

**Ein neues Kontrastmittel für die MRT auf der Basis
Citrat-stabilisierter magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel:
Wirkstofffindung, präklinische Entwicklung
und klinische Prüfung**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Diagnostische Radiologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dipl. Phys. Dr. med. Matthias Taupitz
geboren am 18.8.1959 in Saarbrücken

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht am: 15. Oktober 2004

Habilitationsdatum: 11. Juli 2005

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Michael Laniado
2. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Wolfhard Semmler

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Superparamagnetische Eisenoxid-Partikel als Kontrastmittel für MR-Tomographie und Therapie	5
2.1	Einleitung	5
2.2	Partikelarten und –eigenschaften	6
2.2.1	Terminologie	6
2.2.2	Zusammensetzung, Biodegradation	6
2.2.3	Relaxationsverstärkende Eigenschaften: T ₂ -Effekt versus T ₁ -Effekt	7
2.3	SPIO als Kontrastmittel für Organe des Mononukleären Phagozytierenden Systems	10
2.3.1	Leber und Milz	10
2.3.2	Lymphknoten	12
2.3.3	Knochenmark	13
2.3.4	Andere MPS-bezogene Anwendungen von SPIO	13
2.4	Gefäßdiagnostik mit SPIO: MR-Angiographie, Plaquecharakterisierung, Thrombosedagnostik, Perfusionsstudien	14
2.4.1	Kontrastverstärkte MR-Angiographie	14
2.4.2	Charakterisierung atherosklerotischer Plaques	16
2.4.3	Weitere vaskuläre Anwendungen von SPIO	17
2.4.4	Perfusionsstudien	17
2.5	Rezeptor- und Antikörper-vermittelte Kontrastierung, Zellmarkierung	19
2.5.1	Rezeptor-vermittelte Kontrastierung	19
2.5.2	Antikörper-vermittelte Kontrastierung	20
2.5.3	Magnetische Zellmarkierung	20
2.6	Magen-Darm Kontrastierung	21
2.7	SPIO in der Therapie: Drug Carrier, Hyperthermie	21
2.7.1	SPIO als Drug Carrier, Gentherapie	21
2.7.2	SPIO in der Hyperthermie	22
2.8	Aufbau, Herstellung, physikalische Eigenschaften magnetischer Eisenoxid-Partikel	22
2.8.1	Aufbau magnetischer Eisenoxid-Partikel	22

2.8.2	Physikalische Eigenschaften magnetischer Eisenoxid-Partikel	25
2.8.3	Herstellungswege	26
3	Entwicklung von VSOP als Kontrastmittel für die MRT: Organisation des Projektes, regulatorische Aspekte, Wirkstofffindung	29
3.1	Organisation des Gesamtprojektes	29
3.2	Regulatorische Aspekte der Arzneimittelentwicklung für das Kontrastmittel VSOP	30
3.3	Grundlegende Eigenschaften der neuen Substanzgruppe VSOP	32
3.4	Anforderungen an ein VSOP-basiertes Kontrastmittel für die MR-Angiographie	34
3.5	Iterative Optimierung von VSOP als Blut-Pool Kontrastmittel für die MRT	35
3.5.1	Altersabhängigkeit der Bluthalbwertszeit: Untersuchungen mit VSOP-C42 an Ratten	38
3.5.2	Erste experimentelle Untersuchung zur Wirksamkeit: Ergebnisse mit VSOP-C63 an Ratten und Kaninchen	38
3.6	Entwicklungskandidat VSOP-C184 im Vergleich zu exemplarischen Vorstufen: Physikalisch-chemische Daten	40
3.6.1	Präklinische Charakterisierung	40
3.6.2	Klinisches Prüfpräparat	41
4	Experimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von VSOP	44
4.1	Einleitung	44
4.2	Allgemeine Angaben zu den experimentellen Untersuchungen	44
4.2.1	Messung von T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten	44
4.2.2	Größenbestimmung der Eisenoxid-Partikel	45
4.2.3	Allgemeine Angaben zu Tieren und Narkose	45
4.2.3.1	Anästhesie der Ratten	46
4.2.3.2	Anästhesie der Kaninchen	46
4.2.3.3	Anästhesie der Minischweine	46
4.2.4	Quantitative Eisenbestimmung	47
4.2.5	MR-Tomographie	47

4.3	VSOP-C91 als Blut-Pool Kontrastmittel für die Equilibrium MR-Angiographie der Koronararterien	49
4.3.1	Einleitung	49
4.3.2	Material und Methoden	50
4.3.2.1	Tiere und Narkose	50
4.3.2.2	Kontrastmittel und Dosierungen	50
4.3.2.3	MR-Tomographie	50
4.3.2.4	Auswertung	51
4.3.3	Ergebnisse	53
4.4	Wirksamkeit von VSOP-C184 in der First-Pass MR-Angiographie der Aorta und Nierenarterien	59
4.4.1	Einleitung	59
4.4.2	Material und Methoden	60
4.4.2.1	Tiere und Narkose	60
4.4.2.2	Kontrastmittel und Dosierungen	60
4.4.2.3	MR-Tomographie	61
4.4.2.4	Auswertung	61
4.4.3	Ergebnisse	63
4.5	MRT fokaler Leberläsionen: Experimenteller Vergleich von VSOP-C184 mit Gadopentetat Dimeglumin und Ferucarbotran in T ₁ -gewichteter dynamischer und T ₂ -gewichteter später Bildgebung	68
4.5.1	Einleitung	68
4.5.2	Material und Methoden	69
4.5.2.1	Tiere und Narkose	69
4.5.2.2	Kontrastmittel und Dosierungen	69
4.5.2.3	MR-Tomographie	70
4.5.2.4	Auswertung	71
4.5.3	Ergebnisse	71
4.5.3.1	T ₁ -gewichtete dynamische Bildgebung	71
4.5.3.2	T ₂ -gewichtete späte Bildgebung	76
4.6	Entwicklungskandidat für die klinische Prüfung VSOP-C184: Präklinische Charakterisierung – Toxikologie und Wirksamkeit	81
4.6.1	Einleitung	81
4.6.2	Material und Methoden	82
4.6.2.1	Prüfsubstanz und Dosierungen	82
4.6.2.2	Pharmakokinetik	82
4.6.2.2.1	Plasma-Pharmakokinetik	82

4.6.2.2.2	Eisengehalt in Leber, Milz und Restkörper	83
4.6.2.3	Wirksamkeit in der MR-Tomographie	84
4.6.2.3.1	Intravaskuläres Signalverhalten an der Ratte	84
4.6.2.3.2	MR-Angiographie der Koronararterien am Schwein	84
4.6.2.4	Sicherheitspharmakologie und Toxikologie	84
4.6.2.4.1	Einfluss auf die kardiovaskuläre Physiologie am Schwein	84
4.6.2.4.2	Akute Verträglichkeit nach Einmalgabe an Maus und Ratte	84
4.6.2.4.3	Verträglichkeit nach wiederholter Gabe an Ratte und Schwein	85
4.6.2.4.4	Untersuchung der lokalen Verträglichkeit an Kaninchen	85
4.6.2.4.5	Einfluss auf die Salurese und Diurese an der Ratte	86
4.6.2.4.6	Einfluss auf die Spontanmotilität an der Maus	86
4.6.2.4.7	Genotoxizität	86
4.6.2.5	Statistik	87
4.6.3	Ergebnisse	87
4.6.3.1	Pharmakokinetik	87
4.6.3.1.1	Plasmapharmakokinetik	87
4.6.3.1.2	Eisengehalt von Leber und Milz	87
4.6.3.2	Wirksamkeit in der MR-Tomographie	93
4.6.3.2.1	Intravaskuläre Signalverstärkung an der Ratte	93
4.6.3.2.2	MR-Angiographie der Koronararterien am Schwein	95
4.6.3.3	Sicherheitspharmakologie und Toxikologie	96
4.6.3.3.1	Einfluss auf die kardiovaskuläre Physiologie am Schwein	96
4.6.3.3.2	Akute Verträglichkeit nach Einmalgabe an Maus und Ratte	96
4.6.3.3.3	Verträglichkeit nach wiederholter Gabe an Ratte und Schwein	97
4.6.3.3.4	Untersuchung der lokalen Verträglichkeit am Kaninchen	97
4.6.3.3.5	Einfluss auf die Salurese und Diurese an der Ratte	98
4.6.3.3.6	Einfluss auf die Spontanmotilität an der Maus	98
4.6.3.3.7	Genotoxizität	98
4.7	Diskussion zum experimentellen Teil	98
4.7.1	VSOP-C91: Equilibrium MR-Angiographie der Koronararterien	98
4.7.2	VSOP-C184: First-Pass MR-Angiographie der Aorta und Nierenarterien	103
4.7.3	VSOP-C184: MR-Tomographie fokaler Leberläsionen	107
4.7.4	VSOP-C184: Präklinische Charakterisierung	111

5	Klinische Untersuchungen mit VSOP-C184 an gesunden Probanden: Erste Ergebnisse zur Verträglichkeit und zur Wirksamkeit als Kontrastmittel für die MR-Angiographie der Koronararterien	115
5.1	Einleitung	115
5.1.1	Begründung für die Durchführung der ersten klinischen Prüfungen mit VSOP-C184	115
5.1.2	Allgemeine Angaben zur Organisation der klinischen Prüfungen	116
5.2	Klinische Phase I (Verträglichkeit, Sicherheit, Pharmakokinetik, Blutrelaxometrie)	118
5.2.1	Material und Methoden	118
5.2.1.1	Prüfsubstanz, Dosierungen und Applikation	118
5.2.1.2	Studiendesign und Probanden	118
5.2.1.3	Sicherheitspharmakologie	119
5.2.1.3.1	Unerwünschte Wirkungen	119
5.2.1.3.2	Körperliche Untersuchung, Vitalparameter, EKG und Oximetrie	121
5.2.1.3.3	Laboruntersuchungen	121
5.2.1.4	Pharmakodynamik	122
5.2.1.5	Pharmakokinetik	122
5.2.1.6	Statistik	123
5.2.2	Ergebnisse	123
5.2.2.1	Demographische Daten	123
5.2.2.2	Sicherheitspharmakologie	123
5.2.2.2.1	Unerwünschte Wirkungen	123
5.2.2.2.2	Körperliche Untersuchung, Vitalparameter, EKG und Oximetrie	124
5.2.2.2.3	Laboruntersuchungen	126
5.2.2.3	Pharmakodynamik	126
5.2.2.4	Pharmakokinetik	128
5.3	Klinische Phase IB: Erste Wirksamkeitsprüfung für VSOP-C184 in der MR-Angiographie der Koronararterien	137
5.3.1	Material und Methoden	137
5.3.1.1	Prüfsubstanz, Dosierung und Applikation	137
5.3.1.2	Studiendesign und Probanden	137
5.3.1.3	MR-Tomographie	138
5.3.1.3.1	Datenaufnahme	138
5.3.1.3.2	Datenauswertung	141

5.3.1.4	Unerwünschte Wirkungen, Sicherheit und Verträglichkeit	142
5.3.1.5	Statistik	143
5.3.2	Ergebnisse	143
5.3.2.1	MR-Tomographie	143
5.3.2.1.1	Quantitative Auswertung	144
5.3.2.1.2	Qualitative Auswertung	148
5.3.2.2	Unerwünschte Wirkungen, Sicherheit und Verträglichkeit	149
5.4	Diskussion zu den klinischen Prüfungen der Phase I und IB	151
5.4.1	Klinische Phase I (Verträglichkeit, Sicherheit, Pharmakokinetik, Blutrelaxometrie)	151
5.4.2	Klinische Phase IB: Erste Wirksamkeitsprüfung für VSOP-C184 in der MR-Angiographie der Koronararterien	155
6	Zusammenfassung	159
6.1	Einleitung und Problemstellung	159
6.2	Wirkstofffindung, präklinische Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfung	160
6.2.1	VSOP-C91: Equilibrium MR-Angiographie der Koronararterien	161
6.2.2	VSOP-C184: First-Pass MR-Angiographie der Aorta und Nierenarterien	162
6.2.3	VSOP-C184: MR-tomographische Darstellung von Lebertumoren	163
6.2.4	VSOP-C184: Präklinische Charakterisierung	164
6.3	Klinische Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfung (klinische Phase I und IB)	165
6.3.1	Klinische Phase I: Verträglichkeitsprüfung an gesunden Probanden	165
6.3.2	Klinische Phase IB: Wirksamkeit in der MR-Angiographie der Koronararterien	166
6.4	Schlussfolgerung	166
7	Literatur	168
8	Abkürzungsverzeichnis	187
9	Danksagung	189
10	Erklärung	192

9 Danksagung

Das hier beschriebene Projekt der Entwicklung eines Kontrastmittels für die MR-Tomographie auf der Basis neuartiger superparamagnetischer Eisenoxid-Partikel von der Wirkstofffindung über die experimentelle Wirksamkeitsprüfung, die präklinische Charakterisierung bis zur ersten klinischen Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfung stellt ein umfangreiches Vorhaben dar, zu dessen bisherigem Gelingen zahlreiche Beteiligte beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. med. B. Hamm, Direktor des Institutes für Radiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, herzlich danken. Herr Prof. Hamm hat das Projekt von Anbeginn mit großem Interesse begleitet und durch zahlreiche Diskussionen wichtige Beiträge inhaltlicher und organisatorischer Art für das Gelingen des Projektes geleistet. Des Weiteren gebührt Herrn Prof. Hamm Dank für die Unterstützung bei der Einrichtung der experimentell-radiologischen Arbeitsgruppe am Institut für Radiologie. Hierdurch wurden die räumlichen, gerätetechnischen und auch personellen Voraussetzungen geschaffen, um ein solches Projekt in Angriff nehmen zu können.

Ohne die Zusammenarbeit mit Herrn Dipl. Chem. Dr. rer. nat. H. Pilgrimm wäre das Projekt nicht möglich gewesen. Herr Dr. Pilgrimm ist ein herausragender Fachmann auf dem Gebiet der sogenannten Ferrofluide, hatte die Idee für dieses neuartige Kontrastmittel auf der Basis sehr kleiner Citrat-beschichteter superparamagnetischer Eisenoxid-Partikel und führte im engen Dialog mit der eigenen Gruppe während des gesamten Projektes im Rahmen der Substanzoptimierung die Synthese zahlloser Formulierungen bis hin zum klinischen Prüfmuster durch. Somit möchte ich dem Umstand danken, gemeinsam mit Herrn Dr. Pilgrimm dieses umfangreiche Vorhaben begonnen und durchgeführt haben zu können. Herrn Dr. Pilgrimm möchte ich des Weiteren für das Vertrauen in die Kompetenz der eigenen Arbeitsgruppe bezüglich der präklinischen und klinischen pharmakologischen und MR-spezifischen Entwicklung unter Berücksichtigung der klinischen Erfordernisse danken. Schließlich danke ich Herrn Dr. Pilgrimm für die zahlreichen und aufschlussreichen Gespräche und Diskussionen zum Thema Eisenoxid-Partikel.

Den Mitarbeitern des experimentell-radiologischen Labores am Institut für Radiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, danke ich für die Mitarbeit an dem hier beschriebenen Projekt. Ihr Einsatz und Interesse an dem Vorhaben gingen weit über das durch das jeweilige Anstellungsverhältnis zu erwartende Maß hinaus. Hier ist allen voran Herr Dr. med. vet. Jörg Schnorr zu nennen, der seit der ersten Stunde in

diesem Vorhaben mitgearbeitet hat und im weiteren Verlauf als Laborleiter maßgeblich an der Planung, sowie auch der Koordinierung, Leitung und Auswertung der einzelnen Projektschritte beteiligt war. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Dr. med. vet. Claudia Abramjuk, Frau Dr. med. vet. Gerlind Claaßen, Frau Dr. med. vet. Ines Wojner, Frau Dr. med. vet. Randi Drees, Frau Nicola Kaufels, Herrn Ronny Korn und Herrn Lasse Krug herzlich danken.

Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Ebert und Frau Claudia Heyer (beide Schering AG, Berlin) danke ich, da sie in der Anfangsphase des Projektes in unkomplizierter Weise die ersten VSOP-Varianten am 0,47 T Relaxometer der Firma Schering untersucht haben.

Das beschriebene Projekt hatte ein konkretes Ziel, nämlich die Verbesserung der MR-tomographischen Gefäßdiagnostik, insbesondere der Darstellung der Koronararterien. Daher möchte ich auch meinen klinischen Kollegen für zahlreiche anregende Diskussionen zum Stellenwert verschiedener neuer diagnostischer Verfahren auf diesem Gebiet und der Perspektive der eigenen Entwicklung danken. Hier seien Herr Dr. med. Dietmar Kivelitz, Herr Dr. med. Patrik Rogalla, Herr Dr. med. Marc Dewey und Herr Dr. med. Michael Laule genannt.

Die MR-tomographische Darstellung des Herzens ist technisch anspruchsvoll. Insbesondere für die Durchführung der präklinischen und klinischen Wirksamkeitsstudien zur MR-Angiographie der Koronararterien waren zahlreiche Diskssionen und Vorschläge zu Detailverbesserungen der Untersuchungstechnik wertvoll. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. Gerhard Laub (Siemens AG, Erlangen) und Herrn Dr. rer. nat. Carsten Warmuth aus der eigenen Arbeitsgruppe.

Der klinische Teil dieses Projektes wurde in Zusammenarbeit der eigenen Arbeitsgruppe mit einem Auftragsforschungsinstitut realisiert. Daher möchte ich allen Mitarbeitern dieses Institutes (3ClinicalResearch, Berlin), die in das Projekt involviert waren, für ihr Engagement und Interesse an dem Vorhaben danken. Stellvertretend seien hier Frau Dr. Irina Kravic, Frau Dr. Henrike Bergmann-Fritsch und Herr Dr. Bernd Rosenkranz genannt.

Frau Dipl. Stat. Tania Schink vom Institut für Medizinische Biometrie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, danke ich herzlich für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten einiger der Versuchsabschnitte.

Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots (Direktor des Institutes für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte) möchte ich danken, da er nach Abschluss der präklinischen Phase in Diskussionen und durch Ratschläge wichtige Hinweise für das weitere Vorgehen und die Planung der ersten klinischen Prüfung mit VSOP-C184 gegeben hat.

Des Weiteren danke ich für zahlreiche, anregende Diskussionen zu diesem Thema in seiner Eigenschaft als Experte auf dem Gebiet der Kontrastmittelforschung Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Speck.

Teile der hier vorgelegten Arbeit bilden Bestandteile von drei Promotionsarbeiten. Die abgeschlossene Promotionsarbeit von Frau Dr. med. vet. Claudia Abramjuk umfasst Teile der frühen präklinischen Entwicklung von VSOP. Die noch nicht abgeschlossene Promotionsarbeit von Herrn Ronny Korn beschäftigt sich mit der experimentellen Prüfung von VSOP-C184 in der MR-tomographischen Darstellung von Lebertumoren. Die noch nicht abgeschlossene Promotionsarbeit von Herrn Lasse Krug hat die klinische Verträglichkeits- und erste Wirksamkeitsstudie zum Thema.

Letzendlich möchte ich meiner Ehefrau, Dr. med. vet. Susanne Wagner, ganz besonders danken. Ihre fundiertes Wissen bezüglich pharmakologischer Entwicklung, ihre umfassenden Kenntnisse zum Thema Eisenoxid-Partikel und ihre Zielstrebigkeit in diesem Projekt waren unentbehrlich für das bisherige Gelingen dieses komplexen Vorhabens und damit auch der hier vorgelegten Arbeit.

10 Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift