

RADIOFARMAKA BERBASIS ANTIBODI

Widyastuti

Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR), BATAN
Kawasan Puspiptek, Tangerang, Banten

ABSTRAK

RADIOFARMAKA BERBASIS ANTIBODI. Antibodi adalah senyawa biologis yang merupakan bagian dari sistem kekebalan tubuh. Karena molekul antibodi selalu terakumulasi di tempat terjadinya radang, infeksi, tumor dan keadaan dimana terdapat benda asing yang harus dieliminasi dari dalam tubuh, maka memungkinkan dilakukan pengembangan radiofarmaka berbasis antibodi untuk diagnosis infeksi dan inflamasi maupun untuk terapi kanker. Antibodi dapat dilabel dengan radionuklida melalui metoda secara langsung dan tidak langsung, dilanjutkan dengan analisis hasil pelabelan yang meliputi karakterisasi keutuhan molekul antibodi, analisis kemurnian radiokimia, uji stabilitas in vitro dan uji imunoreaktivitas. Antibodi berlabel radionuklida sebelum diuji pada manusia harus diuji-coba pada hewan percobaan baik yang normal maupun yang diinduksi infeksi/tumor.

Kata kunci: antibodi, radiofarmaka, terapi

ABSTRACT

ANTIBODY BASED RADIOPHARMACEUTICALS. Antibody is a biological compound as a part of immunity system. Antibody molecules accumulate in the sites of inflammation, infection, tumors and in the area where foreign substance exists which should be eliminated from the body, therefore it is possible to develop radiopharmaceuticals based on antibody for diagnosis of infection and inflammation and therapy of cancer. Antibody could be labeled with radionuclides using direct and indirect methods, followed by analysis which comprises characterization of the integrity of antibody molecules, radiochemical purity, in-vitro stability and immunoreactivity. Radiolabeled antibody prior to patients study should undergo preclinical study on experimental animals, both in normal and infection/tumor induced ones.

Keywords: antibody, radiopharmaceutical, therapy.

PENDAHULUAN

Antibodi merupakan senyawa alam yang terdapat di dalam tubuh sebagai bagian dari system pertahanan tubuh. Molekul antibodi memiliki bagian yang dapat mengidentifikasi antigen atau benda asing yang ada dalam tubuh dan bagian yang dapat menghancurkan benda asing melalui cara-cara tertentu baik bekerja sendiri maupun bekerja sama dengan komponen pertahanan tubuh yang lain.

Antibodi di dalam tubuh pada umumnya bersifat poliklonal yaitu mempunyai banyak sisi aktif yang dapat mengikat berbagai jenis antigen sehingga antibodi tersebut bekerja secara tidak spesifik. Tetapi perkembangan ilmu dan teknologi memungkinkan untuk dapat mengembangkan antibodi yang hanya mempunyai satu sisi aktif yang disebut dengan antibodi monoclonal. Antibodi monoclonal yang diturunkan dari antibodi yang berasal dari suatu jaringan tumor akan bekerja secara spesifik terhadap jenis tumor tersebut, dengan demikian dapat diproduksi berbagai jenis antibodi monoclonal yang bekerja spesifik terhadap tumor jenis tertentu.

Karena mekanisme ikatannya yang spesifik terhadap tumor, maka memberikan peluang kepada dunia kedokteran nuklir untuk mengembangkan radiofarmaka berbasis antibodi monoklonal untuk keperluan

diagnosis maupun terapi. Untuk keperluan diagnosis dipilih radionuklida pemancar gamma sebagai atom perunut/penanda, sedangkan untuk keperluan terapi dipilih radionuklida pemancar partikel bermuatan misalnya beta atau positron.

Pelabelan antibodi dengan radionuklida dapat dilakukan melalui metoda pelabelan langsung dan tidak langsung. Pada metoda pelabelan langsung atom radionuklida berikatan dengan molekul antibodi melalui atom S yang terdapat pada gugus disulfida dari molekul antibodi. Pada metoda pelabelan tidak langsung atom radionuklida berikatan dengan suatu senyawa ligan yang salah satu gugusnya diikatkan ke molekul antibodi yang disebut juga senyawa pengkhelat fungsi ganda (*bifunctional chelator*, atau disingkat BFC)).

Tahapan pembuatan radiofarmaka berbasis antibodi terdiri dari penyiapan antibodi menjadi bentuk yang siap dilabel (reduksi antibodi atau konjugasi BFC-antibodi), pemurnian dan pelabelan antibodi dengan radionuklida atau dapat juga dimulai dari pelabelan BFC, pemurnian, konjugasi BFC berlabel dengan .antibodi dan pemurnian (metoda pelabelan tidak langsung paska konjugasi).

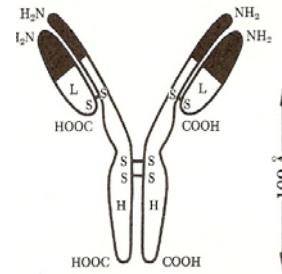
Analisis hasil pelabelan meliputi uji karakterisasi antibodi, kemurnian radiokimia, uji imunoreaktivitas, uji stabilitas in vitro dan uji biodistribusi pada hewan percobaan. Tahap

terakhir adalah uji pada pasien untuk melihat efektivitas radiofarmaka sebagai preparat diagnosis atau terapi.

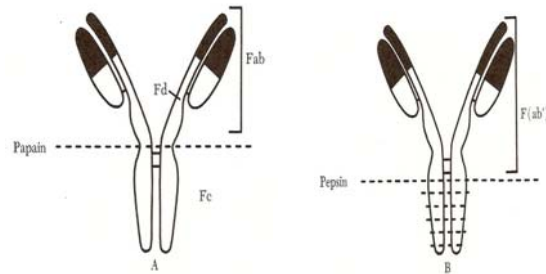
DEFINISI DAN STRUKTUR KIMIA ANTIBODI

Antibodi adalah suatu protein atau globulin dengan berat molekul diatas 150.000 Da yang merupakan bagian dari sistim pertahanan tubuh dan disebut immunoglobulin (Ig). Mekanisme kerjanya adalah sebagai berikut : molekul antibodi yang menempel pada permukaan limfosit akan berikatan dengan molekul yang ada pada permukaan sel bakteri yang masuk ke dalam tubuh dan merangsang pembentukan limfosit sehingga dihasilkan antibodi yang sama dalam jumlah besar. Antibodi dalam jumlah besar akan mengikat bakteri dan diikuti dengan mekanisme pertahanan sekunder oleh makrofag fagositosis dan komplemen. Jadi fungsi antibodi ada dua, yaitu mengenali dan mengikat target spesifik dari bakteri (antigen), dan mengundang sistim pertahanan lain untuk menghancurkan bakteri, misalnya makrofag dan komplemen.

Struktur antibodi sebagai berikut.



Gambar 1. Antibodi IgG



Gambar 2. Bagian molekul IgG yang diputus oleh enzim papain/pepsin

Molekul antibodi terdiri atas 2 pasang struktur rangkaian yang masing-masing rangkaian terdiri dari 2 rantai protein, yaitu rantai berat dan rantai ringan. Rantai berat (H) dan rantai ringan (L) dihubungkan dengan ikatan disulfida, begitu pula antara struktur rangkaian yang satu dengan yang lainnya. Tiap rantai dibagi menjadi 2 area (domain), yaitu VL dan CL atau VH dan CH. (Gambar 1).

VH dan VL mempunyai rangkaian asam amino yang sangat bervariasi sedangkan CH dan CL mempunyai susunan asam amino yang relatif konstan. Perbedaan VH dan VL dari tiap antibodi menyebabkan antibodi mempunyai spesifisitas yang berbeda untuk

tiap jenis bakteri, sedangkan CH dan CL yang konstan untuk tiap antibodi berfungsi sebagai mediator untuk fungsi sekunder sistem imunologi.

Tiap rantai terdiri dari 2 domain, domain bagian atas mempunyai terminal gugus amin primer sedangkan domain bagian bawah merupakan terminal gugus karboksilat. Molekul antibodi dapat difragmentasi sesuai dengan kebutuhan menggunakan enzim papain dan pepsin. Fragmentasi/pemutusan rantai oleh papain terjadi di atas ikatan disulfida rantai berat dan fragmen yang terjadi diberi nama Fab (bagian atas) dan Fc (bagian bawah), sedangkan fragmentasi oleh pepsin menyebabkan pemutusan rantai di bawah ikatan disulfida rantai berat, dan fragmen yang terjadi disebut $F(ab')_2$. (Gambar 2).

Diperkirakan terdapat 10^8 jenis antibodi dalam tubuh dengan spesifisitas yang berbeda. Di dalam tubuh antibodi dikelompokkan atas 5 jenis berdasarkan perbedaan domain konstan, yaitu IgG, IgA, IgE, IgD dan IgM. Kelima jenis Ig ini terdistribusi dalam peredaran darah, disamping itu IgG terdapat juga dalam cairan extravascular, sedangkan IgA terdapat juga dalam sekresi misalnya saliva dan kelenjar air mata serta IgE selain di dalam darah juga terdapat di saluran pernafasan dan pencernaan dan kulit.

Antibodi atau immunoglobulin dalam tubuh manusia maupun hewan pada umumnya bersifat poliklonal, yaitu mempunyai beberapa isotipe atau afinitas ikatan yang berbeda, sehingga tidak dapat berikatan secara spesifik dengan bakteri.

DASAR PEMILIHAN ANTIBODI SEBAGAI RADIOFARMAKA UNTUK DIAGNOSIS TUMOR (*TUMOUR MARKER*)

Tumor didefinisikan sebagai sel normal yang mengalami perubahan sifat pada permukaan selnya sehingga dapat dibedakan dari sel normal. Suatu protein yang terlibat dalam perkembangan sel tumor disebut antigen tumor. Antibodi yang dapat mengenali dan mengikat antigen tersebut dapat digunakan untuk pembuatan sediaan radiofarmaka untuk diagnosis tumor dan disebut *tumour marker*, serta bila dilabel dengan radionuklida pemancar β^- dapat digunakan untuk terapi.

Untuk pembuatan sediaan radiofarmaka berbasis antibodi diperlukan antibodi yang mempunyai spesifisitas yang tinggi, untuk itu diperlukan antibodi monoclonal karena hanya mempunyai 1 isotipe atau *binding site*. Antibodi monoclonal dibuat dari antibodi poliklonal yang ditumbuhkan dalam kultur jaringan, sehingga tidak memungkinkan terjadinya efek HAMA (*Human Anti Mouse Antibodi*) yang biasa

menyertai pemakaian antibodi yang diproduksi melalui media tikus.

Dalam bidang kedokteran nuklir telah berkembang penggunaan antibodi bertanda radioaktif, baik untuk keperluan diagnosis maupun terapi tumor/kanker. Radionuklida yang biasa digunakan untuk diagnosis antara lain ialah I -131, I -123, I -125, In-111 dan Tc-99m, sedangkan untuk tujuan terapi digunakan I-131, Y-90, Re-186, Re-188, Co-67, Sm-153 dan P-32

PRINSIP PELABELAN ANTIBODI DENGAN TEKNESIUM-99m

Antibodi dapat dilabel dengan radionuklida melalui 2 cara, yaitu cara langsung dan cara tidak langsung.

Metoda langsung (*direct method*)

Antibodi mempunyai beberapa ikatan disulfida (ikatan dicysteine), dan karena karakteristik Tc-99m yang dapat berikatan kompleks dengan gugus tiol (-SH) maka pada proses pelabelan antibodi (Ab) ikatan disulfida harus direduksi terlebih dahulu sehingga menjadi gugus tiol bebas. Pereduksi yang biasa digunakan ialah merkaptoetanol dan stanno klorida.

Selain reduktor diperlukan juga senyawa pengkompleks yang relatif lemah yang disebut co-ligand. Co-ligand diperlukan untuk mengikat Tc-99m, untuk mengurangi

kemungkinan terhidrolisisnya Tc-99m tereduksi menjadi TcO₂ yang berbentuk koloid disebabkan lambatnya reaksi kompleksasi Tc-99m-Ab.

Metoda tidak langsung (*indirect method*)

Antibodi tidak langsung dilabel dengan Tc-99m tetapi menggunakan senyawa ligan penghubung yang disebut *bifunctional chelator* (BFC). BFC mempunyai gugus yang dapat membentuk khelat dengan Tc-99m misalnya gugus -SH, -N₃S, -N₂S₂ atau -P, tetapi juga mempunyai gugus -COOH yang dapat membentuk ikatan amida dengan gugus -NH₂ yang terdapat pada Ab.

Metoda tidak langsung dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu prakonjugasi dan paskakonjugasi. Pada metoda prakonjugasi antibodi direaksikan dengan BFC melalui ikatan amida, kemudian dilakukan pemurnian dengan metoda yang sesuai misalnya dilewatkan pada kolom *size exclusion* atau filtrasi gel, setelah itu dilabel dengan Tc-99m. Pada metoda paskakonjugasi BFC dilabel dengan radionuklida kemudian setelah pemurnian BFC bertanda dikonjugasikan dengan antibodi. Metoda ini memerlukan waktu yang lebih panjang sehingga lebih sesuai digunakan untuk pelabelan menggunakan radionuklida berumur panjang misalnya Re-186, Re-188, Y-90 atau Lu-177.

TAHAPAN PREPARASI

Pelabelan Tc-99m antibodi secara langsung terdiri dari beberapa tahap, yaitu

- Reduksi antibodi menggunakan merkaptoetanol dengan perbandingan molar antibodi terhadap merkaptoetanol 1 : 2000
- Pemurnian melalui kolom Sephadex G-50. Hasil pemurnian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm, dan kadarnya dihitung dari persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi standar Antibodi.
- Pelabelan Ab dengan Tc-99m. Pada pelabelan ditambahkan kit MDP atau pirofosfat sebagai sumber Sn(II) dan ko-ligand dan larutan perteknetat Tc-99m dari generator Mo-99/Tc-99m. Reaksi pelabelan dilakukan pada suhu kamar selama 10 atau 30 menit, kemudian dilakukan analisis kemurnian radiokimia dengan KLT

ANALISIS DALAM RANGKA KENDALI KUALITAS

Analisis kemurnian radiokimia

- HPLC
High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dilakukan menggunakan kolom *size exclusion* (SE) dengan eluen larutan dapar fosfat pH 6 dan detektor UV pada panjang gelombang 280

nm dan detector sinar gamma. SE-HPLC ini juga dilakukan untuk karkterisasi Ab sebelum dilabel. Prinsip pemisahannya berdasarkan perbedaan berat molekul dimana spesi yang berat molekulnya lebih besar akan terelusi lebih awal

- Filtrasi gel

Prinsip kerja filtrasi gel adalah pemisahan berdasarkan berat molekul sebagaimana halnya SE-HPLC, tetapi resolusi pemisahannya tidak sebaik HPLC. Eluen yang digunakan biasanya larutan dapar fosfat pH 6-7, dan hasil elusinya diukur dengan alat pencacah gamma (*gamma counter*).

Filtrasi gel menggunakan kolom Sephadex G-25 selain digunakan untuk pemurnian dapat juga digunakan untuk analisis. Kolom Sephadex G-25 dapat dibuat sendiri atau tersedia pula di pasaran dalam bentuk siap pakai dengan nama dagang PD-10 (Pharmacia).

- Kromatografi Lapis Tipis

Analisis kemurnian radiokimia yang praktis dan digunakan sebagai analisis rutin ialah KLT. Sebagai fasa diam digunakan ITLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel*), sedangkan untuk fasa geraknya digunakan aseton dan larutan dapar sitrat pH 5 atau larutan NaCl

0.9% (salin). Apabila digunakan KLT dengan eluen aseton hanya spesi yang paling polar yaitu Tc-99m bebas (perteknetat) yang akan terelusi, sedangkan apabila digunakan dapar sitrat atau salin spesi yang tidak terlalu polar misalnya Tc-99m-colloid akan terelusi pula. Pada KLT dengan eluen salin atau dapar sitrat Tc-99m Ab akan tetap berada di dasar berimpit dengan Tc-99m koloid. Untuk membedakan Tc-99m-Hynic-IgG dari Tc-99m koloid digunakan elektroforesis kertas. Dari kedua hasil KLT tersebut % Tc-99m Ab dan spesi pengotornya dapat ditentukan.

Kemurnian kimia

Kemurnian kimia dapat dianalisis dengan metoda SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis) dan metoda filtrasi gel (menggunakan kolom Sephadex G-25). Metoda lain yang menggunakan sistim filtrasi gel dengan efisiensi pemisahannya lebih tinggi yaitu Size Exclusion HPLC

- **SDS-PAGE**

Merupakan metoda analisis kemurnian protein menggunakan poliakrilamida gel elektroforesis. Sampel antibodi diletakkan diatas permukaan gel sodium dodecyl sulphate polyacrylamide yang diisikan di antara 2 plat gelas, kemudian diberi

potensial elektrik sehingga protein bermigrasi dengan kecepatan tertentu tergantung pada ukuran dan bentuk molekul. Setelah pemisahan akan terbentuk pita pita protein yang dapat divisualisasi dengan menambahkan zat warna Coomassie Blue. Semakin kecil berat molekul protein semakin jauh terelusi.

- **Filtrasi Gel**

Prinsip pemisahan menggunakan metoda filtrasi gel adalah berdasarkan berat molekul senyawa terlarut, yang mana spesi dengan BM lebih besar akan lebih dahulu keluar dari kolom. Hasil elusi ditentukan kadarnya dengan spektrofotometer UV pada 280 nm.

Uji imunoreaktivitas

Imunoreaktivitas adalah kemampuan berikatan antibodi bertanda dengan antigen dibandingkan dengan antibodi yang tidak bertanda, atau dapat pula dikatakan sebagai ukuran fraksi antibodi bertanda yang dapat berikatan dengan antigen.

Metoda yang dapat digunakan untuk mengukur imunoreaktivitas antara lain ialah ELISA (*Enzym Linked Immunosorbent Assay*) dan RIA (*Radioimmuno assay*).

Uji imunoreaktivitas dengan metoda RIA menggunakan sel tumor sebagai sumber antigen. Caranya adalah dengan menambahkan

sejumlah yang sama antibodi bertanda ke dalam satu seri pengenceran sel (misalnya 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.06 dan 0.03), setelah diinkubasi pada suhu kamar selama 1-2 jam kemudian dilakukan sentrifugasi dan pencucian untuk memisahkan fraksi yang terikat dari yang tidak terikat.

Pada ELISA antibodi yang sudah berikatan dengan antigen diikatkan lagi pada antibodi kedua yang telah mengikat enzim peroksidase, yang mana setelah proses pemisahan (melalui sentrifuga dan pencucian) antibodi yang terikat dengan antigen diwarnai dengan senyawa pewarna untuk peroksidase, misalnya o-fenilendiamin, kemudian intensitas warna kuning yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer

Uji stabilitas dengan metoda *cystein challenge*

Stabilitas antibodi bertanda di dalam tubuh dapat disimulasikan dengan metoda *cystein challenge* yaitu melihat kekuatan molekul antibodi dalam mengikat Tc-99m sehingga Tc-99m tidak mudah ditarik untuk berikatan dengan molekul *cystein*. Caranya ialah dengan menginkubasi antibodi bertanda Tc-99m dalam larutan *cystein* dengan konsentrasi berbeda, misalnya 1, 0.1, 0.01 dan 0.001 mg/ml pada suhu 37°C selama 1 jam. Hasil KLT digunakan untuk membandingkan % Tc bebas yang terkandung dalam sampel,

dengan demikian kekuatan ikatan Tc-99m dalam antibodi dapat diperkirakan.

Uji biodistribusi untuk melihat aspek farmakokinetika antibodi bertanda

Untuk melihat aspek farmakokinetika antibodi bertanda dilakukan uji biodistribusi pada mencit yang sehat. Sediaan radiofarmaka untuk diagnosis diharapkan dapat terekskresi dengan cepat melalui ginjal, sehingga hasil yang baik dari biodistribusi ialah apabila diperoleh akumulasi yang tinggi pada ginjal dan kandung kemih sedangkan akumulasi pada organ lain sekecil mungkin. Pada umumnya radiofarmaka berbasis antibodi terakumulasi di hati, jantung dan ginjal pada hewan normal, akumulasi di hati disebabkan karena molekul antibodi yang relatif besar sedangkan akumulasi di ginjal merupakan hal yang umum karena sebagian besar radiofarmaka diekskresi melalui ginjal. Pemilihan jenis antibodi yang difragmentasi menunjukkan penurunan akumulasi di hati, disebabkan oleh ukuran molekul antibodi yang lebih kecil sehingga dapat memperbesar nilai *T/NT ratio* yaitu perbandingan akumulasi di organ sasaran terhadap yang bukan organ sasaran yang merupakan salah satu ukuran kualitas radiofarmaka.

Model hewan percobaan untuk antibodi bertanda

Untuk melihat pengambilan (*uptake*) antibodi bertanda oleh tumor secara *in vivo*

digunakan model hewan percobaan yang mengidap tumor. Yang paling efektif dalam pemilihan model hewan percobaan adalah *nude mice* yang kekebalan tubuhnya sangat rendah karena tidak mempunyai kelenjar timus sehingga tidak dapat memproduksi T-cell. Untuk menginduksi tumor, sel tumor yang telah dibiakkan dalam medium yang cocok diinjeksikan pada paha *nude mice* dan ditunggu beberapa minggu sampai tumbuh tumor dengan ukuran diameter beberapa mm. Uji biodistribusi dilakukan dengan menginjeksikan antibodi bertanda melalui vena ekor *nude mice*, kemudian dianalisis dengan kamera gamma.

Uji klinis

Untuk keperluan diagnosis tumor tidak diperlukan *uptake* yang tinggi oleh sel tumor, tidak demikian halnya dengan radioterapi dimana diperlukan *uptake* yang cukup tinggi pada target spesifik. Tetapi untuk keduanya diperlukan *uptake* yang sekecil mungkin oleh organ/jaringan yang bukan target. Untuk suatu produk baru diperlukan waktu bertahun-tahun guna memperoleh ijin dari FDA untuk dapat digunakan secara komersial. Untuk produk hasil pengembangan pengujian bisa disederhanakan dengan hanya melakukan uji BABE (*bioavailability* dan *bioequivalency*) yaitu melakukan uji pasien terhadap produk hasil pengembangan bersama-sama dengan produk komersial yang telah terdaftar di

lembaga otoritas dan membandingkan kedua produk tersebut. Di pasaran internasional produk yang sudah beredar antara lain ialah Myoscint (Ab bertanda In-111 untuk penatah infark miokardial), Oncoscint (Ab B72.3 bertanda In-111 untuk penatah tumor payudara dan kolorektal, Proscint (Ab 7E11-C5 bertanda In-111 untuk penatah kanker prostat), CEA-scan (Ab anti-CEA Fab' bertanda Tc-99m untuk penatah kanker kolorektal), Verluma (Ab Fab NR-LU-10 bertanda Tc-99m untuk penatah *small cell lung cancer*) dan Technescan HIG (Human IgG bertanda Tc-99m untuk penatah inflamasi).

KESIMPULAN

Radiofarmaka berbasis antibodi mempunyai prospek yang baik untuk keperluan diagnosis maupun terapi karena dapat mencapai sasaran secara spesifik. Kelemahan radiofarmaka berbasis antibodi adalah dapat terakumulasi pada hati sehingga nilai *T/NT ratio* rendah, tetapi dapat diperbaiki dengan memilih jenis antibodi yang terfragmentasi misalnya F(ab')₂ Anti CEA. Radiofarmaka berbasis antibodi untuk diagnosis lebih cocok dibuat melalui metoda penandaan langsung atau penandaan tidak langsung pra konjugasi karena waktu paruh radionuklidanya yang relatif pendek sehingga membutuhkan sediaan radiofarmaka berbentuk

kit yang dibuat dan disimpan dalam keadaan belum mengandung radionuklida.

DAFTAR PUSTAKA

1. A. WHITE, P. HANDLER, E.L. SMITH, "Principles of Biochemistry", 5th Ed., McGraw Hill Kogakusha, Ltd, pp. 90-108.
2. S.J. MATHER, Radiolabelled Antibody and Peptides, "Textbook of Radiopharmaceuticals : Theory and Practices", 3rd Ed., pp. 63-82.
3. N.R. ROSE, F. MILGROM, C.J. VAN OSS, "Principles of Immunology", 2nd Ed., MacMillan Publishing Co., Inc., pp. 41-63.
4. D.J. HNATOWICH, F. VIRZI, M. FOGARASI, M. RUSCKOWSKI AND P. WINNARD, "Can a Cystein Challenge Assay Predict the *In Vivo* Behavior of Tc-99m-labeled Antibodies?", *Nucl. Med. Biol.* , **1** (01), (1994), pp 1-10.
5. T.M. DAMS, W.J.G. OYEN, O.C. BOERMAN, A.M.J. CLAESSENS, A.B. WYMENGA, J.W.M. VAN DER MEER AND F.H.M. CORSTENS, "Technetium-99m Labeled to Human Immunoglobulin G through the NicotinyI Hydrazine Derivative : A Clinical Study", *J. Nucl. Med.* **39**, (1998),119-124.