



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 19 925 T2 2004.09.02

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 019 094 B1

(51) Int Cl.⁷: A61K 49/00

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 19 925.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/20182

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 950 704.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/017809

(86) PCT-Anmeldetag: 24.09.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 15.04.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 19.07.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 19.11.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 02.09.2004

(30) Unionspriorität:

942989 02.10.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Epix Medical, Inc., Cambridge, Mass., US

(72) Erfinder:

LAUFFER, B., Randall, Brookline, US; DUNHAM, O., Stephen, Waterville, US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: Kontrastverstärktes Diagnosebilderzeugungsverfahren zur Überwachung von therapeutischen Eingriffen

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Kontrastmittels für die Herstellung eines Diagnosemittels zur diagnostischen Bilderzeugung mit Kontrastverstärkung. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Kontrastmittels für die Herstellung eines Diagnosemittels für Verfahren der Kernspintomographie (MRI) und optische Bilderzeugungsverfahren, um ein spezifisches Gewebe oder einen Gewebebestandteil anzuzielen (gezielt zu markieren) und die Überwachung von Zustandsveränderungen im Zielgewebe (z. B. Denaturierung, Nekrotisierung, Gewebekoagulation, Apoptose) zu erlauben, die während oder nach einer Interventionstherapie auftreten. Die Kontrastmittel, die in dieser Erfindung verwendet werden, weisen eine vom Zustand abhängige Bindung an einen oder mehrere Bestandteile eines Zielgewebes auf und stellen eine nachweisbare Veränderung bei der Charakterisierung des Signals des an das Gewebe gebundenen Kontrastmittels bereit.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Diagnostische Bilderzeugungsverfahren, wie z. B. Magnetresonanz-Bilderzeugung (MRI), Röntgenstrahlen, Radionuklid-Pharmaka-Bilderzeugung, optische (ultraviolette, sichtbares und/oder infrarotes Licht) Bilderzeugung und Ultraschall-Bilderzeugung, werden in der medizinischen Diagnostik seit mehreren Jahren verwendet. In einigen Fällen findet die Verwendung von Kontrastvermittlern seit vielen Jahren statt, um die Bildqualität zu verbessern, oder um eine spezielle Information zu liefern. In anderen Fällen, wie z. B. bei der optischen oder der Ultraschall-Bilderzeugung, steht die Einführung von Kontrastmitteln kurz bevor oder erfolgte vor Kurzem.

[0003] Kernspintomographie (MRI) und optische Bilderzeugungsverfahren sind in ihrer Art der Bilderzeugung einzigartig, da sie komplexe Signale liefern, die gegenüber der chemischen Umgebung und dem Zustand des Zielgewebes empfindlich sind. Während das Signal von Röntgenstrahlen oder Radionukliden gleich bleibt, egal ob die Mittel frei im Plasma, an Proteine gebunden oder im Knochen gefangen sind, haben bestimmte Mittel für die Kernspintomographie (MRI) und die optische Bilderzeugung unterschiedliche Signaleigenschaften in unterschiedlichen physiologischen Umgebungen und pathologischen Zuständen. Zum Beispiel können durch die Bindung an Gewebebestandteile die MRI-Kontrastmittel Veränderungen in den induzierten Relaxationsraten oder chemische Verschiebungen von benachbarten oder angehängten Atomkernen anzeigen. In ähnlicher Weise kann ein optischer Farbstoff Veränderungen seiner Extinktion, Reflexionsfähigkeit, Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, Lichtstreuung oder anderer spektraler Eigenschaften bei der Bindung aufweisen.

[0004] Im Allgemeinen muß das Kontrastmittel, um diagnostische Daten zu liefern, mit der Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung, die bei dem Bilderzeugungsverfahren verwendet wird, in Wechselwirkung treten, die physikalischen Eigenschaften des Gewebes verändern, um ein verändertes Signal zu liefern, oder, wie im Falle von Radiopharmazeutika, selbst die Quelle der Strahlung darstellen. Üblicherweise verwendete Materialien umfassen organische Moleküle, Metallionen, Salze oder Chelate, einschließlich Metallchelate, Partikel (insbesondere Eisenpartikel) oder markierte Peptide, Antikörper, Proteine, Polymere oder Liposomen.

[0005] Nach der Verabreichung diffundieren einige Mittel unspezifisch durch die Körperkompartimente bevor sie metabolisiert und/oder ausgeschieden werden; diese Mittel sind allgemein als unspezifische Mittel bekannt. Dagegen besitzen andere Mittel eine spezifische Affinität für ein bestimmtes Körperkompartiment, eine Zelle, einen Zellbestandteil, ein Organ oder ein Gewebe; diese Mittel können als Mittel zur gezielten Anwendung bezeichnet werden.

[0006] Eine Anwendung für diagnostische Bilderzeugungsverfahren bestand in der Überwachung von Interventionstherapien. Herkömmliche Interventionstherapien umfassen das Anzielen eines unerwünschten Gewebes oder eines Gewebebestandteils mit hoher Hitzeenergie unter Verwendung des fokussierten Ultraschalls (z. B. Cline et al., „MR Temperature Mapping of Focused Ultrasound Surgery“, Mag. Resn. Med. 31: 628–636 (1994)), Radiofrequenzgeneratoren (z. B. Rossi et al., „Percutaneous RF Interstitial Thermal Ablation in the Treatment of Hepatic Cancer“, AJR 167: 759–758 (1996)), Mikrowellenantennen (z. B. Schwarzmaier et al., „Magnetic Resonance Imaging of Microwave Induced Tissue Heating“, Mag. Resn. Med. 33: 729–731 (1995)) und Laser (z. B. Vogl et al., „Recurrent Nasopharyngeal Tumors: Preliminary Clinical Results with Interventional MR Imaging-Controlled Laser-Induced Thermotherapy“, Radiology 196: 725–733 (1995)); die Verwendung der Kryoablation (Abtragung durch Kälte; d. h. flüssiger Stickstoff) und die Injektion denaturierender Flüssigkeiten (z. B. Ethanol, heiße Kochsalzlösung) direkt in das unerwünschte Gewebe (z. B. Nagel et al., „Contrast-Enhanced MR Imaging of Hepatic Lesions Treated with Percutaneous Ethanol Ablation Therapy“, Radiology 189: 265–270 (1993) und Honda et al., „Percutaneous Hot Saline Injection Therapy for Hepatic Tumors: An Alternative to Percutaneous Ethanol Injection Therapy“, Radiology 190: 53–57 (1994)); die Injektion von

chemotherapeutischen und/oder chaotischen Mitteln in das Gewebe (z. B. 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)) und photodynamische Therapien, bei denen ein cytotoxisches Mittel durch die Bestrahlung mit Licht in vivo aktiviert wird (z. B. Dodd et al., „MRI Imaging of the Effects of Photodynamic Therapy on Prostate Tumors“, Proc. Soc. Mag. Resn. 3: 1368, ISSN 1065-9889 (19.–25. August, 1995)). Das gemeinsame Ziel aller dieser Interventionstherapien ist die Behandlung eines unerwünschten Gewebes oder Gewebebestandteils (d. h. eines krebsartigen, tumorösen, neoplastischen Gewebes oder Gewebebestandteils) durch das Hervorrufen einer Nekrose, einer Abtragung, einer Koagulierung oder einer Denaturierung eines solchen Gewebes.

[0007] Darüber hinaus offenbart WO 86/23526 diagnostische Bilderzeugungskontrastmittel mit verlängerter Blutrückhaltezeit, die unter anderem eine an Plasmaproteine bindende Einheit, eine das Bild verstärkende Einheit und eine die Bluthalbwertszeit verlängernde Einheit besitzen, sowie Verfahren, um sie bei der diagnostischen Bilderzeugung zu verwenden.

[0008] Hynynen et al., Investigative Radiology, Bd. 29, Nr. 10, 1994, 897–903 bezieht sich auf die Nützlichkeit eines Kontrastmittels und der Aufzeichnung einer durch einen Gradienten erzeugten Fließgleichgewichts-Bildsequenz für durch Kernspintomographie geleitete, nicht invasive Ultraschall-Operationen.

[0009] Seibel et al., Surgical Endoscopy, Bd. 11, Nr. 2, 1997, 154–162 diskutieren eine durch Bilderzeugung geleitete, minimal invasive Therapie.

[0010] Ultrasound in Med. and Biol., Bd. 19, Nr. 1, 1993, 91–92 von Hynynen et al. bezieht sich auf die Durchführbarkeit der Verwendung der Kernspintomographie (MRI), um nicht invasive Ultraschall-Operationen zu überwachen und zu leiten.

[0011] Lauffer et al., Academic Radiology, Bd. 3, Nr.: Anhang 02, August 1996, S356–S358 offenbart MS-325 als ein kleines, die Gefäße abbildendes Mittel für die Kernspintomographie.

[0012] Um den maximalen Nutzen aus solchen Interventionsverfahren zu ziehen und um die Nebenwirkungen (z. B. Schäden an benachbarten Geweben) zu minimieren, ist es notwendig, die Wirksamkeit der Therapie in vivo zu überwachen. Tatsächlich muß, um wirklich wirksam zu sein, die Interventionstherapie bis zum vollständigen „Tod“ des unerwünschten Gewebes oder des Gewebebestandteils fortgesetzt werden (keine Überlebensfähigkeit nach der Entfernung oder dem Abschluß der Therapie). Daher muß man nicht nur in der Lage sein, den Fortschritt der Therapie genau zu überwachen, um eine übermäßige Behandlung und mögliche Schäden an benachbarten Geweben zu vermeiden, sondern muß auch in der Lage sein, exakt zwischen wirklich nekrotischem Gewebe und solchen Geweben zu unterscheiden, die bis zu einem gewissen Grad verletzt worden sein könnten, aber dennoch lebensfähig geblieben sind.

[0013] Ein Weg, um die Wirksamkeit der Interventionstherapie zu überwachen, besteht darin, das unerwünschte Gewebe oder den Gewebebestandteil während oder nach einer solchen Therapie abzubilden. Jedes dieser diagnostischen Bilderzeugungsverfahren muß jedoch in der Lage sein, den Kontrast zwischen den Geweben unterschiedlicher pathologischer Zustände (nativ gegenüber denaturiert, lebensfähig gegenüber nekrotisch) auf eine solche Weise zu steigern, dass zwei grundlegende Klassen an Information bereitgestellt werden:

- 1) Nachweisdaten. Dies umfaßt spektroskopische Informationen, die dazu nötig sind, den pathologischen Zustand des abgebildeten Gewebes zu bestimmen. Die Fähigkeit, diese Klasse an Information zu liefern, betrifft die „Spezifität“ und die „Empfindlichkeit“ des Mittels.
- 2) Rückmeldung und Auflösung. Diese Klassen an Informationen liefert die Überwachung von therapeutischen Interventionsverfahren, die Gewebe oder Gewebebestandteile zerstören oder abbauen. Es wird erwartet, dass bei einigen Interventionsverfahren eine Rückmeldung „in Echtzeit“ (etwa 1–10 Sekunden) des Fortschritts der Therapie bevorzugt wird, während bei anderen Verfahren eine Bewertung nach der therapeutischen Behandlung angebracht ist. Bei allen Interventionstherapien ist eine präzise räumliche Auflösung (etwa 1–5 mm) des behandelten Gewebes und aller Wirkungen auf die umgebenden Gewebe während der Behandlung wünschenswert.

[0014] Die derzeitigen auf der Kernspintomographie (MRI) basierenden Verfahren zur Überwachung der Wirksamkeit von Interventionstherapien gehören im Allgemeinen einer der folgenden beiden Klassen an: (1) solche, die kein exogenes Kontrastmittel verwenden, aber auf einigen anderen beobachtbaren MR-Parametern basieren (siehe nachstehend); und (2) solche, die unspezifische, extrazelluläre Kontrastmittel verwenden. Diese Verfahren liefern jedoch praktisch keine direkte Information im Hinblick auf den pathologischen Zustand des Gewebes oder des Gewebebestandteils, das/der der Interventionstherapie unterworfen wird. (z. B. ob es nativ oder denaturiert, nekrotisch oder lebensfähig ist). Weiterhin sind solche Verfahren größtenteils auf die Überwachung von Hitzeablationstherapien beschränkt und liefern eine eingeschränkte Empfindlichkeit für durch induzierte Hitze Temperaturveränderungen des Gewebes.

[0015] Einige dieser auf Kernspintomographie (MRI) basierenden Verfahren zur Überwachung von Hitzeablationstherapien basieren auf temperaturabhängigen NMR-Parametern, wie z. B. den Relaxationszeiten (T_1

und/oder T_2), der Protonenresonanzfrequenz (PRF) des Wassers, Phasenverschiebungen und dem Diffusionskoeffizienten. Diese Verfahren leiden jedoch unter einer Anzahl an Beschränkungen.

[0016] Zum Beispiel umfaßt eines dieser Verfahren die Überwachung der Wirkung der Temperatur auf die T_1 -Relaxationszeit des Gewebes, Vergleiche z. B. mit Cline et al., „MR Temperature Mapping of Focused Ultrasound Surgery“, Mag. Resn. Med. 31: 628–636 (1994). Dieser Ansatz ist jedoch nicht angemessen, da jedes Gewebe ein einzigartiges T_1 -Profil gegenüber der Temperatur besitzt, und daher erfordert dieses Verfahren die Kalibrierung (Eichung) von T_1 für jede Gewebeart. Das T_1 -Verfahren ist mit einer gewebsabhängigen Veränderung von T_1 von nur 0,01% bis 1,5% pro 1°C auch in seiner Empfindlichkeit eingeschränkt.

[0017] Ein anderes Verfahren, das Temperaturmessungen verwendet, umfaßt die Überwachung der Wirkung der Temperatur auf die Protonenresonanzfrequenz (oder die chemische Verschiebung) des Wassers. Dieses Verfahren weist Veränderungen der Wasserstoffbrückenbindungen und der Molekularbewegung von Wasser-molekülen nach, die durch Temperaturveränderungen induziert wurden. Vergleiche z. B. mit 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). Die niedrige Empfindlichkeit dieses Verfahrens (0,01 ppm/°C) erfordert jedoch die Verwendung hoher magnetischer Feldstärken (d. h. > 4,7 T), die klinisch unerwünscht ist. Darüber hinaus erfordert der Nachweis der chemischen Verschiebung von Wasser eine absolute Stabilität des Magnetfeldes und hängt ebenfalls sehr von der magnetischen Suszeptibilität des Gewebes ab, welche unter den verschiedenen Gewebearten stark variiert. Daher erfordert dieses Verfahren, wie das T_1 -Verfahren, ebenfalls eine umfangreiche Kalibrierung für jede Gewebeart. Schließlich liefert dieses Verfahren keine Information im Hinblick auf durch Hitze induzierte Nekrotisierung oder Abbauprozesse.

[0018] Ein anderes bekanntes Verfahren erfordert die Überwachung der Wirkung der Temperatur auf den Protonendiffusionskoeffizienten des Wassers. Vergleiche z. B. mit H. Saint Jalmes, „Precision in Temperature Measurement via T_1 or Diffusion Imaging“, Proc. Soc. Mag. Resn. 2: 1072, ISSN 1065–9889 (19.–25. August 1995). Dieses Verfahren hat jedoch ebenfalls seine Grenzen, da der Diffusionskoeffizient gegenüber Gewebsbewegungen und Perfusion empfindlich ist.

[0019] Bei allen der vorstehenden Verfahren können physiologische Gewebsveränderungen aufgrund eines erhöhten Blutflusses, Gewebsstoffwechsels oder induzierten Ödemen zur nicht vorhersagbaren Variierung des Signals (d. h. Veränderungen der magnetischen Suszeptibilität) führen. Diese Wirkungen verändern die Standard-Hitze-Kalibrierungskurven so, dass sie von geringem oder keinem Wert für die exakte Überwachung der Hitze-Ablationstherapie sind. Darüber hinaus kann es so sein, dass die alleinige Messung der Temperatur nicht ausreicht, um exakt die Wirkung der Gewebsabtragung oder Nebenwirkungen auf die umgebenden Gewebe zu bestimmen.

[0020] Es wurden auch Verfahren beschrieben, die die Wirkung der Temperatur auf die chemische Verschiebung anderer magnetischer Atomkerne überwachen. Zum Beispiel ist die chemische Verschiebung bei der Kobalt-NMR eine sehr empfindliche Sonde für die Temperatur. Die niedrige Empfänglichkeit von ^{59}Co erfordert jedoch hohe Feldstärken ($\geq 4,7$ T), hohe Konzentrationen und sehr lange Meßzeiten. Vergleiche mit A. G. Webb et al., „Measurement of Microwave Induced Heating of Breast Tumors in Animal Models Using Cobalt Based NMR“, Proc. Soc. Mag. Resn. 1: 72, ISSN 1065–9889 (19.–25. August, 1995). Darüber hinaus bleibt die Toxizität von Kobalt enthaltenden Mitteln eine schwerwiegende Einschränkung für die Verwendung *in vivo*.

[0021] Fluor (^{19}F)-NMR wurde ebenfalls dazu verwendet, die temperaturabhängigen Phasenveränderungen von in Liposomen verkapselften Fluorkohlenwasserstoffen und fluorierten Polymeren zu überwachen. Vergleiche mit 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 (6.–12. August 1994). Aus klinischer Sicht sind ^{19}F -Verfahren wegen der eingeschränkten Bioverteilung von polymeren fluorierten Verbindungen, der Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der fluorierten Mittel vom pH-Wert und der Gewebeart und dem Bedarf an starken magnetischen Feldern nicht nützlich. Diese Mittel liefern ebenfalls keine Daten über eine durch Hitze induzierte Gewebsnekrotisierung.

[0022] Bestimmte Kontrastmittel, die paramagnetische Metallkomplexe enthalten, wurden ebenfalls zur Überwachung der Wirksamkeit von Interventionstherapien vorgeschlagen. Solche Mittel können starke Veränderungen der chemischen Verschiebung der Protonen (20–40 ppm) des chelatbildenden Liganden gegenüber dem normalen Bereich der Resonanzfrequenz des Wassers induzieren. Durch die paramagnetische Verschiebung der Resonanzen fort von dem Hauptteil der Resonanz des Wassers *in vivo*, können diese Resonanzen beobachtet werden. Vergleiche z. B. mit 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 (19.–25. August 1995). Obwohl diese hyperfeinen verschobenen Resonanzen temperaturabhängig sind, erfordern sie die Verwendung hoher Konzentrationen des paramagnetischen Komplexes und die klinisch unpraktischen, starken Magnetfelder, um Temperaturveränderungen nachzuweisen. Diese Komplexe liefern ebenfalls keine Daten über eine durch Hitze induzierte Gewebsnekrotisierung.

[0023] Vor Kurzem wurde ein Verfahren zur Unterscheidung zwischen normalem und nekrotischem Lebergewebe beschrieben. Dupas et al., „Delination of Liver Necrosis Using Double Contrast-Enhanced MRI“, J. MRI.

Bd. 7, Nr. 3, S. 472–77 (1997). Dieses Verfahren umfaßt jedoch die Verwendung von unspezifischen Kontrastmitteln, was seine Fähigkeit einschränkt, Zustandsveränderungen des unerwünschten Gewebes oder des Gewebebestandteils spezifisch zu überwachen. Darüber hinaus erfordert dieses Verfahren die Verabreichung mehrerer Kontrastmittel.

[0024] Somit sind die bekannten diagnostischen Bilderzeugungsverfahren dadurch eingeschränkt, dass sie keine exakte Information über den Zustand des spezifischen Gewebes oder des Gewebebestandteils liefern, das/der einer Interventionstherapie unterworfen wird (d. h., ob sich das Gewebe in seinem nativen oder in einem denaturierten Zustand befindet, und ob es nekrotisch oder lebensfähig ist). Daher besteht ein Bedarf an einem diagnostischen Bilderzeugungsverfahren, das nicht-invasiv und exakt den Zustand eines bestimmten Gewebes oder eines Gewebebestandteils überwachen kann, und das gegebenenfalls eine rasche Rückmeldung über eine induzierte Nekrosierung des Gewebes während Interventionstherapien liefern kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung eines Kontrastmittels zur Herstellung eines diagnostischen Mittels zur Überwachung eines Bildkontrasts bereit, insbesondere bei der Kernspintomographie (MRI) und der optischen Bilderzeugung eines spezifischen Gewebes oder eines Gewebebestandteils während einer Interventionstherapie, wobei das Kontrastmittel, das verabreicht werden soll,

- (a) in der Lage ist, an ein Zielgewebe oder einen Zielgewebebestandteil zu binden, das/der einer Interventionstherapie unterzogen wird oder unterzogen worden ist;
- (b) eine spezifische Affinität für das Gewebe oder den Gewebebestandteil aufweist; und wobei
- (c) ein für das Kontrastmittel charakteristisches Bildsignal überwacht wird, um festzustellen, ob die Interventionstherapie abgeschlossen ist.

[0026] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Kontrastmittel umfassen eine bildverstärkende (oder signalerzeugende) Einheit („IEM“) und eine vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit („SDTB“). Diese Kontrastmittel sind in der Lage, eine vom Zustand abhängige Bindung an ein Zielgewebe oder einen Zielgewebebestandteil aufzuzeigen. Eine solche Bindung führt zu einer nachweisbaren Veränderung der Signaleigenschaften des Kontrastmittels und erlaubt daher den Nachweis von Zustandsveränderungen innerhalb eines Zielgewebes (z. B. Abtragung, Abbau oder Denaturierung), das einer Interventionstherapie unterzogen wird oder unterzogen wurde.

[0027] Bei einem Aspekt dieser Erfindung erlaubt die Verwendung der Kontrastmittel die „Echtzeit“-Überwachung während der Hitze-Interventionstherapie der durch Hitze induzierten Nekrosierung. Diese Kontrastmittel weisen einen erhöhten Kontrast zwischen Geweben auf, die sich in unterschiedlichen Zuständen befinden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0028] **Fig. 1** ist eine graphische Darstellung experimenteller Daten über die Wirkungen, die Veränderungen der Temperatur auf die beobachtete Relaxationsfähigkeit (R_1) von HSA-Lösungen mit und ohne Verwendung eines Kontrastmittels besitzen.

[0029] **Fig. 2** ist eine graphische Darstellung experimenteller Daten über den Verlust der Signalintensität von MRI-Bildern im ROI (Bereich von Interesse) im Verlauf der Zeit, die unter Verwendung von HSA-Lösungen mit und ohne Kontrastmittel erzeugt wurden.

[0030] **Fig. 3** ist eine graphische Darstellung experimenteller Daten über die Wirkungen, die Veränderungen der Ethanolkonzentration auf die beobachtete Relaxationsfähigkeit (R_1) von HSA-Lösungen mit und ohne Kontrastmittel besitzen.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0031] Damit die hierin beschriebene Erfindung besser verstanden werden kann, wird die folgende genaue Beschreibung fortgesetzt.

[0032] Die vorliegende Erfindung stellt ein nicht-invasives Verfahren zur exakten Überwachung der Wirksamkeit von Interventionstherapien bereit (d. h. die Überwachung des Zustands eines unerwünschten Gewebes oder eines Gewebebestandteils). Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Kontrastmittels für die Herstellung eines Diagnosemittels zur Überwachung eines Bildkontrastes während einer Interventionstherapie unter Verwendung einer Kernspintomographie (MRI) mit Kontrastverstärkung bereit, wobei das Kontrastmittel:

in der Lage ist, an ein Zielgewebe oder an einen Zielgewebebestandteil zu binden, das/der einer Interventionstherapie unterzogen wird oder unterzogen worden ist;

eine spezifische Affinität für das Gewebe oder den Gewebebestandteil aufweist;

eine bildverstärkende Einheit (IEM) und eine vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit (SDTBM) umfaßt, wobei:

die vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit bei einer Bindung an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in denaturiertem Zustand gekennzeichnet ist durch eine R_1 -Relaxationsfähigkeit, die geringer ist als etwa 80% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder an den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels; und

ein für das Kontrastmittel charakteristisches Bildsignal überwacht wird, um festzustellen, ob die Interventionstherapie abgeschlossen ist.

[0033] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Interventionstherapie“ auf eine beliebige Anzahl an therapeutischen Verfahren, bei denen das Ziel darin besteht, Nekrotisierung, Abtragung oder Koagulierung eines unerwünschten (krebsartigen, tumorösen, neoplastischen) Gewebes oder Gewebebestandteils zu induzieren oder zu verursachen.

[0034] Gleichfalls werden die Ausdrücke „pathologischer Zustand“ oder „Zustand“, wie sie hierin verwendet werden, dazu verwendet, zwei physiologische Zustandsbedingungen eines Gewebes oder eines Gewebebestandteils in weitestem Sinne zu beschreiben, das/der einer Interventionstherapie unterworfen wird. Ein Zustand kann als lebend, nativ oder lebensfähig angesehen werden. Dieser „Anfangs“-Zustand beschreibt gewöhnlich das Gewebe bevor es einer Interventionstherapie unterworfen wurde und in dem die Gewebs- und/oder die zellulären Mechanismen, wie z. B. Stoffwechsel und Atmung, funktionsfähig sind. Der „zweite“ Zustand, der das Gewebe während oder nachdem es einer erfolgreichen Therapie unterzogen wurde beschreibt, kann als nicht lebensfähig, denaturiert, nekrotisch oder apoptotisch angesehen werden und als ein Zustand, in dem solche Gewebs- und/oder zellulären Mechanismen fehlgeleitet, nicht funktionsfähig oder eingeschaltet worden sind.

[0035] Die hierin beschriebene erfinderische Verwendung umfaßt die Verwendung eines Kontrastmittels für die Herstellung eines Diagnosemittels zur Überwachung eines Bildkontrastes während einer Interventionstherapie unter Verwendung einer Kernspintomographie (MRI) mit Kontrastverstärkung, wobei das Kontrastmittel: in der Lage ist, an ein Zielgewebe oder an einen Zielgewebebestandteil zu binden, das/der einer Interventionstherapie unterzogen wird oder unterzogen worden ist;

eine spezifische Affinität für das Gewebe oder den Gewebebestandteil aufweist;

eine bildverstärkende Einheit (IEM) und eine vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit (SDTBM) umfaßt, wobei:

die vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit bei einer Bindung an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in denaturiertem Zustand gekennzeichnet ist durch eine R_1 -Relaxationsfähigkeit, die geringer ist als etwa 80% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder an den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels; und

ein für das Kontrastmittel charakteristisches Bildsignal überwacht wird, um festzustellen, ob die Interventionstherapie abgeschlossen ist.

[0036] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Kontrastmittel umfassen eine bildverstärkende (oder signalerzeugende) Einheit („IEM“) und eine vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit („SDTBM“). Durch die Kombination dieser Einheiten, die nachstehend genauer definiert werden, sind die Kontrastmittel in der Lage, eine vom Zustand abhängige Bindung an ein Zielgewebe oder einen Zielgewebebestandteil anzuzeigen und Signaleigenschaften aufzuzeigen, die bei einer Bindung an das Ziel verändert sind.

[0037] „Vom Zustand abhängige Bindung“ bezieht sich auf die relative Affinität, die das Kontrastmittel für das Zielgewebe oder den Zielgewebebestandteil zeigt, die vom Zustand des Zielgewebes abhängt. Somit besitzen die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Mittel eine höhere oder eine geringere Bindungsaffinität für einen oder mehrere Gewebebestandteile in ihrem denaturierten oder nekrotischen Zustand, verglichen mit der Bindungsaffinität des Mittels für natives oder lebensfähiges Gewebe.

[0038] Diese vom Zustand abhängige Veränderung der Bindung führt zu einer Lokalisierung des Mittels in dem Gewebe eines Zustands gegenüber dem Gewebe im anderen Zustand, während gleichzeitig die Signaleigenschaften des Mittels verändert werden, um den Nachweis der auftretenden Zustandsveränderung zu verstärken. Wenn zum Beispiel das Mittel eine höhere Bindungsaffinität für lebensfähiges oder natives Gewebe zeigt, wobei eine erhöhte Bindungsaffinität zu einem intensiveren Signal führt, wird das lebensfähige Gewebe als ein „heißer Fleck“ abgebildet (oder nachgewiesen). Im Verlauf der Interventionstherapie wird dieser heiße Fleck aufgrund der verminderten Bindungsaffinität des Mittels für das nekrotische Gewebe „kalt“, da das lebende Gewebe nekrotisch wird. Umgekehrt entwickelt sich das Gewebe als heißer Fleck im Verlauf der Therapie, wenn das Mittel eine höhere Bindungsaffinität für nekrotisches oder nicht lebensfähiges Gewebe aufweist.

[0039] Es wird bevorzugt, dass die vom Zustand abhängige Bindungsaffinität des Mittels eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen des physiologischen Zustands aufweist. Die bevorzugten Mittel sind solche, die eine bestimmte Bindungsaffinität und entsprechende Signalveränderungen aufweisen, die empfindlich reguliert werden, um den Zustandsveränderungen zu entsprechen, denen das Gewebe oder der Gewebebestandteil unterzogen wird. In einem Aspekt der Erfindung wird durch die Überwachung der Veränderung des

Signals im Verlauf des intervenierenden Therapieverfahrens die empfindliche Echtzeit-Überwachung der Wirksamkeit und des Ausmaßes der Gewebsabtragung verstärkt.

Struktur der Kontrastmittel

[0040] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Kontrastmittel müssen mindestens eine bildverstärkende (oder signalerzeugende) Einheit („IEM“) und eine vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit („SDTBM“) umfassen. Ein physiologisch verträglicher verbindender Rest („L“) kann gegebenenfalls dazu verwendet werden, die IEM an die SDTBM anzuheften. Beispiele für geeignete Verbindungsreste umfassen lineare, verzweigte oder cyclische Alkyl-, Alkyl-, Aryl-, Ether-, Polyhydroxy-, Polyether-, Polyamin-, heterocyclische, Peptid-, peptidähnliche, Phosphat-, Sulfat- oder andere physiologisch verträgliche kovalente Verbindungsstücke. Der Verbindungsrest kann dem Komplex eine wichtige physikochemische Stabilität durch die Erhöhung der Halbwertszeit im Blut oder in anderen biologischen Flüssigkeiten oder Kompartimenten verleihen. Der Verbindungsrest kann ebenfalls ein Mittel für den biologischen Abbau und die anschließende Ausscheidung des Mittels bereitstellen.

1. Die bildverstärkende Einheit (IEM)

[0041] Die erste Domäne der in der vorliegenden Erfindung verwendeten Kontrastmittel ist eine IEM, die eine beliebige Chemikalie oder ein Stoff sein kann, die/der dazu verwendet wird, das Signal oder den Kontrast bei der Bilderzeugung bereitzustellen. Die IEM muß in der Lage sein, ein unterschiedliches Signalcharakteristikum im Vergleich zu dem des freien Mittels zu erzeugen, wenn das Mittel an ein Gewebe oder an einen Gewebebestandteil gebunden wird. Bei der optischen Bilderzeugung kann dies eine Veränderung der Extinktion, Reflexionsfähigkeit, Fluoreszenz, Streuung, Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, eine Zunahme oder eine Abnahme der Zahl der Absorptionsbanden oder eine beliebige Veränderung ihrer Wellenlängenmaxima oder irgendeine andere beliebige Veränderung sein, die bei dem externen Nachweis einer gebundenen IEM entspricht. Bei der Kernspintomographie (MRI) kann dies eine Veränderung in den induzierten Relaxationsraten der Protonen des Wassers sein ($1/T_1$ oder $1/T_2$) oder anderer beliebiger benachbarter Atomkerne, oder eine Verschiebung einer oder mehrerer Banden im NMR-Spektrum entweder der IEM oder von Banden, die von Atomkernen an der Bindestelle für die SDTBM stammen.

[0042] Demgemäß kann die IEM ein organisches Molekül, ein Metallion, ein Salz oder ein Chelat, einschließlich Metallchelaten; ein Metallcluster oder -partikel (insbesondere Eisenpartikel); oder ein markiertes Peptid, Protein, Polymer oder Liposom sein. Bei der optischen Bilderzeugung (die ultraviolette, sichtbares oder infrarotes Licht verwendet), kann die IEM auch ein beliebiger organischer oder anorganischer Farbstoff sein. Beispiele für nützliche organische Farbstoffe umfassen Indocyaningrün und Fluorescein. Beispiele für anorganische Farbstoffe umfassen lumineszente Metallkomplexe, wie z. B. solche von Eu(III), Tb(III) und anderen Lanthanidenionen (Ordnungszahlen 57–71). Vergleiche mit W. Dew. Horrocks & M. Albin, Pro r. Inorg. Chem. 31, S. 1–104, 1984.

[0043] Eine besonders nützliche IEM ist eine physiologisch verträgliche Metallchelatverbindung, die aus einem oder mehreren cyclischen oder acyclischen organischen Chelatbildnern besteht, die mit einem oder mehreren Metallionen komplexiert sind. Bei der optischen Bilderzeugung umfassen die bevorzugten Metallionen solche mit den Ordnungszahlen 13, 21–31, 39–42, 44–50 oder 57–83. Bei der Kernspintomographie (MRI) umfassen die bevorzugten Metallionen solche mit den Ordnungszahlen 21–29, 42, 44 oder 57–83 und noch bevorzugter eine paramagnetische Form eines Metallions mit den Ordnungszahlen 21–29, 42, 44 oder 57–83. Wenn die IEM ein paramagnetisches Metallchelat umfaßt, ist das bevorzugte paramagnetische Metall ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus: Gd(III), Fe(III), Mn(II und III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III und IV), Ho(III), Er(III), Pr(III) und Eu(II und III). Am stärksten wird Gd(III) bevorzugt.

[0044] Wenn die IEM ein Metallchelat ist, darf sie nicht in größerem Maße dissoziieren während das Mittel den Körper einschließlich des Zielgewebes passiert. Ein signifikante Freisetzung freier Metallionen und insbesondere freier paramagnetischer Metallionen kann zur Toxizität führen, die nur bei pathologischen Geweben tolerierbar wäre.

[0045] Im Allgemeinen steht der Grad der Toxizität eines Metallchelats in Beziehung zu seinem Dissoziationsgrad in vivo vor der Ausscheidung. Die Toxizität steigt im Allgemeinen mit der Menge an freien Metallionen an. Bei Komplexen, bei denen die kinetische Labilität hoch ist, ist eine hohe thermodynamische Stabilität (eine Bildungskonstante von mindestens 10^{15} M^{-1} und noch bevorzugter von mindestens 10^{20} M^{-1}) wünschenswert, um die Dissoziation und die sie begleitende Toxizität zu minimieren. Bei Komplexen, bei denen die kinetische Labilität vergleichsweise niedriger ist, kann die Dissoziation durch eine niedrigere Bildungskonstante, d. h. 10^{10} M^{-1} oder höher, minimiert werden.

[0046] Die Toxizität ist auch eine Funktion der Anzahl an offenen Koordinationsstellen im Komplex. Im Allgemeinen erniedrigen weniger Koordinationsstellen für Wasser die Tendenz des Chelatbildners das paramagne-

tische Metall freizusetzen. Daher wird bevorzugt, dass der Komplex zwei, eine oder keine offene Koordinationsstellen trägt. Das Vorhandensein von mehr als zwei Stellen wird im Allgemeinen die Toxizität durch die Freisetzung des Metallions *in vivo* in nicht mehr tolerierbarer Weise erhöhen.

[0047] Um die Kernspintomographie (MRI)-Bilder wirksam zu verstärken, muß der Komplex in der Lage sein, die Relaxationsraten $1/T_1$ (longitudinal oder Spin-Gitter) und/oder $1/T_2$ (transversal, oder Spin-Spin) der Protonen des Wassers oder anderer bildzeugender oder spektroskopischer Atomkerne, einschließlich von Protonen, P-31, C-13, Na-23 oder F-19 an der IEM, anderen Biomolekülen oder injizierten Biomarkern zu erhöhen. Die Relaxationsfähigkeiten R_1 und R_2 sind als die Fähigkeit definiert, $1/T_1$, beziehungsweise $1/T_2$ pro mM Metallion (d. h., $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) zu erhöhen. In der am meisten gebräuchlichen Form der klinischen Kernspintomographie (MRI), der Wasserprotonen-MRI, ist die Relaxationsfähigkeit optimal, wenn das an den chelatbildenden Liganden gebundene paramagnetische Ion immer noch eine oder mehrere offene Koordinationsstellen zum Wasseraustausch besitzt (R. B. Lauffer, Chemical Reviews 87, S. 901–927 (1987)). Dies muß jedoch mit der Stabilität des Metallchelats (siehe nachstehend) im Gleichgewicht stehen, die im Allgemeinen mit einer steigenden Anzahl an offenen Koordinationsstellen abnimmt. Daher enthält der Komplex noch bevorzugter nur eine oder zwei offene Koordinationsstellen.

[0048] Die Art des chelatbildenden Liganden kann die Rate des Wasseraustausches eines MRI-Mittels stark beeinflussen. Insbesondere kann die Wasseraustauschrate eine signifikante Rolle bei dem Gewebekontrast spielen, der bei Hitze-Ablationstherapien erzeugt wird. Im Allgemeinen ergibt eine höhere Wasseraustauschrate einen höheren R_1 -Wert, wegen der höheren Anzahl an Wassermolekülen, die mit dem paramagnetischen Zentrum in Wechselwirkung treten; umgekehrt ergibt eine geringere Austauschrate einen niedrigeren R_1 -Wert. Somit zeigt ein Metallchelatkomplex, der eine langsame Wasseraustauschrate ($\text{kex-298 K} = 500\text{--}10.000 \text{ ns}$) besitzt, im Allgemeinen eine Erhöhung von $1/T_1$ (R_1), wenn die Temperatur zunimmt, was die positive Wirkungen einer erhöhten thermischen Bewegung der Wassermoleküle und einen erhöhten Wasseraustausch nahe dem paramagnetischen Zentrum widerspiegelt; der R_1 -Wert erreicht dann gewöhnlich bei einer höheren Temperatur als der physiologischen, einen maximalen Kontrastwert. Ab einer bestimmten Temperatur fällt dann der Kontrast auf Minimalwerte, da die nützliche Wirkung eines erhöhten Wasseraustausches durch die nicht ausreichende Menge an Zeit, die jedes Wassermolekül in der Nähe des paramagnetischen Zentrums verbringt, aufgewogen wird.

[0049] Ein Metallchelat mit einer mäßig schnellen Wasseraustauschrate ($\text{kex-298 K} = 10\text{--}100 \text{ ns}$) wird eine relativ flache Abhängigkeit von $1/T_1$ (R_1) mit der Temperatur zeigen, die dann bei einer etwas höheren Temperatur abfällt, wiederum, weil unter solchen Bedingungen jedes Wassermolekül einen nicht ausreichenden Zeitraum in der Nähe des paramagnetischen Zentrums verbringt.

[0050] Ein Metallchelat mit einer sehr schnellen Wasseraustauschrate ($\text{kex-298 K} = 0,1\text{--}10 \text{ ns}$) wird bei physiologischen und bei höheren Temperaturen einen abnehmenden $1/T_1$ -Wert zeigen, da die erhöhte thermische Bewegung der Wassermoleküle die Zeit, die jedes Wassermolekül in der Nähe des paramagnetischen Zentrums verbringt, weiter einschränkt. Ein solches Chelat wird jedoch eine Erhöhung des $1/T_1$ -Wertes bei niedrigeren Temperaturen (d. h. Gefriertemperaturen) aufweisen, aufgrund der erhöhten Zeit, die jedes Wassermolekül in Nachbarschaft des paramagnetischen Metalls verbringt.

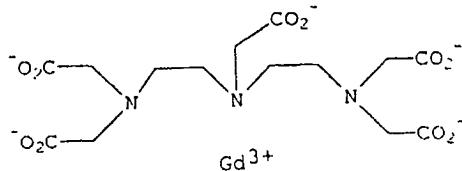
[0051] Wenn das Verfahren der vorliegenden Erfindung dazu verwendet wird, Hitze-Ablationstherapien zu überwachen, wird bevorzugt, dass Chelate mit einem mäßig schnellen Wasseraustausch als IEM verwendet werden, um den Kontrast zwischen dem anfänglichen nativen Gewebezustand (R_1 -Anfangswert) und dem denaturierten oder nekrotischen Gewebezustand (R_1 -Zweitwert) zu maximieren. Bei den Therapien, die Gefriertechniken verwenden, wird bevorzugt, Chelate mit sehr schnellen Wasseraustauschraten anzuwenden, um einen gezielten Vorteil aus der Erhöhung von $1/T_1$ (R_1) zu ziehen, wenn die Temperatur erniedrigt wird. Bei allen Verfahren der Interventionstherapie wird bevorzugt, dass die Empfindlichkeit des R_1 -Profils im Hinblick auf den Gewebezustand exakt mit dem Denaturierungsprofil des Gewebes oder des Gewebebestandteils von Interesse zusammenfällt.

[0052] Neben der Erhöhung des $1/T_1$ - oder des $1/T_2$ -Wertes der Atomkerne des Gewebes über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, können die MRI-Mittel zwei weitere magnetische Eigenschaften beeinflussen und daher klinisch von Nutzen sein:

- 1) ein Eisenpartikel oder ein Metallchelat mit hoher magnetischer Suszeptibilität, insbesondere Chelate von Dy, Gd oder Ho, können die MRI-Signalintensität des Gewebes durch die Erzeugung von mikroskopisch kleinen Gradienten der magnetischen Suszeptibilität verändern (A. Villringer et al., Magn. Reson. Med. 6, S. 164–174 (1988)). Bei dieser Anwendung sind keine offenen Koordinationsstellen auf dem Chelat erforderlich.
- 2) ein Eisenpartikel oder ein Metallchelat kann auch dazu verwendet werden, die Resonanzfrequenz von Wasserprotonen oder von anderen bildzeugenden oder spektroskopischen Atomkernen, einschließlich von Protonen, P-31, C-13, Na-23 oder F-19 auf dem injizierten Mittel oder auf dem Gewebebestandteil an den es bindet, zu verschieben. Hierbei können in Abhängigkeit von dem Atomkern und der verwendeten Strategie, null bis drei offene Koordinationsstellen verwendet werden.

[0053] Der organische chelatbildende Ligand sollte physiologisch verträglich sein. Die Molekülgröße des chelatbildenden Liganden sollte zu der Größe des paramagnetischen Metalls passen. Daher erfordert Gd(III), das im Kristall einen Ionenradius von 0,938 Å besitzt, einen größeren chelatbildenden Liganden als Eisen (III), das einen Kristall-Ionenradius von 0,64 Å hat.

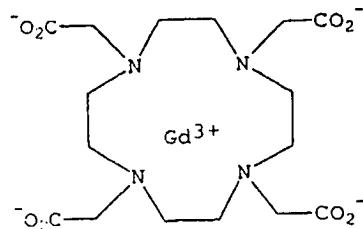
[0054] Es sind viele geeignete chelatbildende Liganden für MRI-Mittel im Fachgebiet bekannt. Diese können ebenfalls für Metallchelate für andere Formen der biologischen Bildherstellung verwendet werden. Bevorzugte IEMs umfassen:



Magnevist

Gadopentetetra-meglumin

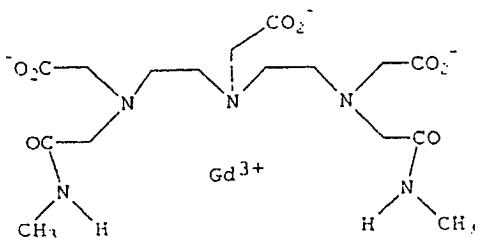
DTPA



Dotarem

Gadoterat-meglumin

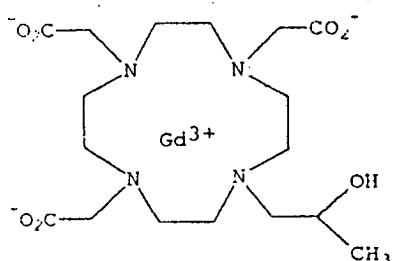
DOTA



Omniscan

Gadodiamid

DTPA-BMA



ProHance

Gadoteridol

HP-DO3A

[0055] Im Fachgebiet ist bekannt, dass bei bestimmten Anwendungen Gd³⁺ durch andere Metalle ersetzt werden kann.

2. Die vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit (SDTBM)

[0056] Die zweite Domäne der Kontrastmittel, die in dieser Erfindung verwendet werden, ist eine vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit (SDTBM), die dem Mittel die Ziel-Funktionalität verleiht. Die SDTBM kann in Abhängigkeit von der Anwendung von Interesse hoch variabel sein. Daher wird die spezifische Struktur der SDTBM von dem spezifischen Gewebe oder dem Gewebebestandteil abhängen, an das/den die Bildung erfolgen soll. Im Allgemeinen muß jedoch die SDTBM das Kontrastmittel mit einer vom Zustand abhängigen Veränderung der Bindungsaffinität für das Zielgewebe oder den Zielgewebebestandteil ausstatten. Diese vom Zustand abhängige Veränderung der Bindungsaffinität muß ebenfalls zu einer nachweisbaren Veränderung der Signaleigenschaften des Kontrastmittels führen. Die Veränderung der Bindungsaffinität sollte ausreichend empfindlich sein, und die Anzahl an Bindestellen ausreichend groß, so dass ein Kontrast erzeugt wird, wenn sich der Zustand des Gewebes verändert.

[0057] Das SDTBM kann ein kleines Molekül oder alternativ ein Biomolekül umfassen. Biomoleküle können in Molekulargewicht und Größe variieren, aber alle haben die gleiche grundsätzliche Eigenschaft gemeinsam, dass sie biologischen Ursprungs sind, oder dass sie aus natürlich vorkommenden Untereinheiten (d. h. Aminosäuren oder Nucleotiden) synthetisiert werden. Beispiele für Biomoleküle umfassen Rezeptorliganden, Saccharide, Lipide, Hormone, Peptide, Proteine, Nucleotide und Nucleinsäuren (DNA, RNA) und Antikörper, einschließlich ihrer Fragmente, sowie monoklonale und gentechnisch hergestellte Versionen.

[0058] Kleine Moleküle sind dagegen wohlbekannte, synthetisch hergestellte, organische Moleküle mit relativ niedrigem Molekulargewicht, die wenig oder keine chemische Ähnlichkeit mit Biomolekülen aufweisen. Kleine Moleküle umfassen typischerweise keine Untereinheiten von Biomolekülen und Bindungen (z. B. natürliche Aminosäuren, die durch Amidbindungen verknüpft sind). Beispiele für kleine Moleküle umfassen synthetische Drogen, lipophile oder amphiphile organische Moleküle und Porphyrine.

[0059] Noch stärker bevorzugte SDTBMs sind solche, die reversibel an Proteine im Plasma, im Interstitialraum (der Flüssigkeit zwischen den Zellen) oder im Intrazellularraum binden. Obwohl jedes Biomolekül oder kleines Molekül, das an ein Protein bindet, verwendet werden kann, sind am nützlichsten diejenigen, die an Proteine binden, welche entweder in hohen Konzentrationen vorliegen oder eine große Anzahl an Bindestellen für bestimmte Liganden besitzen. Da der native Zustand vieler Proteine in den Geweben, im Plasma oder im Interstitial- oder Intrazellularraum strukturell und chemisch gewöhnlich besser definiert ist als im denaturierten oder im entfalteten Zustand, besteht ein bevorzugter Aspekt der Erfindung darin, die SDTBM so zu entwerfen, dass sie mit höherer Affinität an solche native Zustände als an die entsprechenden denaturierten Zustände bindet. Dieser Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen den nativen und den denaturierten Zuständen führt zu einer nachweisbaren Veränderung der Signaleigenschaften des Mittels.

[0060] Eine quantitative Messung der Fähigkeit eines Kontrastmittels, Wasserprotonen zu relaxieren, und folglich das MRI-Bild zu beeinflussen, wird durch seine Relaxationsfähigkeit bereitgestellt. Wie vorstehend beschrieben, ist Relaxationsfähigkeit die Abhängigkeit der Intensität des Wasserprotonensignals von der Konzentration an paramagnetischen Metallionen in Lösung. Die Relaxationsfähigkeit ist definiert als die induzierte T_1 - oder T_2 -Relaxation pro Zeiteinheit (R_1 oder R_2 in der Einheit $\text{mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$), die für ein Kontrastmittel beobachtet wird, wobei die Konzentration des Mittels in Millimol (mM) angegeben wird.

[0061] Die physikalischen Eigenschaften eines Gadoliniumkomplexes beeinflussen die Relaxationsfähigkeit eines Kontrastmittels. Die Anzahl an Wassermolekülen, die an den Gadoliniumkomplex gebunden sind, die Rate des Austausches der Wassermoleküle mit der Haupt-Lösungsmenge, die Relaxationszeit der sieben nicht gepaarten Elektronen und die Rotationstaumelzeit (bekannt als Rotationskorrelationszeit) des Kontrastmittels in Lösung tragen alle zur beobachteten Gesamt-Relaxationsfähigkeit bei. Eine Veränderung dieser physikalischen Eigenschaften kann die Relaxationsfähigkeit dramatisch verändern. Die Wirkung der Wasseraustauschrate auf die Relaxationsfähigkeit wurde vorstehend diskutiert. Darüber hinaus vermindert die Bindung von kleinen Gadoliniumchelaten mit relativ geringen Molekulargewichten an große Makromoleküle die Rotationstaumelzeit und erhöht die Relaxationsverstärkung um Faktoren von 3 bis 10. Die Bindung des Kontrastmittels an das Protein, verursacht, dass die magnetischen Fluktuationen zwischen dem paramagnetischen Ion und den Wasserprotonen im gleichen Zeitrahmen auftreten, wie die Larmor-Frequenz, wobei die wirksamste longitudinale (T_1) Relaxation, die möglich ist, und die größte mögliche Relaxationsfähigkeit erzeugt wird. Daher ist die vom Zustand abhängige Bindung von MRI-Kontrastmitteln an große Makromoleküle, wie z. B. Proteine, ein wirksamer Weg, das MRI-Signal (und den Kontrast) eines Zustandes gegenüber einem anderen zu erhöhen. Der Bildkontrast wird zwischen Bereichen erzeugt, die unterschiedliche Grade der Bindung des Kontrastmittels aufweisen. In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung wird der Bildkontrast zwischen Bereichen mit hoher Bindungsaffinität (dem nativen Zustand) und solchen mit niedriger Bindungsaffinität (dem denaturierten Zustand) erzeugt.

[0062] Um einen Kontrast zwischen Geweben oder Gewebebestandteilen unterschiedlicher Zustände zu erzeugen, ist es wünschenswert, dass die Veränderung der Bindungsaffinität des Kontrastmittel mindestens 20% oder mehr beträgt, wenn sich der Zustand des Gewebes verändert. Wenn zum Beispiel das Mittel im lebensfähigen Zustand eines Zielgewebes oder eines Zielgewebebestandteils (d. h. HSA) zu 90% gebunden wurde (d. h. 10% frei vorliegen), sollte das Mittel zu 72% oder weniger unter den gleichen Bedingungen im nicht mehr lebensfähigen (z. B. im denaturierten) Zustand gebunden sein. Wenn der Unterschied in der Bindungsaffinität größer ist, wird ein stärkerer Kontrast erzeugt. Es ist wünschenswert, dass die Bindungsaffinität des Kontrastmittels für den zweiten Zustand des Gewebes (der durch oder im Verlauf der Interventionstherapie entsteht), 80% oder weniger im Vergleich zur der Bindungsaffinität im zweiten Zustand, bevorzugt 50% oder weniger, bevorzugt 30% oder weniger, noch stärker bevorzugt 20% oder weniger und am meisten bevorzugt 10% oder weniger der Bindungsaffinität für den ersten Zustand des Gewebes beträgt.

[0063] Im Falle, in dem die IEM ein geeignetes Chromophor zur Verwendung bei der optischen Bildzeugung darstellt, erfordert die Erfindung, dass es einen meßbaren Unterschied zwischen den optischen Eigenschaften des nicht an das Gewebe gebundenen Arzneimittels und des an das Gewebe gebundenen Kontrastmittels gibt. Zum Beispiel wird die maximale Extinktion von Indocyaningrün nach der Bindung im Plasma oder im Blut von 770–780 nm zu 790–805 nm verschoben. Diese vom Zustand abhängige Bindung kann dazu verwendet werden, die Denaturierung des Gewebes durch die Überwachung der Verschiebung der Extinktion des Farbstoffs zu überwachen, wenn das Gewebe denaturiert wird und das Protein nicht mehr bindet. Fachleute werden es zu schätzen wissen, dass die optischen Mittel, die in dieser Erfindung nützlich sind, im Allgemeinen dazu tendieren, dem Zustand des Gewebes eine höhere Empfindlichkeit zu verleihen. Daher erfordern die optischen Mittel keinen so hohen Unterschied in der Bindungsaffinität oder einen so großen Signalunter-

schied zwischen den beiden Zuständen des Gewebes, wie die MR-Mittel der vorliegenden Erfindung, um einen ausreichenden Kontrast zu erzeugen.

[0064] Die vom Zustand abhängige Bindung muß auch zu einer charakteristischen Veränderung des Signals des Kontrastmittels führen. Bei der Kernspintomographie (MRI) kann sich diese vom Zustand abhängige Signalveränderung als eine Veränderung der Relaxationsraten ($1/T_1$ oder $1/T_2$) der Wasserprotonen oder der Relaxationsfähigkeiten R_1 und R_2 bemerkbar machen. In einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung beträgt die Relaxationsfähigkeit des Mittels im zweiten Zustand des Gewebes (R_1 -Zweitwert) wünschenswerterweise 80% oder weniger der Relaxationsfähigkeit des Mittel im anfänglichen Zustand des Gewebes (R_1 -Anfangswert). Bevorzugt beträgt R_1 -Zweitwert 50% oder weniger des R_1 -Anfangswertes, bevorzugter 20% oder weniger und noch stärker bevorzugt 10% oder weniger.

[0065] Es wird außerdem bevorzugt, dass, nachdem die Interventionstherapie abgeschlossen und das Zielgewebe auf physiologische Bedingungen zurückführt worden ist (z. B. im Falle der Hitzedenaturierung, nachdem die Temperatur auf die physiologische Temperatur zurückgekehrt ist), die R_1 -Relaxationsfähigkeit des Mittels immer noch niedriger ist, als die Relaxationsfähigkeit des Mittels im anfänglichen Zustand des Gewebes (R_1 -Anfangswert), bevorzugt 80% oder weniger des R_1 -Anfangswertes, bevorzugter 50% oder weniger des R_1 -Anfangswertes, noch stärker bevorzugt 20% oder weniger und am meisten bevorzugt 10% oder weniger. Es ist ebenfalls wünschenswert, dass die R_1 -Relaxationsfähigkeit des Kontrastmittels, nachdem die Interventionstherapie abgeschlossen ist und das Zielgewebe auf physiologische Bedingungen zurückgeführt worden ist, auf der Relaxationsfähigkeit des Mittels beibehalten wird, die unmittelbar nachdem die Interventionstherapie abgeschlossen wurde, gemessen wurde.

[0066] Wie vorstehend angezeigt, hängt die spezifische Struktur der SDTBMs von dem spezifischen Gewebe oder dem Gewebebestandteil ab, an das/den gebunden werden soll. Demgemäß ist es nötig, zuerst zu bestimmen, welches Gewebe oder welcher Gewebebestandteil angezielt werden soll.

[0067] Es werden eine Anzahl an möglichen Bindestellen in Betracht gezogen. Solche Bindestellen umfassen Nucleinsäuren, Glycosylaminoglycane (früher als Mucopolysaccharide bekannt), verkalktes Gewebe, Knochen, Fett, Synovialflüssigkeit, Zellmembranen, Proteine, Lipoproteine, Enzyme, Proteoglycane, Amyloide und Ceroide. Die bevorzugten Bindestellen sind Proteine, wobei Serum- und Struktur/Bindegewebs-Proteine stärker bevorzugt werden.

[0068] Wenn das Ziel ein Protein ist, umfassen die geeigneten Proteine menschliches Serumalbumin (HSA, 0,7 mM im Plasma; niedrigere Konzentrationen im Interstititalraum); das Fettsäure-bindende Protein (FABP, auch als Z-Protein oder Protein A bekannt, etwa 0,1 mM in den primären Zellen der Leber, der Niere, des Herzens und anderen Geweben); Glutathion-S-Transferase (GST, auch bekannt als Ligandin; etwa 0,1 mM in den primären Zellen der Leber, der Niere, des Herzens und anderen Geweben); Alpha-1-Säure-Glycoprotein (AAG, MG 41.000, 0,55 g–1,4 g/L) sowie Lipoproteine (zum Beispiel solche, die in atherosklerotischen Ablagerungen konzentriert sind). Andere Beispiele umfassen die Strukturproteine der extrazellulären Matrix (Kollagene, Laminin, Elastin, Fibronectin, Entactin, Vitronectin), Amyloide (einschließlich des Beta-2-Amyloid-Proteins (A4) der Alzheimer-Krankheit), Ceroid (oder Lipofuscin) und Glycoproteine (zum Beispiel Osteonectin, Tenascin und Thrombospondin).

[0069] Kontrastmittel, die eine verbesserte Zurückhaltung im Blut aufweisen und eine bildverstärkende Einheit (IEM), eine Plasmaprotein-bindende Einheit (PPBM) und eine die Blut-Halbwertszeit verlängernde Einheit (BHEM) enthalten, wurden früher beschrieben (siehe z. B. WO 96/23526, auf die hierin vollständig durch Bezugnahme hingewiesen wird). In PCT WO 96/23526 lösten McMurry et al. das Problem, dass die vor ihrer Erfindung im Fachgebiet bekannten Kontrastmittel zu schnell aus dem Blut eliminiert wurden. Die schnelle Eliminierung dieser Mittel schränkte ihre Verwendung bei bestimmten Anwendungen ein. WO 96/23526 lehrt, dass zum Beispiel die Zugabe einer Phosphat-BHEM die Blut-Halbwertszeit von Kontrastmitteln (gemessen durch die AUC-Konzentration (AUC = Fläche unter der Kurve)) um bis zu 78% erhöht.

[0070] McMurry et al. lehren auch, dass die Relaxationsfähigkeit von Kontrastmitteln durch die Verwendung einer PPBM verbessert wird, die zwei oder mehrere aromatische Ringe in einer nicht planaren Orientierung enthält. Es war vorher gezeigt worden, dass die Rotationsbewegung eines Kontrastmittels, das eine einzige IEM enthält, nach einer nicht kovalenten Bindung an ein Ziel wirksam eingeschränkt werden kann. Diese nicht kovalente Bindung führte zu einer Steigerung der Relaxationsfähigkeit für die an das Ziel gebundenen Formen von bis zu 5–10-fach (vergleiche mit der U.S.-Patent-Nr. 4,880,008). In bevorzugten Ausführungsformen zeigten McMurry et al., dass die Bindung eines Kontrastmittels, das eine PPBM enthielt, die gegen Serumalbumin gerichtet war, zu einer Steigerung des Blutpool-Kontrasts und einer Bildverstärkung des Blutflusses führt. Insbesondere das Kontrastmittel MS-325 weist eine annähernd 7-fache Erhöhung der Relaxationsfähigkeit ($47 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) als Ergebnis einer nicht kovalenten Bindung an Serumalbumin auf (vergleiche mit Lauffer, R. B. et al., Radiology 207: 529–538 (1998)).

[0071] Ein bevorzugtes Zielprotein für positiv geladene Kontrastmittel oder Kontrastmittel, die basische SDTBMs enthalten, wäre das Alpha-1-Säure-Glycoprotein (AAG). Die Plasmaspiegel dieses positiven Proteins der akuten Phase variieren signifikant mit dem Krankheitszustand. Zum Beispiel erhöht sich nach einem Ent-

zündungsreiz die Konzentration an AAG zwei- bis vierfach, und es wurde vorgeschlagen, dass der Plasmaspiegel an AAG ein prognostisches Hilfsmittel für Geschwulste, metastasenbildende Brust- und andere Karzinome, neonatale Infektionen und chronische Schmerzen darstellt. Erhöhte Spiegel wurden bei Atherosklerose, Crohns-Krankheit, Myokard-Infarkt, Nierenentzündung und bakteriellen, viralen und post-operativen Infektionen festgestellt. Das sehr leicht lösliche AAG besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette von 183 Aminosäuren und ist durch einige unübliche Eigenschaften gekennzeichnet, einschließlich eines hohen Gehalts an Kohlenhydraten und Sialinsäure (45%, beziehungsweise 12%) und eines niedrigen isoelektrischen Punkts bei dem pH-Wert 2,7. Das Alpha-1-Säure-Glycoprotein wurde mit der Bindung von zahlreichen basischen Arzneimitteln in Verbindung gebracht, einschließlich Propanolol ($K_a = 11,3 \times 10^5$), Imipramin ($K_a = 2,4 \times 10^5$) und Chloropromazin ($K_a = 35,4 \times 10^5$). Der Prozentanteil an freiem Lignocain wurde mit der Konzentration an AAG in Patienten (0,4 bis 3 g·l⁻¹) korreliert, was beinhaltet, dass eine selektive Bindung an AAG gegenüber anderen Proteinen (z. B. HSA) im Plasma unter Verwendung zielgerichteter Arzneimittel-Neukonstruktions-Verfahren (drug design) erreicht werden kann.

[0072] Liganden für HSA, FABP und GST sind stärker bevorzugte SDTBMs, da diese negativ geladene Moleküle sind oder die teilweise negativ geladenen Reste (z. B. ein Ester, ein Amid oder der Sauerstoff einer Keton-Carbonylgruppe) dazu tendieren neutral zu sein; von solchen Verbindungen nimmt man im Allgemeinen an, dass sie weniger toxisch als positiv geladene Moleküle sind. Von diesen drei Proteinen dürfte HSA in einigen Fällen am stärksten bevorzugt werden, da die Liganden für FABP und GST vor der Bindung erst in gewissem Maße intrazellulär aufgenommen werden müssen. Im Allgemeinen wird die intrazelluläre Aufnahme bei Kontrastmitteln vermieden (außer bei der Leber), um die Toxizität zu minimieren. HSA liegt in beträchtlichen Mengen in vielen extrazellulären Flüssigkeitsumgebungen vor, einschließlich dem Plasma, dem Interstitialraum normaler und krebssartiger Gewebe, der Gelenkschmiere, der Zerebrospinalflüssigkeit und der Flüssigkeit aus einer Entzündung oder einem Abszess. In vielen pathologischen Geweben, wie z. B. Tumoren, Entzündungen, atherosklerotischen Ablagerungen oder den Wänden atherosklerotischer Arterien, weisen die Kapillaren Lecks auf, was sogar zu noch höheren Spiegeln an HSA führt. Dies kann die Nützlichkeit der Mittel dieser Erfindung steigern, da eine große Anzahl an Interventionstherapien auf kranke Gewebe zielt.

[0073] HSA wird auch bevorzugt, weil es dafür bekannt ist, eine gute Affinität und eine hohe Kapazität für die Bindung einer Vielzahl von strukturell unähnlichen Molekülen bei einer gewöhnlich großen Anzahl an Bindestellen zu besitzen. Daher besteht bei dem Entwerfen des Kontrastmittels eine höhere Flexibilität.

[0074] Zur Bindung an den nativen Zustand von HSA kann ein breites Spektrum an hydrophoben oder amphiphilen Stoffen als SDTBM nützlich sein (U. Kragh-Hansen, *Pharm. Rev.* 33: 17–53 (1981); X. M. He et al., *Nature* 358: 209–215 (1992); D. C. Carter, *Adv. Protein Chem.* 45: 153–203 (1994)). Diese umfassen Substanzen, die mindestens einen aliphatischen, Alkoxy-, Alkylthio-, Alkylcarbonyl-, Alkycarbonyloxy-, Arylrest oder einen heterocyclischen Rest mit 1 bis 60 Kohlenstoffatomen enthalten und, gegebenenfalls, einen oder mehrere Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefel-, Halogen-, aliphatische Amid-, Estersulfonamid-, Acyl-, Sulfonat-, Phosphat-, Hydroxylsubstituenten oder organometallische Substituenten, sind aber nicht auf kleine Moleküle beschränkt. Alternativ, aber weniger bevorzugt, kann das SDTBM ein Biomolekül sein, wie z. B. ein Peptid, das hydrophobe Aminosäurereste und/oder Substituenten mit oder ohne hydrophoben oder hydrophilen Endgruppen enthält.

[0075] Wie vorstehend erwähnt, kann zur Bindung an HSA eine Vielzahl von hydrophoben Stoffen als SDTBM nützlich sein. Im Allgemeinen erhöht sich die Bindungsaffinität an HSA und möglicherweise andere Proteine mit der Hydrophobizität der SDTBM. Theoretische Abschätzungen der Hydrophobizität eines Substituenten, wie z. B. einer SDTBM, können durch die Berechnung des Beitrages zu dem Logarithmus des Octanol-Wasser- (oder Octanol-Puffer) Verteilungskoeffizienten ($\log P$) für die TBM selbst unter Verwendung der Hansch 1-Konstanten für die Substituenten erhalten werden. Vergleiche mit A. Leo und C. Hansch, „Partition Coefficients and their Uses“, *Chemical Reviews* 71, S. E525–616 (1971); K. C. Chu, „The Quantitative Analysis of Structure-Activity Relationships“, *Burger's Medicinal Chemistry*, Teil 1, S. 393–418, (4. Ausgabe, 1980). Die Bindungsaffinität erhöht sich mit dem steigenden Beitrag zu $\log P$. Für Substituenten an aliphatischen Resten können die folgenden 1-Konstanten verwendet werden:

Rest	1-aliphatisch
CH ₃	0,50
Phenyl	2,15

[0076] Für Substituenten an Arylresten können die folgenden Konstanten verwendet werden:

Rest	1-aliphatisch
CH ₃	0,56
CH ₂ CH ₃	1,02
Phenyl	1,96

[0077] Somit wird der Beitrag zu $\log P$ für einen p-Methylbenzylrest, der an eine IEM angehängt ist, wie folgt berechnet (unter Verwendung des 1-aliphatischen Wertes für CH_3 als Schätzwert für den $-\text{CH}_2$ -Rest):

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

[0078] Bei der Bindung an HSA ist ein Mindestbeitrag zu $\log P$ von 2 (gleichwertig zu 4 CH_3 -Resten oder einem Phenylring) erforderlich, um eine signifikante Bindung zu erreichen. Stärker bevorzugt wird ein Beitrag zu $\log P$ von 3. Noch stärker bevorzugt wird ein Beitrag zu $\log P$ von 4.

[0079] Die Bindung an HSA kann durch Gleichgewichtsdialyse oder Ultrafiltration unter Verwendung von 4,5% Gewicht/Volumen HSA in einem Puffer mit dem pH-Wert 7,4 ermittelt werden. Bevorzugt werden mindestens 10%, stärker bevorzugt mindestens 50%, noch stärker bevorzugt mindestens 80% und am stärksten bevorzugt werden mindestens 95 % des Kontrastmittel an den nativen Zustand von HSA in physiologisch relevanter Konzentrationen (0,01–10 mM im Plasma für die Kernspintomographie (MRI) und die optische Bildzeugung) gebunden. Bei dieser Anwendung besitzt die Messung des Prozentanteils der Bindung des Kontrastmittels an HSA einen Fehler von annähernd $\pm 5\%$. Die Proteinbindung an andere Proteine oder an Serum kann auf ähnliche Weise ermittelt werden.

[0080] Die Anfügung von lipophilen Resten an ein Kontrastmittel vermindert wahrscheinlich die Löslichkeit des Mittels. Um eine wirksame Löslichkeit des Kontrastmittels bei klinisch wirksamen Dosierungsspiegeln oder höher beizubehalten, kann bevorzugt werden, einen oder mehrere Wasserstoffbindungen ausbildende Reste (Sauerstoff, Stickstoff, usw.) in die SDTBM mit einzubauen.

[0081] Obwohl rein aliphatische Reste als SDTBM verwendet werden können, dürften diese nicht so sehr wie gemischte Aliphat-Aryl-Reste oder reine Arylreste bevorzugt werden. Besonders wenn eine negative Ladung an rein aliphatische Reste angeheftet wird, insbesondere an lange und flexible Reste, kann das Kontrastmittel den Stoffwechsel endogener Moleküle, wie z. B. Fettsäuren, oder die Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen und Lipiden beeinträchtigen. Dies kann die Toxizität des Mittels erhöhen. Daher wird bevorzugt, dass die SDTBM mindestens einen Arylring enthält.

[0082] Im Falle von im nativen Zustand an HSA gebundenen MRI-Mitteln zur Verstärkung von Tumoren oder Geweben wird besonders bevorzugt, dass das Kontrastmittel zwei oder mehrere gesonderte lipophile Reste enthält, um das Mittel vollständig zu immobilisieren, wenn es an das Protein gebunden ist. Diese Reste können als ein Rest auf der SDTBM oder als zwei oder mehrere getrennte chemische Reste, die an das Kontrastmittel angehängt sind, vorliegen. Aufgrund ihrer sperrigen Natur und ihrer Starrheit wird bevorzugt, dass die beiden oder mehrere Reste alle aus einem aromatischen Ring bestehen, wobei die beiden Ringe oder mehrere davon im Gesamt molekül in einer starren, nicht planaren Orientierung angeordnet sind.

[0083] Die magnetische Wirksamkeit oder die Relaxationsfähigkeit eines MRI-Mittels ist im Allgemeinen am größten, wenn das Mittel eine Rotationskorrelationszeit besitzt, die annähernd der von HSA entspricht (R. B. Lauffer, Chemical Reviews 87: 901–927 (1987)). Während ein kleines Molekül, wie z. B. Gd-DTPA eine Rotationskorrelationszeit von etwa 0,1 Nanosekunden (nsec) besitzt, hat HSA eine Korrelationszeit von mehr als 5–10 nsec; wenn ein Chelat diese längere Korrelationszeit aufweist, finden die magnetischen Fluktuationen zwischen dem paramagnetischen Ion und den Wasserprotonen im gleichen Zeitrahmen wie die Larmor-Frequenz statt, was die wirksamste longitudinale (T_1) Relaxation, die möglich ist, und somit die größte mögliche Relaxationsfähigkeit erzeugt. Es wird erwartet, dass jede Flexibilität des Chelats die wirksame Rotationskorrelationszeit und somit die Relaxationsfähigkeit vermindert, wenn es an das Protein gebunden ist. Da eine einzelne Anheftungsstelle am Protein immer noch eine Flexibilität in unterschiedlichen Richtungen ergeben kann, können zusätzliche Stellen der Anheftung bevorzugt werden.

[0084] Wie vorstehend erwähnt, muß die vom Zustand abhängige Bindung auch zu einer charakteristischen Veränderung des Signals des Kontrastmittels führen. Bei der Kernspintomographie (MRI) kann diese vom Zustand abhängige Signalveränderung als eine Veränderung in den induzierten Relaxationsraten ($1/T_1$ oder $1/T_2$) der Wasserprotonen oder der Relaxationsfähigkeiten R_1 und R_2 sichtbar werden. Daher kann, wenn HSA das Ziel darstellt, das Ausmaß bis zu dem ein Mittel auf die maximale Relaxationsfähigkeit angepasst wurde, durch die Messung der vom Zustand abhängigen Relaxationsfähigkeit-gebunden (R_1 -gebunden) in Gegenwart von HSA in seinen beiden physiologischen Zuständen, nativ und denaturiert, ermittelt werden. In einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Relaxationsfähigkeit des Mittels im zweiten Zustand des Gewebes (R_1 -Zweitwert) wünschenwerterweise 80% oder weniger der Relaxationsfähigkeit (R_1 -Anfangswert) des Mittels im anfänglichen Zustand des Gewebes. Bevorzugt beträgt der R_1 -Zweitwert 50% oder weniger des R_1 -Anfangswertes, stärker bevorzugt 20% oder weniger und am stärksten bevorzugt 10% oder weniger.

[0085] Dies erfordert die Messung der Relaxationsfähigkeit des freien Chelats (R_1 -frei), sowie der Relaxationsfähigkeit (R_1 -beobachtet) und des Prozentanteils der Bindung des Mittels in 4,5% HSA in seinen beiden physiologischen Zuständen. In einem bevorzugten Aspekt der Erfindung entspricht der Wert R_1 -frei dem R_1 -Wert, der im denaturierten Zustand beobachtet wurde. Der Wert R_1 -beobachtet ist ein nach dem molaren Anteil gewichteter Mittelwert aus R_1 -frei und R_1 -gebunden:

$R_1\text{-beobachtet} = (\text{Anteil-frei} * R_1\text{-frei}) + (\text{Anteil-gebunden} * R_1\text{-gebunden})$

[0086] Daher gilt:

$R_1\text{-gebunden} = [R_1\text{-beobachtet} - (\text{Anteil-frei} * R_1\text{-frei})]/\text{Anteil-gebunden}$

Die vom Zustand abhängige Bindung an HSA

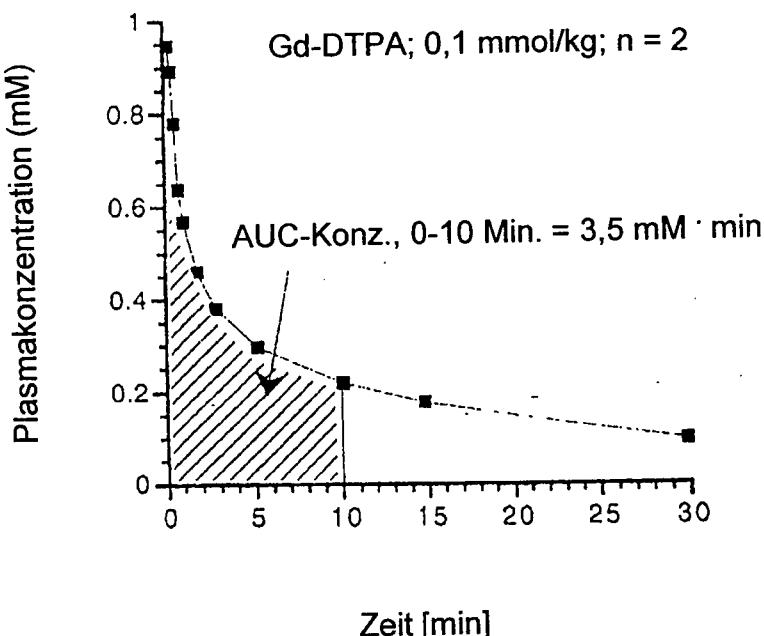
[0087] Wie vorstehend erwähnt, ist HSA das bevorzugte Zielprotein für das Kontrastmittel, das in dieser Erfindung verwendet werden soll. Bei einer solchen Anwendung ist es wünschenswert, dass das Kontrastmittel eine erhöhte Blut-Halbwertszeit aufweist, um das Ausmaß, in dem das Mittel im Blut verbleibt (d. h. an HSA gebunden bleibt) und somit im Verlauf der Interventionstherapie verfügbar bleibt, zu erhöhen. Eine erhöhte Blut-Halbwertszeit kann durch das Einfügen eines verbindenden Rests (L) erreicht werden, der als eine die Blut-Halbwertszeit verlängernde Einheit („BHEM“) wirkt, um die Aufnahmerate des Kontrastmittels durch die Leberzellen zu vermindern. Vergleiche mit der U.S.-Patent-Anmeldung Serien-Nr. 08/382,317, die am 1. Februar 1995 angemeldet wurde und auf welche durch Bezugnahme hingewiesen wird. Die BHEMs sind äußerst hydrophile Reste, die mit Wasser Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können. Die Anwesenheit einer hydrophilen BHEM auf einem Kontrastmittel vermindert die Aufnahme des Mittels durch die Leberzellen.

[0088] Beispiele für chemische Reste, die als BHEM dienen können, umfassen Kohlenstoff-, Phosphor-, Wolfram-, Molybdän- oder Schwefelatome, die angefügte geladene oder neutrale Nebenatome, wie z. B. Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel oder Halogene (insbesondere Fluor) besitzen, die zwei oder mehrere einsame Elektronenpaare (d. h. eine vollständige oder eine teilweise negative Ladung) oder elektropositive Wasserstoffatome (d. h. protonierte Amine) zur Wasserstoffbrückenbindung mit Wasser besitzen. Diese umfassen Reste wie z. B. Sulfon, Ether, Harnstoff, Thioharnstoff, Aminsulfonamid, Carbamat, Peptid, Ester, Carbonat und Acetale. Bevorzugte Reste umfassen solche, die eine oder mehrere teilweise oder vollständig negative Ladungen in wässriger Lösung bei einem physiologischen pH-Wert besitzen, wobei die negativ geladenen Atome durch kovalente Bindung oder kovalente Koordinationsbindung an das IEM nicht teilweise oder vollständig neutralisiert werden können. Beispiele für diese bevorzugten BHEMs umfassen negativ geladene Reste, wie z. B. Phosphat-Monoester, Phosphatdiester, Carboxylat und Sulfonat. Stärker bevorzugt werden solche, die Phosphatgruppen oder irgendeine Form eines Esters davon besitzen. Noch stärker bevorzugt sind Phosphat-Diester, da: a) diese mit vier Wasserstoffbrücken ausbildenden Sauerstoffatomen stark hydrophil sind; b) diese relativ rasch unter Verwendung von Verfahren, die nachstehend gezeigt werden, synthetisiert werden können; c) diese als ausgezeichnete Verbindungsstücke zwischen der IEM und der SDTBM dienen und d) weil Phosphatverbindungen im Körper existieren und auf natürlichem Wege metabolisiert werden, und daher von Phosphatdiester enthaltenden Kontrastmitteln erwartet wird, dass sie nicht toxisch sind.

[0089] Der Einbau einer BHEM in ein Kontrastmittel dieser Erfindung führt zu einer verlängerten Rückhaltung (Retention) des Mittels im Blut. Die Blutretention wird bevorzugt durch die Berechnung der Fläche unter der Plasmakonzentration gegen die Zeitkurve („Fläche unter der Kurve“ oder „AUC-Konz.“) für einen spezifischen Zeitraum (z. B. 0–10 Minuten, 0–30 Min., 0–60 Min. oder 0–unendlich) in einem pharmakokinetischen Experiment mit Rattenplasma gemessen. Die Blutretention (gemessen über die AUC-Konz.) kann experimentell durch die Verabreichung eines Kontrastmittels an Ratten, Kaninchen oder höhere Säugetiere abgeschätzt werden. Es wurde beobachtet, dass die Verlängerung der Blut-Halbwertszeit bei Kaninchen und höheren Säugern größer ist, als bei Ratten. In dieser Anwendung stellen die Daten der Blut-Halbwertszeit, die über die AUC-Konz. bestimmt wurden, experimentelle Daten aus Ratten dar. Der diese Daten begleitende Fehler beträgt etwa $\pm 10\%$.

[0090] Der Grund dafür, dass die Messung der Halbwertszeit selbst nicht verwendet wird, besteht darin, dass die mathematische Definition dieser Menge oft nicht klar ist, und die erhaltenen Schätzungen je nach dem verwendeten mathematischen Modell und der Länge der Zeit, in der die Blutproben gezogen wurden, variieren.

[0091] Die beobachteten durchschnittlichen Plasmakonzentrationen nach der Injektion von 0,1 mmol/kg mit Gd^{153} markiertem Gd-DTPA in die Schwanzvenen von zwei Ratten wird nachstehend gezeigt. Unter Verwendung des Macintosh-Programms KaleidaGraph wurde diese AUC-Konzentration von 0 bis 10 Minuten zu 3,5 mM/min berechnet.



[0092] Die Kontrastmittel dieser Erfindung, die zur zielgerichteten Anheftung an Serumproteine wie z. B. HSA nützlich sind, weisen eine Erhöhung der AUC-Konzentration von mindestens 20% auf, wenn die BHEM der IEM und der SDTBM zugegeben wurde. Sie weisen bevorzugt eine AUC-Konzentrationserhöhung von mindestens 40%, stärker bevorzugt von mindestens 70% und noch stärker bevorzugt von mindestens 100% auf. Im Allgemeinen ist die Erhöhung der AUC-Konzentration, die durch eine BHEM hervorgerufen wird, größer, wenn die Bindung im Plasma signifikant ist, d. h. 20%–50% oder höher. Die berechnete prozentuale Erhöhung der AUC-Konzentration kann für AUC-Konzentrationen, die über unterschiedliche Zeiträume bestimmt wurden, unterschiedlich sein. Im Allgemeinen ist die prozentuale Erhöhung der AUC-Konzentration, die durch die BHEM verursacht wird, größer bei AUC-Konzentrationen, die über längere Zeiträume gemessen werden, z. B. 0–30 Min. im Gegensatz zu 0–10 Min.

[0093] Da die Struktur und die physikalischen Eigenschaften des gesamten Kontrastmittelmoleküls seine Bindung im Plasma bestimmen, ist es wichtig, IEMs und BHEMs auszuwählen, die mit der erwünschten Bindung verträglich sind. Um zum Beispiel eine Bindung an die positiv geladenen Bindestellen auf dem HSA-Molekül zu erreichen, wird bevorzugt, IEMs und BHEMs mit einer neutralen oder einer negativen Nettoladung zu besitzen, um die Möglichkeit der Abstoßung zu vermindern und vielleicht sogar die Bindungsaffinität zu erhöhen. Für die Bindung an das Alpha-Säure-Glycoprotein sollte zumindest ein Teil des Kontrastmittels positiv geladen sein. Für die Bindung an Globuline sollte zumindest ein Teil des Kontrastmittels eine Steroidstruktur aufweisen. Für die Bindung an Lipoproteine sollte zumindest ein Teil des Kontrastmittels lipophil oder Fettsäure-ähnlich sein.

[0094] Es ist absehbar, dass die BHEM in einer Vielzahl von Stellungen in Hinblick auf die IEM und die SDTBM angeordnet sein kann. Die Stellung der Einheiten darf jedoch nicht so sein, dass eine Einheit, die beabsichtigte Funktion einer anderen Einheit beeinträchtigt. Zum Beispiel sollte in einem HSA bindenden Kontrastmittel die Plazierung der BHEM nicht die Fähigkeit der SDTBM das Mittel an HSA zu binden, blockieren. Da die Hauptbindestellen in HSA Socken-ähnlich sind (X. M. He et al., Nature 358: 209–215 (1992); D. C. Carter, Adv. Protein Chem. 45: 153–203 (1994)), mit hydrophoben Innenseiten (insbesondere nahe des „Zehen“-Bereiches) und positiv geladenen „Knöchel“-Bereichen, würde die Bindungsaffinität einer SDTBM abnehmen, wenn der distale Teil der SDTBM sehr hydrophil gemacht würde.

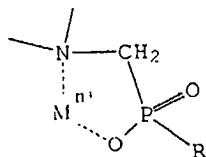
[0095] Als erläuterndes Beispiel sei genannt, dass wenn die SDTBM ein Phenylring ist, die am stärksten bevorzugte Stellung der BHEM an dem Ring in ortho, gefolgt von meta ist. Eine hydrophile Gruppe in para-Stellung würde die Bindungsaffinität der SDTBM an HSA vermindern.

[0096] Für IEMs, die aus einem Metallchelat bestehen, wird bevorzugt, dass die BHEMs und SDTBMs nicht an die IEM angeheftet sind, so dass die Stärke der Bindung zwischen dem Metallion und dem chelatbildenden Liganden nicht signifikant vermindert wird. Wenn zum Beispiel der chelatbildende Ligand Acetat ist, wird die BHEM oder die SDTBM bevorzugt nicht an den Sauerstoff des Acetats angehängt.

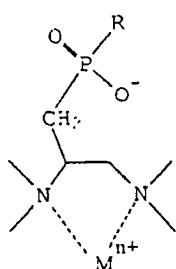
[0097] Eine weitere Erfordernis bei der Anordnung besteht darin, dass die negativ geladenen Atome der BHEM nicht durch kovalente Bindung oder Koordinationsbindung an die IEM teilweise oder vollständig neutralisiert werden können; dies sichert, dass in wässrigen Systemen die sehr hydrophilen Atome der BHEM stark vom Lösemittel umgeben (solvatisiert) sind. Wenn zum Beispiel die IEM ein Metallchelat ist, ist es wichtig, die negativ geladenen Atome der BHEM so anzurufen, dass sie nicht durch das positiv geladene Metallion (M^{n+}) der IEM über kovalente Koordinationsbindung durch die Bildung von 5- oder 6-zähligen Chelatringen, d. h. den stabilsten Ringgrößen, neutralisiert werden können. Da 5-zählige Chelatringe für die Metallionen, die bei den

IEMs von Interesse sind (wie z. B. Gadolinium), am stabilsten sind, ist es äußerst wichtig, ihre Bildung zu verhindern. Somit dürfen, wie in der nachstehenden Zeichnung gezeigt wird, ein Phosphinat ($-\text{PO}_2^-$)- oder ein Phosphonat ($-\text{PO}_3^-$)-BHEM nicht an das Stickstoffatom eines chelatbildenden Aminocarboxylat-Mittels über ein $-\text{CH}_2$ -Verbindungsstück angehängt werden, da dieses (dann) einen sehr stabilen 5-zähligem Chelatring ausbilden wird. In ähnlicher Weise sollte eine Phosphodiester ($-\text{OPO}_3^-$)-BHEM nicht an das Stickstoffatom eines chelatbildenden Aminocarboxylat-Mittels über ein $-\text{CH}_2$ -Verbindungsstück angehängt werden, da dieses (dann) einen 6-zähligem Chelatring bilden könnte. Diese beiden BHEMs können jedoch an anderen Stellen angehängt werden, wie z. B. dem Ethylengerüst des Liganden. In einigen Fällen kann, wie gezeigt, bevorzugt werden, die Länge des Verbindungsstücks vergrößert werden, um sicherzustellen, dass keine 5- oder 6-zähligem Ringe ausgebildet werden können.

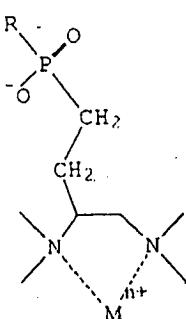
Phosphinat-BHEM



Sehr ungünstig
(5-zähligem Chelatring, Ladung neutralisiert)



Ungünstig
(6-zähligem Chelatring, Ladung neutralisiert)



Stärker bevorzugt
(keine Möglichkeit der Bildung von 5- oder 6-zähligem Chelatringen oder der Ladungsneutralisation)

[0098] Es wird erwartet, dass die Einheiten dieser Erfindung im Kontrastmittel so angeordnet werden können, dass sich die folgenden Strukturen ergeben:

(1)

IEM- $[(\text{L})_m - \{(\text{BHEM})_s - (\text{SDTBM})_o\}_p]_q$

(2) IEM - $[(\text{SDTBM})_o$

|

$(\text{BHEM})_s]_q$

(3) IEM - $(\text{SDTBM})_o$

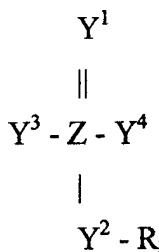
|

$(\text{L})_m - (\text{BHEM})_s$

– wobei m entweder 0–4 betragen kann,

- s, o, und p den gleichen Wert besitzen können und 1–4 betragen und
- r und q mindestens den Wert 1 besitzen.

[0099] Wenn die Einheiten dieser Erfindung in dem Kontrastmittel wie in der vorstehenden Struktur (1) angeordnet sind, ist die BHEM bevorzugt ein Sulfon, Harnstoff, Thioharnstoff Amin, Sulfonamid, Carbamat, Peptid, Ester, Carbonat, Acetale und noch stärker bevorzugt:

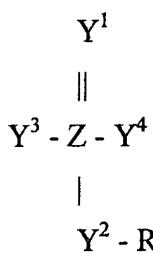


oder Esterformen,

- wobei Z = P, W, Mo oder S
- $Y^1, Y^2 = O$ oder S
- $Y^3, Y^4 = O, S$ oder nicht vorhanden
- $R_2 = H, C_{1-6}$ -Alkyl oder nicht vorhanden.

[0100] Am stärksten bevorzugt ist die BHEM ein Phosphatrest.

[0101] Wenn die Einheiten der Erfindung in dem Kontrastmittel wie in der vorstehenden Struktur (2) angeordnet sind, ist die BHEM bevorzugt ein Sulfon, Harnstoff, Thioharnstoff, Amin, Sulfonamid, Carbamat, Peptid, Ester, Carbonat, Acetal und noch stärker bevorzugt besitzt die BHEM die folgende Formel:

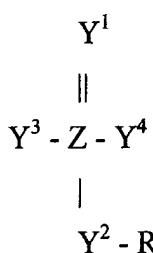


oder Esterformen,

- wobei Z = P, W oder Mo
- $Y^1, Y^2 = O$ oder S
- $Y^3, Y^4 = O, S$ oder nicht vorhanden
- $R_2 = H, C_{1-6}$ -Alkyl oder nicht vorhanden.

[0102] Am stärksten bevorzugt ist die BHEM ein Phosphatrest.

[0103] Wenn die Einheiten der Erfindung in dem Kontrastmittel wie in der vorstehenden Struktur (3) angeordnet sind, ist die BHEM bevorzugt SO_3^- oder Esterformen, ein Sulfon, Harnstoff, Thioharnstoff, Amin, Sulfonamid, Carbamat, Peptid, Ester, Carbonat, Acetal und noch stärker bevorzugt:



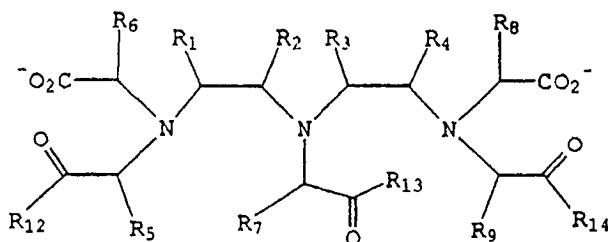
oder Esterformen,

- wobei Z = P, W, Mo oder S
- $Y^1, Y^2 = O$ oder S
- $Y^3, Y^4 = O, S$ oder nicht vorhanden
- $R_2 = H, C_{1-6}$ -Alkyl oder nicht vorhanden.

[0104] Am stärksten bevorzugt ist die BHEM ein Phosphatrest.

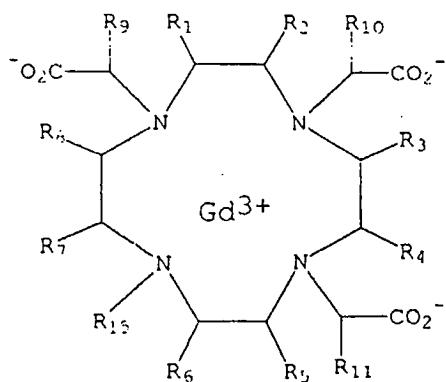
[0105] Es wird erwartet, dass wenn die Einheiten dieser Erfindung im Kontrastmittel wie in der vorstehenden

Struktur (3) angeordnet sind, die bevorzugten Kontrastmittel die folgenden Formeln besitzen:



Gd^{3+}

oder



wobei $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4, \text{R}_5, \text{R}_6, \text{R}_7, \text{R}_8, \text{R}_9, \text{R}_{10}, \text{R}_{11}$ und R_{16} , gleich oder verschieden sein können und ausgewählt sind aus der Gruppe, umfassend H, SDTBM, BHEM und C_{1-6} -Alkyl, vorausgesetzt, dass mindestens einer dieser R_s eine SDTBM und mindestens ein anderer eine BHEM ist,

$\text{R}_{12}, \text{R}_{13}$ und R_{14} können gleich oder verschieden sein und werden aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus O^- und $\text{N}(\text{H})\text{R}_{17}$,

$\text{R}_{15} = \text{H}, \text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, Hydroxylalkyl oder $\text{CH}(\text{R}_{16})\text{COR}_{12}$ und

$\text{R}_{17} = \text{H}$ oder C_{1-6} -Alkyl.

[0106] Bei Kontrastmitteln, die die vorstehend gezeigten Formeln umfassen, ist die BHEM bevorzugt ein Sulfon, Ether, Harnstoff, Thioharnstoff, Amin, Amid, Sulfonamid, Carbamat, Peptid, Ester, Carbonat, Acetal und noch bevorzugter COO^- oder Esterformen, SO_3^- oder Esterformen und

Y^1

\parallel

$\text{Y}^3 - \text{Z} - \text{Y}^4$

|

$\text{Y}^2 - \text{R}_2$

oder Esterformen,

– wobei $\text{Z} = \text{P}, \text{W}, \text{Mo}$ oder S

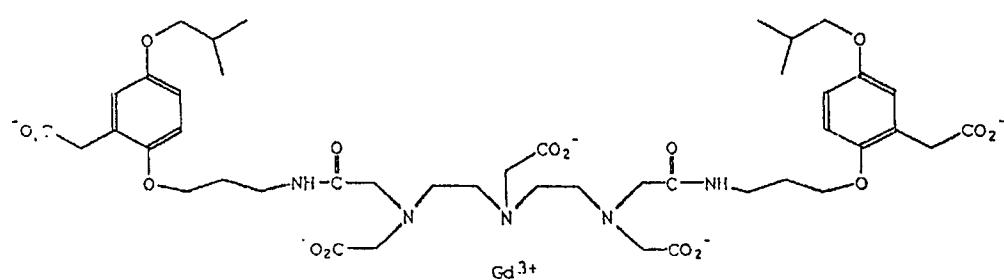
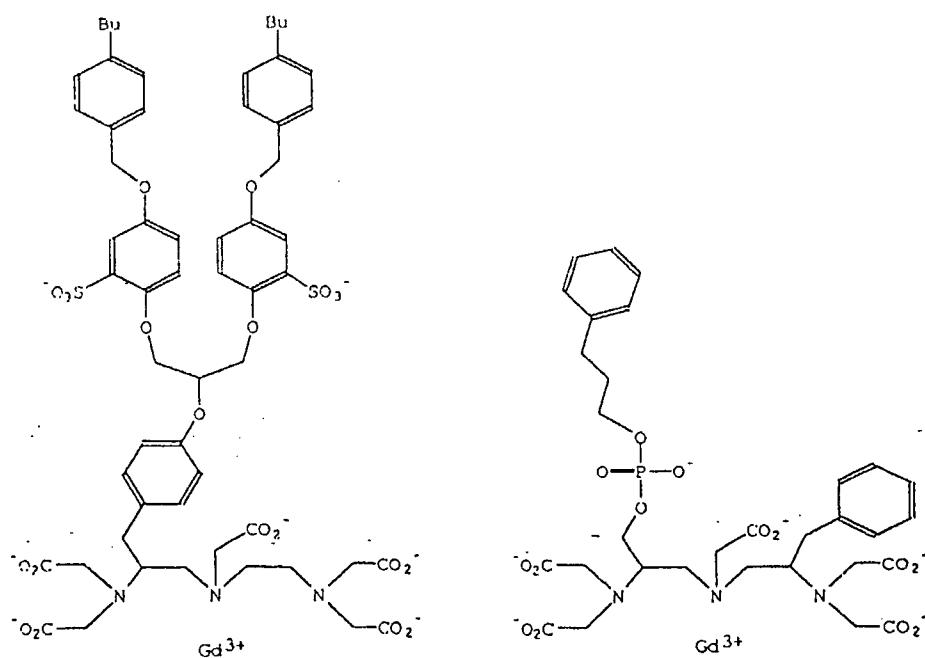
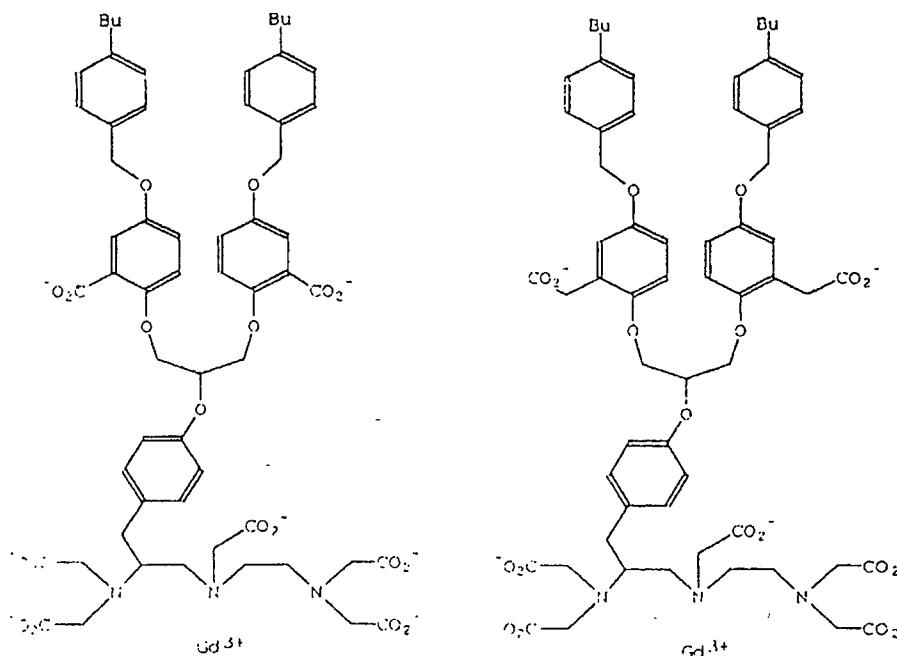
$\text{Y}^1, \text{Y}^2 = \text{O}$ oder S

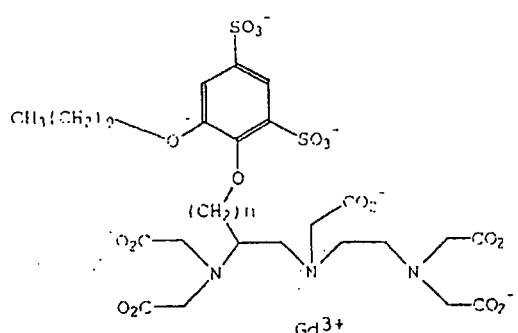
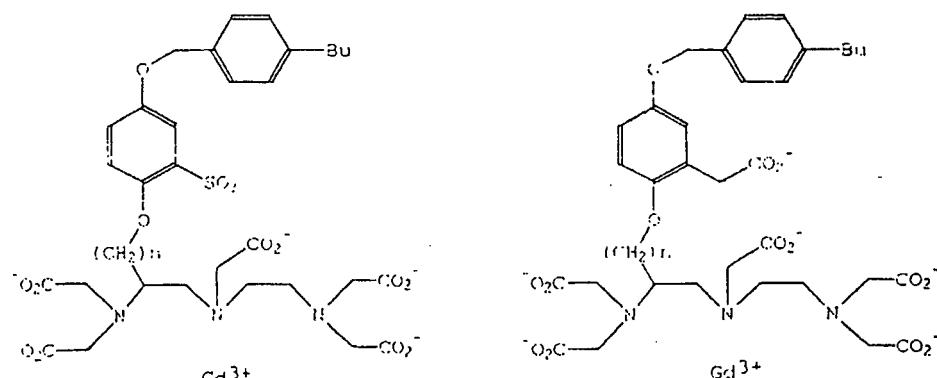
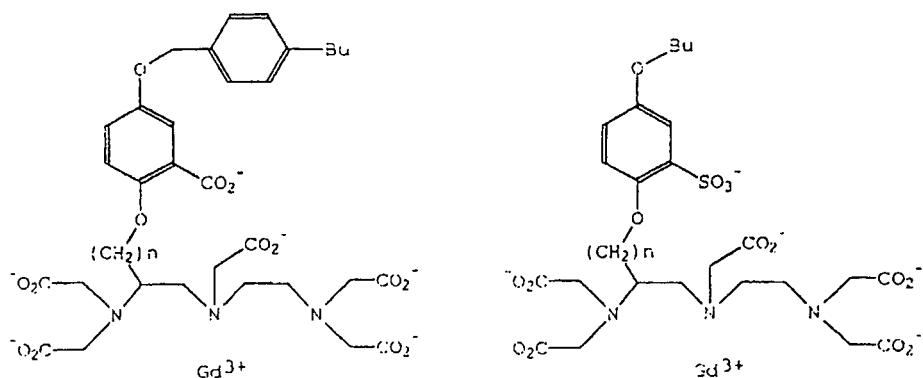
$\text{Y}^3, \text{Y}^4 = \text{O}, \text{S}$ oder nicht vorhanden

$\text{R}_2 = \text{H}, \text{C}_{1-6}$ -Alkyl oder nicht vorhanden.

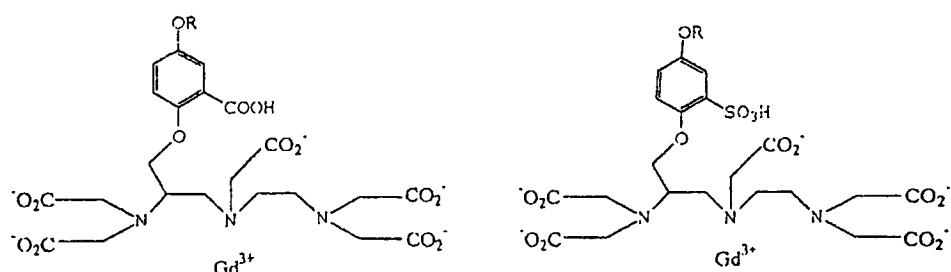
[0107] Im Falle eines an HSA bindenden Kontrastmittels kann die BHEM zwischen die IEM und die SDTBM plaziert werden, wie vorstehend in der Struktur (1) gezeigt, oder an der IEM entfernt von der SDTBM wie vorstehend in Struktur (3) gezeigt. Auf diese Weise kann das ganze Bindepotential des hydrophoben SDTBM-Restes ohne Beeinträchtigung durch den hydrophilen BHEM-Rest zur Geltung kommen.

[0108] In der vorliegenden Erfindung nützliche Kontrastmittel, die eine vom Zustand abhängige Bindung an HSA zeigen, sind in der U.S.-Patentanmeldung mit der Serien-Nr. 08/382,317, die am 1. Februar 1995 angemeldet wurde, dargestellt. Zum Beispiel sind die folgenden Mittel nützlich:



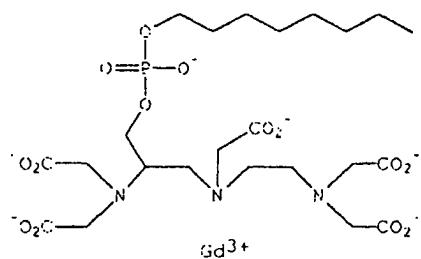


wobei n gleich 1–4 sein kann.

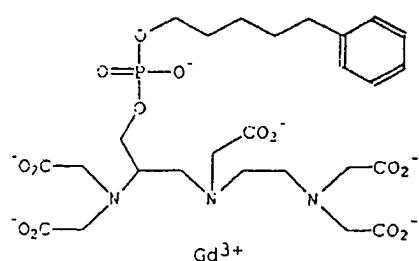


wobei R einen aliphatischen Rest umfaßt und/oder mindestens einen Arylring, oder ein Peptid umfaßt, das hydrophobe Aminosäurereste enthält und/oder Substituenten mit oder ohne hydrophoben oder hydrophilen Endgruppen.

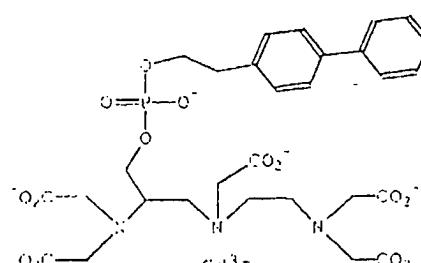
[0109] Die bevorzugten Kontrastmittel, die in dieser Erfindung nützlich sind, sind:



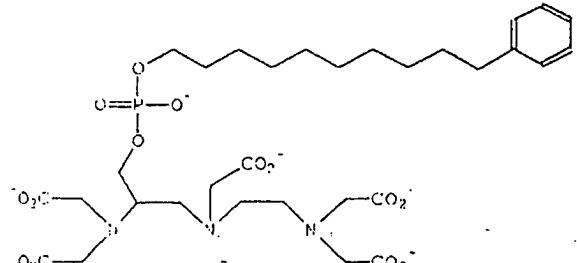
MS-315



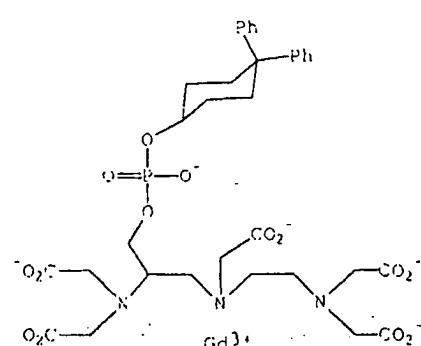
MS-317



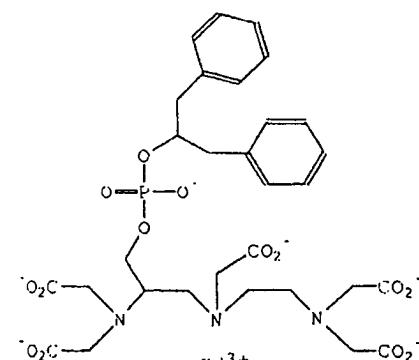
MS-322



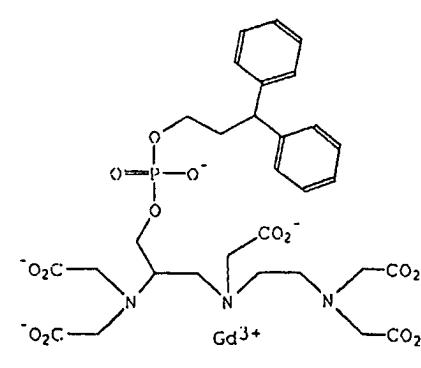
MS-323



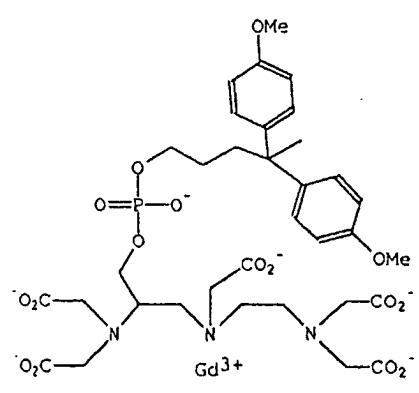
MS-325



MS-326



MS-327



MS-328

[0110] Die stärker bevorzugten Kontrastmittel mit einer vom Zustand abhängigen Bindung an HSA sind MS-317, MS-322, MS-325 und MS-328. Am stärksten wird MS-325 bevorzugt.

Die Verwendung der Kontrastmittel

[0111] Die Mittel, die in dieser Erfindung verwendet werden, werden so definiert, dass sie pharmazeutisch

verträgliche Derivate davon mit einschließen. Ein pharmazeutisch verträgliches Derivat bedeutet jedes pharmazeutisch verträgliche Salz, Ester, Salz eines Esters oder ein anderes Derivat einer Verbindung dieser Erfindung, das nach der Verabreichung an einen Empfänger in der Lage ist, (direkt oder indirekt) eine Verbindung dieser Erfindung bereitzustellen oder einen hemmend wirkenden aktiven Metaboliten oder einen Rest davon. Besonders bevorzugte Derivate sind solche, die die Bioverfügbarkeit der Verbindungen dieser Erfindung erhöhen, wenn solche Verbindungen einem Säuger verabreicht werden (z. B. dadurch, dass sie einer oral verabreichten Verbindung erlauben, schneller in das Blut absorbiert zu werden) oder die die Anlieferung der ursprünglichen Verbindung in ein biologisches Kompartiment (z. B. das Gehirn oder das lymphatische System) steigern.

[0112] Es ist auch abzusehen, dass die in dieser Erfindung verwendeten Mittel ein pharmazeutisch verträgliches Salz umfassen. Pharmazeutisch verträgliche Salze dieser Erfindung umfassen solche, die von anorganischen oder organischen Säuren und Basen stammen. Eingeschlossen unter solche sauren Salze sind die folgenden: Acetat, Adipat, Alginat, Aspartat, Benzoat, Benzolsulfonat, Bisulfat, Butyrat, Citrat, Camphorat, Camphorsulfonat, Cyclopentanpropionat, Digluconat, Dodecylsulfat, Ethansulfonat, Fumarat, Glucoheptanoat, Glycerophosphat, Hemisulfat, Heptanoat, Hexanoat, Hydrochlorid, Hydrobromid, Hydrojodid, 2-Hydroxyethansulfonat, Lactat, Maleat, Methansulfonat, 2-Naphthalensulfonat, Nicotinat, Oxalat, Pamoat, Pectinat, Persulfat, 3-Phenyl-propionat, Pikrat, Pivalat, Propionat, Succinat, Tartrat, Thiocyanat, Tosylat und Undecanoat. Basische Salze umfassen Ammoniumsalze, Alkalimetallsalze wie z. B. Natrium- und Kaliumsalze, alkalische Erdmetallsalze wie z. B. Calcium-, Magnesium- und Zinksalze, Salze mit organischen Basen wie z. B. Dicyclohexylaminsalze, N-Methyl-G-glucamin und Salze von Aminosäuren wie z. B. Arginin, Lysin und so weiter. Die basischen Stickstoff enthaltenden Reste können auch mit solchen Mitteln wie niederen Alkylhaliden, wie z. B. Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Butylchlorid, -Bromiden und -jodiden; Dialkylsulfaten, wie z. B. Dimethyl-, Diethyl-, Di-butyl- und Diamylsulfaten; langketigen Haliden, wie z. B. Decyl-, Lauryl-, Myristyl- und Stearylchloriden, -Bromiden und -jodiden; Aralkylhaliden, wie z. B. Benzyl- und Phenethylbromiden und anderen quarternisiert sein. Dadurch werden wasser- oder öllösliche oder dispergierte Produkte erhalten. Die bevorzugten Salze dieser Erfindung sind N-Methyl-D-glucamin-, Calcium- und Natriumsalze.

[0113] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung umfassen jeden beliebigen Komplex der vorliegenden Erfindung oder pharmazeutisch verträgliche Salze davon, zusammen mit jedem beliebigen pharmazeutisch verträglichen Träger, Adjuvant oder Vehikel. Pharmazeutisch verträgliche Träger, Adjuvanten und Vehikel, die in den pharmazeutisch verträglichen Zusammensetzungen dieser Erfindung verwendet werden können, umfassen Ionenaustauscher, Aluminium, Aluminiumstearat, Lecithin, Serumproteine wie z. B. menschliches Serumalbumin, Puffersubstanzen wie z. B. Phosphate, Glycin, Sorbinsäure, Kaliumsorbit, TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), Teilglycerid-Mischungen gesättigter pflanzlicher Fettsäuren, Wasser, Salze oder Elektrolyte wie z. B. Protaminsulfat, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Natriumchlorid, Zinksalze, kolloidales Kieselgel, Magnesiumtrisilikat, Polyvinylpyrrolidon, auf Cellulose basierende Stoffe, Polyethylenglycol, Natrium-Carboxymethylcellulose, Polyacrylate, Wachse, Polyethylen-Polyoxypropilen-Block-Polymere, Polyethylenglycol und Wollfett, sind aber nicht auf diese beschränkt.

[0114] Gemäß dieser Erfindung können sich die pharmazeutischen Zusammensetzungen in der Form eines sterilen, injizierbaren Präparats befinden, wie zum Beispiel einer sterilen, injizierbaren wässrigen oder öligen Suspension. Diese Suspension kann gemäß den im Fachgebiet bekannten Verfahren unter Verwendung geeigneter Verteilungs- oder Befeuchtungsmittel und Suspendierungsmittel formuliert werden. Das sterile, injizierbare Präparat kann auch eine sterile, injizierbare Lösung oder eine Suspension in einem nicht toxischen, parenteral verträglichen Verdünnungs- oder Lösemittel sein, zum Beispiel eine Lösung in 1,3-Butandiol. Unter den verträglichen Vehikeln und Lösemitteln, die verwendet werden können, befinden sich Wasser, Ringer-Lösung und isotonische Natriumchloridlösung. Zusätzlich werden üblicherweise sterile, gehärtete Öle als Lösemittel oder Suspendierungsmedium verwendet. Zu diesem Zweck kann jedes beliebige milde, gehärtete Öl verwendet werden, einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride. Fettsäuren, wie z. B. Oleinsäure und ihre Glycerid-Derivate sind nützlich zur Herstellung von Injektionsmitteln, ebenso wie natürliche, pharmazeutisch verträgliche Öle, wie z. B. Olivenöl oder Rizinusöl, ebenso wie natürliche, pharmazeutisch verträgliche Öle, wie z. B. Olivenöl oder Rizinusöl, insbesondere in ihren polyoxyethylierten Formen. Diese Öllösungen oder -suspensionen können auch ein langketiges alkoholisches Verdünnungs- oder Verteilungsmittel enthalten, wie z. B. Ph. Helv. oder einen ähnlichen Alkohol.

[0115] Da die Kontrastmittel dieser Erfindung an Plasmaproteine binden können, was in einigen Fällen von der Dosis und der Injektionsrate abhängt, könnte es sein, dass die Bindestellen auf den Plasmaproteinen abgesättigt werden. Diese wird zu einer verminderten Bindung des Mittels führen und könnte die Halbwertszeit oder die Verträglichkeit beeinträchtigen. Daher kann es wünschenswert sein, dass schon vorher an steriles Albumin oder eine Plasmaersatzlösung gebundene Mittel zu injizieren. Alternativ kann ein Apparat/Spritze verwendet werden, der/die das Kontrastmittel enthält und es mit dem Blut vermischt, das in die Spritze aufgezogen wird; dieses wird dann dem Patienten wieder injiziert.

[0116] Die Verbindungen und die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung kön-

nen oral, parenteral, durch ein Inhalationsspray, örtlich, rektal, nasal, bukkal vaginal oder über ein implantiertes Reservoir in Dosierungsformulierungen, die herkömmliche nicht toxische pharmazeutisch verträgliche Träger, Adjuvanzien und Vehikel enthalten, verabreicht werden. Der Ausdruck „parenteral“, wie er hierin verwendet wird, umfaßt subcutane, intravenöse, intramuskuläre, intraarterielle, intrasynoviale, intrarasternale, intrathekale, intrahepatische, intralesionale und intrakraniale Injektions- oder Infusionsverfahren.

[0117] Bei der oralen Verabreichung können die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung in jeder beliebigen oral verträglichen Dosierungsform verabreicht werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Kapseln, Tabletten, wässrige Suspensionen oder Lösungen. Im Falle von Tabletten zur oralen Verwendung umfassen die üblicherweise verwendeten Träger Lactose und Maisstärke. Typischerweise werden Gleitmittel, wie z. B. Magnesiumstearat ebenfalls zugefügt. Bei der oralen Verabreichung in Kapselform umfassen die nützlichen Verdünnungsmittel Lactose und getrocknete Maisstärke. Wenn wässrige Suspensionen zur oralen Verwendung erforderlich sind, wird der aktive Bestandteil mit Emulsionen und Suspensionen bildenden Mitteln kombiniert. Wenn gewünscht, können bestimmte Süßstoffe, Geschmacksstoffe oder Farbstoffe ebenfalls zugegeben werden.

[0118] Alternativ können die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung, wenn sie in Form von Zäpfchen zur rektalen Verabreichung verabreicht werden, durch Mischung des Mittels mit einem geeigneten nicht reizenden Excipienten hergestellt werden, der bei Zimmertemperatur fest, aber bei der Temperatur des Enddarms flüssig ist, und daher im Enddarm schmilzt und das Arzneimittel freisetzt. Solche Materialien umfassen Kakaobutter, Bienenwachs und Polyethylenglycole.

[0119] Wie vorstehend erwähnt, können die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung auch örtlich verabreicht werden, insbesondere, wenn das Ziel der Behandlung Bereiche oder Organe umfaßt, die in einer örtlichen Anwendung rasch zugänglich sind, einschließlich der Augen, der Haut oder dem Enddarmtrakt. Geeignete örtliche Formulierungen können für jeden dieser Bereiche oder Organe rasch hergestellt werden.

[0120] Die örtliche Anwendung im Enddarmtrakt kann durch die Formulierung für ein Zäpfchen für den Enddarm (vergleiche vorstehend) oder durch eine geeignete Formulierung für einen Einlauf vorgenommen werden. Es können auch örtlich angewendete, über die Haut wirkende (transdermale) Pflaster verwendet werden.

[0121] Bei örtlichen Anwendungen können die pharmazeutischen Zusammensetzungen in einer geeigneten Salbe formuliert werden, die den aktiven Bestandteil in einem oder mehreren Trägern suspendiert oder gelöst enthält. Träger zur örtlichen Anwendung der Verbindungen dieser Erfindung umfassen Mineralöl, flüssiges Paraffin, weißes Paraffin, Propylenglycol, Polyethoxyethylen, Polyoxypropylverbindungen, Emulsionen bildende Wachse und Wasser, sind aber nicht auf diese beschränkt. Alternativ können die pharmazeutischen Zusammensetzungen in einer geeigneten Lotion oder einer Creme formuliert werden, die die aktiven Bestandteile in einem oder mehreren pharmazeutisch verträglichen Trägern suspendiert oder gelöst enthält. Geeignete Träger umfassen Mineralöl, Sorbitan-Monostearat, Polysorbat 60, Cetylestearwachse, Cetearylalkohol, 2-Octyldodecanol, Benzylalkohol und Wasser, sind aber nicht auf diese beschränkt.

[0122] Bei der Anwendung über die Nase können die pharmazeutischen Zusammensetzungen als in feinen Tröpfchen verteilter (micronized) Suspension in isotonischer, auf den pH-Wert eingestellter, steriler Kochsalzlösung, oder bevorzugter als Lösung in isotonischer, auf den pH-Wert eingestellter, steriler Kochsalzlösung, entweder mit oder ohne Konservierungsmittel, wie z. B. Benzylalkoniumchlorid, formuliert werden. Alternativ können die pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Anwendung über die Nase in einer Salbe, wie z. B. Paraffin, formuliert werden.

[0123] Zur Anwendung über nasale Aerosole oder zur Inhalation werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen dieser Erfindung gemäß Verfahren hergestellt, die im Fachgebiet der pharmazeutischen Formulierung wohlbekannt sind, und können als Lösungen in Kochsalzlösung unter Verwendung von Benzylalkohol oder anderen geeigneten Konservierungsmitteln, sowie die Absorption fördernden Stoffen, um die Bioverfügbarkeit zu steigern, Fluorkohlenwasserstoffen und/oder anderen herkömmlichen Suspendierungs- oder Verteilungsmitteln hergestellt werden.

[0124] Die Dosierung hängt von der Empfindlichkeit der diagnostischen Bilderzeugungsgeräte ab, sowie von der Zusammensetzung des Kontrastmittels. Zum Beispiel erfordert bei der Bilderzeugung über Kernspintomographie (MRI), ein Kontrastmittel, das eine stark paramagnetische Substanz enthält, wie z. B. Gadolinium (III), im Allgemeinen eine niedrigere Dosierung als ein Kontrastmittel, das eine paramagnetischen Substanz mit einem niedrigeren magnetischen Moment enthält, wie z. B. Eisen (III). Die Dosierung des aktiven Metall-Liganden-Komplexes liegt bevorzugt im Bereich von etwa 0,001 bis zu 1 mmol/kg Körpergewicht pro Tag. Stärker bevorzugt liegt die Dosis im Bereich von etwa 0,005 und etwa 0,05 mmol/kg Körpergewicht pro Tag.

[0125] In dem Fall, in dem die optische Bilderzeugung dazu verwendet wird die Interventionstherapie zu überwachen, wird die Dosis des Mittels in etwa mit der der Kernspintomographie (MRI) vergleichbar sein (0,001–10 mmol/kg). Wie bei den MRI-Kontrastmitteln, ist die Verabreichung optischer Mittel im Fachgebiet wohlbekannt.

[0126] Es ist jedoch verständlich, dass ein spezielles Dosierungsprotokoll bei einem bestimmten Patienten auch von einer Vielzahl an Faktoren abhängt, einschließlich dem Alter, dem Körpergewicht, der allgemeinen Gesundheit, dem Geschlecht, der Ernährung, der Zeit der Verabreichung, der Ausscheidungsrate, der Zusam-

mensetzung des Arzneimittels und der Beurteilung durch den behandelnden Arzt.

[0127] Nach der Verabreichung der geeigneten Dosis des Kontrastmittels wird der Patient dann entweder der Kernspintomographie (MRI) oder der optischen Bilderzeugung (Bilderzeugung durch ultraviolettes Licht, sichtbares Licht oder Infrarotlicht) unterzogen. Die geeigneten Einstellungen und die Parameter für die Bilderzeugung, um diese Bilderzeugungsverfahren sowie die Sammlung der Daten und die Analyse (d. h. die Überwachung der Signaleigenschaften des Mittels) durchzuführen, sind wohlbekannt oder unterliegen allgemein anerkannten Grundsätzen.

[0128] Der abschließende Schritt des Verfahrens dieser Erfindung besteht darin, eine bilderzeugende Signaleigenschaft des verabreichten Kontrastmittels zu überwachen. Bei der optischen Bilderzeugung umfassen solche Eigenschaften die Extinktion, die Reflexionsfähigkeit, die Fluoreszenz oder die Phosphoreszenz und/oder ihre Zerfallszeiten, die Chemilumineszenz, die Lichtstreuung oder andere spektrale Eigenschaften. Bei der MRI-Bilderzeugung umfassen solche Signaleigenschaften die R_1 - und die R_2 -Relaxationsfähigkeiten (beziehungsweise $1/T_1$ und $1/T_2$).

[0129] In einem stärker bevorzugten Aspekt dieser Erfindung ist die „Echtzeit“-Bilderzeugung möglich, wenn ein Bild erzeugt wird, und daher werden die Signaleigenschaften periodisch im Verlauf der Interventionstherapie überwacht. Die Frequenz in der die Bilder erzeugt und überwacht werden, wird von der Art und der Dauer der Therapie abhängen.

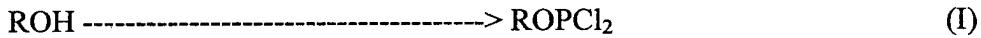
[0130] Damit diese Erfindung besser verstanden werden kann, wird sie in den folgenden Beispielen weitergeführt. Diese Beispiele werden nur zum Zwecke der Erläuterung angeführt und dürfen nicht so ausgelegt werden, dass sie den Rahmen der Erfindung in irgendeiner Weise einschränken.

Beispiele

[0131] Das Folgende ist ein Syntheseschema für die bevorzugten Kontrastmittel, die bei dem Verfahren der Erfindung nützlich sind, insbesondere für MS-325. Vergleiche mit der Patentanmeldung der Vereinigten Staaten mit der Serien-Nr. 08/833,745, die am 11. April 1997 angemeldet wurde und auf die hierin durch Bezugnahme hingewiesen wird. Ein anderes nützliches, jedoch nicht gleichermaßen bevorzugtes, Syntheseschema für diese Kontrastmittel wird in der Patentanmeldung der Vereinigten Staaten mit der Serien-Nr. 08/32,317 beschrieben, die am 1. Februar 1995 angemeldet wurde und auf die hierin durch Bezugnahme hingewiesen wird.

[0132] Zuerst wird ein Alkohol ROH mit PCl_3 , bevorzugt im molaren Verhältnis von 1 : 1, umgesetzt, um ein Dichlorophosphin-Reaktionsprodukt (I) zu bilden:

PCl_3 , Lösemittel

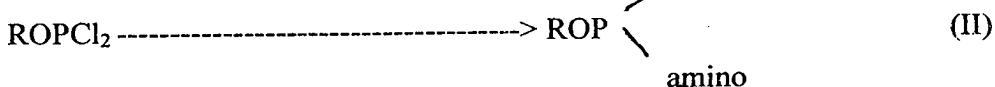


[0133] Der Rest R kann ein linearer, verzweigter oder cyclisch aliphatischer, Aryl-, heterocyclischer, Peptid-, peptidähnlicher, Deoxyribo- oder Ribonucleotid oder -nucleosid, oder cyclischer oder acyclischer organischer chelatbildender Rest sein, der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefel-, Halogen-, Aliphat-, Amid-, Ester-, Sulfonamid-, Aryl-, Acyl-, Sulfonat-, Phosphat-, Hydroxylsubstituenten oder organometallischen Substituenten substituiert ist.

[0134] Diese Reaktion findet in Anwesenheit eines Ether- oder Kohlenwasserstoff-Lösemittels statt und wird bei einer Temperatur von etwa $-50^{\circ}C$ bis etwa $15^{\circ}C$, bevorzugt von etwa $-10^{\circ}C$ bis etwa $-5^{\circ}C$, über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten bis etwa 3 Stunden, bevorzugt von etwa 1 bis etwa 1,5 Stunden, durchgeführt. Bei dem Lösemittel kann es sich um jedes beliebige Ether- oder Kohlenwasserstoff-Lösemittel handeln, und bevorzugt wird es aus der Gruppe ausgewählt, umfassend: Heptane, Methyl-t-butylether, Dioxane, Tetrahydrofuran, Diethylether und Ethylenglycoldialkylether. Noch bevorzugter handelt es sich um Tetrahydrofuran.

[0135] Das Dichlorophosphin (I) wird dann mit etwa 5 bis etwa 6 Äquivalenten einer Aminbase umgesetzt, um ein Bis(amino)phosphino-Reaktionsprodukt (II) zu bilden:

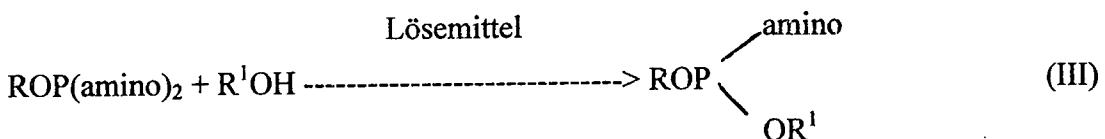
Aminbase, Lösemittel



[0136] Diese Reaktion findet wie vorstehend beschrieben ebenfalls in Gegenwart eines Ether- oder Kohlenwasserstoff-Lösemittels statt und wird bei einer Temperatur von etwa $-50^{\circ}C$ bis etwa $15^{\circ}C$, bevorzugt von etwa $-10^{\circ}C$ bis etwa $-5^{\circ}C$, über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten bis etwa 3 Stunden, bevorzugt von etwa 15 bis etwa 30 Minuten, durchgeführt. Die Base, die dazu verwendet wird, das Reaktionsprodukt (II) zu bilden, kann eine Aminbase sein, bevorzugt eine Base, die einen pK_s -Wert von etwa 5 bis etwa 11 besitzt und noch stärker bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: Imidazol, 2,4-Dimethylimidazol, 1H-Tetrazol, Dialkylaminen (Methyl-, Ethyl-, Butyl-), Pyridin, Piperazin, Piperidin, Pyrrol, 1H-1,2,3-Triazol und

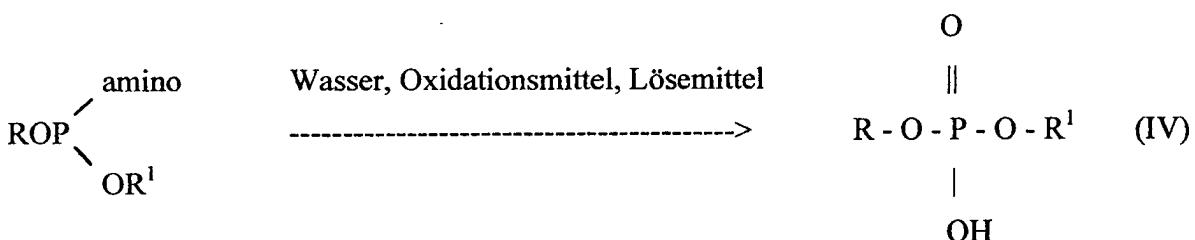
1,2,4-Triazol. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Base Imidazol.

[0137] Die Bis(amino)phosphino-Verbindung (II) wird dann mit etwa 0,75 bis etwa 1,0 Äquivalenten eines zweiten Alkohols R^1OH umgesetzt, um ein (Amino)phosphino-Reaktionsprodukt (III) zu bilden, wobei R^1 irgendeiner der Substituenten sein kann, die vorstehend für den Rest R definiert wurden:



[0138] Diese Reaktion findet in Gegenwart eines Ether- oder Kohlenwasserstoff Lösemittels statt und wird bei einer Temperatur von etwa -50°C bis etwa 15°C , bevorzugt von etwa -10°C bis etwa -5°C , über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten bis etwa 3 Stunden, bevorzugt von etwa 1 bis etwa 1,5 Stunden, durchgeführt. Bei dem Lösemittel kann es sich um jedes beliebige Ether- oder Kohlenwasserstoff-Lösemittel handeln, und bevorzugt wird es aus der Gruppe ausgewählt, umfassend: Heptane, Methyl-t-butylether, Dioxane, Tetrahydrofuran, 1,3-Dioxolane, Diglyme, Diethylether, Dialkylether und Ethylenglycoldialkylether. Noch bevorzugter handelt es sich um Tetrahydrofuran.

[0139] Abschließend wird die (Amino)phosphino-Verbindung (III) mit etwa einem Äquivalent saurem Wasser reagieren gelassen, das bevorzugt einen pH-Wert von etwa 2,5 bis etwa 5 aufweist, und etwa einem oder mehreren Äquivalenten eines Oxidationsmittels, um die gewünschte Phosphodiester-Verbindung (IV) zu bilden:



[0140] Das Oxidationsmittel kann jedes beliebige Peroxid-Oxidationsmittel sein und wird bevorzugt aus der Gruppe der Perjodate ausgewählt. Noch bevorzugter handelt es sich um Natriumperjodat.

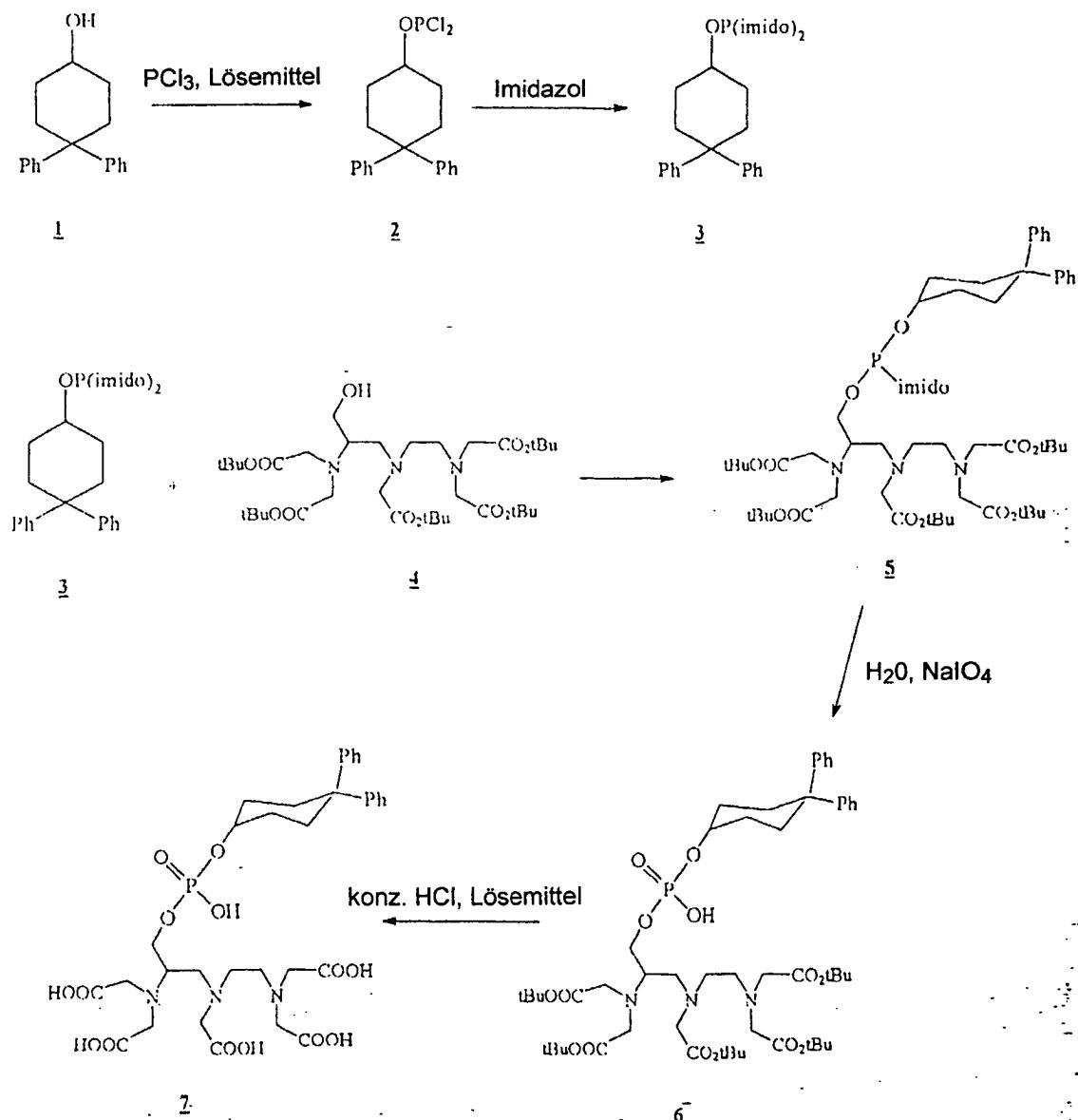
[0141] Die vorstehende Hydrolyse und die Oxidation werden in einem Lösemittelgemisch bei einer Temperatur von etwa -15°C bis etwa 25°C , bevorzugt von etwa 0°C bis etwa 2°C , über einen Zeitraum von etwa 10 bis etwa 24 Stunden, bevorzugt von etwa 10 bis etwa 15 Stunden, durchgeführt. Das Lösemittelgemisch umfaßt jede beliebige Kombination an Lösemitteln, die aus der Gruppe, bestehend aus Ether- oder Kohlenwasserstoff Lösemitteln ausgewählt werden. Bevorzugt umfaßt das Lösemittelgemisch Tetrahydrofuran, Heptan und Toluol in einem Volumenverhältnis von 10 : 10 : 1.

[0142] Gemäß diesem Syntheseschema wird der chelatbildende Ligand im MS-325-Komplex wie folgt hergestellt.

Herstellung von [(4,4-Diphenylcyclohexyl)-phosphooxymethyl]-diethylen-triaminpentaessigsäure

[0143] Die Herstellung des chelatbildenden Liganden, der im MS-325-Komplex verwendet wurde, wird nachstehend in Schema I gezeigt:

Schema I



[0144] Einem einzigen Reaktionsgefäß, das eine Lösung von Phosphortrichlorid (13,2 mL, 0,151 mol) in Tetrahydrofuran (202 ml) enthielt, wurde eine Lösung von 4,4-Diphenylcyclohexanol (1) (38,34 g, 0,152 mol) in Tetrahydrofuran (243 ml) zugegeben, während gerührt wurde und eine interne Temperatur von $-6,2^\circ\text{C}$ bis $-5,3^\circ\text{C}$ über 1,5 Stunden beibehalten wurde. Das Gemisch wurde dann weitere 34 Minuten gerührt und ergab ein Dichlorophosphin-Reaktionsprodukt (2), das ein chemische Verschiebung von 174,28 ppm bei der ^{31}P -NMR besaß.

[0145] Zu dieser Lösung wurde Imidazol (51,34 g, 0,753 mol) in Tetrahydrofuran (243 ml) zugegeben, während gerührt wurde und eine interne Temperatur von $-7,8^\circ\text{C}$ bis $-3,6^\circ\text{C}$ über 37 Minuten beibehalten wurde. Das erhaltene Gemisch wurde dann weitere 20 Minuten gerührt und ergab ein Bis(amino)phosphino-Reaktionsprodukt (3), das ein chemische Verschiebung von 106,36 ppm bei der ^{31}P -NMR besaß.

[0146] Zu diesem Gemisch wurde eine Lösung zugegeben, die aus 2-(R)-Hydroxymethyldiethyltriaminopentaessigsäure-penta-t-butylester (4) (160,0 g, 0,128 mol, Reinheit: 56,32% nach Gewicht) in Heptan (114 ml) bestand, während gerührt wurde und eine interne Temperatur von $-6,8^\circ\text{C}$ bis $-4,8^\circ\text{C}$ über 1 Stunde und 6 Minuten beibehalten wurde. Dieses Gemisch wurde dann weitere 23 Minuten gerührt und ergab eine Lösung (5), die ein chemische Verschiebung von 123,8 ppm bei der ^{31}P -NMR besaß.

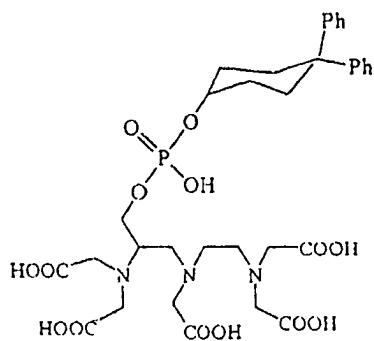
[0147] Abschließend wurde Wasser (202 ml) über einen Zeitraum von etwa 1 Minute zugegeben, während die interne Temperatur auf $-6,5^\circ\text{C}$ bis $6,5^\circ\text{C}$ gehalten wurde. Das Gemisch wurde 5 Minuten gerührt, darauf erfolgte die Zugabe von Heptan (620 ml), Toluol (70 ml) und 5 N wässriger Salzsäure (202 ml) über 5 Minuten, während die interne Temperatur auf $1,0^\circ\text{C}$ bis $12,1^\circ\text{C}$ gehalten wurde. Dann wurde Natriumperjodat (22,6 g, 0,106 mol) über einen Zeitraum von 3 Minuten zugegeben, während die innere Temperatur auf $10,5^\circ\text{C}$ gehalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde innerhalb von 35 Minuten auf Zimmertemperatur erwärmt und weite-

re 2,5 Stunden gerührt und ergab eine Lösung (6), die eine chemische Verschiebung von 4,27 ppm bei der ^{31}P -NMR besaß. Die Phasen wurden voneinander getrennt, und die organische Phase wurde mit 10% wässrigem Natriumthiosulfat ($2 \times 809 \text{ mL}$) gewaschen.

[0148] Zu der vorstehenden organischen Phase wurde Tetraoctylammoniumbromid (8,21 g, 0,015 mol) gegeben. Dann wurde über einen Zeitraum von 22 Minuten konzentrierte Salzsäure (11,51 M, 405 mL) zugegeben, wobei eine innere Temperatur von 22,8°C bis 25,0°C aufrecht erhalten wurde. Dieses Gemisch wurde 16,0 Stunden gerührt und ergab eine Verbindung (7), die eine chemische Verschiebung von 7,78 ppm bei der ^{31}P -NMR besaß. Die Phasen wurden getrennt, und die organische Phase wurde verworfen.

[0149] Zu der vorstehenden wässrigen Phase wurden 8 M wässriges Natriumhydroxid (630 mL) zugegeben, bis ein pH-Wert von 6,56 gemessen wurde. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck (50°C bis 55°C, Vakuum: 85 mm Hg) konzentriert, bis 400 mL des Lösemittels gesammelt worden waren (etwa 1 Stunde). Die Lösung wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt, und Amberlite XAD-4-Harz (92,0 g) wurde zugegeben. Die Suspension wurde 50 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt und filtriert, um eine schwach gelbliche wässrige Lösung (1,1 L) zu erhalten.

[0150] Die vorstehende Lösung wurde auf eine C-18-Umkehrphasen-Kieselgel-Säule geladen (271 g, in Methanol feuchtgepackt und dann mit 800 mL Methanol, 800 mL Methanol/Wasser 1 : 1 und 800 mL Wasser gewaschen) und mit Wasser eluiert. Der erste 1,0 L des gesammelten Eluats wurde verworfen, und die folgenden gesammelten 1,3 L wurden zurück behalten. Zu der aufbewahrten Lösung wurden 6 N wässrige Salzsäure (60 mL, bis zu einem pH-Wert von 2,15) und 3 N wässrige Salzsäure (60 mL, bis zu einem pH-Wert von 1,63) gegeben. Der Brei wurde 1,25 Stunden gerührt und dann filtriert. Der Festkörper wurde mit einer wässrigen Lösung (500 mL) mit einem pH-Wert von 1,67 gewaschen und getrocknet (48–50°C, 4–6 mm Hg) bis ein konstantes Gewicht erreicht war (18,0 Stunden), um eine schmutzig weiße, feste Verbindung mit der folgenden Formel zu erhalten:



(65,5 g, Ausbeute: 68,89%, Reinheit: 99,45% nach Gewicht, 98,95% nach Fläche (Peakfläche), 3,02% Wasser und 97,81% chelatbildendes Material).

Experimentelles

[0151] Es wurden drei Proben hergestellt und bewertet. Die erste war eine Kontrollprobe, die menschliches Serumalbumin (HSA) ohne ein Kontrastmittel enthielt. Die anderen beiden Proben enthielten HSA und das unspezifische Mittel Gd-DTPA, beziehungsweise das HSA-spezifische Mittel MS-325.

[0152] Bei diesen Beispielen wurden die longitudinalen Relaxationsfähigkeiten (R_1 , $\text{mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) überwacht und durch die Bestimmung der Relaxationsrate ($1/T_1$) der Wasserprotonen bei 20 MHz in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, 150 mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH-Wert: 7,4) in PBS-Lösungen, die 4,5 Gewichtsprozent HSA enthielten oder in Gelen, die 4,5 Gewichtsprozent HSA und 1% Agar enthielten, erhalten. Die Abhängigkeit der Relaxationsfähigkeit (R_1) von der Temperatur, wurde durch die Variierung der Temperatur der Proben mit einem Umwälz-Wasserbad und der Überwachung der Probentemperatur mit einem Thermoelement beobachtet.

Beispiel 1: Überwachung der Hitze-Nekrose von 4,5% HSA

[0153] Die folgenden drei Proben wurden in Lösungen von 4,5% HSA hergestellt: (1) eine Kontrollprobe ohne ein Kontrastmittel; (2) eine Vergleichsprobe mit Gd-DTPA und (3) eine Probe mit MS-325. Die Proben mit Gd-DTPA und MS-325 wurden durch die Zugabe einer wässrigen Formulierung (pH-Wert: 7), die entweder Gd-DTPA oder MS-325 enthielt, zu der 4,5%-igen HSA-Lösung hergestellt. Die so erhaltenen Gemische besaßen eine Konzentration von 0,3 mM Gd-DTPA, beziehungsweise 0,1 mM MS-325.

[0154] Die drei Proben wurden dann dazu verwendet, die Hitzedenaturierung der 4,5%-igen HSA-Lösungen zu überwachen. Um dies durchzuführen, wurden die T_1 -Daten (und somit die R_1 -Daten ($= 1/T_1$)) für jede Probe

bei 20 MHz über einen Temperaturbereich von 20–60°C gesammelt. Dann wurde jede Probe aus dem NMR-Gerät entfernt und 15 Minuten bei 85°C erhitzt, um die Hitzedenaturierung des HSA zu induzieren. Anschließend wurden die Proben in das NMR-Gerät zurückgestellt, und die T_1 -Daten wurden bei dieser höheren Temperatur gesammelt. Vergleiche mit der nachstehenden Tabelle 1 und der **Fig. 1**.

Tabelle 1

Temperatur (°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

[0155] Wie Tabelle 1 und **Fig. 1** zeigen, weist nach der Hitzedenaturierung der drei HSA enthaltenden Proben, die Probe, die zusätzlich das HSA-spezifische Kontrastmittel MS-325 enthielt, eine signifikante Abnahme des beobachteten R_1 -Werts (ein Verlust von $26,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) während der Denaturierung des HSA auf, wie durch Messung direkt vor der Denaturierung ($56,2^\circ\text{C}$) und direkt nach der Denaturierung (85°C) bestimmt wurde. Die Probe, die das unspezifische Kontrastmittel Gd-DTPA enthielt, zeigte jedoch sogar bei einer dreifachen Konzentration gegenüber der, die für die MS-325-Probe verwendet worden war, eine nur geringe Veränderung des R_1 -Wertes (eine Verlust von nur $0,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) während der Denaturierung. Dies bedeutet, dass Gd-DTPA weder an natives noch an denaturiertes HSA bindet.

[0156] Nachdem die vorstehenden Daten erhalten worden waren, wurde den denaturierten Proben erlaubt, sich auf die physiologische Temperatur (37°C) abzukühlen, und die T_1 -Daten wurden erneut gesammelt. Die Probe mit MS-325 behielt die signifikante Verminderung des R_1 -Wertes bei (ein Nettoverlust von $25 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$), während die Probe mit Gd-DTPA nur geringe Veränderungen des R_1 -Wertes aufwies (ein Nettoverlust von $0,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$).

Beispiel 2: Kernspintomographie (MRI)-Bilderzeugung der Hitzedenaturierung von HSA bei 1,0 Tesla

[0157] Die folgenden Proben wurden in 1%-igen Agargelen hergestellt, die 4,5% HSA enthielten: (1) eine Kontrollprobe ohne Kontrastmittel; (2) eine Vergleichsprobe mit Gd-DTPA und (3) eine Probe mit MS-325. Die Kontrastmittel wurden in einer Menge zugegeben, die ausreichte, dass die Konzentrationen von Gd-DTPA und MS-325, $0,3 \text{ mM}$ Gd-DTPA, beziehungsweise $0,1 \text{ mM}$ MS-325 betrugen. Solche Agaragele, die 4,5% HSA enthalten, werden als „Phantome“ bezeichnet.

[0158] Die anfänglichen, nach T_1 -gewichteten MRI-Aufzeichnungen (FISP-3D, TR = 15, TE = 4, Alpha = 30) der Agarphantome bei 1,0 Tesla wurden anschließend bei einer Temperatur von etwa 25°C erhalten. Die anfänglichen Aufzeichnungen offenbarten, dass die Phantome, die MS-325 enthielten, heller waren, als die Phantome, die Gd-DTPA enthielten (Vergleichsprobe), oder 4,5% HSA alleine (Kontrollprobe); dieses Ergebnis war aufgrund der spezifischen Bindung von MS-325 an HSA wie erwartet.

[0159] Die Phantome wurden dann in einem Umwälz-Wasserbad erhitzt, wobei zusätzliche, nach dem T_1 -Wert gewichtete MRI-Aufzeichnungen über die Zeit erhalten wurden. Wenn die Temperatur erhöht wurde, blieben die MS-325 enthaltenden Phantome viel heller (geringerer Verlust an Signalintensität, gemessen als prozentualer Verlust des ROI (= Bereich von Interesse)), als die Phantome, die Gd-DTPA oder 4,5% HSA allein enthielten. Vergleiche mit der nachstehenden Tabelle 2 und der **Fig. 2**.

Tabelle 2

Zeit (Min.)	Temperatur (°C)	% Verlust im ROI 4,5 % HSA	% Verlust im ROI 0,3 mM Gd-DTPA in 4,5 % HSA	% Verlust im ROI 0,1 mM MS-325 in 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

[0160] Wenn die Phantome über 50–60°C erhitzt wurden, wurden sie undurchsichtig, was der Hitzedenaturierung des HSA entspricht. Wie Tabelle 2 und **Fig. 2** zeigen, wurde gleichzeitig ein drastischer Verlust der Signalintensität bei den Phantomen beobachtet, die MS-325 enthielten (76% Verlust der Intensität). Die Phantome, die jedoch Gd-DTPA oder HSA allein enthielten, erzeugten eine nur mäßige Veränderung der Signalintensität. Die Gd-DTPA-Phantome verblieben als konstant dunkle Bilder im Verlauf der MRI-Aufzeichnungen nach der Hitzedenaturierung zurück, und dies sogar bei einer Gd-DTPA-Konzentration, die dreimal so hoch war, wie die, die für die MS-325-Phantome verwendet worden war.

[0161] Nachdem die vorstehenden Daten gesammelt worden waren, wurde den denaturierten Proben erlaubt, sich auf die normale physiologische Temperatur (37°C) abzukühlen. Die MS-325 enthaltenden Phantome behielten ihre Verminderung der Signalintensität bei (32% Verlust). Die Kontrollphantome und die Gd-DTPA enthaltenden Phantome wiesen immer noch eine Verminderung von nur 5%, beziehungsweise 10% der Signalintensität nach der Denaturierung auf.

[0162] Gemäß diesen Ergebnissen, können die Kontrastmittel, die in dem Verfahren dieser Erfindung nützlich sind, ein sehr empfindliches Anzeichen für die Hitzedenaturierung von HSA liefern. Tatsächlich war es so, dass wenn sogar die dreifache Konzentration eines anderen Kontrastmittels verwendet wurde, diese höhere Konzentration nicht die Empfindlichkeit liefern konnte, die erforderlich war, um die Hitzedenaturierung von HSA zu überwachen.

Beispiel 3: Die Denaturierung von HSA durch Ethanol

[0163] Die folgenden drei Proben wurden in Lösungen von 4,5% HSA hergestellt: (1) eine Kontrollprobe ohne Kontrastmittel; (2) eine Vergleichsprobe mit Gd-DTPA und (3) eine Probe mit MS-325. Die Proben mit Gd-DTPA und MS-325 wurden durch Zugabe einer wässrigen Formulierung (pH-Wert: 7), die entweder Gd-DTPA oder MS-325 enthielt, zu der 4,5%-igen HSA-Lösung hergestellt. Die so erhaltenen Lösungen besaßen eine Konzentration von 0,31 mM Gd-DTPA, beziehungsweise 0,08 mM MS-325.

[0164] Dann wurde absolutes Ethanol zu jeder dieser Proben titriert. Die T_1 -Daten (und somit die R_1 -Daten (= $1/T_1$) wurden bei 20 MHz und 37°C nach jeder Ethanolzugabe gesammelt. Vergleiche mit der nachstehenden Tabelle 3 und der **Fig. 3**.

Tabelle 3

Ethanol (%)	R ₁ 4,5 % HSA	Ethanol (%) für Gd-DTPA	R ₁ 0,31 mM Gd-DTPA	Ethanol (%) für 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

[0165] Wie Tabelle 3 und **Fig. 3** zeigen, wies während der Abtragung durch Ethanol in den 4,5%-igen HSA-Lösungen die MS-325 enthaltende Probe eine signifikante Abnahme der beobachteten Relaxationsfähigkeit ($33 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) auf und erlaubte daher den Nachweis einer durch Ethanol hervorgerufenen Nekrose. Die Probe, die Gd-DTPA enthielt (sogar in einer fast vierfachen Konzentration verglichen zu MS-325), zeigte jedoch nur eine geringfügige Veränderung der beobachteten Relaxationsfähigkeit ($0,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$).

Patentansprüche

1. Verwendung eines Kontrastmittels für die Herstellung eines Diagnosemittels zur Überwachung eines Bildkontrastes während einer Interventionstherapie unter Verwendung einer Kernspintomographie (MRI) mit Kontrastverstärkung, wobei das Kontrastmittel:

in der Lage ist, an ein Zielgewebe oder an einen Zielgewebebestandteil zu binden, das/der einer Interventions-therapie unterzogen wird oder unterzogen worden ist;

eine spezifische Affinität für das Gewebe oder den Gewebebestandteil aufweist;

eine bildverstärkende Einheit (IEM) und eine vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit (SDTBM) umfasst, wobei:

die vom Zustand abhängige gewebebindende Einheit bei einer Bindung an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in denaturiertem Zustand gekennzeichnet ist durch eine R_1 -Relaxationsfähigkeit, die geringer ist als etwa 80 der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder an den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels; und ein für das Kontrastmittel charakteristisches Bildsignal überwacht wird, um festzustellen, ob die Interventionstherapie abgeschlossen ist.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die IEM ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus organischen Molekülen, Metallionen, Salzen und Chelaten, Partikeln, Clustern, Eisenpartikeln, markierten Peptiden, Proteinen, Polymeren, Liposomen, organischen Farbstoffen und anorganischen Farbstoffen.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die IEM ein physiologisch kompatibles Chelat umfasst, das mindestens einen cyclischen oder acyclischen organischen Chelatbildner umfasst, der mit einem oder mehreren Metallionen mit den Ordnungszahlen 13, 21–34, 39–42, 44–50 oder 57–83 komplexiert ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das Metallion ein paramagnetisches Metallion mit den Ordnungszahlen 21–29, 42, 44 oder 57–83 ist.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das paramagnetische Metallion ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Gd(III), Fe(III), Mn(II), Mn(III), Cr(III), Cu(II), Dy(III), Tb(III), Ho(III), Er(III) und Eu(III).

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Metallion Gd(III) ist.

7. Verwendung nach Anspruch 5, wobei der Chelatbildner ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus DTPA, DOTA, DTPA-BMA und HP-DO3A.

8. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die IEM ein Eisenpartikel oder ein Metallchelat von Dy, Gd oder Ho umfasst.

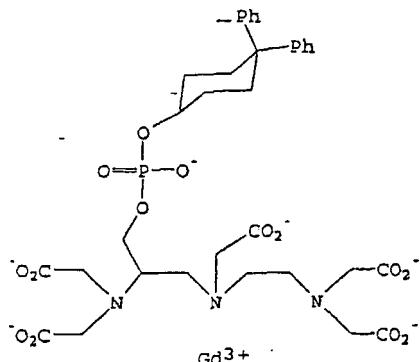
9. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die SDTBM ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus kleinen Molekülen und Biomolekülen.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die SDTBM ein kleines Molekül umfasst, das mindestens einen aliphatischen Rest, einen Alkoxy-, Alkylthio-, Alkylcarbonyl-, Alkylcarbonyloxy-, Arylrest oder einen heterocyclischen Rest mit 1 bis 60 Kohlenstoffatomen und, gegebenenfalls, einen oder mehrere Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefel-, Halogen-, aliphatische Amid-, Estersulfonamid-, Acyl-, Sulfonat-, Phosphat-, Hydroxylsubstituenten oder organometallische Substituenten umfasst.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die SDTBM mindestens einen Arylring umfasst.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die SDTBM mindestens zwei Arylringe umfasst.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das Kontrastmittel die Struktur



MS-325

aufweist.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei das bildgebende Verfahren eine Kernspintomographie mit Kon-

trastverstärkung ist.

15. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Interventionstherapie fokussierter Ultraschall ist.
16. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die SDTBm ein Biomolekül umfasst, das ein Peptid umfasst, enthaltend hydrophobe Aminosäurereste und/oder Substituenten mit oder ohne hydrophobe oder hydrophile Endgruppen.
17. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Kontrastmittel eine vom Zustand abhängige Bindungsaffinität für Gewebe oder einen Gewebebestandteil in Plasma, im Interstitialraum, in Gelenkschmiere, in Zerebrospinalflüssigkeit, in Flüssigkeit aus einer Entzündung oder einem Abzess oder im Interzellularraum aufweist.
18. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Kontrastmittel eine vom Zustand abhängige Bindungsaffinität für ein Protein aufweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus menschlichem Serumalbumin, Fettsäurebindungsprotein, Glutathion-S-Transferase und Lipoproteinen.
19. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Kontrastmittel weiterhin eine Einheit zur Verlängerung der Bluthalbwertszeit (BHEM) umfasst, die eine oder mehrere völlig oder teilweise negative Ladungen in einer wässrigen Lösung beim physiologischen pH-Wert aufweist, wobei die negative Ladung durch eine kovalente oder koordinierte kovalente Bindung an die IEM nicht teilweise oder völlig neutralisiert werden kann.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei das Kontrastmittel eine vom Zustand abhängige Bindungsaffinität für menschliches Serumalbumin aufweist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei mindestens 10% des Mittels an menschliches Serumalbumin in nativem Zustand binden.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei mindestens 50% des Mittels an menschliches Serumalbumin in nativem Zustand binden.
23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei mindestens 80% des Mittels an menschliches Serumalbumin in nativem Zustand binden.
24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei mindestens 95% des Mittels an menschliches Serumalbumin in nativem Zustand binden.
25. Verwendung nach Anspruch 20, wobei das Kontrastmittel eine Bindungsaffinität für menschliches Serumalbumin im denaturierten Zustand aufweist, die geringer ist als etwa 80% der Bindungsaffinität des Kontrastmittels für menschliches Serumalbumin in nativem Zustand.
26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei das Kontrastmittel eine Bindungsaffinität für menschliches Serumalbumin in denaturiertem Zustand aufweist, die geringer ist als etwa 50% der Bindungsaffinität des Kontrastmittels für menschliches Serumalbumin in nativem Zustand.
27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Kontrastmittel eine Bindungsaffinität für menschliches Serumalbumin in denaturiertem Zustand aufweist, die geringer ist als etwa 20% der Bindungsaffinität des Kontrastmittels für menschliches Serumalbumin in nativem Zustand.
28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei das Kontrastmittel eine Bindungsaffinität für menschliches Serumalbumin in denaturiertem Zustand aufweist, die geringer ist als etwa 10% der Bindungsaffinität des Kontrastmittels für menschliches Serumalbumin in nativem Zustand.
29. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Kontrastmittel, wenn es an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in denaturiertem Zustand gebunden ist, eine R_1 -Relaxationsfähigkeit von weniger als etwa 50% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder an den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels aufweist.
30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei das Kontrastmittel, wenn es an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in denaturiertem Zustand gebunden ist, eine R_1 -Relaxationsfähigkeit von weniger als etwa 20% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder an den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels aufweist.

denen Kontrastmittels aufweist.

31. Verwendung nach Anspruch 30, wobei das Kontrastmittel, wenn es an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in denaturiertem Zustand gebunden ist, eine R_1 -Relaxationsfähigkeit von weniger als etwa 10% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder an den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels aufweist.

32. Verwendung nach Anspruch 1 oder 17, wobei das Kontrastmittel, nachdem die Interventionstherapie beendet ist und das Zielgewebe oder der Zielgewebebestandteil sich wieder unter physiologischen Bedingungen befindet, eine R_1 -Relaxationsfähigkeit von weniger als etwa 80% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels aufweist.

33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das Kontrastmittel, nachdem die Interventionstherapie beendet ist und sich das Zielgewebe oder der Zielgewebebestandteil wieder unter physiologischen Bedingungen befindet, eine R_1 -Relaxationsfähigkeit von weniger als etwa 50% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels aufweist.

34. Verwendung nach Anspruch 33, wobei das Kontrastmittel, nachdem die Interventionstherapie beendet ist und sich das Zielgewebe oder der Zielgewebebestandteil wieder unter physiologischen Bedingungen befindet, eine R_1 -Relaxationsfähigkeit von weniger als etwa 20% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels aufweist.

35. Verwendung nach Anspruch 34, wobei das Kontrastmittel, nachdem die Interventionstherapie beendet ist und sich das Zielgewebe oder der Zielgewebebestandteil wieder unter physiologischen Bedingungen befindet, eine R_1 -Relaxationsfähigkeit von weniger als etwa 10% der R_1 -Relaxationsfähigkeit des an das Gewebe oder den Gewebebestandteil in nativem Zustand gebundenen Kontrastmittels aufweist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

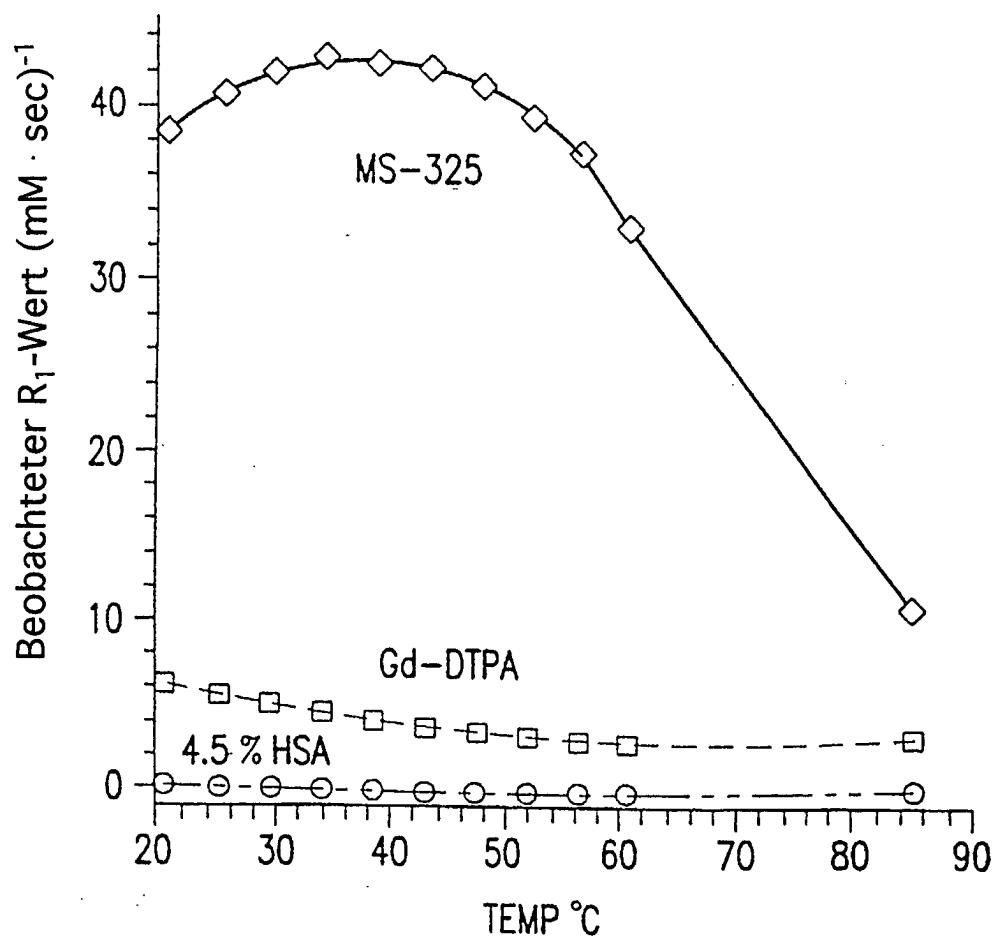


FIG. 1

% Verlust der Signalintensität im ROI (Bereich von Interesse)

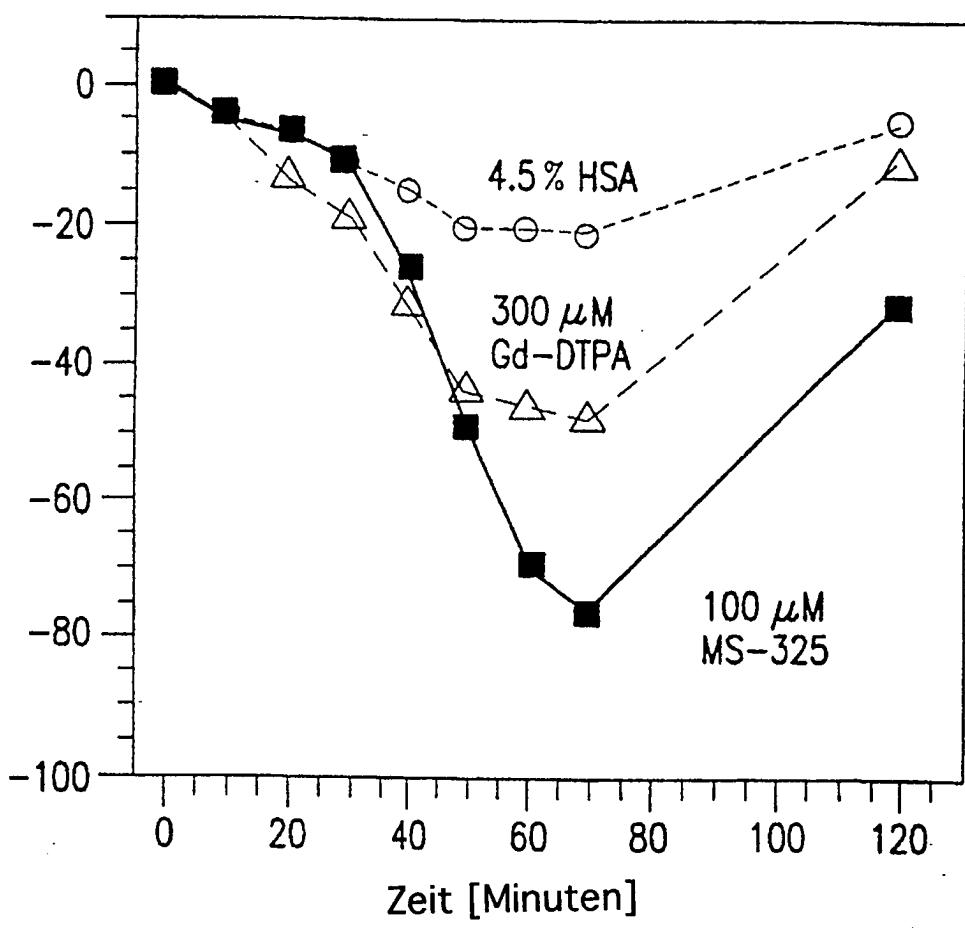


FIG.2

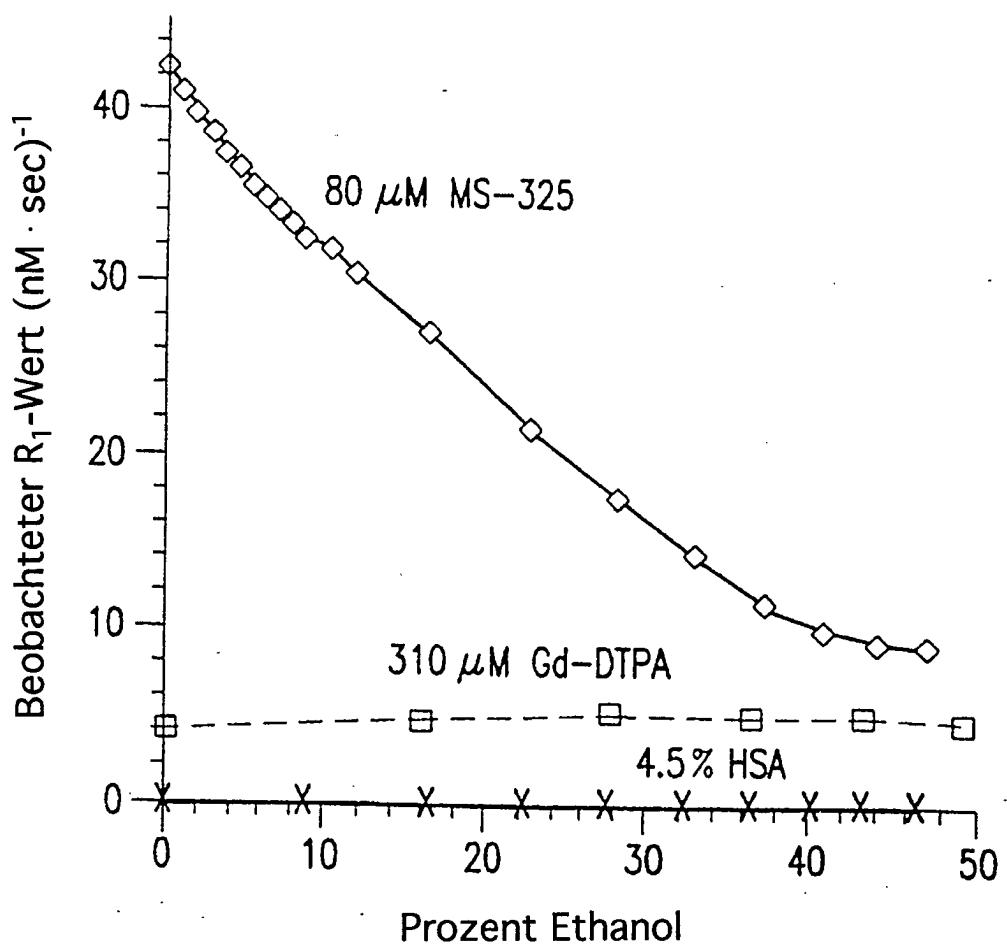


FIG.3