

Abteilung Radiopharmazeutische Chemie (E030)

Leiter: Prof. Dr. rer. nat Michael Eisenhut (kommissarisch)

Wissenschaftliche Mitarbeiter

Dr. Joseph Eisenbarth
Dr. Jochen Schuhmacher
Dipl. Chem. Klaus Weber

Dr. Matthias Gilbert (- 7/03)
Dr. Hannsjörg Sinn (- 8/03)
Priv. Doz. Dr. Andreas Wunder

Doktoranden

Apotheker Markus Wolf (5/02-) Qin Wang (- 5/03)

Gastwissenschaftler

Dr. Claudia Bauer (4/02-)

Technische Angestellte

Ulrike Bauder-Wüst (1/02-) Gertrud Golz (- 6/03)
Harald Hauser Heike Marx
Ronald Matys Armin Runz
Hans-Hermann Schrenk (-1/03) Ulrike Wagner-Utermann
Martin Schäfer (FH-Praktikant, 9/03-)
Sascha Endres (FH-Praktikant, 1 - 9/02)
Nicole DiGallo (Azubi,- 6/01) Bettina Helfert (Azubi, 7/02-)
Stefan Rahn (Azubi, 9/02-)

Sekretariat

Angela Celso

Gruppe Funktion

E0301	Radiopharmazie	Dr. J. Eisenbarth und K. Weber
E0302	Immundiagnostika	Dr. J. Schuhmacher
E0303	Wirkstoff-Transporter	Prof. M. Eisenhut
E0304	Neue Radiopharmaka	Prof. M. Eisenhut

Leiter

Die Radiopharmakaherstellung wird unter der Verantwortung von Herstellungsleiter und Kontrolleiter nach GMP-Richtlinien durchgeführt. In diesem Zusammenhang sind die umfangreichen Validierungen von Herstellungs- und Qualitätskontroll-Verfahren zu nennen, die für die Zulassung von [¹⁸F]FDG aber auch für andere Studienpräparate notwendig sind. Hierzu gehören detaillierte Dokumentationen, die den Herstellungsverfahren behördlich geforderte Kontrollstrukturen verleiht.

Die Vision P. Ehrlichs, Antikörper als „Magic Bullet“ bei der Behandlung von Tumorerkrankungen verwenden zu können, wurde von der Nuklearmedizin auch für die onkologische Diagnostik und Therapie aufgegriffen. Die Verwendung von Antikörpern und Antikörperfragmenten als Trägermoleküle von Radioisotopen einzusetzen, hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht. Nach der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern steht jetzt die Entwicklung und Anwendung rekombinanter Antikörper im Vordergrund. Gekoppelt mit dem sogenannten Pretargeting-Verfahren sind interessante Arbeiten entstanden, die klinische Anwendungen auch auf dem therapeutischen Anwendungsgebiet ermöglichen können. Pretargetingstrategien werden insbesondere mit dem Generatorisotop ⁶⁸Ga verfolgt. Außerdem sind im Rahmen von klinischen Prüfungen ⁶⁸Ga markierte Peptide im Einsatz. Die Entwicklung von Trägermolekülen, die über spezifische Anreicherungsmechanismen Radioisotope in Tumorzellen einschleusen, gehört zum Prinzip der nuklearmedizinischen Diagnostik. So ist es nicht verwunderlich, dass aus diesem Forschungsfeld Entwicklungsarbeiten entspringen, die sich mit dem Transport von Wirkstoffen beschäftigen. Erleichternd für diese Forschung kommt die Möglichkeit hinzu, Trägermoleküle zusätzlich mit Radioisotopen zu markieren, um Informationen über die In-Vivo-Eigenschaften der Neuentwicklungen zu erhalten. Ein Projekt, das zu diesem Themenbereich gehört, ist die Verwendung von rezeptoraffinen Peptiden als Transporter von Oligodeoxynukleotiden (ODN). Die Aufnahme in Tumorzellen führt über die rezeptorvermittelte Endozytose zu der ansonsten nur in geringem Umfang stattfindenden Aufnahme von ODN's.

Zu dem Thema „Neue Radiopharmaka“ zählen Arbeiten über die Synthese neuer Nucleoside als Proliferationsmarker von Tumoren. Hier wurden insbesondere neue Markierungsvorläufer synthetisiert, die zur automatisierten Herstellung des neuen Radiopharmakons eingesetzt werden sollen. Schließlich hat für die Behandlung von Tumoren der programmierte Zelltod (Apoptose) eine immer deutlicher erkennbare Funktion. Deshalb wird die Bildgebung dieses zellbiologischen Vorgangs mit der Entwicklung von radiomarkierten Verbindungen angegangen.

In der Abteilung Radiopharmazeutische Chemie werden Arzneimittel entwickelt, die für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie verwendet werden können. Die weitergehende präklinische und klinische Prüfung von neuentwickelten Radiopharmaka wird in Zusammenarbeit mit der Klinischen Kooperationseinheit Nuklearmedizin durchgeführt (siehe E060).

Die Single Photon Emission Tomography (SPECT) und die Positron Emission Tomography (PET) sind bildgebende Verfahren, welche physikalisch kurzlebige Radioisotope gekoppelt mit speziellen Trägermolekülen im Körper orts aufgelöst nachweisen. Die radiomarkierten Trägermoleküle ermöglichen die Anreicherung in z.B. Tumorgewebe und damit die Aufkonzentrierung der anhängenden Radioisotope. Beide Teile, die Radioisotopenproduktion und die Synthese von geeigneten Trägermolekülen, setzen sehr unterschiedliche Arbeitstechniken voraus. Für die eigene Herstellung von Radioisotopen (hier ausschließlich Positronenstrahler) wird ein Zyklotron eingesetzt (siehe auch E020). Die Entwicklung von Trägersubstanzen wird in chemischen Syntheselabors durchgeführt. Die Zusammenführung von beiden Verfahren, die dann zu sogenannten Radiopharmaka führen sollen, findet in speziell ausgerüsteten Laboratorien statt (Strahlenschutzbereich, Reinraum). Die Anwendung neuer Studienpräparate am Patienten ziehen umfangreiche Vorarbeiten nach sich. Zuerst ist ein Genehmigungsverfahren bei der für die Herstellung aufsichtsführenden Behörde zu durchlaufen. Gleichzeitig müssen durch die Medizin Genehmigungsverfahren für die Durchführung klinischer Studien auf den Weg gebracht werden (E060). Die Zeitdauer bis zur Genehmigung beträgt erfahrungsgemäß zusammen ca. 12-18 Monate.

Zur Bearbeitung der hier genannten Aufgaben und wissenschaftlichen Projekte sind vier Arbeitsgruppen aktiv:

Radiopharmazie (E0301)

J. Eisenbarth, K. Weber, H. Marx, A. Runz,
U. Wagner-Utermann

Kooperationen: U. Haberkorn, L. Strauss, J. Debus, alle DKFZ

Der Schwerpunkt der Arbeiten liegt in der Versorgung der Nuklearmedizin mit Tracersubstanzen für die Positronen-emissionstomographie (PET). Im onkologischen Bereich ist PET von hohem Informationsgehalt bezüglich der Tumor- bzw. Metastasenfindung, Tumorstaging, Therapieverlaufs-kontrolle und Rezidiv- bzw. Narbenbeurteilung nach opera-tiven und strahlentherapeutischen Eingriffen. Auch außer-halb des onkologischen Bereichs hat PET ein breites Anwen-dungsspektrum, z.B. in der Kardiologie, Neurologie und Psychiatrie.

Je nach klinischer Fragestellung kommen unterschiedliche Tracer zum Einsatz. Hierbei muss zwischen sogenannten zugelassenen Arzneimitteln und Studienpräparaten unter-schieden werden. Allen Herstellungsverfahren unterliegen „GMP und GLP“-Richtlinien, wie sie z. B. in der Betriebsver-ordnung für pharmazeutische Unternehmen vorgeschrie-ben werden. Zur Erfüllung dieser Richtlinien sind extrem hohe Anforderungen bezüglich der mikrobiologischen Über-wachung sowohl der Produktionsstätte als auch des Her-stellungsprozesses, des Endproduktes und des Herstellungs-personals zu erfüllen.

Die Qualitätskontrolle und Prozessdokumentation werden ebenfalls nach gesetzlichen Vorgaben durchgeführt (Betriebsverordnung, AMG). Die Einhaltung dieser Quali-tätsstandards wird von dem zuständigen Regierungsprä-sidium überwacht. Es kommt bei den von uns hergestell-ten Radiopharmaka erschwerend hinzu, dass die Haltbar-keit bzw. Verwendbarkeit der Arzneimittel durch die Nu-klid-Halbwertszeiten von 3 bis 108 Minuten stark einge-schränkt ist. Außerdem sind Richtlinien für den Strahlen-schutz zu beachten, welche die Strahlenbelastung des Herstellungs-personals so gering wie möglich halten soll. Um alle Auflagen erfüllen zu können, wurde unter hohem Kos-ten- und Personalaufwand ein Produktionsreinraum und ein Abfüllraum der Klasse C gebaut, der mit pharmazeuti-schen Isolatoren der Klasse A ausgestattet ist. In diesem Reinraum werden die PET-Radiopharmaka 2'-[¹⁸F]-fluoro-2'-deoxy-*D*-glucose ([¹⁸F]FDG) und 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]-fluoro-thymidin ([¹⁸F]FLT) hergestellt.

Ein Großteil der Arbeiten dieser Gruppe bestand in der Antragstellung für eine Zulassung von [¹⁸F]FDG beim Bun-desinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Bonn). Dieser Aufwand war nötig geworden, weil die Ab-gabe von [¹⁸F]FDG nicht mehr für Studienzwecke genehm-igt wurde. Obwohl eine Herstellungsgenehmigung vor-handen war, mussten neben der Aufstellung umfangrei-cher Dokumentationen über das Produkt, eine Vielzahl experimentell nachzuweisender Validierungen von Her-stellungs- und Qualitätskontroll-Verfahren durchgeführt werden. Das Volumen des Antrags belief sich auf 20 Ord-ner. Hier wird deutlich, dass der Gesetzgeber zur Vereinfachung der Zulassung von Radiopharmaka für ausschließ-lich eigene Anwendung aktiv werden muss.

Die Forschungsaktivitäten konzentrierten sich auf die Syn-these von Vorläufersubstanzen, deren stereoselektive Mar-kierung mit [¹⁸F]F- das 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluoro-thymidin ([¹⁸F]FLT), einen viel versprechenden neuen Prolifera-tionsmarker ergibt [1]. Im Zuge dieser Arbeiten wurden eine große Anzahl von Vorläufermolekülen synthetisiert, bspw. 5'-*O*-Dimethoxytrityl-*O*,3'-cyclothymidin, 3'-*N*-Boc-

1-(5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-3'-*O*-nosyl-2-deoxy- β -*D*-lyxofuranosyl)thymidin und 1-(3'-*O*-mesyl-2,5'-anhydro- β -*D*-lyxofuranosyl)thymidin [2]. Bisher konnte [¹⁸F]-FLT mit die-sen Precursoren in einer radiochemischen Ausbeute von 18% (EOB) erhalten werden. Das Verfahren wurde für die anstehenden klinischen Studien auf einen automatisierten Syntheseprozess umgestellt.

Die Reinigung von bestrahltem [¹⁸O]Wasser wird routine-mäßig durch Destillation in Anwesenheit von KMnO₄/NaOH durchgeführt. Diese Methode beseitigt die organisch chemi-schen Verunreinigungen nicht vollständig, so dass Proble-me bei der Wiederverwendung des wertvollen [¹⁸O]H₂O auftreten. Es wurde eine elektrolytische Reinigungsmetho-de entwickelt, die eindrucksvolle Ergebnisse zeigte. Nach Bau einer automatisierten Anlage wurde die Apparatur für die Routine in Betrieb genommen [3].

Ein weitere Thema war die Darstellung von markierungsfäh-igen Nucleosiden wie den 5-(2-radiohaloethyl)- und den 5-(2-radiohalovinyl)-2'-deoxyuridinen bzw. den *in vivo* me-tabolisch stabileren 2'-fluoro-2'-deoxyanaloga. Diese Sub-stanzklasse sollten als Reportertracer in der Gen-Therapie mit dem Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase Suizidsystem (HSV-Tk) eingesetzt werden. Dabei wird als „Prodrug“ eine Pyrimidinbase, die mit einer funktionellen Gruppe modifi-ziert ist (z.B. Ganciclovir), durch HSV-Tk und zelluläre Kinasen zum antimetabolisch-wirkenden Agens aktiviert. Dieser Vor-gang führt dann zum Absterben der Zelle. Dasselbe ge-schieht mit dem Reportertracer, der, metabolisch eingefan-gen, Informationen über den Transfektionsgrad der Gen-therapie liefert [4-6].

Publikationen (*= externer Koautor)

- [1] W. Mier*, U. Haberkorn, M. Eisenhut. Editorial: [¹⁸F]FLT; Por-trait of a Proliferation Marker. Eur J Nucl Med. 2002; 29: 165-9
- [2] S.J. Martin, J.A. Eisenbarth, U. Wagner-Utermann, W. Mier*, M. Henze, H. Pritzkow*, U. Haberkorn, M. Eisenhut. A new pre-cursor for the radiosynthesis of [¹⁸F]FLT. Nucl Med Biol, 2002; 29: 263-273
- [3] K. Weber, H. Marx, J. Vierling, U. Wittstadt*, M. Eisenhut. Electrolytic purification of [¹⁸O]water. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: S279, 2003.
- [4] Nader MW, Oberdorfer F. Syntheses of [carbonyl-¹¹C]2-(2-benzoylphenoxy)-*N*-phenylacetamide from [¹¹C]carbon monoxide by the Suzuki and the Stille reactions. Appl Radiat Isot. 2002 Nov;57(5):681-5.
- [5] Yu CS, Oberdorfer F. Synthesis of a novel aldehyde: 4-*O*-methyl-5-formylmethyl-2'-deoxyuridine. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2003;22(1):71-84.
- [6] Yu CS, Eisenbarth J, Runz A, Weber K, Zeisler S., Oberdorfer F. Syntheses of 5-(2-radiohaloethyl)- and 5-(2-radiohalovinyl)-2'-deoxyuridines. Novel types of radiotracer for monitoring cancer gene therapy with PET. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: 421, 2003.

Gallium-68 Peptiddiagnostika (E0302)

J. Schuhmacher, H. Hauser, R. Matys

Kooperationen: Priv.-Doz. Dr. S. Kaul, Prof. Dr. G. Bastert, Uni-versitäts-Frauenklinik; Prof. Dr. H. Mäcke, Abt. für Nuklearmedi-zin, Kantonsspital Basel; Dr. S. Froidevaux, Prof. Dr. A. Eberle, Abt. für Endokrinologie, Kantonsspital Basel; Dr. M. Henze, Prof. Dr. U. Haberkorn, Klinische Kooperationseinheit Nuklearmedizin (E060), Dr. P. Peschke (E050).

Von entscheidender Bedeutung für eine effektive nuk-learmedizinische Tumordiagnostik und Therapie ist die An-wendung spezifischer, radioaktiv markierter Tracer mit ho-her Anreicherung im Zielgewebe bei gleichzeitig schneller

Ausscheidung der Radioaktivität aus den Normalgeweben. Als geeignete Trägermoleküle für eine radioaktive Markierung haben sich regulatorische, niedermolekulare Peptide erwiesen, die sich selektiv an Tumorzellen mit den entsprechenden Rezeptoren binden.

Bei den bildgebenden Verfahren in der nuklearmedizinischen Diagnostik nimmt die Positronenemissionstomographie auf Grund ihrer hohen Empfindlichkeit, ihrer Option zur quantitativen Bestimmung der Aktivitätsverteilung sowie ihrer guten Kontrast- und Ortsauflösung eine besondere Stellung ein. Mit Positronenstrahlern markierte Peptide erscheinen deshalb als erfolgversprechende Radiotracer für eine spezifische Tumordiagnostik mit PET.

Unsere Ansätze für die Darstellung von Tumoren mit PET basieren auf Gallium-Chelatkomplexen, die sich durch eine hohe *In-Vivo*-Stabilität auszeichnen. Diese Komplexe können gebunden an proteolysestabile Peptidhormonanaloga zum Targeting von Tumoren eingesetzt werden. Zur Markierung dieser Komplexe stehen zwei Radionuklide zur Verfügung: Gallium-67 - ein Gammastrahler mit 78 h Halbwertszeit - und Gallium-68 - ein Positronenstrahler mit 68 min Halbwertszeit. Gallium-68 wird durch Elution eines langlebigen Germanium-68/Gallium-68 Radionuklidgenerators hergestellt und ist damit über einen langen Zeitraum permanent verfügbar.

Rezeptordarstellung neuroendokriner Tumoren mit PET

Viele Tumoren neuroendokrinen Ursprungs wie das Pankreas-Ca, Meningiome, kleinzellige Bronchial-Ca oder Karzinome zeigen eine stark erhöhte Expression von Somatostatinrezeptoren. Somatostatin ist ein zyklisches Peptidhormon aus 14 Aminosäuren und wird von neuroendokrinen Zellen sezerniert. Es beeinflusst das zentrale Nervensystem, den Hypothalamus und den Gastrointestinal-Trakt. Darüber hinaus wirkt es inhibitorisch auf die Produktion des Wachstumshormons Somatotropin und besitzt damit eine antiproliferative Wirkung auf rezeptor-positive Tumoren. Als Therapeutikum ist Somatostatin jedoch auf Grund seines raschen enzymatischen Abbaus im Blut ungeeignet und wurde deshalb durch ein Analogon, das wesentlich stabilere Oktapeptid „Octreotide“, ersetzt.

Octreotide besitzt eine hohe Bindungsaffinität für die Typ II und V Somatostatin-Rezeptoren und wird deshalb mit Indium-111-DTPA markiert zum spezifischen Nachweis endokriner Tumoren in der nuklearmedizinischen Diagnostik eingesetzt. Ein Nachteil dieser Methode ist ihre geringe Sensitivität beim Nachweis kleinerer Tumoren (< 2,5 cm), die durch die Verwendung des Gammastrahlers Indium-111 und die damit verbundene Bildgebung mit konventionellen

Gammakameras bedingt ist. Durch Kopplung des makrozyklischen Komplexbildners DOTA an Octreotide entsteht ein Peptidkonjugat (DOTA-Octreotide), das neben Indium-111 mit einer Vielzahl anderer metallischer Radionuklide markiert werden kann.

Wir haben eine schnelle Methode zur Markierung des DOTA-Octreotide mit dem kurzlebigen Positronenstrahler Gallium-68 entwickelt, die > 80% Markierungsausbeute und eine hohe spezifische Aktivität von ca. 20 MBq ⁶⁸Ga/mg Peptid liefert. ⁶⁸Ga-DOTA-Octreotide zeigt eine hohe *In-Vivo*-Stabilität und auf Grund seiner hydrophileren Eigenschaften eine schnellere Clearance von nichtgebundenem Peptid als das ¹¹¹In-DTPA-Octreotide. In einer ersten klinischen Studie werden durch die Klinische Kooperationseinheit (E060) 200 Patienten mit Meningiomen und Karzinomen untersucht, dabei liefert die PET-Szintigraphie ab 60 min p.i. kontrastreiche Darstellungen auch kleinerer Läsionen von 7-8 mm Durchmesser (Abb. 1).

Rezeptordarstellung von Melanomen mit PET

α -Melanozyten stimulierendes Hormon (α -MSH) ist ein Tridekapeptid, das mit hoher Affinität an Melanocortin-Rezeptoren des Typs MC-1 bindet. MC-1 ist einer von insgesamt 5 Rezeptorsubtypen und wird überwiegend von Melanozyten in der Basalschicht der Epidermis exprimiert



Abb. 1: PET-Aufnahme eines 31-jährigen Patienten nach Resektion eines neuroendokrinen Tumors der rechten Niere. Die Pfeile zeigen bis dato unbekannte Metastasen.



Abb. 2: Coronale und transversale PET-Aufnahmen von Mäusen mit subkutan in die rechte Flanke transplantierten B16 F1 Melanomen 1 h nach Injektion von ⁶⁸Ga α -MSH₍₄₋₁₁₎.

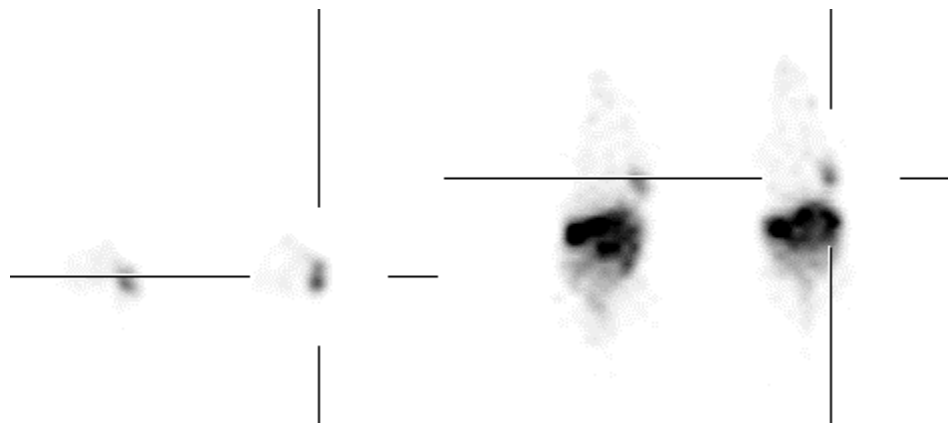
und kontrolliert die Pigmentierung der Haut. Auf Grund der erhöhten MC-1 Expression beim malignen Melanom könnten α -MSH Analoga als spezifische Tracer eine große klinische Bedeutung für die Diagnostik und Therapie, insbesondere von Fernmetastasen, erlangen.

In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Endokrinologie des Kantonspitals Basel wurde ein neues α -MSH Analogon [Nle⁴, Asp⁵, D-Phe⁷, Lys¹¹ (DOTA)] - α -MSH₍₄₋₁₁₎, das nach einem ähnlichen Schema wie das DOTA-Octreotide mit ⁶⁸Ga markiert werden kann, tierexperimentell untersucht. Biokinetische Verteilungsstudien an tumortragenden Mäusen zeigten eine rasche und hohe Tumoranreicherung des ⁶⁸Ga α -MSH₄₋₁₁ bei gleichzeitig schneller renaler Clearance, so dass Tumor-zu-Blut Quotienten von ≥ 15 bereits 1 Stunde nach Applikation erreicht wurden (Abb. 2). Auf Grund seiner geringen Radioaktivitätsretention in den Nieren erscheint dieses Peptid auch für eine therapeutische Anwendung mit Radionukliden geeignet.

Rezeptordarstellung GRP-positiver Tumoren mit Bombesin und PET

Bombesin (BN) ist ein amphibisches Neuropeptid, das aus 14 Aminosäuren besteht und ebenso wie das säugetier-spezifische Gastrin Releasing Peptide (GRP) an humane GRP-Rezeptoren bindet. Neben seiner physiologischen Wirkung auf das ZNS und seiner ebenfalls rezeptorvermittelten Steuerungsfunktion auf die Ausschüttung gastrointestinaler Hormone wirkt BN als autokriner Wachstumsfaktor auf eine Reihe menschlicher Tumoren. Eine Überexpression des GRP-Rezeptors wurde insbesondere bei Pankreastumoren, kleinzelligen Lungen-Carcinomen, sowie dem Prostata- und bei einem großen Teil der Mamma-Carcinome festgestellt. In Zusammenarbeit mit der Abteilung für Nuklearmedizin des Kantonspitals Basel wurde ein neues BN Analogon das DOTA-DOO-BN₍₆₋₁₄₎ mit ^{67/68}Ga markiert und in der Zellkultur sowie im Nacktmaus-Modell untersucht. Die In-vitro-Daten zeigen eine hohe Bindungsaffinität ($K_a = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) und eine schnelle, konzentrationsunabhängige Internalisierung des markierten Peptids verbunden mit einer nur langsamen Radioaktivitätsausscheidung aus der Zelle ($t_{1/2} \sim 15 \text{ h}$). Die Bioverteilung in tumortragenden Nacktmäusen zeigt neben der Anreicherung im Tumor auch eine rezeptorvermittelte Aktivitätsaufnahme im Pankreas und Darm, während Blut und allen anderen Organen nur eine geringe Aktivitätsretention aufweisen (Abb. 3). Trotz dieser erhöhten, physiologischen Aktivitätsverteilung sollten mit Hilfe der PET auch Metastasen im Abdominalbereich, insbesondere des Prostata-Carcinoms, nachweisbar sein.

Abb. 3: Coronale und trans-
versale PET-Aufnahmen A R 42
J tumortragender Nacktmäuse
1 h nach Injektion von
⁶⁸Ga BN₍₆₋₁₄₎. Neben den
Tumoren in der Flanke ist eine
hohe Aktivitätsanreicherung im
Pankreas sowie eine diffuse
Aktivitätsverteilung im Abdo-
minalbereich, hervorgerufen
durch den Darm, sichtbar.



Publikationen (* = externer Koautor)

- [1] Kowalski J, Henze M, Schuhmacher J, *Mäcke HR, *Hofmann M, Haberkorn U. Evaluation of positron emission tomography imaging using ⁶⁸Ga-DOTA-DPhe¹-Tyr³-Octreotide in comparison to ¹¹¹In DTPAOC SPECT. First results in patients with neuro endocrine tumors. *Molecular Imaging and Biology* 2003;5:42-48.
- [2] *Froidevaux S, *Calame-Christe M, Schuhmacher J, *Tanner H, Saffrich R, Henze M, *Eberle AN. A Gallium labeled DOTA- α -Melanocyte-Stimulating Hormone analog for PET imaging of melanoma metastases. *J Nucl Med* 2004; 45: 116-123.
- [3] Henze M, Schuhmacher J, Dimitrakopoulou-Strauss A, Strauss LG, *Mäcke HR, Eisenhut M, Haberkorn U. Exceptional increase of Somatostatin receptor expression in pancreatic neuroendocrine tumour visualized with ⁶⁸Ga-DOTATOC-PET. *Eur J Nucl Med* 2004, 31: 466.
- [4] Henze M, Herfarth K, Schlemmer H, Mohammed A, Mier W, Eisenhut M, Haberkorn U, Debus J, Hoffner S, Haufe S. PET and SPECT for detection of tumor progression in irradiated low-grade astrocytomas: An ROC analysis. *J Nucl Med* 2004,45: 579-586.
- [5] Henze M, Mohammed A, Schlemmer H, Herfarth K, Mier W, Eisenhut M, Debus J, Haberkorn U. Detection of tumor progression in the follow-up of irradiated low grade gliomas: Comparison of Alpha-Methyl-L-Tyrosine- and ^{99m}Tc-Sestamibi SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29:1455-61.
- [6] Henze M, Mohammed A, Mier W, Nollert J, Rudat V, Dietz A, Eisenhut M, Haberkorn U. Pretreatment Evaluation of the Hypopharynx and Larynx Carcinoma with ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose (FDG), ¹²³I-[Alpha]-Methyl-Tyrosine (IMT) and ^{99m}Tc-Sestamibi (MIBI). *Eur J Nucl Med* 2002; 29: 324-330.
- [7] Brix G*, Bellemann ME, Hauser H, Doll J. Recovery coefficients for the quantification of the arterial input functions from dynamic PET measurements: experimental and theoretical determination] *Nuklearmedizin*. 2002; 41(4): 184-90.

Wirkstofftransporter: HSA-Konjugate (E 0303)

H. Sinn, A. Wunder, H.H. Schrenk

Kooperationen: E. Frei, F. Kießling, T. Haase, U. Zillmann alle DKFZ; P. Kremer, Neurochirurgie, Univ. Heidelberg; T. Egelhof, Neuroradiologie Univ. Essen; M. Becker Augenklinik, Univ. Heidelberg; C. Fiehn, T. Möhler und R. Max, alle Univ. Heidelberg, Poliklinik V; G. Hartung III. Med. Klinik, Univ. Klinik Mannheim jetzt Univ. Rostock; G. Stehle I. Med. Klinik, Univ. Klinik Mannheim; E.H.K. Stelzer, EMBL Heidelberg;
Industrie: Klinge Pharma GmbH, München; Orpegen, Heidelberg.
Zusatzfinanzierung: Mittel aus dem Technologietransfer an die Fa. Klinge Pharma GmbH

Ein Schwerpunkt in den Arbeiten auf dem Gebiet der Wirkstofftransporter lag in der Vergangenheit auf der Entwicklung neuer humaner Serum Albumin (HSA) Konjugate mit zytostatisch wirksamen Verbindungen. Nach der erfolgreichen Synthese von Methotrexat-HSA und dessen Einsatz bei experimentellen und klinischen Ansätzen wur-

den kürzlich Aminopterin, cis-Platin und Ellipticin an HSA ankonjugiert. Erste tierexperimentelle Untersuchungen, solide Tumore mit Aminopterin-HSA zu behandeln, ergaben eine hohe Wirksamkeit dieses neuen Albumin-Konjugats [1].

Ein weiterer Ansatz ist die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoff-Albumin Konjugaten zur diagnostischen Unterstützung des Neurochirurgen bei der Operation von Hirntumoren. Klinische Erprobungen zeigten eindrucksvoll das Potenzial dieser Verbindung in der Neurochirurgie. Daraus wurde eine Phase-I/II Studie mit Aminofluorescein-HSA entwickelt und in Heidelberg zur Genehmigung eingereicht.

In den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis reichert sich Methotrexat-HSA an. Im Vergleich zu Methotrexat allein zeigte das Methotrexat-HSA-Konjugat eine signifikant höhere Anreicherung in den entzündeten Bereichen bei geringerer Akkumulation in Leber und Nieren. Bei der Behandlung eines Arthritis-Tiermodells war das Konjugat daher wirksamer als Methotrexat allein. Es scheint daher ein interessantes Anti-Arthritis-Medikament vorzuliegen, das einer klinischen Prüfung bedarf [2-5].

HSA-Konjugate mit Metallkomplexen wurden als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MR) hergestellt und im Tierexperiment getestet. Dazu gehört die Ermittlung biokinetischer Daten und Bestimmung der Organverteilung, die z.Z. in Heidelberg und Essen durchgeführt werden. Ziel dieser Experimente ist es, kontrastreiche Darstellung solider Tumore, deren Metastasen und sogenannter Sentinel Lymphknoten. Letztgenannte sind Wächter-Lymphknoten, die den Lymphabfluss in der nächsten Nähe eines Tumors kontrollieren [6-9].

Publikationen (* = externer Koautor)

[1] Kremer P*; Hartung G*; Bauder-Wüst U; Schrenk HH; Wunder A; Heckel S; Zillmann U; Sinn H: Efficacy and tolerability of an aminopterin-albumin conjugate in tumor-bearing rats. *Anti-Cancer Drugs*, 13 (2002) 615-23.

[2] Fiehn C*, Wunder A, Krienke S*, Max R*, Ho AD*, Moehler T*: Lack of evidence for inhibition of angiogenesis as a central mechanism of the antiarthritic effect of methotrexate. *Rheumatol Int.* 2003 Nov 15 [Epub ahead of print].

[3] Wunder A, Müller-Ladner U*, Stelzer EH*, Funk J*, Neumann E*, Stehle G*, Pap T*, Sinn H, Gay S*, Fiehn C*: Albumin-based drug delivery as novel therapeutic approach for rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2003 May 1;170(9):4793-801.

[4] Fiehn C*, Neumann E*, Wunder A, Krienke S*, Ho AD*, Gay S*, Schölmerich J*, and Müller-Ladner U*: Methotrexate (MTX) and albumin-coupled MTX (MTX-HSA) suppress synovial fibroblast invasion and cartilage degradation *in vivo*. *Ann. Rheum. Dis.* 2004 (in press)

[5] Wunder A, Grimm J*, Müller-Ladner U*: Molecular imaging in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol.* 2003;62 Suppl 2:II33-II36.

[6] Kiessling F; Fink C; Hansen M; Bock M; Sinn H; Schrenk HH; Krix M; Egelhof T; Fusenig NE; Delorme S: Magnetic resonance imaging of nude mice with heterotransplanted high-grade squamous cell carcinomas: Use of a low-loaded, covalently bound Gd-HSA conjugate as contrast agent with high tumor affinity. *Investigative Radiology*, 37 (2002) 193-198.

[7] Weigand M; Hartung G*; Roboz J*; Sieger S; Wolf M*; Sinn H; Schrenk HH; Wiessler M; Frei E: *Anti-Cancer Drug Design*, 16 (2002) 227-237.

[8] Grimm J*, Potthast A*, Wunder A, Moore A*: Magnetic resonance imaging of the pancreas and pancreatic tumors in a mouse orthotopic model of human cancer. *Int J Cancer.* 2003 Sep 20;106(5):806-11.

[9] Vajkoczy P*; Farhadi M*; Gaumann A*; Heidenreich R*; Erber R*; Wunder A; Tonn JC*; Menger MD*; Breler G*: Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiotensin-2. *Journal of Clinical Investigation*, 109(6) (2002) 777-785.

Neue Radiopharmaka (E0304)

M. Eisenhut, J. Eisenbarth, K. Weber, U. Wagner-Utermann, C. Bauer, M. Wolf, Q. Wang, M. Gilbert

Kooperationen: U. Haberkorn, P. Krammer, H. Weyd DKFZ; W. Mier und A. Mohammed, Univ-Klinikum Heidelberg; A. Mahmood, A. Jones, M. Friebe, Harvard Medical School, Boston, USA; M. Little, S. Knackmuss, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg; A. Popkov, University of South Bohemia, Tschechische Republik. Zusatzfinanzierung: Tumorzentrum Heidelberg/Mannheim

Unter dem breitgefassten Titel „Neue Radiopharmaka“ wurden Entwicklungsarbeiten durchgeführt, die in die vier Themenbereiche aufgeteilt sind: a. die nuklearmedizinischen Bildgebung des „Programmierten Zelltods“ (Apoptose), b. radioiodierte und ^{99m}Tc-markierte Benzamide für die Melanomdiagnostik, c. Zytostatika-Benzamidkonjugate für die zielgerichtete Behandlung von Melanommetastasen, d. somatostatinrezeptoraffine Liganden für den Oligodesoxynukleotidtransport in Tumorzellen, e. Konjugationschemie und f. Verschiedenes.

Als Anwendungsbereich eines potentiellen Radiopharmakons für die PET- oder SPECT-Darstellung von Apoptose ist die onkologische Therapiekontrolle und Gewebeschämie in z.B. Herz oder Gehirn anzusehen. Caspasen, eine Reihe proteolytisch wirkender Enzyme, haben eine Schlüsselrolle inne und sind deshalb als ein Zielmolekül für die Apoptose-Bildgebung ausgewählt worden. Caspasen wirken innerhalb der intrazellulären Signalkaskade und liegen vermehrt nur während der Apoptose in aktivierter Form vor.

In einem ersten Versuchsansatz wurde daher Benzyl-oxycarbonyl-Val-Ala-DL-Asp(O-methyl)-fluoromethylketon [Z-VAD-fmk], ein Pan-Caspase-Inhibitor, der irreversibel an aktivierte Caspasen bindet, als potentieller Apoptotracer untersucht. Wegen der grundsätzlichen Nachteile einen Enzyminhibitor für die Bildgebung zu nehmen (Sättigung), wurde die Entwicklung auf peptidische Caspasesubstrate gerichtet. Enzymsubstrate haben den Vorteil die spezifisch aktivierten Enzyme nicht zu blockieren. Es wurde eine Reihe von Peptiden mit den Erkennungssequenzen DEVDG und NQVNG synthetisiert. Die C- und N-terminalen Modifikationen sahen verschiedene ^{99m}Tc-Liganden, ¹³¹I-Gruppen und peptidische Transportersequenzen vor [1].

Die frühzeitige Lokalisation von Metastasen ist für die Behandlung des aggressiv wachsenden Melanoms von großer klinischer Bedeutung. Seit längerem wird daher an der Entwicklung neuer Radiopharmaka gearbeitet, welche den spezifischen Nachweis von Melanommetastasen mit nuklearmedizinischen Methoden ermöglichen. In der Vergangenheit wurden radioiodierte Benzamide entwickelt, welche neben hoher Melanomaffinität eine für die Bildgebung günstige Pharmakokinetik im Untergrundgewebe zeigten. Der erzielte Fortschritt lag in dem wesentlich verbesserten szintigraphischen Bildkontrast. Weitere Arbeiten zeigten, dass sich die Melanomaufnahme mit der Einführung von verschiedenen Substituenten deutlich steigern ließ.

Die viel versprechenden Eigenschaften dieser Verbindungsklasse wurden auf ^{99m}Tc-Komplexe übertragen. Die Vorteile der ^{99m}Tc-Chemie sollten zusammen mit den günstigen physikalischen Eigenschaften und den vergleichsweise ge-

ringen Tracerkosten der klinischen Melanomdiagnostik zuzugute kommen. Dazu wurden N_2S_2 - bzw. N_3S -Liganden synthetisiert, die einerseits vom sogenannten BAT-Ligandentyp sind [BAT: Bis(aminoethanethiol)] und andererseits auf dem DADS-Ligandentyp basieren (DADS: Diamidodisulphydryl). Beide Ligandentypen bilden mit Tc(V) stabile Komplexe, die als ^{99m}Tc -BAT-Komplexe ungeladen und als ^{99m}Tc -DADS-Komplexe negativ geladen sind. In Anlehnung an die aus eigenen Vorarbeiten gewonnene Erkenntnis, dass die 2-Dimethylaminoethylgruppe ein für die Melanomaufnahme optimales Strukturelement radioiodierter Benzamide darstellt, wurden die Synthesen der Liganden ausschließlich mit dem Pharmakophor N-(2-diethylaminoethyl)benzamid vorgenommen. Neben den oben genannten Liganden wurde auch die Hydrazinonicotinsäure (HYNIC) an 2-Diethylaminoethylamin konjugiert und mit dem Koliganden Tricin an Tc(V) komplexiert. Einer der ^{99m}Tc -Komplexe, der mit dem Liganden 4-(S-benzoyl-2-thioacetyl-glycyl-glycyl-amido)-N-(2-diethylaminoethyl)benzamid erhalten wurde, zeigte die bisher höchsten Anreicherung in dem murinen B16 Melanom/C57Bl6-Maus-Modell [2-4].

Durch die außerordentlich hohe Anreicherung in B16 Melanomen sollte geprüft werden, ob N,N-(Dialkylamino)benzamide (BA) als Transporter von zytotoxischen Substanzen geeignet sind. Der Anlass für dieses Vorhaben basierte auf experimentellen Ergebnissen, bei denen keine Sättigung bei der Melanomaufnahme von radioiodierten BA beobachtet wurde, obwohl sich die spezifische Aktivität der Substanzen verringerte. Die hohe Transportkapazität von BA erschien daher für die zielgerichtete Einschleusung von zytotoxischen Verbindungen attraktiv. Es zeigte sich, dass BA als niedermolekulare, melanomaffine Träger-substanzen für Zytostatika in Betracht kommen, weil sie sich in B16-Melanomzellen besser anreichern als die unveränderten Zytostatika. Es wurde jedoch beobachtet, dass durch Konjugation die Wirkung von CA auf andere Tumorzellen ebenfalls verstärkt wurde. Unklar ist, wie sich die Konjugate auf Normalgewebe auswirken. Es sind daher Therapieexperimente mit melanomtragenden Mäusen vorgesehen, um Aufschluss über die Wirksamkeit und das *In-Vivo*-Targeting zu erhalten [5].

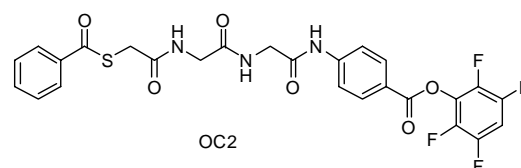
In einem weiteren Projekt wurden Octreotid-Oligonukleotid-Konjugate untersucht, die einerseits ein Oligonukleotid enthalten, dessen Sequenz einer intrazellulären Nucleinsäuresequenz komplementär ist (z.B. mRNA) und andererseits ein Peptid enthalten, das an dem Somatostatinrezeptor bindet. Die Idee, die sich dahinter verbirgt, ist die Ausnutzung der nach Bildung des Rezeptor/Liganden-Komplexes stattfindenden Endozytose für die intrazelluläre Einschleusung von Oligonucleotidsequenzen. Oligonucleotide werden bekanntermaßen nur schlecht durch Zellmembranen transportiert. Der rezeptoraffine Teil dieses Konjugats stellt eine zielgerichtete Aufnahme sicher, welche die Therapie von Tumoren gewährleistet, bei denen der Somatostatin-Rezeptor (SSTR) überexprimiert wird.

Für die Nucleinsäuresequenz des Konjugats wurde beispielhaft das Protoncogen Bcl-2 ausgesucht, das durch die t(14;18) Translokation in B-Zell-Lymphomen überexprimiert ist. Dieser Tumortyp enthält auch vermehrt Somatostatinrezeptoren und könnte daher für eine Therapie mit Octreotid-Oligonukleotid-Konjugaten zugänglich sein. Die Bemühungen, mit Octreotid-Oligonukleotid-Konjugaten die Antisense-therapie zu verbessern, erscheinen aussichtsreich, da diese Moleküle trotz der molekularen Größenunterschiede zwischen dem Peptid- (ca. 1.200 Da) und Oligonukleotidteil

(ca. 8.000 Da) sowohl stark rezeptoraffin sind, als auch unveränderte Hybridisierungseigenschaften zeigen [6].

In diesem Zusammenhang wurden auch eine Reihe von Modifikationen an dem Somatostatin-Rezeptor-Liganden Octreotat durchgeführt. Dabei wurden die C- und N-terminalen Modifikationen systematisch untersucht [7-10].

Heterobifunktionelle ^{99m}Tc Liganden stellen wichtige Werkzeuge für die Antikörpermarkierung nach der „Precomplexation Route“ dar. Es wurde daher ein Ligand synthetisiert, der ausreichende Stabilität aufweist, um ihn mit ^{99m}Tc komplexieren zu können, ohne dass die labile Konjugationsgruppe inaktiviert wird. Es wurde mit dem Liganden 2,3,5,6-Tetrafluorphenyl N-(S-benzoylthioacetyl)glycylglycyl-p-aminobenzoate (OC2) >60% des ^{99m}Tc -Komplexes erhalten.



^{99m}Tc -OC2 wurde in ungetragener Form mit dem monoklonalen Antikörper mAb425 in hoher Ausbeute erhalten. Im Vergleich zu den bislang beschriebenen Methoden, die eine *In-Situ*-Aktivierung der ^{99m}Tc -Komplexe vorsehen, stellt das Verfahren, das zu diesem Komplex führt eine deutliche Verbesserung dar [11]. Verschiedene andere Konjugationsmethoden, die für die Chelatorkonjugation an Peptide nützlich sind, wurden ebenfalls entwickelt. Unter anderem konnte ein 4-Nitrophenyl-mono-Ester des Liganden DOTA hergestellt werden, der als vielseitiges Syntheton für N-terminale Peptidkonjugation eingesetzt werden kann [12-15].

Es existieren nur wenige Berichte über die asymmetrische Synthese von ^{11}C markierten α -Methyl-aminosäuren. Im Rahmen einer Kooperation wurde ein Ni(II) Komplex aus der Schiffschen Base (S)-N-benzylproline-(2-benzoylphenyl)-amide (BPB) und α -Phenylalanin hergestellt. Die [^{11}C]Methylierung verlief wie erwartet wegen sterischer Behinderung mit einer vergleichsweise geringen radiochemischen Ausbeute und führte zu einer Mischung diastereomerer α -[^{11}C]methylDOPA Komplexe, die über die HPLC auftrennbar waren [16].

Nitroimidazole werden außer als Antibiotika und Strahlensensitizer seit einigen Jahren auch als mögliche Tracer zur Darstellung hypoxischer Gewebe evaluiert. Die zumindest theoretische Möglichkeit, hypoxische Gewebe als mehrspeichernd szintigraphisch darzustellen, ist für eine klinische Anwendung sehr interessant. Vor allem bei kardiovaskulären Erkrankungen treten Gewebhypoxien im Rahmen ischämischer Ereignisse auf, die auch das wesentliche diagnostische Problem der kardiologischen Nuklearmedizin darstellen. Der in der Abteilung Radiochemie entwickelte Technetium-Komplexbildner BAT (bis-Aminoethanethiol) wurde mit einer 2-Nitroimidazolgruppe (NI) gekoppelt. Der daraus resultierende Komplex $^{99m}\text{TcO}(\text{BAT-NI})$ wurde mit den Vergleichstracern $^{99m}\text{TcO}(\text{BAT-I})$ (ohne Nitrogruppe), $^{99m}\text{TcO}(\text{BAT-Br})$ (ohne NI-Gruppe) und ^{125}I -NI (Tracer ohne ^{99m}TcO -BAT) systematisch *in vivo*, in klinisch relevanten Modellen myokardialer Ischämie, durch Autoradiographie, planare Szintigraphie, Organverteilungsstudien und HPLC untersucht. Nachdem Vorbefunde eine Anreicherung von $^{99m}\text{TcO}(\text{BAT-NI})$ im ischämischen Rand experimenteller Myokardinfarkte *in vivo* gezeigt hatten, konnten weitere Un-

tersuchungen nach Ausdehnung des ischämischen Areals auf größere Myokardabschnitte erfolgen. Dazu wurde ein low-flow Ischämiemodell entwickelt, bei dem über repetitive Messungen der Gewebepерfusion mit der Wasserstoff-Clearance Technik eine über 90 min etwa konstante, ca. 50 prozentige Minderung des myokardialen Blutflusses induziert wurde. In diesen experimentellen Ischämien läßt sich die Speicherung von ^{99m}Tc (BAT-NI) mit dem Parameter myokardialer Blutfluß korrelieren [17,18].

Publikationen (* = externer Koautor)

- [1] W. Mier*, J. Hoffend*, U. Haberkorn and M. Eisenhut. Current strategies in tumor-targeting. In "Apoptotic Pathways as Targets for Novel Therapies in Cancer & Other Diseases" (Eds. Spencer B. Gibson, Marek Los). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, Boston, London. 2004, in press.
- [2] Z. Cheng*, A. Mahmood*, D. Kramer*, M. Friebe*, C. Bolzati*, M. Eisenhut, A. Davison*, A. G. Jones*. ^{99m}Tc -Labeled compounds with high melanoma affinity: Evaluation in subcutaneous and metastatic tumor models. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: S400, 2003.
- [3] A. Mahmood*, Z. Cheng*, H. Li*, D. Kramer*, M. Eisenhut, A. Davison*, A. G. Jones*. *N,N*-Diethylaminoethyl-benzamide-containing amine-amide-dithiol ^{99m}Tc -complexes (AADT) with melanoma affinity. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: S399, 2003.
- [4] M. Eisenhut, A. Mohammed*, W. Mier*, M. Friebe*, A. Mahmood*, A. G. Jones*, U. Haberkorn. Melanoma Affine ^{99m}Tc Complexes Comprising the *N*-(2-diethylaminoethyl)benzamide Structure Element. J Med Chem, 2002; 45: 5802-5805.
- [5] M. Wolf, U. Bauder-Wüst, A. Mohammed*, F. Schönsiegel, W. Mier*, U. Haberkorn, M. Eisenhut. Alkylating benzamides with melanoma cytotoxicity. Melanoma Res 2004; in press.
- [6] W. Mier*, R. Eritja*, A. Mohammed*, U. Haberkorn, M. Eisenhut. Peptid-PNA-Konjugate: gezielter Transport von Antisense-Oligonucleotiden in Tumoren. Angewandte Chemie, 42:1968-1971, 2003
- [7] K. Graham*, Q. Wang, U. Haberkorn, M. Eisenhut, W. Mier*. Synthesis and evaluation of C-terminally modified derivatives of Tyr³-Octreotate. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: S71, 2003.
- [8] Graham K.A.N. *, Wang Q., Eisenhut M., Haberkorn U., Mier W*. A general method for functionalising both the C- and N-terminals of Tyr₃-octreotate. Tetrahedron Letters 43 (2002) 5021-5024.
- [9] Q. Wang, K. Graham*, T. Schauer*, T. Fietz, A. Mohammed*, U. Haberkorn, M. Eisenhut, W. Mier*. Pharmacological properties of hydrophilic and lipophilic derivatives of octreotate. Nucl Med Biol 2004, 31: 21-30.
- [10] K. Graham*, Q. Wang, U. Haberkorn, M. Eisenhut, W. Mier*. Synthesis of DOTATATE derivatives with an intercalating moiety. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: S259, 2003.
- [11] O. Calderon Sanchez*, A. Mohammed*, W. Mier*, K. Graham*, J. Schuhmacher, S.O. Arndt*, U. Haberkorn, R. Mocelo* and M. Eisenhut. 2,3,5,6-Tetrafluorophenyl *N*-(*S*-benzoylthioacetyl)glycylglycyl-p-amino-benzoate, a heterobifunctional ^{99m}Tc ligand for precomplexed antibody labeling. Bioconjugate Chem 2003, 14: 1209 – 1213.
- [12] O. Calderon Sanchez*, A. Mohammed*, W. Mier*, K. Graham*, U. Haberkorn and M. Eisenhut. Synthesis, protein Synthesis, ^{99m}Tc Complexation and Protein Conjugation of 2,3,5,6-Tetrafluorophenyl *N*-(*S*-benzoylthioacetyl)glycylglycyl-p-amino-benzoate. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: S247, 2003.
- [13] Mier W*, Hoffend J*, Schuhmacher J, Eisenhut M, Haberkorn U. Conjugation of DOTA using isolated phenolic active esters: the labeling and biodistribution of albumin as blood pool marker. Bioconjugate Chemistry 2004; in press.

[14] R. Repp*, H.H. van Ojik*, T. Valerius*, G. Groenewegen*, G. Wieland*, C. Oetzel*, M. Eisenhut, B. Stockmeyer*, W. Becker*, H. Steininger*, Y.M. Deo*, G.H. Blijham*, J.R. Kalden*, J.G.J. van de Winkel*, M. Gramatzki*. Phase I clinical trial of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-FcγRI x anti HER-2/neu) in combination with Filgrastim (G-CSF) for treatment of advanced breast cancer. Brit J Cancer 2003, 89: 2234-2243.

[15] S. Wagner, R. Eritja*, M. Zuhayra, F. Oberdorfer, A. Mohammed*, W. Mier*, U. Haberkorn and M. Eisenhut. Synthesis and Properties of Radiolabeled CPTA-Oligonucleotides. J labelled Comp Radiopharm 46: 175-186 (2003).

[16] A. Popkov*, M. Nádvořník*, P. Kružberská*, A. Lyèka*, M. Eisenhut, N.M. Gillings*. Asymmetric synthesis of ^{11}C -labelled α -methyl amino acids via metallocomplex chiral synthons. J. labelled Comp. Radiopharm. 46: S227, 2003.

[17] J. Hoffend*, G. Linke*, A. Mohammed*, C.P. Tiefenbacher*, M. Eisenhut, U. Haberkorn. ^{99m}Tc (BAT-NI), a novel nitroimidazole tracer: *in vivo* uptake studies in ischemic myocardium. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003; 30, 494-501.

[18] M. Eisenhut. Nuklearmedizinische Schmerztherapie. In AINS, H Beck, E Martin, J Motsch, J Schulte am Esch (Eds); Band 4 "Schmerztherapie" Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2002: 538-553.

[19] M. Eisenhut, W. Mier*. Radioiodination chemistry and radioiodinated compounds. In "Handbook of Nuclear Chemistry" (A. Vertes, S. Nagy, Z. Klencsar, Eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, Boston, London. 2003, 257 – 278.