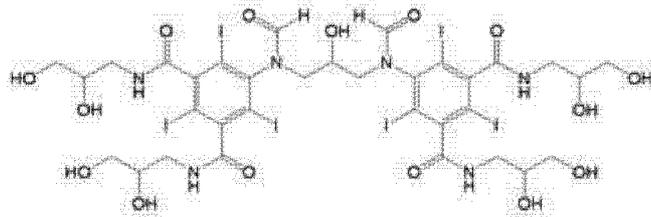


1. 一种诊断组合物,其包含化合物 I

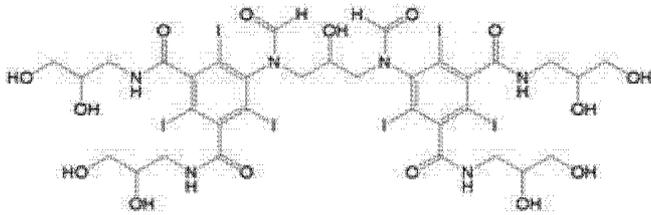


化合物 I

药学上可接受的载体;

和溶于其中提供 40-50 mM 钠离子浓度和 0.1-0.7 mM 钙离子浓度的钠化合物和钙化合物。

2. 权利要求 1 的诊断组合物,其包含提供 42-47 mM 钠离子浓度的钠化合物。
3. 权利要求 1 的诊断组合物,其包含提供 44-46 mM 钠离子浓度的钠化合物。
4. 权利要求 1 的诊断组合物,其包含提供 45 mM 钠离子浓度的钠化合物。
5. 权利要求 1-4 中任一项的诊断组合物,其包含提供 0.3-0.6 mM 钙离子浓度的钙化合物。
6. 权利要求 1-4 中任一项的诊断组合物,其包含提供 0.4-0.5 mM 钙离子浓度的钙化合物。
7. 权利要求 1-4 中任一项的诊断组合物,其包含提供 0.5 mM 钙离子浓度的钙化合物。
8. 权利要求 1 的诊断组合物,其中钠离子浓度与钙离子浓度之间的比率为 63-117。
9. 一种诊断组合物,其包含
化合物 I



化合物 I

药学上可接受的载体;

和溶于其中的钠化合物和钙化合物,其中钠离子浓度与钙离子浓度之间的比率为 40-45。

10. 权利要求 1-4 和 8-9 中任一项的诊断组合物,其中钠化合物和钙化合物是包含选自氯离子、硫酸根、磷酸根和碳酸氢根的反离子的盐。
11. 权利要求 10 的诊断组合物,其中钠化合物是氯化钠,钙化合物是氯化钙。
12. 权利要求 1-4,8-9 和 11 中任一项的诊断组合物,其进一步包含 EDTA 和 / 或 TRIS。
13. 权利要求 1-4,8-9 和 11 中任一项的诊断组合物用于制备造影剂的用途,所述造影剂用于一种诊断方法,其包含将所述诊断组合物给予人或动物身体,用诊断设备检查身体和编译检查数据。
14. 权利要求 1-4,8-9 和 11 中任一项的诊断组合物用于制备造影剂的用途,所述造影

剂用于一种体内成像检测方法,其包含以下步骤:

- i) 给予可检测量的诊断组合物;
- ii) 使给予的组合物分布;
- iii) 检测由分布组合物的化合物 I 发出的信号,
- iv) 产生代表所述信号的位置和 / 或量的图像。

15. 权利要求 14 的用途,其中所述方法是冠状动脉造影术方法。

16. 权利要求 1-4, 8-9 和 11 中任一项的诊断组合物,其用作 X 射线诊断或 X 射线成像中的 X 射线造影剂。

包含具有优良安全性概况的血浆阳离子的诊断组合物

[0001] 本发明涉及表现优良的心脏安全性概况 (profile) 的新的诊断 X 射线组合物。该组合物包含药学上可接受的载体中的非离子碘化二聚体。本发明还涉及用此类诊断组合物成像的方法。

[0002] 所有诊断成像都基于从体内不同的结构获得不同的信号水平。因此例如对于使指定身体结构在图像中可见的 X 射线成像, 该结构的 X 射线衰减必须与周围组织不同。身体结构与其周围之间的信号差异通常称为对比, 已投入许多努力到增强诊断成像的对比的手段中, 因为身体结构与其周围之间的对比越大, 图像的质量越高, 它们对进行诊断的医生的价值越大。而且, 对比越大, 在成像程序中可见到的身体结构越小, 即增加的对比可导致空间分辨率增加。图像的诊断质量强烈取决于成像程序中的固有噪音水平, 对比水平与噪音水平的比率因此可视为代表诊断图像的有效诊断质量因子。实现此类诊断质量因子的改善一直以来且仍然是重要的目标。

[0003] 在比如 X 射线的技术中, 改善诊断质量因子的一种方法是将配制为造影剂 (contrast media) 的对比增强材料引入成像身体区域内。因此关于 X 射线, 对比剂 (contrast agent) 的早期实例是不溶性无机钡盐, 其增强它们分布其中的身体区域的 X 射线衰减。最近 50 年 X 射线对比剂领域以可溶性含碘化合物为主导。市售可得的含碘化对比剂的造影剂 (CM) 通常分为离子单体比如泛影葡胺 (如以商标 Gastrografen™ 销售), 离子二聚体比如碘克酸 (如以商标 Hexabrix™ 销售), 非离子单体比如碘海醇 (如以商标 Omnipaque™ 销售)、碘帕醇 (如以商标 Isovue™ 销售)、碘美普尔 (如以商标 Iomeron™ 销售) 和非离子二聚体碘克沙醇 (如以商标 Visipaque™ 销售)。最近几十年通过开发新剂已不断改善碘化 X 射线造影剂的临床安全性; 从离子单体 (Isopaque™) 到非离子单体 (如 Omnipaque™) 和非离子二聚体 (如 Visipaque™)。但是, 即使目前市场上高度精制的 X 射线造影剂也表现低程度的不期望的临床副作用, 比如对比剂肾病 (CIN)、不良心脏事件和延迟不良反应 (DAR)。因此, 临床上需要一种新的更安全的 X 射线造影剂, 尤其是关于涉及对这些副作用有高风险的患者的诊断研究。

[0004] 造影剂的效用主要受以下支配: 其毒性、其诊断功效、其对给予造影剂的受试者可具有的不良作用和生产、贮存和给药的容易程度。造影剂的毒性和不良生物作用归结于制剂即诊断组合物的组分, 如溶剂或载体以及对比剂本身及其组分比如离子对比剂的离子, 还有其代谢物。

[0005] 冠状动脉造影程序的数量持续增加, 与冠脉介入的能力扩大相符, 包括经皮穿刺冠状动脉成形术、支架植入和冠脉内给予治疗。每年全世界进行超过 7 千万例程序, 其中大部分与心脏有关。由碘化放射线造影剂引起的严重副作用很少见, 但可发生在高危患者中和经皮冠脉介入期间。

[0006] 在冠状动脉造影术中, 理想地应将冠状动脉中的血液完全用碘化放射线造影剂的推注 (bolus) 代替以使放射线衰减最大化, 从而优化诊断成像。当造影剂代替血液时, 造影剂分子在冠状血管内引起化学毒性和渗透作用, 还改变电解质浓度、粘度和氧张力。这些改变可影响收缩力和心律, 引起心室纤维性颤动 (VF)。选择性注射造影剂进入冠

状动脉内引起区域性电生理学和血液动力学作用。严重的室性心律失常,以及心脏衰退(cardiodepression),是已知可能与造影剂有关的冠状动脉造影术并发症。

[0007] W091/13636 和 W090/11094(两者都属于 Nycomed AS(现 GE Healthcare AS))涉及 X 射线造影剂及其包括不同盐的制剂。在文献中还有许多关于包括盐(主要是 NaCl)的 X 射线对比剂制剂的优点的研究。已在来自大鼠(Jynge 等, Investigative Radiology 1993, 28, 20-25) 和家兔(Bååth 等, Investigative Radiology 1993, 28, 223-227) 的分离的心脏上、在犬(Pedersen 等, Acad. Radiol. 1994, 1, 136-144) 和猪中进行了研究。特别相关的是 Chai 等的研究(Acad. Radiol. 2004, 11, 583-593), 其中显示含有 19mM NaCl 和 0.3mM CaCl₂ 的碘克沙醇制剂表现比单独碘克沙醇更低的心室纤维性颤动频率。

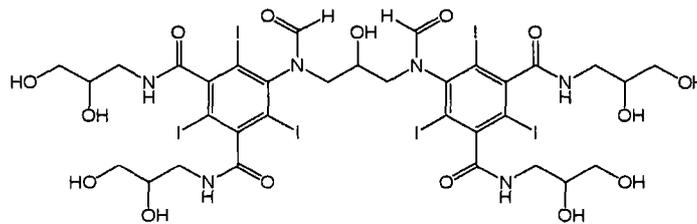
[0008] Jacobsen 等, Investigative Radiology 1993 ;28, 917-924 显示在犬中快速反复注射造影剂导致对收缩力和单相动作电位的累加作用,而林格氏溶液无作用。对此进行研究以理解临床实践中的血管造影术(其中反复注射并不是不常见的,以填充整个冠脉树)怎样可引起心脏参数改变和导致并发症。

[0009] 目前上市的碘克沙醇制剂, 320mgI/ml 含有 19mM 钠离子和 0.3mM 钙离子(Visipaque™)。在实验上已显示该制剂与不加盐的碘克沙醇相比表现优良的心脏安全性概况,主要通过心脏猪模型中的体内研究,还通过对分离的动物心脏的研究。在类似研究中已显示当将碘海醇与加入的盐(主要是 NaCl)配制时,也显示增加的心脏耐受性。

[0010] GE Healthcare AS 的 W0 2009/008734 公开一类新的化合物及其作为 X 射线对比剂的用途。所述化合物是含有两个连接的碘化苯基的二聚体。连接这两个碘化苯基的桥是任选被 1-6 个 -OH 或 OCH₃ 基团取代的直链 C₃-C₈ 亚烷基链。该申请的通式 (I) 覆盖一系列化合物,并提出了许多具体化合物。

[0011] 化合物 I, 一种具体的二聚 X 射线对比剂, 落在 W02009/008734 的式 I 内, 申请人已发现其具有有利的性质:

[0012]



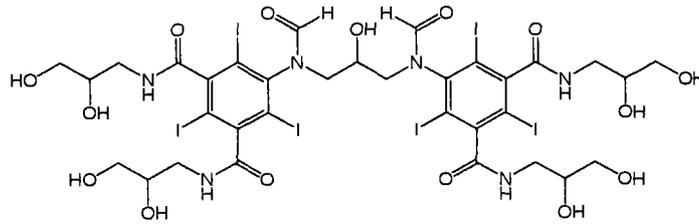
[0013] 化合物 I :5-[甲酰基 -[3-[甲酰基 -[3,5- 双 (2,3- 二羟基丙基氨基甲酰基) -2,4,6- 三碘苯基] 氨基] -2- 羟基丙基] 氨基] -N,N' - 双 (2,3- 二羟基丙基) -2,4,6- 三碘苯 -1,3- 二甲酰胺。

[0014] 申请人现已意外鉴定一种新的诊断 X 射线组合物, 与 Visipaque™ 相比其表现优良的心脏安全性概况, 如在上文指出的类似体内研究中显示。

[0015] 因此, 第一方面本发明提供一种诊断组合物, 其包含

[0016] 化合物 I

[0017]



[0018] 化合物 I

[0019] 药学上可接受的载体；

[0020] 和溶于其中的提供 40–50mM 钠离子浓度和 0.1–0.7mM 钙离子浓度钠化合物和钙化合物。

[0021] 化合物 I 的生化性质见下文。除了生物分布和急性毒性信息以外，关于所用方法的其它信息在实施例 1 提供。

[0022] **蛋白结合**：用平衡透析法测定化合物 I 与人血清白蛋白 (HSA) 的结合。化合物 I 与人血清白蛋白的结合经测定非常低， $3.1 \pm 1.3\%$ ，证实该物质与内源性蛋白可忽略的相互作用。

[0023] **分配系数**：化合物 I 的亲水性，通过在辛醇与水之间的分配测定，显示化合物 I 非常亲水， $\log P$ 为 -4.28 。

[0024] **粘度**：以三种不同浓度在 20°C 和 37°C 测定化合物 I 的粘度。结果显示于图 4。在 320mgI/ml 和 20°C 粘度为约 24mPas 。

[0025] **同渗重摩**：以四种不同浓度， 204 、 254 、 310 和 324mgI/ml ，测定化合物 I 的同渗重摩。化合物 I 在 320mgI/ml 的同渗重摩为 136mOsm/kg 。

[0026] 已鉴定一种与 Visipaque™ 相比表现优良心脏安全性概况的新的诊断 X 射线组合物。除了化合物本身即提供对比的化合物的安全性以外，诊断组合物的另外的组分是关键的。

[0027] Chai 等的研究显示含有 19mM NaCl 和 0.3mM CaCl_2 的碘克沙醇制剂比单独碘克沙醇表现更低的心室纤维性颤动 (VF) 频率。该研究对猪进行，其中将造影剂直接注入事先闭塞的左冠状动脉 (LCA) 内。在注射 Visipaque™ 后看到无心室纤维性颤动发生。作为化合物 I 安全性测试的一部分，和对它的制剂的鉴定，将化合物 I 的制剂进行测试并与 Visipaque™ 相比。因为在先前公开的研究 (上文) 中经 40-s 注射时间进行 20ml 碘克沙醇的冠脉内注射，无 VF 发生的情况，所以经 62.5s 时间将注射体积增加至 25ml 以增加 VF 的情况用于比较的目的。此外，将测试和参考溶液选择性注入左前降支冠状动脉 (LAD) 以进一步增加模型的敏感性。在这种高体积，即使 Visipaque 也 100% 表现显著的心室纤维性颤动频率 (图 3)。实验在实施例 2 概述。

[0028] 令我们惊奇的是，新的 X 射线对比剂化合物 I，当与多至 $40\text{-}50\text{mM NaCl}$ 和 $0.1\text{-}0.7\text{mM CaCl}_2$ 配制在诊断组合物中时，显示无心室纤维性颤动发生 (细节见图 3 和表 3)。

[0029] 当比较来自两项不同研究的结果时，看到 Visipaque 的心室纤维性颤动频率从 0% 增加至 100% 。但是，即使在高剂量，二聚 X 射线对比剂化合物 I 也不表现心室纤维性颤动。主要区别是在本研究中化合物 I 与 45mM NaCl 配制，明显高于 Visipaque (19mM)。虽然 $0.1\text{-}0.7\text{mM}$ 钙离子浓度没有见到心室纤维性颤动 (VF) 的显著作用，但当存在较少钙时动脉收缩压 (SAP) 和左心室收缩压 (LVP) 明显减小 (表 2)。这些数据表明影响心室纤维性

颤动频率的主要因素是氯化钠浓度,而钙对动脉收缩压和左心室收缩压(LVSP)具有显著作用。的确,在正常猪中的研究显示,LAD注射不加CaCl₂、含有45mM NaCl的化合物I组合物导致注射后45-70秒LVSP下降(标化至林格乳酸盐平均-5.7mm Hg),而注射含有45mM NaCl和0.5mM CaCl₂的化合物I组合物以类似于Visipaque的方式维持LVSP(标化至林格乳酸盐分别为-0.3和+0.1mm Hg)(实施例2b)。此外,以相同速率和体积注射碘帕醇在开始注射后大约27-50秒每次(3头猪总计9次注射)都诱发VF(这限制对LVSP反应的任何分析)。这些结果进一步表明在化合物I的组合物中存在0.5mM CaCl₂是有益的,以类似于Visipaque的方式限制对LVSP的任何负作用。而且,在化合物I和Visipaque的诊断组合物中存在的加入的电解质与不加入电解质的碘帕醇相比可降低诱发VF的倾向。研究的电解质的量和比率在实施例2b的表4提供。

[0030] 在更快速注射(40ml,以5ml/秒)的研究中,当将化合物I与45mM NaCl和0.5mM CaCl₂在组合物中选择性注入正常猪的LAD时,维持左心室收缩压,类似于给予林格乳酸盐和Visipaque后所见。相反不含加入的电解质的碘帕醇注射诱发LVSP明显下降(实施例2c)。而且,碘帕醇诱发dP/dt实质增加(69%),而在这方面化合物I类似于林格乳酸盐和Visipaque(适当增加至多30%)。考虑在所研究的化合物I和Visipaque的制剂中电解质钠(Na)和钙(Ca)的存在和比率(其更接近林格乳酸盐和间质液的Na/Ca平衡组成)促成与注射不含有加入的电解质的碘帕醇之后相比优良的心脏功能的维持。电解质的量和比率在实施例2b的表5提供。

[0031] 在本发明又一个实施方案中本发明组合物包含提供42-47mM钠离子浓度,甚至更优选44-46mM钠离子浓度,且最优选45mM钠离子浓度的钠化合物。

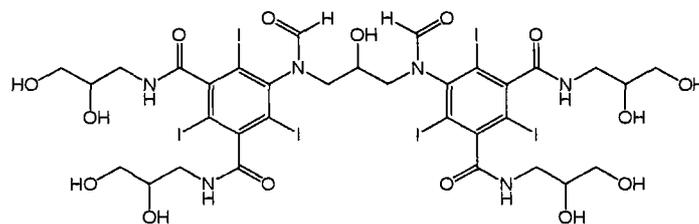
[0032] 在本发明又一个实施方案中本发明组合物包含提供0.3-0.6mM钙离子浓度,甚至更优选0.4-0.5mM钙浓度且最优选0.5mM钙离子浓度的钙化合物。

[0033] 在这方面,钠离子浓度与钙离子浓度之间的比率应为57-500,比如63-117,更优选70-156,更优选85-115且最优选88-95。

[0034] 第二方面,本发明提供诊断组合物,其包含

[0035] 化合物I

[0036]



[0037] 化合物I

[0038] 药学上可接受的载体;

[0039] 和溶于其中的钠化合物和钙化合物,其中钠离子浓度与钙离子浓度之间的比率为40-45,优选43。这反映林格乳酸盐组合物的电解质浓度。

[0040] 可将所述组合物的钠化合物和钙化合物提供为盐的形式,即化合物包括生理学上可耐受的反离子,如选自氯离子、硫酸根、磷酸根和碳酸氢根。优选钠化合物是氯化钠,钙化合物是氯化钙。

[0041] 药学上可接受的载体是水溶液, 优选纯水。

[0042] 钠对于心肌去极化是必需的, 心肌去极化依赖于向内 Na^+ 流。我们相信将 40-50mM 钠离子, 优选 45mM NaCl 加入化合物 I 使其比碘克沙醇 +19mM Na^+ /L 更接近正常 Na^+ 间质浓度。因此, 化合物 I 可能更生理性和更能够维持快速钠通道的动作电位, 从而抵消因太少或无钠所致的“慢反应”动作电位。

[0043] 先前的研究已显示将少量钠 (10-30mmol/L) 加入非离子造影剂可降低这些造影剂导致心室纤维性颤动 (VF) 的风险。但是研究还显示将更多钠加入造影剂内还可增加负性收缩力, 如通过减小的动脉收缩压 / 左心室收缩压 (SAP/LVP) 所指示。为了维持正常的细胞外和细胞内钠 - 钙 (Na-Ca) 关系, 将钙加入非离子造影剂内减少负性收缩作用。但关键问题是应加入多少钙以防止负性收缩力增加。考虑在 Visipaque 制剂中将 19mM NaCl 和 0.3mM CaCl_2 加入碘克沙醇 320mg I/mL 内最佳, 以将冠脉造影期间的生理学紊乱比如 VF 和负性收缩力增加减到最少。

[0044] 在我们的研究中, 证实了 CaCl_2 对于含有 45mM NaCl 的化合物 I 的益处 (表 3)。具有 0.1mM CaCl_2 的制剂 (F1) 与具有 0.3mM CaCl_2 (F3) 或 0.7mM CaCl_2 (F5) 的制剂相比分别诱发明显更低的 SAP 和 LVP。具有 0.3mM CaCl_2 的化合物 I 制剂与具有 0.7mM CaCl_2 的制剂相比引起更低的 SAP。由此断定将钙离子加入造影剂内可抵消因加入钠所致的负性收缩力。

[0045] 但是, 在钠与钙离子之间有关键性平衡。将适当浓度的钠和钙加入非离子造影剂内降低 VF 的风险和减少对收缩力的不良作用。加入太多钠降低心肌收缩力。这后一种作用被加入 Ca^{2+} 离子抵消。含有 45mM NaCl 和 0.7mM CaCl_2 (F7) 的化合物 I 的制剂似乎是最佳制剂, 因为它不引起任何 VF 且与 F1 和 F3 制剂相比维持更好的收缩力。但是, 化合物 I 的 F5 制剂的血液动力学作用等于 Visipaque, 因此优选 F3 与 F5 之间的钙浓度。因此, 在一个特别优选的实施方案中本发明的组合物包含 45mM NaCl 和 0.5mM CaCl_2 。

[0046] 化合物 I 的这种组合物的静脉内和动脉内安全性在单独的研究中显示。在此研究中, 在急性猪模型中以三种剂量水平体内评估化合物 I 在 45mM NaCl 和 0.5mM CaCl_2 的组合物中的心血管作用。概括而言当经静脉内和动脉内途径给予组合物时心肌性能整体无改变。该研究进一步描述于实施例 3。

[0047] 一般, 碘化造影剂可在暴露后 1 小时至几天在易感患者中引起迟发超敏反应。这些反应主要是不严重的皮疹比如斑疹、斑丘疹和荨麻疹样皮疹。造影剂诱发的延迟不良反应 (DAR) 比如皮疹似乎由造影剂 - 反应性 T 细胞引起, 所述 T 细胞在识别造影剂后增殖接着在皮肤中使炎症反应协调进行。申请人已评价一个体外 T 细胞增殖模型, 该模型设计用于用它预测造影剂 (比如化合物 I) 将在血管内给药后引起患者的迟发皮肤反应的相对频率。对于来自 100 个供体 (其代表世界人群 HLA-DR 频率) 的 $\text{CD}25^+$ 耗尽的外周血单核细胞中的体外 T 细胞增殖, 筛选两种具有已知延迟皮肤反应速率的造影剂 (碘克沙醇和碘海醇) 和新造影剂化合物 I (2 和 5mg I/mL)。根据公开的方案和刺激指数值 (阳性反应 ≥ 1.9) 评价阳性 T 细胞反应。通过测量用测试造影剂 (5mg I/mL) 培养的前 10 份供体样品的细胞活力来测试体外毒性。结果是所有主要 HLA-DR 同种异型都表现为等于世界人群的频率。测试的造影剂都不显示对细胞活力具有有意的作用。化合物 I 与两种浓度的碘克沙醇和碘海醇相比具有更少的阳性 T 细胞增殖供体样品。对于碘克沙醇和碘海醇, 大多数供体的 T

[0059] 又一方面,本发明提供体内成像检测方法,其包含以下步骤:

[0060] i) 给予可检测量的本发明诊断组合物;

[0061] ii) 使给予的组合物分布;

[0062] iii) 检测由分布组合物的化合物 I 发出的信号;

[0063] iv) 产生代表所述信号的位置和 / 或量的图像。

[0064] 所述成像方法是 X 射线成像方法,在这方面的一个优选实施方案中,检测方法是冠脉造影术方法,更优选将诊断组合物作为推注注射给予冠状动脉。

[0065] 又一方面,本发明提供用于 X 射线成像或诊断,比如冠脉造影术,的本发明组合物。

[0066] 附图简述:

[0067] 图 1 描述在 [¹²³I] 标记的化合物 I 给药后 48 小时雄性和雌性 Wistar 大鼠中放射性分布的比较。

[0068] 图 2 描述通过注射甘露醇,甘露醇 + 加入的钠和钙,碘克沙醇 + 甘露醇,Visipaque™ 和林格溶液引起的心室纤维性颤动的频率。数据取自 Chai 等。

[0069] 图 3 描述与注射 Visipaque 相比,通过注射包含不同浓度氯化钙的化合物 I 组合物引起的心室纤维性颤动的频率。经过 62.5s 时间注射体积是 25ml,将溶液选择性注入 LAD 内。

[0070] 图 4 描述化合物 I 在 20°C 和 37°C 的粘度对浓度。

[0071] 图 5 描述从开始注射至正常猪 LAD 后 45-70 秒化合物 I (加入和不加 Ca) 和 Visipaque 对 LVSP 的作用,标化至林格乳酸盐 (LR) 注射。

[0072] 图 6 描述在将 40ml (5ml/ 秒) 林格乳酸盐、化合物 I、Visipaque 或碘帕醇注射至正常猪的 LAD 后对心血管参数的作用。

实施例:

[0073] 实施例 1. 化合物 I 的生化性质、急性毒性和生物分布数据。

[0074] 蛋白结合.

[0075] 用平衡透析法测定化合物 I 与人血清白蛋白 (HSA) 的结合。将化合物 I 原液 (5.0mg/ml 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中) 与柠檬酸盐:人血浆 (比率为 1 : 9) 混合。用 Diachem 10.17MW 截止 10000 膜在 Diachem Dianorm Dialyser 中对水性磷酸盐缓冲盐水进行平衡,进行 25 小时。用 ICP-AES 仪器进行溶液的分析。此外,还使掺料 (spike) PBS 溶液对含柠檬酸盐的人血浆溶液平衡以确保已获得平衡。化合物 I 与人血清白蛋白的结合经测定非常低, $3.1 \pm 1.3\%$, 证实该物质与内源性蛋白可忽略的相互作用。作为参比,碘克沙醇与 HAS 的结合经测定为 $0.4 \pm 0.9\%$ 。

[0076] 分配系数.

[0077] 作为化合物 I 亲水性的度量,测定在辛醇与水之间的分配系数。将含有测试物质 (0.3mg/ml) 的水 (5ml) 与 15ml 正辛醇振荡直至已获得平衡。将水相离心分离,在 244nm 和 0.3ml/min 流速用 UV 检测通过 HPLC (HP1100, 配备 Discovery C18 柱, $100 \times 2.1\text{mm}$) 分析。使用等度 HPLC 条件,在水中的 8% 乙腈 (v/v)。用水 (0.75ml) 萃取辛醇相 (12.5ml) 直至已获得平衡,使相离心分离。将水相通过 HPLC 用上文详细描述的条件分析。在分配系数实

验之前,将辛醇和水两者分别用水和辛醇预饱和。通过辛醇与水之间的分配测定的化合物 I 的亲水性显示化合物 I 非常亲水, logP 为 -4.28。作为比较,碘克沙醇相应的 logP 经测定为 -4.02。报道的文献值是 -4.05。化合物 I 与碘克沙醇相比亲水性增加通过其 HPLC 性能证实。

[0078] 粘度:

[0079] 在两种不同温度 20°C 和 37°C,和三种不同浓度 246、295 和 313mgI/ml 测定化合物 I 的粘度。通过用 NaCl 调节同渗重摩使测试溶液等渗,并通过高压灭菌消毒。用密度计 DMA58(Anton Paar) 测定溶液的密度。使用校正的 U-管技术,其中用落下时间作为动态粘度的度量。以三种不同浓度在 20°C 和 37°C 测定化合物 I 的粘度。结果显示于图 4。与 Visipaque 相比,在 320mgI/ml 和 20°C 的粘度相似,为约 24mPas。

[0080] 同渗重摩:

[0081] 以四种不同浓度 204、254、310 和 324mgI/ml 测定化合物 I 的同渗重摩。使用来自 Vapro Inc. 的 Vapro 5520 蒸气压渗透压计。化合物 I 的同渗重摩显示与浓度的关系接近线性。化合物 I 在 320mgI/ml 的同渗重摩低于碘克沙醇,在 320mgI/ml 为 136mOsm/kg 对 210mOsm/kg。

[0082] 急性毒性:

[0083] 年轻的成年雄性 Sca:SD 大鼠 (Scanbur, Sweden),重 200±20g,以 1.2ml/min 速率静脉内注射化合物 I (340mgI/mL, 286mosmol/kg)、碘克沙醇 (321mgI/mL, 284mosmol/kg)、渗透对照甘露醇 (283mosmol/kg) 或盐水 (290mosmol/kg),隔 4 小时以 2 个单独剂量给药。对于中间杀死的动物 (处理后第 2 天),将化合物 I 和碘克沙醇以 8、10 和 12.8g I/kg 给药,分别相当于 23.7、29.7 和 38.0ml/kg,和 25、31.3 和 40ml/kg 的总剂量体积,而对于甘露醇和盐水,剂量体积是 40ml/kg。对于 7 天最终杀死的动物,有 4 种剂量组:化合物 I 和碘克沙醇 (12.8gI/kg),和盐水和甘露醇 (40mL/kg)。在所有情况下,各组包括 8 只动物。

[0084] 在研究期间进行以下评价:临床体征、体重和血液用于在第 0、2 和 7 天的血液学和临床化学,在第 2 或 7 天通过过量静脉内硫酸妥钠注射杀死的动物的组织的粗略观察、器官重量和组织形态学检查。将给药当天定义为第 0 天。在 37°C 在 Beckman Synchron CX5 上测量临床生物化学参数 (Na, K, Cl, PO₄, Ca, AST, ALT, ALP, 胆固醇, 肌酐, CK, GGT, TG (甘油三酯), 总胆红素, 总蛋白, 尿素, 白蛋白, LDH 和 GLDH。用 Abbott Cell-Dyn 3500CS 自动血液分析仪分析血液参数 (WBC, 差异化 WBC, RBC, WBC/RBC 比率, Hgb, PLT, HCT, MCH, MCHC, MCV, MPV 和 RDW)。将来自盐水对照和 12.8gI/kg 化合物 I 和碘克沙醇组的肾脏浸渍固定在 10% 中性缓冲福尔马林中,处理在石蜡内,以 5 μ m 标称厚度切片,用苏木精和伊红染色,通过光学显微镜检查。

[0085] 将数据通过参数单因素 ANOVA,然后通过 Dunnett's 程序后试验分析,用 2 天和 7 天盐水组与 2 天和 7 天碘克沙醇和化合物 I 组相比。统计分析应用于第 -1 天 (基线)、第 2 天和第 7 天。

[0086] 生物分布:

[0087] 对于每个时间点 (2, 20 分钟, 1, 2, 4, 24, 48 小时) 将每种性别的 3 只动物用异氟烷麻醉。在大约 20 秒内每只研究动物接受 2 次注射。第一次注射为 ~ 320mgI/ml 化合物 I 制剂 (非放射性),经指定的尾静脉 (左或右) 给药以得到 ~ 1.6gI/kg 的总化学剂量。然

后尽可能快地（在大约 20 秒内）将放射性 [¹²³I] 化合物 I 试验品（~ 1 至 ~ 8MBq, 至多 350ug）作为静脉内推注注射至对侧尾静脉。这种方法允许在不明显改变化合物 I 总化学剂量的情况下根据解剖时间点（研究第 1、2 或 3 天）调节给予的放射性量。然后将动物置于代谢笼中用于收集尿液和粪便直至注射标记化合物 I 后适合的时间。此时，将动物用异氟烷再次麻醉，通过颈脱位法处死。取出选择的器官和组织（血液、肾脏、膀胱和尿液、肺脏、肝脏、胃、小肠和大肠、心脏、睾丸、卵巢、子宫和粪便），连同作为注射部位测定的尾部一起。然后用自动双晶 γ 计数器和分析系统测定所选器官、组织和排泄物中的放射性量。

[0088] 急性毒性结果：

[0089] 在用盐水或甘露醇处理的大鼠中没有不良临床体征，而在用化合物 I 和碘克沙醇处理的大鼠中看到轻度至中度衰退和运动共济失调和虚弱 / 不活动，以及肢体水肿和红斑。这些作用在首次给药后 10-20 分钟开始并持续 2-3 小时，但没有清楚的剂量 - 反应。分析血液和临床化学数据指明在任何组都没有毒理学显著的不良作用。

[0090] 在肾脏，主要的处理相关发现是近端小管细胞质空泡形成，且在肾小球中，含有蛋白性材料的鲍曼氏腔的膨胀。第 2 天，与化合物 I 相比给予碘克沙醇的大鼠中空泡形成的严重度更大。至第 7 天，两组的空泡形成的严重度都比第 2 天小一些，鲍曼氏腔膨胀和蛋白性材料的存在也一样。

[0091] 表 1- 肾脏主要组织形态学发现的概述：

[0092]

组	大鼠尸检天数	试验品	剂量 (gI/kg)	近端小管空泡形成		肾小球: 鲍曼氏腔膨胀		肾小球: 鲍曼氏腔膨胀蛋白性材料		
				左肾	右肾	左肾	右肾	左肾	右肾	
1	8	2	盐水	-	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	
5	8	2	化合物 I	12,8	3,3,3,3 3,3,3,3	3,4,3,3 0,0,0,P	P,P,0,P P,0,P,0	0,0,0,0 0,0,0,P	P,P,0,P P,0,P,0	
8	8	2	碘克沙醇	12,8	4,4,4,4 4,4,4,4	4,4,4,4 P,0,P,P	P,P,0,0 P,P,P,P	P,P,0,0 P,0,P,P	P,P,P,P P,P,P,0	
9	8	7	盐水	-	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	0,0,0,0 0,0,0,0	
10	8	7	化合物 I	12,8	3,3,2,2 2,2,3,3	3,3,2,2 3,2,3,3	0,0,P,P 0,0,P,0	0,P,0,0 0,0,0,P	0,0,P,P 0,0,P,0	0,P,0,0 0,0,0,P
11	8	7	碘克沙醇	12,8	3,3,2,2 3,3,3,3	3,3,2,2 3,3,3,3	0,0,0,0 P,0,0,0	0,0,0,0 0,0,P,0	0,0,0,0 P,0,0,0	0,0,0,0 0,0,P,0

[0093] 发现的要点 :0 = 不存在 ;P = 存在 ;1 = 最小 ;2 = 轻度 ;3 = 中度 ;4 = 明显 ;5 = 重度。

[0094] 生物分布结果：

[0095] 在静脉内给药后， [¹²³I] 标记化合物 I 迅速排泄，注射后 2 小时 > 80% 注射剂量 (id) 存在于膀胱和尿液中。血中水平从注射后 2 分钟的 21% id 下降至注射后 2 小时的 0.6% id。经粪便途径有小但显著量的排泄，在注射后 48 小时雌性动物（在粪便中 14.3% id）似乎稍高于雄性动物（在粪便中 8.2% id），但这种差异无统计学显著性。在注射标记

化合物 I 后 48 小时小于 2% id 保留在体内,约 0.5% 保留在肾脏,0.1% 保留在肝脏,小于 1% 在尸体其余部分 (图 1),自 24 小时时间点所有都进一步下降。这可能反映在最初的快速排泄阶段后保留在体内的化合物 I 持续、缓慢的排泄。在生殖器官中无放射性保留。总体而言,标记化合物 I 的生物分布概况类似于其它二聚碘化对比剂。

[0096] 实施例 2. 比较研究

[0097] 2a) Visipaque™ 和化合物 I 诊断组合物在猪 LAD 闭塞模型中的心脏毒性的比较

[0098] 参考 Chai 等的研究 (Acad. Radiol. 2004, 11, 583-593), 其中显示含有 19mM NaCl 和 0.3mM CaCl₂ 的碘克沙醇制剂与单独碘克沙醇相比表现更低的心室纤维性颤动频率。该研究在猪中进行, 其中将造影剂直接注入事先闭塞的左冠状动脉 (LCA) 内。从图 2 清楚可知, 含有 19mM NaCl 和 0.3mM CaCl₂ 的碘克沙醇制剂与单独碘克沙醇相比表现更低的心室纤维性颤动频率 (P < 0.01)。在这种情况下, 注射 Visipaque™ 看不到心室纤维性颤动发生。在这些实验中给定的剂量是 20ml, 注射速率为 2.0ml/ 分钟。

[0099] 因为在 Chai 等的研究中冠脉内注射 20ml 碘克沙醇 (配制为 Visipaque) 经 40-s 注射时间进行, 不发生 VF 的情况, 所以我们进行其中经 62.5s 的时间将注射体积增加至 25ml 的研究以增加 VF 的情况用于比较的目的。此外, 将测试和参比溶液选择性注入左前降支冠状动脉 (LAD) 以进一步增加模型的敏感性。测试溶液的物理和化学性质在表 2 提供, 结果在图 3 呈现。

[0100] 表 2. 测试溶液的物理和化学性质

测试剂	碘浓度 (mg I/mL)	电解质 (mM)	
		Na	Ca
[0101] F1: 化合物 I+ NaCl + CaCl ₂	320	45	0.1
F3: 化合物 I+ NaCl + CaCl ₂	320	45	0.3
F5: 化合物 I+ NaCl + CaCl ₂	320	45	0.7
碘克沙醇+ NaCl + CaCl ₂ (Visipaque)	320	19	0.3

[0102] 在这种高注射体积, 即使 Visipaque™ 也 100% 表现明显的心室纤维性颤动频率 (图 3)。

[0103] 但是, 出乎我们意料的是, 新的 X 射线对比剂化合物 I, 当与 45mM NaCl 和 0.1-0.7mM CaCl₂ 配制时, 显示无心室纤维性颤动发生 (细节见图 3 和表 3)。

[0104] 当比较两项不同研究的结果时, 看到 Visipaque™ 的心室纤维性颤动频率从 0% 增加至 100%。但是, 即使在高剂量, 诊断组合物中的二聚 X 射线对比化合物 I 也不表现心室纤维性颤动。主要差异是化合物 I 已与 45mM NaCl 配制, 这明显高于 Visipaque (19mM)。虽然在 VF 看不到 0.1-0.7mM 钙离子浓度对 VF 的显著作用, 但当存在较少钙时 SAP 和 LVP 明显下降 (表 3)。

[0105] 表 3. 在开始注射后 50s 的血液动力学变化, 注射前数值的 %

	F1	F3	F5	Visipaque	
[0106]	SAP	-18% ± 11	-9% ± 7.2*	-4% ± 6.1†‡	-5% ± 4.5†§
	LVP	-16% ± 10	-7% ± 8*	-3 ± 7†	-4% ± 5†
	dP/dt max	+10% ± 27	+31% ± 38	+34% ± 29	+21% ± 10.8
[0107]	HR	-1% ± 1.0	0% ± 0.8	-2% ± 3.0	0% ± 3.5

[0108] SAP :动脉收缩压 (mm Hg)

[0109] LVP :左心室收缩压 (mm Hg)

[0110] dP/dt max :LV 压力产生的最大速率 (mm Hg/s)

[0111] HR :心率 (次 / 分)

[0112] *P < 0.05 vs F1.

[0113] †P < 0.01 vs F1.

[0114] ‡P < 0.05 vs F3.

[0115] §P < 0.01 vs F3.

[0116] 这些数据表明影响心室纤维性颤动频率的主要因素是氯化钠的浓度,而钙对动脉收缩压和左心室收缩压具有显著作用。

[0117] 2b :化合物 I 在加入和不加 CaCl₂ 的组合物中与 Visipaque 和碘帕醇的比较

[0118] 在选择性给予没有球囊闭塞的正常猪的 LAD 后,比较加入和不加 CaCl₂ 的化合物 I 组合物和 Visipaque 及碘帕醇的血液动力学作用。将每种造影剂的作用标化为等量注射林格乳酸盐溶液可见的任何作用,其充当体积和电解质 - “比率”对照。在本研究中总计有 12 头猪,每头猪接受以 10ml (4ml/sec)、20ml (1ml/sec) 和 25ml (0.4ml/sec) 体积注射 3 次的单一 CM (每头猪总计 9 次 CM 注射)。每次 CM 之前或之后是林格乳酸盐的对照注射,每头猪每次注射 (体积) 的顺序是随机的。表 4 提供所用钠和钙电解质的量和比率。

[0119] 表 4 :

[0120]

电解质	Visipaque mM	化合物 I mM	化合物 I+CaCl ₂ mM	林格乳酸盐 mM 或(比率)	人间质液 mM 或(比率)
Na	19	45	45	130	140 (135-145)
Ca	0.3	-	0.5	3	1.2 (1.2-1.3)
Na/Ca	63	-	90	43	117

[0121] 在 25ml 注射体积,在不加 CaCl₂ 的组合物中的化合物 I 伴随注射后 45-70 秒 LVSP 下降 (平均 -5.7mm Hg, 标化至林格乳酸盐),而在加入 CaCl₂ 的组合物中的化合物 I 和 Visipaque 具有很小或没有作用 (分别为 -0.3 和 +0.1mm Hg, 标化至林格乳酸盐) (图 5)。在不加 CaCl₂ 的化合物 I 组合物中观察到的 LVSP 下降与加入 CaCl₂ 的明显不同,后者与

Visipaque 没有显著差异。此外,对碘帕醇注射的相应反应无法分析,因为在开始 25ml 注射后大约 27-50 秒每种情况都观察到 VF。这些结果表明在化合物 I 组合物中存在 0.5mM CaCl_2 是有益的,以类似于 Visipaque 的方式限制对 LVSP 的任何负性作用。此外,与不加电解质的碘帕醇相比,在化合物 I 诊断组合物和 Visipaque 中存在另外的电解质可降低诱发 VF 的倾向。

[0122] 2c:以快速注射速率在正常猪中比较化合物 I 组合物与 Visipaque、碘帕醇和林格乳酸盐

[0123] 在又一个研究中,在以快速注射速率 (5ml/sec) 选择性给予正常猪的 LAD 后,比较在具有 45mM NaCl 和 0.5mM CaCl_2 的组合物中的化合物 I 与 Visipaque 和碘帕醇的血液动力学作用。还将林格乳酸盐作为体积和电解质“比率”对照研究。总计研究 3 头猪,以随机顺序将各 CM 给予每头猪 2 次。使用注射速率是 5ml/sec,总注射体积是 40ml。表 5 提供所用钠和钙电解质的量和比率。

[0124] 表 5:

电解质	Visipaque mM	化合物 I mM	林格乳酸盐 mM 或(比率)	人间质液 mM 或(比率)
[0125] Na	19	45	130	140 (135-145)
Ca	0.3	0.5	3	1.2 (1.2-1.3)
Na / Ca	63	90	43	117

[0126] 虽然化合物 I 和 Visipaque 注射没有诱发 LVSP 或 dP/dt 从基线改变,这与林格乳酸盐给药明显不同,碘帕醇诱发 LVSP 和 dP/dt 值分别明显下降和增加 (图 6)。在碘帕醇给药后 LVSP 下降 $9\% \pm 6$ 和 dP/dt 增加 $69\% \pm 16$ 。这与林格乳酸盐、化合物 I 和 Visipaque 注射形成对比,它们伴随 LVSP 轻度增加 ($\sim 5\%$) 和 dP/dt 中度增加 (至多 $\sim 30\%$)。这些结果表明在快速注入正常猪的 LAD 后,化合物 I 在含有 45mM NaCl 和 0.5mM CaCl_2 的组合物中对血液动力学参数具有类似于 Visipaque 或生理学林格氏溶液的最小作用。考虑在研究的化合物 I 制剂和 Visipaque 中存在电解质 (它们更类似于林格乳酸盐和间质液的平衡组成) 促成与不加电解质的碘帕醇注射后相比优良的心功能维持。

[0127] 实施例 3. 化合物 I 诊断组合物的静脉内和动脉内安全性

[0128] 在单独的研究 (ref. B145095) 中显示化合物 I 组合物的静脉内 (i. v) 和动脉内 (i. a.) 安全性。在该研究中在急性猪模型体内以三种剂量水平评估化合物 I 在含有 45mM NaCl 和 0.5mM CaCl_2 的组合物中的心血管作用。

[0129] 方法:将组合物以三种剂量水平 (标准体积 2ml/kg 的 1 倍、2 倍或 3 倍) 其中一种经动脉内或静脉内注入三只动物的组内。每只动物还接受等体积林格-乳酸盐溶液作为体积对照。评估 CV 作用:心率 (HR)、脉搏血氧、心电图 (ECG)、主动脉压 (收缩压、舒张压和平均压)、左心室舒张末期压 (LVEDP)。还评价超声/超声心动图以评估心搏量、射血分数和心脏收缩性。

[0130] 结果:评价初步实验数据概括表明化合物 I 对猪心脏的 HR、脉搏血氧和 ECG 没有重要的剂量或途径相关性作用。脉搏血氧分析显示给药自始至终血氧饱和度保持约 98%。

HR 也保持在正常范围内。没有化合物 I 相关性心律失常；QT 间期在正常范围内，无论化合物 I 是动脉内或静脉内给药。类似地，看到在整个剂量范围化合物 I 对主动脉压（收缩、舒张和平均）的作用很小或无作用。主动脉压的改变表现类似，无论化合物 I 是通过静脉内或动脉内途径给药。随着化合物 I 剂量增加，LVEDP 稍微增加，无论化合物 I 是经静脉内或动脉内途径给药，作用都是类似的。此外，LVEDP 增加在幅度上类似于给予增加体积的林格-乳酸盐后所见。通过超声心动图分析心搏量、射血分数和心脏收缩性显示舒张末期容积（EDV）仅轻微改变，证实任何作用都是体积相关性，并非特异于化合物 I 给药。

[0131] 因此，当化合物 I 经动脉内或静脉内途径给药时对心肌性能没有总体改变。CV 功能参数的较小改变归因于给药体积而并非测试品化合物 I，因为用林格乳酸盐溶液注射后看到类似作用。在静脉内或动脉内给予标准剂量体积 2ml/kg 至多 3 倍的化合物 I 后，所有心肌参数都在正常范围内。

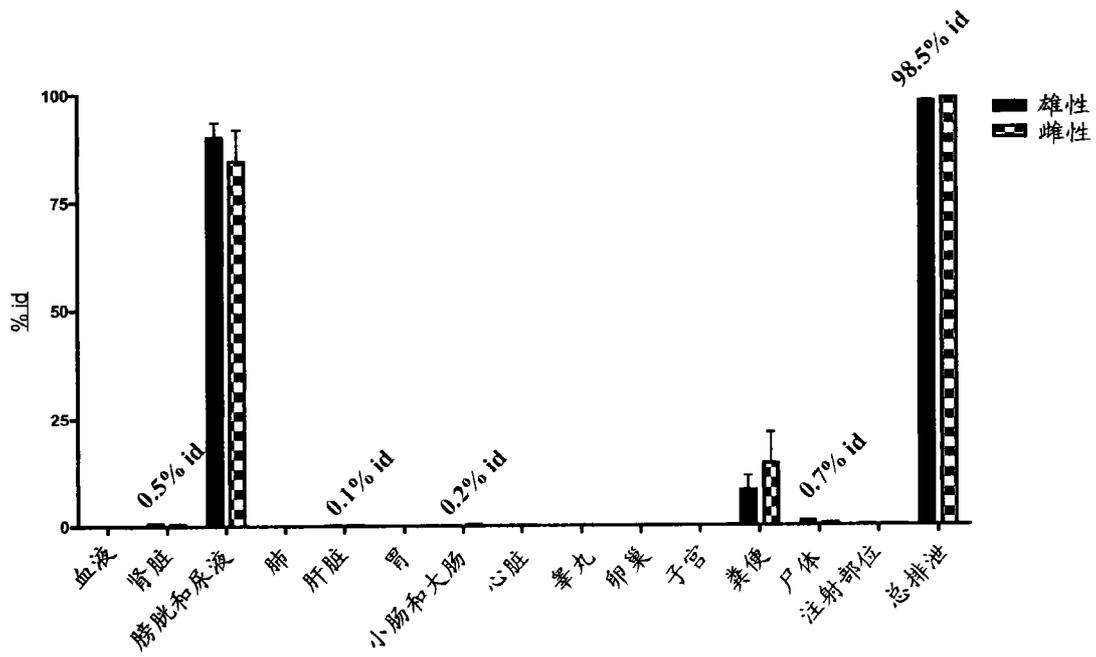


图 1

在 [¹²³I] 标记化合物 I 给药后 48 小时雄性和雌性 Wistar 大鼠中放射性分布的比较。
总排泄 = 膀胱和尿液加粪便中放射性的总数。

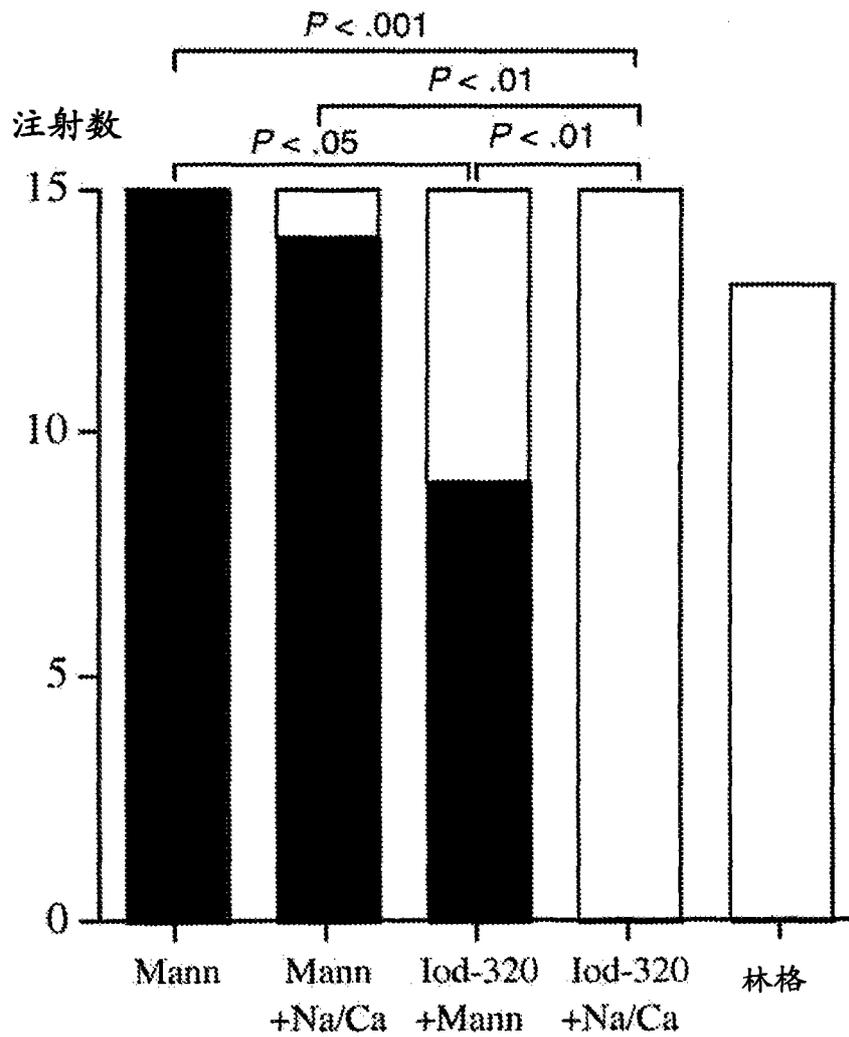


图 2

通过注射甘露醇 (Mann ;275mM), 甘露醇 + 加入的钠和钙 (Mann+Na/Ca ;240mM 甘露醇, 19mM NaCl 和 0.3mM CaCl₂), 碘克沙醇 + 甘露醇 (Iod-320+Mann ;320mgI/ml 碘克沙醇和 50mM 甘露醇), Visipaque™ (Iod-320 ;320mgI/ml 碘克沙醇, 19mM NaCl 和 0.3mM CaCl₂) 和林格溶液 (林格, 林格乙酸盐, KabiVitrum AB, Sweden) 引起的心室纤维性颤动的频率。黑色填充表示 VF, 白色填充表示无 VF。数据取自 Chai 等。

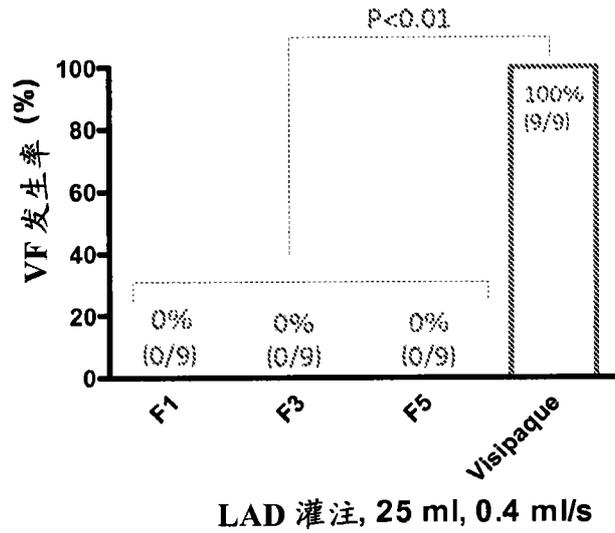


图 3

通过注射以下引起的心室纤维性颤动的频率：

- 化合物 I, 0.1mM CaCl₂ (F1, 320mgI/ml 化合物 I, 45mM NaCl 和 0.1mM CaCl₂) ；
- 化合物 I, 0.3mM CaCl₂ (F3, 320mgI/ml 化合物 I, 45mM NaCl 和 0.3mM CaCl₂) ；
- 化合物 I, 0.7mM CaCl₂ (F5, 320mgI/ml 化合物 I, 45mM NaCl 和 0.7mM CaCl₂) ，
- Visipaque

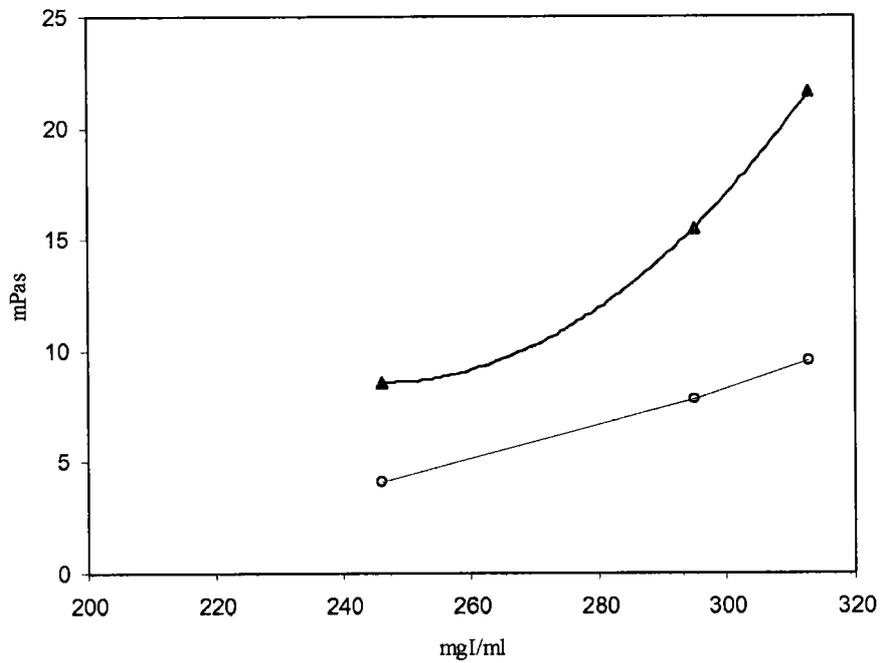


图 4 化合物 I 在 20°C (▲) 和 37°C (○) 的粘度对浓度。

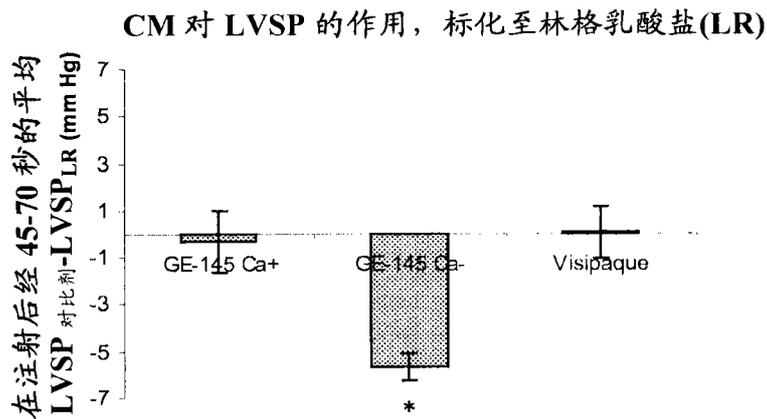
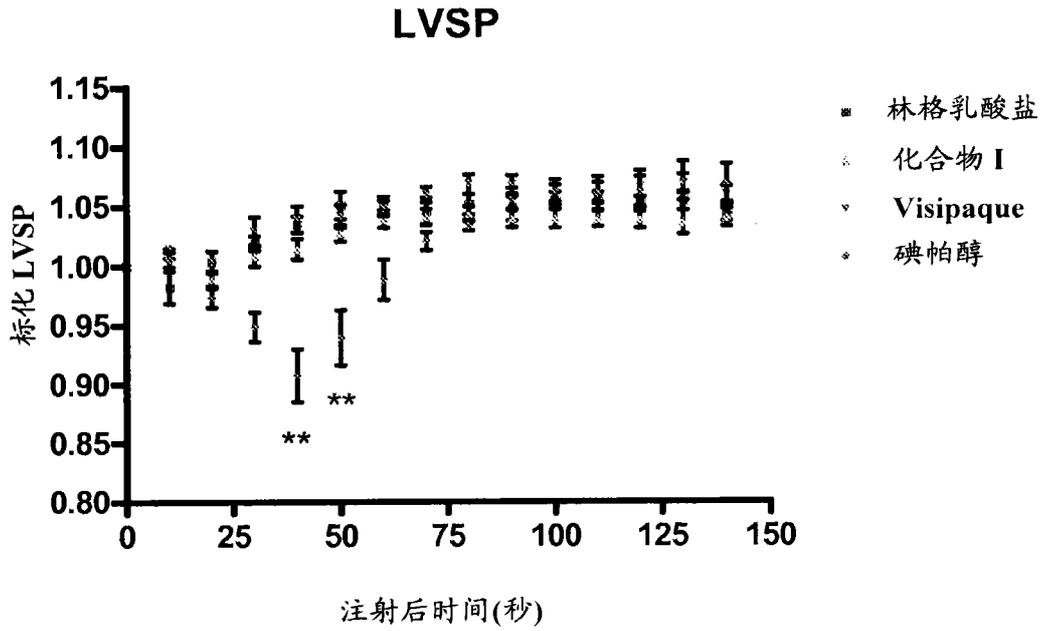


图 5

从开始注射至正常猪 LAD 后 45-70 秒化合物 I (加入和不加 Ca) 和 Visipaque 对 LVSP 的作用, 标化至林格乳酸盐 (LR) 注射。注射体积是 25ml (0.4ml/秒)。“GE-145Ca+”是含有 45mM Na, 0.5mM Ca 的化合物 I 组合物, “GE-145Ca-”是含有 45mM Na 且不加入 Ca 的化合物 I 组合物。平均 \pm SEM。* = $p < 0.05$, 与用双尾 Dunnett's 试验的 GE-145Ca+ 显著差异。

a)



b)

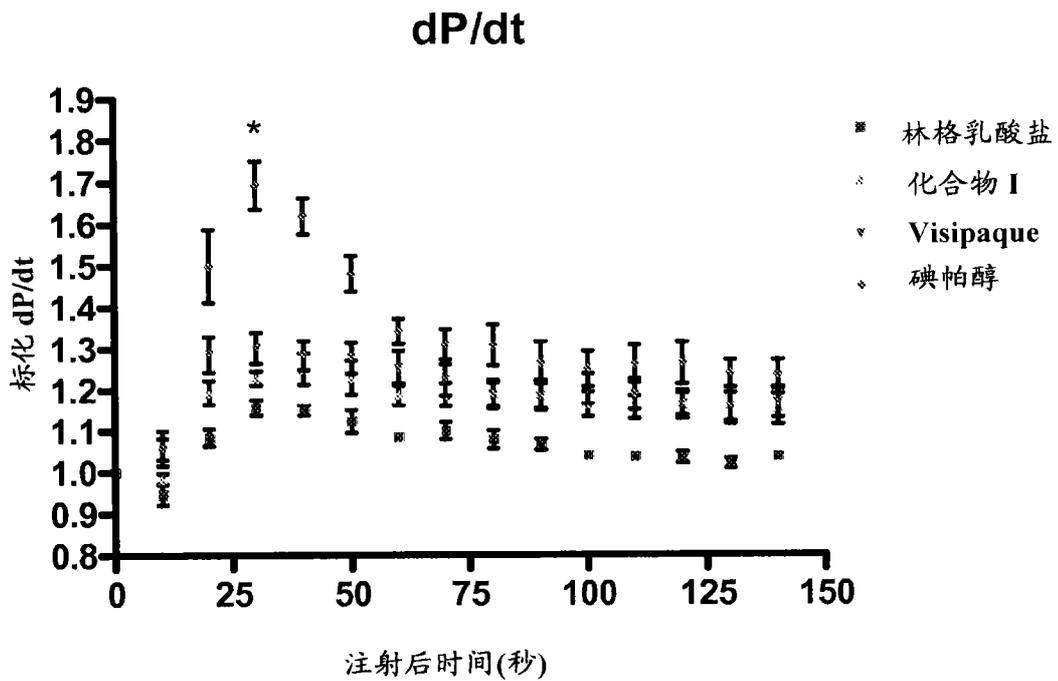


图 6

在将 40ml (5ml/ 秒) 林格乳酸盐、化合物 I、Visipaque 或碘帕醇注射至正常猪的 LAD 后对心血管参数的作用。a) 标化至基线的 LVSP 改变。b) 标化至基线的 dP/dt 改变。平均 ± SD。* = 与林格乳酸盐显著差异, *p < 0.05, **p < 0.01, 使用双因素 ANOVA, 用 Bonferroni 后测试。