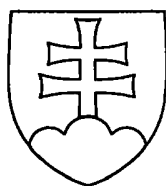


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 24.09.1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/942 989
(32) Dátum priority: 02.10.1997
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 07.11.2000
(86) Číslo PCT: PCT/US98/20182, 24.09.1998

(21) Číslo dokumentu:

484-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

A 61K 49/00

(71) Prihlasovateľ: EPIX MEDICAL, INC., Cambridge, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Lauffer Randall B., Brookline, MA, US;
Dunham Stephen O., Waterville, ME, US;

(74) Zástupca: Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Použitie kontrastného činidla**

(57) Anotácia:

Kontrastné činidlo sa použije na prípravu diagnostického činidla na diagnostické zobrazovanie so zvýšeným kontrastom pomocou MRI, ultrafialového svetla, viditeľného svetla alebo infračerveného svetla, pričom sa monitoruje zobrazovacia signálna charakteristika kontrastného činidla na stanovenie toho, či je intervenčná terapia celkom skončená. Kontrastné činidlo obsahuje zobrazenie zosilňujúcu skupinu (IEM) a od stavu závislú skupinu viažucu sa na tkanivo (SDTBM). Tieto kontrastné činidlá prejavujú od stavu závislú väzbu k jednej alebo niekoľkým zložkám cieľového tkaniva a poskytujú detegovateľnú zmenu v signálnych charakteristikách kontrastného činidla, len čo je naviazané na cieľové tkanivo. V dôsledku toho tieto činidlá prejavujú väzbovú afinitu, a tiež obrazový kontrast, na cieľové tkanivo, ktoré sa mení s tým, ako sa mení stav tkaniva v priebehu terapie.

Použitie kontrastného činidla

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka použitia kontrastného činidla na prípravu diagnostického činidla na diagnostické zobrazovanie so zvýšeným kontrastom pomocou MRI, ultrafialového svetla, viditeľného svetla alebo infračerveného svetla, pričom sa monitoruje zobrazovacia signálna charakteristika kontrastného činidla na stanovenie toho, či je intervenčná terapia celkom skončená. Kontrastné činidlo zameriava špecifické tkanivo alebo zložku tkaniva a dovoľuje monitorovať zmeny stavu cieľového tkaniva (napríklad denaturáciu, nekrózu, tkanivovú koaguláciu, apoptózu), ku ktorým dochádza v priebehu intervenčnej terapie alebo po intervenčnej terapii. Kontrastné činidlo používané v tomto vynáleze prejavuje väzbu na jednu alebo niekoľko zložiek cieľového tkaniva, ktorá je závislá od stavu tkaniva, a poskytuje tak detegovateľnú zmenu v charakteristikách signálu kontrastného činidla viazaného na tkanivo.

Doterajší stav techniky

Diagnostické zobrazovacie metódy, ako je napríklad zobrazovanie pomocou magnetickej rezonancie (MRI), zobrazovanie Röntgenovým žiarením, nukleárne zobrazovanie pomocou rádiofarmák, optické zobrazovanie (pomocou ultrafialového, viditeľného a/alebo infračerveného svetla) a ultrazvukové zobrazovania sa používajú v lekárenskej diagnostike už veľa rokov. V niektorých prípadoch sa už tiež roky používa kontrastná látka na zlepšenie kvality zobrazenia alebo na získanie špecifickej informácie. V iných prípadoch, ako je napríklad optické alebo ultrazvukové zobrazovanie, sa kontrastné činidlá používajú krátko a alebo sa až teraz začínajú používať.

MRI a optické zobrazovacie metódy sú medzi zobrazovacími metódami jedinečné, pretože poskytujú veľmi komplexné signály, ktoré sú citlivé na chemické prostredie a stav cieľového tkaniva. Zatiaľ čo signál získaný pomocou Röntgenového žiaren-

nia alebo rádionuklidov zostáva rovnaký nezávisle na tom, či je činidlo voľné v plazme alebo je viazané na proteíny alebo zachytené v kostiach, určité činidlá pre MRI alebo optické zobrazovanie poskytujú odlišné signálne charakteristiky v rôznom fyziologickom prostredí a na rôzne patologické stavy. Tak napríklad naviazaním na zložku tkaniva kontrastné činidlo pre MRI môže ukázať zmeny v indukovanej rýchlosti relaxácie alebo chemickom posune vedľajších alebo príľahlých jadier. Podobne optické farbivo môže po naviazaní ukázať zmeny v absorbanzii (pohlcovaní), reflektancii (odrážavosti), fluorescencii, fosforescencii, chemiluminiscencii, rozptyle alebo iných spektrálnych vlastnostiach.

Všeobecne je možné povedať, že kontrastné činidlo, aby poskytlo diagnostické údaje, musí interferovať s vlnovou dĺžkou elektromagnetického žiarenia, ktoré sa používa v danom zobrazovacom spôsobe, meniť fyzikálne vlastnosti tkaniva, aby vznikol odlišný signál, alebo ako je tomu v prípade rádiofarmák, činidlo je samotné zdrojom žiarenia. K všeobecne používaným materiálom patria organické molekuly, ióny kovov, soli, cheláty, vrátane chelátov kovov, častice (zvlášť častice železa), značené peptidy, protilátky, proteíny, polyméry alebo liposómy.

Po podaní niektoré činidlá nešpecificky difundujú telovými kompartmentami pred tým, ako sú metabolizované a/alebo vylúčené, tieto činidlá sú všeobecne známe ako nešpecifické činidlá. Alternatívne, iné činidlá majú špecifickú afinitu na určitý telový kompartment, bunku, bunkovú zložku, orgán alebo tkanivo, tieto činidlá sa všeobecne nazývajú cielené činidlá.

Jednou z aplikácií diagnostických zobrazovacích metód je monitorovanie intervenčných terapií. K všeobecne známej intervenčnej terapii patrí zameranie nežiaduceho tkaniva alebo zložky tkaniva vysokotermálnou energiou pomocou zaostreného ultrazvuku (napríklad Cline et al., "MR Temperature Mapping of Focused Ultrasound Surgery", Mag. Resn. Med. 31: 628-636, 1994), rádiovfrekvenčné generátory (napríklad Rossi et al.,

Percutaneous RF Interstitial Thermal Ablation in the Treatment of Hepatic Cancer, *AJR* 167: 759-768, 1996), mikrovlnné antény (napríklad Schwarzmeier et al., Magnetic resonance Imaging of Microwave Induced Tissue heating, *Mag. Resn. Med.* 33: 729-731, 1995) a lasery (napríklad Vogl et al., Recurrent Nasopharyngeal Tumors: Preliminary Clinical Results with Interventional MR Imaging-Controlled Laser-Induced Thermotherapy, *Radiology* 196: 725-733, 1995), použitie kryoablácie (to znamená kvapalného dusíka) a injekcie denaturačného roztoku (napríklad etanolu, horúceho roztoku soli) priamo do požadovaného orgánu (napríklad Nagel et al., Contrast-Enhanced MR Imaging of Hepatic Lesions Treated with Percutaneous Ethanol Ablation Therapy, *Radiology* 189: 265-270, 1993 a Honda et al., Percutaneous Hot Saline Injection Therapy for Hepatic Tumors: An Alternative to Percutaneous Ethanol Injection Therapy, *Radiology* 190: 53-57, 1994), injekcie chemoterapeutických alebo chaotropných činidiel do tkaniva (napríklad Pauser et al., Evaluation of Efficient Chemoembolization Mixtures by Magnetic Resonance Imaging of Therapy Monitoring: An Experimental Study on the VX2 Tumor in the Rabbit Liver, *Cancer res.* 56: 1863-67, 1996), a fotodynamickej terapie, kedy sa cytotoxické činidlo aktivuje *in vivo* po ožiarení svetlom (napr. Dodd et al., MRI Monitoring of the Effects of Photodynamic Therapy on Prostate Tumors, *Proc. Soc. Mag. Resn.* 3: 1368, ISSN 1065-9889, August 19-25, 1995). Spoločným cieľom všetkých takých intervenčných terapií je takéto ošetrovanie nežiaduceho tkaniva alebo tkanivovej zložky (napríklad nádorov, neoplázických tkanív alebo zložiek tkanív), ktoré spôsobí nekrózu, abláciu, koaguláciu alebo denaturáciu takého tkaniva.

Aby takáto intervenčná terapia viedla k maximálnemu osahu a minimalizovali sa vedľajšie účinky (napríklad poškodenie susedných tkanív), je nevyhnutné monitorovať *in vivo* účinnosť terapie. A skutočne, aby terapia bola účinná, intervenčná terapia musí pokračovať tak dlho, pokiaľ požadované tkanivo alebo tkanivová zložka celkom a úplne odumrie (to znamená je celkom neživotná po odstránení alebo skončení terapie). Teda je potreba nielen monitorovať presne priebeh terapie, aby sa

zabránilo nadbytočnému liečeniu a s tým spojenému prípadnému poškodeniu susedných tkanív, ale je tiež potrebné presne odlišovať skutočne nekrotické tkanivo od tkaniva, ktoré je v určitej miere poškodené, ale napriek tomu zostáva životaschopné.

Jednou z ciest, ako monitorovať účinnosť intervenčnej terapie, je zobrazovať nežiaduce tkanivo alebo zložku tkaniva v priebehu terapie a tiež po terapii. Avšak takáto diagnostická zobrazovacia metóda musí byť schopná zvýšiť kontrast medzi tkanivami rôzneho patologického stavu (medzi natívnym a denaturovaným tkanivom, medzi živým a nekrotickým tkanivom), a to takým spôsobom, aby poskytla dve základné triedy informácií:

1) Detekčné dáta: K nim patria spektroskopické informácie nevyhnutné na stanovenie patologického stavu zobrazovaného tkaniva. Schopnosť poskytnúť túto triedu súvisí so "špecifickosťou" a "senzitivitou" činidla.

2) Spätná väzba a rozlíšenie: Táto trieda informácií poskytuje monitorovanie intervenčných terapeutických postupov, ktoré vedú k likvidácii alebo degradácii tkaniva alebo zložky tkaniva. Je zrejmé, že pri niektorých intervenčných metódach je v priebehu terapie výhodná spätná väzba v reálnom čase (okolo 1 až 10 sekúnd), zatiaľ čo pri iných metódach je postačujúce vyhodnotenie až po terapii. Pri všetkých intervenčných terapiách je ale potrebné presné priestorové rozlíšenie (asi 1 až 5 mm) ošetrovaných tkanív a akéhokoľvek účinku na susedné tkanivá v priebehu terapie.

Súčasná metódy založené na MRI na monitorovanie účinnosti intervenčných terapií spadajú všeobecne do jednej z dvoch tried: 1) metódy, kedy sa nepoužíva exogénne kontrastné činidlo, ale sa spolieha na iný pozorovateľný parameter MR (pozri skôr) a 2) metódy, ktoré používajú nešpecifické extracelulárne kontrastné činidlo. Tieto metódy však v skutočnosti neposkytujú žiadnu priamu informáciu týkajúcu sa patologického stavu tkaniva alebo zložky tkaniva podrobujúceho sa intervenčnej terapii (napríklad či je natívna alebo denaturovaná, živá alebo

nekrotická). Okrem toho sú tieto metódy silno obmedzené v podstate na monitorovanie termálnej ablačnej terapie a prejavujú len obmedzenú senzitivitu na termálne indukované teplotné zmeny v tkanivách.

Niekoľko z týchto metód založených na MRI na monitorovanie termálnej ablačnej terapie sa opiera o teplotne závislé parametre NMR ako sú relaxačné časy (T_1 a/alebo T_2), frekvencia protónovej rezonancie (PRF) vody, fázový posun a difúzny koeficient. Avšak tieto metódy majú celý rad rôznych obmedzení.

Napríklad jedna z týchto metód zahŕňa monitorovanie účinku teploty na relaxačný čas T_1 tkaniva (pozri napríklad Cline et al., MR Temperature Mapping of Focused Ultrasound Surgery, Mag. Resn. Med. 31: 628-636, 1994). Tento prístup je však nedostatočný, lebo každé tkanivo má inú závislosť T_1 na teplotnom profile a teda táto metóda vyžaduje kalibráciu T_1 na každý typ tkaniva. Metóda založená na T_1 je tiež obmedzená svojou citlivosťou s tkanivovo závislou zmenou v T_1 len 0,01 % až 1,5 % na 1°C.

K ďalšej metóde používajúcej meranie teploty patrí monitorovanie účinku teploty na frekvenciu protónovej rezonancie (alebo chemický posun) vody. Táto metóda detekuje zmeny vo vodíkovej väzbe a molekulárnom pohybe molekúl vody, ktoré sú indukované teplotnými zmenami (pozri napríklad J.D.Poorter et al., Noninvasive MRI Thermometry with the Proton Resonance Frequency (PRF) Method: In Vivo Results in Human Muscle, Mag. Resn. Med. 33: 74-81, 1995). Avšak nízka senzitivita tejto metódy (0,01 ppm/°C) vyžaduje použitie veľmi silného magnetického poľa (to znamená > 4,7 T), čo je klinicky nežiaduce. Navyše stanovenie chemického posunu vody vyžaduje absolútne stále magnetické pole a veľmi závisí na magnetickej citlivosti tkaniva, ktorá je veľmi premenlivá pre rôzne druhy tkanív. Takže aj táto metóda, podobne ako metóda založená na T_1 , vyžaduje extenzívnu kalibráciu pre každý tkanivový typ. Nakoniec táto metóda taktiež neposkytuje informáciu týkajúcu sa tepelne

indukovanej nekrózy alebo degradácie tkaniva.

Ďalšia známa metóda vyžaduje monitorovať účinok teploty na difúzny koeficient protónu vody (pozri napríklad H.Saint Jalmes, Precision in Temperature Measurement via T1 or Diffusion Imaging, Proc. Soc. Mag. Resn. 2: 1072, ISSN 1065-9889, August 19-25, 1995). Táto metóda je však tiež obmedzená, lebo difúzny koeficient je citlivý na pohyb tkaniva a perfúziu.

Pri všetkých skôr uvedených metódach fyziologické zmeny v tkanive spôsobené zvýšeným prietokom krvi, tkanivovým metabolizmom alebo indukovaným edémom, môžu viesť k nepredvídaným zmenám v signále (to znamená k zmene magnetickej citlivosti). Kvôli týmto účinkom štandardné termálne kalibračné krivky majú len malý alebo vôbec žiadny význam na presné monitorovanie termálnej ablačnej terapie.

Boli opísané sa aj iné metódy, ktoré monitorujú účinky teploty na chemický posun iných magnetických jadier. Napríklad NMR chemický posun kobaltu je veľmi citlivou sondou na teplotu. Nízka receptivita ^{59}Co vyžaduje znova veľmi silné pole ($\geq 4,7\text{ T}$), vysoké koncentrácie a dlhé meracie časy (pozri A.G. Webb et al., Measurement of Microwave Induced Heating of Breast Tumors in Animal Model Using Cobaltbased NMR, Proc. Soc. Mag. Resn. 1: 72, ISSN 1065-9889, August 19-25, 1995). Okrem toho toxicita kobaltového činidla predstavuje vážne obmedzenie na využitie *in vivo*.

Fluorová (^{19}F) NMR sa použila tiež na monitorovanie teplotne závislých fázových prechodov fluorovaných uhľovodíkov enkapsulovaných v lipozómoch a fluorovaných polymérov (pozri napríklad Webb et al., Microencapsulation of Fluorine Containing Phase Transition Agents for Monitoring Temperature Changes *in vivo*, Proc. Soc. Mag. Resn. 3: 1574, ISSN 1065-9889, August 6-12, 1994). Klinicky však metóda s (^{19}F) nie je užitočná, lebo dochádza len k obmedzenej biologickej distribúcii polymérnych fluorovaných činidiel, a tiež vzhľadom na závislosť chemického posunu fluorovaných činidiel od pH

a typu tkaniva a od potreby silného magnetického poľa. Tieto činidlá neposkytujú informácie o termálne indukovaných nekrózach.

Určité kontrastné činidlá obsahujúce komplexy paramagnetických kovov sa tiež navrhli na monitorovanie účinnosti intervenčných terapií. Takéto činidlá môžu indukovať veľké zmeny v chemickom posune protónov (20 až 40 ppm) chelatujúceho ligandu od normálneho rozsahu frekvencie rezonancie vody. Paramagnetickým posunom rezonancií mimo oblasť hlavnej rezonancie vody *in vivo* je možné tieto rezonancie pozorovať (pozri napríklad Aime et al., Yb(III)DOTMA as Contrast Agent in CSI and Temperature Probe in MRS, Proc. Soc. Mag. Resn. 2: 1109, ISSN 1065-9889, August 19-25, 1995). Aj keď tieto mimoriadne rezonančné posuny sú závislé od teploty, vyžadujú použitie vysokých koncentrácií paramagnetických komplexov a klinicky nevhodné silné magnetické pole na detekciu teplotných zmien. Tieto komplexy tiež neposkytujú žiadne informácie o tepelno-indukovaných nekrózach tkanív.

Bola opísaná metóda na odlíšenie normálneho a nekrotického pečeneového tkaniva (Dupoas et al., Delineation of Liver Necrosis using Double Contrast-Enhanced MRI, J. MRI Vol. 7 no. 3, pp. 472-77, 1997). Táto metóda však vyžaduje použitie nešpecifického kontrastného činidla, ktoré obmedzuje jej schopnosť špecificky monitorovať zmeny stavu požadovaného tkaniva alebo zložky tkaniva. Takže aj táto metóda vyžaduje podávanie niekoľkých kontrastných činidiel.

Doteraz známe diagnostické zobrazovacie metódy sú obmedzené tým, že nemôžu poskytnúť presnú informáciu o stave špecifického tkaniva alebo zložky tkaniva, ktoré je podrobené intervenčnej terapii (či je tkanivo v natívnom alebo denaturovanom stave, či je tkanivo živé alebo nekrotické). Existuje teda veľká potreba diagnostickej zobrazovacej metódy, ktorá by neinvazívnym spôsobom a presne monitorovala stav špecifického tkaniva alebo zložky tkaniva, a ktorá by prípadne poskytovala aj rýchlu spätnú väzbu týkajúcu sa tkanivovej nekrózy v prie-

behu intervenčných terapií.

Podstata vynálezu

Predložený vynález sa týka použitia kontrastného činidla na prípravu diagnostického činidla na diagnostické zobrazovanie so zvýšeným kontrastom pomocou MRI, ultrafialového svetla, viditeľného svetla alebo infračerveného svetla, kde kontrastné činidlo je schopné naviazať sa na cieľové tkanivo alebo zložku tkaniva, má špecifickú afinitu pre toto tkanivo alebo zložku tkaniva, a obsahuje skupinu zosilňujúcu zobrazenie (IEM) a skupinu viažucu sa na tkanivo v závislosti od jeho stavu (SDTBM), pričom sa monitoruje zobrazovacia signálna charakteristika kontrastného činidla na stanovenie toho, či je intervenčná terapia celkom skončená.

Predložený vynález sa týka diagnostického zobrazovania so zvýšeným kontrastom, zvlášť MRI a optického zobrazovania, a síce špecifického tkaniva alebo zložky tkaniva, na ktorom sa uskutočňuje intervenčná terapia. Tento spôsob obsahuje kroky, keď:

a) sa podá pacientovi kontrastné činidlo schopné naviazať sa na cieľové tkanivo alebo zložku tkaniva, ktoré sa podrobuje alebo sa podrobilo intervenčnej terapii,

b) pacient sa podrobí vyšetreniu jednou zo zobrazovacích metód MRI, pomocou ultrafialového svetla, viditeľného svetla alebo infračerveného žiarenia, a

c) monitoruje sa zobrazovací signál charakteristický pre kontrastné činidlo, aby sa stanovilo, či je intervenčná terapia celkom skončená.

Kontrastné činidlo použité v predloženom vynáleze obsahuje zobrazenie zosilňujúcu (alebo signál vytvárajúcu) skupinu (IEM) a skupinu viažucu sa na tkanivo v závislosti na jeho

stave (SDTBM). Tieto kontrastné činidlá sú schopné prejaviť na stave závislú väzbu na cieľové tkanivo alebo zložku tkaniva. Takáto väzba vedie k detegovateľnej zmene v signálnych charakteristikách kontrastného činidla a teda dovoľuje stanoviť zmeny stavu cieľového tkaniva (abláciu, degradáciu alebo denaturáciu), ktoré sa podrobuje alebo podrobilo intervenčnej terapii.

V jednom aspekte predloženého vynálezu použitie kontrastného činidla dovoľuje monitorovanie termálne indukovanej nekrózy v reálnom čase v priebehu termálnej intervenčnej terapie. Tieto kontrastné činidlá vykazujú zvýšený kontrast medzi tka-

nivami rôznych stavov.

Detailný opis vynálezu

Na lepšie pochopenie predloženého vynálezu je uvedené nasledujúce podrobnejšie vysvetlenie.

Predložený vynález sa týka neinvazívneho spôsobu presného monitorovania účinnosti intervenčných terapií (to znamená monitorovanie stavu nežiaduceho tkaniva alebo zložky tkaniva). Vynález konkrétne poskytuje diagnostickú zobrazovaciu metódu, ktorá zahŕňa použitie kontrastného činidla, a toto činidlo vykazuje väzbu k cieľovému tkanivu alebo k zložke tkaniva závislú od ich stavu, pričom signálne charakteristiky činidla sa menia, keď sa naviaže na cieľové tkanivo. Zobrazovacia metóda vhodná na uplatnenie vynálezu je MRI (kam patria techniky magnetickej rezonančnej spektroskopie) a optické zobrazovacie metódy.

Termín "intervenčná terapia" sa tu používa tak, že označuje akýkoľvek z mnohých spôsobov terapie, ktorých cieľom je indukovať alebo spôsobiť nekrózu, abláciu alebo koaguláciu nejakého nežiaduceho (napr. rakovinového tkaniva, nádoru, neoplázie) tkaniva alebo zložky tkaniva.

Termín "patologický stav" alebo len "stav" sa tu široko používa na označenie dvoch fyziologických stavov tkaniva alebo zložky tkaniva, ktoré je podrobované intervenčnej terapii. Jeden z týchto stavov je považovaný za stav živý, natívny (prirodzený) alebo životaschopný. Tento "začiatočný" stav obvykle opisuje tkanivo pred začatím akejkoľvek intervenčnej terapie, kedy tkanivo a/alebo bunkové mechanizmy ako je metabolizmus a respirácia sú úplne funkčné. "Druhý" stav, ktorý opisuje tkanivo v priebehu terapie alebo potom, čo absolvovalo úspešnú intervenčnú terapiu, je považovaný za neživý, denaturovaný, nekrotický alebo apoptotický, kedy tkanivá a/alebo bunkové mechanizmy sú aberantné, nefunkčné alebo funkcie ustali.

Spôsob podľa vynálezu obsahuje kroky, keď:

a) sa podá pacientovi kontrastné činidlo schopné naviazať sa na cieľové tkanivo alebo zložku tkaniva, ktoré sa podrobuje alebo sa podrobilo intervenčnej terapii,

b) sa pacient podrobí vyšetreniu jednou zo zobrazovacích metód MRI, pomocou ultrafialového svetla, viditeľného svetla alebo infračerveného žiarenia, a

c) monitoruje sa zobrazovací signál charakteristický pre kontrastné činidlo na to, aby sa stanovilo, či je intervenčná terapia skončená.

Kontrastné činidlo použité v predloženom vynáleze obsahuje zobrazenie zosilňujúce (alebo signál vytvárajúce) skupinu (IEM) a skupinu viažucu sa na tkanivo v závislosti na jeho stave (SDTBM). V dôsledku kombinácie týchto dvoch skupín, ktoré sú podrobnejšie opísané ďalej, sú kontrastné činidlá schopné prejaviť na stave závislú väzbu k cieľovému tkanivu alebo zložke tkaniva, a prejavujú také signálne charakteristiky, ktoré sa menia, keď dôjde k naviazaniu na cieľ.

Väzba závislá od stavu sa týka relatívnej afinity, ktorú vykazuje kontrastné činidlo k cieľovému tkanivu alebo zložke tkaniva a ktorá je závislá od stavu cieľového tkaniva. Takže činidlo použité v predloženom vynáleze má väčšiu alebo menšiu väzbovú afinitu k jednej alebo niekoľkým zložkám tkaniva v ich denaturovanom alebo nekrotickom stave v porovnaní s väzbovou afinitou činidla k natívnemu alebo živému tkanivu.

Tieto od stavu závislé zmeny vo väzbe vedú k lokalizácii činidla do tkaniva v jednom stave oproti tkanivu v druhom stave a súčasne sa menia signálne charakteristiky činidla, ktoré zosilňujú detekciu zmeny stavu, ku ktorej dochádza. Napríklad pokiaľ činidlo prejavuje vyššiu väzbovú afinitu k živému alebo natívnemu tkanivu, keď zvýšená väzbová afinita vedie k intenzívnejšiemu signálu, potom živé tkanivo je zobra-

zené (alebo detekované) ako horúce miesto (*hot spot*). V priebehu intervenčnej terapie toto horúce miesto "chladne", ako sa živé tkanivo mení na nekrotické, odumreté, lebo sa znižuje väzbová afinita činidla k nekrotickému tkanivu. Naopak, keď činidlo prejavuje vyššiu väzbovú afinitu k nekrotickému alebo neživotaschopnému tkanivu, potom sa z tohto tkaniva stane *hot spot* v priebehu intervenčnej terapie.

Je výhodné, keď od stavu závislá väzbová afinita činidla vykazuje vyššiu citlivosť na zmeny fyziologického stavu. Výhodné činidlá sú také, ktoré majú väzbovú afinitu a zodpovedajúce zmeny signálu, ktoré sú citlivo vyladené, aby zodpovedali zmenám stavu, ktoré v tkanive alebo zložke tkaniva prebiehajú. Podľa jedného aspektu predloženého vynálezu, monitorovaním zmien v signále v priebehu intervenčnej terapie, je zlepšené citlivé monitorovanie účinnosti a rozsahu ablácie tkaniva v reálnom čase.

Štruktúra kontrastného činidla

Kontrastné činidlá použité v predloženom vynáleze musia obsahovať prinajmenšom zobrazenie zosilňujúcu (alebo signál vytvárajúcu) skupinu (IEM) a skupinu viažucu sa na tkanivo v závislosti na jeho stave (SDTBM). Prípadne sa môže použiť ešte fyziologicky kompatibilná spájacia skupina (L) na vzájomné spojenie IEM s SDTBM. K príkladom vhodných skupín na vytvorenie spojenia patria priama, rozvetvená alebo cyklická alkylová, arylová, éterová, polyhydroxylová, polyéterová, polyamínová, heterocyklická, peptidová, peptoidová, fosfátová alebo sulfátová skupina, alebo aj iná fyziologicky kompatibilná skupina. Spájacie skupiny môžu poskytnúť dôležitú fyzikálnochemickú stabilitu komplexu tým, že zvýšia biologický polčas v krvi alebo v iných tekutinách alebo kompartmentoch. Spájacie skupiny môžu tiež poskytnúť prostriedky na biologickú degradáciu a následné vylúčenie činidla.

1. Skupina zosilňujúca zobrazenie (IEM)

Prvou doménou kontrastného činidla použitého v predložennom vynáleze je IEM, čo môže byť akákoľvek chemická látka alebo substancia použitá na to, aby poskytla signál alebo kontrast pri zobrazení. IEM musí byť schopná tvoriť rôzne signálne charakteristiky, keď je činidlo naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v porovnaní s voľným činidlom. Pri optickom zobrazení to môže byť zmena absorbancie, reflektancie, fluorescencie, rozptylu, fosforescencie, chemiluminiscencie, zvýšenie alebo zníženie počtu vrcholov absorbancie alebo akákoľvek zmena vlnovej dĺžky maxím, alebo akákoľvek iná zmena, ktorá by pri vonkajšej detekcii zodpovedala naviazanej IEM. Pre MRI je to zmena v indukovanej relaxačnej rýchlosti protónov vody ($1/T_1$ alebo $1/T_2$) alebo akýchkoľvek blízkych jadier, alebo posun jedného alebo niekoľkých vrcholov v spektre NMR buď IEM alebo vrcholov, ktoré pochádzajú z jadier vo väzbovom mieste pre SDTBM.

Teda IEM môže byť organická molekula, kovový ión, soľ alebo chelát, vrátane chelátov kovov, kovový klaster alebo častica (najmä železná častica), alebo značený peptid, proteín, polymér alebo lipozóm. Na optické zobrazovanie (ktoré používa ultrafialové, viditeľné alebo infračervené svetlo) môže ako IEM slúžiť tiež akékoľvek organické alebo anorganické farbivo. K príkladom vhodných farbív patrí indokyanínová zeleň a fluoresceín. K príkladom anorganických farbív patria luminescenčné kovové komplexy ako sú napríklad komplex Eu(III), Tb(III) a iných lantanidových iónov (atómové čísla 57 až 71) (pozri napríklad W.Dew. Horrocks, M. Albin, Progr. Inorg. Chem. 1984, 31, pp. 1-104).

Zvlášť užitočné IEM predstavujú zlúčeniny chelátov kovov obsahujúce jedno alebo niekoľko cyklických alebo acyklických organických chelatujúcich činidiel vytvárajúcich komplex s jedným alebo niekoľkými iónmi kovu. Pre optické zobrazovanie k výhodným iónom kovov patria tie, ktoré majú atómové čísla 13, 21 až 31, 39 až 42, 44 až 50 alebo 57 až 83. Pre MRI k výhodným iónom kovov patria tie, ktoré majú atómové čísla 21 až 29, 42, 44 alebo 57 až 83 a ešte výhodnejšie paramagnetické

formy kovových iónov s atómovými číslami 21 až 29, 42, 44 alebo 57 až 83. Keď IEM obsahuje chelát paramagnetického kovu, výhodný paramagnetický kov je vybraný zo skupiny obsahujúcej Gd(III), Fe(III), Mn(II a III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III a IV), Ho(III), Er(III), Pr(III) a Eu(II a III). Najvýhodnejší je Gd(III).

Ak je IEM chelát kovu, nesmie vo významnej miere disociovať pokým činidlo prechádza organizmom, vrátane cieľového tkaniva. Významné uvoľňovanie voľných iónov kovu, a zvlášť voľné ióny paramagnetických kovov, môžu viesť k toxicite, ktorá by bola akceptovateľná len v patologickom tkanive.

Všeobecne platí, že stupeň toxicity chelátov kovov súvisí so stupňom disociácie *in vivo* pred vylúčením. Toxicita sa všeobecne zvyšuje s množstvom voľných iónov kovu. Pre komplexy s vysokou kinetickou labilitou je žiaduca vysoká termodynamická stabilita (formačná konštanta aspoň 10^{15} M^{-1} a výhodnejšie aspoň 10^{20} M^{-1}) aby sa minimalizovala disociácia a sprevádzajúca toxicita. Pre komplexy, kde kinetická labilita je porovnateľne nižšia, disociácia môže byť minimalizovaná s nižšou formačnou konštantou, to znamená 10^{10} M^{-1} alebo vyššou.

Toxicita je tiež funkciou počtu voľných koordinačných miest v komplexe. Všeobecne menej koordinačných miest vody znižuje tendenciu chelatačného činidla uvoľňovať paramagnetický kov. Preto je výhodný komplex obsahujúci dve, jedno alebo žiadne voľné koordinačné miesto. Prítomnosť viac ako dvoch otvorených koordinačných miest všeobecne v neprijateľnej miere zvýši toxicitu uvoľňovaním iónov kovu *in vivo*.

Aby sa účinne zlepšilo zobrazenie MRI, komplex musí byť schopný zvýšiť relaxačné rýchlosti $1/T_1$ (pozdĺžnou, alebo spin-mriežka) a/alebo $1/T_2$ (pričnou, alebo spin-spin) protónov vody alebo iných jadier použitých na zobrazenie alebo spektroskopiu, vrátane protónov P-31, C-13, Na-23 alebo F-19 na IEM, iných biomolekúl alebo injikovaných biomarkerov. Relativity sú tu definované ako schopnosť zvýšiť $1/T_1$ alebo $1/T_2$

na 1 mM iónov kovu (to znamená $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Pre najobvyklejšiu formu klinickej MRI, MRI protónov vody, je relaxivita optimálna, keď paramagnetický ión naviazaný na chelatujúci ligand má ešte jednu alebo niekoľko voľných koordinačných miest na výmenu vody (R.B. Laufer, Chemical Reviews, 87, 901-927, 1987). Avšak táto musí byť v rovnováhe so stabilitou chelátu kovu (pozri skôr uvedené), ktorá sa všeobecne znižuje s rastúcim počtom voľných koordinačných miest. Výhodnejšie preto komplex obsahuje len jedno alebo dve voľné koordinačné miesta.

Typ chelatujúceho ligandu môže značne ovplyvniť rýchlosť výmeny vody pri MRI číndle. Najmä rýchlosť výmeny vody hrá dôležitú úlohu pri tkanivovom kontraste vytváranom pri termálnej ablačnej terapii. Všeobecne vyššia rýchlosť výmeny vody poskytuje vyššie R_1 , lebo väčší počet molekúl vody reaguje s paramagnetickým centrom, a naopak, nižšia rýchlosť výmeny vedie k nižšiemu R_1 . Takže komplex chelátu kovu, ktorý má nízku rýchlosť výmeny vody ($k_{\text{ex-298K}} = 500$ až $10\,000$ ns) všeobecne povedie k zvýšeniu $1/T_1$ (R_1), keď sa bude zvyšovať teplota, čo bude odrážať pozitívny účinok zvýšeného tepelného pohybu molekúl vody a zvýšenú rýchlosť výmeny vody v blízkosti paramagnetického centra, R_1 potom dosahuje obvykle maximálne kontrastné hodnoty pri teplote vyššej ako je fyziologická. Pri určitej teplote kontrast klesne na minimum, keď je užitočný účinok zvýšenej výmeny vody vyvážený nedostatočným časom, ktorý molekuly vody strávia v blízkosti paramagnetického centra.

Chelát kovu s mierne rýchlou výmenou vody ($k_{\text{ex-298 K}}=10$ až 100 ns) vykazuje relatívne plochú závislosť $1/T_1$ (R_1) od teploty, ktorá klesne pri určitej vyššej teplote, znova z dôvodu nedostatočného času, ktorý molekuly vody strávia v blízkosti paramagnetického centra s týmito podmienkami.

Chelát kovu s veľmi rýchlou výmenou vody ($k_{\text{ex-298 K}}=0,1$ až 10 ns) pri fyziologických a vyšších teplotách vykazuje zníženú hodnotu $1/T_1$, lebo zvýšený pohyb molekúl vody ďalej obmedzuje čas, ktorý molekuly vody strávia v blízkosti paramagnetického centra. Avšak taký chelát vykazuje zvýšenie hodnoty

$1/T_1$ pri nižších teplotách (to znamená kryogénnych) v dôsledku zvýšeného času, ktorý molekuly vody strávia v blízkosti paramagnetického kovu.

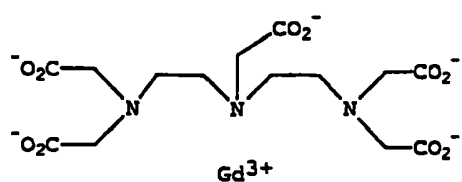
Keď sa spôsob podľa predloženého vynálezu použije na monitorovanie termálnej ablačnej terapie, je výhodné ako IEM použiť cheláty so stredne rýchlou výmenou vody, aby sa maximalizoval kontrast medzi začiatočným natívnym alebo živým stavom tkaniva ($R_{1zaciatočny}$) a denaturovaným alebo nekrotickým stavom tkaniva (R_{1druhy}). Na terapiu využívajúcu kryogénnu techniku je výhodne použiť cheláty s veľmi rýchlou výmenou vody, aby sa využila selektívna výhoda zvýšenia $1/T_1$ (R_1), keď sa zníži teplota. Pri všetkých spôsoboch intervenčnej terapie je výhodné, aby senzitivita profilu R_1 vzhľadom na stav tkaniva presne sledovala denaturačný profil sledovaného tkaniva alebo jeho zložky.

Okrem zvýšenia hodnôt $1/T_1$ alebo $1/T_2$ jadier v tkanive prostredníctvom interakcií dipól-dipól, činidlá MRI môžu ovplyvniť dve ďalšie magnetické vlastnosti, a byť tak klinicky využiteľné: 1) Častice železa alebo chelát kovu s vysokou magnetickou citlivosťou, zvlášť cheláty Dy, Gd alebo Ho, môžu zmeniť intenzitu signálu MRI tkaniva tým, že vytvoria mikroskopické gradienty magnetickej citlivosti (A. Villringer et al., Magn. Reson. Med. 6, pp. 164 - 174, 1998). Pri tejto aplikácii nie sú potrebné žiadne voľné koordinačné miesta chelátu. 2) Častice železa alebo chelát kovu sa môžu použiť tiež na posun rezonančnej frekvencie protónov vody alebo iných jadier využitých na zobrazenie alebo spektroskopiu, vrátane protónov P-31, C-13, Na-23 alebo F-19 na injikovanom činidle alebo zložke tkaniva, na ktorú sa viažu. V tomto prípade je možné využiť, v závislosti od jadra a použitej stratégie, žiadne až tri voľné koordinačné miesta.

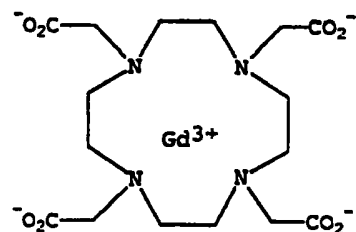
Organické chelatujúce ligandy musia byť fyziologicky kompatibilné. Molekulárna veľkosť chelatujúceho ligandu musí byť kompatibilná s veľkosťou paramagnetického kovu. Tak Gd(III) majúci kryštálový iónový polomer 0,938 Å, vyžaduje väčší che-

latujúci ligand ako Fe(III) , ktoré má kryštálový iónový polomer 0,64 Å.

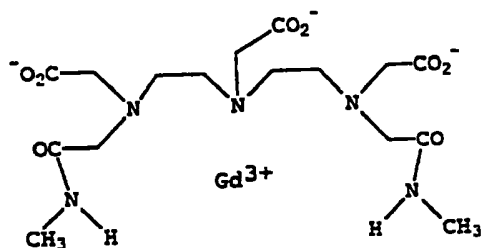
V odbore je známych veľa chelatujúcich ligandov pre MRI činidlá. Tie sa môžu použiť pre cheláty kovov pre ostatné formy biologického zobrazovania. K výhodným IEM patria nasledujúce:



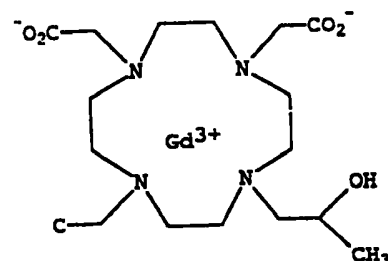
Magnevist
gadopentetate dimeglumine
DTPA



Dotarem
gadoterate meglumine
DOTA



Omniscan
gadodiamide
DTPA-BMA



ProHance
gadoteridol
HP-DO3A

V odbore je známe, že pri určitých aplikáciách je možné nahradiť Gd^{3+} inými kovmi.

2. Skupina viažuca sa na tkanivo v závislosti od jeho stavu (SDTBM)

Druhou doménou kontrastného činidla použitého podľa predloženého vynálezu je skupina viažuca sa na tkanivo v závislosti od jeho stavu (SDTBM), ktorá činidlu poskytuje zameriavaciu funkciu. SDTBM je vysoko variabilná a závislá od požadovanej aplikácie. Takže špecifická štruktúra SDTBM je

závislá od špecifického tkaniva alebo zložky tkaniva, na ktoré sa má viazať. Všeobecne SDTMB musí vybaviť kontrastné činidlo od stavu závislou zmenou väzbovej afinity k cieľovému tkanivu alebo zložke tkaniva. Od stavu závislá zmena väzbovej afinity musí tiež viesť k detekovateľnej zmene v signálnych charakteristikách kontrastného činidla. Zmena vo väzbovej afinite musí byť dostatočne citlivá a množstvo väzbových miest dostatočne veľké, aby sa vytvoril kontrast, keď dôjde k zmene stavov.

SDTBM môže obsahovať malú molekulu alebo alternatívne biomolekulu. Biomolekuly sa môžu odlišovať čo do molekulovej hmotnosti a veľkosti, ale všetky majú základnú vlastnosť, a síce, že sú biologicky odvodené alebo syntetizované z prirodzene sa vyskytujúcich podjednotiek (to znamená aminokyselín alebo nukleotidov). K príkladom biomolekúl patria receptory ligandov, sacharidy, lipidy, hormóny, peptidy, proteíny, nukleotidy a nukleové kyseliny (DNA, RNA) a protilátky vrátane fragmentov protilátok a ich monoklonálnych verzií alebo verzií upravených metódami génového inžinierstva.

Malé molekuly sú známe synteticky pripravené organické molekuly s relatívne nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré sú chemicky len málo podobné a alebo nie sú vôbec podobné biomolekulám. Malé molekuly väčšinou typicky neobsahujú podjednotky biomolekúl a väzby (napríklad prirodzené aminokyseliny spojené amidovými väzbami). K príkladom malých molekúl patria syntetické liečivá, lipofilné alebo amfifilné organické molekuly a porfyríny.

K výhodnejším SDTBM patria tie, ktoré sa reverzibilne viažu na plazmatické proteíny, proteíny v intersticiálnom priestore (tekutina medzi bunkami) alebo v medzibunkovom priestore. Aj keď sa môže použiť akákoľvek biomolekula alebo malá molekula, ktorá sa viaže na proteín, najužitočnejšie sú také, ktoré sa viažu na proteíny, ktoré sa vyskytujú buď vo vysokých koncentráciách, alebo majú vysoký počet väzbových miest pre určité ligandy. Nakoľko natívny stav mnohých proteínov v tkanivách, plazme, intersticiálnom alebo intracelulárnom

priestore je obvykle lepšie štruktúrne a chemicky definovaný ako v stave denaturovanom alebo rozloženom, je výhodným aspektom predloženého vynálezu navrhnúť SDTBM, ktorá sa viaže s vyššou afinitou k takým natívnym stavom, ako k zodpovedajúcim denaturovaným stavom. Tento rozdiel vo väzbovej afinite medzi natívnym a denaturovaným stavom vedie k detekovateľnej zmene v signálnych charakteristikách činidla.

Kvantitatívne meranie schopnosti kontrastného činidla relaxovať protóny vody a teda ovplyvňovať zobrazenie MRI poskytuje relaxivita. Ako už bolo opísané, relaxivita je závislosť intenzity signálu protónov vody od koncentrácie paramagnetického iónu kovu v roztoku. Relaxivita je definovaná ako indukovaná T_1 alebo T_2 relaxácia na jednotku času (R_1 alebo R_2 jednotkách $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) pozorovaná pre kontrastné činidlo, keď je koncentrácia činidla vyjadrená ako milimolárna (mM).

Fyzikálne vlastnosti gadolíniového komplexu ovplyvňujú relaxivitu kontrastného činidla. Počet molekúl vody viazaných ku gadolíniovému komplexu, rýchlosť výmeny molekúl vody s okolitým roztokom, relaxačný čas siedmich nespárovaných elektrónov a rotačný čas (známy ako rotačný korelačný čas) kontrastného činidla v roztoku, prispievajú k celkovej pozorovanej relaxivite. Zmeny týchto fyzikálnych vlastností môžu dramaticky zmeniť relaxivitu. Účinok rýchlosti výmeny vody na relaxivitu sa už rozoberal skôr. Okrem toho väzba malých chelátov gadolína s relatívne nízkou molekulovou hmotnosťou chelátu k veľkým makromolekulám spomaľuje rotačný čas a zvyšuje relaxačné zosilnenie 3 až 10x. Väzba kontrastného činidla na proteín spôsobuje, že magnetické fluktuácie medzi paramagnetickým iónom a protónmi vody sa vyskytujú v rovnakom časovom meradle ako Larmorova frekvencia, čo generuje najúčinnnejšiu možnú pozdĺžnu (T_1) relaxáciu a najvyššiu možnú relaxivitu. Takže od stavu závislá väzba MRI kontrastného činidla k veľkým makromolekulám, ako sú proteíny, je účinnou cestou ako zvýšiť signál MRI (a kontrast) jedného stavu proti druhému. Zobrazovací kontrast je vytváraný medzi oblasťami, ktoré prejavujú

rôznu hladinu väzby kontrastného činidla. Vo výhodnom aspekte vynálezu je zobrazovací kontrast vytváraný medzi oblasťami s vysokou väzbovou afinitou (natívny stav) a nízkou väzbovou afinitou (denaturovaný stav).

Na vytvorenie kontrastu medzi tkanivami alebo zložkami tkaniva rôzneho stavu, je potrebné, aby zmena väzbovej afinity kontrastného činidla pri zmene stavu tkaniva bola aspoň 20 % alebo viac. Tak napríklad, keď je činidlo na 90 % naviazané (to znamená 10 % je voľných) na živý stav cieľového tkaniva alebo jeho zložku (to znamená HSA), činidlo by sa za rovnakých podmienok malo viazať na 72 % alebo menej na neživý (to znamená denaturovaný) stav. Väčší kontrast sa vytvorí, ak rozdiel vo väzbovej afinite bude vyšší. Je teda žiaduce, aby väzbová afinita kontrastného činidla pre druhý stav tkaniva (ktorý vzniká v dôsledku intervenčnej terapie v jej priebehu alebo po nej) bola 80 % alebo menej z väzbovej afinity k prvému stavu tkaniva, výhodne 50 % alebo menej a najvýhodnejšie 10 % alebo menej.

V prípade, keď IEM je vhodný chromofor na použitie pri optickom zobrazovaní, vynález vyžaduje, aby existoval merateľný rozdiel medzi optickými vlastnosťami liečiva nenaviazaného na tkanivo a kontrastného činidla naviazaného na tkanivo. Tak napríklad maximálna absorbanca indokyanínovej zelene sa posúva zo 770 až 780 nm na 790 až 805 nm po naviazaní na plazmu alebo krv. Táto, na stave závislá väzba, sa môže využiť na detekciu tkanivovej denaturácie monitorovaním posunu absorbancie farbiva, keď sa tkanivo denaturuje a proteíny sa už ďalej neviažu. Odborník ocení, že optické činidlá užitočné v predložennom vynáleze majú všeobecne tendenciu poskytovať vyššiu citlivosť k stavu tkaniva. Preto na vytvorenie dostatočného kontrastu optické činidlo nevyžaduje tak veľký rozdiel vo väzbovej afinite alebo tak veľký rozdiel v signále pre dva stavy tkaniva ako činidla pre MRI podľa vynálezu.

Väzba závislá od stavu musí viesť k zmenám signálnych charakteristík kontrastného činidla. Pri MRI sa tieto zmeny

vlastností signálu prejavia ako zmeny indukovaných relaxačných rýchlostí ($1/T_1$ alebo $1/T_2$) protónov vody alebo relaxív R_1 a R_2 . Podľa výhodného aspektu predloženého vynálezu relaxivita činidla v druhom stave tkaniva (R_{1druhy}) je 80 % alebo menej relaxivity ($R_{1zaciatočne}$) činidla v začiatočnom stave tkaniva. Výhodne je R_{1druhy} 50 % alebo menej hodnoty $R_{1zaciatočne}$, výhodnejšie 20 % alebo menej a najvýhodnejšie 10 % alebo menej.

Je tiež výhodné, aby po tom, ako sa skončí intervenčná terapia a cieľové tkanivo sa vráti do fyziologických podmienok (napríklad v prípade termálnej denaturácie po tom, ako sa teplota zníži na fyziologickú teplotu) relaxivita R_1 činidla bola stále nižšia ako relaxivita činidla v začiatočnom stave tkaniva ($R_{1zaciatočna}$), výhodne 80 % ($R_{1zaciatočna}$) alebo nižšia, výhodnejšie 50 % alebo nižšia, ešte výhodnejšie 20 % alebo nižšia a najvýhodnejšie 10 % ($R_{1zaciatočna}$) alebo nižšia). Je tiež žiaduce, aby sa relaxivita kontrastného činidla, po tom, ako je intervenčná terapia skončená a cieľové tkanivo sa vrátilo do fyziologického stavu, udržala na relaxivite činidla meranej bezprostredne po tom, ako je intervenčná terapia skončená.

Ako sa uviedlo skôr, špecifická štruktúra SDTBM bude závisieť od špecifického tkaniva alebo zložky tkaniva, na ktoré sa má viazať. Teda je nevyhnutné najskôr stanoviť, ktoré tkanivo alebo jeho zložku je potrebné zamerať.

Je možné uvažovať o celom rade väzbových miest. K takým väzbovým miestam patria nukleové kyseliny, glykozaminoglykány (skôr známe ako kyslé mukopolysacharidy), kalcifikované tkanivo, kosť, tuk, synoviálna tekutina, bunkové membrány, proteíny, lipoproteíny, enzýmy, proteoglykány, amyloidy a ceroidy. Výhodné väzbové miesta poskytujú proteíny, pričom najvýhodnejšie sú proteíny séra a štruktúrne/spojivé proteíny.

Keď je cieľom proteín, potom k vhodným proteínom patria ľudský sérový albumín (HSA, 0,7 mM v plazme, nižšia koncentrá-

cia v intersticiálnom priestore), proteín viažuci mastné kyseliny. (FABP, známy tiež ako Z-proteín alebo proteín A, asi 0,1 mM v primárnych bunkách pečene, ľadvinách, srdci a iných tkanivách), glutathion-S-transferáza (GST, známa tiež ako ligandin, asi 0,1 mM v primárnych bunkách pečene, ľadvinách, srdci a iných tkanivách), α -1-kyslý glykoproteín (AAG, m.h. 41000, 0,55 až 1,4 g/l) a tiež lipoproteíny (napríklad také, ktoré sa koncentrujú v aterosklerotických plátoch). K ďalším príkladom patria štrukturálne proteíny medzibunkovej hmoty (kolagény, laminín, elastín, fibronektín, entaktín, vitronektín), amyloid (vrátane β -2-amyloidového proteínu (A4) pri Alzheimerovej chorobe), ceroid (alebo lipofuscín) a glykoproteíny (napríklad osteonektín, tenascín a trombospodín).

Výhodným proteínovým cieľom pre pozitívne nabité kontrastné činidlá alebo kontrastné činidlá obsahujúce zásadité SDTBM je α -1-kyslý glykoproteín (AAG). Plazmatické hladiny tohto pozitívneho proteínu akútnej fázy sa významne líšia v závislosti od stavu ochorenia. Napríklad koncentrácia AAG sa zvyšuje dvakrát až štyrikrát v dôsledku zápalového podnetu a plazmatická hladina AAG sa navrhla ako prognostická pomôcka pre glióm, metastázy karcinómu prsníka aj iných, neonatálna infekcia a chronické bolesti. Zvýšené hladiny sa pozorovali pri ateroskleróze, Crohnovej chorobe, infarkte myokardu, nefritíde a bakteriálnych, vírusových alebo postoperačných infekciách. Vysoko rozpustný AAG má jediný polypeptidový reťazec veľkosti 183 aminokyselín a charakterizuje ho niekoľko neobvyklých vlastností, vrátane vysokého obsahu sacharidov a sialovej kyseliny (45 % a 12 %, v uvedenom poradí) a nízkeho izoelektrického bodu pH 2,7. α -1-glykoproteín sa zúčastňuje väzby mnohých liečiv, ako je napríklad propranolol ($K_a = 11,3 \times 10^5$), imipramín ($K_a = 2,4 \times 10^5$) a chlórpromazín ($K_a = 35,4 \times 10^5$). Percento voľného lidokaínu korelovalo s koncentráciou AAG u pacientov (0,4 až 3 g/l), čo znamenalo, že je možné dosiahnuť selektívnu väzbu k AAG v porovnaní s inými proteínmi v plazme (napríklad HSA) pri použití metód racionálneho návrhu liečiv.

Ligandy pre HSA, FABP a GST sú výhodnejšie SDTBM, lebo sú to negatívne nabité molekuly alebo majú tendenciu byť neutrálne s čiastkovými negatívne nabitými skupinami (napríklad ester, amid alebo karbonylový kyslík ketónu), také zlúčeniny sú všeobecne považované za menej toxické ako pozitívne nabité molekuly. Z týchto troch proteínov je v niektorých prípadoch najvýhodnejší HSA, lebo ligandy pre FABP a GST vyžadujú určitý intracelulárny príjem pred naviazaním. Všeobecne sa pri kontrastných činidlách intracelulárnemu príjmu bráni (s výnimkou pečene), aby sa minimalizovala toxicita. HSA je prítomný v podstatných množstvách vo viacerých extracelulárnych tekutinách vrátane plazmy, intersticiálneho priestoru v normálnom aj rakovinovom tkanive, synoviálnej tekutine, cerebrospinálnom moku a tiež v infiltráte v zápale alebo abscese. Vo viacerých patologických tkanivách ako sú nádory, zápaly, aterosklerotické pláty alebo stený aterosklerotických artérií, presakujú kapiláry, čo vedie k ešte vyšším hladinám HSA. To môže zvýšiť užitočnosť činidla podľa predloženého vynálezu, lebo veľký počet intervenčných terapií sa zameriava na takéto choré tkanivá.

HSA je výhodný tiež preto, že je známy dobrou afinitou a vysokou väzbovou kapacitou pre široké spektrum štruktúrne nie podobných molekúl, a to obvykle vo veľkom počte väzbových miest. Teda pri návrhu kontrastného činidla existuje značná flexibilita.

Pre väzbu k natívnemu stavu HSA je ako SDTBM užitočný celý rad hydrofóbných alebo amfifilných látok (U. Kragh-Hansen, Pharm. rev. 33, pp. 17-53, 1981, X.M. He et al., Nature 358, 209-215, 1992, D.C.Carter, Adv. Protein. Chem. 45, 153-203, 1994). Patria k nim, bez toho aby tento výpočet bol obmedzujúci, malé molekuly obsahujúce aspoň jednu alifatickú skupinu, alkoxyskupinu, alkyltioskupinu, alkylkarbonylovú skupinu, alkylkarbonyloxyskupinu, aryllovú alebo heterocyklickú skupinu s 1 až 60 atómami uhlíka a prípadne obsahujúce jeden alebo niekoľko atómov dusíka, kyslíka, síry, halogénových prvkov, alifatických amidov, estersulfónamidov alebo acylových, sulfo-

nátových, fosfátových, hydroxylových skupín alebo organokovových substituentov. Alternatívne, ale menej výhodne, SDTBM môže byť biomolekula ako je peptid obsahujúci hydrofóbne aminokyselinové zvyšky a/alebo substituenty buď s alebo bez hydrofóbných alebo hydrofilných koncových skupín.

Ako sa skôr uviedlo, pre väzbu k HSA existuje celý rad hydrofóbných zlúčenín vhodných ako SDTBM. Všeobecne väzbová afinita k HSA a prípadne iným proteínom rastie so zväčšujúcou sa hydrofobicitou SDTBM. Teoretické stanovenie hydrofobicity substituentov ako je SDTBM je možné získať výpočtom príspevku k log oktanol-voda (alebo oktanol-pufor) rozdeľovacieho koeficienta (logP) pre samotné TBM použitím Hansovej 1 konštanty pre substituenty (pozri A. Leo a C. Hansch, Partition Coefficients and Their Uses, Chemical Reviews 71, E525-616, 1971, K.C.Chu, The Quantitative Analysis of Structure-Activity Relationships, Burger's Medicinal Chemistry, Part 1, s. 393-418, 4th ed., 1980). Väzbová afinita bude narastať so zvyšujúcim sa príspevkom k logP. Napríklad pre substituenty na alifatických skupinách sa použijú nasledujúce 1 konštanty:

skupina	1-alifatická
CH ₃	0,50
fenylová	2,15

Pre substituenty na arylových skupinách sa použijú nasledujúce 1 konštanty:

skupina	1-alifatická
CH ₃	0,56
CH ₂ CH ₃	1,02
fenylová	1,96

Takže príspevok logP pre p-metylbenzylovú skupinu naviazanú na IEM sa vypočíta nasledovne (použitím hodnoty 1-alifatická pre CH₃ ako odhad pre skupinu -CH₂-):

príspevok $\log P = 0,50 + 2,15 + 0,56 = 3,2$.

Pri väzbe na HSA je potrebný minimálny príspevok $\log P$ v hodnote 2 (ekvivalent 4 skupín CH_3 alebo jedného fenylového kruhu), aby sa dosiahla významná väzba. Výhodnejší je príspevok $\log P$ 3 a ešte výhodnejšia je hodnota $\log P$ 4.

Väzba na HSA sa môže vyhodnotiť pomocou rovnovážnej dialýzy alebo ultrafiltrácie použitím 4,5 % HSA (hmotn./objem) v pufrí s pH 7,4. Výhodne aspoň 10 %, výhodnejšie aspoň 50 %, ešte výhodnejšie aspoň 80 % a najvýhodnejšie aspoň 95 % kontrastného činidla sa viaže na natívny stav HSA vo fyziologicky relevantných koncentráciách (0,01 až 10 mM v plazme pre MRI a optické zobrazovanie). Pri tomto spôsobe merania percenta naviazaného kontrastného činidla na HSA je s chybou ± 5 %. Väzba proteínu na iné proteíny alebo v sére sa môže hodnotiť podobným spôsobom.

Pripojenie lipofilných skupín ku kontrastnému činidlu pravdepodobne zníži rozpustnosť činidla. Aby sa udržala účinná rozpustnosť kontrastného činidla v klinicky účinnej dávke alebo vyššej, je výhodne vniesť do SDTBM jednu alebo niekoľko skupín viažucich vodík (kyslík, dusíky a pod.).

Čisto alifatické skupiny sa môžu použiť ako SDTBM, ale nie sú tak výhodné ako zmiešané alifaticko-arylové skupiny alebo čisto arylové skupiny. Zvlášť keď je pripojený negatívny náboj k čisto alifatickým skupinám, najmä k dlhým a flexibilným, kontrastné činidlo potom môže interferovať s metabolizmom endogénnych molekúl ako sú mastné kyseliny alebo s interakciami medzi membránovými proteínmi a lipidmi. To môže zvyšovať toxicitu činidla. Je teda výhodné, keď SDTBM obsahuje aspoň jeden arylový kruh.

V prípade činidla pre MRI viažuceho sa na natívny stav HSA na zvýraznenie nádoru alebo tkaniva, je zvlášť výhodné, aby kontrastné činidlo obsahovalo dve alebo viac odlišných lipofilných skupín na úplnú imobilizáciu činidla po naviazaní

na proteín. Tieto skupiny môžu byť na jednom SDTBM, alebo ako dve alebo aj viac oddelených chemických skupín naviazaných na kontrastné činidlo. Vzhľadom na ich rozmernosť a rigiditu je výhodné, keď dve alebo viac skupín, každá obsahuje aromatický kruh s dvoma alebo viacerými kruhmi v celej molekule usporiadanými v rigidnej, priestorovej (nie rovinnej) orientácii.

Magnetická účinnosť alebo relaxivita činidla pre MRI je všeobecne vyššia, keď má činidlo rotačný korelačný čas približne rovnaký s HSA (R.B. Laufer, Chemical Reviews, 87, 901-927, 1987). Zatiaľ čo malá molekula ako je napríklad Gd-DTPA má rotačný korelačný čas 0,1 nanosekúnd (ns), HSA má rotačný korelačný čas dlhší ako 5 až 10 ns, ak má taký dlhý korelačný čas chelát, magnetické fluktuácie medzi paramagnetickým iónom a protónom vody sa objavujú v rovnakom časovom meradle ako je Larmorova frekvencia a vytvárajú najúčinnnejšiu longitudinálnu (T_1) relaxáciu, aká je možná a teda najvyššiu možnú relaxivitu. Akákoľvek flexibilita chelátu, keď je naviazaný na proteín, podľa očakávania znižuje účinný čas rotačnej korelácie a teda znižuje relaxivitu. Nakoľko jedna strana spojenia s proteínom stále môže poskytovať flexibilitu v niekoľkých smeroch, sú výhodné ďalšie miesta na naviazanie.

Ako už bolo uvedené, väzba závislá od stavu musí tiež viesť k zmenám charakteristík signálu kontrastného činidla. Pri MRI sa táto zmena signálu závislá od stavu prejavuje zmenou indukovanej rýchlosti ($1/T_1$ alebo $1/T_2$) protónov vody alebo relaxív R_1 a R_2 . Takže pokiaľ je cieľom HSA stupeň, v akom sa činidlo vyladilo na maximálnu relaxivitu, môže sa vyhodnotiť meraním od stavu závislej viazanej relaxivity ($R_{1\text{viazana}}$) v prítomnosti HSA v jeho dvoch fyziologických stavoch: natívnom a denaturovanom. Podľa výhodného aspektu predloženého vynálezu je žiaduce, aby relaxivita činidla v druhom stave tkaniva ($R_{1\text{druhy}}$) bola 80 % alebo menej z relaxivity ($R_{1\text{zaciatočne}}$) činidla v začiatočnom stave tkaniva. Výhodne je $R_{1\text{druhy}}$ 50 % alebo menej z $R_{1\text{zaciatočne}}$, výhodnejšie 20 % alebo menej a najvýhodnejšie 10 % alebo menej.

Vyžaduje to meranie relaxivity voľného chelátu (R_1 -volny) a tiež relaxivity (R_1 pozorovana) a percenta väzby činidla v 4, 5 % HSA v oboch jeho fyziologických stavoch. Vo výhodnom aspekte predloženého vynálezu R_1 -volny zodpovedá hodnote R_1 -pozorovany v denaturovanom stave. R_1 -pozorovany je priemer R_1 -volny a R_1 -viazany vážený molárnym zlomkom:

$$R_1\text{-pozorovany} = (\text{zlomok_volny} * R_1\text{-volny}) + \\ + (\text{zlomok_viazany} * R_1\text{-viazany})$$

čiže

$$R_1\text{-viazany} = (R_1\text{-pozorovany} - (\text{zlomok_volny} * R_1\text{-volny})) / \\ / \text{zlomok_volny}$$

Väzba na HA závislá od stavu

Ako sa skôr uviedlo, výhodným cieľovým proteínom, ktorý sa môže využiť pre kontrastné činidlá podľa predloženého vynálezu, je HSA. Pre také aplikácie je žiaduce, aby kontrastné činidlo vykazovalo zvýšený polčas v krvi, aby sa zvýšil čas, počas ktorého činidlo zostáva v krvi (to znamená naviazané na HSA) a je dostupné v priebehu intervenčnej terapie. Predĺžený polčas v krvi je možné dosiahnuť vložením spájacej skupiny (L), ktorá účinkuje ako "skupina predlžujúca polčas v krvi" (BHEM), ktorá znižuje rýchlosť príjmu kontrastného činidla hepatocytmi (pozri patentová prihláška US 08/382 317, podaná 1. februára 1995, na ktorú sa odkazuje). Skupiny BHEM sú mimoriadne hydrofilné skupiny, ktoré vytvárajú vodíkové väzby s vodou. Prítomnosť hydrofilných BHEM na kontrastnom činidle znižuje príjem tohto činidla hepatocytmi.

K príkladom chemických skupín, ktoré môžu slúžiť ako BHEM, patria atómy uhlíka, fosforu, wolfrámu, molybdénu alebo síry majúce naviazané nabité alebo neutrálne heteroatómy ako kyslík, dusík, síru alebo halogénové prvky (najmä fluór), ktoré majú dva alebo viac voľných elektrónových párov (to znamená plný alebo čiastočný negatívny náboj) alebo elektropozi-

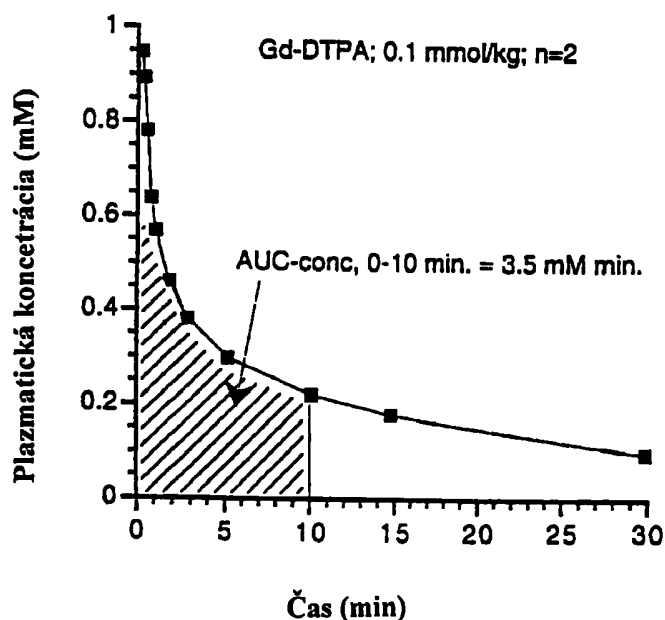
tívne atómy vodíka (to znamená protónovaný amín) pre vodíkové mostíky s vodou. Patria sem skupiny ako je skupina sulfónová, éterová, močovinová, tiomočovinová, amínsulfónamidová, karbamátová, peptidová, esterová, karbonátová a acetálové skupiny. K výhodným skupinám patria také, ktoré majú jeden alebo niekoľko čiastočných alebo úplných negatívnych nábojov vo vodnom roztoku pri fyziologickom pH, keď negatívne nabité atómy nemôžu byť čiastočne alebo celkom neutralizované kovalentnou alebo koordinačne kovalentnou väzbou na IEM. K príkladom takýchto výhodných skupín BHEM patria negatívne nabité skupiny ako fosfátmonoesterová, fosfátdiesterová, karboxylátová a sulfonátová skupina. Výhodnejšie sú také skupiny, ktoré majú fosfátové skupiny alebo akékoľvek ich esterové formy. Ešte výhodnejšie sú fosfátdiesterové skupiny, lebo a) sú vysoko hydrofilné s kyslíkmi so štyrmi vodíkovými mostíkmi, b) relatívne ľahko sa syntetizujú pomocou v odbore známych techník, c) slúžia ako vynikajúce spájacie skupiny medzi IEM a SDTBM a d) pretože fosfátové zlúčeniny existujú a sú prirodzene metabolizované v organizme, je možné očakávať, že kontrastné činidlo obsahujúce fosfátdiestery nebude toxické.

Vloženie BHEM do kontrastného činidla podľa predloženého vynálezu vedie k predĺženiu retencie činidla v krvi. Retencia v krvi sa výhodne určuje tak, že sa na základe farmakokinetického experimentu s plazmou potkana vypočíta plocha pod krivkou závislosti koncentrácie v plazme na čase (plocha pod krivkou, AUC-konc.) pre špecifické časové obdobie (napríklad 0 až 10 minút, 0 až 30 minút, 0 až 60 minút, 0 až 120 minút, 0 až nekonečno). Retencia v krvi (meraná ako AUC-konc.) sa môže vyhodnotiť experimentálne podávaním kontrastného činidla potkanom, králikom alebo vyšším cicavcom. Pozorovalo sa, že polčas v krvi je väčší u králikov a vyšších cicavcov ako u potkanov. V tejto prihláške sú uvedené dáta z experimentov meraní polčasu v krvi ako AUC-konc. u potkanov. Chyba týchto dát je asi +/-10 %.

Dôvod, prečo nie je použité priamo samotné meranie polčasu je ten, že matematická definícia tejto kvantity je často

nejasná a výsledné stanovenia sú často rôzne v závislosti od použitého farmakokinetického modelu a časových intervalov, v ktorých sa získali vzorky krvi.

Napríklad priemerná plazmatická koncentrácia pozorovaná po injekcii dávky 0,1 mmol/kg Gd-DTPA značeného pomocou Gd¹⁵³ do žily chvostu u dvoch potkanov je ukázaná na obrázku uvedenom ďalej. Pomocou programového vybavenia KaleidaGraph pre počítače Macintosh sa vypočítala hodnota AUC-konc. pre 0 až 10 minút na 3,5 mM min..



Kontrastné činidlo podľa predloženého vynálezu, užitočné v zameraní na sérové proteíny, ako je napríklad HSA, vykazuje zvýšenie hodnoty AUC-konc. najmenej o 20 % keď sa pridá BHEM k IEM a SDTBM. Výhodne vykazujú zvýšenie hodnoty AUC-konc. najmenej o 40 %, výhodnejšie o 70 % a najvýhodnejšie o 100 %. Všeobecne je zvýšenie AUC-konc. spôsobené BHEM vyššie, keď je významná väzba na plazmu, napríklad 20 až 50 % alebo vyššia. Vypočítané percentuálne zvýšenie AUC-konc. môže byť rôzne na stanovenie AUC-konc. pre rôzne dlhý čas. Všeobecne je percentuálne zvýšenie hodnoty AUC-konc. spôsobené BHEM vyšším na meranie AUC-konc. dlhší čas, napríklad 0 až 30 minút, ako na meranie 0 až 10 minút.

Pretože štruktúra a fyzikálne vlastnosti celej molekuly kontrastného činidla rozhodujú o jej väzbe v plazme, je dôležité vybrať také skupiny IEM a BHEM, ktoré sú kompatibilné s požadovanou väzbou. Tak napríklad, aby sa dosiahla väzba na pozitívne nabité väzbové miesta na HSA, je výhodné vybrať IEM a BHEM s čistým neutrálnym alebo čistým negatívnym nábojom, aby sa znížila možnosť, že dôjde k repulzii alebo dokonca zvýšeniu väzbovej afinity. Pre väzbu k α kyslému glykoproteínu by aspoň nejaká časť kontrastného činidla mala byť pozitívne nabitá. Pre väzbu na globulíny by aspoň nejaká časť kontrastného činidla mala byť steroidnej povahy. Pre naviazanie na lipoproteíny by aspoň nejaká časť kontrastného činidla mala byť lipofilná alebo podobná mastným kyselinám.

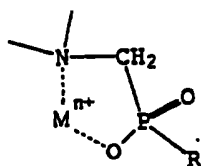
Je možné si predstaviť, že BHEM môžu byť usporiadané vo viacerých rôznych pozíciách vzhľadom k IEM a SDTBM. Avšak pozícia skupín by nemala byť taká, aby jedna skupina rušila myšlenú funkciu druhej. Tak napríklad v kontrastnom činidle viažucom sa na HSA umiestnenie skupiny BHEM nesmie blokovať schopnosť SDTBM viazať činidlo na HSA. Pretože hlavné väzbové miesta v HSA sú "ponožkovitého tvaru" (X.M.He et al., Nature 358, 209-215, 1992, D.C.Carter, Adv. Protein Chem. 45, 153-203, 1994, s hydrofóbnym vnútrojškom (zvlášť v blízkosti oblasti "prstov") a pozitívne nabitou oblasťou "členka", väzbová afinita SDTBM by sa znížila, ak by distálna časť SDTBM bola extrémne hydrofilná. Ako ilustratívny príklad je možné uviesť, ak SDTBM je fenylový kruh, najvýhodnejšou pozíciou BHEM na kruhu je orto a potom hneď meta, zatiaľ čo hydrofilná skupina v polohe para by redukovala väzbovú afinitu SDTBM k HSA.

Pre IEM, ktoré sú chelátmi kovov, je výhodné, keď skupiny BHEM a SDTBM nie sú pripojené k IEM, aby neredukovali silu väzby medzi kovovým iónom a chelatujúcim ligandom. Napríklad keď je chelatujúcou skupinou acetátová skupina, výhodné je, keď ani BHEM ani SDTBM nie sú naviazané na acetátový kyslík.

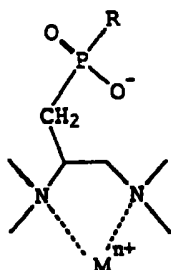
Ďalšou požiadavkou týkajúcou sa pozície je, aby negatívne

nabité atómy BHEM nemohli byť ani čiastočne ani celkom neutralizované kovalentnou alebo koordináčne kovalentnou väzbou na IEM, a to zabezpečuje, že vo vodnom systéme aj veľmi hydrofilné atómy BHEM sú silno solvatované. Napríklad keď je IEM chelát kovu, je dôležité umiestniť negatívne nabité atómy BHEM tak, aby nemohli byť neutralizované pozitívne nabitým iónom kovu (M^{n+}) z IEM koordináčne kovalentnou väzbou prostredníctvom vytvorenia chelátových kruhov s 5 alebo 6 členmi, čo sú najstabilnejšie veľkosti týchto kruhov. Pretože päťčlenné alebo šesťčlenné chelátové kruhy sú najstabilnejšie formy pre kovové ióny zaujímavé pre IEM (ako je napríklad gadolinium) je najdôležitejšie zabrániť ich vytvoreniu. Ako je vidieť na nasledujúcich obrázkoch, fosfinátová ($-PO_2-$) alebo fosfonátová ($-PO_3-$) BHEM nemôže byť naviazaná na atóm dusíka v aminokarboxylátovom chelatujúcom činidle prostredníctvom spojky $-CH_2-$, lebo by to viedlo k vytvoreniu veľmi stabilného päťčlenného chelátového kruhu. Podobne fosfodiesterová ($-OPO_3$) BHEM nemôže byť naviazaná na atóm dusíka v aminokarboxylátovom chelatujúcom činidle prostredníctvom spojky $-CH_2-$, lebo by to viedlo k vytvoreniu veľmi stabilného šesťčlenného chelátového kruhu. Avšak obidve tieto BHEM môžu byť naviazané na iné polohy, ako je napríklad etylénová kostra ligandu. V niektorých prípadoch, ako je vidieť, je výhodné zväčšiť dĺžku spájacej skupiny, aby bolo isté, že sa nemôže vytvoriť päťčlenný ani šesťčlenný kruh.

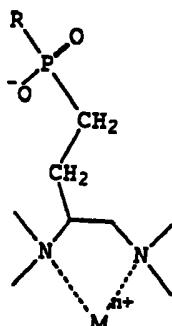
Fosfinátové BHEM



Veľmi nevýhodný
(päťčlenný chelátový kruh,
náboj neutralizovaný)

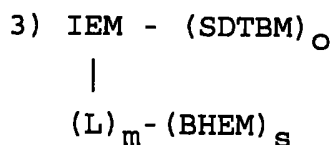
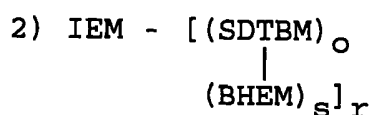
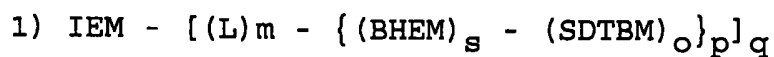


Nevýhodný
(šesťčlenný chelátový kruh,
náboj neutralizovaný)



Výhodnejší
(eliminovaná možnosť päťčlenného
alebo šesťčlenného chelátového
kruhu alebo neutralizácia náboja)

Je možné uvažovať, že skupiny podľa predloženého vynálezu môžu byť umiestnené v kontrastnom číidle tak, že vzniknú nasledujúce štruktúry:

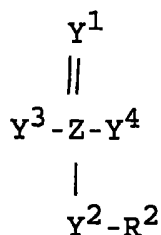


kde m je rovné 0 až 4,

s , o a p môžu byť rovnaké alebo rôzne a rovné 1 až 4, a

r a q sú rovné najmenej 1.

Keď sú skupiny podľa vynálezu umiestnené v kontrastnom číidle, ako je to v štruktúre 1) skôr uvedenej, BHEM je výhodne sulfónová, močovinová, tiomočovinová, amínová, sulfónamidová, karbamátová, peptidová, esterová, karbonátová, acetálová skupina a ešte výhodnejšie



alebo esterové formy, kde

$\text{Z} = \text{P}, \text{W}, \text{Mo}$ alebo S ,

$y^1, y^2 = O$ alebo S ,
 $y^3, y^4 = O$ alebo S alebo nie sú prítomné a
 $R^2 = H$, alkylová skupina s 1 až 6 atómami uhlíka alebo nie je prítomná.

Najvýhodnejšie BHEM je fosfátová skupina.

Ak sú skupiny podľa vynálezu umiestnené v kontrastnom čí-
 nidle podľa štruktúry 2) uvedenej skôr, BHEM je výhodne sulfó-
 nová, močovinová, tiomočovinová, amínová, sulfónamidová, kar-
 bamátová, peptidová, esterová, karbonátová, acetálová skupina
 a ešte výhodnejšie má BHEM nasledujúci vzorec



$Z = P, W$, alebo Mo ,
 $y^1, y^2 = O$ alebo S ,
 $y^3, y^4 = O$ alebo S alebo nie sú prítomné a
 $R^2 = H$, alkylová skupina s 1 až 6 atómami uhlíka alebo nie je prítomná.

Najvýhodnejšie BHEM je fosfátová skupina.

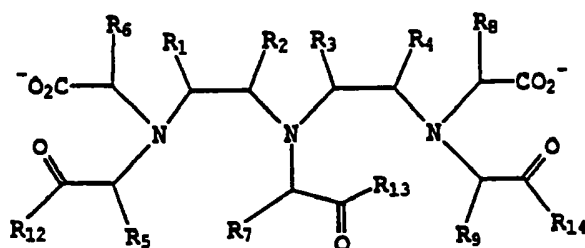
Ak skupiny podľa vynálezu sú umiestnené v kontrastnom čí-
 nidle podľa štruktúry 3) uvedenej skôr, BHEM je výhodne SO_3^-
 alebo esterové formy, sulfónová, močovinová, tiomočovinová,
 amínová, sulfónamidová, karbamátová, peptidová, esterová, kar-
 bonátová, acetálová skupina a ešte výhodnejšie



$Z = P, W, Mo$ alebo S ,
 $Y^1, Y^2 = O$ alebo S ,
 $Y^3, Y^4 = O$ alebo S alebo nie sú prítomné a
 $R^2 = H$, alkylová skupina s 1 až 6 atómami uhlíka alebo nie je prítomná.

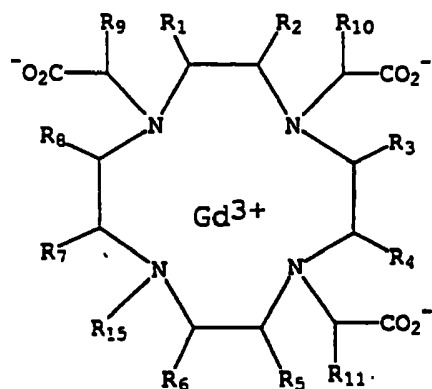
Najvýhodnejšie BHEM je fosfátová skupina.

Je možné uvažovať, že ak skupiny podľa vynálezu sú umiestnené v kontrastnom činidle ako v štruktúre 3) uvedenej skôr, výhodné kontrastné činidlá majú nasledujúci vzorec:



Gd^{3+}

alebo



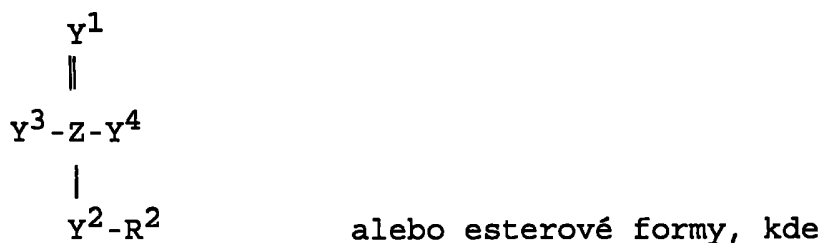
kde $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}, R^{11}$ a R^{16} môžu byť rovnaké alebo rôzne a sú vybrané zo skupiny obsahujúcej H , SDTBM, BHEM a alkylovú skupinu s 1 až 6 atómami uhlíka, s predpokladom, že aspoň jedna z týchto R skupín je SDTBM a aspoň jedna ďalšia skupina je BHEM,

R^{12}, R^{13} a R^{14} môžu byť rovnaké alebo rôzne a sú vybrané zo skupiny obsahujúcej O^- alebo $N(H)R^{17}$,

$R^{15} = H, CH_2CH(OH)CH_3$, hydroxyalkylová skupina alebo $CH(R^{16})COR^{12}$ a

$R^{17} = H$ alebo alkylová skupina s 1 až 6 atómami uhlíka.

Pre kontrastné činidlá obsahujúce skôr uvedené vzorce je BHEM výhodne sulfónová, éterová, močovínová, tiomočovínová, amínová, amidová, sulfónamidová, karbamátová, peptidová, esterová, karbonátová, acetálová skupina a ešte výhodnejšie COO^- alebo esterové formy, SO_3^- alebo esterové formy a



$Z = P, W, Mo$ alebo S ,

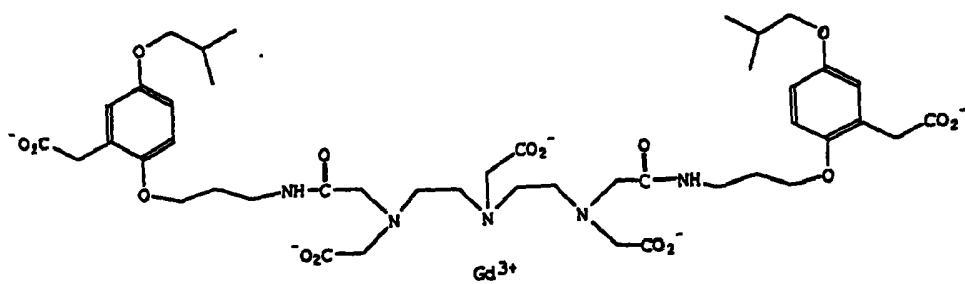
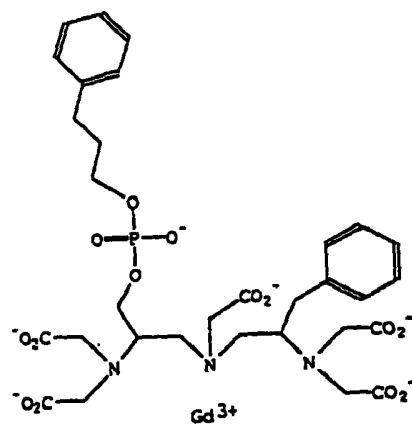
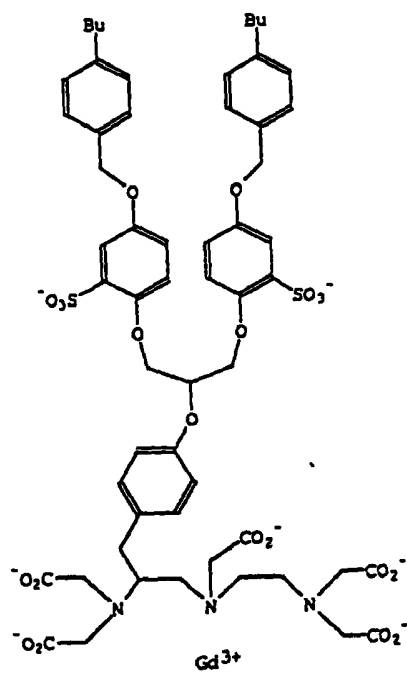
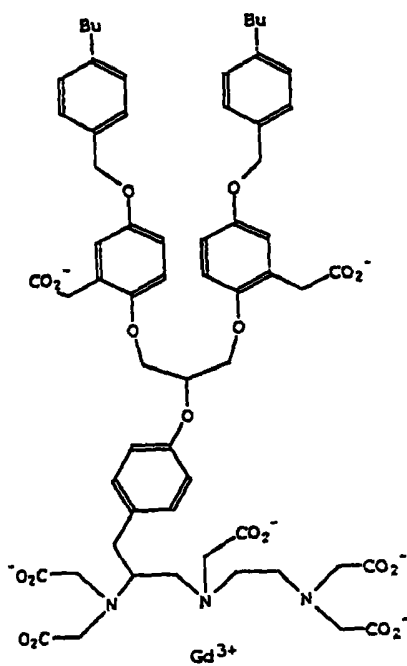
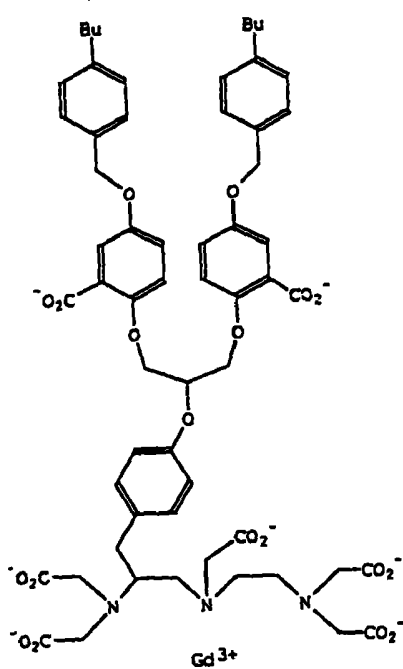
$Y^1, Y^2 = O$ alebo S ,

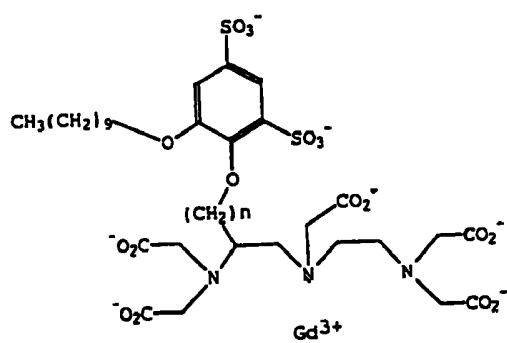
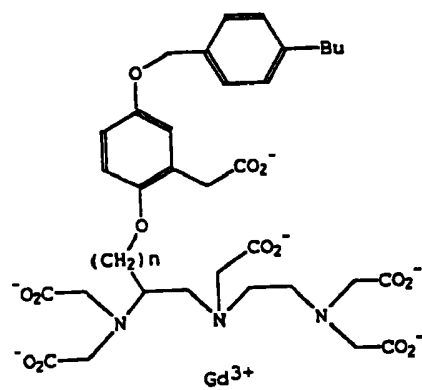
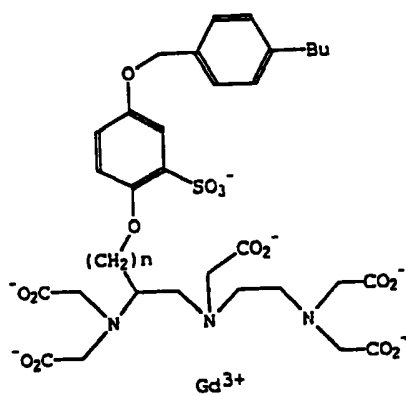
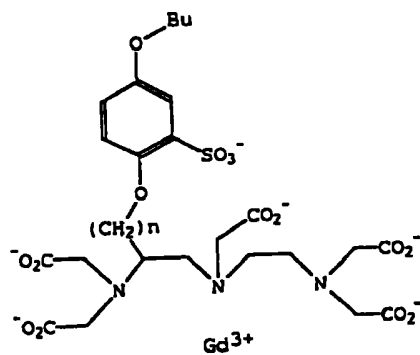
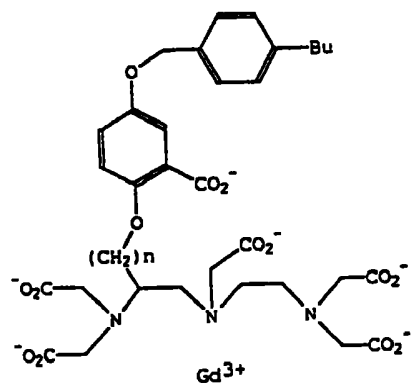
$Y^3, Y^4 = O$ alebo S alebo nie sú prítomné a

$R^2 = H$, alkylová skupina s 1 až 6 atómami uhlíka alebo nie je prítomná.

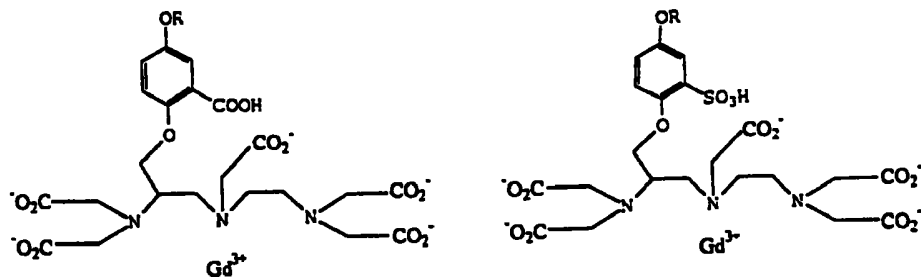
V prípade kontrastného činidla viažuceho sa na HSA môže byť BHEM umiestnená medzi IEM a SDTBM, ako je vidieť v štruktúre 1), alebo na IEM vzdialenej od SDTBM, ako je vidieť v štruktúre 3). Týmto spôsobom sa môže prejaviť plný väzbový potenciál hydrofóbných skupín SDTBM bez rušenia vplyvom hydrofilných skupín BHEM.

Kontrastné činidlá užitočné podľa predloženého vynálezu, ktoré prejavujú na stave závislú väzbu na HSA, sú uvedené v patentovej prihláške U.S. 08/382 317, podanej 1. februára 1995. Príklady užitočných činidiel sú uvedené ďalej:

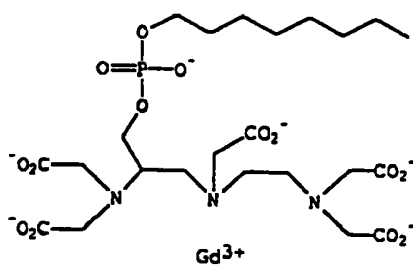




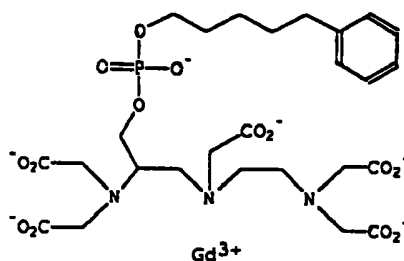
kde n je rovné 1 až 4



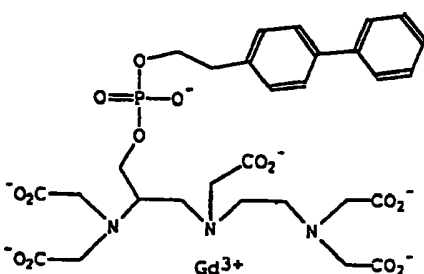
kde R obsahuje alifatickú skupinu a/alebo aspoň arylový kruh, alebo obsahuje peptid obsahujúci hydrofóbne aminokyselinové zvyšky a/alebo substituenty buď s alebo bez prítomnosti hydrofóbných alebo hydrofilných koncových skupín. Výhodné kontrastné činidlá podľa predloženého vynálezu sú nasledujúce:



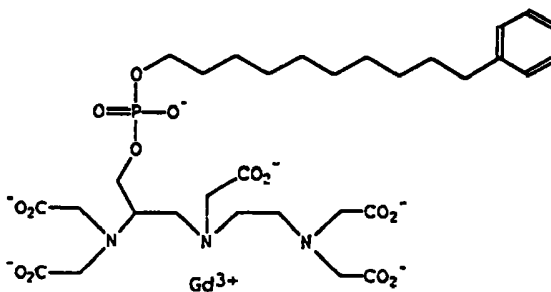
MS-315



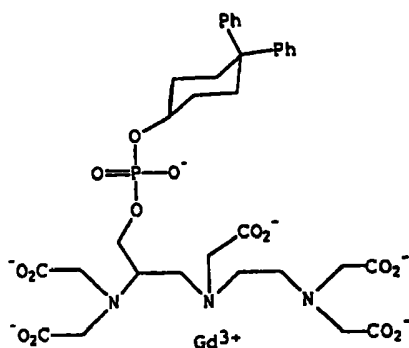
MS-317



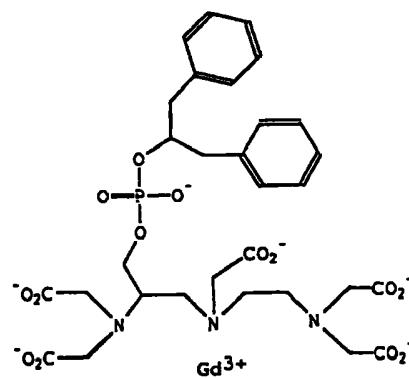
MS-322



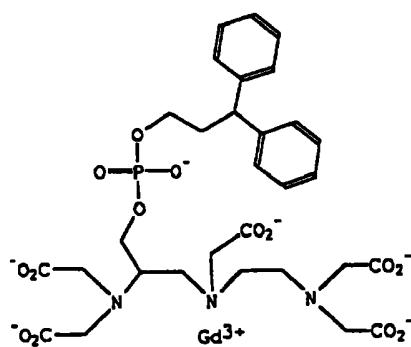
MS-323



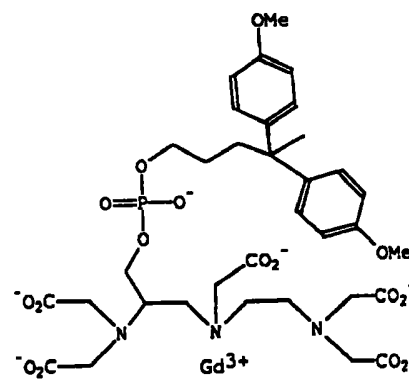
MS-325



MS-326



MS-327



MS-328

Výhodnejšie kontrastné činidlá s väzbou závislou na stave HSA sú MS-317, MS-322, MS-325 a MS-328. Najvýhodnejšie je MS-325.

Použitie kontrastných činidiel

Činidlá použité v tomto vynáleze sú definované tak, aby zahŕňali tiež svoje farmaceuticky prijateľné deriváty. Farmaceuticky prijateľný derivát znamená každú farmaceuticky prijateľnú soľ, ester, soľ esteru, alebo iný derivát zlúčeniny tohto vynálezu, ktorý je pri podávaní príjemcovi schopný poskytnúť (priamo alebo nepriamo) zlúčeninu tohto vynálezu alebo jej inhibične aktívny metabolit alebo zvyšok. Konkrétne výhodné sú tie, ktoré zvyšujú biologickú dostupnosť zlúčenín tohto vynálezu, keď sú tieto zlúčeniny podávané cicavcovi (napríklad tak, že umožnia, že perorálne podávaná zlúčenina je ľahšie absorbovaná do krvi) alebo ktoré zosilňujú podávanie základnej zlúčeniny do biologického kompartmentu (napríklad mozgu alebo lymfatického systému).

Je tiež zamýšľané, že činidlá použité v tomto vynáleze zahŕňajú farmaceuticky prijateľnú soľ. Farmaceuticky prijateľné soli tohto vynálezu zahŕňajú soli pochádzajúce z anorganických alebo organických kyselín a zásad. K takýmto kyslým soliam patria nasledujúce: acetát, adipát, alginát, aspartát, benzoát, benzénsulfonát, bisulfát, butyrát, citrát, gáfrat, gáforsulfonát, cyklopentánpropionát, diglukonát, dodecylsulfát, etánsulfonát, fumarát, glukohexanoát, glycerofosfát, hemisulfát, heptanoát, hexanoát, hydrochlorid, hydrobromid, hydrojodid, 2-hydroxyetánsulfonát, laktát, maleát, metánsulfonát, 2-naftalénsulfonát, nikotinát, oxalát, pamoát, pektinát, persulfát, 3-fenyl-propionát, pikrát, pivalát, propionát, sukcinát, tartrát, tiokyanát, tozylát a undekanoát. Zásadité soli zahŕňajú soli amónne, soli alkalických kovov, ako sú soli sodné a draselné, soli kovov alkalických zemín, ako sú soli vápenaté, horečnaté a zinočnaté, soli s organickými zásadami, ako sú soli dicyklohexylamínové, soli N-metyl-G-glukamínu a soli s aminokyselinami, ako sú arginín, lyzín atď.. Tiež zásadité skupiny obsahujúce dusík môžu byť kvarternizované takými činidlami, ako sú halogenidy nižších alkylových skupín, ako sú metyl-, etyl-, propyl- a butylchlorid, -bromidy a -jodidy, dialkylsulfáty, ako sú dimetyl-, dietyl-, dibutyl-

a diamylsulfáty, halogenidy s dlhým reťazcom, ako sú decyl-, lauryl-, myristyl- a stearylchloridy, -bromidy a -jodidy, aralkylové halogenidy, ako sú benzyl- a fenetylbromidy a ďalšie. Získajú sa tak produkty rozpustné vo vode alebo v oleji alebo produkty, ktoré je možné dispergovať. Výhodné soli tohto vynálezu sú soli N-metyl-D-glukamínu, vápenaté a sodné soli.

Farmaceutické prípravky tohto vynálezu zahŕňajú ktorýkoľvek z komplexov predloženého vynálezu alebo jeho farmaceuticky prijateľných solí, spolu s akýmkoľvek farmaceuticky prijateľným nosičom, adjuvans alebo vehikulom. Farmaceuticky prijateľné nosiče, adjuvans a vehikulá, ktoré môžu byť použité vo farmaceutických prípravkoch tohto vynálezu zahŕňajú, ale nie sú obmedzené na iónomeniče, oxid hlinitý, stearát hlinitý, lecitín, sérové proteíny, ako je ľudský sérový albumín, pufrovacie látky, ako sú fosfáty, glycín, kyselina sorbová, sorbát draselný, TRIS (tris(hydroxymetyl)amino-metán), čiastočne glyceridové zmesi saturovaných mastných kyselín rastlinného pôvodu, voda, soli alebo elektrolyty, ako je protamínsulfát, hydrogenfosfát sodný, hydrogenfosfát draselný, chlorid sodný, zinkové soli, koloidný silikát, trisilikát horečnatý, polyvinylpyrrolidón, látky založené na celulóze, polyetylénglykol, karboxymetylcelulóza sodná, polyakryláty, vosky, blokové polyméry polyetylén-polyoxypropylénu, polyetylénglykol a tuk z ovčej vlny.

Podľa tohto vynálezu môžu byť farmaceutické prípravky vo forme sterilného prípravku pre injekcie, napríklad sterilná vodná alebo olejnatá suspenzia pre injekcie. Táto suspenzia môže byť formulovaná podľa techník v odbore známych s použitím vhodných dispergujúcich alebo zmáčacích činidiel a suspendujúcich činidiel. Sterilný prípravok pre injekcie môže byť tiež sterilný injikovateľný roztok alebo suspenzia v netoxickom parenterálne prijateľnom riedidle alebo rozpúšťadle, napríklad ako je roztok v 1,3-buténdiole. Prijateľné vehikulá a rozpúšťadlá, ktoré sa môžu použiť, sú voda, Ringerov roztok a izotonický roztok chloridu sodného. Navyše sú obvykle ako rozpúš-

ľadlo alebo suspendujúce činidlo použité sterilné stále oleje. Na tento cieľ sa môže použiť akýkoľvek zmesový stály olej, vrátane syntetických mono- alebo diglyceridov. Mastné kyseliny, ako je kyselina olejová a jej glyceridové deriváty, sú použiteľné v príprave prípravkov pre injekcie, ako sú prirodzené farmaceuticky prijateľné oleje, ako je olivový olej, alebo ricínový olej, najmä vo svojich polyoxyetylovaných variantoch. Tieto olejové roztoky alebo suspenzie môžu tiež obsahovať ako riedidlo alebo ako dispergujúce činidlo alkohol s dlhým reťazcom, ako je Ph. Helv. alebo podobný alkohol.

Pretože kontrastné činidlá tohto vynálezu sa môžu viazať na plazmatické proteíny, v niektorých prípadoch v závislosti na dávke a rýchlosti injekcie, môžu sa väzbové miesta na plazmatických proteínoch saturovať. Vedie to k zníženej väzbe činidla a môže byť znížený polčas alebo tolerancia. Môže byť tak žiaduce injikovať činidlo vopred viazané na sterilný albumín alebo náhradný roztok plazmy. Alebo sa môže použiť prístroj/striekačka, ktorý obsahuje kontrastné činidlo a zmieša ho s krvou odobranou do striekačky, ktorá je potom podaná injekciou naspäť pacientovi.

Zlúčeniny a farmaceutické prípravky predloženého vynálezu sa môžu podávať perorálne, parenterálne, inhalačným sprejom, topicky, rektálne, nazálne, bukálne, vaginálne alebo prostredníctvom liekovej formy v implantovanom zásobníku obsahujúcom obvyklé netoxické farmaceuticky prijateľné nosiče, adjuvans a vehikulá. Termín "parenterálny", ako sa tu používa, zahŕňa subkutánne, intravenózne, intramuskulárne, intraartikulárne, intrasynoviálne, intrasternálne, intratekálne, intrahepatálne, intrakraniálne injekcie a injekcie do rany, alebo infúzne techniky.

Keď sa podávajú perorálne, môžu byť farmaceutické prípravky podľa tohto vynálezu podávané formulované v akejkolvek perorálne prijateľnej dávkovej forme vrátane, ale bez obmedzenia, toboliek, tabliet, vodných suspenzií alebo roztokov. V prípade tabliet na perorálne použitie sú všeobecne používa-

né nosiče, ktoré zahŕňajú laktózu a kukuričný škrob. Typicky sú tiež pridávané lubrikačné činidlá, ako je stearát horečnatý. Na perorálne podávanie vo forme tobolky použiteľné riedidlá zahŕňajú laktózu a kukuričný škrob. Keď sú na perorálne používanie žiaduce vodné suspenzie, aktívna zložka je spojená s emulgujúcimi a suspendujúcimi činidlami. Ak je žiaduce, môžu byť tiež pridané určité sladidlá, príchute alebo farbivá.

Alternatívne, pri podávaní vo forme čapíkov na rektálne podávanie, sa môžu farmaceutické prípravky tohto vynálezu pripraviť zmiešaním činidla s vhodným nedráždivým excipientom, ktorý je pri teplote miestnosti v pevnom stave, ale pri rektálnej teplote je kvapalný, a teda v rekte sa bude topiť s uvoľnením liečiva. Takéto látky zahŕňajú kakaové maslo, včelí vosk a polyetylén glykoly.

Ako už bolo uvedené, farmaceutické prípravky tohto vynálezu sa môžu podávať tiež lokálne, najmä keď cieľ ošetrenia zahŕňa oblasti alebo orgány ľahko dostupné lokálnej aplikácii vrátane oka, kože alebo dolnej časti zažívacieho traktu. Pre každú z týchto oblastí alebo orgánov je ľahké pripraviť vhodné lokálne prípravky.

Lokálne aplikácie pre dolnú časť zažívacieho traktu sa môžu uskutočniť v prípravku vo forme rektálneho čapíka (pozri uvedené skôr) alebo v prípravku v podobe vhodného klystíru. Môžu sa tiež použiť lokálne-transdermálne náplasti.

Na lokálne aplikácie môžu byť farmaceutické prípravky formulované vo vhodnej masti obsahujúcej aktívnu zložku suspendovanú alebo rozpustenú v jednom alebo viacerých nosičoch. Nosiče na lokálne podávanie zlúčenín tohto vynálezu zahŕňajú, ale nie sú na ne obmedzené, minerálny olej, tekuté petrolatum, biele petrolatum, propylén glykol, polyoxyetylén, polyoxypropylénové zlúčeniny, emulgujúci vosk a vodu. Alternatívne môžu byť farmaceutické prípravky formulované vo vhodnom lotione alebo kréme obsahujúcim aktívne zložky suspendované alebo rozpustené v jednom alebo viacerých farmaceuticky

prijateľných nosičoch. Vhodné nosiče zahŕňajú, ale nie sú na ne obmedzené, minerálny olej, sorbitanmonostearát, polysorbát 60, vosk cetylesterov, cetearylalkohol, 2-oktyldodekanol, benzylalkohol a vodu.

Na oftalmologické použitie môžu byť farmaceutické prípravky formulované ako mikronizované suspenzie v izotonickom sterilnom fyziologickom roztoku s upraveným pH, alebo výhodne ako roztoky v izotonickom sterilnom fyziologickom roztoku s upraveným pH, buď s konzervačným činidlom alebo bez neho, ako je benzylalkóniumchlorid. Alternatívne na oftalmologické použitie môžu byť farmaceutické prípravky formulované v masti ako je petrolatum.

Na podávanie nosným aerosolom alebo inhaláciou sú farmaceutické prípravky tohto vynálezu pripravené podľa techník známych v odbore farmaceutických prípravkov a môžu byť pripravené ako roztoky vo fyziologickom roztoku, s použitím benzylalkoholu alebo iných vhodných konzervačných činidiel, absorpčných promótorov na zvýšenie biologickej dostupnosti, fluorovaných uhľovodíkov, a/alebo ďalších obvyklých solubilizáčnych alebo dispergujúcich činidiel.

Dávkovanie závisí od citlivosti diagnostickej zobrazovacej prístrojovej techniky, a tiež od prípravku kontrastného činidla. Napríklad na zobrazovanie MRI, kontrastné činidlo obsahujúce vysoko paramagnetickú látku, napríklad gadolinium (III), všeobecne vyžaduje nižšie dávkovanie, ako kontrastné činidlo obsahujúce paramagnetickú látku s menším magnetickým momentom, napríklad železo (III). Výhodne je dávkovanie v rozsahu asi 0,001 až 1 mmol/kg telesnej hmotnosti denne aktívneho komplexu kov-ligand. Výhodnejšie je dávkovanie v rozsahu asi 0,005 až 0,05 mmol/kg telesnej hmotnosti denne.

V prípade, že sa použije optické zobrazenie na monitorovanie intervenčnej terapie, sú dávky činidla asi rovnaké ako dávky pre MRI (0,001-10 mmol/kg). Tiež ako pri kontrastných činidlách pre MRI, je podávanie optických činidiel v odbore

dobre známe.

Potrebné je rozumieť, že špecifický režim dávkovania na každého jednotlivého pacienta závisí tiež od celého radu faktorov, vrátane veku, telesnej hmotnosti, celkovom zdraví, pohlaví, diéte, čase podania, rýchlosti vylučovania, kombinácii liekov a úsudku ošetrojúceho lekára.

Po podaní príslušnej dávky kontrastného činidla je potom pacient podrobený vyšetreniu buď MRI alebo optickým zobrazovacím systémom (zobrazenie ultrafialovým, viditeľným alebo infračerveným svetlom). Príslušné nastavenie a zobrazovacie parametre na uskutočňovanie týchto zobrazovacích techník, a tiež zber dát a analýza (to znamená monitorovanie signálnych charakteristík činidla) sú dobre známe alebo zahŕňajú všeobecne prijaté princípy.

Konečný krok spôsobu podľa tohto vynálezu je monitorovanie zobrazovacích signálnych charakteristík podávaného kontrastného činidla. Na optické zobrazovanie tieto signálne charakteristiky zahŕňajú absorbanciu, odrážavosť, fluorescenciu alebo fosforescenciu a/alebo ich polčas, chemiluminiscenciu, rozptyl alebo ďalšie spektrálne vlastnosti. Na zobrazovanie MRI tieto signálne charakteristiky zahŕňajú relaxivity R_1 a R_2 ($1/T_1$ a $1/T_2$, v príslušnom poradí).

Vo výhodnejšom aspekte tohto vynálezu je možné monitorovanie v "reálnom čase", kedy vzniká obraz a teda signálna charakteristika je monitorovaná periodicky počas celého priebehu intervenčnej terapie. Početnosť, s ktorou obrazy vznikajú a sú monitorované, závisí na type a trvaní terapie.

Aby bol tento vynález lepšie vysvetlený, sú uvedené nasledujúce príklady, ktoré slúžia len na ilustráciu a nemajú byť považované žiadnym spôsobom za obmedzujúce rozsah vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1 je grafické znázornenie experimentálnych dát účinkov, ktoré majú zmeny teploty na pozorovanú relaxivitu (R_1) pre roztok HSA s použitím kontrastného činidla alebo bez neho.

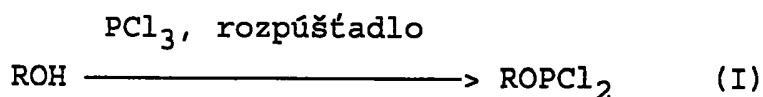
Obr. 2 je grafické znázornenie experimentálnych dát straty intenzity signálu ROI v priebehu času pri zobrazovaní MRI generovanom použitím roztoku HSA s použitím kontrastného činidla alebo bez neho.

Obr. 3 je grafické znázornenie experimentálnych dát účinkov, ktoré majú zmeny v koncentrácii etanolu na pozorovanú relaxivitu (R_1) pre roztok HSA s použitím kontrastného činidla alebo bez neho.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasleduje schéma syntézy výhodných kontrastných činidiel použiteľných v spôsobe podľa vynálezu, a najmä MS-325. Pozri patentovú prihlášku U.S. 08/833 745, podanú 11. apríla, 1997, a zahrnutú tu do odkazov. Ďalšia použiteľná, aj keď nie tak výhodná, schéma syntézy pre tieto kontrastné činidlá je opísaná v patentovej prihláške U.S. 08/382 317, podanej 1. februára, 1995, a zahrnutá tu do odkazov.

Najskôr alkohol ROH reaguje s PCl_3 , výhodne v molárnom pomere 1:1, pričom vzniká reakčný produkt dichlórfosfínu (I):

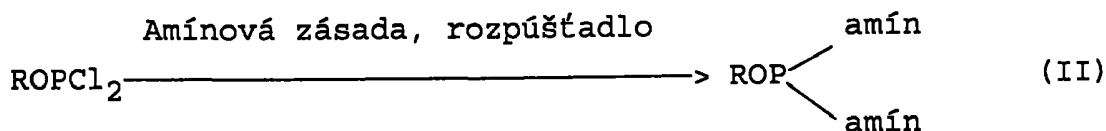


Skupina R môže byť priama, rozvetvená alebo cyklická alifatická skupina, arylová, heterocyklická, peptidová, peptoidová, deoxyribo- alebo ribonukleotidová alebo nukleozidová, alebo cyklická alebo acyklická skupina organického chelatačného činidla, ktorá môže byť voliteľne substituovaná jedným alebo

viacerými atómami dusíka, kyslíka, síry, halogénového prvku, alebo alifatickou skupinou, amidovou, esterovou, sulfónamidovou, arylovou, acylovou, sulfonátovou, fosfátovou, hydroxylovou skupinou alebo organokovovými substituentami.

Táto reakcia prebieha v prítomnosti éterického alebo uhľovodíkového rozpúšťadla a uskutočňuje sa pri teplote od asi -50°C do asi 15°C , výhodne od asi -10°C do asi -5°C , od asi 30 minút do asi 3 hodín, výhodne od 1 do 1,5 hodiny. Rozpúšťadlo môže byť akékoľvek éterické alebo uhľovodíkové rozpúšťadlo a výhodne môže byť vybrané zo skupiny skladajúcej sa z heptánov, metal-*t*-butyl éterov, dioxánov, tetrahydrofuránov, dietyléterov a etylénglykoldialkyléterov. Výhodnejšie je rozpúšťadlo tetrahydrofurán.

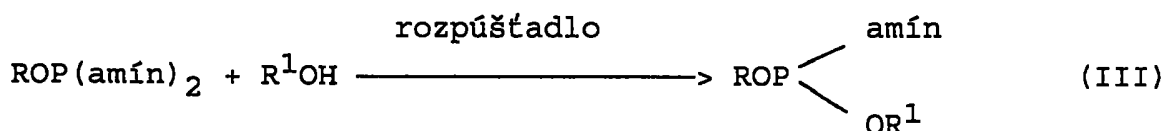
Dichlórfosfín (I) potom reaguje s asi 5 až asi 6 ekvivalentami amínovej zásady pričom vzniká bis(amín)fosfínový reakčný produkt (II):



Táto reakcia tiež prebieha v prítomnosti éterického alebo uhľovodíkového rozpúšťadla, ako je opísané skôr, a uskutočňuje sa pri teplote od asi -50°C do asi 15°C , výhodne od asi -10°C do asi -5°C , od asi 30 minút do asi 3 hodín, výhodne od 15 do 30 minút. Zásada použitá na vytvorenie reakčného produktu (II) môže byť akákoľvek amínová zásada, výhodne zásada majúca hodnotu pK_a od asi 5 do asi 11 a výhodnejšie vybraná zo skupiny skladajúcej sa z imidazolu, 2,4-dimetylimidazolu, 1H-tetrazolu, dialkylamínov (metyl, etyl, butyl), pyridínu, piperazínu, piperidínu, pyrolu, 1H-1,2,3-triazolu a 1,2,4-triazolu. Vo výhodnejšom uskutočnení je zásada imidazol.

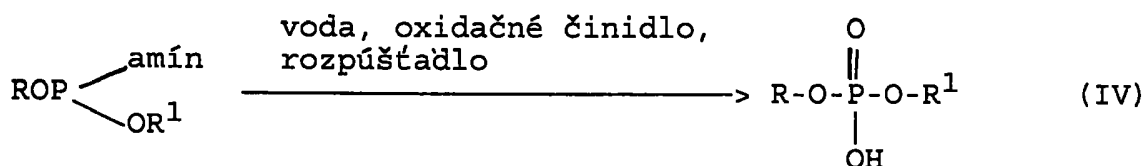
Bis(amín)fosfínová zlúčenina (II) potom reaguje s asi 0,75 až asi 1,0 ekvivalentom druhého alkoholu $R^1\text{OH}$, kde R^1

môže byť akýkoľvek zo substituentov definovaných skôr pre skupinu R, pričom vzniká (amín)fosfínový reakčný produkt (III):



Táto reakcia prebieha v prítomnosti éterického alebo uhľovodíkového rozpúšťadla a uskutočňuje sa pri teplote od asi -50°C do asi 15°C , výhodne od asi -10°C do asi -5°C , od asi 30 minút do asi 3 hodín, výhodne od 1 do 1,5 hodiny. Rozpúšťadlo môže byť akékoľvek éterické alebo uhľovodíkové rozpúšťadlo a výhodne môže byť vybrané zo skupiny skladajúcej sa z heptánov, metal-t-butyl éterov, dioxánov, tetrahydrofuránov, 1,3-dioxolánov, diglymov, dietyléterov, dialkyléterov a etylénglykoldialkyléterov. Výhodnejšie je rozpúšťadlo tetrahydrofurán.

Nakoniec (amín)fosfínová zlúčenina (III) reaguje s asi jedným ekvivalentom kyslej vody, výhodne majúcej pH asi 2,5 až asi 5, a asi 1 alebo viac ekvivalentov oxidačného činidla pričom vzniká požadovaná fosfodiesterová zlúčenina (IV):



Oxidačné činidlo môže byť akékoľvek oxidačné činidlo peroxidového typu a výhodne vybrané zo skupiny skladajúcej sa z jodistanov. Výhodnejšie je oxidačné činidlo jodistan sodný.

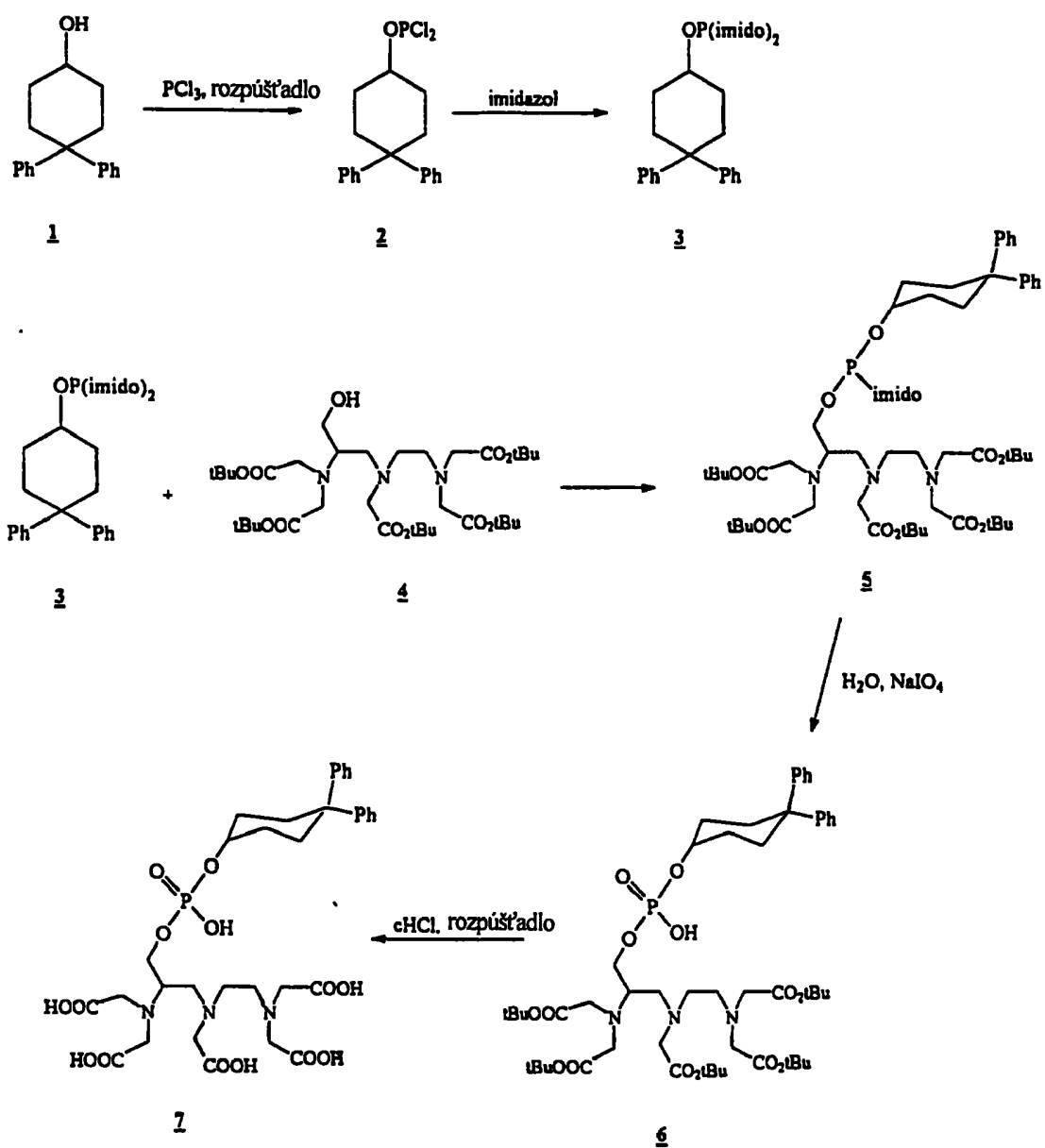
Skôr uvedená hydrolýza a oxidácia sa uskutočňujú v zmesi rozpúšťadla pri teplote od asi -15°C do asi 25°C , výhodne od asi 0°C do asi 2°C , od asi 10 hodín do asi 2 hodín, výhodne od 10 do 15 hodín. Zmes rozpúšťadla zahŕňa akúkoľvek kombináciu rozpúšťadiel vybraných zo skupiny skladajúcej sa z éterických alebo uhľovodíkových rozpúšťadiel. Výhodne zmes rozpúšťadiel

obsahuje tetrahydrofurán, heptán a toluén v objemovom pomere 10:10:1.

V súlade s touto syntetickou schémou je chelatačný ligand v komplexe MS-325 pripravený takto.

Príprava kyseliny [(4,4-difenylcyklohexyl)fosfooxymetyl]di-etyléntriámínpentaoctovej

Príprava chelatačného ligandu použitého v komplexe MS-325 je uvedená ďalej v schéme I:



Do jednej reakčnej nádoby, ktorá obsahovala roztok chloridu fosforitého (13,2 ml, 0,151 mol) v tetrahydrofuráne (202 ml) sa pridal roztok 4,4-difenylcyklohexanolu (1) (38,34 g, 0,152 mol) v tetrahydrofuráne (243 ml) za miešania a udržiavania vnútornej teploty $-6,2^{\circ}\text{C}$ až $-5,3^{\circ}\text{C}$ počas 1,5 hodiny. Zmes sa potom miešala ďalších 34 minút pričom vznikol dichlórfosfínový reakčný produkt (2), ktorý mal ^{31}P NMR chemický posun 174,23 ppm.

K roztoku sa pridal imidazol (51,34 g, 0,753 mol) v tetrahydrofuráne (243 ml) za miešania a udržiavania vnútornej teploty $-7,8^{\circ}\text{C}$ až $-3,6^{\circ}\text{C}$ počas 37 minút. Výsledná zmes sa potom miešala ďalších 20 minút pričom vznikol roztok bis(amín)-fosfínový reakčný produkt (3), ktorý mal ^{31}P NMR chemický posun 106,36 ppm.

K tejto zmesi sa pridal roztok skladajúci sa z kyseliny 2-(R)-hydroxymetyldietyléntriámín-pentaoctovej, penta-t-butyl esteru (4) (160,0 g, 0,128 mol, čistota: 56,32 % (hmotnostných)) v heptáne (114 ml) za miešania a udržiavania vnútornej teploty $-6,8^{\circ}\text{C}$ až $-4,8^{\circ}\text{C}$ počas 1 hodiny a 6 minút. Zmes sa potom miešala ďalších 23 minút pričom vznikol roztok (5), ktorý mal ^{31}P NMR chemický posun 123,8 ppm.

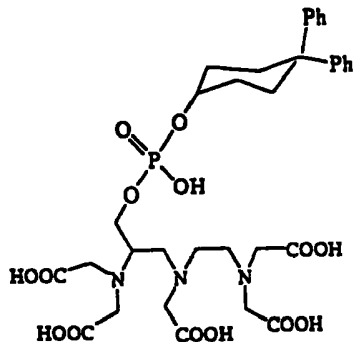
Nakoniec sa počas asi 1 minúty pridávala voda (202 ml) pri udržiavaní vnútornej teploty $-6,5^{\circ}\text{C}$ až $6,5^{\circ}\text{C}$. Zmes sa potom miešala 5 minút, potom sa v priebehu 5 minút pridal heptán (620 ml), toluén (70 ml) a 5N vodná kyselina chlorovodíková (202 ml) pri udržiavaní vnútornej teploty $1,0^{\circ}\text{C}$ až $12,1^{\circ}\text{C}$. Potom sa počas 3 minút pridával jodistan sodný (22,6 g, 0,106 mol) pri udržiavaní vnútornej teploty $10,5^{\circ}\text{C}$. Reakčná zmes sa zohriala na teplotu miestnosti v priebehu 35 minút a miešala sa ďalšie 2,5 hodiny pričom vznikol roztok (6) s ^{31}P NMR chemický posun 4,27 ppm. Vrstvy sa oddelili a organická vrstva sa premyla 10 % vodným tiosulfátom sodným (2 x 809 ml).

K uvedenej organickej vrstve sa pridal bromid tetraoktylamónny (8,21 g, 0,015 mol). Potom sa počas 22 minút

pridávala koncentrovaná kyselina chlorovodíková (11,51 M, 450 ml) pri udržiavaní vnútornej teploty 22,8°C až 25,0°C. Táto zmes sa miešala 16,0 hodín pričom vznikla zlúčenina (7) s ^{31}P NMR chemický posun 7,78 ppm. Vrstvy sa oddelili a organická vrstva sa odstránila.

K uvedenej vodnej vrstve sa pridal 8M vodný hydroxid sodný (630 ml) pokiaľ sa nezaznamenalo pH 6,56. Roztok sa koncentroval za zníženého tlaku (50°C až 55°C, vákuum 85 mm Hg) pokiaľ sa neodobralo 400 ml rozpúšťadla (asi 1 hodina). Roztok sa ochladil na teplotu miestnosti a pridala sa amberlitová živica XAD-4 (92,0 g). Suspenzia sa miešala 50 minút pri teplote miestnosti a filtrovala, pričom vznikol ľahko žltý vodný roztok (1,1 l).

Uvedený roztok sa naniesol na silikagél C-18 s obráteným pomerom fáz (271 g, balený vlhký v metanole a potom premytý 800 ml metanolu, 800 ml metanol/voda, 1:1 a 800 ml vody) a eluoval vodou. Prvý odobraný eluent v množstve 1,0 l sa odstránil a ďalší odobraný eluent v množstve 1,3 l sa zachoval. K zachovanému roztoku sa pridala 6N vodná kyselina chlorovodíková (60 ml k pH = 2,15) a 3N vodná kyselina chlorovodíková (30 ml k pH = 1,63). Kašovitá hmota sa miešala 1,25 hodiny a filtrovala sa. Pevná látka sa omyla vodným roztokom s pH 1,67 (500 ml) a usušila (48-50°C, 4-6 mm Hg) na konštantnú hmotnosť (18,0 hodín) pričom vznikla špinavo biela pevná látka zlúčeniny vzorca:



(65,5 g, výtazok: 68,89 %, čistota: 99,45 % (hmotnostných), 98,98 % (plochy), 3,02 % voda a 97,81 % chelatovateľných).

Ako konkrétne príklady uskutočnenia vynálezu sa pripravili a vyhodnotili tri typy vzoriek. Prvá bola kontrolná vzorka obsahujúca ľudský sérový albumín (HSA) bez kontrastného činidla. Ďalšie dve vzorky obsahovali HSA a nešpecifické činidlo Gd-DTPA a HSA-špecifické činidlo MS-325.

V týchto príkladoch sa monitorovali priebežné relaxivity (R_1 , $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) a získavali sa v 20 Mhz určovaním relaxačnej rýchlosti ($1/T_1$) protónov vody vo fyziologickom roztoku pufrovanom fosfátmi (PBS, 150 mM NaCl, 10 mM fosfát, pH 7,4), v roztokoch PBS obsahujúcich 4,5 % (hmotnostných) HSA alebo v géloch obsahujúcich 4,5 % (hmotnostných) HSA a 1 % agar. Závislosť teploty na relaxivite (R_1) sa sledovala pozmeňovaním teploty vzoriek pomocou cirkulujúceho vodného kúpeľa a monitorovaním teploty vzorky termoelektrickým článkom.

Príklad 1

Monitorovanie termálnej nekrózy 4,5 % HSA

Pripravili sa nasledujúce tri vzorky v roztokoch 4,5 % HSA: 1) kontrolná vzorka bez kontrastného činidla, 2) komparatívna vzorka s Gd-DTPA a 3) vzorka s MS-325. Vzorky s Gd-DTPA a MS-325 sa pripravili pridaním vodného prípravku (pH = 7) obsahujúceho buď Gd-DTPA alebo MS-325 k roztoku 4,5 % HSA. Výsledné zmesi mali koncentráciu 0,3 mM Gd-DTPA a 0,1 mM MS-325.

Tieto tri vzorky sa potom použili na monitorovanie tepelnej denaturácie roztokov 4,5 % HSA. S týmto cieľom sa zbierali dáta T_1 (a teda dáta R_1 ($=1/T_1$)) pre každú vzorku v 20 MHz v priebehu teplotného rozsahu 20-60°C. Každá vzorka sa potom odstránila z NMR a zohrievala v 85°C počas 15 minút, aby sa vyvolala tepelná denaturácia HSA. Potom sa vzorky vrátili do NMR a zbierali sa dáta T_1 pri tejto vysokej teplote, pozri tabuľku 1 ďalej a obrázok 1.

Ako ukazujú tabuľka 1 a obrázok 1, po tepelnej denaturácii troch roztokov obsahujúcich HSA sa pri vzorke, ktorá obsahovala tiež HSA-špecifické kontrastné činidlo MS-325, prejavilo významné zníženie v pozorovanej R_1 (strata $26,7 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) v priebehu denaturácie HSA, ako sa meralo od okamihu tesne pred denaturáciou ($56,2^\circ\text{C}$) po okamih tesne po denaturácii (85°C). Ale vzorka, ktorá obsahovala nešpecifické kontrastné činidlo Gd-DTPA, dokonca aj v koncentrácii trikrát väčšej ako v koncentrácii použitej na vzorku MS-325, vykazovala v priebehu denaturácie malé zmeny v R_1 (strata len $0,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). To ukazuje, že Gd-DTPA neviaže ani natívny ani denaturovaný HSA.

Tabuľka 1

Teplota ($^\circ\text{C}$)	R_1 4,5 % HSA	R_1 Gd-DTPA	R_1 MS-325
7,3	0,396	9,4556	31,2
11,7	0,319	8,8125	33,4
16,2	0,246	8,0690	36,0
20,6	0,181	7,4182	38,6
25,0	0,123	6,7426	40,6
29,5	0,072	6,2117	42,0
33,9	0,033	5,7089	42,8
38,4	0,000	5,2984	42,4
42,8	-0,026	4,8917	42,3
47,3	-0,041	4,5992	41,3
51,7	-0,045	4,3083	39,5
56,2	-0,056	4,0592	37,5
60,6	-0,065	3,8806	33,3
85,0	0,084	4,2102	10,8

Potom, ako sa získali skôr uvedené dáta, denaturované vzorky sa nechali vychladnúť na fyziologickú teplotu (37°C) a znova sa zbierali T_1 dáta. Vzorka s MS-325 udržiavala významnú stratu v R_1 (čistá strata $25 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), zatiaľ čo vzorka s Gd-DTPA vykazovala len malé zmeny v R_1 (čistá strata $0,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Príklad 2

Zobrazovanie MRI tepelnej denaturácie HSA v 1,0 Tesla

V 1 % géle obsahujúcom 4,5 % HSA sa pripravili nasledujúce vzorky: 1) kontrolná vzorka bez kontrastného činidla, 2) komparatívna vzorka s Gd-DTPA a 3) vzorka s MS-325. Kontrastné činidlá sa pridali v množstve postačujúcom tak, že koncentrácie Gd-DTPA a MS-325 boli 0,3 mM Gd-DTPA a 0,1 mM MS-325. Tie-to agarové gély obsahujúce 4,5 % HSA sa nazývali "fantómy".

Potom sa získali východiskové MRI obrazy agarových fantómov s váženými T_1 (FISP-3D, TR=15, TE=4, $\alpha=30$) v 1,0 Tesla pri teplote asi 25°C. Tieto východiskové obrazy odhalili, že fantómy obsahujúce MS-325 sú jasnejšie ako fantómy obsahujúce Gd-DTPA (komparatívna vzorka) alebo samotný 4,5 % HSA (kontrolná vzorka), tento výsledok sa očakával kvôli špecifickej väzbe MS-325 na HSA.

Fantómy sa potom zohriali v cirkulujúcom vodnom kúpeli s ďalšími MRI obrazmi s váženými T_1 získanými v priebehu času. Ako sa zvyšovala teplota, fantómy obsahujúce MS-325 zostávali oveľa jasnejšie (menšia strata intenzity signálu ako merané v % straty ROI (oblasť záujmu)) ako fantómy obsahujúce Gd-DTPA alebo samotný 4,5 % HSA, pozri tabuľka 2 ďalej a obrázok 2.

Tabuľka 2

Čas (min.)	Teplota (°C)	% straty ROI, 4,5 % HSA	% straty ROI, 0,3 mM Gd-DTPA v 4,5 % HSA	% straty ROI, 0,1 mM MS-325 v 4,5 % HSA
0	25,3	-0,41519	-0,24557	0,0000
10	29,6	-4,2635	-5,1875	-4,4755
20	38,3	-6,8972	-12,806	-6,4144
30	45,0	-10,360	-18,985	-11,241
40	53,0	-15,205	-30,964	-26,153
50	64,7	-20,250	-43,833	-49,262
60	72,8	-20,667	-46,086	-69,499
70	87,1	-20,953	-47,529	-76,469
120	35,5	-4,9098	-10,190	-31,869

Keď sa fantómy zohriali na viac ako 50-60°C, ich farba tmavla, čo zodpovedalo tepelnej denaturácii HSA. V tom istom čase, ako ukazuje tabuľka 2 a obrázok 2, sa pozorovala prekvapujúca strata intenzity signálu pri fantómoch, ktoré obsahova-

li MS-325 (76 % strata intenzity). Ale fantómy, ktoré obsahovali Gd-DTPA alebo samotný HSA, vykázali len miernu zmenu v intenzite signálu. Fantómy Gd-DTPA, dokonca aj v koncentrácii Gd-DTPA, ktorá bola trikrát vyššia ako koncentrácia použitá pre fantómy MS-325, zostávali ako nemenné tmavé obrazy v priebehu MRI skenovania po tepelnej denaturácii.

Potom, ako sa získali už uvedené dáta, denaturované vzorky sa nechali vychladnúť na normálnu fyziologickú teplotu (37°C). Fantómy obsahujúce MS-325 si ponechávali svoju stratu intenzity signálu (32 % strata). Kontrolné fantómy a fantómy obsahujúce Gd-DTPA stále vykazovali len 5 % a 10 % zníženie intenzity signálu po denaturácii.

Podľa týchto výsledkov môžu kontrastné činidlá použiteľné v spôsobe podľa tohto vynálezu poskytnúť veľmi citlivú indikáciu tepelnej denaturácie HSA. Dokonca aj keď sa použila trojnásobná koncentrácia iného kontrastného činidla, nemohla táto vyššia koncentrácia poskytnúť citlivosť vyžadovanú na monitorovanie tepelnej denaturácie HSA.

Príklad 3

Etanolová denaturácia HSA

Pripravili sa nasledujúce tri vzorky v roztokoch 4,5 % HSA: 1) kontrolná vzorka bez kontrastného činidla, 2) komparatívna vzorka s Gd-DTPA a 3) vzorka s MS-325. Vzorky s Gd-DTPA a MS-325 sa pripravili pridaním vodného prípravku (pH=7) obsahujúceho buď Gd-DTPA alebo MS-325 k roztoku 4,5 % HSA. Výsledné zmesi mali koncentráciu 0,31 mM Gd-DTPA a 0,08 mM MS-325.

Ku každej vzorke sa potom titroval absolútny etanol. Zbierali sa dáta T_1 (teda dáta $R_1 (=1/T_1)$) v 20 MHz a 37°C po každom pridaní etanolu, pozri tabuľku 3 ďalej a obrázok 3.

Tabuľka 3

Etanol (%)	R_1 4,5% HSA	Etanol (%) pre Gd-DTPA	R_1 0,31 mM Gd-DTPA	Etanol (%) pre MS-325	R_1 0,08 mM MS-325
0,0000	0,000	0,0	4,1737	0,0	42,216
8,7382	0,030	16,1	4,7191	0,9	40,848
16,072	0,060	27,8	5,0021	1,9	39,541
22,315	0,090	36,6	4,9347	2,8	38,423
27,693	0,109	43,5	4,7997	3,7	37,064
32,375	0,125	49,0	4,4623	4,5	36,375
36,487	0,128			5,4	35,234
40,128	0,142			6,2	34,576
43,375	0,153			7,1	33,895
46,287	0,168			7,9	33,099
				8,7	32,224
				10,2	31,689
				11,7	30,403
				16,4	26,939
				22,8	21,456
				28,3	17,428
				33,1	14,082
				37,3	11,187
				41,0	9,6943
				44,2	8,9506
				47,2	8,7970

Ako ukazuje tabuľka 3 a obrázok 3 v priebehu etanolovej ablácie roztokov 4,5 % HSA vzorka obsahujúca MS-325 vykázala významné zníženie v pozorovanej relaxivite ($33 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) a umožnila detekciu nekrózy indukovanej etanolom. Avšak vzorka obsahujúca Gd-DTPA (dokonca v takmer štvornásobnej koncentrácii MS-325) vykázala len malú zmenu v pozorovanej relaxivite ($0,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie kontrastného činidla na prípravu diagnostického činidla na diagnostické zobrazovanie so zvýšeným kontrastom pomocou MRI, ultrafialového svetla, viditeľného svetla alebo infračerveného svetla, kde kontrastné činidlo je schopné naviazať sa na cieľové tkanivo alebo zložku tkaniva, na ktorom sa uskutočňuje alebo sa už uskutočnila intervečná terapia, a ktoré má špecifickú afinitu pre toto tkanivo alebo zložku tkaniva, pričom kontrastné činidlo obsahuje skupinu zosilňujúcu zobrazenie (IEM) a skupinu viažucu sa na tkanivo v závislosti od jeho stavu (SDTBM), pričom sa monitoruje zobrazovacia signálna charakteristika kontrastného činidla na stanovenie toho, či je intervenčná terapia celkom skončená.

2. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že IEM je vybraná zo skupiny obsahujúcej organické molekuly, ióny, soli a cheláty kovov, častice, klustre, častice železa, značené peptidy, proteíny, polyméry, lipozómy, organické farbivá a anorganické farbivá.

3. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že IEM obsahuje fyziologicky kompatibilné cheláty obsahujúce aspoň jedno cyklické alebo acyklické organické chelatujuce činidlo komplexované s jedným alebo niekoľkými iónmi kovu s atómovými číslami 13, 21 až 34, 39 až 42, 44 až 50 alebo 57 až 83.

4. Použitie podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kovovým iónom je paramagnetický kov s atómovým číslom 21 až 29, 42, 44 alebo 57 až 83.

5. Použitie podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c e s a

t ý m, že paramagnetický kovový ión je vybraný zo skupiny obsahujúcej Gd(III), Fe(III), Mn(II), Mn(III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III), Ho(III), Er(III) a Eu(III).

6. Použitie podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kovovým iónom je Gd(III).

7. Použitie podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že chelatujúce činidlo je vybrané zo skupiny obsahujúcej DTPA, DOTA, DTPA-BMA a HP-DO3A.

8. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že IEM obsahuje luminiscenčný komplex kovu.

9. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že IEM obsahuje časticu železa alebo chelát kovu zo skupiny Dy, Gd a Ho.

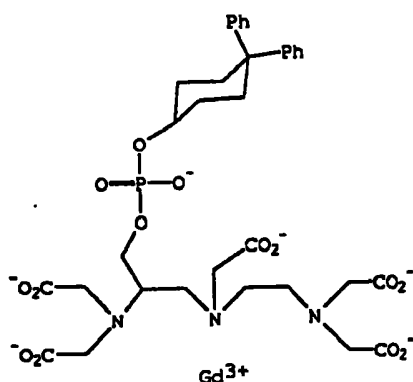
10. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že SDTBM je vybraná zo skupiny obsahujúcej malé molekuly alebo biomolekuly.

11. Použitie podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že SDTBM obsahuje malú molekulu obsahujúcu aspoň jednu alifatickú skupinu, alkoxy skupinu, alkyltioskupinu, alkylkarbonylovú skupinu, alkylkarbonyloxyskupinu, arylovú skupinu alebo heterocyklickú skupinu s 1 až 60 atómami uhlíka a voliteľne jeden alebo niekoľko dusíkových, kyslíkových, sírových, halogénových, alifatických amidových, estersulfónamidových, acylových, sulfonátových, fosfátových, hydroxylových alebo organokovových substituentov.

12. Použitie podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že SDTBM obsahuje aspoň jeden arylový kruh.

13. Použitie podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že SDTBM obsahuje aspoň dva arylové kruhy.

14. Použitie podľa nároku 13, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo má štruktúru:



MS-325

15. Použitie podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že zobrazovacou metódou je zobrazovanie so zvýšeným kontrastom pomocou MRI.

16. Použitie podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že intervenčnou terapiou je terapia pomocou zaostreného ultrazvuku.

17. Použitie podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že SDTBM obsahuje biomolekulu, ktorá obsahuje peptid obsahujúci zvyšky hydrofóbných aminokyselín a/alebo substituenty buď s alebo bez hydrofóbných alebo hydrofilných koncových skupín.

18. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo prejavuje väzbovú afinitu, ktorá

je závislá od stavu, k tkanivu alebo zložke tkaniva v plazme, intersticiálnom priestore, synoviálnej tekutine, mozgovomiechovom moku, zápalovom výpotku, tekutine v abscese alebo v intracelulárnom priestore.

19. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo prejavuje na stave závislú väzbovú afinitu k proteínu vybranému zo skupiny obsahujúcej ľudský sérový albumín, väzbový proteín mastných kyselín, glutathion-S-transferázu a lipoproteíny.

20. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo ešte obsahuje skupinu predlžujúcu polčas v krvi (BHEM), ktorá má jeden alebo niekoľko úplných alebo parciálnych negatívnych nábojov vo vodnom roztoku pri fyziologickom pH, keď negatívny náboj nemôže byť ani parciálne ani celkom neutralizovaný kovalentnou alebo koordinačne kovalentnou väzbou k IEM.

21. Použitie podľa nároku 20, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo prejavuje od stavu závislú afinitu k ľudskému sérovému albumínu.

22. Použitie podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že najmenej 10 % činidla sa viaže k ľudskému sérovému albumínu v jeho natívnom stave.

23. Použitie podľa nároku 22, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že najmenej 50 % činidla sa viaže k ľudskému sérovému albumínu v jeho natívnom stave.

24. Použitie podľa nároku 23, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že najmenej 80 % činidla sa viaže k ľudskému sérovému

albumínu v jeho natívnom stave.

25. Použitie podľa nároku 24, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že najmenej 95 % činidla sa viaže k ľudskému sérovému albumínu v jeho natívnom stave.

26. Použitie podľa nároku 21, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo prejavuje väzbovú afinitu k ľudskému sérovému albumínu v jeho denaturovanom stave, ktorá je menšia ako 80 % väzbovej afinity kontrastného činidla k ľudskému sérovému albumínu v jeho natívnom stave.

27. Použitie podľa nároku 26, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo prejavuje väzbovú afinitu k ľudskému sérovému albumínu v jeho denaturovanom stave, ktorá je menšia ako 50 % väzbovej afinity kontrastného činidla k ľudskému sérovému albumínu v jeho natívnom stave.

28. Použitie podľa nároku 27, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo prejavuje väzbovú afinitu k ľudskému sérovému albumínu v jeho denaturovanom stave, ktorá je menšia ako 20 % väzbovej afinity kontrastného činidla k ľudskému sérovému albumínu v jeho natívnom stave.

29. Použitie podľa nároku 28, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo prejavuje väzbovú afinitu k ľudskému sérovému albumínu v jeho denaturovanom stave, ktorá je menšia ako 10 % väzbovej afinity kontrastného činidla k ľudskému sérovému albumínu v jeho natívnom stave.

30. Použitie podľa nároku 1 alebo 18, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je naviazané

na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho denaturovanom stave, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 80 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

31. Použitie podľa nároku 30, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho denaturovanom stave, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 50 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

32. Použitie podľa nároku 31, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho denaturovanom stave, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 20 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

33. Použitie podľa nároku 32, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho denaturovanom stave, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 10 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

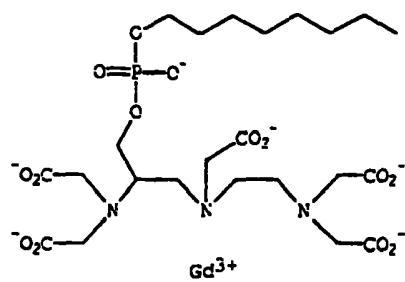
34. Použitie podľa nároku 1 alebo 18, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je intervenčná terapia skončená a cieľové tkanivo alebo zložka tkaniva sa vrátilo do fyziologického stavu, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 80 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

35. Spôsob podľa nároku 34, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je intervenčná terapia skončená a cieľové tkanivo alebo zložka tkaniva sa vrátilo do fyziologického stavu, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 50 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

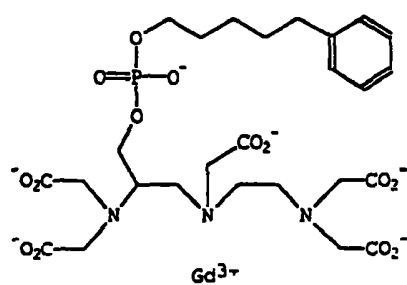
36. Použitie podľa nároku 35, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je intervenčná terapia skončená a cieľové tkanivo alebo zložka tkaniva sa vrátilo do fyziologického stavu, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 20 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

37. Použitie podľa nároku 36, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo, keď je intervenčná terapia skončená a cieľové tkanivo alebo zložka tkaniva sa vrátilo do fyziologického stavu, má relaxivitu R_1 , ktorá je menšia ako 10 % relaxivity R_1 kontrastného činidla, keď je naviazané na tkanivo alebo zložku tkaniva v jeho natívnom stave.

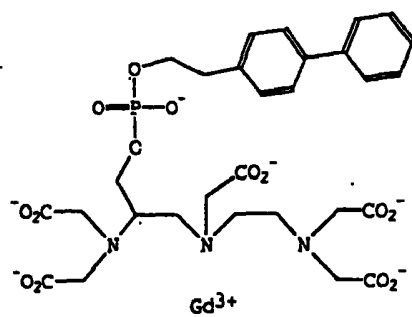
38. Použitie kontrastného činidla na prípravu diagnostického činidla na diagnostické zobrazovanie so zvýšeným kontrastom špecifického tkaniva alebo zložky tkaniva, na ktorom sa uskutočňuje alebo sa už uskutočnila intervenčná terapia, pomocou MRI, ultrafialového svetla, viditeľného svetla alebo infračerveného svetla, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že kontrastné činidlo má jednu z nasledujúcich štruktúr:



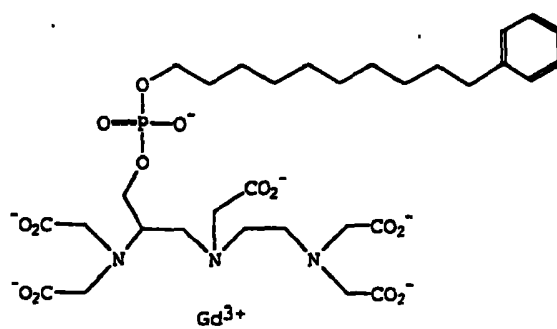
MS-315



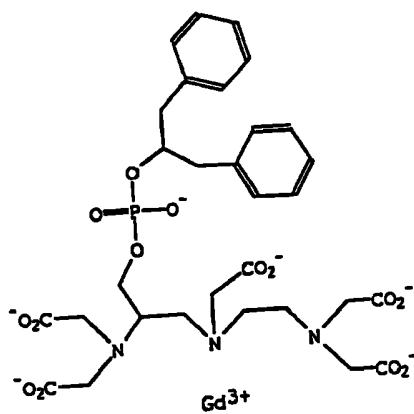
MS-317



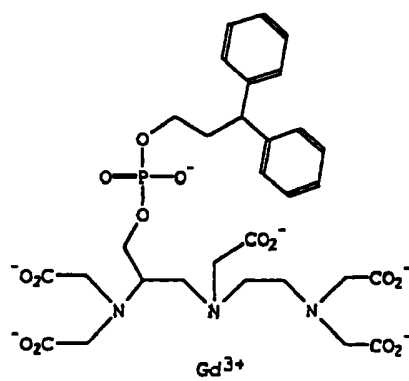
MS-322



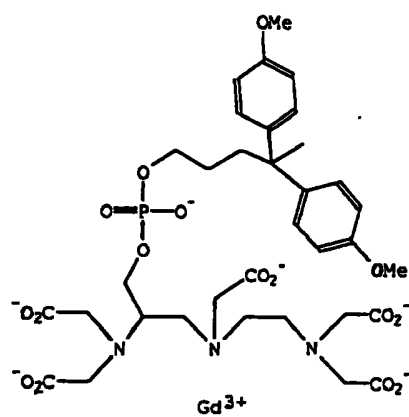
MS-323



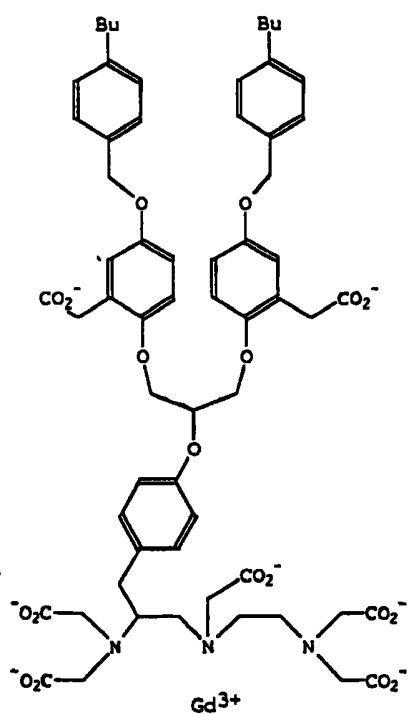
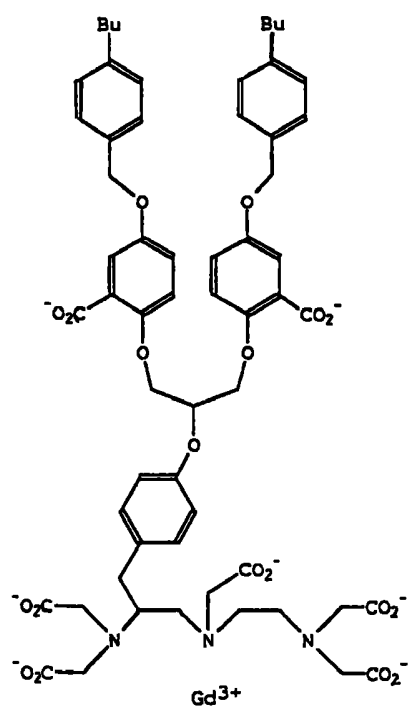
MS-326

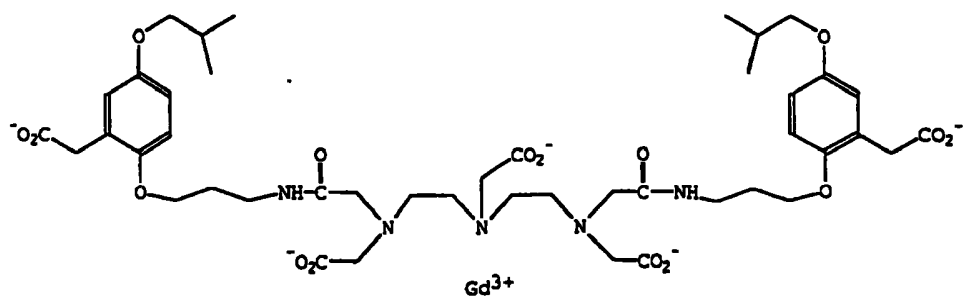
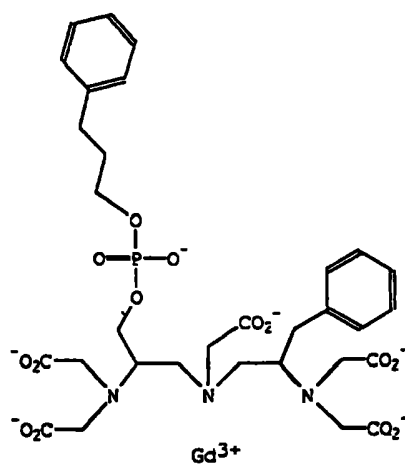
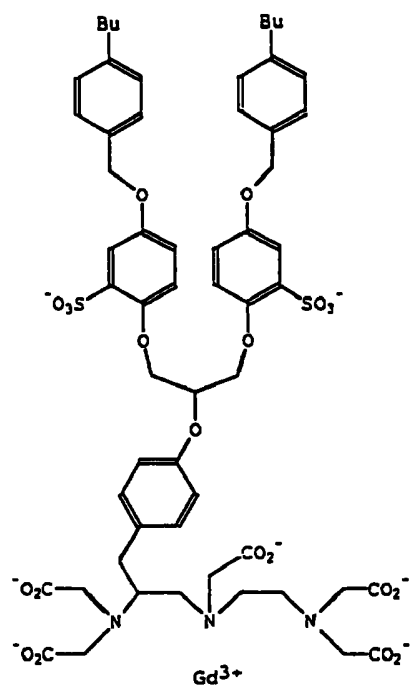


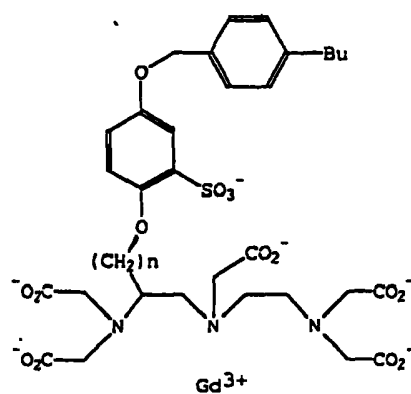
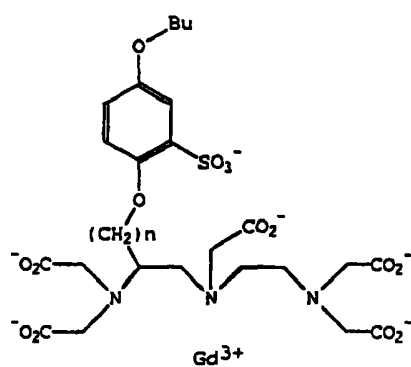
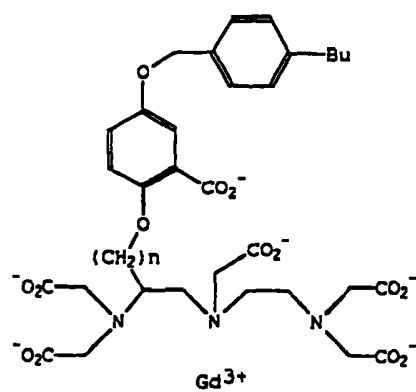
MS-327

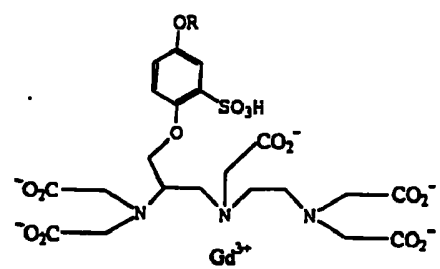
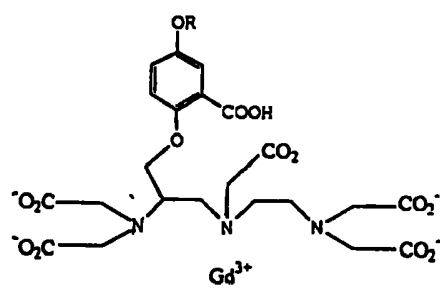
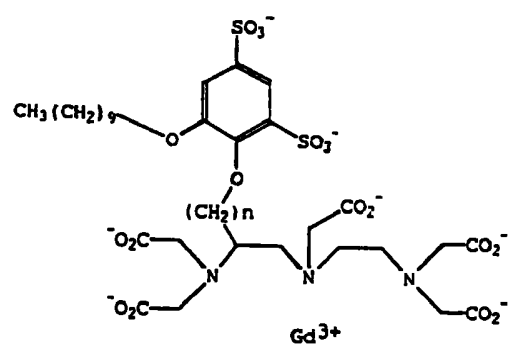
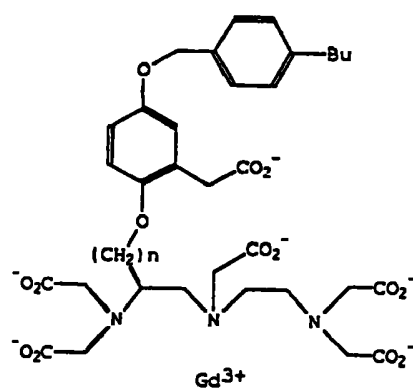


MS-328



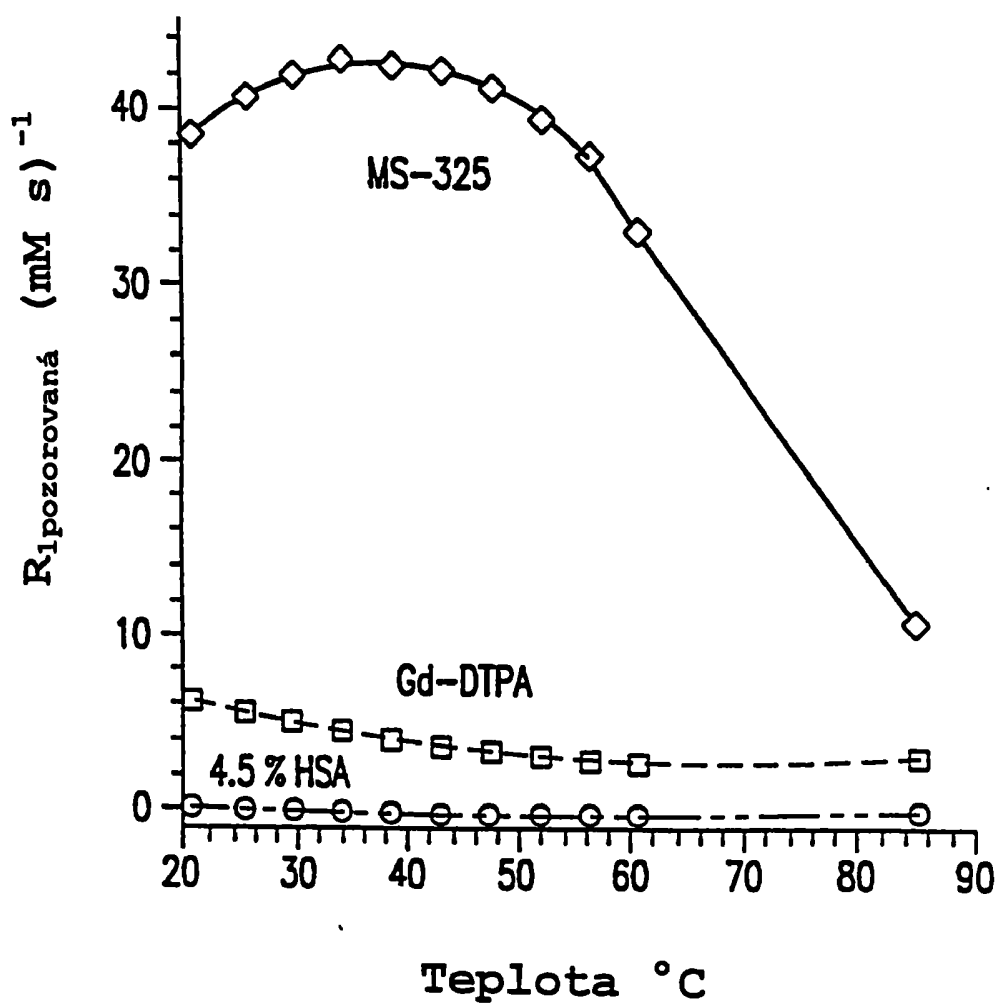






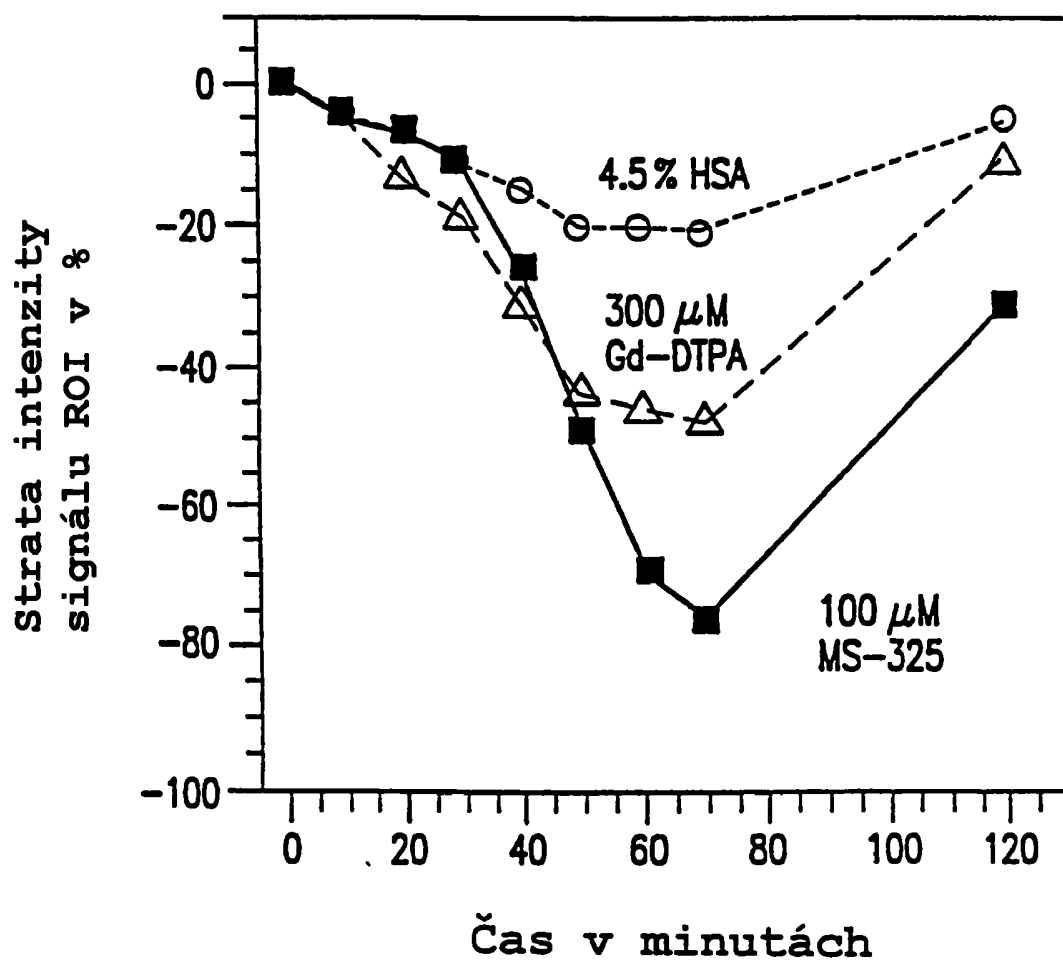
kde n má hodnotu 1 až 4 a R obsahuje alifatickú skupinu a/alebo aspoň jeden arýlový kruh, pričom monitorujú sa zobrazovacie signálne charakteristiky kontrastného činidla na stanovenie toho, či je intervenčná terapia celkom skončená.

1/3



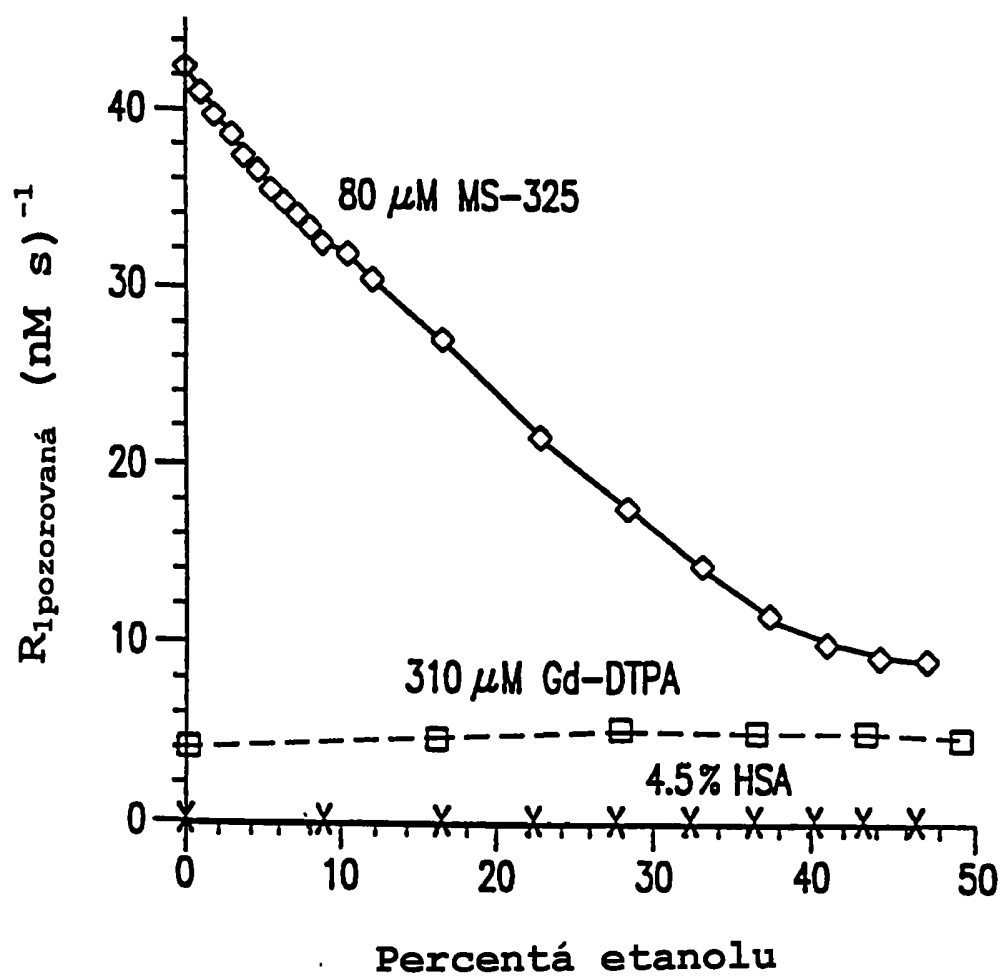
Obr. 1

2/3



Obr. 2

3/3



Obr. 3