

DISS. ETH NO. 28987

***DEVELOPMENT OF TERBIUM RADIOISOTOPES TOWARDS CLINICAL
THERAGNOSTICS APPLICATIONS IN NUCLEAR MEDICINE***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZÜRICH
(Dr. Sc. ETH Zürich)

presented by
CHIARA FAVARETTO

MSc in Pharmacy, University of Padova, Italy

born on 29.05.1993

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roger Schibli, examiner
Dr. Nicholas Philip van der Meulen, co-examiner
Prof. Dr. Robert Eichler, co-examiner
Prof. Dr. Patrick Julian Steinegger, co-examiner

2023

Summary

Radiopharmaceuticals, fundamental in nuclear medicine, include a systemic approach where a radionuclide is conjugated to a ligand that binds to a disease-associated target, in order to localize the drug, and the radiation emitted by the radionuclide carried with it, to where the only disease cells are located, hence preventing accumulation in healthy tissues. By using radionuclides with different emission properties, it is possible to conduct either diagnosis or therapy of the disease. The combination of diagnostic imaging with the subsequent treatment using the same targeting ligand but a different isotope of the same element is known as "radiotheragnostics." Due to the identical kinetic behavior of the two radioligands, the localization of the treatment on the same tumor cells previously detected would be ensured ("what you image is what you treat"). Over the last decade, our group, the Radionuclide Development group, as part of the Center for Radiopharmaceutical Sciences (CRS) at Paul Scherrer Institute (PSI), has focused on the development of terbium radioisotopes for radiotheragnostics. Terbium provides four radioisotopes with complementary physical decay properties for radiotheragnostics, including terbium-152 and terbium-155, which are useful for diagnosis, together with terbium-149 and terbium-161, which are suitable for therapy. In previous studies in collaboration with CERN-ISOLDE, experiments using mass separation techniques were conducted, and isobars of 149, 152, and 155 were collected and delivered to PSI for radiochemical separation. The purified products (terbium-149, terbium-152, and terbium-155, respectively) were used for preliminary preclinical research, but the production yield was insufficient for it to be considered a viable approach for clinical and extensive preclinical studies. The first part of this thesis focuses on the development and optimization of production routes for the α -therapy- and SPECT-suitable terbium-149 and terbium-155 radioisotopes.

In Chapter 2, the optimization of the production of terbium-149 ($T_{1/2}=4.1$ h, $E_{\alpha}=3.98$ MeV (16.7%), 28 μm range in tissue) is reported. On-line isotope separation technique was used and proved suitable for producing enough terbium-149 for in vivo preclinical studies (~100 MBq per production run). Specifically, a revised radiochemical separation process based on chromatographic and extraction resins was established, which, in comparison to the previously described method, produced [^{149}Tb]TbCl₃ with higher purity. Particularly, terbium-149 had a radionuclidic purity (RNP) of 99.8% and could be used to radiolabel peptides at 20 MBq/nmol molar activity, for extended in-vitro and in-vivo therapy studies that will be reported elsewhere.

In Chapter 3 and 4 the development of new production routes for terbium-155 ($T_{1/2}=5.32$ d, $E_{\gamma} = 87$ keV (32%) 105 keV (25%)) were investigated. First, the $^{155}\text{Gd}(p,n)^{155}\text{Tb}$ and $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ nuclear reactions were studied using the Injector 2 cyclotron at PSI (Chapter 3). The enriched

gadolinium-155 and gadolinium-156 targets irradiations (at 10 and 24 MeV, respectively) and the following radiochemical separation of terbium-155 from the target material, employing cation exchange and extraction chromatography, were established for the first time. Target irradiation produced up to 4.4 GBq of terbium-155, with the $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ nuclear reaction reporting greater production yields. However, the $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ production route resulted in greater terbium-156 impurities (8%), compared to the $^{155}\text{Gd}(p,n)^{155}\text{Tb}$ reaction (6%). In terms of terbium-155 chemical purity, however, it was possible to achieve labelling of peptides at 100 MBq/nmol molar activity consistently, enabling preclinical imaging studies that proved terbium-155 eligibility for SPECT. Further production routes were examined to ascertain whether terbium-155 of higher RNP could be achieved (Chapter 4). In this dissertation, terbium-155 was produced in collaboration with CERN-ISOLDE by online mass separation, as previously detailed in other studies. This production was then compared to that performed at CERN-MEDICIS, a facility with offline mass separation capabilities, thus, terbium-155 was firstly produced via $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ nuclear reaction and then mass separated from terbium-156. In addition to the mass separation procedures, an indirect production route was pursued: $^{\text{nat}}\text{Tb}(p,5n)^{155}\text{Dy} \rightarrow ^{155}\text{Tb}$. The main disadvantage of the mass separation strategies was the low production yield, which confined the production to 135 MBq with online mass separation and 4.85 MBq with the offline method, respectively. Nevertheless, the online mass separation approach yielded a final product with higher chemical purity to that obtained in previous studies. Terbium-155 produced via online mass separation method could be used to radiolabel peptides for preclinical use at 20 MBq/nmol, whereas only 6 MBq/nmol molar activity had been accomplished earlier. In contrast, the offline mass separation strategy resulted in a very low final yield due to its poor mass separation efficiency (< 0.5%), despite the numerous approaches that were tried to enhance this feature throughout the course of this investigation. Regarding the indirect production route, this route displayed the same production yields as the direct $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ nuclear reaction, but with a greater RNP. In fact, terbium-156 and terbium-160 were co-produced with terbium-155; nonetheless, the suggested approach for radiochemical separation would involve an initial separation between the produced dysprosium-155 and terbium from the target material, as well as all co-produced terbium isotopic impurities.

Moreover, in recent years, the Radionuclide Development group has developed and produced terbium-161 ($T_{1/2} = 6.96$ d, $E_{\beta\text{-av}} = 154$ keV (100%)) in quality suitable for extensive preclinical and potential clinical applications. The second part of this thesis addressed the introduction of terbium-161 into clinical practice; hence, both the production of the radionuclide and the ^{161}Tb -radiopharmaceuticals must adhere to a quality standard. In particular, in this thesis (Chapter 5) terbium-161 was extensively characterized for therapeutic application. Comparing the $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ solution to the requirements of the commercially-available no-carrier added $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$, which is approved for the manufacture of several radiopharmaceuticals for clinical investigations, was one

way to establish the solution's clinical suitability. As with lutetium-177, the quality of the terbium-161 solution demonstrated, at pH 1-2, radionuclidic and radiochemical purity of > 99.9% and endotoxin level below the permitted range (175 IU/mL), indicating its appropriate quality for clinical use. Following this evaluation, a protocol for the production of ¹⁶¹Tb-based radiopharmaceuticals was devised. During the radiolabeling process, special attention was paid to the prevention of pharmaceutical contamination and the reduction of operator/manufacturer radiation exposure. To this end, automated modules for the radiolabeling and production of the final radiopharmaceutical product were employed. Particularly, a procedure for the synthesis of [¹⁶¹Tb]Tb-DOTATOC was established for the first time using a modular automated system with clinically applicable specifications and activity levels, i.e. from 1.0 to 7.4 GBq in 20 mL at a molar activity of 50 MBq/nmol. The radiopharmaceutical's quality control (QC) was also developed using chromatographic methods, which confirmed the product's stability (RCP ≥ 95%) over 24 hours.

Recent preclinical research suggests that terbium-161 is more effective than lutetium-177 in combination with somatostatin antagonists. As a result, the ¹⁶¹Tb-radiolabeled somatostatin antagonist [¹⁶¹Tb]Tb-DOTA-LM3 was identified as promising new treatments for neuroendocrine tumors, which was proposed for a clinical study as a possible novel therapy. However, a Good Manufacturing Practice (GMP) production must be developed to assure its clinical use. To this purpose, the present work (Chapter 6) includes the development of a GMP-compliant purification method for terbium-161 and the subsequent synthesis of [¹⁶¹Tb]Tb-DOTA-LM3 using an automated module system. Establishing the terbium-161 purification procedure resulted in the purification of up to 7.4 GBq with a final yield ranging from 62% to 93%. The approach was validated for the range of activity (0.5 to 1 GBq/dose) that would be used in the first arm of the clinical trial, which is intended for the evaluation of dosimetry prior to the therapeutic dose escalation phase. The production of the final medicinal product [¹⁶¹Tb]Tb-DOTA-LM3 was established and validated using the same automated module, based on the protocols previously developed for the similarly ¹⁶¹Tb-labeled radiopeptide [¹⁶¹Tb]Tb-DOTATOC. Synthesis and QC for [¹⁶¹Tb]Tb-DOTA-LM3 were performed with activities up to 4.5 GBq, but were also validated for 0.5-1 GBq range of activity, demonstrating the product's suitability for the initial phase of its clinical use. The QC on the synthesis batches demonstrated good quality of the product, with RCP ≥ 95% up to 24 hours, together with acceptable levels of ethanol (≤ 7%) and bacterial endotoxins (≤ 175 UI/20 mL). However, further efforts, such as sterility evaluation and process controls, were required to establish a GMP-compliant process, which were not required for the [¹⁶¹Tb]Tb-DOTATOC pilot project.

In conclusion, in this thesis, considerable developments were made at various stages in the production of three terbium radioisotopes that are of great relevance for potential future radiotheragnostic clinical applications in nuclear medicine.

Sommario

I radiofarmaci, fondamentali in medicina nucleare, consistono in un approccio sistemico dove un radionuclide è coniugato ad una molecola (ligando) che si lega specificatamente ad un bersaglio associato alla malattia, al fine di localizzare il farmaco, e la radiazione emessa dal radionuclide trasportato, unicamente dove si trovano le cellule associate alla malattia, impedendone così l'accumulo nei tessuti sani. Utilizzando radionuclidi con diverse proprietà di decadimento, è possibile effettuare sia la diagnosi che la terapia di una malattia. La combinazione della diagnostica per immagini con il successivo trattamento utilizzando lo stesso ligando coniugato ad un diverso isotopo dello stesso elemento è nota come "radioteragnostica". Grazie al comportamento cinetico identico tra due radioligandi, il trattamento viene localizzato a livello delle stesse cellule tumorali precedentemente individuate ("ciò che rilevi è ciò che curi"). Nell'ultimo decennio, il gruppo per lo sviluppo dei radionuclidi del Center for Radiopharmaceutical Sciences (CRS) presso il Paul Scherrer Institute (PSI), si è concentrato sullo sviluppo dei radioisotopi del terbio per la radioteragnostica. Il terbio, infatti, offre quattro radioisotopi con proprietà di decadimento fisico complementari e utilizzabili in radioteragnostica, tra cui il terbio-152 e il terbio-155 per la diagnosi, insieme al il terbio-149 e il terbio-161 per la terapia. In studi precedenti in collaborazione con CERN-ISOLDE, sono stati condotti esperimenti utilizzando tecniche di separazione di massa dove tutte le specie ioniche di massa 149, 152 e 155 sono state collezionate e trasferite poi al PSI per la successiva separazione radiochimica. I prodotti purificati (terbio-149, terbio-152 e terbio-155, rispettivamente) sono stati utilizzati per alcuni studi preclinici preliminari, ma la resa di produzione si è dimostrata insufficiente per essere considerata un approccio praticabile per studi preclinici articolati o studi clinici. La prima parte di questa tesi si concentra sullo sviluppo e l'ottimizzazione della produzione dei radioisotopi terbio-149 e terbio-155, che trovano impiego rispettivamente per terapia con particelle α e SPECT.

Nel Capitolo 2 è riportata l'ottimizzazione della produzione del terbio-149 ($T_{1/2} = 4.1$ h, $E_{\alpha} = 3.98$ MeV (16.7%), 28 μm di penetrazione). Come metodo di produzione è stata utilizzata la tecnica di separazione di massa in linea, che si è dimostrata idonea per produrre abbastanza terbio-149 per studi preclinici in vivo (~100 MBq per ciclo di produzione). Nello specifico, è stato messo a punto un metodo di separazione radiochimica ottimizzato basato su resine cromatografiche e di estrazione che, rispetto al metodo sviluppato in precedenza, ha prodotto $[^{149}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ con maggiore purezza. In particolare, il terbio-149 ha dimostrato una purezza radionuclidica (RNP) del 99,8% ed è stato utilizzato per radiomarcare peptidi ad una attività molare di 20 MBq/nmol, per studi di terapia approfonditi in vitro e in vivo che saranno descritti in altra sede.

Nei capitoli 3 e 4 è stato studiato lo sviluppo di nuovi metodi di produzione del terbio-155 ($T_{1/2} = 5.32$ d, $E_{\gamma} = 87$ keV (32%) 105 keV (25%)). In primo luogo, le reazioni nucleari $^{155}\text{Gd}(p,n)^{155}\text{Tb}$ e $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ sono state perseguite utilizzando il ciclotrone Injector 2 installato al PSI (Capitolo 3). Per la prima volta targets di gadolinio-155 e gadolinio-156 arricchito sono stati irraggiati (rispettivamente a 10 e 24 MeV) e successivamente il terbio-155 è stato separato chimicamente dal materiale del target, utilizzando tecniche di cromatografia a scambio cationico e di estrazione. L'irraggiamento dei targets ha prodotto fino a 4.4 GBq di terbio-155, principalmente attraverso la reazione nucleare $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$, che ha riportato maggiori rese di produzione. Tuttavia, la reazione nucleare $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ ha prodotto un maggiore livello di impurezze radionuclidiche (8% di terbio-156), rispetto alla reazione $^{155}\text{Gd}(p,n)^{155}\text{Tb}$ (6%). In termini di purezza chimica del terbio-155, tuttavia, è stato possibile ottenere in maniera riproducibile la radiomarcatura di peptidi ad attività molare di 100 MBq/nmol, consentendo studi di imaging preclinici che hanno dimostrato l'idoneità del terbio-155 per la SPECT. Inoltre, sono stati esaminati ulteriori metodi di produzione per verificare la possibilità di ottenere il terbio-155 con una maggiore RNP (Capitolo 4). In questo lavoro di tesi, il terbio-155 è stato prodotto in collaborazione con CERN-ISOLDE mediante separazione di massa in linea, come descritto in precedenza in altri studi. Questa produzione è stata quindi confrontata con quella eseguita presso CERN-MEDICIS, una struttura con capacità di separazione di massa non in linea. Il terbio-155 è stato inizialmente prodotto tramite reazione nucleare $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$ e poi separato dal terbio-156 co-prodotto tramite separazione di massa. Inoltre, oltre alle diverse strategie riguardanti la separazione di massa, per la produzione del terbio-155, è stata esaminata anche una reazione nucleare indiretta: $^{nat}\text{Tb}(p,5n)^{155}\text{Dy} \rightarrow ^{155}\text{Tb}$. La bassa resa di produzione si è rivelata essere il principale svantaggio delle strategie di separazione di massa, che ha limitato la produzione rispettivamente a 135 MBq con la separazione di massa in linea e 4,85 MBq con il metodo non in linea. Tuttavia, l'approccio della separazione di massa in linea ha prodotto un prodotto finale con una purezza chimica superiore a quella ottenuta negli studi precedenti. Infatti, è stato possibile utilizzare il terbio-155 prodotto tramite il metodo di separazione di massa in linea per radiomarcare peptidi per uso preclinico a 20 MBq/nmol, mentre in precedenza era stata raggiunta al massimo un'attività molare di 6 MBq/nmol. Al contrario, la strategia di separazione di massa non in linea ha riportato una resa finale molto bassa a causa della sua scarsa efficienza di separazione di massa (<0,5%), nonostante i numerosi approcci tentati per migliorare questo parametro nel corso di questo studio. Per quanto riguarda il metodo di produzione indiretto, questa reazione nucleare ha mostrato la stessa resa di produzione della reazione nucleare diretta $^{156}\text{Gd}(p,2n)^{155}\text{Tb}$, ma con una RNP maggiore. Infatti, sebbene il terbio-156 e il terbio-160 siano co-prodotti con il terbio-155, l'approccio suggerito per la separazione radiochimica comporterebbe una separazione iniziale tra il disprosio-155 e il terbio del target insieme a tutte le impurezze isotopiche di terbio coprodotte.

Inoltre, negli ultimi anni, il gruppo per lo sviluppo dei radionuclidi ha sviluppato e prodotto il terbio-161 ($T_{1/2} = 6,96$ d, $E\beta_{av}^+ = 154$ keV (100%)) con caratteristiche di qualità adeguate per applicazioni precliniche approfondite e potenziali usi clinici. La seconda parte di questa tesi ha affrontato l'introduzione del terbio-161 nella pratica clinica; ovvero la produzione del radionuclide e dei radiofarmaci marcati con esso, rispettando lo standard qualitativo necessario. In particolare, in questa tesi (Capitolo 5) il terbio-161 è stato ampiamente caratterizzato per applicazioni terapeutiche. Per verificare l'idoneità clinica del terbio-161, la soluzione $[^{161}\text{Tb}]\text{TbCl}_3$ è stata confrontata con le specifiche del $[^{177}\text{Lu}]\text{LuCl}_3$ no-carrier-added disponibile in commercio e approvato per la produzione di diversi radiofarmaci per studi clinici. Come per il lutezio-177, la qualità della soluzione di terbio-161 ha dimostrato, a pH 1-2, purezza radionuclidica e radiochimica $> 99,9\%$ e livello di endotossine al di sotto del limite consentito (175 IU/mL), indicando quindi una qualità appropriata per l'uso clinico. A seguito di questa valutazione, è stato sviluppato un protocollo per la produzione di radiofarmaci marcati con terbio-161. Durante il processo di radiomarcatura, è stata prestata particolare attenzione alla prevenzione della contaminazione del radiofarmaco e alla riduzione dell'esposizione alle radiazioni dell'operatore/produttore. A tal fine, per la radiomarcatura e la produzione del prodotto medicinale finale, sono stati impiegati moduli automatizzati. In particolare, è stata delineata per la prima volta una procedura con un sistema automatizzato per la sintesi di $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTATOC}$ con specifiche e livelli di attività adeguati all'uso clinico, ovvero da 1.0 a 7.4 GBq in 20 mL, a un'attività molare di 50 MBq/nmol. Il controllo qualità (QC) del radiofarmaco è stato implementato utilizzando metodi cromatografici, che hanno confermato la stabilità del prodotto ($\text{RCP} \geq 95\%$) nelle 24 ore successive alla sua produzione.

Inoltre, recenti ricerche precliniche suggeriscono che il terbio-161 è più efficace del lutezio-177 in combinazione con antagonisti del recettore della somatostatina. Di conseguenza, l'antagonista della somatostatina radiomarcato con terbio-161, $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTA-LM3}$, è stato individuato come nuovo promettente trattamento per tumori neuroendocrini, ed è stato quindi proposto per uno studio clinico come possibile nuova terapia. Tuttavia, è necessario sviluppare una produzione conforme alle norme di buona fabbricazione (GMP) per poterlo utilizzare in clinica. A tal fine, il presente lavoro di tesi (Capitolo 6) include lo sviluppo di un metodo di purificazione conforme alle norme GMP per il terbio-161 e la successiva sintesi di $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTA-LM3}$ utilizzando un modulo automatizzato. La procedura di purificazione del terbio-161 ha portato alla purificazione fino a 7.4 GBq di terbio-161 con una resa finale compresa tra il 62% e il 93%. L'approccio è stato convalidato per l'intervallo di attività (da 0.5 a 1 GBq/dose) che sarà utilizzato nel primo braccio della sperimentazione clinica, destinato alla valutazione della dosimetria prima della fase di aumento della dose terapeutica. La produzione del medicinale finale $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTA-LM3}$ è stata quindi definita e convalidata utilizzando lo stesso modulo automatizzato utilizzato per la purificazione, sulla base dei protocolli precedentemente sviluppati per il radiopeptide $[^{161}\text{Tb}]\text{Tb-DOTATOC}$, che

possiede caratteristiche chimiche simili. La sintesi e il QC per [¹⁶¹Tb]Tb-DOTA-LM3 sono stati eseguiti con attività fino a 4.5 GBq, ma sono stati convalidati anche in questo caso per l'intervallo di attività 0.5-1 GBq, dimostrando l'idoneità del prodotto per la fase iniziale dello studio clinico. Il QC sui lotti di sintesi ha dimostrato una buona qualità del prodotto, con RCP \geq 95% fino a 24 ore, insieme a livelli accettabili di etanolo (\leq 7%) ed endotossine batteriche (\leq 175 UI/20 mL). Tuttavia, per stabilire un procedimento conforme alle norme GMP, sono stati necessari ulteriori accorgimenti, come la valutazione della sterilità e il monitoraggio del processo, che non sono stati necessari durante lo sviluppo del progetto pilota con [¹⁶¹Tb]Tb-DOTATOC.

In conclusione, in questa tesi, sono stati raggiunti notevoli risultati in varie fasi dello sviluppo della produzione di tre radioisotopi del terbio di grande rilevanza per potenziali future applicazioni radioteragnostiche in medicina nucleare.