



(51) МПК  
*A61K 49/04* (2006.01)  
*A61K 47/02* (2006.01)  
*A61B 5/0215* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012116882/15, 28.10.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 28.10.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
 29.10.2009 EP 09174413.6

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2013 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 10.03.2015 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2009/008734 A2, 15.01.2009. WO 91/13636 A1, 19.09.1991. EP 0390242 A1, 03.10.1990. RU 2088261 C1, 27.08.1997. RU 2147592 C1, 20.04.2000

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 29.05.2012

(86) Заявка РСТ:  
 EP 2010/066351 (28.10.2010)

(87) Публикация заявки РСТ:  
 WO 2011/051387 (05.05.2011)

Адрес для переписки:  
 191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

ВИСТРАНД Ларс-Йёран (NO),  
 ТАНИНГ Миккель (NO),  
 НЬЮТОН Бен (GB)

(73) Патентообладатель(и):

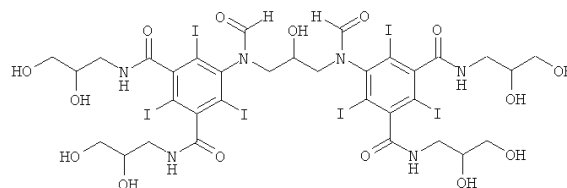
ДжиИ Хелткер АС (NO)

(54) ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КАТИОНЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ, ОБЛАДАЮЩАЯ ПРЕВОСХОДНЫМ ПРОФИЛЕМ БЕЗОПАСНОСТИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и описывает рентгеновскую диагностическую композицию, которая демонстрирует превосходный профиль кардиологической безопасности. Композиция содержит Соединение I, фармацевтически приемлемый носитель и растворенные в нем натриевое соединение и кальциевое соединение, обеспечивающие концентрацию ионов натрия 40-50 мМ и концентрацию ионов кальция 0,1-0,7 мМ. Настоящее изобретение также относится к

способам визуализации с использованием такой диагностической композиции. 4 н. и 12 з.п. ф-лы, 6 ил., 3 пр., 5 табл.



Соединение I



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*A61K 49/04* (2006.01)*A61K 47/02* (2006.01)*A61B 5/0215* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2012116882/15, 28.10.2010**(24) Effective date for property rights:  
**28.10.2010**

Priority:

(30) Convention priority:  
**29.10.2009 EP 09174413.6**(43) Application published: **10.12.2013 Bull. № 34**(45) Date of publication: **10.03.2015 Bull. № 7**(85) Commencement of national phase: **29.05.2012**(86) PCT application:  
**EP 2010/066351 (28.10.2010)**(87) PCT publication:  
**WO 2011/051387 (05.05.2011)**

Mail address:

**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT"**

(72) Inventor(s):

**VISTRAND Lars-Jeran (NO),  
TANING Mikkel' (NO),  
N'JuTON Ben (GB)**

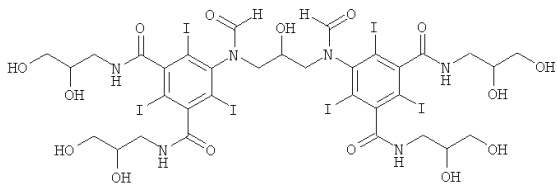
(73) Proprietor(s):

**Dzhiil Kheltker AS (NO)**(54) **DIAGNOSTIC COMPOSITION CONTAINING BLOOD PLASMA CATIONS AND POSSESSING EXCELLENT SAFETY PROFILE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: composition contains Compound I



a pharmaceutically acceptable carrier and dissolved

sodium compound and calcium compound providing the sodium ion concentration of 40-50 mM and the calcium ion concentration of 0.1-0.7 mM. The present invention also refers to imaging methods using such diagnostic composition.

EFFECT: invention describes the X-ray diagnostic composition, which exhibits the excellent cardiac safety profile.

16 cl, 6 dwg, 3 ex, 5 tbl

Настоящее изобретение относится к новой рентгеновской диагностической композиции, которая демонстрирует превосходный профиль кардиологической безопасности. Композиция содержит неионный йодированный димер в фармацевтически приемлемом носителе. Изобретение также относится к способам визуализации с использованием такой диагностической композиции.

Вся диагностическая визуализация основана на получении различных уровней сигнала от различных структур в организме. Таким образом, например, в рентгеновской визуализации для заданной структуры организма, визуализируемой на изображении, ослабление рентгеновских лучей этой структурой должно отличаться от ослабления окружающими тканями. Различие в сигнале между структурами организма и окружающими их тканями часто называют контрастом, и значительные усилия посвящены средствам усиления контраста в диагностической визуализации, поскольку чем больше контраст между структурами организма и окружающими тканями, тем выше качество изображений и тем больше их ценность для лечащего врача, осуществляющего диагностику. Кроме того, чем больше контраст, тем более мелкие структуры организма могут быть визуализированы в способах визуализации, т.е. увеличенный контраст может привести к увеличенному пространственному разрешению. Диагностическое качество изображений сильно зависит от внутреннего уровня шума в процедуре визуализации, и, таким образом, отношение уровня контраста к уровню шума может представлять собой эффективный фактор диагностического качества для диагностических изображений. Достижение улучшения такого фактора диагностического качества в течение длительного времени до сих пор остается важной целью. В способах, таких как рентгенологические исследования, один из подходов для улучшения фактора диагностического качества заключается во введении материалов, усиливающих контраст, приготовленных как контрастные среды, в область организма, подвергаемую визуализации. Таким образом, для рентгенологического исследования первые примеры контрастных агентов представляли собой нерастворимые неорганические соли бария, которые усиливали ослабление рентгеновских лучей в зонах организма, в которых они распределены. В течение последних 50 лет в области рентгеновских контрастных агентов доминировали растворимые йодсодержащие соединения. Имеющиеся в продаже контрастные среды (СМ), содержащие йодированные контрастные агенты, обычно классифицируют как ионные мономеры, такие как диатризоат (представленный в продаже, например, под товарным знаком Gastrografen™), ионные димеры, такие как йоксагат (представленный в продаже, например под товарным знаком Hexabrix™), неионные мономеры, такие как йогексол (представленный в продаже, например, под товарным знаком Omnipaque™), лопамидол (представленный в продаже, например, под товарным знаком Isovue™), йомепрол (представленный в продаже, например, под товарным знаком Iomeron™) и неионный димер йодиксанол (представленный в продаже под товарным знаком Visipaque™). Клиническая безопасность йодированных рентгеновских контрастных сред непрерывно улучшается в течение последних десятилетий путем разработки новых агентов; от ионных мономеров (Isopaque™) к неионным мономерам (например, Omnipaque™) и неионным димерам (например, Visipaque™). Тем не менее, даже высокоочищенные рентгеновские контрастные среды, имеющиеся в настоящее время в продаже, демонстрируют низкую степень нежелательных клинических побочных действий, таких как вызванная контрастным агентом нефропатия (CIN), неблагоприятные кардиологические события и замедленные неблагоприятные реакции (DAR). Следовательно, существует клиническая потребность в новой и безопасной рентгеновской контрастной среде, особенно в отношении

диагностических исследований, охватывающих пациентов, у которых имеется высокий риск этих побочных действий.

Применимость контрастных сред в основном зависит от их токсичности, их диагностической эффективности, неблагоприятных действий, которые они могут оказывать на субъекта, которому вводят контрастную среду, и легкости получения, хранения и введения. В токсичность и неблагоприятные биологические действия контрастной среды вносят вклад компоненты среды композиции, т.е. диагностической композиции, например растворитель или носитель, а также сам контрастный агент и его компоненты, такие как ионы для ионных контрастных агентов, и также их метаболиты.

Количество процедур коронарной ангиографии продолжает увеличиваться в соответствии с растущими возможностями коронарных процедур, включая перкутанную чреспросветную коронарную ангиопластику, имплантацию зондов и внутрисердечное введение терапевтических агентов. По всему миру ежегодно осуществляют свыше 70 миллионов процедур, основная часть из которых связана с сердцем. Тяжелые побочные действия, вызванные йодированными радиографическими контрастными средами, являются редкими, но могут возникать у пациентов, имеющих высокий риск, а также во время перкутанной коронарной ангиопластики.

При коронарной ангиографии кровь в коронарных артериях идеально должна быть полностью заменена болюсом йодированных радиографических контрастных сред для максимизации ослабления рентгенограмм и, таким образом, оптимизации диагностической визуализации. Когда контрастные среды заменяют кровь, молекулы контрастных сред приводят к хемотоксическим и осмотическим эффектам в коронарных сосудах, а также изменениям концентрации электролита, вязкости и давления кислорода. Эти изменения могут влиять на сократительную способность и сердечный ритм и вызвать мерцание желудочков (VF). Избирательная инъекция контрастных сред в коронарные артерии вызывает местные электрофизиологические и гемодинамические эффекты. Серьезные желудочковые аритмии, а также кардиодепрессия, представляют собой известные осложнения коронарной ангиографии, которые могут быть связаны с контрастными средами.

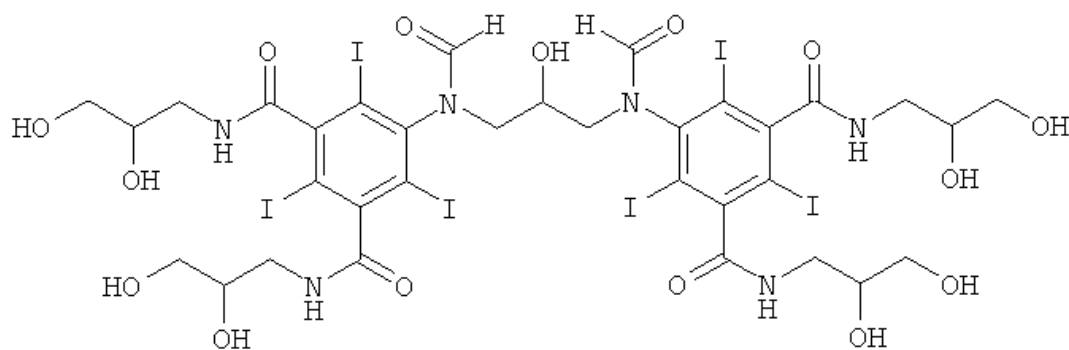
WO 91/13636 и WO 90/11094, оба от Nycomed AS (в настоящее время GE Healthcare AS), относятся к рентгеновским контрастным средам и к их композициям, включающим различные соли. В литературе также приведены многочисленные исследования преимуществ композиций рентгеновских контрастных агентов, включающих соли, в основном NaCl. Исследования осуществляли на изолированных сердцах крыс (Junge et al., *Investigative Radiology* 1993, 28, 20-25) и кроликов (Baath et al., *Investigative Radiology* 1993, 28, 223-227), собак (Pedersen et al., *Acad. Radiol.* 1994, 1, 136-144) и свиней. Особенное значение имеет исследование Chai et al. (*Acad. Radiol.* 2004, 11, 583-593), в котором показано, что композиция йодиксанола, содержащая 19 mM NaCl и 0,3 mM CaCl<sub>2</sub>, демонстрирует меньшую частоту мерцания желудочков по сравнению только с йодиксанолом.

Jacobsen et al. *Investigative Radiology* 1993; 28, 917-924 продемонстрировал, что быстро повторяющиеся инъекции контрастных сред собакам приводили в результате к аддитивным действиям на инотропию и монофазный потенциал действия, тогда как раствор Рингера не оказывал действия. Это исследование провели для того, чтобы понять, каким образом ангиография в клинической практике, где повторяющиеся инъекции являются обычными для заполнения всего коронарного дерева, может вызывать изменения в сердечных параметрах и привести к осложнениям.

Имеющаяся в настоящее время в продаже композиция йодиксанола, 320 мг I/мл, содержит 19 мМ ионов натрия и 0,3 мМ ионов кальция (Visipaque™). Экспериментально показано, что эта композиция демонстрирует превосходный профиль кардиологической безопасности по сравнению с йодиксанолом без добавления солей, в основном в исследованиях *in vivo* в модели сердца свиньи, но также в исследованиях на изолированных сердцах животных. В похожих исследованиях показано, что йогексол также демонстрирует увеличенную сердечную устойчивость при приготовлении с добавлением солей, в основном NaCl.

В WO 2009/008734 от GE Healthcare AS раскрыт новый класс соединений и их применение в качестве рентгеновских контрастных агентов. Эти соединения представляют собой димеры, содержащие две связанные йодированные фенильные группы. Мостиковая связь между двумя йодированными фенильными группами представляет собой прямоцепочечную C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>алкиленовую цепь, возможно замещенную группами -OH или OCH<sub>3</sub> в количестве от одной до шести. Объем соединений описан общей формулой (I) заявки на изобретение, и предложено множество конкретных соединений.

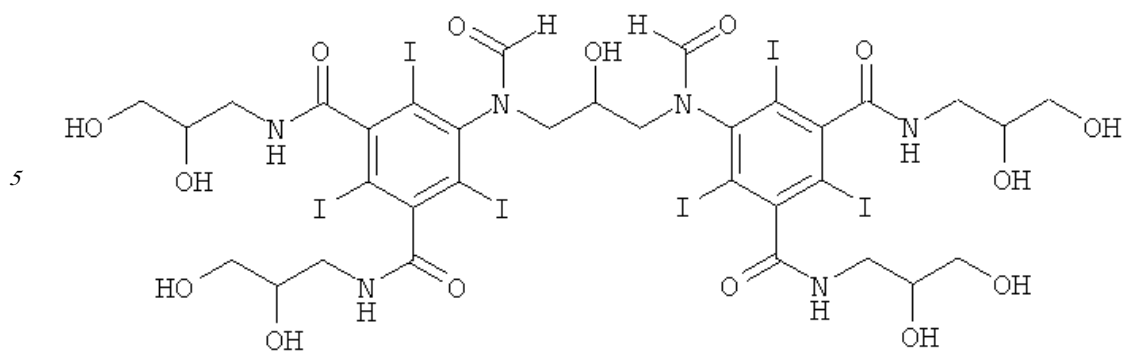
Соединение I, представляющее собой один из специфических димерных рентгеновских контрастных агентов, описываемых формулой I в WO 2009/008734, как обнаружено авторами изобретения, обладает благоприятными свойствами:



Соединение I: 5-[формил-[3-[формил-[3,5-бис(2,3-дигидроксипропилкарбамоил)-2,4,6-трийодфенил]амино]-2-гидроксипропил]амино]-N,N'-бис(2,3-дигидроксипропил)-2,4,6-трийодбензол-1,3-дикарбоксамид.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили новую диагностическую рентгеновскую композицию, которая демонстрирует превосходный профиль кардиологической безопасности по сравнению с Visipaque™, как показано в похожих исследованиях *in vivo*, как указано выше.

Таким образом, в первом аспекте в изобретении предложена диагностическая композиция, содержащая Соединение I



Соединение I

фармацевтически приемлемый носитель

и растворенные в нем натриевое соединение и кальциевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов натрия 40-50 мМ и концентрацию ионов кальция 0,1-0,7 мМ.

15 Физико-химические свойства Соединения I представлены ниже. Кроме того, информация об используемых способах, дополнительно к информации о биораспределении и острой токсичности, приведена в примере 1.

Связывание белка: связывание Соединения I с человеческим сывороточным альбумином (HSA) определяли с использованием способа равновесного диализа.

20 Связывание соединения I с человеческим сывороточным альбумином определяли как очень низкое,  $3,1 \pm 1,3\%$ , что подтверждает незначительное взаимодействие вещества с эндогенными белками.

25 Коэффициент распределения: гидрофильность Соединения I, как определено по распределению между октанолом и водой, демонстрирует, что Соединение I является очень гидрофильным с  $\log P -4,28$ .

Вязкость: вязкость Соединения I определяли при 20°C и 37°C при трех различных концентрациях. Результаты представлены на Фиг.4. Вязкость при 320 мг I/мл и 20°C составляет приблизительно 24 мПа·с.

30 Осмоляльность: осмоляльность Соединения I определяли при четырех различных концентрациях 204, 254, 310 и 324 мг I/мл. Осмоляльность Соединения I при 320 мг I/мл составляет 136 мОсм/кг.

35 Идентифицирована новая диагностическая рентгеновская композиция, которая демонстрирует превосходный профиль кардиологической безопасности по сравнению с Visipaque™. Дополнительно к безопасности самого соединения, т.е. соединения, обеспечивающего контраст, ключевыми являются дополнительные компоненты диагностической композиции.

40 В исследовании Chai et al. показано, что композиция йодиксанола, содержащая 19 мМ NaCl и 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub>, демонстрирует меньшую частоту мерцания желудочков (VF) по сравнению только с йодиксанолом. Это исследование осуществляли на свиньях, которым среду инъектировали непосредственно в левую коронарную артерию (LCA), предварительно подвергнутую окклюзии. Никакого мерцания желудочков не обнаружено при инъекции Visipaque™. Как часть тестирования безопасности Соединения I и идентификации композиции для этого, композиции Соединения I тестировали и сравнивали с Visipaque™. Поскольку в ранее опубликованном исследовании (выше) 45 внутрикоронарную инъекцию 20 мл йодиксанола осуществляли в течение 40 с, и не возникали VF, объем инъекции увеличивали до 25 мл в течение периода 62,5 с для увеличения частоты случаев VF для задач сравнения. Дополнительно, тестируемый и референсный растворы избирательно инъектировали в левую переднюю

межжелудочковую ветвь коронарной артерии (LAD) для дополнительного увеличения чувствительности модели. В этом большом объеме даже Визипак демонстрировал значительную частоту мерцания желудочков, 100%. (Фиг.3). Эксперименты изложены в примере 2.

5 Неожиданно для авторов изобретения, новый рентгеновский контрастный агент Соединение I, будучи приготовленным в диагностической композиции с 40-50 мМ NaCl и 0,1-0,7 мМ CaCl<sub>2</sub>, не демонстрировал случаи мерцания желудочков (подробную информацию смотри на Фиг.3 и в таблице 3).

10 При сравнении результатов двух отличающихся исследований увеличение частоты мерцания желудочков от 0% до 100% обнаружено для Визипак. Тем не менее, даже при высокой дозе димерный рентгеновский контрастный агент Соединение I не демонстрировал мерцания желудочков. Основное различие заключается в том, что Соединение I приготовлено с 45 мМ NaCl в этом исследовании, что значительно выше, чем в случае Визипак (19 мМ). Хотя никакого значительного действия не обнаружено  
15 в отношении мерцания желудочков (VF) при концентрации ионов кальция от 0,1 до 0,7 мМ, происходило значительное уменьшение систолического артериального давления (SAP) и систолического давления в левом желудочке (LVP) при уменьшении кальция (таблица 2). Эти данные указывают на то, что основной фактор, влияющий на частоту мерцания желудочков, представляет собой концентрацию хлорида натрия, тогда как  
20 кальций оказывал значительное действие на систолическое артериальное давление и систолическое давление в левом желудочке (LVSP). Действительно, исследование на нормальных свиньях продемонстрировало, что тогда как LAD инъекция композиции Соединения I, содержащей 45 мМ NaCl без добавления CaCl<sub>2</sub>, приводила в результате к уменьшению LVSP от 45 до 70 секунд после инъекции (среднее -5,7 мм рт.ст. (-759,94 Па), нормализованного к Рингер-лактату), инъекция композиции Соединения I, содержащей 45 мМ NaCl и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, поддерживала LVSP подобно Визипак (-0,3 и +0,1 мм рт.ст. (-40 и 13,33 Па), нормализованного к Рингер-лактату, соответственно)  
25 (пример 26). Дополнительно, инъекция Лопамидола с той же скоростью и объемом вызывала в каждом случае появление VF (в общем 9 инъекций 3 свиньям) между приблизительно 27-50 секундами после начала инъекции (последнее ограничивало какой-либо анализ LVSP ответа). Эти результаты также указывают на то, что присутствие 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub> в композиции Соединения I является благоприятным и ограничивает какие-либо отрицательные действия на LVSP, подобно Визипак. Кроме  
30 того, добавленные электролиты, присутствующие в диагностической композиции Соединения I и Визипак, могут уменьшать способность вызывать VF по сравнению с Лопамидолом, который не имеет добавленных электролитов. Количества и отношения исследуемых электролитов приведены в таблице 4 примера 26.

В исследовании более быстрых инъекций (40 мл, при 5 мл/с) систолическое давление  
40 в левом желудочке поддерживалось и было близким к обнаруженному после введения Рингер-лактата и Визипак, когда Соединение I в композиции с 45 мМ NaCl и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub> инъецировали избирательно в LAD нормальной свиньи. Наоборот, инъекции Лопамидола, который не содержит добавленных электролитов, вызывали значительное уменьшение в LVSP (пример 2с). Кроме того, Лопамидол вызывал значительное  
45 увеличение в dP/dt (69%), тогда как Соединение I оказывало подобный эффект, что и Рингер-лактат и Визипак в этом отношении (умеренное увеличение до 30%). Полагают, что присутствие и соотношение электролитов натрия (Na) и кальция (Ca) в исследованных композициях Соединения I и Визипак, которые ближе к Na/Ca сбалансированным

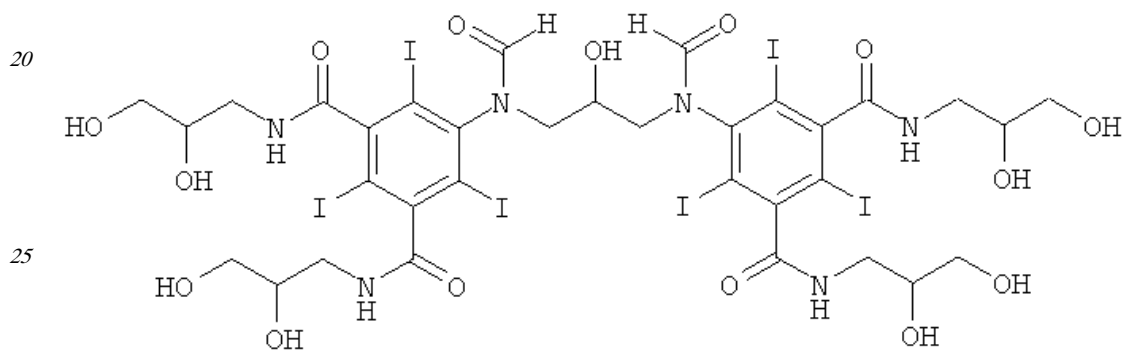
композициям Рингер-лактата и интерстициальной жидкости, вносит вклад в превосходное поддержание сердечной функции по сравнению с инъекцией Лопамидола, который не содержит добавленных электролитов. Количества и соотношения электролитов приведены в таблице 5 примера 26.

5 В еще одном воплощении изобретения композиция по изобретению содержит натриевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов натрия 42-47 мМ, и еще более предпочтительно концентрацию ионов натрия 44-46 мМ и наиболее предпочтительно концентрацию ионов натрия 45 мМ.

10 В еще одном воплощении изобретения композиция по изобретению содержит кальциевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов кальция 0,3-0,6 мМ, и еще более предпочтительно концентрацию кальция 0,4-0,5 мМ и наиболее предпочтительно концентрацию ионов кальция 0,5 мМ.

15 В этом аспекте соотношение между концентрацией ионов натрия и концентрацией ионов кальция должно быть от 57 до 500, такое как от 63 до 117, более предпочтительно от 70 до 156, более предпочтительно от 85 до 115 и наиболее предпочтительно от 88 до 95.

Во втором аспекте в изобретении предложена диагностическая композиция, содержащая Соединение I



Соединение I

30 фармацевтически приемлемый носитель

и растворенные в нем натриевое соединение и кальциевое соединение, где отношение между концентрацией ионов натрия и концентрацией ионов кальция составляет от 40 до 45, и предпочтительно составляет 43. Это отражает концентрации электролитов в композиции Рингер-лактат.

35 Натриевое соединение и кальциевое соединение в композиции могут быть представлены в форме соли, т.е. соединения включают физиологически приемлемые противоионы, например, выбранные из группы хлорида, сульфата, фосфата и гидрокарбоната. Предпочтительно, натриевое соединение представляет собой хлорид натрия, а кальциевое соединение представляет собой хлорид кальция.

40 Фармацевтически приемлемый носитель представляет собой водный раствор, предпочтительно чистую воду.

Натрий является важным для деполяризации в миокарде, которая зависит от потока  $\text{Na}^+$  внутрь. Авторы изобретения полагают, что добавление 40-50 мМ натрий-ионов и предпочтительно 45 мМ  $\text{NaCl}$ , к Соединению I делает его ближе к нормальным  
45 интерстициальным концентрациям  $\text{Na}^+$  по сравнению с йодиксанолом +19 мМ  $\text{Na}^+$ /л. Таким образом, Соединение I может быть более физиологичным и обладает большей способностью поддерживать потенциал действия быстрых натриевых каналов, таким



образом, в противоположность потенциалу действия "медленного ответа", вызванного очень низким уровнем натрия или отсутствием натрия.

Предшествующие исследования продемонстрировали, что добавление небольших количеств натрия (10-30 ммоль/л) в неионные контрастные среды может уменьшить риск мерцания желудочков (VF) вследствие этих контрастных сред. Тем не менее, исследования также продемонстрировали, что добавление большего количества натрия в контрастные среды может также увеличить отрицательную инотропию, о чем судят по уменьшенному систолическому артериальному давлению/систолическому давлению в левом желудочке (SAP/LVP). Для поддержания нормальных внеклеточных и внутриклеточных натрий-кальциевых (Na-Ca) отношений, добавление кальция к неионным контрастным средам уменьшает отрицательные инотропные действия. Ключевой вопрос заключается в том, какое количество кальция должно быть добавлено для предотвращения увеличения отрицательной инотропии. Добавление 19 мМ NaCl и 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub> к йодиксанолу 320 мг/мл в композиции Визипак рассматривается как оптимальное для минимизации физиологических расстройств, таких как VF и увеличенная отрицательная инотропия во время коронарной ангиографии.

В исследованиях авторы изобретения подтвердили пользу добавления CaCl<sub>2</sub> в Соединение I, содержащее 45 мМ NaCl (таблица 3). Композиция (F1) с 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub> вызывала значительно меньшие SAP и LVP по сравнению с композицией с 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub> (F3) или 0,7 мМ CaCl<sub>2</sub> (F5), соответственно. Композиция Соединения I с 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub> вызывала меньшие SAP по сравнению с композицией с 0,7 мМ CaCl<sub>2</sub>. Из этого следует, что добавление кальций-ионов к контрастным средам может уравновешивать отрицательную инотропию, вызванную добавлением натрия.

Тем не менее, существует критический баланс между ионами натрия и кальция. Добавление правильных концентраций натрия и кальция в неионные контрастные среды уменьшает риск VF и уменьшает неблагоприятные действия в отношении сократительной способности. Добавление слишком большого количества натрия уменьшает сократительную способность миокарда. Это последнее действие уравновешивается путем добавления Ca-ионов. Композиция соединения I, содержащая 45 мМ NaCl и 0,7 мМ CaCl<sub>2</sub> (F7), по-видимому, представляет собой самую хорошую композицию, поскольку не вызывает каких-либо VF и поддерживает более хорошую инотропию по сравнению с композициями F1 и F3. Тем не менее, гемодинамические действия F5 композиции Соединения I, тем не менее, равны действиям Визипак, поэтому предпочтительной является концентрация кальция между F3 и F5. Таким образом, в особенно предпочтительном воплощении композиция по изобретению содержит 45 мМ NaCl и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub>.

Внутривенная и внутриартериальная безопасность этих композиций Соединения I показана в отдельном исследовании. В этом исследовании кардиоваскулярные действия Соединения I в композиции 45 мМ NaCl и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub> оценивали для трех уровней дозы in vivo в острой модели у свиньи. В общем, отсутствует общее изменение функционирования миокарда при введении композиции внутривенным и внутриартериальным путем. Исследование также описано в примере 3.

В общем, йодированные контрастные среды могут вызывать реакции гиперчувствительности у склонных к этому пациентов в течение от 1 часа до нескольких суток после воздействия. Эти реакции в основном представляют собой нетяжелые кожные высыпания, такие как макулярные, макулопапулезные высыпания и высыпания

по типу крапивницы. Индуцированные контрастными средами неблагоприятные реакции замедленного типа (DAR), такие как кожные сыпи, по-видимому, вызваны реактивными в отношении контрастных сред Т-клетками, которые при распознавании контрастных сред пролиферируют и затем контролируют воспалительную реакцию в коже. Авторы изобретения оценили модель Т-клеточной пролиферации *in vitro*, разработанную для предсказания относительной частоты, с которой контрастные среды, такие как Соединение I, вызывают аллергические реакции замедленного типа у пациентов после интраваскулярного введения. Две контрастные среды, йодиксанол и йогексол, обладающие известными уровнями кожных реакций замедленного типа, и новую контрастную среду, Соединение I, оценивали (2 и 5 мг I/мл) в отношении Т-клеточной пролиферации *in vitro* в мононуклеарных клетках периферической крови, истощенных по CD25<sup>+</sup>, от 100 доноров, представляющих частоты HLA-DR мировой популяции. Положительные Т-клеточные ответы оценивали в соответствии с опубликованными протоколами, и значения индекса стимуляции (положительный ответ больше или равен 1,9). Токсичность *in vitro* тестировали путем измерения клеточной жизнеспособности образцов первых 10 доноров, инкубированных с тестируемыми контрастными средами (5 мг I/мл). Результаты были такие, что представляли все основные аллотипы HLA-DR с частотой, эквивалентной мировой популяции. Никакие из протестированных контрастных сред, по-видимому, не оказывали значительного действия на клеточную жизнеспособность. Соединение I приводило к появлению меньшего числа донорных образцов с положительной Т-клеточной пролиферацией по сравнению с йодиксанолом и йогексолом в обеих концентрациях. Для йодиксанола и йогексола ответы в виде Т-клеточной пролиферации для большинства доноров возникали на 7 и 8 сутки; статистическая значимость способствовала уменьшенному пролиферативному ответу на Соединение I на 8 сутки. В заключение модель успешно оценивала относительную частоту, с которой контрастные среды вызывали Т-клеточную активацию *in vitro*. Результаты коррелировали с сообщаемой частотой аллергических кожных реакций замедленного типа с двумя представленными в продаже контрастными средами и идентифицировали меньшую частоту для Соединения I.

Таким образом, результаты указывают на то, что Соединение I обладает наименьшей способностью стимулировать Т-клеточную пролиферацию *in vitro* по сравнению с йодиксанолом и йогексолом. Принимая во внимание более частую ассоциацию DAR с димерными контрастными средами, открытие авторов изобретения того, что неионный димер, тесно связанный с йодиксанолом, не стимулирует Т-клеточную пролиферацию *in vitro* в той же самой степени, как йодиксанол, или действительно в той же самой степени, как мономер йогексол, представляет значительный интерес. Поскольку в настоящее время известно, что Т-клеточная пролиферация лежит в основе DAR, данные авторов изобретения свидетельствуют о том, что димерная структура сама по себе может не вызывать более высокую частоту Т-клеточной пролиферации. Ключевое структурное различие между Соединением I и йодиксанолом заключается в том, что 2 ацетильные группы в йодиксаноле заменены 2 формильными группами в Соединении I. Эта модификация оказывает действие на молекулярную структуру линкера, конформацию и физико-химическое поведение, и неожиданно Соединение I обладает меньшей способностью стимулировать Т-клеточную пролиферацию *in vitro* по сравнению с йодиксанолом и йогексолом. Следовательно, диагностическая композиция в соответствии с первыми аспектами изобретения, как ожидается, вызывает меньше реакций гиперчувствительности замедленного типа по сравнению с имеющимися в продаже контрастными средами, такими как Omniraque™ (Йогексол) и Visiraque™

(Йодиксанол).

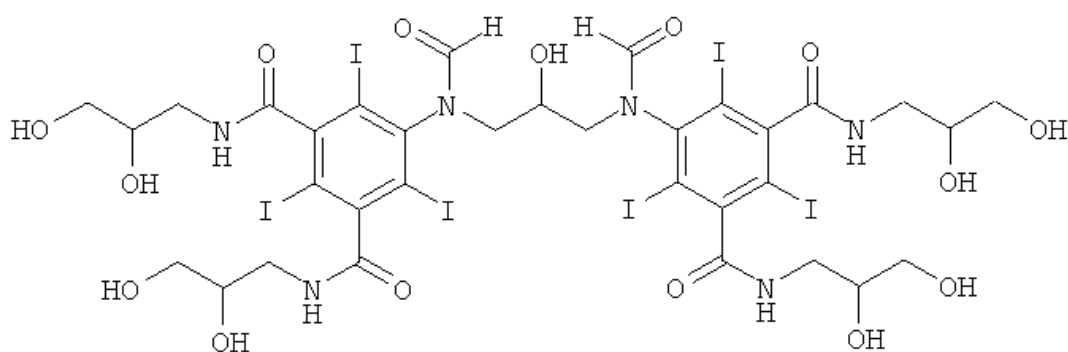
Соединение I может быть получено, как изложено в WO 2009/008734. Общий способ изложен на стр.16-20, и конкретный способ получения приведен в примере 1 в WO 2009/008734. Заявка на изобретение WO 2009/008734 с описанием способа получения включена сюда путем ссылки.

Соединение I может существовать в нескольких изомерных формах вследствие хиральных атомов углерода. Дополнительно, соединение демонстрирует экзо/эндо изомерию вследствие ограниченного вращения связи N-CO в формильной функциональной группе, вызванной близостью объемного атома йода. Под энантиомерно чистыми продуктами также включены смеси оптических изомеров.

Диагностическая композиция по изобретению находится в концентрации, готовой для применения. В общем, композиции в готовой для применения форме имеют концентрацию йода по меньшей мере 100 мг I/мл, предпочтительно по меньшей мере 150 мг I/мл, с предпочтительной концентрацией по меньшей мере 300 мг I/мл, например 320 мг I/мл. Диагностическая композиция предпочтительно дополнительно включает фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты. Их примеры включают этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS).

Диагностическая композиция по изобретению является предпочтительной для применения в качестве рентгеновской контрастной среды в рентгенологической диагностике или рентгенологической визуализации. Композиция может быть введена в виде инъекции болюса или путем инфузии. Кроме того, композиция может быть введена интраваскулярным, внутривенным или внутриартериальным путем. Альтернативно, композиция может также быть введена перорально.

В третьем аспекте в изобретении предложено применение Соединения I



Соединение I

в изготовлении диагностической композиции для использования в рентгенологической диагностике, где композиция содержит

фармацевтически приемлемый носитель

и растворенные в нем натриевое соединение и кальциевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов натрия 40-50 мМ и концентрацию ионов кальция 0,1-0,7 мМ.

В еще одном аспекте в изобретении предложен способ диагностики, включающий введение диагностической композиции по изобретению в организм человека или животного, исследование организма посредством диагностического устройства и сбор данных в результате исследования. В способе диагностики в организм может также быть предварительно введена диагностическая композиция.

В еще одном аспекте в изобретении предложен способ обнаружения путем визуализации *in vivo*, включающий следующие стадии:

1) введения обнаруживаемого количества диагностической композиции по

изобретению;

- 2) обеспечения распределения введенной композиции;
- 3) обнаружения сигналов, испускаемых Соединением I из распределенной композиции,
- 4) формирования изображения, демонстрирующего расположение и/или количество

5 указанного сигнала.

Способ визуализации представляет собой способ рентгенологической визуализации, и в предпочтительном воплощении этого аспекта способ обнаружения представляет собой способ коронарной ангиографии, и более предпочтительно диагностическую композицию вводят в виде болюсной инъекции в коронарные артерии.

10 В еще одном аспекте в изобретении предложена композиция по изобретению для применения в рентгенологической визуализации или диагностике, такой как коронарная ангиография.

Краткое описание графических материалов.

15 На Фиг.1 изображено сравнение распределения радиоактивности у самцов и самок крыс Wistar через 48 часов после введения Соединения I,

меченного [ $^{123}\text{I}$ ]. Общая экскреция равна сумме радиоактивности в мочевом пузыре и моче, а также фекалиях.

20 На Фиг.2 изображена частота мерцания желудочков, вызванная путем инъекции маннита (Манн; 275 мМ), маннита + добавленный натрий и кальций (Манн + Na/Ca; 240 мМ маннит, 19 мМ NaCl и 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub>), йодиксанола+маннит (Йод-320 + Манн; 320 мг I/мл йодиксанол и 50 мМ маннит), Visiraque™ (Йод-320; 320 мг I/мл йодиксанол, 19 мМ NaCl и 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub>) и раствора Рингера (Рингер, Ацетат Рингера, KabiVitrum AB, Sweden). Черные столбцы обозначают VF, белые обозначают отсутствие VF. Данные 25 взяты из Chai et al.

На Фиг.3 изображена частота мерцания желудочков, вызванная путем инъекции композиции Соединения I, содержащей различные концентрации хлорида кальция, по сравнению с инъекциями Визипака:

Соединение I, 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub> (F1, 320 мг I/мл Соединения I, 45 мМ NaCl и 0,1 мМ CaCl<sub>2</sub>);

30 Соединение I, 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub> (F3, 320 мг I/мл Соединения I, 45 мМ NaCl и 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub>);

Соединение I, 0,7 мМ CaCl<sub>2</sub> (F5, 320 мг I/мл Соединения I, 45 мМ NaCl и 0,7 мМ CaCl<sub>2</sub>),

Визипак.

Объем инъекции составлял 25 мл в течение периода 62,5 с, и растворы избирательно 35 инъецировали в LAD.

На Фиг.4 изображена зависимость вязкости Соединения I при 20°C (▲) и 37°C (○) в зависимости от концентрации.

40 На Фиг.5 изображено действие Соединения I (с добавлением и без добавления Ca) и Визипак на LVSP на 45-70 секунды от начала инъекции в LAD нормальной свиньи, нормализованное к инъекции Рингер-лактата (LR). Объем инъекции составлял 25 мл (0,4 мл/с). "GE-145 Ca+" представляет собой композицию Соединения I, содержащую 45 мМ Na, 0,5 мМ Ca, и "GE-145 Ca-" представляет собой композицию Соединения I, содержащую 45 мМ Na, без добавления Ca. Среднее ± CO\* = p<0,05 значимое различие с GE-145 Ca<sup>+</sup> с использованием двухстороннего теста Даннетта.

45 На Фиг.6 изображено влияние на кардиоваскулярные параметры после инъекции 40 мл (5 мл/с) Рингер-лактата, Соединения I, Визипак или Лопамидола в LAD нормальных свиней, (а) Изменение в LVSP, нормализованное к базовой линии, (б) Изменение в dP/dt, нормализованное к базовой линии. Среднее ± CO\* = значимое различие с Рингер-

лактатом, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  с использованием 2-стороннего ANOVA с последующим тестом Бонферрони.

#### Примеры

Пример 1. Физико-химические свойства, острая токсичность и данные по биораспределению для Соединения I.

#### Связывание с белком:

Связывание Соединения I с человеческим сывороточным альбумином (HSA) определяли с использованием способа равновесного диализа. Концентрированный раствор соединения I (5,0 мг/мл в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS)) смешивали со смесью цитрат:человеческая плазма в соотношении 1:9. Уравновешивание осуществляли в диализаторе Diachem Dianorm Dialyser против водного забуференного фосфатом физиологического раствора с использованием мембраны Diachem 10,17 с отсечением 10000 MM и осуществляли в течение 25 часов. Анализ растворов осуществляли с использованием прибора ICP-AES (атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой). Дополнительно, растворы PBS также уравновешивали против растворов человеческой плазмы с цитратом для обеспечения того, что достигается равновесие. Связывание Соединения I с человеческим сывороточным альбумином определяли как очень низкое,  $3,1 \pm 1,3\%$ , подтверждая незначительное взаимодействие вещества с эндогенными белками. Для сравнения определили, что связывание йодиксанола с HSA составляет  $0,4 \pm 0,9\%$ .

#### Коэффициент распределения:

В качестве меры гидрофильности Соединения I определяли коэффициент распределения между октанолом и водой. Воду (5 мл), содержащую тестируемое вещество (0,3 мг/мл), встряхивали с 15 мл н-октанола до достижения равновесия. Водную фазу отделяли путем центрифугирования и анализировали при помощи HPLC (высокоэффективной жидкостной хроматографии) (HP1100, оборудованный колонкой Discovery C18,  $100 \times 2,1$  мм) с использованием УФ-детекции при 244 нм и потоком 0,3 мл/мин. Использовали изократические условия HPLC, 8% ацетонитрил в воде (об./об.). Октанольную фазу (12,5 мл) экстрагировали водой (0,75 мл) до достижения равновесия, и фазы разделяли путем центрифугирования. Водную фазу анализировали при помощи HPLC с использованием условий, подробно описанных выше. Как октанол, так и воду предварительно насыщали водой и октанолом, соответственно, перед проведением экспериментов с коэффициентом распределения. Гидрофильность Соединения I, определенная путем распределения между октанолом и водой, демонстрирует, что Соединение I является весьма гидрофильным с  $\log P -4,28$ . Для сравнения, определенное значение  $\log P$  для йодиксанола составляет  $-4,02$ . Приведенное в литературе значение составляет  $-4,05$ . Повышенная гидрофильность Соединения I по сравнению с йодиксанолом подтверждается его поведением в HPLC.

#### Вязкость:

Вязкость Соединения I определяли при двух различных температурах,  $20^\circ\text{C}$  и  $37^\circ\text{C}$  и трех различных концентрациях 246, 295 и 313 мг I/мл. Тестируемые растворы были изотоническими путем корректирования осмоляльности при помощи NaCl, и их стерилизовали путем автоклавирования. Вязкость растворов определяли с использованием измерителя вязкости DMA58 (Anton Paar). Использовали способ с калиброванной U-пробиркой, в которой время опускания использовали для измерения динамической вязкости. Вязкость Соединения I определяли при  $20^\circ\text{C}$  и  $37^\circ\text{C}$  для трех различных концентраций. Результаты представлены на Фиг.4. В сравнении с Визипаком вязкость при 320 мг I/мл и  $20^\circ\text{C}$  близка и составляет приблизительно 24 мПа·с.

## Осмоляльность:

Осмоляльность Соединения I определяли для четырех различных концентраций 204, 254, 310 и 324 мг I/мл. Использовали осмометр на основе давления паров Vapro 5520 от Vapro Inc. Осмоляльность Соединения I демонстрирует взаимосвязь с концентрацией, которая близка к линейной. Осмоляльность Соединения I при 320 мг I/мл меньше, чем йодиксанола, 136 мОсм/кг по сравнению с 210 мОсм/кг при 320 мг I/мл.

## Острая токсичность:

Молодым взрослым самцам крыс Sca:SD (Scanbur, Sweden), имеющим массу 200±20 г, внутривенно инъецировали со скоростью 1,2 мл/мин Соединение I (340 мг I/мл, 286 мОсмоль/кг), йодиксанол (321 мг I/мл, 284 мОсмоль/кг), маннит в качестве осмотического контроля (283 мОсмоль/кг) или физиологический раствор (290 мОсмоль/кг), вводимые в виде 2 отдельных доз с интервалом 4 часа. Для животных, умерщвляемых в течение эксперимента (2 сутки после обработки), Соединение I и йодиксанол вводили в дозе 8, 10 и 12,8 г I/кг, что соответствует общим дозируемым объемам 23,7, 29,7 и 38,0 мл/кг и 25, 31,3 и 40 мл/кг, соответственно, тогда как для маннита и физиологического раствора объем дозы составлял 40 мл/кг. Для животных, окончательно умерщвляемых на 7 сутки, существовали 4 группы доз: Соединение I и йодиксанол (12,8 г I/кг) и физиологический раствор и маннит (40 мл/кг). Во всех случаях каждая группа включала 8 животных.

В течение исследования делались следующие оценки: клинические симптомы, масса организма и кровь на гематологию и клиническую химию на 0, 2 и 7 сутки и общие наблюдения: масса органа и гистоморфологическое исследование тканей животных, убитых путем внутривенной инъекции избытка тиопентала на 2 или 7 сутки. Сутки введения дозы определяли как Сутки 0. Параметры клинической биохимии (Na, K, Cl, PO<sub>4</sub>, Ca, AST (аспартатаминотрансфераза), ALT (аланинаминотрансфераза), ALP (щелочная фосфатаза), холестерин, креатинин, СК (креатинкиназа), GGT (гамма-глутамилтранспептидаза), TG (триглицериды), общий билирубин, общий белок, мочевины, альбумин, LDH (лактатдегидрогеназа) и GLDH (глутаматдегидрогеназа) измеряли на Beckman Synchron CX5 при 37°C. Гематологические параметры (WBC (лейкоциты), дифференцированные WBC, RBC (эритроциты), отношение WBC/RBC, Hgb (гемоглобин), PLT (тромбоциты), HCT (гематокрит), MCH (среднее содержание гемоглобина в эритроцитах), MCHC (средняя концентрация клеточного гемоглобина в эритроцитах), MCV (средний объем клеток), MPV (гематокритное число) и RDW (показатель распределения эритроцитов по объему)) анализировали при помощи автоматического гематологического анализатора AbbotT-cell-Dyn 3500 CS. Почки от животных из группы с физиологическим раствором в качестве контроля и 12,8 г I/кг Соединения I и йодиксанолом фиксировали путем погружения в 10% нейтральный забуференный формалин, переводили в парафиновый воск, резали с номинальной толщиной 5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином и проверяли при помощи световой микроскопии.

Данные анализировали при помощи параметрического одностороннего дисперсионного анализа ANOVA, а затем при помощи теста Даннетта после процедуры с использованием групп с физиологическим раствором на 2 сутки и 7 сутки для сравнения с группами, которым вводили йодиксанол на 2 сутки и 7 сутки и Соединение I.

Статистический анализ осуществляли на сутки 1 (базовый), сутки 2 и сутки 7.

## Биораспределение:

Для каждого момента времени (2, 20 мин, 1, 2, 4, 24, 48 часов) 3 животных каждого пола анестезировали изофлураном. Каждое исследуемое животное получало 2 инъекции

в течение приблизительно 20 секунд. Первая инъекция представляла собой композицию соединения I (нерадиоактивного) в концентрации приблизительно 320 мг I/мл, вводимого с получением общей химической дозы приблизительно 1,6 г I/кг, через конкретную хвостовую вену (левую или правую). По возможности как можно быстрее после этого (в течение приблизительно 20 секунд) радиоактивное тестируемое [<sup>123</sup>I] Соединение I (от приблизительно 1 до приблизительно 8 МБк, до 350 мкг) инъецировали в виде внутривенного болюса в противоположную хвостовую вену. Этот подход дал возможность корректировать количество введенной радиоактивности в соответствии с моментом препарирования (1, 2 или 3 сутки исследования) без значительного изменения общей химической дозы соединения I. Животных затем помещали в клетки для исследования метаболизма для сбора мочи и фекалий в течение соответствующего времени после инъекции меченого Соединения I. В этот момент животных вновь анестезировали изофлураном и умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Извлекали выбранные органы и ткани (кровь, почки, мочевого пузыря и мочу, легкие, печень, желудок, тонкую и толстую кишку, сердце, семенники, яичники, матку и фекалии), а также хвост, который исследовали в качестве сайта инъекции. Количество радиоактивности в выбранных органах, тканях и секретах затем исследовали с использованием автоматического гамма-счетчика на основе двойного кристалла и системы анализа.

Результаты исследования острой токсичности:

Неблагоприятные клинические симптомы отсутствовали у крыс, обработанных физиологическим раствором или маннитом, тогда как у крыс, которых обрабатывали Соединением I и йодиксанолом, обнаружена депрессия от слабой до умеренной и некоординированные движения и слабость/неактивность, а также отек и покраснение конечностей. Эти действия начинаются через 10-20 мин после первого введения и продолжаются в течение 2-3 ч, но без явной зависимости от дозы. Анализы данных гематологии и клинической химии указывают на то, что отсутствуют токсикологически значимые неблагоприятные действия в любой из групп.

В почках основные явления, связанные с обработкой, представляли собой цитоплазматическую вакуолизацию проксимальных канальцев и расширение боуменова пространства, содержащего белковый материал, в клубочках. На 2 сутки тяжесть вакуолизация была больше у тех, которым давали йодиксанол, по сравнению с Соединением I. На 7 сутки тяжесть вакуолизации была несколько меньше по сравнению с 2 сутками в обеих группах, а также расширение пространства Боумана и присутствие белкового материала.

Таблица 1

Обзор основных гистоморфологических обнаружений в почках

Группа	Кол-во крыс	Сутки аутопсии	Тестируемый объект	Доза (г/кг)	Вакуолизация проксимального канальца		Клубочек: Расширение боуменова пространства		Клубочек: Боуменово пространство Белковый материал	
					Левая почка	Правая почка	Левая почка	Правая почка	Левая почка	Правая почка
1	8	2	Физиол. раствор	-	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	0,0,0,0	0,0,0,0
					3,3,3,3	3,4,3,3	PP0,P	0,0,0,0	PP0,P	0,0,0,0
5	8	2	Соед-е I	12,8	3,3,3,3	3,3,3,3	0,0,0,P	P0,P0	0,0,0,P	P0,P0
					4,4,4,4	4,4,4,4	PP0,0	PPPP	PP0,0	PPPP
					4,4,4,4	4,4,4,4	PP0,0	PPPP	PP0,0	PPPP
8	8	2	Йодиксанол	12,8	4,4,4,4	4,4,4,4	P0,PP	PPPP	P0,PP	PPP0

			Физиол. раствор	-	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0
9	8	7			0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0
					3,3,2,2	3,3,2,2	0,0,РР	0,Р0,0	0,0,РР	0,Р0,0,
10	8	7	Соед-е I	12,8	2,2,3,3	3,2,3,3	0,0,Р0	0,0,0,Р	0,0,Р0	0,0,0,Р
					3,3,2,2	3,3,2,2	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0	0,0,0,0,
5	11	8	Йодикса- нол	12,8	3,3,3,3	3,3,3,3	Р0,0,0	0,0,Р0	Р0,0,0	0,0,Р0

Легенда 0 = отсутствует, Р = присутствует; 1 = минимальный, 2 = слабый, 3 = умеренный, 4 = выраженный, 5 = тяжелый

### Результаты исследования биораспределения:

После внутривенного введения [ $^{123}\text{I}$ ] меченное Соединение I быстро выводилось из организма, причем более 80% инъецированной дозы (id) присутствовало в мочевом пузыре и моче через 2 часа после инъекции. Уровни в крови уменьшались от 21% id через 2 минуты после инъекции до 0,6% id через 2 часа после инъекции. Существовал небольшой, но значимый уровень экскреции через фекальный путь, которые, по-видимому, несколько выше у самок животных (14,3% id в фекалиях) по сравнению с самцами животных (8,2% id в фекалиях) через 48 часов после инъекции, хотя это различие не было статистически значимым. Меньше чем 2% id оставалось в организме через 48 часов после инъекции меченого Соединения I, причем приблизительно 0,5% оставались в почках, 0,1% оставались в печени и меньше чем 1% в оставшемся теле (Фиг.1), все из которых, кроме того, уменьшались с 24-часового момента. Последнее, вероятно, отражает длительную медленную экскрецию Соединения I, оставшегося в организме после исходной быстрой фазы экскреции. Не обнаружена задержка радиоактивности в репродуктивных органах. В общем, профиль биораспределения меченого Соединения I похож на профиль других димерных йодированных контрастных агентов.

### Пример 2. Сравнительные исследования

2а) Сравнение кардиотоксичности Visipaque<sup>TM</sup> и диагностической композиции соединения I в модели окклюзии LAD у свиньи

Ссылаются на исследование Chai et al. (Acad. Radiol. 2004, 11, 583-593), в котором показано, что композиция йодиксанола, содержащая 19 мМ NaCl и 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub>, демонстрирует меньшую частоту мерцания желудочков по сравнению только с йодиксанолом. Исследование осуществляли на свиньях, которым среду инъецировали непосредственно в левую коронарную артерию (LCA), которая ранее была подвергнута окклюзии. Из Фиг.2 ясно, что композиция йодиксанола, содержащая 19 мМ NaCl и 0,3 мМ CaCl<sub>2</sub>, демонстрирует меньшую частоту мерцания желудочков по сравнению только с йодиксанолом (Р меньше 0,01). В этом случае не обнаружено никакого мерцание желудочков при инъекции Visipaque<sup>TM</sup>. Доза, заданная в этих экспериментах, составила 20 мл при скорости инъекции 2,0 мл/минуту.

Поскольку в исследовании Chai et al. внутрикоронарную инъекцию 20 мл йодиксанола (приготовленного как Визипак) осуществляли в течение 40 секунд и не возникали случаи VF, авторы изобретения осуществляли исследование, в котором инъецируемый объем увеличивали до 25 мл в течение периода 62,5 секунд для увеличения частоты VF для задач сравнения. Дополнительно, тестируемый и референсный растворы избирательно инъецировали в левую переднюю нисходящая ветвь левой коронарной артерии (LAD) для дополнительного увеличения модели чувствительности. Физические и химические свойства тестируемых растворов приведены в таблице 2 и результаты представлены на Фиг.3.

Таблица 2

Физические и химические свойства тестируемых растворов



	Тестируемый агент	Иод-концентрация (мг I/мл)	Электролиты (мМ)	
			Na	Ca
	F1: Соединение I+NaCl+CaCl <sub>2</sub>	320	45	0,1
	F3: Соединение I+NaCl+CaCl <sub>2</sub>	320	45	0,3
5	F5: Соединение I+NaCl+CaCl <sub>2</sub>	320	45	0,7
	Йодиксанол+NaCl+CaCl; (Визипак)	320	19	0,3

При этом высоком инъекцируемом объеме даже Visipaque™ демонстрировал значительную частоту мерцания желудочков, 100% (Фиг.3).

Тем не менее, неожиданно, новый рентгеновский контрастный агент Соединение I, будучи приготовленным с 45 мМ NaCl и 0,1-0,7 мМ CaCl<sub>2</sub>, демонстрировал отсутствие мерцания желудочков (подробную информацию смотри на Фиг.3 и в таблице 3).

При сравнении результатов двух отличающихся исследований, увеличение частоты мерцания желудочков от 0% до 100% обнаружено для Visipaque™. Тем не менее, даже при высокой дозе димерное рентгеновское контрастное Соединение I в диагностической композиции демонстрирует отсутствие мерцания желудочков. Основное различие заключается в том, что Соединение I приготовлено с 45 мМ NaCl, что значительно выше, чем для Визипак (19 мМ). Хотя никакого значительного действия обнаружено в VF, с концентрацией ионов кальция от 0,1 до 0,7 мМ на VF, существовало значительное уменьшение в SAP и LVP, когда присутствует меньше кальция (таблица 3).

	F1	F3	F5	Визипак
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
HR	-1%±1,0	0%±0,8	-2%±3,0	0%±3,5

SAP: систолическое артериальное давление (мм рт.ст.).  
LVP: систолическое давление в левом желудочке (мм рт.ст.).  
dP/dt max: максимальная скорость образования давления LV (мм рт.ст./с).  
HR: частота пульса (ударов/мин).  
\*P<0,05 для F1.  
†P<0,01 для F1.  
‡P<0,05 для F3.  
§P<0,01 для F3.

Эти данные указывают на то, что основной фактор, влияющий на частоту мерцания желудочков, представляет собой концентрацию хлорида натрия, тогда как кальций оказывает значительное действие на систолическое артериальное давление и систолическое давление в левом желудочке.

2б: Сравнение Соединения I в композиции с добавлением и без добавления CaCl<sub>2</sub> с Визипаком и Лопамидолом

Гемодинамические действия композиции Соединения I с добавлением и без добавления CaCl<sub>2</sub> сравнивали с Визипаком и Лопамидолом после избирательного введения в LAD нормальной свиньи без баллонной окклюзии. Действия каждой контрастирующей среды нормализовали к любому из действий, обнаруженных с эквивалентной инъекцией лактатного раствора Рингера, который действовал как объем и электролит - "отношение" - контроль. В общем, в этом исследовании использовали 12 свиней, и каждая свинья получала разовую дозу CM, инъекцированную 3 раза в объемах 10 мл (4 мл/с), 20 мл (1 мл/с) и 25 мл (0,4 мл/с) (в общем 9 инъекций CM каждой свинье). Каждой дозе CM предшествовала или за ней следовала инъекция контроля Рингер-лактата, и последовательность каждой инъекции (объема) рандомизировали для каждой свиньи. В таблице 4 приведены количества и отношения натриевых и кальциевых

использованных электролитов.

Таблица 4

Электролиты	Визипак, мМ	Соед-е I, мМ	Соед-е I + CaCl <sub>2</sub> , мМ	Рингер-лактат, мМ, или (Соотношение)	Человеческая интерстициальная жидкость, мМ, или (Соотношение)
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

При инъекции объема 25 мл Соединения I в композиции без добавления CaCl<sub>2</sub> было связано с уменьшением LVSP между 45 и 70 секундами после инъекции (среднее -5,7 мм рт.ст., нормализованного к Рингер-лактату), тогда как Соединение I в композиции с добавлением CaCl<sub>2</sub> и Визипака оказывало минимальное действие или не оказывает действия (от -0,3 до +0,1 мм рт.ст., нормализованного к Рингер-лактату, соответственно) (Фиг.5). Уменьшение LVSP, обнаруженное для композиции Соединения I без добавления CaCl<sub>2</sub>, значительно отличалось от уменьшения при добавлении CaCl<sub>2</sub>, которое значительно не отличалось от Визипак. Дополнительно, соответствующий ответ на инъекцию Лопамидола не может быть проанализирован, поскольку VF обнаруживали в каждом случае между приблизительно 27 и 50 секундами после начала инъекции 25 мл. Эти результаты указывают на то, что присутствие 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub> в композиции Соединения I благоприятно и ограничивает какие-либо отрицательные действия на LVSP, подобно Визипак. Кроме того, дополнительные электролиты, присутствующие в диагностической композиции Соединения I и Визипак, могут уменьшать предрасположенность к индукции VF по сравнению с Лопамидолом, который не имеет добавленных электролитов.

2в: Сравнение композиции Соединения I с Визипак, Лопамидолом и Рингер-лактатом у нормальных свиней с быстрой скоростью инъекции

В дополнительном исследовании гемодинамические действия Соединения I в композиции с 45 мМ NaCl и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub> сравнивали с Визипак и Лопамидолом после избирательного введения в LAD нормальной свиньи с быстрой скоростью инъекции (5 мл/с). Рингер-лактат также исследовали в виде "соотношения" объема и электролита к контролю. В общем, исследовали 3 свиньи, и каждую дозу CM вводили дважды каждой свинье в произвольном порядке. Используемая скорость инъекции составляла 5 мл/с с общим инъецируемым объемом 40 мл. В таблице 5 приведены количества и отношения натриевых и кальциевых использованных электролитов.

Таблица 5

Электролиты	Визипак, мМ	Соединение I, мМ	Рингер-лактат, мМ, или (Отношение)	Человеческая интерстициальная жидкость, мМ, или (Отношение)
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

Хотя инъекция Соединения I и Визипак не вызывала изменения в LVSP или dP/dt относительно базовой линии, которая значительно отличалась от введения Рингер-лактата, Лопамидол вызывал значительное уменьшение и увеличение значений LVSP и dP/dt соответственно (Фиг.6). LVSP уменьшалось на 9%±6 и dP/dt увеличивалось на 69%±16 после введения Лопамидола. Последнее контрастировало с инъекцией Рингер-лактата, Соединения I и Визипак, которые были связаны со слабым увеличением LVSP (приблизительно 5%) и умеренным увеличением dP/dt (до приблизительно 30%). Эти результаты указывают на то, что после быстрой инъекции в LAD нормальной свиньи

Соединения I в композиции с 45 мМ NaCl и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub> оказывало минимальные действия на гемодинамические параметры, похожие на Визипак или физиологический раствор Рингера. Предполагают, что присутствие электролитов в исследуемых композициях Соединения I и Визипак, которые более похожи на сбалансированную композицию Рингер-лактата и интерстициальную жидкость, вносило вклад в превосходное поддержание сердечной функции по сравнению с поддержанием сердечной функции после инъекции Лопамидола, который не содержит добавленных электролитов.

Пример 3. Внутривенная и внутриартериальная безопасность диагностической композиции Соединения I

Внутривенная (i.v) и внутриартериальная (i.a.) безопасность композиции Соединения I показана в отдельном исследовании (ссылка B145095). В этом исследовании кардиоваскулярные действия Соединения I в композиции с 45 мМ NaCl и 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub> оценивали для трех уровней дозы in vivo в острой модели у свиньи.

Способы: Композицию вводили внутриартериально или внутривенно группам из трех животных с одной из трех уровней дозы (1-кратной, 2-кратной или 3-кратной относительно стандартного объема 2 мл/кг). Каждое животное также получало эквивалентный объем раствора Рингер-лактата в качестве контроля объема. Оценивали CV действия: частота пульса (HR), пульс-оксиметрия, электрокардиограмма (ECG), давление в аорте (систолическое, диастолическое и среднее), конечное диастолическое давление в левом желудочке (LVEDP). При помощи ультразвука/эхокардиографии оценивали ударный объем сердца, фракцию выброса и сердечную сократимость.

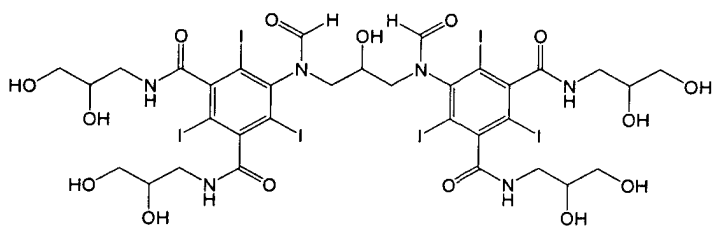
Результаты: Оценка предварительных данных свидетельствует о том, что отсутствовали важные зависимые от дозы или пути введения эффекты Соединения I в отношении HR, пульс-оксиметрии и ECG в сердце свиньи. Анализ путем пульс-оксиметрии продемонстрировал насыщение кислородом, сохраняющееся для приблизительно 98% диапазона дозы. HR также сохранялся в нормальных пределах. Отсутствовали связанные с Соединением I нарушения ритма: QT интервал сохранялся в нормальном диапазоне независимо от i.a. или i.v. введении дозы Соединения I.

Аналогично, небольшие действия или отсутствие действий Соединения I обнаружено в отношении давления в аорте (систолического, диастолического и среднего) в течение всего диапазона дозы. Изменения в давлении в аорте, по-видимому, похожи независимо от того, вводят ли Соединение I i.v. или i.a. путем. Обнаружено слабое увеличение LVEDP при увеличении дозы Соединения I, причем действие похоже независимо от того, вводят ли Соединение I i.v. или i.a. путями. Дополнительно, увеличения в LVEDP похожи по величине на обнаруженные после введения увеличивающихся объемов Рингер-лактата. Анализ ударного объема сердца, фракции выброса и сердечной сократимости путем эхокардиографии продемонстрировал лишь слабое изменение конечного диастолического объема (EDV), подтверждая то, что любые действия связаны с объемом и не являются специфическими для вводимого Соединения I.

Следовательно, отсутствуют общие изменения в функционировании миокарда при введении Соединения I i.a. или i.v. путем. Небольшие изменения в CV функциональных параметрах относятся к вводимому объему, а не тестируемому Соединению I, поскольку похожие действия наблюдали при инъекции лактатного раствора Рингера. Все параметры миокарда сохранялись в нормальных диапазонах после внутривенного или внутриартериального введения Соединения I до 3-кратного объема относительно стандартного объема дозы 2 мл/кг.

Формула изобретения

## 1. Рентгеновская диагностическая композиция, содержащая Соединение I



## Соединение I

фармацевтически приемлемый носитель

и растворенные в нем натриевое соединение и кальциевое соединение, обеспечивающие концентрацию ионов натрия 40-50 мМ и концентрацию ионов кальция 0,1-0,7 мМ.

2. Диагностическая композиция по п. 1, содержащая натриевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов натрия 42-47 мМ.

3. Диагностическая композиция по п. 1, содержащая натриевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов натрия 44-46 мМ.

4. Диагностическая композиция по п. 1, содержащая натриевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов натрия 45 мМ.

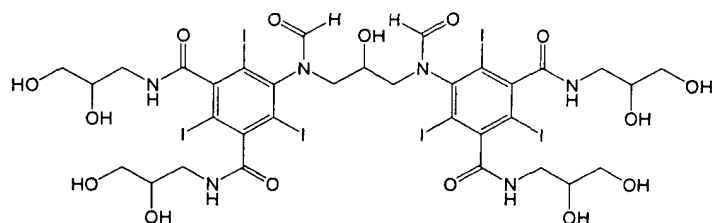
5. Диагностическая композиция по п. 1, содержащая кальциевое соединение, обеспечивающее концентрацию ионов кальция 0,3-0,6 мМ.

6. Диагностическая композиция по п. 1, содержащая кальциевое соединение, обеспечивающее концентрацию кальция 0,4-0,5 мМ.

7. Диагностическая композиция по п. 1, содержащая кальциевое соединение, обеспечивающее концентрацию кальция 0,5 мМ.

8. Диагностическая композиция по п. 1, где соотношение между концентрацией ионов натрия и концентрацией ионов кальция составляет от 63 до 117.

## 9. Рентгеновская диагностическая композиция, содержащая Соединение I



## Соединение I

фармацевтически приемлемый носитель

и растворенные в нем натриевое соединение и кальциевое соединение, где соотношение между концентрацией ионов натрия и концентрацией ионов кальция составляет от 40 до 45.

10. Диагностическая композиция по любому из пп. 1-9, где натриевое соединение и кальциевое соединение представляют собой соли, содержащие противоионы, выбранные из группы хлорида, сульфата, фосфата и гидрокарбоната.

11. Диагностическая композиция по п. 10, где натриевое соединение представляет собой хлорид натрия, а кальциевое соединение представляет собой хлорид кальция.

12. Диагностическая композиция по п. 1 или 9, дополнительно содержащая этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и/или трис(гидроксиэтил)аминометан (TRIS).

13. Способ рентгенологической диагностики, включающий введение рентгеновской

диагностической композиции по любому из пп. 1-12 в организм человека или животного, исследование организма посредством диагностического устройства и сбор данных в результате исследования.

5 14. Способ обнаружения путем рентгенологической визуализации *in vivo*, включающий следующие стадии:

1) введения обнаруживаемого количества рентгеновской диагностической композиции по любому из пп. 1-12;

2) обеспечения распределения введенной композиции;

10 3) обнаружения сигналов, испускаемых Соединением I из распределенной композиции,

4) формирования изображения, демонстрирующего расположение и/или количество указанного сигнала.

15 15. Способ по п. 14, представляющий собой способ коронарной ангиографии.

16. Диагностическая композиция по п. 1 или 9 для применения в качестве рентгеновской контрастной среды в рентгенологической диагностике или рентгенологической визуализации.

20

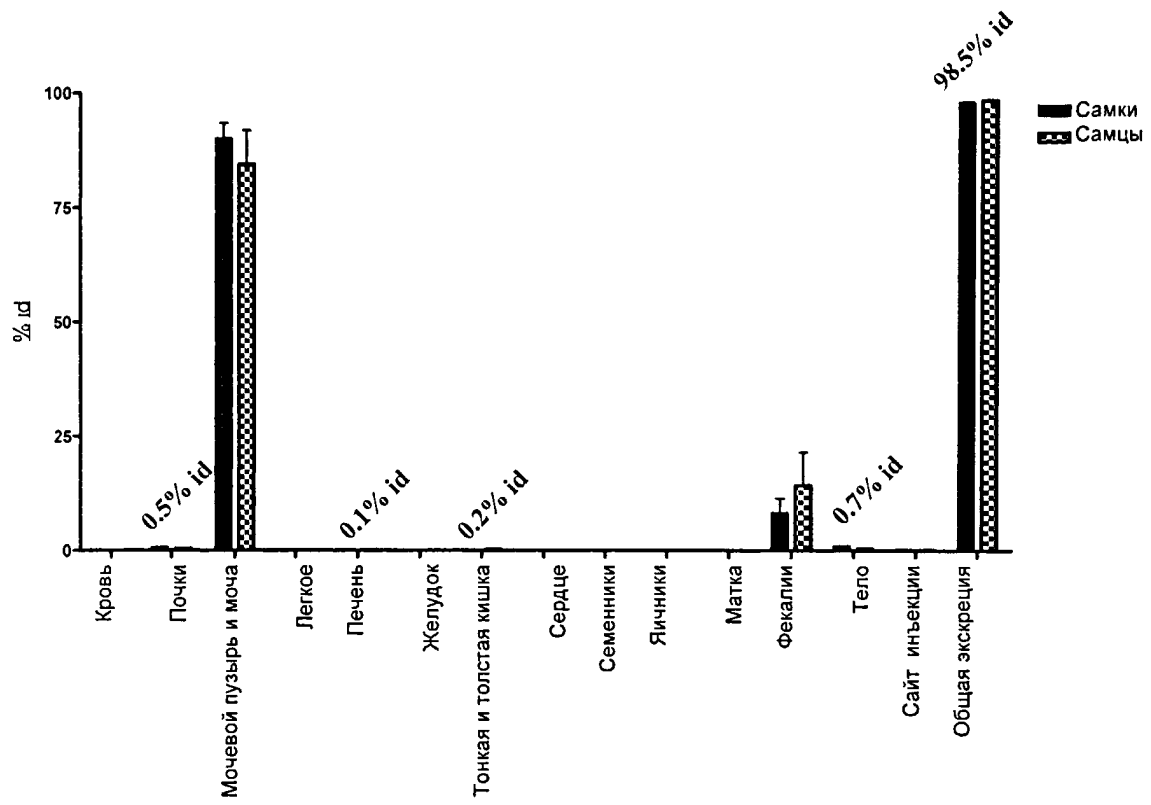
25

30

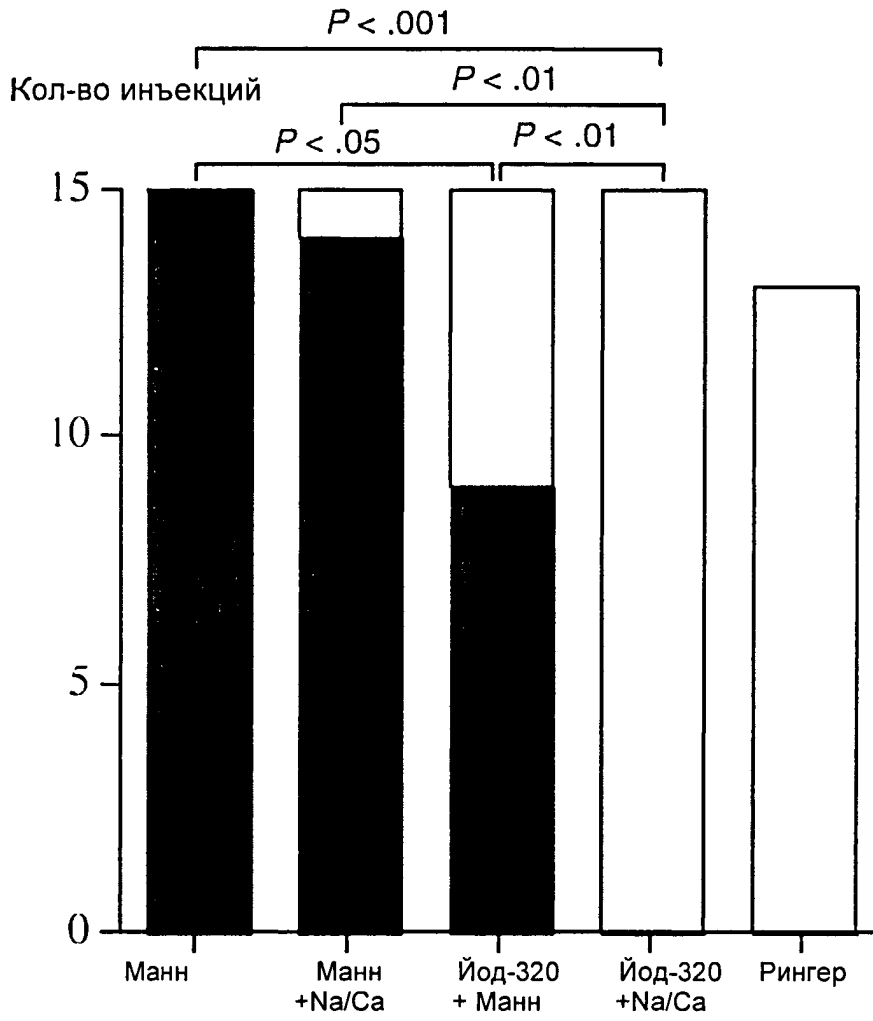
35

40

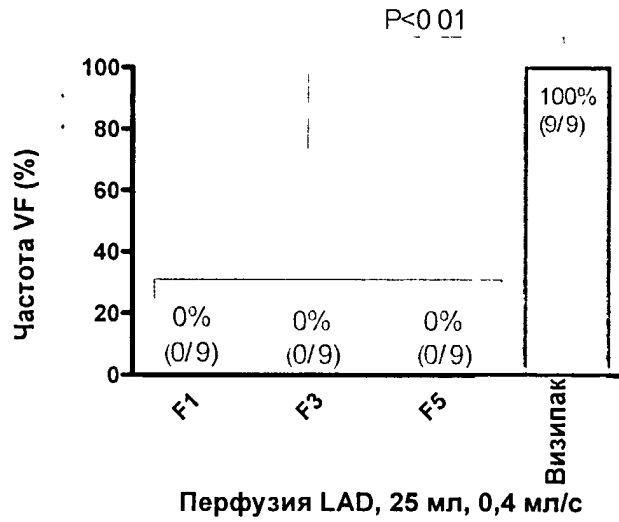
45



Фиг. 1

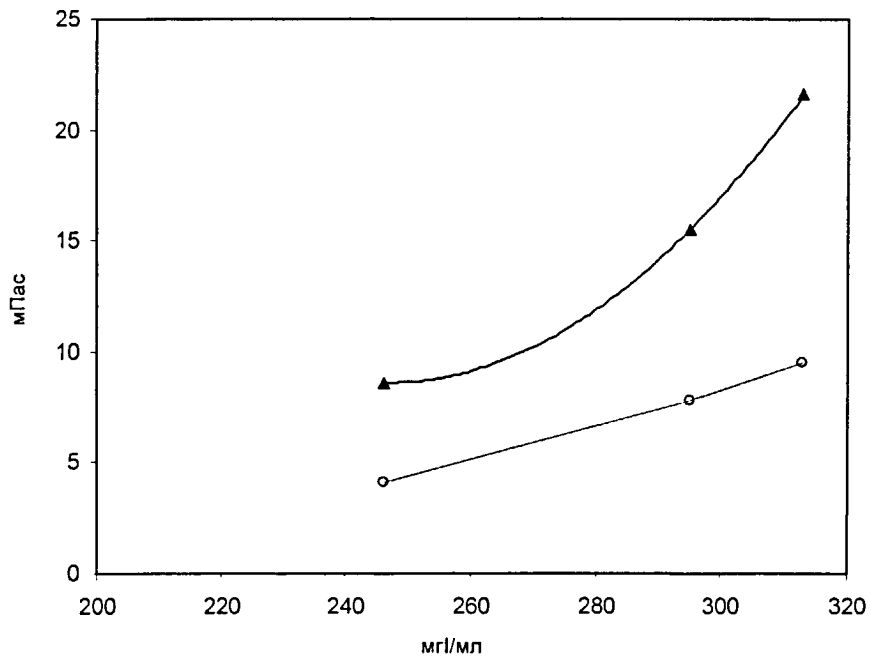


Фиг. 2



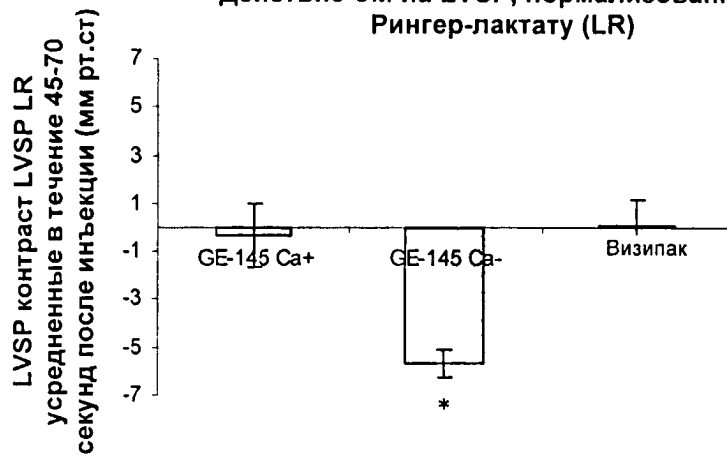
Перфузия LAD, 25 мл, 0,4 мл/с

Фиг. 3



Фиг. 4

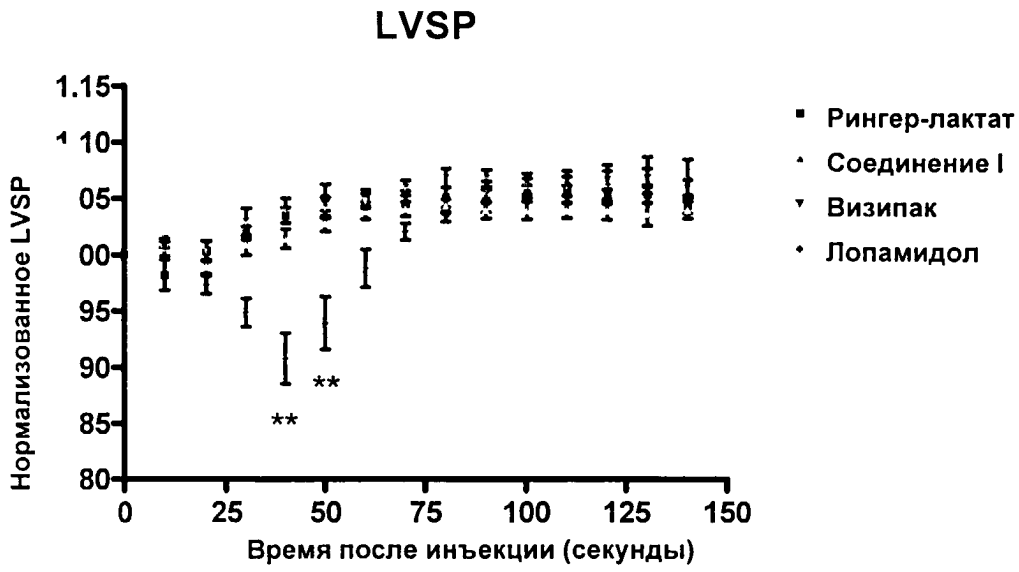
Действие СМ на LVSP, нормализованное к Рингер-лактату (LR)



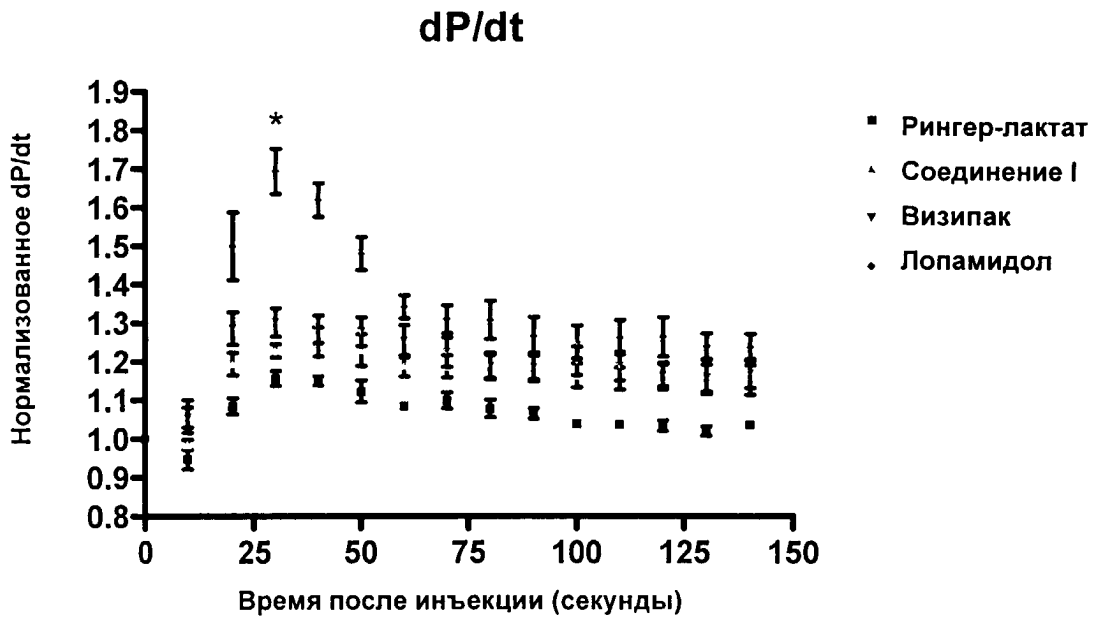
Фиг. 5



а)



б)



Фиг. 6