

4 Experimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit und Verträglichkeit von VSOP

4.1 *Einleitung*

Im Rahmen der Substanzoptimierung auf der Basis der elektrostatisch stabilisierten, Citrat-beschichteten VSOP wurden zahlreiche präklinische Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfungen durchgeführt, von denen ein großer Teil orientierenden Charakter hatte (Kapitel 3.5). An dieser Stelle werden exemplarisch insgesamt vier ausführliche experimentelle Studien aus dieser präklinischen Optimierungsphase beschrieben. Hiervon betrifft die erste Studie die Prüfung der Wirksamkeit von VSOP-C91, einer Vorstufe der Entwicklung der endgültigen Substanz VSOP-C184, als Kontrastmittel für die Equilibrium MR-Angiographie der Koronararterien (Kapitel 4.3). Die zweite Studie wurde mit der endgültigen Formulierung VSOP-C184 zur Prüfung der Eignung der Substanz als Kontrastmittel für die First-Pass MR-Angiographie durchgeführt (Kapitel 4.4). Die dritte Studie befasst sich mit der Frage, ob ein solches Kontrastmittel auch für die Diagnostik der Leber geeignet ist. Diese Anwendung stellt die klassische Indikation von Eisenoxid-Partikeln in der MR-Diagnostik dar (Kapitel 4.5). Im letzten Abschnitt des experimentellen Teiles wird schließlich die präklinische Charakterisierung bezüglich Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Sicherheitspharmakologie und Toxikologie sowie bezüglich Wirksamkeitsparameter, wie sie für die geplante Anwendung als MR-Kontrastmittel relevant sind, beschrieben (Kapitel 4.6). Dieser letztgenannte Abschnitt wurde entsprechend GLP-Richtlinien durchgeführt und umfasste den notwendigen Satz von Parametern, auf dessen Basis bei positivem Ergebnis eine klinische Phase I und II durchgeführt werden kann (vergleiche Kapitel 3.2). Da in den vier experimentellen Studien zahlreiche methodische Aspekte identisch sind, werden im ersten Unterkapitel die mehrfach verwendeten Geräte und Methoden gesammelt dargestellt (Kapitel 4.2). Die Diskussion zu den vier experimentellen Abschnitten wird geschlossen in Kapitel 4.7 geführt.

4.2 *Allgemeine Angaben zu den experimentellen Untersuchungen*

4.2.1 *Messung von T₁- und T₂-Relaxationszeiten*

Die Messungen von T₁- und T₂-Relaxationszeiten, z.B. zur Bestimmung von T₁- und T₂-Relaxivitäten oder für die Bestimmung der Pharmakokinetik der verschiedenen Kontrastmittel und Kontrastmittelpräparationen, erfolgte an standardisierten, kommerziell

erhältlichen Relaxometern. Diese relaxometrischen Messungen wurden in der ersten Phase des Projektes extern bei 0,47 T, entsprechend 20 MHz Protonenresonanzfrequenz, an einem Relaxometer Minispec PC 100 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt (Frau Claudia Heyer und Herr Dr. rer. nat. Wolfgang Ebert, Schering AG, Berlin). Da die Feldstärke von 0,47 T deutlich unter der für die kontrastmittelverstärkte MR-Angiographie relevanten Feldstärke von 1,5 T liegt, wurde im weiteren Verlauf des Projektes das institutseigene Relaxometer Minispec MQ 40 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Magnetfeldstärke von 0,94 T, entsprechend 40 MHz Protonenresonanzfrequenz, eingesetzt. Alle relaxometrischen Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Die T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten wurden mit der standardmässig implementierten Inversion-Recovery bzw. Carr-Purcell-Meyboom-Gill Spinecho Multiecho Sequenz nach automatischer Justage der entsprechenden Transmitteramplituden, Pulsdauern sowie gegebenenfalls manueller Justage der Delayzeiten gemessen. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem dazugehörigen Steuer- und Auswerteprogramm (the minispec software for Windows, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland). Die auf diese Weise für eine Verdünnung der zu untersuchenden Substanz erhaltene Relaxationszeit wurde am Monitor abgelesen und im Protokollbuch dokumentiert.

Für die Bestimmung von Relaxivitäten wurde entsprechend eine Verdünnungsreihe zwischen ca. 0,1 bis max 2 $\mu\text{mol Fe/ml}$ im jeweiligen Medium (je nach Fragestellung NaCl, aqua dest., Plasma, Serum, Vollblut) hergestellt, die T_1 - und T_2 -Relaxationszeit als Rate ($1/T_1$, $1/T_2$) gegenüber der Konzentration aufgetragen und mit dem Programm DeltaGraph (DeltaPoint Inc, Monctrey, CA, USA) aus der Steigung die T_1 - bzw. T_2 -Relaxivität bestimmt (r_1 , r_2).

4.2.2 Größenbestimmung der Eisenoxid-Partikel

Die Bestimmung des Gesamtdurchmessers der Partikel einschließlich Hüllmaterial erfolgte mittels Laserlicht-Streuung (laser light scattering, LLS) an einem Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Die Kerndurchmesser wurden anhand von extern an einem Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM) durchgeführten Aufnahmen durchgeführt.

4.2.3 Allgemeine Angaben zu Tieren und Narkose

Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Wirksamkeit der verschiedenen Kontrastmittelpräparationen wurden im Labor der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt. Des Weiteren erfolgte ein Teil der toxikologischen Untersuchungen im eigenen Labor. Alle Untersuchungen an Tieren waren zuvor von der entsprechenden Behörde genehmigt

worden (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, Genehmigungsnummern 0043/98, 0160/98, 0016/99, 0169/99, 0011/01). Die Ratten wurden von Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Als Kaninchen wurden sogenannte Chinchilla Bastard Kaninchen bezogen, ebenfalls von Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland). Bei den Schweinen handelte es sich um die Rasse Mini-LEWE, bezogen von: Medizinische Fakultät der TU Dresden, Dresden, Deutschland. Mit Untersuchungen zur Sicherheitspharmakologie und Toxikologie wurde als CRO die Firma LPT, Hamburg, beauftragt.

4.2.3.1 Anästhesie der Ratten

An Ratten wurde für die alleinige Kontrastmittelinjektion eine kurze Äther- oder Isoflurannarkose herbeigeführt. Für die längerdauernden MR-Untersuchungen wurden die Ratten mit 50 mg/kg Ketaminhydrochlorid i.m. (Ketavet, Parke-Davis, Berlin, Deutschland), 5 mg/kg Xylazine i.m. (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), und 2 mg/kg Diazepam s.c. (Diazepam-ratiopharm 10, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) narkotisiert.

4.2.3.2 Anästhesie der Kaninchen

Für einen Teil der Untersuchungen wurde bei den Kaninchen ein intrahepatischer Tumor erzeugt. Für die dafür notwendige intrahepatische Tumorzellimplantation wurden die Kaninchen mit 50 mg/kg Ketamin hydrochlorid i.m. (Ketavet, Parke-Davis, Berlin, Germany) und 5 mg/kg Xylazin i.m. (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany) anästhesiert. Für die MR-Untersuchung wurde die Narkose auf dem selben Wege eingeleitet. Nachdem die Anästhesie eingetreten war, wurden die Tiere mit einem Endotrachealtubus (Mallinckrodt Laboratories, Athlon, Ireland oder SIMS Portex Limited Hythe, Kent, UK) je nach Körpergewicht mit 2,5 – 3,0 mm Innendurchmesser intubiert und die Anästhesie mit einer Mischung aus 2-3% Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany) und medizinischem Sauerstoff aufrechterhalten. Dies erfolgte mit Hilfe eines elektronischen Systems für die Steuerung von Beatmung und Anästhesie (ADS 1000, Engler Engineering Co, Hialeah, USA). Für die Verabreichung des Muskelrelaxans (Pancuronium Curamed, CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Germany) und eventuell notwendiger weiterer Medikamente sowie für die Kontrastmittelinjektion wurde den Tieren in eine Ohrdravene eine Venenverweilkanüle (22G, Optiva*2, Ethicon, Pomezia, Italia) platziert.

4.2.3.3 Anästhesie der Minischweine

Für die alleinige Kontrastmittelinjektion wurden die Schweine in eine Kurznarkose

versetzt. Hierzu wurde den Tieren eine Mischspritze mit 15 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketamin 500 mg, Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 0,2 mg/kg Droperidol (Dehydrobenzperidol, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 0,2 mg/kg Midazolamhydrochlorid (Dormicum, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland) intramuskulär in die Nackenmuskulatur verabreicht.

Für die MR-Untersuchung an Minischweinen wurde den Tieren nach der Narkoseeinleitung, wie unter Kurznarkose im Absatz zuvor beschrieben, zunächst eine Venenverweilkanüle (Venofix, Braun, Melsungen, Deutschland) in eine Ohrtrandvene gelegt und die Narkose mittels i.v. Infusion von Propofol (Disoprivan, 1%, Grünenthal, Aachen, Deutschland), nach Bedarf vertieft. Nach Eintreten einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Tier mit einem Endotrachealtubus (Mallinckrodt Laboratories, Athlon, Ireland) je nach Körpergewicht mit 6,0 – 7,0 mm Innendurchmesser intubiert und die Narkose anschließend mit einem Gemisch von 2-3% Isoflurane (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und medizinischem Sauerstoff aufrechterhalten. Für die Beatmung wurde ein elektronisches System für die Steuerung von Beatmung und Anästhesie verwendet (ADS 1000, Engler Engineering Co, Hialeah, FL, USA).

Die Intubationsnarkose war erforderlich, da bei sämtlichen MR-Untersuchungen Messungen während Atemstopps durchgeführt wurden.

4.2.4 Quantitative Eisenbestimmung

Für Untersuchungen zur Organverteilung der Kontrastmittelpräparationen wurden quantitative Eisenbestimmungen durchgeführt. Hierfür wurden die Plasma- bzw. Gewebeprobe mit 65%iger HNO_3 (Salpetersäure) aufgeschlossen und in einem Atomemissionspektrometer (AES, Unicam 969, Nicolet Instruments GmbH, Offenbach, Deutschland) analysiert.

4.2.5 MR-Tomographie

Alle tierexperimentellen bildgebenden MR-Untersuchungen wurden bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla an einem Magnetom Vision (Siemens AG, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Das Gradientensystem erlaubt eine maximale Gradientenamplitude von 25 mT/m bei einer minimalen Schaltzeit von 600 μs . Für einzelne Untersuchungen (MR-Angiographie der Koronararterien an Minischweinen) wurde der zusätzlich vorhandene sogenannte EPI booster (Gradientenverstärker für Echo-Planar Bildgebung) genutzt, der eine minimale Schaltzeit von 300 μs ermöglicht.

Für Untersuchungen an Ratten wurde die vom Hersteller des MR-Tomographen angebotene standardmäßige, zirkular polarisierte Extremitätenspule (Kniespule)

eingesetzt. Diese fungiert als Sende- und Empfangsspule. Für Untersuchungen an Schweinen wurde die kommerziell erhältliche 4-Element Körper Phased Array Spule verwendet, diese dient als Empfangsspule, wobei die Hochfrequenzpulse über den Ganzkörperresonator gesendet werden.

Die quantitativen Auswertungen von MR-Bildern mit Bestimmung von Signalintensitätswerten (SI) erfolgte mittels standard „region-of-interest“ (ROI) Messungen mit einer ROI in dem Zielgewebe (SI_{Gewebe}) sowie außerhalb des Körpers in Frequenzkodierichtung ohne Erfassung von Bewegungsartefakten (SI_{Rauschen}) (Hintergrundrauschen). Es wurde für das Zielgewebe das Signal-zu-Rausch-Verhältnis S/R ($S/R_{\text{Gewebe}} = SI_{\text{Gewebe}} / SI_{\text{Rauschen}}$) gebildet. Für die Bestimmung von Kontrasten wurde die SI in den entsprechenden zwei Zielgeweben sowie im Hintergrund gemessen und das Signaldifferenz-zu-Rausch-Verhältnis SD/R ($SD/R = (SI_{\text{Gewebe1}} - SI_{\text{Gewebe2}}) / SI_{\text{Rauschen}}$) berechnet.

4.3 VSOP-C91 als Blut-Pool Kontrastmittel für die Equilibrium MR-Angiographie der Koronararterien

4.3.1 Einleitung

Mit der Formulierung VSOP-C91 lag ein Kandidat vor, der bezüglich der physikalischen Eigenschaften (T_1 - und T_2 -Relaxivität) und Pharmakokinetik (Bluthalbwertszeit) weitgehend dem angestrebten Ziel für ein Blut-Pool Kontrastmittel auf der Basis von superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln entsprach. Allerdings erfüllten die in einer orientierenden toxikologischen Prüfung gefundenen Verträglichkeitsdaten nicht in vollem Umfang die hohen Anforderungen (höchste nicht toxische Dosis > 5 mmol Fe/kg, vergl. Tabelle 3.1). Des Weiteren war der Syntheseweg der Substanz mit einem erheblichen Aufwand verbunden, den es im weiteren Optimierungsprozess noch zu vereinfachen galt. Dennoch entschied man sich angesichts der guten Wirksamkeitsdaten von VSOP-C91, mit dieser Substanz eine erste ausführliche experimentelle Wirksamkeitsprüfung bezüglich der kontrastverstärkten MR-Angiographie der Koronararterien durchzuführen.

Als erste Wirksamkeitsprüfung wählte man die technisch anspruchsvolle MR-Angiographie der Koronararterien, da dieses Gefäßterritorium eine wesentliche Indikation für die Anwendung von Blut-Pool Kontrastmitteln darstellen dürfte (87). In der MR-Angiographie der Koronararterien kann die intravenöse Applikation eines T_1 -Relaxationszeit verkürzenden Kontrastmittels gegenüber der nicht Kontrastmittel verstärkten Technik das intravaskuläre Signal steigern (94, 219). Für niedermolekulare Kontrastmittel, die nach intravenöser Injektion rasch extravasieren, hält dieser Effekt jedoch nur kurz (20 – 40 s) an und wird mittels First-Pass MR-Angiographie während Atemstillstand genutzt (69, 268). Für die vollständige Abbildung des Herzens bzw. des Koronararteriensystems mit hoher Ortsauflösung sind bislang mehrere Messungen notwendig, dabei übersteigt die Zeit der Datenakquisition die Dauer des First-Pass des Kontrastmittels auch an modernen MR-Tomographen mit leistungsfähigen Gradientensystemen bei weitem. Um bei 3D-Datenakquisition mit hoher, möglichst isotroper Ortsauflösung für die somit notwendige lange Messzeit den erforderlichen Kontrast zwischen Gefäßlumen und Myokardium zu erzielen, wurden und werden derzeit verschiedene Blut-Pool Kontrastmittel experimentell und klinisch geprüft.

In dieser ersten Studie zur Wirksamkeit der neuartigen Citrat-beschichteten Eisenoxid-Nanopartikel als Blut-Pool Kontrastmittel für die MR-Angiographie der Koronararterien erfolgte ein Vergleich mit zwei unspezifischen, niedermolekularen MR-Kontrastmitteln, die

seit längerem für die klinische Anwendung zugelassen sind. Hierbei handelte es sich um Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin. Im Rahmen dieses Vergleiches interessierte neben dem intravaskulären Signalverhalten auch eine mögliche Signaländerung im Myokard. Um eine solche Auswertung vornehmen zu können, wurde als Untersuchungstechnik eine GRE-Sequenz ohne Magnetisierungspräparation verwendet.

4.3.2 Material und Methoden

4.3.2.1 Tiere und Narkose

Insgesamt wurden 5 Schweine mit einem Gewicht zwischen 21 und 28 kg Körpergewicht eingesetzt. Jedes Tier wurde dreimal untersucht, wobei der Abstand zwischen zwei Untersuchungen minimal 1 Woche und maximal 3 Wochen betrug. Jedes Tier wurde somit mit allen drei Kontrastmitteln untersucht. Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte wie in Abschnitt 4.2.3 dieses Kapitels beschrieben.

4.3.2.2 Kontrastmittel und Dosierungen

Bei der in diesem Abschnitt verwendeten Präparation Citrat-beschichteter Eisenoxid-Partikel VSOP-C91 haben die Partikel einen Kerndurchmesser von 5 nm und einen Gesamtdurchmesser von 7 nm. Weitere Angaben zu VSOP-C91 finden sich in Kapitel 3.6. VSOP-C91 wurde für die Untersuchung an den Schweinen in einer Dosis von 0,06 mmol Fe/kg appliziert. Diese Dosis hatte sich in einer zuvor an Ratten durchgeführten Dosisfindung als gut geeignet für ein maximales intravasales Signalenhancement erwiesen (231). Die weiteren, zum Vergleich eingesetzten Kontrastmittel waren Gadopentetat Dimeglumin (Magnevist®, Schering AG, Berlin, Deutschland) und Gadobenat Dimeglumin (Multihance®, Bracco SA, Mailand, Italien). Die Dosierung für Gadopentetat Dimeglumin betrug 0,3 mmol Gd/kg und für Gadobenat Dimeglumin 0,2 mmol Gd/kg. Diese Dosierungen wurden gewählt, da Gadopentetat Dimeglumin klinisch für die i.v. Injektion bis 0,3 mmol Gd/kg zugelassen ist und bis zu dieser Dosis häufig für die First-Pass MR-Angiographie eingesetzt wird. Gadobenat Dimeglumin wurde zum Zeitpunkt der Durchführung der hier beschriebenen Studie in Dosierungen bis 0,2 mmol Gd/kg klinisch für die First-Pass MR-Angiographie geprüft. Pro Substanz wurden n=5 Tiere untersucht. Die i.v. Injektion der Kontrastmittel und die anschließende Injektion von 20 ml 0,9% NaCl Lösung erfolgte per Hand mit einer Injektionsgeschwindigkeit von ca. 1 ml/s.

4.3.2.3 MR-Tomographie

Alle MR-Untersuchungen wurden bei 1,5 T an einem Ganzkörper Tomographen

Magnetom Vision durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.5). Als Empfangsspule diente die standardmäßige 4-Kanal Körper Phased Array Spule.

Für die Bildgebung des Herzens wurde eine 3D GRE-Sequenz in fast low angle shot Technik (FLASH) (67) eingesetzt. Diese Sequenz war zuvor optimiert worden, um bei kleinem FOV eine schnelle Bildgebung mit kurzer Akquisitionszeit erzielen zu können. Hierzu wurde für die GRE-Sequenz das sogenannte EPI-Gradientensystem genutzt. Die Technik des zero filling (46) wurde zusammen mit folgenden Parametern verwendet: TR = 4,5 ms, TE = 1,7 ms, $\alpha = 25^\circ$, Empfängerbandbreite = 325 Hz/Pixel, axiale Schichtorientierung, rechteckiges FOV = 160 x 320 mm, Matrix = 140 x 512 (112 gemessene Phasenkodierschritte, 140 rekonstruierte Phasenkodierschritte), Pixeldimension Blockdicke = 40 mm, 20 gemessene 3D-Partitionen, 40 rekonstruierte 3D-Partitionen, effektive Dicke einer Partition = 1 mm.

Die Pulssequenz war so programmiert, dass während jedes RR-Zyklus während einer Akquisitionszeit von 90 ms jeweils 20 Partitionen aufgenommen werden. Hierbei entsprach die für die Erstellung der Aufnahme notwendige Anzahl von Herzzyklen der Anzahl der Phasenkodierschritte.

Eine Technik zur Magnetisierungspräparation zur Unterdrückung der Signalintensität des Myokards wurde nicht verwendet, da eine quantitative Auswertung auch des Myokards beabsichtigt war. Als Triggersignal wurde der periphere Puls verwendet, der mit dem serienmäßig am Gerät vorhandenen Pulsoxymeter abgeleitet wurde. Die Ableitung erfolgte an der Hintergliedmaße und es wurde eine Triggerverzögerung von 0 s eingesetzt. Diese Verzögerung wurde im Rahmen von Vorversuchen ermittelt. Die Auswertung des zusätzlich abgeleiteten EKG zeigte, dass die Datenakquisition etwa 300 – 400 ms nach der R-Zacke während der Diastole erfolgte. Die Aufnahmezeit einer Sequenz betrug je nach Herzfrequenz etwa 60 – 90 s. Jede Aufnahme wurde während eines endexpiratorischen Atemstillstandes durchgeführt, für den das Beatmungssystem manuell gestoppt wurde. Datensätze wurden vor sowie in 5 – 10 min Intervallen bis 35 min nach Kontrastmittelinjektion gemessen. Die erste Messung wurde mit der Kontrastmittelinjektion gestartet.

4.3.2.4 Auswertung

Quantitative Auswertung:

Für die MR-Angiographie Messungen wurden in den entsprechenden Einzelschichten für alle Zeitpunkte die SI im Blut des Ventrikellumens, im abgangsnahen Drittel des Ramus interventricularis descendens (left anterior descending coronary artery, LAD) und im Myokard des linken Ventrikels mittels ROI-Messungen bestimmt. Diese Messungen

wurden durch zwei Auswerter im Konsensus durchgeführt. Hierbei wurde unter Beachtung angrenzender Schichten darauf geachtet, dass die angepassten runden oder ovalären ROIs möglichst keine Partialvolumeneffekte oder Bewegungsartefakte mit erfassten. Zusätzlich wurde in einer dieser Schichten mittels einer ROI-Messung das Rauschen außerhalb des Körpers gemessen, ohne dabei Bewegungsartefakte in Phasenkodierrichtung zu erfassen. Es wurde für alle Zeitpunkte das Verhältnis aus SI des Blutes (Ventrikellumen, LAD) bzw. des Myokards und SI des Rauschens (S/R) gebildet, des Weiteren der Kontrast zwischen Blut und Myokard als Signaldifferenz-zu-Rausch-Verhältnis ($SD/R = (SI_{\text{blood}} - SI_{\text{myocard}})/SI_{\text{Noise}}$) berechnet.

Qualitative Auswertung:

In der qualitativen Auswertung wurde für alle Untersuchungen (n=15) die zweite postkontrast Messung bezüglich verschiedener Kriterien durch zwei erfahrene Auswerter bewertet, die gegenüber der Art des Kontrastmittels verblindet waren: (A) Allgemeine Bildqualität: 1, starke Bewegungsartefakte, deutliche Konturunschärfe; 2, mäßige Bewegungsartefakte, mäßige Konturunschärfe; 3, minimale Bewegungsartefakte, hohe Konturschärfe; 4, keine Bewegungsartefakte, exzellente Konturschärfe. (B) Kontrast zwischen Koronarlumen bzw. Ventrikellumen und Myokard: 1, gering; 2, mäßig; 3, gut; 4, exzellent. (C) Kontinuität der Koronararterien, getrennt für rechte und linke Koronararterie: 1, Koronararterie kaum oder bruchstückhaft erkennbar; 2, proximale 2/3 des Koronararterienverlaufes mit maximal einer Unterbrechung erkennbar; 3, vollständiger Verlauf der Koronararterie ohne Unterbrechung erkennbar; 4, vollständiger Verlauf bis zum Apex des Herzens exzellent dargestellt. (D) Visualisierung von Seitenästen der Koronararterien: 1, keine Seitenäste erkennbar; 2, Abgänge von einzelnen Seitenästen gerade erkennbar; 3, bis zu zwei Seitenäste in längerem Verlauf erkennbar; 4, mindestens drei Seitenäste in längerem Verlauf erkennbar. Die Bewertungen wurden getrennt nach Auswerter, Kontrastmittel, und Kriterium addiert. Die qualitative Auswertung wurde an einer Workstation (Magic View, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

Statistische Auswertung:

Um die Tatsache zu berücksichtigen, dass die Messungen korreliert sind, wurde eine nicht parametrische Varianzanalyse der Daten durchgeführt (2, 32). Für die quantitative Auswertung erfolgte für jeden ausgewerteten Parameter eine zwei-Faktoren Varianzanalyse mit den beiden Faktoren „Kontrastmittel“ und „Zeit“. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden von den insgesamt 5 gemessenen postkontrast Zeitpunkten nur 3 für diese statistische Auswertung verwendet. Dies waren der Zeitpunkt bei 0 s (unmittelbar nach Kontrastmittelinjektion), bei 5 min und 35 min. Mit dem Wilcoxon Test

für gepaarte Stichproben wurde geprüft, ob sich im Verlauf einer Untersuchung die Herzfrequenz änderte und ob zwischen den Gruppen, die mit den verschiedenen Kontrastmitteln untersucht wurden, Unterschiede in der Herzfrequenz vorlagen oder nicht. Für die qualitative Auswertung wurde für jeden bewerteten Parameter eine zwei-Faktoren Varianzanalyse zu den Faktoren „Kontrastmittel“ und „Auswerter“ durchgeführt. Ein p Wert < 0,05 wurde als signifikant erachtet.

4.3.3 Ergebnisse

Alle 15 Untersuchungen konnten technisch erfolgreich durchgeführt werden. Bezüglich der Herzfrequenz unterschieden sich die drei mit den verschiedenen Kontrastmitteln (VSOP-C91, Gadopentetat Dimeglumin, Gadobenat Dimeglumin) untersuchten Gruppen nicht. Auch ergaben sich innerhalb eines Individuums im Verlauf der Untersuchung keine signifikanten Änderungen der Herzfrequenz. Die Herzfrequenz der Tiere lag während der MR-Untersuchung zwischen 70 und 96 s⁻¹ ($83 \pm 12 \text{ s}^{-1}$).

Quantitative Auswertung:

In der LAD wurde für VSOP-C91, Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin die maximale Steigerung der S/R-Werte in der ersten Messung nach Kontrastmittelapplikation erreicht und betrug 102%, 94% und 103% (Tabelle 4.1). Für alle drei Kontrastmittel bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach Kontrastmittelinjektion. Im Myocard wurde ebenfalls für alle drei Kontrastmittel die maximale Steigerung der S/R-Werte in der ersten Messung nach Kontrastmittelapplikation erreicht. Diese beträgt für VSOP-C91 29%, für Gadopentetat Dimeglumin 83% und für Gadobenat Dimeglumin 83%. Hier lagen die Werte für Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin für alle Zeitpunkte signifikant höher als für VSOP-C91, wobei kein Unterschied zwischen den beiden Gadoliniumverbindungen bestand. Zwischen allen postkontrast S/R-Werten von Myokard und Ventrikellumen und den entsprechenden präkontrast Werten bestanden signifikante Unterschiede.

Die resultierenden SD/R-Werte sind graphisch in Abbildung 4.1 dargestellt. Die SD/R-Werte für VSOP-C91 lagen für alle Zeitpunkte bis 35 Minuten nach der Kontrastmittelapplikation signifikant über dem Leerwert. Für Gadopentetat Dimeglumin war das SD/R nur zum ersten Zeitpunkt signifikant höher als der Leerwert. Alle weiteren Zeitpunkte unterschieden sich nicht signifikant vom Leerwert. Für Gadobenat Dimeglumin unterschied sich zu keinem Zeitpunkt nach Kontrastmittelapplikation das SD/R signifikant vom Leerwert. Das SD/R zwischen LAD und Myokard war bei VSOP-C91 für alle Zeitpunkte nach Kontrastmittelapplikation signifikant höher ($p < 0,05$) als für Gadopentetat

Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin.

Qualitative Auswertung:

Bezüglich der Bildqualität wurden zwischen den drei mit den verschiedenen Kontrastmitteln untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede gefunden. Allerdings bewertete Auswerter 2 die Untersuchungen mit den Gd-basierten Kontrastmitteln bezüglich der „allgemeinen Bildqualität“ signifikant höher. Die Ergebnisse der qualitativen Auswertung sind in Tabelle 4.2 wiedergegeben.

Den Parameter „Kontinuität der Koronararterien“ bewerteten beide Auswerter für die linke Koronararterie in der mit VSOP-C91 untersuchten Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin) signifikant höher, wobei kein Unterschied zwischen den Auswertern bestand. Bezüglich der Kontinuität der rechten Koronararterie ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Bezüglich der Parameter „Kontrast zwischen LAD und Myokard“ und „Darstellung von Seitenästen der Koronararterien“ ergaben sich für die mit VSOP-C91 untersuchte Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant höhere Bewertungen, wiederum ohne Unterschied zwischen den beiden Auswertern. Zwischen den mit Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin untersuchten Gruppen wurde bezüglich keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied gefunden.

Tabelle 4.1: MR-Angiographie der Koronararterien - Ergebnisse der quantitativen Auswertung (S/R-Bestimmungen) für die drei untersuchten Kontrastmittel

Zeit [min]	VSOP-C91			Gadopentetat Dimeglumin			Gadobenat Dimeglumin		
	Ventrikel-lumen S/R	linke Koronararterie S/R	Myokard S/R	Ventrikel-lumen S/R	linke Koronararterie S/R	Myokard S/R	Ventrikel-lumen S/R	Linke Koronararterie S/R	Myokard S/R
prä	4,79 ± 0,25	4,47 ± 0,64	4,07 ± 0,18	4,64 ± 0,57	4,30 ± 0,64	3,68 ± 0,65	5,34 ± 0,76	4,51 ± 0,78	3,98 ± 0,35
0	8,70 ± 0,48	9,01 ± 0,33	5,27 ± 0,65	8,21 ± 0,90	8,36 ± 0,33	6,75 ± 1,15	9,05 ± 1,21	9,16 ± 0,92	7,29 ± 1,40
5	9,03 ± 0,26	8,87 ± 0,19	5,43 ± 0,50	7,95 ± 0,71	8,21 ± 0,19	6,60 ± 0,45	8,27 ± 0,93	8,98 ± 1,02	6,65 ± 0,75
15	8,61 ± 0,46	9,01 ± 0,61	5,06 ± 0,55	8,12 ± 0,92	8,32 ± 0,61	6,29 ± 0,95	8,23 ± 1,15	8,93 ± 0,88	6,63 ± 0,88
25	8,87 ± 0,43	9,19 ± 0,51	5,21 ± 0,53	7,02 ± 1,29	7,20 ± 0,51	5,45 ± 0,79	8,17 ± 1,33	8,12 ± 0,84	6,36 ± 1,20
35	8,54 ± 0,29	8,58 ± 0,28	5,21 ± 0,66	7,35 ± 1,18	7,35 ± 0,28	5,85 ± 0,91	7,80 ± 0,75	7,89 ± 0,74	6,08 ± 0,85

Anmerkung: Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Ventrikellumen und linker Koronararterie für die 3 Kontrastmittel gefunden. Des Weiteren wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Kontrastmitteln bezüglich Ventrikellumen und linker Koronararterie gefunden. Für Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin sind die Werte für das Myokard signifikant höher als für VSOP-C91. Für alle drei Kontrastmittel zeigen die postkontrast Werte der verschiedenen Zeitpunkte keine signifikanten Unterschiede (für alle Auswertungen: $p < 0,05$).

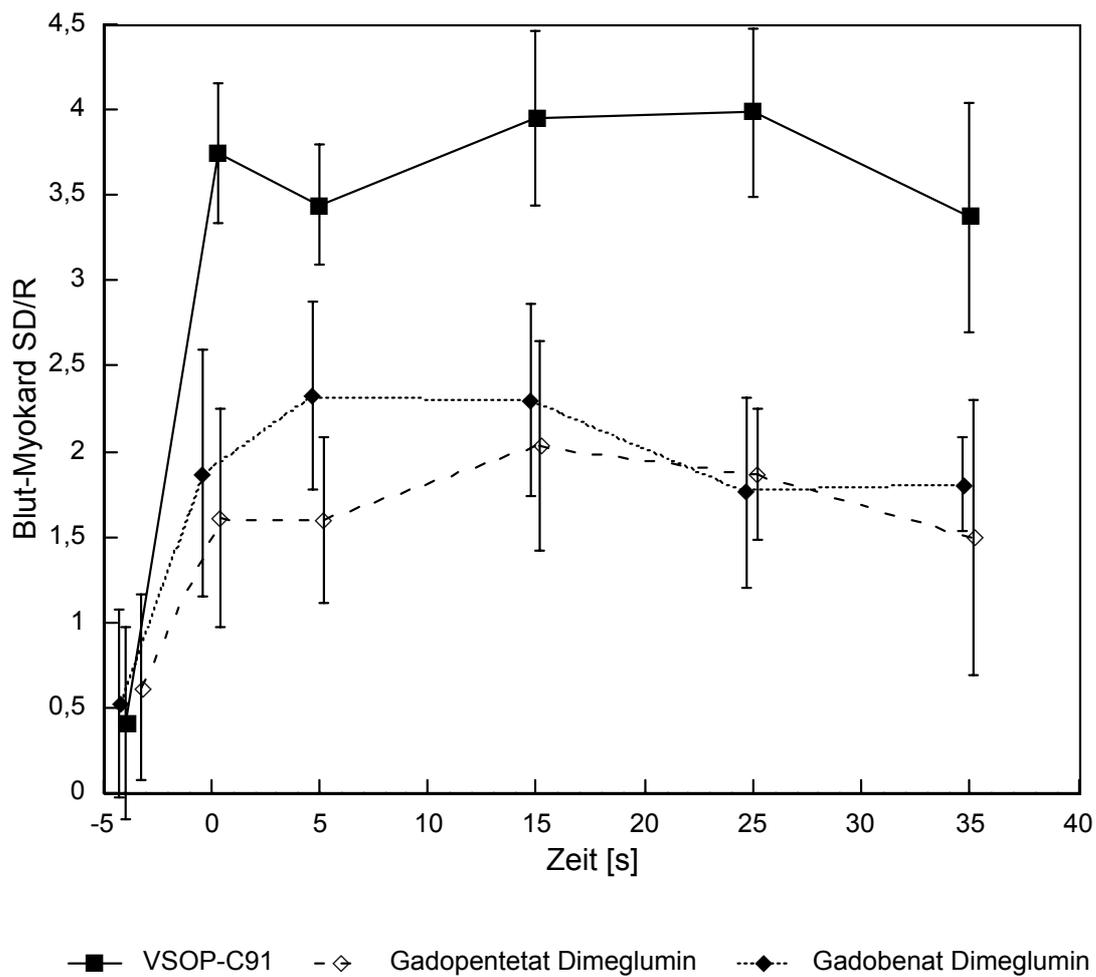


Abbildung 4.1 Kontrastverstärkte MR-Angiographie der Koronararterien am Schwein, quantitative Auswertung: Vergleich des Blut-Pool Kontrastmittels VSOP-C91 mit zwei niedermolekularen, unspezifischen Gd-haltigen Kontrastmitteln bezüglich Kontrast (SD/R) zwischen Lumen des LAD und Myokard. Das SD/R war für VSOP-C91 für alle Zeitpunkte nach Kontrastmittelapplikation signifikant höher ($p < 0,05$) als für Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin.

Tabelle 4.2: MR-Angiographie der Koronararterien – Ergebnisse der qualitativen Auswertung für die

	VSOP-C91		Gadopentetat Dimeglumin		Gadobenat Dimeglumin	
	Auswerter #1	Auswerter #2	Auswerter #1	Auswerter #2	Auswerter #1	Auswerter #2
Bildqualität	17	17	15	17	15	19
Koronararterien						
Kontrast	14*	14*	7	7	9	8
Kontinuität						
Rechts	13	11	7	10	9	11
Links	13*	15*	6	7	9	8
Seitenäste	13*	13*	6	6	5	5

Anmerkung:

Die Zahlen stellen Summenscores dar, zur Methode der Auswertung siehe Kapitel 4.3.2.4.

*Auswerter 1 und 2 erzielten für VSOP-C91 im Vergleich zu den nieder molekularen Kontrastmitteln signifikant höhere Summenscores. Es ergab sich für keinen der Parameter ein Unterschied zwischen den beiden nieder molekularen Kontrastmitteln.

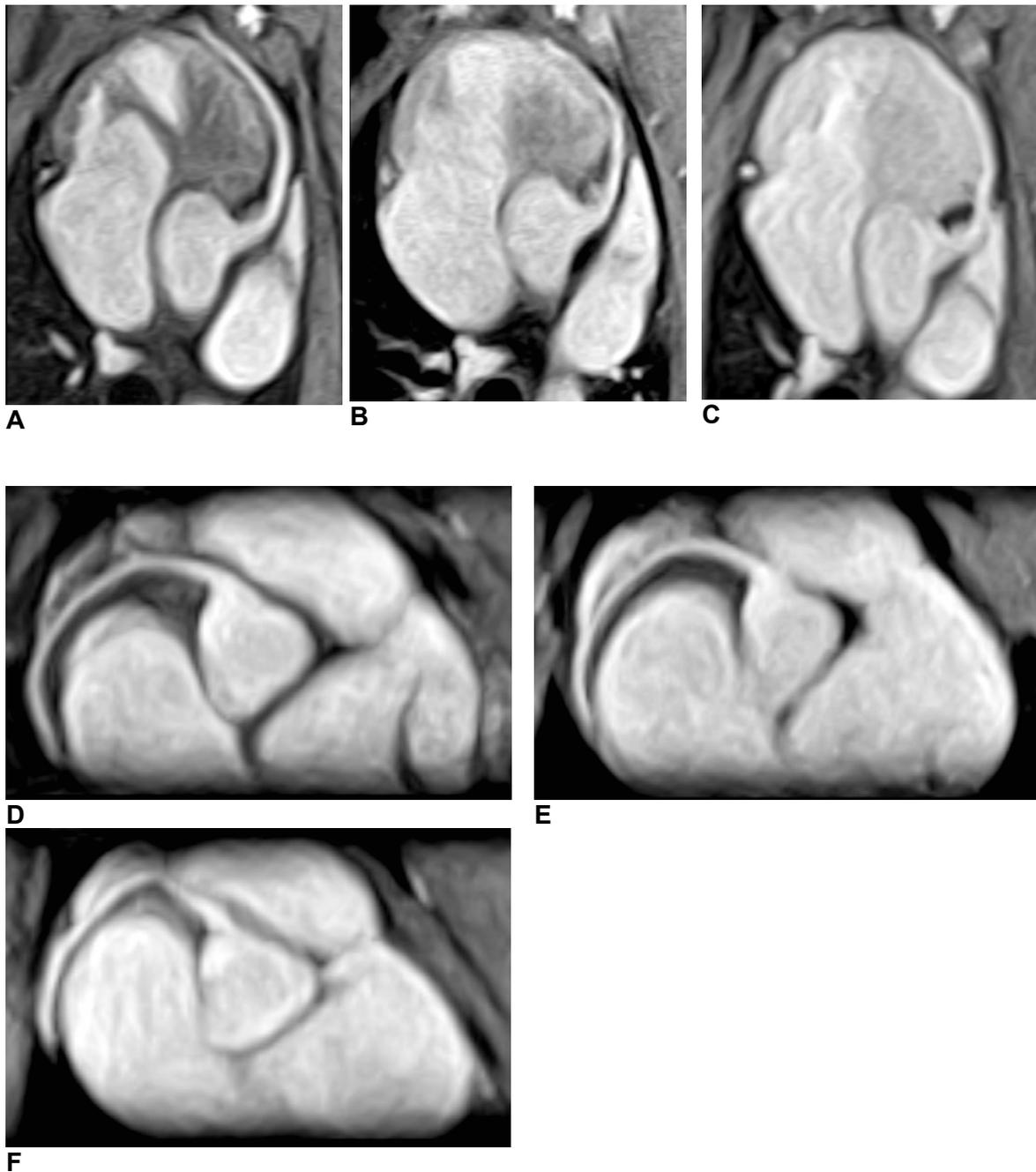


Abbildung 4.2: MR-Angiographie der Koronararterien am Schwein bei 1,5 T: Multiplanare Rekonstruktionen in doppelt schräger Orientierung entlang der LAD (A-C) und der RCA (D-F). Die Aufnahmen wurden jeweils unmittelbar nach i.v. Injektion von VSOP-C91 (A, D), Gadopentetat Dimeglumin (B, E) und Gadobenat Dimeglumin (C, F) angefertigt. Alle Kontrastmittel führten zu einem hohen intravasalen Signal (A-F). Für VSOP-C91 blieb das Myokard signalarm, hieraus resultiert eine gute Abgrenzbarkeit der Koronararterien. Die niedermolekularen Substanzen verursachten einen myokardialen Signalanstieg und bedingten hierdurch einen verminderten Kontrast zwischen Koronararterie und Myokard.

4.4 *Wirksamkeit von VSOP-C184 in der First-Pass MR-Angiographie der Aorta und Nierenarterien*

4.4.1 Einleitung

Die First-Pass MR-Angiographie mit schneller 3D Bildgebung während der arteriellen Passage eines peripher venös injizierten niedermolekularen Gd-haltigen T₁-verkürzenden Kontrastmittels erreicht heute bezüglich der diagnostischen Aussagekraft in zahlreichen Gefäßterritorien die konventionelle Katheterangiographie, z.B. im Bereich der aortoiliacalen Arterien (225, 271), Karotiden (48, 179), Nierenarterien (63, 136), und der Becken/Beinarterien (49, 196).

Allerdings ist die räumliche Auflösung der First-Pass MR-Angiographie wegen der kurzen Zeit der arteriellen Passage des Kontrastmittels von ca. 10 – 25 s letztendlich limitiert. Durch Extravasation fällt die Blutkonzentration der hier verwendeten niedermolekularen Kontrastmittel nach Injektion rasch ab und es entsteht ein Hintergrundsignal außerhalb der Blutgefäße. Hierdurch sind Messzeiten, die länger als die Zeit der arteriellen Passage des Kontrastmittelbolus sind, in der Regel nicht sinnvoll. Durch spezielle Akquisitionsschemata, wie z.B. die elliptische k-Raum Abtastung bei Untersuchungen an den Halsarterien, kann das Zeitfenster allerdings geringfügig erweitert werden (62, 253).

Für bestimmte Fragestellungen der Gefäßdiagnostik besteht eindeutig ein Bedarf an einem deutlich verlängerten Zeitfenster für die Bildgebung. Dies trifft für atembewegte Organe bzw. ihre Gefäße zu, wie z.B. die Pulmonalarterien (1, 142) oder die Koronararterien (88, 107, 221), bei denen durch Atemgating oder Messungen während wiederholter Atemstopps die Gesamtmesszeit deutlich verlängert wird. Des Weiteren kann ein längeres Zeitfenster für eine Erhöhung der Ortsauflösung genutzt werden, z.B. zur verbesserten morphologischen Beurteilung von Gefäßwandveränderungen (274).

Im Vergleich zu unspezifischen, niedermolekularen MR-Kontrastmitteln wird die Dauer des intravasalen Signalanstieges durch Verwendung von Blut-Pool Kontrastmitteln verlängert. Neben makromolekularen Gd-haltigen Verbindungen, z.B. Gadomer (144) oder P792 (165), und niedermolekularen, proteinbindenden Gd-haltigen Substanzen, z.B. MS-325 (120) oder B22956 (40), wurden oder werden derzeit mehrere superparamagnetische Eisenoxid-Partikel als T₁-verkürzende Blut-Pool Kontrastmittel präklinisch oder klinisch geprüft, z.B. SHU 555 C (3), NC100150 (104) oder Ferumoxytol (170). Den genannten Substanzklassen ist gemeinsam, dass sie nach Injektion nicht oder nur in geringem Maße extravasieren. Wünschenswert wäre, dass ein MR angiographisches Kontrastmittel sowohl für die First-Pass als auch für die Equilibrium MR-

Angiographie einsetzbar ist. Hierdurch könnte die arterielle Phase für eine Darstellung der Arterien ohne venöse Überlagerung genutzt werden und anschließend die Equilibriumphase für eine Darstellung mit erhöhter morphologischer Auflösung.

Ein Ziel in der Entwicklung von VSOP-C184 war, dass diese Substanz klinisch als i.v. applizierter Bolus gut verträglich ist, was durch bisherige experimentelle Daten bestätigt wurde. Des Weiteren hatte ein Vorläufer von VSOP-C184 eine hohe Wirksamkeit als Blut-Pool Kontrastmittel in der Equilibrium MR-Angiographie gezeigt (Kapitel 4.3). Daher sollte geprüft werden, ob VSOP-C184 auch in der First-Pass MR-Angiographie einen nutzbaren intravaskulären Signalanstieg herbeiführt und zu einer guten Darstellung der Arterien führt. Hierzu wurden bei 1,5 T an Minischweinen Untersuchungen der Bauchaorta und Nierenarterien mit VSOP-C184 in drei Dosierungen im Vergleich zu Gadopentetat Dimeglumin in zwei Dosierungen durchgeführt und eine quantitative sowie qualitative Auswertung vorgenommen.

4.4.2 Material und Methoden

4.4.2.1 Tiere und Narkose

Insgesamt wurden 3 Minischweine mit einem Gewicht zwischen 22 und 27 kg Körpergewicht eingesetzt (Kapitel 4.2.3). Jedes Tier wurde fünfmal untersucht, wobei der Abstand zwischen zwei Untersuchungen minimal 1 Woche und maximal 3 Wochen betrug. Dazu wurde jedes Tier in randomisierter Folge mit drei Dosierungen von VSOP-C184 und zwei Dosierungen von Gadopentetat Dimeglumin untersucht, so dass sich insgesamt 15 Untersuchungen ergaben.

Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose sowie die Beatmung erfolgte wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben.

4.4.2.2 Kontrastmittel und Dosierungen

Für diese Studie wurde VSOP-C184 der Charge 050701 eingesetzt. Es handelt sich um die gleiche Charge, wie sie auch für die klinischen Prüfungen verwendet wurde (siehe Kapitel 5). Zum Vergleich wurde das niedermolekulare, unspezifische MR-Kontrastmittel Gadopentetat Dimeglumin (Magnevist®, Schering AG, Berlin, Deutschland) eingesetzt.

Es wurden fünf Gruppen gebildet: Mit VSOP-C184 erfolgten für die Dosierungen 0,015, 0,025 und 0,035 mmol Fe/kg je drei Untersuchungen, mit Gadopentetat Dimeglumin für die Dosis 0,1 und 0,2 mmol Gd/kg ebenfalls je drei Untersuchungen. Die VSOP-C184 Dosierungen wurden aufgrund früherer Untersuchungen zum Dosisvergleich gewählt (231). Die beiden Gadopentetat Dimeglumin Dosierungen wurden gewählt, da 0,1 mmol

Gd/kg der klinischen Standarddosis z.B. für die MR-Tomographie des ZNS, von parenchymatösen Abdominalorganen oder für die muskuloskeletale MR-Tomographie entspricht und 0,2 mmol Gd/kg häufig in der First-Pass MR-Angiographie eingesetzt wird. Eine höhere Gd-Dosis wurde nicht in den Vergleich eingeschlossen, da für Gd-Chelate bei ca. 0,2 mmol Gd/kg ein Sättigungseffekt bezüglich der diagnostischen Wirksamkeit in der First-Pass MR-Angiographie einzusetzen scheint (116). Für die Bolusinjektion wurde VSOP-C184 mit 6% Mannitol Lösung auf 0,075 mmol Fe/ml verdünnt, um eine für die Bolusinjektion gut handhabbare Konzentration zu erhalten. Es wurde jeweils unmittelbar nach Kontrastmittelinjektion mit 20 ml 0,9% NaCl nachgespült. Die Injektion von Kontrastmittel und NaCl erfolgte mit einem MR-Injector Spectris™ (Medrad, Indianola, USA) mit einer Geschwindigkeit von 0,6-1,4 ml/s, je nach Injektionsmenge und Körpergewicht des Tieres. Die Injektionsgeschwindigkeit für die verdünnte Lösung von VSOP-C184 und für Gadopentetat Dimeglumin wurde so gewählt, dass die Kontrastmittelmenge innerhalb von 8 s injiziert wurde, entsprechend 75 % der Akquisitionszeit der First-Pass MR-Angiographie Sequenz.

4.4.2.3 MR-Tomographie

Alle MRT Untersuchungen erfolgten an einem 1,5 T MRT (Magnetom Vision, Siemens, Erlangen) mit der kommerziellen 4-Kanal Körper Phased Array Spule (Kapitel 4.2.5). Die Tiere wurden mit einer 3D fast low angle shot (FLASH) Sequenz untersucht, die für eine minimale Akquisitionszeit bei gleichzeitig hohem Signal/Rausch-Verhältnis optimiert war. Die Parameter waren: TR = 4,5 ms, TE = 1,7 ms; $\alpha = 25^\circ$, Bandbreite = 325 Hz/Pixel, koronare Schichtorientierung, FOV=250, Matrix=100x256 (entsprechend 1,88 x 0,98 mm Voxeldimensionen), Blockdicke = 112 mm, 32 Partitionen, effektive Schichtdicke = 3,5 mm, konventionelle Phasenkodierung, Messzeit = 11 s. Die Messung wurde jeweils vor und 10 s nach Start der Kontrastmittelinjektion durchgeführt. Die Kreislaufzeit wurde nicht individuell bestimmt, da in früheren Untersuchungen an den gleichen Versuchstieren sich gezeigt hatte, dass die Zeit von Injektion eines Kontrastmittel in die Ohrrendvene bis zum Erscheinen in der Bauchorta 12 s mit sehr geringer interindividueller Schwankung beträgt. Die prä- und postkontrast Messungen wurden jeweils mit identischer Sende- und Empfängereinstellungen durchgeführt, um die kontrastmittelbedingte Signaländerung quantifizieren zu können. Alle Aufnahmen wurden während eines endexpiratorischen Atemstillstandes durchgeführt, für den das Beatmungssystem manuell gestoppt wurde.

4.4.2.4 Auswertung

Quantitative Auswertung: Es wurden für alle Untersuchungen zwei quantitative Parameter ermittelt. (1) Signalanstieg (Enhancement, ENH) im Gefäß als Maß für die

Kontrastmittelwirkung und (2) im postkontrast Bild die Steigung des Signalintensitätsverlaufes an der Grenze zwischen Gefäß und Umgebung als Maß für die Schärfe der Abbildung der Gefäßwand (Vessel Edge Definition, VED) (57). Für die Auswertung von ENH wurde die SI in der Aorta vor und nach den Nierenarterienabgängen sowie in beiden Nierenarterien jeweils etwa 1 cm nach ihrem Abgang aus der Aorta bestimmt. Hierbei wurden bei jedem Tier an jeder der genannten Lokalisationen drei ROI-Messungen durchgeführt und jeweils ein Mittelwert gebildet, hierbei wurde ein Mittelwert aus beiden Nierenarterienabgängen gebildet. Diese Messungen wurden sowohl in der präkontrast ($SI_{prä}$) als auch in der postkontrast Messung (SI_{pos}) durchgeführt. Der Wert für den Signalanstieg wurde dann für jedes Individuum und jede Gefäßlokalisierung berechnet: $ENH = (SI_{post} - SI_{prä}) / SI_{prä}$. Für die Ermittlung der Gefäßwandschärfe wurden an den gleichen Lokalisationen wie für die Bestimmung von ENH Signalintensitätsprofile senkrecht zur Gefäßachse gemessen und zu beiden Seiten des Gefäßes der Wert für VED als maximale Änderung der Signalintensität pro mm berechnet. Diese Messung wurde innerhalb eines Tieres an jeder Gefäßregion an drei verschiedenen Lokalisation durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Eine Berechnung des S/R erfolgte nicht, da aufgrund des kleinen FOV nicht in allen Messungen SI-Werte für das Rauschen ermittelt werden konnten. Zusätzlich wurde in allen Messungen der Durchmesser der Aorta 1 cm oberhalb der Nierenarterienabgänge sowie der Durchmesser beider Nierenarterien jeweils 1 cm distal ihrer Abgänge bestimmt. Alle Auswertungen wurden mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Qualitative Auswertung: Zwei erfahrene Auswerter, die gegenüber Art und Dosis des Kontrastmittels verblindet waren, werteten unabhängig voneinander die kontrastverstärkten MR-Aufnahmen bezüglich Bildqualität, Kontrast und Abgrenzbarkeit der Gefäße aus. Es wurden die Aorta in der Umgebung der Nierenarterienabgänge, die Nierenarterien und die intraparenchymatösen Nierenarterienaufzweigungen gegebenenfalls in getrennten Schichten bewertet. Die Bewertung erfolgte anhand folgender Scores: 0, nicht auswertbar bzw. gering; 1, moderat; 2, gut; 3, exzellent. Die scores wurden summiert und tabellarisch dargestellt. Die Auswertung erfolgte an einer Workstation (Magic View, Siemens, Erlangen, Germany) unter Verwendung der Einzelschichten oder, falls erforderlich, an Hand interaktiv rekonstruierter Sekundärschichten.

Statistik: ENH und VED für VSOP-C184 und Gadopentetat Dimeglumin wurden mittels t-Test verglichen. Da bei einem nichtsignifikanten Ergebnis nicht auf Gleichheit geschlossen werden kann und die Fallzahlen für die Durchführung von Äquivalenztests zu klein waren, wurden Konfidenzintervalle der Differenzen berechnet, um die klinische

Irrelevanz der Differenzen zu zeigen. Die beiden Kontrastmittel wurden bezüglich der Durchmesser von Aorta sowie von rechter und linker Nierenarterie mit dem t-test verglichen, wobei die Daten der drei Dosisgruppen von VSOP-C184 bzw. der zwei Dosisgruppen von Gadopentetat Dimeglumin zusammengefasst wurden. Die qualitative Analyse erfolgte nur deskriptiv.

4.4.3 Ergebnisse

Alle Untersuchungen konnten technisch erfolgreich durchgeführt werden. Die quantitative Auswertung ergab für die drei Dosierungen von VSOP-C184 (0,015, 0,025 und 0,035 mmol Fe/kg) in der Aorta ein ENH von $9,4 \pm 2,6$, $12,3 \pm 1,2$ und $16,5 \pm 1,7$ und in den Nierenarterien von $7,6 \pm 2,2$, $9,9 \pm 1,0$ und $13,2 \pm 0,5$. Für die beiden Dosierungen Gadopentetat Dimeglumin (0,1 und 0,2 mmol Gd/kg) waren das ENH in der Aorta $12,9 \pm 1,0$ und $16,8 \pm 2,2$, in den Nierenarterien $11,2 \pm 1,3$ und $11,3 \pm 1,7$ (Abbildung 4.3). Für VSOP-C184 waren die entsprechenden Werte für VED an der Aorta $106,3 \pm 31,0$, $135,3 \pm 58,8$ und $141,3 \pm 71,0$, an den Nierenarterien $102,2 \pm 24,3$, $146,8 \pm 63,0$ und $126,9 \pm 37,6$. Für die beiden Dosierungen von Gadopentetat Dimeglumin ergab sich für VED an der Aorta $157,2 \pm 47,8$ und $164,2 \pm 36,8$, an den Nierenarterien $165,9 \pm 30,4$ und $170,3 \pm 38,2$ (Abbildung 4.4).

Der Vergleich der beiden höheren Dosierungen von VSOP-C184 mit den beiden Dosierungen von Gadopentetat Dimeglumin ergab für die Differenzen folgende 95% Konfidenzintervalle. Für ENH in der Aorta war die untere Grenze $-2,7$ und die obere Grenze $4,1$, in den Nierenarterien ergaben sich $-2,3$ und $2,1$. Für VED waren die entsprechenden Werte an der Aorta $-13,4$ und $87,2$, an den Nierenarterien $3,6$ und $71,3$. Diese Differenzen wurden als klinisch nicht relevant erachtet.

Bezüglich der Durchmesser von Aorta und Nierenarterien bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen VSOP-C184 und Gadopentetat Dimeglumin. In der VSOP-C184 Gruppe sind die Durchmesser von Aorta, rechter und linker Nierenarterie $7,4 \pm 1,0$, $4,3 \pm 0,5$, und $4,3 \pm 0,5$ mm, in der Gadopentetat Dimeglumin Gruppe $7,3 \pm 0,6$, $4,2 \pm 0,2$, und $4,3 \pm 0,7$ mm.

Die qualitative Auswertung der Bildqualität, des Kontrastes und der Darstellbarkeit der Aorta und der Nierenarterien ergab, dass sich VSOP-C184 in der Dosis von 0,025 und 0,035 mmol Fe/kg nicht von Gadopentetat Dimeglumin in den beiden verwendeten Dosierungen unterscheidet (Tabelle 4.3). Die intrarenalen Aufzweigungen der Nierenarterien im Nierenparenchym sind mit VSOP-C184 teilweise zu erkennen, während mit Gadopentetat Dimeglumin die intrarenalen Aufzweigungen aufgrund des kräftigeren Signalanstieges im Nierenparenchym nicht zu erkennen sind (siehe Abbildung 4.5).

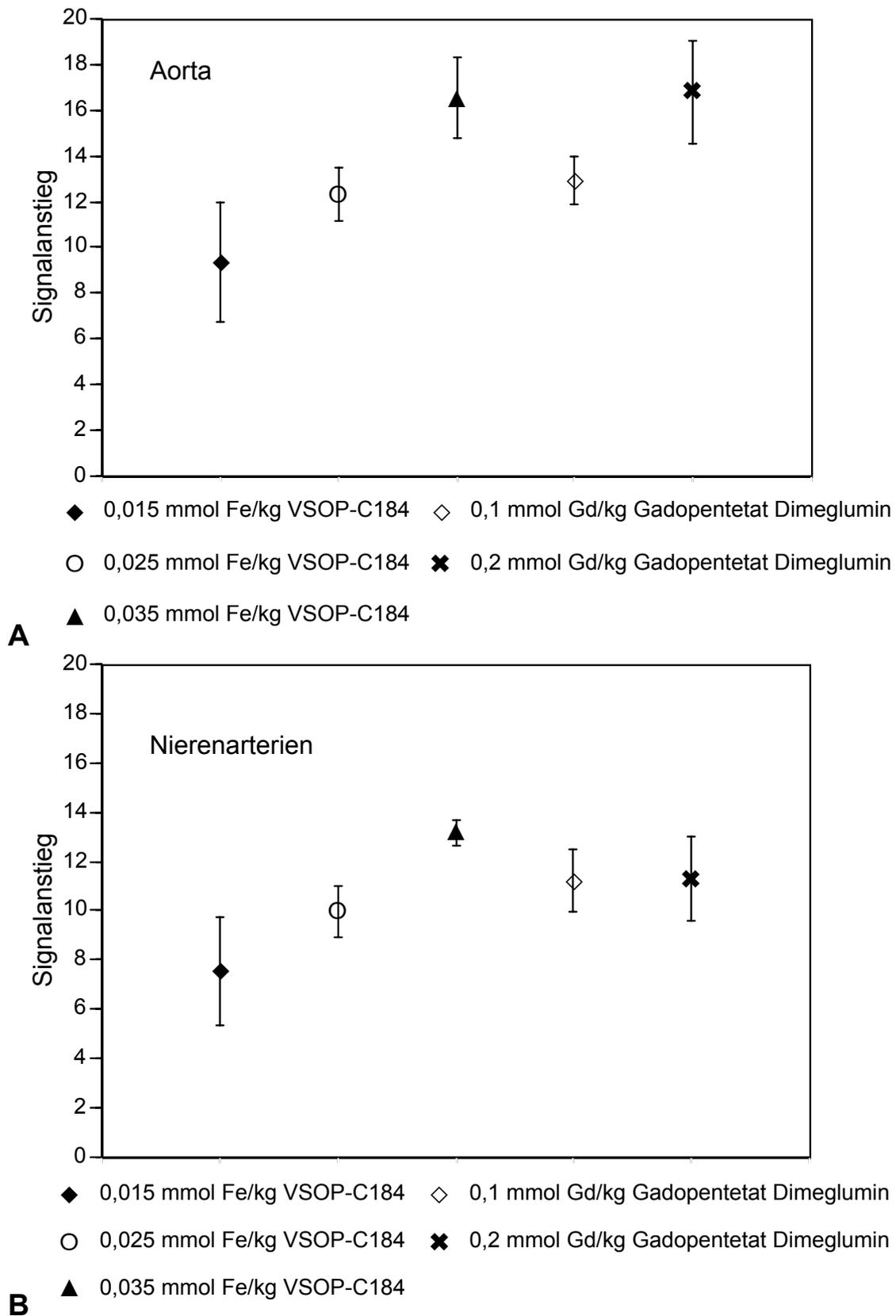


Abbildung 4.3: Vergleich von VSOP-C184 und Gadopentetat Dimeglumin in verschiedenen Dosierungen in der First-Pass MR-Angiographie: Signalanstieg in Aorta (A) und Nierenarterien (B).

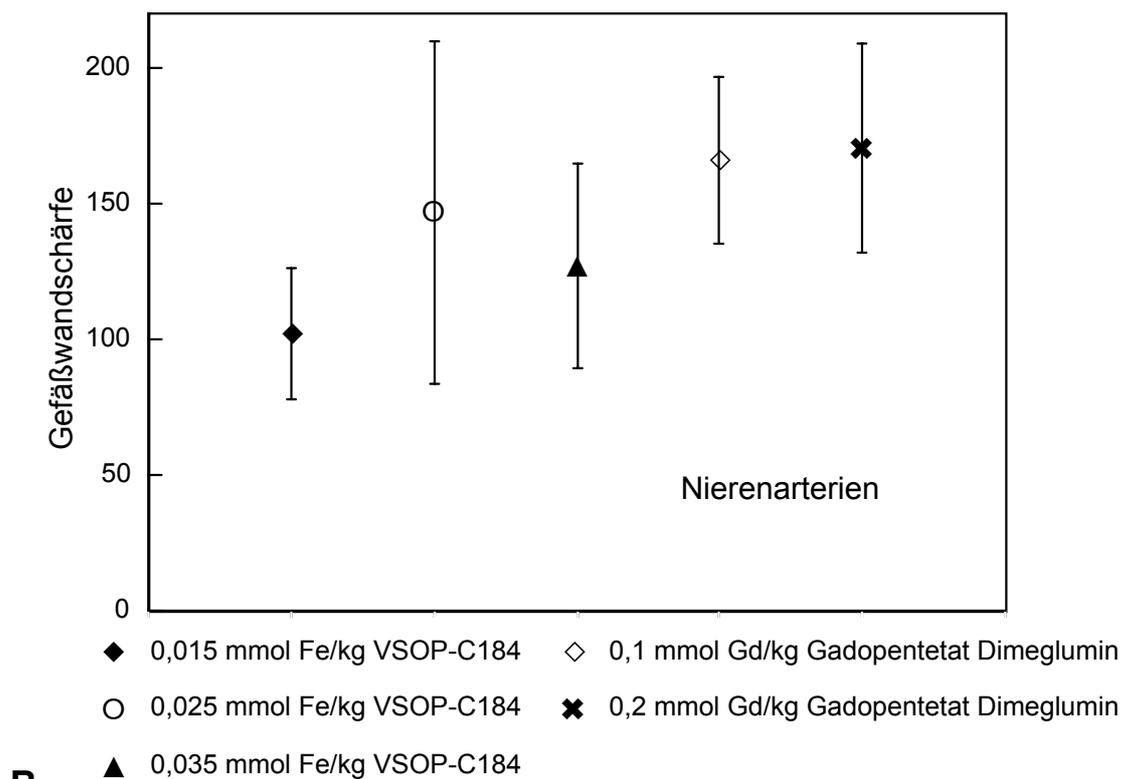
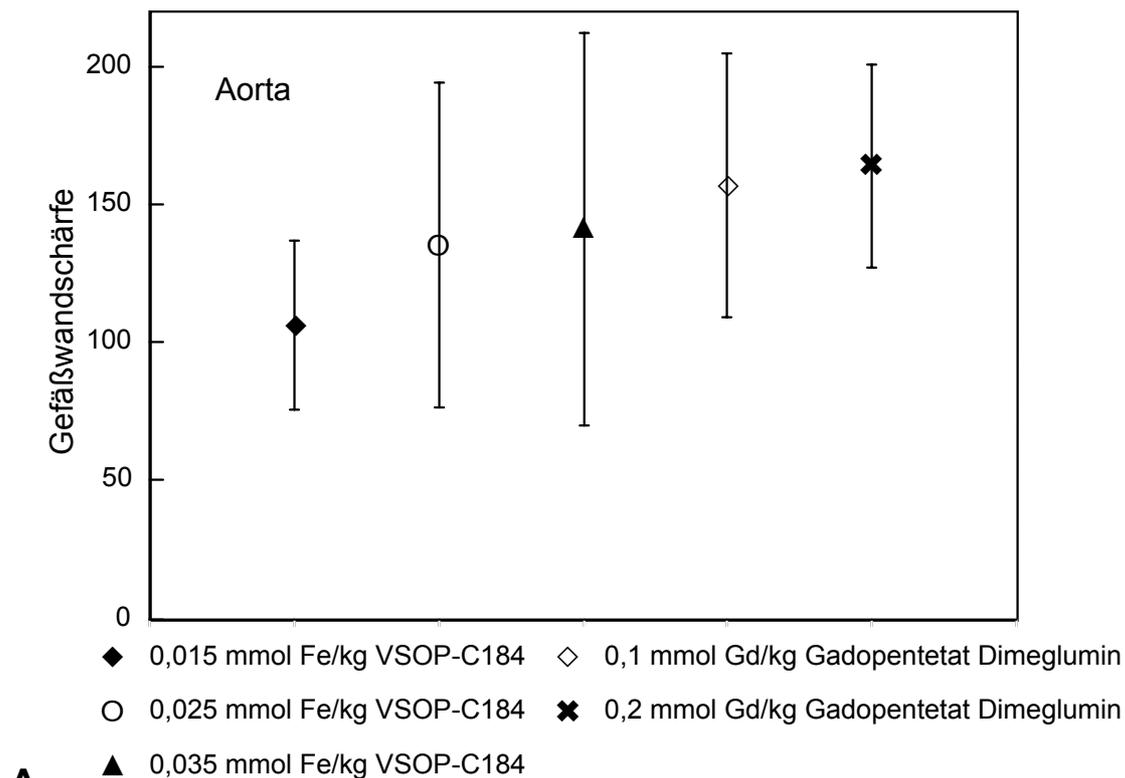


Abbildung 4.4: Vergleich von VSOP-C184 und Gadopentetat Dimeglumin in verschiedenen Dosierungen in der First-Pass MR-Angiographie: Quantitativ bestimmte Gefäßwandschärfe von Aorta (A) und Nierenarterien (B).

Tabelle 4.3: First pass MR-Angiographie der Bauchaorta und der Nierenarterien am Schwein bei 1,5 T nach i.v. bolusförmiger Injektion von VSOP-C184 und Gadopentetat Dimeglumin: Ergebnis der qualitativen Auswertung

Kontrastmittel und Dosierungen		Aorta	Nierenarterien	Intrarenale Arterienaufzweigungen
VSOP-C184	0,015 mmol Fe/kg	21	40	22
	0,025 mmol Fe/kg	27	49	41
	0,035 mmol Fe/kg	25	44	36
Gadopentetat Dimeglumin	0,1 mmol Gd/kg	28	46	27
	0,2 mmol Gd/kg	24	44	18

Anmerkung: Die Werte stellen Summen der Bewertungen von zwei Auswertern für die drei Dosierungen von VSOP-C184 und die zwei Dosierungen von Gadopentetat Dimeglumin dar. Der maximal mögliche Wert für die Aorta ist 30, für die Nierenarterien und intrarenalen Arterienaufzweigungen ist 60.

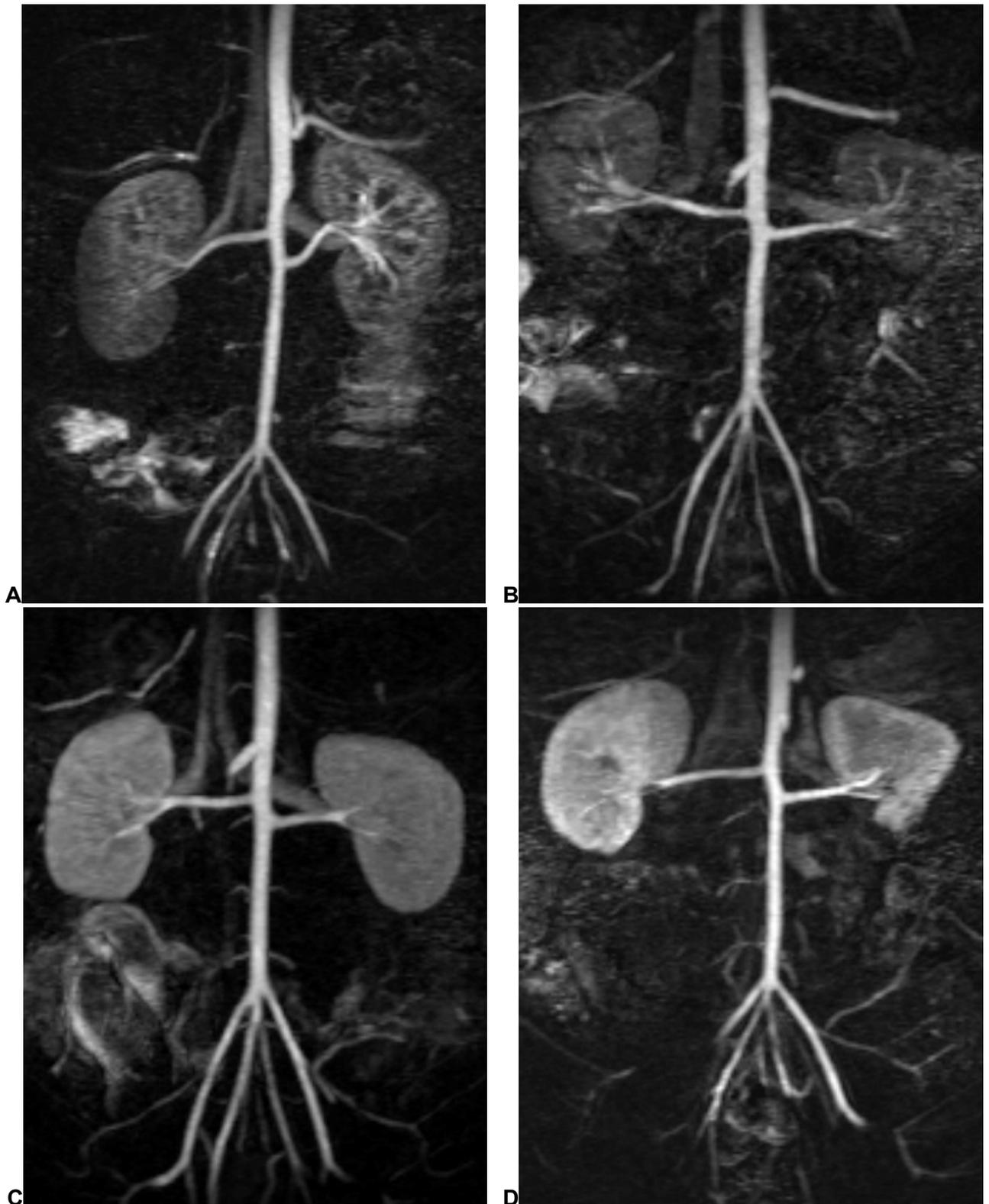


Abbildung 4.5: First-Pass MR-Angiographie der Bauchaorta und der Nierenarterien am Schwein bei 1,5 T nach i.v. bolusförmiger Injektion von VSOP-C184 (A: 0,025 mmol Fe/kg, B: 0,035 mmol Fe/kg) und Gadopentetat Dimeglumin (C: 0,1 mmol Gd/kg, D: 0,2 mmol Gd/kg). Alle Untersuchungen zeigen qualitativ einen exzellenten Kontrast und eine gute Abgrenzbarkeit der Arterien ohne Überlagerung durch kontrastierte Venen (jeweils MIP-Darstellungen nach Subtraktion des präkontrast Datensatzes vom postkontrast Datensatz).

4.5 MRT fokaler Leberläsionen: Experimenteller Vergleich von VSOP-C184 mit Gadopentetat Dimeglumin und Ferucarbotran in T₁-gewichteter dynamischer und T₂-gewichteter später Bildgebung

4.5.1 Einleitung

Wie in Kapitel 2.2.1 des Grundlagenkapitels dieser Arbeit ausgeführt, wurden SPIO ursprünglich als Kontrastmittel für die MRT der Leber entwickelt, um die Detektion fokaler Leberläsionen, insbesondere von Lebermetastasen zu verbessern (10, 22, 55, 75, 191, 192, 218). Zusätzlich kann in T₂-gewichteten Spätaufnahmen in Grenzen eine Differenzierung im Wesentlichen zwischen lebereigenen bzw. eher gutartigen Tumoren und Metastasen getroffen werden (70, 220, 244).

SPIO zeigen nach intravenöser Injektion auch einen T₁-Relaxationszeit verkürzenden Effekt, der bei USPIO besonders ausgeprägt ist (151, 188, 189, 190). In der MRT der Leber macht dieser T₁ Effekt in Verbindung mit den Eigenschaften von SPIO und USPIO eines Blut-Pool Kontrastmittels weitere diagnostische Kriterien zugänglich. Nach intravenöser Injektion kommt es in T₁-gewichteter Bildgebung zu einem Signalanstieg in gut vaskularisierten Strukturen und es resultiert insbesondere eine verbesserte Charakterisierung von Leberhämangiomen (189, 190).

Bisher für die MRT der Leber experimentell oder klinisch geprüfte SPIO bzw. USPIO weisen hier jedoch Nachteile auf. SPIO, die bolusförmig injizierbar sind, wie z.B. Ferucarbotran, zeigen insbesondere in der frühen Phase einer dynamischen T₁-gewichteten MRT nur einen limitierten signalanhebenden Effekt. Andererseits können USPIO mit ausgeprägtem signalanhebendem Effekt, z.B. Ferumoxtran-10, lediglich als Infusion oder langsame Injektion intravenös verabreicht werden. Somit ist bislang mit SPIO oder USPIO die frühe Phase einer T₁-gewichteten dynamischen Untersuchung der Leber im Vergleich zum Einsatz von niedermolekularen unspezifischen Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln von verminderter Aussagekraft (227).

VSOP-C184 zeichnet sich gegenüber bisher in der Leberdiagnostik geprüften SPIO oder USPIO durch die Eigenschaft aus, dass es in der T₁-gewichteten Bildgebung einen stark signalsteigernden Effekt hat und als Bolus applizierbar ist (siehe Kapitel 4.3 und 4.4). Daneben wirkt es wie alle SPIO in der T₂-gewichteten Bildgebung stark signalmindernd (siehe Kapitel 4.6). Daher wurde für das in diesem Kapitel beschriebene Teilprojekt die Hypothese aufgestellt, dass VSOP-C184 in der MRT der Leber in der dynamischen T₁-

gewichteten Bildgebung einen starken Signal steigernden Effekt aufweist und in der T₂-gewichteten Bildgebung der Spätphase einen mit konventionellen SPIO vergleichbaren Signal mindernden Effekt verursacht. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde an einem Lebertumormodell VSOP-C184 bezüglich des Signal steigernden Effektes in der T₁-gewichteten dynamischen Untersuchung mit einem niedermolekularen unspezifischen Gd-haltigen Kontrastmittel sowie bezüglich des Signal mindernden Effektes in der T₂-gewichteten Spätuntersuchung mit einem für die MRT der Leber optimierten SPIO verglichen.

4.5.2 Material und Methoden

4.5.2.1 Tiere und Narkose

Insgesamt wurden 20 Kaninchen (Chinchilla Bastard Kaninchen, Bezugsquelle: Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von $3,5 \pm 0,45$ kg untersucht. Alle im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche wurden zuvor von der entsprechenden Behörde (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin) genehmigt. Für Tumorimplantation und MR-Untersuchung erfolgte die Anästhesie, wie in Kapitel 4.2.3.2 beschrieben. Nach Eintritt der Narkose erfolgte unterhalb des Xyphoid eine Rasur, Hautdesinfektion und eine Minilaparotomie. Nach Hervorluxieren des linken Leberlappens wurden in diesen 0,3-0,5 ml einer VX-2 Tumorzellsuspension, entsprechend 2×10^6 lebender Zellen, injiziert und die Injektionsstelle kurzfristig komprimiert. Nach der Injektion der Tumorzellen wurde der linke Leberlappen wieder reponiert und die Bauchdecke in zwei Schichten verschlossen. Die Tiere wurden 14 – 18 Tage nach Tumorimplantation MR-tomographisch untersucht.

4.5.2.2 Kontrastmittel und Dosierungen

Für diese Studie zur MR-tomographischen Darstellung von Lebertumoren wurde VSOP-C184 aus der für die klinische Prüfung verwendeten Charge 050701 eingesetzt.

Als Vergleichssubstanzen wurden das niedermolekulare, unspezifische Kontrastmittel Gadopentetat Dimeglumin (Magnevist®, Schering AG, Berlin, Germany) sowie das SPIO-Kontrastmittel Ferucarbotran (Resovist®, Schering AG, Berlin Germany) verwendet. Bei 1,5 T sind die Relaxivitäten von Gadopentetat Dimeglumin 4,1 (r_1) und 4,6 (r_2) $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ und von Ferucarbotran 7,4 (r_1) und 95 (r_2) $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ (Angaben für beide Substanzen: persönliche Mitteilung, M. Rohrer und H.-J. Weinmann, Schering AG, Berlin, Deutschland).

Als Dosierungen wurden für VSOP-C184 0,015 und 0,025 mmol Fe/kg verwendet. Die niedrigere dieser Dosierungen wurde gewählt, da diese klinisch in Diagnostik der Leber

auch für Ferucarbotran eingesetzt wird. Die höhere Dosis wurde gewählt, da für diese Dosis experimentell in der First-Pass MR-Angiographie ein mit einer Standarddosis von Gadopentetat Dimeglumin vergleichbares intravasales Signalenhancement gefunden wurde (Kapitel 4.4). Für Gadopentetat Dimeglumin wurde eine Dosis von 0,15 mmol Gd/kg verwendet. Diese Dosis liegt zwischen der für die MRT der Leber häufig verwendeten Dosis (0,1 mmol Gd/kg) und der Dosis, die häufig für die First-Pass MR-Angiographie (0,2 mmol Gd/kg) eingesetzt wird. Für Ferucarbotran wurde eine Dosis von 0,015 mmol Fe/kg verwendet, da diese theoretisch der klinisch maximal vorkommenden Dosierung entspricht. Ferucarbotran wird klinisch in zwei verschiedenen Mengen verabreicht und nur grob an das Körpergewicht angepasst. VSOP-C184 wurde für die Bolusinjektion mit 6% Mannitol Lösung auf 0,075 mmol Fe/ml verdünnt, um eine für die Bolusinjektion gut handhabbare Menge zu erhalten. Gadopentetat Dimeglumin wurde in der unverdünnten 0,5 M Lösung verwendet. Ferucarbotran wurde in der gleichen Weise wie VSOP-C184 verdünnt. Die Kontrastmittelinjektion erfolgte jeweils als Bolus mit 0,5 ml/s, gefolgt von einer Injektion mit 5 ml NaCl, ebenfalls mit 0,5 ml/s. Pro Kontrastmittel und Dosis wurden 5 Tiere untersucht (insgesamt 20 Tiere).

4.5.2.3 MR-Tomographie

Die Untersuchungen fanden bei 1,5 T an einem Ganzkörpertomographen (Magnetom Vision, Siemens AG, Erlangen, Germany) unter Verwendung der standardmäßigen Extremitätenspule statt (Kapitel 4.2.5). Für die T_1 -gewichtete Bildgebung wurde eine zweidimensionale Gradientenecho (T_1 -GRE) Sequenz (fast low angle shot Technik) mit einem TR von 35 ms, einem TE von 4,1 ms, und einem Anregungswinkel von 60° verwendet (Schichtdicke = 3 mm, Schichtzahl = 3, Schichtabstand = 0,6 mm, transversale Schichtorientierung, Matrix 87 x 256, FOV 150 x 300 mm, Aufnahmezeit 6 s). Für die T_2 -gewichtete Bildgebung wurde eine Turbo Spinecho (T_2 -TSE) Sequenz verwendet (TR = 1800 ms, TE = 85 ms, Schichtdicke = 4 mm, Schichtzahl = 9, Schichtabstand = 0,6 mm, transversale Schichtorientierung, Matrix = 120 x 256, FOV = 110 x 220 mm, Aufnahmezeit = 7 min und 12 s). Bei beiden Messungen wurde die Phasenkodierrichtung in lateraler Richtung vorgenommen, um Pulsationsartefakte der großen Gefäße in Projektion auf die Leber zu vermeiden.

Nach Positionierung der Tiere in der Extremitätenspule in Rückenlage und Akquisition einer Übersichtssequenz wurden bei jedem Tier mit oben genannten Sequenzen insgesamt 10 Bilddatensätze nach folgendem Protokoll aufgenommen: Präkontrast T_2 -TSE Sequenz; dynamische Messung mit der T_1 -GRE Sequenz, wobei 8 Messungen in Folge erfolgten, hierbei wurde unmittelbar zum Ende der ersten Messung in einer Messpause von 5 s das Kontrastmittel injiziert, anschließend erfolgten die 7 weiteren T_1 -

GRE Messungen in Serie, jeweils ohne Pause. Mit dieser Serie wurde die Kontrastmitteldynamik bis 42 s nach Injektion aufgezeichnet. Abschließend wurde bei 5 min nach Injektion die T₂-TSE Sequenz wiederholt.

Nach Abschluss der jeweiligen MR-Untersuchung wurden die Tiere in tiefer Narkose durch intravenöse Injektion von 1,5 ml T61 (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) getötet, die Leber entnommen, lamelliert, makroskopisch auf das Vorhandensein von Lebertumoren begutachtet und das Ergebnis dokumentiert.

4.5.2.4 Auswertung

In allen Bilddatensätzen wurde durch Vergleich mit den Nachbarschichten jeweils eine Schicht identifiziert, in der sowohl der Lebertumor als auch eine größere Fläche Lebergewebe ohne Partialvolumen abgrenzbar waren. In diesen Schichten wurden mittels ROI Messungen die SI von Leber (SI_{Leber}), Tumor (SI_{Tumor}) und Rauschen (SI_{Rauschen}) ermittelt. Bei der Messung von SI_{Leber} wurde darauf geachtet, dass keine größeren Blutgefäße in der ROI beinhaltet waren. Bei der Messung von SI_{Tumor} wurde anhand der T₂-TSE Bilder darauf geachtet, dass die ROI kein größeres nekrotisches Areal beinhaltete. SI_{Rauschen} wurde in Frequenzkodierichtung ventral neben dem Kaninchen bestimmt, so dass keine durch Atmung oder Gefäßpulsation bedingten Bewegungsartefakte mit erfasst wurden. Aus den derart ermittelten Werten wurde für jedes Tier und alle Zeitpunkte das S/R, sowie als Parameter für den Kontrast zwischen Leber und Tumor das SD/R berechnet ($SD/R = [SI_{Leber} - SI_{Tumor}] / SI_{Rauschen}$). Aus den errechneten Werten wurden für die jeweils 5 Tiere, die pro Kontrastmittel und Dosierungen untersucht wurden, die Mittelwerte mit den dazu gehörigen Standardabweichungen bestimmt und graphisch dargestellt.

Für die statistische Auswertung wurde eine nicht parametrische Varianzanalyse nach Zeitpunkten und Kontrastmittelgruppen durchgeführt (2, 32). Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0.05$ festgelegt.

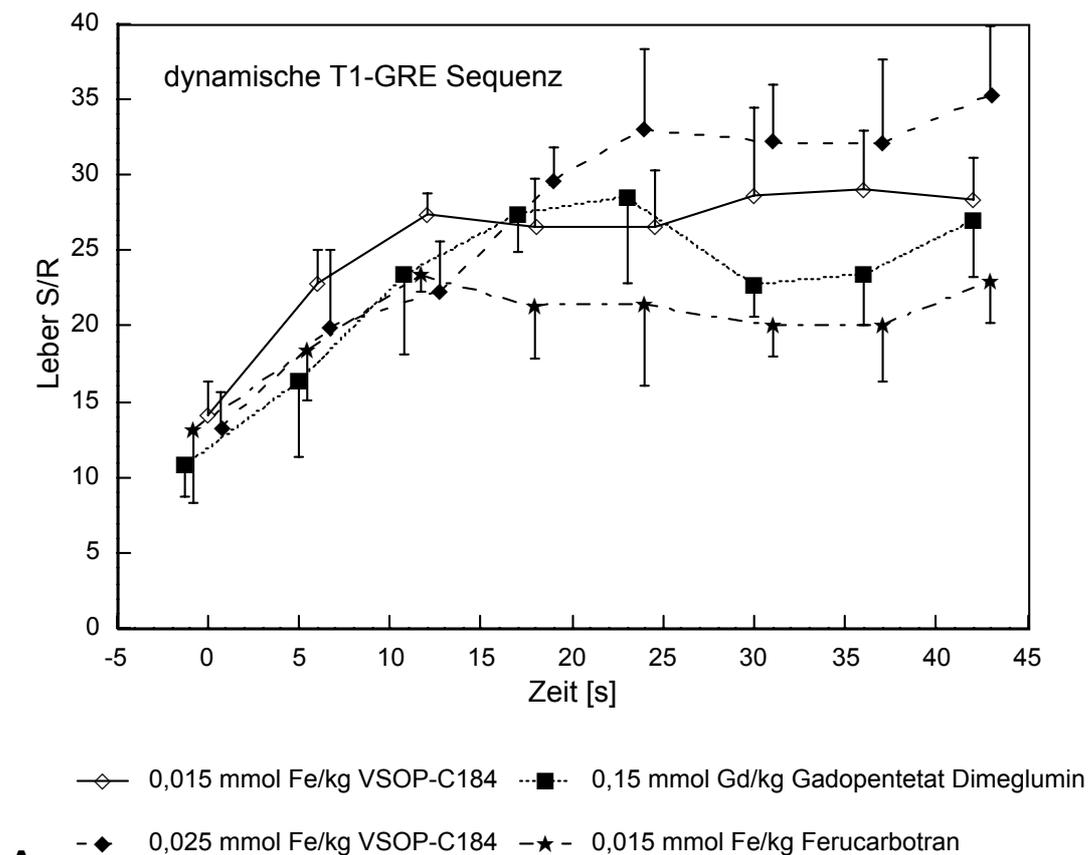
4.5.3 Ergebnisse

Alle Untersuchungen konnten technisch erfolgreich durchgeführt werden. Bei allen Tieren wurden am Leberpräparat ein oder mehrere Lebertumoren nachgewiesen und sichergestellt, dass die entsprechende MR-Messung und die quantitative Auswertung einen Lebertumor mit dem umgebenden Lebergewebe erfasst hat.

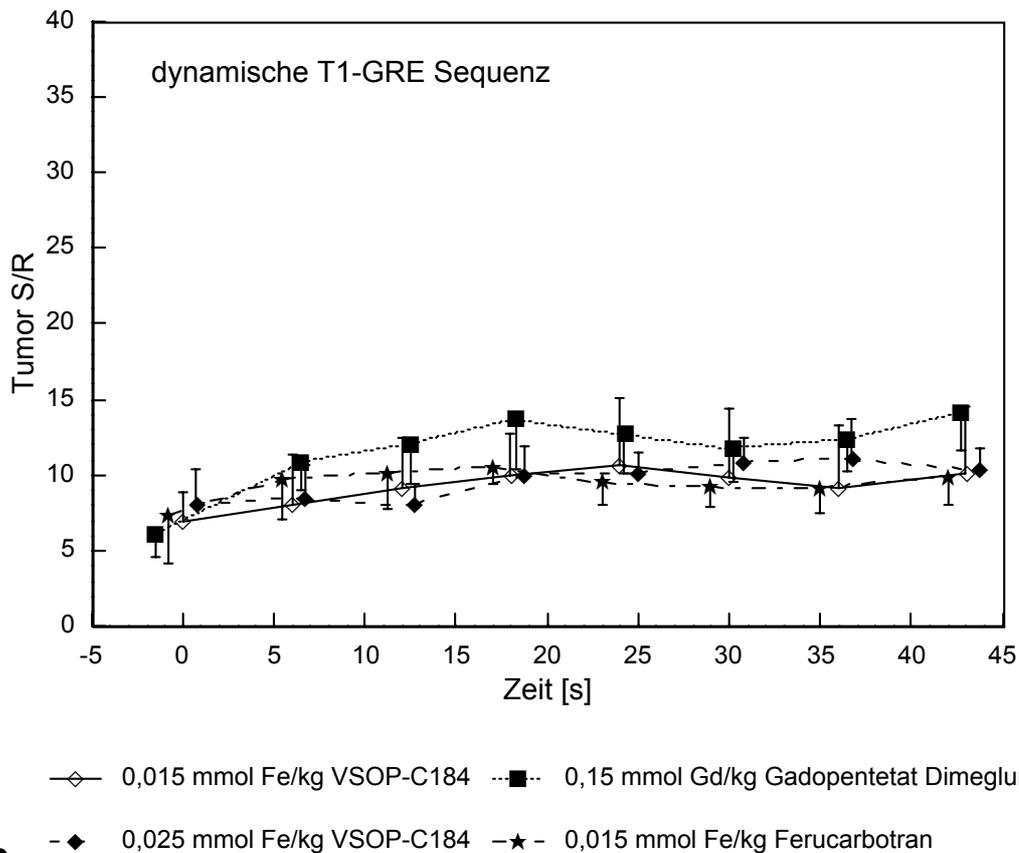
4.5.3.1 T₁-gewichtete dynamische Bildgebung

In den nativen T₁-GRE Bildern stellten sich die Lebertumoren hypointens im Vergleich zum Lebergewebe dar. Nach Injektion von VSOP-C184 kam es in den dynamischen T₁-

GRE Bildern für beide Dosierungen zu einem Anstieg von S/R_{Leber} , der für die höhere Dosis (0,025 mmol Fe/kg) im Vergleich zur niedrigen Dosis (0,015 mmol Fe/kg) ausgeprägter war, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Dosierungen (Abbildung 4.6). Für keine der beiden Dosierungen von VSOP-C184 kam es zu einer signifikanten Änderung von S/R_{Tumor} (Abb 1 B). In den T_1 -GRE Bildern resultierte in der untersuchten Zeit bis 42 s nach Injektion für beide Dosierungen von VSOP-C184 ein signifikanter Anstieg von SD/R , wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Dosierungen gefunden wurde. Das Maximum von SD/R lag jeweils zwischen 24 und 42 s (Abbildung 4.6 C, Abbildung 4.7 A-D). Für Gadopentetat Dimeglumin kam es in der dynamischen T_1 -gewichteten Untersuchung ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg von S/R_{Leber} , der bis 24 s vergleichbar mit dem der beiden Dosierungen von VSOP-C184 war (Abbildung 4.6 A). Gadopentetat Dimeglumin führte auch zu einem signifikanten Anstieg von S/R_{Tumor} , der im Vergleich zu S/R_{Leber} geringer ausgeprägt war (Abbildung 4.6 B). Hieraus resultierte für Gadopentetat Dimeglumin ein Anstieg von SD/R , der ein Maximum bei 12 s nach Injektion hatte und im Maximum vergleichbar mit dem für beide Dosierungen von VSOP-C184 erreichten SD/R war (Abbildung 4.6 C, Abbildung 4.7 E,F). Für Ferucarbotran kam es in der dynamischen T_1 -GRE Untersuchung für alle Zeitpunkte zu einem signifikanten Anstieg von S/R_{Leber} (Abbildung 4.6 A). Für Ferucarbotran wurde hier keine Änderung von S/R_{Tumor} gemessen (Abbildung 4.6 B). Es resultierte für Ferucarbotran ein signifikanter Anstieg von SD/R für alle Zeitpunkte der dynamischen T_1 -GRE Untersuchung mit einem Maximum bei 18 s nach Injektion (Abbildung 4.6 C, Abbildung 4.7 G,H). In der T_1 -gewichteten dynamischen Untersuchung unterschied sich das maximal für Ferucarbotran erzielte SD/R nicht von dem maximal für Gadopentetat Dimeglumin erreichten SD/R , es lag andererseits signifikant unter dem maximal für beide Dosierungen von VSOP-C184 erreichten SD/R .

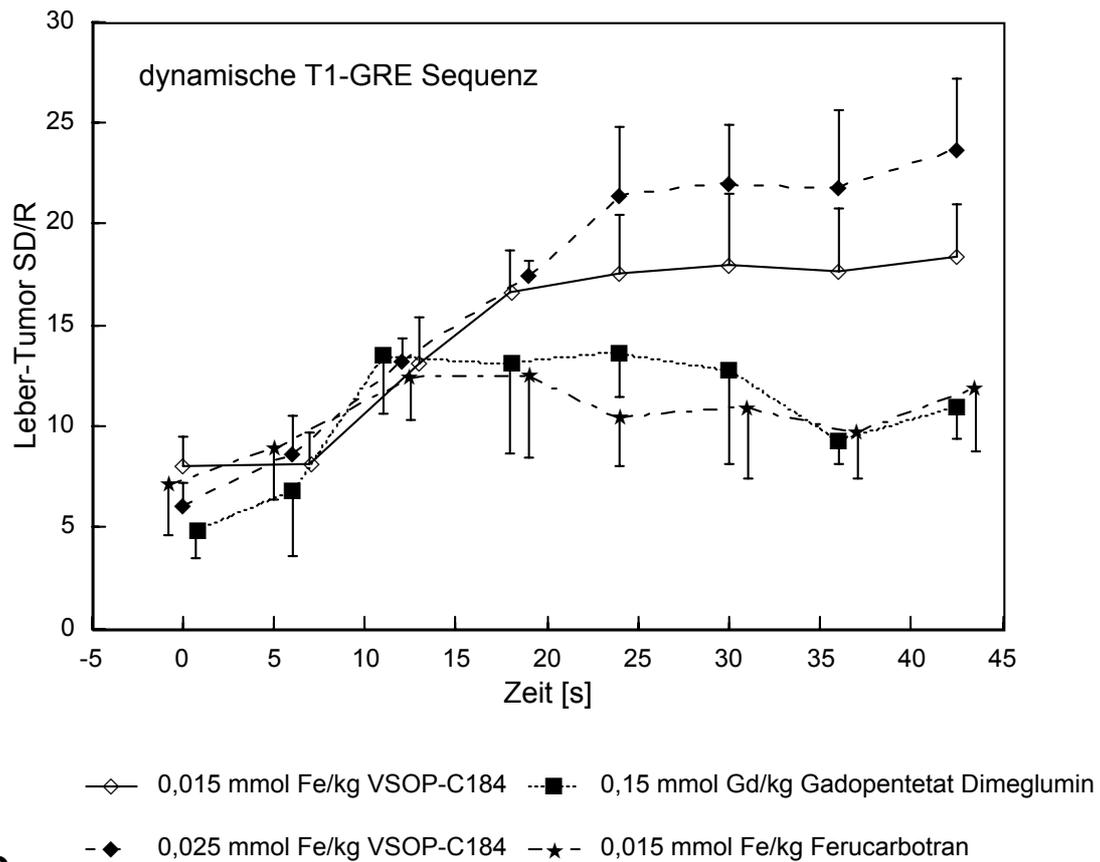


A



B

Abbildung 4.6: Fortsetzung und Legende auf der folgenden Seite



C

Abbildung 4.6: Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/R) von Leber (A) und Tumor (B) sowie Signaldifferenz-zu-Rausch-Verhältnis (SD/R) zwischen Leber und Tumor (C) in der T₁-gewichteten dynamischen MR-Bildgebung mit bolusförmiger intravenöser Injektion von VSOP-C184 (0,015 und 0,025 mmol Fe/kg), Gadopentetat Dimeglumin (0,15 mmol Gd/kg) und Ferucarbotran (0,015 mmol Fe/kg), Sequenz: GRE, TR=35 ms/TE=4,1 ms/Anregungswinkel=60°

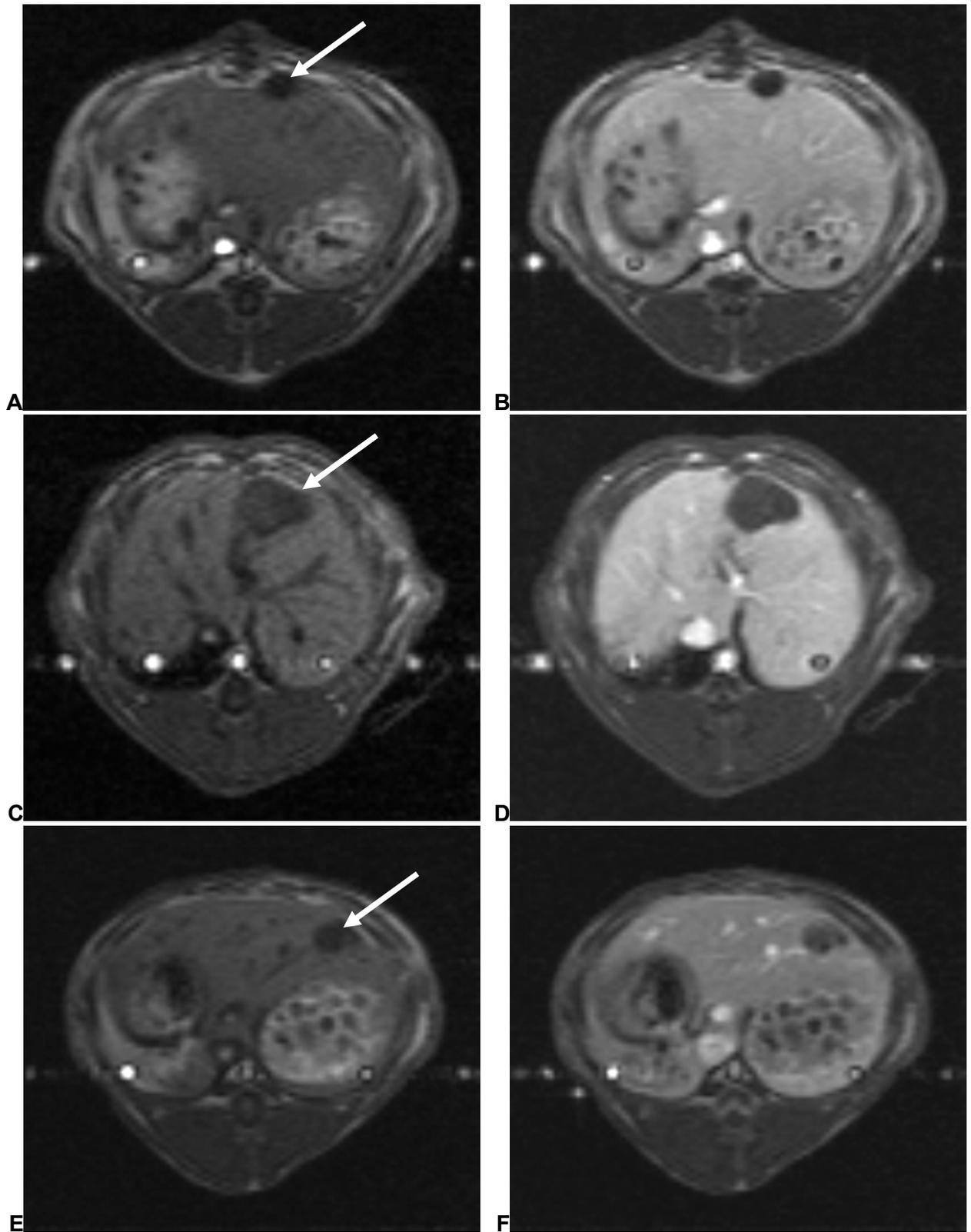


Abbildung 4.7: Fortsetzung und Legende auf der folgenden Seite

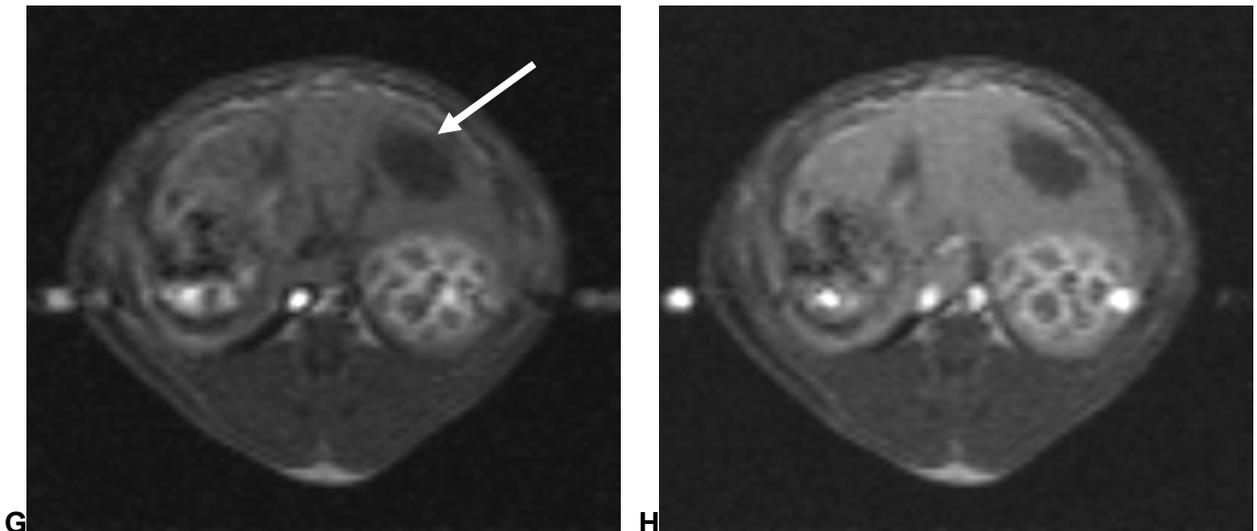


Abbildung 4.7:

Axiale T_1 -gewichtete MR-Aufnahmen durch den Oberbauch von Kaninchen mit implantiertem VX2-Karzinom in der Leber (Pfeile) vor sowie 24 s nach bolusförmiger intravenöser Injektion von VSOP-C184 (A, B, 0,015 und C, D, 0,025 mmol Fe/kg), Gadopentetat Dimeglumin (E, F, 0,15 mmol Gd/kg) und Ferucarbotran (G, H, 0,015 mmol Fe/kg), Sequenz: GRE, TR=35 ms/TE=4,1 ms/ $\alpha=60^\circ$. In allen Untersuchungen nach Kontrastmittelinjektion Anstieg des Lebertumor-Kontrastes, der für die beiden Dosierungen von VSOP-C184 am stärksten ausgeprägt ist.

4.5.3.2 T_2 -gewichtete späte Bildgebung

In den nativen T_2 -TSE Bildern stellten sich die Lebertumoren mässig hyperintens im Vergleich zum Lebergewebe dar. Nach Injektion von VSOP-C184 kam es für beide Dosierungen (0,015 mmol Fe/kg und 0,025 mmol Fe/kg) im T_2 -TSE Bild zu einem signifikanten Abfall von S/R_{Leber} ohne Unterschied zwischen den beiden Dosierungen (Abbildung 4.8 A), während sich für keine der Dosierungen das S/R_{Tumor} änderte (Abbildung 4.8 B). Hieraus resultierte für beide Dosierungen von VSOP-C184 ein signifikanter Anstieg des Absolutwertes von SD/R, ohne Unterschied zwischen den beiden Dosierungen (Abbildung 4.8 C, Abbildung 4.9 A-D). Für Gadopentetat Dimeglumin wurde nach intravenöser Injektion keine signifikante Änderung des Absolutwertes von S/R_{Leber} oder S/R_{Tumor} gemessen (Abbildung 4.8 A,B), der resultierende Absolutwert für SD/R zeigte keine signifikante Änderung und lag signifikant unter dem Wert von VSOP-C184 (Abbildung 4.8 C, Abbildung 4.9 E, F). Nach Injektion von Ferucarbotran nahm das S/R_{Leber} signifikant ab und erreichte den gleichen Wert wie für beide Dosierungen von VSOP-C184 (Abbildung 4.8 A), der Wert für S/R_{Tumor} änderte sich nicht (Abbildung 4.8 B). Hieraus resultierte für Ferucarbotran ein signifikanter Anstieg des Absolutwertes von SD/R, der sich von den Werten für beide Dosierungen von VSOP-C184 nicht unterschied (Abbildung 4.8 C, Abbildung 4.9 G,H).

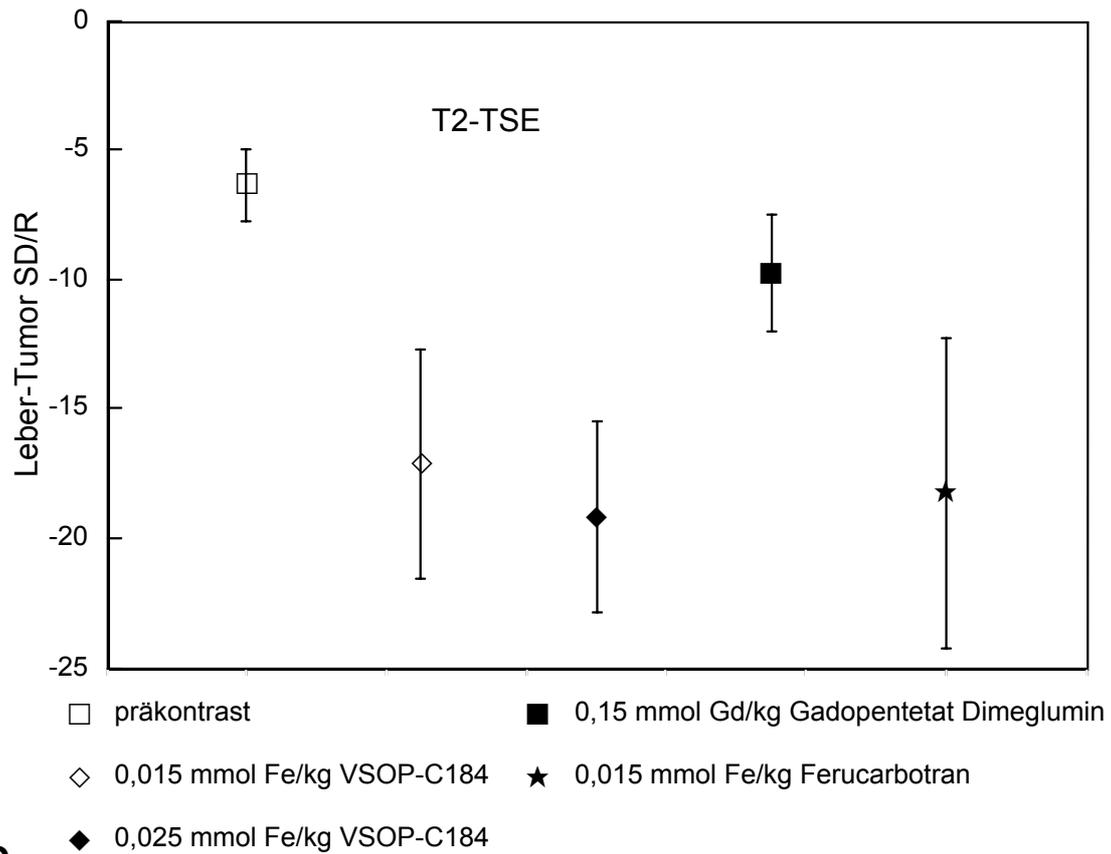


Abbildung 4.8:

Signal-zu-Rausch-Verhältnisse (S/R) von Leber (A), Tumor (B) und Signaldifferenz-zu-Rausch-Verhältnis (SD/R) zwischen Leber und Tumor (C) in der T₂-gewichteten MR-Bildgebung vor sowie nach bolusförmiger intravenöser Injektion von VSOP-C184 (0,015 und 0,025 mmol Fe/kg), Gadopentetat Dimeglumin (0,15 mmol Gd/kg) und Ferucarbotran (0,015 mmol Fe/kg), Sequenz: T2-TSE, TR=1800 ms/TE=85 ms.

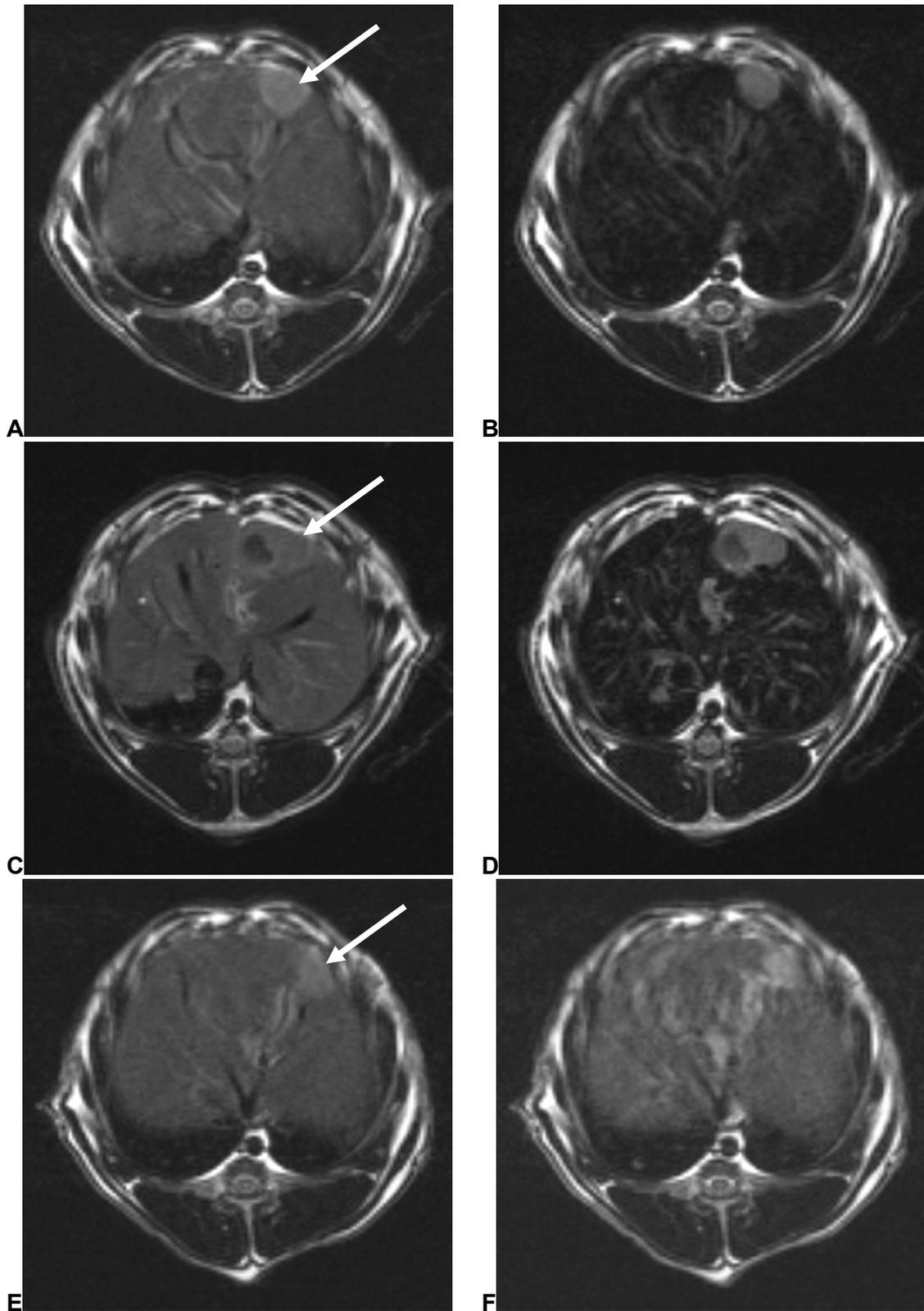


Abbildung 4.9: Fortsetzung und Legende auf der folgenden Seite

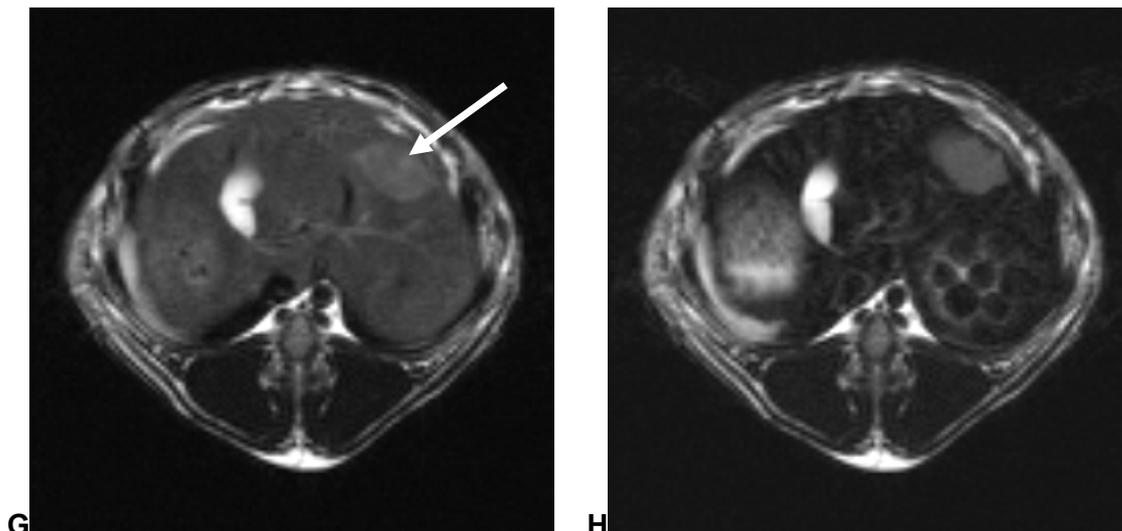


Abbildung 4.9: Axiale T₂-gewichtete MR-Aufnahmen durch den Oberbauch von Kaninchen mit implantiertem VX2-Karzinom in der Leber (Pfeile) vor sowie 5 min nach bolusförmiger intravenöser Injektion von VSOP-C184 (A, B, 0,015 und C, D, 0,025 mmol Fe/kg), Gadopentetat Dimeglumin (E, F, 0,15 mmol Gd/kg) und Ferucarbotran (G, H, 0,015 mmol Fe/kg), Sequenz: T2-TSE, TR=1800 ms/TE=85 ms. Für beide Dosierungen von VSOP-C184 kommt es zu einem starken Signalabfall im Leberparenchym. Dieser ist mit dem Effekt durch Ferucarbotran vergleichbar. Es resultiert in allen Fällen ein hoher Leber-Tumor-Kontrast. Die Injektion von Gadopentetat Dimeglumin hat in der T₂-gewichteten Aufnahme keinen Einfluss auf den Leber-Tumor-Kontrast.

4.6 *Entwicklungskandidat für die klinische Prüfung*

VSOP-C184: Präklinische Charakterisierung – Toxikologie und Wirksamkeit

4.6.1 Einleitung

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die wesentlichen Wirksamkeitsprüfungen während der Entwicklung des Eisenoxid-basierten, Citrat-beschichteten MR-Kontrastmittels VSOP beschrieben. In Zusammensicht mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur kurz zusammengefassten orientierenden Untersuchungen zu den verschiedenen Vorläufern bezüglich der physikalischen Eigenschaften (T_1 - und T_2 -Relaxivität), der Pharmakokinetik (Bluthalbwertszeit, Organverteilung) und Toxikologie (siehe Kapitel 3.5) hatte sich die Version VSOP-C184 als optimal erwiesen. Daher wurde entschieden, mit dieser Substanz die notwendigen präklinischen Untersuchungen durchzuführen, die eine weiterführende klinische Prüfung ermöglichen würden. Die Auswahl dieser präklinischen Untersuchungen (Toxikologie, Pharmakokinetik, Wirksamkeit an Tieren) erfolgte gemäß den ICH-Richtlinien (90). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden folgende Untersuchungen in Anlehnung an die geltenden GLP-Richtlinien durchgeführt:

- Pharmakokinetik an Ratte und Schwein mit Untersuchungen zur Organverteilung
- Pharmakodynamik
- Wirksamkeit in der MR-Tomographie
- Toxizität nach wiederholter Gabe an Ratte und Schwein

Diejenigen Untersuchungen, von deren Ergebnis die Durchführbarkeit einer ersten klinischen Prüfung unmittelbar abhängt und daher streng nach GLP-Richtlinien durchgeführt werden mussten, wurden extern bei einem CRO, der Firma LPT, Hamburg, (siehe Kapitel 3.2) in Auftrag gegeben. Dies waren:

- Einfluss auf kardiovaskuläre Parameter am Schwein,
- Akute Verträglichkeit nach Einmalgabe an Maus und Ratte,
- Lokale Verträglichkeit am Kaninchen,
- Einfluss auf Salurese und Diurese an der Ratte,
- Einfluss auf die Spontanmotilität an der Ratte,
- Genotoxizität: Amestest und Mikrokerntest,

Unter Berücksichtigung der entsprechenden regulatorischen Aspekte (Kapitel 3.2) und aufbauend auf den bisherigen eigenen Ergebnissen mit der Prüfsubstanz bzw. mit deren Vorläufern wurden die Inhalte dieser letztgenannten Untersuchungen gemeinsam mit LPT festgelegt. Die im Folgenden beschriebenen Methoden und Ergebnisse zu den Untersuchungen, die bei LPT durchgeführt wurden, sind in Anlehnung an die von LPT erstellten Prüfberichte verfasst. Die Methoden und Ergebnisse zu den Untersuchungen, die in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, sind im Wesentlichen deckungsgleich mit den entsprechenden Passagen der dazu gehörigen selbst erstellten Prüfberichte.

Die in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen waren von der zuständigen Behörde zuvor genehmigt worden (siehe Kapitel 4.2.3).

4.6.2 Material und Methoden

4.6.2.1 Prüfsubstanz und Dosierungen

Als Prüfsubstanz (präklinisches Produkt) wurde die Charge VSOP-C184 050701 eingesetzt, sowie für einzelne Untersuchungsabschnitte die Vorstufen VSOP-C180 und VSOP-C183, die sich nur minimal bezüglich der galenischen Formulierung unterschieden. Einzelheiten hierzu sind in Kapitel 3.6.1 erläutert.

Für die in vivo Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Wirksamkeit in der MR Bildgebung wurde VSOP-C184 in den drei Dosierungen 0,015, 0,045 und 0,075 mmol Fe/kg eingesetzt. In Vorversuchen zur MR-Angiographie hatte sich abgezeichnet, dass mit einer Dosis von 0,075 mmol Fe/kg der Bereich der Überdosierung mit Signalminderung auch in MR-Angiographie Sequenzen mit kurzer Echozeit erreicht ist. Für alle Versuche wurde das Kontrastmittel i.v. als Bolus injiziert, d.h. mit einer Injektionsdauer von 2 - 4 s an der Ratte und von 4 - 8 s am Schwein. Die speziellen Dosierungen für die Untersuchungen zur Sicherheitspharmakologie und Toxikologie sind an entsprechender Stelle erwähnt.

4.6.2.2 Pharmakokinetik

4.6.2.2.1 Plasma-Pharmakokinetik

Daten zur Plasma-Pharmakokinetik nach i.v. Injektion von VSOP-C184 wurden an Ratten und Schweinen sowohl mittels Relaxometrie als auch mittels quantitativer Eisenbestimmung erhoben. Hierzu wurden für die drei Dosierungen an jeweils 6 weiblichen und 6 männlichen Wistar-Ratten (insgesamt 36 Tiere, Alter ca. 65 Tage, Gewicht ca. 280 gr (weiblich) und ca. 340 gr (männlich)) vor sowie 2 min, 30 min, 60 min,

4 h und 24 h nach i.v. Injektion von VSOP-C184 jeweils 0,2 ml Blut über eine Schwanzvene entnommen und hieraus 100 µl Citratplasma gewonnen. Bei männlichen Minischweinen (insgesamt 9 Tiere, Alter ca. 6 Monate, Gewicht 16,75 – 20 kg) wurden für die drei Dosierungen (n=3/Dosis) je 2 ml Blut vor sowie 1, 2, 5, 15, 30, 45, und 60 min nach Injektion über eine Gliedmaßenvene entnommen, hieraus je 1 ml Citratplasma gewonnen und die T_1 - und T_2 -Relaxationszeit gemessen. Anschließend wurden die Plasmaproben mittels AES untersucht. Halbwertszeiten für den zeitlichen Verlauf der Eisenkonzentration sowie der T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten wurden unter Annahme einer Kinetik 1. Ordnung (66) mittels Anpassung mit einer monoexponentziellen e-Funktion ermittelt.

4.6.2.2 Eisengehalt in Leber, Milz und Restkörper

Weitere Daten zur Pharmakokinetik wurden anhand quantitativer Eisenbestimmungen von Leber, Milz und Restkörper und mittels MR-Bildgebung durch Bestimmung der SI-Werte von Leber und Milz erhoben. Hierzu wurden Ratten 24 h und 28 d nach i.v. Injektion von VSOP-C184 untersucht.

Für die quantitative Bestimmung von Eisen in Leber, Milz und Restkörper wurden für die Kontrolle (NaCl) sowie für jede der drei Dosierungen von VSOP-C184 zu den beiden postkontrast Zeitpunkten je 3 männliche und 3 weibliche Wistar Ratten untersucht (insgesamt 48 Tiere: Alter ca. 85 Tage, Gewicht zu Beginn der Untersuchung ca. 320 gr (weiblich) oder ca. 400 gr (männlich)). Zum Untersuchungszeitpunkt wurden die Tiere in tiefer Anästhesie durch Exsanguinieren getötet. Um eine Verfälschung der quantitativen Eisenbestimmungen durch den Bluteisengehalt zu minimieren, wurde hierbei das gesamte Blut durch Plasma Expander (Expafusin sine, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) ersetzt. Pro Ratte wurden je eine Probe von Leber, Milz und vom aufgeschlossenen Restkörper bezüglich des Eisengehaltes mit AES untersucht (siehe Kapitel 4.2.4).

Mit der MR-Bildgebung wurde der Verbleib bzw. der Abbau von VSOP-C184 in Leber und Milz erfasst. Für die Kontrolle (NaCl) und die drei Dosierungen von VSOP-C184 wurden je 3 männliche Wistar-Ratten (insgesamt 12 Tiere: Alter ca. 45 Tage, Gewicht zu Beginn der Untersuchung ca. 230 gr) vor sowie 24 h und 28 Tage nach intravenöser Injektion untersucht (Magnetom Vision, 1,5 T, Kniespule; SE Sequenz: TR = 450 ms, TE = 12 ms, FOV = 100 x 200 mm, Matrix = 128 x 256 mm, axiale Schichtorientierung, Schichtdicke = 3 mm, 20 Schichten, Aufnahmezeit = 3 min und 53 s). Es wurde S/R_{Leber} und S/R_{Milz} ermittelt.

4.6.2.3 Wirksamkeit in der MR-Tomographie

4.6.2.3.1 Intravasuläres Signalverhalten an der Ratte

Für alle drei Dosierungen von VSOP-C184 wurden jeweils 6 männliche Wistar Ratten (insgesamt 18 Tiere: Alter 85 Tage, Gewicht ca. 420 gr) vor sowie kontinuierlich mit 7 Messungen bis 30 min nach i.v. Injektion am MR-Tomographen untersucht (Magnetom Vision, 1,5 T, Kniespule; 3D FLASH-Sequenz: TR = 6,6 ms, TE = 2,3 ms, $\alpha = 25^\circ$, FOV = 197 x 300 mm, Matrix = 235 x 512 mm, koronare Schichtorientierung, Blockdicke = 50 mm, 40 3D-Partitionen aufgenommen, 80 rekonstruiert, effektive Partitionsdicke = 0,625 mm, Aufnahmezeit = 1 min und 25 s). Es wurde das S/R_{Blut} ausgewertet.

4.6.2.3.2 MR-Angiographie der Koronararterien am Schwein

Für alle drei Dosierungen wurden bei je drei Minischweinen MR-Untersuchungen des Herzens durchgeführt. Messungen wurden vor sowie bei 0, 5, 10, 30, 45 und 60 min nach i.v. Injektion von VSOP-C184 durchgeführt. Die Messungen sowie deren Auswertung erfolgte in gleicher Weise, wie in Kapitel 4.3.2.3 für die MR-Angiographie der Koronararterien beschrieben.

4.6.2.4 Sicherheitspharmakologie und Toxikologie

4.6.2.4.1 Einfluss auf die kardiovaskuläre Physiologie am Schwein

Folgende Parameter wurden nach i.v. Injektion von 0,15 ml/kg 6% wässriger Mannitol Lösung und 0,075 mmol Fe/kg VSOP-C184 gemessen: (1) Peripherer Blutdruck in der A. femoralis (systolischer, diastolischer Wert, Mittelwert); (2) Blutdruck in der A. pulmonalis (systolischer und diastolischer Wert), pulmonaler Kapillardruck (Wedge Druck); (4) EKG und Herzfrequenz; (5) Ejektionsfraktion und Schlagvolumen; (6) systolischer linksventrikulärer Druck, dp/dt max; (7) zentralvenöser Druck; (8) Atemfrequenz und -tiefe; (9) Blutgase. Vor der ersten Gabe sowie zu geeignet erscheinenden Zeitpunkten nach Gabe der Kontrolllösung bzw. der Prüfsubstanz wurde Noradrenalin und Isoproterenol i.v. injiziert, um die Reaktivität des Herz-Kreislaufsystems zu prüfen (112).

4.6.2.4.2 Akute Verträglichkeit nach Einmalgabe an Maus und Ratte

An Mäusen und Ratten wurden fünf Dosierungen von VSOP-C184 untersucht (0,83, 1,79, 3,85, 8,3 und 17,9 mmol Fe/kg), wobei in jeder Dosisgruppe jeweils fünf Tiere eine einzelne i.v.-Bolusinjektion der Substanz über eine Schwanzvene erhielten. Die Tiere wurden hinsichtlich verschiedener Vitalitätsparameter (Motilität, Gleichgewicht, allgemeines Befinden) untersucht, und zwar vor der Injektion sowie unmittelbar nach der Injektion und bei 5, 15, 30 und 60 Minuten sowie bei 3, 6 und 24 Stunden nach Injektion.

Die LD₅₀ wurde mittels Regressionsanalyse berechnet. Mortalitätsraten wurden für 24 Stunden und 14 Tage ermittelt.

4.6.2.4.3 Verträglichkeit nach wiederholter Gabe an Ratte und Schwein

An Ratten wurden die Untersuchungen zur Toxizität nach wiederholter Gabe der Prüfmedikation unter Verwendung der Formulierungen VSOP-C180 und -C183 durchgeführt. Diese Substanzen stellten Vorläufer der endgültigen Formulierung VSOP-C184 dar und unterschieden sich von diesen nur geringfügig (siehe Kapitel 3.6). Je fünf männliche und weibliche Ratten erhielten eine intravenöse Injektion von VSOP-C183 mit den Dosierungen 0,075, 0,75 und 2 mmol Fe/kg. Zehn zusätzliche Ratten (fünf männliche und fünf weibliche Tiere) erhielten eine intravenöse Injektion von 0,9 % NaCl-Lösung als Kontrollgruppe. In Anbetracht der bekannten langen Verweildauer von Eisenoxid-Partikeln in der Leber (265) wurde die wiederholte Gabe nicht an aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, sondern zweimal pro Woche über einen Zeitraum von zwei Wochen. Dies resultierte in einer Gesamtzahl von vier Injektionen pro Tier. Für die höchste Einzeldosis von 2 mmol Fe/kg führte dies zu einer kumulativen Dosis von 8 mmol Fe/kg. Diese Dosis beträgt mehr als das 100-fache der wahrscheinlich maximalen klinisch sinnvoll einsetzbaren Dosis von 0,075 mmol Fe/kg. Eine Woche nach der letzten Injektion wurde den Tieren Blut für Laboruntersuchungen abgenommen und die Tiere anschließend getötet.

Vier Schweine erhielten eine intravenöse Injektion von VSOP-C180 oder -C183 in einer Dosis von 0,75 mmol Fe/kg zweimal pro Woche über einen Zeitraum von zwei Wochen. Dies resultierte in einer Gesamtzahl von vier Injektionen mit einer kumulativen Dosis von 3 mmol Fe/kg. Vier weitere Schweine wurden zu Kontrollzwecken untersucht und erhielten intravenöse Injektionen von 0,9%iger NaCl-Lösung.

4.6.2.4.4 Untersuchung der lokalen Verträglichkeit an Kaninchen

Es wurden am Kaninchen Untersuchungen zur lokalen Verträglichkeit nach intravenöser intraarterieller, subkutaner, intramuskulärer und paravenöser Injektion durchgeführt. Dies dient als Sicherheitsparameter für die Abschätzung der Folgen einer Fehlinjektion im klinischen Einsatz. Die Wahl der Injektionsorte beinhaltet die möglichen Lokalisationen der Fehlinjektion bei primär geplanter intravenöser Injektion.

Es wurden 6 Himalaya-Kaninchen von Charles River (3 männliche und 3 weibliche Tiere) mit einem Gewicht von 2,4 bis 2,6 kg untersucht. Folgende Injektionen der 0,5 molaren Prüfsubstanz VSOP-C184 wurden an jedem Tier auf der linken Körperseite durchgeführt:

- Intravenös: 5 ml in die Ohrtrandvene, dies entspricht dem 10-fachen der angestrebten maximalen Humandosis,
- subkutan: 1 ml unter die Rückenhaut,
- intramuskulär: 0,5 ml in den M. gastrocnemius,
- paravenös: 0,5 ml an der V. saphena parva,
- intraarteriell: 1 ml in die zentrale Ohrarterie.

Als Kontrolle erhielten die Tiere Injektionen mit 0,9% NaCl-Lösung an den entsprechenden Stellen und mit entsprechenden Injektionsmengen auf der rechten Seite. Je ein Männchen und ein Weibchen wurden 48, 96 Stunden und 14 Tage nach Injektion getötet und die Injektionsstellen entnommen. Es erfolgte eine makroskopische Beurteilung und eine histologische Aufarbeitung anhand von Paraffin-Präparaten nach HE-Färbung.

4.6.2.4.5 Einfluss auf die Salurese und Diurese an der Ratte

Mit dem Ziel, den Einfluss der i.v. Injektion von VSOP-C184 auf die Salurese und Diurese zu erfassen, wurden insgesamt 40 Tiere untersucht. Die Ratten (Sprague-Dawley, 160-200g, Charles-River) erhielten folgende Dosierungen: 0,18, 0,54, 1,8 mmol Fe/kg (n=10 Weibchen pro Dosis). Eine Kontrollgruppe erhielt aqua ad injectabilia. Der Urin wurde in den Zeitintervallen 0-1, 2-3, 3-4 und 5-24 Stunden nach Injektion in speziellen Stoffwechsellkäfigen gesammelt. Im Urin wurden Chlorionen, Natriumionen und Kaliumionen quantitativ bestimmt.

4.6.2.4.6 Einfluss auf die Spontanmotilität an der Maus

Mit dem Ziel, den Einfluss einer intravenösen Injektion auf die Spontanmotilität von Mäusen zu untersuchen, wurde VSOP-C184 in drei Dosisgruppen (0,18, 0,385, 0,83 mmol Fe/kg) im Vergleich zu einer 6% Mannitol-Lösung getestet. Die Untersuchungen erfolgten an weiblichen CD-1/NMRI Mäusen (insgesamt 32 Tiere) von Charles River mit einem Gewicht zwischen 18-23 g. In jeder Gruppe wurden 8 Tiere untersucht.

4.6.2.4.7 Genotoxizität

Die Zytotoxizität und Mutagenität wurden mittels des hierfür allgemein gebräuchlichen Ames Test („Salmonella typhimurium reverse mutation in vitro assay“) geprüft (5). VSOP-C184 wurde in den fünf Salmonella-typhimurium-Zelllinien TA-98, TA 100, TA 102, TA 1535 und TA 1537 in zwei unabhängigen Experimenten, jeweils ohne und mit metabolischer Aktivierung geprüft (139). Das erste Experiment wurde als Plättcheninkorporationstest und das zweite Experiment wurde als Präinkubationstest mit Eisenkonzentrationen zwischen 6 und 104 µmol Fe pro Plättchen durchgeführt. Zusätzlich

wurden die mutagenen Eigenschaften von VSOP-C184 mit dem hierfür üblicherweise benutzten Mikrokerntest an Knochenmarkzellen der Sprague-Dawley-Ratte geprüft (139). Hierzu wurde VSOP-C184 intravenös in Dosierungen von 0,89, 1,79 und 3,58 mmol Fe/kg injiziert. Dies erfolgte in Gruppen von jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Ratten, die 24 und 48 Stunden nach Injektion getötet wurden. Unmittelbar hiernach wurden Knochenmarkausstrichpräparate hergestellt. Intravenös injizierte 0,9%ige NaCl-Lösung diente als negative Kontrolle. Intraperitoneal injiziertes Zyklophosphamid in einer Dosis von 27 mg/kg diente als positive Kontrolle.

4.6.2.5 Statistik

Für die Untersuchungen zu Pharmakokinetik und Wirksamkeit wurde der Mann-Whitney-Test für ungepaarte Proben und der Wilcoxon-Test für gepaarte Proben in entsprechender Weise angewendet, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Dosisgruppen und Zeitpunkten zu ermitteln. Für die Untersuchungen zur Toxizität wurden Chi²-Tests verwendet, um Unterschiede zwischen VSOP-C184 und den Kontrollen zu analysieren. Statistische Signifikanz wurde für ein $p < 0,05$ angenommen.

4.6.3 Ergebnisse

4.6.3.1 Pharmakokinetik

4.6.3.1.1 Plasmapharmakokinetik

An der Ratte und am Schwein folgen die Zeitverläufe der T₁- und T₂-Relaxationsraten und der Plasmaeisenkonzentration nach Injektion von VSOP-C184 einer monoexponentziellen Funktion (Abbildung 4.10, Abbildung 4.11). In den Untersuchungen an Ratten wird die T₁-Relaxationszeit von Plasma bei einer Dosis von 0,045 mmol Fe/kg über einen Zeitraum von 20 Minuten unter 100 ms gesenkt, bei der Dosis von 0,075 mmol Fe/kg über einen Zeitraum von etwa 40 Minuten. Am Schwein sind die entsprechenden Zeiten 30 und extrapoliert 75 min. Die Plasmaeliminationshalbwertszeiten, die anhand der drei Parameter T₁- und T₂-Relaxationsrate sowie Eisenkonzentration bestimmt wurden, sind in Tabelle 4.4 wiedergegeben.

4.6.3.1.2 Eisengehalt von Leber und Milz

Zwischen den Gruppen, die die Prüfsubstanz erhalten hatten und den Kontrollgruppen fand sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Eisenkonzentration nur für die Leber und dies auch nur für die höchste untersuchte Dosierung von 0,075 mmol Fe/kg VSOP-C184 und für die Untersuchung 24 Stunden nach Injektion ($P < 0,05$) (Tabelle 4.5). Die Signalintensitätswerte von Leber und Milz, die anhand der MR-Bildgebung ermittelt wurden, sind in Tabelle 4.6 wiedergegeben.

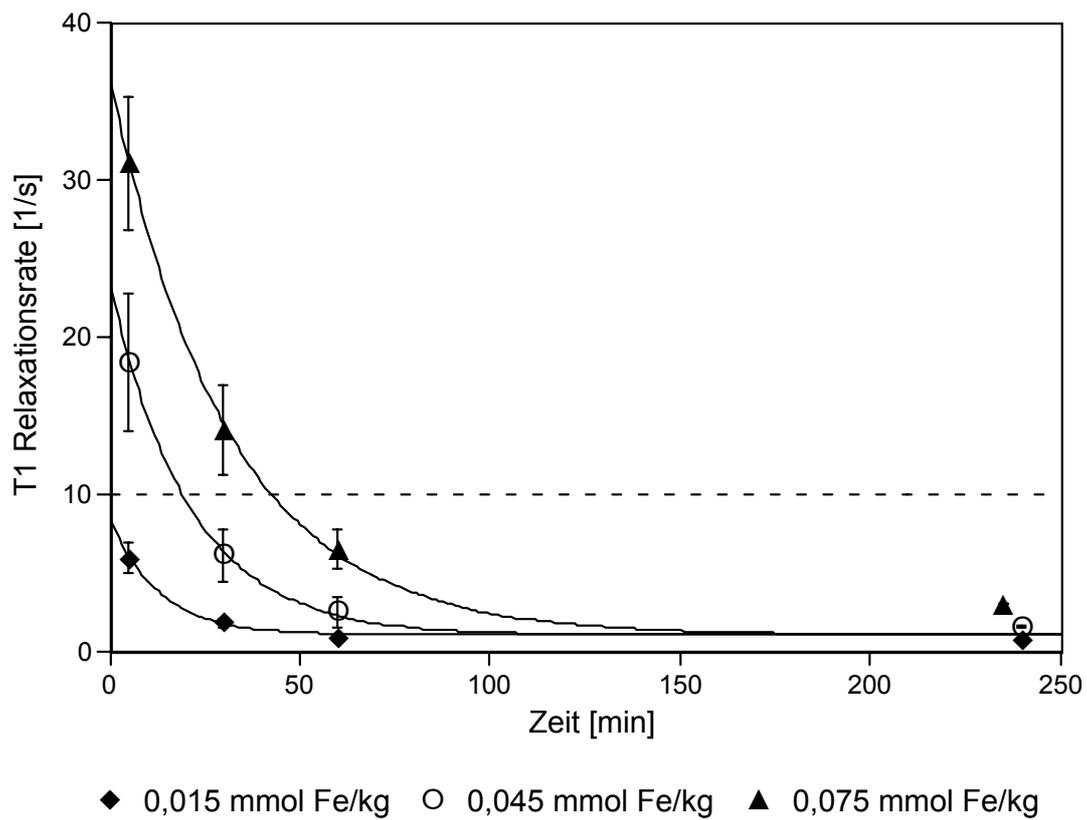
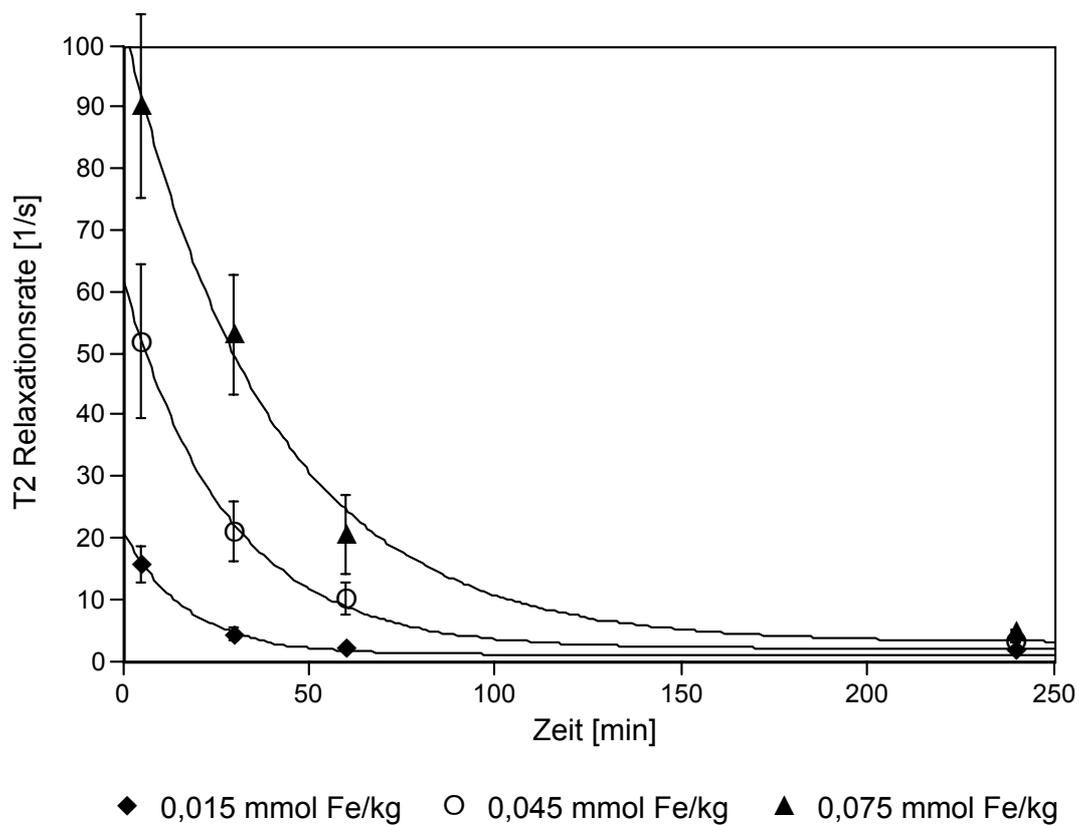
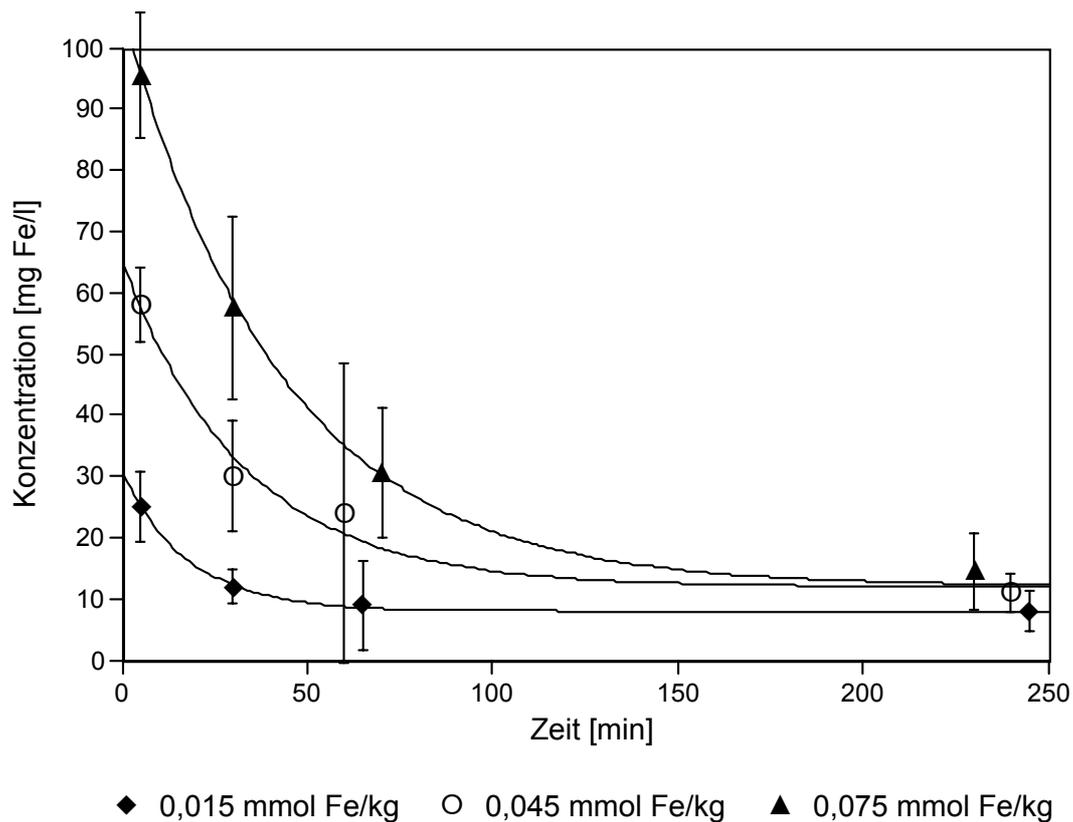
**A****B**

Abbildung 4.10: Fortsetzung und Legende auf der folgenden Seite



C

Abbildung 4.10: Pharmakokinetische Daten von VSOP-C184 im Plasma nach i.v. Injektion von drei verschiedenen Dosierungen an der Ratte. (A) T_1 -Relaxationsrate, (B) T_2 -Relaxationsrate und (C) Eisenkonzentration in Plasma als Funktion der Zeit nach Injektion ($n=12$ /Dosis). In (A) repräsentiert die gestrichelte Linie eine T_1 -Relaxationszeit von 100 ms.

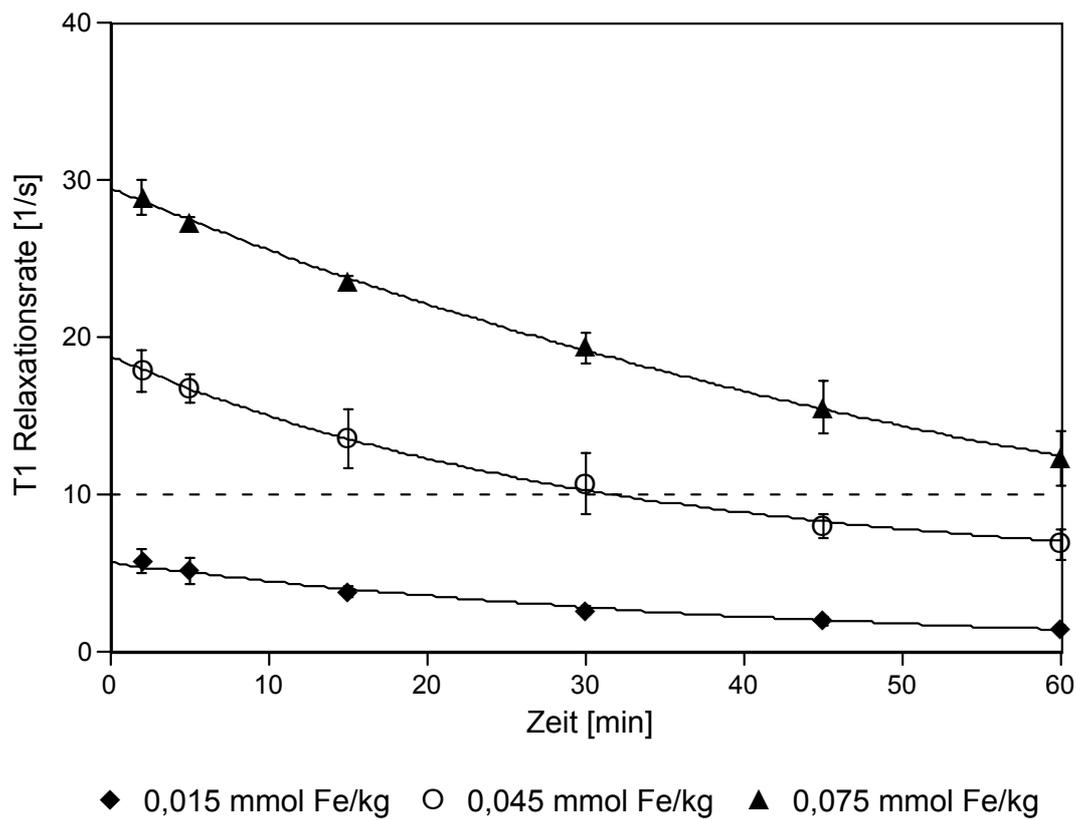
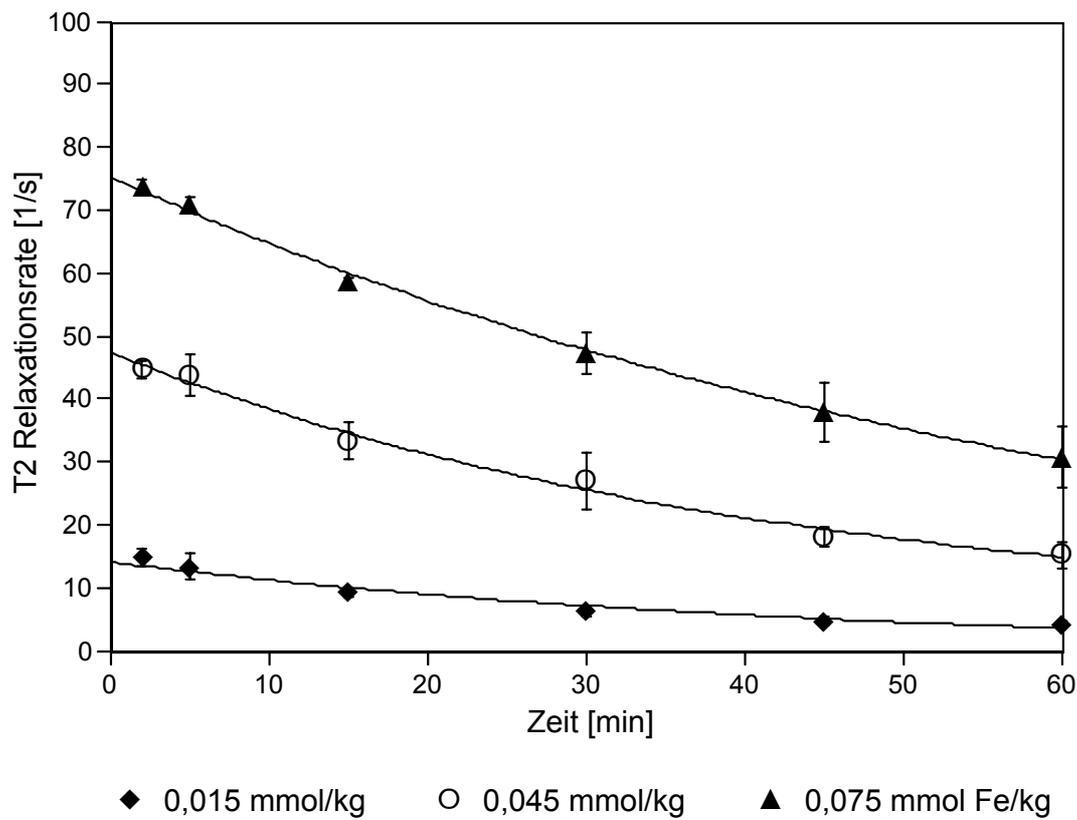
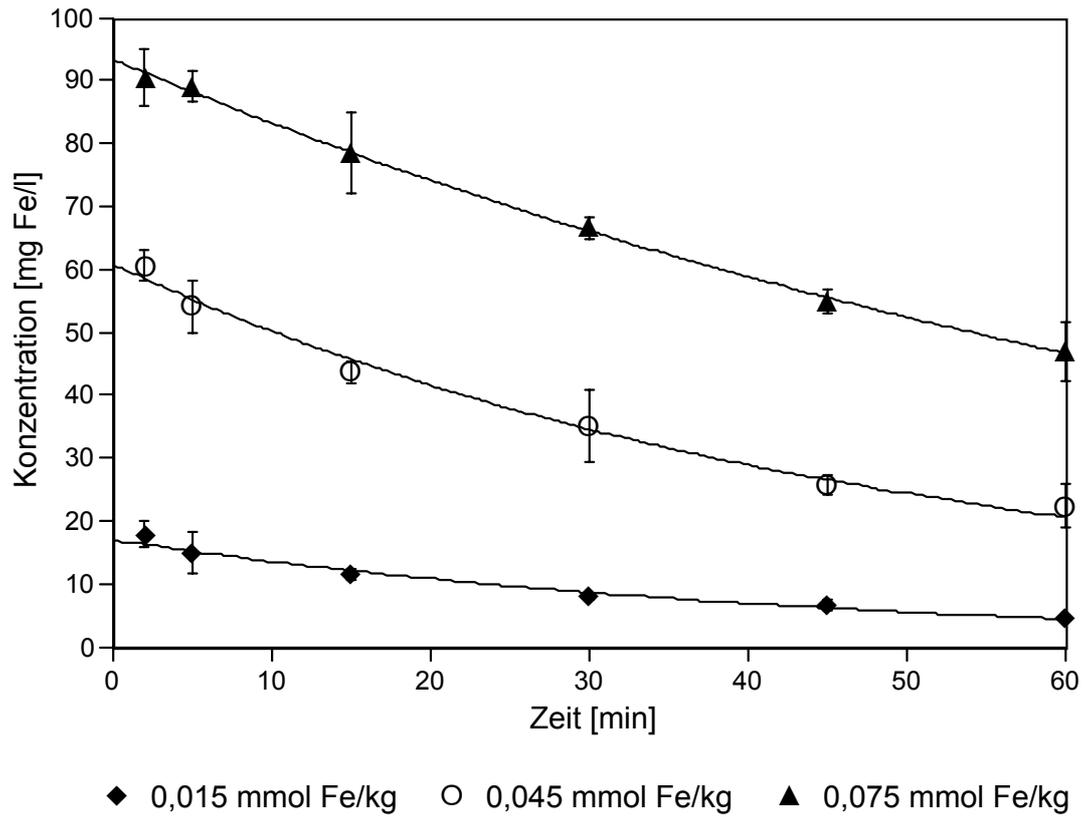
**A****B**

Abbildung 4.11: Fortsetzung und Legende auf der folgenden Seite



C

Abbildung 4.11: Pharmakokinetische Daten von VSOP-C184 im Plasma nach i.v. Injektion von drei verschiedenen Dosierungen am Schwein. (A) T_1 -Relaxationsrate, (B) T_2 -Relaxationsrate und (C) Eisenkonzentration in Plasma als Funktion der Zeit nach Injektion ($n=3/\text{Dosis}$). In (A) repräsentiert die gestrichelte Linie eine T_1 -Relaxationszeit von 100 ms.

Tabelle 4.4: Plasma-Eliminationshalbwertszeiten ($t_{1/2\beta}$) nach intravenöser Injektion von VSOP-C184 an Ratten und Schweinen. Die Bestimmung erfolgte anhand von quantitativer Eisengehaltsbestimmung (Fe) sowie mittels Messung der T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten (n=12/Dosis).

	Dosis [mmol Fe/kg]	$t_{1/2\beta}$		
		Fe [min]	T_1 [min]	T_2 [min]
Ratte	0,015	15,4 ± 3,9	14,2 ± 2,4	11,8 ± 1,9
	0,045	21,3 ± 5,5	19,8 ± 5,1	18,6 ± 3,7
	0,075	28,4 ± 8,9	26,8 ± 8,6	28,7 ± 10,3
Schwein	0,015	22,1 ± 1,7	22,2 ± 2,4	20,4 ± 1,6
	0,045	36,1 ± 4,2	36,9 ± 4,5	32,9 ± 5,1
	0,075	59,6 ± 9,2	46,4 ± 7,0	44,4 ± 7,4

Tabelle 4.5: Zeitverlauf und Dosisabhängigkeit des Eisengehaltes von Leber, Milz und Restkörper nach i.v Injektion von VSOP-C184

	Dosis [mmol Fe/kg]	Leber [μ mol Fe/g Gewebe]	Milz [μ mol Fe/g Gewebe]	Restkörper [μ mol Fe/g Gewebe]
Kontrolle		2,02 ± 1,13	18,8 ± 7,8	0,46 ± 0,16
1. Tag	0,015	2,17 ± 0,84	7,7 ± 2,3	0,42 ± 0,12
	0,045	3,03 ± 0,88	10,4 ± 5,9	0,46 ± 0,12
	0,075	4,14 ± 1,72	11,9 ± 6,3	0,52 ± 0,15
28. Tag	0,015	2,25 ± 1,21	15,5 ± 11,1	0,30 ± 0,08
	0,045	2,61 ± 0,73	16,1 ± 4,8	0,37 ± 0,09
	0,075	3,20 ± 1,44	15,3 ± 7,0	0,38 ± 0,12

4.6.3.2 Wirksamkeit in der MR-Tomographie

4.6.3.2.1 Intravaskuläre Signalverstärkung an der Ratte

Die Untersuchungen an Ratten zeigen, dass nach i.v. Injektion von VSOP-C184 für alle Dosierungen ein ausgeprägter und langanhaltender Anstieg des S/R_{Blut} auftritt. Die Ergebnisse der dazugehörigen quantitativen Auswertungen sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Im Vergleich zum Mittelwert in der Untersuchung vor Kontrastmittelgabe war das mittlere S/R_{Blut} für die drei untersuchten Dosierungen 2 Minuten nach Kontrastmittelinjektion um den Faktor 5,8, 10,9 und 11,4 höher und 26 Minuten nach Injektion um den Faktor 3,9, 8,8 und 9,3 höher. Hierbei lagen die postkontrast Werte signifikant über den präkontrast Werten, nach Kontrastmittelgabe unterschieden sich für beide Zeitpunkte die beiden höheren Dosierungen (0,045 und 0,075 mmol Fe/kg) nicht, diese lagen beide signifikant über den Werten der niedrigen Dosierung (0,015 mmol Fe/kg). Qualitativ führte dieser Signalanstieg für alle drei untersuchten Dosierungen zu einer exzellenten Abgrenzbarkeit und Visualisierung der thorakalen und abdominalen Gefäße der Ratte, auch für die geringste geprüfte Dosierung von 0,015 mmol Fe/kg (Abbildung 4.12).

Tabelle 4.6 Zeitverlauf und Dosisabhängigkeit des S/R von Leber und Milz im MR-Bild (1,5 T, SE 450/12) nach i.v. Injektion von VSOP-C184 im Vergleich zur Kontrolle

	Dosis [mmol Fe/kg]	Leber S/R	Milz S/R
prä	0 (Kontrolle)	23,7 ± 0,38	15,1 ± 0,59
	0,015	20,6 ± 1,53	20,2 ± 1,22
	0,045	24,9 ± 3,1	20,6 ± 1,47
	0,075	27,2 ± 1,08	24,9 ± 0,39
1. Tag	0 (Kontrolle)	24,2 ± 0,81	16,9 ± 1,33
	0,015	13,7 ± 1,61	18,7 ± 1,34
	0,045	11,9 ± 1,35	21,1 ± 0,44
	0,075	7,0 ± 0,76	16,5 ± 1,52
28. Tag	0 (Kontrolle)	22,3 ± 2,22	16,4 ± 1,41
	0,015	19,0 ± 3,43	12,1 ± 0,26
	0,045	15,7 ± 2,22	17,0 ± 2,78
	0,075	14,2 ± 1,22	17,5 ± 2,08

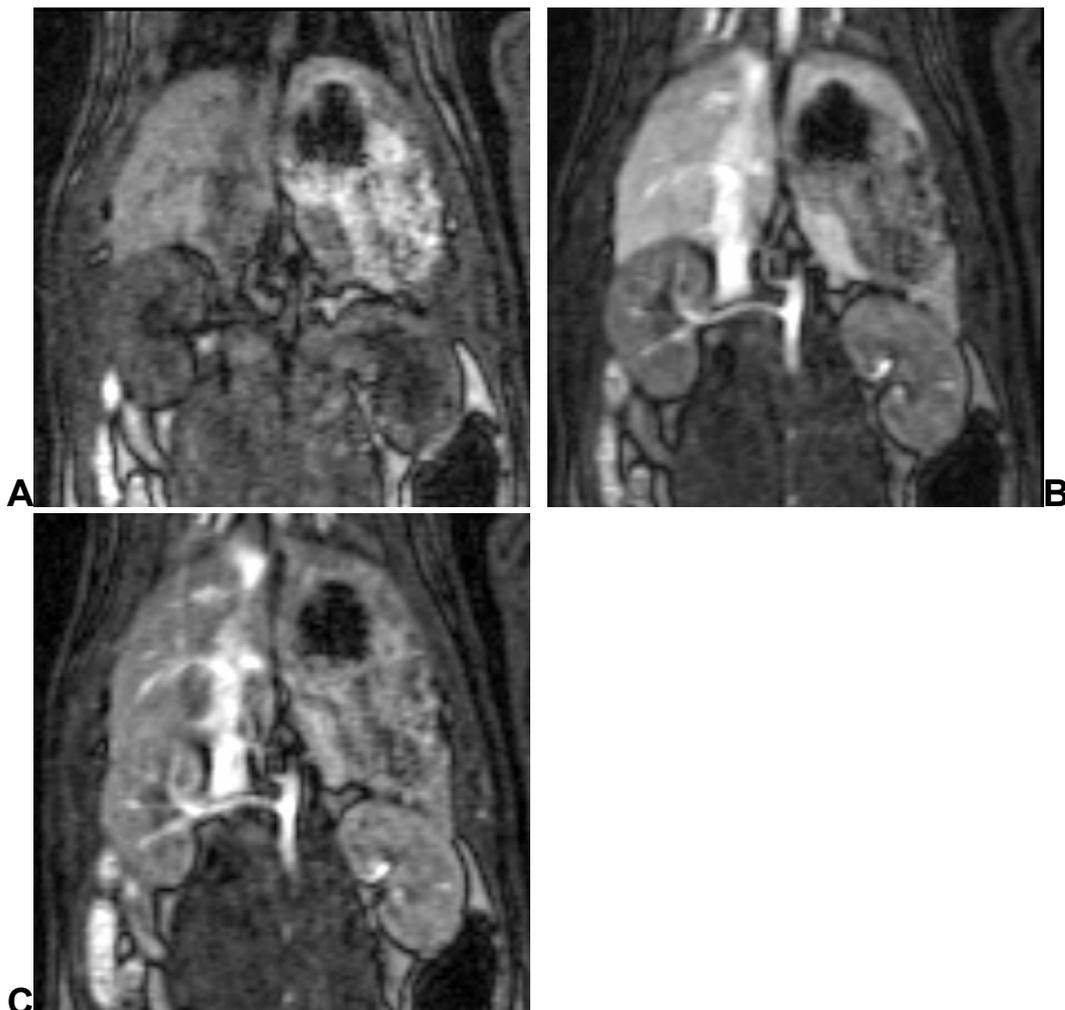


Abbildung 4.12 MR-Angiographie an der Ratte bei 1,5 T (3D-FLASH, 6,6/2,3/25°): Aufnahmen vor (A) sowie 5 min (B) und 60 min (C) nach i.v. Injektion von VSOP-C184 in einer Dosis von 0,045 mmol Fe/kg. Es ist jeweils eine entlang der rechten Nierenarterie rekonstruierte Schicht dargestellt. Es besteht über einen langen Zeitraum eine hohe intravaskuläre SI, die zu einer scharfen Darstellung der Gefäße, hier insbesondere der rechten Nierenarterie, führt.

4.6.3.2.2 MR-Angiographie der Koronararterien am Schwein

Die intravenöse Injektion von VSOP-C184 führte am Schwein für die Dosierungen 0,045 und 0,075 mmol Fe/kg zu einem ausgeprägten und langanhaltenden Anstieg des S/R_{Blut} bis zu 60 Minuten nach Injektion, dies wiederum führte zu einem deutlich angestiegenen Kontrast zwischen Koronararterienlumen und Myokard, ausgedrückt als SD/R , für alle geprüften Dosierungen (Tabelle 4.7). Im Vergleich zum mittleren Wert vor Kontrastmittelgabe war das S/R_{Blut} für die drei untersuchten Dosierungen 5 Minuten nach Injektion um den Faktor 4,6, 12,2 und 6,3 höher und 26 Minuten nach Injektion um den

Faktor 2,1, 7,5 und 7,5. Die höchste geprüfte Dosis von 0,075 mmol Fe/kg führte im Vergleich zu 0,045 mmol Fe/kg zu einem geringer ausgeprägten Anstieg von S/R_{Blut} und $SD/R_{\text{Blut-Myokard}}$ bis 60 Minuten nach Injektion. Dieser Effekt ist für die gewählte Untersuchungstechnik als Überdosierung durch zunehmende Verkürzung der $T2^*$ -Relaxationszeit zu werten.

Tabelle 4.7: MR-Angiographie nach i.v. Injektion von VSOP-C184 (1,5 T, 3D-FLASH, 6,6/2,3/25°): S/R-Werte der Bauchaorta von Ratten (n=6 pro Dosis) und SD/R-Werte zwischen Koronararterie und Myokard am Schwein (n= 3 pro Dosis) vor sowie zu zwei Zeitpunkten postkontrast.

Ratte	Dosis [mmol Fe/kg]	S/R (Arterie)		
		präkontrast	2 min	26 min
	0,015	6,0 ± 1,0	34,9 ± 1,7	23,5 ± 1,8
	0,045	5,8 ± 1,4	63,5 ± 4,0	51,2 ± 4,6
	0,075	6,0 ± 1,2	68,4 ± 3,3	55,8 ± 3,2
Schwein	Dosis [mmol Fe/kg]	SD/R (Koronararterie-Myokard)		
		präkontrast	2 min	60 min
	0,015	0,91 ± 0,22	4,18 ± 0,33	1,87 ± 0,11
	0,045	0,58 ± 1,12	4,79 ± 0,20	4,36 ± 0,05
	0,075	0,51 ± 0,22	3,19 ± 0,54	3,81 ± 0,78

4.6.3.3 Sicherheitspharmakologie und Toxikologie

4.6.3.3.1 Einfluss auf die kardiovaskuläre Physiologie am Schwein

Fünf Minuten nach der intravenösen Injektion von VSOP-C184 kam es zu einer geringen und statistisch nicht signifikanten Abnahme des systolischen und diastolischen pulmonalarteriellen Druckes (-19 %) sowie des pulmonalkapillären Druckes (Wedge-Druck -29 %). Bezüglich aller anderen Parameter zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und der Prüfmedikation.

4.6.3.3.2 Akute Verträglichkeit nach Einmalgabe an Maus und Ratte

An der Maus ergab sich für VSOP-C184 als no effect dose level die Dosis von 0,83 mmol

Fe/kg, erste Unverträglichkeitsreaktionen traten bei 1,79 mmol Fe/kg auf. Für Mäuse ergab sich als berechnete LD₅₀ ein Wert über 17,9 mmol Fe/kg.

An Ratten wurde als no effect dose level die Dosis von 0,83 mmol Fe/kg ermittelt, erste Unverträglichkeitsreaktionen traten bei 1,79 mmol Fe/kg auf. Bei dieser Dosis zeigten Ratten eine reduzierte Motilität und aufgestellte Haare. Für männliche Ratten ergab sich eine LD₅₀ von 12,2, für weibliche von 8,7 mmol Fe/kg. Falls Mäuse oder Ratten im Rahmen dieses Versuches starben, geschah dies innerhalb der ersten 24 Stunden nach Injektion der Prüfsubstanz.

4.6.3.3.3 *Verträglichkeit nach wiederholter Gabe an Ratte und Schwein*

Im Rahmen dieser Untersuchung verstarb keines der Tiere, es wurde keine klinisch erkennbare Reaktion beobachtet. An Ratten waren die ausgeprägtesten Befunde: (1) ein Anstieg der Serum-Eisen-Werte in der 0,75 und in der 2,0 mmol Fe/kg Dosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, (2) ein Anstieg des Serum-Cholesterins bei männlichen Ratten in der 2,0 mmol Fe/kg Dosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, (3) ein Anstieg des Lebergewichtes ($P < 0,01$) in der 0,75 und in der 2,0 mmol Fe/kg Dosisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, (4) histologisch fand sich in der 2,0 mmol Fe/kg Dosisgruppe eine große Menge von Eisen in Makrophagen und Endothelzellen aller Gewebe und Organe mit Ausnahme des zentralen Nervensystems, (5) es ergaben sich histopathologisch weder in der Kontrollgruppe noch in der 2,0 mmol Fe/kg Dosisgruppe Zeichen von Gewebeschädigungen. Bei Schweinen ergaben sich zwischen der Gruppe, die die Prüfsubstanz erhielt, und der Kontrollgruppe keine Unterschiede bezüglich der untersuchten Blut-, Plasma- oder Serumparameter. Akute Unverträglichkeitsreaktionen wurden an Schweinen bei drei der insgesamt 16 Injektionen beobachtet und traten jeweils unmittelbar nach der intravenösen Injektion auf. Die klinischen Symptome waren Hautrötung und beschleunigte Atmung. Diese Symptome bildeten sich innerhalb von 5 Minuten ohne Medikation zurück.

4.6.3.3.4 *Untersuchung der lokalen Verträglichkeit am Kaninchen*

Nach intravenöser Injektion zeigt sich bei der makroskopischen Beurteilung 96 h nach Injektion der Prüfsubstanz eine leichte Rötung und Schwellung im Vergleich zur Kontrolle. Bei der histologischen Beurteilung zeigte sich 14 Tage nach Injektion eine minimale bis moderate Darstellung von Makrophagen mit braunem Pigment durch die Prüfsubstanz. Auf der Kontrollseite zeigt sich 48 h nach Injektion eine milde fokale Blutung und 96 h nach Injektion eine geringe Thrombosierung.

Nach paravenöser, subkutaner oder intramuskulärer Injektion der Testsubstanz zeigt sich eine minimale bis milde Infiltration von Entzündungszellen mit geringen Einblutungen, die

auch auf der Kontrollseite gefunden wurde. Diese Reaktion wird als gute lokale Verträglichkeit gewertet.

Die intraarterielle Injektion führte bei einem Tier 96 Stunden nach Injektion zu moderaten Infiltraten von Entzündungszellen und zu milden fokalen Nekrosen von Muskelfasern. Die übrigen Tiere zeigten keine Reaktionen.

4.6.3.3.5 Einfluss auf die Salurese und Diurese an der Ratte

Innerhalb der ersten zwei Stunden wurde für die Dosierungen 0,54 und 1,8 mmol Fe/kg VSOP-C184 eine signifikante Reduktion der Urinmenge gefunden. Die Urinmenge zwischen 5 und 24 Stunden war im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Innerhalb der ersten zwei Stunden wurde für die Dosierungen 0,54 und 1,8 mmol Fe/kg eine signifikante Reduktion der Ausscheidung der Chlorionen, Kaliumionen und Natriumionen gefunden. Die Ausscheidung der Salze zwischen 5-24 Stunden war im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen wurde als höchste Dosis, die an Ratten keine Effekte auf die Salurese und Diurese hat, mit 0,18 mmol Fe/kg VSOP-C184 bestimmt.

4.6.3.3.6 Einfluss auf die Spontanmotilität an der Maus

Bei keiner der drei Dosierungen wurde ein negativer Einfluss auf die Spontanmotilität der Mäuse nachgewiesen.

4.6.3.3.7 Genotoxizität

Der Ames Test ergab für keine der fünf getesteten Zelllinien bis zur höchsten untersuchten Dosierung von 104 µmol Fe VSOP-C184/Plättchen Hinweise auf eine Zytotoxizität. Dies war der Fall sowohl für den Plättcheninkorperations- als auch den Präinkubationstest ohne und mit metabolischer Aktivierung. Des Weiteren wurde bei keiner der untersuchten Konzentrationen ein mutagener Effekt gefunden. Dies traf für alle untersuchten Zelllinien ohne und mit metabolischer Aktivierung zu. Schließlich zeigte VSOP-C184 bis zur höchsten untersuchten Dosis von 3,58 mmol Fe/kg keine mutagenen Eigenschaften im Knochenmarkmikrokerntest an der Ratte.

4.7 Diskussion zum experimentellen Teil

4.7.1 VSOP-C91: Equilibrium MR-Angiographie der Koronararterien

Seit den ersten Ansätzen zur Abbildung der Koronararterien mittels der MR-Angiographie ohne i.v. Kontrastmittelapplikation (60, 137, 143) wurden zahlreiche neue Techniken bzw. Verbesserungen für die native MR-Angiographie der Koronararterien vorgeschlagen.

Diese Verbesserungen umfassen beispielsweise lokalisierte 3D-Akquisitionen während Atemstillstand (268) oder Navigator gesteuerte 3D-Akquisitionen während Atmung (128, 222), wobei die intrinsisch geringen Kontraste nativer 3D-Techniken durch Präpulse zur T₂-Präparation verbessert werden können (27). Die Navigator gesteuerte 3D MR-Angiographie der Koronararterien wurde von Sardanelli et al. zwar als vielversprechend eingestuft, allerdings hielten die Autoren weitere Verbesserungen insbesondere für die Darstellung der distalen Segmente der Koronararterien für erforderlich (195). Zwischenzeitlich konnte die Abbildungsqualität in der Navigator gesteuerten nativen MR-Angiographie durch technische Verbesserungen gesteigert werden (215, 216). Es konnte jedoch noch nicht belegt werden, dass die native MR-Angiographie der Koronararterien auf dem heutigen Stand eine zuverlässige diagnostische Methode zur Abklärung einer koronaren Herzkrankheit ist.

In Analogie zur kontrastmittelverstärkten MR-Angiographie, die sich in der Darstellung der Aorta und ihrer Abgänge sowie der Extremitätenarterien insbesondere durch Fortschritte in der Gradiententechnik zu einer Alternative zur Katheterangiographie entwickelt hat, gab es bereits frühzeitig Versuche zur kontrastmittelverstärkten MR-Angiographie der Koronararterien. Die angestrebte hohe intravaskuläre Signalintensität in der Kontrastmittel verstärkten MR-Angiographie basiert auf einer effizienten Verkürzung der T₁-Relaxationszeit des Blutes durch ein entsprechendes Kontrastmittel möglichst über die gesamte Akquisitionszeit.

Bislang sind klinisch lediglich niedermolekulare Kontrastmittel für die MR-Angiographie verfügbar, die nach intravenöser Injektion rasch extravasieren und sich im Extrazellulärraum verteilen. Für die Darstellung der Koronararterien wird ihr kontrastverstärkender Effekt daher mittels First-Pass Bildgebung des Herzen mit einer EKG-getriggerten Sequenz während eines 20 – 30 s langen Atemstillstands genutzt (69, 268, 277). Diese Techniken haben jedoch den Nachteil, dass vor der Messung die schmalen 3D-Volumina exakt positioniert werden müssen und wegen der kurzen verfügbaren Zeit die Ortsauflösung limitiert ist. Für die vollständige Abbildung des Herzens mit hoher Ortsauflösung übersteigt die Zeit der Datenakquisition jedoch sowohl die Zeitdauer des First-Pass des Kontrastmittels als auch die Atemanhaltekapazität eines Patienten. Um mit niedermolekularen, extrazellulären Kontrastmitteln auch über einen verlängerten Akquisitionszeitraum ein erhöhtes intravasales Signal zu erzeugen, wurden Protokolle mit langsamer Infusion des Kontrastmittels vorgeschlagen (276). Zheng und Mitarbeiter folgern aus ihren Untersuchungen, dass einerseits mit einem niedermolekularen Kontrastmittel bei langsamer Infusion keine ausreichende Verkürzung der T₁-Relaxationszeit des Blutes eintritt, andererseits für eine optimale Abbildung der

Koronararterien mit guter Gefäßabgrenzbarkeit über die gesamte Akquisitionszeit eine möglichst konstante Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit erforderlich ist. Diese Ergebnisse bekräftigen die Notwendigkeit, für die MR-Angiographie der Koronararterien ein Blut-Pool Kontrastmittel einzusetzen.

Für verschiedene Indikationen der Gefäßdiagnostik (z.B. periphere Arterien, Venen, Koronararterien) werden derzeit mehrere Blut-Pool Kontrastmittel klinisch geprüft oder befinden bzw. befanden sich in experimentellen Studien. Es können drei Gruppen dieser Blut-Pool Kontrastmittel unterschieden werden: (a) kleine oder ultrakleine superparamagnetische Eisenoxide (SPIO, USPIO) wie z.B. NC100150 (104, 235), SHU 555 C (29, 108) oder Ferumoxytol (170) (siehe auch Kapitel 2.4.1); (b) makromolekulare, Gadolinium-basierte Substanzen wie z.B. Gadomer (58), P792 (47, 166) und andere Verbindungen, bei denen Gadoliniumkomplexe kovalent an Makromoleküle wie Albumin, Dextran oder Polylysin gebunden sind (23, 24, 82, 200, 269); und schließlich (c) niedermolekulare Verbindungen, die nach i.v. Injektion an Plasmaproteine binden und hierdurch sowohl ihre ausgeprägte T_1 -verkürzende Wirkung als auch ihre pharmakokinetischen Eigenschaften eines Blut-Pool Kontrastmittel entwickeln, z.B. MS-325 (120, 127, 221) oder B22956 (40, 118). Ein Teil dieser Blut-Pool Kontrastmittel wird derzeit klinisch für die MR-Angiographie der Koronararterien geprüft. Dies sind Gadomer (84), NC100150 (107) und B22956 (88, 157). Ziel dieser Untersuchungen zur kontrastverstärkten MR-Angiographie der Koronararterien ist es, bei 3D-Datenakquisition mit hoher, möglichst isotroper Ortsauflösung für die entsprechend lange Messzeit die erforderliche konstant starke Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit mit hohem Kontrast zwischen Gefäßlumen und Myokardium zu erreichen. Die genannten Studien zur Equilibrium MR-Angiographie der Koronararterien zeigen vielversprechende Ergebnisse in diese Richtung.

Die in diesem Studienabschnitt untersuchte Substanz VSOP-C91 weist mit ca. 7 nm einen sehr kleinen Gesamtpartikeldurchmesser auf. Des Weiteren besitzen diese Partikel ein hohes r_1/r_2 -Verhältnis (vergleiche Tabelle 3.1). Soweit im Rahmen von Literaturdaten, die mit unterschiedlichen Messtechniken erhoben wurden, bewertbar, liegt das r_1/r_2 -Verhältnis von VSOP-C91 eher in der Nähe eines makromolekularen Gd-haltigen Blut-Pool Kontrastmittels wie z.B. Gadomer-17, als bei Werten anderer USPIO (vergleiche Tabelle 2.2). Ein Vergleich der Relaxivitäten von VSOP-C91 zu proteinbindenden Substanzen, z.B. MS-325, wird dadurch erschwert, dass diese Verbindungen eine stark konzentrationsabhängige Relaxivität aufweisen. So lässt sich der Literatur entnehmen, dass im untersten Dosisbereich, der klinisch keine Relevanz hat, MS-325 eine R_1 von ca. 50 l/(mmol*s) aufweist, während diese für höhere Dosierungen auf etwa 6 l/(mmol*s)

absinkt (120, 132).

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass mit VSOP-C91 im Vergleich zu den niedermolekularen Substanzen Gadopentetat Dimeglumin und Gadobenat Dimeglumin sowohl im First-Pass als auch im Equilibrium zwar ein vergleichbarer intravasaler Signalanstieg erzielt wird, jedoch durch eine signifikant geringere Signalsteigerung des Myokards ein verbesserter Kontrast zwischen den Koronararterien und dem Myokard entsteht. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die gute qualitative Beurteilbarkeit der Koronararterien und auch die Erkennbarkeit ihrer Abgänge. Diese verbesserte Beurteilbarkeit besteht nicht nur für den Zeitraum unmittelbar nach der Kontrastmittelinjektion sondern während eines Zeitraumes von mindestens 30 Minuten nach Injektion.

In diesem Studienabschnitt wurde seinerzeit für die MR-Angiographie der Koronararterien erstmals ein direkter Vergleich eines Blut-Pool Kontrastmittels mit niedermolekularen Gd-haltigen Substanzen sowohl im First-Pass als auch im Equilibrium durchgeführt. Die theoretischen Vorteile eines Blut-Pool Kontrastmittels gegenüber niedermolekularen Substanzen (i.e. verlängerte intravasale Verweildauer, keine Signalsteigerung im Myokard) konnten für die von uns eingesetzte Substanz VSOP-C91 experimentell in vollem Umfang bestätigt werden. Der Nachteil einer raschen Extravasation von niedermolekularen Kontrastmitteln und des damit verbundenen Signalanstiegs des Myokard kann durch verschiedene Vorsättigungstechniken in Grenzen kompensiert werden. Zheng und Mitarbeiter setzten zur Unterdrückung des Signals von Weichteilstrukturen, insbesondere des Myokards, eine inversionspräparierte 3D GRE Sequenz ein (276). Allerdings ist hier für eine optimale Suppression des Myokards die Kenntnis der T_1 -Relaxationszeit des Myokards Voraussetzung. Die T_1 -Relaxationszeit des Myokards ändert sich insbesondere für niedermolekulare Kontrastmittel nach der Injektion rasch, so dass eine korrekte Wahl der Inversionsverzögerung schwierig ist. Eine weitere Möglichkeit, das Hintergrundsignal zu supprimieren, ist die Schaltung einer Folge von Präpulsen mit dem gleichen Anregungswinkel wie für die Datenakquisition. Durch diese sogenannten Dummyscans wird eine Gleichgewichtsmagnetisierung mit weitgehend Signalintensitäts supprimiertem Hintergrund hergestellt, wie sie auch für die nicht EKG-getriggerte Kontrastmittel verstärkte MR-Angiographie in anderen Körperregionen während der gesamten Datenaufnahme besteht (127, 208). In diesem Studienabschnitt wurde bewusst auf derartige Präpulse verzichtet, um die Signalsteigerung des Myokards nach der Injektion der verschiedenen Kontrastmittel empfindlich nachweisen zu können. Zweifelsohne kann die Qualität der MR-Angiographie der Koronararterien durch Einsatz eines entsprechenden Präpulses zur Suppression der an sich schon geringen

Signalintensität des Myokard bei Verwendung von VSOP-C91 weiter verbessert werden. Die für VSOP-C91 gegenüber niedermolekularen Substanzen für die MR-Angiographie der Koronararterien gefundenen Vorteile müssten auch für andere Blut-Pool Kontrastmittel in ähnlicher Weise gelten. Es wäre daher ein direkter Vergleich verschiedener Blut-Pool Kontrastmittel an dem standardisierten Modell der Schweinekoronarien sinnvoll, um den bestgeeigneten Kandidaten zu ermitteln. Eine solche Untersuchung ist unseres Wissens bislang nicht veröffentlicht worden. Theoretisch sind zwischen den derzeit in der Prüfung befindlichen Substanzen, MS-325, Gadomer und B22956 und dem hier vorgestellten Kontrastmittel VSOP-C91 Unterschiede in ihren intravaskulär signalsteigernden Eigenschaften zu erwarten. Da z.B. die verlängerte intravaskuläre Verweildauer von MS-325 auf einer Proteinbindung beruht und diese nicht vollständig ist, zirkuliert auch immer ein freier Anteil der Substanz. Dies dürfte einerseits dazu führen, dass nicht die gesamte Dosis zum intravasalen Signalenhancement beiträgt, andererseits dazu, dass es durch die partielle extrazelluläre Verteilung auch zu einer Anhebung der Signalintensität des Hintergrundes kommt (21, 47). Hierin besteht die Gefahr einer Minderung des potenziellen Kontrastes zwischen Koronararterien und Myokard. Ähnliches dürfte auch für B22956 zutreffen. NC100150 ist ebenso wie die hier vorgestellte Substanz ein USPIO-Kontrastmittel. Die bereits diskutierte, vergleichsweise niedrige T_1 -Relaxivität macht eine relativ hohe Dosis von 5 – 6 mg Fe (entsprechend ca. 100 $\mu\text{mol Fe/kg}$) für einen adäquaten intravaskulären Signalanstieg notwendig (183). Die relativ hohe T_2 -Relaxivität führt, falls nicht sehr kurze Echozeiten verwendet werden, zu einem Signalverlust in diesem Dosierungsbereich (235).

Um das Potenzial eines Blut-Pool Kontrastmittels für die Darstellung der Koronararterien für die in-vivo Situation abschätzen zu können, ist die Verwendung einer optimierten Pulssequenz von entscheidender Bedeutung. Dies gilt insbesondere für Untersuchungen am Minischwein, bei dem die Dimensionen am Herzen um den Faktor 3 – 4 geringer sind als am Menschen und die Untersuchungen ansonsten unter Bedingungen durchgeführt werden, die mit der klinischen Situation vergleichbar sind (z.B. Körper Phased Array Spule). Die Dauer der Datenakquisition pro Herzzyklus muss im Vergleich zum RR-Abstand kurz sein und während eines diastolischen Intervalls relativer Unbeweglichkeit des Herzens erfolgen. Andernfalls wird die Bildqualität durch Unschärfen beeinträchtigt, und es muss gegebenenfalls auf eine Evaluation des Kontrastmittels am explantierten Herz übergegangen werden (127), was natürlich nur eine eingeschränkte Bewertung des Potenzials der Substanz erlaubt. In unserer Studie wurde eine 3D-FLASH Sequenz auf eine möglichst hohe geometrische Auflösung (0.6 x 1.1 x 1.0 mm) bei gleichzeitig relativ niedriger Empfängerbandbreite (315 Hz/pixel) und einem Akquisitionszyklus von 96 ms

Länge pro Herzschlag optimiert, wobei insgesamt 40 3D-Partitionen erstellt werden konnten. Eine in gewissem Sinne artefizielle Situation resultierte aus dem für die Messung notwendigen, relativ langen Atemstopp von bis zu ca. 100 s. Vor dem Hintergrund, dass mit moderneren MR-Tomographen, als der, der uns für diese Studie zur Verfügung stand, durch kürzere Schaltzeiten und flexiblere Sequenzstruktur eine weitere Verkürzung der Messzeit möglich sein wird, trafen wir die Entscheidung, dennoch die Messungen unter diesen experimentellen Bedingungen durchzuführen. Die beatmeten Tiere haben den prolongierten Atemstopp problemlos toleriert, ohne dass sich die Herzfrequenz signifikant änderte oder Arrhythmien auftraten. Insgesamt konnten bei allen 15 Untersuchungen die Datenaufnahme exakt in die Diastole positioniert werden und Aufnahmen der Koronararterien mit guter bis sehr guter Bildqualität erstellt werden. Bezüglich des experimentellen Vorgehens halten wir die Ergebnisse auf die klinische Anwendung übertragbar.

Zusammenfassend kann für diesen Studienabschnitt gesagt werden, dass bereits die Vorstufe VSOP-C91 günstige Eigenschaften als Blut-Pool Kontrastmittel für die MR-Angiographie der Koronararterien aufwies. Diese beruhten auf einer langen intravaskulären Verweildauer in Kombination mit einem günstigen Verhältnis von T_1 - zu T_2 -Relaxivität. Die resultierende effiziente intravasale Signalsteigerung bei nahezu fehlendem Signalanstieg des Myokards führte in dieser experimentellen Studie am Schwein zu einer hervorragenden Abbildung der Koronararterien sowohl unmittelbar nach Kontrastmittelinjektion als auch zu späten Zeitpunkten. Eine vergleichbare Darstellung wird mit extrazellulären Kontrastmitteln nicht erreicht.

4.7.2 VSOP-C184: First-Pass MR-Angiographie der Aorta und Nierenarterien

Wie im vorhergehenden Diskussionsabschnitt erläutert, werden Blut-Pool Kontrastmittel für die Equilibrium MR-Angiographie mit dem Ziel entwickelt und geprüft, im Vergleich zu niedermolekularen Substanzen ein längeres Bildgebungsfenster zur Verfügung zu stellen. Für einige Indikationen ist der potenzielle Nutzen von Blut-Pool Kontrastmitteln in der MR-Angiographie bereits herausgearbeitet worden. Diese Indikationen betreffen vor allem Organe mit stark atemabhängiger Bewegung, wie die Lunge oder das Herz bzw. deren Gefäße. Meaney et al (142) sowie Abolmaali et al (1) weisen darauf hin, dass mit Blut-Pool Kontrastmitteln die MR-Angiographie der Pulmonalarterien verbessert werden kann. Hier erlaubt das lange Bildgebungsfenster von Blut-Pool Kontrastmitteln den Einsatz von Navigator-gesteuerten Sequenzen, in denen man gegenüber atemangehaltenen Sequenzen eine höhere Ortsauflösung erreichen kann. Auch für die MR-Angiographie der

Koronararterien wird die Navigatortechnik erfolgreich eingesetzt, um mit langer Messzeit bei Verwendung eines Blut-Pool Kontrastmittels eine hohe Ortsauflösung zu erzielen (88, 107, 157, 221). Für die verschiedenen Blut-Pool Kontrastmittel werden Bluthalbwertszeiten bzw. Bildgebungsfenster von 30 min bis 2 h nach Injektion angegeben (123, 238).

Andererseits existieren Indikationen, bei denen für die Equilibrium MR-Angiographie unter Verwendung eines Blut-Pool Kontrastmittels im Vergleich zur First-Pass MR-Angiographie mit einem niedermolekularen Kontrastmittel kein Vorteil bezüglich Auswertbarkeit bzw. Diagnostik zu sehen ist. Dies ist durch die Überlagerung der ebenfalls kontrastierten Venen bedingt, wie z.B. bei der Diagnostik der aortoiliakalen und femoropoplitealen Arterien (123) oder auch der Nierenarterien (219). Hieraus wäre zu folgern, dass je nach Indikation entweder ein niedermolekulares Kontrastmittel für die First-Pass MR-Angiographie oder ein Blut-Pool Kontrastmittel für die Equilibrium MR-Angiographie zu wählen ist. Optimal wäre ein MR angiographisches Kontrastmittel, das sowohl für die First-Pass als auch die Equilibrium MR-Angiographie geeignet ist.

Für VSOP-C184 konnte experimentell bereits eine hohe Wirksamkeit in der Equilibrium MR-Angiographie sowohl an Gefäßen des Körperstamms (231) sowie mit einer Vorläufersubstanz auch der Koronararterien gezeigt werden (Kapitel 4.3 und 4.6). Erste Ergebnisse an gesunden Probanden deuten an, dass diese Eigenschaften auch klinisch genutzt werden können, wie z.B. für die MR-Angiographie der Koronararterien (234) (Kapitel 5.3). Da VSOP-C184 als Bolus applizierbar und klinisch gut verträglich ist, ist diese Substanz theoretisch auch als Kontrastmittel für die First-Pass MR-Angiographie einsetzbar. Daher wurde in dem hier diskutierten Studienabschnitt experimentell an der Bauchorta und den Nierenarterien von Minischweinen untersucht, ob die bolusförmige Injektion von VSOP-C184 in der First-Pass MR-Angiographie zu einer Signalsteigerung führt, die mit dem Effekt eines für diese Indikation etablierten niedermolekularen Kontrastmittels vergleichbar ist. Die experimentelle Situation für diesen Vergleich sollte möglichst weitgehend mit der klinischen Situation vergleichbar gestaltet werden. Dies betrifft vor allem die Punkte Geometrie der Messtechnik und die Kreislaufzeit. Als Tiermodell wurde daher das Minischwein mit einem Körpergewicht von ca. 25 kg gewählt. Die Dimensionen des Minischweines liegen eher im klinischen Bereich als die von Kanichen oder Ratten, so dass hier die auch in der klinischen Situation standardmässig eingesetzte 4 Kanal Körper Phased Array Spule verwendet werden konnte. Für die First-Pass MR-Angiographie wurde in unserer Studie eine Sequenz verwendet, wie sie routinemässig auch in der klinischen Situation eingesetzt wird. Lediglich die Anzahl der Partitionen wurde von 48 auf 32 Partitionen reduziert, um die Messzeit an die kürzere

Zirkulationszeit der Minischweine anzupassen. Die Zeit von der Injektion des Kontrastmittels in eine Ohrrendvene bis zum Erscheinen in der Bauchaorta lag mit ca. 12 s etwas unterhalb der Kreislaufzeit des Menschen bei Injektion in eine antekubitale Vene. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bei Verwendung des Blut-Pool Kontrastmittels VSOP-C184 als auch des niedermolekularen Kontrastmittel Gadopentetat Dimeglumin die arterielle Phase gut getroffen wurde und in einigen Fällen allenfalls eine geringe Kontrastierung der Nierenvenen vorlag. Die quantitative und qualitative Auswertung zeigt, dass zwischen den beiden geprüften höheren Dosierungen von VSOP-C184 und den beiden geprüften Dosierungen von Gadopentetat Dimeglumin kein Unterschied bezüglich der intravaskulären Signalsteigerung, der Abbildungsschärfe des Gefäßrandes und subjektiven Parametern in der abdominellen Aorta und den Nierenarterien vorliegt. Somit können die hier gewonnenen Ergebnisse als auf die klinische Situation übertragbar angesehen werden. Diese Ergebnisse erscheinen auch plausibel, da man die T_1 -Relaxivitäten der beiden Substanzen in ein sinnvolles Verhältnis zu den hier applizierten Dosierungen der beiden Kontrastmittel setzen kann. VSOP-C184 hat im Vergleich zu Gadopentetat Dimeglumin eine um den Faktor 4 – 5 höhere T_1 -Relaxivität (230) und wurde mit einer Dosis eingesetzt, die etwa 1/4 bis 1/5 der Dosis von Gadopentetat Dimeglumin entsprach. Somit ist zu erwarten, dass bei in dieser Weise vergleichbaren Dosierungen, z.B. 0,025 mmol Fe/kg VSOP-C184 und 0,1 mmol Gd/kg Gadopentetat Dimeglumin, im First-Pass ein gleichwertiger intravaskulärer Signalanstieg erfolgt, wie wir es in diesem Studienabschnitt beobachtet haben. Voraussetzung hierfür ist, dass eine Messtechnik mit sehr kurzer Echozeit verwendet wird, die nicht anfällig auf den im Vergleich zu Gadopentetat Dimeglumin stärker ausgeprägten T_2 -Relaxationszeit verkürzenden Effekt von VSOP-C184 ist. Dies war in der vorliegenden Studie mit einer Echozeit von 1,7 ms der Fall. Es könnte spekuliert werden, dass für VSOP-C184 mit einer höheren als den hier verwendeten Dosierungen ein höheres intravaskuläres Enhancement erzielt werden kann. Frühere Untersuchungen zeigen, dass für VSOP-C184 bzw. für Vorgängersubstanzen, die bezüglich der signalverändernden Eigenschaften vergleichbar sind, in der Equilibrium MR-Angiographie die Sättigungsgrenze für einen dosisabhängigen Signalanstieg auch bei Verwendung sehr kurzer Echozeiten bei ca. 0,06 – 0,075 mmol Fe/kg liegt (231). Allerdings liegt bei der First-Pass MR-Angiographie das Kontrastmittel während der ersten Zirkulation im Blut höher konzentriert als in der Equilibriumphase vor. Daher hatte eine Abschätzung der maximalen für die First-Pass MR-Angiographie geeigneten Dosis für VSOP-C184 einen Wert von 0,035 mmol Fe/kg ergeben. Da allerdings in der hier gefundenen Dosis-Wirkungs-Beziehung für das intravaskuläre Enhancement noch keine Zeichen einer Sättigung zu erkennen sind, wäre die Prüfung von VSOP-C184 für die First-Pass MR-Angiographie mit höheren

Dosierungen bis maximal 0,06 mmol Fe/kg sinnvoll.

In Studien zur kontrastverstärkten MRT des Herzens mit NC100150 hatte sich gezeigt, dass der Durchmesser der Koronararterien in der Untersuchung nach Kontrastmittelinjektion kleiner erscheint, als in der Nativuntersuchung (235) oder sich die Grenze zwischen Blut und Endokard in der postkontrast Untersuchung signalarm demarkiert (236). In unserer Studie wurde zwar kein Vergleich zwischen nativer und kontrastverstärkter MR-Angiographie durchgeführt, so dass zu dem genannten Phänomen für VSOP-C184 keine endgültige Aussage möglich ist. Allerdings zeigte sich in unserer Studie kein Unterschied zwischen VSOP-C184 und Gadopentetat Dimeglumin bezüglich der Gefäßdurchmesser und es trat in keinem Fall eine signalarme Darstellung der Grenze zwischen Blut und Gefäßwand auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass für die Bauchaorta und die Nierenarterien nach quantitativen Kriterien mit VSOP-C184 nicht ganz der Kontrast zwischen Gefäßlumen und Umgebung erreicht wird, wie mit Gadopentetat Dimeglumin. Andererseits wird in der qualitativen Auswertung zwischen den beiden höheren Dosierungen von VSOP-C184 und den beiden Dosierungen von Gadopentetat Dimeglumin kein Unterschied gefunden. Daher kann man folgern, dass in der klinischen Situation nach bolusförmiger Injektion von VSOP-C184 eine aussagekräftige First-Pass MR-Angiographie möglich ist.

Bislang existieren nur wenige systematische Untersuchungen zur Eignung eines Blut-Pool Kontrastmittels für die First-Pass MR-Angiographie. Allkemper et al. fanden für kleine Carboxydextran-ummantelte superparamagnetische Eisenoxid-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 21 nm in experimentellen Untersuchungen an Kaninchen eine Eignung dieser Substanz sowohl für die First-Pass als auch die Equilibrium MR-Angiographie (3). Eine Dosis von 0,04 mmol Fe/kg führte im Vergleich zu 0,2 mmol/kg Gadopentetat Dimeglumin zu einem etwas geringeren, statistisch nicht unterscheidbaren Signalanstieg in den Abdominalarterien in der First-Pass Messung. Allerdings war die Messzeit der MR-Angiographie Sequenz von 35 s im Vergleich zur Kreislaufzeit des Kaninchens von ca. 7 s relativ lang. Man kann spekulieren, dass bei einer kürzeren, der Kreislaufzeit des Kaninchens angepassten Messzeit ein höherer maximaler Signalanstieg für Gadopentetat Dimeglumin hätte gemessen werden können. Zwischenzeitlich konnte für diese Substanz (SHU 555 C) in einer klinischen Prüfung der Phase I gezeigt werden, dass sie auch am Menschen sowohl für die First-Pass als auch die Equilibrium MR-Angiographie geeignet ist (238).

Die in diesem Kapitel beschriebene Studie zur First-Pass MR-Angiographie mit dem Blut-Pool Kontrastmittel VSOP-C184 weist zwei Limitationen auf. Es wurde mit n=3 eine relativ

geringe Anzahl von Tieren pro Dosis und Kontrastmittel untersucht, so dass bezüglich Kontrastmittel- und Dosisvergleich die statistische Aussagekraft eingeschränkt ist. Des Weiteren wurde bei dem Dosisvergleich für keines der Kontrastmittel eine maximal wirksame Dosis ermittelt. Für beide Kontrastmittel müssten zur Bestimmung eines Dosisoptimums höhere Dosierungen untersucht werden. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse kann allerdings eine weitere Dosisoptimierung durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann zu diesem Studienabschnitt gesagt werden, dass die ursprünglich als Blut-Pool Kontrastmittel für die MR-Angiographie entwickelte, als i.v. Bolus applizierbare Substanz VSOP-C184 auch für die First-Pass MR-Angiographie geeignet ist. Im First-Pass erreicht der Kontrast und die Abgrenzbarkeit zwischen Gefäßlumen und Umgebung für klinisch einsetzbare Dosierungen von VSOP-C184 quantitativ und qualitativ denjenigen einer Doppeldosis von Gadopentetat Dimeglumin. Es erscheint gerechtfertigt, in klinischen Studien die First-Pass MR-Angiographie mit zu berücksichtigen.

4.7.3 VSOP-C184: MR-Tomographie fokaler Leberläsionen

Für die klinische MRT der Leber stehen heute verschiedenartige Kontrastmittel zur Verfügung, um gegenüber der Nativuntersuchung die Detektion und Charakterisierung von Lebertumoren zu verbessern. Niedermolekulare unspezifische Gd-Chelate, wie z.B. Gadopentetat Dimeglumin, werden im Rahmen einer dynamischen T₁-gewichteten Untersuchung eingesetzt. Für hypervaskularisierte Lebertumoren, wie zum Beispiel das hepatozelluläre Karzinom oder Metastasen von Karzinoiden, kann die Detektion durch Erfassung ihrer hyperintensiven Darstellung in der arteriellen Phase der dynamischen Untersuchung gegenüber der nativen MRT verbessert werden (59, 153). Die Erfassung charakteristischer Kontrastierungsmuster während der dynamischen T₁-gewichteten MRT erlaubt gegenüber der Nativuntersuchung eine verbesserte Charakterisierung, z.B. aufgrund der Darstellung des Irisblenden Phänomens bei Leberhämangiomen oder durch Darstellung des Randenhancement oder des peripheren washout bei Metastasen (77, 211). Die Detektion von hypovaskularisierten Metastasen, z.B. kolorektaler Karzinome, die den überwiegenden Anteil von Lebermetastasen ausmachen, wird durch die dynamische Untersuchung mit niedermolekularen unspezifischen Kontrastmitteln allerdings nicht in allen Fällen verbessert (73, 210).

Eine Verbesserung der Detektion von Lebermetastasen, unabhängig vom Vaskularisationsgrad, wird durch die T₂-gewichtete späte Bildgebung nach intravenöser Injektion von SPIO erreicht (10, 22, 55, 75, 218) (siehe auch Kapitel 2.3.1). Sofern SPIO für die Leberdiagnostik als intravenöser Bolus applizierbar sind, wie es aktuell klinisch

zugelassen nur für Ferucarbotran der Fall ist, kann unmittelbar nach Injektion auch eine T_1 -gewichtete dynamische Untersuchung durchgeführt werden. Hier kann der Blut-Pool Effekt dieser Substanz mit T_1 -Relaxationszeit verkürzender Wirkung ausgenutzt werden, um analog zu niedermolekularen unspezifischen Substanzen Lebertumoren, insbesondere Leberhämangiome, anhand ihres Kontrastierungsmusters in der dynamischen Untersuchung zu charakterisieren (172, 174). Allerdings ist für Ferucarbotran diese Möglichkeit der Tumorcharakterisierung im Vergleich zu niedermolekularen unspezifischen Substanzen aufgrund der wesentlich geringer ausgeprägten Signalsteigerung in T_1 -gewichteter Bildgebung von limitierter Bedeutung (171).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen tierexperimentellen Untersuchungen und ersten klinischen Ergebnisse zeigen, dass VSOP-C184, bzw. ähnliche Vorläufer dieser Substanz, aufgrund der starken T_1 -Relaxationszeit verkürzenden Wirkung im Blut und der langen Bluthalbwertszeit ein gut wirksames Kontrastmittel für die Equilibrium MR-Angiographie von Arterien des Körperstammes sowie der Koronararterien sind. Des Weiteren konnte experimentell gezeigt werden, dass VSOP-C184 in der First-Pass MR-Angiographie der Abdominalarterien eine ähnliche intravaskuläre Signalsteigerung herbeiführt wie Gadopentetat Dimeglumin. Andererseits zeigte sich im Rahmen der präklinischen Charakterisierung von VSOP-C184 mit Bestimmung der Organverteilung, dass diese Substanz letztendlich zu einem beträchtlichen Anteil in der Leber aufgenommen wird und hier im MR-Bild zu einem Signalverlust führt (249), wie es typisch für SPIO oder USPIO, z.B. für Ferucarbotran, ist (121).

Daher sollte in der hier diskutierten experimentellen Studie an Lebertumoren geprüft werden, inwiefern VSOP-C184 in der T_1 -gewichteten dynamischen MRT mit Gadopentetat Dimeglumin vergleichbar ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob VSOP-C184 in der T_2 -gewichteten späten MRT mit Ferucarbotran vergleichbar ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass VSOP-C184 in der T_2 -gewichteten späten MRT der Leber, als klassische Anwendung von SPIO, in der Dosis von 0,015 mmol Fe/kg den gleichen, hohen Leber-Tumor-Kontrast herbeiführen, wie Ferucarbotran bei 0,015 mmol Fe/kg. Dieses Ergebnis war prinzipiell zu erwarten, da VSOP-C184, ebenso wie Ferucarbotran, nach intravenöser Injektion von Kupfer-Zellen der Leber aufgenommen wird (121, 249) und hier zu einer Verkürzung der T_2 -Relaxationszeit führt, während die T_2 -Relaxationszeiten des Tumors unverändert bleiben. Ferucarbotran hat am Menschen nach intravenöser Injektion eine kurze Bluthalbwertszeit von ca. 5 min (75) und wird rasch in der Leber aufgenommen (121). Demgegenüber weist VSOP-C184 am Menschen nach

intravenöser Injektion eine vergleichsweise lange Bluthalbwertszeit von ca. 20 min bei 0,015 mmol Fe/kg auf. Daher war in der aktuellen experimentellen Studie überraschend, dass VSOP-C184 bereits 5 min nach i.v. Injektion ebenso wie Ferucarbotran in einer moderat T_2 -gewichteten Sequenz einen weitgehenden Signalabfall nahezu bis auf das Niveau des Rauschens verursachte. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die zu diesem Zeitpunkt in der Leber aufgenommene Fraktion von VSOP-C184 nach Phagozytose einen starken T_2 -Relaxationszeit verkürzenden Effekt entwickeln. Über die genaue Zeitabhängigkeit der Phagozytose von VSOP-C184 und der Entwicklung der T_2 -Relaxationszeit verkürzenden Wirkung in der Leber in der frühen Phase nach intravenöser Injektion liegen noch keine Daten vor. Aus den Eigenschaften der Partikel von VSOP-C184 lässt sich jedoch indirekt die relativ schnelle Aufnahme in der Leber erklären. Die Partikel von VSOP-C184 besitzen eine negativ geladene Oberfläche. Für negativ geladene Partikel ist eine schnelle Phagozytose und damit auch eine schnelle Aufnahme in den Kupffer-Zellen der Leber bekannt (270). Erwartungsgemäß bewirkt Gadopentetat Dimeglumin in der T_2 -gewichteten Spätuntersuchung keine signifikante Änderung des Leber-Tumor-Kontrastes.

In der T_1 -gewichteten dynamischen MRT zeigte VSOP-C184 im gut vaskularisierten Leberparenchym einen starken Signalanstieg, der im Vergleich zu Gadopentetat Dimeglumin bis 24 s nach Injektion vergleichbar war und anschließend den Wert von Gadopentetat Dimeglumin übertraf. Da VSOP-C184 im Tumor nicht oder nur gering extravasiert, resultiert aus diesem Signalverhalten in der T_1 -gewichteten FLASH Sequenz ein hoher Leber-Tumor-Kontrast. Demgegenüber zeigt Gadopentetat Dimeglumin in der T_1 -gewichteten Untersuchung neben einem signifikanten Signalanstieg in der Leber durch Extravasation auch einen signifikanten Signalanstieg im Tumor. Hieraus resultiert für VSOP-C184 im Vergleich zu Gadopentetat Dimeglumin für beide Dosierungen (0,015 und 0,025 mmol Fe/kg VSOP-C184) ein signifikant höherer Leber-Tumor-Kontrast in der T_1 -gewichteten dynamischen MRT bis 42 s nach intravenöser Injektion. Ferucarbotran führte in der untersuchten Dosis im Vergleich der drei Kontrastmittel in der T_1 -gewichteten dynamischen MRT zu dem geringsten Anstieg des Leber-Tumor-Kontrastes, der sich allerdings auch signifikant vom Ausgangswert unterschied.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieses Teilprojektes, dass VSOP-C184 im Vergleich zu dem für die MRT der Leber optimierten SPIO Ferucarbotran bei äquivalenter Dosis in der T_2 -gewichteten Aufnahme zu einem vergleichbaren Kontrast führt. Somit könnte VSOP-C184 bei einem zukünftigen klinischen Einsatz auch mit Ferucarbotran vergleichbare gute Ergebnisse bezüglich der Tumordetektion liefern. Andererseits zeigen die Ergebnisse, dass VSOP-C184 zusätzlich in der dynamischen T_1 -gewichteten MRT

unmittelbar nach Kontrastmittelinjektion einen beträchtlichen signalsteigernden Effekt aufweist. Dieser führt bei dem hier verwendeten Modell eines hypovaskularisierten Lebertumores zu einem signifikant höheren Leber-Tumor-Kontrast als ein für die T_1 -gewichtete Bildgebung optimiertes niedermolekulares Gadolinium-haltiges Kontrastmittel.

Die hier diskutierte Studie hat einige Limitationen. Als Tumormodell wurde mit dem VX-2 Karzinom in der Leber des Kaninchens lediglich ein deutlich hypovaskularisierter Tumor verwendet. (226). Daher können anhand unserer Studie keine Aussagen zur Darstellung hypervaskularisierter Tumoren in der T_1 -gewichteten dynamischen Bildgebung gemacht werden. Andererseits sind Modelle für ausgesprochen hypervaskularisierte Lebertumoren, wie z.B. als maligner Tumor Metastasen von neuroendokrinen Karzinomen, oder als benigner Tumor die Fokal Noduläre Hyperplasie, nicht ohne weiteres verfügbar. Eine weitere Limitation könnte darin gesehen werden, dass wir für die niedermolekulare unspezifische Vergleichssubstanz lediglich eine Dosierung verwendet haben. Des Weiteren umfasste das Bildgebungsprotokoll eine T_1 -gewichtete dynamische Phase nur bis 42 s nach Kontrastmittelinjektion. Allerdings beinhaltet diese Messung bei der kurzen Zirkulationszeit von ca. 12 s beim Kaninchen die für die T_1 -gewichtete dynamische Untersuchung der Leber wichtige arterielle und portalvenöse Phase.

Für den Fall einer klinischen Anwendung des bolusförmig applizierbaren superparamagnetischen Eisenoxid-Kontrastmittels VSOP-C184 für die MRT der Leber ergeben sich aus den in der vorliegenden Studie gefundenen Ergebnissen folgende mögliche Konsequenzen: Mit VSOP-C184 kann eine T_1 -gewichtete dynamische Untersuchung der Leber durchgeführt werden, wobei der hohe Kontrast in dieser frühen Phase nach Injektion einen Beitrag zur Detektion von Lebertumoren leisten könnte. Des Weiteren kann aufgrund der starken Signalsteigerung die Beurteilung des Kontrastierungsmusters von Lebertumoren in der dynamischen T_1 -gewichteten Untersuchung zur Charakterisierung von Lebertumoren beitragen, indem Kenntnisse aus der Anwendung niedermolekularer unspezifischer Kontrastmittel in derartigen Untersuchungen auf die Anwendung von VSOP-C184 übertragen werden. Dieser Aspekt wäre eine neue Anwendung von SPIO oder USPIO in der MR Diagnostik von Lebertumoren. Zusätzlich besitzt VSOP-C184 die bekannten Eigenschaften von SPIO als Kontrastmittel für die MRT der Leber. Dies sind ein starker kontraststeigernder Effekt in der späten T_2 -gewichteten Bildgebung mit gegenüber der Nativuntersuchung verbesserter Detektion von Lebertumoren. Somit kann mit VSOP-C184 als Kontrastmittel für die MRT der Leber der Nachteil von bisherigen bolusförmig applizierbaren SPIO, dies ist der unzureichende T_1 -Effekt in der frühen Phase, überwunden werden, ohne Abstriche an der Wirkung in der T_2 -gewichteten Bildgebung machen zu müssen. In dem hier

beschriebenen experimentellen Studienabschnitt wurde VSOP-C184 in zwei Dosierungen für die MR-Tomographie von Lebertumoren geprüft. Hiervon ergab die niedrigere Dosis von 0,015 mmol Fe/kg bereits Vorteile in der T₁-gewichteten dynamischen MRT gegenüber der niedermolekularen Vergleichssubstanz, während diese Dosis gegenüber dem für die Leberdiagnostik optimierten SPIO Ferucarbotran in der Standarddosis gleichwertige Ergebnisse erzielte. Somit könnte gefolgert werden, dass auch für die mögliche klinische Anwendung von VSOP-C184 in der MRT fokaler Leberläsionen die Dosis von 0,015 mmol Fe/kg ausreichend ist. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass die Dosis von 0,025 mmol Fe/kg insbesondere den Effekt in der T₁-gewichteten dynamischen Bildgebung nochmals verbessert, was sich in der klinischen Situation in einer besseren Detektion insbesondere kleiner Lebertumoren äußern könnte oder auch spezifische Perfusionsmuster der einzelnen Tumorentitäten zuverlässiger nachweisen lassen könnte. Zudem könnte die höhere Dosis von 0,025 mmol Fe/kg einen guten MR-angiographischen Effekt bieten (siehe Kapitel 4.4), so dass im Rahmen einer MRT der Leber mit dieser Dosis gleichzeitig die Gefäße des Oberbauchs mit ausreichender Aussagekraft mit untersucht werden könnten. Letztendlich muss in einer klinischen Prüfung der Phase II mit entsprechender Dosisfindung die optimale Dosis für die MRT der Leber mit VSOP-C184 unter Berücksichtigung aller relevanten diagnostischen Kriterien bestimmt werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Studienabschnitt an experimentellen Lebertumoren gezeigt werden, dass VSOP-C184 als superparamagnetisches Eisenoxid Kontrastmittel in der dynamischen T₁-gewichteten MR-Bildgebung einen höheren Leber-Tumor-Kontrast erzielt, als ein unspezifisches niedermolekulares Kontrastmittel. In der späten T₂-gewichteten Bildgebung ist der Leber-Tumor-Kontrast äquivalent zu dem eines für die MRT der Leber optimierten SPIO. Mit VSOP-C184 kann in der MRT der Leber der Nachteil von bisherigen bolusförmig applizierbaren SPIO, dies ist der unzureichende T₁-Effekt, überwunden werden, ohne Abstriche in der Wirkung in der T₂-gewichteten Bildgebung machen zu müssen. Von den beiden untersuchten Dosierungen von VSOP-C184 wäre auf der Basis dieser experimentellen Studie der höheren Dosis von 0,025 mmol Fe/kg der Vorzug zu geben.

4.7.4 VSOP-C184: Präklinische Charakterisierung

Ziel des Studienabschnittes zur präklinischen Charakterisierung von VSOP-C184 war es, in Vorbereitung der klinischen Prüfung diese Substanz bezüglich Pharmakokinetik, Pharmakodynamik, Wirksamkeit für die MR-Angiographie, Sicherheitspharmakologie und Toxizität zu untersuchen. Die Plasmapharmakokinetik zeigt, wie zu erwarten (231), an

Ratte und Schwein dosisabhängige Eliminationshalbwertszeiten mit zunehmenden Werten für steigende Dosierungen. Wichtig hinsichtlich der MR-Angiographie ist der hieraus resultierende Verlauf der T_1 -Relaxationszeit des Blutes. An Schweinen konnte mit der für den klinischen Einsatz geplante Dosis von 0,045 mmol Fe/kg unmittelbar nach Injektion eine T_1 -Relaxationszeit von Blut von ca. 50 ms erzielt werden, die T_1 -Relaxationszeit steigt erst nach 30 min wieder auf einen Wert von 100 ms an. Diese starke Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit ist vor allem in Hinblick auf den Einsatz von VSOP-C184 für die MR-Angiographie der Koronararterien (94) von Bedeutung. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass hier eine Verkürzung der T_1 -Relaxationszeit des Blutes unter 100 ms eine wichtige Bedingung für das Erzielen eines hohen Kontrastes zwischen Koronararterie und Umgebung ist (129). Für Vorläufersubstanzen von VSOP-C184 (VSOP-C63 and VSOP-C91) konnte die Eignung als Blut-Pool Kontrastmittel an Ratten und Schweinen bereits belegt werden (231, 232), wobei insbesondere eine exzellente Darstellung von Koronararterien am Schwein gelang (Kapitel 4.3).

Neben der Plasmapharmakokinetik, welche neben den physikalischen Eigenschaften der Partikel wichtig für die Wirksamkeit in der MR-Angiographie ist, wurden in diesem Studienabschnitt an Ratten Daten zur Pharmakokinetik des Eisengehaltes von Leber, Milz und Restkörper bis 28 Tage nach Injektion von VSOP-C184 gewonnen, um Hinweise auf den Abbau der Partikel zu erhalten. Da bekannt ist, dass SPIO durch ihre Aufnahme in Kupferzellen der Leber und in Makrophagen der Milz eine temporäre Abnahme der Signalintensität dieser Organe im MR-Bild verursachen (192), haben wir zusätzlich zu den genannten Zeitpunkten die SI von Leber und Milz in MR-Bildern ausgewertet. In der quantitativen Eisenbestimmung wurde eine, wenn auch geringe Zunahme des Eisengehaltes im Lebergewebe der Ratte unmittelbar nach Injektion von VSOP-C184 gefunden. Vier Wochen nach Injektion war der Eisengehalt nicht mehr vom Leerwert zu unterscheiden. Korrespondierend hierzu ergab sich ein dosisabhängiger Signalverlust der Leber im MR-Bild, der mit der Zeit wieder abnahm. Die Daten deuten daher an, dass die Citrat stabilisierten Partikel von VSOP-C184 ähnlich wie Dextran-ummantelte Partikel (265), nach i.v. Injektion über das MPS abgebaut werden, allerdings nahezu ausschließlich über die Leber. Andere SPIO werden mit einem wesentlichen Anteil sowohl über Leber als auch die Milz aufgenommen und abgebaut. So konnten z.B. Bremer et al. bei einem Vergleich unterschiedlich großer, Carboxydextran-ummantelter Partikel zeigen, dass alle Partikelgrößen einschließlich der ultrakleinen Partikel zu einer Anreicherung in der Milz führten (29). Dagegen konnten wir für VSOP-C184 weder quantitativ noch über SI-Messungen im MR-Bild Hinweise für eine signifikante Akkumulation in der Milz finden. In der hier diskutierten Untersuchung wurden die quantitativen Daten zur Pharmakokinetik

erstmalig mittels direkter Eisenbestimmung erhoben. Um hierbei den Hintergrund durch das Blut-Eisen zu minimieren, wurden die Tiere für diese Untersuchungen vollständig entblutet. Die Ergebnisse der quantitativen Eisenbestimmungen von Leber, Milz und Restkörper zeigen, dass bis zu einer Dosis von 0,045 mmol Fe/kg, der voraussichtlichen klinischen Dosis für die MR-Angiographie, keine messbare Zunahme der Eisenkonzentration erfolgt. Lediglich die Dosis von 0,075 mmol Fe/kg führt zu dem erwähnten, leichten Anstieg der Eisenkonzentration in der Leber unmittelbar nach Injektion. Üblich sind für pharmakokinetische Untersuchungen zu SPIO nuklearmedizinische Messungen mit ^{59}Fe - oder ^{111}I -präparierten Substanzen (197, 265). Für diese Methode gilt als Einschränkung, dass die Gesamtkomposition der radioaktiv markierten SPIO nicht unbedingt mit der Originalsubstanz identisch sein muss und somit die pharmakokinetischen Daten nicht vollständig das Verhalten der Originalsubstanz widerspiegeln. Des Weiteren ist die Untersuchung der Auswirkung der i.v. SPIO Injektion auf den Eisengehalt des Körpers nicht möglich.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Sicherheitspharmakologie haben wir besonderes Augenmerk auf eine mögliche Beeinflussung von Kreislaufparametern gelegt. Das entsprechende Experiment wurde an Schweinen durchgeführt, da diese Spezies, anders als sonst verwendete Labortiere (z.B. Maus, Ratte, Meerschweinchen, Hund) mit kardiovaskulären Reaktionen empfindlich auf die i.v. Injektion partikulärer Substanzen reagiert. Diese Empfindlichkeit wird der Anwesenheit sogenannter pulmonaler intravaskulärer Makrophagen (PIMs) beim Schwein zugeschrieben (28, 112). Die von einer intravenösen Injektion partikulärer Substanzen am Schwein bekannte Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes konnte für VSOP-C184 nicht beobachtet werden. Dies könnte an dem sehr geringen Partikeldurchmesser von VSOP-C184 (< 10 nm) liegen. Die in der Untersuchung zur Toxizität bei wiederholter Gabe der Prüfmedikation an einzelnen Schweinen unmittelbar nach Injektion gesehenen Reaktionen mit leichter Hautrötung und Atmungsbeschleunigung war auf die Verwendung einer nicht endgültigen Formulierung von VSOP in diesen Fällen zurückzuführen. Den in diesen Fällen verwendeten Formulierungen VSOP-C180 und VSOP-C183 war Mannitol nur in einer Konzentration von 50 g/l zugesetzt, während die endgültige Formulierung 60 g/l enthält. Hierdurch lag der pH bei 6.44-6.5 und die Osmolalität bei 284 – 314 mOsm/kg H₂O, bei VSOP-C184 ist demgegenüber der pH auf 7.0 und die Osmolalität auf 376 mOsm/kg H₂O eingestellt.

In der Prüfung der akuten Toxizität an Mäusen liegt für VSOP-C184 die berechnete LD₅₀ über einer Dosis von 17.9 mmol Fe/kg und damit um mindestens den Faktor 230 über der maximal am Menschen während einer Untersuchung zu applizierenden Dosis (0,075 mmol Fe/kg). Aus der an Ratten ermittelten LD₅₀ ergibt sich ebenfalls ein hoher

Sicherheitsfaktor von mindestens 116. Damit zeigt VSOP-C184 ähnliche akute Verträglichkeitsdaten wie die im Tierversuch als akut exzellent verträglich geltenden polymerummantelten SPIO und USPIO (121, 265). In der Prüfung der Toxizität bei wiederholter Gabe zeigten sich weder bezüglich der Laborparameter noch in der Beurteilung der Histologie der verschiedenen Organe Veränderungen, die für eine Toxizität von VSOP-C184 sprechen würden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse zur Sicherheitspharmakologie und Toxizität, dass VSOP-C184 vergleichbar mit anderen SPIO (265) eine ausgezeichnete Verträglichkeit aufweist.

Zusammenfassend zu diesem Studienabschnitt stellt VSOP-C184 ein MR-Kontrastmittel dar, das aufgrund des pharmakokinetischen Profils und der starken T_1 -Relaxationszeit verkürzenden Wirkung in besonderer Weise für die MR-Angiographie geeignet ist. Das lange Zeitfenster für die Bildgebung dürfte die Substanz insbesondere für die MR-Angiographie der Koronararterien prädestinieren. Da die Substanz zusätzlich günstige Daten zur Sicherheitspharmakologie, sowie zur akuten Toxizität nach einzelner und mehrfacher Gabe aufweist, stellt VSOP-C184 ein vielversprechendes Kontrastmittel für die MR-Angiographie dar. Auf der Basis der in diesem experimentellen bzw. präklinischen Teil des Projektes erhobenen Daten konnte die Durchführung der nachfolgend beschriebenen ersten klinischen Prüfung am gesunden Probanden gerechtfertigt werden.