



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0052859
(43) 공개일자 2009년05월26일

(51) Int. Cl.

A61K 49/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7003270

(22) 출원일자 2009년02월17일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2009년02월17일

(86) 국제출원번호 PCT/NO2007/000287

국제출원일자 2007년08월17일

(87) 국제공개번호 WO 2008/020765

국제공개일자 2008년02월21일

(30) 우선권주장

20063701 2006년08월18일 노르웨이(NO)

(71) 출원인

지이 헬스케어 에이에스

노르웨이 오슬로 니코비엔 2(우편번호 0485)

(72) 발명자

브린들, 케빈, 엠.

영국 씨비2 1지에이 캠프리지 캠프리지쉬어 테니스 코트 로드 80 유니버시티 오브 캠프리지 디파트먼트 오브 바이오케미스트리

데이, 사무엘, 에반

미국 85704 아리조나주 투손 이스트 마운틴 선라이즈 플레이스 621

(74) 대리인

김영, 양영준

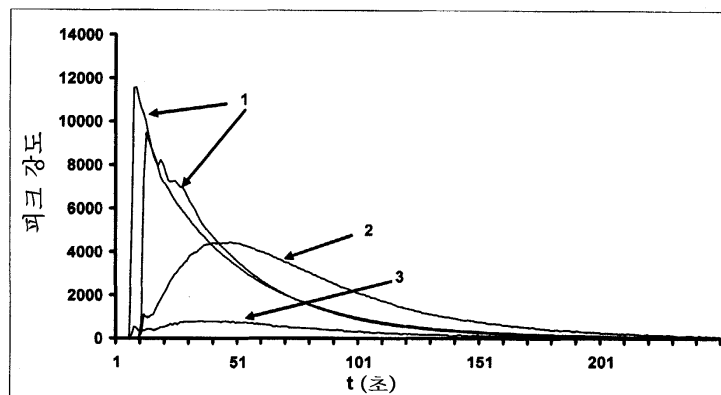
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 락테이트 및 과분극화 13C-피루베이트를 포함하는 영상화 매질

(57) 요약

본 발명은 락테이트 및 과분극화 ¹³C-피루베이트를 포함하는 영상화 매질, 상기 영상화 매질의 제조 방법, 상기 영상화 매질의 용도 및 상기 영상화 매질을 사용하는 ¹³C-MR 영상화 및/또는 ¹³C-MR 분광법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 영상화 매질.

청구항 2

제1항에 있어서, 거의 동일하거나 동일한 농도의 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 영상화 매질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 락테이트가 락트산, 나트륨 락테이트 또는 리튬 락테이트로부터 선택되는 영상화 매질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 담체를 추가로 포함하는 영상화 매질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 통상의 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제 및/또는 제제 보조제를 추가로 포함하는 영상화 매질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 생체내 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법에 사용하기 위한 영상화 매질.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 1 이상의 비수용매, 바람직하게는 DMSO 및/또는 메탄올을 추가로 포함하는 영상화 매질.

청구항 8

제1항 내지 제4항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법에 사용하기 위한 영상화 매질.

청구항 9

^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체의 대사 과정의 생체내 연구를 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 영상화 매질의 용도.

청구항 10

^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체 내의 중앙 조직의 생체내 확인을 위한 제7항 또는 제8항에 따른 영상화 매질의 용도.

청구항 11

^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체 내의 심근 조직의 생존력의 생체내 평가를 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 영상화 매질의 용도.

청구항 12

^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체 내의 세포사의 생체내 검출을 위한 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 영상화 매질의 용도.

청구항 13

¹³C-MR 영상화 및/또는 ¹³C-MR 분광법을 이용한 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체의 조직 내의 대사 과정의 시험관내 연구를 위한 제7항 또는 제8항에 따른 영상화 매질의 용도.

청구항 14

¹³C-MR 영상화 및/또는 ¹³C-MR 분광법을 이용한 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체의 조직 내의 종양 세포의 시험관내 확인을 위한 제7항 또는 제8항에 따른 영상화 매질의 용도.

청구항 15

¹³C-MR 영상화 및/또는 ¹³C-MR 분광법을 이용한 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체의 조직 내의 세포사의 시험관내 검출을 위한 제7항 또는 제8항에 따른 영상화 매질의 용도.

청구항 16

¹³C-피루브산 또는 ¹³C-피루베이트의 동적 핵 분극화에 의해 과분극화 ¹³C-피루베이트를 얻고, 상기 과분극화 ¹³C-피루베이트 용액에 락테이트를 첨가하는, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 영상화 매질의 제조 방법.

청구항 17

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 영상화 매질을 이용한 ¹³C-MR 영상화 방법 및/또는 ¹³C-MR 분광법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 락테이트 및 과분극화 ¹³C-피루베이트를 포함하는 영상화 매질, 상기 영상화 매질의 제조 방법, 상기 영상화 매질의 용도, 및 상기 영상화 매질을 사용한 ¹³C-MR 영상화 방법 및/또는 ¹³C-MR 분광법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 자기 공명(MR) 영상화(MRI)는 비침습적 방법으로 및 환자와 의료진이 X선과 같이 잠재적으로 유해한 방사선에 노출됨 없이 환자 신체 또는 그 일부의 영상을 얻을 수 있어 의사들에게 특히 매력적인 기술이 되었다. MRI는 그것의 양질의 영상 및 높은 공간 해상도 및 시기 해상도 때문에, 연조직 및 기관의 영상화에 유리한 영상화 기술이다.
- <3> MRI는 MR 조영제와 함께 또는 MR 조영제 없이 행해질 수 있다. 그러나 조영 증강 MRI로는 대개 훨씬 더 작은 조직의 변화를 검출할 수 있는데, 이는 그것이 작은 종양 또는 전이와 같은 조직 변화의 초기 단계를 검출하는 데 강력한 도구가 되게 한다.
- <4> 몇몇 종류의 조영제가 MRI에서 사용되어 왔다. 수용성 상자성의 금속 킬레이트, 예를 들어 옴니스캔(Omniscan™) (지이 헬스케어(GE Healthcare)사)과 같은 가돌리늄 킬레이트는 널리 이용되는 MR 조영제이다. 이들은 혈관에 투여되면, 낮은 분자량 때문에 세포외 공간 (예를 들면, 혈액 및 간질)으로 빠르게 분산된다. 그들은 또한 신체로부터 상대적으로 빠르게 제거된다.
- <5> 다른 편의 혈액 풀(pool) MR 조영제, 예를 들어 초상자성 산화철 입자는 지연된 시간 동안 혈관계 내부에 보존된다. 이들은 간에서 조영을 증진시킬 뿐만 아니라 모세혈관의 침투성 이상, 예를 들어 종양혈관 발생의 결과인 종양 내의 "누출" 모세혈관 벽을 검출하는 데에 매우 유용한 것으로 증명되었다.
- <6> 전술한 조영제의 명백히 탁월한 특성에도 불구하고, 이를 사용하는 데에는 위험이 있다. 상자성 금속 킬레이트가 대개 높은 안정도 상수를 갖지만, 투여 후에 신체에 독성 금속 이온이 방출될 가능성이 있다. 또한 이런 유형의 조영제는 낮은 특이성을 갖는다.
- <7> WO-A-99/35508호에 MRI 조영제로서 고 T₁ 약제의 과분극화 용액을 사용하여 환자를 MR 조사하는 방법이 기재되어

있다. "과분극화"라는 용어는 고 T_1 약제에 존재하는 NMR 활성 핵, 즉 핵 스핀이 0이 아닌 핵, 바람직하게는 ^{13}C - 또는 ^{15}N -핵의 핵 분극화를 증진시킴을 의미한다. NMR 활성 핵의 핵 분극화를 증진시키면, 이들 핵의 여기 핵 스핀 상태와 기저 핵 스핀 상태 사이의 수 차이가 상당히 증가하고, 이로 인해 MR 신호 강도가 100배 이상 증폭된다. 과분극화 ^{13}C - 및/또는 ^{15}N -농축된 고 T_1 약제를 사용하는 경우, ^{13}C 및/또는 ^{15}N 의 자연적인 존재량은 무시할 수 있으므로 배경 신호로부터의 간섭이 근본적으로 없을 것이고, 따라서 영상 조영이 유리하게 높을 것이다. 종래의 MRI 조영제와 이 과분극화 고 T_1 약제의 주된 차이점은 전자의 경우 조영에서의 변경이 신체 내의 물 양성자 이완 시간에 영향을 줌으로써 야기되는 반면, 후자의 약제의 경우 얻어진 신호는 오로지 약제로부터 기인하기 때문에 비-방사능 추적자로서 여겨질 수 있다는 것이다.

<8> MR 영상화제로서 사용하기 위한 다양한 가능한 고 T_1 약제는 WO-A-99/35508호에 기재되어 있고, 이는 비내인성 및 내인성 화합물, 예를 들어 아세테이트, 피루베이트, 옥살레이트 또는 글루코네이트, 당, 예를 들어 글루코스 또는 프럭토스, 우레아, 아미드, 아미노산, 예를 들어 글루타메이트, 글리신, 시스테인 또는 아스파르테이트, 뉴클레오티드, 비타민, 예를 들어 아스코르브산, 페니실린 유도체 및 술폰아미드를 포함한다. 시트르산 사이클과 같은 대사 사이클 내의 중간 생성물이 대사 활성의 MR 영상화에 바람직한 영상화제인 것으로 추가로 기재되어 있다.

<9> 인체 및 비인간 동물체 내의 대사 과정에서 역할을 하는 과분극화 MR 영상화제는 이 과분극화 영상화제가 생체 내 MR 조사에서 조직의 대사 상태에 관한 정보를 얻는데 이용될 수 있기 때문에, 즉 이들이 대사 활성의 생체내 영상화에 유용하기 때문에 큰 관심을 받는다. 조직의 대사 상태에 관한 정보는, 예를 들어 건강한 조직과 병든 조직을 구별하는 데 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

<10> 피루베이트는 시트르산 사이클 내에서 역할을 하는 화합물이고, 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 그의 대사 산물인 과분극화 ^{13}C -락테이트, 과분극화 ^{13}C -비카르보네이트 및 과분극화 ^{13}C -알라닌으로의 전환은 인체내 대사 과정의 생체내 MR 연구에 사용될 수 있다. 과분극화 ^{13}C -피루베이트는, 예를 들어 WO-A-2006/011810호에 상세히 기재된 생체내 종양 영상화 및 WO-A-2006/054903호에 상세히 기재된 MR 영상화에 의한 심근 조직 생존력의 평가를 위해 MR 영상화제로서 사용될 수 있다.

<11> 피루베이트는 고농도인 경우에도 인체가 매우 잘 견디는 내인성 화합물이다. 시트르산 사이클의 전구체로서, 피루베이트는 인체내에서 중요한 대사 기능을 수행한다. 피루베이트는 상이한 화합물로 전환되는데 : 아미노기 전이에 의해 알라닌으로 되고, 산화성 카르복시 이탈 반응을 통해 피루베이트가 아세틸-CoA 및 이산화탄소 (추가적으로 비카르보네이트로 전환됨)로 전환되고, 피루베이트의 환원의 결과로 락테이트 및 그의 카르복시화로 옥살로아세테이트가 된다.

<12> 추가로, 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 그의 대사 산물인 과분극화 ^{13}C -락테이트, 과분극화 ^{13}C -비카르보네이트 ($^{13}\text{C}_1$ -피루베이트, $^{13}\text{C}_{1,2}$ -피루베이트 또는 $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -피루베이트의 경우에만) 및 과분극화 ^{13}C -알라닌으로의 대사 전환은 인체내 대사 과정의 생체내 MR 연구에 사용될 수 있다. $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트는 37°C에서 약 42초 동안 인간 전혈 내 T_1 이완을 갖지만, 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 과분극화 ^{13}C -락테이트, 과분극화 ^{13}C -비카르보네이트 및 과분극화 ^{13}C -알라닌으로의 전환은, ^{13}C -피루베이트 모 화합물 및 그것의 대사 산물로부터 신호를 검출하기에 충분히 빠른 것으로 밝혀졌다. 알라닌, 비카르보네이트, 및 락테이트의 양은 조사 중인 조직의 대사 상태에 의존한다. 과분극화 ^{13}C -락테이트, 과분극화 ^{13}C -비카르보네이트 및 과분극화 ^{13}C -알라닌의 MR 신호 강도는 검출시에 남아 있는 분극 정도 및 이들 화합물의 양과 관련이 있기 때문에, 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 과분극화 ^{13}C -락테이트, 과분극화 ^{13}C -비카르보네이트 및 과분극화 ^{13}C -알라닌으로의 전환을 관찰함으로써 비침습적 MR 영상화 또는 MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체의 생체내 대사 과정의 연구가 가능하다.

<13> 상이한 피루베이트 대사 산물에서 기인한 MR 신호의 진폭은 조직 유형에 따라 변동된다. 알라닌, 락테이트, 비카르보네이트 및 피루베이트에 의해 형성된 독특한 대사 피크 양상은 검사 중인 조직의 대사 상태의 지문으로서

사용될 수 있다.

- <14> 비-과분극화 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하고 있는 MR 영상화제는 과분극화 ^{13}C -피루베이트 단독으로 있을 때와 비교해 우수한 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이러한 영상화제의 사용으로 관측 가능한 ^{13}C -락테이트 양이 증가하고, 따라서 ^{13}C -락테이트로 인한 MR 신호의 증가를 초래한다. ^{13}C -락테이트로 인한 신호는 WO-A-2006/011810호에 기재된 바와 같이 종양 조직이 높은 ^{13}C -락테이트 신호에 의해 나타나는 MR 종양 영상화를 모니터할 수 있는 신호이다. ^{13}C -락테이트로 인한 증가된 신호를 이용해, 더 작은 종양 또는 종양 조직을 매우 초기 단계에 검출하는 것이 가능할 수 있다. 또한 ^{13}C -락테이트로 인한 신호는 WO-A-2006/054903호에 기재된 바와 같이 위험 상태의 심근 조직, 즉 허혈성 심근 조직이 가장 낮은 ^{13}C -비카르보네이트 신호 및/또는 가장 높은 ^{13}C -락테이트 신호에 의해 확인되는 MR 심장 영상화를 모니터할 수 있는 신호이다. 추가로, ^{13}C -락테이트로 인한 신호는 죽어가는 조직이 낮은 ^{13}C -락테이트 신호 또는 ^{13}C -락테이트 신호의 부재에 의해 확인되는 세포사의 MR 영상화를 모니터할 수 있는 신호이다.
- <15> 따라서, 첫 번째 양상으로 본 발명은 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 영상화 매질을 이용한 ^{13}C -MR 영상화 방법 또는 ^{13}C -MR 분광법을 제공한다.
- <16> "과분극화된" 및 "분극된"이라는 용어는 하기에서 호환되어 사용되고, 0.1%를 초과하는, 더 바람직하게는 1% 초과, 가장 바람직하게는 10% 초과하는 수준의 핵 분극화를 나타낸다.
- <17> 분극화의 수준은, 예를 들어 고체 과분극화 ^{13}C -피루베이트, 예를 들어 ^{13}C -피루베이트의 동적 핵 분극화 (dynamic nuclear polarisation (DNP))에 의해 얻어진 고체 과분극화 ^{13}C -피루베이트 내에서 고체 상태 ^{13}C -NMR 측정에 의해 결정될 수 있다. 고체 상태 ^{13}C -NMR 측정은 작은 플립 각(flip angle)을 이용한 간단한 펄스-획득 (pulse-acquire) NMR 시퀀스(sequence)로 이루어지는 것이 바람직하다. NMR 스펙트럼에서의 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 신호 강도를 분극화 과정 전에 얻은 NMR 스펙트럼에서의 ^{13}C -피루베이트의 신호 강도와 비교한다. 이어서 분극화 전과 후의 신호 강도의 비로부터 분극화 수준을 계산한다.
- <18> 유사한 방법으로, 용해된 과분극화 ^{13}C -피루베이트에 대한 분극화의 수준을 액체 상태 NMR 측정에 의해 결정할 수 있다. 다시 용해된 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 신호 강도를 분극화 전의, 용해된 ^{13}C -피루베이트의 신호 강도와 비교한다. 이어서 분극화 전과 후의 ^{13}C -피루베이트의 신호 강도 비로부터 분극화의 수준을 계산한다.
- <19> "영상화 매질"이라는 용어는 MR 활성제, 즉 영상화제로서의 ^{13}C -피루베이트 및 비-분극화된 락테이트를 포함하는 액체 조성물을 나타낸다. 본 발명에 따른 영상화 매질은 MR 영상화에서 영상화 매질로서, 또는 MR 분광법에서 MR 분광제로서 사용될 수 있다.
- <20> 본 발명의 방법에 사용되는 영상화 매질은 생체내 ^{13}C -MR 영상화 또는 분광법에 대한 영상화 매질로서 사용될 수 있는데, 즉 살아있는 인간 또는 인간이 아닌 동물에 사용되는 것을 말한다. 추가로, 본 발명의 방법에 사용되는 영상화 매질은 시험관내 ^{13}C -MR 영상화 또는 분광법에 대한 영상화 매질로서 사용될 수 있는데, 예를 들어 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플, 예를 들어 소변, 침 또는 혈액, 또는 생체외 조직, 예를 들어 생체 검사로부터 얻어진 생체외 조직에 사용될 수 있다.
- <21> 본 발명의 방법에 사용되는 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 동위원소 농축은 최소 75%가 바람직하고, 더 바람직하게는 최소 80%, 특히 바람직하게는 최소 90%이며, 90%가 넘는 동위원소 농축이 가장 바람직하다. 이상적인 농축은 100%이다. 본 발명의 방법에 사용되는 ^{13}C -피루베이트는 C1-위치에서 (하기에 $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트 라고 나타냄), C2-위치에서 (하기에 $^{13}\text{C}_2$ -피루베이트라고 나타냄), C3-위치에서 (하기에 $^{13}\text{C}_3$ -피루베이트라고 나타냄), C1- 및 C2-위치에서 (하기에 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -피루베이트라고 나타냄), C1- 및 C3-위치에서 (하기에 $^{13}\text{C}_{1,3}$ -피루베이트라고 나타

념), C2- 및 C3-위치에서 (하기에 $^{13}\text{C}_{2,3}$ -피루베이트라고 나타냄) 또는 C1-, C2- 및 C3-위치에서 (하기에 $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -피루베이트라고 나타냄) 동위원소 농축될 수 있다. C1-위치에서의 동위원소 농축이 바람직한데, 이는 $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트가 다른 C-위치에서 동위원소 농축된 ^{13}C -피루베이트보다 37°C (약 42초)의 인간 전혈에서 더 높은 T_1 이완을 갖기 때문이다.

<22> NMR 활성 ^{13}C -핵의 과분극화는 상이한 방법, 예를 들어 본원에 도입된 참고 문헌 WO-A-98/30918호, WO-A-99/24080호 및 WO-A-99/35508호에 기재된 방법에 의해 얻을 수 있고, 과분극화 방법에는 불활성 기체로부터의 분극화 전달, "브루트 포스(brute force)", 스핀 냉장, 파라수소 방법 및 동적 핵 분극화(DNP)가 있다.

<23> 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 얻기 위해, ^{13}C -피루베이트를 직접 분극화하거나 ^{13}C -피루브산을 분극화하고, 분극화 ^{13}C -피루브산을, 예를 들어 염기에 의해 중화함으로써 분극화 ^{13}C -피루베이트로 전환하는 것이 바람직하다.

<24> 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 얻기 위해 적합한 하나의 방법은 WO-A-98/30918호에 기재된 과분극화 불활성 기체로부터의 분극화 전달이다. 핵 스핀이 0이 아닌 불활성 기체는 원형으로 분극화된 빛을 사용함으로써 과분극화될 수 있다. 과분극화 불활성 기체, 바람직하게는 He 또는 Xe, 또는 이들 기체의 혼합물은 ^{13}C -핵의 과분극화에 영향을 주는 데에 사용될 수 있다. 과분극화 기체는 기체 상태일 수 있거나, 액체/용매에 용해될 수 있거나, 또는 과분극화 기체 그 자체가 용매로서 작용할 수 있다. 별법으로, 기체는 냉각된 고체 표면에 응축되어, 이 형태로 사용될 수 있고, 또는 기화될 수 있다. 과분극화 기체를 ^{13}C -피루베이트 또는 ^{13}C -피루브산과 함께 긴밀하게 혼합하는 것이 바람직하다. 나아가, 실온에서 액체인 ^{13}C -피루브산이 분극화되면 과분극화 기체는 바람직하게는 액체/용매에 용해되거나 용매로서 작용한다. ^{13}C 피루베이트가 분극화되면, 과분극화 기체는 피루베이트도 또한 용해시키는 액체/용매에 용해됨이 바람직하다.

<25> 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 얻기 위한 또 다른 적합한 방법은 매우 낮은 온도 및 높은 자기장에서 열역학적 평형에 의해 ^{13}C -핵에 분극을 주는 것이다. 과분극화는 NMR 분광계의 동작 범위 및 온도에 비하여 매우 높은 자기장 및 매우 낮은 온도의 사용에 의한다 (브루트 포스). 사용된 자기장의 강도는 가능한 한 높아야 하고, 1 T보다 높은 것이 적절하며, 바람직하게는 5 T보다 높게, 더 바람직하게는 15 T 이상, 특히 바람직하게는 20 T 이상이 되어야 한다. 온도는 매우 낮아야 하고, 예를 들어 4.2 K 이하, 바람직하게는 1.5 K 이하, 더 바람직하게는 1.0 K 이하, 특히 바람직하게는 100 mK 이하가 되어야 한다.

<26> 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 얻기 위한 또 다른 적합한 방법은 스핀 냉장 방법이다. 이 방법은 스핀 냉장 분극화에 의한 고체 화합물 또는 시스템의 스핀 분극화를 포함한다. 이 시스템은 3차 이상의 대칭 축을 갖는 Ni^{2+} , 란탄족 원소 또는 악티늄족 원소 이온과 같은 적합한 결정성 상자성 물질로 도핑되거나 그와 긴밀하게 혼합된다. 기체는 DNP에서 요구되는 것보다 간단하고, 공명 여기 장이 적용되지 않기 때문에 균일한 자기장을 필요로 하지 않는다. 이 과정은 자기장의 방향에 수직인 축의 주위에 샘플을 물리적으로 회전시킴으로써 수행된다. 이 방법에 대한 필수 조건은 상자성 종이 매우 이방성인 g-인자를 가져야 하는 것이다. 샘플 회전의 결과, 전자 상자성 공명은 핵 스핀과 접촉하게 되고, 핵 스핀 온도가 감소한다. 샘플 회전은 핵 스핀 분극화가 새로운 평형에 도달할 때까지 수행된다.

<27> 바람직한 실시 태양에서 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 얻기 위해 DNP(동적 핵 분극화)를 이용한다. DNP에서 분극화될 화합물 내의 MR 활성 핵의 분극화는 분극화제 또는 홀전자들을 포함하는 화합물인 소위 DNP 약제에 의해 행해진다. DNP 과정 동안에, 일반적으로 극초단파 방사선 형태의 에너지가 제공되는데, 이는 초기에 DNP 약제를 여기시킬 것이다. 기저 상태로 감쇄되면, DNP 약제의 홀전자로부터 분극화될 화합물의 NMR 활성 핵, 예를 들어 ^{13}C -피루베이트 내의 ^{13}C 핵으로 분극화가 전달된다. 일반적으로, DNP 과정에서 적당하거나 높은 자기장과 매우 낮은 온도를 사용하는데, 예를 들어 액체 헬륨 및 1 T 이상의 자기장에서 DNP 과정을 수행한다. 별법으로, 충분한 분극화 증진이 이루어지는 적당한 자기장 및 임의의 온도가 사용될 수 있다. DNP 기법은 예를 들어 WO-A-98/58272호 및 WO-A-01/96895호에 추가로 기재되어 있고, 이들은 본원에 참고 문헌으로 도입되어 있다.

- <28> DNP 방법에 의해 화합물을 분극화하기 위해, 분극화될 화합물과 DNP 약제의 혼합물을 준비하고 ("샘플"), 이어서 이것을 동결시키고, 분극화를 위해 DNP 분극자에 주입한다. 분극화 후에, 동결된 고형 과분극화 샘플은 적합한 용해 매질에서의 그것의 용융 또는 용해에 의해 액체 상태로 빠르게 전환된다. 용해가 바람직하며, 동결된 과분극화 샘플의 용해 과정 및 적합한 장치는 WO-A-02/37132호에 상세히 기재되어 있다. 용융 과정 및 용융을 위한 적합한 장치는, 예를 들어 WO-A-02/36005호에 기재되어 있다.
- <29> 분극화될 화합물에서 높은 분극화 수준을 얻기 위해서, 상기 화합물 및 DNP 약제가 DNP 과정 동안 긴밀한 접촉을 할 필요가 있다. 이것은 샘플이 동결 또는 냉각될 때 결정화되는 경우가 아니다. 결정화를 방지하기 위해서, 샘플 내에 유리 형성제가 존재해야 하거나 동결시에 결정화하기보다는 유리를 형성하는 화합물이 분극화를 위해 선택될 필요가 있다.
- <30> 진술한 바와 같이 ^{13}C -피루브산 또는 ^{13}C -피루베이트는 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 얻는데 적합한 출발 물질이다.
- <31> 동위원소 농축된 ^{13}C -피루베이트는, 예를 들어 나트륨 ^{13}C -피루베이트로서 상업적으로 이용 가능하다. 방법으로, 이것은 문헌 [S. Anker, J. Biol. Chem 176, 1948, 133-1335]의 기재에 따라 합성할 수 있다.
- <32> $^{13}\text{C}_1$ -피루브산의 몇 가지 합성 방법이 당업계에 공지되어 있다. 간단히, 문헌 [Seebach et al., Journal of Organic Chemistry 40(2), 1975, 231-237]에 S,S-아세탈로서의 카르보닐-함유 출발 물질, 예를 들어 1,3-디티안 또는 2-메틸-1,3-디티안의 보호 및 활성화에 의존하는 합성 경로가 기재되어 있다. 디티안을 금속화하고, 메틸-함유 화합물 및/또는 $^{13}\text{CO}_2$ 와 반응시킨다. 이 참고 문헌에 기재된 바와 같이 적절한 동위원소 농축된 ^{13}C -성분을 사용하여, $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트, $^{13}\text{C}_2$ -피루베이트 또는 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -피루베이트를 얻을 수 있다. 그 결과 카르보닐 작용기는 이 문헌에 기재된 통상적 방법의 사용에 의해 방출된다. 상이한 합성 경로는 아세트산으로부터 출발하여, 먼저 아세틸 브로마이드로 전환되고, 이어서 Cu^{13}CN 과 반응한다. 얻어진 니트릴은 아미드를 통해 피루브산으로 전환된다 (예를 들어 문헌 [S.H. Anker et al., J. Biol. Chem. 176 (1948),1333], 또는 [J. E. Thirkettle, Chem Commun. (1997), 1025]을 참조). 추가로, 상업적으로 얻을 수 있는 나트륨 ^{13}C -피루베이트를 양성자화 함으로써, 예를 들어 미국 특허 제 6,232,497호 또는 WO-A-2006/038811호에 기재된 방법에 의해 ^{13}C -피루브산을 얻을 수 있다.
- <33> DNP에 의한 ^{13}C -피루브산의 과분극화는 본원에 참조로 포함되어 있는 WO-A1-2006/011809호에 상세히 기재되어 있다. 간단히, ^{13}C -피루브산은 동결시에 유리를 형성하기 때문에 DNP에 직접적으로 사용될 수 있다. DNP 후에, 동결된 과분극화 ^{13}C -피루브산은 용해 및 중화될 필요가 있는데, 즉 ^{13}C -피루베이트로 전환될 필요가 있다. 전환을 위해 강염기가 필요하다. 추가로, ^{13}C -피루브산이 강산이기 때문에, 이 강산에서 안정한 DNP 약제가 선택되어야 한다. 바람직한 염기는 수산화나트륨이고, 수산화나트륨을 이용한 과분극화 ^{13}C -피루브산의 전환의 결과 과분극화 나트륨 ^{13}C -피루베이트가 되는데, 이는 생체내 MR 영상화 및/또는 분광법, 즉 살아있는 인간 또는 비인간 동물에 수행되는 MR 영상화 및/또는 분광법에 사용하는 영상화 매질에 대해 바람직한 ^{13}C -피루베이트이다.
- <34> 방법으로, ^{13}C -피루베이트, 즉 ^{13}C -피루브산의 염은 DNP에 사용될 수 있다. 바람직한 염은 본원에 도입된 참고 문헌 PCT/N007/00109호에 상세히 기재되어 있는 바와 같이 NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} 및 Ba^{2+} , 바람직하게는 NH_4^+ , K^+ , Rb^+ 또는 Cs^+ , 더 바람직하게는 K^+ , Rb^+ , Cs^+ 그리고 가장 바람직하게는 Cs^+ 로 이루어진 군으로부터 무기 양이온을 포함하는 ^{13}C -피루베이트이다. 이러한 바람직한 ^{13}C -피루베이트의 합성은 PCT/N007/00109호에도 또한 기재되어 있다. 과분극화 ^{13}C -피루베이트가 생체내 MR 영상화 및/또는 분광법을 위한 영상화 매질에 사용되는 경우, NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} 및 Ba^{2+} 를 포함하는 군으로부터 무기 양이온을 생리학적으로 매우 잘 견디는 양이온, 예를 들어 Na^+ 또는 메글루민으로 교환하는 것이 바람직하다. 이것은 양이온 교환 칼럼(cation exchange column)의 이용과 같이 당업계에 공지된 방법에 의해 행해질 수 있다.

- <35> 추가의 바람직한 염은 유기 아민 또는 아미노 화합물의 ^{13}C -피루베이트로, 바람직하게는 본원에 도입된 참고 문헌 WO-A-2007/069909호에 기재되어 있는 TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트 또는 메글루민- $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트이다. 이들 바람직한 ^{13}C -피루베이트의 합성은 WO-A-2007/069909호에도 또한 기재되어 있다.
- <36> DNP에 의해 본 발명의 방법에서 사용되는 과분극화 ^{13}C -피루베이트가 얻어지면, DNP 약제 및 ^{13}C -피루브산 또는 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 분극화된 샘플은 상자성 금속 이온을 추가로 포함할 수 있다. DNP에 의해 분극화된 조성물 내에 상자성 금속 이온의 존재는 본원에 도입된 참고 문헌 WO-A-2007/064226호에 상세히 기재된 바와 같이 ^{13}C -피루브산/ ^{13}C -피루베이트에서 분극화 수준을 증가시키는 것으로 밝혀졌다.
- <37> 전술한 바와 같이, 본 발명의 방법에 따른 영상화 매질은 생체내 MR 영상화 및/또는 분광법, 즉 살아있는 인간 또는 비인간 동물에 행해지는 MR 영상화 및/또는 분광법에서의 영상화 매질로서 사용될 수 있다. 이러한 영상화 매질은 MR 활성제 ^{13}C -피루베이트 뿐만 아니라 수성 담체, 바람직하게는 생리학적으로 견딜 수 있고, 제약상 허용 가능한 수성 담체, 예를 들어 물, 완충 용액 또는 염수를 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 영상화 매질은 통상의 제약 담체, 수의학적 담체 또는 부형제, 예를 들어 인간 의약 또는 수의학 약물에서의 진단용 조성물에 통상적인 제제 보조제를 추가로 포함할 수 있다.
- <38> 추가로, 본 발명의 방법에 따른 영상화 매질은 시험관내 MR 영상화 및/또는 분광법, 예를 들어 세포 배양물 내 또는 생체의 조직에서의 세포사의 검출을 위한 영상화 매질로서 사용될 수 있다. 이러한 영상화제는 MR 활성제 ^{13}C -피루베이트 뿐만 아니라 시험관내 세포 또는 조직 분석에 사용되고, 이와 양립할 수 있는 용매, 예를 들어 DMSO 또는 메탄올, 또는 수성 담체 및 비수용매를 포함하는 용매 혼합물, 예를 들어 DMSO와 물 또는 완충 용액의 혼합물 또는 메탄올과 물 또는 완충 용액과의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다. 당업자에게 명백하듯이 제약상 허용 가능한 담체, 부형제, 및 제제 보조제는 이러한 영상화 매질에 존재할 수 있으나, 이러한 목적을 위해 요구되지는 않는다.
- <39> 본 발명의 방법에서 사용되는 영상화 매질에는 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트가 포함된다. 락테이트는 비-과분극화 상태이다. 락테이트는 분극화 과정 후에 과분극화 ^{13}C -피루베이트에 적절히 첨가된다. 락테이트를 첨가하는 방법으로 여러가지가 가능하다. 분극화 과정의 결과로 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 액체 조성물이 야기되면, 락테이트는 상기 액체 조성물 또는 적절한 용매 내의 락테이트 용액에 용해될 수 있거나, 바람직하게는 수성 담체가 액체 조성물에 첨가될 수 있다. 분극화 과정이 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 고체 조성물을 야기한다면, 락테이트는 고체 조성물을 용해시키는데 사용되는 용해 매질에 용해될 수 있다. 예를 들어 DNP 방법에 의해 분극화된 ^{13}C -피루베이트는 수성 담체, 예를 들어 락테이트를 함유한 완충 용액 또는 물에 용해될 수 있다. 과분극화 ^{13}C -피루베이트가 동적 핵 분극화에 의해 얻어지는 경우, 락테이트를 최종 액체 조성물, 즉 용해/용융 후의 액체 조성물 또는 DNP 약제 및/또는 임의적인 상자성 이온의 제거 후의 액체 조성물에 첨가하는 것이 바람직하다. 다시 락테이트를 액체 조성물에 고체로 첨가하거나 바람직하게는 적절한 용매, 예를 들어 물 또는 완충 용액과 같은 수성 담체에 용해시킬 수 있다. 락테이트의 용해를 향상시키기 위해, 당업계에 공지된 몇몇 수단, 예를 들어 교반, 볼텍싱(vortexing) 또는 초음파 처리를 이용할 수 있다. 그러나 신속한 방법이 바람직하고, 혼합 장치 또는 액체 조성물과 접촉을 하는데 도움을 필요로 하지 않는 방법이 바람직하다. 따라서 볼텍싱 또는 초음파 처리와 같은 방법이 바람직하다.
- <40> 적당하게, 락테이트는 락트산 또는 락트산의 염의 형태, 바람직하게는 리튬 락테이트 또는 나트륨 락테이트, 가장 바람직하게는 나트륨 락테이트의 형태로 첨가된다. 본 발명의 방법에서 사용되는 영상화 매질 내의 과분극화 ^{13}C -피루베이트와 락테이트의 농도는 거의 동일 또는 동일하거나 락테이트가 ^{13}C -피루베이트보다 저농도 또는 고농도로 존재한다. 예를 들어 영상화제가 x M의 ^{13}C -피루베이트를 포함한다면, 이는 x M 또는 거의 x M 또는 더 저농도의 락테이트, 그러나 바람직하게는 x M의 1/10 배보다 적지는 않은 락테이트를 포함하거나 또는 더 고농도의 락테이트, 그러나 바람직하게는 x M의 3배보다 많지는 않은 락테이트를 포함한다. 바람직한 실시 태양에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 영상화 매질 내의 락테이트의 농도는 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 농도와 거의 동일하거나 동일하다. "거의 동일한 농도"라는 용어는 락테이트 농도가 ^{13}C -피루베이트 농도의 +/- 30%, 바

람직하게는 +/- 20%, 더 바람직하게는 +/- 10%임을 나타낸다.

<41> 본 발명의 방법에서의 생체내 ^{13}C -MR 영상화 또는 ^{13}C -MR 분광법에 대한 영상화 매질로서 사용되기 위해, 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 영상화 매질은 살아 있는 인체 또는 비인간 동물체에 투여하기에 적절한 조성물로서 제공된다. 영상화 매질은 수성 담체, 예를 들어 완충액 또는 상기 기재된 바와 같이 완충액의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다. 영상화 매질은 통상의 제약상 허용 가능한 담체, 부형제 및 제제 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 영상화 매질은, 예를 들어 안정제, 삼투압 농도 조절제, 가용화제 등을 포함할 수 있다.

<42> 본 발명의 방법에서 사용되는 영상화 매질이 생체내 MR 영상화 또는 분광법, 예를 들어 살아 있는 인체 또는 비인간 동물체에 사용되는 경우, 상기 영상화 매질은 상기 신체에 비경구적으로, 바람직하게는 정맥내로 투여되는 것이 바람직하다. 일반적으로, 검사 중인 신체는 MR 자석 내에 위치한다. 전용 ^{13}C -MR RF-코일은 목적물 부분을 덮도록 위치시킨다. 영상화 매질의 투여량 및 농도는 많은 인자, 예를 들어 독성 및 투여 경로에 의존할 것이다. 적절하게, 영상화 매질은 신체 1 kg 당 ^{13}C -피루베이트 1 mmol 농도까지, 바람직하게는 0.01 내지 0.5 mmol/kg, 더 바람직하게는 0.1 내지 0.3 mmol/kg의 농도로 투여된다. 투여 속도는 10 ml/s 이하가 바람직하고, 더 바람직하게는 6 ml/min 이하, 가장 바람직하게는 5 ml/s 내지 0.1 ml/s이다. 투여 후 400초 이내에, 바람직하게는 120초 이내, 더 바람직하게는 투여 후 60초 이내, 특히 바람직하게는 20 내지 50초에, MR 영상화 시퀀스를 적용해 결합 주파수 및 공간적 선택적 방법으로 목적물의 체적을 인코딩한다. 이로써 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트의 대사 영상이 얻어진다. MR 시퀀스를 적용하는 정확한 시간은 목적물의 체적에 크게 의존한다.

<43> 본 발명의 방법에서의 시험관내 ^{13}C -MR 영상화 또는 ^{13}C -MR 분광법에 대한 영상화 매질로서 사용되기 위해, 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 영상화 매질은, 예를 들어 세포 배양물, 인체 또는 비인간 동물체로부터 얻은 샘플 또는 생체 검사 조직과 같은 생체의 조직에 첨가되기에 적합한 조성물로서 제공된다. 당업자에게 명백한 바와 같이, 제약상 허용되는 담체, 부형제 및 제제 보조제가 영상화 매질 내에 존재할 수는 있으나, 이러한 목적을 위해 존재해야 할 필요가 있지는 않으며, 따라서 영상화 매질은 상기 기재된 바와 같이 완충액 또는 완충액의 혼합물과 같은 수성 담체 및/또는 세포 배양물 또는 조직과 양립할 수 있는 1 이상의 비수용매, 예를 들어 DMSO 또는 메탄올을 포함하는 것이 바람직하다. 세포 배양물, 인체 또는 비인간 신체로부터 얻은 샘플 또는 생체 검사 조직과 같은 생체의 조직에서 사용되는 영상화 매질은 ^{13}C -피루베이트 내에 바람직하게는 10 mM 내지 100 mM, 더 바람직하게는 20 mM 내지 90 mM, 가장 바람직하게는 40 내지 80 mM 존재한다.

<44> 추가의 측면에서, 본 발명은 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 영상화 매질을 제공한다.

<45> 추가의 바람직한 실시 태양에서, 본 발명에 따른 영상화 매질은 거의 동일하거나 동일한 농도의 락테이트와 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하거나, ^{13}C -피루베이트의 농도보다 저농도 또는 고농도의 락테이트를 포함한다. 예를 들어 영상화제가 x M의 ^{13}C -피루베이트를 포함한다면, 이는 x M 또는 거의 x M 또는 더 저농도의 락테이트를, 그러나 바람직하게는 x M의 1/10 배보다 적지는 않은 락테이트를 포함하거나 또는 더 고농도의 락테이트, 그러나 바람직하게는 x M의 3배보다 많지는 않은 락테이트를 포함한다. 바람직한 실시 태양에서, 본 발명에 따른 영상화 매질 내의 락테이트의 농도는 과분극화 ^{13}C -피루베이트의 농도와 거의 동일하거나 동일하다. "거의 동일한 농도"라는 용어는 락테이트 농도가 ^{13}C -피루베이트의 농도의 +/- 30%, 바람직하게는 +/- 20%, 더 바람직하게는 +/- 10%임을 나타낸다.

<46> 또 다른 바람직한 실시 태양에서, 락테이트는 락트산, 리튬 락테이트 또는 나트륨 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<47> 영상화 매질은 ^{13}C -MR 영상화 또는 ^{13}C -MR 분광법에서 사용되는 것이 바람직하다.

<48> 본 발명에 따른 영상화 매질이 생체내 영상화 매질, 즉 살아 있는 인간 또는 비인간 동물에의 투여에 사용되는 경우, 상기 영상화 매질은 상기 기재된 바와 같이 완충액 또는 완충액의 혼합물과 같은 수성 담체를 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 영상화 매질은 통상의 제약상 허용 가능한 담체, 부형제 및 제제 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 영상화 매질은, 예를 들어 안정제, 삼투압 농도 조절제, 가용화제 등을 포함할 수

있다.

- <49> 본 발명에 따른 영상화 매질이 시험관내 ^{13}C -MR 영상화 또는 ^{13}C -MR 분광법에 사용되는 경우, 이것은 이전 문단에 언급된 바와 같이 제약상 허용 가능한 담체, 부형제 및 제제 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 그러나 이러한 제약상 허용되는 담체, 부형제 및 제제 보조제가 이러한 목적을 위해 존재해야 할 필요가 있지는 않음이 당업자에게 명백하다. 따라서 영상화 매질은 상기 기재된 바와 같이 완충액 또는 완충액의 혼합물과 같은 수성 담체 및/또는 세포 배양물 또는 조직과 양립할 수 있는 1 이상의 비수용매, 예를 들어 DMSO 또는 메탄올을 추가로 포함하는 것이 바람직하다.
- <50> 또한 발명의 다른 측면은 락테이트 및 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 포함하는 영상화 매질을 생산하는 방법에 대한 것이고, 이때 과분극화 ^{13}C -피루베이트는 ^{13}C -피루브산 또는 ^{13}C -피루베이트의 동적 핵 분극화를 통해 얻고, 락테이트를 상기 과분극화 ^{13}C -피루베이트 용액에 첨가한다.
- <51> 본 발명의 추가 측면은 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체의 대사 과정에 대한 생체내 연구를 위한 본 발명에 따른 영상화 매질의 용도이다.
- <52> 본 발명의 추가 측면은 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체의 조직의 대사 과정에 대한 시험관내 연구를 위한 본 발명에 따른 영상화 매질의 용도이다.
- <53> 또한 본 발명의 또 다른 측면은 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체 내의 생체내 종양 조직의 확인을 위한 본 발명에 따른 영상화 매질의 용도이다.
- <54> 또한 본 발명의 추가 측면은 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체의 조직 내의 종양 세포의 시험관내 확인을 위한 본 발명에 따른 영상화 매질의 용도이다.
- <55> 종양 조직의 생체내 확인 및 종양 세포의 시험관내 확인에 적합한 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법 프로토콜은 WO-A-2006/011810호에 기재되어 있다.
- <56> 또한 본 발명의 다른 측면은 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체 내의 심근 조직의 생존력의 생체내 평가를 위한 본 발명에 따른 영상화 매질의 용도이다.
- <57> 인체 또는 비인간 동물체 내의 심근 조직의 생존력의 생체내 평가에 적합한 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법 프로토콜은 WO-A-2006/054903호에 기재되어 있다.
- <58> 또한 본 발명의 다른 측면은 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 인체 또는 비인간 동물체 내의 세포사의 생체내 검출을 위한 본 발명에 따른 영상화 매질의 용도이다.
- <59> 또한 본 발명의 다른 측면은 ^{13}C -MR 영상화 및/또는 ^{13}C -MR 분광법을 이용한 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체외 조직 내의 세포사의 시험관내 검출을 위한 본 발명에 따른 영상화 매질의 용도이다.
- <60> 세포사 (예를 들어 세포 자멸(apoptosis) 및 괴사(necrosis))는 시간에 따른 ^{13}C -피루베이트 신호 및 그것의 대사 산물인 ^{13}C -락테이트의 신호에 따라 본 발명의 방법에 의해 검출될 수 있다. 생존 가능한 세포에서 ^{13}C -피루베이트 신호는 시간에 따라 감소한다. ^{13}C -락테이트 신호는 ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -락테이트로의 대사 전환 때문에 초반에 증가하고, 그 다음에는 주로 이완 때문에 서서히 감소한다. 죽어가는 세포에서, ^{13}C -피루베이트의 ^{13}C -락테이트로의 대사 전환이 크게 감소하고, ^{13}C -피루베이트 신호가 시간에 따라 감소하더라도, 세포사의 정도/죽어가는 세포의 양/죽은 세포의 양에 따라 ^{13}C -락테이트 신호는 단지 약간만 증가하거나 또는 전혀 검출되지 않는다. 이 이론에 의하지 않고, 이것은 NADH와 NAD⁺의 동시 상호 전환과 함께 피루베이트와 락테이트의 상호 전

환을 촉진시키는 락테이트 탈수소효소의 활성화 상실 및/또는 NADH와 NAD⁺ 보조 인자의 상실 및/또는 세포의 락테이트 농도의 감소 때문이라고 생각된다.

- <61> 에토포시드(etoposide) 처리에 의해 세포사가 일어나도록 유도된 EL-4 뮤린 림프종의 산-추출물에서의 ³¹P-NMR 측정은 처리되지 않은 대조 세포와 비교했을 때, NAD(H)로부터의 공명의 강도 감소를 증명해 왔다. NAD(H)의 상실은 다양한 단백질을 폴리아데닐화하고, 기질로서 NAD⁺를 사용하는 폴리-ADP-리보스 폴리머라제(PARP)의 활성화를 유도하는 DNA-손상으로 설명할 수 있다. 또한 조효소인 NAD(H)의 상실을 통한 당분해 중간체, 프럭토스-1,6-비스포스페이트(FBP)로부터의 공명의 증가가 있었는데, 이는 당분해 효소, 글리세르알데히드 3-인산 탈수소효소(GAPDH)의 억제로 설명할 수 있다. 경쟁적 억제제 (20 mM 니코틴아미드) 또는 3-아미노벤즈아미드 (10 mM)를 이용한 PARP 활성의 억제는 자멸 세포에서 관찰된 FBP 농도의 증가 및 NAD(H)의 상실을 억제했다.
- <62> PARP 활성화에 의한 NAD(H)의 상실은 또한 락테이트 탈수소효소 (LDH) 활성화, 피루베이트와 락테이트 사이의 ¹³C-표지의 측정 플럭스를 억제해야 한다. 이 가정은 형광 현미경을 이용해 검출했을 때, 여전히 죽어가는 세포의 통상의 형태적 특징을 보이면서, 니코틴아미드와 에토포시드 또는 3-아미노벤즈아미드와 에토포시드로 처리된 세포가 피루베이트와 락테이트 풀(pool) 사이에서 과분극화 ¹³C-표지를 전달하는 능력을 유지했다는 관측과 일관된다.
- <63> 본 발명에 따른 영상화 매질이 시험관내 세포사의 검출, 예를 들어 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체의 조직 내의 세포사의 검출을 위해 사용되는 경우, 영상화 매질은 ¹³C-피루베이트 내에 10 mM 내지 50 mM, 바람직하게는 20 mM 내지 40 mM 존재한다.
- <64> 본 발명에 따른 영상화 매질이 생체내 세포사의 검출, 즉 살아있는 인체 또는 비인간 동물체 내의 세포사의 검출을 위해 사용되는 경우, 본 발명에 따른 영상화 매질은 상기 신체에 비경구적으로, 바람직하게는 정맥내로 투여되는 것이 바람직하다. 일반적으로, 검사 중인 신체는 MR 자석 내에 위치한다. 전용 ¹³C-MR RF-코일은 목적물 부분을 덮도록 위치시킨다. 영상화 매질의 투여량 및 농도는 많은 인자, 예를 들어 독성 및 투여 경로에 의존할 것이다. 적절하게, 영상화 매질은 신체 1 kg 당 ¹³C-피루베이트 1 mmol 농도까지, 바람직하게는 0.01 내지 0.5 mmol/kg, 더 바람직하게는 0.1 내지 0.3 mmol/kg의 농도로 투여된다. 투여 속도는 10 ml/s 이하가 바람직하고, 더 바람직하게는 6 ml/min 이하, 가장 바람직하게는 5 ml/s 내지 0.1 ml/s이다. 투여 후 400초 이내에, 바람직하게는 120초 이내, 더 바람직하게는 투여 후 60초 이내, 특히 바람직하게는 20 내지 50초에 MR 영상화 시퀀스를 적용해 결합 주파수 및 공간적 선택적 방법으로 목적물의 체적을 인코딩한다. 이로써 ¹³C-피루베이트 및 ¹³C-락테이트의 대사 영상/스펙트럼이 얻어진다. MR 시퀀스를 적용하는 정확한 시간은 세포 자멸의 검출을 위한 목적물의 체적에 크게 의존한다.
- <65> MR 영상화 시퀀스를 적용해 결합 주파수 및 공간적 선택적 방법으로 목적물의 체적을 인코딩하고, ¹³C-피루베이트의 ¹³C-MR 신호는 영상화제의 첨가 시점 (t=0)부터 약 10분까지, 바람직하게는 6분, 더 바람직하게는 5분까지의 시간 동안 MR 영상화 또는 분광법이 이어진다. 같은 시간 동안에, ¹³C-락테이트 신호의 외관, 증가 및 뒤이은 감소를 모니터한다. 정량 평가를 위해, 건강한 세포 또는 조직의 MR 영상화 또는 분광법이 행해질 수 있고, 그 결과 - 주어진 시간 동안 형성된 락테이트의 양-의 비교를 할 수 있다.
- <66> 목적물 체적의 인코딩은, 예를 들어 문헌 [T.R. Brown et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3523-3526 (1982)] 및 [A. A. Maudsley, et al., J. Magn. Res 51, 147-152 (1983)]에 기재된 바와 같이, 소위 분광학적 영상화 시퀀스를 사용하여 달성할 수 있다. 분광학적 영상 데이터는 각 요소가 전 ¹³C-MR 스펙트럼을 갖는 다수의 체적 요소를 포함한다. ¹³C-피루베이트 및 그의 대사 산물 ¹³C-락테이트는 ¹³C-MR 스펙트럼에서 그들의 독특한 위치를 갖고, 그들의 공명 주파수를 이용해 그들을 확인할 수 있다. 그 공명 주파수의 피크의 적분은 ¹³C-피루베이트 및 ¹³C-락테이트 각각의 양과 직접적으로 관련된다. ¹³C-피루베이트 및 ¹³C-락테이트의 양이, 예를 들어 문헌 [L. Vanhamme et al., J Magn Reson 129, 35-43 (1997)]에 기재된 바와 같이 시간 영역 피팅 루틴을 이용해 측정될 때, ¹³C-피루베이트 및 ¹³C-락테이트에 대한 영상이 생성될 수 있고, 색 코딩 또는 회색 코딩은 측

정된 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트의 양을 나타낸다.

- <67> 분광학적 영상화 방법이 모든 종류의 MR 핵, 예를 들어 ^1H , ^{31}P , ^{23}Na 을 사용한 대사 영상을 생성하는 데 있어서 그들의 가치가 증명되었음에도 불구하고, 분광학적 영상의 완전한 인코딩에 필요한 반복 정도는 이 접근법을 과분극화 ^{13}C 에 덜 적합하게 만든다. 전체 MR 데이터를 획득하는 동안에 과분극화 ^{13}C -신호가 확실히 얻어질 수 있게 하기 위한 주의가 필요하다. 감소된 신호 대 노이즈(noise)의 비의 대가로, 이는 모든 위상 인코딩 단계에 적용되는 RF-펄스 각을 감소시킴으로써 달성될 수 있다. 매트릭스 크기가 클수록 더 많은 위상 인코딩 단계와 더 긴 스캔(scan) 시간을 요한다.
- <68> 문헌 [P. C. Lauterbur, Nature, 242, 190-191, (1973)] 및 [P. Mansfield J. Phys. C. 6, L422-L426 (1973)]에 기재된 첨단 작업에 기초한 영상화 방법은 데이터 획득 중에 판독 구배를 적용하는데, 이는 높은 신호에 대한 노이즈 영상 또는 동등한, 높은 공간 해상도 영상을 허용할 것이다. 그러나 기본 형태의 이들 영상화 방법은 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트에 대해 별개의 영상을 생성할 수 없는데, 즉 특이적 대사 산물의 확인은 불가능하다.
- <69> 바람직한 실시 태양에서, 주파수 정보를 코딩하기 위해 다중 에코 (multiechoes)를 사용할 수 있게 하는 영상화 시퀀스가 사용된다. 별개의 물 및 지방 ^1H -영상을 생성할 수 있는 시퀀스는, 예를 들어 문헌 [G. Glover, J Magn Reson Imaging 1991;1:521-530] 및 [S. B. Reeder et al., MRM 51 35-45 (2004)]에 기재되어 있다. 검출할 대사 산물 및 이들의 MR주파수가 공지되어 있기 때문에, 상기 참고 문헌에서 논의된 접근법은 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트의 직접 영상을 얻는데 적용될 수 있다. 이 과정은 과분극화 ^{13}C -MR 신호를 더 효율적으로 이용하게 하여 분광학적 영상화에 비해 양질의 신호, 높은 공간 해상도 및 빠른 획득 시간을 제공한다.
- <70> 바람직한 실시 태양에서, 세포사의 검출은 본 발명에 따른 영상화 매질을 미리 투여한 인체 또는 비인간 동물체로부터 또는 본 발명에 따른 영상화 매질이 첨가된 세포 배양물, 인체 또는 비인간체로부터 얻은 샘플 또는 생체의 조직으로부터 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트의 스펙트럼 또는 직접 ^{13}C -MR 영상을 얻는 것을 포함한다. 세포사는 ^{13}C -락테이트의 낮은 ^{13}C -신호 강도 또는 ^{13}C -락테이트 신호의 부재 또는 ^{13}C -락테이트 형성 속도의 감소에 의해 확인되고 검출된다.
- <71> 피루베이트 신호를 보정하기 위해, 락테이트 및 피루베이트 영상 모두는 각각의 영상에서 최대값으로 표준화될 수 있다. 다음으로, 표준화된 락테이트 영상에 역전된 피루베이트 영상, 예를 들어 영상 내 최대의 피루베이트 신호에서 모든 화소의 피루베이트 값을 빼준 것을 곱한다. 마지막 단계로, 상기의 조작 중에 얻어진 중간 결과에 본래의 락테이트 영상을 곱한다. 별법으로, 표지 플럭스에 대한 속도 상수 및 스핀 래티스 이완 시간(spin lattice relaxation times)을 얻기 위해 개개 영상의 각각의 화소에서의 피루베이트 및 락테이트 피크 강도는 피루베이트 및 락테이트 사이의 ^{13}C 표지의 플럭스 운동 모델에 부합될 수 있다. 보정은 분극화의 상실에 미치는 다중 RF 펄스의 효과에 대해 이루어질 필요가 있을 수 있다.
- <72> 해부학적 및/또는 관류 정보는 그 방법이 생체내 세포사의 검출에 사용되는 경우, 세포사의 검출에 포함될 수 있다. 해부학적 정보는, 예를 들어 양성자 또는 적절한 조영제를 사용하거나 조영제 없이 ^{13}C -MR 영상에 의해 얻을 수 있다. 상대적 관류는 MR 조영제, 예를 들어 옴니스캔(Omniscan™)을 사용해 결정할 수 있다. 마찬가지로 조영제의 투여 없이 관류 측정을 하기 위한 MR 영상화 기법이 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 실시 태양에서, 비-대사된 과분극화 ^{13}C -조영제를 사용하여 양적 관류를 결정한다. 적합한 기법 및 조영제가, 예를 들어 WO-A-02/23209호에 기재되어 있다. 더 바람직한 실시 태양에서는, 과분극화 ^{13}C -피루베이트를 사용하여 양적 관류를 결정한다.
- <73> 또 다른 바람직한 실시 태양에서, 본 발명에 따른 영상화 매질을 반복적으로 투여함으로써 동적 연구가 가능하다. 피루베이트의 낮은 독성 및 이의 유리한 안전성 특징 때문에, 환자는 이 화합물의 반복된 투여를 잘 견딘다.
- <74> 얻어진 결과에 의해, 예를 들어 의사가 검사 중인 환자를 위한 적절한 치료법을 선택할 수 있거나, 의사는 치료 방법이 성공적인지를 결정할 수 있다.

실시예

<84> 하기에서, 피루베이트, ¹³C-피루베이트 및 ¹³C₁-피루베이트라는 용어는 호환되어 사용되고, 모두 ¹³C₁-피루베이트를 나타낸다. 마찬가지로 피루브산, ¹³C-피루브산 및 ¹³C₁-피루브산이라는 용어는 호환되어 사용되고, 모두 ¹³C₁-피루브산을 나타낸다.

<85> **실시예 1: 트리스(8-카르복시-2,2,6,6-(테트라(메톡시에틸)벤조-[1,2-4,5']비스-(1,3)디티올-4-일)메틸 나트륨 염, DNP 약제의 합성**

<86> WO-A1-98/39277호의 실시예 7에 따라 합성된 트리스(8-카르복시-2,2,6,6-(테트라(히드록시에틸) 벤조-[1,2-4,5']비스-(1,3)디티올-4-일)메틸 나트륨 염 10 g (70 mmol)을 아르곤 분위기에 디메틸아세트아미드 280 ml에 현탁시켰다. 수소화 나트륨 (2.75 g)에 이어서 요오드화 메틸 (5.2 ml)을 첨가하고, 약간 발열성인 반응을 34 °C 수욕에서 1시간 동안 진행시켰다. 수소화나트륨 및 요오드화 메틸의 첨가를 동일한 양의 각 화합물을 사용해 2 회 반복하고, 최종 첨가 후에, 혼합물을 실온에서 68시간 동안 교반한 후 물 500 ml에 부었다. 1 M NaOH (aq) 40 ml를 사용해 pH를 13 보다 높게 조절하였고, 형성된 메틸 에스테르를 가수분해하기 위해 혼합물을 주위 온도에서 15시간 동안 교반하였다. 이어서 2 M HCl (aq) 50 ml를 사용해 혼합물을 pH 약 2로 산성화하고, 에틸 아세테이트 (500 ml 및 2 x 200 ml)로 3 회 추출하였다. 합한 유기 상을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 그 다음 증발시켜 건조하였다. 용출액으로 아세트니트릴/물을 사용하는 제조용 HPLC에 의해 조생성물 (24 g)을 정제하였다. 분획물을 모아 증발시켜 아세트니트릴을 제거하였다. 남아 있는 수상을 에틸 아세테이트로 추출하고, 유기상을 Na₂SO₄ 상에서 건조한 다음 증발시켜 건조시켰다. 물 (200 ml)을 잔류물에 첨가하고, 0.1 M NaOH (aq)를 이용해 pH 7로 조심스럽게 조절하였고, 잔류물은 이 과정 중에 서서히 용해되었다. 중화 후 수용액을 동결 건조하였다.

<87> **실시예 2: 락테이트 및 과분극화 ¹³C₁-피루베이트를 포함하는 영상화 매질의 제조**

<88> 실시예 1의 라디칼을 ¹³C₁-피루브산 (44 mg, 91%)에 용해시켜 15 mM 용액을 준비했다. 샘플을 균질 혼합하고, 그 용액을 샘플 컵에 넣고, DNP 분극자에 주입하였다.

<89> 극초단파 (각각 94 GHz 및 100 mW)를 이용한 조사하에 샘플을 3.35 T 자기장 내의 1.2 K에서 DNP 조건하에 분극화하였다. 분극화 후 고체 상태 NMR을 하였다. 90분 동안의 과분극화 후에, 샘플을 NaOH 94 mM, NaCl 30 mM, HEPES 40 mM 및 EDTA 50 mg/l 수용액 6 ml에 용해시켰다. 75 mM의 최종 ¹³C₁-피루베이트 농도를 갖는 용해된 샘플의 pH는 7.4였다.

<90> 결과 용액 2 ml를 리튬 락테이트 18 mg을 함유한 물 500 μl와 혼합하여 과분극화 ¹³C₁-피루베이트 60 mM 및 락테이트 75 mM을 포함하는 영상화 매질을 제조하였다.

<91> **실시예 3: 세포 배양물에서의 세포사 검출**

<92> **3.1 EL4 세포의 준비**

<93> EL4 뮤린 림프종 세포 (세포 10⁸ 개)를 16시간 노출 후에 세포사를 유도하는 것으로 알려진 화합물인 에토포시드 (PCH 파마케미(Pharmachemie) BV, Harleem) 15 μM로 처리했다. 에토포시드 15 μM에 공지된 PARP 억제제인 니코틴 아마이드 20 mM을 첨가하여 별도의 세트의 세포들을 16시간 동안 처리하였다. 세포사 (세포 자멸 및 괴사)를 아크리딘 오렌지(acridine orange) 및 프로피디움 요오다이드(propidium iodide) 착색으로 확인하였다. 세포를 37°C에서 10% FCS를 함유하는 RPMI 1640 성장 배지를 이용해 3 회 세척하였고, 실시예 2에 따른 영상화 매질 2 ml를 에토포시드- 및 에토포시드/니코틴아미드 처리한 EL4 세포 현탁액 2 ml에 첨가하였다. 따라서 최종 세포 현탁액에는 과분극화 ¹³C₁-피루베이트 30 mM과 락테이트 37.5 mM이 포함되었다.

<94> **3.2 EL4 세포의 ¹³C-MR 분광법**

<95> 3.1에 기재된 바와 같이 에토포시드 처리된 EL4 세포 현탁액 내의 ¹³C-피루베이트 및 ¹³C-락테이트의 ¹³C-신호 강

도가 영상화 매질을 첨가한 시간으로부터 240초에 걸쳐 얻어졌다. 총 240개의 스펙트럼에 대해 9.4 T에서 작은 플립 각 펄스를 이용하여 1초당 하나의 ^{13}C 스펙트럼을 얻었다. 에토포시드 처리되지 않은(미처리) EL4 림프종 세포의 대조군 또한 상기에 기재하였듯이 실험하였고, 처리되지 않은 것 및 에토포시드 처리된 것으로부터의 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트의 피크 강도를 그래프에 도시하였다 (도 1).

<96> **3.3 EL4 세포의 ^{13}C -MR 분광법**

<97> 3.1에 기재된 바와 같이 에토포시드 처리된 및 에토포시드/니코틴아미드 처리된 EL4 세포 현탁액 내의 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트의 ^{13}C -신호 강도가 영상화 매질을 첨가한 시간으로부터 240초에 걸쳐 얻어졌다. 총 240개의 스펙트럼에 대해 9.4 T에서 작은 플립 각 펄스를 이용하여 1 초당 하나의 ^{13}C 스펙트럼을 얻었다. 에토포시드 처리되지 않은(미처리) EL4 림프종 세포의 대조군 또한 상기에 기재하였듯이 실험하였고, 처리되지 않은 EL4 세포, 에토포시드 처리된 EL4 세포 및 에토포시드/니코틴아미드 처리된 EL4 세포로부터의 ^{13}C -피루베이트 및 ^{13}C -락테이트 피크 강도를 비교하였다. 데이터를 변형된 블로흐 식(Bloch equation)에 기초한 2-사이트 교환 모델에 피팅하여, 정방향 및 역방향 교환 ^{13}C -플럭스의 속도 상수를 구하였다. 도 2의 막대 그래프는 3개 실험치 +/- 표준 편차를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

<75> 도 1은 에토포시드 처리한 EL4 세포 현탁액 및 처리하지 않은 EL4 세포 현탁액 내의 $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트 및 $^{13}\text{C}_1$ -락테이트의 피크 강도 대 시간을 나타낸다. 도 1의 곡선 번호는 다음을 나타낸다:

<76> 1: 처리되지 않은 대조 세포 및 에토포시드 처리된 세포 현탁액 내의 $^{13}\text{C}_1$ -피루베이트 강도 (100으로 나눈 것)

<77> 2: 대조 세포 현탁액 내의 $^{13}\text{C}_1$ -락테이트 강도

<78> 3: 에토포시드 처리된 세포 현탁액 내의 $^{13}\text{C}_1$ -락테이트 강도

<79> 도 2는 약물 에토포시드가 유발하는 세포사에 대한 EL4 세포에 미치는 에토포시드 및 에토포시드/니코틴아미드 처리의 효과를 보여준다. 도 2의 막대 그래프는 3개 실험치 +/- 표준편차를 나타낸다.

<80> 도 2의 막대 번호는 다음을 나타낸다:

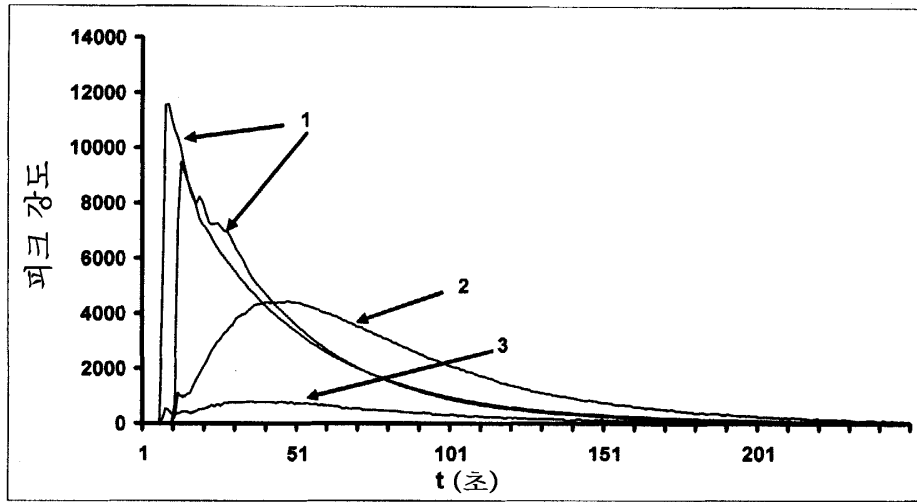
<81> 1: 처리되지 않은 EL4 세포 현탁액

<82> 2: 에토포시드 처리된 EL4 세포 현탁액

<83> 3: 에토포시드/니코틴아미드 처리된 EL4 세포 현탁액

도면

도면1



도면2

락테이트 표지 (mM/초)

