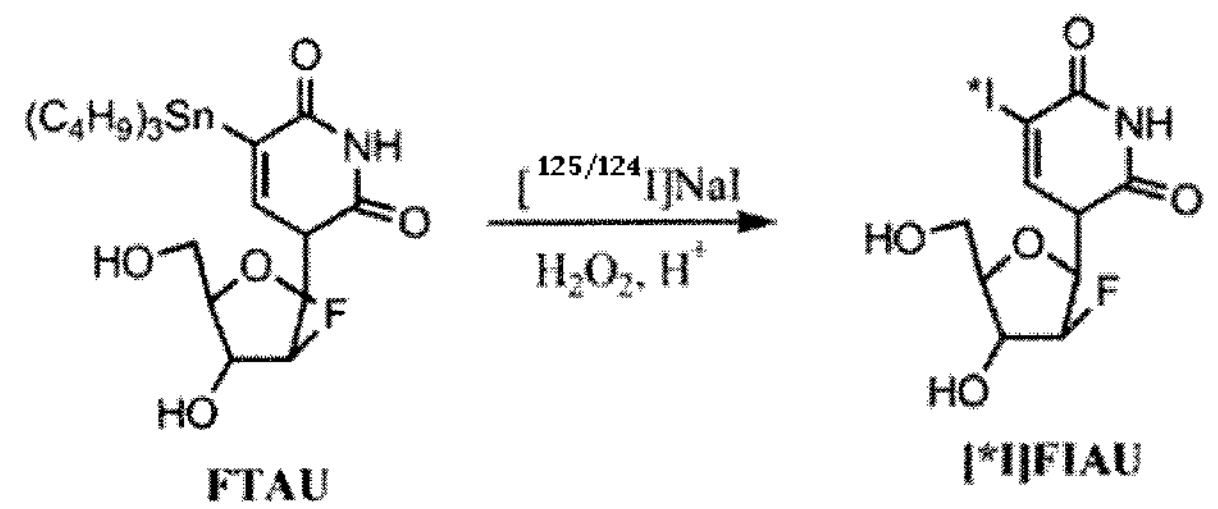


Figure 1. Scheme for preparation of [<sup>125/124</sup>I]FIAU from organotin precursor.

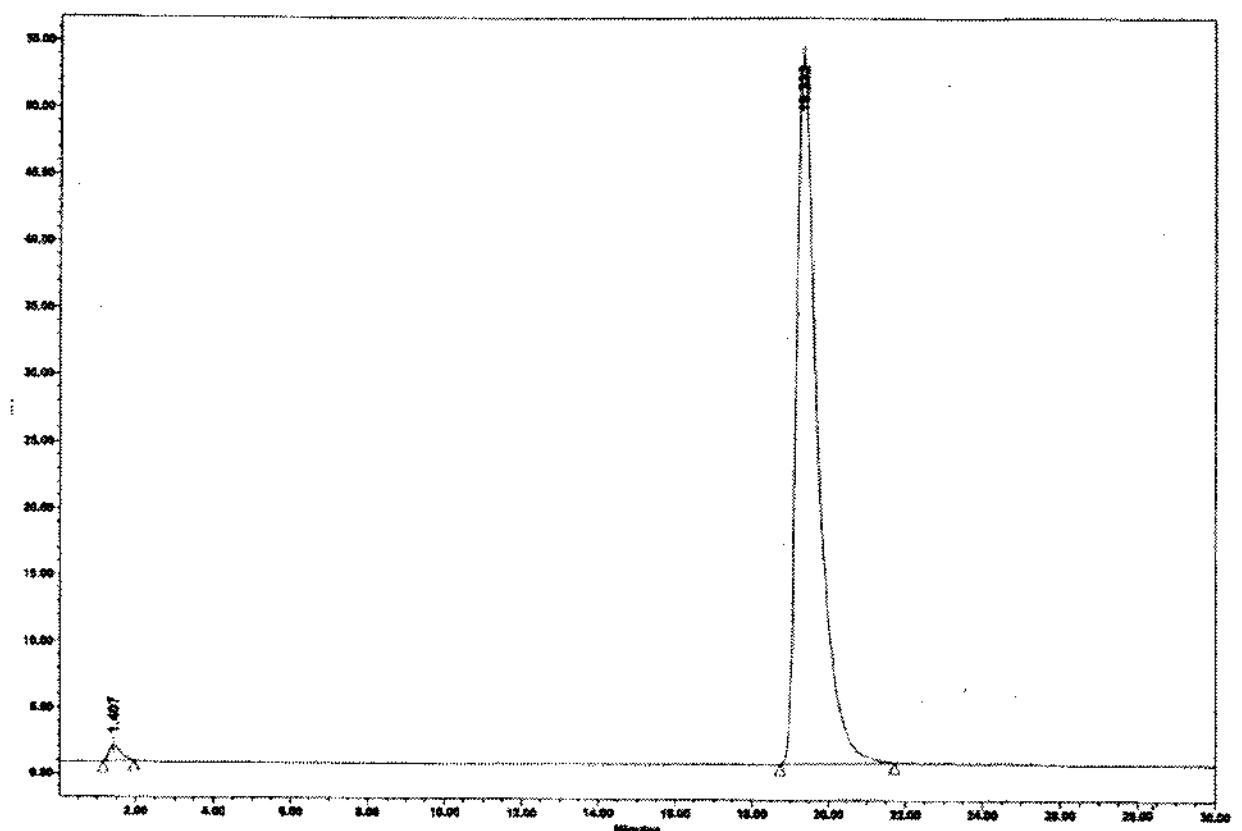


Figure 2. HPLC radiochromatogram of [<sup>125/124</sup>I]FIAU after Sep-Pak C-18 cartridge purification.

씩 정적영상을 얻었다.

소동물 PET 영상은 lutetium Oxyorthosilicate (LSO) 섬광결정을 가지고 있는 microPET R4 (Concorde Microsystems, Knoxville TN) 스캐너를 이용하여 350~750 keV 에너지 창과 6 nS 시간 창으로 설정하여 3 span 과 31 ring difference로 획득하였다. 획득된 영상을 ASIpro (Concorde Microsystems Inc, Knoxville, TN)를 이용하여 재구성하고 분석하였다. MCA 종양, MCA-tk 종양, 간에서의 시간-방사능 곡선은 소동물 PET영상의 각 시간에서 재구성된 영상에서 120 화소의 크기로 관심영역을 그려서 분석하였다.

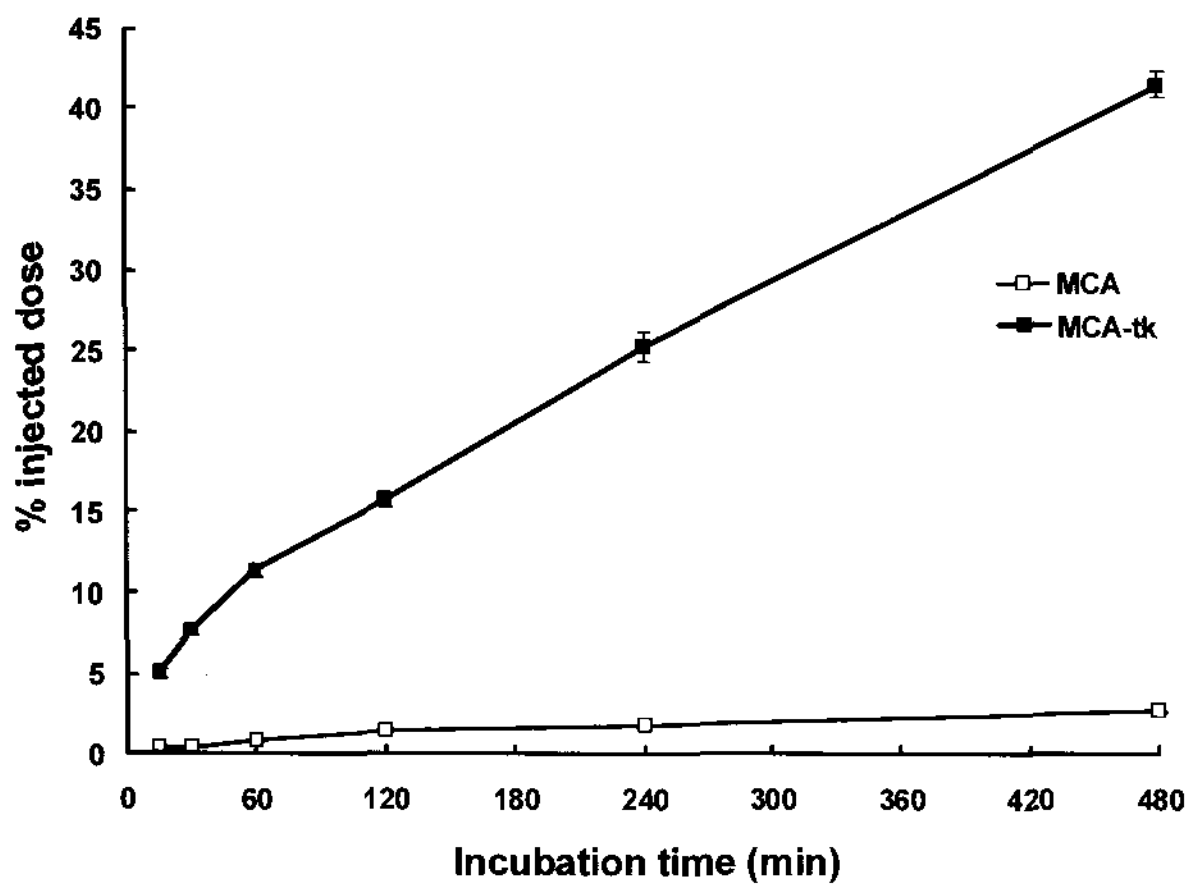
얻어진 생체영상과 해부학적인 위치를 확인하고자 생체영상을 얻은 누드 마우스를 동결하고 3% carboxy methyl cellulose로 봉입하고 이를 아세톤과 드라이 아이스를 이용하여 -78°C로 냉각된 용액에 담그어 동결블록을 만들었다. 얻어진 동결블록을 자동 동결 박절기를 이용하여 30 μm 두께로 절편을 제작하고 이를 imaging plate에 노출하여 자가방사크로마토그램을 얻고 phosphor imager를 이용하여 흑화도의 정도를 pseudo-color로 변환하고 얻어진 절편의 영상과 중첩하여 종양과 장기들의 해부학적인 위치를 평가하고 소동물 PET 영상과 비교하였다.



**Table 1.** Biodistribution of [<sup>124</sup>I]FIAU in MCA and MCA-tk tumor bearing nude mice\*

Organ	1 h	4 h	24 h
Blood	2.16±0.66	0.79±0.32	0.04±0.02
Liver	1.64±0.62	0.47±0.19	0.04±0.01
Lung	2.08±0.59	0.88±0.39	0.05±0.02
Spleen	1.54±0.58	0.75±0.15	0.07±0.02
Kidney	4.59±2.15	0.74±0.23	0.04±0.01
Stomach	10.33±1.92	8.25±3.75	0.31±0.24
Small intestine	2.10±0.49	0.92±0.32	0.29±0.11
Large intestine	3.72±0.49	2.60±0.61	0.11±0.02
Femur	1.28±0.25	0.56±0.05	0.06±0.01
Muscle	1.67±0.43	0.42±0.13	0.04±0.01
Thyroid	0.47±0.27	2.12±0.88	1.55±1.60
MCA	3.56±0.98	1.63±0.78	0.10±0.00
MCA-tk	21.74±6.17	26.89±7.06	18.91±8.50

\* Data are mean±SD of % injected dose per gram of organ or tumor obtained from 3 animals per each time point.



**Figure 3.** Incubation time dependent uptake of [<sup>125</sup>I]FIAU in cultured MCA and MCA-tk cells. Specific accumulation of [<sup>125</sup>I]FIAU is shown in MCA-tk cells, whereas it is minimal in MCA cells.

## 결 과

### 1. FIAU 전구체를 이용한 [<sup>125/124</sup>I]FIAU의 합성 및 분리정제

[<sup>125/124</sup>I]FIAU의 전구체인 FTAU에 산화반응을 이용하여 생산된 [<sup>125</sup>I]FIAU의 감쇠보정된 표지수율은 약 85-95% 이었으며 [<sup>124</sup>I]FIAU의 표지수율은 55-70% 이었으며, HPLC를 이용하여 방사화학적 순도를 평가한 결과 98% 이상이었으며 컬럼상에서의 머무름시간은 19.3 분이였다(Fig. 2).

### 2. HSV-tk 발현 간암세포주에서의 FIAU 섭취율 실험

HSV1-tk 유전자가 이입되지 않은 MCA 세포주의 경우 FIAU의 최대 섭취율이 2.65 %ID로서 세포내로의 FIAU 집적이 높지 않아서 동물세포의 티미딘 키나제에 의한 FIAU

비특이적 인산화가 적음을 확인할 수 있었다. 이에 반해 HSV1-tk 유전자가 이입된 MCA-tk 세포주의 경우에는 상대적으로 증가된 섭취율을 보임으로써 이입된 HSV1-tk 유전자에 의해 생성된 HSV1-TK 효소에 의해 FIAU가 인산화 되어 세포 밖으로 빠져나가지 못하고 집적되는 것을 확인할 수 있었다. MCA-tk 세포주에서의 FIAU 섭취율은 15 분, 30 분, 60 분, 120분, 240분, 480 분에서 각각 5.04 %ID, 7.71 %ID, 11.38 %ID, 15.78 %ID, 25.29 %ID, 41.56 %ID 였으며 같은 시간대의 MCA 세포주의 섭취율에 비하여 각각 11 배, 15배, 13 배, 10 배, 14 배, 15 배의 증가된 섭취율(p<0.01)을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

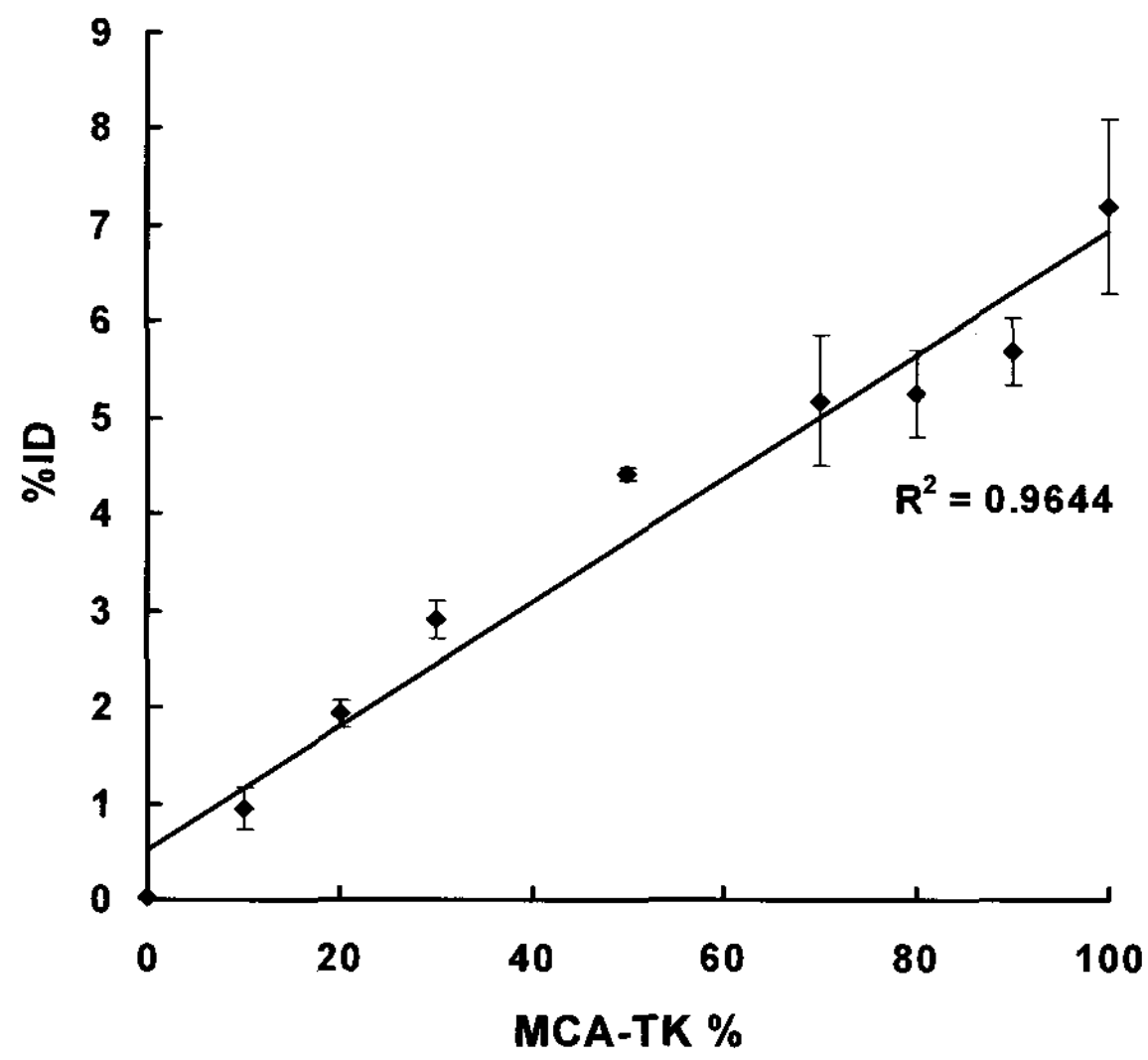
### 3. HSV-tk 발현 간암세포주의 백분율에 따른 섭취율 상관도 실험

전체 세포 수에서 HSV1-tk 유전자가 발현된 MCA-tk 세포수의 백분율 증가에 따른 FIAU 섭취율과의 상관관계를 평가한 결과, MCA-tk 세포수에 따른 FIAU 섭취율의 증가를 관찰할 수 있었으며 이때 상관관계는 직선성을 보였다 ( $R^2 = 0.964$ )(Fig. 4).

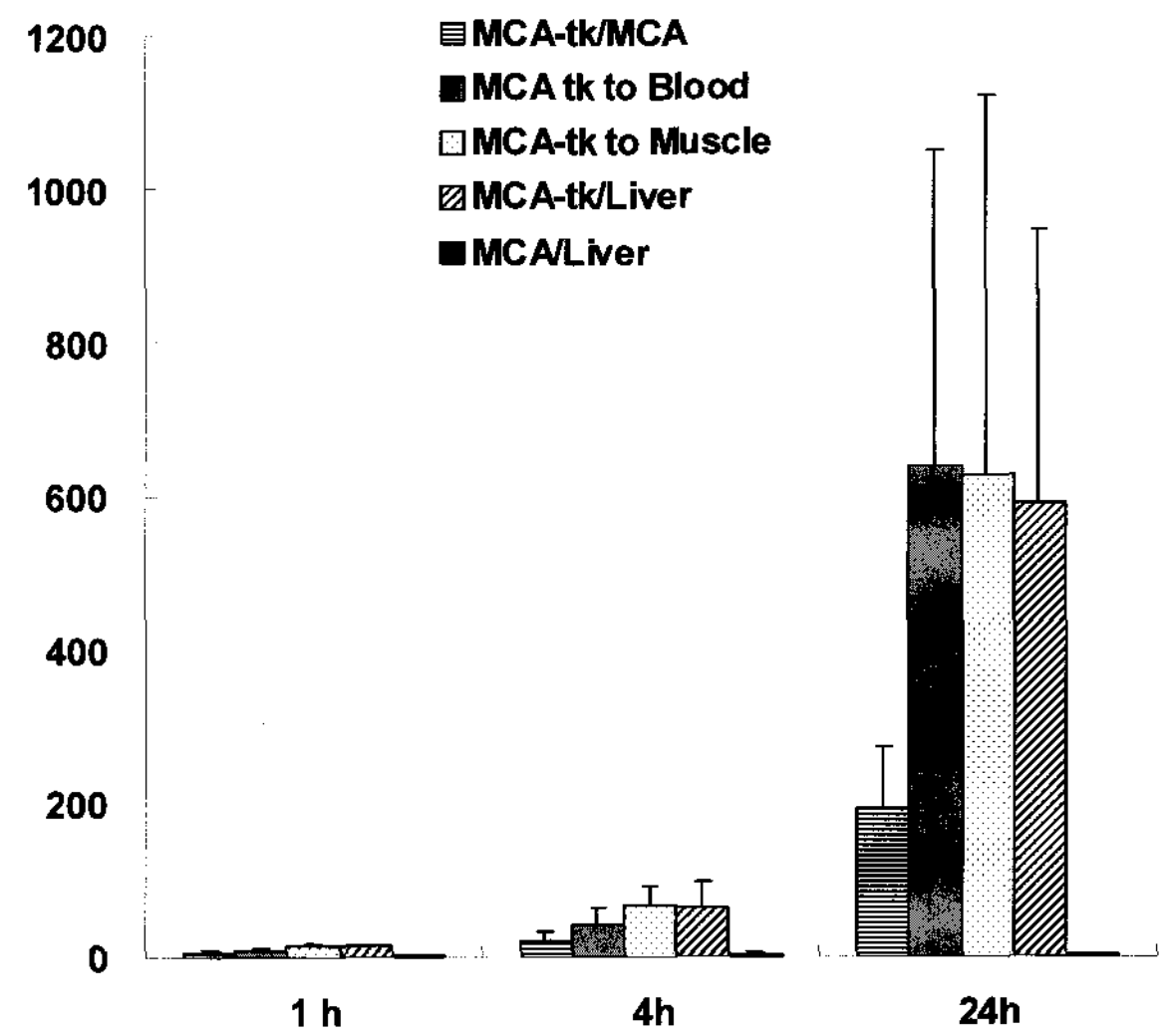
### 4. 종양 동물모델에서의 FIAU 생체분포

MCA 세포와 HSV1-tk 유전자 이입된 MCA-tk 세포를 이용하여 종양을 형성 시킨 Balb/c 누드 마우스 모델에서 [<sup>125</sup>I]FIAU의 시간별 생체분포는 Table 1에 요약되어 있다. [<sup>125</sup>I]FIAU의 배출 경로는 초기에 신장으로 빠르게 배출되며 1 시간 이후에 생체 내 deiodinase에 의하여 분해되어 위와 갑상선의 섭취가 증가된 값을 보였다.

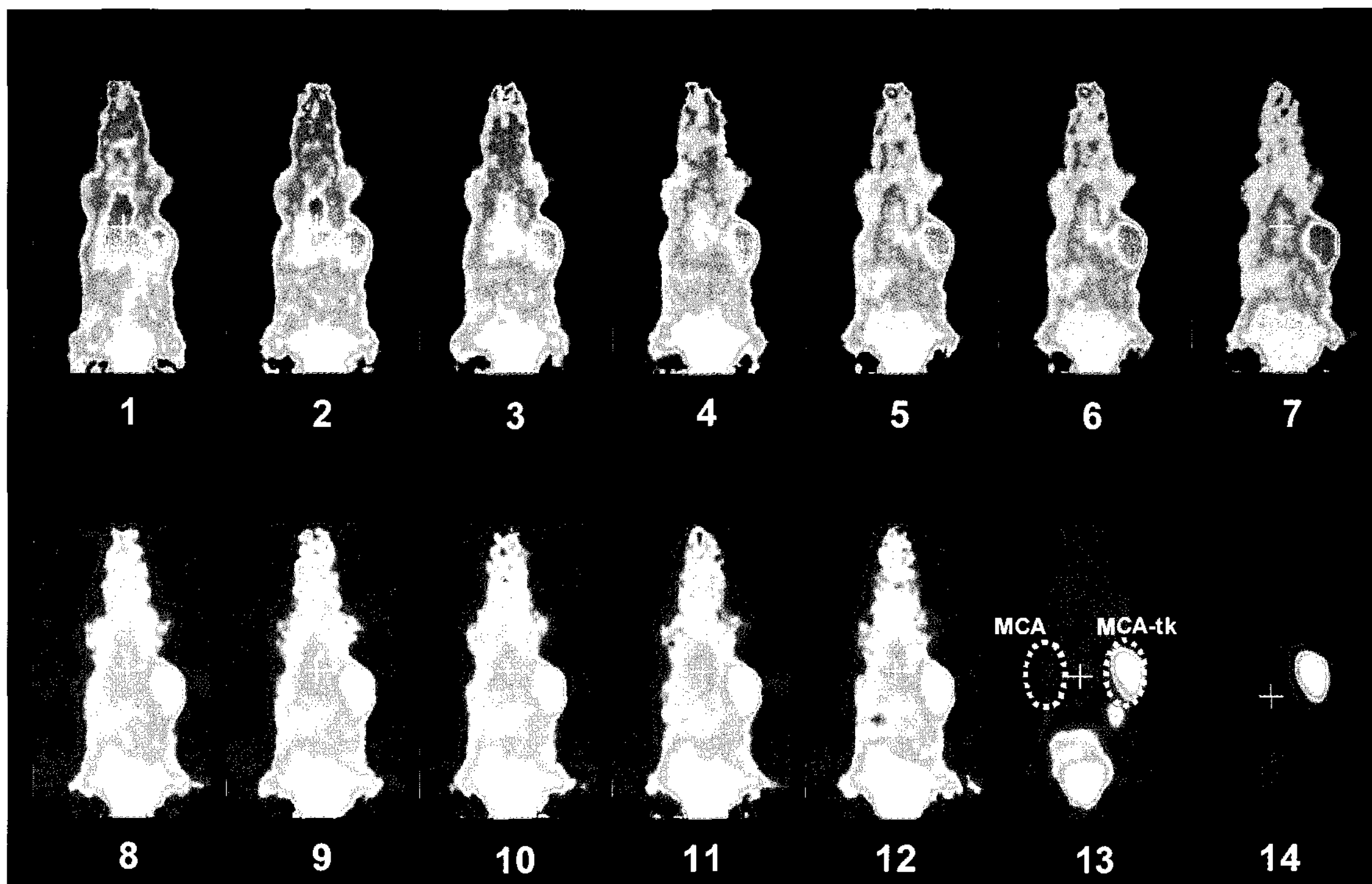
HSV1-tk 유전자 이입된 MCA-tk 종양의 경우 섭취된 방사능의 종양 대 혈액 비 (Rratio of tumor to blood : T/B)는 1 시간, 4 시간, 24 시간에서 각각 10.2, 41.5, 641.7 이었고



**Figure 4.** Correlation between proportion of MCA-tk cells and total cellular uptake of  $^{125}\text{I}$ FIAU. Uptake of  $^{125}\text{I}$ FIAU was highly correlated with proportion of MCA-tk cells ( $n=3$ ,  $p<0.01$ ).



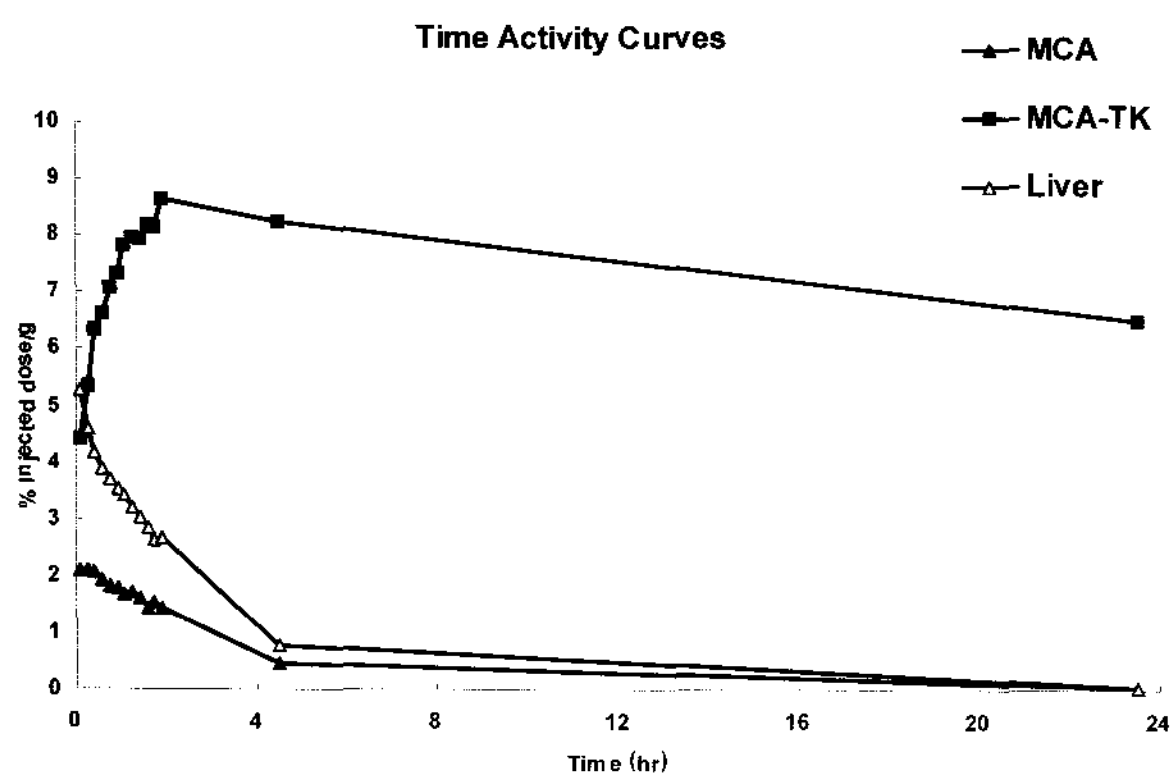
**Figure 5.** Tumor uptake ratios in Balb/c nude mice bearing both MCA and MCA-tk tumors. Data are mean $\pm$ SD of MCA-tk/MCA, MCA-tk/Blood, MCA-tk/Muscle, MCA-tk/Liver, and MCA/Liver  $^{125}\text{I}$ FIAU uptake ratios at 1 h, 4 h, and 24 h after injection ( $n=3$ ,  $p<0.01$ ).



**Figure 6.** Small animal PET images of  $^{124}\text{I}$ FIAU in Balb/c nude mice bearing MCA and MCA-tk tumors on both flank. Coronal sections show HSV1-tk reporter gene specific  $^{124}\text{I}$ FIAU accumulation in MCA-tk tumor. Each image was reconstructed from 10 min (image 1 to 12), 30 min (image 13), or 60 min (image 14) acquisition data at various times post-injection. (1-12: 0-120 min, 13: 4 h, 14: 24 h)



**Figure 7.** Small animal PET images and autoradiographic image of (<sup>124</sup>I)FIAU at in Balb/c nude mice bearing MCA and MCA-tk tumors on each flank. (<sup>124</sup>I)FIAU PET image (A) during 110~120 min, (B) at 4 h, and (C) at 24 h. (D) Fused image of frozen section photo image and autoradiographic image at 24 h.



**Figure 8.** Time activity curves of (<sup>124</sup>I)FIAU activity in the MCA tumor, MCA-tk tumor, and liver on small animal PET images.

근육에 대한 섭취 비율(The ratio of tumor to muscle : T/M)은 13.5, 68.6, 624.4를 보여 배후 방사능에 비해 *HSV1-tk* 발현 종양에의 방사능 집적도가 상당히 높은 것으로 나타났다. 또한 *HSV1-tk* 유전자가 이입되지 않은 MCA 종양 대비 MCA-tk 종양의 섭취 비율 역시 1 시간, 4 시간, 24 시간에서 각각 6.5, 20.3, 192.7로서 시간이 경과함에 따라 증가하며 섭취되는 결과를 보여주어 MCA-tk 종양에서의 *HSV1-TK* 효소에 의한 <sup>125</sup>I-FIAU 인산화에 의해 특이적으로 섭취가 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 또한 MCA 종양과 MCA-tk 종양과 간에서의 섭취 비율이 1 시간, 4 시간, 24 시간에서 MCA 종양에서는 2.6, 3.5, 2.8로 미미하였으나 이에 반하여 MCA-tk 종양에서는 13.8, 66.8, 588.3으로 매우

높은 섭취를 보였다(Fig. 5).

이러한 결과로 볼 때 [<sup>125</sup>I]FIAU의 주요 대사 배출경로가 신장이므로 대부분의 장기 및 조직에 있어서 *HSV1-tk* 유전자 발현의 확인을 위한 핵의학 영상용 추적자로 사용할 수 있는 것으로 확인되었다.

### 5. 종양 동물모델에서의 소동물 PET 생체영상

좌우 측부에 각각 MCA 세포와 MCA-tk 세포를 피하로 주사하여 종양을 형성시킨 Balb/c 누드 마우스 동물모델 한 마리에서 소동물 PET 생체영상을 평가한 결과, [<sup>124</sup>I]FIAU 주사후 2 시간 동안 얻은 역동영상에서 초기에 혈액풀 영상이 관찰되었고 신장을 통한 배설로 방광에서 높은 집적을 나타내었다. 각 10 분 영상에서 점차적으로 혈액풀이 감소하고 MCA-tk 종양에서의 집적은 증강되었고 MCA 종양에서는 거의 [<sup>124</sup>I]FIAU의 섭취가 관찰되지 않았다. 또한 간이나 다른 장관 등의 비특이적 섭취도 미미하였다. 4 시간의 정적영상에서는 MCA 종양과 다른 장기 및 조직에서는 거의 관찰되지 않았고 MCA-tk 종양에서만 섭취가 관찰되었으며 방광으로 배설된 방사능만이 있었다. 24 시간의 정적 영상에서는 방광으로의 배설도 거의 관찰되지 않고 MCA-tk 종양에서만 [<sup>124</sup>I]FIAU의 섭취가 관찰되어 매우 높은 신호대 잡음비를 보였다(Fig. 6). 이러한 소동물 PET 영상의 해부학적 위치 평가를 위하여 24 시간 PET 영상 획득 후 시행한 자가 방사영상에서도 MCA-tk 종양의 위치를 확인할 수 있었다(Fig. 7).

소동물 PET 영상에서 MCA 종양, MCA-tk 종양, 간의

시간-방사능 곡선을 통하여 각각의 섭취를 비교하였을 때, MCA 종양과 간은 시간이 경과함에 따라 계속적으로 감소되고 MCA-tk 종양은 더욱 집적되는 양상을 보였으며, MCA-tk 종양/MCA 종양, MCA-tk 종양/간, MCA 종양/간의 섭취비율을 보면 각각 2 시간, 4 시간, 24 시간에서 MCA-tk 종양/MCA 종양과 MCA-tk 종양/간은 6.1, 17.6, 286.2와 3.2, 10.5, 189.8로 시간이 지남에 따라 매우 큰 대조도를 보였으나 MCA 종양/간은 0.5, 0.6, 0.7로 미미한 차이를 보였다(Fig. 8).

## 고 찰

이 연구에서 저자들은 간암 동물 모델에서 *HSV1-tk* 보고 유전자 발현을 평가하는 핵의학 영상법을 확립하고자 방사성동위원소로 표지된 pyrimidine 유도체인 FIAU를 보고물질로 사용하여 Morris hepatoma 세포주인 MCA 세포에 *HSV1-tk* 유전자가 안정적으로 발현한 세포주 시험관 실험과 피하 간암 동물모델에서 소동물 PET 영상을 이용하여 *HSV1-tk* 보고 유전자의 발현에 선택적이고 지속적인 축적에 따른 대조도가 높은 생체영상을 구현하였다.

FIAU는 *HSV1-tk* 유전자 발현 영상의 초기부터 활발히 연구되어 왔다. 본 연구에서 *HSV1-tk* 유전자가 유입된 MCA-tk 세포주에 대한 시험관 섭취율와 피하 MCA-tk 종양 실험동물에 대한 생체분포와 소동물 PET 영상에서 모두 *HSV1-tk* 유전자가 유입되지 않은 MCA 세포, MCA 종양, 그 외 각 장기 및 조직과 비교할 때 높은 섭취를 보여 주고 있었다. 기존 연구에서 FIAU와 다른 유도체들을 비교한 결과, pyrimidine 유도체들뿐만(FMAU, FBAU, FCAU, FEAU) 아니라 acycloguanosine 유도체(FHPG, PCV, GCV, <sup>14</sup>C-FIAU)와의 그 집적정도를 비교하였을 때 FIAU의 기질의 우수성을 제시하였다.<sup>11,12)</sup> 민 등<sup>21)</sup>은 뇌교종 세포주를 이용하여 *HSV1-tk* 유전자 발현에 대한 <sup>14</sup>C-FIAU와 <sup>18</sup>F-FHBG의 비교에서 유전자가 이입된 방법이 서로 다른 세포들 대조군과 비교하였는데 유전자가 retrovirus를 이용하여 안정적으로 이입된 경우에는 FIAU의 섭취가 더 높았고 아데노바이러스를 이용하여 유전자가 유입된 경우에는 FHBG에서 더 높은 섭취율을 보였다. 민 등은 *HSV1-tk* 유전자의 이입 방법에 따라 차이가 나는 것이 DNA 복사된 수에 의한 차이에 따른 발현량의 차이 때문에 섭취가 달라질 것이라고 제시하면서 FHBG가 FIAU보다 세포외의 티미딘 키나제의 변화에 더욱 예민하기 때문일 것으로 해석하였다. 또한 아데노바이러스와 관련되어서는 핵산 전달체(nucleoside transporter)의 양을 변화시키는 것도 한 원인이 될 것

으로 제안하였다. 이렇게 아데노바이러스가 pyrimidine 유도체와 purine 유도체에서 다르게 반응하는 것은 pyrimidine과 purine이 그 합성에 있어 서로 다른 경로를 이용하기 때문이라고 언급하였다. 민 등이 언급한 것처럼 대부분의 많은 연구들은 안정적으로 유전자가 이입된 세포주를 사용하였다. FIAU 기질이 *HSV1-tk* 유전자에 대한 발현양을 평가하는 보고 물질로서 이 연구에서와 같이 좋은 결과를 보여주고 있었으나 민 등이 보고한 것처럼 유전자가 유입되는 방식이나 또는 세포주에 따라서, 돌연변이 형태의 *HSV1-tk* 유전자의 사용에 따라서도 영향을 줄 수 있음을 고려해야 할 것이다.

강 등<sup>26)</sup>은 <sup>14</sup>C-FIAU와 <sup>14</sup>C-FMAU, <sup>3</sup>H-FEAU, <sup>3</sup>H-PCV의 보고 기질들을 *HSV1-tk* 시험관 실험을 통하여 FEAU가 FIAU보다 더 섭취율이 우수했다고 보고하였다. 강 등은 Morris hepatoma 세포주와 뇌교종 세포주에서 각각을 *HSV1-tk* 유전자를 안정적으로 이입하는 방법과 아데노바이러스로 유입하는 방법을 이용하였고 돌연변이 형태의 *HSV1-tk*를 사용한 경우와 wild type의 *HSV1-tk*를 사용한 경우로 나누어서 각 세포주의 섭취율을 비교하였다. 그의 결과에서 뇌교종 세포주에서는 FIAU의 섭취가 *HSV1-tk* 유전자가 유입된 세포와 그렇지 않은 경우의 차이가 미미하였다. 그러나 Morris hepatoma 세포주에서는 유의하게 높은 차이를 보여주어 세포주에 따라 차이가 있음을 나타내었다. 또한 이러한 결과가 생체내 실험 없이 수용하기에는 한계가 있을 수 있다.

본 연구에서 *HSV1-tk* 유전자가 유입된 세포주와 대조 세포주의 시험관에서의 최대 8 시간 까지 섭취비율을 관찰하였는데 최대 15 배였고, 시간이 증가함에 따라 *HSV1-tk* 유전자가 유입된 세포로 더욱 집적되는 양상이었지만 대조군 세포에서도 섭취가 다소 증가하여 그 대조도가 시간 경과와 관계없이 섭취 비율이 10~15 배를 나타내었다. 그러나 생체 분포 실험과 소동물 PET 생체 영상의 시간-방사능 곡선에서의 결과를 보면 생체분포에서는 MCA-tk 종양 대 MCA 종양의 비가 24 시간에 최대 641, PET 영상 분석에서는 286로 시간이 경과함에 따라 급격이 대조도를 보여 주어 실질적인 생체내 실험에서 매우 효과적인 결과를 얻었다. 이렇게 시험관 세포실험과 생체내의 결과가 다소 차이가 있는 것은 앞에서 언급된 것처럼 핵산 전달체등 생체내에 유전자 발현과 그 기질 사용에 있어 알려지지 않은 다른 기전들 때문일 것이며 이는 지속적으로 연구되어야 할 것이다.

Haubner 등<sup>27)</sup>이 *HSV1-tk* 유전자 발현과 관련하여 방사성 동위원소를 표지한 FIAU의 초기의 역동학에 관한 연구를 보면 섬유육종 세포에 안정적으로 유전자가 이입된 세포주를 사용하여 Balb/c 누드 마우스에 피하 종양 모델을 만들



어 결과를 얻었는데, 그들은 FIAU가 혈액으로부터의 지수 함수적으로 제거되며 초기 반감기(Ea)는 0.6 시간이고 후기 반감기(EB)는 4.6 시간이었다. *HSV1-tk* 유전자 발현 종양에서의 반감기는 37 시간으로 최대 섭취량은 20.3±5.7% ID/g으로 1 시간에서 관찰되었다. 본 연구에서는 MCA-tk 종양에서의 최대 섭취율이 26.9±7.1% ID/g로 4 시간에서 약간 더 높게 관찰되었다. 24 시간의 섭취율은 12.3±2.2% ID/g로 본 연구의 18.9±8.5% ID/g 보다 다소 낮게 측정되었으나 24 시간까지 높은 방사능 집적을 보여 주었다. 이러한 FIAU의 역동학을 고려할 때 그들은 처음 혈중 반감기인 0.6 시간에 종양 대 혈액 비가 3.8±1.1로 초기부터 영상을 얻기에 충분한 시간이라고 제안하였으며 24 시간의 종양 대 혈액 비는 615.5±217.6 으로 시간이 경과함에 따라 더 좋은 대조도를 보여 주었다. 본 연구에서도 1 시간에 종양 대 혈액 비가 10.2±2.1, 24 시간에 641.7±410.5로 비슷한 결과를 보여 초기부터 생체영상이 가능할 것으로 기대할 수 있겠다. 강 등이 지적한 바와 같이 FMAU와 FIAU는 간과 신경세포의 미토콘드리아의 독성을 가지고 있어 임상실험에서 항바이러스 치료를 위한 기질로는 적합하지 않을 수 있으나,<sup>28)</sup> 이러한 독성이 용량 의존적이므로 본 연구에서와 같이 영상 목적의 추적자 개념으로 FIAU를 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

핵의학 영상을 위해서는 종양 대 혈액비도 중요하며 또한 종양에서 치료 유전자 발현과 관련된 *HSV1-tk*가 유입된 종양과 대조 종양의 비도 고려해야 하며, 본 연구에서는 *HSV1-tk* 유전자가 이입된 Morris hepatoma 세포주와 대조 세포주의 시험관 실험에서 방사성 요오드로 표지된 FIAU의 섭취율이 *HSV1-tk*가 유입되지 않은 MCA 세포주와 비교하였을 때 최대 15 배 이상의 높은 것을 확인하였고, 유전자 발현의 영상화에 있어서 중요한 보고 유전자의 발현량과 보고 기질의 섭취량과의 상관관계에서 볼 때, 본 연구에서 제조한 FIAU는 직선적인 상관관계를 나타내었다. 따라서 FIAU의 생체 내 반감기를 37 시간으로 고려하여, 독성이 유발되기 어려운 매우 적은 양의 방사성 표지된 FIAU를 투여한 후 충분한 시간을 집적시켜 대조도를 높여 생체 영상을 얻음으로써 유전자 발현을 측정하기에 매우 유용한 기질이 될 수 있을 것으로 기대된다.

FHBG등의 purine 유도체의 경우, 간담도계로 배설되어 간을 표적으로 하는 경우 종양 대 간의 대조도가 좋지 않을 수 있다. 본 연구에서는 간암 세포주를 사용하였고 유전자 치료시 주요한 대상 장기인 간에서의 섭취율이 FIAU 모두에서 정상적으로는 낮게 나타났고, 종양 대 간의 섭취비 또한 1 시간에 13.8 배, 24 시간에 588.3 배로 초기에서부터 큰 대조도를 보여, 유전자 치료를 간을 대상으로 하는 경우에

유전자의 발현을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서 사용된 피하 간암 동물 모델은 간 직생 동물 모델이 아니므로 *HSV1-tk*를 이용한 간암 치료 시 비침습적인 핵의학 영상의 적용에는 한계가 있으므로 간 직생 동물 모델을 이용한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

FIAU는 본 연구에서 이용한 <sup>124</sup>I-FIAU PET 영상뿐만 아니라 <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I을 이용한 감마카메라와 SPECT 영상에도 다양하게 적용될 수 있을 것이며 최근에는 Aluddin 등이<sup>47)</sup> <sup>18</sup>F-FIAU와 <sup>18</sup>F-FEAU의 소동물 PET 영상에서 좋은 결과를 얻어 이 두 물질 모두 잠재력 있는 PET 영상 기질로 제안하였다. 이는 방사성 요오드 뿐만 <sup>18</sup>F로도 표지가능한 표지물질의 다양성을 보여 각 연구센터의 여건에 따라 접근 가능한 표지물질을 이용하여 손쉽게 간암 보고 유전자 연구에 활용될 수 있을 것이다.

## 요 약

**목적:** 간암은 치명적인 질환으로 유전자 치료가 기존 치료의 대체적 치료로 기대되고 있으며, 이러한 치료법의 발달과 함께 유전자의 발현을 평가할 수 있는 보고 유전자 시스템의 필요하다. 그 중 *HSV1-tk* 유전자는 보고 유전자로서 필요한 조건을 두루 만족시키고 있을 뿐만 아니라 별도의 치료유전자를 따로 이입할 필요가 없다는 장점을 가지고 있어 가장 많이 사용되는 방법이다. 이 연구는 간암의 유전자 치료를 위해 간암 동물 모델에서 유전자로 *HSV1-tk*를 사용하고 보고 기질로 방사성 요오드 표지 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuranosyl-5-iodouracil (FIAU)를 사용하여 소동물 양전자 방출영상(positron emission tomography, PET)을 얻어 비침습적 생체 유전자 발현 영상의 가능성을 확인하고자 하였다. **대상 및 방법:** *HSV1-tk* 보고 유전자 이입 간암 세포주인 MCA-tk와 MCA 세포주를 이용하여 *in vitro* 상에서의 [<sup>125</sup>I]FIAU의 섭취실험과 섭취량과 발현량의 상관성 평가를 위해 세포수 백분율에 따른 섭취실험을 실시하였다. 피하 간암 동물모델을 이용하여 [<sup>125</sup>I]FIAU의 생체분포를 평가하였으며 [<sup>125</sup>I]FIAU를 이용하여 소동물 PET을 통한 생체영상을 분석하였다. **결과:** *HSV1-tk* 유전자가 이입된 MCA-tk 세포에서는 특이적인 동위원소의 집적이 발생하였으며 대조군인 MCA에서는 거의 집적이 이루어지지 않았다. 섭취 후 480 분에서 두 세포주의 섭취비는 15 배로 나타났다. MCA-tk 세포주의 백분율이 증가함에 따라 [<sup>125</sup>I]FIAU의 섭취량도 직선적 상관관계( $R^2=0.9644$ )에 따라 증가하여 기질의 섭취량이 유전자 발현량을 잘 반영하고 있음이 확인

되었다. 피하 종양 동물모델의 생체분포 결과 [<sup>125</sup>I]FIAU는 초기에 신장으로 빠르게 배출되며 1 시간 이후 생체내 deiodinase에 의하여 분해되어 위와 갑상선의 섭취가 증가된 값을 보였다. MCA-tk 종양 대 혈액 비와 MCA-tk 종양 대 근육 비는 투여 후 24 시간 사이에 최대 641의 값을 나타내었다. 또한 *HSV1-tk* 유전자가 발현하지 않은 MCA 종양에 비하여 MCA-tk 종양은 192.7 배 높은 섭취를 보여 [<sup>125</sup>I]FIAU의 섭취는 *HSV1-tk* 유전자 발현에 특이적임을 확인하였다. MCA-tk 종양 대 간의 집적의 경우에도 초기 1 시간에 13.8 배, 4 시간에 66.8 배, 24 시간에 혈액 비와 비슷한 정도의 588.3 배 이상의 대조도를 보여 주었다. [<sup>124</sup>I]FIAU를 보고 기질로 사용한 소동물 PET 생체영상에서 대조군인 MCA 종양과 보고 유전자가 이입된 MCA-tk 종양에의 집적이 차이가 매우 큰 대조도를 보여주었으며 생체분포 결과와 일치하는 양상을 나타내었다. 결론: <sup>125</sup>I-FIAU가 세포 섭취를 시험과 생체 분포에서 MCA-tk 종양에 높은 집적을 나타내었고 <sup>124</sup>I-FIAU를 이용한 소동물 PET 영상에서 MCA-tk 종양이 표적장기인 간이나 MCA 종양에 비하여 매우 높은 대조도를 나타냈다. 향후, 간암의 유전자 치료에서 FIAU은 *HSV1-tk*를 보고 유전자로 사용할 때 적절한 기질로서 비침습적으로 핵의학 영상을 이용한 유전자 발현의 평가를 가능하게 할 수 있을 것으로 기대된다.

## References

- Juan Ruiz, Guillermo Mazzolini, Bruno Sangro, Cheng Qian, Jesus Prieto. Gene Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis* 2001; 19:324-32.
- Qian C, Idoate M, Bilbao R, Sangro B, Bruna O, Vazquez J, et al. Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 1997;8:349-58.
- Bilbao R, Gerolami R, Bralet MP, Qian C, Tran PL, Tennant B, et al. Transduction efficacy, antitumoral effect and toxicity of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of hepatocellular carcinoma: The woodchuck animal model. *Cancer Gene Ther* 2000;7:657-62.
- Gerolami R, Cardoso J, Lewin M, Bralet MP, Sa Cunha A, Clement O, et al. Evaluation of HSV-tk gene therapy in a rat model of chemically induced hepatocellular carcinoma by intratumoral and intrahepatic artery routes. *Cancer Res* 2000;60:993-1001.
- Cheng YC, Huang ES, Lin JC, Mar EC, Pagano JS, Dutschman GE, et al. Unique spectrum of activity of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)-methyl]-guanine against herpesviruses in vitro and its mode of action against herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:2767-70.
- Elion GB, Furman PA, Fyfe JA, de Miranda P, Beauchamp L, Schaeffer HJ. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:5716-20.
- Keller PM, Fyfe JA, Beauchamp L, Lubbers CM, Furman PA, Schaeffer HJ, et al. Enzymatic phosphorylation of acyclic nucleoside analogs and correlations with antiherpetic activities. *Biochem Pharmacol* 1981;30:3071-7.
- Miyagawa M, Anton M, Haubner R, Simoes MV, Stadele C, Erhardt W. et al. PET of cardiac transgene expression: comparison of 2 approaches based on herpesviral thymidine kinase reporter gene. *J Nucl Med* 2004;45:1917-23.
- Martin JA, Thomas GJ, Merrett JH, Lambert RW, Bushnell DJ, Dunsdon SJ, et al. The design, synthesis and properties of highly potent and selective inhibitors of herpes simplex virus types 1 and 2 thymidine kinase. *Antivir Chem Chemother* 1998;9:1-8.
- Chia-Hung Hsieh, Ren-Shyan Liua,b, Hsin-Ell Wang. In vitro evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter system in dynamic studies of transcriptional gene regulation *Nucl Med Biol* 33 (2006) 653-60.
- Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, Uehara H, Watanabe K, Gansbacher B, et al. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res* 1995;55:6126-32.
- 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.
- de Vries EF, van Waarde A, Harmsen MC, Mulder NH, Vaalburg W, Hospers GA. [<sup>11</sup>C]FMAU and [<sup>18</sup>F]FHPG as PET tracers for herpes simplex virus thymidine kinase enzyme activity and human cytomegalovirus infections. *Nucl. Med. Biol.* 2000;27:113-9.
- 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.
- Namavari M, Barrio JR, Toyokuni T, Gambhir SS, Cherry SR, Herschman HR, et al. Synthesis of 8-[<sup>18</sup>F]fluoroguanine derivatives: in vivo probes for imaging gene expression with positron emission tomography. *Nucl. Med. Biol* 2000;27:157-62.
- 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, 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, Doubrovina M, Akhurst T, Cai S, Balatoni J, Alauddin MM, et al. Comparison of radiolabeled nucleoside probes (FIAU, FHBG, and FHPG) for PET imaging of *HSV1-tk* gene expression. *J Nucl Med* 2002;43:1072-83.
- Moon BS, Lee TS, Lee MK, Lee KC, An GI, Chun KS, et al. 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. *Nucl Med Mol Imaging* 2006;4:218-27.
- 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(11):1547-60.
- Beck C, Cayeux S, Lupton SD, Dörken B, Blankenstein T. The

- thymidine kinase/ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells. *Hum Gene Ther* 1995;6:1525-1530.
23. Haberkorn U, Altmann A, Morr I, Knopf KW, Germann C, Haeckel R, et al. Monitoring gene therapy with herpes simplex virus thymidine kinase in hepatoma cells: uptake of specific substrates. *J Nucl Med* 1997;38:287-294.
24. 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.
25. Brust P, Haubner R, Friedrich A, Scheunemann M, Anton M, Koufaki ON, et al. Comparison of [<sup>18</sup>F]FHPG and [<sup>124</sup>I/125I]FIAU for imaging herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression. *J Nucl Med* 2001;28:721-9.
26. Kang KW, Min JJ, Chen X, Gambhir SS. Comparison of [<sup>14</sup>C]FMAU, [<sup>3</sup>H]FEAU, [<sup>14</sup>C]FIAU, and [<sup>3</sup>H]PCV for monitoring reporter gene expression of wild type and mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase in cell culture. *Mol Imaging Biol* 2005 7:296-303.
27. Haubner R, Avrill N, Hantzopoulos PA, Gansbacher B, Schwaiger M. In vivo imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene expression: early kinetics of radiolabelled FIAU. *Eur J Nucl Med* 2000; 27:283-91.
28. Morin KW, Duan W, Xu L, Zhou A, Moharram S, Knaus EE. et al. Cytotoxicity and cellular uptake of pyrimidine nucleosides for imaging herpes simplex type-1 thymidine kinase (HSV-1 TK) expression in mammalian cells. *Nucl Med Biol* 2004;31:623-30.