

Chelator-konjugierte Bisphosphonate: Synthese, Radiomarkierung und *in vivo*-Evaluierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Nina Pfannkuchen

geboren in Mainz

Mainz, im Dezember 2017

Zusammenfassung

Die Behandlung von Krebserkrankungen stellt vor allem aufgrund der immer weiter steigenden Patientenzahlen eine der größten medizinischen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts dar. Brust- und Prostatakrebs zählen dabei zu den häufigsten Krebsarten. Eine schwerwiegende und mit hoher Wahrscheinlichkeit auftretende Folge dieser Erkrankungen ist die Metastasierung des Primärtumors in das Knochengewebe, welche immense Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten hat.

Für die Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte verschiedene Radiopharmaka entwickelt. Hierzu zählen Konjugate aus makrozyklischen Chelatoren und knochenaffinen Bisphosphonaten. So zeigte eine der ersten Verbindungen dieser Klasse, das BPAMD, positive Ergebnisse in der Anwendung am Patienten in Kombination mit dem PET-Nuklid ^{68}Ga sowie dem Therapienuklid ^{177}Lu . Die Weiterentwicklung der BPAMD-Leitstruktur lieferte das DOTA^{ZOL} , das eine erhöhte Affinität zum Knochen aufweist. Die Optimierung und Weiterentwicklung dieses Konzepts der Chelator-konjugierten Bisphosphonate war das grundlegende Ziel dieser Arbeit. Die Evaluierung eines dem DOTA^{ZOL} -analogen NODAGA-Derivats hinsichtlich der Radiomarkierung mit ^{68}Ga sowie des Verhaltens *in vivo* lieferte die Grundlage für die Verwendung von $\text{NODAGA}^{\text{ZOL}}$ als diagnostischer Teil des theranostischen Molekülpaars $\text{DOTA}^{\text{ZOL}}/\text{NODAGA}^{\text{ZOL}}$. Im Vergleich zum DOTA -Derivat vereinfacht es die Radiomarkierung mit ^{68}Ga deutlich und zeigte in PET-Aufnahmen sowie Biodistributionsstudien eine höhere Knochenanreicherung sowohl als ^{68}Ga - als auch als ^{64}Cu -Komplex.

Da mit der Gruppe der PSMA-Liganden weitere Tracer existieren, die sich in Knochenmetastasen als Folge des Prostatakarzinoms anreichern, wurden bekannte Vertreter beider Klassen, PSMA-11 und NO2AP^{BP} , hinsichtlich ihrer Anreicherung an Knochenmetastasen in zwei Patienten verglichen. Hierbei zeigte das Bisphosphonat eine im Schnitt deutlich bessere Anreicherung. Um die Vorteile beider Targeting-Strukturen vereinen zu können und eine maximal mögliche Akkumulation in den Zielregionen zu erreichen, wurde schließlich ein Bisphosphonat-PSMA-Konjugat erfolgreich synthetisiert und radiomarkiert. In ersten *in vivo*-Evaluierungen in gesunden Ratten und tumortragenden Mäusen konnte dieser Tracer sein Potential unter Beweis stellen. Er zeigte sowohl eine Anreicherung im Tumor als auch die bekannte Anreicherung der Bisphosphonate in den hochmetabolischen Epiphysenfugen.

Zuletzt wurde das bereits in Kombination mit ^{68}Ga und ^{177}Lu evaluierte DOTA^{ZOL} erstmals zur Komplettierung des α -Emitters ^{225}Ac verwendet. Die Etablierung der Radiomarkierung und erste *in vivo*-Untersuchungen in gesunden Ratten legten den Grundstein für die Verwendung dieses hochpotenten Tracers in der α -Therapie. Die Ergebnisse der Biodistributionsstudien wiesen darauf hin, dass sich das *in vivo*-Verhalten des ^{225}Ac -markierten Derivats kaum von dem der anderen beiden radiomarkierten Derivate unterscheidet.

Abstract

The treatment of cancer is one of the major challenges in the 21st century's medicine, especially with regard to the increasing number of cancer cases worldwide. Prostate and breast cancer are amongst the most common types of cancer. A serious and most likely occurring consequence of these diseases is the metastatic spread of the primary tumor to the bone which dramatically reduces the patients' quality of life.

Over the last few decades, various radiopharmaceuticals have been developed for diagnosis and therapy of bone metastases, for example conjugates of macrocyclic chelators and bisphosphonates which own a natural affinity to bone material. One of the first compounds in this class of bone-seeking radiopharmaceuticals, BPAMD, showed positive results in applications in patients in combination with the generator derived PET nuclide ^{68}Ga and the therapeutic nuclide ^{177}Lu . Further development of this lead structure provided DOTA^{ZOL} which demonstrated a higher bone affinity compared to BPAMD. Essential objective of this thesis was to enhance and optimize this concept of chelator-conjugated bisphosphonates. Evaluation of a NODAGA based DOTA^{ZOL} analog regarding radiolabelling and *in vivo* behavior was the first step towards application of NODAGA^{ZOL} as diagnostic part of the theranostic pair DOTA^{ZOL}/NODAGA^{ZOL}. The new derivative simplifies radiolabelling with ^{68}Ga compared to DOTA^{ZOL} and exhibited an increased bone accumulation in small animal PET and biodistribution studies in combination with ^{68}Ga as well as ^{64}Cu .

Owing to the fact that PSMA ligands also show accumulation in bone lesions as a consequence of prostate cancer, representative compounds of both types of radiopharmaceuticals, PSMA-11 and NO2AP^{BP}, were compared regarding their diagnostic abilities in two prostate cancer patients. On average, the bisphosphonate showed a distinctly higher accumulation in the same metastases. To take advantage of both targeting structures and to reach the best possible accumulation in the target tissue, a bisphosphonate-conjugated PSMA ligand was successfully synthesized and radiolabelled with ^{68}Ga . During first *in vivo* evaluations in healthy rats and tumor bearing mice the potential of this dual targeting was proved. The tracer showed accumulation in the tumor as well as in the high metabolic epiphyseal plates which is known for bisphosphonates.

Finally, DOTA^{ZOL}, which has already been evaluated in combination with ^{68}Ga and ^{177}Lu , was used for complexation of the α -emitter ^{225}Ac for the first time. Radiolabelling was established and the ^{225}Ac -complex was examined *in vivo* in healthy rats to provide a basis for a possible application of this promising tracer for α -therapy. The results of the *ex vivo* biodistribution studies hardly indicate any differences between the *in vivo* behavior of the ^{225}Ac -labelled derivative compared to the already known ^{68}Ga - and ^{177}Lu -labelled tracers.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Aufbau des Knochens	2
1.2. Knochenmetastasen	3
1.2.1. Entstehung von Knochenmetastasen	3
1.2.2. Bedeutung von Knochenmetastasen für den Patienten	5
1.2.3. Diagnose	5
1.2.4. Therapie	11
1.3. Bisphosphonate	12
1.3.1. Struktur und Wirkweise	12
1.3.2. Bisphosphonate in der Nuklearmedizin	14
1.4. Das prostataspezifische Membranantigen	16
1.4.1. Diagnose des Prostatakarzinoms	16
1.4.2. Das prostataspezifische Membranantigen in der Nuklearmedizin	17
1.5. Radiometalle für die nuklearmedizinische Anwendung	18
1.5.1. Radiometalle für die Diagnostik	19
1.5.1.1. Gallium-68	21
1.5.1.2. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator	22
1.5.2. Radiometalle für die Therapie	24
1.5.2.1. Lutetium-177	26
1.5.2.2. Actinium-225	27
2. Problemstellung und Zielsetzung	38
3. Manuskripte	45
3.1. ^{68}Ga- und ^{177}Lu-markierte Bisphosphonate als Knochenmetastasen-Theranostika	47
3.2. Novel radiolabelled bisphosphonates for PET diagnosis and endoradiotherapy of bone metastases	65
3.3. NODAGA^{ZOL} and DOTA^{ZOL} for theranostics of bone metastases	87

3.4. Comparison of uptake parameters of [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in prostate cancer patients expressing bone metastases	105
3.5. Synthesis, radiolabelling and first <i>in vivo</i> evaluation of a DOTA-bisphosphonate-conjugated PSMA inhibitor	119
3.6. <i>In vivo</i> evaluation of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} for α-therapy of bone metastases	149
3.7. Supplementary Results: Synthesis of a chelator-conjugated heterocyclic nitrogen-containing bisphosphonate via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition	169
4. Zusammenfassung und Ausblick	177
5. Anhang	188
5.1. Abkürzungsverzeichnis	188
5.2. Beiträge zu den Manuskripten	193
5.3. Eidesstattliche Erklärung	198

1. Einleitung

Die fortschreitende Entwicklung in Medizin und Technik führte in den letzten Jahren zu einem deutlichen Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung [1]. Diese Entwicklung verursacht einen ebenfalls deutlichen Anstieg häufig altersbedingter Erkrankungen, etwa im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen (wie z. B. Alzheimer oder Morbus Parkinson). Die Folgen der steigenden Lebenserwartung werden aber auch am Beispiel von Tumorerkrankungen ersichtlich. Laut Weltgesundheitsorganisation WHO war Krebs im Jahr 2012 die weltweit häufigste Todesursache. Bis 2025 sollen in Ländern mit niedrigen bis mittleren Einkommen jährlich 20 Millionen Menschen an Krebs erkranken, 40 Prozent mehr als heute [2]. Die frühzeitige Diagnose sowie eine effiziente Therapie von Krebserkrankungen stellen somit die zentralen Ziele der aktuellen und zukünftigen Krebsforschung dar.

Die Entdeckung der Röntgenstrahlung durch Wilhelm Conrad Röntgen [3] sowie die Entdeckung der Radioaktivität durch Henri Bequerel [4] beeinflussten maßgeblich die Entwicklung moderner bildgebender Verfahren in der Medizin. Im Gegensatz zu morphologischen Bildgebungsverfahren wie der Computertomographie (CT) oder der Magnetresonanztomographie (MRT) können mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowie der Einzelphotonen-Emissionstomographie (SPECT) auch biochemische Prozesse im Körper direkt dargestellt werden. Die Grundlage dieser auf Radioaktivität basierenden bildgebenden Verfahren bildet das Tracerprinzip [5]. Hierbei wird dem Patienten ein sogenannter Radiotracer verabreicht, der sich spezifisch im Körper anreichert, indem er an Stoffwechselprozessen teilnimmt, ohne diese zu beeinflussen. Die spezifische Anreicherung der Radioaktivität macht diese Verfahren unter anderem sehr interessant für die onkologische Bildgebung. Die Detektion der emittierten Strahlung ermöglicht die Lokalisierung selbst kleinster Tumorkläsionen [6]. Die Kombination aus PET bzw. SPECT mit CT oder MRT erlaubt schließlich die Darstellung von Stoffwechselprozessen im Körper sowie deren anatomische Zuordnung [7]. Moderne Geräte kombinieren daher Verfahren zur morphologischen und funktionellen Bildgebung, um eine möglichst effektive Diagnostik bzw. Therapiekontrolle zu ermöglichen.

Neben der nuklearmedizinischen Diagnostik gewinnt auch die Therapie in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Die Kombination der für die Diagnostik beschriebenen Tracer mit therapeutischen Radionukliden ermöglicht aufgrund der spezifischen Anreicherung des Tracers eine selektive Zerstörung tumorösen Gewebes durch die emittierte Strahlung. Eine Kombination von Diagnostik und Therapie durch sogenannte Theranostika ist dabei ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur personalisierten Therapie [8, 9].

1.1. Aufbau des Knochens

Die Hauptaufgaben des menschlichen Skeletts sind zum einen die mechanische Stabilisierung und zum anderen die Speicherung von Calcium und Phosphat für unterschiedliche metabolische Zwecke [10]. Es trägt damit maßgeblich zur Calciumhomöostase bei. Der Knochen setzt sich aus einem organischen und einem anorganischen Anteil zusammen (Abbildung 1). Der organische Anteil der Knochensubstanz macht 30 % aus und besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I (95 %), der Rest sind nichtkollagene Proteine. Zu diesen nichtkollagenen Proteinen zählen unter anderem Osteokalzin und Osteonektin. Sie sind von großer Bedeutung für den Metabolismus des Knochengewebes und die Mineralisation der Matrix. Der anorganische Anteil besteht zu 95 % aus Hydroxyapatit. Dieser nimmt aufgrund des hohen Anteils an Carbonat keine reine Kristallform an und ist dadurch leichter löslich und für den Stoffwechsel schneller verfügbar. Die übrigen 5 % der anorganischen Substanz sind Magnesium-, Natrium- und Kaliumfluoride bzw. -chloride [11].

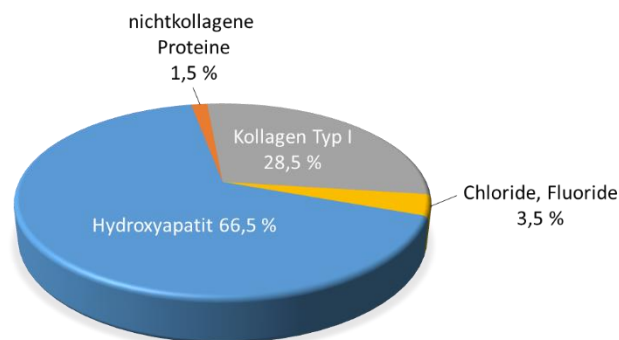


Abbildung 1: Prozentuale Zusammensetzung des Knochens.

Zu den knochenspezifischen Zellen gehören die Osteoblasten, die Osteoklasten sowie die Osteozyten. Die Osteoblasten – die Knochenbildner – synthetisieren die organische Matrix des Knochens. Mit zunehmendem Knochenaufbau werden die Osteoblasten in das Innere des Knochens eingelagert, wobei etwa 20 % in Osteozyten umgewandelt werden. Diese sind durch zahlreiche Kanäle untereinander sowie mit der Knochenoberfläche verbunden. Dieses Netzwerk gewährleistet den Transport von Stoffwechselprodukten sowie die Kommunikation zwischen den Zellen. Es wird angenommen, dass es außerdem an der Steuerung des Knochenumbaus beteiligt ist.

Die Osteoklasten sind spezifische und hochspezialisierte Zellen, die für die Knochenabbau verantwortlich sind. Daher sind sie hauptsächlich in Gebieten starker Knochenresorption, wie in den Metaphysen des wachsenden Knochens oder in der Umgebung von metastatischen Tumorzellen, zu finden. Es sind relativ große, mehrkernige Zellen, was auf eine hohe Stoffwechselaktivität schließen

lässt. Die Osteoklasten sind in sogenannte *Lining*-Zellen eingebettet, ruhende Osteoblasten, die die Knochenoberfläche bedecken. Kommt es zu einem resorptionsaktivierenden Reiz, weichen die *Lining*-Zellen auseinander und die Resorption kann beginnen.

Der Knochen unterliegt einem ständigen Erneuerungsprozess, er wird durch das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten dauerhaft auf- und abgebaut. Der gesamte Prozess des Knochenab- und -aufbaus dauert 3-4 Monate. Die Umbaurate liegt je nach Art des Knochens bei 2-10 % pro Jahr [12]. Beim gesunden Knochen sind Abbau und Aufbau aneinander gekoppelt und dadurch aufeinander abgestimmt. In Folge von Knochenerkrankungen wie Osteoporose, aber auch bei malignen Knochenerkrankungen oder Knochenmetastasen, kommt es jedoch zu einer Entkopplung von Knochenresorption und -bildung.

1.2. Knochenmetastasen

Neben Lymphknoten, Lunge und Leber ist der menschliche Knochen am häufigsten von Metastasen betroffen. Etwa 65 % der Patienten mit Prostata- oder Mammakarzinomen und 35 % mit Tumoren der Lunge, Schilddrüse oder Nieren entwickeln im Laufe der Erkrankung Knochenmetastasen. Dabei sind Brust- und Prostatakrebs für 80 % aller skelettalen Metastasen verantwortlich [13, 14]. Knochenmetastasen entwickeln sich bereits sehr früh im Laufe einer Tumorerkrankung, Symptome treten jedoch häufig erst verhältnismäßig spät auf [15].

1.2.1. Entstehung von Knochenmetastasen

Maligne Tumoren, die häufig in den Knochen metastasieren, durchlaufen eine phänotypische Umwandlung. Währenddessen entstehen aus relativ unbeweglichen Zellen mobile Zellen mit reduzierten Zell-Zell-Verbindungen, die die Basalmembran durchdringen und durch das Bindegewebe migrieren können, wodurch die Tumorzellen über die Blutbahn zum Skelett gelangen [15]. Die Entstehung von Knochenmetastasen lässt sich durch zwei Theorien erklären, der hämodynamischen Theorie von Ewing [16] und der „seed and soil“-Theorie von Paget [17]. Die Theorie von Ewing beschreibt die Entwicklung von Metastasen in Abhängigkeit vom Blutvolumen des jeweiligen Gewebes und damit der Anzahl von Krebszellen, die mit dem arteriellen Blut in das jeweilige Gewebe gelangen. Da das Blutvolumen im Knochen jedoch gering ist im Vergleich zu anderen Geweben wie Lunge oder Leber, kann diese Theorie die Spezifität von Mamma- und Prostatakarzinomen, in den Knochenraum einzuwandern, nicht erklären [18]. Eine Metastasierung in den Knochen scheint also noch von anderen speziellen Eigenschaften der Tumorzellen abzuhängen und die Theorie von Paget ist zur Erklärung

dieser Vorgänge besser geeignet. Der Knochen unterscheidet sich von anderen Geweben wie der Lunge und der Leber vor allem durch seine Morphologie und zelluläre Struktur. Die Knochenmatrix enthält neben den bereits beschriebenen Bestandteilen eine Reihe von Wachstumsfaktoren [19]. Diese werden nach der Knochenresorption freigesetzt und können einwandernde Krebszellen stimulieren. Diese Umgebung begünstigt das Festsetzen metastasierender Zellen, vor allem jener der Mamma und Prostata, was darauf hindeutet, dass diese Tumorzellen intrinsische Eigenschaften besitzen, die die Entwicklung von Knochenmetastasen fördern. Der Prozess der Metastasierung ist in mehrere Stufen unterteilbar und beinhaltet Interaktionen zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen [20]. Es ist kein zufälliger Prozess, der durch den Blutfluss determiniert wird, sondern abhängig von spezifischen Eigenschaften der Tumorzellen und unterstützender Faktoren der Umgebung, was Paget in seiner „seed and soil“-Theorie beschreibt. Der Prozess der Metastasierung in das Knochengewebe lässt sich in 5 Schritte unterteilen.

- i. Aufgrund einer erhöhten Produktion an proteolytischen Enzymen sowie einer verringerten Zahl an zellulären Adhäsionsmolekülen kommt es zur Ablösung von Krebszellen aus dem Zellverband, Invasion in das umliegende Gewebe und schließlich zum Eintritt in die Blutbahn.
- ii. Eine erhöhte Migrationsfähigkeit ermöglicht die Passage durch Zellbarrieren. Des Weiteren dürfen die Tumorzellen nicht von der körpereigenen Immunabwehr erkannt werden. In der Blutbahn überlebt nur 1 % aller Tumorzellen.
- iii. Für die Anhaftung und Erkennung der Zielregion ist eine erhöhte Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle nötig.
- iv. Die Tumorzellen treten im Bereich der Sinusoide des Knochenmarks aus den Gefäßen aus. Hierzu müssen sie, ähnlich wie bei der Ablösung vom Primärtumor, an der Basalmembran adhären, diese durch proteolytische Enzyme auflösen und passieren.
- v. Der letzte Schritt im Prozess der Metastasierung in das Knochengewebe ist die Zerstörung der Knochenstruktur.

Die Metastasierung findet vorwiegend in den am besten vaskularisierten Teilen des Skeletts statt, insbesondere im Knochenmark des Achsenskeletts und der proximalen Enden der Röhrenknochen, in den Rippen und in der Wirbelsäule [20].

Infolge der Metastasierung kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Knochenaufbau und -abbau und dadurch zur Ausbildung unterschiedlicher Arten von Metastasen. Im Falle von Brustkrebs sind die Metastasen vorwiegend osteolytisch, es kommt zu einer Aktivierung der Osteoklasten. Bei Prostatakarzinomen hingegen liegen überwiegend osteoblastische Metastasen vor, die durch eine Stimulation der Osteoblastenaktivität gekennzeichnet sind. Knochenaufbau und -abbau sind jedoch immer miteinander verbunden, auch wenn das Gleichgewicht durch die Metastasierung

gestört ist. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass sowohl die Knochenresorption als auch die Neubildung in den meisten Metastasen aktiviert ist [21].

1.2.2. Bedeutung von Knochenmetastasen für den Patienten

Die Metastasierung in den Knochen ist eine schwerwiegende Komplikation für Krebspatienten. Zum einen verschlechtern die Symptome der Knochenmetastasen die Lebensqualität drastisch. Zum anderen ist eine Heilung der Krebserkrankung im Normalfall nicht mehr möglich, sobald es zur Einnistung von Tumorzellen in das Skelett kommt [20]. Nachfolgend werden die häufigsten Symptome infolge der Metastasierung beschrieben [22].

Knochenschmerzen: Knochenschmerzen sind ein häufiges Symptom bei Patienten sowohl mit osteolytischen als auch osteoblastischen Läsionen. Der Schmerz kann verschiedenste Ursachen haben. Mechanische oder chemische Stimulation von Schmerzrezeptoren, hoher Druck durch die sich ausbreitende Tumormasse, die Freisetzung von Cytokinen und die Entstehung von Mikrofrakturen sind einige mögliche Erklärungen.

Pathologische Frakturen: Spontane Frakturen, die ebenfalls mit starken Schmerzen einhergehen, treten bei etwa 50 % der Patienten auf. Sie betreffen meist die Röhrenknochen sowie Rippen und Wirbelsäule. Die mittlere Lebensdauer nach pathologischer Fraktur eines Röhrenknochens beträgt nur etwa 12 Monate.

Rückenmarkskompression: Eine Kompression des Rückenmarks ist ein medizinischer Notfall, der durch direkte Metastasenbildung am Rückenmark oder Frakturen der Wirbelkörper ausgelöst werden kann. Sie kann zu Lähmungserscheinungen und Empfindungsstörungen führen.

Hyperkalzämie: Hyperkalzämie tritt vorwiegend bei Patienten mit osteolytischen Metastasen auf. Beim Abbau der Knochensubstanz wird Calcium freigesetzt. Der erhöhte Calciumspiegel kann unter anderem Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Dehydrierung, Polyurie, Nierenversagen und Herzrhythmusstörungen verursachen.

1.2.3. Diagnose

Knochenmetastasen entwickeln sich bereits früh im Verlauf einer Tumorerkrankung, Symptome treten jedoch in der Regel erst verhältnismäßig spät auf. Eine frühzeitige und zuverlässige Diagnostik und damit verbunden eine möglichst früh einsetzende Therapie sind von großer Bedeutung. Dabei stehen unterschiedliche diagnostische Methoden zur Verfügung. Zunächst einmal gibt es Biomarker mit Bezug zu einem erhöhten Knochenmetabolismus. Dabei stehen zwei Serumparameter zur Diskussion. Das

knochenspezifische Isoenzym der alkalischen Phosphatase wird durch Osteoblasten während der Knochenneubildung freigesetzt. Der zweite ist das Abbauprodukt des Kollagen Typ I und steht im Zusammenhang mit der Knochenresorption durch Osteoklasten [23]. Diese klinischen Marker sind zwar einfach zu bestimmen, jedoch erlauben sie keine Lokalisation der Metastasen. Die Nutzung bildgebender Verfahren ist daher unerlässlich. Dabei steht eine Reihe von Verfahren zur Verfügung, die sich in ihrer Spezifität und Sensitivität sowie der entstehenden Kosten unterscheiden. Tabelle 1 vergleicht das Röntgen, CT, MRT, die sogenannte Knochenszintigraphie (engl. *bone scan*, BS) und SPECT sowie PET miteinander.

Tabelle 1: Vergleich unterschiedlicher bildgebender Verfahren für die Diagnostik von Knochenmetastasen [24, 25].

Verfahren	Anatomie	Metabolismus	Umfang der Darstellung	diagnostische Sensitivität	diagnostische Spezifität
Röntgen	ja	nein	regional/ Ganzkörper	niedrig (44-50 %)	k.A.
CT	ja	nein	regional	hoch (71-100 %)	k.A.
MRT	ja	nein	regional	hoch (82-100 %)	hoch (73-100 %)
BS	nein	ja	Ganzkörper	variiert (62-100 %)	variiert (78-100 %)
SPECT	nein	ja	Ganzkörper	hoch (87-92 %)	hoch (91-93 %)
PET	nein	ja	Ganzkörper	sehr hoch (94-99 %)	sehr hoch (97-100 %)

Röntgen: Durch konventionelle Röntgenaufnahmen können tumoröse Knochenprozesse aufgrund der Änderung der Knochendichte diagnostiziert werden. Jedoch sind Läsionen an den Wirbelkörpern erst erkennbar, wenn bereits 30-75 % des Knochenmaterials verloren gegangen sind. Eine Röntgenuntersuchung eignet sich daher höchstens, um morphologische Informationen zusätzlich zu anderen besser geeigneten Verfahren zu erhalten.

Computertomographie: Die CT liefert mehr anatomische Details im Vergleich zur Röntgenaufnahme, was die diagnostische Sensitivität erhöht. Sie liefert außerdem bessere Ergebnisse bei der Diagnose von Wirbelsäulenmetastasen. Der Nachteil besteht jedoch darin, dass die CT üblicherweise auf bestimmte Körperregionen limitiert ist und keine Ganzkörperaufnahmen durchgeführt werden.

Magnetresonanztomographie: Die Kernspintomographie kann detaillierte Darstellungen des Knochens sowie des Knochenmarks liefern. Sie ermöglicht eine bessere Auflösung als die CT bei der Visualisierung

von Weichgewebe sowie des Rückenmarks. Nachteilig ist die Schwierigkeit der Durchführung von Ganzkörperaufnahmen [26].

Skelettszintigraphie: Die Szintigraphie ist das am häufigsten verwendete Verfahren zur Detektion von Knochenmetastasen. Im Gegensatz zur CT und MRT sind Ganzkörperaufnahmen problemlos möglich. Für die Szintigraphie ist die Verabreichung eines Radiopharmakons nötig. Auf die Funktionsweise dieses bildgebenden Verfahrens sowie die Eigenschaften des Radiopharmakons wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen, da sich die Szintigraphie und die SPECT lediglich in der Art der Darstellung unterscheiden. Während die planare Szintigraphie zweidimensionale Bilder liefert, ermöglicht das tomographische Verfahren die dreidimensionale Darstellung der Aktivitätsverteilung.

Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie: Während Röntgen, CT und MRT rein morphologische Informationen liefern, erhält man mit Hilfe der Szintigraphie bzw. SPECT biochemische und metabolische Informationen. Die Grundlage hierfür bildet der Nachweis eines radioaktiv markierten Tracers, der vor der Untersuchung verabreicht wird und sich spezifisch im Körper anreichert. Bei der SPECT werden hierfür γ -Strahlung emittierende Radionuklide eingesetzt. Der Tracer besitzt im Falle der Darstellung von Knochenmetastasen eine Affinität zum Knochenmaterial, insbesondere zu Regionen, die einen erhöhten Knochenumbau aufweisen. Diese Affinität kann vom Radionuklid selbst stammen oder auf einen sogenannten Targetvektor, eine Verbindung mit hoher Knochenaffinität, zurückzuführen sein, der mit dem Radionuklid markiert wird. Die emittierte γ -Strahlung wird im Falle der SPECT von einer oder mehreren um den Patienten kreisenden Gammakameras detektiert. Aus diesen planaren Aufnahmen lässt sich mittels computerbasierter Rekonstruktion auf die Verteilung des Radiopharmakons im Körper zurückschließen [7]. Die am häufigsten verwendeten Tracer für die Darstellung von Knochenmetastasen sind ^{99m}Tc -markierte Diphosphonate wie MDP (Methylen-diphosphonat) und HMDP (Hydroxymethylen-diphosphonat) (Abbildung 2) [27].

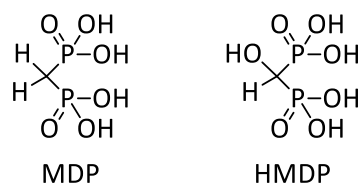
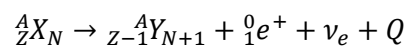


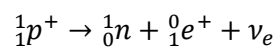
Abbildung 2: Struktur von MDP und HMDP.

Positronen-Emissions-Tomographie: Auch bei der PET kommen Radiotracer zum Einsatz, die im Körper an bestimmte Zielstrukturen binden und sich so spezifisch anreichern. Basierend auf dem Tracerprinzip sind die verabreichten Stoffmengen des Radiopharmakons sehr gering, sodass keine pharmakologischen Wechselwirkungen zu erwarten sind.

Die in der PET verwendeten Radionuklide sind Positronenemitter, neutronenarme bzw. protonenreiche Kerne (Proton/Neutron-Verhältnis >1), die sich unter Aussendung eines Positrons (β^+ -Teilchen) stabilisieren. Zum Spinerhalt wird zusätzlich ein Neutrino (ν_e) ausgesandt, es handelt sich also um einen Dreikörperzerfall:



Auf Nukleonenebene handelt es sich hierbei um die Umwandlung eines Protons in ein Neutron unter Aussendung eines Positrons und eines Elektronneutrinos:



Die dabei stattfindende Umwandlung von Elementarteilchen, der sogenannten Quarks, lässt sich mit Hilfe eines Feynman-Diagramms beschreiben (Abbildung 3).

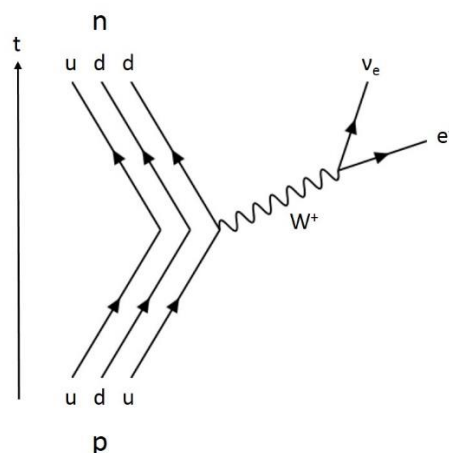


Abbildung 3: Feynman-Diagramm zur Umwandlung eines up - in ein $down$ -Quark: β^+ -Umwandlung.

Die Umwandlung eines up - in ein $down$ -Quark durch die schwache Wechselwirkung führt zur Umwandlung des Protons in ein Neutron und damit zur Bildung eines Tochternuklids mit einer um eins geringeren Kernladungszahl sowie einer um eins höheren Neutronenzahl. Die Massenzahl bleibt konstant.

Im Gegensatz zur SPECT, bei der das emittierte γ -Quant mittels Szintillationsdetektoren direkt gemessen wird, wird bei der PET nicht das zunächst emittierte Positron detektiert. Das Positron hat in

Abhängigkeit seiner charakteristischen kinetischen Energie eine gewisse Reichweite im Gewebe. Durch Wechselwirkung mit der umgebenden Materie verliert es an kinetischer Energie. Nach entsprechendem Energieverlust wird es beim Zusammentreffen mit einem Elektron gemeinsam mit diesem vernichtet. Möglich ist hierbei zum einen die Vernichtung des freien Positrons oder aber die Rekombination mit einem Elektron im thermischen Bereich unter Bildung eines intermediären Positroniums mit anschließender Zwei- oder Drei-Gammaquanten-Vernichtung [28].

Trifft ein Positron auf ein Elektron und es kommt zur direkten Annihilation, hängt die Anzahl der emittierten γ -Quanten vom Spin beider Teilchen ab. Sind der Spin des Positrons und des Elektrons antiparallel ausgerichtet (sogenannter Singulett-Zustand), verlangen die Auswahlregeln für die Erhaltung von Energie, Impuls und Parität die Emission von zwei γ -Quanten. Diese besitzen nach $E = mc^2$ ($m =$ Ruhemasse des Elektrons, $c =$ Lichtgeschwindigkeit) jeweils eine Energie von 511 keV und werden in einem Winkel von 180° abgestrahlt, wenn sich das Positron-Elektron-System während der Vernichtung in absoluter Ruhe befindet. Bei paralleler Ausrichtung der Spins (sogenannter Triplett-Zustand) verlangen die Auswahlregeln die Aussendung einer ungeraden Zahl (meistens drei) von Photonen. Die Winkelverteilung sowie die Verteilung der Vernichtungsenergie von 1,02 MeV sind hierbei wesentlich komplizierter. Für das Verhältnis der Wirkungsquerschnitte der beiden Vernichtungsarten gilt:

$$\frac{\sigma_{3\gamma}}{\sigma_{2\gamma}} = \frac{\lambda_{3\gamma}}{\lambda_{2\gamma}} \cdot \frac{2J_T + 1}{2J_S + 1} = \frac{1}{1115} \cdot 3 = \frac{1}{372}$$

Da der Wirkungsquerschnitt für die Vernichtung des freien Positrons deutlich kleiner ist als der für die Energieübertragung durch Ionisation oder Anregung von Substratmolekülen, findet die Vernichtung des freien Positrons jedoch nur zu 5 % statt. Außerdem weicht das experimentell beobachtete Verhältnis von Drei- zu Zwei-Quanten-Vernichtung meist deutlich vom quantenmechanisch ermittelten Wert von $1/372$ ab. 1951 gelang schließlich der Nachweis einer kurzlebigen, wasserstoffähnlichen Verbindung aus Positron und Elektron, dem Positronium (Ps) [29, 30].

Auch bei der Bildung des Positroniums sind zwei Zustände möglich: *ortho*-Ps (Triplett) mit parallel ausgerichteten Spins und *para*-Ps (Singulett) mit antiparalleler Ausrichtung der Spins. Die Annihilation erfolgt aufgrund der Auswahlregeln wieder unter Aussendung von zwei γ -Quanten beim Zerfall des *para*-Ps bzw. drei γ -Quanten beim *ortho*-Ps. *Ortho*-Ps und *para*-Ps bilden sich in einem Verhältnis von 3:1, das für die PET interessante *para*-Ps entsteht also nur zu 25 %. Aufgrund der längeren Lebensdauer des *ortho*-Ps ($1,4 \times 10^{-7}$ s verglichen mit $1,55 \times 10^{-10}$ s) kann jedoch eine Umwandlung zum *para*-Ps stattfinden, wodurch das Verhältnis zum Zwei-Quanten-Zerfall hin verschoben wird. Die Emission dieser beiden 511 keV γ -Quanten in einem Winkel von nahezu 180° bildet die Grundlage für die PET, da über eine Koinzidenzmessung der Ort der Annihilation bestimmt werden kann [31] (Abbildung 4).

Die Strecke, die das Positron nach der Emission bis zur Annihilation zurücklegt, hängt hauptsächlich von seiner kinetischen Energie ab und sorgt für eine gewisse Ortsunschärfe. Die Auflösung der PET steht also im direkten Zusammenhang zur β -Energie des Radionuklids.

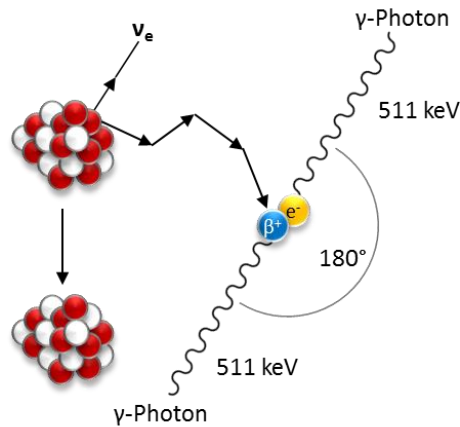


Abbildung 4: β^+ -Umwandlung und anschließende Annihilation des emittierten Positrons unter Emission zweier 511 keV γ -Quanten [32].

Die Koinzidenzmessung der beiden emittierten Photonen erfolgt über ringförmig angeordnete Szintillationsdetektoren [33]. Es werden nur Ereignisse detektiert, die nahezu gleichzeitig auf gegenüberliegende Detektorbereiche treffen (Abbildung 5). Gestreute Photonen oder Photonen aus einem Drei-Quanten-Zerfall werden nicht erfasst. Der Ort der Annihilation liegt auf der Linie zwischen den beiden koinzidenten Signalen, der sogenannten „line of response“. Mit dem Fehler der Ortsunschärfe der β^+ -Energie kann somit der Ort der β -Umwandlung und damit der Ort der Anreicherung des Tracers bestimmt werden [34].

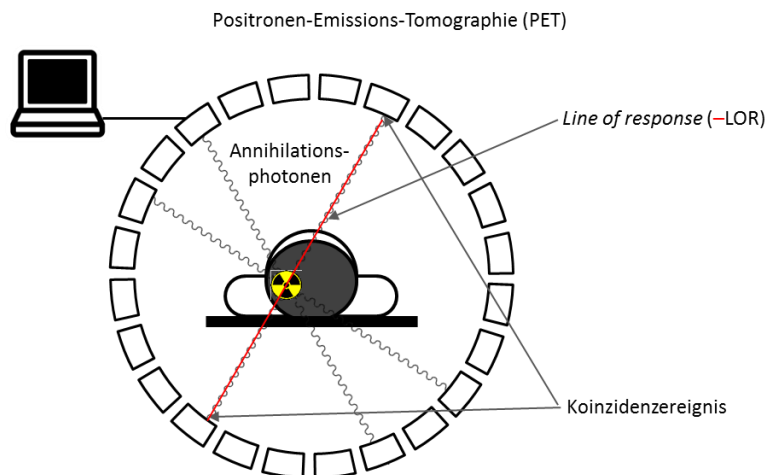


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Koinzidenzmessung bei der PET [32].

1.2.4. Therapie

Die Therapie von Knochenmetastasen gestaltet sich häufig schwierig, vor allem da die Diagnostik meist erst im fortgeschrittenen Stadium möglich ist. Eine kurative Behandlung mit dem Ziel der vollständigen Heilung des Patienten ist nahezu nicht möglich und so beschränkt sich die Therapie oft auf die palliative Behandlung. Diese beinhaltet die Verringerung der Symptome und zielt damit primär auf die Erhaltung der Lebensqualität des Patienten ab. Auf einige Behandlungsmöglichkeiten soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Chirurgie: Operative Eingriffe werden vor allem bei hohem Risiko für pathologische Frakturen durchgeführt bzw. wenn das Rückenmark involviert ist oder es zur Kompression von Nerven kommt [35].

Klassische Schmerztherapie: Die analgetische Behandlung umfasst drei Stufen. Beginnend bei nicht-steroidalen entzündungshemmenden Arzneimitteln wie Aspirin bei leichten bis moderaten Schmerzen. Es folgen schwache Opiate wie Codein. Bei weiterhin anhaltenden oder sich verschlimmernden Schmerzen werden stärkere Opiate wie Morphin oder Oxycodon verabreicht [36].

Strahlentherapie: Die Indikationen für eine externe Strahlentherapie sind Schmerzen, das Risiko pathologischer Frakturen und neurologische Probleme aufgrund von Rückenmarkskompressionen. Die Bestrahlung erfolgt mit Röntgen- oder γ -Strahlung und es sind sowohl einzelne Bestrahlungen als auch Intervalle mehrerer Bestrahlungen möglich. Mehrere Studien zeigen jedoch, dass einzelne Bestrahlungen (meist 8 Gy) genauso effektiv sind [37].

Hormontherapie: Sexualhormone spielen eine große Rolle beim Tumorwachstum im Falle von Mamma- und Prostatakarzinomen. Bei der Behandlung dieser Tumore haben sich daher Strategien zur Reduktion der Wirkung dieser Hormone als erfolgreich erwiesen. Nachteilig ist jedoch, dass nicht alle Tumore hormonsensitiv sind oder bei fortschreitender Erkrankung hormonresistent werden [14].

Bisphosphonate: Bisphosphonate bieten eine weitere Möglichkeit der systemischen Therapie und sind im Gegensatz zur Strahlentherapie nicht auf einzelne anatomische Bereiche beschränkt. Sie inhibieren die Aktivierung der Osteoklasten und reduzieren die Knochenresorption. Sie fördern außerdem die Reparatur und Neubildung des Knochens [38]. Auf die Wirkmechanismen der Bisphosphonate sowie die unterschiedlichen Generationen dieser Wirkstoffklasse wird in Abschnitt 1.3 näher eingegangen.

Radionuklidtherapie: Die Verwendung von Radionukliden zur Behandlung von Schmerzen infolge von Knochenmetastasen zeigt sehr gute Ergebnisse, ist gut verträglich und verbessert die Lebensqualität der Patienten deutlich. Daher spielen knochenaffine Radiopharmaka eine wichtige Rolle bei der Schmerztherapie und sollten auch bereits in früheren Stadien in Betracht gezogen werden [39]. Der Effekt basiert auf der Knochenakkumulation der Radiopharmaka, vor allem im Bereich der

hochmetabolischen Metastasen, und der dort erfolgenden Emission von β - oder α -Teilchen [40]. ^{32}P und ^{89}Sr , die beide eine natürliche Knochenaffinität aufweisen, waren die ersten Radionuklide in der klinischen Anwendung [41]. Ihnen folgte eine Reihe weiterer Radiopharmaka, die sich hauptsächlich in zwei Gruppen unterteilen lassen, entsprechend ihres Mechanismus der Knochenanreicherung. Eingesetzt werden zum einen Radionuklide in ionischer Form, zum Beispiel Calciumanaloga wie ^{89}Sr , und Verbindungen, die auf der Knochenaffinität der Phosphonate beruhen. Sowohl auf die verwendeten Radionuklide als auch auf die Knochenaffinität Phosphonat-basierter Verbindungen wird in den nächsten Abschnitten näher eingegangen.

1.3. Bisphosphonate

1.3.1. Struktur und Wirkweise

Der pharmakologische Effekt von Bisphosphonaten ist zurückzuführen auf zwei Eigenschaften: ihre Affinität zu Hydroxyapatit, also Knochenmineral, sowie ihre inhibitorische Wirkung auf Osteoklasten. Bisphosphonate sind daher die am häufigsten eingesetzte Klasse von Medikamenten zur Behandlung von Osteoporose und anderen Erkrankungen mit erhöhter Knochenresorption [42].

Bisphosphonate sind stabile Analoga des natürlichen Pyrophosphats. Aufgrund des Ersatzes des zentralen Sauerstoffatoms durch ein Kohlenstoffatom sind sie sowohl gegenüber chemischer als auch enzymatischer Hydrolyse stabil. Die beiden Phosphonatgruppen besitzen zwei Funktionen. Sie sind für die Bindung an das Knochenmaterial sowie die antiresorptive Wirkung verantwortlich. Über die beiden Seitenketten R1 und R2 (Abbildung 6) am zentralen Kohlenstoffatom lässt sich die Aktivität der Bisphosphonate steuern. Die beiden Phosphonate komplexieren divalente Metallionen, wie Mg^{2+} oder Ca^{2+} , indem je ein Sauerstoffatom eines Phosphonats mit dem Kation koordiniert. Die Affinität für Ca^{2+} und damit für das Knochenmaterial lässt sich durch Substitution von R1 durch eine Hydroxygruppe oder ein primäres Amin steigern, da dies die Bildung eines dreizähligen Komplexes ermöglicht [43]. Über unterschiedliche Substituenten für R2 lässt sich die antiresorptive Wirkung beeinflussen [44]. Anhand dieser Substituenten unterscheidet man drei Gruppen von Bisphosphonaten (Abbildung 6):

- i. Verbindungen der ersten Generation, wie Clodronat oder Etidronat, besitzen einfache Alkyl-, Halogen- oder Hydroxylseitenketten und haben eine vergleichsweise geringe Wirkung auf die Knochenresorption [45].
- ii. Die potenteren Bisphosphonate der zweiten Generation, wie Pamidronat, Alendronat und Ibandronat, sind charakterisiert durch eine stickstoffhaltige aliphatische Seitenkette.

- iii. Die Bisphosphonate der dritten Generation weisen einen heterozyklischen Substituenten auf, der ein (Risedronat) oder zwei Stickstoffatome (Zoledronat) enthält. Sie besitzen den stärksten inhibitorischen Effekt auf die Knochenresorption aller bekannten Bisphosphonate [45].

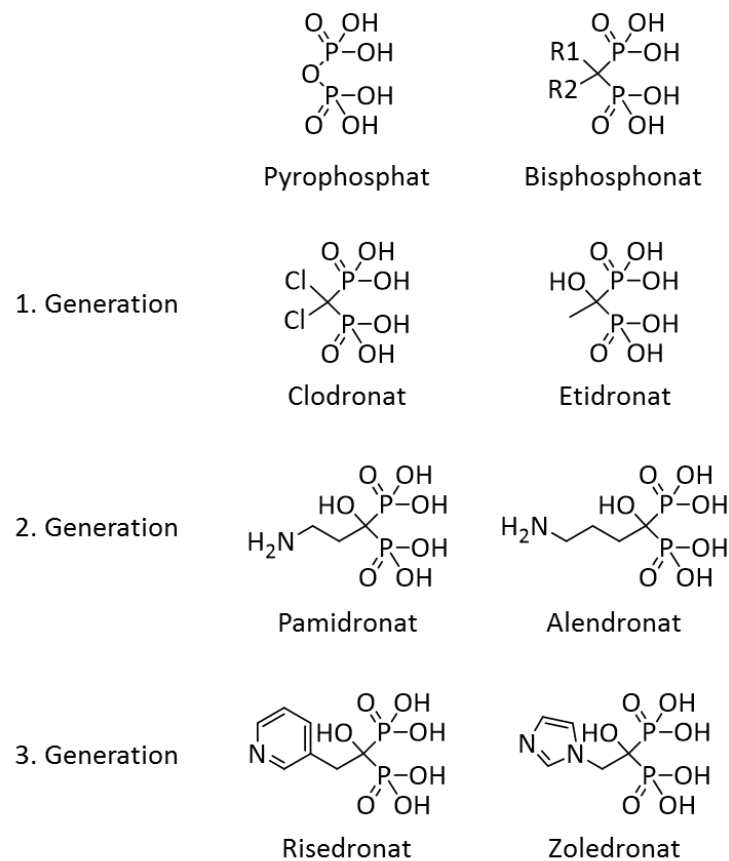


Abbildung 6: Struktur von Pyrophosphat und Grundstruktur sowie Generationen der Bisphosphonate.

Durch die Adsorption an der Knochenoberfläche gelangen die Bisphosphonate in die Nähe der Osteoklasten. Der extrazelluläre Raum zwischen den aktiven Osteoklasten und der Knochenmatrix, in dem die Knochenresorption stattfindet, weist einen verringerten pH-Wert auf. Dieser ist essentiell für den Abbau der Knochenmatrix. Vermutlich kommt es hierdurch zu einer Protonierung des Hydroxyapatits, was die Auflösung des Minerals ermöglicht [46, 47]. Aufgrund des niedrigen pH-Werts im Bereich der Knochenresorption dissoziieren die Bisphosphonate vom Hydroxyapatit, da die Phosphonatgruppen protoniert werden, was die Fähigkeit zur Komplexbildung von Ca^{2+} senkt [48]. Anschließend werden sie von den Osteoklasten durch Endozytose aufgenommen. Dort induzieren sie die Apoptose der Osteoklasten, was zu einer verringerten Osteoklastenaktivität und damit zu einer geringeren Knochenresorption führt [49]. Die Apoptose kann dabei je nach Art des Bisphosphonats auf zwei Wegen herbeigeführt werden. Bisphosphonate ohne Stickstoffatom werden nach Aufnahme durch die Osteoklasten wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Pyrophosphat in ATP

(Adenosintriphosphat) eingebaut. Da diese ATP-Analoga aufgrund der Substitution des zentralen Sauerstoffatoms hydrolysebeständig sind, werden durch ihre Bildung ATP-abhängige zelluläre Prozesse inhibiert, was zur Apoptose der Osteoklasten führt. Stickstoffhaltige Bisphosphonate hingegen inhibieren die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS), ein Schlüsselenzym des Mevalonatwegs, das eine Rolle bei der Biosynthese von Cholesterol und anderen Steroiden spielt. Dadurch wird die posttranslationale Modifikation (Isoprenylierung) von Proteinen wie den kleinen GTPasen, die wichtig für die Funktion und das Überleben der Osteoklasten sind, gestört, was schließlich zur Apoptose führt [50, 51].

Unter den heute verwendeten Bisphosphonaten weist das Zoledronat nicht nur die höchste Affinität zu Hydroxyapatit auf, es zeigt auch die stärkste Inhibierung der FPPS und ist damit das zurzeit potenteste Bisphosphonat.

1.3.2. Bisphosphonate in der Nuklearmedizin

Die Knochenaffinität Phosphonat-basierter Verbindungen spielt schon lange eine große Rolle bei der Entwicklung knochenbindender Radiopharmaka. Für den Einsatz in der Nuklearmedizin ist allerdings nicht die biologische Wirkung der Bisphosphonate entscheidend, sondern vielmehr ihre selektive Anreicherung im Knochengewebe. Die skeletale Retention hängt von der Verfügbarkeit von Bindungsstellen am Hydroxyapatit ab. Bisphosphonate akkumulieren daher bevorzugt in Bereichen eines erhöhten Knochenumbaus. Hier ist die mineralische Struktur des Hydroxyapatits freier zugänglich, da diese entweder von den Osteoklasten freigelegt wurde oder sich die Osteoblasten nicht in ihrer Ruhephase befinden und somit keine Schicht aus *Lining*-Zellen um den Knochen bilden [52, 53]. Da Knochenmetastasen charakterisiert sind durch einen verstärkten Knochenumbau, ausgelöst durch ein Ungleichgewicht zwischen Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, sind die Bisphosphonate eine hervorragende Leitstruktur zur Entwicklung von Radiopharmaka für die Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen. Dass sie außerdem kaum Aufnahme in sonstiges Gewebe zeigen und der Anteil, der nicht am Knochen akkumuliert, eine schnelle renale Ausscheidung aufweist, ist vor allem für die Therapie von großem Vorteil [50].

Die ersten nuklearmedizinischen Anwendungen unter Verwendung von Bisphosphonaten wie MDP oder HMDP (Abbildung 2) in Kombination mit ^{99m}Tc dienten der Diagnose von Knochenmetastasen mittels Szintigraphie oder SPECT [54]. Auch in der Therapie findet dieses Konzept schon lange Anwendung. Hier ermöglichen Phosphonat-basierte Verbindungen wie EDTMP (Ethylendiamin-tetra(methylenphosphonsäure)) und HEDP (1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure) (Abbildung 7) die Behandlung von Knochenmetastasen in Kombination mit Radionukliden wie ^{153}Sm , ^{90}Y oder ^{188}Re [55, 56].

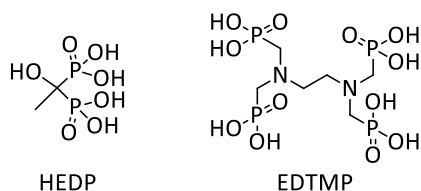


Abbildung 7: Strukturen von HEDP und EDTMP.

Die EDTMP-Komplexe zeigen jedoch eine geringe *in vivo*-Stabilität, weshalb routinemäßig ein Überschuss des Liganden appliziert wird, um eine Dekomplexierung *in vivo* zu vermeiden [57, 58]. Des Weiteren sind bei den bisher beschriebenen Verbindungen zur Diagnose und Therapie die Phosphonate sowohl für die Komplexierung des Radionuklids als auch für die Bindung an das Zielgewebe verantwortlich, was zu einer geringeren Akkumulation an den Metastasen führen kann [59]. Dieses Problem kann durch Separation des Targetingvektors vom Chelator umgangen werden. Hierfür wird ein Chelator an ein Bisphosphonat gekoppelt. Die Verwendung von makrozyklischen Chelatoren führt außerdem zur Bildung von Komplexen mit höherer kinetischer Stabilität im Vergleich zu offenkettigen Chelatoren wie EDTMP [57]. Je nach Chelator können unterschiedliche Nuklide komplexiert werden, was außerdem die Kombination von Diagnose und Therapie in einem Molekül und damit die sogenannte Theranostik ermöglicht. Eins der ersten dieser Chelator-konjugierten Bisphosphonate war BPAMD, ein DOTA-gekoppeltes Bisphosphonat (Abbildung 8). NOTA-konjugierte Bisphosphonate (1,4,7-Triazacyclododecan-1,4,7-triessigsäure) wie zum Beispiel NO2AP^{BP} eignen sich dabei besonders zur Diagnose mittels PET, da sie bessere Eigenschaften zur Komplexierung von ⁶⁸Ga aufweisen als DOTA-Derivate (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) [60]. DOTA-Bisphosphonate hingegen können ein breiteres Spektrum an Radionukliden komplexieren. Sie eignen sich besonders zur Komplexierung des therapeutischen β -Strahlers ¹⁷⁷Lu.

Eine Weiterentwicklung im Bereich der Chelator-konjugierten Bisphosphonate ist die Verwendung von Bisphosphonaten der dritten Generation zur Kopplung an den Chelator. So wurde jüngst die Entwicklung des DOTA-basierten Derivats DOTA^{ZOL} beschrieben [61]. Ein äquivalentes NOTA-basiertes Derivat wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

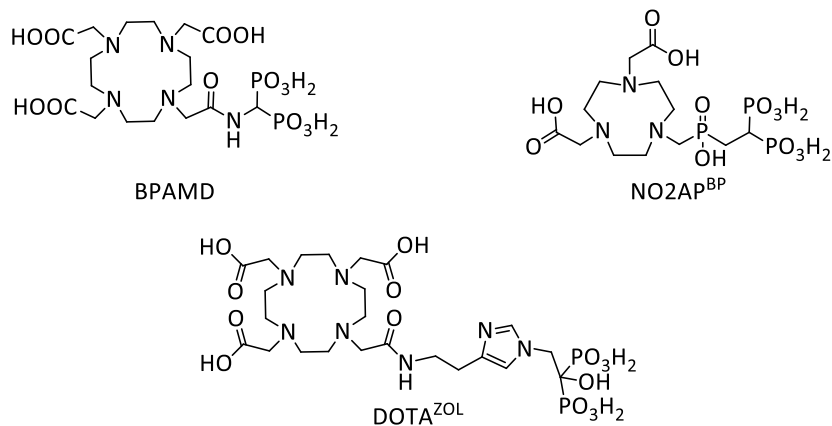


Abbildung 8: Strukturen von BPAMD, NO2AP^{BP} und DOTA^{ZOL}.

1.4. Das prostataspezifische Membranantigen

1.4.1. Diagnose des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebsart bei Männern in den Industrieländern und die dritthäufigste tödliche Krebserkrankung [62]. Bei frühzeitiger Diagnose liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei nahezu 100 %. Hat der Tumor jedoch erst metastasiert, sinkt die Überlebensrate drastisch. Ein zu aggressives Vorgehen, wie beispielsweise die operative Entfernung der Prostata, kann die Lebensqualität des Patienten stark beeinträchtigen [63]. Eine zuverlässige Diagnose ist daher unerlässlich für eine adäquate und erfolgreiche Behandlung.

Neben dem Abtasten der Prostata dient häufig die Bestimmung von Tumormarkern im Blut des Patienten als Diagnosemittel. Der bekannteste Marker ist das prostataspezifische Antigen (PSA), das in der Prostata gebildet wird und der Verflüssigung des Spermas dient. Eine erhöhte PSA-Konzentration im Blut deutet auf eine Erkrankung der Prostata hin. Es können jedoch keine zuverlässigen Aussagen über das Vorhandensein eines Karzinoms getroffen werden, ein verlässlicher Schwellenwert existiert nicht [64].

Das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) ist eine weitere mögliche Zielstruktur für die Diagnose von Prostatakarzinomen. Es ist ein membrangebundenes Glykoprotein mit enzymatischer Aktivität und kann im Gegensatz zum PSA nicht im Blutkreislauf nachgewiesen werden [64]. PSMA tritt in gesundem Gewebe kaum auf, wird aber von Prostatakarzinomzellen stark überexprimiert. Die Expression korreliert gut mit dem Krankheitsstadium. Auch infolge des Karzinoms gebildete Knochenmetastasen weisen zu 40 % eine Expression von PSMA auf [65].

1.4.2. Das prostataspezifische Membranantigen in der Nuklearmedizin

Das prostataspezifische Membranantigen dient in der Nuklearmedizin als Zielstruktur für Radiopharmaka und kann so zur Tumordiagnostik verwendet werden. Als Targetvektoren können beispielsweise Antikörper verwendet werden, um an die Proteinstruktur des PSMA zu binden. Des Weiteren kann die enzymatische Wirkung des Proteins genutzt werden [66]. Diese Herangehensweise bietet den Vorteil, dass das Protein in die Zelle internalisiert wird und zwar unabhängig davon, ob eine enzymatische Spaltung erfolgt oder nicht [67]. Die Verwendung von PSMA-Inhibitoren eignet sich daher besonders gut für die Entwicklung von PSMA-bindenden Radiopharmaka. Die radioaktiv markierten Inhibitoren binden an das aktive Zentrum des Enzyms im Inneren des Proteins, werden dort aber aufgrund ihrer inhibitorischen Eigenschaft nicht umgesetzt. Dadurch wird die Bindung zwischen dem Inhibitor und dem radioaktiven Label nicht gebrochen und durch die Internalisierung des Proteins gelangt der gebundene Inhibitor zusammen mit dem radioaktiven Label in die Zelle, was die Anreicherung des Radioisotops steigert.

Entscheidend für die Entwicklung solcher Inhibitoren ist zunächst eine gute Bindung an das Enzym. Dessen Aufgabe ist die Abspaltung von C-terminalem Glutamat von *N*-Acetyl-Aspartyl-Glutamat (NAAG) und Folsäure-(poly)- γ -Glutamat. Im aktiven Zentrum des Enzyms befinden sich zwei Zn^{2+} -Ionen, die das Glutamat im Substrat binden. Die Substratbindungstasche wird durch dieses aktive Zentrum in zwei Hälften geteilt. Eine dieser Hälften, auch „Pharmakophor-Tasche“ genannt, ist optimiert für die Bindung von Glutamat oder Glutamat-ähnlicher Reste. Die beiden natürlichen Substrate weisen jeweils eine C-terminale Glutamat-Einheit auf [68]. Für eine gute Enzymbindung sollte der Inhibitor demnach ein Glutamat-Motiv enthalten. Dieses Motiv muss dann mit dem Rest des Moleküls über eine durch das Enzym nicht spaltbare Bindung verknüpft werden. Hierfür eignen sich beispielsweise Thiole, die vom Enzym nicht verarbeitet werden können. Eine Reihe an PSMA-Inhibitoren, die auch Grundlage für die bereits klinisch relevanten Radiopharmaka PSMA-11 und PSMA-617 sind, sind Harnstoff-basiert [69, 70].

Vor der Substratbindungstasche liegt außerdem eine aromatische Bindungstasche. Um diese zu nutzen, hat sich das Einfügen einer aromatischen Struktur in den Inhibitor als vorteilhaft erwiesen. Dass sich auf diese Weise eine Steigerung des Inhibitions potentials erreichen lässt, konnte auch im Laufe der Entwicklung von Chelator-gekoppelten PSMA-Inhibitoren beobachtet werden. So ergibt die Kopplung von L-Lysin-Urea-L-Glutamat (KuE) als Targetvektor mittels eines Hexyllinkers an den aromatischen Chelator HBED (*N,N'*-Di-(2-hydroxybenzyl)ethylendiamin-*N,N'*-diessigsäure) das potente Radiopharmakon PSMA-11. Ersetzt man jedoch den HBED-Chelator durch DOTA, so sind deutliche Einbußen in der Affinität zu beobachten [71] (Abbildung 9). Durch Einfügen eines aromatischen Linkers kann die Affinität wieder gesteigert werden und die Entwicklung von PSMA-617 ermöglichte schließlich

die Nutzung des DOTA-Chelators und damit auch die Therapie von Prostatakarzinomen unter Verwendung von therapeutischen Nukliden wie ^{177}Lu oder ^{225}Ac [72].

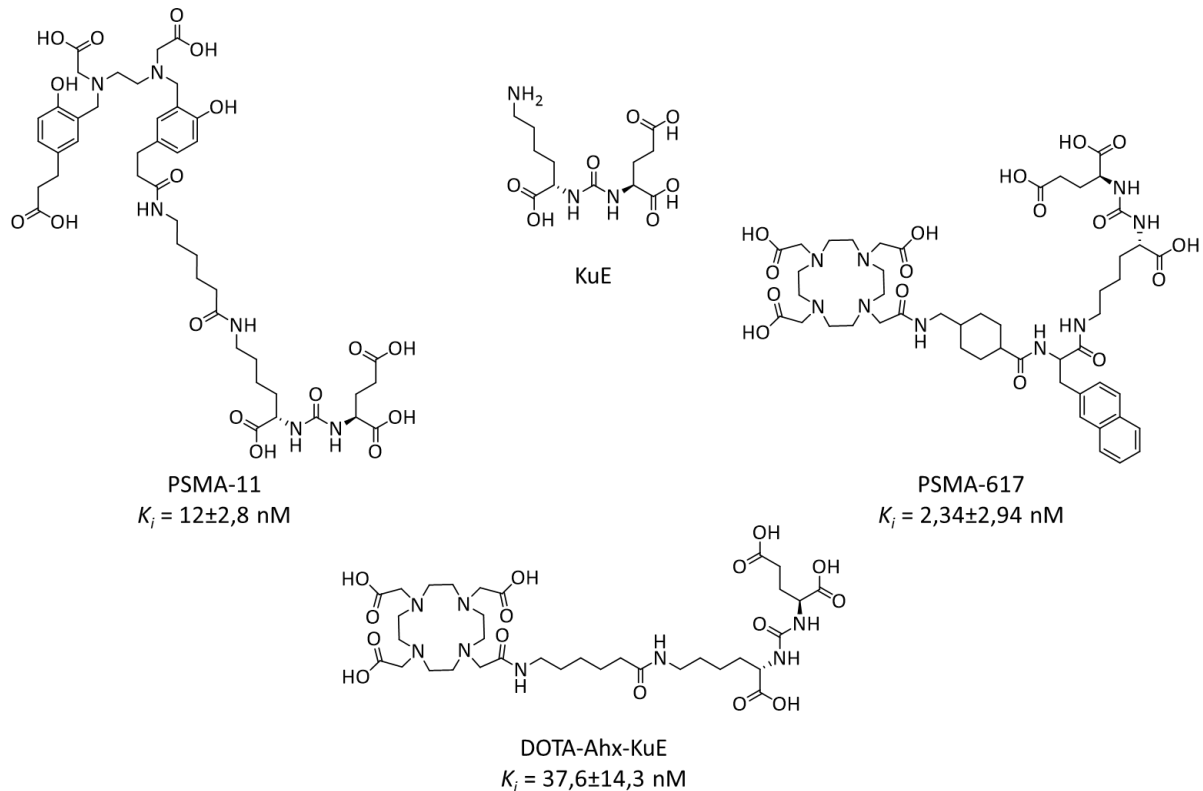


Abbildung 9: PSMA-Inhibitoren und ihre K_i -Werte.

1.5. Radiometalle für die nuklearmedizinische Anwendung

Die Anwendung von Radioaktivität in den Lebenswissenschaften geht zurück auf den ungarischen Chemiker Georg de Hevesy (1885-1966, Nobelpreis 1943). Bereits 1923 untersuchte er unter Verwendung von ^{212}Pb Stoffwechselforgänge in Pflanzen [73] und einige Jahre später mit Hilfe von ^{32}P in Ratten [74]. Das von ihm formulierte Tracerprinzip ist von großer Bedeutung für die Untersuchung chemischer, biochemischer und pharmakologischer Prozesse und somit auch für die Diagnostik in der Nuklearmedizin.

Die nuklearmedizinische Anwendung von Radionukliden beruht auf der Nutzung der von ihnen emittierten Strahlung. Für die Diagnostik wird die Umwandlung von Radionukliden unter Aussendung durchdringender Strahlung (γ -Strahlung) genutzt. Für therapeutische Anwendungen werden Partikel-emittierende Radionuklide verwendet, die ihre Zerfallsenergie innerhalb eines möglichst kleinen

Radius abgeben. Wichtige Radiometalle für die diagnostische Anwendung sind ^{68}Ga und $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Für therapeutische Zwecke werden unter anderem ^{89}Sr , ^{177}Lu , $^{186/188}\text{Re}$, ^{225}Ac und ^{223}Ra verwendet.

Erfolgt die Verwendung des Radiometalls nicht in ionischer Form, wie z. B. beim $^{89}\text{Sr}^{2+}$, so wird zur komplexchemischen Anknüpfung des Nuklids an den Tracer ein Chelator benötigt. Dabei kann der Chelator selbst die Affinität zur Zielstruktur liefern, wie z. B. bei $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP, oder der Chelator wird an einen Targetvektor gekoppelt, der mit der Zielstruktur wechselwirkt, wie z. B. beim ^{68}Ga -DOTATOC.

1.5.1. Radiometalle für die Diagnostik

Radiometalle wie ^{68}Ga oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ermöglichen durch ihre Anwendung in der PET bzw. SPECT eine nicht-invasive Bildgebung auf molekularer Ebene.

Die SPECT bzw. Szintigraphie ist die am häufigsten angewandte nuklearmedizinische Bildgebungstechnik. Sie verwendet γ -Strahlung emittierende Radionuklide mit einer γ -Energie zwischen 70 und 360 keV. Hierzu zählen ^{67}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{123}I und ^{201}Tl (Tabelle 2), wobei $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mit Abstand am wichtigsten ist und am häufigsten verwendet wird [75]. Laut International Atomic Energy Association (IAEA) wird es in über 80 % der diagnostischen Untersuchungen eingesetzt [76].

Die weite Verbreitung von $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ist vor allem auf seine gute Verfügbarkeit über den $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator zurückzuführen [77]. Des Weiteren wurde seine Verwendung durch die Entwicklung sogenannter „instant Kits“ gefördert, die eine schnelle und reproduzierbare Synthese in hohen Ausbeuten ermöglichen. Das Nuklid besitzt eine Halbwertszeit von 6,02 Stunden. Bei der isomeren Umwandlung zu ^{99}Tc wird γ -Strahlung mit einer Energie von 140 keV emittiert [78].

Tabelle 2: Eigenschaften wichtiger SPECT-Nuklide [79–81]

Radionuklid	$t_{1/2}$ [h]	Umwandlungsart	E_γ [keV]	Produktion
^{67}Ga	78,3	EC	90/190/300	$^{67}\text{Zn}(p,n)^{67}\text{Ga}$
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,02	IT	140	$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator
^{111}In	67,9	EC	170/250	$^{111}\text{Cd}(p,n)^{111}\text{In}$ $^{112}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$
^{123}I	13,2	EC	160	$^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$
^{201}Tl	73,1	EC	135/167	$^{203}\text{Tl}(p,3n)^{201}\text{Pb} \rightarrow ^{201}\text{Tl}$

Das für diese Arbeit relevante diagnostische Nuklid ist das PET-Nuklid ^{68}Ga . Weitere wichtige Vertreter für die Anwendung in der PET, neben den organischen Isotopen ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N und ^{11}C , sind unter anderem ^{64}Cu , ^{82}Rb , ^{44}Sc und ^{89}Zr . Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Eigenschaften dieser Nuklide. Die organischen Radionuklide sind Isotope natürlicher Elemente, die in den meisten Biomolekülen und Arzneistoffen vorkommen. Im Gegensatz zur Verwendung metallischer Radionuklide können Biomoleküle hiermit direkt markiert werden und die Notwendigkeit eines Chelators entfällt. Die radiomarkierten Tracer weisen damit die größtmögliche Ähnlichkeit mit ihrem natürlichen Vorbild auf. ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ min, β^+ -Anteil = 97 %, $E_{\beta\text{max}} = 0,653$ MeV) ist eins der am häufigsten eingesetzten Radioisotope in der Diagnostik und Bestandteil vieler zugelassener Radiopharmaka für die PET [82].

Tabelle 3: Eigenschaften wichtiger Radiometalle für die PET [80, 83–85]

Radionuklid	$t_{1/2}$	β^+ -Anteil [%]	$E_{\beta\text{max}}$ [MeV]	Produktion
^{44}Sc	3,9 h	94	1,463	$^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ -Generator
^{64}Cu	12,7 h	19	0,656	$^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ $^{64}\text{Ni}(d,2n)^{64}\text{Cu}$
^{68}Ga	67,71 min	89	1,9	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator
^{82}Rb	1,27 min	95	3,378	$^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$ -Generator
^{89}Zr	78,4 h	22,8	0,901	$^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ $^{89}\text{Y}(d,2n)^{89}\text{Zr}$

Die Auswahl des für die jeweilige Anwendung geeigneten Radionuklids hängt von mehreren Faktoren ab [86]. Dazu zählen unter anderem die Halbwertszeit, die maximale β^+ -Energie, die Verfügbarkeit sowie der β^+ -Anteil der Stabilisierung des Radionuklids, da Konkurrenzprozesse, wie etwa der Elektroneneinfang (EC) für die Messung mittels PET nicht geeignet sind. Des Weiteren spielt auch durch andere kernchemische Prozesse auftretende zusätzliche Strahlung eine Rolle.

Der wohl wichtigste Faktor bei der Wahl des Radioisotops zur Visualisierung eines bestimmten Prozesses im Körper stellt die Halbwertszeit dar. Alleine die kleine Übersicht an Nukliden in Tabelle 3 zeigt, dass die Bandbreite hier von einigen Minuten bis zu mehreren Tagen reicht. Radionuklide mit sehr kurzen Halbwertszeiten im Bereich von wenigen Minuten können nicht zur Darstellung komplexer und langsamer biochemischer Prozesse oder gar zur Synthese komplexer Verbindungen mit anschließender Aufreinigung eingesetzt werden. So wird ^{82}Rb beispielsweise für Perfusionsmessungen eingesetzt, während das längerlebige ^{89}Zr zur Visualisierung langsamerer Stoffwechselprozesse wie der Anreicherung von Antikörpern verwendet wird [87].

Auch die jeweilige β^+ -Energie spielt eine große Rolle bei der Wahl des Radionuklids. Die in Materie zurückgelegte Wegstrecke des emittierten Positrons steigt mit zunehmender kinetischer Energie und damit steigt auch die Ortsunschärfe. Zur Visualisierung kleiner Zielregionen sind daher Nuklide mit geringerer β -Energie besser geeignet.

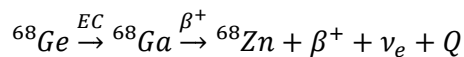
Gerade für den Einsatz in der Klinik ist die Verfügbarkeit der Radioisotope von großer Wichtigkeit. Die benötigten protonenreichen Nuklide können durch Beschuss eines Targets mit geladenen Teilchen am Zyklotron produziert oder durch Radionuklidgeneratoren erhalten werden [82]. Diese nutzen den Zerfall eines langlebigen Mutternuklids in ein kurzlebige Tochternuklid, das nach Separation zur Markierung eingesetzt werden kann. In Sachen Verfügbarkeit besitzen generatorproduzierte metallische Radionuklide deutliche Vorteile gegenüber den organischen Radioisotopen wie ^{18}F , deren Produktion das Vorhandensein eines Zyklotrons voraussetzt. Das prominenteste und am weitesten verbreitete Beispiel für ein solches Generatorsystem ist der $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator zur Gewinnung des SPECT-Nuklids $^{99\text{m}}\text{Tc}$, der sowohl durch die FDA als auch für den europäischen Markt zugelassen ist. Aber auch der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator, der jüngst in Europa und den USA zugelassen wurde, ermöglicht eine kostengünstige und einfache Herstellung des PET-Nuklids ^{68}Ga .

1.5.1.1. Gallium-68

Gallium ist ein in der Natur selten auftretendes Metall der 13. Hauptgruppe des Periodensystems mit der Elektronenkonfiguration $[\text{Ar}]4s^23d^{10}4p^1$ und der stabilen Oxidationsstufe +3. Nach dem „HSAB“-Konzept ist es eine harte Säure und bildet thermodynamisch stabile Komplexe mit harten Lewis-Basen wie Hydroxy-, Amino- oder Carboxylfunktionen [88]. Gallium bildet oktaedrische Komplexe mit der Koordinationszahl 6. Aufgrund ähnlicher Eigenschaften hinsichtlich Ladung und Ionenradius bildet Ga^{3+} vergleichbare Komplexe wie Fe^{3+} , was bei der Darstellung von Galliumkomplexen berücksichtigt werden muss [80, 89, 90]. Gallium hat zwei stabile Isotope (^{69}Ga und ^{71}Ga) und eine Vielzahl radioaktiver Isotope (u.a. ^{66}Ga , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{73}Ga und ^{74}Ga), die sich über β^+/β^- -Umwandlung oder Elektroneneinfang stabilisieren. Des Weiteren sind verschiedene metastabile Zustände bekannt ($^{64\text{m}}\text{Ga}$, $^{72\text{m}}\text{Ga}$ und $^{74\text{m}}\text{Ga}$).

Mit seiner Halbwertszeit von knapp 68 Minuten und einem β^+ -Anteil von 89 % in Kombination mit der einfachen und kostengünstigen Herstellung per Generator bietet ^{68}Ga sehr gute Voraussetzungen für den Einsatz in der Nuklearmedizin.

Nach Bildung durch das Mutternuklid ^{68}Ge ($t_{1/2} = 271 \text{ d}$) durch Elektroneneinfang zerfällt es unter Aussendung eines Positrons in das stabile ^{68}Zn :



Das Mutternuklid ^{68}Ge wird in einer $^{69}\text{Ga}(p,2n)^{68}\text{Ge}$ -Kernreaktion mit Protonenenergien von 23 MeV hergestellt [91].

1.5.1.2. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator

Nach radiochemischer Abtrennung vom bestrahlten Target wird das Mutternuklid ^{68}Ge auf einer anorganischen oder organischen Matrix fixiert, auf der es sich kontinuierlich in das Tochternuklid ^{68}Ga umwandelt. Das gebildete Gallium lässt sich in Abhängigkeit vom verwendeten Säulenmaterial mit 0,05-1,0 M HCl eluieren, ohne das fixierte Germanium von der Säule zu lösen [92].

Neben dem gewünschten $^{68}\text{Ga}^{3+}$ werden dabei aber auch noch andere metallische Verunreinigungen vom Generator eluiert. Dabei handelt es sich um Auswaschungen des Trägermaterials (Ti^{4+} oder Sn^{4+}), das aus ^{68}Ga gebildete stabile ^{68}Zn , Fe^{3+} -Ionen (vor allem aus der Herstellung der HCl) und eventuell vorhandenen Durchbruch an ^{68}Ge [93]. Darüber hinaus sind sowohl das stark saure Milieu als auch das große Volumen des Generatoreluats im Hinblick auf eine sich anschließende Markierung ungeeignet. Daher schließt sich an die Elution zunächst ein sogenanntes *post processing* an. Dabei unterscheidet man drei mögliche Methoden, die heute Anwendung finden: Fraktionierung, Anionenaustausch und Kationenaustausch (Abbildung 10).

Fraktionierung: Die Fraktionierung ist die einfachste Methode, bei der lediglich kleine Volumina getrennt aufgefangen und die Fraktionen mit der höchsten Volumenaktivität verwendet werden. Dabei werden meist über 80 % der Aktivität in Volumina kleiner 1,5 mL erhalten, die direkt zur Markierung verwendet werden können [93]. Zwar wird hierdurch das Volumen reduziert und die Kontamination mit ^{68}Ge verringert, weitere Fremdionen werden jedoch nicht entfernt. Des Weiteren kommt es zu einem Verlust von ^{68}Ga [94].

Anionenaustausch: Beim anionischen *post processing* wird dem initialen Eluat konzentrierte HCl zugesetzt, was zur Bildung anionischer Chlorokomplexe des Galliums führt, wie GaCl_6^{3-} oder GaCl_4^- . Diese werden auf einem Anionenaustauscher fixiert, während andere Ionen schlecht oder gar nicht gebunden und mit der Säure vom Austauscher gespült werden. Das fixierte Gallium kann schließlich mit Wasser eluiert werden [95].

Kationenaustausch: Im Rahmen dieser Arbeit wurde vorwiegend das kationische *post processing* verwendet. Dabei wird das $^{68}\text{Ga}^{3+}$ auf einem starken Kationenaustauscher fixiert. Der $^{68}\text{Ge}^{4+}$ -Durchbruch wird nicht gebunden und somit abgetrennt. Weitere fixierte Fremdionen können durch Waschen des Tauschers vor der Elution des Galliums entfernt werden. Die Elution kann schließlich mit unterschiedlichen Lösungsmitteln erfolgen. Man unterscheidet das Ethanol-, Aceton- und NaCl-basierte kationische *post processing* [96–98].

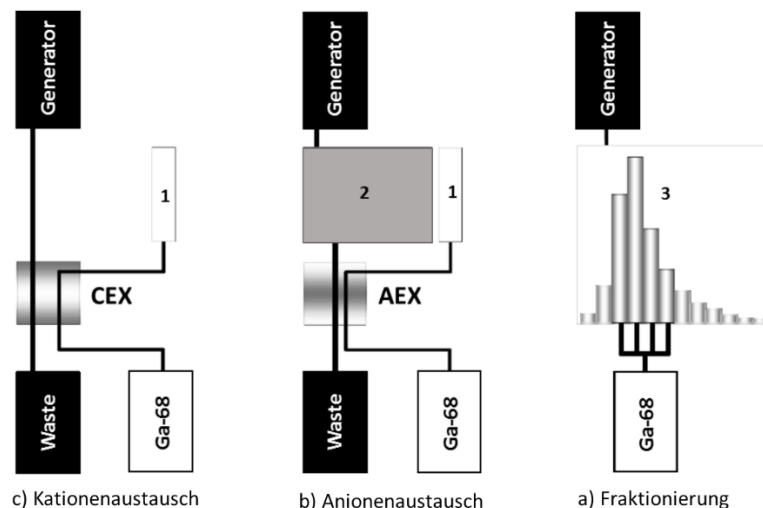


Abbildung 10: Schematische Darstellung der drei *post processing*-Methoden für $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatoren. CEX = cation exchange cartridge (Kationenaustauscher), AEX = anion exchange cartridge (Anionenaustauscher), 1: Elutionslösung des ^{68}Ga , 2: HCl-Reservoir (5-6 N HCl), 3: Eluatfraktionen [92].

Grundlage aller Generatorsysteme bildet ein radiochemisches Gleichgewicht, wobei je nach Verhältnis der Halbwertszeiten der Mutter und der Tochter zwischen zwei Fällen unterschieden wird. Ist die Halbwertszeit der Mutter etwa 10-mal so groß wie die der Tochter, so liegt ein transientes Gleichgewicht vor. Dies ist beim $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Generator der Fall. Beim säkularen Gleichgewicht hingegen ist die Halbwertszeit der Mutter wesentlich größer als die der Tochter und dieses Gleichgewicht liegt demnach dem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator zugrunde. Bei dieser Art des radioaktiven Gleichgewichts nähert sich die Aktivität der Tochter mit der Zeit der Aktivität der Mutter an, bis sie diese schließlich erreicht. Die Einstellung des Gleichgewichts erfolgt in der Regel nach 10 Halbwertszeiten der Tochter, in der Praxis werden beim $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator bereits nach 4 Stunden 94 % der maximal möglichen Aktivität erreicht. Aufgrund dieser Tatsache kann der Generator mehrmals täglich eluiert werden, was den Betrieb höchst wirtschaftlich macht. Des Weiteren ergibt sich aus der langen Halbwertszeit der Mutter eine Standzeit von etwa einem Jahr für klinische Anwendungen [99].

1.5.2. Radiometalle für die Therapie

Als Radionuklidtherapie, oder auch Endoradiotherapie, wird die systemische Applikation eines Radiopharmakons bezeichnet. Hierbei finden Radionuklide Anwendung, die sich unter Emission von Partikelstrahlung (β^- - bzw. α -Partikel oder Auger- bzw. Konversionselektronen) umwandeln. Der therapeutische Effekt beruht auf der Schädigung des Gewebes durch die ionisierende Wirkung der emittierten Strahlung. Demnach ist eine selektive Anreicherung des Radiopharmakons im erkrankten Gewebe unerlässlich, um eine Schädigung des umliegenden, gesunden Gewebes zu vermeiden und die Dosisleistung für den Patienten möglichst gering zu halten. Der Einsatz von Radionukliden zu therapeutischen Zwecken erfolgt zum Beispiel zur Behandlung von Lebertumoren (selektive interne Radiotherapie, SIRT), bei chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen, neuroendokrinen Tumoren und der palliativen Therapie von Knochenmetastasen [39, 100–102].

Auch bei der Auswahl des Radionuklids für die therapeutische Anwendung müssen, ähnlich wie bereits für die Diagnose beschrieben, einige Faktoren berücksichtigt werden [103]:

- Halbwertszeit des Radionuklids
- Art und Energie der emittierten Partikel
- spezifische Aktivität
- Kosten und Verfügbarkeit des Radioisotops

Die Halbwertszeit des Radionuklids muss auch bei der Therapie der Pharmakokinetik des Radiopharmakons angepasst werden. Zum anderen spielt sie eine Rolle bei der Verfügbarkeit. Je nach Art und Häufigkeit eines Targets ist die spezifische Aktivität von Bedeutung für die Wirksamkeit des Radiopharmakons. Die Art und Energie der Partikelemission und damit auch die Reichweite der emittierten Strahlung sollte schließlich, zum Beispiel im Falle der onkologischen Anwendung, der Größe und Morphologie des Tumors angepasst sein. Des Weiteren ist das Vorhandensein geeigneter γ -Linien für die parallele Visualisierung der Anreicherung sowie Kontrolle des Therapieverlaufs von Vorteil. Zu guter Letzt spielen die Kosten sowie die Verfügbarkeit des Nuklids eine große Rolle für die klinische Anwendung.

Heutzutage findet eine große Zahl therapeutischer Nuklide Anwendung in der Nuklearmedizin. Dazu gehören zum Beispiel ^{131}I (vor allem für die Radioiodtherapie von Schilddrüsenerkrankungen), ^{90}Y (Radiosynoviorthese von chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen, SIRT), ^{177}Lu (Radiopeptidtherapie neuroendokriner Tumoren) sowie eine ganze Reihe von Nukliden für die palliative Behandlung von Knochenmetastasen, deren Eigenschaften in Tabelle 4 zusammengefasst sind. Diese Nuklide werden in unterschiedlichen Formen (ionisch oder als Komplex) und Dosierungen verabreicht (Tabelle 5).

Tabelle 4: Eigenschaften wichtiger Radionuklide für die palliative Therapie von Knochenmetastasen [55, 104–108].

Radionuklid	$t_{1/2}$	$E_{\beta\max}$ [MeV]	E_{γ} [keV]	mttl. Reichweite im Gewebe [mm]	Produktion
^{32}P	14,3 d	1,71	-	2-3	$^{32}\text{S}(n,p)^{32}\text{P}$
^{89}Sr	50,5 d	1,46	-	2,4	$^{88}\text{Sr}(n,\gamma)^{89}\text{Sr}$
^{153}Sm	1,9 d	0,81	103,2	0,6	$^{152}\text{Sm}(n,\gamma)^{153}\text{Sm}$
^{186}Re	3,7 d	1,07	137	1,1	$^{185}\text{Re}(n,\gamma)^{186}\text{Re}$
^{188}Re	16,98 h	2,12	155	3,1	$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ -Generator

Tabelle 5: Dosierung verschiedener Radiopharmaka für die palliative Therapie von Knochenmetastasen [14].

Radionuklid	Radiopharmakon	Standarddosis
^{32}P	$\text{Na}_3^{32}\text{PO}_4$	5-10 mCi (185-370 MBq)
^{89}Sr	$^{89}\text{SrCl}_2$ (Metastron®)	4 mCi (148 MBq)
^{153}Sm	^{153}Sm -EDTMP (Quadramet®)	1 mCi/kg (37 MBq/kg)
^{186}Re	^{186}Re -HEDP	35 mCi (1295 MBq)
^{188}Re	^{188}Re -HEDP	30-118 mCi (1,1-4,4 GBq)

^{32}P in Form von Natriumorthophosphat und $^{89}\text{SrCl}_2$ waren die ersten Radiopharmaka für die palliative Therapie von Knochenmetastasen. Beide Isotope werden in Hydroxyapatit eingebaut, ^{32}P anstelle von natürlichem Phosphor und ^{89}Sr aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Calcium. Die hohe β -Energie und die damit verbundene vergleichsweise hohe Reichweite im Gewebe hat allerdings eine Myelotoxizität zur Folge [109]. Außerdem ist eine direkte Verlaufskontrolle aufgrund fehlender γ -Emission nicht möglich.

Die Entwicklung hin zu Nukliden mit geringerer β -Energie und damit potentiell geringerer Toxizität für gesundes Gewebe sowie das Knochenmark führte zur verstärkten Anwendung von ^{153}Sm , das meist als EDTMP-Komplex verwendet wird, und damit zur Ablösung vor allem von ^{32}P . ^{153}Sm -EDTMP ist eins der am häufigsten verwendeten Radiopharmaka für die palliative Behandlung von Knochenmetastasen. Die geringe maximale β -Energie von 0,81 MeV bedingt lediglich ein geringes Risiko der Knochenmarkstoxizität. Gleichzeitig zeigt ^{153}Sm -EDTMP eine hohe Effektivität hinsichtlich der Schmerzlinderung. Es hat jedoch keinen nachgewiesenen positiven Einfluss auf die Gesamtüberlebensrate [40, 110]. Das Nuklid ermöglicht außerdem eine parallele Therapiekontrolle sowie Untersuchungen der Dosimetrie aufgrund der Emission geeigneter γ -Strahlung. Es lässt sich

durch den Neutronenbeschuss eines angereicherten ^{152}Sm -Targets in einer $^{152}\text{Sm}(n,\gamma)^{153}\text{Sm}$ -Kernreaktion herstellen. Der relativ hohe Neutroneneinfangsquerschnitt ($\sigma = 208 \text{ b}$) ermöglicht die Produktion adäquater spezifischer Aktivitäten von $1,24 \times 10^7 \text{ GBq mol}^{-1}$ ($3,35 \times 10^5 \text{ Ci mol}^{-1}$ oder 2190 Ci g^{-1}) bei einem Neutronenfluss von $1 \times 10^{14} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [106]. Von Vorteil für die klinische Anwendung ist außerdem wie beim $^{99\text{m}}\text{Tc}$ das Vorhandensein von „instant Kits“, die eine schnelle und reproduzierbare Markierung gewährleisten.

Auch zwei Rhenium-Isotope, ^{188}Re und ^{186}Re , wurden bereits in Form des jeweiligen HEDP-Komplexes zur palliativen Behandlung von Knochenmetastasen eingesetzt. ^{188}Re hat die höchste β -Energie unter den verwendeten Nukliden und somit auch die höchste Reichweite, was wiederum von Nachteil ist für umliegendes Gewebe. Zwar ist hier die Gewinnung über den $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ -Generator von Vorteil, ^{188}Re -HEDP findet jedoch keine weite Anwendung in der klinischen Praxis. ^{186}Re hat wiederum eine geringere β -Energie und damit einhergehend ein geringeres Risiko der Knochenmarkstoxizität. Es wird durch Neutronenbeschuss eines angereicherten ^{185}Re -Targets in einer n,γ -Reaktion produziert. Auch für die Synthese von ^{186}Re -HEDP stehen „instant Kits“ zur Verfügung und dieses Radiopharmakon ist für den europäischen Markt zugelassen [14, 107].

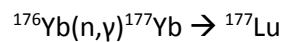
Neben den genannten β -Emittlern wurde mit $^{223}\text{RaCl}_2$ kürzlich das erste α -emittierende Radiopharmakon von der FDA zugelassen. Genau wie $^{89}\text{SrCl}_2$ hat es als Calcium-Mimetikum eine natürliche Knochenaffinität. ^{223}Ra hat eine Halbwertszeit von 11,4 Tagen und eine mittlere α -Energie von 5,64 MeV. Es zerfällt über eine Zerfallsreihe kurzlebiger Tochternuklide und liefert dabei vier α -Partikel mit einer Gesamtenergie von 28 MeV [111]. Die zusätzliche niederenergetische γ -Emission von 269 keV (13,6 %) und 154 keV (6,04 %) ermöglicht eine parallele Kontrolle des Therapieverlaufs. Das Radionuklid wird über einen $^{227}\text{Ac}/^{223}\text{Ra}$ -Nuklidgenerator erhalten, der eine lange Standzeit und damit permanente Versorgung mit ^{223}Ra gewährleistet [112]. $^{223}\text{RaCl}_2$ ist das erste Radiopharmakon, das neben der Schmerzlinderung auch zu einer Verlängerung der durchschnittlichen Lebensdauer führte [113]. Die hohen Kosten dieses Radiopharmakons könnten jedoch eine weitläufige klinische Anwendung behindern [39].

Auf die radiochemischen Eigenschaften der für diese Arbeit relevanten therapeutischen Nuklide ^{177}Lu und ^{225}Ac wird in den folgenden beiden Abschnitten näher eingegangen.

1.5.2.1. Lutetium-177

^{177}Lu hat aufgrund seiner kernchemischen Eigenschaften in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung für die nuklearmedizinische Anwendung gewonnen. Es hat eine Halbwertszeit von 6,7 Tagen und eine maximale β -Energie von 0,49 MeV, wodurch es ein für die Radionuklidtherapie

attraktives Radioisotop ist. Die Halbwertszeit erlaubt die Produktion, radiochemische Verarbeitung und weltweite Distribution ohne großen Aktivitätsverlust und ist dennoch nicht so lange, dass sie eine große Strahlenbelastung für den Patienten darstellt. Die vergleichsweise geringe β -Energie bedingt ein niedriges Risiko einer Knochenmarkstoxizität. Während des Zerfalls zu stabilem ^{177}Hf werden außerdem γ -Photonen von 208 bzw. 113 keV emittiert, die eine simultane Bildgebung ermöglichen. ^{177}Lu kann durch Neutronenbeschuss von natürlichem Lu_2O_3 (2,6 % ^{176}Lu) oder angereichertem Lu_2O_3 (60,6 % ^{176}Lu) über eine $^{176}\text{Lu}(n,\gamma)^{177}\text{Lu}$ -Kernreaktion produziert werden. Diese Reaktion liefert eine vergleichsweise hohe spezifische Aktivität im Bereich von knapp 200 Ci g^{-1} bei Verwendung von natürlichem Lutetium als Target bis über 6000 Ci g^{-1} bei Verwendung von hoch angereichertem ^{176}Lu (Bestrahlung von 100 mg Target über 100 h bei einem Neutronenfluss von $1 \times 10^{14} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$) aufgrund des sehr großen Neutroneneinfangsquerschnitts von ^{176}Lu ($\sigma = 2011 \text{ b}$) [114, 115]. Eine weitere Möglichkeit zur Produktion von ^{177}Lu ist die Bestrahlung von angereichertem ^{176}Yb mit thermischen Neutronen. Das dabei zunächst gebildete ^{177}Yb ($t_{1/2} = 1,9 \text{ h}$) zerfällt unter β^- -Emission zu ^{177}Lu :



Diese Produktionsroute ermöglicht zwar die Herstellung von n.c.a. ^{177}Lu , jedoch erfordert sie die Abtrennung des ^{176}Yb . Eine von Lebedev *et al.* entwickelte Separationsmethode ermöglicht die Abtrennung des produzierten ^{177}Lu vom Targetmaterial. Die so erhaltene spezifische Aktivität entspricht der theoretisch möglichen von $7,2 \times 10^7 \text{ GBq mol}^{-1}$ bzw. $1,0994 \times 10^5 \text{ Ci g}^{-1}$ [115].

Wie bei den Lanthaniden üblich, ist die stabilste Oxidationszahl des Lutetiums +3. Es bildet Komplexe mit mehrzähligen Liganden, die nach dem HSAB-Konzept harte Donoratome wie Sauerstoff oder Stickstoff enthalten [116]. Im Komplex mit DOTA, dem geläufigsten Chelator für ^{177}Lu , der 8 Koordinationsstellen bietet, weist es eine quadratisch-antiprismatische Koordinationsgeometrie auf [117].

1.5.2.2. Actinium-225

Nachdem $^{223}\text{RaCl}_2$ gute Ergebnisse in klinischen Studien gezeigt und außerdem, im Gegensatz zu allen gebräuchlichen β -Partikel emittierenden Radiopharmaka, zu einer Verlängerung der durchschnittlichen Lebensdauer geführt hat, steigt auch das Interesse an weiteren α -Partikel-emittierenden Radionukliden für die therapeutische Anwendung. ^{223}Ra ist ein Calcium-Mimetikum und reichert sich daher in ionischer Form im Knochen an. Andere α -Emitter, wie beispielsweise ^{225}Ac , können jedoch ebenso wie diverse bereits beschriebene Radiometalle in komplexierter Form unter Verwendung Phosphonat-basierter Strukturen zum Knochen transportiert werden [118].

Der therapeutische Effekt von knochenbindenden Radiopharmaka beruht nicht nur auf der möglichst guten Anreicherung im metastatischen Knochen, er hängt vor allem von der Energiedeposition des verwendeten Partikelemitters ab. Im Vergleich zu β -Partikeln deponiert ein α -Partikel ≥ 500 -mal mehr Energie auf der gleichen Wegstrecke aufgrund seines hohen linearen Energietransfers (LET) im Bereich von $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Außerdem beträgt seine Reichweite in Gewebe nur $50\text{-}100 \mu\text{m}$ und damit nur wenige Zelldurchmesser, was eine deutlich spezifischere Energiedeposition ermöglicht und damit gleichzeitig das Risiko für umgebendes, gesundes Gewebe, vor allem das Knochenmark, minimiert [119]. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass α -Partikelstrahlung eine Radioresistenz gegenüber β -Emittern bzw. eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika überwinden kann [119, 120]. Es gibt eine Reihe potentiell verwendbarer α -Emitter, darunter unter anderem ^{211}At , ^{213}Bi , ^{227}Th oder ^{212}Pb .

Auch ^{225}Ac mit einer Halbwertszeit von 10 Tagen sowie einer hochenergetischen α -Emission von $5,8 \text{ MeV}$ ist ein geeigneter Kandidat für die therapeutische Anwendung. Es zerfällt über eine Zerfallsreihe mit 6 radioaktiven Töchtern. Jedem Zerfall von ^{225}Ac folgt die Emission von 4 α - und 2 β -Partikeln (Abbildung 11). Die Emission zweier geeigneter γ -Linien durch die Töchter ^{221}Fr ($t_{1/2} = 4,8 \text{ min}$, $E_\gamma = 218 \text{ keV}$) und ^{213}Bi ($t_{1/2} = 45,6 \text{ min}$, $E_\gamma = 440 \text{ keV}$) ermöglicht außerdem die Darstellung der Bioverteilung [121].

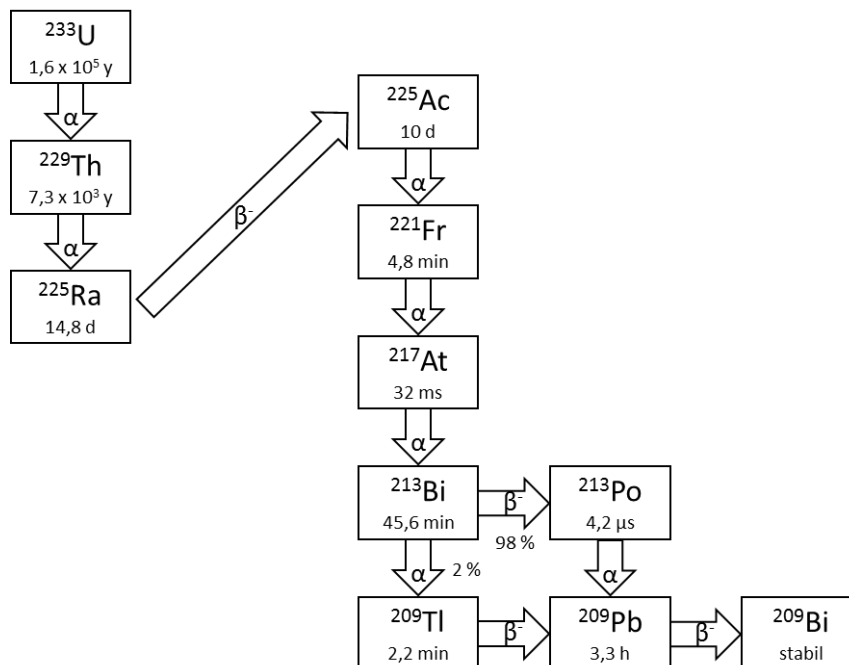


Abbildung 11: Zerfallsschema von ^{225}Ac .

Das Radionuklid kann zum einen aus dem Zerfall von ^{229}Th erhalten werden, welches wiederum aus dem Zerfall von ^{233}U und somit aus der Neptunium-Zerfallsreihe stammt. ^{229}Th ($t_{1/2} = 7340 \text{ y}$) zerfällt zu

^{225}Ra ($t_{1/2} = 14,8$ d) und dieses wiederum unter β -Emission zu ^{225}Ac , welches schließlich unter Verwendung von Anionen- und Kationenaustauschern abgetrennt werden kann [122]. Das benötigte ^{229}Th kann unterschiedlichen Ursprungs sein. Zum Beispiel aus dem Neutroneneinfang von ^{232}Th , welcher zur Bildung von ^{233}U führt. Es kann auch durch mehrfachen Neutroneneinfang von ^{223}Ra erhalten werden [123]. Außer durch den Zerfall von ^{229}Th kann ^{225}Ac aber auch direkt über die Bestrahlung von ^{226}Ra mit Protonen am Zyklotron über eine $^{226}\text{Ra}(p,2n)^{225}\text{Ac}$ -Kernreaktion produziert werden [124].

Die Koordinationschemie von Ac^{3+} ist nicht genau bestimmt, vor allem da keine stabilen Isotope existieren. Die Anwendung von ^{225}Ac ist daher bisher limitiert durch das Vorhandensein geeigneter Chelatorsysteme, die das Radionuklid stabil komplexieren. Problematisch hinsichtlich der stabilen Komplexbildung ist außerdem die Rückstoßenergie der α -Partikelemission (100-200 keV), die größer ist als die Bindungsenergie des Komplexes [125]. Es wurden bereits diverse Chelatorsysteme bezüglich ihrer Fähigkeit zur Komplexbildung des Nuklids getestet [126]. Die großen makrozyklischen Chelatoren PEPA (1,4,7,10,13-Pentaazacyclopentadecan- N,N',N'',N''',N'''' -pentaessigsäure) und HEHA (1,4,7,10,13,16-Hexaazacyclohexadecan- $N,N',N'',N''',N''''',N''''''$ -hexaessigsäure) (Abbildung 12) wurden als geeignete Kandidaten angesehen, vor allem HEHA mit seinen insgesamt 12 Donorliganden und der großen makrozyklischen Kavität passend zum großen Ionenradius von Ac^{3+} . Der ^{225}Ac -HEHA-Komplex erwies sich jedoch ebenfalls als nicht stabil. Daher bleibt DOTA bis heute der „Goldstandard“ zur Komplexbildung von ^{225}Ac [127].

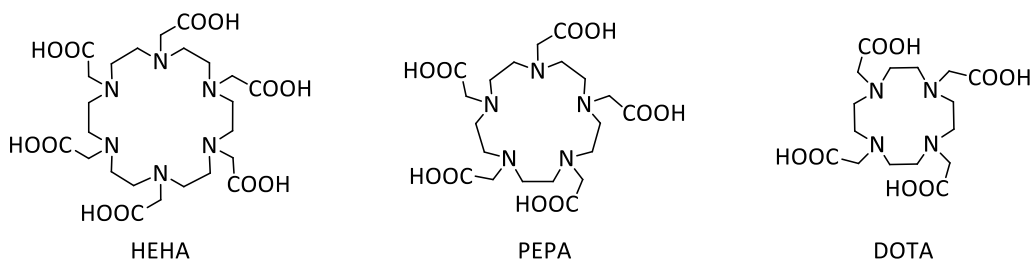


Abbildung 12: Strukturen der Chelatoren HEHA, PEPA und DOTA.

Referenzen

- [1] Weiland, S.K.; Rapp, K.; Klenk, J.; Keil, U. Zunahme der Lebenserwartung: Größenordnung, Determinanten und Perspektiven. *Dtsch Arztebl International*, **2006**, 103, A-1072.
- [2] Stewart, B.W.; Wild, C.P. *World Cancer Report 2014*; International Agency for Research on Cancer/World Health Organization: Lyon, **2014**.
- [3] Friedrich, C.R. 100 Jahre Röntgenstrahlen Erster Nobelpreis für Physik. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.*, **1995**, 26, 598–607.

- [4] Allisy, A. Henri Becquerel: The Discovery of Radioactivity. *Radiation Protection Dosimetry*, **1996**, 68, 3–10.
- [5] Garrett, A.B. Radioactive tracers: George de Hevesy. *J. Chem. Educ.*, **1963**, 40, 36.
- [6] Phelps, M.E. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2000**, 97, 9226–9233.
- [7] Herzog, H.; Rösch, F. PET- und SPECT-Technik: Chemie und Physik der Bildgebung. *Pharmazie in unserer Zeit*, **2005**, 34, 468–473.
- [8] Baum, R.P.; Kulkarni, H.R. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labelled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*, **2012**, 2, 437–447.
- [9] DeNardo, G.L.; DeNardo, S.J. Concepts, consequences, and implications of theranosis. *Semin Nucl Med*, **2012**, 42, 147–150.
- [10] Dorozhkin, S.V.; Epple, M. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew. Chem.*, **2002**, 114, 3260–3277.
- [11] Felsenberg, D. Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxyapatit. *Pharmazie in unserer Zeit*, **2001**, 30, 488–494.
- [12] Avioli, L.V.; Krane, S.M., Eds. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*; Academic Press: San Diego, **1998**.
- [13] Keck, A. V., Pecherstorfer, M. Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. *Journal für Mineralstoffwechsel*, **2003**, 10, 6–11.
- [14] Paes, F.M.; Serafini, A.N. Systemic metabolic radiopharmaceutical therapy in the treatment of metastatic bone pain. *Semin Nucl Med*, **2010**, 40, 89–104.
- [15] Hoffmann, O. Zelluläre und molekulare Mechanismen der Tumormetastasierung in den Knochen. *Journal für Mineralstoffwechsel*, **2003**, 10, 12–15.
- [16] Ewing, J. Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours. *Br. J. Surg.*, **1928**, 16, 174–175.
- [17] Paget, S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *The Lancet*, **1889**, 133, 571–573.
- [18] Weiss, L.; Haydock, K.; Pickren, J.W.; Lane, W.W. Organ vascularity and metastatic frequency. *Am J Pathol*, **1980**, 101, 101–113.
- [19] Hauschka, P.V.; Mavrakos, A.E.; Iafrazi, M.D.; Doleman, S.E.; Klagsbrun, M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem*, **1986**, 261, 12665–12674.
- [20] Mundy, G.R. Mechanisms of bone metastasis. *Cancer*, **1997**, 80, 1546–1556.
- [21] Mundy, G.R. Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, **2002**, 2, 584–593.
- [22] Rubens, R.D. Bone metastases—The clinical problem. *European Journal of Cancer*, **1998**, 34, 210–213.
- [23] Huang, Q.; Ouyang, X. Biochemical-markers for the diagnosis of bone metastasis: A clinical review. *Cancer Epidemiol*, **2012**, 36, 94–98.

- [24] Hamaoka, T.; Madewell, J.E.; Podoloff, D.A.; Hortobagyi, G.N.; Ueno, N.T. Bone imaging in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, **2004**, *22*, 2942–2953.
- [25] Tateishi, U.; Morita, S.; Taguri, M.; Shizukuishi, K.; Minamimoto, R.; Kawaguchi, M.; Murano, T.; Terauchi, T.; Inoue, T.; Kim, E.E. A meta-analysis of ¹⁸F-Fluoride positron emission tomography for assessment of metastatic bone tumor. *Ann Nucl Med*, **2010**, *24*, 523–531.
- [26] Mosavi, F.; Johansson, S.; Sandberg, D.T.; Turesson, I.; Sörensen, J.; Ahlström, H. Whole-body diffusion-weighted MRI compared with ¹⁸F-NaF PET/CT for detection of bone metastases in patients with high-risk prostate carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, **2012**, *199*, 1114–1120.
- [27] Beheshti, M.; Langsteger, W.; Fogelman, I. Prostate cancer: Role of SPECT and PET in imaging bone metastases. *Semin Nucl Med*, **2009**, *39*, 396–407.
- [28] Ache, H.J. Chemie des Positrons und Positroniums. *Angew. Chem.*, **1972**, *84*, 234–255.
- [29] Deutsch, M. Evidence for the Formation of Positronium in Gases. *Phys. Rev.*, **1951**, *82*, 455–456.
- [30] Deutsch, M. Three-Quantum Decay of Positronium. *Phys. Rev.*, **1951**, *83*, 866–867.
- [31] Herzog, H. Methods and applications of positron-based medical imaging. *Radiation Physics and Chemistry*, **2007**, *76*, 337–342.
- [32] Engelbogen, N. Quadratsäurediester als Brücke zwischen Chelatoren und Biomolekülen in der Radiopharmazie: Synthese und Evaluierung von Radiopharmaka zur Diagnose von Leberfibrose sowie zur Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen. *Dissertation*, **2017**.
- [33] Melcher, C.L. Scintillation Crystals for PET. *Journal of Nuclear Medicine*, **2000**, *41*, 1051–1055.
- [34] Jadvar, H., Parker, J. A. *Clinical PET and PET/CT*; Springer-Verlag: London, **2005**.
- [35] Selvaggi, G.; Scagliotti, G.V. Management of bone metastases in cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2005**, *56*, 365–378.
- [36] Christo, P.J.; Mazloomdoost, D. Cancer pain and analgesia. *Ann N Y Acad Sci*, **2008**, *1138*, 278–298.
- [37] Jeremic, B. Single fraction external beam radiation therapy in the treatment of localized metastatic bone pain. A review. *J Pain Symptom Manage*, **2001**, *22*, 1048–1058.
- [38] Costa, L.; Major, P.P. Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. *Nat Clin Pract Oncol*, **2009**, *6*, 163–174.
- [39] Das, T.; Banerjee, S. Radiopharmaceuticals for metastatic bone pain palliation: Available options in the clinical domain and their comparisons. *Clin Exp Metastasis*, **2017**, *34*, 1–10.
- [40] Sartor, O.; Hoskin, P.; Bruland, O.S. Targeted radio-nuclide therapy of skeletal metastases. *Cancer Treat Rev*, **2013**, *39*, 18–26.
- [41] Lewington, V.J. Targeted radionuclide therapy for bone metastases. *Eur J Nucl Med*, **1993**, *20*, 66–74.
- [42] Palma, E.; Correia, J.D.G.; Campello, M.P.C.; Santos, I. Bisphosphonates as radionuclide carriers for imaging or systemic therapy. *Mol Biosyst*, **2011**, *7*, 2950–2966.
- [43] Jung, A.; Bisaz, S.; Fleisch, H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calc. Tis Res.*, **1973**, *11*, 269–280.

- [44] van Beek, E.; Löwik, C.; Que, I.; Papapoulos, S. Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group. *J Bone Miner Res*, **1996**, *11*, 1492–1497.
- [45] Rogers, M.J.; Gordon, S.; Benford, H.L.; Coxon, F.P.; Luckman, S.P.; Monkkonen, J.; Frith, J.C. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*, **2000**, *88*, 2961–2978.
- [46] Baron, R.; Neff, L.; Louvard, D.; Courtoy, P.J. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. *J Cell Biol*, **1985**, *101*, 2210–2222.
- [47] Blair, H.C.; Teitelbaum, S.L.; Ghiselli, R.; Gluck, S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, **1989**, *245*, 855–857.
- [48] Ebetino, F.H.; Francis, M.D.; Rogers, M.J.; Russell, R.G.G. Mechanisms of action of etidronate and other bisphosphonates. *Reviews in Contemporary Pharmacotherapy*, **1998**, *9*, 233–243.
- [49] Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, **2008**, *19*, 733–759.
- [50] Drake, M.T.; Clarke, B.L.; Khosla, S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*, **2008**, *83*, 1032–1045.
- [51] Papapoulos, S.E. Bisphosphonates: How do they work? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **2008**, *22*, 831–847.
- [52] Sato, M.; Grasser, W.; Endo, N.; Akins, R.; Simmons, H.; Thompson, D.D.; Golub, E.; Rodan, G.A. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest*, **1991**, *88*, 2095–2105.
- [53] Lin, J.H. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone*, **1996**, *18*, 75–85.
- [54] Even-Sapir, E.; Metser, U.; Mishani, E.; Lievshitz, G.; Lerman, H.; Leibovitch, I. The Detection of Bone Metastases in Patients with High-Risk Prostate Cancer: ^{99m}Tc-MDP Planar Bone Scintigraphy, Single- and Multi-Field-of-View SPECT, ¹⁸F-Fluoride PET, and ¹⁸F-Fluoride PET/CT. *Journal of Nuclear Medicine*, **2006**, *47*, 287–297.
- [55] Pandit-Taskar, N.; Batraki, M.; Divgi, C.R. Radiopharmaceutical therapy for palliation of bone pain from osseous metastases. *J Nucl Med*, **2004**, *45*, 1358–1365.
- [56] Khalid, M.; Bokhari, T.H.; Ahmad, M.; Bhatti, H.N.; Iqbal, M.; Ghaffar, A.; Qadir, M.I. Evaluation of carrier added and no carrier added ⁹⁰Y-EDTMP as bone seeking therapeutic radiopharmaceutical. *Pak J Pharm Sci*, **2014**, *27*, 813–818.
- [57] Kálmán, F.K.; Király, R.; Brücher, E. Stability Constants and Dissociation Rates of the EDTMP Complexes of Samarium(III) and Yttrium(III). *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, *2008*, 4719–4727.
- [58] Beyer, G.J.; Offord, R.; Künzi, G.; Aleksandrova, Y.; Ravn, U.; Jahn, S.; Barker, J.; Tengblad, O.; Lindroos, M. The influence of EDTMP-concentration on the biodistribution of radio-lanthanides and ²²⁵Ac in tumor-bearing mice. The ISOLDE Collaboration. *Nucl Med Biol*, **1997**, *24*, 367–372.

- [59] Ogawa, K.; Mukai, T.; Inoue, Y.; Ono, M.; Saji, H. Development of a novel ^{99m}Tc -chelate-conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent. *J Nucl Med*, **2006**, 47, 2042–2047.
- [60] Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Semin Nucl Med*, **2016**, 46, 373–394.
- [61] Meckel, M.; Bergmann, R.; Miederer, M.; Roesch, F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: ^{67}Ga -DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. *EJNMMI radiopharm. chem.*, **2017**, 1, 1481.
- [62] Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, **2015**, 65, 87–108.
- [63] Eder, M.; Eisenhut, M.; Babich, J.; Haberkorn, U. PSMA as a target for radiolabelled small molecules. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2013**, 40, 819–823.
- [64] Pillai, M.R.A.; Nanabala, R.; Joy, A.; Sasikumar, A.; Russ Knapp, F.F. Radiolabelled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: Effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. *Nucl Med Biol*, **2016**, 43, 692–720.
- [65] Silver, D.A.; Pellicer, I.; Fair, W.R.; Heston, W.D.; Cordon-Cardo, C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res*, **1997**, 3, 81–85.
- [66] Wüstemann, T.; Bauder-Wüst, U.; Schäfer, M.; Eder, M.; Benesova, M.; Leotta, K.; Kratochwil, C.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Mier, W. Design of Internalizing PSMA-specific Glu-ureido-based Radiotherapeutics. *Theranostics*, **2016**, 6, 1085–1095.
- [67] Rajasekaran, S.A.; Anilkumar, G.; Oshima, E.; Bowie, J.U.; Liu, H.; Heston, W.; Bander, N.H.; Rajasekaran, A.K. A novel cytoplasmic tail MXXXL motif mediates the internalization of prostate-specific membrane antigen. *Mol Biol Cell*, **2003**, 14, 4835–4845.
- [68] Barinka, C.; Rojas, C.; Slusher, B.; Pomper, M. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *CMC*, **2012**, 19, 856–870.
- [69] Kozikowski, A.P.; Zhang, J.; Nan, F.; Petukhov, P.A.; Grajkowska, E.; Wroblewski, J.T.; Yamamoto, T.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J.H. Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: Efficacy as analgesic agents. *J Med Chem*, **2004**, 47, 1729–1738.
- [70] Lütje, S.; Heskamp, S.; Cornelissen, A.S.; Poeppel, T.D.; van den Broek, S.A.M.W.; Rosenbaum-Krumme, S.; Bockisch, A.; Gotthardt, M.; Rijpkema, M.; Boerman, O.C. PSMA Ligands for Radionuclide Imaging and Therapy of Prostate Cancer: Clinical Status. *Theranostics*, **2015**, 5, 1388–1401.
- [71] Eder, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Hull, W.-E.; Wängler, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. ^{68}Ga -complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug Chem*, **2012**, 23, 688–697.
- [72] Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Schäfer, M.; Klika, K.D.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. *J Med Chem*, **2016**, 59, 1761–1775.

- [73] Hevesy, G. The Absorption and Translocation of Lead by Plants: A Contribution to the Application of the Method of Radioactive Indicators in the Investigation of the Change of Substance in Plants. *Biochemical Journal*, **1923**, 17, 439–445.
- [74] CHIEWITZ, O.; HEVESY, G. Radioactive Indicators in the Study of Phosphorus Metabolism in Rats. *Nature*, **1935**, 136, 754–755.
- [75] Banerjee, S.; Ambikalmajan Pillai, M.R.; Ramamoorthy, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med*, **2001**, 31, 260–277.
- [76] *Technetium-99 m radiopharmaceuticals: Manufacture of kits*; Internat. Atomic Energy Agency: Vienna, **2008**.
- [77] Molinski, V.J. A review of ^{99m}Tc generator technology. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, **1982**, 33, 811–819.
- [78] van den Wyngaert, T.; Strobel, K.; Kampen, W.U.; Kuwert, T.; van der Bruggen, W.; Mohan, H.K.; Gnanasegaran, G.; Delgado-Bolton, R.; Weber, W.A.; Beheshti, M.; Langsteger, W.; Giammarile, F.; Mottaghy, F.M.; Paycha, F. The EANM practice guidelines for bone scintigraphy. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2016**, 43, 1723–1738.
- [79] Pimlott, S.L.; Sutherland, A. Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chem Soc Rev*, **2011**, 40, 149–162.
- [80] Wadas, T.J.; Wong, E.H.; Weisman, G.R.; Anderson, C.J. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev*, **2010**, 110, 2858–2902.
- [81] *Cyclotron produced radionuclides - physical characteristics and production methods*; Internat. Atomic Energy Agency: Vienna, **2009**.
- [82] Vallabhajosula, S.; Solnes, L.; Vallabhajosula, B. A broad overview of positron emission tomography radiopharmaceuticals and clinical applications: What is new? *Semin Nucl Med*, **2011**, 41, 246–264.
- [83] Vértes, A.; Nagy, S.; Klencsár, Z.; Lovas, R.G.; Rösch, F., Eds. *Handbook of Nuclear Chemistry*; Springer US: Boston, MA, **2011**.
- [84] Blue, J.W.; Bleuler, E. Radioactivity of Sc-44. *Phys. Rev.*, **1955**, 100, 1324–1329.
- [85] Conti, M.; Eriksson, L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: A review and a discussion. *EJNMMI Phys*, **2016**, 3, 8.
- [86] Lundqvist, H.; Tolmachev, V. Targeting peptides and positron emission tomography. *Biopolymers*, **2002**, 66, 381–392.
- [87] van de Watering, F.C.J.; Rijpkema, M.; Perk, L.; Brinkmann, U.; Oyen, W.J.G.; Boerman, O.C. Zirconium-89 labelled antibodies: A new tool for molecular imaging in cancer patients. *Biomed Res Int*, **2014**, 2014, 203601.
- [88] Pearson, R.G. Hard and Soft Acids and Bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3533–3539.
- [89] Delgado, R.; Sun, Y.; Motekaitis, R.J.; Martell, A.E. Stabilities of divalent and trivalent metal ion complexes of macrocyclic triazatriacetic acids. *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 3320–3326.
- [90] Harris, W.R.; Pecoraro, V.L. Thermodynamic binding constants for gallium transferrin. *Biochemistry*, **2002**, 22, 292–299.

- [91] Rösch F., Filosofov D. V., John K.D., Mausner J.L., Ruth T.J., Samanta S.K., Knapp F.F., Mirzadeh S.J., Garland M., Ponsard B., Kuznetsov R. *Production of long lived parent radionuclides for generators: ^{68}Ge , ^{82}Sr , ^{90}Sr and ^{188}W* ; IAEA: Vienna, **2010**.
- [92] Roesch, F. Maturation of a Key Resource – The Germanium-68/Gallium-68 Generator: Development and New Insights. *CRP*, **2012**, 5, 202–211.
- [93] Zhernosekov, K.P.; Filosofov, D.V.; Baum, R.P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A.A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Rösch, F. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. *J Nucl Med*, **2007**, 48, 1741–1748.
- [94] Breeman, W.A.P.; Jong, M. de; Blois, E. de; Bernard, B.F.; Konijnenberg, M.; Krenning, E.P. Radiolabelling DOTA-peptides with ^{68}Ga . *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2005**, 32, 478–485.
- [95] Meyer, G.-J.; Mäcke, H.; Schuhmacher, J.; Knapp, W.H.; Hofmann, M. ^{68}Ga -labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2004**, 31, 1097–1104.
- [96] Eppard, E.; Wuttke, M.; Nicodemus, P.L.; Rösch, F. Ethanol-Based Post-processing of Generator-Derived ^{68}Ga Toward Kit-Type Preparation of ^{68}Ga -Radiopharmaceuticals. *J Nucl Med*, **2014**, 55, 1023–1028.
- [97] Mueller, D.; Klette, I.; Baum, R.P.; Gottschaldt, M.; Schultz, M.K.; Breeman, W.A.P. Simplified NaCl based ^{68}Ga concentration and labelling procedure for rapid synthesis of ^{68}Ga radiopharmaceuticals in high radiochemical purity. *Bioconjug Chem*, **2012**, 23, 1712–1717.
- [98] Asti, M.; Pietri, G. de; Fraternali, A.; Grassi, E.; Sghedoni, R.; Fioroni, F.; Roesch, F.; Versari, A.; Salvo, D. Validation of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator processing by chemical purification for routine clinical application of ^{68}Ga -DOTATOC. *Nucl Med Biol*, **2008**, 35, 721–724.
- [99] Roesch, F.; J. Riss, P. The Renaissance of the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ Radionuclide Generator Initiates New Developments in ^{68}Ga Radiopharmaceutical Chemistry. *CTMC*, **2010**, 10, 1633–1668.
- [100] Heuft-Dorenbosch, L.L.J. Yttrium radiosynoviorthesis in the treatment of knee arthritis in rheumatoid arthritis: A systematic review. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **2000**, 59, 583–586.
- [101] Kaltsas, G.A.; Besser, G.M.; Grossman, A.B. The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocr Rev*, **2004**, 25, 458–511.
- [102] Stubbs, R.S.; Cannan, R.J.; Mitchell, A.W. Selective internal radiation therapy (SIRT) with ^{90}Y trium microspheres for extensive colorectal liver metastases. *Hepatogastroenterology*, **2001**, 48, 333–337.
- [103] Cutler, C.S.; Hennkens, H.M.; Sisay, N.; Huclier-Markai, S.; Jurisson, S.S. Radiometals for combined imaging and therapy. *Chem Rev*, **2013**, 113, 858–883.
- [104] Silberstein, E.B.; Elgazzar, A.H.; Kapilivsky, A. Phosphorus-32 radiopharmaceuticals for the treatment of painful osseous metastases. *Semin Nucl Med*, **1992**, 22, 17–27.
- [105] Vimalnath, K.V.; Shetty, P.; Chakraborty, S.; Das, T.; Chirayil, V.; Sarma, H.D.; Jagadeesan, K.C.; Joshi, P.V. Practicality of production of ^{32}P by direct neutron activation for its utilization in bone pain palliation as $\text{Na}_3^{32}\text{PPO}_4$. *Cancer Biother Radiopharm*, **2013**, 28, 423–428.
- [106] Das, T.; Pillai, M.R.A. Options to meet the future global demand of radionuclides for radionuclide therapy. *Nucl Med Biol*, **2013**, 40, 23–32.

- [107] Maxon, H.R.; Deutsch, E.A.; Thomas, S.R.; Libson, K.; Lukes, S.J.; Williams, C.C.; Ali, S. Re-186(Sn) HEDP for treatment of multiple metastatic foci in bone: Human biodistribution and dosimetric studies. *Radiology*, **1988**, 166, 501–507.
- [108] Bodei, L.; Lam, M.; Chiesa, C.; Flux, G.; Brans, B.; Chiti, A.; Giammarile, F. EANM procedure guideline for treatment of refractory metastatic bone pain. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2008**, 35, 1934–1940.
- [109] Atkins, H.L. Overview of nuclides for bone pain palliation. *Applied Radiation and Isotopes*, **1998**, 49, 277–283.
- [110] Holmes, R.A. ¹⁵³Sm EDTMP: A potential therapy for bone cancer pain. *Semin Nucl Med*, **1992**, 22, 41–45.
- [111] Vaidyanathan, G.; R. Zalutsky, M. Applications of ²¹¹At and ²²³Ra in Targeted Alpha-Particle Radiotherapy. *CRP*, **2011**, 4, 283–294.
- [112] Henriksen, G.; Hoff, P.; Alstad, J.; Larsen, R.H. ²²³Ra for endoradiotherapeutic applications prepared from an immobilized ²²⁷Ac/²²⁷Th source. *Radiochimica Acta*, **2001**, 89, 651.
- [113] Wissing, M.D.; van Leeuwen, F.W.B.; van der Pluijm, G.; Gelderblom, H. Radium-223 chloride: Extending life in prostate cancer patients by treating bone metastases. *Clin Cancer Res*, **2013**, 19, 5822–5827.
- [114] Pillai, M.R.A.; Chakraborty, S.; Das, T.; Venkatesh, M.; Ramamoorthy, N. Production logistics of ¹⁷⁷Lu for radionuclide therapy. *Applied Radiation and Isotopes*, **2003**, 59, 109–118.
- [115] Lebedev, N.A.; Novgorodov, A.F.; Misiak, R.; Brockmann, J.; Rösch, F. Radiochemical separation of no-carrier-added as produced via the process. *Applied Radiation and Isotopes*, **2000**, 53, 421–425.
- [116] Cutler, C.S.; Smith, C.J.; Ehrhardt, G.J.; Tyler, T.T.; Jurisson, S.S.; Deutsch, E. Current and potential therapeutic uses of lanthanide radioisotopes. *Cancer Biother Radiopharm*, **2000**, 15, 531–545.
- [117] Aime, S.; Barge, A.; Botta, M.; Fasano, M.; Danilo Ayala, J.; Bombieri, G. Crystal structure and solution dynamics of the lutetium(III) chelate of DOTA. *Inorganica Chimica Acta*, **1996**, 246, 423–429.
- [118] Lange, R.; Ter Heine, R.; Knapp, R.F.; Klerk, J.M.H. de; Bloemendal, H.J.; Hendrikse, N.H. Pharmaceutical and clinical development of phosphonate-based radiopharmaceuticals for the targeted treatment of bone metastases. *Bone*, **2016**, 91, 159–179.
- [119] Baidoo, K.E.; Yong, K.; Brechbiel, M.W. Molecular pathways: Targeted α -particle radiation therapy. *Clin Cancer Res*, **2013**, 19, 530–537.
- [120] Kratochwil, C.; Giesel, F.L.; Bruchertseifer, F.; Mier, W.; Apostolidis, C.; Boll, R.; Murphy, K.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. ²¹³Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: A first-in-human experience. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2014**, 41, 2106–2119.
- [121] Miederer, M.; Scheinberg, D.A.; McDevitt, M.R. Realizing the potential of the Actinium-225 radionuclide generator in targeted alpha particle therapy applications. *Adv Drug Deliv Rev*, **2008**, 60, 1371–1382.

- [122] Boll, R.A.; Malkemus, D.; Mirzadeh, S. Production of actinium-225 for alpha particle mediated radioimmunotherapy. *Applied Radiation and Isotopes*, **2005**, 62, 667–679.
- [123] Koch, L.; Apostolidis, C.; Janssens, W.; Molinet, R.; van Geel, J. Production of Ac-225 and application of the Bi-213 daughter in cancer therapy. *Czech J Phys*, **1999**, 49, 817–822.
- [124] Apostolidis, C.; Molinet, R.; McGinley, J.; Abbas, K.; Möllenbeck, J.; Morgenstern, A. Cyclotron production of Ac-225 for targeted alpha therapy. *Applied Radiation and Isotopes*, **2005**, 62, 383–387.
- [125] Kim, Y.-S.; Brechbiel, M.W. An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biol*, **2012**, 33, 573–590.
- [126] Davis, I.A.; Glowienka, K.A.; Boll, R.A.; Deal, K.A.; Brechbiel, M.W.; Stabin, M.; Bochsler, P.N.; Mirzadeh, S.; Kennel, S.J. Comparison of ²²⁵actinium chelates: Tissue distribution and radiotoxicity. *Nucl Med Biol*, **1999**, 26, 581–589.
- [127] Price, E.W.; Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*, **2014**, 43, 260–290.

2. Problemstellung und Zielsetzung

Mit immer weiter steigenden Zahlen an Tumorerkrankungen steigt auch der Bedarf an adäquaten Diagnose- und Therapiemöglichkeiten. Eine Metastasierung als Folge einer solchen Tumorerkrankung stellt zum einen eine deutliche Verschlechterung des Krankheitsverlaufs dar und erschwert zum anderen eine effiziente Diagnose sowie häufig eine effektive Therapie. Insbesondere die Entstehung von Knochenmetastasen stellt einen schwerwiegenden Einschnitt dar, da sie sich drastisch auf die Lebensqualität des Patienten auswirkt. Trotz des medizinischen Fortschritts in den letzten Jahrzehnten bleibt die Behandlung skelettaler Metastasen weiterhin eine große Hürde für die Medizin, denn eine Heilung ist bis heute nicht möglich [1]. Knochenmetastasen entwickeln sich bereits sehr früh im Laufe einer Tumorerkrankung, Symptome treten jedoch häufig erst verhältnismäßig spät auf [2]. Eine frühzeitige Diagnose ist also unerlässlich für eine möglichst erfolgreiche Therapie. Radioaktiv markierte diagnostische Tracer auf Basis der hohen Knochenaffinität von Bisphosphonaten, wie beispielsweise ^{99m}Tc -MDP, finden hierfür schon lange Anwendung [3]. Auch die Endoradiotherapie unter Verwendung Phosphonat-basierter knochenbindender Radiopharmaka in Form von z.B. ^{153}Sm -EDTMP und ^{186}Re -HEDP zur palliativen Behandlung ist weit verbreitet [4].

Die Entwicklung von Konjugaten aus makrozyklischen Chelatoren und Bisphosphonaten, stellte den nächsten Schritt auf dem Weg zur verbesserten Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen dar. Sie ermöglicht die Verwendung einer Vielzahl von Radionukliden und je nach Art des eingesetzten Chelators auch die Kombination von Diagnose und Therapie in einem Molekül [5]. Auf Basis eines der ersten Chelator-konjugierten Bisphosphonate, dem BPAMD (Abbildung 1), wurden bereits einige Modifikationen hinsichtlich des Chelators, des Targetvektors oder des verwendeten Radionuklids untersucht [6, 7].

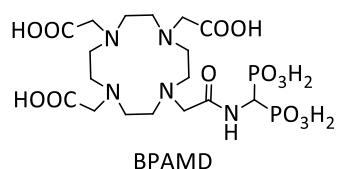


Abbildung 1: Struktur von BPAMD.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun weitere Modifikationen durchgeführt und evaluiert werden, die die folgenden Aspekte des Radiotracers betreffen.

Bifunktionaler Chelator

Von der Art des Chelators hängt ab, welche Radiometalle in Verbindung mit dem jeweiligen Targetingvektor, also hier dem BP, verwendet werden können. So eignen sich NOTA bzw. sein bifunktionelles Derivat NODAGA hervorragend zur Komplexierung von ^{68}Ga , da die Größe ihrer makrozyklischen Kavität ideal zum Ionenradius von Ga^{3+} passt [8]. In Ergänzung zum jüngst publizierten DOTA^{ZOL} , einem Chelator-konjugierten Bisphosphonat der neusten Generation, wurde auch ein NODAGA-basiertes Zoledronat-Derivat entwickelt, welches die Radiomarkierung mit ^{68}Ga zur Diagnose von Knochenmetastasen vereinfachen soll (Abbildung 2).

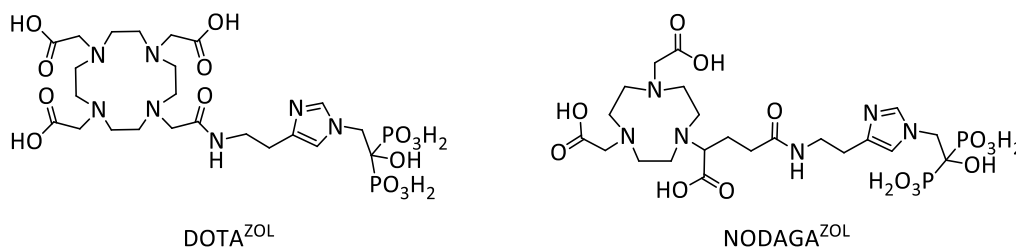


Abbildung 2: Struktur von DOTA^{ZOL} und $\text{NODAGA}^{\text{ZOL}}$.

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Etablierung der Radiomarkierung von $\text{NODAGA}^{\text{ZOL}}$ mit ^{68}Ga sowie die Untersuchung der *in vitro*-Stabilität von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$. Anschließend sollte das Verhalten des ^{68}Ga -Komplexes *in vivo* mittels PET-Aufnahmen sowie *ex vivo*-Biodistributionsstudien in gesunden Ratten evaluiert werden. Ein *in vivo*-Vergleich beider Zoledronat-Derivate sollte ihr Potential als theranostisches Paar aufzeigen.

Targetvektor

Mit DOTA^{ZOL} wurde kürzlich ein Chelator-konjugiertes Bisphosphonat der neusten Generation entwickelt, welches aufgrund des verwendeten stickstoffhaltigen Hydroxybisphosphonats Zoledronat eine höhere Knochenaffinität besitzt als Konjugate mit einfachen Bisphosphonaten der ersten Generation. In Anlehnung an diese Struktur sollte ein Derivat synthetisiert werden, bei dem der stickstoffhaltige Heterozyklus der Bisphosphonatseitenkette über eine Cu(I) -katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition erhalten wird (Abbildung 3). Das dabei entstehende Triazol könnte den Imidazolring des Zoledronats in seiner Funktion ersetzen. Gleichzeitig sollten über diesen Syntheseweg die für die Kopplung des Zoledronats an den DOTA-Chelator beschriebenen synthetischen Probleme umgangen werden [9].

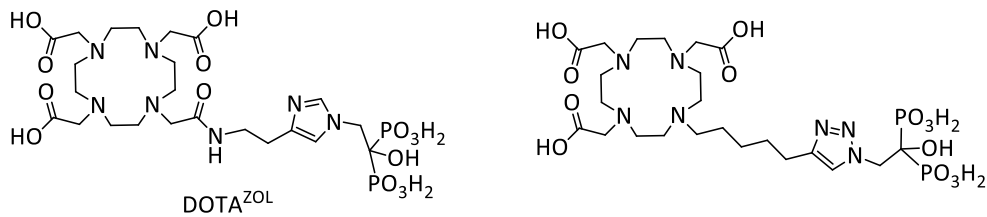


Abbildung 3: Struktur von DOTA^{ZOL} sowie daran angelehnte Struktur eines Chelator-konjugierten Bisphosphonats, das über eine Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition dargestellt werden soll.

Prostatakarzinome sind eine der Hauptursachen für die Entstehung von Knochenmetastasen. Urea-basierte peptidomimetische Inhibitoren des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) werden seit einigen Jahren weltweit untersucht in Bezug auf die Diagnose und Therapie von metastasiertem Prostatakrebs [10]. Hierzu zählt beispielsweise auch der weithin angewandte Tracer PSMA-11. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst das Potential dieses Tracers hinsichtlich der Detektion von Knochenmetastasen mit einem literaturbekanntem Chelator-konjugierten Bisphosphonat (NO2AP^{BP}, Abbildung 4) in PET-Scans an Prostatakarzinompatienten verglichen werden.

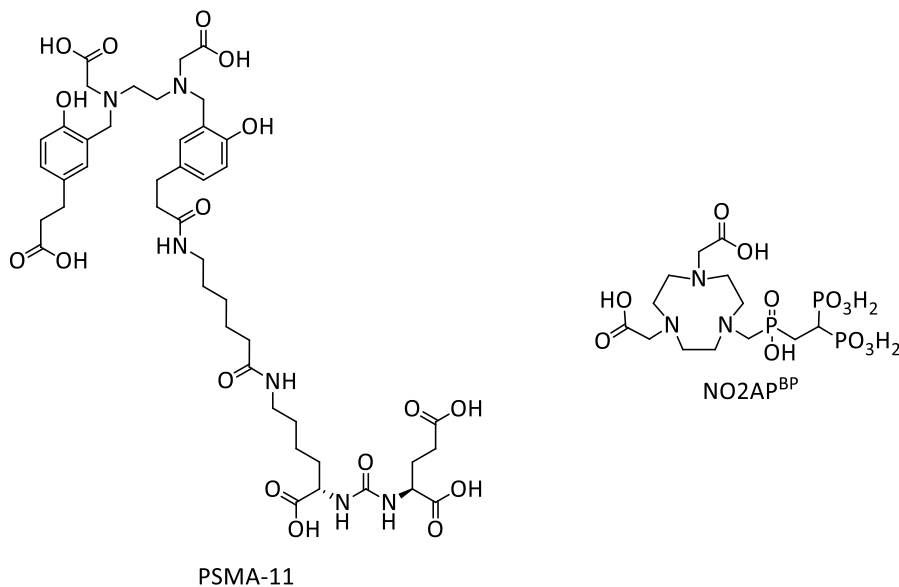


Abbildung 4: Struktur von PSMA-11 und NO2AP^{BP}.

Des Weiteren sollte durch Kombination der bekannten Struktur von BPAMD mit einem der vielversprechendsten PSMA-Inhibitoren, PSMA-617 [11], ein Derivat entwickelt werden, das über zwei verschiedene Mechanismen an die Knochenmetastasen bindet. Ein solcher Tracer könnte zum einen eine höhere Affinität haben als die bekannten Verbindungen und zum anderen könnte das Problem umgangen werden, dass einer der bekannten Tracer keine Affinität für einzelne Metastasen aufweist. So hat sich beispielsweise herausgestellt, dass nicht alle Metastasen eine erhöhte PSMA-Expression

zeigen [12]. Dieses Derivat sollte auf Basis des DOTAGA-Chelators synthetisiert werden, um trotz der zweifachen Substitution am Chelator durch die beiden Targetvektoren 7 Koordinationsstellen zu erhalten (Abbildung 5). Dies ist vor allem im Hinblick auf die Komplexierung größerer therapeutischer Nuklide wie zum Beispiel ^{177}Lu von Bedeutung. Nach Kopplung des Bisphosphonats an den Chelator sollte das so erhaltene DOTAGA-Bisphosphonat im Rahmen der Festphasen-Peptidsynthese an den bekannten PSMA-Liganden gekoppelt werden. Nach erfolgreicher Synthese sollte die Radiomarkierung des Bisphosphonat-PSMA-Konjugats etabliert und die *in vitro*-Stabilität des ^{68}Ga -Komplexes untersucht werden. Anschließend sollte das *in vivo*-Verhalten des Tracers in gesunden Ratten hinsichtlich der Knochenaufnahme sowie in tumortragenden Mäusen mit Hauptaugenmerk auf die Tumoraufnahme evaluiert werden.

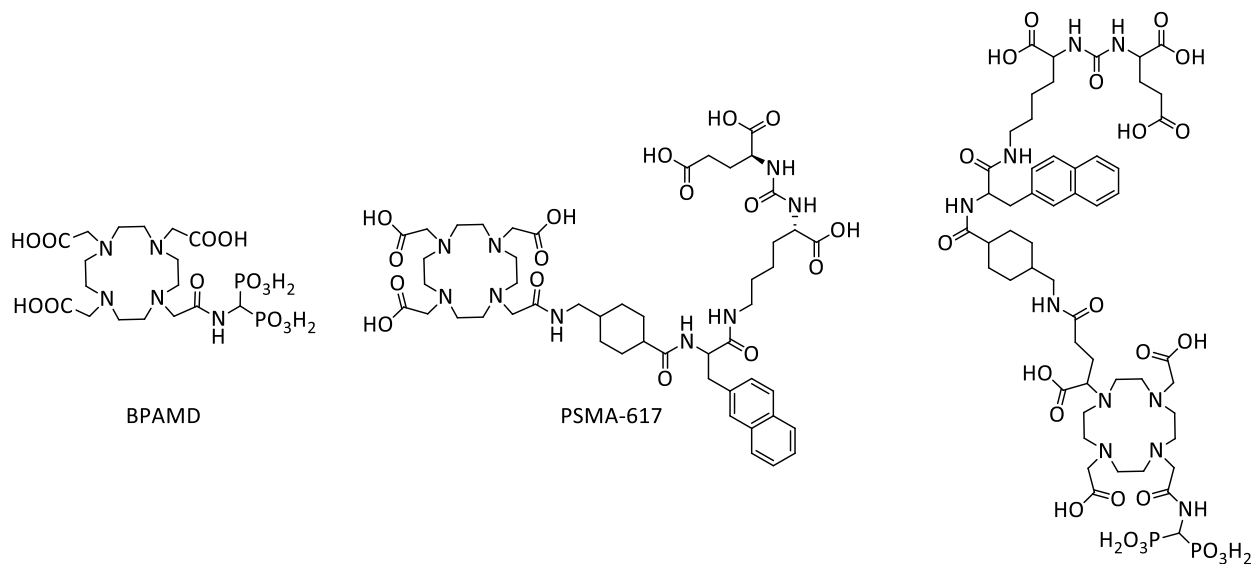


Abbildung 5: Struktur von BPAMD und PSMA-617 sowie Zielstruktur des dualen Tracers.

Radionuklid

^{64}Cu bietet aufgrund seiner Umwandlung unter γ -, β^+ - und β^- -Emission sowohl die Möglichkeit der diagnostischen als auch der therapeutischen Anwendung [13]. Dieses Nuklid lässt sich mit NOTA-basierten Chelatoren stabil komplexieren [14] und daher sollte das bereits erwähnte NODAGA^{ZOL} ebenfalls mit ^{64}Cu markiert werden. Durch die *in vivo*-Evaluierung von [^{64}Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} sollte die zusätzliche Möglichkeit zur eigenständigen theranostischen Anwendung dieser Verbindung untersucht werden.

α -Partikel emittierende Radionuklide gelten als besonders vielversprechend für die Radionuklidtherapie, da sie im Vergleich zu β^- -Emittlern ein Vielfaches an Energie in einem deutlich

begrenzteren Bereich abgeben. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Radiomarkierung von DOTA^{ZOL} mit dem α -Emitter ²²⁵Ac etabliert werden. Dabei ging es in diesem Fall nicht nur um die Evaluierung der optimalen Markierungsbedingungen, sondern vielmehr auch um die Schaffung geeigneter Rahmenbedingungen zum Beispiel hinsichtlich der Messtechnik, da sich dieses Nuklid über eine Reihe radioaktiver Töchter stabilisiert. Die anschließende erste *in vivo*-Evaluierung dieses Tracers sollte Aussagen über sein Potential für die α -Therapie ermöglichen und so die Grundlage für eine eventuelle humane Anwendung schaffen.

Die Ergebnisse hinsichtlich dieser beabsichtigten Modifikationen sind im folgenden Abschnitt in Form von individuellen Manuskripten beschrieben.

Referenzen

- [1] Mundy, G.R. Mechanisms of bone metastasis. *Cancer*, **1997**, 80, 1546–1556.
- [2] Hoffmann, O. Zelluläre und molekulare Mechanismen der Tumormetastasierung in den Knochen. *Journal für Mineralstoffwechsel*, **2003**, 10, 12–15.
- [3] Hamaoka, T.; Madewell, J.E.; Podoloff, D.A.; Hortobagyi, G.N.; Ueno, N.T. Bone imaging in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, **2004**, 22, 2942–2953.
- [4] Lange, R.; Ter Heine, R.; Knapp, R.F.; Klerk, J.M.H. de; Bloemendal, H.J.; Hendrikse, N.H. Pharmaceutical and clinical development of phosphonate-based radiopharmaceuticals for the targeted treatment of bone metastases. *Bone*, **2016**, 91, 159–179.
- [5] Baum, R.P.; Kulkarni, H.R. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labelled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*, **2012**, 2, 437–447.
- [6] Meckel, M. Macrocyclic Bisphosphonates for PET-diagnosis and Endoradiotherapy of Bone Metastases. *Dissertation*, **2014**.
- [7] Pfannkuchen, N.; Meckel, M.; Bergmann, R.; Bachmann, M.; Bal, C.; Satheke, M.; Mohnike, W.; Baum, R.P.; Rösch, F. Novel Radiolabelled Bisphosphonates for PET Diagnosis and Endoradiotherapy of Bone Metastases. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2017**, 10.
- [8] Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Semin Nucl Med*, **2016**, 46, 373–394.
- [9] Meckel, M.; Bergmann, R.; Miederer, M.; Roesch, F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: *Me(III)-DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. *EJNMMI radiopharm. chem.*, **2017**, 1, 1481.
- [10] Afshar-Oromieh, A.; Holland-Letz, T.; Giesel, F.L.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haufe, S.; Debus, N.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Schäfer, M.; Neels, O.; Hohenfellner, M.; Kopka, K.; Kauczor, H.-U.; Debus, J.; Haberkorn, U. Diagnostic performance of ⁶⁸Ga-PSMA-11 (HBED-CC) PET/CT in patients with recurrent prostate cancer: Evaluation in 1007 patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2017**, 44, 1258–1268.

- [11] Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kratochwil, C.; Benesova, M.; Eder, M.; Neels, O.C.; Eisenhut, M.; Kübler, W.; Holland-Letz, T.; Giesel, F.L.; Mier, W.; Kopka, K.; Haberkorn, U. The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions. *J Nucl Med*, **2015**, 56, 1697–1705.
- [12] Silver, D.A.; Pellicer, I.; Fair, W.R.; Heston, W.D.; Cordon-Cardo, C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res*, **1997**, 3, 81–85.
- [13] Anderson, C.J.; Ferdani, R. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: Advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm*, **2009**, 24, 379–393.
- [14] Price, E.W.; Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*, **2014**, 43, 260–290.

3. Manuskripte

Die vorliegende Arbeit basiert auf folgenden Manuskripten und ergänzenden Ergebnissen:

- I. N. Pfannkuchen, M. Meckel, V. Kubicek, P. Hermann, R. Bergmann, J. Steinbach, J. Pietzsch, C. S. Bal, H. R. Kulkarni, W. Mohnike, R. P. Baum, F. Rösch. *⁶⁸Ga- und ¹⁷⁷Lu-markierte Bisphosphonate als Knochenmetastasen-Theranostika*. *Nuklearmediziner*, 2015, 38(02), 138-144 (DOI: 10.1055/s-0035-1549862)
- II. N. Pfannkuchen, M. Meckel, R. Bergmann, M. Bachmann, C. Bal, M. Sathekge, W. Mohnike, R. P. Baum, F. Rösch. *Novel radiolabelled bisphosphonates for PET diagnosis and endoradiotherapy of bone metastases*. *Pharmaceuticals*, 2017, 10(2), 45 (DOI: 10.3390/ph10020045)
- III. N. Pfannkuchen, R. Bergmann, M. Bachmann, F. Rösch. *NODAGA^{ZOL} and DOTA^{ZOL} for theranostics of bone metastases*. In Vorbereitung
- IV. N. Pfannkuchen, M. Meckel, F. Rösch, H. Stobbe, B. Zimontkowski, W. Mohnike. *Comparison of uptake parameters of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in prostate cancer patients expressing bone metastases*. In Vorbereitung
- V. N. Pfannkuchen, R. Bergmann, P. Spang, N. Engelbogen, M. Bachmann, F. Rösch. *Synthesis, radiolabelling and first in vivo evaluation of a DOTA-bisphosphonate-conjugated PSMA inhibitor*. In Vorbereitung
- VI. N. Pfannkuchen, N. Bausbacher, S. Pektor, M. Miederer, F. Rösch. *In vivo evaluation of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} for α -therapy of bone metastases*. *Current Radiopharmaceuticals*, submitted
- VII. *Supplementary results: Synthesis of a chelator-conjugated heterocyclic nitrogen-containing bisphosphonate via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*

3.1. ^{68}Ga - und ^{177}Lu -markierte Bisphosphonate als Knochenmetastasen-Theranostika

^{68}Ga - und ^{177}Lu -markierte Bisphosphonate als Knochenmetastasen- Theranostika

^{68}Ga - and ^{177}Lu -labelled bisphosphonates as theranostics for bone metastases

N. Pfannkuchen¹, M. Meckel¹, V. Kubicek², P. Hermann², R. Bergmann³, J. Steinbach^{3,4}, J. Pietzsch^{3,4},
C. S. Bal⁵, H. R. Kulkarni⁷, W. Mohnike⁶, R. P. Baum⁷, F. Rösch¹

¹ Institut für Kernchemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

² Institut für Anorganische Chemie, Karls-Universität Prag, Tschechische Republik

³ Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung

⁴ Technische Universität Dresden, Fachbereich Chemie und Lebensmittelchemie

⁵ All India Institute of Medical Sciences, Neu-Delhi, Indien

⁶ Diagnostisch Therapeutisches Zentrum am Frankfurter Tor, Berlin

⁷ Klinik für Molekulare Radiotherapie, Zentralklinik Bad Berka

Zusammenfassung

Der erhöhte Metabolismus der Knochenmatrix kann zum einen mit der SPECT- und zum anderen mit der PET-Technik visualisiert werden. Als SPECT-Nuklid wird überwiegend ^{99m}Tc in Form von ^{99m}Tc -Bisphosphonat-Komplexen verwendet. Die PET bietet im Gegensatz zur SPECT eine höhere lokale und temporale Auflösung. Mit dem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystem existiert ein hervorragendes PET-Gegenstück zum etablierten ^{99m}Tc -Generator.

Neuartige Bisphosphonate (BP) in Kombination mit makrozyklischen Chelatoren sind derzeit Gegenstand verschiedener Forschungsgruppen weltweit. Zur Komplexierung von Ga(III) werden häufig DOTA und NOTA sowie deren Derivate verwendet. DOTA-BP die bieten die Möglichkeit, auch ^{177}Lu stabil zu koordinieren. Dies eröffnet hervorragende Chancen für Theranostika: [^{68}Ga]NOTA-BP für die PET/CT und – im Falle hoher SUV-Werte in den Knochenmetastasen – eine Patienten-individuelle Therapie mit ^{177}Lu -Analoga.

Das vorliegende Manuskript beschreibt den aktuellen Stand zur Diagnostik von Knochenmetastasen mit [^{68}Ga]Ga-NO₂AP^{BP} und [^{68}Ga]Ga-BPAMD einerseits und die erfolgreiche Anwendung des [^{177}Lu]Lu-BPAMD zur Therapie. Die neuen PET-Tracer werden mit [^{99m}Tc]Tc-MDP und [^{18}F]Fluorid verglichen. Im Zusammenhang mit dem Potential von [^{68}Ga]Ga-HBED-PSMA zur Visualisierung von Knochenmetastasen werden erstmals Ergebnisse im direkten Vergleich mit [^{68}Ga]Ga-NO₂AP^{BP} vorgestellt. In Hinblick auf die Therapie werden die vorliegenden *ex vivo*-Daten mit [^{223}Ra]Ra²⁺ diskutiert.

Abschließend wird ein Ausblick gegeben auf die laufenden Weiterentwicklungen hin zu neuen ^{68}Ga - bzw. ^{177}Lu -markierten Bisphosphonaten mit noch weiter verbesserten pharmakologischen Eigenschaften.

Schlüsselwörter: Knochenmetastasen, Bisphosphonate, ^{68}Ga , ^{177}Lu , Theranostik

Abstract

The increased metabolism of the bone material can be visualized by PET as well as SPECT. For SPECT, ^{99m}Tc is predominantly used in the form of bisphosphonate complexes. In contrast to SPECT, PET offers a higher spatial resolution and owing to the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator there exists an analog to the established ^{99m}Tc generator. Currently, the combination of novel bisphosphonates (BP) and macrocyclic chelators is studied worldwide.

For complexation of Ga(III) DOTA, NOTA and their derivatives are often used. DOTA bisphosphonates are also able to coordinate ^{177}Lu , which offers the possibility of developing theranostics by using ^{68}Ga NOTA-BP for PET/CT and ^{177}Lu -labelled analogs for an individual therapy.

This manuscript describes the status quo of diagnosis of bone metastases using ^{68}Ga Ga-NO₂AP^{BP} and ^{68}Ga Ga-BPAMD as well as successful application of ^{177}Lu Lu-BPAMD for therapy. The new PET tracers are compared to ^{99m}Tc Tc-MDP and ^{18}F fluoride and results concerning the visualization of bone metastases using ^{68}Ga Ga-NO₂AP^{BP} are presented in comparison to ^{68}Ga Ga-HBED-PSMA. In terms of therapy, available *ex vivo* data is compared to ^{223}Ra Ra²⁺.

Finally, there is an overview of further developments providing new ^{68}Ga - and ^{177}Lu -labelled bisphosphonates offering improved pharmacological properties.

Key words: bone metastases, bisphosphonates, ^{68}Ga , ^{177}Lu , theranostics

Einleitung

Maligne Tumore, vor allem Prostata-, Brust und Lungenkarzinome, führen im fortgeschrittenen Stadium häufig zu schmerzhaften Knochenmetastasen [1]. Sowohl zur Diagnose als auch für die Therapie steht bereits eine Reihe von Radiopharmaka zur Verfügung.

Diagnostik

Der erhöhte Metabolismus der Knochenmatrix kann zum einen mit der SPECT- und zum anderen mit der PET-Technik visualisiert werden. Als SPECT-Nuklid wird überwiegend ^{99m}Tc in Form von ^{99m}Tc -Bisphosphonat-Komplexen verwendet. Die PET bietet im Gegensatz zur SPECT eine höhere lokale und temporale Auflösung. Zudem ermöglichen kinetische Modelle die absolute Quantifizierung der mittels PET gemessenen, lokal akkumulierten Radioaktivität, die bei spezifischer Bindung an ein biologisches Target eine Funktion der Dichte des molekularen Targets darstellt. Für die Erfassung kleinster Metastasen ist die PET das klar überlegene Verfahren [2]. Mit ^{18}F steht ein Positronenemitter als Alternative zum ^{99m}Tc zur Verfügung [3]. Als osteotrope Verbindung wird $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ verwendet. Das Fluoridion wird in die Knochenmatrix eingebaut und der Tracer-Uptake ist an Stellen mit erhöhtem Metabolismus besonders hoch. Nachteilig ist jedoch die Zyklotron-basierte Produktion des ^{18}F [4]. Mit dem $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generatorsystem existiert ein hervorragendes PET-Gegenstück zum etablierten ^{99m}Tc -Generator. Das Tochternuklid ^{68}Ga besitzt herausragende Zerfallseigenschaften ($t_{1/2} = 67,7$ min, β^+ -Anteil = 89 %, $E_{\beta\text{max}} = 1,9$ MeV) und der $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator gewährleistet neben einer langen Verwendbarkeit eine permanente Versorgung mit ^{68}Ga [5].

Die Entwicklung von Radiometall-markierten Tracern auf Bisphosphonat-Basis erfordert die Einführung eines Chelators für die dreiwertigen Metalle. Neuartige Bisphosphonate (BP) in Kombination mit azyklischen bzw. makrozyklischen Chelatoren sind derzeit Gegenstand verschiedener Forschungsgruppen weltweit. Solche Verbindungsklassen vereinen eine hohe Affinität zur Knochenmatrix mit der thermodynamischen und kinetischen Stabilität des Chelators. Makrozyklische Liganden haben sich dabei aufgrund ihrer hohen Komplexbildungskonstanten, aus denen eine hohe thermodynamische und kinetische Stabilität resultiert, bewährt. Für Ga(III) werden häufig DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) und NOTA (1,4,7-Tetraazacyclononan-1,4,7-triessigsäure) sowie deren Derivate verwendet.

Therapie

Die einfachsten knochenbindenden Radiopharmaka zur palliativen Endoradiotherapie sind die Therapienuklide in ionischer Form: [⁸⁹Sr]Strontiumchlorid, [³²P]Natriumorthosphosphat und [²²³Ra]Radiumchlorid. Aufgrund der ungünstigen Nuklideigenschaften des ⁸⁹Sr und des ³²P (lange Halbwertszeit, sehr hohe β⁻-Energie) finden heute meist andere Nuklide Verwendung, wie zum Beispiel ¹⁵³Sm und ¹⁷⁷Lu. Diese Nuklide besitzen als Kationen selbst nur eine geringe Knochenaufnahme und werden daher mit Hilfe eines Phosphatgruppen-Chelators wie EDTMP oder DOTP als Metallkomplex zur Stelle mit erhöhtem Knochenmetabolismus befördert. Man nimmt an, dass ein Austausch zwischen dem Radionuklid aus dem Chelator und der Knochenmatrix stattfindet und ein Einbau in die Hydroxyapatit-Struktur erfolgt.

[²²³Ra]Radiumchlorid (Xofigo, Algeta) reichert sich in gleicher Weise wie [⁸⁹Sr]Strontiumchlorid in der Knochensubstanz an. Die sehr kurze Reichweite von nur 0,1 mm der α-Strahlung verhindert eine umfassende Beeinträchtigung der blutbildenden Zellen im Knochenmark bei gleichzeitig hoher Energieplatzierung im umliegenden Zielgewebe. Erste erfolgreiche Patientenstudien führen eine niedrige Hämatotoxizität sowie eine höhere durchschnittliche Lebenserwartung an [6]. Unklar bleiben das Verhalten der zahlreichen Radionuklide innerhalb der ²²³Ra-Zerfallskette sowie die Auswirkungen der α-Strahlung auf den empfindlichen Gastrointestinaltrakt, über den die Ausscheidung des ungebundenen ²²³Ra²⁺ als Calcium-Mimetikum erfolgt [7].

Die Phosphonat-Komplexe zeigen mit den meisten dreiwertigen Nukliden eine hohe thermodynamische Stabilität, jedoch besitzen die offenkettigen azyklischen Chelatoren eine deutlich weniger ausgeprägte kinetische Stabilität [8]. Um eine Dissoziation der Komplexe im Blutplasma zu verhindern, wird eine hohe Menge des nicht-markierten Chelators ko-injiziert. Dies allerdings blockiert Bindungsstellen an der Metastasen-Knochenmatrix und führt folglich zu einer geringeren Aufnahme des aktiven Komplexes [9]. Hinzu kommt die geträgerte Produktion des ¹⁵³Sm. Beides führt zu einer Verringerung der Dosisleistung an ossären Metastasen [10]. Der Austausch des Therapienuklids ¹⁵³Sm durch ¹⁷⁷Lu, welches sich aufgrund seiner hervorragenden Zerfalleigenschaften ($t_{1/2} = 6,71$ d, $E_{\beta_{\max}} = 0,5$ MeV) in besonderem Maße als Therapienuklid eignet, bewirkt zwar eine höhere spezifische Aktivität des Therapeutikums (bedingt durch einen trägerfreien Produktionsweg des ¹⁷⁷Lu [11]), löst aber dennoch nicht das Problem der niedrigen kinetischen Stabilität der EDTMP-Komplexe.

Konventionelle Therapie

In den letzten zehn Jahren ist die Gabe von Bisphosphonaten in der Medizin stark gestiegen. Eine zunehmend bedeutende Funktion bekommen Bisphosphonate bei der Behandlung von malignen Neoplasien. Ihre Wirkung beruht hier zum einen auf ihrer hohen Knochenaffinität und zum anderen auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum Pyrophosphat bzw. Diphosphat. Im Gegensatz zum Pyrophosphat sind Bisphosphonate durch die Substitution des zentralen Sauerstoffatoms durch eine Kohlenstoffbrücke metabolisch stabil.

Der Ersatz eines Restes R1 durch eine Hydroxygruppe führt zu einer verstärkten Calciumbindung an Hydroxyapatit und Verbindungen dieses Typs zeigen eine höhere Hemmung der Knochendemineralisation durch Osteoklasten. Die Substitution an R2 hingegen toleriert eine Vielzahl unterschiedlicher chemischer Gruppen, vgl. Abbildung 1. Bekannt ist, dass ein Stickstoffatom mit drei bis vier CH₂-Gruppen Abstand vom Hydroxybisphosphonat eine zusätzliche osteotrope Verstärkung bewirkt. Zum einen liegt dies an einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung des Amins zur Hydroxyapatitoberfläche und zum anderen besitzen solche Moleküle eine hemmende Wirkung auf die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS), welche essentiell für die Funktion der Osteoklasten ist. Die FPPS ist ein Schlüsselenzym im Mevalonat-Biosyntheseweg und ihre Produkte werden benötigt, um kleine G-Proteine an der Zellmembran zu verankern. Die Hemmung dieses Enzyms bewirkt eine erhöhte Apoptoserate der behandelten Zellen. Besonders aromatische stickstoffhaltige Hydroxybisphosphonate wie Zoledronat zeigen eine starke Hemmeigenschaft [12].

Neuentwicklungen von ⁶⁸Ga- und ¹⁷⁷Lu-markierten Bisphosphonaten: Klinisches state-of-the-art

Das Konzept unserer Arbeiten ist in Abbildung 1 dargestellt. Es vereint die wichtigen dreiwertigen Radionuklide mit effizienten Chelatoren und modernen Bisphosphonaten.

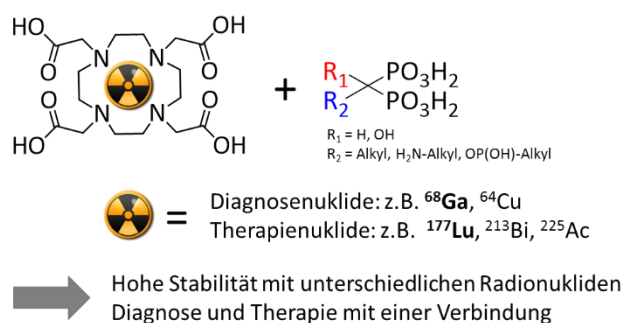


Abbildung 1: Konzept der Kombination eines makrozyklischen Chelators mit einem Bisphosphonat. Die Kohlenstoffbrücke bietet zusätzlich zwei freie Stellen für Substituenten an (R1 und R2), siehe Text.

In den letzten Jahren wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Lukes von der Karls-Universität Prag systematische Untersuchungen einer ganzen Reihe neuer knochenaffiner Chelator-konjugierter Bisphosphonate durchgeführt. Diese stellen, markiert mit dem Generator-basierten PET-Nuklid ^{68}Ga und dem Therapienuklid ^{177}Lu , erstmals eine Verbindungsklasse dar, die Diagnostik und Therapie ossärer Tumorerkrankungen in einem Molekül vereinen kann [3].

Die Verbindungen zeigen hohe Markierungsausbeuten sowie außerordentliche Komplexstabilitäten. Gemeinsam mit dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Mainz und dem Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung des Helmholtz-Zentrums Dresden-Rossendorf konnte im Tierexperiment das große Potential dieser Verbindungen untermauert werden. Es konnte eine hohe Knochenakkumulation der Verbindungen in ^{68}Ga - μPET -Experimenten nachgewiesen werden [13]. Speziell in Bereichen hoher metabolischer Aktivität, wie *condylus medialis/lateralis*, wurde eine starke Anreicherung festgestellt. In Bezug zu diesen Ergebnissen wurden an der Zentralklinik Bad Berka sehr erfolgreich erste nuklearmedizinische Anwendungen mit [^{68}Ga]Ga-BPAMD durchgeführt [14] (Abbildung 2).

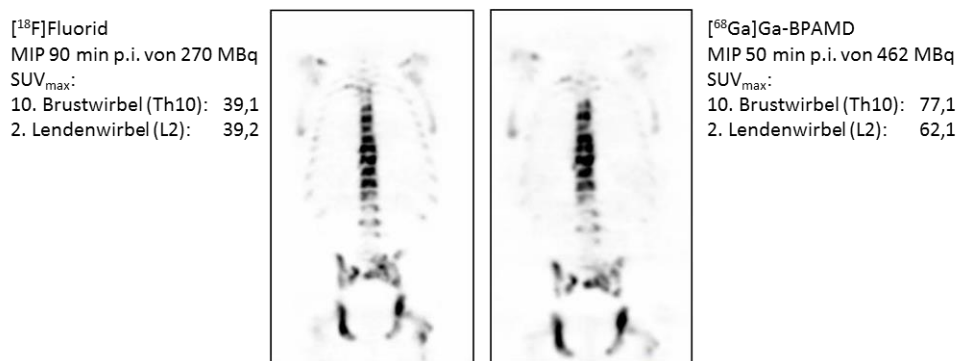


Abbildung 2: [^{68}Ga]Ga-BPAMD- und [^{18}F]Fluorid-PET bei einem Patienten mit ausgeprägter Metastasierung eines Prostata-Adenokarzinoms im Bereich der Wirbelsäule und des Beckens. Die SUV-Werte sind vergleichbar, einzelne Metastasen weisen sogar höhere Werte für [^{68}Ga]BPAMD auf.

Diese positiven diagnostischen Daten sprechen für eine Übertragung der Verbindungsklasse der DOTA-Bisphosphonate auf ^{177}Lu und die Therapie von Patienten. In mehreren Pilotstudien wurde daher das [^{177}Lu]Lu-BPAMD bereits für die Therapie von Knochenmetastasen eingesetzt. Abbildung 3 zeigt den Verlauf der Ganzkörperverteilung von [^{177}Lu]Lu-BPAMD bei einem Patienten.

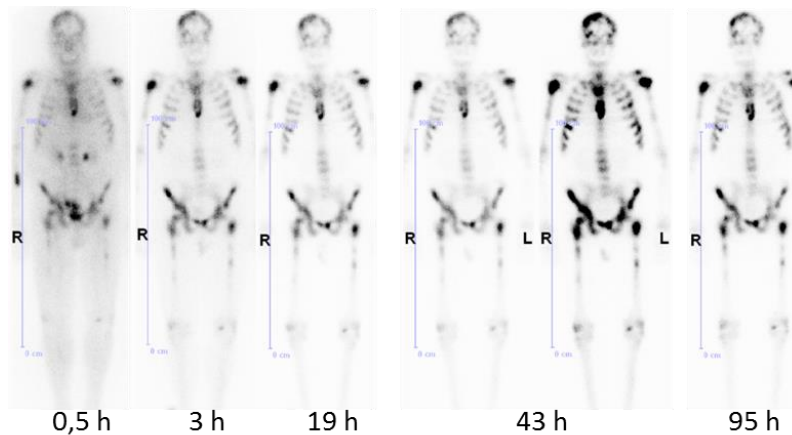


Abbildung 3: Patient mit Prostata-Adenokarzinom und ausgeprägten, metastatisch bedingten ossären Schmerzen (Z. n. externer Strahlentherapie von BWK 8-12, LWK 4 sowie dem Os sacrum, maximale antiandrogene Behandlung sowie medikamentöse Schmerztherapie). Posttherapeutische [^{177}Lu]Lu-BPAMD-Ganzkörperzintigramme 0,5 h, 3 h, 19 h, 43 h (2 verschiedene Intensitätsskale) und 95 h nach Applikation der Therapieaktivität von 3,5 GBq. Es zeigt sich eine intensive Anreicherung des Radiotherapeutikums in zahlreichen ossären Metastasen in der Schädelkalotte, im Sternum sowie im Humeruskopf und im Beckenskelett. Bereits am Tag nach der Therapie gab der Patient eine deutliche Besserung der Schmerzsymptomatik an.

Die Zyklotron-unabhängige Bereitstellung eines PET-Knochen tracers auf Basis des $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generators in Kombination mit einer Therapieoption mit trägerfreiem ^{177}Lu führt mittlerweile zu einer zunehmenden Verbreitung der in Mainz entwickelten Tracer. Unter anderem nehmen [^{68}Ga]Ga-BPAMD und [^{177}Lu]Lu-BPAMD an klinischen Studien teil (Clinico Alemana de Santiago, All India Institute of Medical Sciences New Delhi, Children's Hospital at Westmead Sydney).

Weiterentwicklungen von ^{68}Ga - und ^{177}Lu -markierten Bisphosphonaten

Trotz der hervorragenden klinischen Ergebnisse sehen wir in der Leitstruktur der verwendeten Bisphosphonate noch großes Potential: zur Verbesserung der Radiosynthese einerseits wie auch zur Erhöhung der Anreicherung der Verbindungen an den Knochenmetastasen bei gleichzeitig weiter sinkender Belastung des Normalgewebes andererseits. Im Weiteren sollen zwei ausgewählte Richtungen der aktuellen Entwicklungen beschrieben werden.

Optimale Chelatoren für ^{68}Ga und ^{177}Lu

Speziell für ^{68}Ga bieten die Triazacyclononan-Derivate (TACN) bessere Bedingungen für die ^{68}Ga -Markierung. Abbildung 4 zeigt die schnelle und quantitative Markierung eines NOTA-BP-Derivates, NO2AP^{BP}.

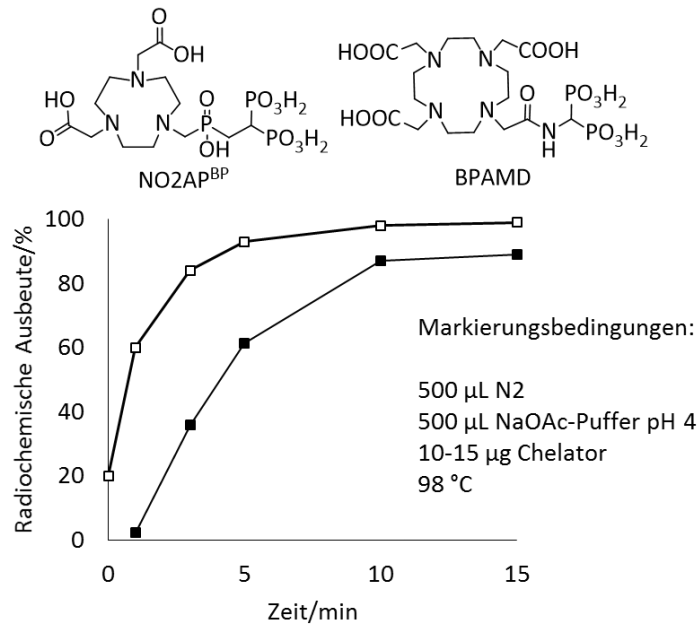


Abbildung 4: Synthese des [⁶⁸Ga]Ga-NO2APBP (□) im Vergleich zum [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD (■). Das TACN-Derivat zeigt deutlich höhere radiochemische Ausbeuten nach kürzeren Reaktionszeiten.

Interessanterweise bewirkt die Verwendung des TACN-Derivates nicht nur die erwartete Verbesserung der ⁶⁸Ga-Markierungschemie, sondern das Pharmakon zeigt überraschenderweise in Ratten auch eine deutlich bessere Anreicherung am Femur als das DOTA-Analogon, siehe Abbildung 5.

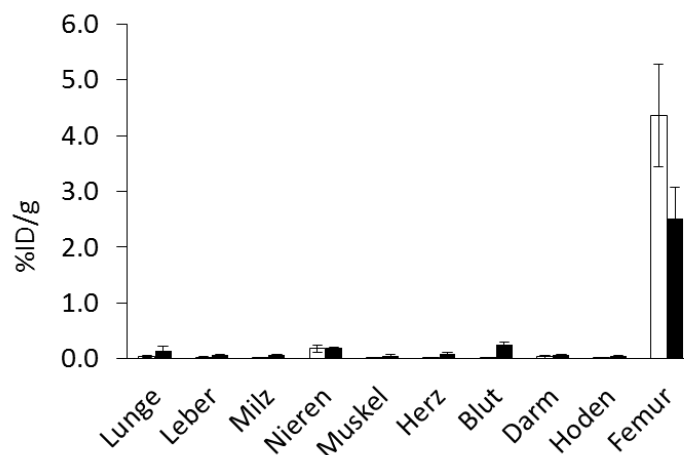


Abbildung 5: Vergleich der *ex vivo*-Bioverteilung von [⁶⁸Ga]Ga-NO2APBP (□) und [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD (■) bei gesunden Wistar-Ratten 60 Minuten nach Injektion.

Diese Daten spiegeln sich auch beim Menschen wider. Abbildung 6 zeigt die [⁶⁸Ga]Ga-NO2APBP-PET-Aufnahme eines Patienten im Vergleich mit [^{99m}Tc]Tc-MDP und [¹⁸F]F⁻.

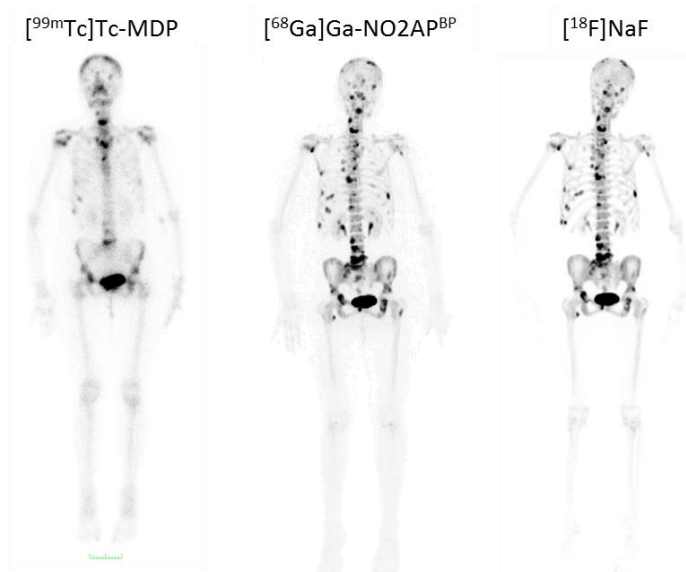


Abbildung 6: $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ bei einem Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom im Vergleich mit $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MDP-SPECT}$ und $[^{18}\text{F}]\text{NaF-PET}$ (C.S. Bal, AIIMS, New Delhi). Die PET-Tracer identifizieren mehr und kleinere Knochenmetastasen als der SPECT-Tracer. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ ist qualitativ äquivalent zu $[^{18}\text{F}]\text{NaF-PET}$.

Neue pharmakophore Strukturen

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Anreicherung der Verbindungen in den Knochenmetastasen bietet die Kombination des DOTA-Makrozyklus mit Hydroxybisphosphonaten (HBP) der neuesten Generation. Die Einführung einer Hydroxygruppe am Bisphosphonat erhöht die Bindung des Tracers an die Knochenstruktur erheblich und sollte hierdurch die Anreicherung an Knochenmetastasen fördern. Durch Modifikation des bekannten und hochaffinen knochenbindenden Pharmazeutikums Zoledronat wird die DOTA-konjugierte Verbindung DOTA^{ZOL} erhalten. Analog zu DOTA können speziell in Hinblick auf ^{68}Ga -Markierungen wiederum die TACN-Varianten verwendet werden.

Ausblick

Diagnostik von Knochenmetastasen

Mit $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$, einem ^{68}Ga -Knochenmetastasen-Tracer der 2. Generation, existiert ein exzellenter Tracer für die effiziente, schnelle und quantitative Diagnostik von Knochenmetastasen mittels PET/CT. Mit Derivaten der neuen Generationen verbinden sich zusätzliche Erwartungen.

Endoradiotherapie (ERT) mit ^{177}Lu -BP der 2. Generation

Bereits das [^{177}Lu]Lu-BPAMD bewährt sich hervorragend in der klinischen Anwendung. Die derzeit vorliegenden Derivate der 3. Generation sind noch erfolgreicher im Tiermodell und lassen eine noch ausgeprägtere Anreicherung an der Knochenmetastasen-Struktur am Patienten erwarten.

Hier sei ein Vergleich mit dem aktuell verwendeten Radiotherapeutikum, dem ^{223}Ra , erlaubt. Anreicherungen im gesunden Tier zeigen in Tierversuchen tatsächlich eine vergleichbare Potenz der ^{68}Ga -/ ^{177}Lu -markierten Chelator-konjugierten Bisphosphonate am Femur, siehe Abbildung 7.

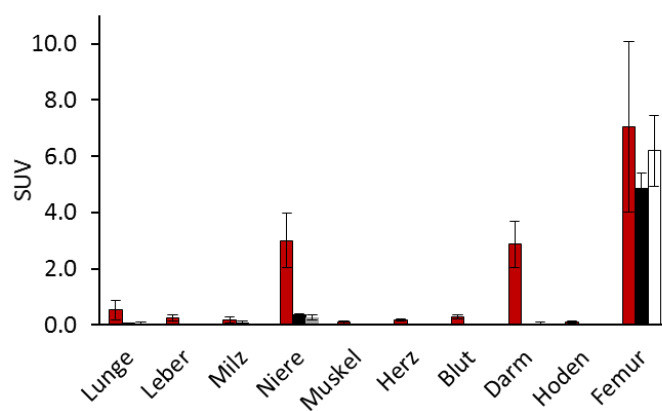


Abbildung 7: Vergleich der *ex vivo*-Bioverteilung von [^{68}Ga]Ga-NO₂APBP (□), [^{177}Lu]Lu-BPAMD (■) und $^{223}\text{RaCl}_2$ (■) in gesunden Wistar-Ratten 60 Minuten nach Injektion im standardized uptake value (SUV).

In diesen *ex vivo*-Bioverteilungen wird jedoch gleichzeitig die bekannte fehlende Spezifität des ^{223}Ra offensichtlich: Als Calcium-Mimetikum sind die ^{223}Ra -Gehalte in einer Reihe von Weichteilorganen sehr viel höher als bei den Bisphosphonaten. Dies stimmt überein mit den bekannten Ganzkörperszintigraphien, siehe Abbildung 8, und ist ein Grund für die Toxizität des ^{223}Ra . Hier bietet ein optimales ^{177}Lu -markiertes DOTA-BP-Derivat mit injizierbaren Aktivitäten von einigen GBq eine in verschiedener Hinsicht wichtige Alternative.

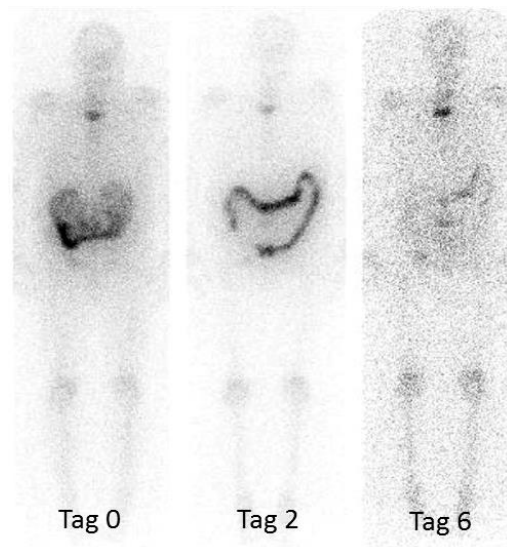


Abbildung 8: Szintigrafische Abbildung der Aktivitätsverteilung von $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion. Aus Sartor *et al.* [7]

^{68}Ga -PSMA-Derivate - Vergleich mit ^{68}Ga -BP

Interessant wäre ein Vergleich mit dem aktuell vielverwendeten Heidelberger $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -HBED-PSMA [15]. Dieses diagnostiziert über das Prostatakarzinom hinaus auch disseminierte Knochenmetastasen. Ein erster vorläufiger Vergleich von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NO2AP^{BP} und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -HBED-PSMA bei Patienten mit Knochenmetastasen infolge von Prostatakarzinomen zeigt nun, dass die Anreicherung des Bisphosphonats deutlich ausgeprägter ist. Im Durchschnitt bietet $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -NO2AP^{BP} eine mehr als dreimal höhere Aufnahme in identischen Metastasen als $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -HBED-PSMA. Gleichzeitig führt der Bisphosphonat-Tracer zu einer geringeren Akkumulation in Weichgewebe sowie in wichtigen Organen wie Leber und Nieren. In Tabelle 1 werden die jeweiligen SUV-Werte wiedergegeben.

Daraus lassen sich durchaus relevante Überlegungen hinsichtlich des Erfolges der ^{177}Lu -Therapie-Analoga beider Verbindungsklassen extrahieren.

Tabelle 1: Injizierte Aktivitäten, Aufnahmezeitpunkte und SUV-Werte der mit [⁶⁸Ga]Ga-HBED-PSMA sowie [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} durchgeführten PET-Scans an zwei Patienten mit ossär metastasierendem Prostatakarzinom.

Patient 1			Patient 2		
Gewicht	106 kg		Gewicht	115 kg	
Alter	73 Jahre		Alter	53 Jahre	
Tracer	[⁶⁸ Ga]Ga-HBED-PSMA	[⁶⁸ Ga]Ga-NO2AP ^{BP}	Tracer	[⁶⁸ Ga]Ga-HBED-PSMA	[⁶⁸ Ga]Ga-NO2AP ^{BP}
Inj. Aktivität	198 MBq	214 MBq	Inj. Aktivität	211 MBq	156 MBq
Scan p.i.	60 min p.i.	130 min p.i.	Scan p.i.	47 min p.i.	76 min p.i.
Region	SUV _{PSMA}	SUV _{BP}	Region	SUV _{PSMA}	SUV _{BP}
Acetabulum	10,3	41,0	Scapula li.	3,8	24,7
Sakrum	20,6	45,0	Os ilium li.	20,7	30,8
LWK 3	16,6	46,0	Os sacrum re.	47,7	34,6
Humeruskopf re.	13,9	34,0	Os pubis re.	3,6	17,1
2. Rippe re.	5,0	20,4			
Muskulatur	2,1	0,3	Muskulatur	2,0	2,4
			Fett	0,3	2,1
Leber	14,2	6,5	Leber	14,6	7,1
Nierencortex	42,0	6,2	Nierencortex	25,8	6,8
			Aorta	5,9	4,6

Zusammenfassung

Neuartige Bisphosphonate (BP) in Kombination mit makrozyklischen Chelatoren stellen eine neue Gruppe vielversprechender Tracer für die Diagnose, Therapie und Theranostik von Knochenmetastasen dar.

Das derzeit potenteste ⁶⁸Ga-BP ist [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} – ein effizient und quantitativ markierbares Diagnostikum für die PET/CT. Es zeigt extrem hohe SUV-Werte an Knochenmetastasen bereits eine Stunde nach Injektion bei gleichzeitig schneller Blutclearance. Es ist dem [^{99m}Tc]Tc-MDP deutlich überlegen, dem [¹⁸F]Fluorid mindestens ebenbürtig. Erste Vergleiche mit [⁶⁸Ga]Ga-HBED-PSMA zur Visualisierung von Knochenmetastasen belegen deutliche Vorteile für das [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP}.

DOTA-BP dagegen sind perfekte Kandidaten für die Markierung mit ¹⁷⁷Lu. [¹⁷⁷Lu]Lu-BPAMD wird therapeutisch so erfolgreich eingesetzt, weil auch hier die Anlagerung an Knochenmetastasen zügig erfolgt und es dann dort komplett verbleibt, alle Weichteilorgane eine vernachlässigbare Retention

aufweisen, das trägerfreie ^{177}Lu eine hochselektive Aufnahme an den Knochenmetastasen garantiert und die niederenergetische β -Emission des ^{177}Lu das Knochenmark kaum erreicht. Erste Vergleiche mit *ex vivo*-Daten von $^{223}\text{RaRa}^{2+}$ unterstreichen das Potential von ^{177}Lu -BPAMD.

Aktuelle Weiterentwicklungen hin zu neuen ^{68}Ga - bzw. ^{177}Lu -markierten Bisphosphonaten mit noch weiter verbesserten pharmakologischen Eigenschaften versprechen noch weitergehende Optimierungen der chemischen Strukturen der BP-Derivate mit noch gesteigerten Aufnahmen an den Knochenmetastasen bei gleichzeitig noch geringerer Restkörper-Retention.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Miederer, Nicole Bausbacher und Frau Barbara Biesalski von der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Mainz für die Zusammenstellung der tierexperimentellen Daten der ^{177}Lu -Bisphosphonate und des $^{223}\text{RaCl}_2$. Ein Teil der Arbeiten ist gefördert durch (RPB) die Wilhelm u. Ingeburg Dinse-Gedächtnis-Stiftung, Hamburg, gerichtet an das THERANOSTICS Research Network, ENETS Center of Excellence, Zentralklinik Bad Berka, sowie (PH) die Grant Agency of the Czech Republic, No. 13-08336S. FR dankt der Europäischen Kommission für Unterstützungen über die COST action TD1004. ITG München sei für die Bereitstellung des ^{177}Lu und des ^{223}Ra gedankt.

Referenzen

- [1] Ogawa, K.; Kawashima, H.; Shiba, K. et al. Development of ^{90}Y DOTA-conjugated bisphosphonate for treatment of painful bone metastases. *Nucl Med Biol*, 2009, 36, 129–135.
- [2] Spencer, S.S.; Theodore, W.H.; Berkovic, S.F. Clinical applications: MRI, SPECT, and PET. *Workshop on Magnetic Resonance Techniques and Epilepsy Research*, 1995, 13, 1119–1124.
- [3] Meckel, M.; Fellner, M.; Thieme, N. et al. In vivo comparison of DOTA based ^{68}Ga -labelled bisphosphonates for bone imaging in non-tumour models. *Nucl Med Biol*, 2013, 40, 823–830.
- [4] Lee, J.; Kim, B.-I.; Johnson, A. L. et al. The nuclear medicine production and delivery problem. *Eur J Oper Res*, 2014, 236, 461–472.
- [5] Rösch, F. Past, present and future of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators. *Appl. Radiat. Isot.*, 2013, 76, 24–30.
- [6] Suominen, M.I.; Rissanen, J.P.; Käkönen, R. et al. Survival Benefit With Radium-223 Dichloride in a Mouse Model of Breast Cancer Bone Metastasis. *J Natl Cancer I*, 2013, 105, 908–916.
- [7] Sartor, O.; Hoskin, P.; Bruland, Ø.S. Targeted radio-nuclide therapy of skeletal metastases. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39, 18–26.

- [8] Kálmán, F.K.; Király, R.; Brücher, E. Stability Constants and Dissociation Rates of the EDTMP Complexes of Samarium(III) and Yttrium(III). *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 2008, 4719–4727.
- [9] Beyer, G.J.; Offord, R.; Künzi, G. et al. The influence of EDTMP-concentration on the biodistribution of radio-lanthanides and ^{225}Ac in tumor-bearing mice. *Nucl Med Biol*, 24, 367–372.
- [10] Awang, M.B.; Hardy, J.G.; Davis, S. S. et al. Radiolabelling of pharmaceutical dosage forms by neutron activation of samarium-152. *J Label Compd Radiopharm*, 1993, 33, 941–948.
- [11] Lebedev, N.A.; Novgorodov, A.F.; Misiak, R. et al. Radiochemical separation of no-carrier-added as produced via the process. *Appl. Radiat. Isot.*, 2000, 53, 421–425.
- [12] Russell, R. G. G.; Watts, N.B.; Ebetino, F. H. et al. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, 2008, 19, 733–759.
- [13] Fellner, M.; Biesalski, B.; Bausbacher, N. et al. ^{68}Ga -BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator based positron emitter. *Nucl Med Biol*, 2012, 39, 993–999.
- [14] Fellner, M.; Baum, R.P.; Kubicek, V. et al. PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: first human study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 37, 834.
- [15] Eder, M.; Wängler, B.; Knackmuss, S. et al. Tetrafluorophenolate of HBED-CC: a versatile conjugation agent for ^{68}Ga -labelled small recombinant antibodies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2008, 35, 1878–1886.

3.2. Novel radiolabelled bisphosphonates for PET diagnosis and endoradiotherapy of bone metastases

Novel radiolabelled bisphosphonates for PET diagnosis and endoradiotherapy of bone metastases

N. Pfannkuchen¹, M. Meckel¹, R. Bergmann², M. Bachmann^{2,3}, C. S. Bal⁴, M. Sathekge⁵, W. Mohnike⁶,
R. P. Baum⁷, F. Rösch¹

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

² Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Institute of Radiopharmaceutical Cancer Research,
Dresden, Germany

³ Technische Universität Dresden, University Cancer Center (UCC), Germany

⁴ Department of Nuclear Medicine & PET, All India Institute of Medical Sciences, New-Delhi, India

⁵ Department of Nuclear Medicine, University of Pretoria & Steve Biko Academic Hospital,
South Africa

⁶ Diagnostisch Therapeutisches Zentrum, DTZ am Frankfurter Tor, Berlin, Germany

⁷ Department of Nuclear Medicine, Center for PET/CT, Zentralklinik Bad Berka, Germany

Abstract

Bone metastases, often a consequence of breast, prostate, and lung carcinomas, are characterized by an increased bone turnover, which can be visualized by positron emission tomography (PET) as well as single-photon emission computed tomography (SPECT). Bisphosphonate complexes of ^{99m}Tc are predominantly used as SPECT tracers. In contrast to SPECT, PET offers a higher spatial resolution and, owing to the $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator, an analog to the established ^{99m}Tc generator exists. Complexation of Ga(III) requires the use of chelators. Therefore, DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), NOTA (1,4,7-triazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid), and their derivatives are often used. The combination of these macrocyclic chelators and bisphosphonates is currently studied worldwide. The use of DOTA offers the possibility of a therapeutic application by complexing the β -emitter ^{177}Lu . This overview describes the possibility of diagnosing bone metastases using [^{68}Ga]Ga-BPAMD (^{68}Ga -labelled (4-[[bis-(phosphonomethyl)]carbamoyl]methyl}-7,10-bis(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1,4,7-triyl)triacetic acid) as well as the successful application of [^{177}Lu]Lu-BPAMD for therapy and the development of new diagnostic and therapeutic tools based on this structure. Improvements concerning both the chelator and the bisphosphonate structure are illustrated providing new ^{68}Ga - and ^{177}Lu -labelled bisphosphonates offering improved pharmacological properties.

Key words: bisphosphonates, bone metastases, diagnosis, therapy, ^{68}Ga , ^{177}Lu

Introduction

Malignant tumors, especially carcinomas of the breast, prostate, and lung, often lead to painful bone metastases. Since complications, like severe bone pain, pathological fractures, spinal cord compression, or hypercalcaemia, distinctly influence the quality of life and result in a shorter survival, diagnosis of bone metastases at an early stage as well as subsequent therapy is of great importance for patients [1,2]. Bone-seeking radiopharmaceuticals are currently used for diagnostic and therapeutic purposes [3].

Bone lesions are characterized by an increase in bone turnover. This increased metabolism of the bone material can be visualized via both single-photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET). In contrast to SPECT, PET offers a higher spatial as well as temporal resolution [4]. As a SPECT nuclide, ^{99m}Tc is predominantly used in the form of ^{99m}Tc -labelled bisphosphonate complexes. For PET, ^{18}F NaF is used as bone-seeking compound [5,6].

The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator system provides a distinguished PET analog of the established $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator. The daughter nuclide ^{68}Ga offers appropriate decay properties ($t_{1/2} = 67.7$ min, $\beta^+ = 89\%$, $E_{\beta\text{max}} = 1.9$ MeV) and the generator ensures a long shelf-life with a continuous supply of ^{68}Ga [7]. In addition to ^{18}F NaF, ^{68}Ga -labelled PSMA radioligands have emerged recently and are currently used for diagnosis of bone metastases as a consequence of prostatic cancer [8]. However, further ^{68}Ga -based bone-seeking PET-radiopharmaceuticals have not been established clinically.

The development of radiometal-labelled bisphosphonate-based tracers requires the use of chelators for complexation of trivalent metals. Many research groups across the world are currently undertaking research into labelling bisphosphonate compounds with radionuclides using macrocyclic chelators and aim at identifying a labelled product that has high affinity for bone and offers a high thermodynamic and kinetic stability. For the complexation of Ga(III), DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), NOTA (1,4,7-triazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid) as well as their derivatives are commonly used.

For the treatment of disseminated bone metastases, there are two classes of therapeutic bone-seeking radiopharmaceuticals: calcimimetic- and phosphonate-based radiopharmaceuticals. The simplest bone binding radiopharmaceuticals for palliative endoradiotherapy, belonging to the class of calcium mimetics, are for example ^{89}Sr , and ^{223}Ra . Their localization underlies the same mechanisms as calcium and, therefore, may be unpredictable [9].

Due to the short range of the α -rays emitted by ^{223}Ra , an impairment of the red bone marrow can be avoided, while allowing deposition of high-energy doses into the target tissue. The first successful clinical phase III studies showed a low haemotoxicity and prolonged survival in metastatic prostate

cancer [10]. However, the consequences of the ^{223}Ra decay chain for the body as well as the influence of the α -rays on the sensitive gastrointestinal tract remain uncertain [9]. The longer half-lives of nuclides such as ^{89}Sr and ^{32}P have discouraged their use and have favored nuclides such as ^{153}Sm and ^{177}Lu with shorter half-lives and lower bone marrow toxicity. The use of ^{177}Lu is particularly promising due to its suitable decay properties ($t_{1/2} = 6.71$ d, $\beta^- = 89\%$, $E_{\beta\text{max}} = 0.5$ MeV) and its carrier-free production route [11]. These trivalent nuclides reach regions of increased bone turnover in the form of complexes with phosphonate-containing chelators, like EDTMP (ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid)) (Figure 1). These phosphonate-containing chelators exhibit high thermodynamic stabilities with trivalent nuclides. The acyclic ligands, however, possess lower kinetic stabilities [12]. Nevertheless, radiopharmaceuticals based on phosphonates like EDTMP and HEDP (1,1-hydroxyethylidene diphosphonate) (Figure 1) show good results in palliative therapy of painful bone metastases in combination with ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{186}Re , and ^{188}Re [13]. ^{188}Re has also been shown to have good properties as a therapeutic nuclide due to its appropriate decay characteristics ($t_{1/2} = 0.7$ d, $E_{\beta\text{max}} = 2.12$ MeV) and its generator-based production [14].

However, EDTMP complexes have shown low *in vivo* stability and an excess of the ligand is routinely applied in order to avoid decomplexation *in vivo* (>1.5 mg/kg body weight of EDTMP vs. approximately 0.05–0.250 mg BPAMD [12,15]). This excess may lead to a blocking of the biological target which could reduce the radiotracer uptake. Furthermore, high amounts of ^{152}Sm due to the production route of ^{153}Sm can cause a reduction of the dose rate deposited on osseous metastases and, therefore, a lower therapeutic efficiency [16,17]. Using ^{177}Lu instead of ^{153}Sm increases the specific activity due to the carrier-free production [17] but the low kinetic stability of EDTMP complexes remains problematic.

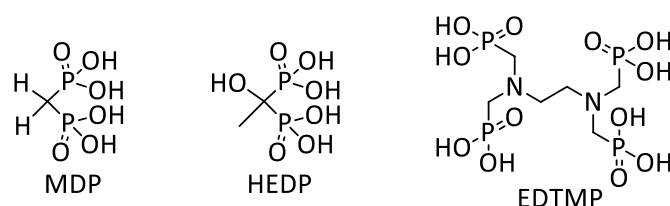


Figure 1: Structures of MDP (methylene diphosphonate), HEDP (1,1-hydroxyethylidene diphosphonate), and EDTMP (ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid)).

This review describes the concept of macrocyclic chelate-conjugated bisphosphonates, which are able to circumvent the disadvantages of open-chain chelators, and possible improvements concerning the chosen chelator as well as the bisphosphonate structure based on the DOTA bisphosphonate BPAMD.

Design and development of radiolabelled bisphosphonates

Status quo

During the last 10 years, the clinical application of bisphosphonates, especially for the treatment of patients with osseous metastases, distinctly increased. Bisphosphonates are analogs of naturally-occurring pyrophosphate. In contrast to pyrophosphate, they are resistant to chemical as well as enzymatic hydrolysis due to the substitution of the central oxygen atom by a carbon atom. Their effect is based on two characteristics: they show high affinity for bone material and inhibitory effects on osteoclasts [18]. Binding of bisphosphonates to bone material probably relies on bidentate or tridentate complexation of calcium atoms in the hydroxyapatite depending on the bisphosphonate structure [19].

The two side chains on the carbon atom are replaceable and responsible for the activity of the particular bisphosphonate (Figure 2). Substitution of R1 by a hydroxyl or amino group enhances the affinity to hydroxyapatite. Varying the R2 side chain influences the antiresorptive potency [18]. Nitrogen atoms, especially aromatic nitrogen atoms, considerably raise the antiresorptive potency. This is linked to another hydrogen bond between the amine and the hydroxyapatite and the ability to act on biochemical activities, for example, the inhibition of farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) [18].

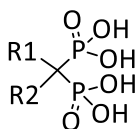


Figure 2: Bisphosphonate structure with variable side chains R1 and R2.

In SPECT tracers like [^{99m}Tc]Tc-MDP (^{99m}Tc -labelled methylene diphosphonate) the phosphonates are responsible for complexation of the radionuclide as well as binding to the target tissue which may lead to a decreased uptake in bone metastases [20]. This drawback can be circumvented by complete separation of the chelating unit and the targeting vector, using a macrocyclic chelator for complexation of the radiometal and a coupled bisphosphonate as targeting vector. Figure 3 shows the concept of the combination of a macrocyclic chelator with a bisphosphonate. Depending on the chelator, various radionuclides can be complexed, also allowing the combination of diagnosis and therapy in one and the same compound. This theranostic concept already showed excellent results concerning diagnosis and treatment of neuroendocrine tumors using DOTATOC (1,4,7,10-tetraazacyclododecan-4,7,10-tricarboxy-methyl-1-yl-acetyl-D-Phe¹-Tyr³-octreotide) radiolabelled with ^{68}Ga and ^{177}Lu [21].

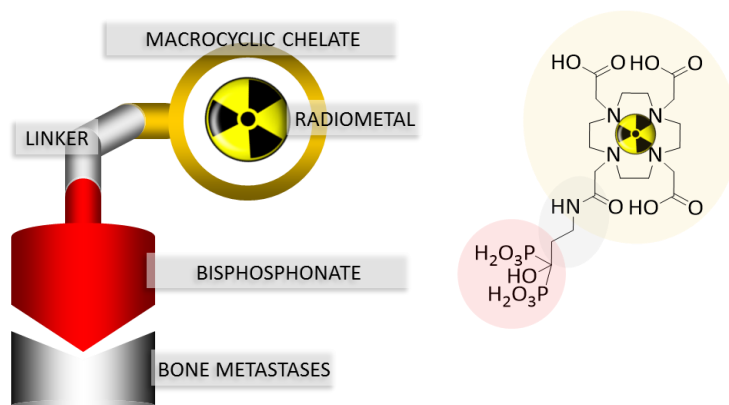


Figure 3: Concept of the combination of a macrocyclic chelator with a bisphosphonate illustrated with DOTA^{ZOL}.

One of these macrocyclic chelate-conjugated bisphosphonates is BPAMD (Figure 4), which was initially able to show its high potential in terms of high bone accumulation in ⁶⁸Ga small animal PET experiments [22].

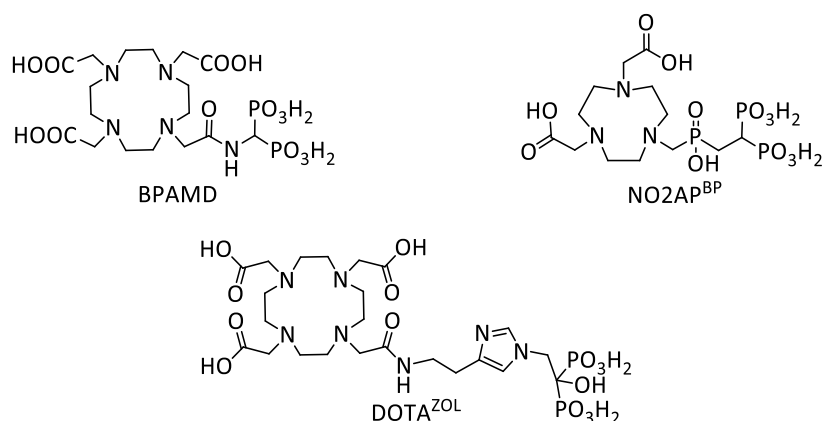


Figure 4: Structures of macrocyclic chelator-conjugated bisphosphonates BPAMD, NO2AP^{BP} (2,2'-(7-(((2,2-diphosphonoethyl)(hydroxy)-phosphoryl)methyl)-1,4,7-triazonane-1,4-diyl)diacetic acid) and DOTA^{ZOL} (2,2',2''-(10-(2-(2-(1-(2-hydroxy-2,2-diphosphonoethyl)-1H-imidazol-4-yl)ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid).

Later, it also showed good results in the first human applications [23] (Figure 5). The bisphosphonate revealed very high target-to-soft tissue ratios combined with a fast renal clearance. SUVs (standardized uptake values) were comparable with those of the [¹⁸F]NaF scan, and some metastases even showed higher accumulation of the bisphosphonate. These promising diagnostic examinations finally led to the first therapeutic applications using the β -emitter ¹⁷⁷Lu instead of ⁶⁸Ga. [¹⁷⁷Lu]Lu-BPAMD was successfully applied in several patients (Figure 6). It showed a comparable biodistribution as [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD, including a good target-to-background ratio and a fast renal clearance. The radiopharmaceutical's long half-life in the metastases provided high tumor doses which led to a

significant reduction in osteoblastic activity of the bone metastases. Furthermore, the therapy did not cause any significant adverse effects [21,24].

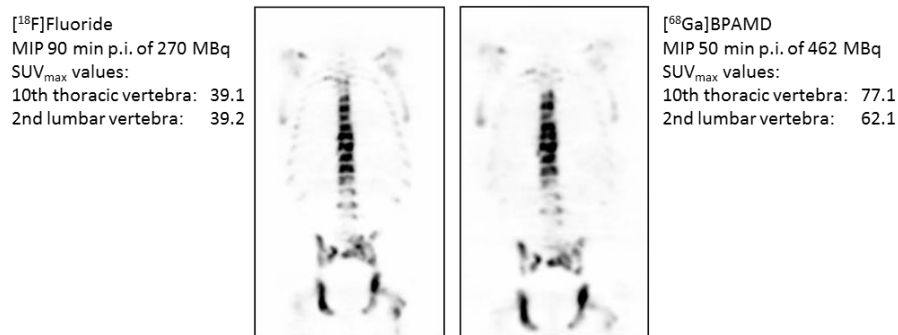


Figure 5: Maximum intensity projection (MIP) 90 min post injection (p.i.) of 270 MBq [¹⁸F]NaF (left) and maximum intensity projection 50 min p.i. of 462 MBq [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD (right). Comparison of standardized uptake values (SUV) of Th10 and L2 [23].

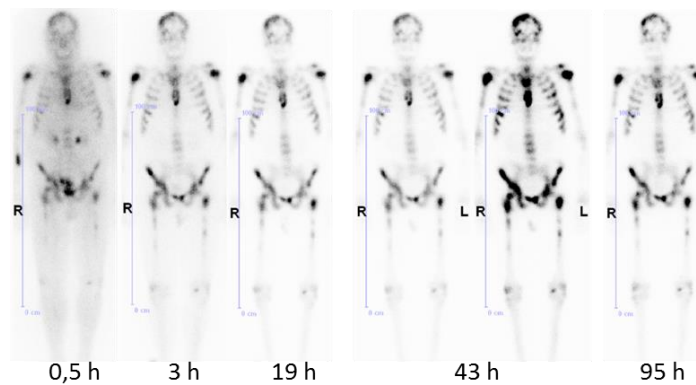


Figure 6: Anterior whole-body scintigraphs of a prostate cancer patient 30 min, 3 h, 19 h, 43 h, and 95 h after application of 3.5 GBq [¹⁷⁷Lu]Lu-BPAMD, demonstrating abnormal accumulation in the skull, both humeri, ribs, sternum, vertebrae, pelvis, and both femora. The best target-to-background ratio is demonstrated at 43 h p.i.

A comparative biodistribution study between [¹⁷⁷Lu]Lu-BPAMD and [¹⁷⁷Lu]Lu-EDTMP indicated higher bone uptake for [¹⁷⁷Lu]Lu-BPAMD as well as a higher target-to-background ratio [25]. This may be attributed to the already mentioned much higher amount of ligand used for the preparation of [¹⁷⁷Lu]Lu-EDTMP and the conceivable target blocking.

Despite those promising clinical results, there is still much potential for improvements with regard to radiosynthesis, raising the accumulation in bone metastases and reducing the uptake in healthy tissue. According to Figure 3, both the bisphosphonate and the chelator should be optimized.

Chelator

Chelators based on a polyamino polycarboxylic structure belong to the most efficient ligands and are widely used for the complexation of metal ions. They can be divided into two categories, open chain ligands, such as EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and DTPA (diethylenetriaminepentacetic acid) and macrocyclic chelates, such as DOTA or NOTA [26].

DOTA is the most commonly used macrocyclic chelator for PET applications. It is able to complex a variety of isotopes, e.g. $^{44/47}\text{Sc}$, ^{111}In , ^{177}Lu , $^{86/90}\text{Y}$, and ^{225}Ac . It is also used broadly with $^{67/68}\text{Ga}$, which offers the possibility of a theranostic application, as already mentioned using the example of ^{68}Ga - and ^{177}Lu -labelled DOTATOC [27,28]. Nevertheless, DOTA has a comparatively low stability constant for gallium ($\log K = 21.3$) resulting in temperatures of about 95 °C needed for radiolabelling. NOTA, by contrast, exhibits a smaller ring structure and a higher stability constant ($\log K = 31.0$) due to the smaller gallium fitting cavity [28].

Figure 7 shows the fast and quantitative ^{68}Ga -labelling of the NOTA bisphosphonate NO2AP^{BP} (Figure 4). A comparison with the DOTA-based BPAMD shows the expected faster labelling of NOTA derivatives.

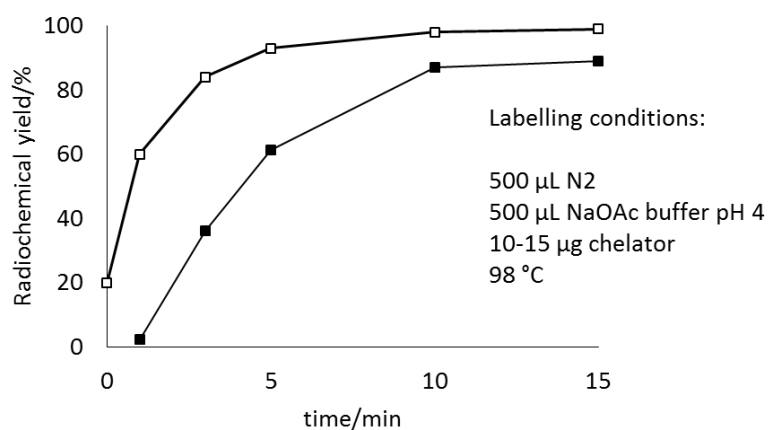


Figure 7: Radiosynthesis of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO2AP}^{\text{BP}}$ (□) in comparison to $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPAMD}$ (■). The NOTA-based derivative clearly shows higher radiochemical yields within a shorter reaction time.

Interestingly, using this NOTA derivative not only provides an improved radiosynthesis, it also exhibits a significantly higher femur accumulation in rats compared with the DOTA derivative BPAMD (Figure 8). This may be explained by differences in charge and physical properties of both complexes. It is a recurrent phenomenon that different chelators provide different *in vivo* properties with the same target vector [27].

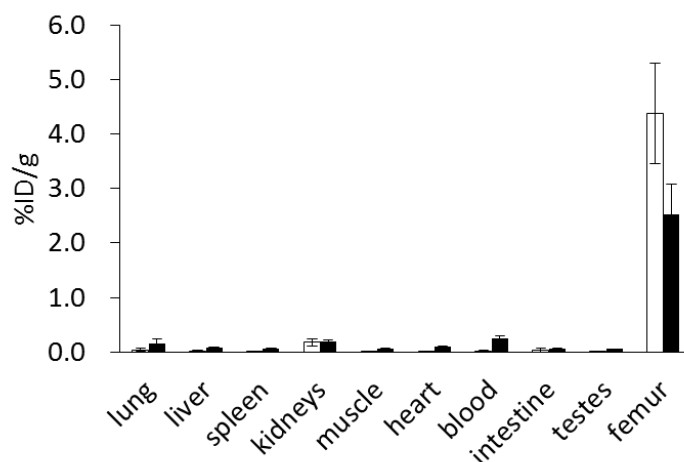


Figure 8: *Ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-NO₂APBP (□) (3.0 ± 0.1 MBq, $n = 4$) and [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD (■) (9.7 ± 1.3 MBq, $n = 8$) in healthy Wistar rats 60 min p.i.

These positive results were also confirmed in a prospective patient study by Passah *et al.* comparing [⁶⁸Ga]Ga-NO₂APBP, [¹⁸F]NaF, and [^{99m}Tc]Tc-MDP in female breast cancer patients with osseous metastases [29]. Within this study, the NOTA-based bisphosphonate was able to underline its high diagnostic efficiency. Figure 9 shows the PET and SPECT scans of a breast cancer patient. Generally, the PET tracers are able to detect more as well as smaller metastases. [⁶⁸Ga]Ga-NO₂APBP revealed a similar detection capability as the gold standard [¹⁸F]NaF. In selected metastases bisphosphonate uptake was even higher.

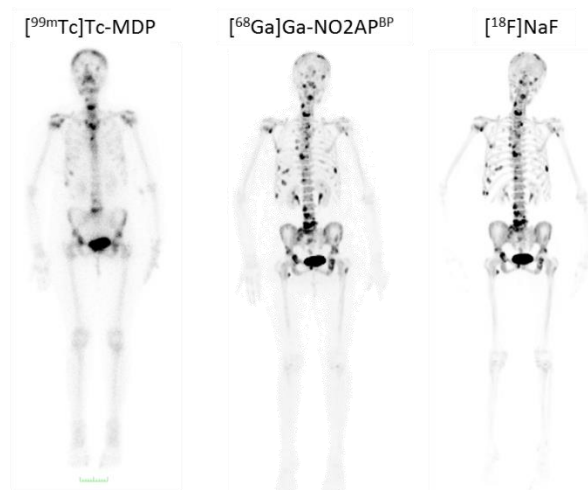


Figure 9: Comparison of [^{99m}Tc]Tc-MDP, [⁶⁸Ga]Ga-NO₂APBP, and [¹⁸F]NaF in a breast cancer patient with bone metastases [29]. [^{99m}Tc]Tc-MDP demonstrates abnormal uptake only in the skull, cervical vertebra, sternum, two ribs on the right side, and pelvis, while both [⁶⁸Ga]Ga-NO₂APBP and [¹⁸F]NaF distinctly show more lesions in the skull, cervical, thoracic, lumbar and sacral vertebrae, pelvis, and both femorae. [⁶⁸Ga]Ga-NO₂APBP and [¹⁸F]NaF are equivalent regarding the number of detected lesions and far superior than [^{99m}Tc]Tc-MDP [29].

In addition to the well-established NOTA derivatives, there is another class of bifunctional chelators appropriate for labelling with ^{68}Ga . These so-called DATA chelators are based on 6-amino-1,4-diazepine-triacetic acid and enable more rapid quantitative radiolabelling under milder conditions [30]. The combination of this chelator with next-generation bisphosphonates is also conceivable and might provide a compound of high diagnostic efficiency, as well [31].

Pharmacophoric Group

As mentioned above, the side chains on the central carbon atom are responsible for the bisphosphonate's activity, i.e., in terms of affinity to hydroxyapatite. Using a hydroxybisphosphonate, bearing a hydroxyl group as R1, could lead to higher bone accumulation due to increased affinity for bone material. Furthermore, an aromatic nitrogen atom in the R2 side chain could cause building of another hydrogen bond and thereby also raise bone accumulation (Figure 10) [18].

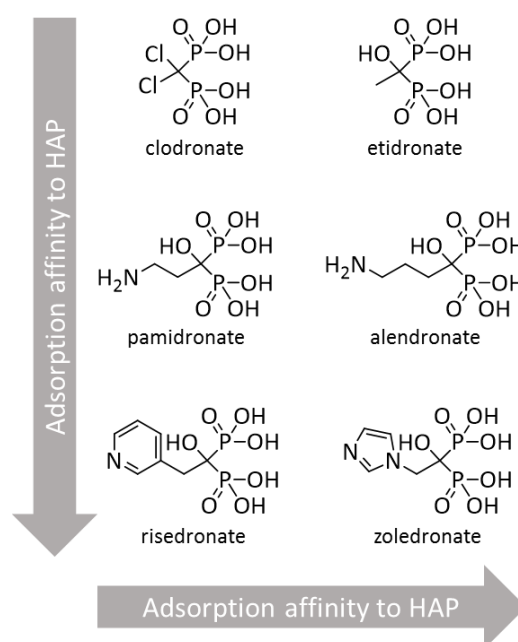


Figure 10: Classification of bisphosphonates according to their adsorption affinity to hydroxyapatite (HAP).

Such a bisphosphonate, like risedronate or zoledronate, would also influence biochemical processes. They possess an inhibiting effect on the FPPS and inhibition of this enzyme causes an increased apoptosis rate [18]. A DOTA-conjugated zoledronate (DOTA^{ZOL} , Figure 4) was already labelled with ^{68}Ga and ^{177}Lu and examined in *ex vivo* biodistribution studies as well as small animal PET and SPECT studies. ^{68}Ga]-Ga-DOTA^{ZOL} was compared to ^{18}F]-NaF and a known DOTA- α -H-bisphosphonate (^{68}Ga]-Ga-BPAPD (^{68}Ga -labelled (4-[[[bis-phosphonopropyl]carba-moyl]methyl]-7,10-bis-(carboxy-methyl)-1,4,7,10-

tetraazacyclododec-1,4,7-triyl)-triacetic acid) (Figures 11 and 12) [32]. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ showed the highest bone accumulation and very low uptake in soft tissue. $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ revealed a comparable femur accumulation in *ex vivo* biodistribution studies in healthy Wistar rats (Figure 13) [32]. Figure 14 shows its high bone accumulation, especially in the high metabolic epiphyseal plates and other joint regions.

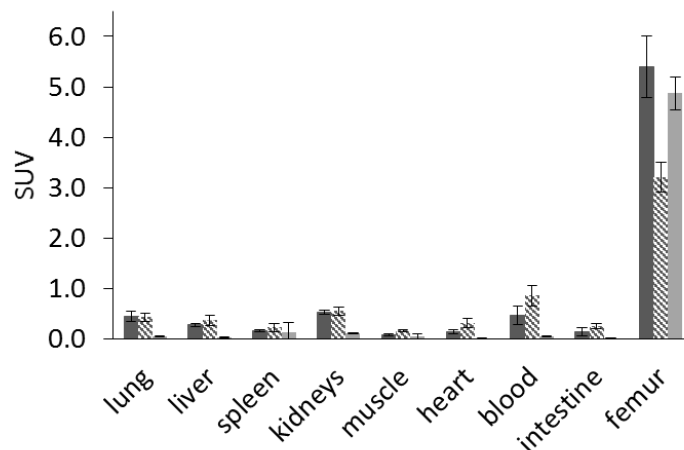


Figure 11: *Ex vivo* biodistribution of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ (■) (6.9 ± 0.1 MBq, $n = 4$), $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPAPD}$ (▨) (9.8 ± 0.2 MBq, $n = 8$), and $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ (■) (10.9 ± 0.4 , $n = 4$) in healthy Wistar rats 60 min p.i.

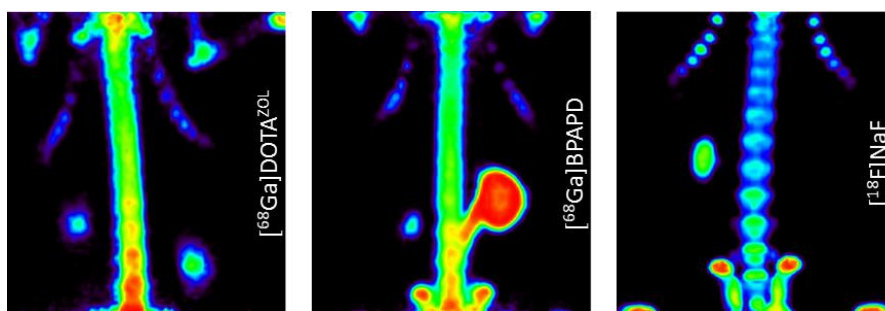


Figure 12: Maximum intensity projection of the thorax region of Wistar rats 60 min p.i. [32].

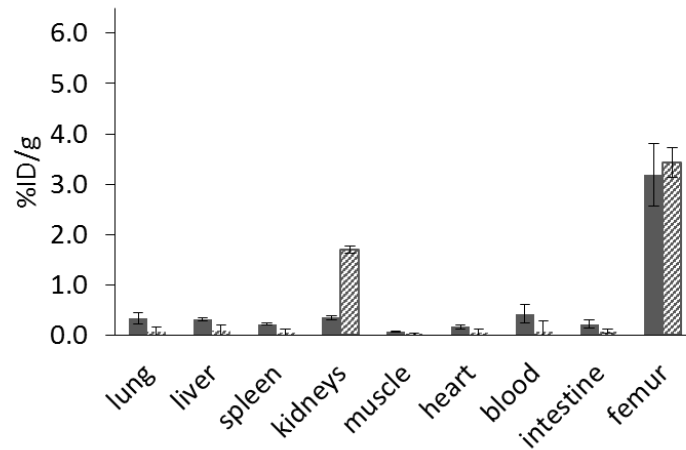


Figure 13: *Ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA²⁰L (■) (6.9 ± 0.1 MBq, $n = 4$) and [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA²⁰L (▨) (3.7 ± 0.1 MBq, $n = 4$) in healthy Wistar rats 60 min p.i.



Figure 14: Whole body scintigraphy 60 min p.i. of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA²⁰L in a healthy Wistar rat [32].

Considering the good results of both the ⁶⁸Ga- and the ¹⁷⁷Lu-labelled derivatives in small animal studies, ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-labelled DOTA²⁰L seem to offer high potential for theranostic applications. This potential now needs to be proven in clinical studies.

Figure 15 shows a comparison of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 and [⁶⁸Ga]Ga-DOTA²⁰L in one and the same prostate cancer patient. Both tracers detected multiple skeletal lesions in the thoracic and lumbar vertebrae as well as in the pelvis. Comparison of SUVs revealed an approximately three-fold higher uptake of the bisphosphonate in bone metastases and an approximately three-fold lower uptake in normal tissue organs, exemplifying the bisphosphonate's better target-to-background ratio.

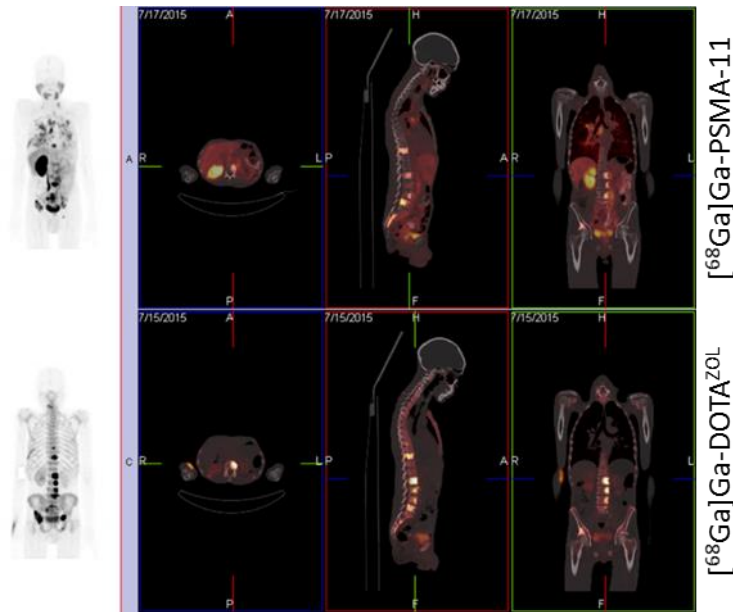


Figure 15: Whole-body PET/CT at 60 min p.i. of 170 MBq $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ and 155 MBq $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$, respectively, in a prostate cancer patient (71 years old, Gleason 4 + 4).

$[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ has been used in ten patients with bone metastases for dosimetry studies (data to be published). Whole body scintigraphic images were acquired at different points of time after injection. Within this study it showed a fast renal clearance and a high target-to-background ratio and was able to confirm the results of the *ex vivo* biodistribution studies (Figure 16).

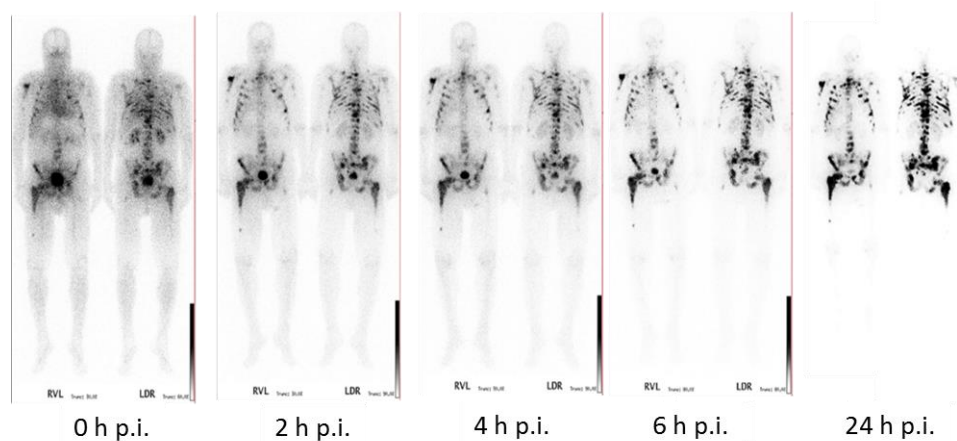


Figure 16: Anterior and posterior whole-body scintigraphs of $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ in a prostate cancer patient at 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, and 24 h after injection of 1 GBq $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ demonstrating multiple intense accumulation in the axial skeleton and both humerae and femora. The target-to-background ratio is progressively better in later images and best at 24 h p.i.

Conclusions

The combination of novel bisphosphonates with macrocyclic chelators provides promising tracers for diagnosis, therapy, and also theranostics of bone metastases.

Currently, the most potent ^{68}Ga -bisphosphonate is ^{68}Ga -NO₂AP^{BP}, which enables quantitative radiolabelling and exhibits very high accumulation in bone metastases 30–60 min after injection as well as a fast blood clearance and very low uptake in soft tissue. It is superior to $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP and comparable to ^{18}F -NaF.

DOTA bisphosphonates are eminently suitable for labelling with ^{177}Lu . ^{177}Lu -BPAMD has proved valuable in clinical application. The low-energy β^- emission hardly reaches the bone marrow and only a low or no haematotoxicity was observed. The good target-to-background ratio, that all examined bisphosphonates have in common, is also advantageous for therapeutic applications due to reduced radiation dose for non-target tissue.

Due to further developments regarding the chemical structure of these macrocyclic chelate-conjugated bisphosphonates, new ^{68}Ga - and ^{177}Lu -labelled bisphosphonates possessing improved pharmacological properties are expected. Zoledronate based bisphosphonates appear to be the most potent radiotracers with regard to bone lesions. Thus, DOTA^{ZOL} for example may be a potent conjugate for theranostics of bone metastases.

Acknowledgements

The authors thank Matthias Miederer, Nicole Bausbacher, and Barbara Biesalski (University Hospital Mainz) for processing of the biodistribution studies. Thanks are given to ITG Munich for supplying ^{177}Lu . This work was partially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant BE-2607/1-1/1-2, Ralf Bergmann).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Nørgaard, M.; Jensen, A.Ø.; Jacobsen, J.B.; Cetin, K.; Fryzek, J.P.; Sørensen, H.T. Skeletal Related Events, Bone Metastasis and Survival of Prostate Cancer: A Population Based Cohort Study in Denmark (1999 to 2007). *The Journal of Urology*, **2010**, 184, 162–167.
- [2] Rubens, R.D. Bone metastases—The clinical problem. *European Journal of Cancer*, **1998**, 34, 210–213.
- [3] Sartor, O.; Hoskin, P.; Bruland, Ø.S. Targeted radio-nuclide therapy of skeletal metastases. *Cancer Treatment Reviews*, **2013**, 39, 18–26.
- [4] Rahmim, A.; Zaidi, H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl Med Commun*, **2008**, 29, 193–207.
- [5] Harmer, C.L.; Burns, J.E.; Sams, A.; Spittle, M. The value of fluorine-18 for scanning bone tumours. *Clinical Radiology*, **1969**, 20, 204–212.
- [6] Love, C.; Din, A.S.; Tomas, M.B.; Kalappambath, T.P.; Palestro, C.J. Radionuclide Bone Imaging: An Illustrative Review. *RadioGraphics*, **2003**, 23, 341–358.
- [7] Rösch, F. Past, present and future of $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generators. *Ga-68 Special Issue*, **2013**, 76, 24–30.
- [8] Benesova, M.; Schafer, M.; Bauder-Wust, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J Nucl Med*, **2015**, 56, 914–920.
- [9] Lange, R.; Ter Heine, R.; Knapp, R.F.; de Klerk, John M H; Bloemendal, H.J.; Hendrikse, N.H. Pharmaceutical and clinical development of phosphonate-based radiopharmaceuticals for the targeted treatment of bone metastases. *Bone*, **2016**, 91, 159–179.
- [10] Hoskin, P.; Sartor, O.; O’Sullivan, J.M.; Johannessen, D.C.; Helle, S.I.; Logue, J.; Bottomley, D.; Nilsson, S.; Vogelzang, N.J.; Fang, F.; Wahba, M.; Aksnes, A.-K.; Parker, C. Efficacy and safety of radium-223 dichloride in patients with castration-resistant prostate cancer and symptomatic bone metastases, with or without previous docetaxel use: a prespecified subgroup analysis from the randomised, double-blind, phase 3 5ALSYPMA6 trial. *The Lancet Oncology*, **2014**, 15, 1397–1406.
- [11] Lebedev, N.A.; Novgorodov, A.F.; Misiak, R.; Brockmann, J.; Rösch, F. Radiochemical separation of no-carrier-added ^{177}Lu as produced via the $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}\rightarrow^{177}\text{Lu}$ process. *Applied Radiation and Isotopes*, **2000**, 53, 421–425.
- [12] Kálmán, F.K.; Király, R.; Brücher, E. Stability Constants and Dissociation Rates of the EDTMP Complexes of Samarium(III) and Yttrium(III). *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 2008, 4719–4727.
- [13] Pandit-Taskar, N.; Batraki, M.; Divgi, C.R. Radiopharmaceutical Therapy for Palliation of Bone Pain from Osseous Metastases. *Journal of Nuclear Medicine*, **2004**, 45, 1358–1365.
- [14] Pillai, M.R.A.; Dash, A.; Knapp, F.F., JR. Rhenium-188: availability from the $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator and status of current applications. *Curr Radiopharm*, **2012**, 5, 228–243.
- [15] Fellner, M.; Riss, P.; Loktionova, N.S.; Zhernosekov, K.P.; Thews, O.; Geraldès, Carlos F. G. C.; Kovacs, Z.; Lukes, I.; Rösch, F. Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ^{68}Ga for PET-imaging of bone metabolism. *Radiochimica Acta*, **2011**, 99, 43–51.

- [16] Awang, M.B.; Hardy, J.G.; Davis, S.S.; Wilding, I.R.; Parry, S.J. Radiolabelling of pharmaceutical dosage forms by neutron activation of samarium-152. *J Label Compd Radiopharm*, **1993**, 33, 941–948.
- [17] Yousefnia, H.; Zolghadri, S.; Shanehsazzadeh, S. Estimated human absorbed dose of ^{177}Lu -BPAMD based on mice data: Comparison with ^{177}Lu -EDTMP. *Appl Radiat Isot*, **2015**, 104, 128–135.
- [18] Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis International*, **2008**, 19, 733–759.
- [19] Papapoulos, S.E. Bisphosphonates: how do they work? *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2008**, 22, 831–847.
- [20] Ogawa, K.; Mukai, T.; Inoue, Y.; Ono, M.; Saji, H. Development of a Novel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Chelate–Conjugated Bisphosphonate with High Affinity for Bone as a Bone Scintigraphic Agent. *Journal of Nuclear Medicine*, **2006**, 47, 2042–2047.
- [21] Baum, R.P.; Kulkarni, H.R. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labelled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*, **2012**, 2, 437–447.
- [22] Fellner, M.; Biesalski, B.; Bausbacher, N.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Rösch, F.; Thews, O. ^{68}Ga -BPAMD: PET-imaging of bone metastases with a generator based positron emitter. *Nuclear Medicine and Biology*, **2012**, 39, 993–999.
- [23] Fellner, M.; Baum, R.P.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Lukeš, I.; Prasad, V.; Rösch, F. PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: first human study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2010**, 37, 834.
- [24] Rosch, F.; Baum, R.P. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS. *Dalton Trans*, **2011**, 40, 6104–6111.
- [25] Yousefnia, H.; Zolghadri, S.; Sadeghi, H.R.; Naderi, M.; Jalilian, A.R.; Shanehsazzadeh, S. Preparation and biological assessment of ^{177}Lu -BPAMD as a high potential agent for bone pain palliation therapy: comparison with ^{177}Lu -EDTMP. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **2016**, 307, 1243–1251.
- [26] Lattuada, L.; Barge, A.; Cravotto, G.; Giovenzana, G.B.; Tei, L. The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 3019–3049.
- [27] Price, E.W.; Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*, **2014**, 43, 260–290.
- [28] Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Semin Nucl Med*, **2016**, 46, 373–394.
- [29] Passah, A.; Tripathi, M.; Ballal, S.; Yadav, M.P.; Kumar, R.; Roesch, F.; Meckel, M.; Sarathi Chakraborty, P.; Bal, C. Evaluation of bone-seeking novel radiotracer ^{68}Ga -NO2AP-Bisphosphonate for the detection of skeletal metastases in carcinoma breast. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2017**, 44, 41–49.
- [30] Seemann, J.; Waldron, B.P.; Roesch, F.; Parker, D. Approaching ‘Kit-Type’ Labelling with ^{68}Ga : The DATA Chelators. *ChemMedChem*, **2015**, 10, 1019–1026.

- [31] Zehui Wu; Zhihao Zha; Seok Rye Choi; Karl Plössl; Lin Zhu; Hank F. Kung. New ^{68}Ga -PhenA bisphosphonates as potential bone imaging agents. *Nuclear Medicine and Biology*, **2016**, 43, 360–371.
- [32] Meckel, M.; Bergmann, R.; Miederer, M.; Roesch, F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: ^{67}Ga -DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, **2016**, 1, 14.

3.3. NODAGA^{ZOL} and DOTA^{ZOL} for theranostics of bone metastases

NODAGA^{ZOL} and DOTA^{ZOL} for theranostics of bone metastases

N. Pfannkuchen¹, R. Bergmann², M. Bachmann², F. Rösch¹

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

² Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Dresden, Germany

Abstract

Purpose Conjugates of bisphosphonates (BPs) with macrocyclic chelators already showed promising results for the diagnosis and endoradiotherapy of painful bone metastases. Based on zoledronic acid, the currently most potent BP in medical use, DOTA^{ZOL} demonstrated high potential especially for the endoradiotherapy with the low-energy β -emitter ¹⁷⁷Lu in first patient studies. A NODAGA based zoledronic acid derivative shall now simplify radiolabelling with ⁶⁸Ga for the diagnosis of skeletal lesions via PET. Here we report on first *in vivo* evaluations of ⁶⁸Ga- as well as ⁶⁴Cu-labelled NODAGA^{ZOL} in healthy Wistar rats and a comparison with [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}.

Methods NODAGA^{ZOL} was labelled with ⁶⁸Ga and ⁶⁴Cu and [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} was prepared for comparison. Radiochemical purity was determined by radio-TLC. Stability of [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} was examined in PBS (pH 7.4) and human serum over 2 h. *Ex vivo* biodistribution studies as well as small animal PET were performed in healthy male Wistar rats. The *in vivo* behaviour of both complexes was compared to that of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}.

Results Radiolabelling of NODAGA^{ZOL} with ⁶⁸Ga provided quantitative radiochemical yields within 10 min at 98 °C which is superior to the preparation of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} which requires separation of the ⁶⁸Ga-complex from free ⁶⁸Ga³⁺. Radiolabelling of NODAGA^{ZOL} with ⁶⁴Cu provided radiochemical yields >99 % in 30 min at 90 °C. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} showed a stability of >98 % in PBS and human serum over 2 h post synthesis. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} as well as [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} showed distinct bone uptake already after 5 min, low uptake in non-target tissues and a fast clearance from blood as well as renal excretion of the unbound tracer. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} had a higher bone accumulation than [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} at 5 min (SUV_{femur} = 3.51 ± 0.17 and SUV_{femur} = 2.89 ± 0.44, respectively) and at 60 min (SUV_{femur} = 4.53 ± 0.28 and SUV_{femur} = 3.67 ± 0.37, respectively) after injection. Blood clearance of the NODAGA derivative was a little faster (SUV_{blood} = 0.08 ± 0.00 and SUV_{blood} = 0.44 ± 0.04 at 1 h p.i.) resulting in higher femur-to-blood and femur-to-muscle ratios for [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL}. Biodistribution of [⁶⁴Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} was very similar to that of [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} concerning bone uptake (SUV_{femur} = 4.76 ± 0.50 and SUV_{femur} = 4.53 ± 0.28, respectively, at 60 min p.i.) and clearance of the unbound tracers. Accordingly, the femur-to-blood ratios were also comparable.

Conclusions Both [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} and [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} exhibit high bone accumulation, low uptake in soft tissue and a fast renal clearance. Interestingly, bone uptake was higher for [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL}. Considering the potential of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} for endoradiotherapy, NODAGA^{ZOL} can serve as the diagnostic arm of a useful theranostic pair for bone metastases. Complexation of ⁶⁴Cu may even extend theranostic options.

Keywords: zoledronic acid, bone metastases, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, theranostics

Introduction

Malignant tumours, like carcinomas of the breast, prostate, and lung, but also kidney and thyroid cancer commonly spread into the skeleton. Bone metastases cause a lot of complications including severe pain, hypercalcaemia and pathologic fractures which decrease quantity as well as quality of life [1]. During the last decades, bone-seeking radiopharmaceuticals showed promising results for both diagnosis and therapy of bone metastases. The metastases can be visualized via both single-photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET) due to the increased bone turnover characterising those lesions. ^{99m}Tc is predominantly used as a SPECT nuclide in the form of ^{99m}Tc -labelled bisphosphonate complexes [2]. PET, and more recently PET/CT (positron emission tomography/computed tomography) offers a higher spatial as well as temporal resolution compared to SPECT [3]. ^{18}F NaF PET provides a higher sensitivity, specificity and accuracy than ^{99m}Tc Tc-MDP (methylene diphosphonate) SPECT concerning detection of bone lesions [4].

One of the first radionuclides used for therapy of bone metastases was ^{89}Sr , administered as ^{89}Sr SrCl₂, which acts as a calcium mimetic [5]. Localization of those calcimimetic agents may be variable and unpredictable [6]. As an alternative, bone accumulation of radionuclides can be achieved using bisphosphonates (BPs) which possess a high affinity to bone mineral [7]. One of these BPs is EDTMP (ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid)) which is used as ^{153}Sm Sm-EDTMP with worldwide marketing authorization [6]. Both in ^{153}Sm Sm-EDTMP and ^{99m}Tc Tc-MDP, the phosphonates are responsible for complexation of the radionuclide as well as for bone binding. Accordingly, the phosphonate groups are seriously involved in coordinating the radiometal, which may lower their capacity to bind to the hydroxyapatite target of the bone metastases [8]. In contrast, the principle of bifunctional chelating agents conjugated to a target vector, in this case a BP, not only shall lead to a complete chemical separation of the chelating unit from the target vector. Furthermore, it allows complexation of various radionuclides and thereby, combination of diagnosis and therapy with one and the same compound.

Zoledronic acid (Figure 1) shows a higher affinity to hydroxyapatite than other BPs due to its *N*-heteroaromatic side chain [7] and is the currently most potent BP in medical use [9]. A DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) conjugated zoledronic acid derivative (DOTA^{ZOL}, Figure 1) was already evaluated in healthy Wistar rats using ^{68}Ga and ^{177}Lu and $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ DOTA^{ZOL} seems to have potential for a theranostic application [10]. Nevertheless, NOTA (1,4,7-triazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid) is optimally suitable for the complexation of ^{68}Ga [11] and a NOTA based zoledronic acid derivative could simplify radiolabelling with ^{68}Ga for diagnosis of skeletal lesions. Therefore, ^{68}Ga Ga-NODAGA^{ZOL} (Figure 1) should be evaluated *in vivo* and compared to ^{68}Ga Ga-DOTA^{ZOL} to investigate their potential as a theranostic pair for bone metastases.

Furthermore, radiolabelling of NODAGA^{ZOL} with ⁶⁴Cu and *in vivo* evaluation of this complex was intended. With this versatile radionuclide, the NOTA based BP could also serve as a theranostic compound on its own [12].

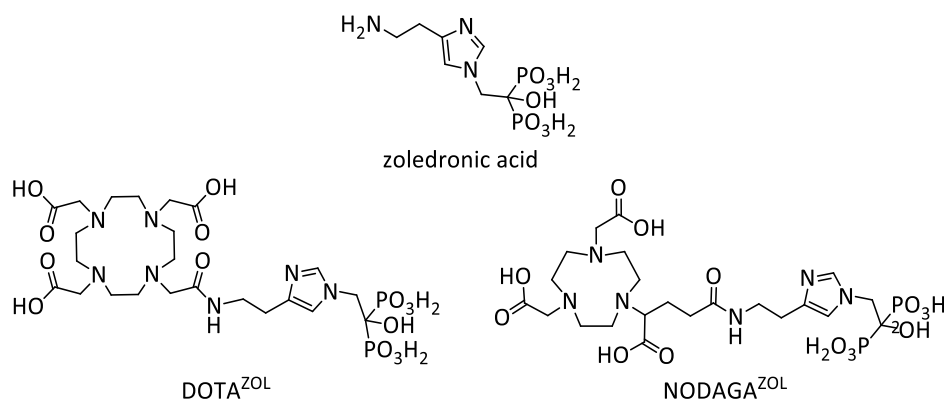


Figure 1: Structures of zoledronic acid, DOTA^{ZOL} and NODAGA^{ZOL}.

Materials and methods

Chemicals and instrumentation

DOTA^{ZOL} and NODAGA^{ZOL} were obtained from ITG (Isotope Technologies Garching, Germany). For radiolabelling reactions, trace metal-free salts and water commercially available at Sigma-Aldrich and Fluka were used.

Activities were determined using an Isomed 2000-Aktivimeter (MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH) and radio-TLC analysis was carried out using a Rita-Star TLC scanner (Raytest, Straubenhardt, Germany).

Radiochemical yields were determined by radio-TLC using Merck Silica F₂₅₄ TLC plates as the stationary phase and acetone/aceytalacetone/30 % HCl 10:10:1 and 0.1 M citrate buffer pH 4 for the ⁶⁸Ga- and the ⁶⁴Cu-labelling, respectively, as the mobile phase. Radio-TLC analysis was carried out using a Raytest Rita-Star TLC scanner.

Samples collected during *ex vivo* biodistribution studies were measured in a Wallac WIZARD automatic gamma counter (PerkinElmer, Germany).

The PET studies were carried out with a NanoScanPET/CT (Mediso, Hungary).

Radiolabelling with n.c.a. ^{68}Ga

^{68}Ga]Ga-DOTA^{ZOL} was produced as previously described [10]. NODAGA^{ZOL} was labelled as follows.

Method A ^{68}Ga]Ga³⁺ was obtained from a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator (iThemba LABS, South Africa). Concentration and purification of the initial generator eluate were performed using a cationic post processing [13]. NODAGA^{ZOL} was labelled in sodium acetate buffer (0.2 M pH 4.5) with 100 MBq of ^{68}Ga using different amounts of precursor (1, 5 and 10 nmol) at 98 °C. TLC samples were taken after 1, 3, 5, 10 and 15 min.

After radiolabelling with ^{68}Ga , ^{68}Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} was incubated in human serum and phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) at 37 °C. TLC samples were taken after 15, 30, 60 and 120 min. Percentage of intact complex was determined by radio-TLC.

Method B ^{68}Ga]Ga³⁺ was obtained from a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radionuclide generator (ITG, München, Germany). Concentration and purification of the initial generator eluate were performed using an anionic post processing [14]. NODAGA^{ZOL} was labelled in HEPES buffer (0.4 M pH 7) with 200 – 300 MBq of ^{68}Ga using 20 nmol of precursor for 15 min at 98 °C

Radiolabelling with ^{64}Cu

^{64}Cu was produced by a Cyclone 18/9 cyclotron (IBA, Louvain la Neuve, Belgium) using the $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ reaction following standard procedures [15]. NODAGA^{ZOL} was radiolabelled by adding 130 MBq of ^{64}Cu]CuCl₂ in 0.01 M HCl that was adjusted to pH 5.5 with 2 M NH₄OAc to 15 nmol NODAGA^{ZOL} dissolved in 100 µL water for 30 min at 90 °C. The radiochemical purity was determined by radio-TLC.

Animals, feeding, husbandry and animal preparation

Animal experiments in male Wistar rats (Wistar Unilever, HsdCpb:WU, Harlan Winkelmann, Borchon, Germany) were carried out according to the guidelines of the German regulations for animal welfare. The protocol was approved by the local ethical committee for animal experiments (reference number 24–9168.21–4/2004–1). Rats were housed under standard conditions with free access to food and tap water.

Ex vivo biodistribution

Before formulation for the *in vivo* application, the labelling solutions were filtrated (45 µm pore size, REZIST 13/0.45 PTFE, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The filtrates were then diluted with

isotonic sodium chloride solution E-154 (154 mmol L⁻¹ Na⁺, 154 mmol L⁻¹ Cl⁻, Serumwerk Bernburg, Germany) to reach a concentration of about 20 MBq mL⁻¹ and directly used for the radiopharmacological studies.

Four male Wistar-Unilever rats aged between 7 and 9 weeks and weighing 157 ± 34 g (mean ± SD, *n* = 24) were intravenously injected into a tail vein with 0.5 mL of electrolyte solutions E-154 of the ⁶⁸Ga- and ⁶⁴Cu-labelled compounds containing approximately 6.4 ± 0.5 MBq and 0.45 ± 0.01 MBq, respectively, for each point of time. Animals were sacrificed at 5 and 60 min post injection. Blood and the major organs were collected, weighed and measured. The activity of the tissue samples was decay-corrected and calibrated by comparing the counts in tissue with the counts in aliquots of the injected tracer that had been measured in the gamma counter at the same time. The activity amount in selected organs was expressed as percent of injected dose (% ID). The activity concentration in the biodistribution measurements were calculated as SUV (SUV = (activity × g⁻¹ tissue)/ (injected activity × body weight⁻¹)) and expressed as mean ± SD for each group of four animals. The SUV and tissue-to-blood or -muscle ratios were used for better comparison with the PET data and values from the literature.

Small animal PET

Anesthetized, spontaneously breathing animals were allowed to stabilize for 10 min after preparation. The animals were positioned on a heated bed to maintain the body temperature at 37 °C. The activity of the injection solution was measured in a well counter cross-calibrated to the PET scanners. A CT transmission scan was recorded during this time for each subject. The transmission scans were used to correct the emission scan for γ-ray attenuation caused by body tissues and supporting structures. The dynamic PET acquisition over 120 min was started and the infusion of the ⁶⁸Ga- or ⁶⁴Cu-labelled compound was initiated. The radiotracers were infused over 1 min by a syringe pump (Harvard apparatus 44 syringe pump) into a lateral tail vein. Afterwards, a whole body scan (3 bed positions with 20 min duration each) was carried out. At the end of the experiment, the animals were deeply anesthetized and sacrificed by an intravenous injection of potassium chloride.

Statistical analysis

Values are expressed as mean ± SD. Values were compared using ANOVA or an unpaired Student's *t*-test with Welch's correction and an *F*-test to compare the variances (*GraphPad Prism* 6.0). A *P* value of <0.05 was considered significant.

Results and Discussion

Radiolabelling

Radiolabelling of NODAGA^{ZOL} with n.c.a. ⁶⁸Ga using *Method A* provided radiochemical yields of >98 % within 10 min with precursor amounts of ≥5 nmol (Figure 2). *Method B* also led to radiochemical yields of >98 % within 10 min showing that fast and quantitative labelling can also be achieved using different post processings of the generator eluate, different buffer systems and higher activities. The radiotracer was used in all subsequent biological experiments without further purification.

Radiolabelling of NODAGA^{ZOL} with ⁶⁸Ga provided higher radiochemical yields than synthesis of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} which needs additional purification after the labelling reaction by solid phase extraction as radiochemical yields reach about 80-90 % [10]. Hence, NODAGA^{ZOL} facilitates radiolabelling with ⁶⁸Ga.

Besides good labelling properties of the ligand, the metal complex should possess high stability. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} was evaluated regarding its *in vitro* stability in human serum as well as phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) as injection solvent. The ⁶⁸Ga-complex showed a stability of >98 % in both media at 37 °C over about two half-lives of the radionuclide (120 min) (Figure 2).

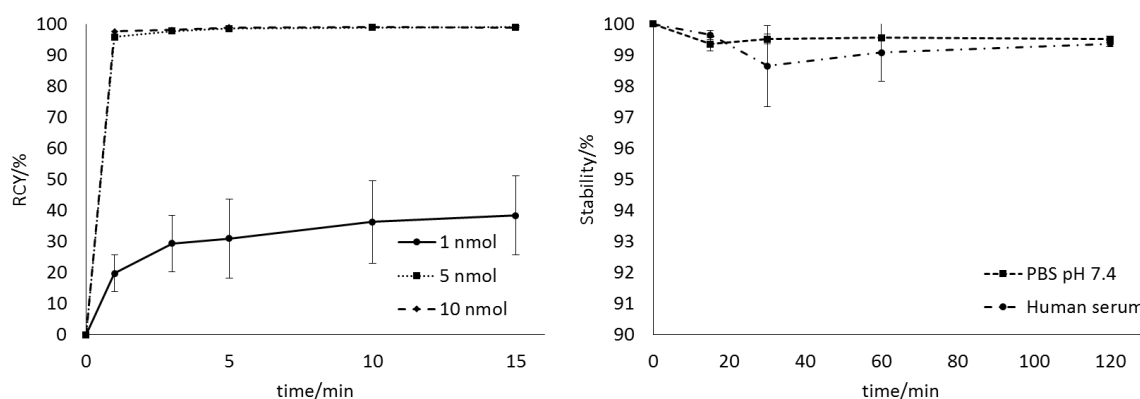


Figure 2: Radiolabelling kinetics of NODAGA^{ZOL} with ⁶⁸Ga in NaOAc (0.2 M pH 4.5) using 1, 5 and 10 nmol precursor at 98 °C (n = 3); *in vitro* stability of [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} in PBS and human serum at 37 °C over 2 h (n = 3).

Radiolabelling of NODAGA^{ZOL} with ⁶⁴Cu provided radiochemical yields >99 % within 30 min. [⁶⁴Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} was used in all subsequent biological experiments without further purification.

Ex vivo biodistribution

Ex vivo biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} was studied in 7-9 weeks old healthy Wistar rats. At this age, metaphyses are still growing leading to increased bone turnover at the proximal and distal end of the femur diaphysis. Biodistribution of this new compound was compared to biodistribution of the already known [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} at 5 min and 60 min post injection. Results are shown in Table 1.

Table 1: Ex vivo biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} and [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} in healthy Wistar rats at 5 min and 60 min p.i.

organ	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA ^{ZOL} 5 min p.i.	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA ^{ZOL} 60 min p.i.	[⁶⁸ Ga]Ga- NODAGA ^{ZOL} 5 min p.i.	[⁶⁸ Ga]Ga- NODAGA ^{ZOL} 60 min p.i.
blood	1.27 (0.21)	0.44 (0.04)	1.24 (0.11)	0.08 (0.00)
BAT	0.45 (0.07)	0.16 (0.02)	0.45 (0.04)	0.06 (0.02)
hair + skin	0.58 (0.10)	0.19 (0.05)	0.67 (0.05)	0.08 (0.01)
brain	0.06 (0.01)	0.03 (0.01)	0.05 (0.01)	0.02 (0.01)
pancreas	0.37 (0.11)	0.15 (0.04)	0.28 (0.01)	0.04 (0.01)
spleen	0.28 (0.03)	0.14 (0.02)	0.22 (0.02)	0.05 (0.01)
adrenals	0.54 (0.11)	0.19 (0.03)	0.53 (0.07)	0.10 (0.01)
kidneys	2.54 (0.84)	0.51 (0.08)	2.35 (0.51)	0.33 (0.03)
WAT	0.39 (0.08)	0.11 (0.03)	0.52 (0.36)	0.05 (0.01)
muscle	0.28 (0.11)	0.08 (0.10)	0.24 (0.05)	0.04 (0.02)
heart	0.42 (0.05)	0.16 (0.02)	0.47 (0.05)	0.04 (0.00)
lung	0.72 (0.12)	0.25 (0.04)	0.62 (0.05)	0.08 (0.01)
thymus	0.34 (0.02)	0.14 (0.02)	0.31 (0.03)	0.04 (0.01)
hard. gland	0.53 (0.03)	0.28 (0.05)	0.45 (0.05)	0.28 (0.18)
liver	0.43 (0.10)	0.18 (0.01)	0.40 (0.06)	0.07 (0.01)
femur 1	2.95 (0.52)	3.71 (0.32)	3.57 (0.24)	4.67 (0.14)
femur 2	2.84 (0.36)	3.64 (0.43)	3.46 (0.28)	4.40 (0.43)
femur total	2.89 (0.44)	3.67 (0.37)	3.51 (0.17)	4.53 (0.28)
testes	0.29 (0.02)	0.11 (0.01)	0.28 (0.03)	0.03 (0.01)

Data are expressed in SUV. Each value represents the mean (S.D.) of four animals.

Both compounds showed distinct bone uptake already after 5 min and low uptake in non-target tissues. Blood clearance was very fast and renal excretion of the unbound tracer occurred within 1 h. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} had a higher bone accumulation than [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} at 5 min (SUV_{femur} = 3.51 ± 0.17 and SUV_{femur} = 2.89 ± 0.44, respectively) as well as 60 min (SUV_{femur} = 4.53 ± 0.28 and SUV_{femur} = 3.67 ± 0.37, respectively) after injection. Blood clearance of the NODAGA derivative was a little faster. At 5 min post injection, blood-pool activity of both compounds was comparable (SUV_{blood} = 1.24 ± 0.11 and SUV_{blood} = 1.27 ± 0.21 for [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} and [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}, respectively). After 1 h there is still some activity found in the blood for [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} in contrast

to [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} (SUV_{blood} = 0.08 ± 0.00 and SUV_{blood} = 0.44 ± 0.04). This is also evident by comparing the femur-to-blood ratios of both complexes. Femur-to-muscle ratios behaved similar (Table 3).

Based on these results, NODAGA^{ZOL} seems to offer suitable diagnostic abilities with ⁶⁸Ga. The NODAGA-chelator is also able to form stable complexes with other radionuclides such as ⁶⁴Cu. ⁶⁴Cu has a physical half-life of 12.7 h which enables distribution of the cyclotron produced radionuclide without much loss of activity [16]. In addition, the relatively long half-life for example allows for dosimetry studies which are not possible using the short-living ⁶⁸Ga. Hence, *in vivo* behaviour of [⁶⁴Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} and especially the comparison with [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} are of interest. *Ex vivo* biodistribution of [⁶⁴Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} also was studied in young healthy Wistar rats. Results are shown in Table 2.

Table 2: *Ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} and [⁶⁴Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} in healthy Wistar rats at 5 min and 60 min p.i.

organ	[⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA ^{ZOL} 5 min p.i.	[⁶⁸ Ga]Ga-NODAGA ^{ZOL} 60 min p.i.	[⁶⁴ Cu]Cu-NODAGA ^{ZOL} 5 min p.i.	[⁶⁴ Cu]Cu-NODAGA ^{ZOL} 60 min p.i.
blood	1.24 (0.11)	0.08 (0.00)	1.10 (0.19)	0.08 (0.01)
BAT	0.45 (0.04)	0.06 (0.02)	0.40 (0.05)	0.23 (0.11)
skin	0.67 (0.05)	0.08 (0.01)	0.66 (0.03)	0.39 (0.13)
brain	0.05 (0.01)	0.02 (0.01)	0.08 (0.05)	0.11 (0.06)
pancreas	0.28 (0.01)	0.04 (0.01)	0.57 (0.27)	0.39 (0.20)
spleen	0.22 (0.02)	0.05 (0.01)	0.31 (0.07)	0.15 (0.08)
adrenals	0.53 (0.07)	0.10 (0.01)	4.62 (3.91)	2.08 (1.45)
kidneys	2.35 (0.51)	0.33 (0.03)	5.00 (2.40)	0.70 (0.04)
WAT	0.52 (0.36)	0.05 (0.01)	1.50 (1.22)	0.20 (0.17)
muscle	0.24 (0.05)	0.04 (0.02)	0.29 (0.07)	0.11 (0.06)
heart	0.47 (0.05)	0.04 (0.00)	0.51 (0.03)	0.10 (0.03)
lung	0.62 (0.05)	0.08 (0.01)	0.78 (0.09)	0.26 (0.12)
thymus	0.31 (0.03)	0.04 (0.01)	0.50 (0.21)	0.21 (0.13)
hard. gland	0.45 (0.05)	0.28 (0.18)	0.59 (0.23)	0.51 (0.21)
liver	0.40 (0.06)	0.07 (0.01)	0.52 (0.05)	0.17 (0.03)
femur 1	3.57 (0.24)	4.67 (0.14)	3.34 (0.21)	4.77 (0.48)
femur 2	3.46 (0.28)	4.40 (0.43)	3.40 (0.33)	4.76 (0.59)
femur total	3.51 (0.17)	4.53 (0.28)	3.37 (0.31)	4.76 (0.50)
testes	0.28 (0.03)	0.03 (0.01)	0.45 (0.09)	0.12 (0.04)

Data are expressed in SUV. Each value represents the mean (S.D.) of four animals.

$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ showed a fast femur uptake during the first minutes which still increased over time ($\text{SUV}_{\text{femur}} = 3.37 \pm 0.31$ and $\text{SUV}_{\text{femur}} = 4.76 \pm 0.50$, 5 min and 60 min p.i. respectively). It had a high kidney accumulation at 5 min p.i. in combination with a very fast clearance within 1 h ($\text{SUV}_{\text{kidneys}} = 5.00 \pm 2.40$ and $\text{SUV}_{\text{kidneys}} = 0.70 \pm 0.04$, respectively). All non-target tissues exhibited low tracer uptake. A comparison of both the ^{68}Ga - and the ^{64}Cu -labelled NODAGA^{ZOL} revealed very similar results concerning bone uptake ($\text{SUV}_{\text{femur}} = 4.53 \pm 0.28$ and $\text{SUV}_{\text{femur}} = 4.76 \pm 0.50$, respectively) and clearance of the unbound tracers. Accordingly, the femur-to-blood ratios were also comparable (Table 3). Femur-to-muscle ratio at 1 h p.i. was higher for $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ due to the higher activity accumulation of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ in the muscle. A comparison of biodistribution of all three evaluated compounds is illustrated in Figure 3.

Table 3: Femur-to-blood and femur-to-muscle ratios of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ and $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ in healthy Wistar rats at 60 min p.i.

	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$	$[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$	$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$
femur-to-blood ratio	8.39 (1.41)	57.14 (4.92)	56.55 (9.46)
femur-to-muscle ratio	45.36 (5.64)	191.27 (12.41)	66.39 (22.15)

Each value represents the mean (S.D.) of four animals.

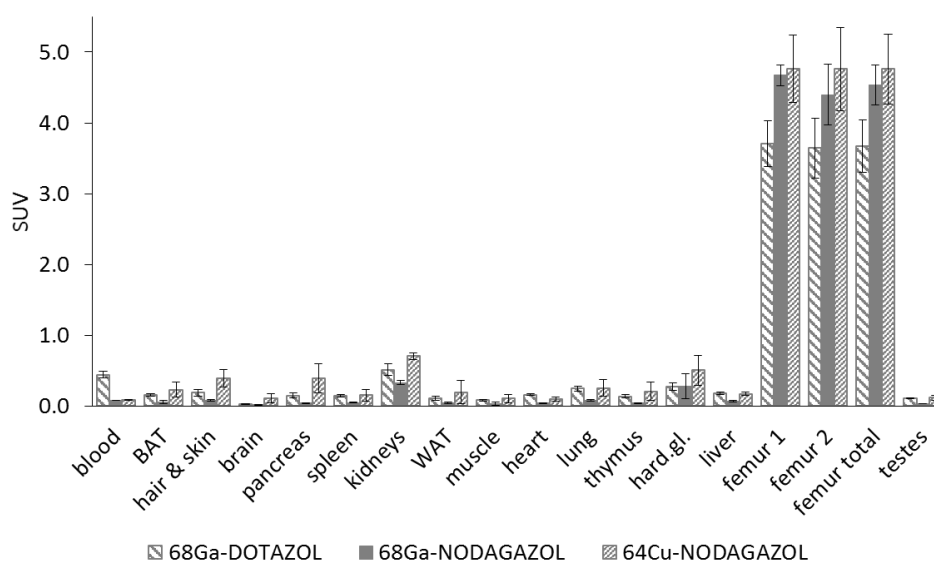


Figure 1: Comparison of biodistribution of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ and $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ in healthy Wistar rats at 60 min p.i.

Small animal PET

In vivo evaluation of all radiotracers was carried out in young healthy Wistar rats. PET scans of both ^{68}Ga -labelled compounds are presented in Figure 4. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ as well as $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ showed a fast bone accumulation, especially in the high metabolic joint regions which allows prognoses about the tracers' accumulation in skeletal lesions. Due to the fast blood clearance and the fast renal excretion of the unbound tracer, both radiotracers showed a very good target-to-background ratio. No considerable uptake was observed in other organs and tissues.

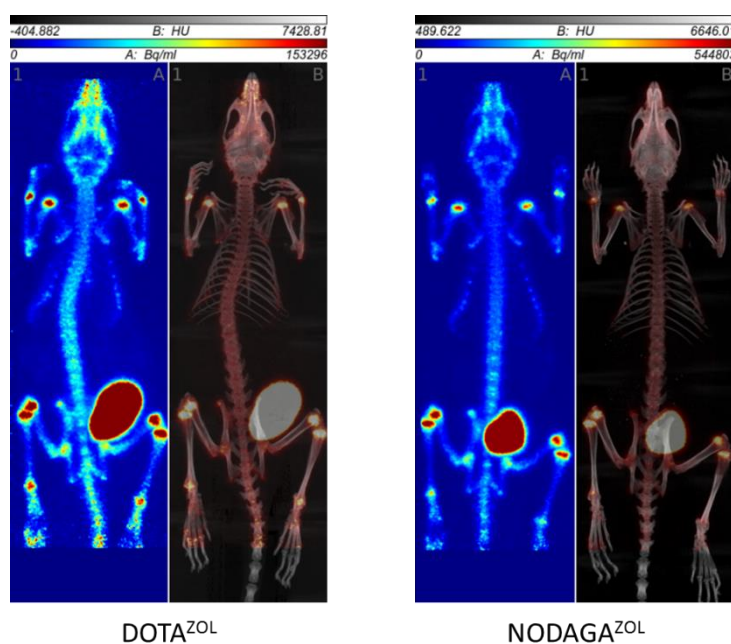


Figure 4: Maximum intensity projection (left) and PET/CT (right) derived from small animal PET/CT imaging of young healthy Wistar rats at 2 h p.i. of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ and $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$.

The time-activity curves shown in Figure 5 point up the fast epiphysis accumulation within the first minutes after injection, reaching a plateau after about 50 min. SUV of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ is distinctly higher in the epiphysis ($\text{SUV}_{\text{epiphysis}} = 17.34$ and $\text{SUV}_{\text{epiphysis}} = 25.57$ at 1 h p.i.). Hence, the PET scans confirmed the higher bone uptake of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ compared to $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ and according to this, the time-activity curves indicated a clearly higher epiphysis-to-blood ratio for $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ resulting in an even better target-to-background ratio. As mentioned for the *ex vivo* biodistribution studies, $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ also exhibited a similar *in vivo* behaviour as $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ in small animal PET imaging with a high tracer uptake in the epiphyseal plates and very low uptake in other organs and tissues beside excretion organs (Figure 6). As illustrated by the time-activity curves in Figure 5, blood clearance of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ is comparable to that of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ and a little slower than for $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$. In contrast to a slightly higher bone

uptake of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ compared to $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ in *ex vivo* biodistribution studies, uptake of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ in the epiphysis is distinctly higher than uptake of both ^{68}Ga -labelled compounds ($\text{SUV}_{\text{epiphysis}} = 78.11$ at 1 h p.i.) in small animal PET imaging. This leads to comparable epiphysis-to-blood ratios for $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ and $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ despite the faster blood clearance of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$. To examine if the distinctly higher epiphysis uptake of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ results from differences concerning the complex chemistry of ^{68}Ga and ^{64}Cu , additional PET imaging was performed using $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA}^{\text{ZOL}}$. The time-activity curves of this ^{64}Cu -complex are also presented in Figure 5. $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ showed a higher uptake in the epiphysis than $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ leading to the assumption that the chelator as well as the radionuclide can influence bone uptake.

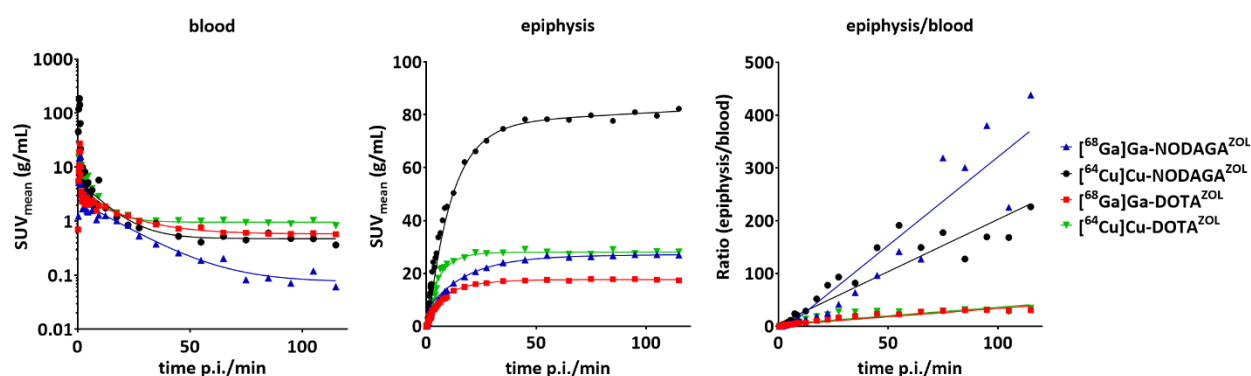


Figure 5: Time-activity curves of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$, $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$ and $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ in the blood and epiphysis of healthy Wistar rats as well as epiphysis-to-blood ratios obtained from PET imaging.

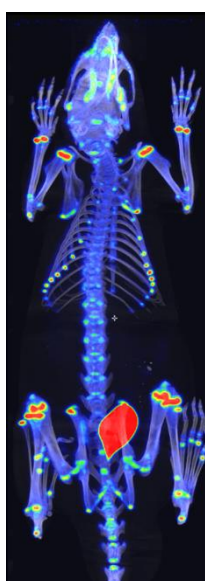


Figure 6: PET/CT derived from small animal PET/CT imaging of a young healthy Wistar rat at 2 h p.i. of $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$.

Conclusion

The new chelator-conjugated bisphosphonate NODAGA^{ZOL} was evaluated regarding its labelling properties with ⁶⁸Ga and its *in vivo* behaviour. It allows for a fast, quantitative and robust labelling with ⁶⁸Ga and facilitates radiolabelling compared to the DOTA based analog DOTA^{ZOL}. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} showed high bone accumulation, low uptake in non-target tissues, a fast renal clearance and altogether a very good target-to-background ratio. Bone uptake was even higher than that of the corresponding DOTA derivative [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}. This difference regarding bone uptake of NOTA- and DOTA-conjugated bisphosphonates has already been observed for [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD. The NOTA derivative [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} exhibited a significantly higher femur accumulation in rats compared to the DOTA derivative [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD [17]. This may be explained by differences in charge and physical properties of both complexes. It is a recurrent phenomenon that different chelators provide different *in vivo* properties with the same target vector [18]. Furthermore, complex chemistry of the used radionuclide seems to have a certain influence on bone uptake of the radiotracers. The ⁶⁴Cu-complexes of NODAGA^{ZOL} as well as DOTA^{ZOL} showed higher uptake in the epiphysis compared to the respective ⁶⁸Ga-complexes in small animal PET imaging. Considering the potential of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} for endoradiotherapy which has already been shown in small animals as well as in first applications in patients, NODAGA^{ZOL} can serve as the diagnostic arm of a useful theranostic pair for bone metastases. Furthermore, the range of applications for NODAGA^{ZOL} can be extended using other radionuclides like ⁶⁴Cu. Owing to its longer half-life of 12.7 h it enables for example dosimetry studies and as it decays via β⁺, β⁻ and γ-emission, a theranostic application is conceivable [16]. [⁶⁴Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} showed a very similar biodistribution compared to [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL}. The radionuclide does not seem to have significant influence on the biodistribution, it merely seems to increase bone uptake. Altogether, NODAGA^{ZOL} is a useful extension of the class of macrocyclic chelate-conjugated bisphosphonates as bone-seeking radiopharmaceuticals.

References

- [1] Sartor, O.; Hoskin, P.; Bruland, O.S. Targeted radio-nuclide therapy of skeletal metastases. *Cancer Treat Rev*, **2013**, 39, 18–26.
- [2] Love, C.; Din, A.S.; Tomas, M.B.; Kalappambath, T.P.; Palestro, C.J. Radionuclide bone imaging: an illustrative review. *Radiographics*, **2003**, 23, 341–358.
- [3] Rahmim, A.; Zaidi, H. PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges. *Nucl Med Commun*, **2008**, 29, 193–207.
- [4] Chakraborty, D.; Bhattacharya, A.; Mete, U.K.; Mittal, B.R. Comparison of ¹⁸F fluoride PET/CT and ^{99m}Tc-MDP bone scan in the detection of skeletal metastases in urinary bladder carcinoma. *Clin Nucl Med*, **2013**, 38, 616–621.

- [5] Kutzner, J.; Grimm, W.; Hahn, K. Palliative Strahlentherapie mit Strontium-89 bei ausgedehnter Skelettmetastasierung. *Strahlentherapie*, **1978**, 154, 317–322.
- [6] Lange, R.; Ter Heine, R.; Knapp, R.F.; de Klerk, John M H; Bloemendal, H.J.; Hendrikse, N.H. Pharmaceutical and clinical development of phosphonate-based radiopharmaceuticals for the targeted treatment of bone metastases. *Bone*, **2016**, 91, 159–179.
- [7] Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, **2008**, 19, 733–759.
- [8] Ogawa, K.; Mukai, T.; Inoue, Y.; Ono, M.; Saji, H. Development of a novel ^{99m}Tc-chelate-conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent. *J Nucl Med*, **2006**, 47, 2042–2047.
- [9] Widler, L.; Jaeggi, K.A.; Glatt, M.; Müller, K.; Bachmann, R.; Bisping, M.; Born, A.-R.; Cortesi, R.; Guiglia, G.; Jeker, H.; Klein, R.; Ramseier, U.; Schmid, J.; Schreiber, G.; Seltenmeyer, Y.; Green, J.R. Highly Potent Geminal Bisphosphonates. From Pamidronate Disodium (Aredia) to Zoledronic Acid (Zometa). *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3721–3738.
- [10] Meckel, M.; Bergmann, R.; Miederer, M.; Roesch, F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: ⁶⁷Me(III)-DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. *EJNMMI radiopharm. chem.*, **2017**, 1, 1481.
- [11] Spang, P.; Herrmann, C.; Roesch, F. Bifunctional Gallium-68 Chelators: Past, Present, and Future. *Semin Nucl Med*, **2016**, 46, 373–394.
- [12] Niccoli Asabella, A.; Cascini, G.L.; Altini, C.; Paparella, D.; Notaristefano, A.; Rubini, G. The copper radioisotopes: a systematic review with special interest to ⁶⁴Cu. *Biomed Res Int*, **2014**, 2014, 786463.
- [13] Zhernosekov, K.P.; Filosofov, D.V.; Baum, R.P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A.A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Rösch, F. Processing of generator-produced ⁶⁸Ga for medical application. *J Nucl Med*, **2007**, 48, 1741–1748.
- [14] Gebhardt, P.; Opfermann, T.; Saluz, H.P. Computer controlled ⁶⁸Ga milking and concentration system. *Appl Radiat Isot*, **2010**, 68, 1057–1059.
- [15] Thieme, S.; Walther, M.; Pietzsch, H.-J.; Henniger, J.; Preusche, S.; Mäding, P.; Steinbach, J. Module-assisted preparation of ⁶⁴Cu with high specific activity. *Appl Radiat Isot*, **2012**, 70, 602–608.
- [16] Anderson, C.J.; Ferdani, R. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: Advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm*, **2009**, 24, 379–393.
- [17] Pfannkuchen, N.; Meckel, M.; Bergmann, R.; Bachmann, M.; Bal, C.; Sathekge, M.; Mohnike, W.; Baum, R.P.; Rösch, F. Novel Radiolabelled Bisphosphonates for PET Diagnosis and Endoradiotherapy of Bone Metastases. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2017**, 10.
- [18] Price, E.W.; Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*, **2014**, 43, 260–290.

3.4. Comparison of uptake parameters of [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in prostate cancer patients expressing bone metastases

Comparison of uptake parameters of [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in prostate cancer patients expressing bone metastases

N. Pfannkuchen¹, M. Meckel¹, F. Rösch¹, H. Stobbe², B. Zimontkowski², W. Mohnike²

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

² Diagnostisch Therapeutisches Zentrum am Frankfurter Tor (MVZ), Berlin, Germany

Abstract

Purpose [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 is increasingly used for imaging both prostate cancer tissue and also bone metastases and lymph node metastases of prostate cancer patients. The accumulation observed in those target organs induces interest in therapeutic analogs. Concerning PET/CT imaging of bone metastases, the bisphosphonate tracer [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} demonstrated excellent uptake on disseminated bone lesions. The aim of this preliminary study was to quantitatively compare the accumulation of the two different ⁶⁸Ga-labelled tracers in bone metastases and healthy organs head-to-head in the same prostate cancer patients.

Methods Two patients were examined to determine SUVs (standardized uptake value) in individual bone metastases and soft tissue organs (liver, kidney cortex, aorta, musculature, fat). PET/CT imaging was performed at 130 min p.i. for [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} and at 60 min p.i. for [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 for patient one and at 76 min p.i. for [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} and at 47 min p.i. for [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 for patient two.

Results [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} showed on average a more than threefold higher uptake in identical metastases than [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. The range of SUVs was 17.1–30.8 and 20.4–46.0 for the BP tracer and 3.6–20.7 and 5.0–20.6 for the PSMA tracer for patient one and two, respectively. Average ratios for bone metastases uptake between [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 were 3.4 and 3.1. At the same time, the BP tracer revealed lower accumulation in soft tissue as well as in important organs like liver and kidney. SUVs for liver were 7.1 and 6.5 ([⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP}) compared to 14.6 and 14.2 ([⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11) in patient one and two, respectively. Corresponding values for kidney cortex were 6.8 and 6.2 ([⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP}) compared to 25.8 and 42.0 ([⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11).

Conclusions [⁶⁸Ga]Ga-NO₂AP^{BP} is by far the superior tracer for imaging disseminated bone metastases. Uptake in bone metastases is larger by a factor of >3, clearance of the unbound tracer is rapid and accumulation in all soft tissue organs is much lower compared to [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11. The potential of ¹⁷⁷Lu-DOTA-BP and ¹⁷⁷Lu-DOTA-PSMA derivatives for the treatment of bone metastases should be discussed correspondingly.

Key words: prostate cancer, bone metastases, ⁶⁸Ga, NO₂AP^{BP}, PSMA-11

Introduction

Prostate and breast cancer are high rated in the number of cancer cases worldwide [1]. One serious consequence of these tumours is the metastatic spread into the skeleton which dramatically reduces the patients' quality of life due to symptoms like spinal cord compression, fractures, hypercalcaemia and severe bone pain leading to the permanent consumption of analgesic drugs like codeine or morphine [2]. Radiopharmaceuticals play a key role in diagnosis and therapy of bone metastases. Due to the increased bone turnover which characterises those lesions, bone-seeking radiopharmaceuticals show an enhanced uptake compared to healthy bone material. For decades, bisphosphonate (BP) based compounds are used in this context due to their high affinity to hydroxyapatite, which is the main component of the inorganic matrix of the bone [3]. In addition to established bisphosphonates like MDP (methylene diphosphonate) and HEDP (1-hydroxyethylidene diphosphonate) or phosphonate-based chelators like EDTMP (ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid)), which are used for SPECT diagnosis or systemic radiotherapy of bone metastases in combination with radionuclides like ^{99m}Tc , ^{188}Re or ^{153}Sm [4–6], a new class of bone-seeking radiopharmaceuticals emerged recently. These compounds are based on a macrocyclic chelate which is coupled to a bisphosphonate entity [7]. One of these chelate-conjugated bisphosphonates is NO₂AP^{BP} [8], which allows fast and robust labelling with ^{68}Ga owing to the NOTA chelator (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid) (Figure 1). [^{68}Ga]Ga-NO₂AP^{BP} was evaluated in a study in breast cancer patients and compared to [^{99m}Tc]Tc-MDP as well as [^{18}F]NaF [9]. Within this study it was able to underline its high diagnostic efficiency as it revealed a similar detection capability as [^{18}F]NaF.

This ^{68}Ga -labelled bisphosphonate should next be compared to [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 (Figure 1), which is the most common radiotracer used for diagnosis of prostate cancer [10, 11], in terms of detection of bone metastases. PSMA-11 is an inhibitor of the prostate-specific membrane antigen (PSMA). This transmembrane protein is significantly overexpressed in prostate cancer cells while being hardly expressed in normal tissues [12]. Therefore it is a promising biological target for imaging of metastatic prostate cancer.

The aim of this preliminary study was to quantitatively compare the uptake of both ^{68}Ga -labelled compounds head-to-head in two patients suffering from metastatic prostate cancer.

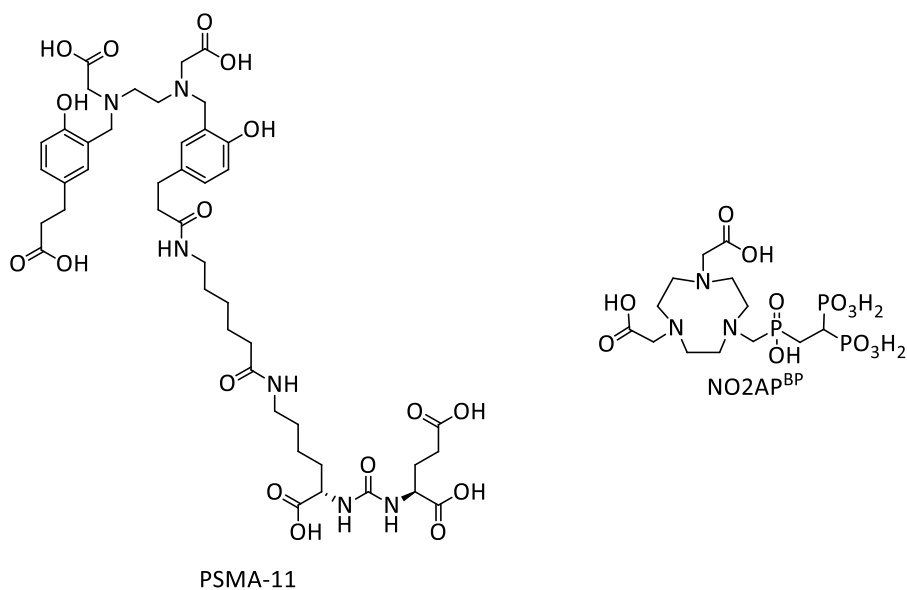


Figure 1: Structures of PSMA-11 and NO2AP^{BP}.

Results and Discussion

Uptake kinetics of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP}

In one prostate cancer patient showing disseminated bone metastases, the uptake kinetics of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} was measured in 5 PET scans over a period of 2 h. The ⁶⁸Ga-labelled BP showed a fast uptake in all bone metastases (Figure 2). The time-activity curves reached a plateau after about one hour and uptake afterwards only increased slightly. This *in vivo* behavior is also known from the evaluation of this compound in small animals [8]. Beside this fast accumulation in the target tissue, [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} revealed a fast renal excretion. The temporarily high SUVs for kidneys and bladder already decreased distinctly during the examined period of 2 h (SUV_{kidney} = 55.45 at 35 min p.i. and SUV_{kidney} = 19.2 at 120 min p.i.). Other organs and tissues like heart, spleen, intestine and fat tissue only showed low uptake, also suggesting a very fast blood clearance (Figure 2). Due to the uptake characteristics of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP}, different time periods between injection and PET scan should not noticeably influence the results concerning uptake in bone metastases and other tissues as long as the PET scan is conducted at least 1 h post injection. After this time, the above mentioned plateau regarding uptake in bone metastases is reached and the uptake will not differ distinctly afterwards. Uptake in other organs and tissues also will not change in time as there is hardly any uptake besides accumulation in excretory organs.

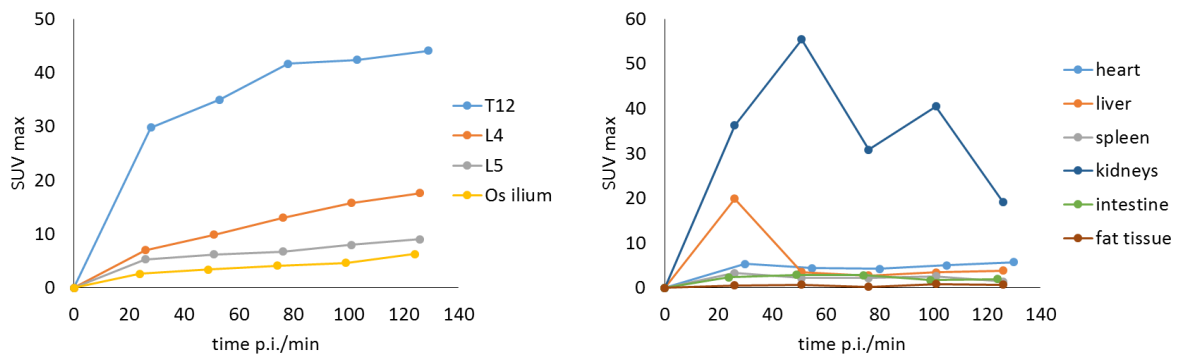


Figure 2: Accumulation of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ in bone metastases in the spine (T12, L4, L5) and os ilium and in organs and soft tissue over 2 h.

These results are also visible in the corresponding PET scans which were conducted at 10, 35, 60, 85 and 120 min after injection (Figure 3).

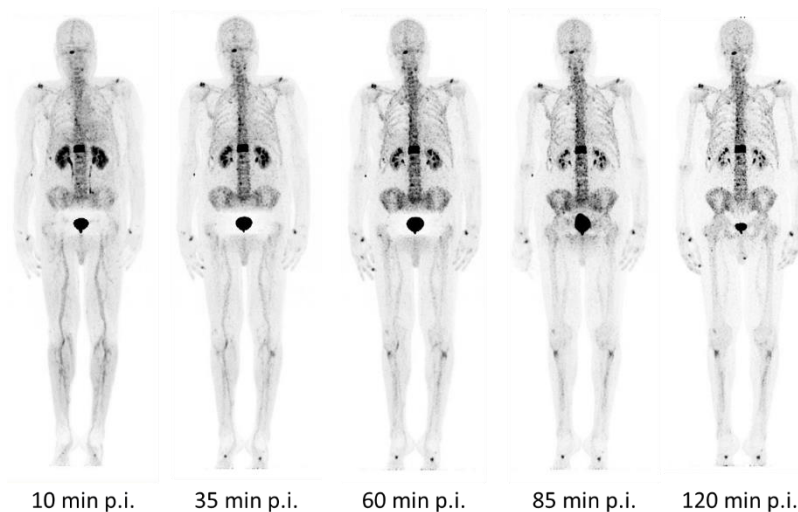


Figure 3: PET scans at different points of time after injection of 339 MBq of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ in a prostate cancer patient.

In the first scan right after injection, the kidneys and the bladder are clearly visible as well as the blood volume. There is also already accumulation in the metastases, especially in one vertebra of the thoracic spine (T12). In the next scans, SUV of the kidneys decreased distinctly. After two hours, most of the unbound tracer is excreted and the metastases show an explicit uptake with a very good target-to-background ratio as there is hardly any activity accumulation in nontarget tissues.

Comparison of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in two prostate cancer patients

[⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 were compared in two patients suffering from metastatic prostate cancer regarding uptake in bone metastases and other organs. Table 1 depicts the data of both patients, injected activities, times of acquisition and SUVs of both compounds in bone metastases as well as other organs and tissues.

Table 1: Patient data and SUVs in bone metastases and different organs and tissues after injection of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11.

Patient 1			Patient 2		
weight	106 kg		weight	115 kg	
age	73 years		age	53 years	
tracer	[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	[⁶⁸ Ga]Ga-NO2AP ^{BP}	tracer	[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	[⁶⁸ Ga]Ga-NO2AP ^{BP}
inj. activity	198 MBq	214 MBq	inj. activity	211 MBq	156 MBq
time p.i.	60 min	130 min	time p.i.	47 min	76 min
region	SUV _{PSMA}	SUV _{BP}	region	SUV _{PSMA}	SUV _{BP}
acetabulum	10.3	41.0	scapula l.	3.8	24.7
os sacrum	20.6	45.0	os ilium l.	20.7	30.8
L3	16.6	46.0	os sacrum	47.7	34.6
caput humeri r.	13.9	34.0	os pubis r.	3.6	17.1
2. rib r.	5.0	20.4			
heart	8.3	7.3	heart	6.4	8.9
liver	14.2	6.5	liver	14.6	7.1
spleen	20.7	2.7	spleen	21.2	4.2
kidney (cortex)	42.0	6.2	kidney (cortex)	25.8	6.8
intestine	19.2	5.2	intestine	21.3	8.2
bladder	67.1	181.6	bladder	8.2	40.9
fat tissue	0.5	0.5	fat tissue	0.6	0.7
musculature	2.1	0.3	musculature	2.0	2.4

Uptake of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} was noticeably higher than that of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in 8 of 9 of the metastases quantified. In addition, the BP showed generally lower activity accumulation in other organs and tissues. Conspicuous differences can be seen for example for the liver and the kidneys.

These results are illustrated in Figure 4 and Figure 5 by SUV ratios between both radiotracers. These ratios demonstrate again that almost all metastases show a higher uptake for the BP. On average uptake of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO2AP}^{\text{BP}}$ is about threefold higher in identical metastases.

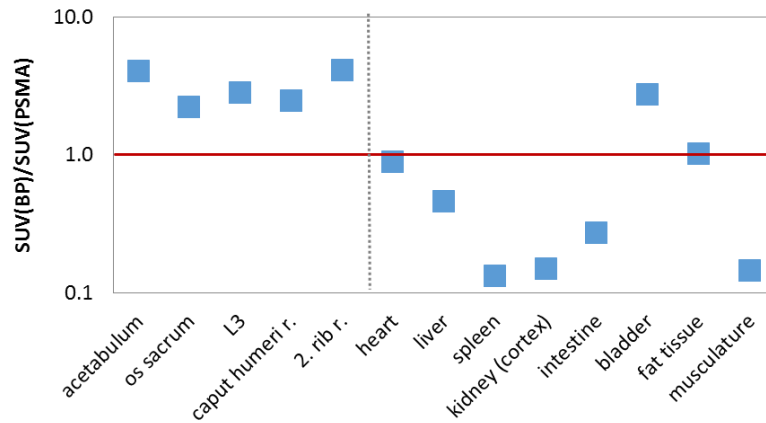


Figure 4: SUV ratios of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO2AP}^{\text{BP}}$ and $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ in bone metastases and other tissues for patient one.

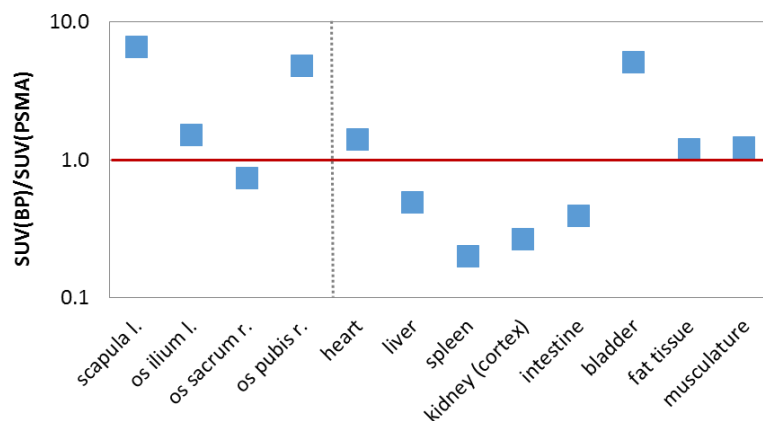


Figure 5: SUV ratios of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO2AP}^{\text{BP}}$ and $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$ in bone metastases and other tissues for patient two.

Comparing the PET scans of both patients using $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO2AP}^{\text{BP}}$ and $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-PSMA-11}$, especially the differences concerning uptake in non-target tissues is striking (Figure 6). As already mentioned, there are great differences regarding uptake in liver and kidneys. Furthermore, the BP shows no uptake at all in the salivary glands in contrast to PSMA. All these facts result in a considerably better target-to-background ratio of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NO2AP}^{\text{BP}}$.

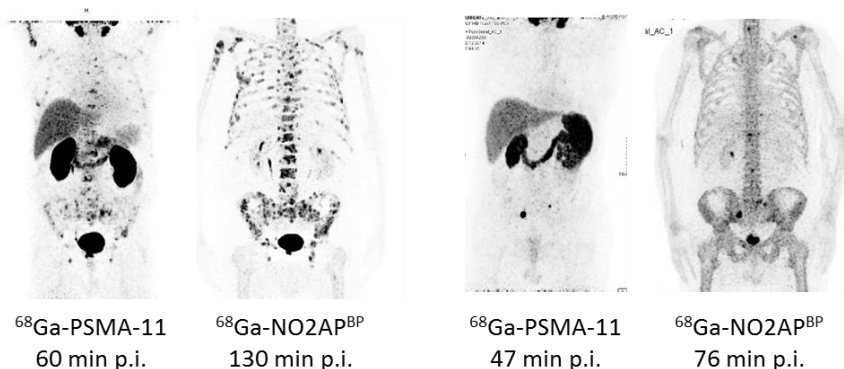


Figure 6: PET scans of patient 1 (left) and patient 2 (right) using [^{68}Ga]Ga-NO2AP^{BP} and [^{68}Ga]Ga-PSMA-11.

Altogether, [^{68}Ga]Ga-NO2AP^{BP} shows the typical fast blood clearance in connection with a fast and high uptake in bone lesions, which is generally higher than that of [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 in identical metastases. Furthermore, the [^{68}Ga]Ga-NO2AP^{BP} provides a better target-to-background ratio.

Conclusion

[^{68}Ga]Ga-NO2AP^{BP} seems to be an appropriate tracer for diagnosis of disseminated bone metastases, which also has been described by Passah *et al.* [9]. But the question that outruns the simple diagnostic application of those macrocyclic chelate-conjugated BPs, is how to treat a patient which shows predominantly bone metastases. For both classes of radiopharmaceuticals, the BPs as well as PSMA ligands, ^{177}Lu -labelled derivatives are available [13, 14]. This preliminary comparison of the corresponding PET tracers suggests that BPs are quite interesting in view of radiotherapy, not only based on their high accumulation in the metastatic regions, but also owing to their low uptake in other organs and tissues and their fast clearance. With regard to a therapeutic application this is also of great importance to avoid unnecessary radiation of nontarget tissues. Therefore, the potential of the available ^{177}Lu -labelled derivatives should be discussed and examined correspondingly.

Experimental Procedures

Radiolabelling of NO2AP^{BP} and PSMA-11 with ^{68}Ga and quality control

NO2AP^{BP} was obtained from Prof. Petr Hermann (Charles University Prague, Czech Republic). [^{68}Ga]Ga³⁺ was eluted from a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator on site. Concentration and purification of the initial generator eluate were performed using a cationic post-processing [15]. NO2AP^{BP} was labelled in 1 mL sodium acetate buffer (0.2 M pH 4.5) at 98 °C using 50 nmol of precursor. Quality control was performed by thin-layer chromatography with Merck Silica F₂₅₄ TLC plates as the stationary phase and

acetone/aceyalacetone/30 % HCl 10:10:1 as the solvent. After development, radiochemical purity was determined using a Raytest MiniGITA TLC scanner. Radiochemical purity of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} was >98 %. After synthesis, the reaction mixture was diluted and sterility was ensured via sterile filtration.

The labelling conditions for [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 already have been described in literature [11].

PET/CT imaging

For this preliminary study, PET/CT imaging was conducted applying [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and/or [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in 3 patients showing multiple bone metastases as a consequence of prostate cancer. One patient was examined to determine uptake kinetics of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP}. PET scans were conducted at 10, 35, 60, 85 and 120 min after injection of 339 MBq of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP}.

Two patients were examined to determine SUVs in several individual bone metastases and soft tissue organs (liver, kidney cortex, aorta, musculature, fat). PET imaging was performed 130 min after injection of 214 MBq of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and 60 min after injection of 198 MBq of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 for patient one. PET imaging was performed 76 min after injection of 156 MBq of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and 47 min after injection of 211 MBq of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 for patient two.

References

- [1] Torre, L.A.; Siegel, R.L.; Ward, E.M.; Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2016**, *25*, 16–27.
- [2] Sartor, O.; Hoskin, P.; Bruland, O.S. Targeted radio-nuclide therapy of skeletal metastases. *Cancer Treat Rev*, **2013**, *39*, 18–26.
- [3] Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, **2008**, *19*, 733–759.
- [4] Fogelman, I.; Citrin, D.L.; McKillop, J.H.; Turner, J.G.; Bessent, R.G.; Greig, W.R. A clinical comparison of Tc-99m HEDP and Tc-99m MDP in the detection of bone metastases: Concise communication. *J Nucl Med*, **1979**, *20*, 98–101.
- [5] Savio, E.; Gaudiano, J.; Robles, A.M.; Balter, H.; Paolino, A.; López, A.; Hermida, J.C.; Marco, E. de; Martinez, G.; Osinaga, E.; Knapp, F.F. Re-HEDP: Pharmacokinetic characterization, clinical and dosimetric evaluation in osseous metastatic patients with two levels of radiopharmaceutical dose. *BMC Med Phys*, **2001**, *1*, 799.
- [6] Finlay, I.G.; Mason, M.D.; Shelley, M. Radioisotopes for the palliation of metastatic bone cancer: A systematic review. *The Lancet Oncology*, **2005**, *6*, 392–400.
- [7] Pfannkuchen, N.; Meckel, M.; Bergmann, R.; Bachmann, M.; Bal, C.; Sathekge, M.; Mohnike, W.; Baum, R.P.; Rösch, F. Novel Radiolabelled Bisphosphonates for PET Diagnosis and Endoradiotherapy of Bone Metastases. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2017**, *10*.

- [8] Holub, J.; Meckel, M.; Kubíček, V.; Rösch, F.; Hermann, P. Gallium(III) complexes of NOTA-bis (phosphonate) conjugates as PET radiotracers for bone imaging. *Contrast Media Mol Imaging*, **2015**, *10*, 122–134.
- [9] Passah, A.; Tripathi, M.; Ballal, S.; Yadav, M.P.; Kumar, R.; Roesch, F.; Meckel, M.; Sarathi Chakraborty, P.; Bal, C. Evaluation of bone-seeking novel radiotracer ^{68}Ga -NO2AP-Bisphosphonate for the detection of skeletal metastases in carcinoma breast. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2017**, *44*, 41–49.
- [10] Afshar-Oromieh, A.; Avtzi, E.; Giesel, F.L.; Holland-Letz, T.; Linhart, H.G.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Boxler, S.; Hadaschik, B.A.; Kratochwil, C.; Weichert, W.; Kopka, K.; Debus, J.; Haberkorn, U. The diagnostic value of PET/CT imaging with the ^{68}Ga -labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2015**, *42*, 197–209.
- [11] Eder, M.; Neels, O.; Müller, M.; Bauder-Wüst, U.; Remde, Y.; Schäfer, M.; Hennrich, U.; Eisenhut, M.; Afshar-Oromieh, A.; Haberkorn, U.; Kopka, K. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2014**, *7*, 779–796.
- [12] Kinoshita, Y.; Kuratsukuri, K.; Landas, S.; Imaida, K.; Rovito, P.M.; Wang, C.Y.; Haas, G.P. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J Surg*, **2006**, *30*, 628–636.
- [13] Rösch, F.; Baum, R.P. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: On the way to THERANOSTICS. *Dalton Trans*, **2011**, *40*, 6104–6111.
- [14] Kratochwil, C.; Giesel, F.L.; Stefanova, M.; Benešová, M.; Bronzel, M.; Afshar-Oromieh, A.; Mier, W.; Eder, M.; Kopka, K.; Haberkorn, U. PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with ^{177}Lu -Labelled PSMA-617. *J Nucl Med*, **2016**, *57*, 1170–1176.
- [15] Zhernosekov, K.P.; Filosofov, D.V.; Baum, R.P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A.A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Rösch, F. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. *J Nucl Med*, **2007**, *48*, 1741–1748.

3.5. Synthesis, radiolabelling and first *in vivo* evaluation of a DOTA-bisphosphonate-conjugated PSMA inhibitor

Synthesis, radiolabelling and first *in vivo* evaluation of a DOTA-bisphosphonate-conjugated PSMA inhibitor

N. Pfannkuchen¹, R. Bergmann², P. Spang¹, N. Engelbogen¹, M. Bachmann², F. Rösch¹

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

² Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf, Dresden, Germany

Abstract

Purpose Conjugates of bisphosphonates (BPs) with macrocyclic chelators recently showed promising results for the diagnosis and radiotherapy of painful bone metastases which often occur as a consequence of prostate carcinomas. In parallel, urea-based peptidomimetic inhibitors of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) are widely investigated for diagnosis and therapy of metastatic prostate cancer. The combination of both structures could provide a useful theranostic compound simultaneously binding to bone metastases by two mechanisms.

Methods A DOTA-based BP bearing the peptidomimetic glutamate-urea-lysine binding motif was obtained in a 20 step synthesis. The DOTA-based BP was synthesized in 11 steps starting from cyclen. The peptidomimetic binding motif including a naphthyl linker was synthesized by solid-phase peptide chemistry followed by coupling of the DOTA-based BP, cleavage from the resin and deprotection. After purification by RP-HPLC the compound was labelled with n.c.a. ^{68}Ga . Radiochemical yields were determined by radio-TLC and radio-HPLC. Stability of [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA was examined in PBS (pH 7.4) and human serum over 2 h. *Ex vivo* biodistribution studies and small animal PET imaging were conducted in healthy Wistar rats and NMRI nu/nu mice with subcutaneous LNCaP tumour.

Results Radiolabelling of the new chimeric BP-conjugated PSMA inhibitor with ^{68}Ga in sodium acetate buffer (0.2 M pH 4.5) provided radiochemical yields $\geq 95\%$ within 15 min at 95 °C. [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA showed a stability of 93-99 % in PBS as injectable solution and human serum over 2 h post synthesis. The new compound [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA revealed a distinct tumour uptake in *ex vivo* biodistribution studies and small animal PET imaging ($\text{SUV}_{\text{tumour}}$ was 0.37 ± 0.12 and 0.40 ± 0.05 at 1 h p.i., respectively), demonstrating that its PSMA motif is still capable of binding to the PSMA target expressed on the prostate cancer derived bone metastases. Furthermore, it showed clearly visible uptake in high metabolic bone regions ($\text{SUV}_{\text{femur}}$ was 0.33 ± 0.08 and 0.30 ± 0.05 at 1 h p.i. in biodistribution studies in healthy rats and tumour bearing mice, respectively, and $\text{SUV}_{\text{epiphysis}}$ was 13.47 in PET imaging in a healthy rat), demonstrating that the bisphosphonate moiety is still binding to the inorganic hydroxyapatite target of the prostate cancer derived bone metastases. Uptake in other organs and tissues was expectably low. [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA is excreted predominantly via the kidneys and the bladder. Initially high uptake in the kidneys and the bladder due to the renal excretion decreased very fast.

Conclusion Successful synthesis of a BP-conjugated PSMA inhibitor and radiolabelling with ^{68}Ga are the first steps towards a new theranostic concept for diagnosis and therapy of bone metastases as a consequence of prostate cancer. [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA accumulates both in the tumour as well as in high metabolic bone regions.

Key words: bone metastases, bisphosphonate, PSMA, dual targeting, ^{68}Ga

Introduction

The dynamic balance between bone resorption and bone formation mediated by osteoclasts and osteoblasts, respectively, is the basis for bone remodeling. Imbalanced skeletal remodeling is found in various metabolic bone diseases such as osteoporosis, Paget's disease and bone metastases [1]. Bone metastases may occur in almost all cancers, but carcinomas of the breast, prostate and lung most likely spread directly into the skeleton. About 70 % of patients suffering from prostate or breast cancer will develop bone metastases [2]. Subsequently, those bone metastases have an extremely negative impact on the quality of life of those patients as they cause severe complications such as bone pain, pathological fractures, hypercalcaemia or spinal cord compression [3].

Bisphosphonates targeting hydroxyapatite

For decades, bisphosphonates (BPs) are used as an effective drug class for the treatment of pathological conditions characterized by an increased bone resorption [4, 5]. They are analogs of naturally occurring pyrophosphate (Figure 1) and are stable against chemical as well as enzymatic hydrolysis thanks to the replacement of the central oxygen atom by a carbon atom. They show a high affinity to hydroxyapatite, which is the main component of the inorganic matrix of the bone [6]. Their high bone affinity results from complexation of the Ca^{2+} ions of hydroxyapatite by the phosphonate groups [7].

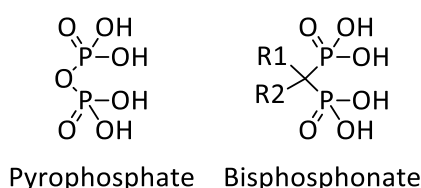


Figure 1: Structure of pyrophosphate and general structure of bisphosphonates.

This affinity is also used for the development of bone-seeking radiopharmaceuticals. Acyclic BPs like MDP (methylene diphosphonate) or HEDP (1-hydroxyethylidene diphosphonate) (Figure 2) are able to chelate quite efficiently radionuclides like $^{99\text{m}}\text{Tc}$ or ^{188}Re , which can be applied for SPECT diagnosis or systemic radiotherapy of bone metastases, respectively, while maintaining their bone targeting properties [8, 9]. Since the late 1990s, the acyclic phosphonate-based chelator EDTMP (ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid)) is used worldwide for the treatment of painful metastatic bone disease in combination with the β^- -emitter ^{153}Sm [10]. Due to the enhanced thermodynamic stability and kinetic inertness of metal-ligand complexes with macrocyclic chelators, a macrocyclic

analog of EDTMP called DOTMP (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetramethylene phosphonic acid) has been developed [11]. Clinical evaluation of [^{177}Lu]Lu-DOTMP has recently been initiated [12].

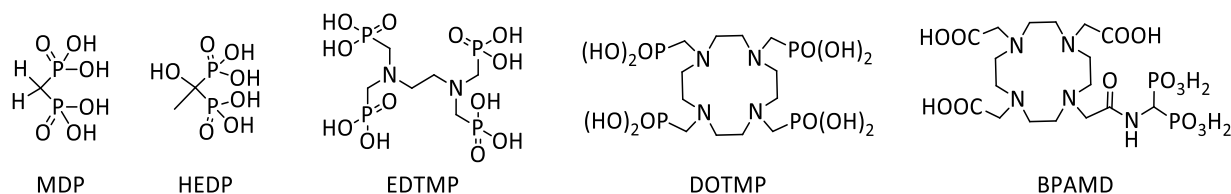


Figure 2: Structures of MDP, HEDP, EDTMP, DOTMP and BPAMD.

Despite the good results of these compounds in terms of diagnosis of bone lesions and pain reduction, they have one common drawback: the phosphonates are responsible simultaneously for complexation of the radionuclide as well as binding to the target structure which may reduce uptake in bone metastases [13]. To overcome this problem, a separation of the chelating unit from the targeting vector was accomplished, leading to the principle of bifunctional chelators conjugated to a BP. Various examples adopting this principle are known from literature [14, 15]. The most often applied example is BPAMD, which can be used for theranostic applications with ^{68}Ga and ^{177}Lu [16–18]. Figure 3 schematically compares the two different approaches.

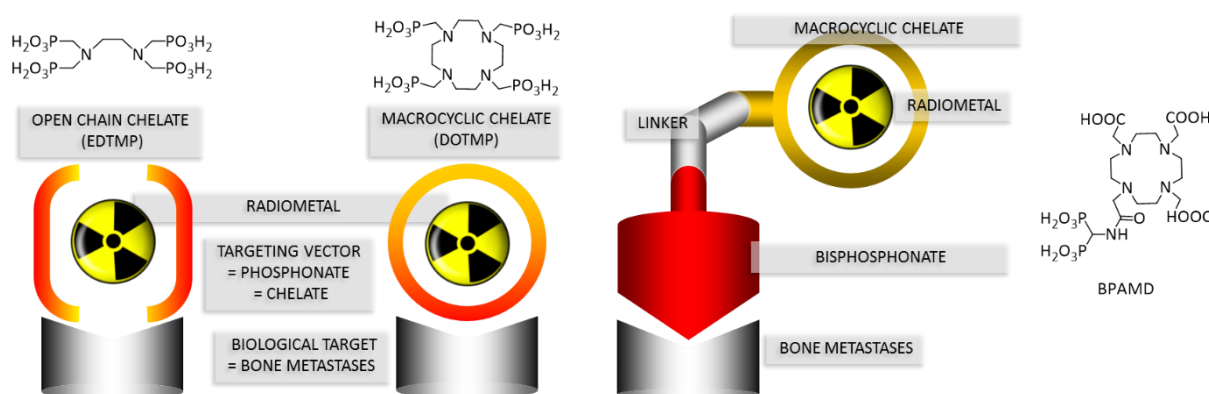


Figure 3: Schematic illustration of the difference between phosphonate-based chelators like EDTMP or DOTMP and chelator-conjugated BPs like BPAMD.

Urea-based peptidomimetic ligands targeting PSMA

As mentioned, prostate carcinomas are one of the major causes for the development of bone metastases. Prostate cancer is the most common malignant tumour in men worldwide [19]. Imaging of tumour relapses after initial therapy and metastases is often challenging due to insufficient sensitivity and specificity of conventional imaging modalities like CT (computed tomography) and MRI (magnetic resonance imaging) [20]. Searching for improved techniques to image prostate cancer (PCa), many groups have focused on the prostate-specific membrane antigen (PSMA) as biological target. It is a transmembrane protein which is significantly overexpressed in prostate cancer cells while being hardly expressed in normal tissues [21]. Furthermore, owing to the low expression of the protein in healthy tissue, it also has the potential for endoradiotherapy with low risk for untargeted tissues. Over the last two decades, many PSMA ligands were developed [22–25]. One of these ligands, PSMA-11, has become the most common radiotracer in clinical use [26, 27]. Modifications of PSMA-11 have led to the development of the novel PSMA ligand PSMA-617 (Figure 4), which provides a high binding affinity to PSMA and a highly efficient internalization into PCa cells while allowing for complexation of therapeutic nuclides like ^{177}Lu [28].

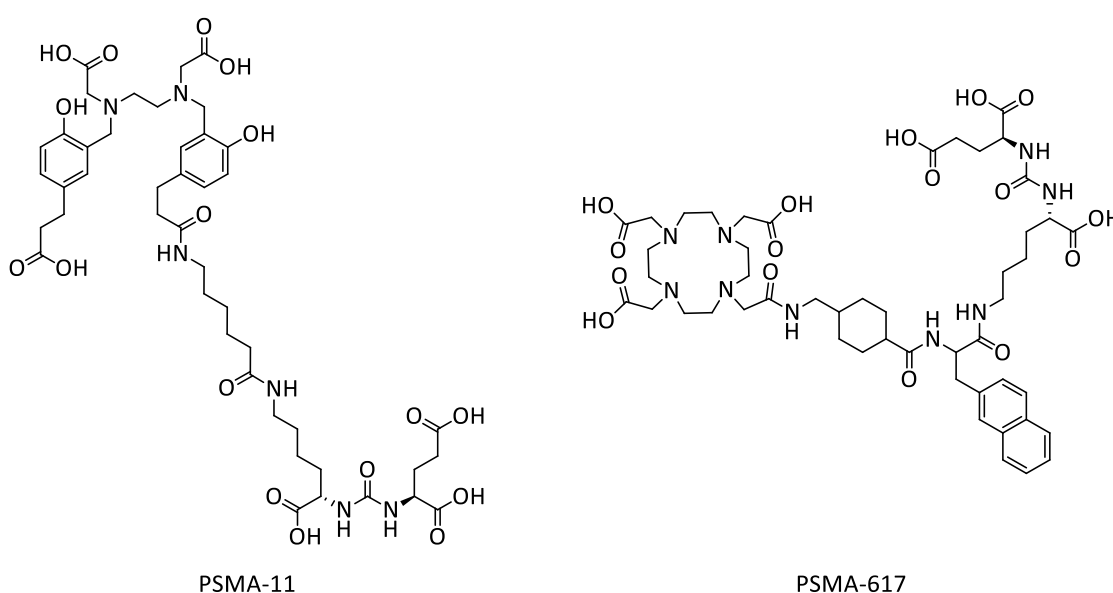


Figure 4: Structures of PSMA-11 and PSMA-617.

Combination of both targeting vectors, a BP for binding to metabolic active bone and a PSMA ligand to bind to PCa cells, could provide a useful theranostic compound for bisphosphonates simultaneously binding to bone metastases by two mechanisms. Here we report on the synthesis, radiolabelling and first *in vivo* evaluation of BPDPSMA, a DOTAGA-based BP bearing the peptidomimetic glutamate-urea-lysine binding motif and combining the structures of BPAMD and PSMA-617 (Figure 5).

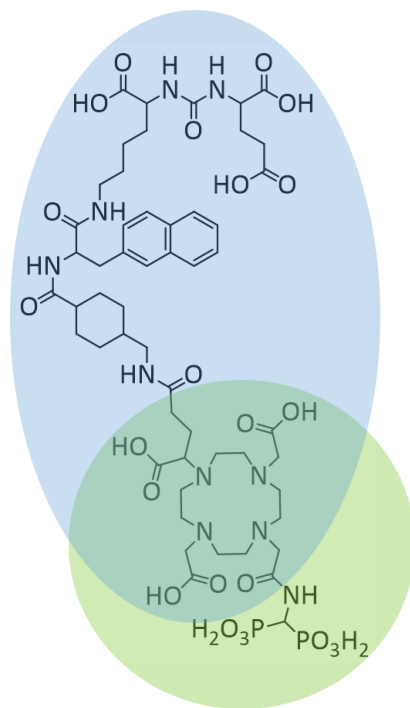


Figure 5: Structure of BPDPSMA based on BPAMD (green) and PSMA-617 (blue).

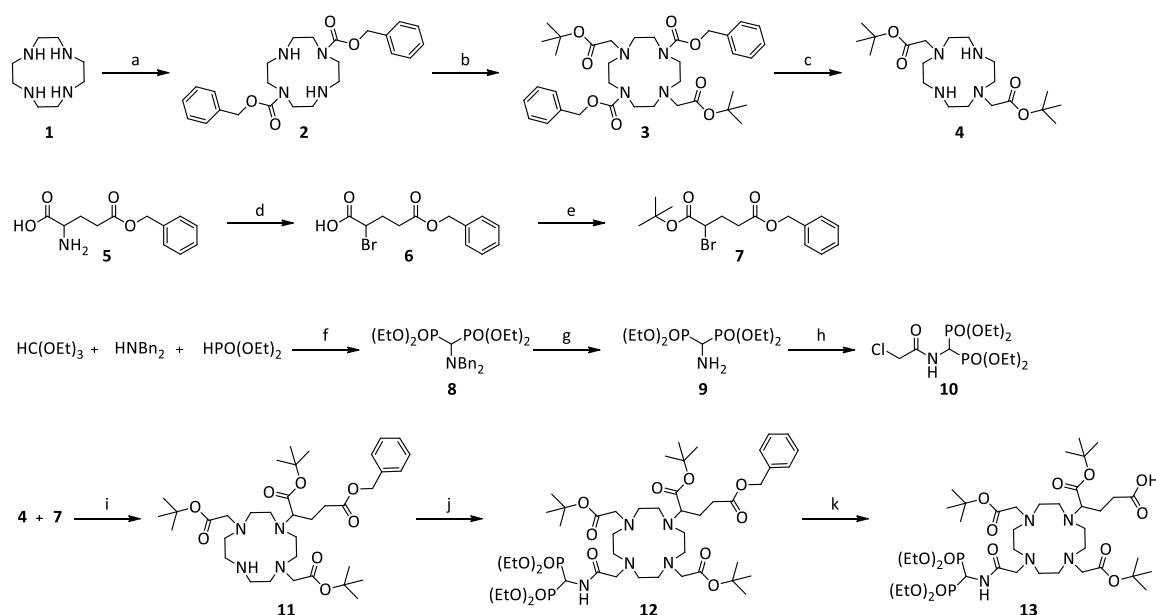
Results and Discussion

Organic synthesis

BPDPSMA **24** was synthesized in a multistep synthesis which is divided into three different parts below.

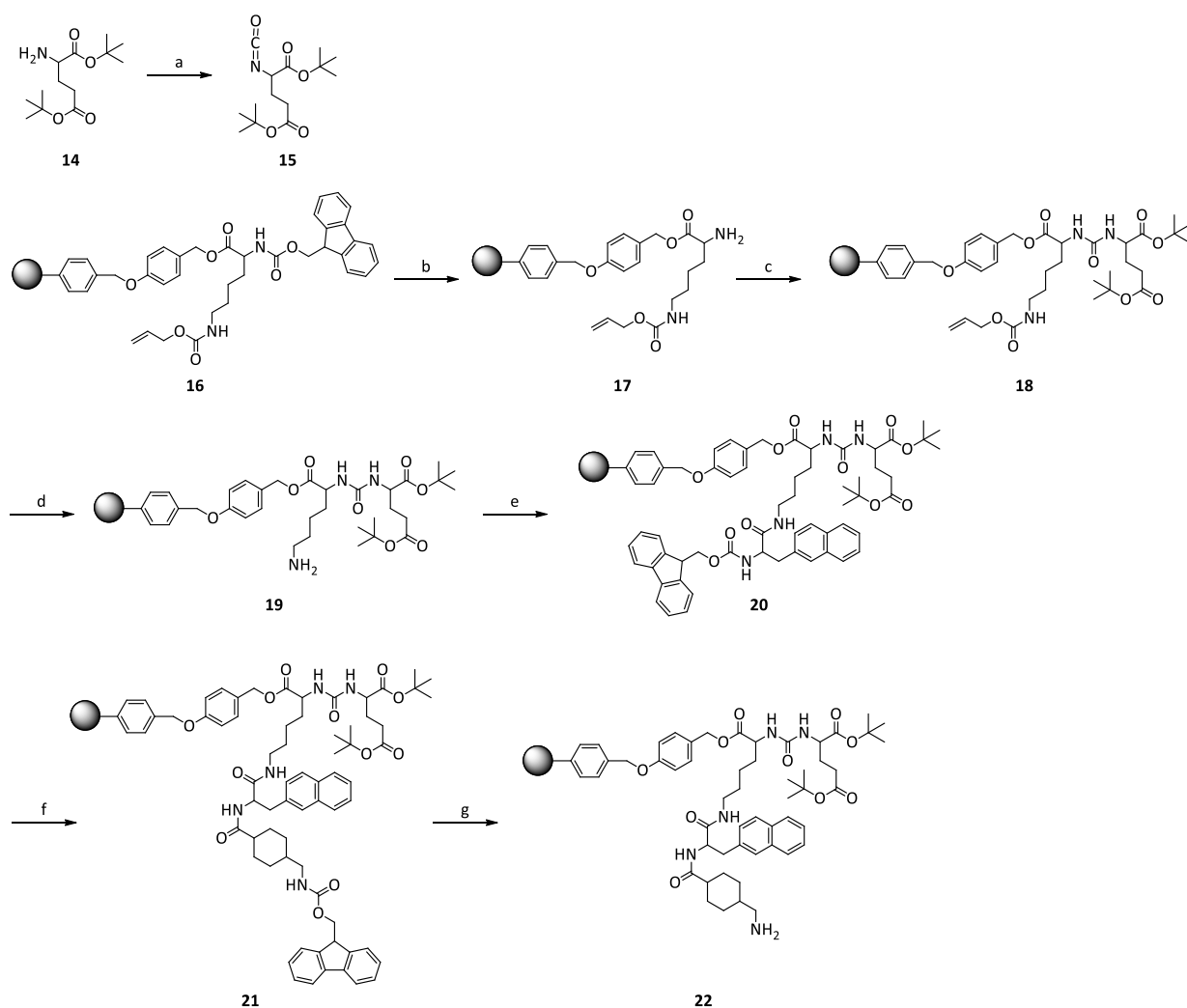
Synthesis of the DOTA-BP **13** started from cyclen **1** (Scheme 1). Protection of two amines by reaction with benzyl chloroformate allowed for selective alkylation of two amines with *tert*-butyl bromoacetate. Following removal of the Cbz-protecting groups by hydrogenation, the DO2A-*tert*-butyl ester **4** was obtained. A glutamate-based side chain for coupling to the chelator was synthesized starting from L-glutamic acid-5-benzylester. Bromination via formation of a diazonium compound and protection of the carboxylic acid with *tert*-butyltrichloroacetimidate yielded compound **7**. Reaction of triethylorthoformate, diethyl phosphite and dibenzylamine followed by removal of the benzyl groups by hydrogenation and alkylation with chloroacetyl chloride provided the BP side chain **10**. After coupling of the glutamate side chain **7** to compound **4**, a DOTAGA-based chelator **11** was obtained. By using DOTAGA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-(glutaric acid)-4,7,10-triacetic acid) instead of DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), the tracer still has 7 donor ligands despite the twofold substitution at the amine functions of the chelator which is of great importance particularly for the use of therapeutic nuclides. The subsequent substitution reaction with the BP side

chain **10** and selective removal of the benzyl-protecting group provided the DOTAGA-based BP **13** ready for coupling to the PSMA ligand which was synthesized as described below.



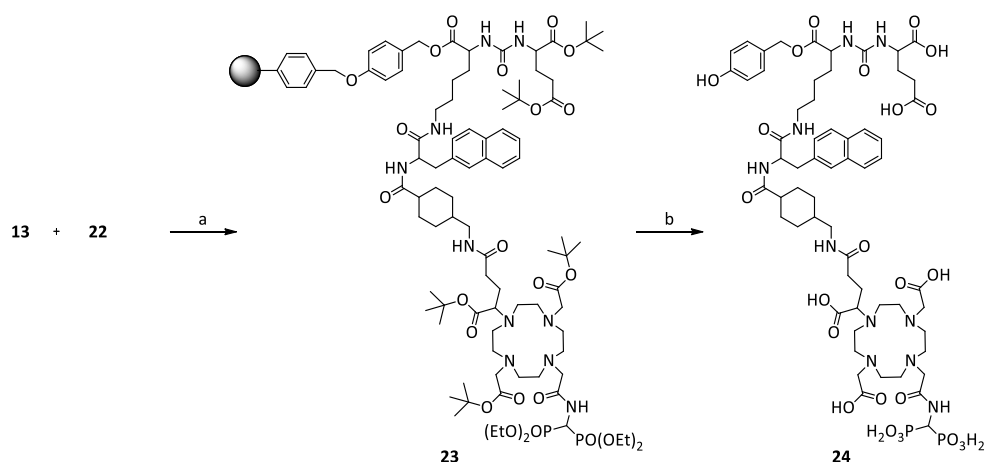
Scheme 1: Synthesis of the DOTAGA-conjugated BP 13 for coupling to the PSMA ligand. Reagents: (a) benzyl chloroformate in CHCl₃; (b) *tert*-butyl bromoacetate and NaHCO₃ in MeCN; (c) H₂, Pd/C in absolute ethanol; (d) NaNO₂ and KBr in 1 M H₂SO₄; (e) *tert*-butyl trichloroacetimidate, dimethylacetamide and boron trifluoride ethyl etherate in cyclohexane/CHCl₃; (f) argon; (g) H₂, Pd/C in absolute ethanol; (h) chloroacetyl chloride and Na₂CO₃ in MeCN; (i) DIPEA in MeCN; (j) compound **10 and K₂CO₃ in MeCN; (k) H₂, Pd/C in absolute ethanol.**

The peptidomimetic glutamate-urea-lysine binding motif and the aromatic linker were synthesized by solid-phase peptide chemistry as described by Benesova *et al.* [29] (Scheme 2). After selective removal of the Fmoc-protecting group from the resin-immobilized lysine **16**, reaction of compound **17** with the in situ generated isocyanate **15** yielded the Alloc- and *tert*-butyl-protected glutamate-urea-lysine binding motif **18**. The Alloc-protecting group was removed using tetrakis(triphenyl)palladium and morpholine, allowing for the synthesis of the aromatic linker. It was synthesized by coupling of Fmoc-3-(2-naphthyl)-L-alanine and Fmoc-4-Amc-OH (*trans*-4-(Fmoc-aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid) in the presence of HBTU, each with subsequent elimination of the Fmoc-protecting group using piperidine in DMF leading to compound **22**.



Scheme 2: Synthesis of the glutamate-urea-lysine binding motif and coupling of the linker. Reagents: (a) triphosgene and DIPEA in DCM; (b) 50 % piperidine in DMF; (c) compound 15 in DCM; (d) tetrakis(triphenyl)palladium and morpholine in DCM; (e) Fmoc-3-(2-naphthyl)-L-alanine, HBTU and DIPEA in DMF; (f) 50 % piperidine in DMF, Fmoc-4-Amc-OH, HBTU and DIPEA in DMF; (g) 50 % piperidine in DMF.

In the last part of the synthesis, the immobilized PSMA ligand **22** obtained in this way was coupled to the chelator-conjugated BP **13** in the presence of HATU and HOBt (Scheme 3). Finally, cleavage from the resin and removal of all protecting groups was achieved using 30 % HBr in acetic acid providing the final tracer BDPDPSMA **24** which was subsequently purified via RP-HPLC.



Scheme 3: Coupling of the PSMA ligand to the DOTA-conjugated BP. Reagents: (a) HATU, HOBt and DIPEA in DMF; (b) 30 % HBr in acetic acid.

Radiolabelling of BPDPSMA with n.c.a. ^{68}Ga

Radiolabelling of BPDPSMA with n.c.a. ^{68}Ga using *Method A* provided radiochemical yields of $\geq 95\%$ within 15 min at $98\text{ }^\circ\text{C}$ with precursor amounts of 10-15 nmol or $>90\%$ for lower amounts of precursor (5 nmol) (Figure 6). *Method B* also led to radiochemical yields of $\geq 95\%$ within 15 min. The radiotracer was used in all subsequent biological experiments without further purification.

Besides good labelling properties of the ligand, the metal complex should possess high stability. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$ was evaluated regarding its *in vitro* stability in human serum as well as phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) as injection solvent. The ^{68}Ga -complex showed a high stability of $>99\%$ in PBS and a stability of $\geq 93\%$ in human serum at $37\text{ }^\circ\text{C}$ over about two half-lives of the radionuclide (120 min) (Figure 6).

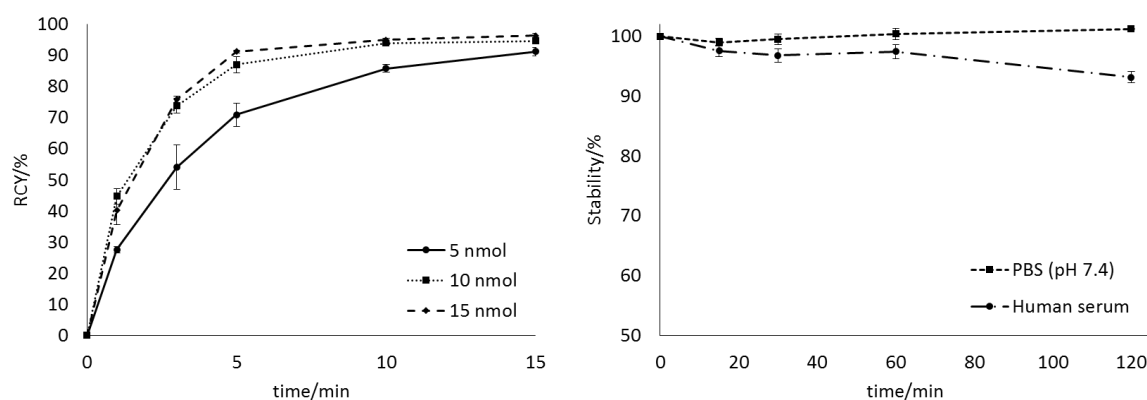


Figure 6: Radiolabelling kinetics of BPDPSMA with ^{68}Ga in NaOAc (0.2 M pH 4.5) using 5, 10 and 15 nmol precursor at $98\text{ }^\circ\text{C}$ ($n = 3$); *in vitro* stability of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$ in PBS and human serum at $37\text{ }^\circ\text{C}$ over 2 h ($n = 3$).

Ex vivo biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA

The *ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA was studied in healthy Wistar rats with a focus on bone uptake and LNCaP-Luc+ tumour bearing mice with a focus on binding to PSMA. The results of both biodistribution studies are shown in Figure 7 and Figure 8, respectively. In healthy Wistar rats, [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA exhibited low uptake in soft tissue organs and a fast clearance from the blood and the kidneys as it is known from bisphosphonate based structures. But in contrast to other evaluated chelator-conjugated bisphosphonates like BPAMD, uptake in healthy bone is rather low ($SUV_{\text{femur}} = 0.33 \pm 0.08$ and $SUV_{\text{femur}} = 3.02 \pm 0.40$ at 60 min p.i. for [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA and [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD, respectively). Furthermore, bone accumulation decreased between 5 min and 60 min after injection which is also uncommon. Femur-to-blood ratio was 0.88 ± 0.13 and femur-to-muscle ratio was 2.36 ± 0.93 at 1 h post injection. These ratios are also lower than ratios calculated for other bisphosphonate compounds accordingly (femur-to-blood ratio = 3.4 and femur-to-muscle ratio = 21.6 for BPAMD) [30]. Table 1 shows a comparison of the *ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA, [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD and [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} in healthy Wistar rats at 60 min post injection. SUVs are virtually comparable. Merely, the lower femur uptake of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA is apparent, which is not explainable especially regarding the following results from the PET imaging.

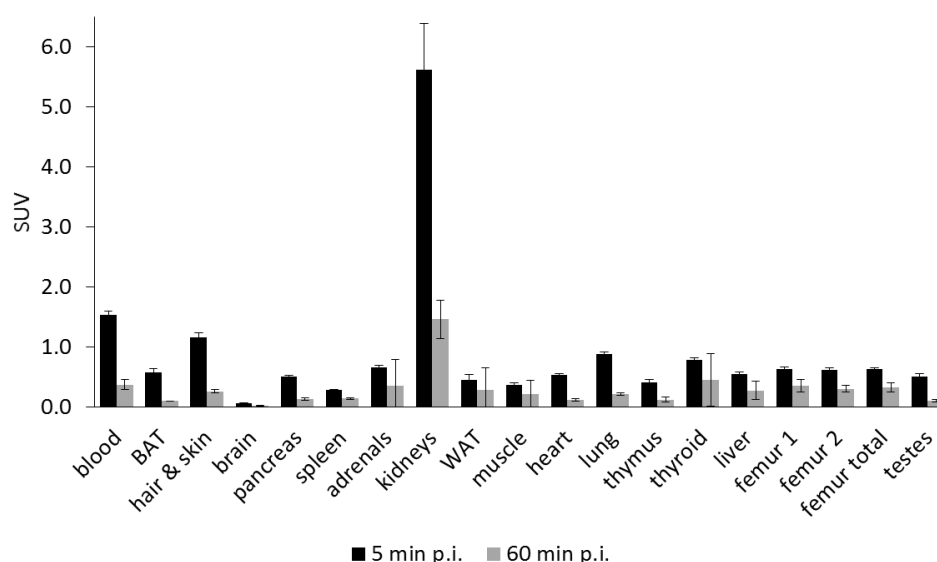


Figure 7: *Ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA in healthy Wistar rats (n = 4, mean ± SEM) at different points of time p.i.

Table 1: Comparison of the *ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA, [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD and [⁶⁸Ga]Ga-^{ZOL} in healthy Wistar rats at 60 min p.i.

organ	[⁶⁸ Ga]Ga-BPDPSMA	[⁶⁸ Ga]Ga-BPAMD ^a	[⁶⁸ Ga]Ga- ^{ZOL}
blood	0.38 (0.09)	0.88 (0.14)	0.44 (0.04)
BAT	0.10 (0.01)	0.20 (0.02)	0.16 (0.02)
hair + skin	0.26 (0.03)	0.22 (0.03)	0.19 (0.05)
brain	0.02 (0.00)	0.04 (0.01)	0.03 (0.01)
pancreas	0.13 (0.02)	0.49 (0.73)	0.15 (0.04)
spleen	0.14 (0.02)	0.42 (0.39)	0.14 (0.02)
adrenals	0.36 (0.43)	0.37 (0.13)	0.19 (0.03)
kidneys	1.46 (0.32)	0.65 (0.06)	0.51 (0.08)
WAT	0.28 (0.37)	0.23 (0.13)	0.11 (0.03)
muscle	0.22 (0.23)	0.14 (0.02)	0.08 (0.10)
heart	0.12 (0.02)	0.33 (0.04)	0.16 (0.02)
lung	0.22 (0.02)	0.41 (0.08)	0.25 (0.04)
thymus	0.12 (0.04)	0.25 (0.04)	0.14 (0.02)
hard. gland	0.15 (0.01)	0.44 (0.12)	0.28 (0.05)
liver	0.27 (0.15)	0.36 (0.07)	0.18 (0.01)
femur total	0.35 (0.08)	3.02 (0.40)	3.67 (0.37)

Data are expressed in SUV. Each value represents the mean (S.D.) of four animals.

^a Data taken from [30]

In LNCaP tumour bearing mice, the biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA at 60 min p.i. is comparable to biodistribution in healthy rats regarding activity accumulation in all nontarget tissues (e.g. $SUV_{\text{kidneys}} = 1.46 \pm 0.32$ and $SUV_{\text{kidneys}} = 0.88 \pm 0.03$ in healthy rats and tumour bearing mice, respectively) and femur uptake ($SUV_{\text{femur}} = 0.33 \pm 0.08$ and $SUV_{\text{femur}} = 0.30 \pm 0.05$ in healthy rats and tumour bearing mice, respectively). Femur-to-blood ratio was 1.32 ± 0.42 and femur-to-muscle ratio was 4.47 ± 1.56 . SUV_{mean} for the tumour was 0.37 ± 0.12 . Tumour-to-blood ratio was 1.49 ± 0.29 and tumour-to-muscle ratio was 6.35 ± 4.72 at 1 h post injection. As expected, [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA predominantly showed a renal excretion ($\%ID_{\text{renal}} = 50.25 \pm 10.22$ vs. $\%ID_{\text{hepatobiliary}} = 12.80 \pm 5.94$ and $\%ID_{\text{renal}} = 83.74 \pm 0.82$ vs. $\%ID_{\text{hepatobiliary}} = 2.74 \pm 0.59$ at 60 min p.i. in healthy rats and tumour bearing mice, respectively). In Table 2 these results are compared to *ex vivo* biodistribution data of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA I&T and [¹⁸F]PSMA-1007 in LNCaP tumour bearing mice at 60 min post injection from literature. The experiments were performed in different mouse models and furthermore, the data are expressed in %ID/g. Therefore, all values depend on the respective animal weights which hampers a reliable comparison. [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA obviously has a

lower tumour uptake compared to the known PSMA derivatives. But on the other hand, uptake in organs like spleen, liver, lung and especially the kidneys is also distinctly lower.

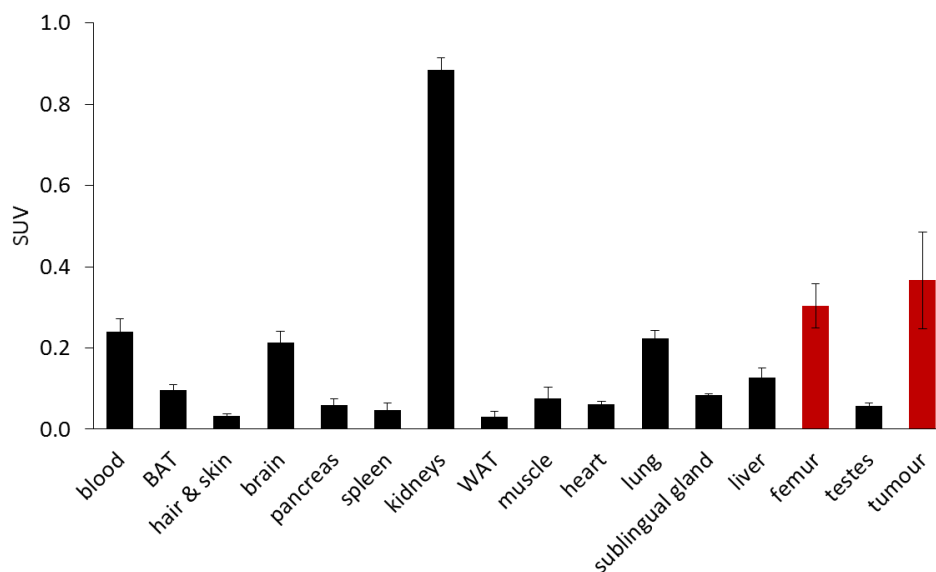


Figure 8: *Ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA in NMRI nu/nu mice with subcutaneous LNCaP tumour (n = 3, mean ± SEM) at 60 min p.i.

Table 2: Comparison of the *ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617, [⁶⁸Ga]Ga-PSMA I&T and [¹⁸F]PSMA-1007 in LNCaP tumour bearing mice at 60 min p.i. [28, 31-33].

organ	[⁶⁸ Ga]Ga-BPDPSMA	[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-11	[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA-617	[⁶⁸ Ga]Ga-PSMA I&T	[¹⁸ F]PSMA-1007
blood	1.03 (0.04)	0.53 (0.04)	-	0.45 (0.23)	0.60 (0.21)
spleen	0.22 (0.08)	17.90 (2.87)	2.13 (0.16)	3.88 (1.46)	6.99 (1.04)
kidneys	3.88 (0.60)	139.44 (21.40)	113.3 (24.4)	53.26 (9.02)	84.03 (13.85)
muscle	0.36 (0.14)	1.00 (0.24)	-	0.35 (0.08)	0.79 (0.28)
heart	0.19 (0.13)	0.83 (0.08)	-	0.26 (0.08)	1.11 (0.20)
lung	0.14 (0.00)	2.36 (0.27)	1.41 (0.41)	1.49 (0.38)	1.25 (0.27)
liver	0.57 (0.12)	1.43 (0.19)	1.17 (0.10)	1.00 (0.39)	1.06 (0.20)
tumor	1.53 (0.30)	4.89 (1.34)	8.47 (4.09)	4.95 (1.57)	8.04 (2.39)
tumor-to-blood	1.5	9.2	7.8	11.0	13.4
tumor-to-muscle	5.8	4.9	17.1	14.1	10.2

Data are expressed in %ID/g (SD).

Small animal PET

Small animal PET imaging of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA was conducted in healthy Wistar rats and LNCaP-Luc+ tumour bearing mice. Figure 9 shows the PET scans at different points of time after injection of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA in a healthy rat. The tracer showed a fast bone accumulation, especially in the high

metabolic joint regions which allows prognoses about the tracers' accumulation in skeletal lesions ($SUV_{\text{epiphysis}} = 7.48$ at 5 min p.i. and $SUV_{\text{epiphysis}} = 13.47$ at 60 min p.i.). Meanwhile, excretion of the unbound tracer via the kidneys occurred very fast ($SUV_{\text{kidney}} = 15.17$ at 5 min p.i. and $SUV_{\text{kidney}} = 4.15$ at 60 min p.i.). No considerable uptake was observed in other organs and tissues. Therefore, 2 h after injection noticeable accumulation of activity is found only in the bones and the bladder. The time-activity curves in Figure 10 confirm the fast uptake in bone reaching a plateau after about 1 h as well as the fast clearance from the kidneys and the blood leading to a high bone-to-background ratio. At 1 h post injection bone-to-blood ratio was 5.80 and bone-to-muscle ratio was 17.09.

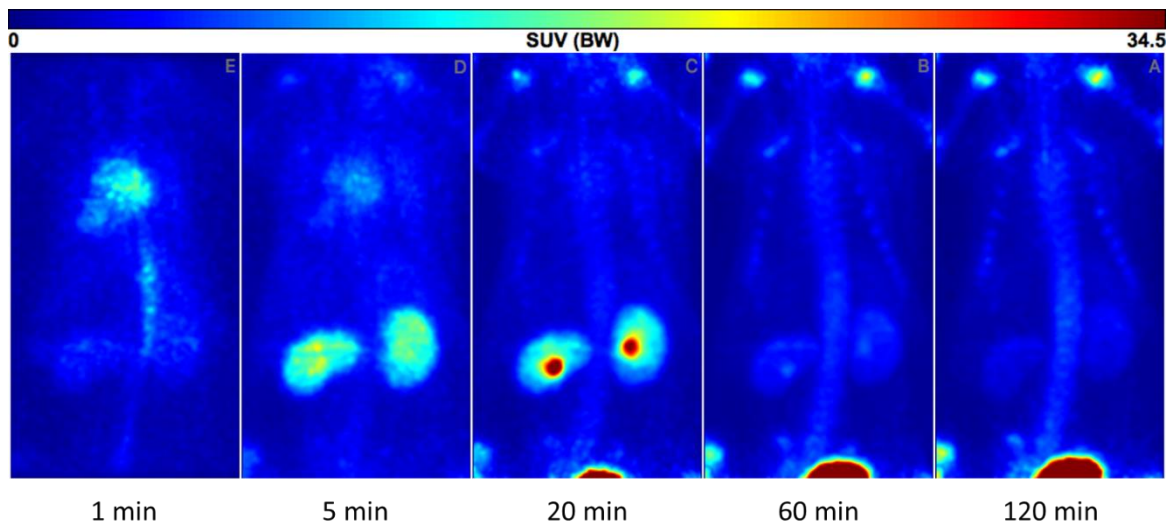


Figure 9: Maximum intensity projections at different points of time after injection derived from small animal PET imaging of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$ in a healthy Wistar rat.

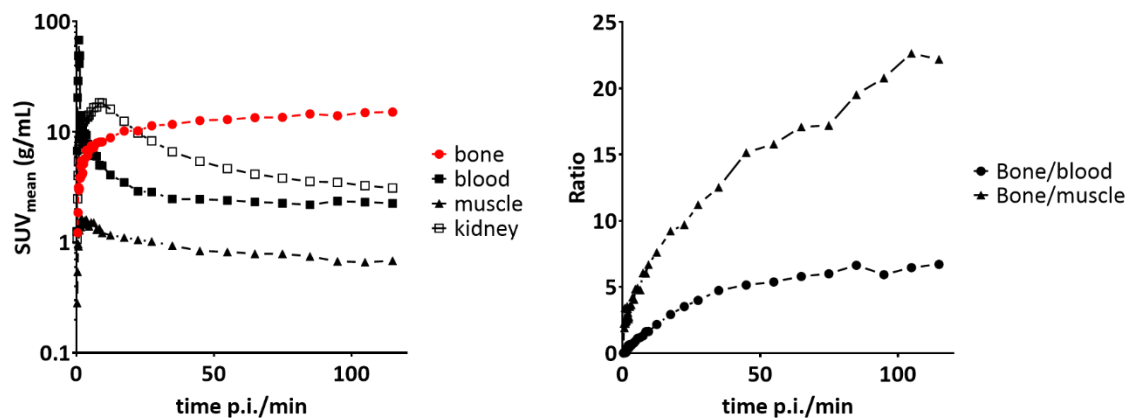


Figure 10: Time-activity curves obtained from PET imaging of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$ in a healthy Wistar rat.

In Figure 11 a whole-body PET image as well as PET/CT at 2 h after injection of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA is depicted. Contrary to the results from the *ex vivo* biodistribution study, [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA showed a clearly visible uptake in the epiphyseal plates as it is known from previous *in vivo* evaluations of chelator-conjugated bisphosphonates. Owing to the fast blood clearance and the fast renal excretion, the radiotracer exhibited a very good target-to-background ratio.

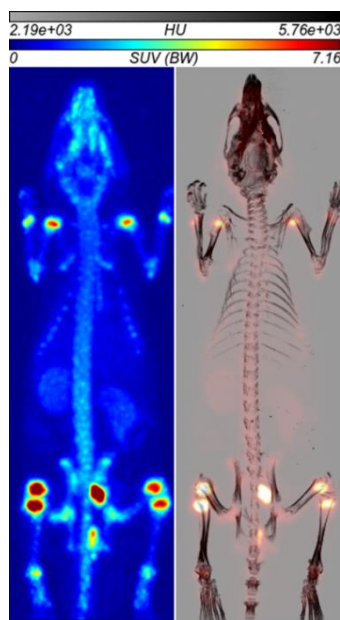


Figure 11: Maximum intensity projection (left) and PET/CT (right) derived from small animal PET/CT imaging of a young healthy Wistar rat at 2 h p.i.

PET scans of two LNCaP tumour bearing mice at 90 min p.i. are presented in Figure 12. They revealed a good visualization of the tumour in the right flank. Additional activity accumulation is found predominantly in the kidneys and the bladder due to the tracer's renal excretion. Furthermore, uptake of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA can be observed also in the high metabolic bone regions of the joints and the spine which is common for bisphosphonate based compounds. The time-activity curves obtained from PET imaging in two NMRI nu/nu mice with subcutaneous LNCaP tumor are illustrated in Figure 13. At 1 h post injection, SUV for the tumour was 0.40 ± 0.05 , SUV for the blood was 0.19 ± 0.02 and SUV for the muscle was 0.10 ± 0.01 . Consequently, the tumour-to-blood ratio was 2.05 and the tumour-to-muscle ratio was 3.81. For example, Benesova *et al.* reported a SUV for the tumour of 0.59 ± 0.32 and a tumour-to-muscle ratio of 8.5 at 1 h post injection for [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-617 [29]. Tumour accumulation nearly remained constant after an initial decrease during the first 20 min of the PET scan. The uptake in the liver was very low and the uptake in the kidneys due to the renal excretion decreased distinctly over the 120 min of the PET scan.

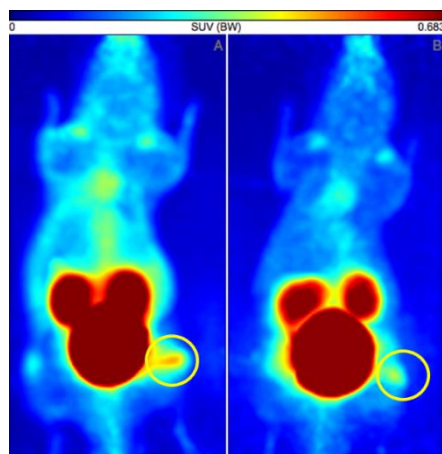


Figure 12: Maximum intensity projection derived from small animal PET imaging of two NMRI nu/nu mice with subcutaneous LNCaP tumour (right flank). Scans were evaluated up to 120 min p.i. of 15-20 MBq of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$.

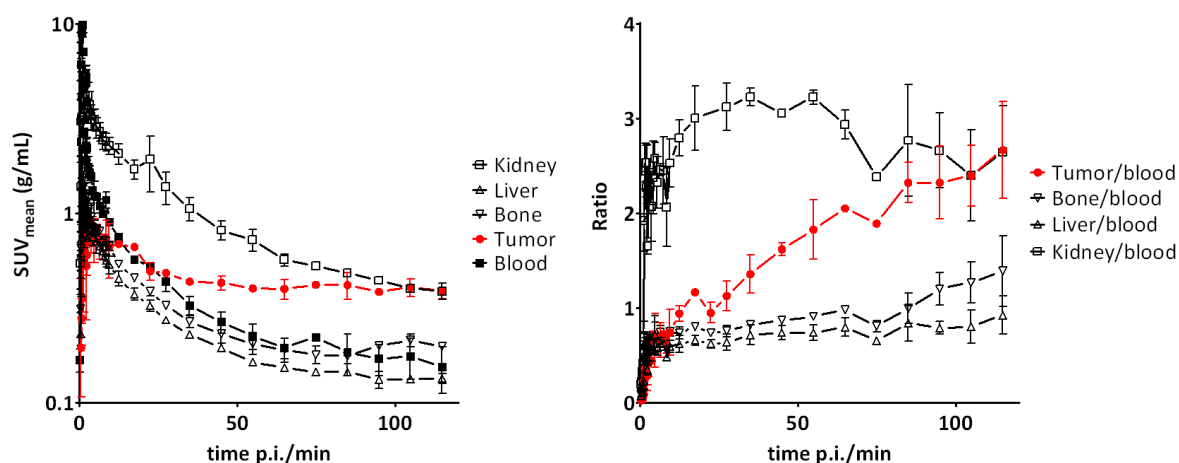


Figure 13: Time-activity curves obtained from PET imaging of $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$ in two NMRI nu/nu mice with subcutaneous LNCaP tumour.

Conclusion

The chimeric BP-PSMA tracer BPDPSMA was successfully synthesized combining the structures of one of the first chelator-conjugated bisphosphonates (BPAMD) and the currently most promising PSMA ligand (PSMA-617) (Figure 5). In contrast to BPAMD and PSMA-617, the new compound was synthesized based on the DOTAGA chelator, a DOTA derivative bearing an additional glutaric acid side chain. In this way, it was possible to maintain 7 donor ligands despite the twofold substitution at the amine functions of the chelator which is of great importance particularly for the use of therapeutic nuclides. BPDPSMA was successfully radiolabelled with the generator derived PET nuclide ^{68}Ga . $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$ showed high *in vitro* stability in human serum and phosphate buffered saline,

which can be used for injection of the tracer. The *ex vivo* biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA as well as small animal PET imaging was conducted in healthy Wistar rats and LNCaP-Luc+ tumour bearing mice. [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA showed a clearly visible tumour uptake and low uptake in other organs and tissues beside the kidneys and the bladder as excretion organs. Femur uptake in the biodistribution studies in young rats was lower compared to other chelator-conjugated bisphosphonates. Nevertheless, uptake of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA in high metabolic bone regions like the epiphyseal plates was clearly visible in PET imaging. Hence, the PSMA motif is still capable of binding to the PSMA target expressed on the prostate cancer derived bone metastases and the bisphosphonate moiety is still binding to the inorganic hydroxyapatite target of the bone metastases. The possibility of a dual targeting has been demonstrated by this proof-of-principle. Further developments regarding the structure of this chimeric BP-PSMA tracer have to be done. As the affinity of bisphosphonates to hydroxyapatite increases from simple bisphosphonates to hydroxybisphosphonates and finally nitrogen-containing hydroxybisphosphonates, improvements regarding this targeting vector are yet to come. Moreover, the spacer between the targeting vectors and the chelator could be varied. These structural changes again need to be examined *in vivo*. Finally, the potential of this dual targeting to achieve the primary objective, namely inducing an increased therapeutic dose delivered to bone metastases, has to be further evaluated.

Experimental Procedures

Materials and instrumentation

All chemicals (purity >95 %; trace metal basis for radiolabelling) and solvents (HPLC-grade purity) were purchased from Carbosynth (Compton, UK), CheMatech (Dijon, France), Iris Biotech (Marktredwitz, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and VWR International (Darmstadt, Germany) and used as received without further purification.

Purification of the final product was performed on a Dionex HPLC system (ICS-Series 5000, AD-50 autosampler, UV/VIS DAD detector, AFC-3000 fraction collector). Radio-HPLC was performed using a HPLC system from Merck (LaChrom, pump Hitachi L-7100, UV detector L-7400, interface D-7000, autosampler L-7250) and a Raytest Gabi Star radioactivity detector.

¹H and ¹³C NMR (nuclear magnetic resonance) spectra were acquired using a Bruker Avance III HD 300 or Avance III HD 400. Chemical shifts are given in parts per million downfield from TMS ($\delta = 0$ ppm) referred to the solvent residual signal.

ESI-MS was performed using a Micromass Quattro Micro API LC-ESI spectrometer.

Activities were determined using an Isomed 2000-Aktivimeter (MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH) and radio-TLC analysis was carried out using a Raytest Rita-Star TLC scanner.

Synthetic procedures

Synthesis of 1,7-bis-(benzyloxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (2)

Cyclen **1** (2.00 g, 11.61 mmol) was dissolved in chloroform (15 mL) and the solution was cooled below 0 °C. Benzyl chloroformate (3.41 mL, 4.16 g, 24.38 mmol) was dissolved in chloroform (10 mL) and added dropwise. Afterwards, the reaction was stirred at room temperature for 12 h. The solvent was evaporated under reduced pressure. After addition of diethylether (20mL), the white solid was filtered and washed with diethylether. Drying in vacuo gave the dihydrochloride salt of **2** (5.55 g, 10.81 mmol, 93 %) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 7.50-7.40 (m, 10H), 5.18 (s, 4H), 3.65 (s, 8H), 3.26 (s, 8H). ¹³C NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 135.59, 128.83, 128.74, 128.38, 68.54, 47.08, 46.01, 43.07.

ESI-MS: m/z calcd for C₂₄H₃₂N₄O₄ + H⁺ 441.25, found 441.25.

Synthesis of 1,7-bis-(benzyloxycarbonyl)-4,10-bis-(carbo-tert-butoxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (3)

The dihydrochloride salt of **2** (2.00 g, 3.895 mmol) was dissolved in dry acetonitrile (MeCN) (40 mL). NaHCO₃ (2.29 g, 27.27 mmol) and *tert*-butyl bromoacetate (1.21 mL, 1.60 g, 8.18 mmol) were added and the reaction stirred at 60 °C for 48 h. The mixture was filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate 2:1) to give **3** (2.08 g, 3.11 mmol, 80 %) as a colourless viscous liquid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.40-7.27 (m, 10H), 5.12 (s, 4H), 3.48-3.14 (m, 12H), 2.87 (s, 8H), 1.42 (s, 18H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.15, 170.58, 156.46, 136.86, 128.48, 127.94, 127.89, 80.96, 77.23, 66.99, 60.40, 56.00, 54.39, 47.05, 46.86, 28.18, 21.06, 14.20.

ESI-MS: m/z calcd for C₃₆H₅₂N₄O₈ + H⁺ 669.39, found 669.39.

Synthesis of 1,7-bis(carbo-tert-butoxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (4)

3 (2.08 g, 3.11 mmol) was dissolved in abs. ethanol (30 mL). After addition of 10 % Pd/C, the mixture was stirred under hydrogen atmosphere for 12 h. Filtration through a Celite pad and evaporation of the filtrate under reduced pressure gave **4** (1.11 g, 2.76 mmol, 89 %) as yellowish solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 3.29 (s, 4H), 2.78 (s, 8H), 2.59 (t, $J = 5.1$ Hz, 8H), 1.44 (s, 18H).
 ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.93, 80.96, 77.24, 57.21, 55.09, 51.99, 45.66, 28.20, 28.21.

ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}^+$ 401.31, found 401.31.

Synthesis of α -bromoglutaric acid-5-benzylester (6)

To a solution of L-glutamic acid-5-benzylester **5** (2.00 g, 8.43 mmol) and KBr (6.02 g, 50.58 mmol) in 1 M H_2SO_4 (60 mL) was added portionwise NaNO_2 (1.57 g, 22.76 mmol) at 0 °C. The solution was stirred for 1 h and extracted with diethyl ether. The extract was dried (Na_2SO_4) and evaporated. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate 4:1 + 3 % formic acid) to give **6** (976 mg, 3.24 mmol, 38 %) as a yellowish viscous liquid.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.49-7.31 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 4.44 (dd, $J = 8.4, 5.8$ Hz, 1H), 2.70-2.56 (m, 2H), 2.54-2.22 (m, 2H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 174.33, 171.91, 135.53, 128.64, 128.43, 128.31, 77.23, 66.74, 44.04, 31.42, 29.44.

ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{BrO}_4 + \text{K}^+$ 338.96, found 338.96.

Synthesis of α -bromoglutaric acid-1-tert-butylester-5-benzylester (7)

A solution of *tert*-butyltrichloroacetimidate (2.20 mL, 2.69 g, 12.31 mmol) in cyclohexane (8 mL) was added dropwise to a solution of **6** (1.85 g, 6.16 mmol) in chloroform (8 mL). Addition of dimethylacetamide (DMA) (1.40 mL) was followed by addition of boron trifluoride ethyl etherate (120 μL). The reaction was stirred for 3 d at room temperature. The mixture was concentrated under reduced pressure and the DMA phase extracted with hexane. Evaporation under reduced pressure followed by purification via column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate 15:1) gave **7** (1.31 g, 3.67 mmol, 60 %) as colourless viscous liquid.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.45-7.30 (m, 5H), 5.16 (s, 2H), 4.27 (dd, $J = 8.4, 5.9$ Hz, 1H), 2.65-2.52 (m, 2H), 2.49-2.20 (m, 2H), 1.50 (s, 9H). ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 172.00, 168.31, 135.68, 128.61, 128.35, 128.25, 82.66, 77.23, 66.56, 46.65, 31.63, 29.70, 27.74.

ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{BrO}_4 + \text{Na}^+$ 379.05, found 379.05.

Synthesis of tetraethyl (N,N-dibenzyl)aminomethyl-bis(phosphonate) (8)

Triethylorthoformate (5.04 mL, 4.51 g, 30.41 mmol), diethyl phosphite (10.12 mL, 10.85 g, 78.57 mmol) and dibenzylamine (4.87 mL, 5.00 g, 25.35 mmol) were mixed and refluxed under argon atmosphere

at 150 °C for 5 h. After 5 h, the cooler was removed and the solution was heated for 18 h at 160 °C under argon flux. After cooling to room temperature, CHCl₃ (100 mL) was added and the solution was washed with 1 M NaOH (3 x 30 mL) and brine (2 x 30 mL). The organic fraction was dried (Na₂SO₄) and the solvent was removed by rotary evaporation. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/(ethyl acetate/ethanol 3:1) 4:1) to give **8** (4.51 g, 9.33 mmol, 37 %) as a colourless viscous liquid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.57-7.18 (m, 10H), 4.34-3.92 (m, 12H), 3.58 (t, *J* = 25.0 Hz, 1H), 1.34 (td, *J* = 7.1, 2.2 Hz, 12H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 129.53, 128.16, 127.23, 77.23, 62.44, 62.39, 56.40, 56.15, 54.74, 53.34, 16.47. ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20.20.

ESI-MS: *m/z* calcd for C₂₃H₃₅NO₆P₂ + Na⁺ 506.18, found 506.18.

Synthesis of tetraethyl aminomethyl-bis(phosphonate) (9)

To a solution of **8** (4.42 g, 9.14 mmol) in abs. ethanol (150 mL) was added 10 % Pd/C. The mixture was refluxed under hydrogen atmosphere at 80 °C for 18 h. After filtration and evaporation of the solvent, **9** (2.75 g, 9.06 mmol, 99 %) was obtained as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.34-4.15 (m, 8H), 3.44 (t, *J* = 20.6, 1H), 1.37 (t, *J* = 7.0, 12H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 77.24, 63.25, 63.21, 63.17, 63.13, 49.13, 47.70, 46.26, 16.44, 16.42. ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 20.26.

ESI-MS: *m/z* calcd for C₉H₂₃NO₆P₂ + Na⁺ 326.09, found 326.09.

Synthesis of tetraethyl (2-chloroacetamido)methylenediphosphonate (10)

A solution of **9** (2.74 g, 9.04 mmol) in dry MeCN (40 mL) was slowly dropped into a suspension of Na₂CO₃ (5.75 g, 54.22 mmol) in a solution of chloroacetyl chloride (2.30 mL, 3.27 g, 28.92 mmol) in dry MeCN (40 mL), which was cooled to -40 °C. The mixture was allowed to warm up to room temperature and stirred overnight. After treatment with charcoal and filtration, the excess of chloroacetyl chloride was removed by repeated evaporation with toluene. Purification via column chromatography (silica gel, hexane/(ethyl acetate/ethanol 3:1) 2:1) gave **10** (2.19 g, 5.78 mmol, 64 %) as a colourless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.94 (td, *J* = 21.5, 10.1, 1H), 4.29-4.14 (m, 8H), 4.11 (s, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.1, 12H). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.37, 165.32, 77.26, 63.87, 63.83, 63.76, 63.73, 63.69, 45.70, 44.24, 42.78, 42.28, 16.38, 16.34, 16.30. ³¹P NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 15.59.

ESI-MS: *m/z* calcd for C₁₁H₂₄ClNO₇P₂ + Na⁺ 402.06, found 402.06.

Synthesis of 5-benzyl 1-tert-butyl 2-(4,10-bis(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)pentanedioate (11)

To a solution of **4** (1.05 g, 2.62 mmol) and DIPEA (445 μ L, 338 mg, 2.62 mmol) in dry MeCN (20 mL) cooled to 0 °C was added dropwise a solution of **7** (842 mg, 2.36 mmol) in dry MeCN (20 mL). The mixture was allowed to warm up room temperature and stirred overnight. After evaporation of the solvent, the crude product was purified by column chromatography (silica gel, dichloromethane + 3 % triethylamine). Extraction with diethylether gave **11** (707 mg, 1.04 mmol, 40 %) as a yellowish oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.42-7.26 (m, 5H), 5.11 (q, J = 12.3 Hz, 2H), 3.44-3.28 (m, 2H), 3.20 (d, J = 17.4 Hz, 2H), 3.02-2.69 (m, 11H), 2.52 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 2.44-2.27 (m, 2H), 2.04-1.83 (m, 2H), 1.44 (d, J = 2.5 Hz, 27H), 1.02 (t, J = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 173.54, 171.64, 170.88, 136.05, 128.53, 128.32, 128.17, 81.32, 81.04, 77.23, 66.20, 59.91, 56.25, 52.98, 51.75, 50.01, 47.32, 46.25, 30.38, 28.34, 28.24, 24.78, 11.59, 8.12.

ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8 + \text{H}^+$ 677.45, found 677.45.

Synthesis of 5-benzyl 1-tert-butyl 2-(4,10-bis(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-7-(2,2-bis((diethoxyphosphoryl)methylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)pentanedioate (12)

To a solution of **11** (144 mg, 0.21 mmol) in dry MeCN (5 mL) was added K_2CO_3 (29 mg, 0.21 mmol) and a solution of **10** (97 mg, 0.26 mmol) in dry MeCN (3 mL). The mixture was stirred overnight at 60 °C. Afterwards, the solvent was evaporated and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, dichloromethane/ethanol 5:1) to give **12** (99 mg, 0.097 mmol, 46 %) as a yellowish viscous oil.

ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{83}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_2 + \text{Na}^+$ 1042.53, found 1042.53.

Synthesis of 4-(4,10-bis(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-7-(2,2-bis((diethoxyphosphoryl)methylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl)-5-tert-butoxy-5-oxopentanoic acid (13)

To a solution of **12** (63 mg, 0.062 mmol) in abs. ethanol (2 mL) was added 10 % Pd/C. The mixture was stirred under hydrogen atmosphere at 30 °C for 3 h. After filtration and evaporation of the solvent, **13** (50 mg, 0.054 mmol, 87 %) was obtained as yellowish solid.

ESI-MS: m/z calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{77}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}_2 + \text{Na}^+$ 952.48, found 952.48.

Synthesis of the PSMA ligand (22)

The peptidomimetic glutamate-urea-lysine binding motif and the linker were synthesized by solid-phase peptide chemistry as described by Benesova *et al.* [29].

The isocyanate **15** was generated in situ by adding a mixture of bis(*tert*-butyl) L-glutamate hydrochloride **14** (887 mg, 3 mmol) and DIPEA (1.5 mL, 1.14 g, 8.82 mmol) in dry DCM (200 mL) to a solution of triphosgene (298 mg, 1 mmol) in dry DCM (10 mL) at 0 °C over 4 h followed by stirring at room temperature for 1 h. Selective removal of the Fmoc-protecting group from resin-immobilized protected lysine (Fmoc-L-Lys(Aloc)-Wang resin, **16**) (0.9 mmol/g; 333 mg, 0.3 mmol) by threefold washing with a mixture of dimethylformamide (DMF) and piperidine (1:1) for 5 min lead to compound **17** which was added to **15** in dry DCM (4 mL). The mixture was stirred at room temperature for 16 h leading to compound **18** which was filtered off and washed with DCM.

The Alloc-protecting group was removed using 0.3 equiv of tetrakis(triphenyl)palladium in the presence of 20 equiv of morpholine in dry DCM. The reaction was performed in the dark using aluminum foil for 2 h at room temperature resulting in compound **19**.

For the following coupling of the 3-(2-naphthyl)-L-alanine moiety, 4 equiv of Fmoc-3-(2-naphthyl)-L-alanine were activated with 4 equiv of HBTU (O-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate) in the presence of 6 equiv DIPEA in dry DMF. After addition to the DMF pre-swollen compound **19**, agitation overnight and washing of the resin with DMF, product **20** was obtained.

Selective removal of the Fmoc-protecting group was conducted by threefold washing with a mixture of DMF and piperidine (1:1) for 5 min, followed by washing of the resin with DMF. For the coupling of the aminomethylcyclohexyl moiety, 4 equiv of Fmoc-4-Amc-OH were activated with 4 equiv of HBTU in the presence of 6 equiv of DIPEA in dry DMF. After addition to the selectively deprotected and DMF pre-swollen resin, agitation overnight and washing of the resin with DMF, product **21** was obtained.

Selective removal of the Fmoc-protecting group as described above provided product **22**.

Coupling of the PSMA ligand (22) to the DOTA-BP (13)

The immobilized PSMA ligand **22** was coupled to the selectively deprotected DOTA-conjugated BP **13** using 3 equiv of the chelator, 4 equiv of HATU (1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate), 4 equiv of HOBt (1-hydroxybenzotriazole) and 12 equiv of DIPEA. Agitation overnight at room temperature and following washing of the resin with DCM resulted in compound **23**.

Synthesis of BPDPSMA (24)

Cleavage from the resin and removal of all protecting groups was performed in 30 % HBr in acetic acid by agitation overnight at 30 °C. After removing the solvent, the crude product was dissolved in MeCN and water (1:1) for subsequent HPLC purification. HPLC purification was performed using a Phenomenex RP-HPLC column (Luna C18, 250 x 10 mm, 10 µ) and a mobile phase consisting of 0.1 % TFA (trifluoroacetic acid) in water (A) and 0.1 % TFA in MeCN (B). A linear gradient of solvent B (20-35 % in 20 min) in solvent A at a flow rate of 5 mL/min was used. Retention time of BPDPSMA was 12.04 min.

ESI-MS: m/z calcd for C₅₃H₈₀N₁₀O₂₃P₂ + H⁺ 1287.4951, found 1287.4951.

Radiolabelling with ⁶⁸Ga

Method A [⁶⁸Ga]Ga³⁺ was obtained from a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radionuclide generator (iThemba LABS, South Africa). Concentration and purification of the initial generator eluate were performed using a cationic post processing [34]. BPDPSMA was labelled in sodium acetate buffer (500 µL, 0.2 M pH 4.5) with 50 MBq of ⁶⁸Ga using different amounts of precursor (5, 10 and 15 nmol) at 95 °C. TLC samples were taken after 1, 3, 5, 10 and 15 min. Radiochemical yields were determined by radio-TLC (Merck Silica F₂₅₄ TLC plates, solvent: citrate buffer 0,1 M pH 4) and/or radio-HPLC using a RP-HPLC column (100 x 4.6 mm) with a Chromolith RP-18 EC stationary phase and a mobile phase consisting of 0.1 % TFA in water (A) and 0.1 % TFA in MeCN (B). A linear gradient of solvent B (5-95 % in 4.5 min) in solvent A at a flow rate of 2.5 mL/min was used. Retention time of [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA was 3.7 min.

After radiolabelling with ⁶⁸Ga, [⁶⁸Ga]Ga-BPDPSMA was incubated in human serum and phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) at 37 °C. TLC samples were taken after 15, 30, 60 and 120 min. Percentage of intact complex was determined by radio-TLC (Merck Silica F₂₅₄ TLC plates, solvent: citrate buffer 0.1 M pH 4).

Method B [⁶⁸Ga]Ga³⁺ was obtained from a ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga radionuclide generator (ITG, Munich, Germany). Concentration and purification of the initial generator eluate were performed using an anionic post processing [35]. BPDPSMA was labelled in ammonium acetate buffer (0.2 M pH 4.5) with 150 MBq of ⁶⁸Ga using 15.5 nmol precursor at 95 °C for 15 min. Radiochemical yields were determined by radio-TLC (Merck Silica F₂₅₄ TLC plates, solvent: citrate buffer 0.1 M pH 4). The TLC stripes were cut up into front and start pieces and measured in a well-counter.

Animals, feeding, husbandry and animal preparation

Animal experiments were carried out according to the guidelines of the German regulations for animal welfare. The protocol was approved by the local ethical committee for animal experiments (reference number 24–9168.21–4/2004–1). Male Wistar rats (Wistar unilever outbred rat, HsdCpb:WU, Envigo, Netherlands) and NMRI-nu Rj:NMRI-Foxn1nu/nu mice (Janvier Labs, France) were housed under standard conditions with free access to food and water. Tumours were prepared by subcutaneously injection of 2×10^6 LNCaP-Luc+ cells in the right leg of the mice [36]. The mice were studied at tumour sizes with diameters between 7 and 9 mm.

Ex vivo biodistribution of [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA

The *ex vivo* biodistribution of [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA was studied in healthy Wistar rats and LNCaP-Luc+ tumour bearing mice. Four male Wistar-Unilever rats per point of time aged between 5 and 6 weeks and weighing 167 ± 7 g (mean \pm SD, $n = 8$) were intravenously injected into a tail vein with 0.5 mL of electrolyte solutions E-154 of the [^{68}Ga]-labelled compound containing approximately 6.4 ± 0.2 MBq. The specific activity was $9.7 \text{ GBq} \times \mu\text{mol}^{-1}$ at the time of injection. Animals were sacrificed at 5 and 60 min post injection. Three LNCaP-Luc+ tumor bearing NMRI-nu mice (body weight 23.3 ± 3.0 g) were studied at 1 h p.i. of 21.31 ± 0.09 MBq of [^{68}Ga]Ga-BPDPSMA. Blood and the major organs were collected, weighed and counted in a Wallac WIZARD automatic gamma counter (PerkinElmer, Germany). The activity of the tissue samples was decay-corrected and calibrated by comparing the counts in tissue with the counts in aliquots of the injected tracer that had been measured in the gamma counter at the same time. The activity amount in selected organs was expressed as percent of injected dose (% ID). The activity concentration in the biodistribution measurements were calculated as SUV ($\text{SUV} = (\text{activity} \times \text{g}^{-1} \text{ tissue}) / (\text{injected activity} \times \text{body weight}^{-1})$) and expressed as mean \pm SD. The SUV and tissue-to-blood or tissue-to-muscle ratios were used for better comparison with the PET data and values from the literature.

Small animal PET

Anesthetized, spontaneously breathing animals were allowed to stabilize for 30 min after preparation. The animals were positioned on a heated bed to maintain the body temperature at 37 °C. The PET studies were carried out with a NanoScanPET/CT (Mediso, Hungary). The activity of the injection solution was measured in a well counter (Isomed 2000, Dresden, Germany) cross-calibrated to the PET scanners. A CT transmission scan was recorded during this time for each subject. The transmission scans were used to correct the emission scan for γ -ray attenuation caused by body tissues and

supporting structures. The dynamic PET acquisition over 120 min was started and the infusion of 15 to 20 MBq of the ^{68}Ga -labelled compound was initiated. The radiotracer was infused over 1 min by a syringe pump (Harvard apparatus 44 syringe pump) into a lateral tail vein. At the end of the experiment, the animals were deeply anesthetized and sacrificed by an intravenous injection of potassium chloride.

References

- [1] Avioli, L.V.; Krane, S.M., Eds. *Metabolic bone disease and clinically related disorders*; Academic Press: San Diego, **1998**.
- [2] Selvaggi, G.; Scagliotti, G.V. Management of bone metastases in cancer: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*, **2005**, 56, 365–378.
- [3] Sartor, O.; Hoskin, P.; Bruland, O.S. Targeted radio-nuclide therapy of skeletal metastases. *Cancer Treat Rev*, **2013**, 39, 18–26.
- [4] Fleisch, H. The role of bisphosphonates in breast cancer: Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*, **2001**, 4, 317.
- [5] Costa; Luís, V.; Casimiro; Ribeiro. Zoledronic Acid: Its Use in the Treatment of Breast Cancer. *CMT*, **2010**, 913.
- [6] Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, **2008**, 19, 733–759.
- [7] Jung, A.; Bisaz, S.; Fleisch, H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calc. Tiss Res.*, **1973**, 11, 269–280.
- [8] Fogelman, I.; Citrin, D.L.; McKillop, J.H.; Turner, J.G.; Bessent, R.G.; Greig, W.R. A clinical comparison of Tc-99m HEDP and Tc-99m MDP in the detection of bone metastases: Concise communication. *J Nucl Med*, **1979**, 20, 98–101.
- [9] Savio, E.; Gaudio, J.; Robles, A.M.; Balter, H.; Paolino, A.; López, A.; Hermida, J.C.; Marco, E. de; Martinez, G.; Osinaga, E.; Knapp, F.F. Re-HEDP: Pharmacokinetic characterization, clinical and dosimetric evaluation in osseous metastatic patients with two levels of radiopharmaceutical dose. *BMC Med Phys*, **2001**, 1, 799.
- [10] Finlay, I.G.; Mason, M.D.; Shelley, M. Radioisotopes for the palliation of metastatic bone cancer: A systematic review. *The Lancet Oncology*, **2005**, 6, 392–400.
- [11] Das, T.; Chakraborty, S.; Sarma, H.D.; Banerjee, S. ^{177}Lu -DOTMP: A viable agent for palliative radiotherapy of painful bone metastasis. *Radiochimica Acta*, **2008**, 96, 1358.
- [12] Das, T.; Shinto, A.; Karuppuswamy Kamaleshwaran, K.; Banerjee, S. Theranostic Treatment of Metastatic Bone Pain With ^{177}Lu -DOTMP. *Clin Nucl Med*, **2016**, 41, 966–967.
- [13] Ogawa, K.; Mukai, T.; Inoue, Y.; Ono, M.; Saji, H. Development of a novel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -chelate-conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent. *J Nucl Med*, **2006**, 47, 2042–2047.

- [14] Passah, A.; Tripathi, M.; Ballal, S.; Yadav, M.P.; Kumar, R.; Roesch, F.; Meckel, M.; Sarathi Chakraborty, P.; Bal, C. Evaluation of bone-seeking novel radiotracer ^{68}Ga -NO2AP-Bisphosphonate for the detection of skeletal metastases in carcinoma breast. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2017**, *44*, 41–49.
- [15] Meckel, M.; Bergmann, R.; Miederer, M.; Roesch, F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: ^{67}Ga -DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. *EJNMMI radiopharm. chem.*, **2017**, *1*, 1481.
- [16] Fellner, M.; Baum, R.P.; Kubíček, V.; Hermann, P.; Lukes, I.; Prasad, V.; Rösch, F. PET/CT imaging of osteoblastic bone metastases with ^{68}Ga -bisphosphonates: First human study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2010**, *37*, 834.
- [17] Yousefnia, H.; Zolghadri, S.; Sadeghi, H.R.; Naderi, M.; Jalilian, A.R.; Shanehsazzadeh, S. Preparation and biological assessment of ^{177}Lu -BPAMD as a high potential agent for bone pain palliation therapy: Comparison with ^{177}Lu -EDTMP. *J Radioanal Nucl Chem*, **2016**, *307*, 1243–1251.
- [18] Baum, R.P.; Kulkarni, H.R. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labelled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*, **2012**, *2*, 437–447.
- [19] Siegel, R.; Ma, J.; Zou, Z.; Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, **2014**, *64*, 9–29.
- [20] Afshar-Oromieh, A.; Hetzheim, H.; Kratochwil, C.; Benesova, M.; Eder, M.; Neels, O.C.; Eisenhut, M.; Kübler, W.; Holland-Letz, T.; Giesel, F.L.; Mier, W.; Kopka, K.; Haberkorn, U. The Theranostic PSMA Ligand PSMA-617 in the Diagnosis of Prostate Cancer by PET/CT: Biodistribution in Humans, Radiation Dosimetry, and First Evaluation of Tumor Lesions. *J Nucl Med*, **2015**, *56*, 1697–1705.
- [21] Kinoshita, Y.; Kuratsukuri, K.; Landas, S.; Imaida, K.; Rovito, P.M.; Wang, C.Y.; Haas, G.P. Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World J Surg*, **2006**, *30*, 628–636.
- [22] Hillier, S.M.; Maresca, K.P.; Femia, F.J.; Marquis, J.C.; Foss, C.A.; Nguyen, N.; Zimmerman, C.N.; Barrett, J.A.; Eckelman, W.C.; Pomper, M.G.; Joyal, J.L.; Babich, J.W. Preclinical evaluation of novel glutamate-urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer. *Cancer Res*, **2009**, *69*, 6932–6940.
- [23] Barrett, J.A.; Coleman, R.E.; Goldsmith, S.J.; Vallabhajosula, S.; Petry, N.A.; Cho, S.; Armor, T.; Stubbs, J.B.; Maresca, K.P.; Stabin, M.G.; Joyal, J.L.; Eckelman, W.C.; Babich, J.W. First-in-man evaluation of 2 high-affinity PSMA-avid small molecules for imaging prostate cancer. *J Nucl Med*, **2013**, *54*, 380–387.
- [24] Banerjee, S.R.; Pullambhatla, M.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Green, G.; Fox, J.J.; Horti, A.; Mease, R.C.; Pomper, M.G. ^{68}Ga -labelled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. *J Med Chem*, **2010**, *53*, 5333–5341.
- [25] Szabo, Z.; Mena, E.; Rowe, S.P.; Plyku, D.; Nidal, R.; Eisenberger, M.A.; Antonarakis, E.S.; Fan, H.; Dannals, R.F.; Chen, Y.; Mease, R.C.; Vranesic, M.; Bhatnagar, A.; Sgouros, G.; Cho, S.Y.; Pomper, M.G. Initial Evaluation of [^{18}F]DCFPyL for Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeted PET Imaging of Prostate Cancer. *Mol Imaging Biol*, **2015**, *17*, 565–574.

- [26] Eder, M.; Neels, O.; Müller, M.; Bauder-Wüst, U.; Remde, Y.; Schäfer, M.; Hennrich, U.; Eisenhut, M.; Afshar-Oromieh, A.; Haberkorn, U.; Kopka, K. Novel Preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of ^{68}Ga -PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2014**, *7*, 779–796.
- [27] Afshar-Oromieh, A.; Avtzi, E.; Giesel, F.L.; Holland-Letz, T.; Linhart, H.G.; Eder, M.; Eisenhut, M.; Boxler, S.; Hadaschik, B.A.; Kratochwil, C.; Weichert, W.; Kopka, K.; Debus, J.; Haberkorn, U. The diagnostic value of PET/CT imaging with the ^{68}Ga -labelled PSMA ligand HBED-CC in the diagnosis of recurrent prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2015**, *42*, 197–209.
- [28] Benešová, M.; Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Afshar-Oromieh, A.; Kratochwil, C.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Preclinical Evaluation of a Tailor-Made DOTA-Conjugated PSMA Inhibitor with Optimized Linker Moiety for Imaging and Endoradiotherapy of Prostate Cancer. *J Nucl Med*, **2015**, *56*, 914–920.
- [29] Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Schäfer, M.; Klika, K.D.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. *J Med Chem*, **2016**, *59*, 1761–1775.
- [30] Meckel, M.; Fellner, M.; Thieme, N.; Bergmann, R.; Kubicek, V.; Rösch, F. In vivo comparison of DOTA based ^{68}Ga -labelled bisphosphonates for bone imaging in non-tumour models. *Nucl Med Biol*, **2013**, *40*, 823–830.
- [31] Schäfer, M.; Bauder-Wüst, U.; Leotta, K.; Zoller, F.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M.; Eder, M. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ^{68}Ga -PET imaging of prostate cancer. *EJNMMI Res*, **2012**, *2*, 23.
- [32] Weineisen, M.; Schottelius, M.; Simecek, J.; Baum, R.P.; Yildiz, A.; Beykan, S.; Kulkarni, H.R.; Lassmann, M.; Klette, I.; Eiber, M.; Schwaiger, M.; Wester, H.-J. ^{68}Ga - and ^{177}Lu -Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies. *J Nucl Med*, **2015**, *56*, 1169–1176.
- [33] Cardinale, J.; Schäfer, M.; Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Leotta, K.; Eder, M.; Neels, O.C.; Haberkorn, U.; Giesel, F.L.; Kopka, K. Preclinical Evaluation of ^{18}F -PSMA-1007, a New Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand for Prostate Cancer Imaging. *J Nucl Med*, **2017**, *58*, 425–431.
- [34] Zhernosekov, K.P.; Filosofov, D.V.; Baum, R.P.; Aschoff, P.; Bihl, H.; Razbash, A.A.; Jahn, M.; Jennewein, M.; Rösch, F. Processing of generator-produced ^{68}Ga for medical application. *J Nucl Med*, **2007**, *48*, 1741–1748.
- [35] Gebhardt, P.; Opfermann, T.; Saluz, H.P. Computer controlled ^{68}Ga milking and concentration system. *Appl Radiat Isot*, **2010**, *68*, 1057–1059.
- [36] Feldmann, A.; Arndt, C.; Bergmann, R.; Loff, S.; Cartellieri, M.; Bachmann, D.; Aliperta, R.; Hetzenecker, M.; Ludwig, F.; Albert, S.; Ziller-Walter, P.; Kegler, A.; Koristka, S.; Gärtner, S.; Schmitz, M.; Ehninger, A.; Ehninger, G.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Bachmann, M. Retargeting of T lymphocytes to PSCA- or PSMA positive prostate cancer cells using the novel modular chimeric antigen receptor platform technology “UniCAR”. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 31368–31385.

3.6. *In vivo* evaluation of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} for α-therapy of bone metastases

***In vivo* evaluation of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} for α-therapy of bone metastases**

N. Pfannkuchen¹, N. Bausbacher², S. Pektor², M. Miederer², F. Rösch¹

¹ Institute of Nuclear Chemistry, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

² Department of Nuclear Medicine, University Medical Center, Mainz, Germany

Abstract

Purpose Conjugates of bisphosphonates (BP) with macrocyclic chelators possess high potential in bone targeted radionuclide imaging and therapy. DOTA^{ZOL}, zoledronic acid conjugated to DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), demonstrated promising results *in vivo* in small animals as well as in first patient applications using ⁶⁸Ga for diagnosis via PET and the low-energy β -emitter ¹⁷⁷Lu for therapy of painful bone metastases. In consideration of the fact that targeted α -therapy probably offers various advantages over the use of β -emitters, the ²²⁵Ac-labelled derivative [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} was synthesized and evaluated *in vivo*. Here we report on radiolabelling and biodistribution of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in healthy Wistar rats.

Methods DOTA^{ZOL} was labelled with ²²⁵Ac and injected without further purification into the tail vein with activities of 404 ± 47 kBq per animal. *Ex vivo* biodistribution studies were performed in healthy Wistar rats at 1 h, 24 h, 5 d and 10 d post injection. The accumulation of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} on healthy bone and in soft tissue organs was obtained in terms of SUV. The results were compared to those of other radiolabelled bisphosphonates such as [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} and [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL}.

Results Radiolabelling of DOTA^{ZOL} with ²²⁵Ac at 98 °C provided radiochemical yields ≥ 98 % within 30 min. [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} showed high femur uptake ($SUV_{femur} = 4.99 \pm 0.97$, 10 d p.i.), which was comparable to that of other Me(III)-DOTA^{ZOL} derivatives. Ratios between bone uptake and blood pool activity reached levels of 5, 940, 2181 and 2409 at 24 h, 5 d and 10 d post injection.

Conclusion [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} repeats the well-known pharmacology of DOTA^{ZOL} derivatives in preclinical evaluations. It thus may be considered for translational application.

Keywords: bone metastases, bisphosphonates, zoledronic acid, ²²⁵Ac, theranostics, α -emitter

Introduction

Prostate and breast cancer are the most common types of cancer worldwide [1]. One serious consequence of these tumours is the metastatic spread into the skeleton which reduces dramatically the patients' quality of life due to symptoms like severe bone pain, spinal cord compression, fractures and hypercalcaemia [2]. Radiopharmaceuticals play a key role in diagnosis and therapy of bone metastases. Due to the increased bone turnover, which characterises those lesions, bone-seeking radiopharmaceuticals show an enhanced uptake compared to healthy bone. In this way, bone metastases can be visualized by both single-photon emission computed tomography (SPECT) and positron emission tomography (PET).

For the endoradiotherapy of bone metastases there are two different types of bone-seeking radiopharmaceuticals: calcimimetic and phosphonate-based compounds. Calcimimetic compounds, which include the therapeutic isotopes ^{89}Sr and ^{223}Ra , are the simplest bone-seeking radiopharmaceuticals [3]. $^{223}\text{Ra}\text{RaCl}_2$ emits high-energy α -particles with only short range ($<100\ \mu\text{m}$) which allows deposition of high energy doses into the target tissue while avoiding an impairment of non-target tissue, especially the red bone marrow. In a clinical phase III study it showed a low haematotoxicity and prolonged survival in metastatic prostate cancer [4].

Alternatively, bone accumulation of radionuclides can be achieved using phosphonate-based structures like the commonly utilized bisphosphonates. These are stable analogues of the naturally occurring pyrophosphate and show high affinity for bone mineral [5]. Bisphosphonates like MDP (methylene diphosphonate) or HEDP (1,1-hydroxyethylidene diphosphonate) and other phosphonate-based structures like EDTMP (ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid) are well-known chelators for the radiometals $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and $^{186/188}\text{Re}$, and ^{153}Sm and ^{90}Y , respectively (Figure 1). They have already been used for the delivery of diagnostic as well as therapeutic radionuclides to bone [3, 6].

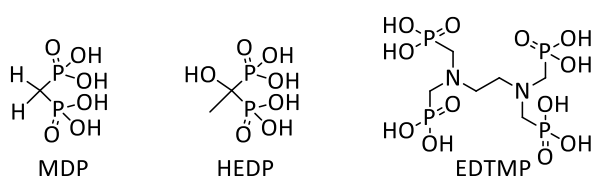


Figure 1: Structures of MDP (methylene diphosphonate), HEDP (1,1-hydroxyethylidene diphosphonate), and EDTMP (ethylenediamine tetra(methylene phosphonic acid)).

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled bisphosphonates are the most widely used radiopharmaceuticals for diagnosis of bone metastases using bone scintigraphy [7]. HEDP and EDTMP showed good results in bone pain palliation in combination with ^{153}Sm , ^{177}Lu and $^{186/188}\text{Re}$ [8, 9]. However, despite their high thermodynamic

stabilities with trivalent metals, acyclic ligands like EDTMP possess lower kinetic stabilities than cyclic chelators. EDTMP complexes have shown low *in vivo* stability and an excess of the ligand is routinely applied to avoid decomplexation *in vivo* [10, 11]. The use of macrocyclic chelates can circumvent the disadvantages of open chain chelators. Furthermore, the already mentioned phosphonate-based structures are responsible for complexation of the radionuclides as well as binding to the target tissue which may lead to a decreased uptake in bone metastases [12]. Complete separation of the chelating unit and the target vector could therefore increase bone uptake. This leads to the concept of macrocyclic chelate-conjugated bisphosphonates, using an appropriate macrocyclic chelator for complexation of the radionuclide and a coupled bisphosphonate for bone binding. The great variety of chelators enables complexation of various radionuclides, also allowing the combination of diagnosis and therapy in one and the same compound. The choice of the bisphosphonate for coupling to the chelator depends on their affinity for bone mineral, as their two side chains are responsible for the activity of the particular bisphosphonate (Figure 2). As a hydroxybisphosphonate, zoledronic acid shows a high affinity to hydroxyapatite or bone mineral. [2]. Therefore, a DOTA-conjugated zoledronate derivative (DOTA^{ZOL}, Figure 2) was developed recently and radiolabelled with ⁶⁸Ga and ¹⁷⁷Lu [13].

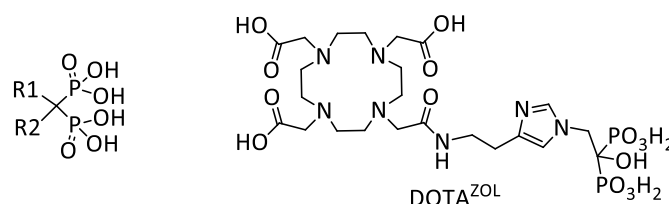


Figure 2: Bisphosphonate structure with variable side chains R1 and R2 and structure of the macrocyclic chelate-conjugated bisphosphonate DOTA^{ZOL} (2,2',2''-(10-(2-(2-(1-(2-hydroxy-2,2-diphosphonoethyl)-1H-imidazol-4-yl)ethylamino)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid).

In an *in vivo* comparison of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} with [¹⁸F]NaF and [⁶⁸Ga]Ga-BPAPD in healthy rats, [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} showed the highest bone accumulation and very low uptake in soft tissue [13]. [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} provided similar results in *ex vivo* biodistribution studies. These good results of both the ⁶⁸Ga- and the ¹⁷⁷Lu-labelled derivative turn DOTA^{ZOL} into a promising candidate for theranostic applications.

The therapeutic effect of bone-seeking radiopharmaceuticals not only depends on accumulation on metastatic sites but also on the energy deposit by the particle radiation used. ¹⁷⁷Lu is a promising candidate for the treatment of skeletal metastases due to its appropriate nuclide properties ($t_{1/2} = 6.71$ d, $E_{\beta_{max}} = 0.421$ MeV) and the carrier-free production route [14]. For example, the

^{177}Lu -labelled PSMA (prostate-specific membrane antigen) ligand PSMA-617 is successfully used for radiotherapy of prostate cancer [15]. But despite its good results in terms of dosimetry and patient response [16, 17], about 30 % of patients do not respond to ^{177}Lu -labelled PSMA ligands [18]. In comparison to a β^- -particle an α -particle deposits ≥ 500 times more energy per unit path length due to its high linear energy transfer (LET) in the range of 100 keV/ μm and its short range in tissue (50-100 μm) [19]. This short range of about 2-3 cell diameters also allows for more specific energy deposition which limits the damage to surrounding untargeted tissue. Furthermore, it has already been demonstrated that α -particle radiation can overcome radioresistance to β -emitters [20, 21]. ^{225}Ac has been considered a potential candidate for targeted α -therapy due to its 10 day half-life, high energy α -particle emission and convenient rapid decay chain [22]. Kratochwil *et al.* published a first-in-human treatment of two prostate cancer patients with the ^{225}Ac -labelled PSMA ligand PSMA-617. Both patients showed a complete therapy response, even if one patient was resistant to [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 [18]. Therefore, the transfer of all mentioned advantages of ^{225}Ac for therapeutic applications to the concept of macrocyclic chelate-conjugated bisphosphonates seems to have high potential regarding treatment of skeletal metastases.

Here, we report on an initial *in vivo* evaluation of [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in healthy Wistar rats to estimate its potential for theranostics of bone metastases in combination with [^{68}Ga]Ga-DOTA^{ZOL}.

Material and Methods

Radiolabelling of DOTA^{ZOL} with ^{225}Ac and quality control

DOTA^{ZOL} as well as ^{225}Ac (in 0.1 M HCl) were obtained from ITG (Garching, Germany). Radiolabelling was carried out in 200 μL 0.1 M sodium ascorbate solution at pH 6 with 2 MBq of ^{225}Ac and 30 nmol precursor for 30 min at 98 °C.

Quality control was performed by thin-layer chromatography (Merck Silica F₂₅₄ TLC plates, solvent: 0.1 M citrate buffer pH 4). After development, the chromatography strip was stored 1 h to obtain radiochemical equilibrium between ^{225}Ac and its daughter nuclide ^{221}Fr ($t_{1/2} = 4.8$ min). Radiochemical yield was determined by measuring the 218 keV γ -emission of ^{221}Fr on the upper and the lower part of the TLC strip.

For determination of labelling kinetics, DOTA^{ZOL} was labelled in 0.1 M sodium ascorbate solution at pH 6 with 1 MBq of ^{225}Ac and 20 or 30 nmol precursor for 30 min at 98 °C. TLC samples were taken after 1, 3, 5, 10, 15 and 30 min reaction time. After development, the chromatography strips were stored 24 h and radiochemical yields were determined using a RITA radioactivity TLC analyser (Raytest, Germany).

Animals

Young male Wistar rats weighing 188 ± 34 g (mean \pm SD, $n = 16$) at the start of the experiment were purchased from Janvier Labs. At this age, metaphyses are still growing leading to increased bone turnover at the proximal and distal end of the femur diaphysis. Animals had access to food and water *ad libitum*. Temperature and humidity were kept at 24 ± 2 °C and 60 %, respectively. All animals were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle. Handling occurred only during the light cycle. All animal experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and the German law for animal welfare and were approved by the local ethical committee for animal experiments (permission nr.: 23177-07/G15-1-033).

Ex vivo biodistribution

The Wistar rats received a short-term anaesthesia *via* isoflurane inhalation. Mean activities of 404 ± 47 kBq of [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in isotonic saline were injected in a volume of 0.5 – 0.6 mL into the tail vein. Animals were sacrificed 1 h, 24 h, 5 d and 10 d p.i. and organs of interest were excised rapidly and weighed. The ^{225}Ac activity was determined with a 2480 WIZARD² Automatic Gamma Counter (PerkinElmer, Germany) in the 218 keV window of ^{221}Fr and the 440 keV window of ^{213}Bi after secular equilibrium was established (at least 8 h) and decay corrected. The distribution data are normalized to the body weight (BW) as standard uptake value (SUV) which was calculated via $\text{SUV} = (\text{activity per g tissue}) / (\text{injected activity}) \times \text{BW}$. The total activities in the skeleton were calculated using the activity concentrations in the femur and the total skeleton weight. The skeleton weight was calculated as follows: $\text{skeleton weight} = 9.66 + 0.0355 \times \text{BW}$ [23].

Injected activities were determined by γ -spectrometry of the syringes before and after injection after calibration of the γ -spectrometer with known activities of ^{225}Ac . Volume activity of the obtained ^{225}Ac was determined using α -spectrometry.

Results and Discussion

Radiolabelling of DOTA^{ZOL} with ^{225}Ac and quality control

Radiolabelling of DOTA^{ZOL} with ^{225}Ac provided radiochemical yields of ≥ 98 %. Quantitative yields of ≥ 95 % were reached within 5 min with 20 nmol as well as 30 nmol of precursor.

Ex vivo biodistribution

The results of the organ distribution of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} are presented in Table 1 and illustrated in Figure 3. As expected, the ²²⁵Ac-labelled bisphosphonate showed a fast and predominant accumulation in the skeleton. Bone uptake occurred quite fast within 1 h, still increased slightly until 24 h p.i. and remained constant over the whole period of one half-life of the radionuclide. Beside the bone, an appreciable amount of activity was found in the kidneys 1 h p.i. as a result of the known renal clearance of bisphosphonate based compounds. Renal excretion of the unbound tracer as well as blood clearance were very fast and 24 h p.i. there was almost no activity found in most of the non-targeted tissues. Remaining accumulation was only observed for the liver.

Table 1: Biodistribution of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in healthy Wistar rats at different points of time p.i.

organ	1 h p.i.	24 h p.i.	5 d p.i.	10 d p.i.
lung	0.55 (0.28)	0.09 (0.08)	0.06 (0.01)	0.13 (0.03)
blood	1.20 (0.86)	0.01 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
liver	0.69 (0.23)	0.73 (0.09)	0.78 (0.16)	0.97 (0.45)
spleen	0.98 (0.40)	0.15 (0.01)	0.28 (0.05)	0.46 (0.18)
kidneys	0.48 (0.15)	0.32 (0.05)	0.25 (0.03)	0.25 (0.04)
heart	0.48 (0.15)	0.04 (0.02)	0.04 (0.00)	0.04 (0.01)
muscle	0.11 (0.07)	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)
intestine	0.24 (0.11)	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)	0.02 (0.00)
testes	0.21(0.15)	0.02 (0.00)	0.02 (0.00)	0.02 (0.01)
femur left	3.61 (0.62)	4.95 (0.58)	4.87 (0.60)	5.02 (1.08)
femur right	4.20 (0.30)	4.78 (0.92)	4.51 (0.44)	4.97 (0.89)
femur total	3.90 (0.43)	4.86 (0.36)	4.69 (0.49)	4.99 (0.97)

Data are expressed in SUV. Each value represents the mean (SD) of four animals.

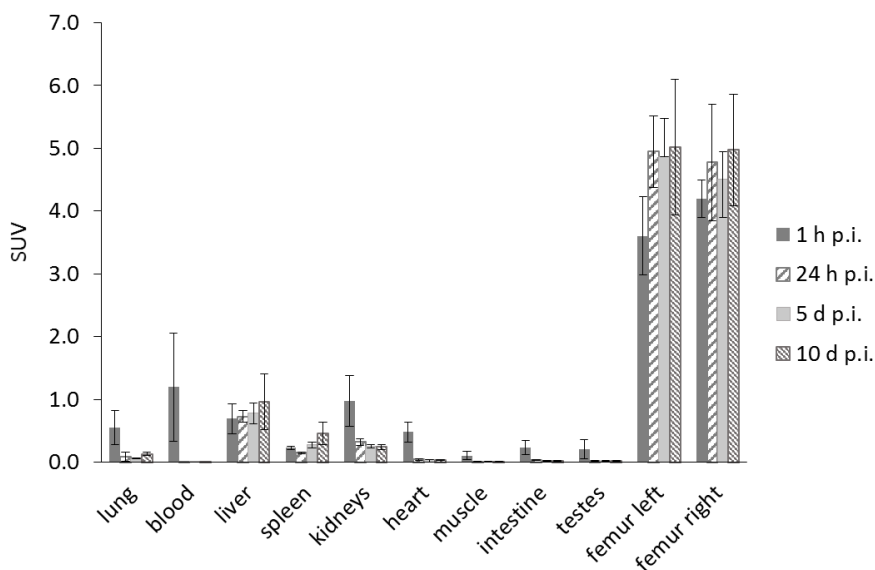


Figure 3: Biodistribution of $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOTA}^{20\text{L}}$ in healthy Wistar rats at different points of time p.i.

Bone-to-organ ratios are presented in Table 2. They were calculated from the respective SUVs from Table 1. As predictable from the biodistribution data, ratios were increasing until 24 h p.i. and $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOTA}^{20\text{L}}$ showed a very good target-to-background ratio.

Table 2: Bone-to-organ ratios of $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac-DOTA}^{20\text{L}}$ in healthy Wistar rats at different points of time p.i.

organ	1 h p.i.	24 h p.i.	5 d p.i.	10 d p.i.
lung	8	82	80	37
blood	5	940	2181	2409
liver	6	7	6	6
spleen	17	32	17	12
kidneys	4	15	18	20
heart	9	134	127	139
muscle	51	548	462	643
intestine	20	149	208	222
testes	29	207	229	233

Each value represents the mean of four animals.

^{225}Ac as well as ^{213}Bi as the longest lived α -emitting daughter nuclide exhibit specific biological sites of deposition, which could cause undesirable toxicity to healthy tissue. ^{225}Ac has been shown to highly accumulate primarily in the liver [24]. Thus, a low liver uptake can be used as a marker for the *in vivo* stability of the ^{225}Ac complex [25, 26]. As can be seen in Figure 3, the liver is the only organ that showed appreciable amounts of activity later than 1 h post injection. But a $\text{SUV} \leq 1$ does not indicate either

high liver accumulation of the tracer or high release of free radiometal due to low *in vivo* stability of the complex. Especially the lack of a significant increase of liver uptake over time does not suggest decomplexation *in vivo*. The observed slightly higher amount of activity in the liver compared to the ^{68}Ga - and ^{177}Lu -labelled compounds thus results most likely from residues of free ^{225}Ac in the injected solution, which amounted to about 2 % of the total activity. An additional separation after the labelling or addition of an aliquot of DTPA (diethylenetriaminepentacetic acid) to scavenge free radiometal are conceivable solutions in terms of translational application.

After the initial decay of ^{225}Ac , the α -emitting daughter nuclides will be released and their distribution is no longer controlled by the chelator-conjugated targeting vector [27]. ^{213}Bi shows a renal clearance, which is why it accumulates in the kidneys in its unchelated form [25]. Thus, release of unchelated ^{213}Bi into the bloodstream due to decomplexation after the decay of ^{225}Ac could lead to nephrotoxicity. To discriminate between ^{225}Ac distribution and ^{213}Bi distribution, the activity in organ samples taken 10 d p.i. was measured in the 440 keV window of ^{213}Bi directly as well as after the radiochemical equilibrium was achieved. In this way, a possible kidney accumulation of released ^{213}Bi could be detected. SUVs calculated from both measurements are presented in Table 3. SUVs determined before and after achievement of the radiochemical equilibrium are comparable and do not suggest high release of ^{213}Bi into the bloodstream followed by kidney accumulation.

Table 3: Examination of kidney accumulation of unchelated ^{213}Bi by comparison of SUVs determined directly after excising of organ samples and after establishing of the radiochemical equilibrium.

organ	distribution without radiochemical equilibrium	distribution with radiochemical equilibrium
lung	0.15 (0.04)	0.13 (0.03)
blood	0.01 (0.00)	0.00 (0.00)
liver	0.97 (0.40)	0.97 (0.40)
spleen	0.49 (0.16)	0.46 (0.16)
kidneys	0.34 (0.03)	0.25 (0.03)
heart	0.04 (0.01)	0.04 (0.01)
muscle	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)
intestine	0.03 (0.01)	0.02 (0.00)
testes	0.03 (0.01)	0.02 (0.01)
femur left	5.14 (1.02)	5.14 (1.02)
femur right	5.03 (1.07)	5.11 (0.94)
femur total	5.08 (1.02)	5.12 (0.97)

Data are expressed in SUV. Each value represents the mean (SD) of four animals.

Comparison of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}, [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} and [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL}

Tables 4 and 5 present the results of *ex vivo* biodistribution studies of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}, [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} and [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL}. At 1 h after injection, bone uptake is highest for [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}. Bone accumulation of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} and [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} is comparable at every point of time with a slightly higher uptake for [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL}. Organ distribution of all three radiolabelled compounds is nearly comparable. All of them showed a fast blood clearance as well as a fast renal excretion of unbound tracer. Only [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} still exhibited some kidney accumulation after 24 h. Altogether, very low background in terms of accumulation in non-target tissues was observed for all three tracers. Merely, the constant amount of activity in the liver in case of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} stands out a little bit.

Table 4: Comparison of biodistribution of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}, [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} and [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in healthy Wistar rats 1 h p.i.

organ	[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA ^{ZOL} [a]	[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA ^{ZOL} [a]	[²²⁵ Ac]Ac-DOTA ^{ZOL}
lung	0.45 (0.11)	0.09 (0.03)	0.55 (0.28)
blood	0.47 (0.19)	0.08 (0.01)	1.20 (0.86)
liver	0.28 (0.03)	0.10 (0.04)	0.69 (0.23)
spleen	0.17 (0.02)	0.06 (0.01)	0.98 (0.40)
kidneys	0.53 (0.04)	1.90 (0.15)	0.48 (0.15)
heart	0.14 (0.04)	0.04 (0.01)	0.48 (0.15)
muscle	0.08 (0.02)	0.02 (0.00)	0.11 (0.07)
intestine	0.14 (0.08)		0.24 (0.11)
testes		0.06 (0.03)	0.21 (0.15)
femur	5.40 (0.62)	3.65 (0.33)	3.90 (0.43)

Data are expressed in SUV. Each value represents the mean (SD) of four animals.

[a]Data taken from [13]

Table 5: Comparison of biodistribution of [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} and [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in healthy Wistar rats 24 h p.i. and 8 d/10 d p.i.

organ	[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA ^{ZOL} 24 h p.i. [a]	[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA ^{ZOL} 8 d p.i. [a]	[²²⁵ Ac]Ac-DOTA ^{ZOL} 24 h p.i.	[²²⁵ Ac]Ac-DOTA ^{ZOL} 10 d p.i.
lung	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	0.09 (0.08)	0.13 (0.03)
blood	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.00)	0.00 (0.00)
liver	0.03 (0.01)	0.04 (0.01)	0.73 (0.09)	0.97 (0.45)
spleen	0.03 (0.00)	0.03 (0.01)	0.15 (0.01)	0.46 (0.18)
kidneys	1.69 (0.15)	0.12 (0.02)	0.32 (0.05)	0.25 (0.04)
heart	0.01 (0.00)	0.00 (0.00)	0.04 (0.02)	0.04 (0.01)
muscle	0.01 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)
intestine			0.03 (0.01)	0.02 (0.00)
testes	0.01 (0.00)	0.01 (0.00)	0.02 (0.00)	0.02 (0.01)
femur	4.18 (0.36)	4.63 (0.36)	4.86 (0.36)	4.99 (0.97)

Data are expressed in SUV. Each value represents the mean (SD) of four animals.

[a]Data taken from [13]

In the case of systemically increased bone turnover similar to the femur uptake in these experiments the maximum expectable total activities in the skeleton were calculated within the range of 40 to 45 % of the injected dose for all three compounds at every point of time (Table 6). Bone-to-blood ratios of the ⁶⁸Ga-, ¹⁷⁷Lu- and ²²⁵Ac-labelled derivatives are presented in Table 7. They are nearly in the same range at the particular points of time and indicate the general fast blood clearance of these compounds which leads to a very good target-to-background ratio. Differences between the ratios for example between the ¹⁷⁷Lu- and the ²²⁵Ac-tracer after 8 and 10 d, respectively, are not crucial because of the generally very low blood activity at these points of time and the comparable femur accumulation.

Table 6: Calculated total activities in the skeleton of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}, [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} and [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} at different points of time p.i.

compound	1 h p.i.	24 h p.i.	8 d/10 d p.i.
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA ^{ZOL}	42.7 (5.2)	-	-
[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA ^{ZOL}	44.62 (5.00)	44.79 (4.82)	44.78 (3.71)
[²²⁵ Ac]Ac-DOTA ^{ZOL}	39.67 (7.42)	43.69 (7.99)	42.70 (6.15)

Data are expressed in %ID/organ. Each value represents the mean (SD) of four animals.

Table 7. Bone-to-blood ratios of [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL}, [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} and [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} at different points of time p.i.

compound	1 h p.i.	24 h p.i.	8 d/10 d p.i.
[⁶⁸ Ga]Ga-DOTA ^{ZOL}	12	-	-
[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA ^{ZOL}	46	4570	6437
[²²⁵ Ac]Ac-DOTA ^{ZOL}	5	940	2409

Furthermore, biodistribution of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} is comparable to BPAMD, a DOTA-conjugated bisphosphonate, which already showed good results in first human applications [28, 29]. Femur uptake of [¹⁷⁷Lu]Lu-BPAMD is comparable to all three radiolabelled DOTA^{ZOL} derivatives at different points of time post injection (SUV_{1h} = 4.84 ± 0.44, SUV_{8d} = 5.04 ± 0.45) [30].

Conclusion

The DOTA-conjugated zoledronic acid derivative DOTA^{ZOL} represents a very promising bone-seeking tracer for diagnosis as well as treatment of painful bone metastases. [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} and [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} already showed good results *in vivo* both in small animals and in first patient applications. The capability of their combination for theranostics is still under investigation. The extension of this theranostic concept to targeted α -therapy is the next logical step in the development of new bone-seeking radiopharmaceuticals. This initial evaluation of [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in small animals showed great promise regarding a further investigation of this α -emitting derivative in patients. It was in no way inferior in terms of blood clearance, fast renal excretion and especially bone uptake. Accumulation in non-target tissue and thereby possible risk for healthy tissue was very low. Only the liver exhibited a certain, nearly constant, accumulation, which could result from free co-injected ²²⁵Ac. A chemical purification step after the labelling and/or addition of an aliquot of DTPA to the solution prior to injection to scavenge the free [²²⁵Ac]Ac³⁺ cation species are conceivable solutions in terms of translational application.

Overall, [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} provides high potential as α -emitting bone-seeking radiopharmaceutical, which now needs to be further evaluated for clinical application.

Conflict of Interest

None.

Acknowledgements

The authors thank ITG (Garching, Germany) for providing DOTA^{Zn} and ²²⁵Ac.

References

- [1] Torre, L.A.; Siegel, R.L.; Ward, E.M.; Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2016**, *25*, 16–27.
- [2] Rubens, R.D. Bone metastases—The clinical problem. *European Journal of Cancer*, **1998**, *34*, 210–213.
- [3] Lange, R.; Ter Heine, R.; Knapp, R.F.; de Klerk, John M H; Bloemendal, H.J.; Hendrikse, N.H. Pharmaceutical and clinical development of phosphonate-based radiopharmaceuticals for the targeted treatment of bone metastases. *Bone*, **2016**, *91*, 159–179.
- [4] Hoskin, P.; Sartor, O.; O’Sullivan, J.M.; Johannessen, D.C.; Helle, S.I.; Logue, J.; Bottomley, D.; Nilsson, S.; Vogelzang, N.J.; Fang, F.; Wahba, M.; Aksnes, A.-K.; Parker, C. Efficacy and safety of radium-223 dichloride in patients with castration-resistant prostate cancer and symptomatic bone metastases, with or without previous docetaxel use: a prespecified subgroup analysis from the randomised, double-blind, phase 3 5ALSYMPCA6 trial. *The Lancet Oncology*, **2014**, *15*, 1397–1406.
- [5] Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, **2008**, *19*, 733–759.
- [6] Palma, E.; Correia, J.D.G.; Campello, M.P.C.; Santos, I. Bisphosphonates as radionuclide carriers for imaging or systemic therapy. *Mol Biosyst*, **2011**, *7*, 2950–2966.
- [7] Banerjee, S.; Ambikalmajan Pillai, M.R.; Ramamoorthy, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, **2001**, *31*, 260–277.
- [8] Pandit-Taskar, N.; Batraki, M.; Divgi, C.R. Radiopharmaceutical Therapy for Palliation of Bone Pain from Osseous Metastases. *Journal of Nuclear Medicine*, **2004**, *45*, 1358–1365.
- [9] Thapa, P.; Nikam, D.; Das, T.; Sonawane, G.; Agarwal, J.P.; Basu, S. Clinical Efficacy and Safety Comparison of ¹⁷⁷Lu-EDTMP with ¹⁵³Sm-EDTMP on an Equidose Basis in Patients with Painful Skeletal Metastases. *J Nucl Med*, **2015**, *56*, 1513–1519.
- [10] Kálmán, F.K.; Király, R.; Brücher, E. Stability Constants and Dissociation Rates of the EDTMP Complexes of Samarium(III) and Yttrium(III). *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, *2008*, 4719–4727.
- [11] Fellner, M.; Riss, P.; Laktionova, N.S.; Zhernosekov, K.P.; Thews, O.; Geraldès, Carlos F. G. C.; Kovacs, Z.; Lukes, I.; Rösch, F. Comparison of different phosphorus-containing ligands complexing ⁶⁸Ga for PET-imaging of bone metabolism. *Radiochimica Acta*, **2011**, *99*, 43–51.
- [12] Ogawa, K.; Mukai, T.; Inoue, Y.; Ono, M.; Saji, H. Development of a Novel ^{99m}Tc-Chelate-Conjugated Bisphosphonate with High Affinity for Bone as a Bone Scintigraphic Agent. *Journal of Nuclear Medicine*, **2006**, *47*, 2042–2047.
- [13] Meckel, M.; Bergmann, R.; Miederer, M.; Roesch, F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: *Me(III)-DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. *EJNMMI radiopharm. chem.*, **2017**, *1*, 1481.

- [14] Lebedev, N.A.; Novgorodov, A.F.; Misiak, R.; Brockmann, J.; Rösch, F. Radiochemical separation of no-carrier-added ^{177}Lu as produced via the $^{176}\text{Yb}(n,\gamma)^{177}\text{Yb}\rightarrow^{177}\text{Lu}$ process. *Applied Radiation and Isotopes*, **2000**, 53, 421–425.
- [15] Rahbar, K.; Ahmadzadehfar, H.; Kratochwil, C.; Haberkorn, U.; Schäfers, M.; Essler, M.; Baum, R.P.; Kulkarni, H.R.; Schmidt, M.; Drzezga, A.; Bartenstein, P.; Pfestroff, A.; Luster, M.; Lützen, U.; Marx, M.; Prasad, V.; Brenner, W.; Heinzl, A.; Mottaghy, F.M.; Ruf, J.; Meyer, P.T.; Heuschkel, M.; Eveslage, M.; Bögemann, M.; Fendler, W.P.; Krause, B.J. German Multicenter Study Investigating ^{177}Lu -PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med*, **2017**, 58, 85–90.
- [16] Delker, A.; Fendler, W.P.; Kratochwil, C.; Brunegraf, A.; Gosewisch, A.; Gildehaus, F.J.; Tritschler, S.; Stief, C.G.; Kopka, K.; Haberkorn, U.; Bartenstein, P.; Böning, G. Dosimetry for ^{177}Lu -DKFZ-PSMA-617: a new radiopharmaceutical for the treatment of metastatic prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2016**, 43, 42–51.
- [17] Ahmadzadehfar, H.; Eppard, E.; Kürpig, S.; Fimmers, R.; Yordanova, A.; Schlenkhoff, C.D.; Gärtner, F.; Rogenhofer, S.; Essler, M. Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with ^{177}Lu -PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Oncotarget*, **2016**, 7, 12477–12488.
- [18] Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Giesel, F.L.; Weis, M.; Verburg, F.A.; Mottaghy, F.; Kopka, K.; Apostolidis, C.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. ^{225}Ac -PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med*, **2016**, 57, 1941–1944.
- [19] Graf, F.; Fahrner, J.; Maus, S.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F.; Venkatachalam, S.; Fottner, C.; Weber, M.M.; Huelsenbeck, J.; Schreckenberger, M.; Kaina, B.; Miederer, M. DNA double strand breaks as predictor of efficacy of the alpha-particle emitter Ac-225 and the electron emitter Lu-177 for somatostatin receptor targeted radiotherapy. *PLoS ONE*, **2014**, 9, e88239.
- [20] Baidoo, K.E.; Yong, K.; Brechbiel, M.W. Molecular pathways: targeted α -particle radiation therapy. *Clin Cancer Res*, **2013**, 19, 530–537.
- [21] Kratochwil, C.; Giesel, F.L.; Bruchertseifer, F.; Mier, W.; Apostolidis, C.; Boll, R.; Murphy, K.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. ^{213}Bi -DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2014**, 41, 2106–2119.
- [22] Kim, Y.-S.; Brechbiel, M.W. An overview of targeted alpha therapy. *Tumour Biol*, **2012**, 33, 573–590.
- [23] Sontag, W. Long-term behavior of ^{239}Pu , ^{241}Am and ^{233}U in different bones of one-year-old rats: macrodistribution and macrodosimetry. *Human Toxicology*, **1984**, 3, 469–483.
- [24] Beyer, G.J.; Offord, R.; Künzi, G.; Aleksandrova, Y.; Ravn, U.; Jahn, S.; Barker, J.; Tengblad, O.; Lindroos, M. The influence of EDTMP-concentration on the biodistribution of radio-lanthanides and ^{225}Ac in tumor-bearing mice. The ISOLDE Collaboration. *Nucl Med Biol*, **1997**, 24, 367–372.
- [25] Hassfjell, S.; Brechbiel, M.W. The Development of the α -Particle Emitting Radionuclides ^{212}Bi and ^{213}Bi , and Their Decay Chain Related Radionuclides, for Therapeutic Applications. *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2019–2036.

- [26] Davis, I.A.; Glowienka, K.A.; Boll, R.A.; Deal, K.A.; Brechbiel, M.W.; Stabin, M.; Bochsler, P.N.; Mirzadeh, S.; Kennel, S.J. Comparison of ^{225}Ac Actinium chelates: tissue distribution and radiotoxicity. *Nucl Med Biol*, **1999**, 26, 581–589.
- [27] Miederer, M.; McDevitt, M.R.; Sgouros, G.; Kramer, K.; Cheung, N.-K.V.; Scheinberg, D.A. Pharmacokinetics, dosimetry, and toxicity of the targetable atomic generator, ^{225}Ac -HuM195, in nonhuman primates. *J Nucl Med*, **2004**, 45, 129–137.
- [28] Rösch, F.; Baum, R.P. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS. *Dalton Trans*, **2011**, 40, 6104–6111.
- [29] Baum, R.P.; Kulkarni, H.R. THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labelled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience. *Theranostics*, **2012**, 2, 437–447.
- [30] Bergmann, R.; Meckel, M.; Kubíček, V.; Pietzsch, J.; Steinbach, J.; Hermann, P.; Rösch, F. ^{177}Lu -labelled macrocyclic bisphosphonates for targeting bone metastasis in cancer treatment. *EJNMMI Res*, **2016**, 6, 5.

3.7. Supplementary Results: Synthesis of a chelator-conjugated heterocyclic nitrogen-containing bisphosphonate via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

Introduction

Third-generation bisphosphonates like risedronate and zoledronate, which are characterized by a heterocyclic nitrogen-containing side chain, exhibit high affinities to hydroxyapatite owing to their additional hydroxyl group at the central carbon atom and the further possibility to bind to hydroxyapatite via the nitrogen moiety [1]. Based on zoledronic acid, the chelator-conjugated bisphosphonate DOTA^{ZOL} was developed. It showed an increased bone uptake compared to conjugates with simple bisphosphonates like BPAPD in *ex vivo* biodistribution studies in healthy rats [2]. Nevertheless, problems were described for the coupling of the zoledronate derivative to the chelator due to the decomposition of the DOTA-NHS-ester (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid mono-*N*-hydroxysuccinimide ester) [2]. The requirement of a bisphosphonate with a heterocyclic nitrogen-containing side chain led to the idea of a DOTA^{ZOL} analog obtained via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. The triazole which is built during this reaction could substitute the imidazole ring of zoledronic acid. Figure 1 shows a possible structure of such an analog. In the following, synthesis efforts are described.

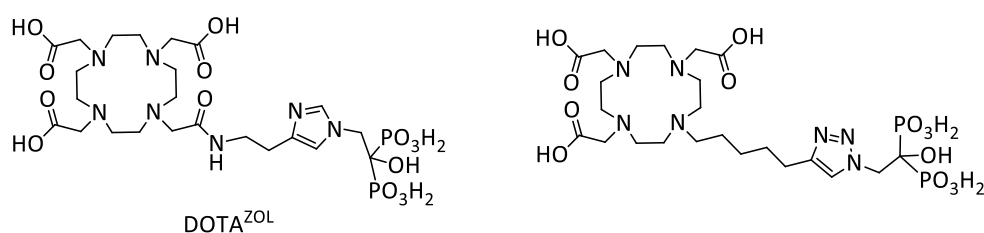


Figure 1: Structure of DOTA^{ZOL} and planned structure of an analogous derivative via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.

Materials and Methods

Chemicals and instrumentation

All chemicals (purity >95 %) and solvents (HPLC-grade purity) were purchased from CheMatech (Dijon, France), Merck (Darmstadt, Germany) TCI (Eschborn, Germany) and VWR International (Darmstadt, Germany) and used as received without further purification.

¹H NMR (nuclear magnetic resonance) spectra were acquired using a Bruker Avance III HD 300. Chemical shifts are given in parts per million downfield from TMS ($\delta = 0$ ppm) referred to the solvent residual signal. Mass spectra (ESI-MS) were recorded on an Agilent 6100 Series Quadrupole LC/MS System.

Synthetic procedures

7-bromohept-1-yne (2)

To a solution of 6-heptyn-1-ol **1** (1.00 g, 1.12 mL, 8.92 mmol) in dry dichloromethane (20 mL) cooled to 0 °C was added tetrabromomethane (4.43 g, 1.30 mL, 13.37 mmol) and triphenylphosphine (3.51 g, 13.37 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h. After removal of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate 1:1) to give **2** (1.56 g, 8.91 mmol, 99 %) as a yellowish liquid

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.41 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.31 (s, 2H), 2.27-2.16 (m, 2H), 1.95 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 1.92-1.82 (m, 2H), 1.61-1.51 (m, 4H).

DO3A-tert-butyl ester (4)

To a solution of cyclen **3** (2.00 g, 11.63 mmol) in dry acetonitrile (20 mL) was added NaHCO₃ (3.04 g, 36.05 mmol). A solution of *tert*-butyl bromoacetate (6.80 g, 5.20 mL, 34.88 mmol) in dry acetonitrile (5 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solid was filtered off and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was recrystallized from toluene for two times to yield **4** (2.67 g, 5.22 mmol, 45 %) as a colourless solid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.39 (s, 4H), 3.31 (s, 2H), 3.11 (m, 4H), 2.92 (m, 12H), 1.48 (s, 18H), 1.47 (s, 9H).

ESI-LC/MS: m/z calcd for C₂₆H₅₀N₄O₆ + H⁺ 515.38, found 515.4.

tert-butyl 2,2',2''-(10-(hept-6-ynyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetate (5)

To a solution of DO3A-*tert*-butyl ester **4** (100 mg, 0.18 mmol) in dry acetonitrile (3 mL) were added K₂CO₃ (48 mg, 0.35 mmol) and catalytic amounts of potassium iodide. After addition of 7-bromohept-1-yne **2** (46 mg, 37 μL, 0.26 mmol), the reaction mixture was stirred overnight at 80 °C. The solid was filtered off and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, chloroform/methanol 15:1 + 3 % NH₃(aq)) to give **5** (18 mg, 0.03 mmol, 17 %) as a yellow viscous oil.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.32-3.01 (m, 8H), 2.98-2.73 (m, 8H), 2.46-2.24 (m, 10H), 2.18 (td, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2H), 1.91 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.49 (s, 18H), 1.46 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H).

ESI-LC/MS: *m/z* calcd for C₃₃H₆₀N₄O₆ + H⁺ 609.46, found 609.5.

tert-butyl dimethylsilyloxydiethyl phosphonic ester (8)

To a solution of lithium bis(trimethylsilyl)amide (1 M in tetrahydrofuran, 7.24 mL, 7.24 mmol) cooled to 0 °C was added dropwise diethyl phosphite **7** (1.00 g, 932 μL, 7.24 mmol) dissolved in tetrahydrofuran (5 mL). After stirring at room temperature for 45 min, the reaction mixture was cooled to 0 °C and *tert*-butyl dimethylsilyl chloride **6** (1.31 g, 8.69 mmol) was added. After stirring overnight at room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the residue was distilled (70 °C, 2 mbar) to give **8** (1.24 g, 4.91 mmol, 68 %) as a colourless liquid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.92-3.80 (m, 4H), 1.26 (td, *J* = 7.1, 0.6 Hz, 6H), 0.95 (s, 9H), 0.19 (d, *J* = 0.5 Hz, 6H).

tetraethyl 2-(benzyloxy)-1-(tert-butyl dimethylsilyloxy)ethane-1,1-diyl diphosphonate (9)

To a solution of benzyloxyacetyl chloride (150 mg, 176 μL, 0.81 mmol) in dichloromethane (3 mL) cooled to 0 °C was added a solution of *tert*-butyl dimethylsilyloxydiethyl phosphonic ester **8** (615 mg, 2.44 mmol) in dichloromethane (1 mL). After stirring at room temperature for 30 min, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/(ethyl acetate/ethanol 3:1) 7:1) to give **9** (421 mg, 0.78 mmol, 96 %) as a colourless viscous liquid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.49-7.21 (m, 5H), 4.56 (s, 2H), 4.33-3.89 (m, 8H), 1.29 (dt, *J* = 12.1, 7.1 Hz, 14H), 0.90 (s, 9H), 0.16 (s, 6H).

ESI-LC/MS: *m/z* calcd for C₂₃H₄₄O₈P₂Si + H⁺ 539.24, found 539.3.

tetraethyl 1-(tert-butyldimethylsilyloxy)-2-hydroxyethane-1,1-diyl diphosphonate (10)

To a solution of **9** (500 mg, 1.12 mmol) in dry tetrahydrofuran (10 mL) was added palladium hydroxide on activated carbon (10 wt.%). The reaction mixture was stirred at room temperature under hydrogen atmosphere for 1 h. After filtration and evaporation of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/(ethyl acetate/ethanol 3:1) 3:1) to give **10** (378 mg, 0.84 mmol, 76 %) as a colourless viscous liquid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.30-4.11 (m, 10H), 1.42-1.24 (m, 12H), 0.92 (s, 9H), 0.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 6H).

ESI-LC/MS: *m/z* calcd for C₁₆H₃₈O₈P₂Si + H⁺ 449.19, found 449.2.

7-benzyloxy-hept-1-yne (14)

To a suspension of sodium hydride (60 % dispersion in mineral oil, 117.63 mg, 4.90 mmol) in dry tetrahydrofuran (10 mL) cooled to 0 °C was added a solution of 6-heptyn-1-ol **1** (500 mg, 558 μL, 4.46 mmol) in dry tetrahydrofuran (3 mL). After stirring for 10 min, benzyl bromide (839 mg, 582 μL, 4.90 mmol) was added dropwise followed by tetrabutylammonium iodide (2.5 mg). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature before being quenched by the addition of water (5 mL). The aqueous layer was extracted with diethylether (2 x 20 mL) and the combined organic layers were washed with brine. After drying with Na₂SO₄ and removal of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography (silica gel, hexane/ethyl acetate 30:1) to give **14** (666 mg, 3.29 mmol, 74 %) as a colourless liquid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.45-7.28 (m, 5H), 4.53 (s, 2H), 3.51 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.22 (td, *J* = 6.8, 2.6 Hz, 2H), 1.97 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H), 1.76-1.44 (m, 6H).

ESI-LC/MS: *m/z* calcd for C₁₄H₁₈O + H⁺ 203.14, found 203.1.

methyl 2-(4-(5-(benzyloxy)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetate (16)

To a solution of 7-benzyloxy-hept-1-yne **14** (200 mg, 0.99 mmol) and methyl 2-azidoacetate **15** (114 mg, 0.99 mmol) in water/*tert*-butanol 1:1 was added sodium ascorbate (0.1 M, 99 μL) and CuSO₄ (0.1 M, 198 μL). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. *Tert*-butanol was removed under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with dichloromethane. After drying with Na₂SO₄ and removal of the solvent under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography (silica gel, dichloromethane/ethanol 50:1) to give **16** (92 mg, 0.29 mmol, 29 %) as yellowish viscous liquid.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.42 (s, 1H), 7.39-7.25 (m, 5H), 5.14 (s, 2H), 4.41 (s, 2H); 3.82 (s, 3H), 3.50 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.84-2.70 (m, 2H), 1.83-1.58 (m, 4H), 1.54-1.42 (m, 2H).

ESI-LC/MS: *m/z* calcd for C₁₇H₂₃N₃O₃ + H⁺ 318.18, found 318.2.

2-(4-(5-(benzyloxy)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid (17)

To a solution of **16** (100 mg, 0.32 mmol) in tetrahydrofuran (1.5 mL) was added lithium hydroxide solution (0.25 M, 1.51 mL, 0.38 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. After removal of the solvents under reduced pressure, **17** was used without further purification.

ESI-LC/MS: *m/z* calcd for C₁₆H₂₁N₃O₃ + H⁺ 304.17, found 304.2.

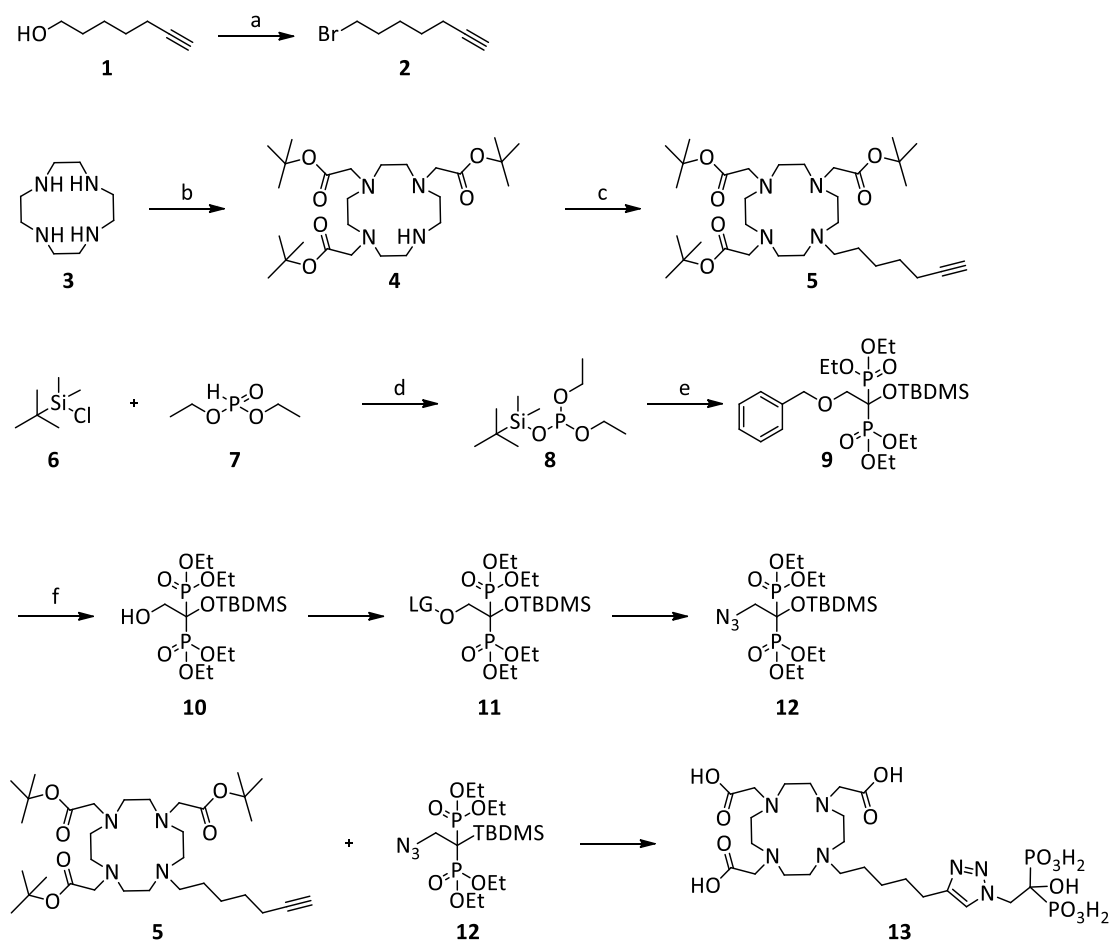
2-(4-(5-(benzyloxy)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetyl chloride (18)

To a solution of **17** (0.32 mmol) in dry dichloromethane was added oxalyl chloride (160 mg, 108 μL, 1.26 mmol). After stirring at room temperature for 20 min, the volatiles were removed under reduced pressure. The residue was kept in a vacuum of 1 x 10⁻³ mbar for 2 h and **18** was used in the next step without further purification.

ESI-LC/MS: *m/z* calcd for C₁₈H₂₆N₃O₃ + H⁺ 332.20, found 332.2 (ethyl ester of **18**, obtained after adding ethanol to a sample of the reaction mixture).

Results and Discussion

The planned synthesis of the chelator-conjugated heterocyclic nitrogen-containing bisphosphonate (Figure 1) comprised the preparation of a bisphosphonate bearing an azide (**12**) and a DOTA derivative (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) containing an alkyne linker (**5**). The Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition using both compounds and following removal of protecting groups should provide the final product **13** (Scheme 1).

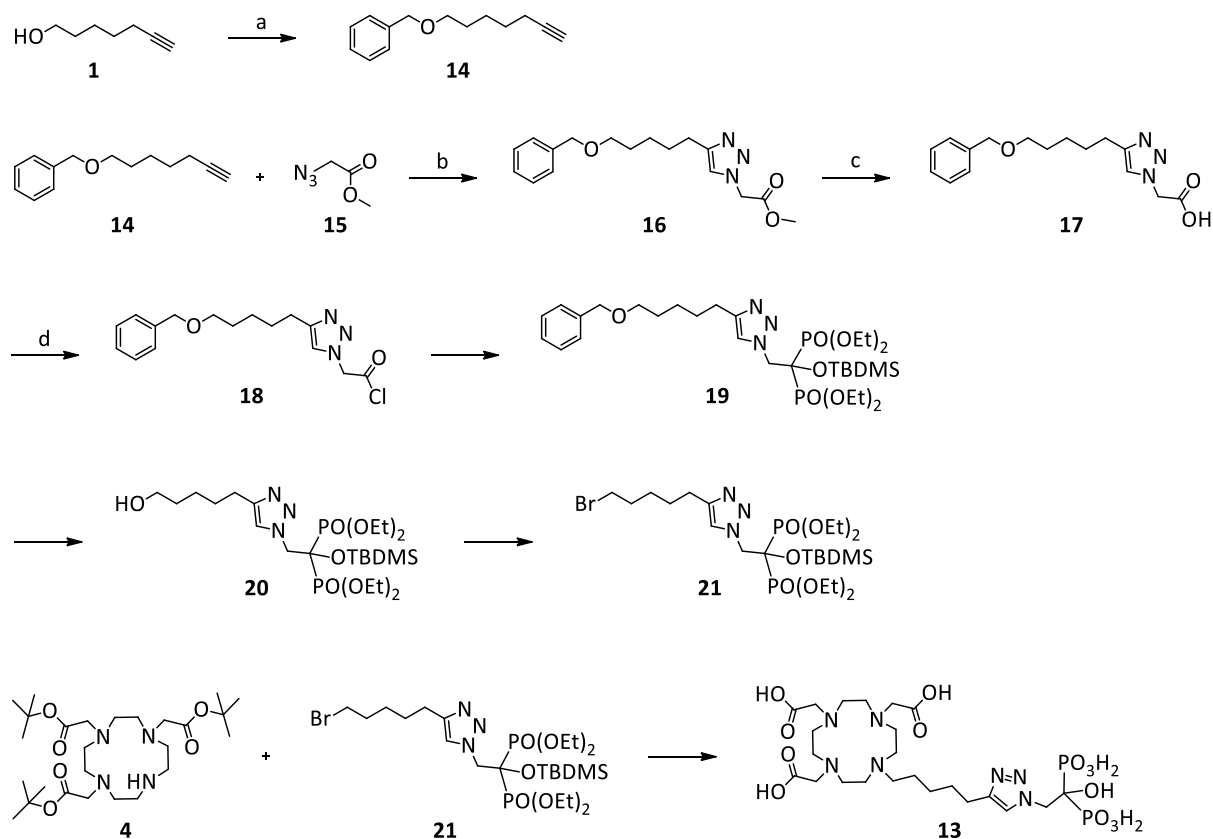


Scheme 1: Planned synthesis to obtain the chelator-conjugated heterocyclic nitrogen-containing bisphosphonate 13. Reagents: (a) tetrabromomethane and triphenylphosphone in dichloromethane; (b) *tert*-butyl bromoacetate and NaHCO₃ in acetonitrile; (c) 7-bromohept-1-yne 2 and K₂CO₃ in acetonitrile; (d) lithium bis(trimethylsilyl)amide solution 1.0 M in tetrahydrofuran; (e) benzyloxyacetyl chloride in dichloromethane; (f) H₂, Pd(OH)₂/C in tetrahydrofuran.

Via Appel reaction, the brominated alkyne linker **2** was synthesized from 6-heptyn-1-ol **1**. Based on cyclen **3**, the DO3A-*tert*-butyl ester **4** was synthesized followed by nucleophilic substitution to give the DOTA derivative **5** ready for coupling in a Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. The synthesis of the azido bisphosphonate **12** was started by reaction of benzyloxyacetyl chloride with *tert*-butyldimethylsilyloxydiethyl phosphonic ester **8**, which was synthesized from *tert*-butyldimethylsilyl chloride **6** and diethyl phosphite **7**. After removal of the benzyl group of the protected hydroxybisphosphonate **9** by hydrogenation to give the alcohol **10**, a leaving group (LG) should be attached to enable the subsequent nucleophilic substitution by sodium azide yielding the azido bisphosphonate **12**. The addition of different leaving groups was examined. Bromination of the alcohol **10** via Appel reaction or using PBr₃ was not successful. Reaction of the alcohol with *p*-toluenesulfonyl chloride under different reaction conditions using pyridine, triethylamine and 4-dimethylaminopyridine in dichloromethane, silver(I) oxide in dichloromethane, sodium hydroxide in tetrahydrofuran/water 1:1, sodium hydride in tetrahydrofuran or 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane in

dichloromethane did not yield any reaction. The same result was obtained trying to treat the alcohol with methanesulfonyl chloride. This not occurring reaction could result from poor deprotonation of the alcohol or steric hindrance due to the proximity of the protected bisphosphonate group. The use of strong bases like sodium hydride led to a decomposition of the educt.

Owing to the lack of an azido bisphosphonate, the planned synthesis route was not further pursued. In a new synthesis route, the Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition should be conducted before the synthesis of the hydroxybisphosphonate (Scheme 2).



Scheme 2: New synthesis route to obtain the chelator-conjugated heterocyclic nitrogen-containing bisphosphonate 13. Reagents: (a) benzyl bromide, NaH 60% and tetrabutylammonium iodide in tetrahydrofurane; (b) CuSO₄ and sodium ascorbate in water/*tert*-butanol 1:1; (c) lithium hydroxide solution 0.25 M/tetrahydrofurane 1:1; (d) oxalyl chloride in dichloromethane.

This synthesis route started with the protection of the hydroxyl group of 6-heptyn-1-ol **1** by reaction with benzyl bromide to give 7-benzyloxyhept-1-yne **14**. Subsequent Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition of **14** with methyl 2-azidoacetate **15** yielded the triazole **16**. This triazole should function as the nitrogen-containing heterocyclic component analog to the imidazole ring of zoledronic acid. Cleavage of the methyl ester using lithium hydroxide was followed by reaction of the carboxylic acid **17** with thionyl chloride to give the corresponding acyl chloride **18**. Based on this acyl chloride, the

protected hydroxybisphosphonate **19** should be synthesized using *tert*-butyldimethylsilyloxydiethyl phosphonic ester **8** analog to the synthesis of **9** in Scheme 1. A reaction was observed during synthesis control via LC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry), but a purification of **19** by column chromatography has not yet been achieved.

Purification of the protected hydroxybisphosphonate **19** has to be further evaluated. It seems to exhibit too strong interaction with the used silica gel leading to too high retention. Hence, purification via RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography) should be examined.

References

- [1] Russell, R.G.G.; Watts, N.B.; Ebetino, F.H.; Rogers, M.J. Mechanisms of action of bisphosphonates: Similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int*, **2008**, 19, 733–759.
- [2] Meckel, M.; Bergmann, R.; Miederer, M.; Roesch, F. Bone targeting compounds for radiotherapy and imaging: ¹⁷⁷Lu(III)-DOTA conjugates of bisphosphonic acid, pamidronic acid and zoledronic acid. *EJNMMI radiopharm. chem.*, **2017**, 1, 1481.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Metastasierung eines Primärtumors in den Knochen stellt für den Patienten eine massive Beeinträchtigung dar. Symptome dieser Knochenmetastasen wie starke Schmerzen, Frakturen oder Rückenmarkskompressionen wirken sich deutlich auf die Lebensqualität aus. Die Metastasierung wird häufig erst sehr spät im Krankheitsverlauf erkannt, oftmals erst aufgrund des Eintretens von Knochenschmerzen. Eine zuverlässige und frühzeitige Diagnose, vor allem bei Primärtumoren mit hohem Risiko der Bildung von Knochenmetastasen, ist daher die Grundlage für eine adäquate Therapie. Trotz des medizinischen Fortschritts ist eine kurative Behandlung dieser Erkrankung auch weiterhin nicht möglich und so liegt das Hauptaugenmerk auf der palliativen Therapie, um den Gesamtzustand des Patienten zu verbessern. Sowohl für die Diagnose als auch die Therapie hat sich in den letzten Jahrzehnten die Anwendung von Radiopharmaka bewährt. Hierzu zählen unter anderem Verbindungen, die auf der Knochenaffinität der Phosphonat-Struktur basieren. Insbesondere Chelator-konjugierte Bisphosphonate besitzen großes Potential für die Anwendung in der Diagnose und Endoradiotherapie von Knochenmetastasen, unter anderem aufgrund der hohen Stabilität der Metallkomplexe und der Vielseitigkeit dieser Verbindungen hinsichtlich des verwendeten Radionuklids. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Konzept der Chelator-konjugierten Bisphosphonate weiter verbessert und erweitert im Hinblick auf den an das Bisphosphonat gekoppelten Chelator, die Möglichkeit eines *dual targeting* durch Anbringen eines zweiten unterschiedlichen Targetvektors und die Anwendung für die α -Therapie.

Bifunktionaler Chelator

Um die Markierungseigenschaften des in Analogie zum DOTA^{ZOL} entwickelten NODAGA-Derivats NODAGA^{ZOL} mit ⁶⁸Ga zu untersuchen, wurden Markierungskinetiken über 15 Minuten in Abhängigkeit von der eingesetzten Vorläufermenge aufgenommen. NODAGA^{ZOL} ermöglicht eine schnelle, quantitative und robuste Markierung. Bereits mit Stoffmengen ab 5 nmol konnten Markierungsausbeuten größer 98 % innerhalb von 10 Minuten erhalten werden. Es erleichtert somit die Radiomarkierung mit ⁶⁸Ga im Vergleich zum DOTA^{ZOL}. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} zeigte eine hohe Stabilität von mehr als 98 % bei Inkubation in humanem Serum sowie PBS, das als Injektionsmedium verwendet wird, bei 37 °C über zwei Stunden. In der anschließenden *in vivo*-Evaluierung in gesunden Ratten zeigte [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} sowohl in den PET-Aufnahmen als auch in den *ex vivo*-Biodistributionsstudien eine hohe und vor allem schnelle Knochenakkumulation, eine sehr geringe Aufnahme in anderen Organen und Geweben sowie eine schnelle renale Clearance. Infolgedessen wurde ein sehr gutes Target-zu-Hintergrund-Verhältnis erhalten. Die PET-Aufnahmen zeigten, dass die

Knochenaufnahme vorwiegend in den hochmetabolischen Gelenkregionen stattfand (Abbildung 1). Diese Aufnahme im Bereich der Epiphysenfugen, dem Ort des Knochenwachstums, erlaubt Vorhersagen über die Anreicherung des Tracers in Knochenmetastasen, die ebenfalls durch einen erhöhten Knochenumbau gekennzeichnet sind.

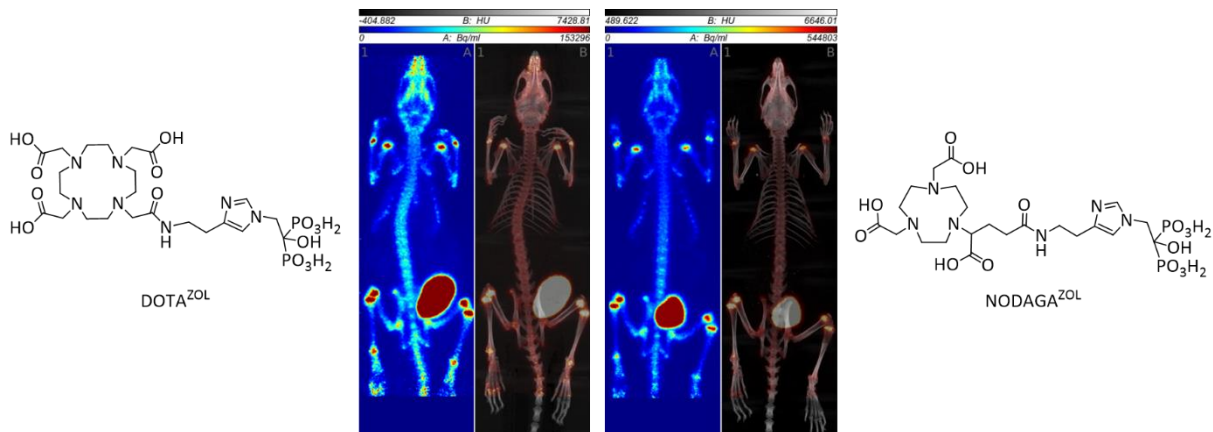


Abbildung 1: Struktur von DOTA^{ZOL} und NODAGA^{ZOL} sowie PET-Aufnahmen von [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} und [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} in gesunden Ratten.

Ein Vergleich der Bioverteilung von [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} und [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} zeigte eine höhere Knochenaufnahme des NODAGA-Derivats bei gleichzeitig schnellerer Blutclearance. Daraus resultierten höhere Femur-zu-Blut- bzw. Femur-zu-Muskel-Verhältnisse für [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} und damit insgesamt ein besseres Target-zu-Hintergrund-Verhältnis. Diese höhere Knochenaufnahme von NOTA-konjugierten im Gegensatz zu DOTA-konjugierten Bisphosphonaten wurde bereits beim Vergleich von [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} und [⁶⁸Ga]Ga-BPAMD beobachtet. Diese erste *in vivo*-Evaluierung von [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} lässt auf ein hohes diagnostisches Potential dieses Tracers schließen. Kürzlich gewonnene Daten am Patienten bestätigen diese Aussage. Abbildung 2 zeigt einen Vergleich von [^{99m}Tc]Tc-MDP, [¹⁸F]NaF und [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} an einem Patienten mit multiplen ossären Metastasen. Die beiden PET-Tracer identifizieren mehr und kleinere Knochenmetastasen als der SPECT-Tracer. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} ist qualitativ mindestens äquivalent zu [¹⁸F]NaF. Zusammen mit den sehr guten bisherigen Ergebnissen des [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} sowohl in Ratten als auch in ersten Patientenanwendungen ist NODAGA^{ZOL}/DOTA^{ZOL} ein vielversprechendes theranostisches Molekülpaar.

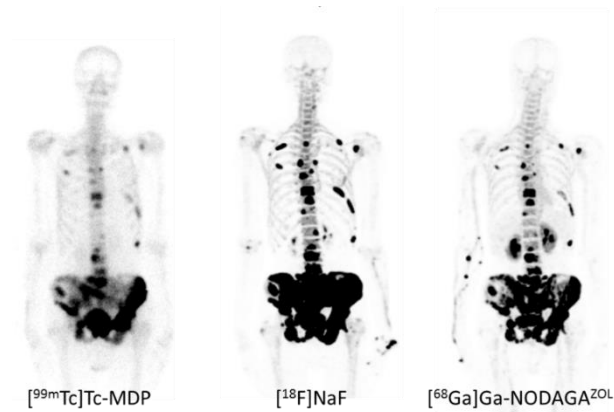


Abbildung 2: Vergleich der Diagnostik von Knochenmetastasen via SPECT bzw. PET unter Verwendung von $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MDP}$, $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ an einem Patienten mit multiplen ossären Metastasen [1].

Targetvektor

Für die Synthese eines Chelator-konjugierten Bisphosphonats, dessen stickstoffhaltige heterozyklische Seitenkette durch eine Cu(I)-katalysierte Azin-Alkin-Cycloaddition erhalten werden sollte (Abbildung 3), war zunächst die Darstellung eines DOTA-Derivats mit Alkinlinker sowie eines geschützten Hydroxybisphosphonats mit Azidrest geplant. Da jedoch die Synthese des Bisphosphonatazids nicht erfolgreich war und die vorgesehene Cycloaddition nicht durchgeführt werden konnte, wurde eine andere Syntheseroute gewählt. Hierbei sollte die Synthese des geschützten Hydroxybisphosphonats erst nach der Cycloaddition erfolgen. Die Darstellung des Triazols war erfolgreich und die Reaktionskontrolle mittels Massenspektrometrie während der Umsetzung des entsprechenden Säurechlorids zum Hydroxybisphosphonat lieferte den erwarteten Massepeak. Die Isolierung des Produkts war jedoch bisher nicht erfolgreich. Das Produkt schien eine starke Wechselwirkung mit dem zur Aufreinigung verwendeten Kieselgel zu haben und dadurch eine zu hohe Retention. Die Aufreinigung mittels RP-HPLC ist daher denkbar und steht noch aus.

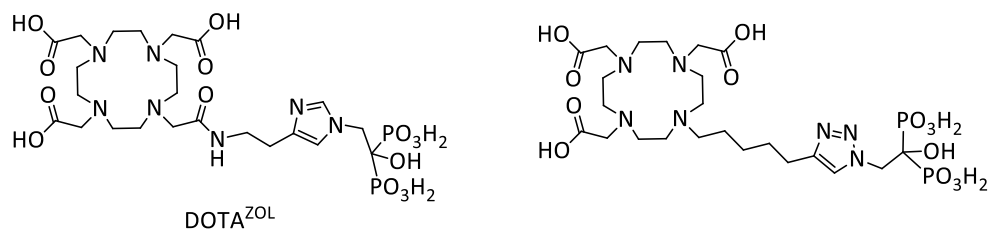


Abbildung 3: In Anlehnung an DOTA^{ZOL} geplante Struktur des Chelator-konjugierten Bisphosphonats, dessen stickstoffhaltiger Heterozyklus über eine Cu(I)-katalysierte Azin-Alkin-Cycloaddition erhalten werden sollte.

Neben den Bisphosphonaten finden auch Harnstoff-basierte peptidomimetische Inhibitoren des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) seit einigen Jahren verstärkt Anwendung bei der Diagnose und Therapie von metastasierten Prostatakarzinomen. Hierzu zählt auch der weithin angewandte Tracer PSMA-11, dessen Potential hinsichtlich der Detektion von Knochenmetastasen im Rahmen dieser Arbeit mit NO2AP^{BP}, einem literaturbekannten Chelator-konjugierten Bisphosphonat, verglichen wurde. Zunächst wurde die Kinetik der Aufnahme von [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} über einen Zeitraum von zwei Stunden in 5 PET-Scans an einem Prostatakarzinompatienten untersucht. [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} zeigte eine anfänglich schnelle Aufnahme in allen Knochenmetastasen, die nach etwa einer Stunde ein Plateau erreichte (Abbildung 4). Neben der schnellen Anreicherung in den Metastasen konnte eine schnelle renale Clearance beobachtet werden. Der zunächst hohe SUV in den Nieren sank innerhalb des untersuchten Zeitraums von zwei Stunden deutlich ab. Alle anderen Organe zeigten lediglich eine sehr geringe Aktivitätsaufnahme, was auch für eine schnelle Blutclearance spricht. Mit Hilfe dieser aufgenommenen Kinetik konnte auch gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der PET-Aufnahme nach Injektion keine großen Auswirkungen auf die Resultate hat, solange wenigstens eine Stunde zwischen Injektion und Aufnahme liegt.

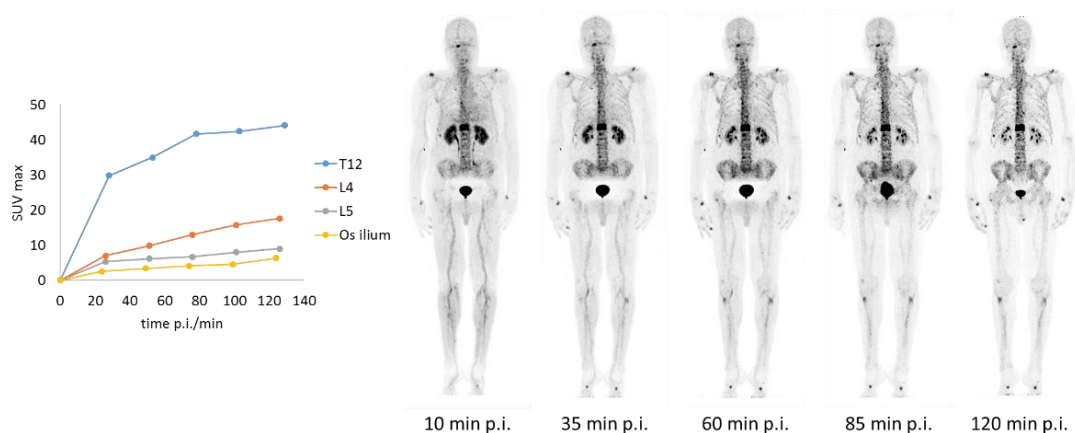


Abbildung 4: Akkumulation von [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} in den Knochenmetastasen eines Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom über zwei Stunden und PET-Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Injektion von [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP}.

Anschließend wurde die Aufnahme von [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} und [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in den Knochenmetastasen sowie anderen Organen und Geweben in zwei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom anhand von PET-Aufnahmen verglichen. In 8 von 9 Knochenmetastasen zeigte [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} eine höhere Anreicherung als [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11, im Schnitt war die Anreicherung in identischen Metastasen dreimal höher. Gleichzeitig konnte im Falle von [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} eine geringere Aktivitätsanreicherung in den Organen beobachtet werden. Deutliche Unterschiede zeigten

sich vor allem für Leber, Milz und Nieren, was auch in den PET-Aufnahmen in Abbildung 5 gut zu erkennen ist.

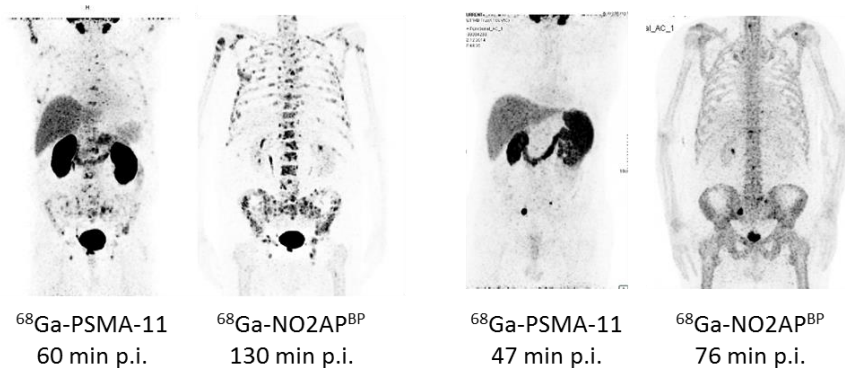


Abbildung 5: PET-Aufnahmen zweier Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom nach Injektion von [^{68}Ga]Ga-NO₂AP^{BP} bzw. [^{68}Ga]Ga-PSMA-11.

Das Potential von [^{68}Ga]Ga-NO₂AP^{BP} wurde bereits in der Literatur beschrieben [2]. Eine weitere Fragestellung dieser Evaluierung, die über die einfache diagnostische Anwendung hinausgeht, betrifft jedoch die Therapie von Patienten mit Knochenmetastasen. Für beide Arten von Radiopharmaka, Bisphosphonate als auch PSMA-Liganden, stehen ^{177}Lu -markierte Derivate zur Verfügung. Den hier beschriebenen Daten nach zu urteilen, eignen sich Bisphosphonate sehr gut für die therapeutische Anwendung. Zum einen aufgrund der hohen Knochenaufnahme und zum anderen insbesondere wegen der geringen Akkumulation in gesunden Organen, wodurch sich eine unnötige Strahlenbelastung vermeiden lässt.

Um beide Mechanismen der Bindung an Knochenmetastasen vereinen zu können, sollte ein Bisphosphonat-konjugierter PSMA-Ligand entwickelt werden. Dieser könnte aufgrund des *dual targeting* eine noch höhere Affinität und im Idealfall die typische schnelle Clearance eines Bisphosphonats aufweisen. Ein solches Derivat konnte in insgesamt 20 Stufen synthetisiert werden, die sich in drei Abschnitte unterteilen lassen. Zunächst wurde auf Basis des DOTAGA-Chelators ein Chelator-konjugiertes Bisphosphonat dargestellt. Durch die Verwendung von DOTAGA statt DOTA ließen sich trotz zweifacher Substitution am Chelator 7 Koordinationsstellen erhalten, was die Grundvoraussetzung für die stabile Komplexbildung größerer Nuklide, wie dem Therapienuklid ^{177}Lu , ist. Die Synthese des PSMA-Liganden erfolgte entsprechend der literaturbekannten Festphasensynthese von PSMA-617 [3]. Es folgte die Kopplung des Chelator-konjugierten Bisphosphonats als letzter Schritt der Festphasensynthese sowie die Abspaltung vom Harz und die Entfernung aller Schutzgruppen. Das so erhaltene Bisphosphonat-PSMA-Konjugat BPDPMSA vereint die Strukturen der bekannten Tracer BPAMD und PSMA-617 (Abbildung 6).

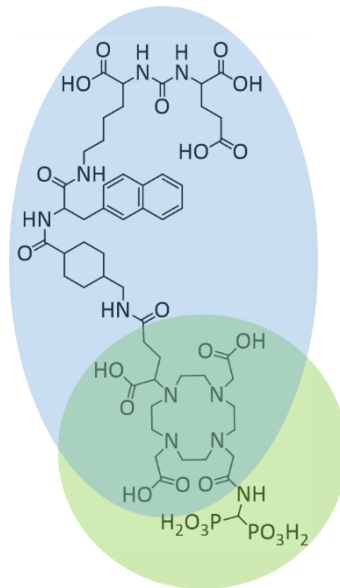


Abbildung 6: Struktur von BPDPSMA auf Basis von BPAMD (grün) und PSMA-617 (blau).

Um die Markierungseigenschaften von BPDPSMA mit ^{68}Ga zu untersuchen, wurden Markierungskinetiken über 15 Minuten in Abhängigkeit von der eingesetzten Vorläufermenge aufgenommen. Mit Stoffmengen von 10-15 nmol konnten radiochemische Ausbeuten $\geq 95\%$ erhalten werden. Die Stabilität des Komplexes in humanem Serum und PBS wurde durch Inkubation von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -BPDPSMA in beiden Medien bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ über zwei Stunden untersucht. Der Komplex zeigte eine Stabilität von $\geq 93\%$ in humanem Serum und $\geq 99\%$ in PBS. Das *in vivo*-Verhalten von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -BPDPSMA wurde daraufhin in gesunden Ratten im Hinblick auf die Knochenaufnahme sowie in tumortragenden Mäusen mit Hauptaugenmerk auf die Tumoraufnahme evaluiert. $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}$ -BPDPSMA zeigte in den Tumortieren sowohl Akkumulation im Tumor als auch in hochmetabolischen Knochenregionen. Die PET-Aufnahmen der gesunden Tiere zeigten die für Bisphosphonate typische Anreicherung in den Epiphysenfugen (Abbildung 7). In dieser ersten *in vivo*-Evaluierung konnte somit gezeigt werden, dass beide im Molekül vorhandenen Targetvektoren noch aktiv sind und es somit zur Anreicherung in beiden Zielregionen kommt.

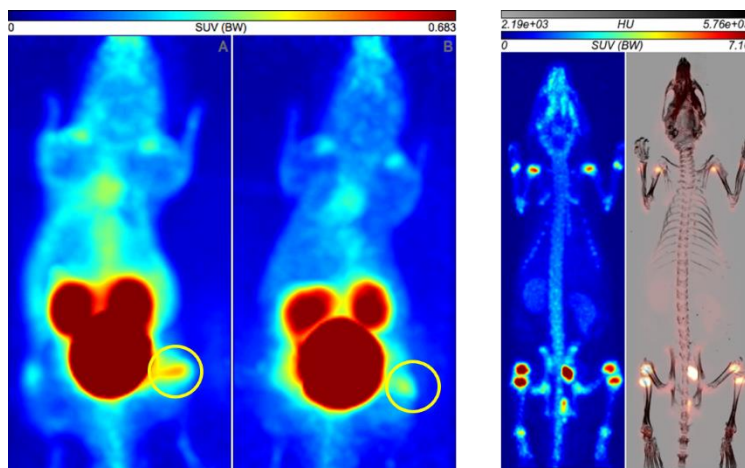


Abbildung 7: PET-Aufnahmen zweier LNCaP-tumortragender Mäuse (links) sowie PET/CT-Aufnahme einer gesunden Ratte (rechts) nach Injektion von $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-BPDPSMA}$.

Radionuklid

Ein Vorteil Chelator-konjugierter Bisphosphonate ist die Möglichkeit der Komplexierung unterschiedlicher Radionuklide. Die Verwendung weiterer Radionuklide erweitert das Anwendungsspektrum dieser Verbindungen. So kann beispielsweise ^{64}Cu aufgrund seiner Umwandlung unter γ -, β^+ - und β^- -Emission sowohl für diagnostische als auch therapeutische Zwecke eingesetzt werden [4]. Außerdem bietet es eine längere Halbwertszeit als ^{68}Ga . Da sich dieses Nuklid mit NOTA-basierten Chelatoren stabil komplexieren lässt [5], wurde das bereits erwähnte $\text{NODAGA}^{\text{ZOL}}$ neben ^{68}Ga auch mit ^{64}Cu markiert und anschließend in Form von PET-Aufnahmen und *ex vivo*-Biodistributionsstudien in gesunden Ratten untersucht. $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ zeigte eine nahezu identische Bioverteilung wie $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ hinsichtlich der sehr schnellen und hohen Knochenanreicherung bevorzugt im Bereich der Epiphysenfugen sowie einer schnellen renalen Ausscheidung und der bekannten geringen Anreicherung in allen anderen Geweben. All dies resultierte in einem sehr guten Target-zu-Hintergrund-Verhältnis und aufgrund der geringeren β -Energie von ^{64}Cu im Vergleich zu ^{68}Ga konnten außerdem noch kontrastreichere Aufnahmen erhalten werden (Abbildung 8). Neben der bereits früher beobachteten höheren Knochenaufnahme von NOTA-konjugierten im Gegensatz zu DOTA-konjugierten Bisphosphonaten wurde aufgrund der nochmals deutlich höheren Knochenanreicherung von $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ im Vergleich zu $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-NODAGA}^{\text{ZOL}}$ auch ein Einfluss des verwendeten Radionuklids vermutet. Die Ergebnisse der daraufhin durchgeführten PET-Aufnahme mit $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ erhärteten diese Vermutung. $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-DOTA}^{\text{ZOL}}$ zeigte ebenfalls eine höhere Knochenaufnahme als $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA}^{\text{ZOL}}$.

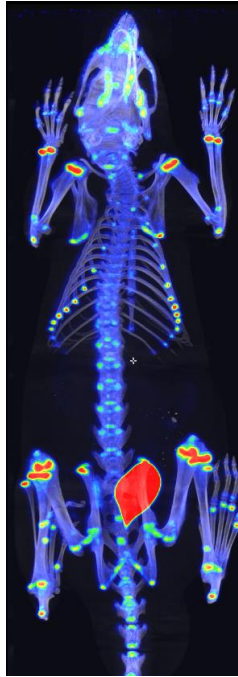


Abbildung 8: PET-Aufnahme einer gesunden Ratte nach Injektion von [^{64}Cu]Cu-NODAGA^{ZOL}.

Neben der Anwendung von β -Emittlern für Diagnose und Therapie sollte das Konzept der Chelator-konjugierten Bisphosphonate auch auf das Gebiet der α -Therapie ausgedehnt werden. α -Partikel emittierende Radionuklide gelten als besonders vielversprechend für die Radionuklidtherapie, da sie im Vergleich zu β -Emittlern ein Vielfaches an Energie in einem deutlich begrenzteren Bereich abgeben. Der bereits mit ^{68}Ga und ^{177}Lu evaluierte Tracer DOTA^{ZOL} wurde daher mit dem α -Emitter ^{225}Ac markiert. Hierfür wurden zunächst geeignete Rahmenbedingungen für die Bestimmung der Aktivität sowie die Qualitätskontrolle geschaffen. Die Bestimmung der erhaltenen Aktivität erfolgte mittels α -Spektroskopie. Radiochemische Ausbeuten wurden mittels γ -Spektroskopie bestimmt. Hierzu wurde die γ -Emission des Tochternuklids ^{221}Fr ($E_{\gamma} = 218 \text{ keV}$) nach Einstellung des radiochemischen Gleichgewichts zwischen ^{225}Ac und ^{221}Fr genutzt. Die Bestimmung der injizierten Dosis für die *in vivo*-Evaluierung wurde mittels γ -Spektroskopie nach vorheriger Kalibrierung des γ -Spektrometers durchgeführt. Um die Markierungseigenschaften von DOTA^{ZOL} mit ^{225}Ac zu untersuchen, wurden Markierungskinetiken über 30 Minuten in Abhängigkeit von der eingesetzten Vorläufermenge aufgenommen. DOTA^{ZOL} konnte in 0,1 M Natriumascorbatlösung mit radiochemischen Ausbeuten $\geq 98 \%$ innerhalb von 30 Minuten markiert werden. Die Natriumascorbatlösung dient dabei gleichzeitig zur Einstellung des pH-Werts der Markierungslösung als auch als Radikalfänger, um die Radiolyse des erhaltenen Markierungsprodukts durch die emittierte α -Strahlung zu verhindern [6]. [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} konnte ohne weitere Aufreinigung für die nachfolgende Untersuchung des *in vivo*-Verhaltens in gesunden Ratten eingesetzt werden. Es wurden *ex vivo*-Biodistributionsstudien zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion durchgeführt (Abbildung 9). Insgesamt wurde die Bioverteilung von

[²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} über einen Zeitraum von 10 Tagen, also einer Halbwertszeit des Radionuklids, beobachtet. Das *in vivo*-Verhalten entsprach nahezu dem der bereits evaluierten Derivate [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} und [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL}. [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} zeigte eine schnelle und hohe Akkumulation am Knochen sowie eine schnelle renale Ausscheidung des ungebundenen Tracers. Die Anreicherung in anderen Organen und Geweben war sehr gering, was besonders für die α-Therapie von großer Bedeutung ist, um eine Schädigung gesunden Gewebes zu vermeiden. Lediglich die Leber zeigte eine gewisse, nahezu konstante Anreicherung an Aktivität, die eventuell von kleinen Mengen an mitinjiziertem freiem ²²⁵Ac stammen könnte. Da jedoch kein deutlicher Anstieg der Leberakkumulation mit der Zeit beobachtet wurde, wird nicht von einer Dekomplexierung *in vivo* ausgegangen. Alles in allem konnte [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in dieser ersten *in vivo*-Evaluierung sein großes Potential als Radiopharmakon für die α-Therapie unter Beweis stellen.

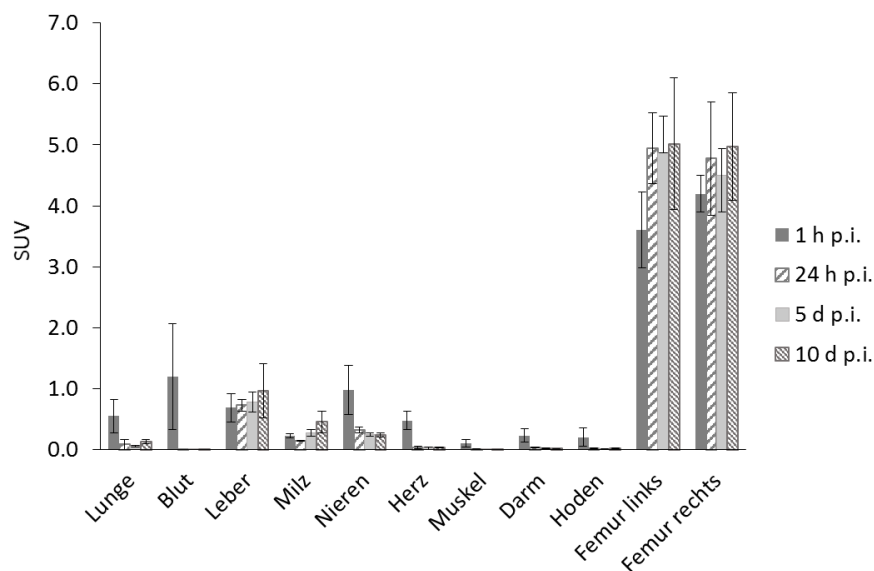


Abbildung 9: Bioverteilung von ²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} in gesunden Ratten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion.

Für die Zukunft gilt es, alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Radiotracer weiter zu evaluieren, mit dem Ziel, sie der humanen Anwendung zugänglich zu machen.

Nach erfolgreicher Evaluierung von [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} in Kleintieren sowie einer ersten vielsprechenden Anwendung am Patienten ist der nächste Schritt die systematische humane Applikation, um die bisher gezeigte hohe diagnostische Effizienz des Tracers zu bestätigen. Außerdem sollte auch im Patienten die Anreicherung von [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} und [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} verglichen werden, um die Verwendung beider Strukturen als theranostisches Molekülpaar zu ermöglichen.

Im Hinblick auf die Anreicherung von Bisphosphonat-basierten Verbindungen sowie PSMA-Liganden an Knochenmetastasen und in gesundem Gewebe sollten im Anschluss an [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} und

[⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 auch ¹⁷⁷Lu-markierte Derivate beider Verbindungsklassen im Patienten verglichen werden. Ziel ist dabei die bestmögliche Therapieoption für Patienten mit Knochenmetastasen, die eine möglichst hohe Anreicherung an den Metastasen bei gleichzeitiger niedriger Belastung für gesundes Gewebe gewährleistet.

Das neue Bisphosphonat-PSMA-Konjugat BPDPSMA sollte hinsichtlich seiner *in vitro*-Affinität zu PSMA sowie der Internalisierungsrate im Vergleich zu bekannten Verbindungen wie PSMA-11 und PSMA-617 untersucht werden. Außerdem sollte die Affinität zu Hydroxyapatit durch Aufnahme einer Adsorptionsisotherme untersucht und diese anschließend mit bekannten Bisphosphonaten wie BPAMD oder DOTA^{ZOL} verglichen werden. BPDPSMA stellt nur eine Möglichkeit der Kombination eines Bisphosphonats mit einem PSMA-Liganden dar. Synthetisch gesehen sind hier noch viele Variationen denkbar. Beispielsweise könnte der Abstand zwischen dem Chelator und dem Bisphosphonat variiert werden. Außerdem gilt es, das verwendete einfache Bisphosphonat durch ein Hydroxybisphosphonat bzw. ein stickstoffhaltiges Hydroxybisphosphonat der neusten Generation zu ersetzen, um so auch bei dieser Verbindung die Affinität zu Hydroxyapatit zu erhöhen. Alle so erhaltenen Derivate müssen dann wieder hinsichtlich ihrer Affinität zu PSMA bzw. Hydroxyapatit sowie ihres *in vivo*-Verhaltens untersucht werden.

Zuletzt sollte die Evaluierung von [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} abgeschlossen werden, um eine humane Anwendung zu ermöglichen. Um die erwähnte während der *in vivo*-Untersuchung des Tracers aufgetretene Aktivitätsanreicherung in der Leber zu vermeiden, sind zwei Lösungen denkbar. Mittels Kartuschenaufreinigung von [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} nach der Markierung könnte freies ²²⁵Ac³⁺ aus der Lösung entfernt werden. Ebenso möglich ist die Zugabe von DTPA zur Markierungslösung vor der Injektion, um freies ²²⁵Ac³⁺ zu komplexieren. Diese Vorgehensweise findet beispielsweise auch bei der Applikation von [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 Anwendung [7]. Eine erneute *in vivo*-Evaluierung müsste zeigen, ob sich dadurch die Leberakkumulation verringern lässt. Zusätzlich zur Bestimmung der Bioverteilung von [²²⁵Ac]Ac-DOTA^{ZOL} wurde im Laufe dieser Arbeit auch eine Untersuchung der Toxizität in denselben gesunden Ratten in die Wege geleitet. Nach Injektion der gleichen Aktivitätsmenge, die für die Biodistributionsstudien verwendet wurde, wird diesen Tieren über einen Zeitraum von 12 Wochen regelmäßig Blut abgenommen, um die Werte mit den Blutproben vor Injektion zu vergleichen. Ebenso kann anhand des Gewichts der Tiere im untersuchten Zeitraum eine Aussage über deren Gesundheitszustand getroffen werden. Innerhalb der ersten 8 Wochen dieser Untersuchung zeigten die Tiere keine erkennbaren Auffälligkeiten und eine normale Gewichtszunahme. Die anfänglich beobachtete leichte Hämatotoxizität ist vollständig zurückgegangen. Hierbei ist zu erwähnen, dass die injizierte Dosis von etwa 2 MBq/kg dem 20-fachen der injizierten Dosis von [²²⁵Ac]Ac-PSMA in der ersten Anwendung am Patienten entspricht [7]. Nach Ende der 12 Wochen gilt es, alle erhaltenen Blutwerte auszuwerten. Eine abschließende histologische Untersuchung der Nieren sowie der Leber

gibt außerdem Aufschluss über die Auswirkungen der emittierten Strahlung auf diese Organe. Im Falle eines positiven Ergebnisses dieser Toxizitätsuntersuchung wäre der nächste Schritt die Anwendung von [^{225}Ac]Ac-DOTA^{ZOL} im Patienten.

Referenzen

- [1] Bal, C.; Department of Nuclear Medicine & PET, All India Institute of Medical Sciences. Personal Communication.
- [2] Passah, A.; Tripathi, M.; Ballal, S.; Yadav, M.P.; Kumar, R.; Roesch, F.; Meckel, M.; Sarathi Chakraborty, P.; Bal, C. Evaluation of bone-seeking novel radiotracer ^{68}Ga -NO2AP-Bisphosphonate for the detection of skeletal metastases in carcinoma breast. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **2017**, *44*, 41–49.
- [3] Benešová, M.; Bauder-Wüst, U.; Schäfer, M.; Klika, K.D.; Mier, W.; Haberkorn, U.; Kopka, K.; Eder, M. Linker Modification Strategies To Control the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA)-Targeting and Pharmacokinetic Properties of DOTA-Conjugated PSMA Inhibitors. *J Med Chem*, **2016**, *59*, 1761–1775.
- [4] Anderson, C.J.; Ferdani, R. Copper-64 radiopharmaceuticals for PET imaging of cancer: Advances in preclinical and clinical research. *Cancer Biother Radiopharm*, **2009**, *24*, 379–393.
- [5] Price, E.W.; Orvig, C. Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev*, **2014**, *43*, 260–290.
- [6] Liu, S.; Ellars, C.E.; Edwards, D.S. Ascorbic acid: Useful as a buffer agent and radiolytic stabilizer for metalloradiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem*, **2003**, *14*, 1052–1056.
- [7] Kratochwil, C.; Bruchertseifer, F.; Giesel, F.L.; Weis, M.; Verburg, F.A.; Mottaghy, F.; Kopka, K.; Apostolidis, C.; Haberkorn, U.; Morgenstern, A. ^{225}Ac -PSMA-617 for PSMA-Targeted α -Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med*, **2016**, *57*, 1941–1944.

5. Anhang

5.1. Abkürzungsverzeichnis

%ID/g	Prozent injizierter Dosis pro Gramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunden
ν_e	Elektroneneutrino
σ	Neutroneneinfangsquerschnitt
abs.	absolut
Alloc	Allyloxycarbonyl
ATP	Adenosintriphosphat
b	Barn
BAT	<i>brown adipose tissue</i> , braunes Fettgewebe
BP	Bisphosphonat
BS	<i>bone scan</i> , Knochenszintigraphie
c	Lichtgeschwindigkeit
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
d	Tage
DC/TLC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure

DOTAGA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1-(glutarsäure)-4,7,10-triessigsäure
DOTATOC	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-4,7,10-tricarboxymethyl-1-yl-acetyl-D-Phe ¹ -Tyr ³ -octreotid
DOTMP	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetramethylenphosphonsäure
DOTP	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetramethylenphosphonsäure
DTPA	Diethylentriamintetraessigsäure
e ⁺	Positron
E _{βmax}	maximale β-Energie
E _γ	γ-Energie
EC	Elektroneneinfang
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTMP	Ethylendiamintetramethylenphosphonsäure
equiv	Äquivalent(e)
ESI	Elektronenspray-Ionisation
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FDA	U.S. Food and Drug Administration
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPPS	Farnesylpyrophosphatsynthase
g	Gramm
GBq	Gigabecquerel
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
hard. gl.	<i>harderian gland</i> , Hardersche Drüse
HBED	Hydroxybenzylethylenediamin

HEDP	1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure
HEHA	1,4,7,10,13,16-Hexaazacyclohexadecan- <i>N,N',N'',N''',N''''</i> , <i>N''''''</i> -hexaessigsäure
HMDP	Hydroxymethyldiphosphonat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSAB-Konzept	Konzept der „Harten und Weichen Säuren und Basen“
IT	isomere Umwandlung
J	Kopplungskonstante
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
LET	linearer Energietransfer
LC/MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i> , Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LOR	<i>line of response</i>
m	Ruhemasse des Elektrons
M	molar (Zusammenhang)
MDP	Methyldiphosphonat
MBq	Megabecquerel
MCi	Millicurie
MeV	Megaelektronenvolt
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter

mmol	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
n	Neutron
n.c.a.	<i>no carrier added</i>
NaOAc	Natriumacetat
nmol	Nanomol
NMR	Kernspinresonanz
NODAGA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarsäure-4,7-diessigsäure
NOTA	1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure
p	Proton (Zusammenhang)
PCa	Prostatakarzinom
PEPA	1,4,7,10,13-Pentaazacyclopentadecan- <i>N,N',N'',N''',N''''</i> -pentaessigsäure
p.i.	<i>post injection</i>
PBS	Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Ps	Positronium
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSMA	prostataspezifisches Membranantigen
Q	Energiebetrag, der bei β^+ -Umwandung frei wird
RCA/RCY	Radiochemische Ausbeute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SIRT	selektive interne Radiotherapie

SPECT	<i>single photon emission computed tomography,</i> Einzelphotonen- Emissionscomputertomographie
SUV	<i>standardized uptake value</i>
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TACN	Triazacyclononan
tert	tertiär
TMS	Tetramethylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
t_R	Retentionszeit
WAT	<i>white adipose tissue,</i> weißes Fettgewebe
y	Jahre
ZOL	Zoledronat

5.2. Beiträge zu den Manuskripten

Manuskript I: *⁶⁸Ga- und ¹⁷⁷Lu-markierte Bisphosphonate als Knochenmetastasen-Theranostika*

Für die Übersicht zum Stand der Entwicklung von ⁶⁸Ga- und ¹⁷⁷Lu-markierten Bisphosphonaten wurden durch mich die Ergebnisse aus der Literatur zusammengetragen sowie durch bis dahin nicht veröffentlichte Daten ergänzt und interpretiert. Das Ganze wurde unter Berücksichtigung von Ergänzungen und Verbesserungsvorschlägen der Co-Autoren zusammengefasst.

Manuskript II: *Novel radiolabelled bisphosphonates for PET diagnosis and endoradiotherapy of bone metastases*

Für den zweiten Übersichtsartikel wurde durch mich der aktuelle Stand der Diagnose und Therapie von Knochenmetastasen zusammengefasst und Weiterentwicklungen unserer Arbeitsgruppe sowie von Kooperationspartnern beschrieben. Für die erste Anwendung von [¹⁷⁷Lu]Lu-DOTA^{ZOL} am Patienten im Rahmen von Dosimetrieuntersuchungen wurde die Radiomarkierung von DOTA^{ZOL} mit ¹⁷⁷Lu eigenständig vor Ort durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden interpretiert und dem Artikel beigelegt.

Manuskript III: *NODAGA^{ZOL} and DOTA^{ZOL} for theranostics of bone metastases*

Für das Manuskript über die *in vivo*-Evaluierung von [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} sowie [⁶⁴Cu]Cu-NODAGA^{ZOL} und den Vergleich mit [⁶⁸Ga]Ga-DOTA^{ZOL} wurde durch mich zunächst die Radiomarkierung von NODAGA^{ZOL} mit ⁶⁸Ga in Abhängigkeit von der eingesetzten Vorläufermenge evaluiert und schließlich im Hinblick auf die anschließende *in vivo*-Evaluierung etabliert. [⁶⁸Ga]Ga-NODAGA^{ZOL} wurde hinsichtlich seiner *in vitro*-Stabilität in PBS sowie humanem Serum untersucht. Die Ergebnisse der Radiomarkierung und Stabilitätsuntersuchung wurden eigenständig ausgewertet und interpretiert. Für die *in vivo*-Evaluierung wurden die Markierungen von NODAGA^{ZOL} und DOTA^{ZOL} vor Ort durchgeführt. Die vom Kooperationspartner erhaltenen Ergebnisse wurden interpretiert und anschließend alle Ergebnisse in einem Manuskript zusammengefasst.

Manuskript IV: *Comparison of uptake parameters of [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} and [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 in prostate cancer patients expressing bone metastases*

Für das Manuskript über den Vergleich des *in vivo*-Verhaltens von [⁶⁸Ga]Ga-NO2AP^{BP} und [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 wurde die Radiomarkierung von NO2AP^{BP} mit ⁶⁸Ga eigenständig vor Ort

durchgeführt. Die vom Kooperationspartner erhaltenen Daten der PET-Untersuchungen wurden ausgewertet, interpretiert und in einem Manuskript zusammengefasst.

Manuskript V: Synthesis, radiolabelling and first in vivo evaluation of a DOTA-bisphosphonate-conjugated PSMA inhibitor

Für das Manuskript über die Synthese, Radiomarkierung und *in vivo*-Evaluierung von BPDPSMA wurde die Verbindung BPDPSMA eigenständig in 20 Stufen synthetisiert und mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Die Radiomarkierung mit ^{68}Ga wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Vorläufermenge evaluiert und die *in vitro*-Stabilität von ^{68}Ga BPDPMSMA in PBS sowie humanem Serum untersucht. Die Ergebnisse der Radiomarkierung und Stabilitätsuntersuchung wurden eigenständig ausgewertet und interpretiert. Die vom Kooperationspartner erhaltenen Ergebnisse der *in vivo*-Evaluierung wurden interpretiert und anschließend alle Ergebnisse eigenständig in einem Manuskript zusammengefasst.

Manuskript VI: In vivo evaluation of ^{225}Ac Ac-DOTA^{ZOL} for α -therapy of bone metastases

Für das Manuskript zur *in vivo*-Evaluierung von ^{225}Ac Ac-DOTA^{ZOL} wurde die Radiomarkierung von DOTA^{ZOL} mit ^{225}Ac durch mich etabliert. Die Etablierung umfasste dabei sowohl die Evaluierung der optimalen Markierungsbedingungen als auch die Schaffung geeigneter Rahmenbedingungen hinsichtlich Messtechnik und Qualitätskontrolle. Bei der anschließenden *ex vivo*-Biodistribution wurde den Verantwortlichen Nicole Bausbacher und Dr. Stefanie Pektor bei der Vorbereitung der Injektionslösung sowie der Probenentnahme assistiert. Die Messung der entnommenen Proben wurde eigenständig durchgeführt, ebenso wie die Auswertung und Interpretation aller erhaltenen Ergebnisse und die Zusammenfassung der Ergebnisse in einem Manuskript, welches mit Hilfe von Verbesserungsvorschlägen und Anregungen aller Kooperationspartner fertig gestellt wurde.

Ergänzung: Synthesis of a chelator-conjugated heterocyclic nitrogen-containing bisphosphonate via Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

Für die ergänzenden Ergebnisse hinsichtlich der Synthese eines Chelator-konjugierten Bisphosphonats über eine Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition wurden alle beschriebenen Synthesen von mir eigenständig durchgeführt inklusive Aufreinigung und Analytik. Die bisherigen Ergebnisse wurden daraufhin zusammengefasst.

5.3. Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.08.2014 bis zum 13.11.2017 am Institut für Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Ich versichere, dass ich die Arbeit selbst durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mainz, den 13.11.2017

Nina Pfannkuchen