

3 Material und Methoden

3.1 Studiensubstanz und Dosierung - Phase I und Phase Ib

Die in den klinischen Prüfungen Phase I und Ib eingesetzte Prüfsubstanz war in beiden Studien identisch und entstammte der Charge VSOP-C184 #050701. Die Konzentration des aktiven Anteils der Testlösung betrug 27,9 g Fe/L, was 0,5 mol Fe/L entspricht. Die Osmolarität entsprach 389 mOsm/kg H₂O bei einem gemessenen pH-Wert der Lösung vom 7,0. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die vorliegende Charge mindestens 24 Monate haltbar / stabil ist.

Phase I

In der ersten klinischen Verträglichkeitsstudie, Phase I bekamen 15 Personen die aktive Prüfsubstanz (5 Probanden pro Dosisgruppe) und ein Proband pro Dosisgruppe eine Kontrolle in Form eines Placebos intravenös verabreicht. Die Dosierung von VSOP-C184 wurde dabei wie folgend den Gruppen A bis C zugeteilt: Gruppe A, 0,015 mmol Fe/kg, Gruppe B, 0,045 mmol Fe/kg und Gruppe C, 0,075 mmol Fe/kg. Die Konzentration der Prüfsubstanz richtete sich dabei nach den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen am tierexperimentellen Modell. Hier zeigte sich, dass eine Konzentration von 0,04-0,05 mmol Fe/kg einen optimalen signalverstärkenden Effekt im MR-Bild aufweist und daher als ideale Dosis im klinischen Einsatz zur Equilibrium MR-Angiographie angesehen werden kann [23, 58]. Neben der klinisch einsetzbaren Dosis wurde auch eine, das MR-Bild betreffend, zu niedrige- (0,015 mmol Fe/kg) und eine zu hohe Konzentration (0,075 mmol Fe/kg) der Prüfsubstanz im Blut auf Verträglichkeit getestet. Die Testsubstanz wurde dabei der Gruppe A über 10 min intravenös verabreicht (dies entspricht etwa 2 ml/10 min). Die Gruppen B und C erhielten die Testsubstanz als Bolus bei einer geschätzten Flussrate von etwa 1 mL/s.

Die Kontrollgruppe erhielt eine Placebo-Substanz, bestehend aus einer wässrigen 10%igen Mannitol Lösung (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und wurde in den drei Dosisgruppen mit dem entsprechenden Volumen verabreicht. Insgesamt 18 Probanden wurden Gruppen zu sechs Personen randomisiert zugeteilt.

Phase Ib

In der ersten Wirksamkeitsprüfung Phase Ib von VSOP-C184 zur Darstellung der Koronararterien wurde die gleiche Charge (050701) verwendet wie in der klinischen Verträglichkeitsstudie Phase I. Zur Kontrastierung wurde die Prüfsubstanz in der Idealdosis von 0,045 mmol Fe/kg verabreicht. Das Kontrastmittel wurde über einen antekubitalen intravenösen Zugang manuell als Bolus Injektion mit einer Flußrate von etwa 1 ml/s appliziert, gefolgt von einer Nachinjektion mit 20 ml Natriumchlorid (NaCl).

3.2 Klinische Verträglichkeitsstudie - Phase I

3.2.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Vor Beginn der Studie wurde das Studienprotokoll der unabhängigen Ethikkommission zur Begutachtung vorgelegt und durch diese als unbedenklich befunden. Die Studie wurde außerdem in Übereinstimmung mit den Richtlinien und der Deklaration von Helsinki und dem deutschen Arzneimittelgesetz durchgeführt. Außerdem entsprach die Verträglichkeitsstudie Phase I und Ib den Grundlagen der durch das ICH Harmonised Tripartite Guideline for Good Clinical Practice festgelegten „Good Clinical Practice Regulations“ (ICH-Topic E6).

Alle Probanden gaben vor Teilnahme an der Studie ihre freiwillige und schriftliche Einverständniserklärung.

Einschlusskriterien zur Teilnahme an der Studie waren:

- Männliche Probanden kaukasischer Rasse
- Alter zwischen 18 und 45 Jahren (J)
- Guter Gesundheitszustand nach Gesundheitscheck durch den Prüfarzt

Untersucht wurden durch diesen: Anamnese, körperliche Untersuchung, Vitalparameter, 12-Kanal-EKG, Laborparameter (HIV-Ab neg, HBs-Ab neg, HCV-Ab neg), negativer Alkohol-Atemtest, negativer Urintest (Cannabinoide, Benzodiazepine, Amphetamine, Kokain, Opiate)

- Zigarettenkonsum < 10 pro Tag
- Bodymassindex zwischen 18-33 kg/m²

Ausgeschlossen wurden Probanden, welche die Einschlusskriterien nicht erfüllten (s.o.) und aufgrund der Besonderheit der Prüfsubstanz, Personen mit einem gestörten Fe-Stoffwechsel.

Zur Untersuchung der Verträglichkeit und der pharmakokinetischen Eigenschaften des neuen MRT-Kontrastmittels wurde eine klinische Studie I an 18 gesunden männlichen Patienten durchgeführt.

Das Studienprotokoll basierte auf einer randomisierten, Placebo kontrollierten einseitig verblindeten Verträglichkeitsstudie. Dabei wurden die Probanden in 3 Gruppen unterteilt, in denen das Kontrastmittel in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert wurde. Jede Gruppe bestand aus 6 Probanden, von denen 5 das Kontrastmittel VSOP-C184 und einer das Placebo-Präparat erhielten.

Tabelle 3.1:		Studienablauf: n = 18 gesunde männliche Probanden; 3 Gruppen (A,B,C); pro Gruppe erhielten 5 der 6 Probanden die Prüfsubstanz, ein Proband erhielt Placebo							
	Einschluss	Studientag							
Tag	-21 bis -2	-1	1	2	3	4	8	14	
Einverständnis	X								
Demographische Werte (mit Gewicht, Größe)	X								
Vorgeschichte	X								
Klinische Untersuchung	X		X					X	
EKG									
- 12 Kanal	X		3	X				X	
- Langzeit			24 h						
- Telemetrie EKG			6 h						
Vitalfunktionen (BD, HF, Temperatur) ¹	X		7	X	X	X	X	X	
Sauerstoffsättigung ²			X						
Labor									
- Hämatologie, klinische Chemie, Urinanalyse	X		X	X			X	X	
- Serologie (HbsAg, anti-HCV, anti-HIV)	X								
- Transferrin (IFCC), Eisen (total), Ferritin, Eisenbindungskapazität ³	X		3	X	X	X	X	X	
- IgG, IgM, IgA, Komplement C3, Komplement C4, Proteinelektrophorese	X		X	X			X	X	
Urindrogenscreening, Alkoholatemtest	X	X							
Kinetik: Blutabnahmen ⁴			9	X					
Injektion des Prüfpräparates ⁵			X						
Kontrolle unerwünschter Wirkungen		X	X	X	X	X	X	X	
Ambulatorische Kontrollen	X				X	X	X	X	
Stationär: Tage			X						
Nächte		X	X						
¹ BD und HF: Vor Injektion, 20, 40, 60 min und 2h, 4h, 8h, 24h nach Injektion; Körpertemperatur vor Injektion, 60 min, 4h und 24h nach Injektion;									
² kontinuierlich, Beginn vor Injektion und bis 6 Stunden nach Injektion									
³ vor Injektion und nach 2, 4, 24 h (Studientag 2), 48 h (Studientag 3), und an den Studientagen 4, 8, 14									
⁴ Blutabnahmen für Eisenkonzentration und Relaxationszeiten: vor, 1, 2, 5, 15, 30, 45, 60 min, 4, 24 h, 2x 2 ml. Ende der Injektion = Zeitpunkt 0.									
⁵ Drei Dosisgruppen:		Gruppe A – 0.015 mmol Fe/kg – 0.03ml/ kg über ca. 10 min (ca. 2 ml/10 min), intravenöse Infusion							
		Gruppe B – 0.045 mmol Fe/kg – 0.09ml/ kg (ca. 1 ml/s) intravenöse Bolus Injektion							
		Gruppe C – 0.075 mmol Fe/kg – 0.15ml/ kg (ca. 1 ml/s) intravenöse Bolus Injektion							

3.2.2 Unerwünschte Nebenwirkungen

Mit der Aufzeichnung aufgetretener Nebenwirkungen (NW) wurde einen Tag vor Beginn der Studie begonnen und diese unabhängig von einem wahrscheinlichen oder unwahrscheinlichen Zusammenhang zwischen Substanz und aufgetretenen Symptomen über einen Zeitraum von 2 Wochen nach Applikation der Testsubstanz fortgeführt. Zu der Gruppe der unerwünschten Nebenwirkungen zählten die Änderung des körperlichen Empfindens und relevante Abweichungen des körperlichen Befundes bzw. Laborparameter zu den vor Studienbeginn erhobenen Befunden. Registrierte unerwünschte Nebenwirkungen wurden dann in „schwerwiegende“, „nicht schwerwiegende“, „behandlungsbedürftige“ und in „erwartete“ und „unerwartete“ unerwünschte Wirkungen unterteilt (siehe Tab. 4.1).

3.2.3 Körperliche Untersuchung, Vitalparameter, EKG und Oximetrie

Neben der Erfassung auftretender Nebenwirkungen wurden noch die körperliche Verfassung, Vitalzeichen, EKG und die Blutgaskonzentration zum Schutz des Probanden bestimmt.

3.2.3.1 Körperliche Untersuchung

Als Eingangsuntersuchung wurde eine sorgfältige, ausführliche körperliche Anamnese des Probanden erhoben. Die untersuchten Körperbereiche schlossen folgende Körperbereiche in die Untersuchung mit ein: Augen, Hals, Nase und Ohren, Herz, periphere Venen und Arterienstatus. Dazu wurde die Lunge auskultiert und perkutiert, der neurologische und psychische Status des Probanden erhoben. Zudem wurden das Abdomen, das Lymphsystem und die Haut untersucht.

3.2.3.2 Vitaparameter

Der systolische und diastolische Blutdruck wurden nach 5 min. in Rückenlage des Probanden, mittels automatisiertem oszillometrischem Verfahren erfasst. Hierbei kam das BOSO medicus PC System (BOSO GmbH, Jungingen, Deutschland) zum Einsatz. Die Untersuchung wurde nach 5 min. Ruhe in Rückenlage bestimmt.

3.2.3.3 EKG

Zur Erfassung der Herzaktionen wurden vollautomatische 12-Kanal-EKG-Geräte der Firma Marquette Hellige (MAC 3000, Marquette Hellige, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Die Herzaktionen wurden über 10 Sekunden bei einem Papiervorschub von 500 mm / Sek. nach 5 minütiger Pause in Rückenlage aufgezeichnet. Außerdem wurde nach der Applikation des Kontrastmittels ein 24-Stunden-Schulterhalter-EKG aufgezeichnet (Gerät: Clinical Information Center, CIC Software Version 1,5, Marquette Hellige, Freiburg, Deutschland). Ein/e geschulte(e) Arzt/Ärztin wertete das EKG aus und stufte es als normal oder auffällig ein. Die Herzfrequenz und EKG-Intervalle wie beispielsweise PQ, QRS, QT und QT_c (QT-Intervall nach der Bazett Formel an die Herzfrequenz angepasst) wurden automatisiert bestimmt.

3.2.3.4 Sauerstoffsättigung

Die Sauerstoffsättigung wurde anhand des Marquette-3000-Patienten-Monitors ermittelt (Marquette Hellige, Freiburg, Deutschland).

3.2.3.5 Laboruntersuchungen zur Probandenüberwachung

Im der Übersichtstabelle (siehe Tab. 3.1), die den Studienzeitplan der Probanden darstellt, können die Zeitpunkte der jeweiligen Blutentnahmen abgelesen werden. Diese wurden durch ein zertifiziertes Labor der klinischen Chemie (W+T, Berlin, Deutschland) auf Blutsalze, Hämatologie, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik hin untersucht.

3.2.3.6 Klinische Chemie

Folgende Parameter wurden aus der klinischen Chemie untersucht: Protein total, Albumin, Bilirubin total, Cholesterol, Triglyceride, Harnsäure, Harnstoff, Kreatinin, Glukose, ASAT, ALAT, alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase, Kreatininphosphokinase und Elektrolyte (Natrium, Kalium, Kalzium).

3.2.3.7 Hämatologie

Nachfolgende Blutbestandteile wurden aus dem Probandenserum bestimmt: rote Blutzellen, Leukozyten, Differenzialblutbild, Thombozyten, Hämoglobin, MCHC.

3.2.3.8 Urinuntersuchung

Der Urin wurde auf folgende Bestandteile hin untersucht: pH-Wert, Leukozyten, Nitrat, Protein, Glukose, Ketonkörper, Urobilinogen, Bilirubin, Blut, Urinsediment, und falls notwendig wurde auch die mikroskopische Untersuchung auf Blut, Zellen und Zylinder durchgeführt.

3.2.3.9 Pharmakodynamik

Die Auswirkung auf den Fe-Stoffwechsel wurde durch Registrierung der jeweiligen Transferrin-, Ferritinwerte und der totalen FE-Bindungskapazität über die Zeit bestimmt.

3.2.3.10 Pharmakokinetik

Zur quantitativen Bestimmung der Fe-Eisenkonzentration in Vollblut, Plasma und Serum wurden die Proben nach Auflösung in Salpetersäure in einem Atom Adsorptions-Spektrometer untersucht (Unicam 969 AA Spectrometer, Nicolet Instruments GmbH, Offenbach, Germany).

Alle Proben wurden, gemäß internationalen Standards zur relaxometrischen Messung, einem Magnetfeld von 0,94 T bei einer Protonen Resonanz Frequenz von 40 MHz und 39° Celsius ausgesetzt. Zur Messung wurde ein Bruker Minispec mq 40 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) benutzt.

Nach Einstellung der entsprechenden Delay-Zeiten, wurden die T₁-und T₂-Werte mit Hilfe von Standard-Inversion-Recovery- und Spinecho-Multiecho-Sequenzen des verwendeten Gerätes bestimmt. Danach wurde die HWZ auf 2 verschiedene Methoden ermittelt. Zum einen durch den direkten Abfall des Fe in den Proben, die über die Zeit abgenommen wurden, zum anderen durch den indirekten Abfall der T₁-und T₂-Werte in Vollblut, Plasma und Serum.

Mit Hilfe des Datenanalyse und Präsentationsprogramms DeltaGraph (DeltaGraph Professional 5.6, DeltaPoint INC, Monctrey, CA) wurden die ermittelten Daten verarbeitet.

Hierzu fand die folgende für die Berechnung der HWZ im Ein-Kompartiment-Modell bei Bolusgabe übliche Formel Verwendung, die an unsere Versuchsbedingungen angepasst wurde [59]:

$$c = c_0 * e^{(-k*t)} + c_p$$

c repräsentiert die ermittelte Konzentration in mg/ml bzw. die Relaxationszeit in 1/s zur Zeit (t) in Minuten. Die Ausgangskonzentration ist c₀ unmittelbar nach Zeitpunkt der Bolusgabe. Die HWZ ist zudem abhängig von der Eliminationskonstante k und der vor der Bolusgabe im Blut vorhandenen Fe-Konzentration, bzw. Relaxationszeit c_p.

Da sich bei der Betrachtung des Kurvenverlaufs der HWZ zeigte, dass sich die Werte nur die ersten vier Stunden nach Bolusgabe in klinisch relevantem Maße veränderten, wurde die Auswertung auf diesen Zeitbereich beschränkt.

Aus diesem Grunde wurde keine Eliminations-HWZ im pharmakokinetischen Sinne (Abfall der Konzentration auf den Normwert c) sondern eine funktionelle HWZ im klinisch relevanten Zeitfenster nach der folgenden Formel vorgenommen [59]:

$$t_{1/2} = \frac{(\ln 2)}{k}$$

3.2.3.11 Statistik

Diese Studie I hat explorativen Charakter und ist daher nicht primär auf eine statistische Aussage ausgerichtet.

Alle Ergebnisse der Probanden, die das Kontrastmittel appliziert bekamen, wurden der jeweiligen Dosisgruppe zugeteilt, separat in Tabellen gesammelt. Die entsprechenden Daten der Placebogruppe wurden zusammengefasst.

Alle der folgenden Variablen stehen für Mittelwert \pm Standardabweichung. Alle der vorgenommenen statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistik Paket SAS (Statistical Analysis System, SAS-Institute, Cary NC) durchgeführt.

3.3 Phase Ib - Erste klinische Wirksamkeitsprüfung für VSOP-C184 in der MR-Angiographie der Koronararterien

Da die bewegungsartefaktfreie Darstellung des Herzens und insbesondere des bewegten Herzens in der Magnetresonanztomographie eine messtechnische Herausforderung darstellt, wurde nach Abschluss der Phase I beschlossen, nicht direkt zur Phase II überzugehen. Zunächst sollte, nach Erfahrungen bei der Darstellung des Schweineherzens, in einer anschließenden Phase Ib Messparameter, Untersuchungstechniken und das Untersuchungsprotokoll auf den menschlichen Körper angepasst und optimiert werden.

3.3.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Die klinische Phase Ib wurde als offene Studie konzipiert, um die Wirksamkeit von VSOP-C184 in der klinisch verwertbaren Dosis an gesunden Probanden zu untersuchen und das Untersuchungsprotokoll zur Evaluierung der Koronararterien zu optimieren.

Das untersuchte Probandenkollektiv bestand aus 6 gesunden Probanden, die durch die Firma 3ClinicalResearch (Clinical Research Competence Center - Aktiengesellschaft für Therapeutische Forschung in Berlin und Brandenburg) in die Studie eingeschlossen wurden.

Das der Studie zugehörige Untersuchungsprotokoll - einschließlich Studienprotokoll und Aufklärungsbogen - wurde zuvor von der Ethikkommission begutachtet und von dieser zur Durchführung freigegeben. Die Patienten gaben vor Einschluss in die Studie ihr schriftliches und mündliches Einverständnis für die Teilnahme an der Studie und der damit verbundenen Prozeduren. Eine Übersicht über den Studienablauf ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

Das Kollektiv bestand ausnahmslos aus männlichen Probanden im Alter von durchschnittlich $30,3 \pm 6,0$ J.

Alle Teilnehmer wurden vor Beginn der Studie aufgeklärt und haben zuvor ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme gegeben.

Tabelle 3.2:		Tabellarische Übersicht über den Ablauf der klinischen Phase IB		
		Screening	Injektion der Studiensubstanz	Abschlussvisite
Tag		-14 bis -1	1	2
Aufklärung und Einwilligung		X		
Demographische Daten		X		
Anamneseerhebung		X		
Körperliche Untersuchung		X	X	X
EKG				
- 12 Kanal ¹		X		X
- 3 Kanal ²			X	
Vitalparameter (RR, HR, Körpertemperatur) ³		X	X	X
Oximetrie ⁴			X	X
Labor - Hämatologie, klinische Chemie, Urin - Serologie (HbsAg, anti-HCV, anti-HIV)		X	X	X
X				
Drogenscreening im Urin, Alkohol- atemtest		X		
Studienmediation ⁵			X	
MR-Untersuchung ⁶			X	
Erfassung unerwünschter Wirkungen			X	X
Ambulante Visite ⁷		X	X	X
¹ EKG mit Dokumentation:	innerhalb des Screening (Tag –14 bis –1), 24 h nach Injektion der Studienmedikation (Tag 2)			
² EKG ohne Dokumentation:	während MR-Untersuchung und Injektion der Studienmedikation (innerhalb des MR-Gerätes)			
³ RR und HF:	prä, 1, 5, 15, 30 min (innerhalb des MRT), 1 h, 24 h (außerhalb des MR-Gerätes) nach Injektion der Studienmedikation;			
³ Körpertemperatur:	prä, 1 h, 24 h nach Injektion der Studienmedikation (außerhalb des MR-Gerätes);			
⁴ Oximetrie:	prä, 1, 5, 15, 30 min (innerhalb des MRT), 1 h, 24 h (außerhalb des MR-Gerätes) nach Injektion der Studienmedikation;			
⁵ Injektion:	Dosis 0,045 mmol Fe/kg, Injektion innerhalb des MR-Gerätes als Bolus mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 ml/s;			
⁶ MR-Untersuchung:	Untersuchungsdauer vor Kontrastmittelgabe etwa 30 min, Injektion der Studienmedikation, Untersuchungsdauer nach Kontrastmittelgabe etwa 45 min;			
⁷ ambulante Visite am Studientag 2:	aus Sicherheitsgründen wurden alle Probanden bis 4 h nach Injektion der Studienmedikation kontinuierlich am Studienzentrum beobachtet .			

3.3.2 Ausschlusskriterien

Vor Einschluss der Probanden in die Studie wurden die Personen auf ihre körperliche Verfassung hin überprüft und freiwillig einem Betäubungsmitteltest unterzogen.

Zum Ausschluss aus der Studie führten die üblichen Kontraindikationen einer MR-Untersuchung:

Absolute Kontraindikationen:

- Herzschrittmacher, Defibrillator
- Künstliche Herzklappe vom Typ Starr-Edwards
- Swan-Ganz Katheder
- OP Clips nach Gefäß- oder neurochirurgischer OP
- Insulinpumpen
- Metallsplitter (Kriegs- und Arbeitsverletzungen)
- Ohrimplantate
- Schwere Ruhedyspnoe und instabiler Zustand
- Schwangerschaft bis Ende des 3. Monats

Relative Kontraindikationen:

- Klaustrophobie
- Adipositas per magna

3.4 *Untersuchungsgerät und verwendetes Messprotokoll*

3.4.1 Hardware und Datenaufnahme

Alle Messungen wurden bei 1,5 T an einem Ganzkörper-MR-Tomographen (Symphony Quantum, Siemens AG, Erlangen, Germany) mit einer 4 Kanal Body-Phased-Array-Spule durchgeführt (Numaris VA 15 A).

Die Patienten wurden zur EKG Anlage mit dem Rücken auf dem Untersuchungstisch mit dem Kopf voran zur Untersuchung im Untersuchungstunnel platziert.

Das zur Synchronisierung und Triggerung der MR-Signale für die MR-Angiographie Sequenzen notwendige EKG Signal wurde durch ein aktives 3 Kanal Ableitungssystem (mit drei präpektoral platzierten Elektroden) erfasst.

Zur Messung wurden bei allen Probanden eine native und eine kontrastmittelgestützte MR-Angiographie der Koronararterien durchgeführt. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die wesentlichen Sequenzparameter der verwendeten Untersuchungstechniken.

In der nativen Sequenz wurde das in der Bildgebung der Hirnarterien verwendete TOF-Verfahren genutzt, welches sich den Einflusseffekt ungesättigten Blutes in das angeregte Untersuchungsvolumen zu nutze macht.

Bei der kontrastmittelgestützten Messung wurde die bei Inversionspräparation mit entsprechender Inversionsverzögerung TI resultierende Verkürzung der T1-Relaxationszeit des Blutes zur Kontrastierung der Gefäße genutzt.

Tabelle 3.3:	Relevante Parameter der Atemstopp- und Navigator Sequenzen	
	Atemstopp	Navigator
Repetitionszeit [ms]	4,5	5,5
Echozeit [ms]	1,6-2,2	1,6-2,2
Anregungswinkel	15°	15°
FOV [mm]	200-250 x 300-360	180-200 x 200-300
Matrix	256 x 144-200	256 x 176-256
Schichtzahl	16	20 48 – 104*
Schichtdicke [mm]	2, interpoliert auf 1,5	2 interpoliert auf 1-1,2
Pixeldim. (in der Schicht) [mm]	1,2 – 1,4 x 1,2 – 1,4	0,8 – 1,2 x 0,8 – 1,2
Segmente pro RR-Zyklus	29-39	15-27
Akquisitionszeit [min/s]	0/20 – 0/29	2/30 – 7/22

3.4.2 Lokalisationsscans und Datenakquisition

Zu Beginn der Messung wurde mit einer EKG getriggerten black-blood half-fournier single-shot-turbo-spinecho Sequenz (HASTE) in axialer und koronarer Orientierung die Lokalisation des Herzens vorgenommen und die grobe Lage der Koronararterien bestimmt. Danach wurden die Koronararterien in 3-4 verschiedenen Höhen mittels retrospektiv getriggelter Cine-True-FISP Sequenzen zur Bestimmung der Lage und der Bewegung abgebildet. Anschließend wurde auf Basis von CINE-Sequenzen der Zeitpunkt innerhalb des RR-Zyklusses bestimmt, in dem sich die Koronararterien am wenigsten bewegen, um eine optimale Bildqualität zu erreichen. Diese wurden dann mit der herstellerseitig in der Messsoftware implementierten 3-Punkt Positionierungsmethode wie folgend festgelegt: ein schmales 3D Volumen entlang der rechten Koronararterie (RCA) und ein zweites 3D Volumen entlang des Hauptstammes der linken Koronararterie mit möglichst langstreckiger Erfassung der „left anterior descending“ (LAD) und der „left circumflexus artery“ (LCX). Darauf folgte eine native TOF Atemstopp 3D Gradientenecho Sequenz (3D-FLASH) mit 16 Schichten, dann eine weitere TOF Navigator 3D-FLASH mit 20 Schichten.

Nach Injektion von VSOP-C184 wurde etwa 2 min vor Start der nächsten Messung gewartet, damit sich das Kontrastmittel intravasal homogen verteilen und sich ein intravasales Equilibrium einstellen konnte. Dann folgte die kontrastmittelverstärkte Atemstopp IR 3D-FLASH mit 16 Schichten, danach je Proband eine kontrastmittelverstärkte navigatorgestützte IR 3D-FLASH mit 48 bis 104 Schichten in schräg koronarer oder axialer Orientierung zur möglichst vollständigen Erfassung des Koronararteriensystems. Die Anzahl der Schichten und die damit verbundene z.T. erhebliche Navigator-Messzeit richtete sich nach der zu erwartenden Compliance des Probanden, dessen Atemverhalten (und des resultierenden Navigatorsignals) sowie Anatomie des untersuchten Herzens. Abschließend wurden die zwei o.g. Atemstopp IR 3D-FLASH Sequenzen wiederholt.

Das Zeitfenster der Bildgebung aller Sequenzen überschreitet hierbei nicht 112 ms pro RR-Zyklus.

Die Atemstopp-Sequenzen wurden vor und nach Gabe von VSOP-C184 in derselben Schichtorientierung und -winkelung vorgenommen. Dagegen wurden in den Navigator-Sequenzen-Schichtposition und Schichtorientierung vor Kontrastmittelapplikation in möglichst schmalen und gezielt auf die Koronararterien angepassten 3D-Volumina eingestellt. Die Post-KM-Sequenzen wurden dann jedoch volumendeckend zur Abbildung gebracht.

Atemstopp-Sequenzen wurden während einer endexpiratorischen, die Navigator gestützten Sequenzen während des endexpiratorischen Plateaus gemessen.

Es wurde in keiner der Messungen ein Normalisierungsfiter zum Ausgleich des veränderlichen Signalintensitätsprofles bei Einsatz von Körper-Phased-Array-Spulen verwendet. Für die Atemstopp und Navigator IR 3D-FLASH Sequenzen wurde als TI-Wert 360 ms gewählt. Dieser Wert wurde in früheren tierexperimentellen Studien als optimal für eine signalarme Darstellung des Myokards in inversionspräparierten Sequenzen nach intravenöser Injektion von VSOP-C184 ermittelt.

3.4.3 Datenauswertung

Die Bildauswertung wurde quantitativ und qualitativ an der rechten Koronararterie vorgenommen, weil diese am häufigsten in der nativen und in der Post-KM-Messung, sowohl in Atemstopp- als auch in der Navigator-Sequenz, längerstreckig abgebildet war.

Als Maß für den Kontrast zwischen Koronararterie und deren Umgebung in der quantitativen Messung wurde das Signaldifferenz zu Rausch Verhältnis (SD/R) bestimmt. Diese Messungen wurden abgangsnah in der Mitte der Koronararterie und in einem distalen Anteil des Gefäßes durchgeführt. Für die Berechnung von SD/R ($SD/R = (SI_{Gefäß} - SI_{Umgebung}) / SI_{Rauschen}$) wurden in Einzelschichten die Signalintensitäten mittels Region-Of-Interest-Messungen (ROI-Messungen) im Lumen der Arterie ($SI_{Gefäß}$), in deren unmittelbarer Umgebung ($SI_{Umgebung}$), und das Hinderrundrauschen außerhalb des Körpers bestimmt.

Um die Konturschärfe der Koronararterie zu bestimmen, wurde das Verfahren der Vessel-Edge-Definition (VED) angewendet [60]. Dazu wurden an den drei oben beschriebenen Lokalisationen der rechten Koronararterie jeweils fünf Signalintensitätsprofile senkrecht zur Koronararterie ermittelt und hieraus die VED als maximale Steige-

nung in SI Einheiten pro Millimeter am Übergang des Gefäßes zur Umgebung berechnet. Aus den jeweils 10 Werten einer Sequenz wurden Mittelwerte getrennt für das proximale sowie das mittlere Drittel der rechten Koronararterie errechnet. Zudem wurden als qualitative Parameter der Durchmesser der rechten Koronararterie 1 cm von deren Ursprung sowie die Länge der RCA bestimmt.

Zur qualitativen Auswertung wurden folgende fünf Parameter ausgewertet:

1. Allgemeine Bildqualität
2. Kontinuität der Koronararterie
3. Homogenität des intravaskulären Signals
4. Kontrast zwischen Koronararterie und unmittelbarer Umgebung
5. Erkennbarkeit von Abgängen

Die Bildqualität beinhaltet das allgemeine Signalniveau, die Homogenität der Signalintensitätsverteilung, Bewegungsartefakte und die Konturschärfe der anatomischen Strukturen. Als Maß der Qualität konnte hier ebenso wie bei den Punkten 3 und 4 folgendes angegeben werden:

- 0 - nicht bzw. unzureichend auswertbar
- 1 - moderat
- 2 - gut
- 3 - exzellent

Die Qualität der Kontinuität der Koronararterie wurde wie folgend beschrieben:

- 0 – Koronararterie nicht erkennbar
- 1 – proximales Drittel dargestellt
- 2 – proximales und mittleres Drittel dargestellt
- 3 – gesamte Koronararterie bis einschließlich distales Drittel kontinuierlich dargestellt

Die Erkennbarkeit von Abgängen wurde wie folgend beurteilt:

0 – keine Abgänge erkennbar

1 – Abgänge Erkennbar

Außerdem wurde bei der qualitativen Auswertung erfasst, inwiefern in einer Messung innerhalb der verschiedenen Sequenzen mehrere Koronararterien erfasst werden konnten.

Zur Auswertung der Parameter SD/R, VED und Gefäßdurchmesser kam folgende Software zum Einsatz: NIH-Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Die Bestimmung der Gefäßlänge sowie die qualitative Auswertung erfolgten an einer diagnostischen Workstation (MagicView, Siemens, Erlangen, Germany).

Die dreidimensionalen Rekonstruktionen wurden an der Vitrea2 Workstation 3.7.0.2 (Vital Images, Minnetonka, Minnesota) angefertigt.

3.4.4 Unerwünschte Wirkungen, Sicherheit und Verträglichkeit

Neben den Parametern zur Wirksamkeitsprüfung wurden zusätzlich Daten zur Sicherheit und Verträglichkeit der intravenösen Injektion von VSOP-C184 erhoben. Dabei wurden unter anderem berücksichtigt:

1. unerwünschte Wirkungen
2. Ergebnisse der körperlichen Untersuchung
3. Vitalparameter
4. EKG und Oximetrie
5. klinische Chemie
6. Hämatologie und Urinanalyse

Die Untersuchungen wurden dabei bezüglich Datenerhebung und Datenauswertung identisch zu denen der Phase I erhoben (Siehe Kap. 3.2.2/3.2.3), wobei jedoch weniger Zeitpunkte zur Bestimmung der Daten geplant waren. Zudem wurden in der Phase Ib Pharmakodynamik und Pharmakokinetik nicht untersucht.

3.4.5 Statistik

Es wurde geprüft, ob für die Wirksamkeitsparameter SD/R, VED und dem qualitativen Score, ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Untersuchungstechniken bzw. der nativen und der Kontrastmittel-Untersuchung bestanden haben. Dazu wurde der Wilcoxon Test für abhängige Größen eingesetzt.

Für die Daten der Probandensicherheit wurde eine deskriptive Statistik durchgeführt und alle Ergebnisse tabellarisch erfasst. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Software Paketes SAS (Statistical Analysis System, SAS-Institute, Cary NC, USA) durchgeführt.