

DISS. ETH Nr. 28445

Investigation of Emerging Radionuclides and Novel PSMA Ligands to Improve Radioligand Therapy of Prostate Cancer

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by
VIVIANE JESSICA TSCHAN

MSc in Molecular Biology, University of Basel

born on 25.05.1992
citizen of Kleinlützel SO, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Roger Schibli, examiner
PD Dr. Cristina Müller, co-examiner
Prof. Dr. Klaus Eyer, co-examiner

2022

Summary

Prostate cancer is one of the most frequent cancer types in men. At an advanced metastatic stage, the prognosis for prostate cancer patients is poor despite available treatment options. With the identification and characterization of the prostate-specific membrane antigen (PSMA), the research field of prostate cancer expanded towards the use of PSMA-targeting radioligands such as [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617.

The main objective of this thesis was the improvement of PSMA-targeted radioligand therapies. This included the evaluation of new PSMA ligands with structural changes to improve the pharmacokinetic profile and the investigation of emerging therapeutic radionuclides with potentially more favorable decay characteristics than those that are currently employed in clinics. Furthermore, it was the aim to characterize and introduce clinically more relevant mouse models, which would potentially allow a more in-depth investigation of novel PSMA radioligands.

Previously, [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA, an albumin-binding PSMA radioligand was developed in the group. In this work, this radioligand was investigated with regard to its therapeutic efficacy and safety profile and compared with [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 and the previously developed albumin-binding [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56 (Chapter 2). The injection of 10 MBq radioligand per mouse did not cause early side effects for any of these radioligands in non-tumor-bearing mice. This activity was, therefore, chosen as the maximum to be applied in PC-3 PIP tumor-bearing mice. As expected from the 1.5-fold increased absorbed tumor dose, [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA was more effective to inhibit tumor growth than [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617. The injection of 2 MBq per mouse resulted in a median survival time of 34 days and 19 days, respectively. While the median survival time for mice that received 5 MBq and 10 MBq of [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 was 32 days and 51 days, respectively, the majority of the mice that received 5 MBq and 10 MBq of [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA survived until study end at Day 84. Despite a 1.2-fold lower mean absorbed tumor dose, the therapeutic efficacy of [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA was almost as high as for [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56. In an additional study with immunocompetent mice, the tolerability of 30 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56 was compromised, which was demonstrated by a decrease of blood cell counts. This was, however, not observed for [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA or [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 applied at the same activity, indicating that [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA provided a better safety profile than [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56.

The tissue distribution profile of [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA and [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 applied at different molar amounts of ligand was compared in LNCaP and PC-3 PIP xenograft models, of which the former expresses PSMA at a lower level than the latter (Chapter 3). In vitro, we found an up to 10-fold lower uptake in LNCaP cells than in transduced PC-3 PIP cells, while the difference in uptake was increased with the application of higher molar amounts of ligand, when saturation was reached for LNCaP tumor cells. In vivo, the uptake in PC-3 PIP xenografts was several folds higher than in LNCaP xenografts, while the tumor uptake in both models as well as off-target accumulation was increased after injection of the lower ligand amount. The LNCaP model was more susceptible to changes in the

injected molar ligand amount than the PC-3 PIP model due to saturation by the unlabeled ligand fraction occurring at low PSMA levels. Differences in injected ligand amount affected the uptake in the LNCaP xenografts slightly more when using [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 than in the case of [^{177}Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA. The opposite was observed for the PC-3 PIP xenograft model in an even more significant manner, indicating that the uptake in tumors with high PSMA expression benefits from the use of an albumin-binding PSMA radioligand. This study demonstrated the impact of the mouse model and the injected molar amount of ligand on the resultant tissue distribution and suggests, therefore, consistent protocols for the preclinical evaluation and comparison of newly developed PSMA radioligands.

The impact of even a minute change in the linker moiety of a radioligand on its tissue distribution profile was demonstrated (Chapter 4). [^{177}Lu]Lu-Ibu-PSMA-02 only differed from the previously developed [^{177}Lu]Lu-Ibu-PSMA-01 in that the linker entity that connected the ibuprofen with the ligand's backbone was two carbon atoms shorter. This modification increased the radioligand's in vitro stability, whereas other in vitro properties were comparable. Biodistribution studies showed that [^{177}Lu]Lu-Ibu-PSMA-02 was excreted slower from the blood stream than it was the case for [^{177}Lu]Lu-Ibu-PSMA-01. This resulted in higher tumor accumulation for [^{177}Lu]Lu-Ibu-PSMA-02, reflected by a 1.6-fold increased tumor $\text{AUC}_{0\rightarrow 8d}$ value, but also the off-target uptake was increased. In the future, such minor modifications of the ligand structure could be applied for the fine-tuning of a radioligand's pharmacokinetic behavior.

Both, lutetium-177 and terbium-161 are β^- -particle emitters with comparable decay characteristics. In addition, terbium-161 emits conversion and Auger electrons characterized by a short range in tissue and significantly higher linear energy transfer (LET) than for β^- -particles. The emerging radionuclide terbium-161 was compared with the clinically established lutetium-177 in combination with PSMA-617, revealing equal physicochemical properties for [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 and [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 (Chapter 5). In vitro tumor cell viability and survival assays using PSMA-positive PC-3 PIP cells demonstrated that [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 was significantly more effective in reducing the cell viability and survival as compared to [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 at activity concentrations in the range of 0.1–10 MBq/mL and 0.05–5.0 MBq/mL, respectively. The treatment of PC-3 PIP tumor-bearing mice with 5 MBq and 10 MBq [^{161}Tb]Tb-PSMA-617 resulted in a prolonged median survival time of 36 days and 65 days, respectively, as compared to mice treated with 5 MBq and 10 MBq [^{177}Lu]Lu-PSMA-617 that had a median survival time of 32 days and 51 days, respectively. The difference in therapeutic efficacy was even more pronounced when the radioligands were injected only two days after tumor cell inoculation when solid tumors had not formed yet. These results demonstrated the benefit of these short-ranged electrons and the potential of terbium-161 for treating small PSMA-positive metastasis and single cancer cells in metastatic prostate cancer cases.

The α -particle emitter actinium-225 is a promising therapeutic radionuclide, which was already used clinically for the treatment of metastatic disease that was resistant to β^- -particle emitters. Actinium-225 was investigated in combination with the *S*-isomer of Ibu-DAB-PSMA, herein referred to as SibuDAB

for the targeted α -therapy (Chapter 6). Whereas the physicochemical properties investigated in this study were similar for [^{225}Ac]Ac-SibuDAB and [^{177}Lu]Lu-SibuDAB, the pharmacokinetic behavior of [^{225}Ac]Ac-SibuDAB differed from its ^{177}Lu -labeled counterpart, resulting in prolonged retention in off-target tissue like the blood and the kidneys. The treatment with [^{225}Ac]Ac-SibuDAB was significantly more effective than with [^{225}Ac]Ac-PSMA-617 at the same activity levels, reflected by the fact that all mice treated with 5 kBq or 10 kBq [^{225}Ac]Ac-SibuDAB survived until the study end on Day 56, which was not the case for mice treated with [^{225}Ac]Ac-PSMA-617. This study demonstrated the therapeutic potential of [^{225}Ac]Ac-SibuDAB, but the increased uptake of this albumin-binding PSMA radioligand in the blood and the kidneys presents a challenge for this treatment approach.

As a model of prostate cancer that might reflect the clinical situation of the disease better than the PC-3 PIP and LNCaP tumor xenograft models, we characterized the patient-derived xenograft (PDX) mouse model LAPC9 (Chapter 7). Based on autoradiography data and immunohistochemical analysis, LAPC9 tumors were shown to express PSMA at levels similar to that of LNCaP xenografts. Furthermore, we were able to image the *in vivo* tumor accumulation of [^{177}Lu]Lu-PSMA-617, [^{177}Lu]Lu-SibuDAB and [^{68}Ga]Ga-PSMA-11 using SPECT and PET imaging, respectively. Biodistribution studies confirmed PSMA-specific radioligand uptake in a comparable range as in LNCaP tumors. This *in vivo* tumor uptake was approximately 10-fold lower compared to the uptake in PC-3 PIP tumor xenografts. With adjustments regarding therapy study design, LAPC9 and other prostate cancer PDX models representing different stages of the disease might provide an option to answer questions regarding the therapeutic efficacy of PSMA radioligands with more clinically relevant models.

In conclusion, the results obtained in the scope of this thesis demonstrated the therapeutic benefit of using an albumin-binding PSMA radioligand due to the increased tumor uptake. Encouraging data was shown for the use of terbium-161 and actinium-225 as emerging radionuclides to improve the therapeutic outcome. In view of the intended clinical translation of these promising treatment options, more detailed investigations are warranted, potentially involving clinically relevant models of prostate cancer.

Zusammenfassung

Prostatakrebs ist eine der häufigsten Krebsarten bei Männern. In einem fortgeschrittenen metastasierten Stadium ist die Prognose trotz vorhandener Behandlungsmöglichkeiten schlecht. Mit der Identifikation und Beschreibung des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) hat sich das Forschungsfeld des Prostatakrebses um die Nutzung von PSMA-gezielten Radioliganden wie [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 erweitert.

Das Hauptziel dieser Dissertation war die Verbesserung von PSMA-gezielten Radioligandtherapien. Dies beinhaltete die Evaluation von neuen PSMA Liganden mit veränderten Strukturen, um das pharmakokinetische Profil zu verbessern, sowie auch die Untersuchung von neu aufkommenden therapeutischen Radionukliden mit potenziell vorteilhafteren Zerfallseigenschaften als die momentan klinisch eingesetzten. Ausserdem war es das Ziel klinisch relevante Mausmodelle zu charakterisieren und einzuführen, welche eine potenziell tiefgründigere Untersuchung neuer PSMA Radioliganden erlauben würden.

[¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA, ein Albumin-bindender PSMA Radioligand, wurde zuvor in der Gruppe entwickelt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Radioligand bezüglich seiner therapeutischen Wirksamkeit und seines Sicherheitsprofils untersucht und mit [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 und dem zuvor entwickelten, Albumin-bindenden [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56 verglichen (Kapitel 2). Die Injektion von 10 MBq Radioligand pro Maus verursachte für keinen der Radioliganden frühe Nebenwirkungen in Mäusen ohne Tumor. Diese Aktivität wurde daher als Maximum für die Anwendung in Mäusen mit PC-3 PIP Tumoren bestimmt. Wie aufgrund der 1.5-fach erhöhten absorbierten Tumordosis erwartet, war [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA bei Injektion derselben Aktivitätslevel effektiver als [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 um das Tumorstadium zu hemmen. Die Injektion von 2 MBq pro Maus resultierte in einer medianen Überlebenszeit von jeweils 34 Tagen und 19 Tagen. Während die mediane Überlebenszeit für Mäuse, die 5 MBq und 10 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 erhielten jeweils 32 Tage und 51 Tage betrug, überlebte die Mehrheit der Mäuse, die 5 MBq und 10 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA erhielten bis zum Studienende an Tag 84. Trotz einer 1.2-fach tieferen mittleren absorbierten Tumordosis war die therapeutische Wirksamkeit von [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA fast so hoch wie für [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56. In einer zusätzlichen Studie mit immunkompetenten Mäusen war die Verträglichkeit gegenüber 30 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56 vermindert, was sich in Form einer Reduktion der Blutzellzahl zeigte. Dies wurde für dieselbe Aktivität von [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA und [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 nicht beobachtet, was darauf hinwies, dass [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA ein besseres Sicherheitsprofil hat als [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-ALB-56.

Das Gewebeverteilungsprofil von [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA und [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 wurde bezüglich der Anwendung verschiedener molarer Mengen an Ligand und der Verwendung von LNCaP und PC-3 PIP Xenograftmodellen verglichen, wobei ersteres Modell weniger PSMA exprimiert als letzteres (Kapitel 3). In vitro haben wir eine bis zu 10-fach tiefere Aufnahme in LNCaP Zellen als in

den transduzierten PC-3 PIP Zellen ermittelt, während die Unterschiede bezüglich der Aufnahme mit der Applikation höherer molarer Ligandmengen grösser wurden, wenn bei den LNCaP Tumorzellen eine Absättigung erreicht wurde. In vivo war die Aufnahme in PC-3 PIP Xenograften mehrfach höher als in LNCaP Xenograften, wobei nach der Injektion einer geringeren Ligandmenge eine erhöhte Aufnahme sowohl im Tumor beider Modelle als auch in nicht-gezieltem Gewebe erzielt wurde. Das LNCaP Modell war aufgrund der Absättigung des weniger exprimierten PSMA durch den nicht markierten Ligandanteil empfindlicher gegenüber Änderungen der injizierten molaren Ligandmenge als das PC-3 PIP Modell. Unterschiede in der injizierten molaren Ligandmenge hatten in LNCaP Xenograften einen leicht grösseren Einfluss auf die Aufnahme von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 als für [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-DAB-PSMA. Das Gegenteil wurde noch signifikanter für das PC-3 PIP Xenograftmodell beobachtet, was darauf hinwies, dass die Aufnahme in Tumoren mit hoher PSMA Expression vom Gebrauch Albumin-bindender PSMA Radioliganden profitieren könnte. Diese Studie demonstrierte den Einfluss des Mausmodells und der injizierten molaren Ligandmenge auf die resultierende Gewebeverteilung und spricht dafür, konsistente Protokolle für die präklinische Evaluation und den Vergleich von neu entwickelten PSMA Radioliganden anzuwenden.

Der Einfluss einer nur schon kleinen Veränderung der Verbindungseinheit eines Radioliganden auf sein Gewebeverteilungsprofil wurde demonstriert (Kapitel 4). [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-PSMA-02 unterschied sich von dem zuvor entwickelten [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-PSMA-01 darin, dass die Verbindungseinheit, die das Ibuprofen mit dem Rückgrat verbindet, zwei Kohlenstoffatome kürzer war. Diese Modifikation erhöhte die in vitro Stabilität des Radioliganden, während andere in vitro Eigenschaften vergleichbar waren. Biodistributionsstudien zeigten, dass [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-PSMA-02 langsamer vom Blutstrom ausgeschieden wurde als es für [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-PSMA-01 der Fall war. Das resultierte in einer höheren Tumorakkumulation für [¹⁷⁷Lu]Lu-Ibu-PSMA-02, was durch einen 1.6-fach erhöhten AUC_{0→8d} Wert des Tumors reflektiert wurde, wobei aber auch die nicht-gezielte Aufnahme erhöht war. In Zukunft könnten solche geringfügigen Anpassungen der Ligandstruktur dazu verwendet werden, um das pharmakokinetische Verhalten eines Radioliganden genau abzustimmen.

Sowohl Lutetium-177 als auch Terbium-161 sind β⁻-Partikelemitter mit vergleichbaren Zerfallseigenschaften. Zusätzlich emittiert Terbium-161 Konversions- und Auger-Elektronen, die eine kurze Reichweite und einen signifikant höheren linearen Energietransfer (LET) als β⁻-Partikel aufweisen. Das aufkommende Radionuklid Terbium-161 wurde mit dem klinisch etablierten Lutetium-177 in Kombination mit PSMA-617 verglichen, was gleiche physikalisch-chemische Eigenschaften für [¹⁶¹Tb]Tb-PSMA-617 und [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 offenbarte (Kapitel 5). Das Untersuchen des Überlebens und Fortbestehens von PSMA-positiven PC-3 PIP Tumorzellen in vitro zeigte, dass bei Aktivitätskonzentrationen zwischen jeweils 0.1–10 MBq/mL und 0.05–5.0 MBq/mL [¹⁶¹Tb]Tb-PSMA-617 signifikant effektiver als [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 war, das Überleben und Fortbestehen der Zellen zu reduzieren. Die Behandlung von PC-3 PIP Tumor-tragenden Mäusen mit 5 MBq und 10 MBq [¹⁶¹Tb]Tb-PSMA-617 resultierte in einer verlängerten medianen Überlebenszeit von jeweils 36 Tagen

und 65 Tagen, verglichen mit den Mäusen, die mit 5 MBq und 10 MBq [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617 behandelt wurden und eine mediane Überlebenszeit von jeweils 32 Tagen und 51 Tagen aufwiesen. Der Unterschied bezüglich der therapeutischen Wirksamkeit war sogar noch stärker ausgeprägt, wenn die Radioliganden bereits zwei Tage nach der Inokulation der Tumorzellen injiziert wurden, was ein Zeitpunkt war an dem sich noch keine soliden Tumore gebildet hatten. Diese Ergebnisse demonstrierten den Nutzen dieser Elektronen kurzer Reichweite und das Potential von Terbium-161 für die Behandlung von kleinen PSMA-positiven Metastasen und einzelnen Krebszellen in Fällen mit metastasiertem Prostatakrebs.

Der α -Partikelemittler Actinium-225 ist ein vielversprechendes therapeutisches Radionuklid, welches bereits klinisch für die Behandlung von metastasierten Fällen zum Einsatz kam, welche eine Resistenz gegenüber β^- -Partikelemittern aufwiesen. Actinium-225 wurde in Kombination mit dem *S*-Isomer von Ibu-DAB-PSMA, hier als SibuDAB bezeichnet, für die gezielte α -Therapie untersucht (Kapitel 6). Während die in dieser Studie untersuchten physikalisch-chemischen Eigenschaften für [²²⁵Ac]Ac-SibuDAB und [¹⁷⁷Lu]Lu-SibuDAB vergleichbar waren, unterschied sich das pharmakokinetische Verhalten von [²²⁵Ac]Ac-SibuDAB von seinem ¹⁷⁷Lu-markierten Gegenstück, was zu einem verlängerten Verbleiben in nicht-gezielten Geweben wie dem Blut und den Nieren führte. Die Behandlung mit [²²⁵Ac]Ac-SibuDAB war signifikant effektiver als mit derselben Aktivität von [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617, was sich dadurch zeigte, dass alle Mäuse, die mit 5 kBq oder 10 kBq [²²⁵Ac]Ac-SibuDAB behandelt wurden bis zum Studienende an Tag 56 überlebten. Dies war nicht der Fall für die Mäuse, die mit [²²⁵Ac]Ac-PSMA-617 behandelt wurden. Diese Studie zeigte das therapeutische Potential von [²²⁵Ac]Ac-SibuDAB, jedoch stellt die erhöhte Aufnahme dieses Albumin-bindenden PSMA Radioliganden im Blut und in den Nieren eine Herausforderung für diesen Therapieansatz dar. Wir charakterisierten das PDX Mausmodell LAPC9 als ein Prostatakrebsmodell, welches die klinische Situation der Erkrankung womöglich besser widerspiegelt als die PC-3 PIP und LNCaP Xenograftmodelle (Kapitel 7). In Autoradiographiestudien und immunohistochemischen Analysen wurde gezeigt, dass das PSMA Expressionslevel von LAPC9 Tumoren mit demjenigen von LNCaP Xenograften vergleichbar ist. Des Weiteren konnten wir die *in vivo* Tumorakkumulation nach der Injektion von [¹⁷⁷Lu]Lu-PSMA-617, [¹⁷⁷Lu]Lu-SibuDAB und [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-11 jeweils mittels SPECT und PET abbilden. Biodistributionsstudien bestätigten PSMA-spezifische Aufnahme von Radioligand in einem zu LNCaP Tumoren vergleichbaren Masse. Diese *in vivo* Aufnahme in LAPC9 Tumoren war ungefähr 10-fach geringer verglichen mit der Aufnahme in PC-3 PIP Tumoren. Mit Anpassungen bezüglich des Therapiestudienplans könnten LAPC9 und andere PDX Modelle, die verschiedene Stadien der Erkrankung repräsentieren, eine Option darstellen um Fragen bezüglich der therapeutischen Wirksamkeit von PSMA Radioliganden mit klinisch relevanten Modellen zu beantworten.

Schlussendlich wurde mit den im Rahmen dieser Dissertation erlangten Resultaten der therapeutische Nutzen von Albumin-bindenden PSMA Radioliganden aufgrund der erhöhten Aufnahme im Tumor

demonstriert. Vielversprechende Daten wurden für die Verwendung von Terbium-161 und Actinium-225 als aufkommende Radionuklide bezüglich der Verbesserung der therapeutischen Wirkung gezeigt. Hinsichtlich der geplanten klinischen Translation dieser vielversprechenden Therapiemöglichkeiten sind detailliertere Untersuchungen, potenziell auch mit klinisch relevanten Prostatakrebsmodellen, gerechtfertigt.