

3 Entwicklung von VSOP als Kontrastmittel für die MRT: Organisation des Projektes, regulatorische Aspekte, Wirkstofffindung

3.1 *Organisation des Gesamtprojektes*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die wesentlichen Teile der präklinischen und klinischen Entwicklung eines neuartigen Blut-Pool Kontrastmittels für die MRT auf der Basis sehr kleiner superparamagnetischer Eisenoxid-Partikel (VSOP, *very small superparamagnetic iron oxide particles*) beschrieben. Dieses Vorhaben wurde durch die Zusammenarbeit von Herrn Dipl. Chem. Dr. rer. nat. H. Pilgrim und der eigenen Arbeitsgruppe möglich. Hierbei hatte Herr Dr. Pilgrim die Idee für die Entwicklung der genannten VSOP als Kontrastmittel für die MR-Tomographie und ist Inhaber der entsprechenden Stoffpatente. In der eigenen Arbeitsgruppe war und ist das entsprechende Fachwissen für die Durchführung der gezielten Wirkstofffindung und der nachfolgenden präklinischen und klinischen Entwicklung eines Arzneimittels vorhanden. Des Weiteren verfügte die eigene Arbeitsgruppe über eine entsprechende räumliche und gerätetechnische Grundausstattung, um ein solches Vorhaben beginnen zu können. Die über die Grundausstattung hinaus hierfür notwendigen personellen und gerätetechnischen Voraussetzungen wurden durch projektbezogene Fördermittel geschaffen. Die Finanzierung des Projektes und somit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Studien erfolgte zum großen Teil über öffentliche Fördermittel, z.B. seitens des BMBF im Rahmen des FUTOUR-Programmes oder seitens der Technologie- und Innovations-Agentur Brandenburg (TINA). In den verschiedenen Teilprojekten agierte die eigene Arbeitsgruppe als Subkontraktor. Bestandteil des BMBF-Projektes war die Gründung einer Firma, die mit der eigenen universitären Arbeitsgruppe kooperieren sollte. Diese Firma wurde von Herrn Dr. Pilgrim zusammen mit Universitätsmitarbeitern 1998 im Sinne eines Start-up Unternehmens als privates Forschungslabor mit der Bezeichnung „Ferropharm GmbH, Forschungslabor“ mit Sitz in Teltow, Brandenburg, gegründet. Das durch das BMBF geförderte Projekt beinhaltete die primäre Wirkstofffindung mit dem Ziel der Entwicklung eines Blut-Pool Kontrastmittels auf der Basis der superparamagnetischen Eisenoxide VSOP für die MR-Angiographie sowie die weitere Substanzoptimierung bis hin zu einem klinischen Prüfpräparat. Hierbei war Projektziel, nach einer knapp 3-jährigen Laufzeit eine klinische Phase I abzuschließen. Diese Förderung betrifft somit die Entwicklungsarbeit, die zeitlich vor den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Teilprojekten lag, sowie die Teilprojekte, die in den Kapiteln 4.3, 4.6 und 5.2 beschrieben

sind. Die TINA-Förderung betraf die experimentelle Erforschung des Potenzials des Entwicklungskandidaten für die MR-Diagnostik von Lebertumoren und ermöglichte somit das Projekt, das in Kapitel 4.5 beschrieben ist.

3.2 *Regulatorische Aspekte der Arzneimittelentwicklung für das Kontrastmittel VSOP*

Das Endziel des hier beschriebenen Projektes, die erste klinische Prüfung von VSOP am gesunden Probanden, erfordert die Erfüllung regulatorischer Anforderungen an den Entwicklungskandidaten VSOP-C184 hinsichtlich präklinischer pharmakologischer und toxikologischer Untersuchungen. Diese Anforderungen sind in den Richtlinien der „International Conference on Harmonisation“ (ICH) dargelegt (90).

Im Rahmen dieser ICH-Richtlinien existieren unterschiedliche Anforderungen an die präklinische Prüfung eines neuen Arzneimittels in Abhängigkeit der Art der Anwendung, der Häufigkeit der Anwendungen und der damit verbundenen, zu erwartenden unerwünschten Wirkungen.

Zur Festlegung des Umfangs der erforderlichen präklinischen Prüfungen für VSOP-C184 hinsichtlich Wirksamkeit und Sicherheit wurden folgende Punkte berücksichtigt:

- Bei den superparamagnetischen Eisenoxiden, zu denen VSOP gehört, handelt es sich um eine bekannte Wirkstoffklasse, aus der bereits zwei Produkte (Endorem® und Resovist®) international für die Anwendung als MRT-Kontrastmittel zugelassen sind. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, bei der Prüfung hinsichtlich des Verbleibs des Wirkstoffes im Organismus auf bekannte Daten aus dieser Wirkstoffklasse zu verweisen.
- In der Gruppe von MR-Kontrastmitteln unterscheidet sich VSOP von Gd-haltigen Verbindungen. Der Eisenkern von VSOP wird im Körper abgebaut und das Eisen in den Körpereisenpool überführt. Demgegenüber ist Gd ein hoch toxisches Element, das nur durch Bindung in einem Komplex die entsprechende Pharmakokinetik erhält und renal ausgeschieden wird. Für Gd-Verbindungen muss daher durch aufwendige Ausscheidungsversuche nachgewiesen werden, dass keine Reste der Substanz im Körper verbleiben. Diese Ausscheidungsversuche sind für Eisenoxid-Partikel nicht notwendig.

- Bei der geplanten klinischen Anwendung des VSOP basierten MR-Kontrastmittels handelt es sich um eine einmalige parenterale Gabe unter Kontrolle eines Arztes und nicht um eine Mehrfach- oder Daueranwendung durch den Patienten selbst, wie es z.B. für Therapeutika aus verschiedensten Arzneimittelgruppen der Fall ist. Dies reduziert den Umfang der erforderlichen präklinischen Prüfung hinsichtlich der Langzeittoxikologie.
- Wie für alle Kontrastmittel in der in vivo Diagnostik basiert für VSOP die Wirksamkeit auf einem physikalischen Prinzip und nicht auf einer Beeinflussung des Organismus, wie bei therapeutisch wirksamen Arzneimitteln. Daher gestaltet sich der präklinische Nachweis der Wirksamkeit von VSOP vergleichsweise einfach im Sinne einer MRT-Untersuchung mit Darstellung der Blutgefäße. Insbesondere sind keine präklinischen Prüfungen an aufwendigen Krankheitsmodellen notwendig.

Auf der Basis dieser Überlegungen und der Vorgaben durch die ICH-Richtlinien wurden unter anderem folgende präklinische Untersuchungen mit dem endgültigen Entwicklungskandidaten VSOP-C184 durchgeführt, um eine erste klinische Prüfung zu ermöglichen (siehe Kapitel 4.6):

- I. Genotoxizität: Amestest und Mikrokerntest,
- II. Akute Verträglichkeit nach Einmalgabe an Ratte und Maus,
- III. Einfluss auf Salurese und Diurese an der Ratte,
- IV. Einfluss auf die Spontanmotilität an der Ratte,
- V. Lokale Verträglichkeit am Kaninchen,
- VI. Einfluss auf kardiovaskuläre Parameter am Schwein,
- VII. Subakute Verträglichkeit nach Mehrfachgabe an Ratte und Schwein,
- VIII. Pharmakokinetik an Ratte und Schwein,
- IX. Untersuchung zur Organverteilung an Ratten,
- X. Untersuchungen zur Wirksamkeit an Ratte und Schwein.

Die Untersuchungen I – VI wurden durch das FDA-zertifizierte Auftragsforschungsinstitut (Contract Research Organisation (CRO)) Laboratory of Pharmacology and Toxicology KG (LPT), Hamburg, nach geltenden internationalen Richtlinien (GLP) durchgeführt, wobei die

Inhalte der Prüfungen in Konsens zwischen LPT und der eigenen Arbeitsgruppe festgelegt wurden.

Die Untersuchungen VII - X wurden in der eigenen Arbeitsgruppe GLP-konform durchgeführt. In der Prüfung VII hat zusätzlich ein Fachtierarzt für Pathologie die resultierenden histologischen Präparate beurteilt und die entsprechenden Ergebnisse dokumentiert.

Die anschließende klinische Prüfung der Phase I wurde gemäß dem deutschen Arzneimittelgesetz (AMG) durchgeführt. Hierbei war zu beachten, dass für die klinische Prüfung ein klinisches Prüfmuster basierend auf VSOP-C184 hergestellt wurde. Dies erfolgte durch die Apotheke der Charité, da diese die Genehmigung zur Herstellung von klinischen Prüfmustern hat, allerdings nur für die Verwendung des Prüfmusters innerhalb der Charité. Hierzu hat die Ferropharm GmbH den Wirkstoff von VSOP-C184, das Megluminsalz des Eisenoxid-Citrat Komplexes, an die Apotheke geliefert. Diese hat wiederum nach Angabe der Ferropharm GmbH die Herstellung gemäß AMG mit Herstellung der galenischen Formulierung, Sterilfiltration, Verpackung, Autoklavieren und Etikettieren vorgenommen. Die klinische Prüfung selbst wurde gemäß ICH- und GCP-Richtlinien durch eine CRO an der Charité durchgeführt und beinhaltete als wesentlichen Punkt die Sicherheits- und Verträglichkeitsprüfung für aufsteigende Dosierungen, wobei die höchste Dosierung knapp über dem zu erwartenden, für die klinische Diagnostik geeigneten Dosisbereich lag.

3.3 *Grundlegende Eigenschaften der neuen Substanzgruppe VSOP*

In Kapitel 2.2 wurde ausgeführt, dass Substanzen auf der Basis von superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln, die als Kontrastmittel für die MRT entweder bereits klinisch zugelassen sind oder sich in der präklinischen oder klinischen Entwicklung befinden, zur Stabilisierung mit Polymeren umhüllt sind. Hierzu wurden oder werden z.B. Dextran (192), Carboxydextran (121), Polyethylenglykol (187), Albumin (267), Stärke (113), eine liposomale Umhüllung (161) u.a.m. verwendet. Durch diese voluminöse Beschichtung wird der minimal mögliche hydrodynamische Durchmesser nach unten begrenzt und liegt für Partikel der Substanzgruppe MION bei etwa 15 bis 20 nm. MION stellen bislang die kleinsten Polymer-beschichteten USPIO dar (213). Allerdings zeigen systematische Untersuchungen mit Polymer-beschichteten SPIO und USPIO mit verschiedenen Durchmessern, dass die Eignung von SPIO für die MR-Angiographie, mit abnehmendem hydrodynamischen Durchmesser steigt (3).

Um den hydrodynamischen Durchmesser weiter zu reduzieren, muss daher ein anderes Umhüllungsmaterial gewählt werden, z.B. eine monomere Substanz. Das Herstellungsverfahren der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzgruppe VSOP erlaubt die Beschichtung bzw. Stabilisierung der Eisenoxidkerne mit Monomeren wie z.B. Citrat (164). Mit diesem Verfahren ist die Herstellung von Monomer-stabilisierten Eisenoxid-Partikeln mit einem hydrodynamischen Durchmesser von weniger als 10 nm möglich. Eine weitere wichtige Partikeleigenschaft in Hinblick auf das gewünschte Einsatzgebiet als signalverstärkendes Kontrastmittel in der MR-Angiographie ist ein hohes r_1/r_2 -Verhältnis. Dies wird zum einen durch einen geringen Anteil von Fe^{2+} im kristallinen Eisenoxidkern von unter 6% gewährleistet (164). Hierdurch besteht innerhalb der Partikel ein Gemisch aus Maghämät ($\gamma\text{-}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3$) und Magnetit ($(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$) (140). Diese Zusammensetzung ist neben der Voraussetzung für ein hohes r_1/r_2 -Verhältnis auch Voraussetzung für eine gute Verträglichkeit. Als Grund für die bessere Verträglichkeit von Partikeln mit geringem Anteil an Fe^{2+} kann die starke oxidative Wirkung dieser Ionen angesehen werden (72). Andere in der präklinischen oder klinischen Prüfung befindlichen oder in der klinischen Anwendung befindlichen SPIOs oder USPIOs (z.B. Ferucarbotran) sind aufgrund dieses Verträglichkeitsaspektes im Vergleich zu VSOP mit einem ähnlich niedrigen Fe^{2+} -Anteil hergestellt. Eine weitere, wichtige Voraussetzung für ein günstiges r_1/r_2 -Verhältnis ist die geringe Größe des Eisenoxidkernes, die durch das Herstellungsverfahren von VSOP möglich ist und deutlich unter 5 nm Durchmesser liegen kann. Hiermit sollten Partikel der Substanzgruppe VSOP bezüglich der physikalischen Eigenschaften gute Voraussetzungen für ein T_1 -verkürzendes und in der T_1 -gewichteten Bildgebung signalsteigerndes Kontrastmittel bieten.

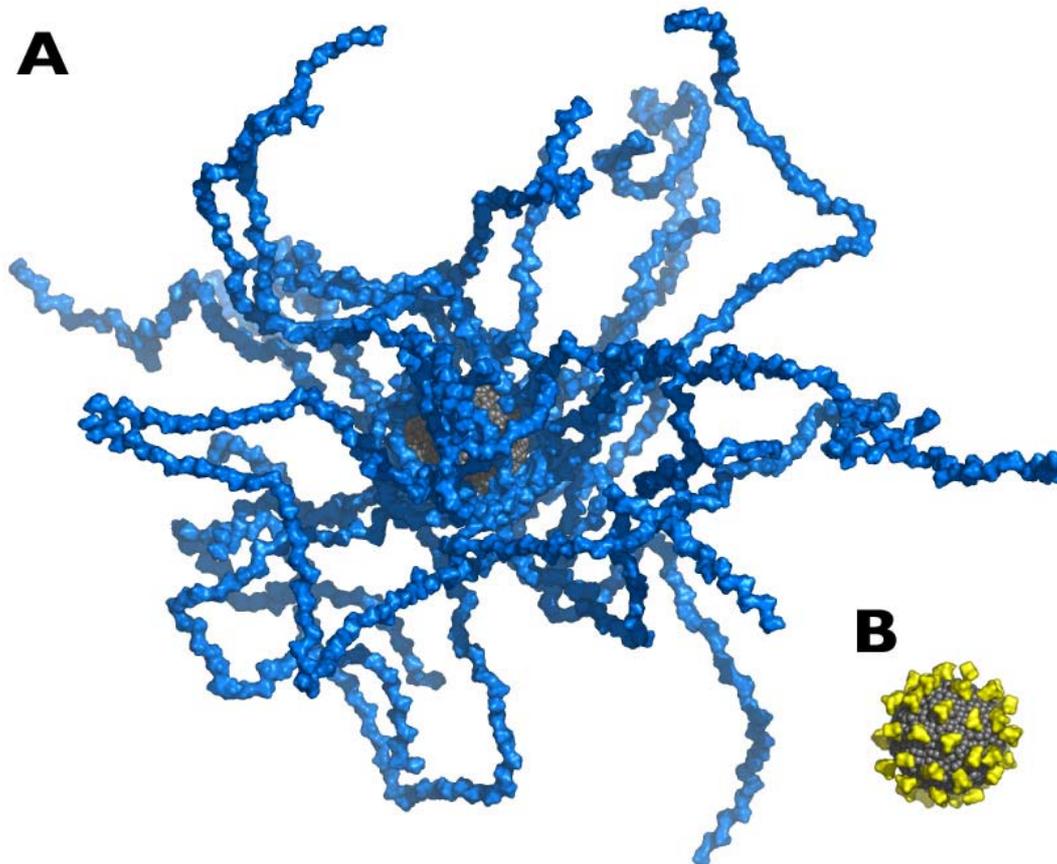


Abbildung 3.1 Schematischer Größenvergleich eines Dextran-umhüllten USPIO Partikel (MION) (A) mit einem Citrat-umhüllten Partikel von VSOP (B). Durch die sterische Stabilisierung mit dem Polymer Dextran (blau) ergibt sich ein großer Gesamtpartikeldurchmesser von ca. 20 - 30 nm. Durch elektrostatische Stabilisierung mit Citrat (gelb) resultiert ein wesentlich geringerer Gesamtpartikeldurchmesser von ca. 7 nm. Die Größe der Eisenoxidkerne ist für beide Partikelarten mit ca. 4 – 5 nm identisch (Computersimulation: E. Schellenberger)

3.4 Anforderungen an ein VSOP-basiertes Kontrastmittel für die MR-Angiographie

Anhand von Literaturdaten zu anderen MR-Kontrastmitteln auf der Basis von SPIO oder USPIO sowie auch zu anderen Blut-Pool Kontrastmitteln wurden in Verbindung mit den Erfahrungen aus der ersten Optimierungsphase bis etwa zur Vorstufe VSOP-C63 folgende Kriterien für einen Kandidaten aus der Substanzgruppe VSOP für eine mögliche klinische Entwicklung definiert:

- Hydrodynamischer Durchmesser < 10 nm,

- Verhältnis zwischen T_1 - und T_2 -Relaxivität (r_1/r_2 -Verhältnis) in demineralisiertem Wasser bei 0,94 T: $> 0,45$,
- Bluthalbwertszeit an der Ratte > 20 min,
- höchste nicht toxische Dosis > 5 mmol Fe/kg. □

Diese Anforderungen wurden im nachfolgend skizzierten iterativen Optimierungsprozess zu Grunde gelegt.

3.5 Iterative Optimierung von VSOP als Blut-Pool Kontrastmittel für die MRT

Die erfolgte und in der vorliegenden Arbeit beschriebene Entwicklung des VSOP-basierten MR-Kontrastmittels lässt sich in drei Abschnitte unterteilen:

- I. Findung des Wirkstoffes und der galenischen Formulierung. Dieser Prozess führte zum präklinischen Produkt.
- II. Präklinische Charakterisierung zu Pharmakokinetik, Sicherheit und Wirksamkeit des präklinischen Produktes unter Berücksichtigung der Ausführungen des Abschnitt 3.2 (regulatorische Aspekte), Bei erfolgreichem Abschluss dieser Phase ist mit diesem Produkt die Durchführung einer klinischen Phase I möglich.
- III. Erste klinische Prüfung zur Sicherheit und Verträglichkeit, und optional, wie in diesem Fall, der Wirksamkeit an gesunden Probanden. Diese Prüfung wurde mit entsprechend hergestellten klinischen Prüfmustern durchgeführt.

Die nachfolgenden Ausführungen zur iterativen Optimierung eines VSOP-basierten Kontrastmittels beschreiben somit den Abschnitt I.

Zu Beginn des hier beschriebenen Vorhabens stand die Idee, auf der Basis der neuen elektrostatisch stabilisierten Eisenoxid-Partikel ein Kontrastmittel für die MRT zu entwickeln (163). Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, zur elektrostatischen Stabilisierung der Eisenoxid-Partikel verschiedene niedermolekulare aliphatische Di- oder Polycarbonsäuren oder deren Derivate zu verwenden, wie z.B. Apfelsäure, Weinsäure, Citronensäure oder Asparaginsäure. Von Beginn an wurde für die Entwicklung von VSOP der Substanz Citrat, dem Salz der Citronensäure, als Hüllmaterial der Vorzug gegeben. Dies begründet sich darin, dass es sich bei dieser Substanz um einen körpereigenen Stoff handelt, der metabolisiert werden kann. Erste analytische Untersuchungen zu Beginn des Projektes zeigten eine hohe Stabilität dieser Eisenoxid-Citrat-Partikel bei einer

Partikelgröße unter 10 nm. Im Rahmen dieses Herstellungsprozesses mit dem Hüllmaterial Citrat kann die Gesamtpartikelgröße zwischen 5 und 12 nm variiert werden, der Oxidationszustand bezüglich Verhältnis von Maghämmit zu Magnetit beeinflusst werden, sowie unterschiedliche Oberflächenladungen erreicht werden. Des Weiteren kann im Rahmen dieses Herstellungsverfahrens die galenische Formulierung durch Zusatz von Hilfsstoffen im Wesentlichen hinsichtlich pH und Osmolalität beeinflusst werden. Diese genannten Variablen haben einerseits erheblichen Einfluss auf die chemisch-physikalischen Eigenschaften. Dies sind die Sättigungsinduktion und die Relaxivitäten r_1 und r_2 und das Verhältnis von r_1 zu r_2 . Andererseits beeinflusst die Art der Herstellung die pharmakologisch-toxikologischen Eigenschaften. Dies sind im Wesentlichen die Bluthalbwertszeit, Organverteilung und akute Toxizität. Mit dem Ziel, ein optimales Blut-Pool Kontrastmittel zu entwickeln, wurden in den experimentellen und präklinischen Phasen dieses Projektes auf Basis der Citrat stabilisierten Eisenoxid-Partikel mehr als 200 Varianten hinsichtlich physikalischer und pharmakologisch-toxikologischer Eigenschaften untersucht. Hierbei handelte es sich um einen iterativen Optimierungsprozess, bei dem auf der Basis vorhergehender Ergebnisse bezüglich analytischer Daten und biologischer Untersuchungen gezielt entsprechende Parameter im Herstellungsprozess variiert wurden.

Aus dieser Vorgehensweise erklärt sich auch die Nomenklatur des hier entwickelten Produktes der Substanzgruppe VSOP. Hierbei bedeutet das C in der Substanzbezeichnung, dass die Partikel mit dem Monomer Citrat stabilisiert sind, sowie z.B. die Zahl 184 in VSOP-C184, dass es sich hierbei um die 184. Formulierung im Rahmen des genannten iterativen Optimierungsprozesses handelt.

Wie bereits erwähnt, wurde die größte Zahl der ca. 200 Varianten von VSOP orientierend bezüglich physikalischer und pharmakologisch-toxikologischer Eigenschaften untersucht. Diese Untersuchungen umfassten die Bestimmung der T_1 - und T_2 -Relaxivität, orientierende Untersuchung der Bluthalbwertszeit an je 3 Ratten und orientierende Verträglichkeitsuntersuchung an je 3 Ratten mit einer Dosis von 5 mmol Fe/kg i.S. einer Abschätzung des non toxic dose level. Die Relaxivitätsbestimmung wurde bis zur Variante VSOP-C63 bei 0,47 T (Minispec PC 100 (Bruker GmbH, Karlsruhe), Gerät der Firma Schering, AG, Berlin, Messungen erfolgten durch Frau Claudia Heyer und Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Ebert) durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurden die relaxometrischen Messungen innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe am institutseigenen 0,94 T Relaxometer (Minispec mq 40, Bruker GmbH, Karlsruhe) durchgeführt.

In der frühen Phase der Wirkstofffindung wurden einzelne Vorstufen selektiert, um ausführlichere Untersuchungen zu verschiedenen Fragestellungen anzustellen. Dies

waren:

- A.I VSOP-C43: Untersuchung der Altersabhängigkeit der Bluthalbwertszeit der Partikel nach i.v. Injektion,
- A.II VSOP-C63: erste experimentelle Wirksamkeitsprüfung in der MR-Angiographie an Ratte und Kaninchen,
- A.III VSOP-C91: erste experimentelle Wirksamkeitsprüfung in der MR-Angiographie der Koronararterien am Schwein.

Diese Vorstufen hatten sich aufgrund von Wirksamkeitsparametern bereits als relativ günstig erwiesen. Andere Aspekte, wie z.B. die noch nicht ausreichende Verträglichkeit oder auch das Bestreben nach Vereinfachungen im Herstellungsprozess bedingten eine Fortsetzung der iterativen Optimierung in der Wirkstofffindung.

Die Untersuchungen zu A.I und A.II sind nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit, die wesentlichen Ergebnisse hierzu werden in den folgenden beiden Abschnitten lediglich kurz zusammengefasst. Die Studie A.III ist Bestandteil des experimentellen Teiles der vorliegenden Arbeit (Kapitel 4.3) und stellt hier die einzige Untersuchung dar, die nicht mit dem Entwicklungskandidaten VSOP-C184 durchgeführt wurden.

VSOP-C184 stellte schließlich einen optimalen Kompromiss bezüglich physikalisch-chemischer und pharmakologisch-toxikologischer Daten hinsichtlich eines sicheren und gut wirksamen MR-Kontrastmittels für die MR-Angiographie dar. Die weiteren experimentellen Wirksamkeitsstudien und die definitive präklinische Charakterisierung wurden mit dem Entwicklungskandidaten VSOP-C184 durchgeführt. Dies waren:

- B.I Wirksamkeitsprüfung in der First-Pass MR-Angiographie im Vergleich zu einem Standardkontrastmittel,
- B.II Wirksamkeitsprüfung in der MR-Tomographie von Lebertumoren im Vergleich zu einem niedermolekularen Standardkontrastmittel und einem für die MR-Tomographie der Leber optimierten SPIO,
- B.III Untersuchung zu Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Toxikologie und Sicherheit sowie zur Wirksamkeit in der Equilibrium MR-Angiographie.

Die Studien B.I bis B.III sind Bestandteil des experimentellen Teiles der vorliegenden Arbeit (Kapitel 4.4, 4.5, 4.6).

3.5.1 Altersabhängigkeit der Bluthalbwertszeit: Untersuchungen mit VSOP-C42 an Ratten

Zunächst wurde bei der Bestimmung der Halbwertszeiten von VSOP-Varianten an Ratten zufällig beobachtet, dass die Bluthalbwertszeit offenbar abhängig vom Alter der Tiere ist, und zwar unabhängig von der Variante von VSOP. Daher wurde für die Vorstufe VSOP-C43 hierzu eine systemische Untersuchung durchgeführt und bestätigt, dass die Bluthalbwertszeit bei alten Ratten signifikant länger ist, als bei jungen Tieren. Gleiches gilt für die Zeitkonstante der Aufnahme der Partikel in Leber und Milz (206). Derartige Daten waren bislang im Umfeld der präklinischen und klinischen Forschung mit partikulären Kontrastmitteln, insbesondere also mit SPIO oder USPIO, nicht berichtet worden. Die Tatsache, dass die Bluthalbwertszeit bzw. die Kinetik der Phagozytose i.v. injizierter partikulärer Substanzen durch das MPS eine Altersabhängigkeit zeigt, ist jedoch außerhalb des Feldes der Kontrastmittelforschung seit längerem bekannt gewesen. Sowohl am Tier als auch am Mensch nimmt für i.v. injizierte kolloidale und partikuläre Substanzen die Bluthalbwertszeit mit zunehmendem Alter zu, bedingt durch eine verminderte Phagozytoseaktivität in der Leber (18, 31, 39, 154, 160, 247). Diese Tatsachen haben insofern Bedeutung für die präklinische Forschung mit partikulären Kontrastmitteln, das bei der Ermittlung und für die Angabe von Bluthalbwertszeiten und Zeitkonstanten für die Aufnahme in Organen des MPS das Alter der Tiere genau berücksichtigt werden muss. Des Weiteren kann bei der klinischen Anwendung von derartigen Substanzen, z.B. SPIO, von kinetischen Daten, die an gesunden jungen Probanden in einer klinischen Phase I erhoben wurden, nicht auf ein mögliches optimales diagnostisches Zeitfenster am alten Patienten geschlossen werden.

3.5.2 Erste experimentelle Untersuchung zur Wirksamkeit: Ergebnisse mit VSOP-C63 an Ratten und Kaninchen

Mit der Vorstufe VSOP-C63 wurden erstmals ausführliche Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit des intravaskulären signalsteigernden Effektes in MR-angiographischen Untersuchungstechniken an Ratten durchgeführt (231). Diese wurden sowohl als Equilibrium MR-Angiographie als auch als First-Pass MR-Angiographie durchgeführt, wobei Messungen bis 50 min nach Injektion erfolgten. Es wurden sechs Dosierungen zwischen 0,015 und 0,09 mmol Fe/kg verwendet. Aus der Zeitabhängigkeit der intravaskulären Signalintensitätswerte wurden die Halbwertszeiten für den Effekt der Partikel bestimmt, von denen auf die Pharmakokinetik der Substanz selbst geschlossen werden kann. Ab einer Dosis von 0,03 mmol Fe/kg wurde eine exzellente Abbildung der Thorakal- und Abdominalgefäße erzielt. Ab einer Dosis von 0,06 mmol Fe/kg konnte keine

weitere Steigerung des intravaskulären Signals bewirkt werden, was als Überdosierungseffekt aufgrund zunehmender Verkürzung der T_2^* -Relaxationszeit zu werten war. Somit konnte geschlossen werden, dass eine gute Dosierung für diese Art von Substanz zwischen 0,03 und 0,06 mmol Fe/kg liegt. Ein weiteres Ergebnis war, dass die Bluthalbwertszeiten mit steigender Dosis zunehmen. Dieser Effekt ist außerhalb des Gebietes der Kontrastmittelforschung seit längerem für i.v. injizierte partikuläre Substanzen bekannt (18, 247). Im Rahmen präklinischer oder klinischer Untersuchungen zu partikulären Kontrastmitteln wurde ein solcher Effekt allerdings noch nicht beschrieben. Ein Grund hierfür kann sein, dass üblicherweise im Rahmen pharmakologischer Prüfungen bei der Anpassung pharmakokinetischer Daten neben dem initialen Konzentrationsabfall die terminale Eliminationskinetik stark gewichtet wird und somit Unterschiede zwischen den Dosierungen nicht mehr auffällig werden. Unserer Ansicht nach ist jedoch für partikuläre Kontrastmittel die initiale Kinetik für den Effekt bzw. die Wirkung in der Bildgebung wichtig und sollte bei der Bestimmung der Zeitkonstanten entsprechend berücksichtigt werden. Als Konsequenz aus unseren Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Bluthalbwertszeit ergibt sich, dass für partikuläre Kontrastmittel die Bluthalbwertszeit standardisiert immer für eine bestimmte Dosis angegeben werden muss. Weitere Ergebnisse dieser Studie mit VSOP-C63 waren, dass eine First-Pass MR-Angiographie mit einer Dosis von 0,045 mmol Fe/kg gleichwertige Ergebnisse wie mit Gadopentetat Dimeglumin in einer Dosis von 0,2 mmol Gd/kg ergibt. Allerdings waren diese Ergebnisse in der Aussage eingeschränkt, da an der Ratte die Zirkulationszeit unter der Akquisitionszeit der Sequenz lag, wie sie mit dem verwendeten klinischen Ganzkörper MR-Tomograph möglich waren, und somit an diesem Tiermodell keine „First pass“ MR-Angiographie im eigentlichen Sinne durchgeführt werden konnte. Daher wurde im weiteren Verlauf der präklinischen Prüfung zu VSOP-C184 ein Vergleich mit Gadopentetat Dimeglumin in der First-Pass MR-Angiographie am Schwein mit vergleichbaren Bedingungen wie in der klinischen Situation durchgeführt (siehe Kapitel 4.4) (207). Letztendlich wurde in dieser Studie am Kaninchen exemplarisch die Möglichkeit der MR-angiographischen Darstellung der Koronararterien mit VSOP-C63 demonstriert. Aufgrund der geringen Dimensionen konnten diese Ergebnisse jedoch nur orientierend sein. Die systematische Untersuchung zur MR-Angiographie der Koronararterien erfolgte mit einer weiteren Vorstufe (VSOP-C91) am Schwein (siehe Kapitel 4.3) (232).

3.6 *Entwicklungskandidat VSOP-C184 im Vergleich zu exemplarischen Vorstufen:*

Physikalisch-chemische Daten

Mit den Vorstufen VSOP-C42 und VSOP-C63 wurden die im vorhergehenden Kapitel zusammengefassten eingehenderen Wirksamkeitsprüfungen durchgeführt. Mit der Vorstufe VSOP-C91 wurden die experimentellen Untersuchungen zur MR-Angiographie der Koronararterien durchgeführt (Kapitel 4.3).

3.6.1 *Präklinische Charakterisierung*

Aus dem vorbeschriebenen Optimierungsprozess im Rahmen der Wirkstofffindung wurde letztendlich VSOP-C184 aufgrund seiner günstigen Eigenschaften als Entwicklungskandidat für die Anwendung als Blut-Pool Kontrastmittel mit Fokus auf der MR-Angiographie selektiert. Auf der Basis des Herstellungsprozesses von VSOP-C184 wurden mehrere Chargen reproduziert, welche für die in den Kapiteln 4 und 5 beschriebenen experimentellen und klinischen Studien eingesetzt wurden. Im speziellen wurde VSOP-C184 Charge 9.12-5 in dem Auftragsforschungsinstitut LPT GmbH (Hamburg) für die Untersuchungen im Rahmen der präklinischen Charakterisierung (Kapitel 4.6) verwendet. Die Untersuchungen, die in der eigenen Gruppe im Rahmen der präklinischen Charakterisierung durchgeführt wurden, erfolgten zum größten Teil ebenfalls mit VSOP-C184 Charge 9.12-5. Hierbei wurden für einzelne Teiluntersuchungen auch zwei Vorstufen verwendet. Dies waren VSOP-C180 und VSOP-C183, die bezüglich der Partikelzusammensetzung mit VSOP-C184 identisch waren und sich von dem Entwicklungskandidaten nur geringfügig bezüglich ihrer galenischen Formulierung unterschieden. Grund für die Verwendung dieser beiden Vorstufen war, dass die endgültige Substanz zum Zeitpunkt der Durchführung der entsprechenden präklinischen Charakterisierung noch nicht in ausreichender Menge verfügbar war. Diese drei Versionen unterscheiden sich nur geringfügig bezüglich ihrer galenischen Formulierung. Dies betrifft die Mannitolkonzentration, die für VSOP-C180 und VSOP-C183 50 g/l ist und für VSOP-C184 60 g/l beträgt. Dies resultiert für die Formulierung VSOP-C180 und VSOP-C183 in einem pH von 6,44 – 6,5 und einer Osmolalität von 284 – 314 mOsm/kg H₂O. Demgegenüber hat VSOP-C184 einen pH von 7,0 und eine Osmolalität von 376 mOsm/kg H₂O. Die Varianten VSOP-C180, -C183 und -C184 unterscheiden sich auch nicht bezüglich physikalischer oder pharmakologisch-toxikologischer Eigenschaften.

Im Folgenden sind exemplarische physikalische Daten von VSOP-C184 im Vergleich der genannten Vorstufen dargestellt (Tabelle 3.1).

3.6.2 Klinisches Prüfpräparat

Die klinischen Prüfungen Phase I und IB (Kapitel 5) wurden mit VSOP-C184 Charge 050701 durchgeführt. Die Konzentration der aktiven Substanz (Megluminsalz des nanopartikulären Eisenoxid-Citrat-Komplexes) betrug 27,9 g Fe/L, entsprechend 0,5 mol Fe/L. Diese Charge hat eine Osmolalität von 389 mOsm/kg H₂O und einen pH von 7,0. Zum Zeitpunkt des Beginns der klinischen Phase I Prüfung war ermittelt worden, dass die verwendete Charge über 12 Monate stabil ist. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Phase IB war nachgewiesen, dass die Charge mindestens 24 Monate stabil ist.

Wie die im Rahmen der präklinischen Entwicklung verwendeten Substanzen weisen die Partikel von VSOP-C184 Charge 050701 einen Kerndurchmesser von 4 nm auf (ermittelt mit Transmissionselektronen-Mikroskopie). Der hydrodynamische Durchmesser wurde aktuell in der Arbeitsgruppe von Prof. R.N. Muller, Mons, mit $7,0 \pm 0,15$ nm bestimmt (Photonenkorrelationsspektroskopie, BIC multiangle laser light scattering system, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA).

Aus Tabelle 3.1 ist ersichtlich, dass im Laufe des Optimierungsprozesses mit zunehmender Variante die T₁-Relaxationszeit zunächst abgenommen hat, um dann wieder leicht zuzunehmen, die T₂-Relaxivität hat im Verlauf leicht abgenommen. Das resultierende r₁/r₂-Verhältnis hat sich nicht wesentlich geändert. Hierbei ist zu beachten, dass beim Übergang von 0,47 T zu 0,94 T ein Sprung entstand. Die Bluthalbwertszeiten haben in der frühen Phase der Entwicklung mit zunehmender Entwicklungsstufe deutlich zugenommen um später wieder leicht abzunehmen. Insgesamt stellt die letztendliche Version VSOP-C184 einen Kompromiss hinsichtlich gleichzeitig guten Werten für Relaxivität, Bluthalbwertszeit und Verträglichkeit dar.

Tabelle 3.1 Relaxivitäten, Bluthalbwertszeiten und höchste nicht toxische Dosis für einzelne Vorstufen und für den Entwicklungskandidaten

	Kerndurchmesser [nm]	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	Relaxivität bei 0,47 T			Relaxivität bei 0,94T			Bluthalbwertszeit (bei 0,030 mmol Fe/kg) [min]	non toxic dose level [mmol Fe/kg]
			r ₁	r ₂	r ₁ /r ₂	R ₁	r ₂	r ₁ /r ₂		
VSOP-C42	5	12	50	72	0,69				8,4 ± 0,9	1,5
VSOP-C63	5	8	30	39	0,77				20,0 ± 3,0	3,0
VSOP-C91	5	7	19	29	0,66	16,0	32,0	0,50	ca. 39 ⁺	3,0
VSOP-C184	4	8,6				20,1	37,1	0,54	21,3 ± 5,5 [*]	6,0

Anmerkung:

Die Daten wurden mit den in Kapitel 4.2 beschriebenen Methoden erhoben (Messungen bei 37°C).

⁺Daten liegen nur für die Dosis von 0,06 mmol Fe/kg vor und sind für 0,03 mmol Fe/kg interpoliert worden.

^{*}Daten liegen nur für die Dosis 0,045 mmol Fe/kg vor.

Da bekannt ist, dass für alle MR-Kontrastmittel die Relaxationszeit beeinflussenden Eigenschaften von der Feldstärke abhängen, insbesondere für SPIO und USPIO (33), wurden die Relaxivitäten von VSOP-C184 Charge 050701 für verschiedene Feldstärken bestimmt. Diese Messungen wurden im Labor von Prof. R.N. Muller durchgeführt. Hierzu wurden von entsprechenden Verdünnungsreihen in demineralisiertem Wasser bei 37°C T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten gemessen. Diese Messungen wurden bei 0,24 T an einem Minispec PC 10, bei 0,47 T an einem Minispec PC 20, bei 1,4 T an einem Minispec mq 60 und bei 7 T an einem AMX-300 NMR-Spektrometer (alle Geräte: Bruker, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Die Messung der T_1 -Relaxationszeit erfolgte mit einer Inversion-Recovery Sequenz, die Messung der T_2 -Relaxationszeit mit einer Carr-Purcell-Meyboom-Gill Spinecho Multiecho Sequenz. Die Relaxivitäten r_1 und r_2 , wurden nach Subtraktion der diamagnetischen Komponente des Verdünnungsmediums (r_1 : dia = $0,28 \text{ s}^{-1}$ und r_2 : dia = $0,3 \text{ s}^{-1}$) berechnet (R.N. Muller, unveröffentlichte Daten) (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Relaxivitäten von VSOP-C184 Charge 050701 bei vier verschiedenen Feldstärken

	0,24 T (10 MHz)	0,47 T (20 MHz)	1,4 T (60 MHz)	7 T (300 MHz)
r_1 [l/(mmol*s)]	18,79	18,70	13,97	3,48
r_2 [l/(mmol*s)]	27,15	30,02	33,45	34,17
r_1/r_2	0,69	0,62	0,42	0,10

Anmerkung: Diese Daten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. R.N. Muller, Mons, bestimmt. Diese Daten sind, methodisch bedingt, nur in Grenzen mit den eigenen Daten (Tabelle 3.1) vergleichbar (Messungen bei 37°C).