



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bone binding studies for the preclinical evaluation of
new bone tracers based on zoledronic acid“

verfasst von

Merete Tschokert

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreut von: O. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein

Summary

Osteosarcoma is the most common bone cancer and is responsible for 0.2% of all malignancies, but for 4% of childhood cancers (<14 years). The 5-year survival rate of children (10-14 years) had dropped from 73% to 64% between 1999 and 2007 in Europe, which emphasises the need for new therapy options. This thesis, as part of a FWF project, addresses this need by developing new potent and specific bone tracers for the diagnosis and therapy of osteosarcoma based on zoledronic acid.

The aim of this work was the preclinical evaluation of the new bone tracers [^{99m}Tc]ZOL, ^{68}Ga -ZOL, [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL. The new bone tracers were successfully labelled and subsequent quality control with thin layer chromatography (ITLC) was performed. The new bone tracers were tested in a *pre vivo* bone binding experiments accordingly to Mitterhauser et al. in a concentration of 0.3 μmol on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) and compared with the established bone tracers [^{99m}Tc]DPD and [^{153}Sm]EDTMP. [^{99m}Tc]ZOL bound higher than 15% on all bone materials; however, [^{99m}Tc]DPD shows 40% uptake on all bone materials. Bone binding of ^{68}Ga -ZOL on artificial bone materials is comparable to [^{99m}Tc]ZOL, both ranging between 25-35%. The two new therapeutic bone tracers [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL bound similar in the range of 75-95% and bound significantly ($p < 0.01$) higher than [^{153}Sm]EDTMP on all bone materials. The concentration of the used bone tracer influenced the binding significantly; a comparison of 0.3 μmol [^{99m}Tc]ZOL and 0.05 μmol [^{99m}Tc]ZOL (the equivalent concentration used for biodistribution and diagnosis in a 20g mouse) showed a significantly ($p < 0.001$) higher binding of 0.05 μmol [^{99m}Tc]ZOL on all bone compartments.

Comparison the data of [^{99m}Tc]DPD and [^{153}Sm]EDTMP with published data of other groups showed a similar bone binding on human bone materials, but different binding values on artificial bone materials. For this variation no explanation is available yet.

The experimental binding data were corrected regarding the binding of the pure radionuclides. The bone bindings of [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL are almost entirely based on the complex, whereas part of the bindings of ^{68}Ga -ZOL and [^{177}Lu]ZOL are influenced by the radionuclide.

The overall evaluation of the new bone tracers in course of this thesis suggests good and selective bone uptake of the tracers [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL. J. Kreiseder has shown in her thesis the stability of [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL in murine and human plasma. Hence, these two new bone tracers will be further evaluated; first experiments in healthy dogs are the next step

in developing new bone tracers based on zoledronic acid, since osteosarcoma in dogs and humans are highly translational.

Zusammenfassung

Osteosarkom ist der häufigste Knochenkrebs und ist für 0,2% aller Tumore verantwortlich, aber für 4% der Krebserkrankungen bei Kindern (<14 Jahre). Die 5-Jahres-Überlebensrate von Kindern (10-14 Jahre) ist in Europa zwischen 1999 und 2007 von 73% auf 64% gesunken. Dadurch wird die Notwendigkeit unterstrichen, neue Therapiewege zu entwickeln. Diese Diplomarbeit ist Teil eines FWF-Projektes, das sich die Aufgabe gestellt hat, neue wirksame und spezifische Knochen Tracer zur Diagnose und Therapie vom Osteosarkom auf Basis von Zoledronsäure zu entwickeln.

Das Ziel dieser Arbeit war die präklinische Bewertung der neuen Knochentracer [^{99m}Tc]ZOL, ^{68}Ga -ZOL, [^{177}Lu]ZOL und [^{153}Sm]ZOL. Die neuen Knochen Tracer wurden erfolgreich markiert und die dazugehörige Qualitätskontrolle mittels Dünnschicht-Chromatographie (ITLC) durchgeführt. Die neuen Knochentracer wurden in einer Konzentration von 0,3 μmol im Zuge von *pre vivo* Knochenbindungsexperimenten nach Mitterhauser et al. auf Hydroxyapatit (HA), amorphes Calciumphosphat (ACP), Spongiosa (CB) und Diaphyse (D) getestet und mit den etablierten Knochentracer [^{99m}Tc]DPD und [^{153}Sm]EDTMP verglichen. [^{99m}Tc]ZOL hat an allen Knochenmaterialien höher als 15% gebunden und [^{99m}Tc]DPD hat über 40% Bindung bei allen Knochenmaterialien gezeigt. Die Bindung von ^{68}Ga -ZOL auf künstlichen Knochenmaterialien ist vergleichbar mit [^{99m}Tc]ZOL, da beide zwischen 25-35% gebunden haben. Die beiden neuen therapeutischen Knochentracer [^{177}Lu]ZOL und [^{153}Sm]ZOL haben ähnlich zueinander (75-95%) und signifikant ($p < 0,01$) höher als [^{153}Sm]EDTMP auf allen Knochenmaterialien gebunden. Die Konzentration der verwendeten Knochentracer beeinflusst die Bindung signifikant. Ein Vergleich von 0,3 μmol [^{99m}Tc]ZOL und 0,05 μmol [^{99m}Tc]ZOL (die äquivalente Konzentration, die in einer 20g-Maus zur Diagnose appliziert wird) zeigte eine signifikante ($p < 0,001$) höhere Bindung von 0,05 μmol [^{99m}Tc]ZOL auf allen Knochenmaterialien.

Die Knochenbindungsdaten von [^{99m}Tc]DPD und [^{153}Sm]EDTMP wurden mit veröffentlichten Daten anderer Gruppen verglichen und zeigten eine ähnliche Knochenbindung an menschlichen Knochenmaterialien, aber eine unterschiedliche an künstlichen Knochenmaterialien. Für dieses Phänomen im Moment ist keine Erklärung vorhanden.

Die experimentellen Bindungsdaten wurden rechnerisch von der Radionuklid-Bindung korrigiert. Die Bindungen von [^{99m}Tc]ZOL und [^{153}Sm]ZOL beruhen fast zur Gänze auf dem Komplex, während ein Teil der Knochenbindungen von ^{68}Ga -ZOL und [^{177}Lu]ZOL vom Radionuklid beeinflusst wird.

Die Gesamtbewertung der neuen Knochentracer legt eine Weiterentwicklung von [^{99m}Tc]ZOL und [^{153}Sm]ZOL nahe. Zusätzlich zu dem spezifischen Knochenuptake konnte die murine und humane Plasmastabilität dieser beiden neuen Knochentracer von J. Kreiseder

gezeigt werden. Somit sind erste Experimente bei gesunden Hunden der nächste Schritt in der Entwicklung neuer Knochentracer auf Basis von Zoledronsäure, da das humane und canine Osteosarkom translational sind.

Acknowledgments

First of all I want to thank Univ.-Prof. Helmut Viernstein for supervising my thesis and to arrange the collaboration for the thesis with the Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy of the General Hospital of Vienna.

I want to thank Assoc.-Prof. Markus Mitterhauser and Assoc.-Prof. Wolfgang Wadsak for the interest in the work and for answering all questions.

Most of all I want to thank Dr. Daniela Häusler who gave me this opportunity to work on her project. Her constant supervision and help got me through this work. Her research and way of thinking inspired and motivated me.

Further, I want to thank the whole working group of the Radiochemistry and Experimental Nuclear Medicine Unit. Thank you all for your help!

“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales.”

— Marie Curie

Table of Content

1. Introduction.....	1
1.1. Osteosarcoma Background	1
1.2. Bone Tracers – current status.....	2
1.2.1. MDP	3
1.2.1. HEDP	4
1.2.2. DPD	4
1.2.3. EDTMP	5
1.3. Zoledronic acid (ZOL)	5
1.4. New Bone Tracers.....	7
1.4.1. Diagnostic Bone Tracers.....	7
1.4.1.1. [^{99m} Tc]ZOL	7
1.4.1.2. ⁶⁸ Ga-ZOL.....	8
1.4.2. Therapeutic Bone Tracers	8
1.4.2.1. [¹⁷⁷ Lu]ZOL.....	8
1.4.2.2. [¹⁵³ Sm]ZOL.....	8
2. Aim.....	9
2.1. FWF Project.....	9
2.2. Theranostics principle applied for zoledronic acid	9
2.3. Thesis.....	10
3. Materials and Methods	11
3.1. Materials.....	11
3.2. Bone Tracer Preparation	13
3.2.1. [^{99m} Tc]ZOL	13
3.2.2. [^{99m} Tc]DPD	13
3.2.3. ⁶⁸ Ga-ZOL.....	13
3.2.4. [¹⁷⁷ Lu]ZOL.....	13
3.2.5. [¹⁵³ Sm]ZOL.....	13
3.2.6. [¹⁵³ Sm]EDTMP	14
3.3. Quality Control.....	14
3.4. Bone Binding experiments	14
3.4.1. Filter experiments	15
3.4.2. Example from the thesis	16
4. Results.....	18
4.1. Bone Tracer Preparation	18
4.1.1. Bone Tracers based on Zoledronic Acid	18

4.1.2.	Quality Control	18
4.1.3.	[^{99m} Tc]ZOL	19
4.1.4.	[^{99m} Tc]DPD	19
4.1.5.	⁶⁸ Ga-ZOL.....	20
4.1.6.	[¹⁷⁷ Lu]ZOL.....	21
4.1.7.	[¹⁵³ Sm]ZOL.....	21
4.2.	Filtration	22
4.3.	Bone Binding Experiments	23
4.3.1.	Statistical analysis of the obtained data	23
4.3.2.	Bone tracers for diagnostic purposes	24
4.3.3.	Differences between artificial and human bone materials of diagnostic bone tracers	26
4.3.4.	Bone tracers for therapeutic purposes	27
4.3.5.	Differences between artificial and human bone materials of therapeutic bone tracers	27
4.3.6.	Comparison of bone tracers for diagnostic and therapeutic purposes.....	28
5.	<u>Discussion</u>	<u>30</u>
5.1.	Preparation of new bone tracers.....	30
5.1.1.	[^{99m} Tc]ZOL and ⁶⁸ Ga-ZOL	30
5.1.2.	[¹⁷⁷ Lu]ZOL.....	30
5.1.3.	[¹⁵³ Sm]ZOL.....	30
5.2.	Quality Control	31
5.2.1.	[^{99m} Tc]ZOL	31
5.2.2.	[^{99m} Tc]DPD	31
5.2.3.	Smearing of [^{99m} Tc]ZOL and [^{99m} Tc]DPD.....	31
5.2.4.	⁶⁸ Ga-ZOL.....	32
5.2.5.	[¹⁷⁷ Lu]ZOL.....	33
5.2.6.	[¹⁵³ Sm]ZOL.....	33
5.1.	Filtration	33
5.2.	Bone Binding Experiments	34
5.2.1.	Diagnostic bone tracers	34
5.2.2.	Differences between artificial and human bone materials of diagnostic bone tracers	35
5.2.3.	Therapeutic bone tracers.....	35
5.2.4.	Differences between artificial and human bone materials of therapeutic bone tracer.....	35
5.3.	Comparison with previously published data	36
5.4.	Correction of Bone Tracer Binding.....	39
6.	<u>Conclusio and Outlook.....</u>	<u>41</u>
7.	<u>References</u>	<u>43</u>
8.	<u>Table of Figures.....</u>	<u>52</u>
9.	<u>List of Tables</u>	<u>53</u>
11.	<u>List of Abbreviations.....</u>	<u>54</u>
	<u>Appendices.....</u>	<u>I</u>

<u>Appendix A</u>	<u>γ-Counter data experiment 06.12.12</u>	<u>II</u>
<u>Appendix B</u>	<u>Package Insert Teceos®</u>	<u>VI</u>
<u>Appendix C</u>	<u>Package Insert Quadramet®</u>	<u>XIII</u>
<u>Appendix D</u>	<u>Quality control protocol from clinic for [^{99m}Tc]DPD and [^{99m}Tc]MDP</u>	<u>XXIV</u>
<u>CV</u>	<u>.....</u>	<u>XXV</u>

1. Introduction

1.1. Osteosarcoma Background

The International Classification of Childhood Cancer (ICCC) distinguishes malignant bone tumours between osteosarcoma, chondrosarcoma, Ewing sarcoma and related tumours of the bone, other specified malignant bone tumours and unspecified malignant bone tumours [1]. According to the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program of the U.S. National Institute of Health, Osteosarcoma is the most frequent bone cancer in adults and between the age of 15-29 osteosarcoma and Ewing sarcoma account for three-fourths of all bone cancers. Adding the next common bone cancer chondrosarcoma, these three account for more than 90% of all bone cancers diagnosed. Osteosarcoma accounts for more than 50% in children under 20 years, followed by Ewing sarcoma with over 30% according to SEER [2, 3].

Osteosarcoma as the most common bone cancer is responsible for 0.2% of all malignancies, but for 4% of childhood cancers (<14 years). The word “osteosarcoma” comes from the Greek words “osteon” (bone) and “sarcoma” (fleshy growth) [4].

Osteosarcoma arises typically within the metaphysis of the long bones, mostly in the knee area and is defined by its production of osteoid or bone or both with association of malignant mesenchymal cells [5, 6]. From a histological point of view, osteoid is amorphous, homogenous, refractive, occasionally curvilinear and randomly oriented, can show varying degrees of calcification and is intimately associated with the malignant cells that comprise osteosarcoma [7].

Osteosarcoma occurs in under 5-year-olds rarely, has a peak during puberty (with a median age of 16), declines after 20-year aged patients and shows another, smaller peak of incidence after the age of 60. The first and greater peak is associated with growth spurt, the second one often with risk factors like Paget’s disease and radiation. Among the ≤ 24 -year-olds, the incidence rate of osteosarcoma is generally consistent worldwide. In contrast, incidence rates of Osteosarcoma after the age of 60 vary in different regions. Osteosarcoma is more common in males (3-5 per million) than in females (2-4 per million) under the age of 24 in most countries. Above the age of 60 the worldwide male-to-female ratio is 1.01:1 [4, 8].

A retrospective study of the consecutive neoadjuvant trials of the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS, 1986-2007) showed that in this time-frame a total of 244 patients with high-grade osteosarcoma were recruited in COSS trials in Austria, whereas 62.7% of the patients were 10-20 years old [9]. In Germany 2-3 out of 1 000 000 children (40 in total) under the age of 15 and in Switzerland 4-5 children and young adults between the ages 0 and 24 develop osteosarcoma each year [10, 8].

At the time of diagnosis, most patients have a seemingly localized disease. Over 10% of the patients have distant metastases; over 85% are lung metastases and over 20% bone metastases. Clinical detectable primary metastases are independent unfavourable prognostic factors. Patients with only pulmonary metastases have a better prognosis than patients with metastases in other sites alone or in combination with pulmonary metastases, as well as patients who had a complete surgical remission (10-year survival rate of 40.3%) [11]. Nevertheless, the incidence of micrometastases is at least 80-90% [12].

SEER data show a 5-year survival rate of over 65% for patients with osteosarcoma younger than 45 years and a less than 45% 5-year survival rate for older patients [2]. These results were confirmed by EURO CARE-5 with a 5-year survival of 69% for children aged 0-14, whereas the 5-year survival rate for girls is 72% and for boys 66% [13].

EURO CARE-5 shows that between 1999 and 2007 the 5-year survival rate of children 10-14 dropped in southern Europe from 82% to 56% (hazard ratio 1.336) and in central Europe from 75% to 70% (hazard ratio 1.017). For Europe as a whole the survival rate dropped from 73% to 64% (hazard ratio 1.011) [13].

The decreasing survival rate and the less favourable outcome of patients with metastases, especially with inoperable metastases, substantiate the need of new therapies for osteosarcoma. The conventional cytotoxic compounds used today are over 25 years old and are characterized by their narrow therapeutic margin, even though, novel therapeutics had been developed the last 20 years [14]. Osteosarcoma patients with malignant bone diseases like osteosarcoma would highly benefit from a selective and potent bone tracer, which could be used for early diagnosis as well as therapy [15].

1.2. Bone Tracers – current status

Bone seekers have been used in nuclear medicine for over 40 years [16]. The first ones were bisphosphonates of the 1st generation like MDP, HEDP and DPD. DPD and MDP are still used in the clinical routine at the general hospital of Vienna and St. Anna Children's hospital in Vienna. Later, bisphosphonates from the second generation as EDTMP were introduced. Bisphosphonates of the third generation like zoledronic acid are still in the research state for the development of new bone tracers as described in this thesis.

Nowadays, bone tracers are routinely used for whole bone scans for osteosarcoma to detect bony metastases and skip metastases [17, 18, 19]. Mostly [¹⁸F]FDG-PET (FDG...fludeoxyglucose, PET...positron emission tomography) or [¹⁸F]FDG-PET/CT (CT...computed tomography) are used for this purpose and [¹⁸F]FDG-PET/CT has been shown to be superior in detection bone metastases (more specific and a higher accuracy) than [^{99m}Tc]MDP

[18, 20, 21]. Besides ^{18}F FDG-PET, ^{18}F fluoride-PET can be used for examining the pathophysiology of metabolic bone diseases and the response of patients to treatment too [22, 23].

Osteosarcoma is considered a radiotherapy resistant tumour and therapeutic bone tracers are mostly applied for palliative medicine [6]. For example for the therapy of bone metastases caused by prostate cancer ^{223}Ra (Xofigo®) is used. ^{223}Ra is handled like calcium in the body. Hence, it accumulates in the bone tissues and the alpha particles destroy the bone metastases [24].

1.2.1. MDP

Medronic acid (MDP, methylenediphosphonate or {[Hydroxy(oxido)phosphoranyl]oxy}methyl phosphonate) is a bisphosphonate of the first generation (contains no nitrogen) and is often used as a complex with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [25]. The structure is shown in Figure 1.

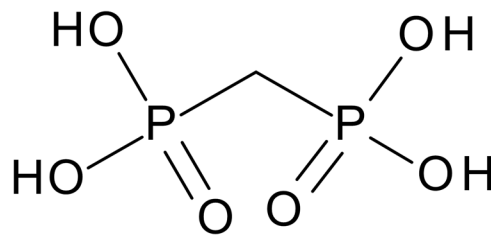


Figure 1: Chemical structure of MDP.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ MDP was introduced 1975 and is since the 1980ies the most used SPECT-tracer (single photon emission computed tomography) for whole body bone scans [26, 19]. As $^{99\text{m}}\text{Tc}$ MDP can be prepared at room temperature, kits for labelling right before the application are commercially available [27].

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ MDP is recommended as whole body screening for the assessment of bone metastases of osteosarcoma [19]. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ MDP is used for scanning of bone metastases from breast, gastric and prostate cancer too [28, 29, 30]. However, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ MDP showed clear uptake along the mineralization fronts, but was only occasionally found in the substance of the osteoid [31]. As described in section 1.1 Osteosarcoma Background, osteosarcomas are characterized by osteoid and it was shown that the bone tracer binding is solely depended on mineralisation [32]; explaining also the poor and most of the times lack of binding to lung metastases [33, 34]. This emphasises the need for new specific bone tracers even more.

Nevertheless, application of [^{99m}Tc]MDP in dogs showed an uptake in soft tissue carcinoma and newer research suggest [^{177}Lu]MDP as a new bone pain palliative agent [35, 36, 37].

1.2.1. HEDP

Etidronic acid or Hydroxyethanediphosphonic acid (HEDP) is a bisphosphonate of the first generation and is shown in Figure 2 [38].

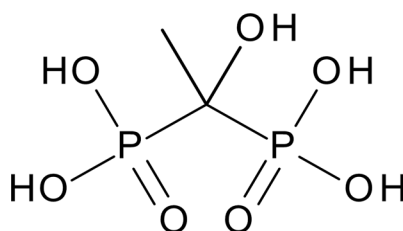


Figure 2: Chemical structure of HEDP.

[^{99m}Tc]HEDP was the first bisphosphonate to be introduced to clinical practice [26]. Nowadays, [^{186}Re]HEDP is used for bone metastases in palliative medicine [39, 40].

1.2.2. DPD

The systematic name of DPD is Tetrasodium 2-[phosphonato(phosphono)methyl]succinate. Other names are 2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonate, Butedronate tetrasodium (USAN), Teceos[®] and tetrasodium 2-[phosphonato(phosphono)methyl]butanedioate [41, 42]. DPD is a bisphosphonate of the first generation (contains no nitrogen) and is shown in Figure 3.

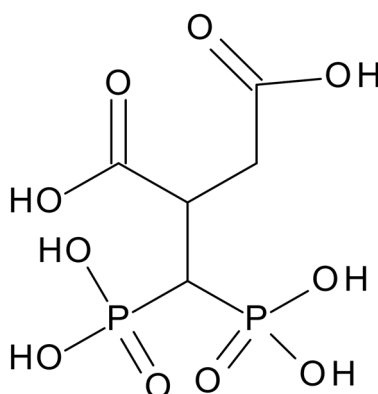


Figure 3: Chemical structure of DPD.

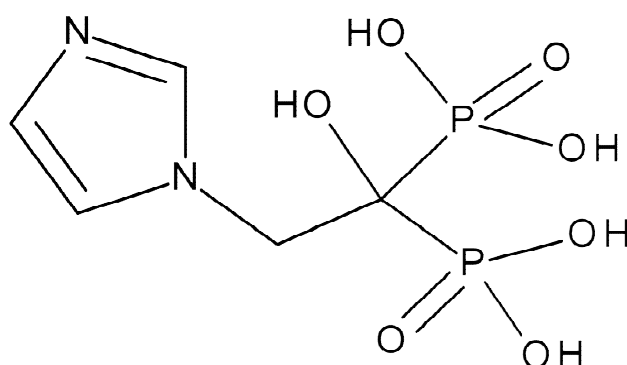


Figure 5: Chemical structure of zoledronic acid.

Zoledronic acid pharmaceuticals are approved for osteoporosis, osteitis deformans, postmenopausal osteoporosis, cancer, bone fractures and hypercalcaemia by the European Medicines Agency [49]. Additionally, European Medicines Agency's Committee for Orphan Medicinal Products adopted a positive opinion to grant zoledronic acid medicine products an orphan designation for the treatment of complex regional pain syndrome and in combination with pravastatin the treatment of Hutchinson-Gilford progeria [50].

As shown in animal models, zoledronic acid has a several orders higher magnitude of affinity to calcified tissue than to noncalcified tissue and a large storage capacity for zoledronic acid exists [51].

Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway through inhibiting farnesyl pyrophosphate synthase, which results in inhibition of protein prenylation and production of triphosphoric acid 1-adenosin-5'yl ester 3-[3-methylbut-3-enyl] ester (Apppl), which both can cause osteoclast apoptosis [52, 53]. This is one of the ways how zoledronic acid leads to an anticancer effect. Additionally, zoledronic acid inhibits factors in the angiogenesis.

A very important effect of zoledronic acid concerns the metastases and is called soil-and-seed hypothesis. Circulating tumour cells in the blood can act as “seeds” for subsequent local and distant relapse and often adhere to the bone marrow microenvironment, which act as “soil”. Zoledronic acid makes the “soil” microenvironment less suitable for the “seed” [54, 55].

In patients with bone metastases from advanced cancers including breast cancer, prostate cancer, renal cell carcinoma and non-small cell lung zoledronic acid had a survival benefit [54].

Furthermore, zoledronic acid does not interfere with chemotherapy of children and young adults with metastatic osteosarcoma [56].

1.4. New Bone Tracers

A very strong need for new diagnostic and therapeutic bone tracers is present. An ideal bone tracer should have the ability to specifically trace and image the primary tumour, bone metastases, skip and soft tissue metastases. The radionuclide should be easy accessible, preferably through a generator. The new bone tracer should be fast eliminated from the blood system, but long enough at the site of the cancer. The list could go on and on. In Dr. Häusler's FWF project, the development of new bone tracers with improved abilities is the main goal as described in 2.1.

The labelling of zoledronic acid with radionuclides is not completely new [57, 58, 59]; nevertheless, bone tracers based on zoledronic acid are not yet developed for human applications. The used radionuclides [^{99m}Tc], ^{68}Ga , [^{177}Lu] and [^{153}Sm] are already used in humans labelling first or second generation bisphosphonates and most of them are applied for malignancies of the bone.

1.4.1. Diagnostic Bone Tracers

1.4.1.1. [^{99m}Tc]ZOL

Technetium-99m ([^{99m}Tc]) is used about 25 million times each year as a radiopharmaceutical, approximately 80% covering of all nuclear medical procedures worldwide [60, 61]. Pertechnetate ([^{99m}Tc]TcO₄⁻) is obtained from a [$^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$] generator and has a half-life of 6h. Technetium can exist in eight different oxidation states, varying from (VII) to (-I). Pertechnetate has the highest oxidation state (VII) and does not bind directly to any ligand. Hence, it has to be first reduced by a suitable ligand before using it for radiopharmaceuticals. During reduction the lower oxidation state is stabilised by the ligand (often SnCl₂), otherwise, colloidal TcO₂ is formed in aqueous media. Most of [^{99m}Tc]-radiopharmaceuticals have an oxidation state of (V) [62]. [^{99m}Tc] decays with emission of 140.5keV gamma radiation and is used for SPECT [63].

[^{99m}Tc]ZOL is a promising candidate to become a new bone SPECT tracer, since the radio-labelling was already successfully performed and it's biodistribution in the rabbit was promising [57, 58]. Hence, it could be used as a substitute for [^{99m}Tc]MDP. The advantage of [^{99m}Tc]ZOL would be the binding to osseous material; thus, targeting more precise bone metastases and soft tissue metastases, due to its unique way of action in the mevalonate pathway.

1.4.1.2. ^{68}Ga -ZOL

Gallium-68 (^{68}Ga) has a half-life of 68min and decays to 89% through positron emission (maximum energy 1.92MeV, mean 0.89MeV). The short half-life is for a diagnostic tracer favourable. As this PET radionuclide is eluted from a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator, which can be used up to one year, there is no need for a cyclotron [64]. Thus, ^{68}Ga -ZOL could be a potential PET bone tracer.

1.4.2. Therapeutic Bone Tracers

1.4.2.1. $[^{177}\text{Lu}]$ ZOL

Lutetium-177 ($[^{177}\text{Lu}]$) is used as a therapeutic and palliative radiopharmaceutical. It has a half-life of 6.73d and decays in beta emission (490keV), gamma emission (113keV, 3%) and with X-ray (210keV, 11%) [65]. $[^{177}\text{Lu}]$ ZOL could be used for bone palliation and targeting bone and soft tissue metastases for therapy.

1.4.2.2. $[^{153}\text{Sm}]$ ZOL

Samarium-153 ($[^{153}\text{Sm}]$) is used as a therapeutic and palliative radiopharmaceutical. It has a half-life of 46.3h and decays in beta (640keV: 30%, 710keV: 50%, 810keV: 20%) and in gamma (103keV: 29%) emission as described in the package insert of Quadramet® (Appendix C).

2. Aim

2.1. FWF Project

The FWF funded project “New bone seeking radiopharmaceuticals for the diagnosis & treatment of Osteosarcoma” from Dr. Daniela Häusler (T553-B19) combines the need of new medical innovations for osteosarcoma treatment and the promising bone seeking and cancer inhibiting abilities of zoledronic acid. The project’s aim is the development and evaluation of new bone seekers for the diagnosis and therapy of osteosarcoma. Furthermore, through the project the understanding of the mechanisms involved in uptake and binding of bone seekers will be deepened.

As new improved bone tracers [^{99m}Tc]ZOL, ^{68}Ga -ZOL and [^{153}Sm]ZOL are to be developed and evaluated. They should be able to allow a more precise and earlier diagnosis of tumour and metastases. Through the theranostics principle, as described in 2.2, a personalised treatment can be achieved.

To successfully develop and evaluate the new bone tracers, they are tested against established bone tracers in an *in vivo* model via μPET and μSPECT , in a *pre vivo* bone model to establish bone affinity and in an *in vitro* pathway model. Additionally, a nanoparticle formulation will be developed and verified via biodistribution in an *in vivo* model of osteosarcoma.

2.2. Theranostics principle applied for zoledronic acid

Theranostics is a principle used in the personalised medicine. The word is a construction merging therapy and diagnosis. It implicates that through personalised diagnosis, a personalised therapy can be provided. This approach is already recommended in the Quadramet® product information as shown in Appendix C.

In the FWF project the theranostic principle is applied, since bone tracers for diagnosis and for therapy based on zoledronic acid are developed. In practice, a diagnosis bone tracer could be applied in an osteosarcoma patient to detect bone and skip and soft tissue metastases. If the bone scan is positive, a therapy bone tracer can be used. As both tracers have the same ligand (zoledronic acid), the therapy bone tracer will bind additionally at the metastases and target them specifically, thus, helping to prevent unnecessary, ineffective procedures.

2.3. Thesis

This work is a part of the FWF project and the specific aims of the thesis are:

1) Tracer preparation of new bone tracers with zoledronic acid

Reproducible preparation of [^{99m}Tc]ZOL, ^{68}Ga -ZOL, [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL with subsequent quality control.

2) Reproduction of an established bone binding assay on human and artificial bone compartments

The main part of the thesis is bone binding experiments performed with new bone tracers.

3) Comparison of new bone tracers with conventional tracers

Performing bone binding experiments with commercially available bone seekers and comparison of the results with the findings of point 2.

4) Comparison of the data with literature

The results of point 3 are compared with published data of other groups.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

The used chemicals and equipments are summarised in Table 1.

Product	Origin	Specifications
Sodium pertechnetate ($\text{Na}^{[99\text{mTc}]\text{TcO}_4}$)	Medical University Vienna, Nuclear medicine ¹	$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -generator
Gallium chloride ($^{68}\text{GaCl}_3$)	Medical University Vienna, Nuclear medicine ²	$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator
Lutetium chloride ($^{[177}\text{Lu}]\text{Cl}_3$)	Perkin Elmer	Product Number: NEZ307B000MC
Samarium chloride ($^{[153}\text{Sm}]\text{Cl}_3$)	BSM Diagnostica	SM-153 chloride-RCH
Zoledronic acid (ZOL)	Novartis	MTA
DPD-Kit, Teceos®	CIS bio international	
$^{[153}\text{Sm}]\text{EDTMP}$, Quadramet®	CIS bio international	1.3GBq
Aqua bidestillata sterilis. "Fresenius"	Fresenius Kabi	
Sodium chloride	Braun	„Natriumchlorid B. Braun Injektionslösung“, 9mg/mL
Natrium chloratum physiologicum 0.9%	S.A.L.F. S.p.A. Laboratoria Farmacologico	„Meditrade“-infusion solution
Ascorbic acid	Sigma Aldrich	CAS 50-81-7
Tin (II) chloride dihydrate	Merck	1.07815.0100, Lot: B391215920
Methanol	Sigma-Aldrich	≥99.9%, CAS 67-56-1
Acetone	Firker Chemical	A/60600/15
Ammonia solution 32%	Merck Millipore	

¹ Many thanks to the RTs for providing sodium pertechnetate.

² Many thanks to Fritz and Ingrid for providing gallium chloride.

pH-indicator strips Acilit®	Merck Millipore	pH 0-6.0, non-bleeding, 1.09531.0001
pH-indicator strips Neutralit®	Merck Millipore	pH 5.0-10.0, non-bleeding; 1.09533.0001
Millex®-FG filters	Merck Millipore	0.2µm, Fluoropore™ membrane SLFGM25LS
Sterifix® Paed filters	Braun	0.2µm, Supor® membrane
Millex®-GV Durapore® filters	Merck Millipore	0.22µm, PVDF membrane, 33mm, SLGV033RS
Millex®-GV filters	Merck Millipore	0.22µm, PVDF membrane, 4mm, SLGV013SL
Chromatography paper Whatman 3MM	GE Healthcare	CAT No.: 3030-6188
Chromatography paper iTLC-SG	Agilent Technologies	SGI0001
Vials	Sarstedt	5mL, 75x12mm, PP, REF 55.526
Hydroxyapatite	Fluka Chemika	Purum p.a., ≥90% (as $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), CAS: 1306-06-5, Lot: 427660/1
Amorphous calcium phosphate	AppliChem	„tri-Calciumphosphat“, extra pure Ph. Eur., CAS: 7758-87-4, Lot: 3N03082
Cancellous bone	Kluger/SMZ Ost – Donauspial ³	0.08mm ⁴ , 11.09.12
Diaphysis	Kluger/SMZ Ost – Donauspital	0.08mm, 11.09.12
Hot plate	Desaga	
Supermicro scales	Sartorius	WBP6003-d94061
Instant Imager	Packard	
Automatic γ-counter	Perkin Elmer	Wizard ² 3'', 2480

Table 1: Materials and used equipment.

³ Many thanks to Dr. Kluger for the human bone materials.

⁴ Many thanks to Prof. Viernstein for providing the facilities to mill the human bones.

3.2. Bone Tracer Preparation

3.2.1. [^{99m}Tc]ZOL

Briefly, [^{99m}Tc]ZOL was prepared according to a previously described method [57, 58]: 1mL of zoledronic acid in saline (0.5-4mg/200-1000 μL) was mixed with 400 μL of a freshly prepared aqueous solution of stannous chloride dihydrate (1mg/mL) and 50 μL of ascorbic acid (10mg/mL in 0.9% sodium chloride). Sodium pertechnetate ($\text{Na}[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4$) was eluted from a commercial [^{99}Mo]/[^{99m}Tc]-generator with 0.9% sodium chloride and approximately 500MBq of radioactivity were added to the ZOL-solution. pH of the solution was adapted to 5.5-6.0 with sodium hydroxide solution (0.1 and 1Mol). The mixture was vortexed for 60sec and was then allowed to stand for 20min at room temperature for the final complex reaction.

3.2.2. [^{99m}Tc]DPD

The DPD-Kit was commercially obtained and the labelling was performed according to the product information as shown in Appendix B: 2-10mL pertechnetate solution was added with a syringe through the rubber plug. After light shakes and a complexation time of 5min [^{99m}Tc]DPD was obtained from the bottle with a syringe.

3.2.3. ^{68}Ga -ZOL

Labelling was done according to Haeusler et al. [66]: zoledronic acid in saline (0.5-3mg/200-500 μL) was added to approximately 1GBq gallium chloride ($^{68}\text{GaCl}_3$) eluted from a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -generator. The pH of the solution was adapted to 5.5-6.0 with sodium hydroxide solution (0.1 and 1Mol). The solution was diluted with 0.9% sodium chloride to approximately 1mL.

3.2.4. [^{177}Lu]ZOL

Labelling was done according to section 3.2.3 ^{68}Ga -ZOL [66]. Lutetium chloride ($[^{177}\text{Lu}]\text{Cl}_3$) was commercially obtained. 1.5-3.1mg zoledronic acid were dissolved in 500-750 μL physiological saline and approximately 500MBq were used. The pH of the solution was adopted to 5.5.

3.2.5. [^{153}Sm]ZOL

The labelling of [^{153}Sm]ZOL is similar to the labelling of ^{68}Ga -ZOL and [^{177}Lu]ZOL. 2.5-3.25mg zoledronic acid were dissolved in 500 μL physiological saline, 2-3MBq commercially obtained [^{153}Sm] Cl_3 were used and the pH was adjusted to 5.5-6.0.

3.2.6. [¹⁵³Sm]EDTMP

[¹⁵³Sm]EDTMP was commercially obtained. Through the rubber plug of the distribution batch vial, an injection needle was pierced to avoid under pressure in the bottle. [¹⁵³Sm]EDTMP was obtained with a syringe out of the bottle.

3.3. Quality Control

The radiochemical purities of [^{99m}Tc]ZOL, ⁶⁸Ga-ZOL, [¹⁷⁷Lu]ZOL and [¹⁵³Sm]ZOL were determined by iTLC (instant thin layer chromatography) [57, 58, 66, 67, 59]. Hence, two aliquots of 1-5µL of [^{99m}Tc]ZOL were applied with a syringe at 1.5cm from the bottom on each of two Whatman 3MM strips (3x10cm). The strips were allowed to dry and subsequently placed into developing chambers containing either physiological saline or acetone. After the solvent reached the end point (1cm from the top), the strips were removed and dried on a heated plate. The dried strips were analysed using a Canberra Packard Instant Imager. For ⁶⁸Ga-ZOL and [¹⁷⁷Lu]ZOL the lipophilic solvent acetone was replaced with ammonium acetate/methanol (1:1) and 0.1M sodium citrate pH 5 was used additionally. For [¹⁵³Sm]ZOL the solvents H₂O/NH₃ (1:32) and sodium citrate were used. For the quality control of [^{99m}Tc]DPD H₂O/NH₃ (1:32) and acetone was used.

To distinguish the bone tracer complex from the free radionuclide, the *R_f* values were compared to be sure that they are not overlapping. The stationary phases were either Whatman 3MM or iTLC-SG. For the liquid phase, physiological saline, acetone, ammonium acetate/methanol (1:1), 0.1M sodium citrate pH 5, H₂O/NH₃ (1:32) and methanol/H₂O/NH₃ (4:4:0.2) were used [57, 58, 66, 67, 59, 68].

The differences between concentrated and diluted radionuclides were tested with all new bone tracer complexes and radionuclides. The influences of different pH, stannous chloride and ascorbic acid were tested on the complexes and on the radionuclides of [^{99m}Tc]ZOL, [¹⁷⁷Lu]ZOL and [¹⁵³Sm]ZOL.

The influence of remaining moisture of the probe on the quality was tested.

3.4. Bone Binding experiments

The binding experiments followed the method published by Mitterhauser et al. [69] and a simplified scheme is shown in Figure 6. Briefly, to 3mg bone material (hydroxyapatite, amorphous calcium phosphate, cancellous bone and diaphysis) 3mL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) was added and incubated in a water bath-shaker at 37°C over night. The next day, the radiolabelled bisphosphonate [57, 58, 59] was added and incubated for 2h at 37°C in

the water bath-shaker. An aliquot of 50 μ L was suspended in 2mL of physiological saline. Three 50 μ L aliquots of this suspension were pipetted into gamma-counter-vials and the tip was discarded into the measure vial (V_{1-3}). The rest was filtered through a Millex-FG[®] single use filter. Three 50 μ L aliquots of the filtrate were pipetted into gamma-counter-vials and the tip was again discarded into the vial (N_{1-3}). The radioactivity of the 6 samples was measured in the gamma-counter.

The irreversible binding of the bone tracers was calculated as percent binding (V_M)= $100 \times [AM(V_i) - AM(N_i)] / AM$, AM = arithmetic mean.

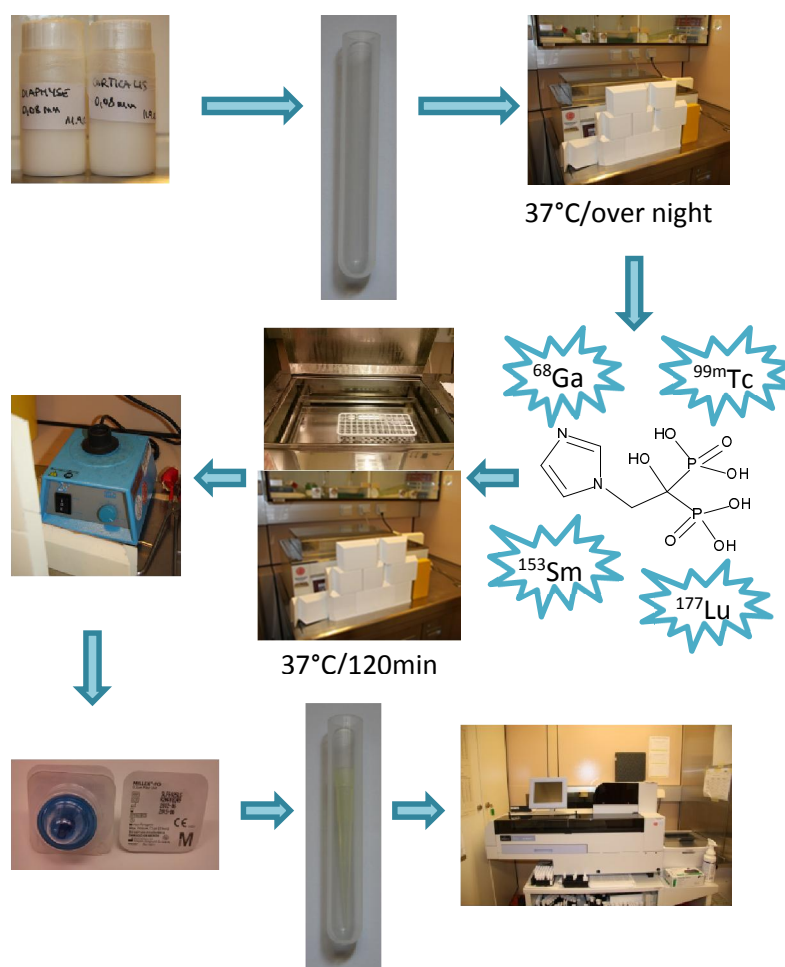


Figure 6: Scheme of the bone binding experiment.

3.4.1. Filter experiments

To subtract the unbound bone tracer complex trapped in the filter, the same experiments as above were performed with vials without bone materials and no incubation period was applied.

Filter correction⁵

The filter correction was calculated as filter value₍₁₋₄₎ = $[FV_M + V_M]/100 * FV_M$.

The result of 4 iterative arithmetic operations was subtracted from V_M .

FV_M ... Filter value, measured in filter experiment

V_M ... Value, measured in binding experiment

3.4.2. Example from the thesis

The following practical example uses the data obtained from 06.12.12 as shown in Appendix A.

The used bone tracer was [^{99m}Tc]ZOL and it was tested on hydroxyapatite (HA) and amorphous calcium phosphate (ACP).

After the extraction of the raw data from the γ -counter, the arithmetic mean and standard deviation of all triple measurements were calculated as shown in Appendix A. The bone binding was calculated as % binding ($V_M=100*[AM(V_i) - AM(N_i)]/AM$) as shown in Table 2.

Then the arithmetic mean and the standard deviation of the samples was calculated.
HA: $(HA1+HA2+HA3+HA4+HA5+HA6)/5=32\% (\pm 6\%)$; ACP: $26\% (\pm 4\%)$.

To calculate the filter correction, the arithmetic mean and the standard deviation of all filter experiments were calculated. As A3 was an outlier, this value was not included in the calculation (A3 is marked orange in Appendix A).

$$(A1+A2+A4)/2=2.78\% (\pm 0.8\%)$$

For the filter correction, four iterative calculations had to be done.

A step by step calculation for HA:

1. iterative calculation:

$$((2.78+(100-31.59))/100)*2.78=1.98$$

2. iterative calculation:

$$((1.98+(100-31.59))/100)*1.98=1.39$$

3. iterative calculation:

$$((1.39+(100-31.59))/100)*1.39=0.97$$

4. iterative calculation:

$$((0.97+(100-31.59))/100)*0.97=0.67$$

$$\% \text{ bone binding HA calculated} = 32\% - 0.67\% = 31\%$$

⁵ Many thanks to Dr. Stefan Tögel for explaining the calculations.

An overview of the filter correction calculation of HA and ACP (06.12.12) is shown in Table 3.

Sample	Tc-99m-CPM	Arithmetic mean	Standard deviation	Calculation	% bone binding
HA 1	268662.23 292213.85 255951.11	272,275.73	18,399.45	$100 \cdot (272.275.73 - 192.308.71) / 272.275.73 =$	29
HA 1 F	192050.58 192049.86 192825.69	192,308.71	447.72		

Table 2: Demonstration of the calculation of % bone binding.

% bone binding measured (V_M)	Filter value measured (FV_M)	Iterative filter correction				% bone binding calculated
HA: 31.59	2.78	1.98	1.39	0.97	0.67	31
ACP: 26.34	2.78	2.12	1.61	1.21	0.91	25

Table 3: Demonstration of iterative filter correction of HA and ACP.

4. Results

4.1. Bone Tracer Preparation

4.1.1. Bone Tracers based on Zoledronic Acid

Radiolabelling of zoledronic acid was successful for all nuclides; parameters are summarized in Table 4.

Bone Tracer	ZOL/ 0.9% NaCl	SnCl ₂ (1mg/mL)	Ascorbic Acid (10mg/mL 0.9% NaCl)	pH	Incubation Time	Temperature
[^{99m} Tc]ZOL	0.5-4mg/ 200-1000μL	400μL	50μL	5.5-6.0	20min	room temperature
⁶⁸ Ga-ZOL	0.5-3mg/ 200-500μL	x	x	5.5-6.0	20min	room temperature
[¹⁷⁷ Lu]ZOL	1.5-3.1mg/ 500-750μL	x	x	5.5	20min	room temperature
[¹⁵³ Sm]ZOL	2.5-3.25mg/ 500μL	x	x	5.5-6.0	20min	room temperature

Table 4: Summary of labelling conditions for new bone tracers.

4.1.2. Quality Control

A suitable quality control was performed for all new bone tracers; an overview of the different chemical purities is shown in Table 5.

Bone Tracer	Radiochemical purity in %	n
[^{99m} Tc]ZOL	96.7 ±4%	28
⁶⁸ Ga-ZOL	85.7 ±9%	6
[¹⁷⁷ Lu]ZOL	88.5 ±7%	6
[¹⁵³ Sm]ZOL	96.6 ±2%	6

Table 5: Overview of the chemical purity of different new bone tracer.

4.1.3. [^{99m}Tc]ZOL

Radiolabelling of zoledronic acid with the nuclide [^{99m}Tc] evinced mean chemical purity of $96.7 \pm 4\%$ (pH 5.5-6.0, $n=28$). The remaining 3.3% were found to be colloidal impurities. The highest achieved value of chemical purity was 99.8%. For the quality control 0.9% sodium chloride and acetone were used as liquid phases and Whatman 3MM as stationary phase. In the system with sodium chloride, the complex migrates with $R_f=1$, the pertechnetate with $R_f=0.7$ and the colloid remains at the origin. In the acetone system, pertechnetate migrates with $R_f=1$ and colloid and the complex remain at the origin. A quality control example is shown in Figure 7.

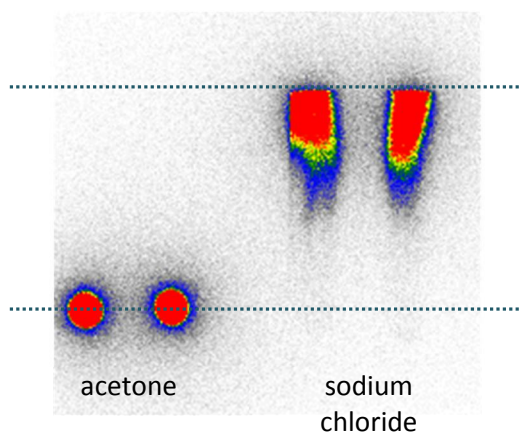


Figure 7: iTLC quality control of [^{99m}Tc]ZOL on Whatman 3MM.

4.1.4. [^{99m}Tc]DPD

Radiolabelling of DPD with the nuclide [^{99m}Tc] evinced mean chemical purities of $97.9 \pm 2\%$ ($n=4$) with the highest value of 100%. For the quality control $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ (1:32) and acetone were used as liquid phases and Whatman 3MM as stationary phase. In the system with $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$, the complex migrates with $R_f=1$, the pertechnetate with $R_f=0.7$ and the colloid remains at the origin. In the acetone system, pertechnetate migrates with $R_f=1$ and colloid and the complex remain at the origin. A quality control example is shown in Figure 8. In a system with sodium chloride the complex migrates with $R_f=1$ and the pertechnetate with $R_f=0.7$ and the colloid remains at the origin. The differences between iTLC with $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ and sodium chloride are shown in Figure 8.

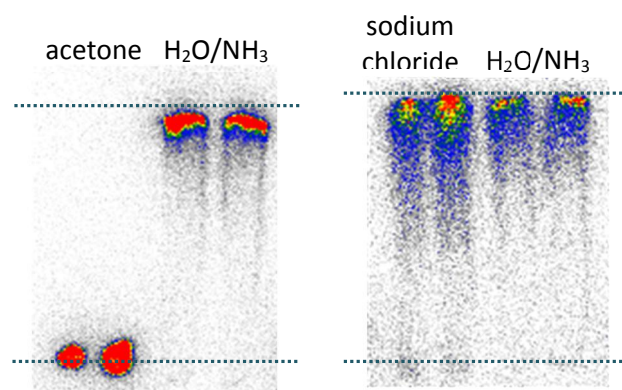


Figure 8: iTLC quality control of [^{99m}Tc]DPD on Whatman 3MM.

4.1.5. ^{68}Ga -ZOL

Radiolabelling of zoledronic acid with the nuclide ^{68}Ga evinced chemical purity of $85.7 \pm 9\%$ (pH 5.5-6.0, $n=5$). The remaining 14.8% were found to be impurities, most likely pure, unreacted gallium chloride. The highest value was 95.9%. For the quality control 0.9% sodium chloride, 1M ammonium acetate/methanol (1:1) and 0.1M sodium citrate pH 5 were used as liquid phases and Whatman 3MM as stationary phase. For sodium chloride the R_f for the complex is 1 and for the free radionuclide 0.7-0.8 with a strong smearing from $R_f=0$ on. For ammonium acetate/methanol the R_f for the complex and the free nuclide is 0. For sodium citrate the R_f for the complex and the free nuclide is 1. $R_f=0$ of colloid in all three systems. However, as can be depicted from Figure 9 (sodium acetate) there is no colloidal impurity within the probe. A quality control example is shown in Figure 9.

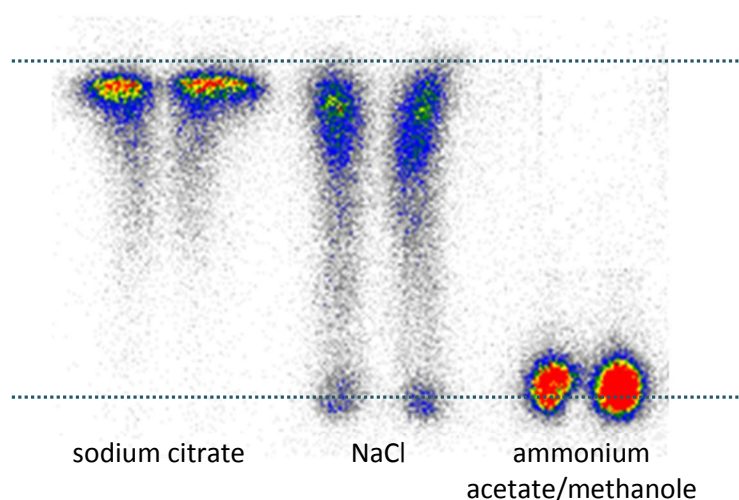


Figure 9: iTLC quality control of ^{68}Ga -ZOL on Whatman 3MM.

4.1.6. [^{177}Lu]ZOL

Radiolabelling of zoledronic acid with the nuclide [^{177}Lu] evinced chemical purity of $88.5 \pm 7\%$ (pH 5.5-6.0, $n=5$). Remaining 11.8% were found to be impurities, most likely most likely pure, unreacted lutetium chloride. The highest value was 98.3%. For the quality control 0.9% sodium chloride, 0.1M sodium citrate pH 5 and 1M ammonium acetate/methanol (1:1) were used as liquid phases and Whatman 3MM as stationary phase. In the ITLC system with sodium chloride, R_f of the complex is 1 and [^{177}Lu]Cl₃ remains at the origin. In the ITLC system with sodium acetate, $R_f=1$ for the complex and [^{177}Lu]Cl₃. In both systems, colloid remains at the origin. In ammonium acetate/methanol system complex, radionuclide chloride and colloid remain at the origin. However, as can be depicted from Figure 10 (sodium citrate) there is no colloidal impurity within the probe. A quality control example is shown in Figure 10.

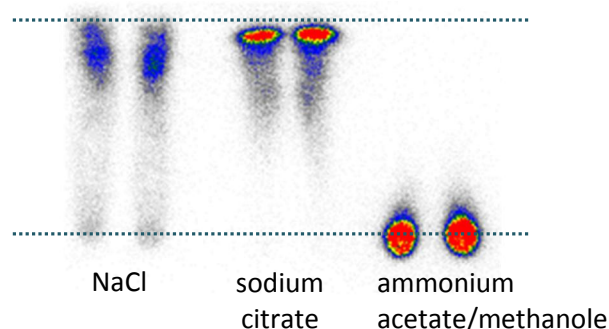


Figure 10: iTLC quality control of [^{177}Lu]ZOL on Whatman 3MM.

4.1.7. [^{153}Sm]ZOL

Radiolabelling of zoledronic acid with the nuclide [^{153}Sm] evinced chemical purity of $96.6 \pm 2\%$ (pH 5.5-6.0, $n=5$). Remaining 3.4% were found to be impurities, most likely pure, unreacted samarium chloride. The highest value was 98.7%. For the quality control H₂O/NH₃ (1:32) and 0.1M sodium citrate pH 5 were used as liquid phases and Whatman 3MM as stationary phase. R_f is 1 for the complex and R_f is 0 for the free radionuclide in the ITLC H₂O/NH₃ system. R_f is 1 for the complex and for the free radionuclide in the ITLC sodium citrate system. However, as can be depicted from Figure 11 (sodium acetate) there is no colloidal impurity within the probe. A quality control example is shown in Figure 11.

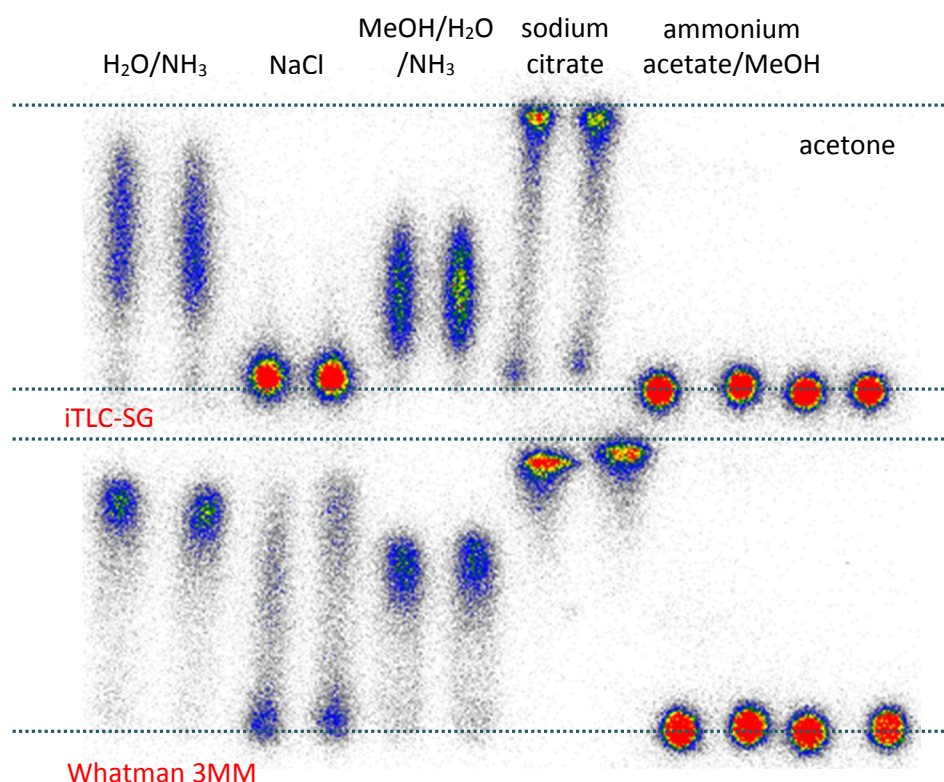


Figure 11: Testing different iTLC-systems for quality control of $[^{153}\text{Sm}]\text{ZOL}$. At top the stationary phase iTLC-SG and below Whatman 3MM. MeOH...methyl alcohol

4.2. Filtration

To prepare a sterile bone tracer for application *in vivo*, $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{ZOL}$ was filtered through different filters to evaluate which one adsorbs the least of the bone tracer complex. A summary of the results are presented in Table 6. The influence of the filtration on the complexation were minor; with $97.7 \pm 0.4\%$ the quality control of the unfiltered bone tracer is better than the filtered with $94.2 \pm 5.6\%$ ($n=3$, every quality control was performed twice) as shown in Figure 12.

Filter	% adsorbed in filter	n
Millex [®] -GV	56%	1
Millex [®] -GV Durapore [®]	69%	1
Millex-FG [®]	60%	1
Sterifix [®]	$31 \pm 0.04\%$	3

Table 6: Summary of sterile filtration of $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{ZOL}$.

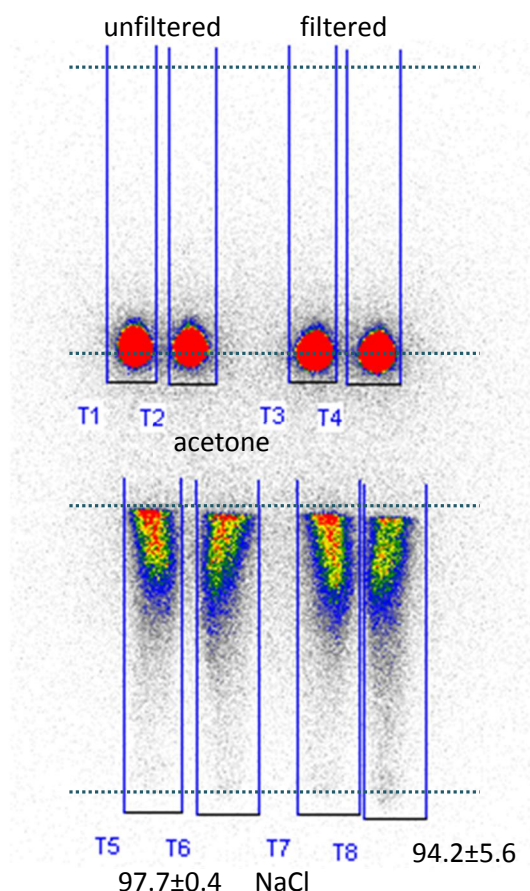


Figure 12: Comparison of ITLC of unfiltered and filtered $[^{99m}\text{Tc}]\text{ZOL}$. Stationary phase was Whatman 3MM.

4.3. Bone Binding Experiments

The binding experiments were performed with the bone tracers $[^{99m}\text{Tc}]\text{ZOL}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{DPD}$, $[^{177}\text{Lu}]\text{ZOL}$, $[^{153}\text{Sm}]\text{ZOL}$ and $[^{153}\text{Sm}]\text{EDTMP}$ on hydroxyapatite, amorphous calcium phosphate, cancellous bone and diaphysis. $^{68}\text{Ga}\text{-ZOL}$ was tested on hydroxyapatite and amorphous calcium phosphate. The bone tracers were used in a concentration of $0.3\mu\text{mol}$, except for $[^{99m}\text{Tc}]\text{ZOL}$, which was used in a concentration of $0.05\mu\text{mol}$ additionally. A compilation of the results (given in % filter corrected binding) is shown in Table 7.

4.3.1. Statistical analysis of the obtained data

Each bar represents the filter-corrected arithmetic mean of 4 binding experiments of $0.3\mu\text{mol}$ bone tracer in percent, except stated otherwise. Each experiment consisted of 4-9 samples of each bone material. The error bars represent the standard deviation. Each measurement was

performed in triplicate. p-values were calculated and marked as highly significant ($p \leq 0.001$, ***), very significant ($p \leq 0.01$, **) and significant ($p \leq 0.05$, *).

Bone tracer	HA	ACP	CB	D
0.05 μmol [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL	64 $\pm$ 6	64 $\pm$ 4	70 $\pm$ 6	79 $\pm$ 4
0.3 μmol [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL	33 $\pm$ 5	29 $\pm$ 6	15 $\pm$ 0.6	28 $\pm$ 5
0.3 μmol [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD	72 $\pm$ 2	56 $\pm$ 4	41 $\pm$ 7	42 $\pm$ 6
0.3 μmol ^{68}Ga-ZOL	27 $\pm$ 3	32 $\pm$ 3		
0.3 μmol [^{177}Lu]ZOL	91 $\pm$ 9	89 $\pm$ 9	78 $\pm$ 9	88 $\pm$ 6
0.3 μmol [^{153}Sm]ZOL	95 $\pm$ 4	94 $\pm$ 4	78 $\pm$ 9	85 $\pm$ 6
0.3 μmol [^{153}Sm]EDTMP	25 $\pm$ 2	23 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	16 $\pm$ 2

Table 7: Binding of bone tracers on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in %.

4.3.2. Bone tracers for diagnostic purposes

A comparison of the bone binding of the new bone tracer [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL and the commercially available [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD is shown in Figure 13. Bone binding of the two tracers over 15% on all bone compartments could be observed. However, statistical analyses showed a significantly higher binding of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD on hydroxyapatite ($p=0.00011$) and amorphous calcium phosphate ($p=0.00034$) and a significantly higher binding on cancellous bone ($p=0.024$) in comparison to [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL.

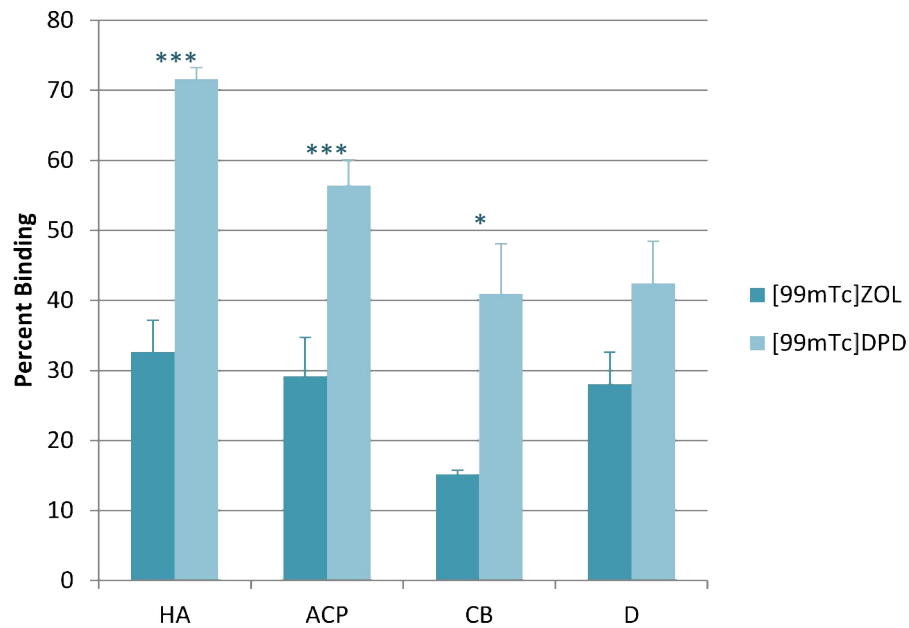


Figure 13: Binding of bone tracers for diagnostic purposes. The bindings were tested on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in a concentration of 0.3 μ mol. Values are given in % as arithmetic mean n=4 ($\pm$ sd).

A comparison of [^{99m}Tc]ZOL and ⁶⁸Ga-ZOL on hydroxyapatite and amorphous calcium phosphate is shown in Figure 14. Whereas [^{99m}Tc]ZOL binds higher on hydroxyapatite than ⁶⁸Ga-ZOL, the bone binding on amorphous calcium phosphate is vice versa. However, statistical analyses show no significant differences between the two bone tracers.

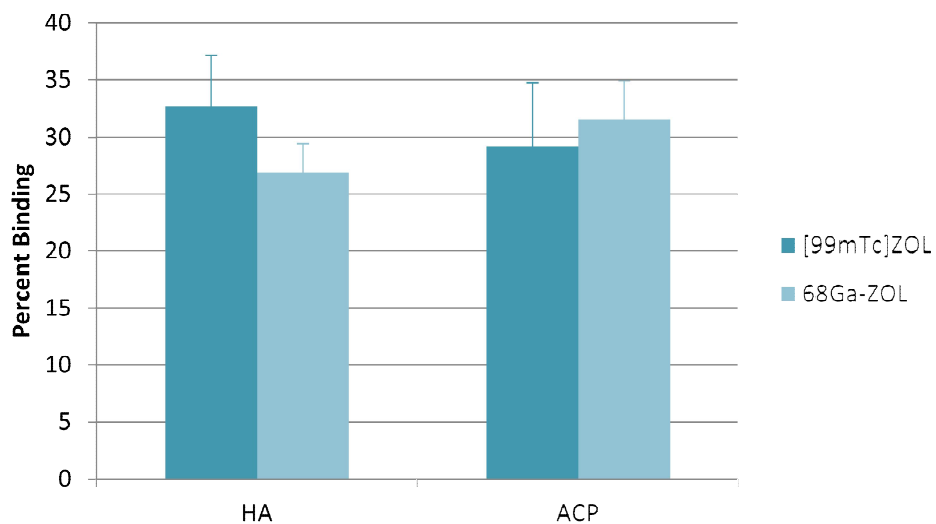


Figure 14: Binding of bone tracers for diagnostic purposes. The bindings were tested on hydroxyapatite (HA) and amorphous calcium phosphate (ACP) in a concentration of 0.3 μ mol. Values are given in % as arithmetic mean of at n=4 ($\pm$ sd).

A comparison of [^{99m}Tc]ZOL in the concentrations of 0.3 μmol and 0.05 μmol is shown in Figure 15. Statistical analyses show a significantly higher binding of 0.05 μmol [^{99m}Tc]ZOL on all bone materials in comparison to 0.3 μmol [^{99m}Tc]ZOL (hydroxyapatite: $p=0.00019$, amorphous calcium phosphate: $p=0.00009$, cancellous bone: $p=0.00024$, diaphysis: $p=0.00013$).

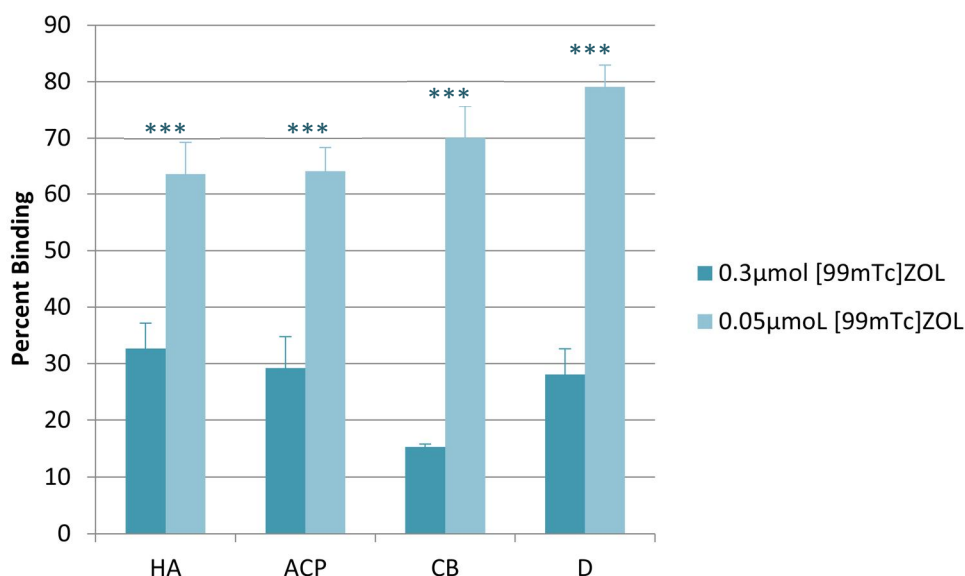


Figure 15: Binding of [^{99m}Tc]ZOL in concentrations 0.3 μmol and 0.05 μmol . The bindings were tested on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D). Values are given in % as arithmetic mean of $n=4$ ($\pm\text{sd}$).

4.3.3. Differences between artificial and human bone materials of diagnostic bone tracers

[^{99m}Tc]ZOL

Statistical analyses of 0.3 μmol [^{99m}Tc]ZOL show a significantly higher binding of hydroxyapatite ($p=0.0037$) in comparison to cancellous bone and a significantly higher binding of amorphous calcium phosphate ($p=0.014$) in comparison to cancellous bone as shown in Figure 13.

Statistical analyses of 0.05 μmol [^{99m}Tc]ZOL show a significantly higher binding of diaphysis in comparison to amorphous calcium phosphate ($p=0.0055$) and a significantly higher binding of diaphysis in comparison to hydroxyapatite ($p=0.014$) as shown in Figure 15.

[^{99m}Tc]DPD

Statistical analyses of [^{99m}Tc]DPD show a significantly higher binding of diaphysis ($p=0.0093$) in comparison to hydroxyapatite and a significantly higher binding of cancellous bone in

comparison to the artificial bone materials hydroxyapatite ($p=0.015$) and amorphous calcium phosphate ($p=0.046$) as shown in Figure 13.

4.3.4. Bone tracers for therapeutic purposes

A comparison of the new bone tracers [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL and the commercially available [^{153}Sm]EDTMP is shown in Figure 16. A bone binding of more than 75% of the new bone tracers on all bone compartments could be observed, whereas the bone binding of the commercially available [^{153}Sm]EDTMP was never higher than 25%.

Statistical analyses show a significantly higher binding of [^{177}Lu]ZOL on all bone materials in comparison to [^{153}Sm]EDTMP (HA: $p=0.00048$, ACP: $p=0.00027$, CB: $p=0.00055$, D: $p=0.00039$). [^{153}Sm]ZOL binds significantly higher on cancellous bone ($p=0.0044$) and on diaphysis ($p=0.0015$) and significantly higher on hydroxyapatite ($p=0.00022$) and on amorphous calcium phosphate ($p=0.000039$) in comparison to [^{153}Sm]EDTMP.

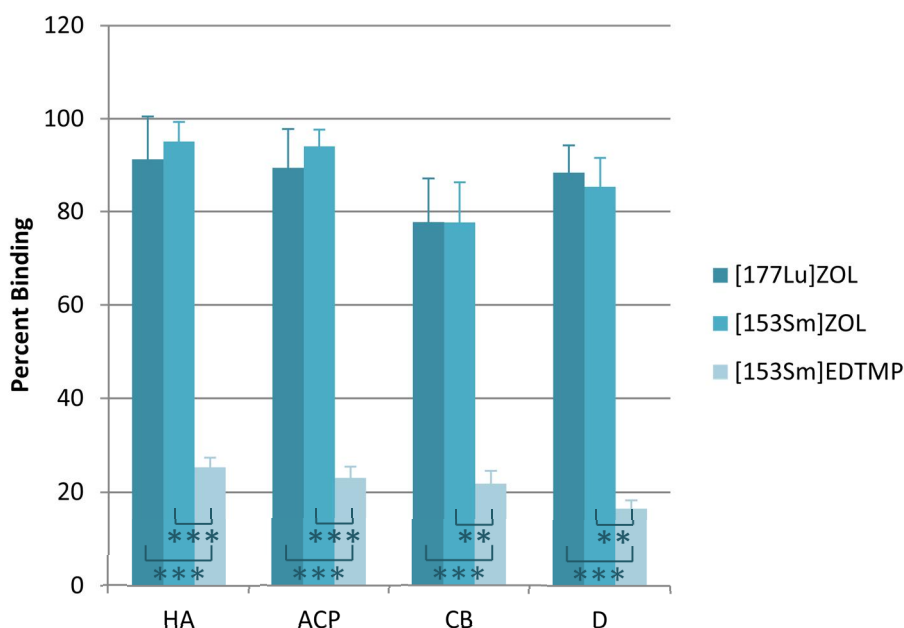


Figure 16: Binding of bone tracers for therapeutic purposes. The bindings were tested on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in a concentration of $0.3\mu\text{mol}$. Values are given in % as arithmetic mean of $n=4$, except $n=3$ of [^{153}Sm]ZOL ($\pm\text{sd}$).

4.3.5. Differences between artificial and human bone materials of therapeutic bone tracers

[^{177}Lu]ZOL

Statistical analyses of [^{177}Lu]ZOL show no significant differences between the bone binding on artificial and human bone materials as shown in Figure 16.

[¹⁵³Sm]ZOL

Statistical analyses of [¹⁵³Sm]ZOL show no significant differences between its binding on artificial and human bone materials as shown in Figure 16.

[¹⁵³Sm]EDTMP

Statistical analyses of [¹⁵³Sm]EDTMP show a significantly higher binding on the artificial bone materials hydroxyapatite (p=0.0024) and amorphous calcium phosphate (p=0.0101) in comparison to diaphysis as shown in Figure 16.

4.3.6. Comparison of bone tracers for diagnostic and therapeutic purposes

A comparison of all tested bone tracers with emphasis on the differences between the bone tracers is shown in Figure 17.

Statistical analyses show significantly higher binding of [¹⁷⁷Lu]ZOL in comparison of [^{99m}Tc]ZOL (hydroxyapatite: p=0.00022, amorphous calcium phosphate: p=0.000060, cancellous bone: p=0.00084, diaphysis: p=0.000023). [¹⁵³Sm]ZOL binds significantly higher in comparison to of [^{99m}Tc]ZOL on hydroxyapatite (p=0.000015), amorphous calcium phosphate (p=0.0000086), diaphysis (p=0.0004) and cancellous bone (p=0.006). [^{99m}Tc]ZOL binds significantly higher than [¹⁵³Sm]EDTMP on hydroxyapatite (p=0.037) and diaphysis (p=0.034) and [¹⁵³Sm]EDTMP binds significantly higher than [^{99m}Tc]ZOL on cancellous bone (p=0.046).

[¹⁷⁷Lu]ZOL and [¹⁵³Sm]ZOL bind significantly higher than ⁶⁸Ga-ZOL ([¹⁷⁷Lu]ZOL: HA: p=0.00043, ACP: p=0.00021; [¹⁵³Sm]ZOL: HA: p=0.00011, ACP: p=0.000026). ⁶⁸Ga-ZOL binds significantly higher on amorphous calcium phosphate (p=0.024) than [¹⁵³Sm]EDTMP.

[¹⁷⁷Lu]ZOL binds significantly higher on diaphysis (p=0.00062), amorphous calcium phosphate (p=0.0019), cancellous bone (p=0.002) and hydroxyapatite (p=0.022) than [^{99m}Tc]DPD. [¹⁵³Sm]ZOL binds significantly higher on amorphous calcium phosphate (p=0.000081), hydroxyapatite (p=0.0057), cancellous bone (p=0.0052) and diaphysis (p=0.0011) than [^{99m}Tc]DPD. [^{99m}Tc]DPD binds significantly higher on hydroxyapatite (p=0.000000066), amorphous calcium phosphate (p=0.000016), cancellous bone (p=0.030) and diaphysis (p=0.012).

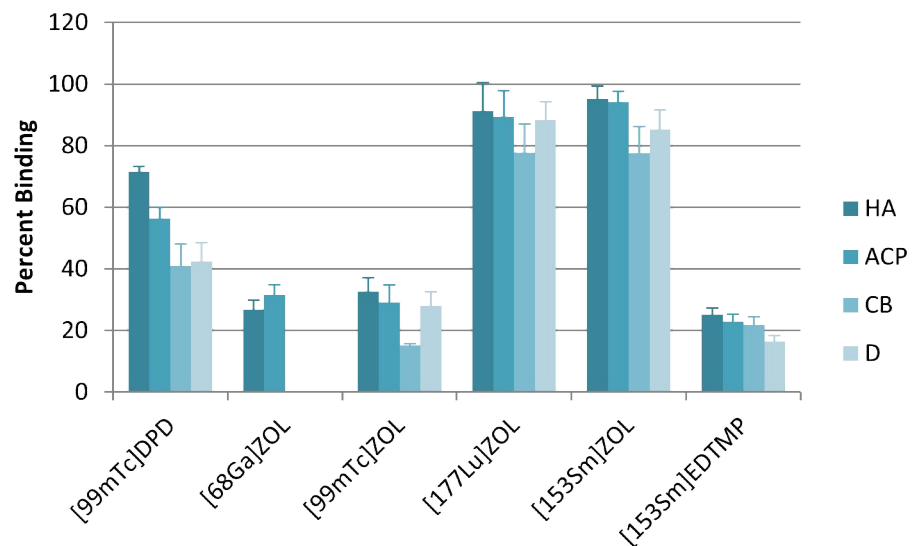


Figure 17: Binding of bone tracers on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in a concentration of 0.3 μ mol. Values are given in % as arithmetic mean

5. Discussion

5.1. Preparation of new bone tracers

5.1.1. [^{99m}Tc]ZOL and ^{68}Ga -ZOL

The preparation of [^{99m}Tc]ZOL and ^{68}Ga -ZOL followed by protocols showed stable results [57, 58, 66].

5.1.2. [^{177}Lu]ZOL

The preparation of [^{177}Lu]ZOL was already published by Majkowska et al. and the protocol is very alike to the protocol for ^{68}Ga -ZOL from Haeusler et al. [59, 66]. The differences are the pH adjustments. In Majkowska et al. the complexation takes place at pH 2 for 30min and the pH is adjusted to 6-7 afterwards [59]. In Haeusler et al. the pH is adjusted to 5.5-6.0 and the complexation takes place 20min at this pH range [66]. For this work, the preparation was oriented to Haeusler et al. and the pH adjustment was changed to 5.5 as the preparation is very pH sensitive.

In a new protocol from Nikzad et al. the pH is adjusted to 7-8.5 after a 60min incubation time and the metal:ligand ratio is 1:50 [70].

5.1.3. [^{153}Sm]ZOL

The preparation of [^{153}Sm]ZOL was done the first time in this work. The labelling could be performed with the protocol of Haeusler et al. for ^{68}Ga -ZOL [66]. It is no surprise that the protocol worked for [^{153}Sm]ZOL too as it was already established that the protocol worked for another lanthanide [^{177}Lu]ZOL. Nevertheless, the liquid phases of the ITLC for the quality control was adapted to $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ and sodium acetate. Testing revealed that [^{153}Sm]ZOL is not as pH sensitive as [^{177}Lu]ZOL and therefore the pH was adjusted to 5.5-6.0.

The preparations of [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL could not be improved by adding stannous chloride or ascorbic acid.

In conclusion the preparations of the new bone tracers are easy and fast to perform.

5.2. Quality Control

The labelling of [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL had a better radiochemical purity than [^{177}Lu]ZOL and ^{68}Ga -ZOL as shown in Table 5. Even though, [^{153}Sm] and [^{177}Lu] are both lanthanides, [^{177}Lu]ZOL and ^{68}Ga -ZOL have a similar behaviour [71].

For all bone tracers Whatman 3MM was chosen as the solid phase as in comparison to iTLC-SG the handling is easier. iTLC-SG strips can break easier and the coating can be destroyed if not carefully handled. Furthermore, the developing time can be longer with iTLC-SG strips. As Whatman 3MM systems are comparable to iTLC-SG systems, for all new bone tracers Whatman 3MM is the first choice [72].

The results of the testing of using a liquid or dry form of the probe on chromatography paper, when applied in the developing chambers, suggests that the differences are minor. For a better reproducibility and comparability, it is better to use the dried version.

To test the ITLC systems with the free radionuclides with the same conditions as the complexes was important to validate the R_f of free radionuclide in the ITLC systems. Through comparing the performance between the free radionuclide and the complex, a suitable ITLC system for all bone tracers could be found.

5.2.1. [^{99m}Tc]ZOL

The quality control of [^{99m}Tc]ZOL was the most successful of the new bone tracers and is shown in Figure 7. The chemical purity of $96.7 \pm 4\%$ is in line with Durak et al. (over 95%), but lower as in Asikoglu et al. (over 99%) [57, 58]. A chemical purity over 99% could be only achieved in 54% of the experiments (15 out of 28). The quality control is easy to perform and could be replicated.

5.2.2. [^{99m}Tc]DPD

The labelling of [^{99m}Tc]DPD was always successful. An example of a quality control is shown in Figure 8. The chemical purity of $97.9 \pm 2\%$ is better than any of the new bone tracers used in this thesis, as is the highest value 100%. The impurities are to be found colloid.

The quality control of [^{99m}Tc]DPD was adopted from iTLC-SG (quality control protocol of the clinic as shown in Appendix D) to Whatman 3MM for the reasons stated above. The liquid phases were changed to $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ and acetone to reduce smearing.

5.2.3. Smearing of [^{99m}Tc]ZOL and [^{99m}Tc]DPD

The smearing of [^{99m}Tc]DPD is not as distinct as [^{99m}Tc]ZOL as shown in Figure 7 and Figure 8, but still visible. More smearing of [^{99m}Tc]DPD occurred with the liquid phase 0.9% sodium chloride

as shown in Figure 8, which is the standard liquid phase for [^{99m}Tc]ZOL. The reason for the smearing is probably a weakening of the binding of [^{99m}Tc] through the dilution of the complex and followed by an interaction of [^{99m}Tc] with the medium or hydrolysis to colloid. This problem is known for over 30 years and 0.9% sodium chloride was recommended for less smearing [74, 75, 76]. Further, J. Kreiseder recommended a solution of 0.9% sodium chloride and 1M HCl (10:1) for even less smearing [71].

5.2.4. ^{68}Ga -ZOL

With $85.7\pm 9\%$ the radiochemical yield of ^{68}Ga -ZOL is the lowest of all new bone tracers and is shown in Figure 9. On the one hand, 85% is below a level which would be suitable for *in vivo* and on the other hand, the standard deviation shows irregularities between the labelling. The quality control itself is not as clear as the other bone tracers are. As the R_f of the complex is 1 and the R_f from the $^{68}\text{GaCl}_3$ is 0.7-0.8 and a smearing effect occurs, an overlap cannot be ruled out. Additionally, a smearing starting from the origin occurred with ^{68}Ga -ZOL with sodium chloride as liquid phase as shown in Figure 9. Unfortunately, a better quality control system could not be found.

The impurities of the quality control of ^{68}Ga -ZOL cannot be allocated for sure to $^{68}\text{GaCl}_3$ or colloid. Noteworthy, if the was $\text{pH}>6$, the labelling was not as successful as otherwise. Through changes in pH, the presentation of free gallium changes too. How exactly free gallium ions appear, is not clear. According to Zhou et al., between $\text{pH}<3.5$ and $\text{pH}>9.5$ insoluble amorphous $\text{Ga}(\text{OH})_3$ and the soluble $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ are built. In consequence, a white precipitate can appear [77]. In contrast, Hacht shows that a polynuclear hydroxide $[\text{Ga}_4(\text{OH})_{11}]^-$ is built between approximately pH 3 and 7.5 with its peak about at pH 7 and $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ start to occur at pH 6 [78]. Nevertheless, in the range pH 5.5 to 6 as it was used, $\text{Ga}(\text{OH})_3$ could be built, especially when the pH was over 6. If gallium oxides and gallat are the only impurities cannot be verified. The different forms of gallium at pH 5.5-6.0 could be an explanation for the smearing in the ITLC as shown in Figure 9. The forming of $\text{Ga}(\text{OH})_3$ is influenced by the complex building time [79]. Through a fast adjustment of the pH to 5.5-6.0 a better radiochemical purity may be achieved.

Another explanation could be the same as for the smearing of [^{99m}Tc]ZOL: if the complex is weak and diluted, ^{68}Ga could react with the medium or hydrolyse to colloid [74, 75, 76]. However, Mitterhauser et al. showed that the quality control of ^{68}Ga -EDTMP had a tailing after 5min migration time, which was gone after 300min [47]. 300min is too long for practical use, but it would show that the smearing is not a product of impurities.

5.2.5. [^{177}Lu]ZOL

The quality control is shown in Figure 10. The radiochemical purity $88.5\pm 7\%$ is not satisfying and the standard deviation of 7% shows a great variety between the values. Nevertheless, the highest value with 98.3% shows that a sufficient complexation is achievable. The impurities are likely to be [^{177}Lu]Cl₃. The radiolabelling of [^{177}Lu]ZOL is very pH sensitive and a pH ≤ 6 decreased the radiochemical purity. An explanation for this phenomenon could be the pH-dependent self-association of lanthanides, which occur with a greater pH [80].

In a new protocol from Nikzad et al. a HPLC method for the quality control is described: 20min, 1mL/min flow rate, pressure: 130kgF/cm², eluent:water:acetonitrile 3:2 (v/v), stationary phase: reversed phase column Whatman Partisphere C₁₈ 4.6x250mm, scintillation detector [70]. If this HPLC works, it would be a step in the right direction to ensure a good quality product.

5.2.6. [^{153}Sm]ZOL

The quality control of [^{153}Sm]ZOL shows a satisfying result with $96.6\pm 2\%$ and is shown in Figure 11. Nevertheless, the high radiochemical purities of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL of 99.8% could not be achieved as the highest value was 98.7%. The impurities are likely to be [^{153}Sm]Cl₃. [^{153}Sm]ZOL labelling is less pH sensitive than [^{177}Lu]ZOL. Nevertheless, a self-association could occur too [80].

In conclusion, the quality control with ITLC is suitable for the new bone tracers. Nevertheless, a quality control with HPLC would increase the validity as cold zoledronic acid would be detected too. First experiments to research a HPLC method were performed in the working group with no leading results. The HPLC protocol of Nikzad et al. has to be further evaluated. If it works, it may be applied to the other bone tracers, too.

5.1. Filtration

For the preparation of parenteralia, methods and materials are needed to ensure sterility and avoid contamination and growth of microorganisms [81]. For this purpose a sterile filtration after the preparation is needed. As filters have different adsorption properties, different filters were tested to verify which has the lowest adsorption. The Sterifix® filter has the lowest adsorption of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL with $31\pm 0.04\%$ as shown in Table 6. As the Sterifix® filter had a much lower adsorption in the first round of experiments, only the adsorption from it was verified.

5.2. Bone Binding Experiments

The tested bone tracers evinced partly significant differences in irreversible bone binding, as shown in Figure 17. [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL bind significantly higher than [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL and ^{68}Ga -ZOL. [^{153}Sm]ZOL binds significantly higher in comparison to [^{153}Sm]EDTMP. These results suggest that the binding is dependent on both, the ligand and the nuclide, which is consistent with Mitterhauser and Toegel [82]. Mitterhauser and Toegel state that the bone binding is influenced by the radionuclide too, as it influences the conformation and stability of the complex. Secondly, after the radionuclide is released from the complex, physicochemical characteristics (such as charge, as ionic radius) influence the binding to bone minerals [82].

The therapeutic bone tracers [^{153}Sm]ZOL and [^{177}Lu]ZOL show the highest bone binding of all bone tracers, as shown in Figure 17. They are followed with decreasing binding by [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL, ^{68}Ga -ZOL and with the lowest binding [^{153}Sm]EDTMP. These results show that zoledronic acid could be used as a ligand in diagnostic and therapeutic bone tracers. This finding strengthens the concept to use zoledronic acid bone tracers as tools.

5.2.1. Diagnostic bone tracers

[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD is an established bone tracer and is used for bone scintigraphy as described in the package leaflet of Teceos®. Even though, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL binds significantly lower as [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD as shown in Figure 13, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL could be a new and improved bone tracer for scintigraphy, since it is hypothesized to reliably visualize soft tissue metastases.

[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL was tested in a concentration of 0.05 μmol additionally as it represents the concentration of 0.1mg applied to a 20g mouse for diagnosis purposes. As described in Asikoglu et al., this is a similar concentration to the maximum therapeutic dose tested in the clinical trials of 8mg i.v. per patient (0.1mg/kg for a 70kg patient) [58]. The influence of the concentration of the ligand has a significant effect on the bone binding as shown in Figure 15, especially on human bone materials.

^{68}Ga -ZOL has about the same bone bindings affinities as [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL. However, J. Kreiseder showed that ^{68}Ga -ZOL is not stable in murine and human plasma [71]. A possible explanation for this phenomenon could be the hydrolysis to $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ (gallat) [83]. This leads to the conclusion, that ^{68}Ga -ZOL is not suitable as a new bone tracer. This is unfortunate, as ^{68}Ga -ZOL could have been a very useful generator based PET-Bone-Tracer. Additionally, for a ^{68}Ga -bone tracer no cyclotron is needed and a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator can be used potentially up to 1 year or even longer. In comparison, a [$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$] generator can be used one week. Moreover, production shortages of [$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$] generators could still occur in the future. Therefore, an

alternative diagnostic bone tracer based on zoledronic acid would have been a great advantage [84, 85, 86, 87].

5.2.2. Differences between artificial and human bone materials of diagnostic bone tracers

Interestingly, 0.3 μmol [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL binds higher on artificial bone materials than on human bone materials, whereas 0.05 μmol [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL binds higher on human materials as shown In Figure 15. This is unusual, as it would not have been expected from the same bone tracer such a difference in binding characteristics merely through change in concentration.

0.3 μmol [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD binds on diaphysis and cancellous bone nearly the same, but it binds more than 15 percentage points more on hydroxyapatite than on amorphous calcium phosphate. On the contrary, 0.3 μmol [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]ZOL bound nearly the same on hydroxyapatite and amorphous calcium phosphate and nearly 15 percentage points higher binding on diaphysis than on cancellous bone.

5.2.3. Therapeutic bone tracers

[^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL have a similar bone binding behaviour. Both bone tracers have nearly the same % binding and bind highest on HA, followed by ACP, D and CB as shown in Figure 16. Both new bone tracers bind significantly higher than the established [^{153}Sm]EDTMP.

These results suggest that [^{153}Sm]ZOL and [^{177}Lu]ZOL are very promising bone tracers for therapeutically purposes and both could be used for bone pain palliation as [^{153}Sm]EDTMP is used now [88].

Unfortunately, [^{177}Lu]ZOL is not stable in murine and human plasma [71]. This leads to the conclusion that [^{177}Lu]ZOL is not a suitable candidate for a new bone tracer.

5.2.4. Differences between artificial and human bone materials of therapeutic bone tracer

[^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL have a similar bone binding on all bone compartments as shown in Figure 16. Binding on cancellous bone is less (78%) than on the other bone materials (85-95%). [^{153}Sm]EDTMP binds significantly higher on the artificial bone materials than on diaphysis as shown in Figure 16.

5.3. Comparison with previously published data

The experiments were conducted with a concentration of 0.3 μmol derived from the papers from Mitterhauser et al. 2004 and 2005 [69, 89].

Table 8 gives an overview of the binding of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD and [^{153}Sm]EDTMP on artificial and human bone materials from Mitterhauser et al. [69, 89] and from this work. Diaphysis consists of cortical bone; hence, the results can be compared.

	[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD		[^{153}Sm]EDTMP	
	MM et al	Thesis	MM et al	Thesis
HA	30 $\pm$ 5	72 $\pm$ 2	52 $\pm$ 1	25 $\pm$ 2
ACP	23 $\pm$ 6	56 $\pm$ 4	47 $\pm$ 3	23 $\pm$ 2
CB	48 $\pm$ 3	41 $\pm$ 7	27 $\pm$ 1	22 $\pm$ 3
D/Co	51 $\pm$ 5	42 $\pm$ 6	28 $\pm$ 3	16 $\pm$ 2

Table 8: Comparison of the thesis bone binding data with the data of Mitterhauser et al. [69,89]. Values are given in % as arithmetic mean ($\pm$ sd). Co...cortical bone

The bone binding values of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD on human bone was comparable between Mitterhauser et al. and this work. However, the binding on artificial bone was found to be significantly higher (HA: $p=0.0027$, ACP: $p=0.003$) than in Mitterhauser et al. as shown in Figure 18.

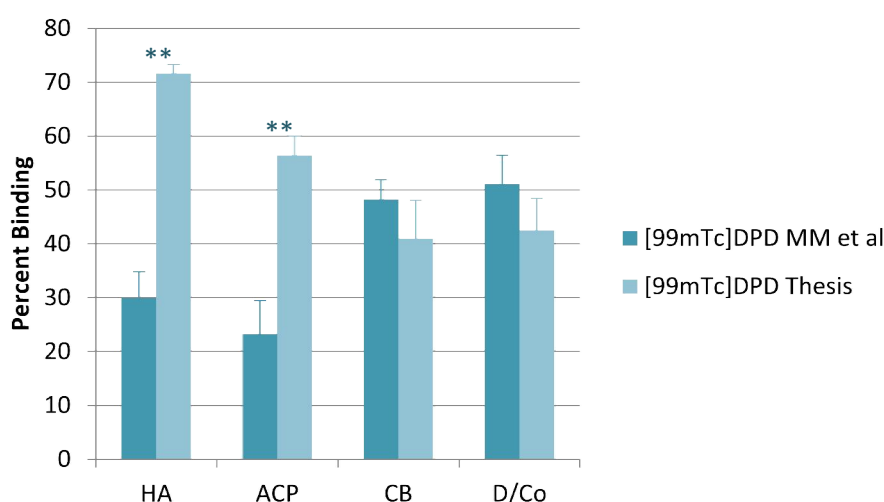


Figure 18: Comparison of the data of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD with the data obtained from Mitterhauser et al. 2004 and 2005 [69,89].

The differences of bone binding of [^{153}Sm]EDTMP between Mitterhauser et al. and this work on human bone materials are highly significant (HA: $p=0.000008$, ACP: $p=0.00044$) and very

significant on diaphysis/cortical bone ($p=0.0028$) as shown in Figure 19. The bone binding of [^{153}Sm]EDTMP does not differ between the different bone materials much in this work. In Mitterhauser et al., the binding on artificial bone materials are much higher than the ones on human bone materials as shown in Figure 19.

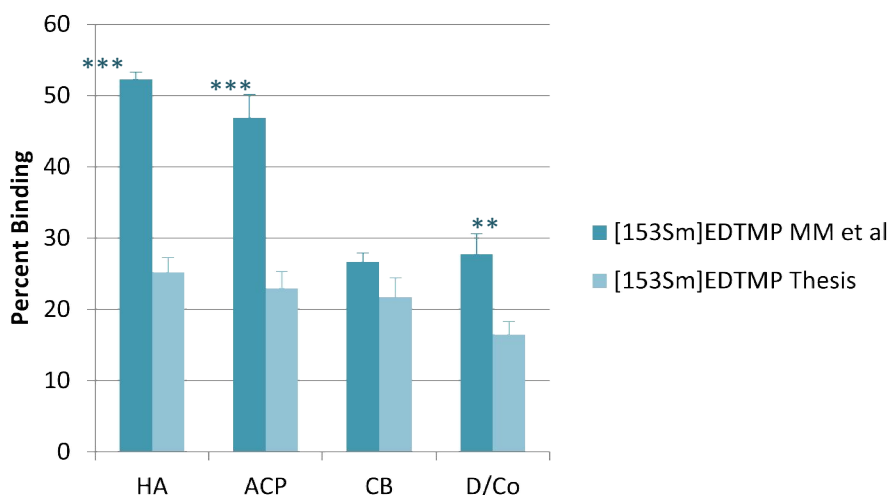


Figure 19: Comparison of the data of [^{153}Sm]EDTMP with the data obtained from Mitterhauser et al. 2004 and 2005 [69,89].

Comparing the binding of [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD and [^{153}Sm]EDTMP on artificial bone materials, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]DPD bound higher in this work, in contrast, [^{153}Sm]EDTMP bound higher in Mitterhauser et al. At this point there is no explanation for this drastic difference. Differences in the used bone materials as well as the operator could have influenced the outcomes. Nevertheless, these parameters seem not to sufficiently explain a variation this high.

Majkowska et al. 2009 tested zoledronic acid bone tracers on hydroxyapatite with a different bone binding protocol [59]. A comparison of the bone binding protocols between Majkowska et al. [59] and Mitterhauser et al. [69] are shown in Table 9.

However, the bone binding results of [^{177}Lu]ZOL ($91\pm 9\%$ on 3mg HA) of the thesis and Majkowska et al. (98% on 5mg HA) [59] are nearly the same.

The comparison of the binding values of the thesis with the published data of Mitterhauser et al. shows that even with the same experimental protocol the results can vary. Interestingly, although the protocols of Majkowska et al. differs, the results of [^{177}Lu]ZOL are similar.

Whether the two protocols (Majkowska et al. and Mitterhauser et al.) can be directly compared in a wider range (for other tracers) cannot be verified so far.

Work Step	Mitterhauser et al.	Majkowska et al.
Used hydroxyapatite	Hydroxyapatite purum p.a. (Fluka Chemika)	Hydroxyapatite Bio-Gels HTP Gel (Bio-Rad Laboratories)
Amount of HA	3mg, 0mg for filter correction	1, 2, 5, 10, 20, 50mg, 0mg for test experiments
Incubation liquid	HBSS	Saline solution (ph=7.4)
Incubation time before adding bone tracers and temperature	12h, 37°C	1h, ?
Amount of added bone tracers	0.3µmol	50µL of 1.4-28mg dissolved ligand, ligand-to-metal molar ratio 5:1 to 200:1
Incubation time after adding bone tracer and temperature	2h, 37°C	24h, room temperature
Preparation of samples	Suspensions were filtered through Millex-FG®	Suspensions were centrifuged
Taking samples	3 aliquotes before and after filtering	2 aliquotes from the supernatant liquid
Measurement	gamma-counter	well-γ-scintillation counter
Calculation	$V_M = 100 * [AM(V_i) - AM(N_i)] / AM$ and $FV_{(1-4)} = [FV_M + V_M] / 100 * FV_M$ (cf. Materials and Methods)	$HB = (1 - A/B) \times 100$ HB...percentage binding to hydroxyapatite A...mean radioactivity value of the sample B...mean value of the “blank”

Table 9: Comparison of the bone binding protocols of Mitterhauser et al. [69] and Majkowska et al. [59].

5.4. Correction of Bone Tracer Binding

Since it is known that pure nuclides can also bind to bone specimen [18, 90], not all of the observed binding can be referred to the complex. The nuclide itself can show binding affinity to the bone materials as shown in Table 10, data obtained from J. Kreiseder [71].

% irreversible bone binding of:	[^{99m} Tc]TcO ₄ ⁻ Arithmetic mean n=3	⁶⁸ GaCl ₃ Arithmetic mean n=3	[¹⁷⁷ Lu]Cl ₃ Two values		[¹⁵³ Sm]Cl ₃ Two values	
HA	0.33 ±0.3	46 ±3	100	98	1	2
ACP	0.86 ±0.7	38 ±11	100	98	0.9	2
Co	0.33 ±0.7	50 ±14	96	92	0.1	0.2
D	0.12 ±2	31 ±9	93	89	0.6	2

Table 10: % bone binding of radionuclides to artificial and human bone materials, data obtained from J. Kreiseder [71]

As the radiochemical purities of the bone tracers are not 100%, the free radionuclide has an influence on the binding. Therefore, the calculation beneath was performed:

Calculation:

$$\text{BNuc} \cdot \text{RCI}\% = X$$

$$100 - X = Y$$

$$\text{Binding}\% \cdot Y = \text{corrected binding}$$

BNuc...Binding in % of the nuclide

RCI%...% of radiochemical impurities (obtained from the quality control)

Binding%...Binding in % of the bone tracer complex

The binding of the radionuclides were used from J. Kreiseder 2014 [71] and the results are shown in Table 11 and Table 12.

Bone Tracer	HA		ACP	
	% experimental	% corrected	% experimental	% corrected
0.05µmol [^{99m}Tc]ZOL	64 ±6	64 ±6	64 ±4	64 ±4
0.3µmol [^{99m}Tc]ZOL	33 ±5	33 ±5	29 ±6	29 ±6
0.3µmol ⁶⁸Ga-ZOL	27 ±3	21 ±5	32 ±3	26 ±3
0.3µmol [¹⁷⁷Lu]ZOL	91 ±9	77 ±13	89 ±9	75 ±12
0.3µmol [¹⁵³Sm]ZOL	95 ±4	95 ±4	94 ±4	94 ±4

Table 11: Comparison of % bone binding on artificial bone materials of thesis with % bone binding corrected.

Bone Tracer	CB		D	
	% experimental	% corrected	% experimental	% corrected
0.05µmol [^{99m}Tc]ZOL	70 ±6	70 ±6	79 ±4	79 ±4
0.3µmol [^{99m}Tc]ZOL	15 ±0.6	15 ±0.5	28 ±5	28 ±5
0.3µmol [¹⁷⁷Lu]ZOL	78 ±9	63 ±15	88 ±6	72 ±12
0.3µmol [¹⁵³Sm]ZOL	78 ±9	78 ±9	85 ±6	85 ±6

Table 12: Comparison of % bone binding on human bone materials of thesis with % bone binding corrected.

The differences between the bone binding data and the corrected data are influenced by nuclides. [¹⁷⁷Lu]Cl₃ has the highest bone binding, followed by ⁶⁸GaCl₃. The calculation results show that the bone tracers with these two nuclides are not as promising for new bone tracers as bone tracers labelled with [^{99m}Tc]TcO₄⁻ or [¹⁵³Sm]Cl₃. The bone binding of [^{99m}Tc]ZOL and [¹⁵³Sm]ZOL is based on the bone tracers themselves and not on the nuclides. The new bone tracers [^{99m}Tc]ZOL and [¹⁵³Sm]ZOL are the two most promising bone tracers based on these results.

Nevertheless, this calculation is an approximation. It is not possible to calculate how much of the binding is due to the bone tracer complex or the free radionuclide. Especially the results of ⁶⁸Ga-ZOL and [¹⁷⁷Lu]ZOL should be handled with caution, as their radiochemical purities were below 90%.

6. Conclusio and Outlook

This work enabled an important step in the development of the new bone tracers [^{99m}Tc]ZOL, ^{68}Ga -ZOL, [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL. Not only could the already published protocols for [^{99m}Tc]ZOL, ^{68}Ga -ZOL and [^{177}Lu]ZOL be verified, a new protocol for the production of [^{153}Sm]ZOL was developed [57, 58, 66, 59]. The labelling of [^{153}Sm] with zoledronic acid could be achieved under the same conditions as ^{68}Ga -ZOL from Haeusler et al.'s protocol [66]. The corresponding quality controls could be further developed. Nevertheless, a tailing occurred in all ITLC and a smearing in the ITLC from [^{99m}Tc]ZOL and ^{68}Ga -ZOL; hence, further development (as conducted from J. Kreiseder) is still preferable [71].

The bone binding experiments based on Mitterhauser et al.'s protocol showed an irreversible binding of over 15% for the diagnostic bone tracers and over 75% for the therapeutic bone tracers on artificial and human bone materials [69]. Even though [^{99m}Tc]ZOL binds significantly less than [^{99m}Tc]DPD on artificial bone materials, it is still a promising candidate for a new diagnostic bone tracer. Furthermore, since it is considered to be affine to lung metastases and reliably visualize them, this new tracer could be superior to [^{99m}Tc]DPD. Although ^{68}Ga -ZOL has a comparable binding profile in regard of artificial bone materials as [^{99m}Tc]ZOL, J. Kreiseder showed an instability in murine and human plasma [71]. Hence, ^{68}Ga -ZOL is no longer a suitable candidate for a new PET bone tracer. [^{177}Lu]ZOL and [^{153}Sm]ZOL in comparison to [^{153}Sm]EDTMP significantly bound higher on all bone compartments. Based on these data both therapeutic bone tracers would have been suitable candidates; however, J. Kreiseder showed a murine and human plasma instability for [^{177}Lu]ZOL, leaving [^{153}Sm]ZOL as promising candidate [71]. As [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL showed specific and clear bone uptake and are stable in murine and human plasma, they are the highly promising candidates for further development and evaluation [71].

The data obtained from this work was compared to the published data from Mitterhauser et al. and Majkowska et al. [59, 69]. This work followed the protocol of Mitterhauser et al.; nevertheless, the bone binding was significantly different on the artificial bone compartments. Even though, different operators and materials could vary the results, a difference as high as experienced cannot be explained by these factors. On the contrary, the bone binding on hydroxyapatite of [^{177}Lu]ZOL of this work is comparable to Majkowska et al.

The calculated bone binding correction with radionuclide bone binding data from J. Kreiseder showed that the bone binding of [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL are based on the complex and not on the radionuclide. Consequently, it underlines the promising development of [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL.

Thus, [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL will be evaluated further in the course of the FWF project. Currently both bone tracers are tested in mice for biodistribution and [^{99m}Tc]ZOL will be applied to healthy dogs, as the osteosarcoma in dogs is very alike the human osteosarcoma [91, 92].

Taken together, the new bone tracers [^{99m}Tc]ZOL and [^{153}Sm]ZOL as theranostics, could lead to a more precise and earlier diagnosis of tumours and metastases and a personalised therapy.

7. References

- [1] Steliarova-Foucher, E., Stiller, C., Lacour, B., and Kaatsch, P.: International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer* 103, 1457–1467 (2005)
- [2] Mascarenhas, L., Siegel, S., Spector, L., Arndt, C., Femino, D., and Malogolowkin, M.: Malignant Bone Tumors. In Bleyer, A., O’Leary, M., Barr, R., and Ries, L., eds., *Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and Survival: 1975-2000*, vol. NIH Pub. No. 06-5767, chap. 8, 97–109. National Cancer Institute, Bethesda, MD (2006)
- [3] Gurney, J. G., Swensen, A. R., and Bulterys, M.: Malignant Bone Tumors. In Ries, L., Smith, M., Gurney, J., Linet, M., T, T., Young, J., and Bunin, G., eds., *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, vol. NIH Pub. No. 99-4649, chap. VIII, 99–110. National Cancer Institute, SEER Program, Bethesda, MD (1999)
- [4] Beckingsale, T. B. and Gerrand, C. H.: (i) Osteosarcoma. *Orthopaedics and Trauma* 24, 321 – 331 (2010)
- [5] Vigorita, V. J.: *Orthopaedic Pathology*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, USA (2008)
- [6] Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I., and Juergens, H.: Osteosarcoma treatment - Where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treatment Reviews* 40, 523 – 532 (2014)
- [7] Raymond, A. K. and Jaffe, N.: Osteosarcoma Multidisciplinary Approach to the Management from the Pathologist’s Perspective. In Jaffe, N., Bruland, Ø. S., and Bielack, S., eds., *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, Cancer Treatment and Research, Steven T. Rosen, M.D., Series Editor, 63–84. Springer (2009)
- [8] Mirabello, L., Troisi, R. J., and Savage, S. A.: International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *International Journal of Cancer* 125, 229–234 (2009)
- [9] Kager, J.: *Inzidenz und Behandlungsergebnisse von Patienten mit Osteosarkom in Österreich*. Master’s thesis, Medical University of Vienna (2014)
- [10] Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Osteosarkom (Kurzinformation).
http://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e9031/e10591/e77088/e63957/e74483/OsteosarkomKurzinfo05072012.doc_ger.pdf (2012). (accessed 00:40, Sep 08, 2014)
- [11] Bielack, S. S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G. U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubek, A., Juergens, H., and Winkler, K.: Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702

patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *Journal of Clinical Oncology* 20, 776–790 (2002)

[12] Jaffe, N.: Adjuvant Chemotherapy in Osteosarcoma. An Odyssey of Rejection and Vindication. In Jaffe, N., Bruland, Ø. S., and Bielack, S., eds., *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, Cancer Treatment and Research, Steven T. Rosen, M.D., Series Editor, 63–84. Springer (2009)

[13] Gatta, G., Botta, L., Rossi, S., Aareleid, T., Bielska-Lasota, M., Clavel, J., Dimitrova, N., Jakab, Z., Kaatsch, P., Lacour, B., Mallone, S., Marcos-Gragera, R., Minicozzi, P., Sánchez-Pérez, M.-J., Sant, M., Santaquilani, M., Stiller, C., Tavilla, A., Trama, A., Visser, O., and Peris-Bonet, R.: Childhood cancer survival in Europe 1999–2007: results of EUROCARE-5—a population-based study. *The Lancet Oncology* 15, 35 – 47 (2014)

[14] Chou, A. J., Geller, D. S., and Gorlick, R.: Therapy for Osteosarcoma. *Pediatric Drugs* 10, 315–327 (2008)

[15] Tschokert, M., Mitterhauser, M., Wadsak, W., Viernstein, H., and Haeusler, D.: Evaluierung neuer Knochentracer anhand von Bindungsstudien an synthetischem und humanen Knochenmaterial. In *21. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Radiochemie/Radiopharmazie (AGRR)* (2013)

[16] Mitterhauser, M. and Toegel, S.: Radiopharmaceutical considerations on bone seeker uptake: should we learn from therapeutical targets of bisphosphonates? *Nuclear Medicine and Biology* 38, 617–618 (2011)

[17] San-Julian, M., Diaz-de Rada, P., Noain, E., and Sierrasesumaga, L.: Bone metastases from osteosarcoma. *International Orthopaedics* 27, 117–120 (2003)

[18] Eftekhari, F.: Imaging Assessment of Osteosarcoma in Childhood and Adolescence: Diagnosis, Staging, and Evaluating Response to Chemotherapy. In Jaffe, N., Bruland, Ø. S., and Bielack, S., eds., *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, Cancer Treatment and Research, Steven T. Rosen, M.D., Series Editor, 63–84. Springer (2009)

[19] Meyer, J. S., Nadel, H. R., Marina, N., Womer, R. B., Brown, K. L. B., Eary, J. F., Gorlick, R., Grier, H. E., Randall, R. L., Lawlor, E. R., Lessnick, S. L., Schomberg, P. J., and Kailo, M. D.: Imaging guidelines for children with Ewing sarcoma and osteosarcoma: a report from the Children’s Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatric Blood and Cancer* 51, 163–170 (2008)

[20] Byun, B. H., Kong, C.-B., Lim, I., Kim, B. I., Choi, C. W., Song, W. S., Cho, W. H., Jeon, D.-G., Koh, J.-S., Lee, S.-Y., and Lim, S. M.: Comparison of (18)F-FDG PET/CT and (99 m)Tc-MDP bone scintigraphy for detection of bone metastasis in osteosarcoma. *Skeletal Radiol* 42, 1673–1681 (2013)

- [21] Sahin, E., Zincirkeser, S., Baris Akcan, A., and Elboga, U.: Is ^{99m}Tc -MDP whole body bone scintigraphy adjuvant to ^{18}F -FDG-PET for the detection of skeletal metastases? *Journal of BUON* 19, 291–296 (2014)
- [22] Blake, G. M., Park-Holohan, S. J., Cook, G. J., and Fogelman, I.: Quantitative studies of bone with the use of ^{18}F -fluoride and ^{99m}Tc -methylene diphosphonate. *Seminars in Nuclear Medicine* 31, 28–49 (2001)
- [23] Blake, G. M., Moore, A. E. B., and Fogelman, I.: Quantitative studies of bone using (^{99m}Tc)-methylene diphosphonate skeletal plasma clearance. *Seminars in Nuclear Medicine* 39, 369–379 (2009)
- [24] European Medicines Agency: Xofigo : EPAR - Summary for the public. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002653/WC500156175.pdf. (accessed 20:23, March 14, 2015)
- [25] ChemSpider: CSID:10616990. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10616990.html>. (accessed 02:40, Sep 8, 2014)
- [26] Fogelman, I.: Diphosphonate bone scanning agents—current concepts. *European Journal of Nuclear Medicine* 7, 506–509 (1982)
- [27] International Atomic Energy Agency (IAEA): Labelling kits containing methylenediphosphonic acid (MDP, medronic acid). http://nucleus.iaea.org/HHW/Radiopharmacy/VirRad/Selection_of_Labelling_Kit/List_of_labelling_kits/index.html. (accessed 05:21, Sep 10, 2014)
- [28] Uematsu, T., Yuen, S., Yukisawa, S., Aramaki, T., Morimoto, N., Endo, M., Furukawa, H., Uchida, Y., and Watanabe, J.: Comparison of FDG PET and SPECT for detection of bone metastases in breast cancer. *AJR Am J Roentgenol* 184, 1266–1273 (2005)
- [29] Choi, C. W., Lee, D. S., Chung, J. K., Lee, M. C., Kim, N. K., Choi, K. W., and Koh, C. S.: Evaluation of bone metastases by Tc- 99m MDP imaging in patients with stomach cancer. *Clinical Nuclear Medicine* 20, 310–314 (1995)
- [30] Even-Sapir, E., Metser, U., Mishani, E., Lievshitz, G., Lerman, H., and 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, ^{18}F -fluoride PET, and ^{18}F -fluoride PET/CT. *Journal of Nuclear Medicine* 47, 287–297 (2006)
- [31] Einhorn, T. A., Vigorita, V. J., and Aaron, A.: Localization of technetium- 99m methylene diphosphonate in bone using microautoradiography. *Journal of Orthopaedic Research* 4, 180–187 (1986)

- [32] Toegel, S., Hoffmann, O., Wadsak, W., Ettlinger, D., Mien, L.-K., Wiesner, K., Nguemo, J., Viernstein, H., Kletter, K., Dudczak, R., and Mitterhauser, M.: Uptake of bone-seekers is solely associated with mineralisation! A study with ^{99m}Tc -MDP, ^{153}Sm -EDTMP and ^{18}F -fluoride on osteoblasts. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 33, 491–494 (2006)
- [33] Hoefnagel, C. A., Bruning, P. F., Cohen, P., Marcuse, H. R., and van der Schoot, J. B.: Detection of lung metastases from osteosarcoma by scintigraphy using ^{99m}Tc -methylene diphosphonate. *Diagnostic Imaging* 50, 277–284 (1981)
- [34] Tsuji, T., Yamamuro, T., Kotoura, Y., Matsumoto, M., Tanaka, H., Tanaka, C., Toguchida, J., Endo, K., Sakahara, H., and Koizumi, M.: Uptake of ^{99m}Tc -MDP in lung metastasis from osteosarcoma: clinical and animal studies. *Nuclear Medicine Communications* 9, 947–954 (1988)
- [35] Daniel, G. B., Avenell, J. S., Young, K., Mason, G. L., and Hahn, K. A.: Scintigraphic detection of subcutaneous metastasis in a dog with appendicular osteosarcoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 37, 146–149 (1996)
- [36] Lass, P., Krzeminski, M., and Teodorczyk, J.: (^{99m}Tc)-MDP uptake in soft-tissue osteosarcoma in a dog. *Nuclear Medicine Review Central and Eastern Europe* 7, 189 (2004)
- [37] Abbasi, I. A.: Studies on ^{177}Lu -labeled methylene diphosphonate as potential bone-seeking radiopharmaceutical for bone pain palliation. *Nuclear Medicine and Biology* 38, 417 – 425 (2011)
- [38] PubChem: Compound ID: 3305.
https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3305&loc=ec_rcs' #'x281.
(accessed 13:20, Sep 10, 2014)
- [39] Pirayesh, E., Amoui, M., Mirzaee, H. R., Tabei, F., Rakhsha, A., Kalantari, B. A., Shafiei, B., Assadi, M., and Asli, I. N.: Phase 2 study of a high dose of ^{186}Re -HEDP for bone pain palliation in patients with widespread skeletal metastases. *Journal of Nuclear Medicine Technology* 41, 192–196 (2013)
- [40] Liepe, K., Kropp, J., Hliscs, R., and Franke, W. G.: Significant reduction of the mass of bone metastasis 1 year after rhenium-186 HEDP pain palliation therapy. *Clinical Nuclear Medicine* 25, 901–904 (2000)
- [41] PubChem: CID: 189890.
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=189890>. (accessed 09:07, Aug 23, 2014)
- [42] Chemspider: CSID: 164917. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.164917.html>. (accessed 20:03, Aug 15, 2014)

- [43] Rossi, P., Tessonnier, L., Frances, Y., Mundler, O., and Granel, B.: 99mTc DPD is the preferential bone tracer for diagnosis of cardiac transthyretin amyloidosis. *Clinical Nuclear Medicine* 37, e209–e210 (2012)
- [44] Etchebehere, E. C. S. d. C., Pereira Neto, C. A. C., Lima, M. C. L. d., Santos, A. d. O., Ramos, C. D., Silva, C. M., and Camargo, E. E.: Treatment of bone pain secondary to metastases using samarium-153-EDTMP. *Sao Paulo Medical Journal* 122, 208–212 (2004)
- [45] Sinzinger, H., Weiss, K., and Hiltunen, J.: Background, Reasons and Benefits Using the Vienna Protocol for the Treatment of Painful Bone Recurrences with 153Samarium-EDTMP. *Anticancer Research* 29, 3393–3395 (2009)
- [46] Agarwal, K., Singla, S., Arora, G., and Bal, C.: ¹⁷⁷Lu-EDTMP for palliation of pain from bone metastases in patients with prostate and breast cancer: a phase II study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (2014). Ahead of print: European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2014
- [47] Mitterhauser, M., Toegel, S., Wadsak, W., Lanzenberger, R. R., Mien, L.-K., Kuntner, C., Wanek, T., Eidherr, H., Ettlinger, D. E., Viernstein, H., Kluger, R., Dudczak, R., and Kletter, K.: Pre vivo, ex vivo and in vivo evaluations of [⁶⁸Ga]-EDTMP. *Nuclear Medicine and Biology* 34, 391–397 (2007)
- [48] Green, J. R., Müller, K., and Jaeggi, K. A.: Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *Journal of Bone and Mineral Research* 9, 745–751 (1994)
- [49] European Medicines Agency: European public assessment reports: Zoledronic Acid. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&source=homeMedSearch&keyword=zoledronic%20acid&category=human&isNewQuery=true. (accessed 19:23, Sep 04, 2014)
- [50] European Medicines Agency: Rare disease (orphan) designations: Zoledronic acid. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/orphan_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d12b&source=homeMedSearch&keyword=zoledronic%20acid&isNewQuery=true. (accessed 19:37, Sep 04, 2014)
- [51] Weiss, H. M., Pfaar, U., Schweitzer, A., Wiegand, H., Skerjanec, A., and Schran, H.: Biodistribution and plasma protein binding of zoledronic acid. *Drug Metabolism and Disposition* 36, 2043–2049 (2008)
- [52] Rogers, M. J., Crockett, J. C., Coxon, F. P., and Mönkkönen, J.: Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone* 49, 34–41 (2011)
- [53] Green, J. R. and Guenther, A.: The backbone of progress - preclinical studies and innovations with zoledronic acid. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 77, Supplement 1, S3

– S12 (2011). Zoledronic Acid: A Framework of Emerging Anticancer Evidence Throughout the Cancer Continuum

[54] Costa, L., Harper, P., Coleman, R. E., and Lipton, A.: Anticancer evidence for zoledronic acid across the cancer continuum. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 77, Supplement 1, S31 – S37 (2011). Zoledronic Acid: A Framework of Emerging Anticancer Evidence Throughout the Cancer Continuum

[55] Gnant, M. and Clézardin, P.: Direct and indirect anticancer activity of bisphosphonates: A brief review of published literature. *Cancer Treatment Reviews* 38, 407 – 415 (2012)

[56] Goldsby, R. E., Fan, T. M., Villaluna, D., Wagner, L. M., Isakoff, M. S., Meyer, J., Randall, R. L., Lee, S., Kim, G., Bernstein, M., Gorlick, R., Krailo, M., and Marina, N.: Feasibility and dose discovery analysis of zoledronic acid with concurrent chemotherapy in the treatment of newly diagnosed metastatic osteosarcoma: A report from the Children’s Oncology Group. *European Journal of Cancer* 49, 2384 – 2391 (2013)

[57] Durak, F., Asikoglu, M., Orumlu, O., Koseoglu, K., and Ozkiloglu, H.: Labeling of zoledronic acid with ^{99m}Tc for bone imaging and biodistribution studies in rabbits. In *Chosen abstracts of 12th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals* (2004)

[58] Asikoglu, M. and Durak, F. G.: The rabbit biodistribution of a therapeutic dose of zoledronic acid labeled with Tc-^{99m} . *Applied Radiation and Isotopes* 67, 1616–1621 (2009)

[59] Majkowska, A., Neves, M., Antunes, I., and Bilewicz, A.: Complexes of low energy beta emitters ^{47}Sc and ^{177}Lu with zoledronic acid for bone pain therapy. *Applied Radiation and Isotopes* 67, 11–13 (2009)

[60] International Atomic Energy Agency (IAEA): Technetium-99m Radiopharmaceutical: Manufacture of Kits. Technical Report Series No. 466. http://www-pub.iaea.org/mtcd/publications/pdf/trs466_web.pdf, Vienna (2008). (accessed 03:50, Sep 11, 2014)

[61] Rösch, F. and Baum, R. P.: Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS. *Dalton Trans* 40, 6104–6111 (2011)

[62] Mazzi, U.: *Technetium-99m Pharmaceuticals. Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*, chap. ^{99m}Tc Chemistry, 7–58. Springer (2007)

[63] Mallol, J. and Zolle, I.: *Technetium-99m Pharmaceuticals. Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*, chap. Preparation of Technetium ^{99m}Tc Pharmaceuticals, 94–98. Springer (2007)

[64] Banerjee, S. R. and Pomper, M. G.: Clinical applications of Gallium-68. *Applied Radiation and Isotopes* 76, 2 – 13 (2013). Ga-68 Special Issue

- [65] Health Physics Society North Carolina Chapter: Nuclide Safety Data Sheet Lutetium-177. <http://hpschapters.org/northcarolina/NSDS/177LuPDF.pdf>. (accessed 05:27, Sep 11, 2014)
- [66] Haeusler, D., Hayer, S., Tschokert, M., Niederreiter, B., Otter, P., Florian, F., Girschele, F., Ungersboeck, J., Nics, L., Wadsak, W., and Mitterhauser, M.: "Multinuclide" radiolabeling of zoledronic acid and its preliminary preclinical evaluation as a potential new theranostic tool for bone-associated pathologies. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 56, 423 (2013)
- [67] Neves, M., Gano, L., Pereira, N., Costa, M. C., Costa, M. R., Chandia, M., Rosado, M., and Fausto, R.: Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies. *Nuclear Medicine and Biology* 29, 329–338 (2002)
- [68] Marques, F., Gano, L., Campello, M. P., Lacerda, S., Santos, I., Lima, L. M., Costa, J., Antunes, P., and Delgado, R.: 13- and 14-membered macrocyclic ligands containing methylcarboxylate or methylphosphonate pendant arms: Chemical and biological evaluation of their ^{153}Sm and ^{166}Ho complexes as potential agents for therapy or bone pain palliation. *Journal of Inorganic Biochemistry* 100, 270 – 280 (2006)
- [69] Mitterhauser, M., Toegel, S., Wadsak, W., Mien, L.-K., Eidherr, H., Wiesner, K., Viernstein, H., Kletter, K., and Dudczak, R.: Binding studies of ^{18}F -fluoride and polyphosphonates radiolabelled with ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{153}Sm and ^{188}Re on bone compartments: a new model for the pre vivo evaluation of bone seekers? *Bone* 34, 835–844 (2004)
- [70] Nikzad, M., Jalilian, A., Shirvani-Arani, S., Bahrami-Samani, A., and Golchoubian, H.: Production, quality control and pharmacokinetic studies of ^{177}Lu -zoledronate for bone pain palliation therapy. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 298, 1273–1281 (2013)
- [71] Kreiseder, J.: *Stabilitätsexperimente zur präklinischen Evaluierung von neuen Knochenstracern*. Master's thesis, University of Vienna (2014)
- [72] Mang'era, K., Wong, D., Douglas, D., Franz, K., and Biru, T.: Evaluation of alternative rapid thin layer chromatography systems for quality control of technetium-99m radiopharmaceuticals. *Applied Radiation and Isotopes* 86, 57 – 62 (2014)
- [73] Zolle, I. and Kladnik, S.: *Technetium-99m Pharmaceuticals. Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*, chap. 99mTc-Diphosphonates, 280–290. Springer (2007)
- [74] Billingham, M. W.: Chromatographic Quality Control of 99mTc-Labeled Compounds. *Journal of Nuclear Medicine* 14, 793–797 (1973)
- [75] Van Gansbeke, B., Jeghers, O., and Ermans, A.: Comparative study of quality control procedures for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiopharmaceuticals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 92, 323–332 (1985)

- [76] Van Gansbeke, B., Jeghers, O., Ermans, A., and Schoutens, A.: Paper and ITLC chromatography of ^{99m}Tc radiopharmaceuticals: An explanation for some artefacts. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 129, 33–41 (1989)
- [77] Zhou, Q., Henoumont, C., Vander Elst, L., Laurent, S., and Muller, R. N.: NMR determination of free gallium(III) ions in aqueous solutions of Ga complexes, "cold" analogs of PET/SPECT tracers. *Contrast Media & Molecular Imaging* 6, 165–167 (2011)
- [78] Hacht, B.: Gallium(III) Ion Hydrolysis under Physiological Conditions. *Bulletin of the Korean Chemical Society* Vol. 29, 372 – 376 (2008)
- [79] Kuícek, V., Havlíčková, J., Kotek, J., Tircsó, G., Hermann, P., Tóth, E., and Lukes, I.: Gallium(III) complexes of DOTA and DOTA-monoamide: kinetic and thermodynamic studies. *Inorganic Chemistry* 49, 10960–10969 (2010)
- [80] Faulkner, S. and Burton-Pye, B. P.: pH Dependent self-assembly of dimetallic lanthanide complexes. *Chemical Communications* 2, 259–261 (2005)
- [81] Europäisches Arzneibuch (Ph. Eur.) 7.8. University Library Vienna Databank (2011)
- [82] Mitterhauser, M. and Toegel, S.: What to consider in the development of new bone seekers: mechanistic and tracer-related aspects. *Nuclear Medicine and Biology* 35, 817–824 (2008)
- [83] Bandoli, G., Dolmella, A., Tisato, F., Porchia, M., and Refosco, F.: Mononuclear six-coordinated Ga(III) complexes: A comprehensive survey. *Coordination Chemistry Reviews* 253, 56 – 77 (2009)
- [84] Breeman, W. and Verbruggen, A.: The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator has high potential, but when can we use ^{68}Ga -labelled tracers in clinical routine? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 34, 978–981 (2007)
- [85] Schultz, M., Donahue, P., Musgrave, N., Zhernosekov, K., Naidoo, C., Razbash, A., Tworowska, I., Dick, D., Watkins, G., Graham, M., Runde, W., Clanton, J., and Sunderland, J.: An Increasing Role for ^{68}Ga PET Imaging: A Perspective on the Availability of Parent ^{68}Ge Material for Generator Manufacturing in an Expanding Market. *Journal of Postgraduate Medicine Education and Research* 47, 26–30 (2013)
- [86] Pillai, M. R. A., Knapp, J., and Russ, F. F.: Overcoming the ^{99m}Tc shortage: are options being overlooked? *Journal of Nuclear Medicine* 52, 15N–16N, 28N (2011)
- [87] International Atomic Energy Agency (IAEA): Nuclear Technology Review 2010 (2010)
- [88] European Medicines Agency: European Public Assessment Report (EPAR) Quadramet. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000150/WC500040111.pdf. (accessed 00:38, Sep 03, 2014)

- [89] Mitterhauser, M., Toegel, S., Wadsak, W., Mien, L.-K., Eidherr, H., Kletter, K., Viernstein, H., Kluger, R., Engel, A., and Dudczak, R.: Binding studies of [^{18}F]-fluoride and polyphosphonates radiolabelled with [$^{99\text{m}}\text{Tc}$], [^{111}In], [^{153}Sm] and [^{188}Re] on bone compartments: verification of the pre vivo model? *Bone* 37, 404–412 (2005)
- [90] Wong, K. K. and Piert, M.: Dynamic bone imaging with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled diphosphonates and ^{18}F -NaF: mechanisms and applications. *Journal of Nuclear Medicine* 54, 590–599 (2013)
- [91] Withrow, S. J. and Wilkins, R. M.: Cross talk from pets to people: translational osteosarcoma treatments. *One Health: The Intersection of Humans, Animals, and the Environment Journal* 51, 208–213 (2010)
- [92] Mueller, F., Fuchs, B., and Kaser-Hotz, B.: Comparative biology of human and canine osteosarcoma. *Anticancer Research* 27, 155–164 (2007)

8. Table of Figures

Figure 1: Chemical structure of MDP.....	3
Figure 2: Chemical structure of HEDP.....	4
Figure 3: Chemical structure of DPD.....	4
Figure 4: Chemical structure of EDTMP.....	5
Figure 5: Chemical structure of zoledronic acid.	6
Figure 6: Scheme of the bone binding experiment.	15
Figure 7: iTLC quality control of [^{99m} Tc]ZOL on Whatman 3MM.....	19
Figure 8: iTLC quality control of [^{99m} Tc]DPD on Whatman 3MM.....	20
Figure 9: iTLC quality control of ⁶⁸ Ga-ZOL on Whatman 3MM.	20
Figure 10: iTLC quality control of [¹⁷⁷ Lu]ZOL on Whatman 3MM.	21
Figure 11: Testing different iTLC-systems for quality control of [¹⁵³ Sm]ZOL. At top the stationary phase iTLC-SG and below Whatman 3MM. MeOH...methyl alcohol.....	22
Figure 12: Comparison of iTLC of unfiltered and filtered [^{99m} Tc]ZOL. Stationary phase was Whatman 3MM.	23
Figure 13: Binding of bone tracers for diagnostic purposes. The bindings were tested on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in a concentration of 0.3μmol. Values are given in % as arithmetic mean n=4 (±sd).	25
Figure 14: Binding of bone tracers for diagnostic purposes. The bindings were tested on hydroxyapatite (HA) and amorphous calcium phosphate (ACP) in a concentration of 0.3μmol. Values are given in % as arithmetic mean of at n=4 (±sd).	25
Figure 15: Binding of [^{99m} Tc]ZOL in concentrations 0.3μmol and 0.05μmol. The bindings were tested on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D). Values are given in % as arithmetic mean of n=4 (±sd).....	26
Figure 16: Binding of bone tracers for therapeutic purposes. The bindings were tested on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in a concentration of 0.3μmol. Values are given in % as arithmetic mean of n=4, except n=3 of [¹⁵³ Sm]ZOL (±sd).....	27
Figure 17: Binding of bone tracers on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in a concentration of 0.3μmol. Values are given in % as arithmetic mean.....	29
Figure 18: Comparison of the data of [^{99m} Tc]DPD with the data obtained from Mitterhauser et al. 2004 and 2005 [69,89].....	36
Figure 19: Comparison of the data of [¹⁵³ Sm]EDTMP with the data obtained from Mitterhauser et al. 2004 and 2005 [69,89].....	37

9. List of Tables

Table 1: Materials and used equipment.....	12
Table 2: Demonstration of the calculation of % bone binding.	17
Table 3: Demonstration of iterative filter correction of HA and ACP.	17
Table 4: Summary of labelling conditions for new bone tracers.	18
Table 5: Overview of the chemical purity of different new bone tracer.	18
Table 6: Summary of sterile filtration of [^{99m} Tc]ZOL.	22
Table 7: Binding of bone tracers on hydroxyapatite (HA), amorphous calcium phosphate (ACP), cancellous bone (CB) and diaphysis (D) in %.	24
Table 8: Comparison of the thesis bone binding data with the data of Mitterhauser et al. [69,89]. Values are given in % as arithmetic mean (±sd). Co...cortical bone	36
Table 9: Comparison of the bone binding protocols of Mitterhauser et al. [69] and Majowska et al. [59].	38
Table 10: % bone binding of radionuclides to artificial and human bone materials, data obtained from J. Kreiseder [71]	39
Table 11: Comparison of % bone binding on artificial bone materials of thesis with % bone binding corrected.....	40
Table 12: Comparison of % bone binding on human bone materials of thesis with % bone binding corrected.....	40

11. List of Abbreviations

ACP	amorphous calcium phosphate
CB	cancellous bone
Co	cortical bone
COSS	Cooperative Osteosarcoma Study Group
CT	Computed Tomography
D	diaphysis
DPD	2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonate
EDTMP	(ethylenedinitrilo)-tetramethylenephosphonic acid
EUROCARE	European Cancer Registry
FDG	fludeoxyglucose
HA	hydroxyapatite
HEDP	etidronic acid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
ICCC	International Classification of Childhood Cancer
iTLC	Instant Thin Layer Chromatography
iTLC-SG	Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel
MDP	medronic acid
PET	positron emission tomography
SEER Program	Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
ZOL	zoledronic acid

Appendices

Appendix A γ -Counter data experiment 06.12.12

Appendix B Package Insert Teceos®

Appendix C Package Insert Quadramet®

Appendix D Quality control protocol from clinic for [^{99m}Tc]DPD and [^{99m}Tc]MDP

Curriculum Vitae

Appendix A γ -Counter data experiment 06.12.12

06.12.2012 [^{99m} Tc]ZOL	HA, ACP	HA: n=6 ACP: n=5	Radiochemical purity: 97.4% (NaCl)		
	wp (mg)	Tc-99m CPM	Arithmetic mean	Standard deviation	% bone binding
BG		107.94 107.41 113.44	109.6	3.34	
A 1		334420.28 326890.36 324996.75	328,769.13	4,984.78	2.02
A 1 F		324008.29 319545.76 322826.69	322,126.91	2,312.10	
HA 1	3.04	268662.23 292213.85 255951.11	272,275.73	18,399.45	29
HA 1 F		192050.58 192049.86 192825.69	192,308.71	447.72	
HA 2	3.01	303676.46 284891.2 290479.42	293,015.69	9,646.04	27
HA 2 F		215647.65 214686.89 214885.81	215,073.45	507.12	
HA 3	3.03	283478.28 289206.11 310390.93	294,358.44	14,176.83	31
HA 3 F		200805.88 205610.15 204963.14	203,793.06	2,607.12	
HA 4	3.03	341537.63	302,715.55	34,103.23	35

		277589.18			
		289019.83			
HA 4 F		197786.78	197,938.02	1,180.46	
		199186.82			
		196840.47			
HA 5	3.04	359600.02	328,845.66	45,302.49	41
		350114.65			
		276822.3			
HA 5 F		193099.47	193,139.96	976.83	
		192184			
		194136.41			
HA 6	3.02	262104.79	261,096.29	5,051.87	27
		265567.83			
		255616.24			
HA 6 F		193537.05	190,780.07	3,214.91	
		191554.46			
		187248.69			
BG		172.9	168.6	15.2	
		181.19			
		151.72			
A 2		271651.85	272,351.44	820.81	2.66
		273255			
		272147.47			
A 2 F		250423.18	265,109.80	13,395.52	
		268249.86			
		276656.36			
BG		148.66	136.12	12.19	
		124.31			
		135.39			
A 3		267980.57	268,927.93	3,166.79	0.52
		272460.28			
		266342.95			
A 3 F		270409.34	267,536.03	2,586.19	
		265394.78			
		266803.96			

ACP 1	3.03	266680.67 261490.35 267823.72	265,331.58	3,375.34	25
ACP 1 F		203746.93 197524.55 196943.6	199,405.03	3,771.40	
ACP 2	2.99	258994.85 235412.15 250242.01	248,216.34	11,921.13	25
ACP 2 F		186644.66 186502.72 187176.17	186,774.52	355.01	
ACP 3	3.04	298506.63 261035.22 296337.22	285,293.02	21,035.86	33
ACP 3 F		189171.07 195959.07 189796.1	191,642.08	3,751.66	
ACP 4	3.04	265370.06 303557.82 256105.36	275,011.08	25,152.45	27
ACP 4 F		196672.09 201512.81 202077.37	200,087.42	2,971.20	
ACP 5	2.97	243232.55 238885 226865.06	236,327.54	8,478.16	22
ACP 5 F		179852.66 189953.15 183057.52	184,287.78	5,161.41	
BG		101.46 91.16 107.02	99.88	8.05	
A 4		259750.7 249287.9	254,522.12	5,231.40	3.65

		254527.75			
A 4 F		242958.29	245,226.31	2,006.21	
		246768.92			
		245951.72			

Raw data extracted from γ -Counter of binding experiment of [^{99m}Tc]ZOL on HA and ACP. A ... activity (no bone materials used); F...filtered; BG...background, γ -counter measurments of empty vials; CPM...counts per minute, data from the γ -counter.

Appendix B Package Insert Teceos®



TECEOS®- Trockenstechampullen

ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS

TECEOS®

Aktivität / Activity

Volumen / Volume

MBq

mCi

mL

Innerhalb von 8 Stunden nach der Markierung verwenden.
Use within 8 hours after labelling

CIS bio International, member of IBA group

B.P.32-91192 GIF SUR YVETTE-France

DS/17-1579, A

1.

BEZEICHNUNG DES ARZNEIMITTELS

TECEOS Trockenstechampullen

2.

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ZUSAMMENSETZUNG

Jede Durchstechflasche enthält 13 mg Tetranatriumdihydrogenbutydronat und 0,23 mg Zinn (II)-oxid.

Das Radiolotop ist nicht Bestandteil des Kits.

Sonstiger Bestandteil: enthält weniger als 1 mmol (23 mg) Natrium pro Durchstechflasche

Die vollständige Auflistung der sonstigen Bestandteile siehe Abschnitt 6.1.

Eigenschaften des Radionuklids:

Das metastabile Nuklid Technetium (^{99m}Tc) entsteht durch radioaktiven Zerfall von Molybdän (⁹⁹Mo), das mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 66,0 Stunden in 87,5 % der Zerfälle zu Technetium (^{99m}Tc), in 12,5 % der Zerfälle direkt zu Technetium (⁹⁹Tc) zerfällt. Technetium (^{99m}Tc) zerfällt unter Emission von 140,5 keV Gammastrahlung mit einer HWZ von 6,0 Stunden zu Technetium (⁹⁹Tc), das aufgrund seiner HWZ von 213.000 Jahren als stabil anzusehen ist.

3.

DARREICHUNGSFORM

Kit zur Herstellung einer Technetium (^{99m}Tc) - butydronat Injektionslösung.

Gefriergetrocknetes, weißes Pulver.

4.

KLINISCHE ANGABEN

4.1

Anwendungsgebiete

Dieses Arzneimittel ist ein Diagnostikum.

Nach Markierung mit Technetium (^{99m}Tc) kann das Mittel für die Knochenszintigraphie angewendet werden, wobei Bereiche mit einer veränderten Osteogenese dargestellt werden.

CIS bio International, member of IBA group

T1918/nl
02/2012

2

VI

Die häufigsten Indikationen für die Knochenszintigraphie sind:

- Nachweis und Lokalisation, nicht aber Artdiagnostik primärer benigner und maligner Tumoren der Knochen
- Konventionell radiologisch nicht erfassbare Frakturen (z. B. battered child, Märsch-, Stressfrakturen)
- Osteomyelitis
- Avaskuläre Nekrosen, Knocheninfarkte, Vitalität von Knochentransplantaten
- Arthritis
- Algodystrophie (M. Sudeck)
- Unklare Knochenschmerzen
- Beurteilung des regionalen Knochenstoffwechsels vor einer Schmerztherapie mit osteotropen Radiopharmaka.

4.2 Dosierung, Art und Dauer der Anwendung

Erwachsene:

Die durchschnittliche, durch Einzelinjektion verabreichte Aktivität beträgt 500 MBq (300 - 700 MBq), bezogen auf einen Patienten mit einem Durchschnittsgewicht von 70 kg.

Die sachgemäß hergestellte Lösung (siehe Abschnitt 12. „Anweisungen zur Zubereitung von radioaktiven Arzneimitteln“) wird intravenös verabreicht.

Die kurz nach der Injektion (z. B. während des sogenannten "3-Phasen-Knochenscan"-Verfahrens) erzielten Darstellungen geben Aufschlüsse über die regionale Durchblutung, die bei Krankheitszuständen, wie Entzündungen, gesteigert sein kann. Die statische Spätphasenszintigraphie (Mineralisationsphase) sollte frühestens 2 Stunden nach der Injektion durchgeführt werden.

Der Patient sollte nach der Injektion aufgefordert werden, ausreichend zu trinken und vor der Untersuchung die Blase zu entleeren.

Kinder und Jugendliche

Bei Kindern und Jugendlichen wird entsprechend den Empfehlungen der „Paediatric and Dosimetry Committees“ der EANM die anzuwendende Aktivität mit folgender Formel und einem Faktor entsprechend dem Körpergewicht des Kindes oder Jugendlichen (siehe Tabelle 1) ermittelt:

Tabelle 1

3 kg = 1 *	22 kg = 5,29	42 kg = 9,14
4 kg = 1,14 *	24 kg = 5,71	44 kg = 9,57
6 kg = 1,71	26 kg = 6,14	46 kg = 10,00
8 kg = 2,14	28 kg = 6,43	48 kg = 10,29
10 kg = 2,71	30 kg = 6,86	50 kg = 10,71
12 kg = 3,14	32 kg = 7,29	52-54 kg = 11,29
14 kg = 3,57	34 kg = 7,72	56-58 kg = 12,00
16 kg = 4,00	36 kg = 8,00	60-62 kg = 12,71
18 kg = 4,43	38 kg = 8,43	64-66 kg = 13,43
20 kg = 4,86	40 kg = 8,86	68 kg = 14,00

Zu injizierende Radioaktivität [MBq] = 35 MBq x Faktor (Tabelle 1)

*) Falls nach dieser Berechnung die zu injizierende Radioaktivität weniger als 40 MBq beträgt, sollte die empfohlene Mindestaktivität von 40 MBq verabreicht werden, um Aufnahmen von ausreichender Qualität zu erzielen.

Für Säuglinge unter 3 kg KG liegen keine Daten vor.

4.3 Gegenanzeigen

Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff, Natriumpertechnetat (^{99m}Tc)-Lösung oder einen der sonstigen Bestandteile.

4.4 Besondere Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung

Schwangerschaft siehe 4.5.

Bei jedem Patienten ist sorgfältig zwischen dem zu erwartenden diagnostischen Nutzen und dem mit der Strahlenexposition verbundenen Risiko abzuwägen. Um die Strahlendosis so gering wie möglich zu halten, darf die zu verabreichende Aktivität nicht höher bemessen werden als für den Erhalt der diagnostischen Information erforderlich ist.

Bei Kindern ist die relativ höhere Strahlenbelastung der Epiphyse in den wachsenden Knochen besonders zu berücksichtigen.

Mit radioaktiven Arzneimitteln behandelte Patienten stellen einen Risikofaktor für andere Personen aufgrund der vom Patienten ausgehenden Strahlung oder aufgrund von Ausscheidungen der Patienten oder Kontamination durch Verschütten von Urin, Erbrochenem usw. dar. Zur Vermeidung der Exposition von Dritten und zur Vermeidung von Kontaminationen sind die nationalen Strahlenschutzverordnungen entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen zu treffen.

Um die Strahlenbelastung der Blase möglichst gering zu halten, sollte der Patient aufgefordert werden, ausreichende Mengen Wasser zu trinken und die Blase so oft wie möglich zu entleeren.

Eine unbeabsichtigte oder versehentliche subkutane Verabreichung von Technetium (^{99m}Tc) - butedronat sollte vermieden werden, da perivaskuläre Entzündungen beschrieben wurden.

Radioaktive Arzneimittel dürfen nur von dazu berechtigten Personen in speziell dafür bestimmten nuklearmedizinischen Kontrollbereichen in Empfang genommen, gehandhabt und verabreicht werden. Der Umgang und die Anwendung unterliegen den Bestimmungen der örtlich zuständigen Aufsichtsbehörde und/oder entsprechenden Genehmigungen.

Radioaktive Arzneimittel dürfen nur unter Vorkehrungen zum Schutz vor ionisierenden Strahlen und unter Beachtung pharmazeutischer Qualitätsanforderungen zubereitet und angewendet werden. Es sind geeignete aseptische Vorsichtsmaßnahmen zu treffen, die den Anforderungen der Guten Pharmazeutischen Herstellungspraxis entsprechen.

Dieses Arzneimittel enthält Natrium, aber weniger als 1 mmol (23 mg) Natrium pro Durchstechflasche.

4.5 Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln und sonstige Wechselwirkungen

Wie bei allen anderen Diphosphonaten sind folgende potentielle Wechselwirkungen zu berücksichtigen. Eine erhöhte Konzentration des Radiotracers außerhalb der Knochen bzw. verminderte Speicherung im Skelettsystem wurde beobachtet in Verbindung mit eisenhaltigen Substanzen, bei akuter Verabreichung von Diphosphonaten, verschiedenen Zytostatika und Immunsuppressiva, Röntgenkontrastmitteln, Antibiotika, entzündungshemmenden Substanzen, Calciumgluconat-Injektionen, Heparincalcium und Gamma-Aminocapronsäure.

Eine bestimmungsgemäße Anwendung von aluminiumhaltigen Arzneimitteln (insbesondere Antazida) kann zu einer abnorm hohen Akkumulation von Technetium (^{99m}Tc) in der Leber führen, vermutlich verursacht durch die Bildung markierter Kolloide.

4.6 Fertilität, Schwangerschaft und Stillzeit

Schwangerschaft

Wenn es unerlässlich ist, einer Frau im gebärfähigen Alter ein radioaktives Arzneimittel zu verabreichen, sollte die Möglichkeit einer Schwangerschaft grundsätzlich vorher ausgeschlossen werden. Jede Frau mit verspäteter Menstruation sollte als schwanger betrachtet werden, bis der Gegenbeweis erbracht wurde. Im Zweifelsfall muss die Strahlenexposition auf das für die benötigte klinische Information unumgängliche Mindestmaß verringert werden. Alternative Untersuchungsmethoden ohne Verwendung ionisierender Strahlung sollten in Betracht gezogen werden.

Untersuchungen mit Radionukliden bei schwangeren Frauen beinhalten auch eine Strahlenbelastung für den Fötus. Daher sollten während der Schwangerschaft nur absolut unerlässliche Untersuchungen aus vitaler Indikation durchgeführt werden, bei denen der zu erwartende Nutzen das Risiko für Mutter und Kind übersteigt. Bei Verabreichung von 700 MBq Technetium (^{99m}Tc) - butedronat bei Patienten mit normaler Knochenaufnahme beträgt die vom Uterus aufgenommene Dosis 4,41 mGy. Die Dosis ist auf 2,03 mGy reduziert bei Patienten mit hoher Knochenaufnahme und/oder schwer beeinträchtigter Nierenfunktion. Es sollte durch Kontrollmessungen sichergestellt sein, dass die Strahlenexposition des Fötus nicht mehr als 1 mSv beträgt.

Stillzeit

Vor der Anwendung eines radioaktiven Arzneimittels bei einer stillenden Mutter sollte geprüft werden, ob die Untersuchung nicht auf einen Zeitpunkt nach dem Abstillen verschoben werden kann und ob die Wahl eines Radiopharmakons wirklich die beste Untersuchungsmethode darstellt im Hinblick auf die Aktivitätsausscheidung in die Muttermilch. Wird die Verabreichung als unerlässlich beurteilt, sollte eine ausreichende Menge Muttermilch für die nächste Mahlzeit vor der Injektion abgepumpt und die nach der Injektion abgepumpte Muttermilch verworfen werden. Das Stillen kann 4 Stunden nach der Injektion wieder aufgenommen werden.

Fertilität

Es wurden keine Studien zur Auswirkung auf die Fertilität durchgeführt.

4.7 Auswirkungen auf die Verkehrstüchtigkeit und die Fähigkeit zum Bedienen von Maschinen

Es wurden keine Studien zu den Auswirkungen auf die Verkehrstüchtigkeit und die Fähigkeit zum Bedienen von Maschinen durchgeführt.

Bei Verabreichung von TECEOS zu diagnostischen Zwecken sind die Mengen allerdings so gering, dass Auswirkungen auf die Verkehrstüchtigkeit und die Fähigkeit zum Bedienen von Maschinen nicht zu erwarten sind.

4.8 Nebenwirkungen

Bei den Häufigkeitsangaben zu Nebenwirkungen werden folgende Kategorien zugrunde gelegt:
Sehr selten (<1/10 000)

In der Tabelle sind die Nebenwirkungen gemäß den Systemorganklassen nach MedDRA klassifiziert.

Systemorganklassen gemäß MedDRA-Datenbank	Bevorzugte Bezeichnung gemäß MedDRA-Konvention	Häufigkeit gemäß MedDRA-Konvention
Erkrankungen der Haut und des Unterhautzellgewebes	Ausschlag	Sehr selten
Gefäßerkrankungen	Pruritus	Sehr selten
Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts	Hitzewallung	Sehr selten
	Übelkeit	Sehr selten

In der Literatur liegen für ähnliche Diphosphonate Berichte von Hautröte (4-24 h p.i.) und Pruritus sowie von Hitzegefühl während der Injektion und von Brechreiz vor. Bei Tecos wurden solche Reaktionen nur sehr selten beobachtet (in weniger als 1 von 10 000 Anwendungen).

Da die verabreichten Wirkstoffmengen sehr gering sind, liegen die Risiken der Anwendung im Wesentlichen bei der Strahlenexposition. Ionisierende Strahlen können Krebs und Erbguveränderungen verursachen. Da die meisten nuklearmedizinischen Untersuchungen mit niedrigen effektiven Strahlendosen von weniger als 20 mSv durchgeführt werden, sind diese Effekte mit geringer Wahrscheinlichkeit zu erwarten. Die effektive Strahlendosis liegt bei Gabe der maximalen empfohlenen Aktivität dieses Arzneimittels bei normaler Knochenanreicherung bei 4,0 mSv.

Zur Risikominimierung bezüglich der strengen i.v. Verabreichung siehe 4.4 Besondere Wahrhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung.

4.9 Überdosierung

Bei Verabreichung einer allfälligen Überdosis an Technetium (^{99m}Tc) - butedronat sollte die vom Patienten aufgenommene Dosis wenn möglich dadurch reduziert werden, dass die Ausscheidung des Radionuklids aus dem Körper durch forcierte Diurese und Blasenentleerung beschleunigt wird.

5. PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

5.1 Pharmakodynamische Eigenschaften

Pharmakotherapeutische Gruppe: Nuklearmedizinisches Diagnostikum für das Skelettsystem
ATC-Code: V09BA04

Bei den verwendeten chemischen Konzentrationen des Radiopharmakons und der Hilfsstoffe scheint die Technetium (^{99m}Tc) - butedronat keine pharmakodynamischen Wirkungen zu haben.

5.2 Pharmakokinetische Eigenschaften

In den ersten Minuten nach der Injektion verteilt sich die Aktivität auf Abdomen und Nieren. Die fortschreitende Clearance aus diesen Kompartimenten ist aus der Konzentration der Aktivität im Skelettsystem ersichtlich. Die Clearance aus dem Blut lässt sich anhand einer Zweiphasenkurve mit einer Halbwertszeit von T₁ = 15 min und T₂ = 100 min beschreiben. Im Vergleich zu anderen Diphosphonaten zeigt Technetium (^{99m}Tc) - butedronat die geringste Proteinbindung im Plasma.

Unmittelbar nach der Injektion wird eine relativ hohe Aktivität im Plasma beobachtet, gefolgt von einer schnellen Blutclearance. Dieses Verhalten könnte auf einen Reabsorptionsprozess in den Nieren zurückzuführen sein. Im Vergleich zu anderen Diphosphonaten wird eine geringere Aktivität in den Harn ausgeschieden, dafür wird ein höherer Prozentsatz Technetium (^{99m}Tc) - butedronat im Skelett gespeichert, der seinen Höchstwert 1 Stunde nach der Injektion erreicht. Ca. 1 Stunde nach der Injektion sind 30 % der verabreichten Aktivität durch den Harn ausgeschieden. Die Menge an unmarkiertem Butedronat innerhalb der empfohlenen Dosis hat keinen Einfluss auf den Ausscheidungsprozess. Die Ausscheidung über Leber und Darm ist äußerst gering. Die Knochenzintigraphie ist eine empfindliche, aber unspezifische Diagnosemethode. Die Konzentration im Knochen ist abhängig von der Blutzufuhr und vom Ausmaß der Osteogenese. Bei gesunden Probanden wurde eine Ganzkörperretention von 40 ± 4 % Technetium (^{99m}Tc) - butedronat gemessen. Dieser Wert erhöht sich bei weitverbreiteten Metastasen, primärem Hyperparathyreoidismus und Osteoporose.

5.3 Präklinische Daten zur Sicherheit

Das Produkt ist nicht für regelmäßige oder kontinuierliche Anwendung bestimmt. Mutagenitätsstudien sowie Langzeitsstudien zur Karzinogenese wurden nicht durchgeführt.

Tiere nahmen keinen Schaden durch Verabreichung der Humandosis in Mehrfachdosis-Toxizitätsstudien bei Ratten und Beagle-Hunden.

PHARMAZEUTISCHE ANGABEN		ZULASSUNGSNUMMER	
6.1	Liste der sonstigen Bestandteile	4-00026	
6.2	Inkompatibilitäten		
	Das Arzneimittel darf, außer mit den unter Abschnitt 12 aufgeführten, nicht mit anderen Arzneimitteln gemischt werden.		
	Auf keinen Fall darf eine kohlenhydrathaltige Lösung zur Verdünnung verwendet werden (z. B. Glucose) und ebenfalls darf die Injektion nicht über eine langsame Infusion - welche derartige Lösungen enthält - erfolgen. Wie bei anderen Diphosphonaten kann es in diesen Fällen zu einer massiven Einschränkung der diagnostischen Aussagekraft der Untersuchung kommen, da die Knochenabsorption zugunsten einer massiven Nierendarstellung drastisch sinkt.		
6.3	Dauer der Haltbarkeit		
	13 Monate		
	Das markierte Produkt innerhalb von 8 Stunden nach der Markierung verwenden.		
6.4.	Besondere Vorsichtsmaßnahmen für die Aufbewahrung		
	Das Kit und das markierte Produkt nicht über 25 °C lagern.		
	Die Lagerung muss in Übereinstimmung mit den nationalen Bestimmungen für radioaktives Material erfolgen.		
6.5.	Art und Inhalt des Behältnisses		
	5 Durchsichtflaschen aus Glas (Typ I) mit Gummistopfen und Aluminiumkappe, Volumen 15 ml.		
6.6.	Besondere Vorsichtsmaßnahmen für die Beseitigung und sonstige Hinweise zur Handhabung		
	Für Anweisungen zur Zubereitung von radioaktiven Arzneimitteln siehe Abschnitt 12.		
7.	INHABER DER ZULASSUNG		
	CIS bio international Member of IBA group B.P. 32 91192 Gilly-sur-Yvette CEDEX Frankreich		
9.	DATUM DER ERTEILUNG DER ZULASSUNG	13/09/2005	
10.	STAND DER INFORMATION	07/2011	

11. DOSIMETRIE

Technetium (^{99m}Tc) zerfällt mit einer Gamma-Strahlenemission mit einer Energie von 140 keV und einer Halbwertszeit von 6 Stunden zu Technetium (⁹⁹Tc), das als quasi stabil angesehen werden kann.

Gemäß der ICRP Publikation 80 werden vom Patienten folgende Strahlendosen absorbiert:

Strahlenexposition (normale Knochenanreicherung)

Organ	Absorbierte Dosis pro verabreichter Aktivität (mGy/MBq)					
	Erwachsener	15 Jahre	10 Jahre	5 Jahre	1 Jahr	
Nebennieren	0,0021	0,0027	0,0039	0,0058	0,011	
Blase	0,048	0,060	0,088	0,073	0,13	
Knochenoberfläche	0,063	0,082	0,13	0,22	0,53	
Gehirn	0,0017	0,0021	0,0028	0,0043	0,0061	
Brust	0,00071	0,00089	0,0014	0,0022	0,0042	
Gallenblase	0,0014	0,0019	0,0035	0,0042	0,0067	
Verdauungstrakt						
Magenwand	0,0012	0,0015	0,0025	0,0035	0,0066	
Dünndarm	0,0023	0,0029	0,0044	0,0053	0,0095	
Dickdarm	0,0027	0,0034	0,0053	0,0061	0,011	
Oberer Teil des Dickdarms	0,0019	0,0024	0,0039	0,0051	0,0069	
Unterer Teil des Dickdarms	0,0038	0,0047	0,0072	0,0075	0,013	
Herz	0,0012	0,0016	0,0023	0,0034	0,005	
Nieren	0,0073	0,0088	0,012	0,018	0,032	
Leber	0,0012	0,0016	0,0025	0,0036	0,0058	
Lungen	0,0013	0,0016	0,0024	0,0036	0,0058	
Muskulatur	0,0019	0,0023	0,0034	0,0044	0,0079	
Speiseröhre	0,0010	0,0013	0,0019	0,0030	0,0053	
Ovarien	0,0036	0,0046	0,0066	0,0070	0,012	
Pankreas	0,0016	0,0020	0,0031	0,0045	0,0082	
Rotes Knochenmark	0,0082	0,010	0,017	0,033	0,067	
Haut	0,0010	0,0013	0,0020	0,0029	0,0055	
Milz	0,0014	0,0018	0,0028	0,0045	0,0079	
Hoden	0,0024	0,0033	0,0055	0,0058	0,011	
Thyrustrüse	0,0010	0,0013	0,0019	0,0030	0,0053	
Schilddrüse	0,0013	0,0016	0,0023	0,0035	0,0056	
Gebärmutter	0,0063	0,0076	0,012	0,011	0,018	
Sonstige Gewebe	0,0019	0,0023	0,0034	0,0045	0,0079	
Effektive Dosis (mSv/MBq)	0,0057	0,007	0,011	0,014	0,027	

11

Die effektive Dosis beträgt 4,0 mSv nach intravenöser Gabe von 700 MBq Technetium (^{99m}Tc) - buletronat beim Erwachsenen (mit einem Gewicht von 70 kg). Die absorbierte Dosis im Zielorgan (Knochen) beträgt dabei 44,1 mGy und im kritischen Organ (Blasenwand): 33,6 mGy.

Gemäß der ICRP Publikation 53 werden vom Patienten folgende Strahlendosen absorbiert:

Strahlenexposition (hohe Knochenanreicherung und/oder stark eingeschränkte Nierenfunktion)

Organ	Absorbierte Dosis pro verabreichter Aktivität (mGy/MBq)					
	Erwachsener	15 Jahre	10 Jahre	5 Jahre	1 Jahr	
Nebennieren	0,0035	0,0050	0,0072	0,011	0,021	
Blasenwand	0,025	0,0035	0,0054	0,0074	0,015	
Knochenoberfläche	0,12	0,16	0,26	0,43	1,0	
Brust	0,0021	0,0021	0,0032	0,0051	0,0096	
Verdauungstrakt						
Magenwand	0,0026	0,0032	0,0051	0,0073	0,014	
Dünndarm	0,0031	0,0038	0,0057	0,0085	0,016	
Oberer Teil des Dickdarms	0,0029	0,0036	0,0053	0,0086	0,015	
Unterer Teil des Dickdarms	0,0034	0,0042	0,0065	0,0096	0,019	
Nieren	0,0030	0,0037	0,0056	0,0087	0,016	
Leber	0,0027	0,0033	0,0049	0,0075	0,014	
Lunge	0,0030	0,0037	0,0053	0,0081	0,015	
Ovarien	0,0029	0,0041	0,0059	0,0089	0,016	
Pankreas	0,0032	0,0040	0,0059	0,0089	0,016	
Knochenmark	0,018	0,023	0,037	0,072	0,14	
Milz	0,0026	0,0034	0,0051	0,0079	0,015	
Hoden	0,0023	0,0027	0,0039	0,0060	0,011	
Schilddrüse	0,0024	0,0037	0,0054	0,0083	0,014	
Gebärmutter	0,0029	0,0037	0,0054	0,0082	0,015	
Sonstige Gewebe	0,0030	0,0035	0,0053	0,0081	0,015	
Effektive Dosis (mSv/MBq)	0,0082	0,011	0,017	0,028	0,051	

Die effektive Dosis beträgt im Falle einer hohen Anreicherung im Knochen und/oder stark beeinträchtigter Nierenfunktion 5,7 mSv nach intravenöser Gabe von 700 MBq Technetium (^{99m}Tc) - buletronat beim Erwachsenen (mit einem Gewicht von 70 kg). Die absorbierte Dosis im Zielorgan (Knochen) beträgt dabei 84 mGy und im kritischen Organ (Knochenmark): 12,6 mGy.

Bei dialysepflichtigen Patienten kann die Durchführung der Dialyse vor der Szintigraphie zur besseren Kontrastierung des Knochens gegenüber Weichteilen führen.

12

12. ANWEISUNGEN ZUR ZUBEREITUNG VON RADIOAKTIVEN ARZNEIMITTELN

Herstellungsverfahren

Die üblichen Vorsichtsmaßnahmen in Bezug auf Sterilität und Strahlenschutz sind einzuhalten.

Die Durchstechflasche sollte niemals geöffnet und innerhalb der Bleiabschirmung aufbewahrt werden. Die Lösung sollte unter aseptischen Bedingungen mit einer sterilen, bleiageschirmten Spritze durch den Stopfen entnommen werden.

Eine Durchstechflasche aus dem Kit nehmen und in eine geeignete Bleiabschirmung stellen.

Mit einer sterilen Spritze 2 bis 10 ml der sterilen und pyrogenfreien Natriumpertechnetat (^{99m}Tc)-Lösung durch den Gummistopfen hindurch in die Durchstechflasche einbringen. Die Radioaktivität variiert in Abhängigkeit vom Volumen zwischen 370 und maximal 11100 MBq. Die Natriumpertechnetat (^{99m}Tc)-Lösung sollte den Spezifikationen des Europäischen Arzneibuchs entsprechen.

Keine Belüftungsnadeln verwenden, da die Durchstechflasche unter Vakuum steht.

Leicht schütteln, bis das Lyophilisat gelöst ist. Nach einer Wartezeit von 5 min. kann das zu injizierende Volumen mit einer sterilen Einmalspritze entnommen werden.

Nach der Rekonstitution mit einer isotonischen Natriumpertechnetat (^{99m}Tc)-Lösung erhält man eine klare, farblose Lösung.

Vor Gebrauch sind die Klarheit der hergestellten Lösung und die Radioaktivität zu prüfen.

Qualitätskontrolle

Die Markierungsqualität (radiochemische Reinheit) sollte wie folgt überprüft werden.

Methoden

Aufsteigende Papierchromatographie.

Material und Reagenzien

1. Chromatographie-Papier

Wasman 1 Streifen von ausreichender Länge und einer Breite von mindestens 2,5 cm, 2,5 cm vom einen Ende des Papierstreifens eine feine, so genannte "Auftragslinie" einzeichnen.

2. Mobile Phase

Methanol/Wasser (70/30)

3. Glasbehälter

Ein Glasbehälter von ausreichender Größe für das verwendete Chromatographiepapier, oben geschliffen, mit dicht schließendem Deckel. Der obere Teil des Behälters befindet sich eine Vorrichtung zur Aufhängung des Chromatographiepapiers, die sich nach unten absenken lässt, ohne dass ein Öffnen der Kammer erforderlich wäre.

4. Sonstiges

Pinzetten, Scheren, Spritzen, Nadeln, geeignetes Zählgerät.

Durchführung

1. Eine 2 cm tiefe Schicht der mobilen Phase in den Glasbehälter eingeben.

2. Mit einer Spritze und einer Nadel einen Tropfen des Präparats auf die "Auftragslinie" des Papierstreifens auftragen und an der Luft trocknen lassen.

3. Mit einer Pinzette den Papierstreifen in den Behälter geben und den Deckel schließen. Das Papier in die mobile Phase absenken und das Lösungsmittel über ca. 45 min wandern lassen.

4. Den Streifen mit der Pinzette wieder entnehmen und an der Luft trocknen lassen.

5. Die Verteilung der Radioaktivität mit einem geeigneten Detektor bestimmen.

Jeden radioaktiven Fleck durch Berechnung des R_f bestimmen. Der R_f von Technetium (^{99m}Tc)-butedronat ist 0, derjenige der Verunreinigungen liegt bei 0,5. Die Radioaktivität jedes Flecks durch Peak-Integration messen.

6. Berechnungen

Den Prozentsatz an Technetium (^{99m}Tc) - busedronat (radiochemische Reinheit) errechnen:

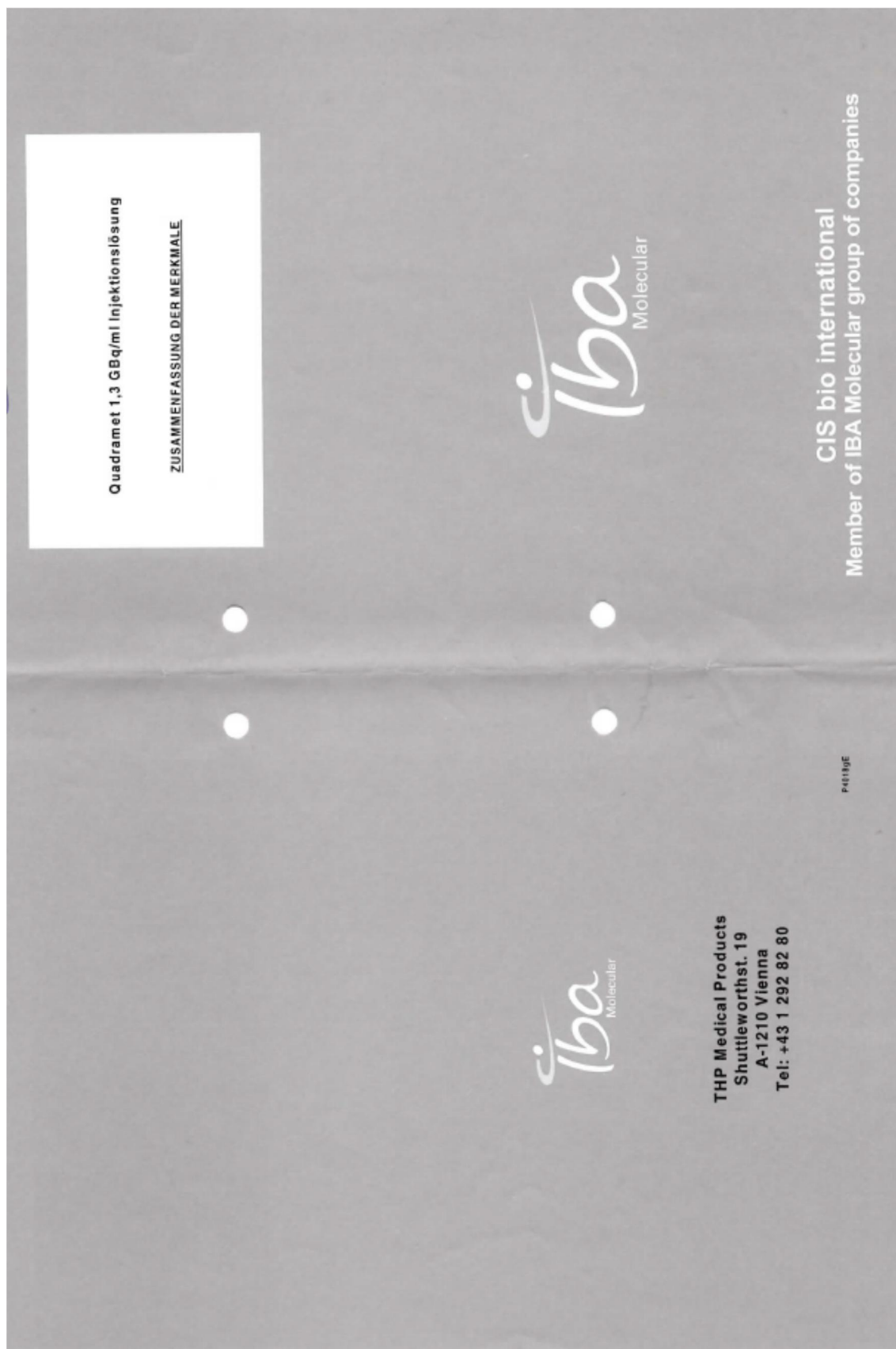
$$\% \text{ Technetium } (^{99m}\text{Tc}) - \text{busedronat} = \frac{\text{Radioaktivität des Flecks bei } R_f 0}{\text{Gesamtradioaktivität des Papierstreifens}} \times 100$$

Den Prozentsatz an Verunreinigungen errechnen:

$$\% \text{ an Verunreinigungen} = \frac{\text{Radioaktivität des Flecks bei } R_f 0,5}{\text{Gesamtradioaktivität des Papierstreifens}} \times 100$$

7. Der Prozentsatz an Technetium (^{99m}Tc) - busedronat (radiochemische Reinheit) sollte mindestens 95 % betragen, der Prozentsatz an Verunreinigungen sollte nicht über 5 % liegen.

Appendix C Package Insert Quadramet®



ZUSAMMENFASSUNG DER MERKMALE DES ARZNEIMITTELS

1. BEZEICHNUNG DES ARZNEIMITTELS

Quadramet 1,3 GBq/ml Injektionslösung

2. QUALITATIVE UND QUANTITATIVE ZUSAMMENSETZUNG

Jeder ml der Lösung enthält 1,3 GBq Samarium (^{153}Sm) lexidronam-Pentanatrium am Referenzzeitpunkt (entspricht 20 bis 80 $\mu\text{g/ml}$ Samarium pro Durchstechflasche).

Die spezifische Aktivität des Samariums beträgt ca. 16 - 65 MBq/ μl Samarium.

Jede Durchstechflasche enthält 2-4 GBq am Referenzzeitpunkt.

Samarium-153 emittiert sowohl Betateilchen mit mittlerer Energie als auch ein für bildgebende Verfahren geeignetes Gammaphoton und hat eine physikalische Halbwertszeit von 46,3 Stunden (1,93 Tagen). Die primären Strahlenemissionen von Samarium-153 sind in Tabelle 1 aufgeführt.

TABELLE 1: WICHTIGSTE DATEN ZUR STRAHLENEMISSION VON SAMARIUM-153

Strahlung	Energie (keV)*	Anteil
Beta	640	30 %
Beta	710	50 %
Beta	810	20 %
Gamma	103	29 %

* Für die Betastrahlen sind die maximalen Energien angegeben, die durchschnittliche Energie der Betateilchen beträgt 233 keV.

Sonstige Bestandteil(e) mit bekannter Wirkung: Natrium 8.1 mg/ml

Vollständige Auflistung der sonstigen Bestandteile siehe Abschnitt 6.1.

3. DARREICHUNGSFORM

Injektionslösung.

Klare, farblose bis hellgelbe Lösung mit einem pH zwischen 7,0 und 8,5.

4. KLINISCHE ANGABEN

4.1 Anwendungsgebiete

Quadramet ist zur Linderung von Knochenschmerzen bei Patienten mit multiplen schmerzhaften osteoblastischen Skelettmetastasen indiziert, die in der Knochenszintigraphie Technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-markierte Bisphosphonate anreichern.

Das Vorliegen von osteoblastische Metastasen, die Technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-markierte Bisphosphonate anreichern, sollte vor der Behandlung bestätigt worden sein.

4.2 Dosierung, Art und Dauer der Anwendung

Quadramet sollte nur von Ärzten verabreicht werden, die mit der Anwendung von Radiopharmaka Erfahrung haben, sowie erst nach einer vollständigen onkologischen Untersuchung des Patienten durch entsprechend qualifizierte Ärzte.

Dosierung

Die empfohlene Dosis von Quadramet beträgt 37 MBq pro kg Körpergewicht.

Kinder und Jugendliche

Quadramet wird nicht für die Anwendung bei Kindern unter 18 Jahren empfohlen, da keine Daten zur Sicherheit und Wirksamkeit vorliegen.

Art der Anwendung

Quadramet wird langsam intravenös über einen intravenösen Zugang in einem Zeitraum von einer Minute injiziert. Quadramet darf vor Gebrauch nicht verdünnt werden.

Bei Patienten, die auf Quadramet ansprechen, tritt im Allgemeinen innerhalb einer Woche nach der Behandlung eine Schmerzlinderung ein. Die Schmerzlinderung kann 4 Wochen bis zu 4 Monate lang anhalten. Patienten, bei denen die Schmerzen nachlassen, können darauf hingewiesen werden, dass sie, ihren Verbrauch an Opioidanalgetika reduzieren können.

Eine wiederholte Verabreichung von Quadramet kann je nach Ansprechen des einzelnen Patienten auf die vorausgehende Behandlung und den klinischen Symptomen in Erwägung gezogen werden. Es sollte ein Mindestintervall von 8 Wochen eingehalten werden, um eine ausreichende Erholung der Knochenmarkfunktion zu erreichen.

Die vorliegenden Daten zur Sicherheit einer wiederholten Anwendung sind begrenzt und basieren allein auf dem Einsatz des Produktes aus humanen Gründen.

Anweisungen zur Zubereitung von radioaktiven Arzneimitteln siehe Abschnitt 12.

4.3 Gegenanzeigen

- Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff (Ethylendiamintetramethylenphosphonat (EDTMP) oder ähnliche Phosphonate) oder einen der in Abschnitt 6.1 genannten sonstigen Bestandteile
- Schwangeren Frauen (siehe Abschnitt 4.6)
- Patienten, die in den vergangenen 6 Wochen eine Chemotherapie oder externe Halbsseitenbestrahlung erhalten haben.

Quadramet dient nur zur palliativen Anwendung und sollte nicht gleichzeitig mit einer myelotoxischen Chemotherapie zum Einsatz kommen, da dies die Knochenmarkstoxizität verstärken könnte.

Es sollte nicht gleichzeitig mit anderen Bisphosphonaten verabreicht werden, wenn in der Technetium (^{99m}Tc)-markierten Bisphosphonat-Szintigraphie eine Interferenz nachgewiesen wird.

4.4 Besondere Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung

Wenn klinische Daten fehlen, sollte die injizierte Aktivität der Nierenfunktion angepasst werden.

Bei Patienten mit nachweislich beeinträchtigter Knochenmarksreserve aufgrund einer früheren Therapie oder einer Krankheitsbeteiligung wird die Anwendung von Quadramet nicht empfohlen, es sei denn, dass der mögliche Nutzen der Behandlung die Risiken aufwiegt.

Aufgrund der potentiellen Knochenmarksdepression nach der Verabreichung sollte das Blutbild wöchentlich kontrolliert werden, beginnend 2 Wochen nach der Verabreichung von Quadramet mindestens 8 Wochen lang oder bis zur ausreichenden Erholung der Knochenmarkfunktion.

Der Patient sollte aufgefordert werden, vor der Injektion mindestens 500 ml Flüssigkeit zu trinken (oder diese intravenös erhalten) und nach der Injektion so oft wie möglich die Blase zu entleeren, um die Strahlenexposition für die Harnblase so gering wie möglich zu halten.

Da die Clearance von Quadramet schnell erfolgt, müssen 6-12 Stunden nach der Verabreichung keine Vorsichtsmaßnahmen mehr wegen der mit dem Urin ausgeschiedenen Radioaktivität getroffen werden.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen wie eine Katheterisierung der Harnblase sollten bei inkontinenten Patienten in den ersten sechs Stunden nach der Verabreichung getroffen werden, um das Risiko einer radioaktiven Kontamination von Kleidung, Bettzeug und Umgebung des Patienten möglichst gering zu halten. Bei allen anderen Patienten sollte der Urin über mindestens sechs (6) Stunden gesammelt werden.

Auch bei Patienten mit einer Harnwegsobstruktion sollte eine Katheterisierung der Harnblase vorgenommen werden.

Radiopharmaka dürfen nur von dazu befugten Personen in speziellen klinischen Abteilungen in Empfang genommen, verwendet und verabreicht werden. Empfang, Lagerung, Verwendung, Transfer und Entsorgung unterliegen den Bestimmungen und/oder entsprechenden Genehmigungen der örtlich zuständigen Behörden.

Bei der Vorbereitung von Radiopharmaka vor Gebrauch müssen sowohl die Strahlenschutzbestimmungen als auch die Anforderungen an die pharmazeutische Qualität beachtet werden. Es müssen geeignete aseptische Vorgehensweisen eingehalten werden, um die Anforderungen der guten pharmazeutischen Herstellungspraxis zu erfüllen.

4.5 Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln und sonstige Wechselwirkungen

Wegen möglicher additiver Wirkungen auf das Knochenmark sollte die Behandlung nicht gleichzeitig mit einer Chemotherapie oder einer externen Strahlentherapie erfolgen. Quadramet kann im Anschluss an solche Behandlungen verabreicht werden, sobald sich das Knochenmark wieder hinreichend erholt hat.

4.6 Fertilität, Schwangerschaft und Stillzeit

Schwangerschaft

Quadramet ist bei Schwangerschaft kontraindiziert (siehe 4.3). Die Möglichkeit einer Schwangerschaft muss strengstens ausgeschlossen werden. Frauen im gebärfähigen Alter müssen während der Behandlung und der gesamten Nachsorgezeit eine zuverlässige Verhütungsmethode anwenden.

Stillzeit

Es liegen keine klinischen Daten über die Ausscheidung von Quadramet in die Muttermilch vor. Wenn also eine Verabreichung von Quadramet als notwendig angesehen wird, sollte abgestillt, die abgepumpte Muttermilch verworfen und künstliche Säuglingsnahrung gegeben werden.

4.7 Auswirkungen auf die Verkehrstüchtigkeit und die Fähigkeit zum Bedienen von Maschinen

Es wurden keine Studien zu den Auswirkungen auf die Verkehrstüchtigkeit und die Fähigkeit zum Bedienen von Maschinen durchgeführt.

4.8 Nebenwirkungen

Bei Patienten, die Quadramet in klinischen Studien erhielten, wurde eine Abnahme der weißen Blutzellen und der Thrombozytenzahl sowie eine Anämie beobachtet.

Die Zahl der weißen Blutzellen und Thrombozyten fiel 3 bis 5 Wochen nach einer Dosis bis auf einen Tiefpunkt von circa 40 % bis 50 % der Ausgangswerte ab und kehrte im allgemeinen innerhalb von 8 Wochen nach der Behandlung wieder auf die Ausgangswerte zurück.

Die wenigen Patienten, bei denen eine hämatopoietische toxische Wirkung Grad 3 oder Grad 4 auftrat, hatten in der Regel entweder vor kurzem eine externe Strahlenbehandlung oder eine Chemotherapie erhalten oder litten an einer rasch progredient verlaufenden Erkrankung mit möglicher Knochenmarksbeteiligung.

Im Rahmen der Postmarketing-Überwachung wurden Thrombozytopenien einschließlich einzelner Fälle intrakranialer Blutungen auch mit Todesfolge berichtet.

Einige wenige Patienten berichteten über eine vorübergehende Verschlimmerung der Knochenschmerzen kurz nach der Injektion (Flare-Reaktion). Diese Reaktion, die meist innerhalb von 72 Stunden nach der Injektion auftritt, ist in der Regel leicht und klingt spontan wieder ab. Solche Reaktionen sprechen meist auf Analgetika an.

Es wurden von Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle und Schwitzen berichtet.

Nach der Verabreichung von Quadramet wurden Überempfindlichkeitsreaktionen, darunter in seltenen Fällen anaphylaktische Reaktionen, beobachtet.

Bei einigen Patienten kam es zu einer Kompression des Rückenmarks bzw. Wurzelkompression, einer disseminierten intravaskulären Gerinnung und zerebrovaskulären Ereignissen. Diese können mit dem Verlauf der Grunderkrankung im Zusammenhang stehen. Beim Vorliegen spinaler Metastasen im zerviko-dorsalen Bereich, kann ein erhöhtes Risiko für eine Rückenmarkskompression nicht ausgeschlossen werden.

Die durch die therapeutische Strahlenexposition verabreichte Strahlendosis kann zu einer erhöhten Inzidenz von Krebserkrankungen und genetischen Mutationen führen. Es muss daher in jedem Fall sichergestellt sein, dass die Risiken für den Patienten aufgrund der Strahlenexposition geringer sind als die der Krankheit selbst.

4.9 Überdosierung

Das Produkt darf nur von qualifiziertem Personal in Abteilungen mit entsprechender Genehmigung verwendet werden. Die Möglichkeit einer pharmakologischen Überdosierung ist daher äußerst gering.

Die zu erwartenden Risiken hängen mit einer versehentlichen Verabreichung einer überhöhten Radioaktivität zusammen. Die Strahlenbelastung des Körpers kann durch eine verstärkte Diurese und häufiges Entleeren der Harnblase begrenzt werden.

5. PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN

5.1 Pharmakodynamische Eigenschaften

Pharmakotherapeutische Gruppe: verschiedene Radiopharmaka für die palliative Schmerzbehandlung.
ATC-Code: V10BX02

Wirkmechanismus

Quadramet hat eine Affinität zum Skelettgewebe und reichert sich in Bereichen mit aktivem Knochenumsatz in enger Nachbarschaft mit Hydroxyapatit an.

Pharmakodynamische Wirkungen

Tierexperimentelle Untersuchungen bei Ratten haben gezeigt, dass Quadramet rasch aus dem Blut eliminiert wird und sich in den Wachstumszonen der Knochenmatrix ansammelt, insbesondere in der Osteoidschicht, in der die Mineralisation erfolgt.

Klinische Wirksamkeit und Sicherheit

In klinischen Studien mit planaren bildgebenden Verfahren reicherte sich Quadramet mit einem Verhältnis Läsion/gesunder Knochen von etwa 5 und einem Verhältnis Läsion/Weichteilgewebe von etwa 6 an. Daher können sich an Stellen mit Metastasenbefall signifikant höhere Mengen von Quadramet anreichern als im umgebenden gesunden Knochen.

5.2 Pharmakokinetische Eigenschaften

Resorption

Die Gesamtskelettaufnahme von Quadramet betrug in Studien mit 453 Patienten mit unterschiedlichen Primärtumoren $65,5 \pm 15,5$ % der verabreichten Aktivität. Zwischen der Skelettanreicherung und der Zahl der Metastasen wurde eine positive Korrelation festgestellt. Im Gegensatz dazu war die Skelettanreicherung nach 30 Minuten umgekehrt proportional zur Radioaktivität im Plasma.

Elimination

Bei Patienten wird Quadramet rasch aus dem Blut eliminiert. Bei 22 Patienten blieben dreißig Minuten nach der Injektion der Substanz nur $9,6 \pm 2,8$ % der verabreichten Aktivität im Plasma zurück. Nach 4 und 24 Stunden hatte die Radioaktivität im Plasma von $1,3 \pm 0,7$ % auf $0,05 \pm 0,03$ % abgenommen.

Die Ausscheidung mit dem Urin erfolgte überwiegend in den ersten vier Stunden ($30,3 \pm 13,5$ %). Nach 12 Stunden waren $35,3 \pm 13,6$ % der verabreichten Aktivität mit dem Urin ausgeschieden. Eine geringere Urinausscheidung fand sich bei Patienten mit ausgedehnten Knochenmetastasen, unabhängig von der verabreichten Menge des Radiopharmakons.

Biotransformation

In Analysen von Urinproben wurde nachgewiesen, dass die Radioaktivität in Form des intakten Komplexes vorlag.

5.3 Präklinische Daten zur Sicherheit

Die Radiolyseprodukte von Sm-EDTMP erwiesen sich bei Ratten und Hunden als nierentoxisch, mit einer maximalen Dosis ohne toxische Wirkung (No-effect-Dosis) von 2,5 mg/kg.

Mehrfachgaben von Samarium (^{153}Sm)-EDTMP an Hunden zeigten Hinweise auf eine geringfügig länger anhaltende Knochenmarkdepression und länger dauernde Normalisierung der peripheren hämatologischen Parameter im Vergleich zur Erholungszeit nach Verabreichung einer Einzeldosis.

Radioaktives Sm-EDTMP wurde bislang nicht auf sein mutagenes/karzinogenes Potential getestet. Es sollte jedoch davon ausgegangen werden, dass aufgrund der aus der therapeutischen Exposition resultierenden Strahlendosis ein gewisses Risiko für genotoxische/karzinogene Wirkungen besteht.

Nicht radioaktives Sm-EDTMP zeigte in einer Reihe von *In-vivo*- und *In-vitro*-Tests kein mutagenes Potential. Die gleichen Ergebnisse wurden für Sm-EDTMP beobachtet, das mit Radiolyseabbauprodukten angereichert worden war.

In einer Untersuchung zum karzinogenen Potential von EDTMP entwickelten sich bei Ratten nach der Verabreichung von hohen Dosen Osteosarkome. Da keine genotoxischen Eigenschaften vorliegen, lassen sich diese Wirkungen auf die chelatbildenden Eigenschaften von EDTMP zurückführen, die zu Störungen des Knochenstoffwechsels führen.

Zur Beurteilung der Wirkung von Quadramet auf die Fertilität wurden keine Studien durchgeführt.

6. PHARMAZEUTISCHE ANGABEN

6.1 Liste der sonstigen Bestandteile

Gesamt-EDTMP-Gehalt (als EDTMP.H₂O)
Kalzium-EDTMP-Natriumsalz (als Ca)
Gesamtnatriumgehalt (als Na)
Wasser für Injektionszwecke

6.2 Inkompatibilitäten

Da keine Kompatibilitätsstudien durchgeführt wurden, darf dieses Arzneimittel nicht mit anderen Arzneimitteln gemischt werden.

6.3 Dauer der Haltbarkeit

Die Haltbarkeit beträgt bis zu 1 Tag ab der auf dem Etikett angegebenen Referenzzeit für die Aktivität.

Innerhalb von 6 Stunden nach dem Auftauen verwenden. Nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren.

6.4 Besondere Vorsichtsmaßnahmen für die Aufbewahrung

Quadramet wird gefroren in Trockeneis geliefert.
In der Originalverpackung tiefgekühlt bei -10°C bis -20°C aufbewahren.

Die Aufbewahrung hat gemäß den lokalen Bestimmungen für radioaktives Material zu erfolgen.

6.5 Art und Inhalt des Behältnisses

15 ml-Durchstechflasche aus farblosem Glas (Typ 1 nach dem Europäischen Arzneibuch), verschlossen mit einem Teflon-überzogenen Chlorbutylkautschuk/Naturgummistopfen und einer abziehbaren Aluminiumkappe.

Jede Durchstechflasche enthält 1,5 ml (2 GBq zum Zeitpunkt der Kalibrierung) bis 3,1 ml (4 GBq zum Zeitpunkt der Kalibrierung) Injektionslösung.

6.6 Besondere Vorsichtsmaßnahmen für die Beseitigung und sonstige Hinweise zur Handhabung

Die Verabreichung von Radiopharmaka kann andere Personen wegen externer Strahlung oder Kontamination durch Urinspritzer, Erbrochenem usw. gefährden. Deshalb müssen die einschlägigen national geltenden Strahlenschutzbestimmungen eingehalten werden.

Nicht verwendetes Arzneimittel oder Abfallmaterial ist entsprechend den nationalen Anforderungen zu entsorgen.

(Anweisungen zur Zubereitung von radioaktiven Arzneimitteln siehe Abschnitt 12)

7. INHABER DER ZULASSUNG

CIS bio international
Boîte Postale 32
F-91192 GIF-SUR-YVETTE Cedex
FRANKREICH

8. ZULASSUNGSNUMMER(N)

EU/1/97/057/001

9. DATUM DER ERTEILUNG DER ZULASSUNG/VERLÄNGERUNG DER ZULASSUNG

Datum der Erteilung der Zulassung: 05. Februar 1998

Datum der letzten Verlängerung der Zulassung: 12. Dezember 2007

10. STAND DER INFORMATION

05/2012

11. DOSIMETRIE

Die von einem durchschnittlichen erwachsenen Patienten nach intravenöser Injektion von Quadramet aufgenommenen veranschlagten Strahlendosen sind in Tabelle 2 angegeben. Die dosimetrischen Schätzwerte basieren auf klinischen Untersuchungen der biologischen Verteilung unter Verwendung von Methoden, die vom Medical Internal Radiation Dose (MIRD) Committee der Society of Nuclear Medicine zur Berechnung von Strahlendosen entwickelt wurden.

Da Quadramet mit dem Urin ausgeschieden wird, wurde der Strahlenexposition ein Blasenentleerungsintervall von 4,8 Stunden zugrundegelegt. Bei den Schätzwerten für die Strahlendosen in Knochen und Knochenmark wird davon ausgegangen, dass die Radioaktivität auf den Knochenoberflächen abgelagert wird, wie Autoradiogrammen von Knochenproben zu entnehmen war, die von mit Quadramet behandelten Patienten stammten.

Die Strahlenbelastung bestimmter Organe, die nicht das Zielorgan der Behandlung sind, kann erheblich von den durch den Krankheitsprozess induzierten pathophysiologischen Veränderungen beeinflusst sein. Dies sollte bei der Verwendung der folgenden Angaben berücksichtigt werden:

TABELLE 2: ABSORBIERTE STRAHLENDOSEN

Organ	Aufgenommene Dosis pro injizierter Aktivität (mGy/MBq)
Nebennieren	0,009
Gehirn	0,011
Brust	0,003
Gallenblase	0,004
Wand des Colon ascendens	0,005
Wand des Colon descendens	0,010
Dünndarm	0,006
Herzwand	0,005
Nieren	0,018
Leber	0,005
Lungen	0,008
Muskel	0,007
Ovarien	0,008
Pankreas	0,005
Rotes Knochenmark	1,54
Knochenoberflächen	6,76
Haut	0,004
Milz	0,004
Magen	0,004
Testes	0,005
Thymus	0,004
Schilddrüse	0,007
Harnblasenwand	0,973
Uterus	0,011
Effektivdosis (mSv/MBq)	0,307

Die sich für dieses Produkt aus einer injizierten Aktivität von 2590 MBq ergebende Effektivdosis beträgt 796 mSv.

Für eine verabreichte Aktivität von 2 590 MBq beträgt die typische Strahlendosis für das Zielorgan, den Skelettmetastasen, 86,5 Gy. Die typischen Strahlendosen für die kritischen Organe sind: gesunde Knochenoberflächen 17,5 Gy, rotes Knochenmark 4,0 Gy, Harnblasenwand 2,5 Gy, Nieren 0,047 Gy und Ovarien 0,021 Gy.

12. ANWEISUNGEN ZUR ZUBEREITUNG VON RADIOAKTIVEN ARZNEIMITTELN

Das Produkt vor der Verabreichung bei Raumtemperatur auftauen lassen.

Die Injektionslösung ist vor der Verabreichung optisch auf Verunreinigungen zu kontrollieren. Die Lösung sollte klar sein und darf keine Partikel enthalten. Der Anwender sollte bei dieser Inspektion darauf achten, dass seine Augen geschützt sind.

Die Aktivität sollte unmittelbar vor der Verabreichung mit einem Dosismessgerät bestimmt werden. Vor der Verabreichung von Quadramet müssen die zu verabreichende Dosis und die Identität des Patienten überprüft werden.

Aus Gründen des Strahlenschutzes darf der Patient nur in einer Einrichtung mit entsprechender Genehmigung zur therapeutischen Anwendung offener radioaktiver Strahlenquellen behandelt werden. Er darf entlassen werden, wenn die Expositionsraten den festgelegten Grenzwerten in den gültigen Bestimmungen entsprechen.

Nicht verwendetes Arzneimittel oder Abfallmaterial ist entsprechend den nationalen Anforderungen zu entsorgen.

Ausführliche Informationen zu diesem Arzneimittel sind auf der Website der Europäischen Arzneimittel Agentur <http://www.ema.europa.eu/> verfügbar.

Appendix D Quality control protocol from clinic for [^{99m}Tc]DPD and [^{99m}Tc]MDP

<u>Bezeichnung:</u>	^{99m}Tc – MDP und DPD		
Trennmethode:	TLC		
1. DC			
Stationäre Phase:	ITLC – SG, Fa. Varian		
Mobile Phase:	Methylethylketon (MEK)		
Sollwerte:	Produkt + Kolloid:	R_f = 0	
	Pertechnetat:	R_f = 1	
2. DC			
Stationäre Phase:	ITLC – SG, Fa. Varian		
Mobile Phase:	1 M NaOAc*		
Sollwerte:	Produkt:	R_f = 1	
	Pertechnetat + Kolloid:	R_f = 0	

Anmerkung: Die 1. DC wird durchgeführt, um das Kolloid zu bestimmen!

Ad * : NaOAc = Natriumacetat z.B.: 13,6 g NaOAc x 3 H₂O in 100 ml H₂O (= 1 M)

Berechnung der radiochemischen Reinheit:

$$\% \text{MDP (DPD)} = 100 - \% \text{Pertechnetat} - \% \text{Kolloid}$$

CV

Personal Information

Place of Birth: Korneuburg

Nationality: Austria



Education

- 2007-2015 Study of Pharmacy at the University of Vienna
- 2009-2011 Study of Development Studies at the University of Vienna
- 09/2008 Traditional Chinese Medicine (TCM) Summer School at the Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (CDUTCM), Chengdu, China
- 2002-2007 Horticultural College and Research Institutes in Vienna
Specialisation: Garden and Landscape Design

Work Experience

Since 2011	Guidance Counselling for Students and Prospective Students at the Austrian Students' Union (ÖH)
09/2014 - 02/2015	Undergraduate Research Assistant at the Department of Biomedical Imaging and Image-guided Therapy, Radiochemistry and Experimental Nuclear Medicine Unit, Medical University of Vienna
7/2014 and 7/2013	Intern at the Chamber of Pharmacists Vienna
2010/11 and 2014/15	Tutor for "Praktikum Quantitative pharmazeutische Analytik" at the Department of Pharmaceutical Chemistry
2009-2010	Technical assistant at the Department for Microbiology, Immunobiology and Genetic, University of Vienna
2007-2009	Technical assistant at the Department for Plantmolecularbiology, University of Vienna
07-08/2009	Intern at Technoclone GmbH, Vienna
07/2006	Intern at the <i>in vitro</i> facilities at Ernst Benary Samenzucht GmbH, Germany
04-07/2005	Intern at Achamore Gardens, United Kingdom

Publications

D. Haeusler, S. Hayer, **M. Tschokert**, J. Kreiseder B. Niederreiter, L.Nics, J. Ungersboeck, R. Kluger, H. Viernstein, W. Wadsak, M. Hacker, M. Mitterhauser: Preparation and preclinical evaluation of newly developed bone seeking radiopharmaceuticals: zoledronic acid as a potential theranostic tool? *Bone* 2014; submitted.

D. Haeusler, S. Hayer, **M. Tschokert**, B. Niederreiter, P. Otter, F. Fuchshuber, F. Girschele, J. Ungersboeck, L. Nics, W. Wadsak, M. Mitterhauser: "Multinuclide" radiolabeling of zoledronic acid and its preliminary preclinical evaluation as a potential new theranostic tool for bone-associated pathologies. *J Label Compd Radiopharm* 2013; 56: S423.

M. Tschokert, M. Mitterhauser, W. Wadsak, H. Viernstein, D. Haeusler: Evaluierung neuer Knochentracer anhand von Bindungsstudien an synthetischem und humanen Knochenmaterial. *21. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Radiochemie/Radiopharmazie (AGRR)* (2013).

M. Tschokert: Allgemeine Informationen zum Thema Gender Mainstreaming in der Kinder- und Jugendarbeit. In Bundesjugendvertretung, ed., *Toolbox: Handbuch zur Förderung von Gender Mainstreaming in der Kinder- und Jugendarbeit*, 11-13. Vienna 2013.

M. Tschokert: Kleinkronige Bäume in der Garten- und Landschaftsgestaltung. Thesis, Horticultural College and Research Institutes in Vienna 2007.

Extra-Curricular Activities

Academic Professional Association of Austrian Pharmacists (AFÖP)

2012-2013 Liaison Secretary for the European Pharmacy Students' Association (EPSA)

2012-2014 Vice President

Pharmacy Students' Council Vienna

2012-2015 Member of the curricular working group to develop a new Pharmacy Curriculum (1 Bachelor, 2 Masters)

2011-2013 Vice President of the Pharmacy Students' Council of Vienna

Austrian National Youth Council (OJV)

2013-2015 President of the Women Committee

Since 2012 Vice Chairperson of the of the Committee on the Monitoring and Evaluation of the Children and Youth Health Strategy of Austria (Ministry of Health)

Since 2011 Member of the Frame Work Health Goals Plenum of Austria (Ministry of Health)

2010-2012 Participation in the preparation of the Children and Youth Health Strategy of Austria (Ministry of Health)

2009-2013 Member of the Board, Vice President of the Women Committee