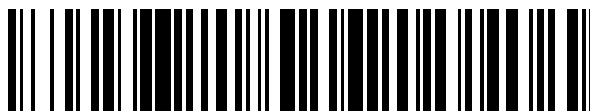


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 312**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/32 (2006.01)

A61B 6/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2013** **PCT/US2013/054551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014** **WO14028392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2013** **E 13829249 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021** **EP 2882863**

54 Título: **Sistema y método para el mapeo cuantitativo del complejo mitocondrial 1**

30 Prioridad:

13.08.2012 US 201261682601 P

14.03.2013 US 201361783468 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2022

73 Titular/es:

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

(100.0%)

55 Fruit Street

Boston, MA 02114, US

72 Inventor/es:

EL FAKHRI, GEORGES y

ALPERT, NATHANIEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 893 312 T3

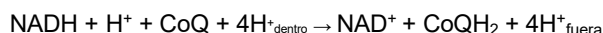
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema y método para el mapeo cuantitativo del complejo mitocondrial 1

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Conocidas como el sitio principal para la producción de energía, las mitocondrias llevan a cabo la fosforilación oxidativa como último paso para generar trifosfato de adenosina (ATP) a partir de la forma reducida de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH), mediante una reacción en cadena de transferencia de electrones. El complejo mitocondrial I (MC-I), también conocido como NADH deshidrogenasa o NADH: ubiquinona oxidoreductasa, es una de las cuatro enzimas unidas a la membrana de la cadena respiratoria en las mitocondrias y la primera enzima que cataliza la fosforilación oxidativa. Hay tres enzimas transductoras de energía en la cadena de transporte de electrones: (i) NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), (ii) Coenzima Q - citocromo C reductasa (complejo III) y (iii) citocromo C oxidasa (complejo IV). El complejo I es la enzima más grande y complicada de la cadena de transporte de electrones. La reacción del complejo I es:



[0002] Además de su papel clave como iniciador de la fosforilación oxidativa, MC-I también se considera el sitio principal de generación de especies reactivas de oxígeno que son dañinas para las células.

[0003] Los trastornos genéticos de las mitocondrias son la causa más frecuente de error metabólico, que afecta a uno de cada cinco mil recién nacidos, y la deficiencia de MC-I es la razón más común. Se cree que los defectos de MC-I son la causa de muchas enfermedades, ya sea por la reducción de la fosforilación oxidativa o por el daño celular debido a las especies reactivas del oxígeno. Por otro lado, la función o el nivel de expresión de MC-I anormales se encuentran en varias enfermedades como resultado de hipoxia o necrosis.

[0004] Además de las enfermedades genéticas, la reducción de expresión MC-I también se ha relacionado con diversos trastornos neurológicos, neuromusculares y psiquiátricos, incluyendo la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, trastornos bipolares y esquizofrenia. Otro campo de aplicación importante es la cuantificación de la expresión de MC-I en la isquemia y el infarto de miocardio, afecciones que se sabe que provocan reducciones de moderadas a severas en MC-I. Por lo tanto, MC-I es de fundamental importancia que afecta a todas las células vivas del cuerpo humano.

[0005] Actualmente no hay métodos clínicamente establecidos para la medición in vivo no invasiva del nivel de expresión MC-I, o equivalentemente su densidad de tejido. El ensayo in vitro es el método de laboratorio estándar actual para tales mediciones, que requieren biopsia o cirugía. Sin embargo, sería clínicamente deseable un ensayo cuantitativo in vivo de esta enzima. Por lo tanto, existe la necesidad de un método no invasivo para el análisis cuantitativo y el mapeo de la expresión de MC-I con fines clínicos y de investigación.

[0006] C. Rischpler et al. (en "Advances in PET myocardial perfusion imaging: F-18 labeled tracers", Annals of Nuclear Medicine, Springer Japan, Japón, vol. 26, nº 1, 9 de noviembre de 2011, páginas 1-6) describe un método que utiliza flurpiridaz F-18, anteriormente conocido como F-18 BMS747158-02, y F-18 fluorobenciltrifenilfosfonio (FBnTP) para imágenes de PET del corazón.

45 RESUMEN DE ASPECTOS DE LA DIVULGACIÓN

[0007] La presente descripción, y la invención de la reivindicación 1 y sus formas de realización como presentes en las reivindicaciones dependientes superan los anteriores y otros inconvenientes proporcionando un método no invasivo para ensayo cuantitativo y mapeo de expresión de MC-I con fines clínicos y de investigación. En un aspecto, se ha desarrollado un sistema y un método para mapear cuantitativamente y de forma no invasiva la expresión regional de MC-I mediante medición in vivo con PET dinámico cuantitativo utilizando un ligando MC-I como ¹⁸F-Flurpiridaz, un análogo químico de piridaben (un inhibidor MC-I). En un aspecto, el sistema y el método son aplicables al campo de la PET cardíaca. En este campo, la presente invención puede usarse para evaluar la enfermedad de las arterias coronarias (CAD). A este respecto, las realizaciones de la presente invención pueden proporcionar un mapeo cuantitativo de la expresión de MC-I así como del flujo sanguíneo miocárdico (FSM).

[0008] En un aspecto, se proporciona un método para ensayo in vivo y obtener imágenes de la expresión del complejo I mitocondrial (MC-I). El método incluye las etapas de: (i) administrar un ligando de PET que se une reversiblemente a MC-I en los tejidos de un sujeto vivo; (ii) obtener imágenes del sujeto con un sistema de formación de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) y almacenar al menos una imagen de PET del sujeto en un medio legible por ordenador no transitorio; y (iii) analizar la firma cinética de al menos una imagen con un procesador de computadora que identifica porciones de la al menos una imagen que representa niveles de expresión de MC-I y almacenar las identificaciones dentro de medios legibles por computadora no transitorios, en donde las representaciones de niveles de expresión de MC-I se basan en una reacción de unión con imágenes de PET entre el ligando de PET y MC-I.

[0009] En un aspecto, el método incluye además procesar las imágenes con un procesador de ordenador que calcula un nivel de flujo sanguíneo (FS) en el sujeto mediante el análisis de la firma cinética de porciones de varias imágenes que expresan niveles de la presencia del ligando de PET en el sujeto. En un ejemplo, el FS comprende FSM.

[0010] En otro aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, ni parte de las realizaciones reivindicadas de la invención, el método incluye además la identificación de estados de isquemia e infarto del miocardio del sujeto evaluando tanto los niveles de expresión de MC-I identificados como los niveles calculados de flujo sanguíneo miocárdico (FSM). Los niveles calculados de los niveles de expresión de FS y MC-I pueden calcularse basándose en un modelo cinético almacenado en un medio legible por computadora.

[0011] En otro aspecto más, el método incluye además identificar estados de un trastorno metabólico, trastorno neurológico, trastorno neuromuscular y trastorno psiquiátrico basándose en la interacción identificada entre un ligando de PET y MC-I.

[0012] En un segundo aspecto, se proporciona un sistema para obtener imágenes de la expresión del complejo I mitocondrial (MC-I). El sistema incluye: un generador de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET); una fuente de marcador radiactivo PET para la administración a un sujeto; y un procesador que tiene un medio legible por ordenador no transitorio programado con instrucciones para obtener imágenes PET del sujeto administrado con el marcador radiactivo. El medio legible por computadora está programado con instrucciones para procesar las imágenes de PET e identificar porciones de las imágenes de PET que representan los niveles de expresión de MC-I. Además, las representaciones de los niveles de expresión de MC-I se basan en interacciones de imágenes PET entre el marcador radiactivo y MC-I.

[0013] En otro aspecto, se proporciona un método para obtener imágenes de la expresión del complejo I mitocondrial (MC-I). El método incluye los pasos de: (i) administrar un marcador radiactivo que sirve como análogo químico de un inhibidor de MC-I; (ii) obtener imágenes del sujeto con un sistema de formación de imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) para adquirir datos de PET del sujeto; (iii) reconstruir imágenes del sujeto a partir de los datos de PET; (iv) procesar la(s) imagen(es) con un procesador de computadora para identificar partes de la(s) imagen(es) que representan niveles de expresión MC-I; y (v) generar un informe que incluya representaciones de los niveles de expresión de MC-I en base a las imágenes del sujeto y las partes de las imágenes que representan los niveles de expresión de MC-I.

[0014] En un aspecto, el marcador radiactivo incluye ^{18}F -flurpiridaz. En otro aspecto, el método incluye procesar la(s) imagen(es) con un procesador de computadora para calcular un nivel de flujo sanguíneo (FS) dentro del sujeto analizando porciones de la(s) imagen(es) del sujeto que expresan niveles de presencia del marcador radiactivo.. En un ejemplo, que no forma parte de la invención reivindicada ni de las realizaciones reivindicadas de la invención, el informe incluye una indicación de estados de isquemia e infarto del miocardio del sujeto correlacionados con los niveles de expresión de MC-I y los niveles de FS.

[0015] En otro aspecto, el informe incluye una cuantificación de al menos uno de los niveles de actividad de expresión MC-I y los niveles de FS. En un ejemplo, el método incluye además identificar estados de un trastorno metabólico, trastorno neurológico, trastorno neuromuscular y trastorno psiquiátrico basándose en la interacción identificada entre el marcador radiactivo y MC-I. En otro aspecto más, el marcador radiactivo proporciona una fracción de extracción unidireccional que se aproxima a la unidad en una pluralidad de valores de flujo fisiológico.

[0016] En otro aspecto más, se proporciona un sistema para obtener imágenes de la expresión del complejo I mitocondrial (MC-I). El sistema incluye: un medio de almacenamiento no transitorio en el que se almacenan imágenes de tomografía por emisión de positrones (PET) de un sujeto que ha recibido una dosis de un marcador radiactivo que sirve como análogo químico de un inhibidor de MC-I; y un procesador que tiene medios legibles por computadora no transitorios programados con instrucciones para hacer que el procesador acceda a las imágenes de PET y procese las imágenes de PET para identificar porciones de las imágenes de PET que representan los niveles de expresión de MC-I.

[0017] En un aspecto, el sistema incluye además una pantalla para proporcionar una imagen que indica las porciones de la(s) imagen(es) PET que representan niveles de expresión de MC-I. En otro aspecto, el procesador analiza la imagen o imágenes PET para determinar una firma cinética. En otro aspecto más, el procesador calcula un nivel de flujo sanguíneo (FS) dentro del sujeto analizando la firma cinética de porciones de la imagen o imágenes de PET que expresan los niveles de presencia del ligando de PET en el sujeto. En otro aspecto, el procesador calcula el flujo sanguíneo miocárdico (FSM) utilizando la imagen o imágenes de PET y, en un ejemplo que no forma parte de la invención reivindicada ni forma parte de las realizaciones reivindicadas de la invención, identifica además estados de isquemia e infarto de miocardio del sujeto evaluando tanto los niveles de expresión de MC-I identificados como los niveles calculados de FSM.

[0018] Las anteriores y otras ventajas de la invención aparecerán a partir de la descripción siguiente. En la descripción,

se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma, y en los que se muestra a modo de ilustración una realización preferida de acuerdo con la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019]

La Fig. 1A-1B es una ilustración esquemática de la cuantificación de MC-I.

La Fig. 1C muestra la estructura molecular de ^{18}F -Flurpiridaz.

La Fig. 2A muestra las imágenes sumadas del miocardio en los ejes corto y largo.

La Fig. 2B es un gráfico que muestra una comparación de las funciones de entrada derivadas con GFADS y muestras de sangre (puntos) y función de entrada basada en ROI.

La Fig. 3A es un gráfico que muestra datos de actividad de un estudio de monos ajustados a un modelo reversible de 2 compartimentos.

La Fig. 3B es un gráfico que muestra los datos de K1 del estudio de monos con el K1 estimado en función de la duración del estudio.

La Fig. 3C es un gráfico que muestra los datos de PA del estudio de monos con PA_A ilustrado para tomar más tiempo (-60 minutos) para una estimación confiable.

La Fig. 4A es un gráfico que muestra la cinética de la absorción del trazador en un estudio dinámico de reposo-estrés.

La Fig. 4B muestra imágenes de estrés y reposo co-registradas del ^{18}F -Flurpiridaz en estudios cardíacos clínicos.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra una comparación de la PA_A estimada con estudios de 60 y 100 minutos en tres tipos de miocardio utilizando estudios de simulación.

La Fig. 6A muestra imágenes de PET con ^{18}F -Flurpiridaz de un cerdo infartado en las vistas de los ejes corto (fila superior) y largo (filas media e inferior). Las flechas indican el sitio del infarto.

La Fig. 6B muestra fotografías adquiridas en la disección que confirman el infarto en la pared anteroseptal (izquierda: vista epicárdica, derecha: miocardio invertido para vista endocárdica).

La Fig. 6C muestra una transferencia de Western que indica una expresión reducida de MC-I en muestras de tejido parcialmente y completamente infartadas.

La Fig. 6D muestra el ajuste del modelo de dos compartimentos de tejido a los datos de PET con ^{18}F -Flurpiridaz en miocardio sano (paneles superiores) e isquémico (paneles inferiores). Los ajustes acoplados (derecha) tienen menos variables libres y presentan una menor degradación en la calidad de los ajustes del modelo a los datos, lo que reduce la varianza de los parámetros estimados.

La Fig. 7 es una vista esquemática de un sistema de tomografía por emisión de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 8 es un diagrama de flujo que muestra los pasos de un ejemplo de un método de uso de un sistema de tomografía por emisión de acuerdo con la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] El sistema y métodos descritos, en una realización, contemplan el uso de un ensayo in vivo para medir los niveles de expresión MC-I. Si bien se proporcionan ejemplos específicos, se contempla que una implementación general podría incluir el uso de una molécula dirigida a MC-I que sea compatible con una o más de una variedad de tecnologías de imágenes médicas. Por ejemplo, en una realización, un método incluye las etapas de administrar la molécula de dirección MC-I ^{18}F -Flurpiridaz para la formación de imágenes de PET. La molécula de dirección MC-I utilizada para la formación de imágenes por PET puede ser compatible con la formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), la formación de imágenes por ultrasonido o cualquier otro tipo de tecnología de formación de imágenes adecuada.

[0021] Con referencia a la FIG. 7, un sistema PET 100 de acuerdo con la presente invención incluye un sistema de hardware de imágenes 110 que incluye un conjunto de anillo detector 112 alrededor de un eje central, u orificio 114. Una estación de trabajo 116 del operador que incluye un procesador disponible que ejecuta un sistema operativo comercialmente disponible que se comunica a través de un enlace de comunicaciones 118 con un controlador de pósito 120 para operación de control del sistema de hardware de formación de imágenes 110.

[0022] El conjunto de anillo detector 112 se forma de una multitud de unidad de detector de radiación 122 que produce una señal que responde a la detección de un fotón en la línea de comunicaciones 124 cuando ocurre un evento. Un conjunto de circuitos de adquisición 126 recibe las señales y produce señales que indican las coordenadas del evento (x, y) y la energía total asociada con los fotones que causaron el evento. Estas señales se envían a través de un cable 128 a un circuito localizador de eventos 130. Cada circuito de adquisición 126 también produce un pulso de detección de eventos que indica el momento exacto en el que tuvo lugar la interacción. Otros sistemas utilizan electrónica digital sofisticada que también puede obtener esta información sobre el instante preciso en que ocurrió el evento a partir de las mismas señales utilizadas para obtener energía y coordenadas del evento.

[0023] Los circuitos de localizador de evento 130 en algunas implementaciones forman parte de un sistema de

procesamiento de adquisición de datos 132 que muestrea periódicamente las señales producidas por los circuitos de adquisición 126. El sistema de procesamiento de adquisición de datos 132 incluye un controlador general 134 que controla las comunicaciones en un bus de plano posterior 136 y en la red general de comunicaciones 118. Los circuitos localizadores de eventos 130 reúnen la información relativa a cada evento válido en un conjunto de números que indican con precisión cuándo tuvo lugar el evento y la posición en la que se detectó el evento. Este paquete de datos de evento se transporta a un detector de coincidencia 138 que también es parte del sistema de procesamiento de adquisición de datos 132.

[0024] El detector de coincidencia 138 acepta los paquetes de datos de eventos desde el circuito de evento localizador 130 y determina si cualquiera de dos de ellos están en coincidencia. La coincidencia está determinada por varios factores. Primero, los marcadores de tiempo en cada paquete de datos de eventos deben estar dentro de una ventana de tiempo predeterminada, por ejemplo, 0,5 nanosegundos o incluso hasta picosegundos. En segundo lugar, las ubicaciones indicadas por los dos paquetes de datos de eventos deben estar en una línea recta que atraviese el campo de visión en el orificio del escáner 114. Los eventos que no se pueden emparejar son descartados por el detector de coincidencia 138, pero los pares de eventos coincidentes son ubicados y registrados como un paquete de datos de coincidencia. Estos paquetes de datos de coincidencia se proporcionan a un clasificador 140. La función del clasificador en muchos sistemas tradicionales de formación de imágenes de PET es recibir los paquetes de datos de coincidencia y generar direcciones de memoria a partir de los paquetes de datos de coincidencia para el almacenamiento eficiente de los datos de coincidencia. En ese contexto, el conjunto de todos los rayos de proyección que apuntan en la misma dirección (θ) y pasan a través del campo de visión del escáner (FOV) es una proyección completa o "vista". La distancia (R) entre un rayo de proyección particular y el centro del FOV ubica ese rayo de proyección dentro del FOV. El clasificador 140 cuenta todos los eventos que ocurren en un rayo de proyección dado (R, θ) durante el escaneo clasificando los paquetes de datos de coincidencia que indican un evento en los dos detectores que se encuentran en este rayo de proyección. Los recuentos de coincidencias se organizan, por ejemplo, como un conjunto de matrices bidimensionales, una para cada plano axial de la imagen, y cada una tiene como una de sus dimensiones el ángulo de proyección θ y la otra dimensión la distancia R. Este mapa θ por R de los eventos medidos se denominan histograma o, más comúnmente, una matriz de sinogramas. Son estos sinogramas los que se procesan para reconstruir imágenes que indican el número de eventos que tuvieron lugar en la ubicación de cada píxel de la imagen durante el escaneo. El clasificador 140 cuenta todos los eventos que ocurren a lo largo de cada rayo de proyección (R, θ) y los organiza en una matriz de datos de imagen.

[0025] El clasificador 140 proporciona conjuntos de datos de imagen a un sistema de procesamiento de imágenes/reconstrucción 142, por ejemplo, por medio de un enlace de comunicaciones 144 a ser almacenado en una matriz de imagen 146. Los arrays de imagen 146 tienen los respectivos conjuntos de datos para el acceso por un procesador de imagen 148 que reconstruye imágenes. El sistema 142 de procesamiento/reconstrucción de imágenes puede comunicarse y/o integrarse con la estación de trabajo 116 u otras estaciones de trabajo remotas.

[0026] La deficiencia en el complejo mitocondrial I (MC-I) es una característica común que afecta a una amplia gama de enfermedades genéticas, psiquiátricas y cardíacas. Se ha utilizado un sistema y método que proporciona un enfoque no invasivo para medir el nivel de expresión de MC-I in vivo. En un aspecto, la presente divulgación utiliza una inyección intravenosa de una cantidad trazadora de un radionúclido ^{18}F -Flurpiridaz. Sin embargo, se anticipa que otras moléculas, como los análogos químicos de piridabén, un inhibidor de MC-I, pueden usarse en la implementación del sistema y los métodos descritos en el presente documento, pero dicho uso de dichas otras moléculas no forma parte de la invención reivindicada. En general, cualquier molécula que obtenga acceso rápido al espacio extravascular y se una de forma selectiva y reversible al complejo MC-I puede potencialmente usarse para medir la expresión de MC-I. Sin embargo, los ligandos de unión tendrán una variedad de propiedades que pueden optimizarse para el propósito del ensayo MC-I. Por ejemplo, la cinética de la unión de ^{18}F -Flurpiridaz es relativamente lenta. Una medición puede tardar una hora o más. En ciertos aspectos, por lo tanto, el ^{18}F -Flurpiridaz es adecuado para la investigación en humanos. En otros aspectos, un ligando particular puede ser útil como agente de flujo sanguíneo independientemente de la utilidad del ligando para un ensayo MC-I y viceversa. En general, el ^{18}F -Flurpiridaz es un ligando de ejemplo existente que ha mostrado la capacidad de unirse reversiblemente a MC-I y se puede esperar que se puedan fabricar muchos agentes que tendrán propiedades adecuadas para la implementación de la presente invención. Además, es probable que se puedan encontrar otros mecanismos para diseñar moléculas que puedan usarse para medir la unión de MC-I.

[0027] El ^{18}F -Flurpiridaz es un trazador de PET que se encuentra actualmente en ensayos clínicos para evaluar el flujo sanguíneo del miocardio (FSM). La presente invención reconoce que Flurpiridaz tiene varias propiedades cinéticas importantes que incluyen una fracción de extracción unidireccional cercana a 1 en todos los valores de flujo fisiológico, y el rasgo de ser un análogo químico del piridabén, un inhibidor de MC-I. Flurpiridaz, actualmente en fase de investigación III, se considera un agente de formación de imágenes cardíacas prometedor, pero su potencial para obtener imágenes/medir la expresión de MC-I no se ha descubierto ni aprovechado hasta ahora.

[0028] En el desarrollo de la presente invención, los experimentos se llevaron a cabo que muestran que los primeros minutos de historia de concentración ^{18}F -Flurpiridaz están determinados únicamente por el flujo de sangre; mientras que su curso de tiempo posterior está determinado por la unión reversible a MC-I, lo que permite el mapeo cuantitativo de su potencial de unión con imágenes de PET y modelado cinético. Por tanto, se determinó que, además de su uso

como trazador de flujo, podría desarrollarse un ensayo in vivo no invasivo de la expresión de MC-I. En un aspecto, dentro de la misma sesión de imágenes y con la misma dosis inyectada de trazador, se pueden cuantificar tanto la perfusión como el nivel de expresión de MC-I. En ejemplos que no forman parte del método reivindicado, ni de las realizaciones reivindicadas, la capacidad de cuantificar de forma no invasiva los niveles de expresión de MC-I puede traducirse potencialmente en el diagnóstico de diversas enfermedades relacionadas con anomalías mitocondriales o en el estudio del papel patológico de las mitocondrias en estas enfermedades. Además (en los ejemplos que no forman parte del método reivindicado ni de las realizaciones reivindicadas), la medición tanto de la perfusión como de la MC-I en el mismo estudio puede ampliar la capacidad para diagnosticar el miocardio en hibernación en pacientes con isquemia miocárdica crónica.

[0029] Los estudios dinámicos de PET con ^{18}F -Flurpiridaz proporcionan una cuantificación exacta y precisa del nivel de expresión de MC-I usando análisis de modelado cinético. Las condiciones en las que el potencial de unión del MC-I se puede calcular con precisión con estudios PET pueden determinarse mediante un primer conjunto de experimentos. Con esta información, la adquisición de PET se puede optimizar para lograr un diseño experimental óptimo. Un modelo porcino desarrollado previamente de isquemia miocárdica crónica se puede utilizar para variar MC-I y los niveles de flujo sanguíneo miocárdico y validar las mediciones de PET mediante comparación directa con ensayos y microesferas de MC-I in vitro, respectivamente.

[0030] En un aspecto de la divulgación, puede ser comprobada la doble función de ^{18}F -flurpiridaz para el mapeo cuantitativo tanto del FSM como de la actividad MC-I. Actualmente, la mayor parte del trabajo realizado para ^{18}F -Flurpiridaz se centra en la obtención de imágenes semicuantitativas de FSM. En un aspecto, el enfoque presentado en este documento amplía aún más el uso de ^{18}F -Flurpiridaz a la medición simultánea de la perfusión y MC-I dentro de una única sesión de exploración dinámica. El modelado cinético y el análisis gráfico se pueden utilizar como enfoque de análisis de datos y se pueden abordar los detalles técnicos para dicho análisis, incluida la extracción de la función de entrada y la determinación de la duración requerida del estudio. En el campo de la medicina nuclear, las técnicas de obtención de imágenes a menudo implican tomar una sola imagen de la distribución de una actividad. En ciertos aspectos de la divulgación, los métodos descritos en este documento incluyen la adquisición de múltiples imágenes espaciadas en el tiempo, seguidas de uno o más cálculos basados en un modelo del comportamiento cinético del ligando MC-I. En un aspecto, el modelo y el cálculo son aplicables a todos los ligandos/trazadores de MC-I.

[0031] En otra forma de realización, el nivel de expresión MC-I medido con ^{18}F -flurpiridaz se puede validar en un modelo porcino por la norma de ensayos in vitro. En el modelo animal, los niveles de expresión de MC-I en diferentes territorios miocárdicos pueden verse alterados por diferentes grados de hipoxia; por lo tanto, se creará un espectro del nivel de expresión MC-I en el corazón. Mediante análisis in vitro, se puede ensayar la expresión de MC-I en esas regiones enfermas así como en el miocardio viable. Estas mediciones realizadas con estudios de ^{18}F -Flurpiridaz in vivo se pueden evaluar en términos de exactitud y precisión con pruebas y mediciones estadísticas. La cuantificación de FSM se puede validar utilizando microesferas, que pueden proporcionar el flujo de referencia en todos los territorios cardíacos.

[0032] En otro aspecto más de la divulgación, que no forma parte de la invención reivindicada, ni parte de las realizaciones reivindicadas de la invención, la relación entre el grado de isquemia miocárdica y el nivel de expresión MC-I puede ser examinada cuantitativamente. En un aspecto de la divulgación, que no forma parte de la invención como se reivindica ni en las realizaciones reivindicadas, basándose en el ensayo in vitro y la histología, las muestras de miocardio se pueden clasificar como miocardio normal, en hibernación e infartado. En un aspecto que no forma parte de la invención como se ha reivindicado ni las realizaciones reivindicadas, se puede comparar el nivel de expresión de MC-I medido con ^{18}F -Flurpiridaz PET y se puede determinar si tales mediciones se pueden utilizar como una herramienta potencial para diferenciar estos tres tipos de tejido de forma no invasiva. En otro aspecto, se puede evaluar el poder discriminante que se puede lograr al discriminar entre las tres clases de tejido usando 1) perfusión solo, 2) MC-I solo y 3) perfusión y MC-I combinados.

[0033] Con referencia a la Fig. 8, se proporciona un diagrama de flujo que expone los pasos de un ejemplo de un método 200 de uso de un sistema de tomografía por emisión de acuerdo con la presente invención. En un primer paso 202 del método 200, se administra una molécula trazadora de dosis adecuada para la unión de MC-I (ligando de MC-I). Un ejemplo de ligando MC-I es el trazador PET ^{18}F -Flurpiridaz. La dosis se administra, en un aspecto, a un sujeto tal como un paciente humano. En un siguiente paso 204 del método 200, se obtienen imágenes del sujeto usando un sistema de tomografía por emisión tal como un sistema PET. Se obtienen imágenes del sujeto durante un período de tiempo basado en la cinética del ligando MC-I. Por ejemplo, cuando el ligando MC-I es ^{18}F -Flurpiridaz, se pueden obtener imágenes del sujeto dentro de los primeros minutos del paso de administración si el objetivo es calcular la perfusión. Sin embargo, si es deseable calcular la expresión de MC-I, entonces se pueden tomar imágenes del sujeto durante un período de tiempo general más largo o comenzando en un momento posterior después del paso de administración.

[0034] En un paso siguiente 206 de método 200, la una o más imágenes de la materia adquirida con el sistema de tomografía de emisión se pueden almacenar en un medio legible de ordenador no transitorio. Luego, en un paso 208 del método 200, una o más imágenes se pueden analizar, por ejemplo, con un procesador de computadora. Después del análisis, en el paso 210, se pueden realizar uno o más cálculos. Los cálculos pueden incluir la cuantificación de la

perfusión del sujeto y los niveles de expresión de MC-I. Además, en el paso opcional 212 del método 200, que no forma parte de la invención reivindicada ni de sus realizaciones reivindicadas, el miocardio sujeto puede diagnosticarse como miocardio hibernante, miocardio sano y/o miocardio isquémico.

[0035] Con referencia al método 200 de arriba, es posible que implementan los pasos en el orden mostrado o en cualquier orden adecuado a la ejecución exitosa del método 200. Para un ejemplo que no forma parte de la invención reivindicada, la formación de imágenes del sujeto en el paso 204 puede llevarse a cabo antes y simultáneamente con la administración del ligando MC-I en el paso 202. En otro ejemplo, el paso 208 de análisis de imagen se puede ser intermitente con los cálculos en el paso 210. Aunque se han realizado varios ejemplos descritos, son probables y anticipadas otras combinaciones útiles de los pasos del método 200.

[0036] En los ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada, ni parte de las realizaciones reivindicadas, la capacidad de cuantificar de forma no invasiva los niveles de expresión MC-I puede ser traducida al diagnóstico de diversas enfermedades relacionadas con anomalías mitocondriales o el estudio de la función patológica de las mitocondrias en estas enfermedades. Además, midiendo tanto la perfusión y MC-I en el mismo estudio se extiende, en los ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada, ni parte de las realizaciones reivindicadas, a la capacidad de diagnosticar miocardio en hibernación en pacientes con isquemia miocárdica crónica

[0037] Actualmente, no existen métodos establecidos para la medición in vivo, no invasiva, del nivel de expresión de MC-I, o de manera equivalente su densidad tisular. El ensayo in vitro es el método de laboratorio estándar actual para tales mediciones, que requieren biopsia o cirugía. Utilizando el trazador ^{18}F -Flurpiridaz (anteriormente conocido como ^{18}F -BMS7472158-02), la presente divulgación y la invención según se reivindica, proporciona un enfoque de formación de imágenes para cuantificar el nivel de expresión de MC-I con fines clínicos y de investigación. El ^{18}F -Flurpiridaz es un análogo de piridabén que se ha demostrado que se une al complejo de mitocondrias I (MC-I). Desarrollado por primera vez como un trazador de perfusión miocárdica, tiene varias características atractivas en ese sentido: alta fracción de extracción de primer paso, retención prolongada en el miocardio y una etiqueta de ^{18}F que permite la distribución comercial a sitios sin ciclotrón y produce una excelente calidad de imagen, debido al corto rango de positrones. Hasta ahora, la afinidad del trazador por MC-I se ha ignorado en gran medida. Como inhibidor de MC-I con una alta afinidad de unión, la presente invención permite medir el potencial de unión de MC-I y utilizarlo para determinar los niveles de expresión de MC-I. Las aplicaciones ejemplares incluyen enfermedades de las arterias coronarias (CAD) y enfermedades neuropsiquiátricas y deficiencias genéticas de MC-I.

[0038] Ha habido algunos informes que estudian el efecto de las lesiones isquémicas, ya sean agudas o crónicas, en MC-I. En modelos animales, se ha demostrado que los animales con isquemia crónica inducida (que también se cree que es la causa del miocardio en hibernación) tienen niveles reducidos de expresión de MC-I en el miocardio. La teoría detrás de este fenómeno es que la expresión de MC-I se reduce porque 1) la demanda de energía y la perfusión se reducen en estas áreas, de modo que la expresión de MC-I se regula a la baja para adaptarse al metabolismo disminuido, y 2) una fracción de las células del miocardio en estas áreas se convierten en tejido fibroso no viable o con cicatrices debido a la lesión isquémica. La densidad general de las mitocondrias se reduce y, por lo tanto, conduce a una menor expresión de MC-I. Como resultado, la observación de una expresión de MC-I significativamente reducida en el miocardio enfermo crea la posibilidad de utilizar imágenes de PET con ^{18}F -Flurpiridaz en tales aplicaciones. En un aspecto, una ventaja de la PET con ^{18}F -Flurpiridaz es que la perfusión se puede medir dentro de la misma sesión de imágenes además de la expresión de MC-I, que puede, en ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada, ni parte de las realizaciones reivindicadas, conducir a un diagnóstico más definitivo de lesión isquémica pero viable frente a infarto.

[0039] La relación entre la anomalía de las funciones de las mitocondrias y diversas enfermedades neuropsiquiátricas ha sido abordada en informes recientes y todavía sigue siendo un tema de investigación activa. Se ha demostrado que la deficiencia de MC-I juega un papel importante en el daño neuronal dopaminérgico en la enfermedad de Parkinson. También se han encontrado deficiencias similares de MC-I en la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la esquizofrenia y los trastornos bipolares. Dado que el vínculo entre las anomalías de MC-I y estas enfermedades se descubrió en los últimos años, este es un campo relativamente nuevo que puede beneficiarse potencialmente del sistema y los métodos descritos en este documento. Excepto por biopsia, actualmente no es posible evaluar anomalías regionales en la expresión de MC-I. En un aspecto de la divulgación (que no forma parte de la invención reivindicada ni de las realizaciones reivindicadas), una técnica de obtención de imágenes de PET para el ensayo regional de MC-I (^{18}F -Flurpiridaz cruza la barrera hematoencefálica) abre oportunidades para evaluar nuevos agentes terapéuticos y ayudarán a diagnosticar y posiblemente avanzar en el tratamiento de las enfermedades por deficiencia de MC-I, como el síndrome de Leigh, la acidosis tubular renal y la miocardiopatía.

[0040] El sistema descrito y métodos tienen implicaciones científicas y clínicas proporcionando una técnica in vivo y no invasiva para medir el nivel de expresión MC-I. Debido a que la PET es una técnica de imagenología bien establecida para el diagnóstico y la investigación clínicos, los métodos descritos pueden, en cierto modo, tener un gran potencial para estudios traslacionales y aplicaciones clínicas. En otro aspecto, además de la expresión de MC-I, el mismo estudio de ^{18}F -Flurpiridaz y análisis de modelado cinético también pueden usarse para cuantificar la perfusión tisular. Esta característica es particularmente atractiva para aplicaciones cardíacas, en las que la información de

perfusión y metabolismo a menudo puede aumentar (en ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada, ni parte de las realizaciones reivindicadas) la sensibilidad diagnóstica cuando se usan juntos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Métodos para cuantificar el nivel de expresión de MC-I de un solo PET con ^{18}F -Flurpiridaz:

El nivel de expresión de MC-I se puede definir usando la Ecuación 1:

donde α es una constante de proporcionalidad y $B_{\max}$ es la concentración local de MC-I en tejido. Suponiendo que la afinidad de Flurpiridaz por MC-I no se altera en la enfermedad o condición patológica, Ec. 1 se puede escribir como

donde $\alpha' = \alpha \cdot K_D$ es una constante de proporcionalidad, $1/K_D$ es la afinidad del ligando (Flurpiridaz) por MC-I, y PA denota el potencial de unión. Por tanto, se planteó la hipótesis de que el potencial de unión de Flurpiridaz podría servir como un criterio de valoración sustituto para el nivel de expresión de MC-I.

[0042] Para el propósito de un estudio de validación inicial y prueba de principio, se elige un modelo porcino de isquemia crónica. Se demostró que este modelo proporciona actividades normales, disminuidas (isquémicas) y muy bajas (infarto) de MC-I, como se describe por Page B, Young R, Iyer V, et al. Persistent regional downregulation in mitochondrial enzymes and upregulation of stress proteins in swine with chronic hibernating myocardium. Circ Res. 4 de enero de 2008; 102 (1): 103-112. El modelo porcino tiene ventajas adicionales para los estudios de PET, incluido un tamaño de modelo similar al del hombre y la idoneidad para la obtención de imágenes dinámicas cuantitativas.

EJEMPLO 2

Diseño experimental:

[0043] La medición del flujo sanguíneo miocárdico y el potencial de unión con ^{18}F -Flurpiridaz se puede abordar con métodos estándar que se comprenden bien y están disponibles en nuestro laboratorio. Usamos un modelo de cuatro parámetros (K_1 , k_2 , k_3 , k_4), dos compartimentos de tejido (Figs. 1A-1B) para describir la cinética de Flurpiridaz. En este modelo, el marcador puede estar en uno de dos estados, ya sea libre, como molécula inyectada, o unido a un receptor. En el caso de ^{18}F -Flurpiridaz, estudios previos han demostrado que se une reversiblemente al complejo mitocondrial I y esto está respaldado por los datos presentados en este documento (ver Ejemplo 3). Haciendo referencia a las Figs. 1A-1B, el producto de la concentración plasmática (C_p) y la velocidad de transporte K_1 es la fuerza que impulsa al trazador desde el plasma capilar al espacio libre (es decir, tanto libre como no específicamente unido). Conceptualmente, C_f representa flurpiridaz libre y C_B representa la unión de Flurpiridaz al complejo MC-I. Se incluyen correcciones (no mostradas) para el desborde de actividad.

[0044] Simbólicamente, K_1 es la tasa de transporte de plasma a los tejidos, FE, el producto del flujo y la fracción de extracción capilar unidireccional, E. k_2 es una constante de velocidad que resume la salida de tejido a plasma. Las constantes de velocidad k_3 ($k_{\text{encendido}} \cdot B'_{\max}$) y k_4 (k_{apagado}) proporcionan una descripción resumida de la unión y liberación del trazador. Este modelo, con mínimos cuadrados no lineales, se utilizó para ajustar 100 minutos de datos obtenidos en un estudio de unión en el corazón de un mono cynomolgus (ver Ejemplo 3). Se prevé que un enfoque similar será adecuado para los estudios de validación en cerdos. Los métodos gráficos también se pueden estudiar y aplicar para la determinación de la PA, ya que pueden ser más apropiados para imágenes paramétricas cuantitativas y traducción futura a estudios humanos. Por ejemplo, considere: Logan J, Fowler JS, Volkow ND, et al. Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. J Cereb Blood Flow Metab. Septiembre de 1990; 10 (5): 740-747 y Zhou Y, Ye W, Brasic JR, Crabb AH, Hilton J, Wong DF. A consistent and efficient graphical analysis method to improve the quantification of reversible tracer binding in radioligand receptor dynamic PET studies. Neuroimage. 1 de febrero de 2009; 44 (3): 661-670. Se han desarrollado programas de software para ambos enfoques. La simulación realista de Monte Carlo y el análisis de sensibilidad se pueden utilizar para determinar la precisión obtenida con una dosis determinada de ^{18}F -Flurpiridaz y la duración experimental del estudio. La estructura de ^{18}F -Flurpiridaz se detalla en la Fig. 1C.

[0045] En algunos aspectos se desarrolla más el modelo. El enfoque de modelado se basa en el modelo de compartimento de dos tejidos que describe la captación y retención de un marcador radiactivo que se intercambia de manera difusa entre la sangre y el tejido y se une reversiblemente a un sitio objetivo específico (FIG. 1A-1B). En este marco, la concentración de marcador radiactivo se considera en tres estados distintos: en el plasma (C_p) o en uno de los dos estados tisulares, suspendido libremente en los fluidos tisulares (C_f) o unido específicamente al sitio diana (C_B). Cuatro parámetros (K_1 , k_2 , k_3 , k_4) detallan los mecanismos fisiológicos subyacentes a la captación y unión. K_1 y k_2 se refieren a las tasas de entrada del marcador (proporcional al flujo sanguíneo) desde la vasculatura y salida del

tejido, respectivamente. La relación K_1/k_2 es el coeficiente de reparto V_{ND} que refleja una captación inespecífica basada en propiedades del tejido que no se espera que varíen regionalmente. La velocidad a la que el trazador se une al sitio diana está relacionada con k_3 . La naturaleza bimolecular de la unión asociativa hace que k_3 sea un parámetro compuesto, el producto de $k_{encendido}$ (una característica de velocidad de unión intrínseca al ligando y al sitio diana) y B_{max} (la densidad de los sitios de unión). Para interacciones de unión reversible como entre ^{18}F -Flurpiridaz y MC-I, el retorno del trazador unido específicamente al estado libre es representado por k_4 . Aquí k_4 es sinónimo de la constante de disociación de unión intrínseca $k_{apagado}$, que no se espera que difiera entre regiones. En nuestra aplicación cardíaca, dos parámetros adicionales (f_{LV} , f_{RV}) explican la contaminación de la señal de las agrupaciones de sangre en los ventrículos izquierdo y derecho adyacentes. Las combinaciones de constantes de velocidad individuales producen macroparámetros que son sólidos e informativos con respecto a la unión del marcador radiactivo en el sitio diana. Estos macroparámetros incluyen el volumen total de distribución ($V_T = [K_1/k_2][1 + k_3/k_4]$, la relación de equilibrio de la concentración del marcador en el tejido frente al plasma) y varias variantes del potencial de unión (PA, proporcional a la densidad diana). Se proporciona una excelente revisión de estos resultados en Wu et al., The Journal of Nuclear Medicine. 1998; 39: 117-425.

[0046] El enfoque compartimental de dos tejidos es a veces incapaz de proporcionar estimaciones únicas o precisas de las constantes de velocidad individuales o macroparámetros, especialmente para marcadores radiactivos con cinética lenta tales como ^{18}F -Flurpiridaz. En estos casos, las transformaciones gráficas del modelo pueden producir caracterizaciones más robustas, aunque a veces sesgadas, de la captación y unión del trazador. Además, estos métodos linealizados son computacionalmente eficientes y pueden facilitar el análisis píxel por píxel para la generación de imágenes paramétricas. Por lo tanto, puede ser beneficioso estudiar estas técnicas y evaluar el equilibrio entre sesgo y precisión. Otro enfoque para mejorar la estabilidad de los parámetros de resultado y aún permanecer dentro del marco del modelo compartimental es analizar múltiples regiones simultáneamente en un "gran ajuste" que empareja parámetros que son comunes o están relacionados entre las diferentes regiones. Como se señaló anteriormente, se espera que la relación K_1/k_2 y k_4 tenga poca o ninguna variación fisiológica entre regiones y se considerará para el ajuste acoplado. Este enfoque se puede caracterizar con respecto a la validez del supuesto de uniformidad espacial y el compromiso entre exactitud y precisión de los parámetros de resultado.

Función de entrada de plasma:

[0047] Todos los métodos para la estimación del flujo sanguíneo y PA pueden beneficiarse de la medición de la función de entrada. La elección del modelo porcino de isquemia miocárdica es ventajosa para la obtención de imágenes por PET, ya que el historial de concentraciones del miocardio, el ventrículo izquierdo y el ventrículo derecho se puede obtener de forma simultánea y no invasiva. Las curvas de concentración para el ventrículo izquierdo y derecho mediante análisis factorial generalizado (GFADS) de los datos de PET dinámico también se pueden obtener como se describe: El Fakhri G, Kardan A, Sitek A, et al. Reproducibility and accuracy of quantitative myocardial blood flow assessment with (82)Rb PET: comparison with (13)N-ammonia PET. J Nucl Med. Julio de 2009; 50 (7): 1062-1071 y El Fakhri G, Sitek A, Guerin B, Kijewski MF, Di Carli MF, Moore SC. Quantitative dynamic cardiac 82Rb PET using generalized factor and compartment analyses. J Nucl Med. Agosto de 2005; 46 (8): 1264-1271.

[0048] En un aspecto, GFADS es valioso en la aplicación del sistema y métodos descritos en el presente documento, ya que la función de entrada GFADS es robusta al ruido y mínimamente afectada por desbordamiento. Se pueden extraer muestras de sangre suplementarias para validar las concentraciones arteriales de PET y para determinar la relación de actividad de ^{18}F -Flurpiridaz en plasma frente a sangre entera y para caracterizar los metabolitos marcados: las muestras se pueden pesar, contar y luego centrifugar para medir las concentraciones de actividad en sangre total y plasma. También se pueden realizar mediciones de hematocrito y gases en sangre estándar. La fracción libre de Flurpiridaz se puede determinar para cada cerdo mediante ultrafiltración. El análisis de metabolitos plasmáticos se puede realizar mediante HPLC. Si la fracción libre de plasma es constante en los cerdos, la PA se puede calcular como PA_A ; Alternativamente, PA se puede calcular como BP_f .

Preparación quirúrgica de los animales para inducir isquemia crónica en el miocardio porcino:

[0049] Protocolos animales pueden ser útiles para la aplicación del sistema y los métodos descritos en el presente documento. En un aspecto, los cerdos domésticos de cualquier sexo se pueden utilizar en la implementación del modelo. La intubación endotraqueal y la ventilación mecánica se pueden realizar bajo anestesia general. Antes de la intubación y la cirugía, los cerdos pueden ser premedicados con la administración intravenosa de tiamilal. En un aspecto, la anestesia se puede mantener con halotano (0,5-1,5%) y una mezcla de óxido nítrico (60%) y oxígeno (40%). La hemodinámica central (p. ej., pH arterial, pCO_2 , pO_2) y el ECG se puede controlar y mantener dentro del rango fisiológico. En cada cerdo, es posible inducir tanto una estenosis parcial (que provoca el miocardio en hibernación) como una completa (que provoca un miocardio infartado). Para el miocardio en hibernación, las imágenes pueden tomarse después de dos a cuatro semanas para dar tiempo al desarrollo. Sin embargo, pueden ser necesarios retrasos más largos para lograr el estado de hibernación, en cuyo caso, el protocolo animal se puede ajustar en consecuencia.

[0050] Para inducir al miocardio hibernado, una estenosis parcialmente oclusiva puede ser creada por la ligadura incompleta de la arteria coronaria izquierda descendente anterior (LAD). La toracotomía se puede realizar a nivel del

cuarto espacio intercostal izquierdo mediante una escisión de 10-15 cm. El tercio proximal de la arteria LAD puede suturarse parcialmente para inducir isquemia crónica de bajo nivel en el territorio LAD. Se puede colocar una cánula de calibre 25 en la arteria LAD distal a la oclusión para controlar la presión arterial. El flujo sanguíneo miocárdico se puede reducir al 40% en el territorio de la LAD.

[0051] Para inducir al miocardio infartado, una estenosis completa puede ser creada por la ligadura completa en la arteria coronaria distal circunfleja izquierda (LCX). Se pueden utilizar procedimientos similares a los anteriores. El ECG y la hemodinámica se pueden controlar cuidadosamente después de la oclusión para garantizar la supervivencia del animal.

[0052] Después de la cirugía, la herida puede ser cerrada y suturada. El animal puede recibir un parche de fentanilo para el manejo del dolor que se aplica el día de la cirugía y se continúa durante 72 horas. En un aspecto, después del período postoperatorio inmediato, se observa al animal diariamente. En otro aspecto, el animal es un observador al menos dos veces al día y la observación adicional puede ser valiosa. Después de un período de tiempo, por ejemplo, de dos a cuatro semanas después de la oclusión, se pueden tomar imágenes de los cerdos con ^{18}F -Flurpiridaz para confirmar la isquemia. Si la exploración revela un área disfuncional dentro del territorio de la LAD, se establece el miocardio en hibernación y se puede determinar que se debe proceder con la PET con ^{18}F -Flurpiridaz real. De lo contrario, el procedimiento se puede retrasar por un período de tiempo adicional (por ejemplo, una semana) y se puede repetir una tomografía por emisión de positrones para evaluar el miocardio hasta que se pueda confirmar el estado de hibernación. Una vez que se establece el estado de hibernación, se pueden tomar imágenes de los cerdos el segundo día o dentro de los siete días para permitir la descomposición del ^{18}F -Flurpiridaz.

Protocolo de formación de imágenes para estudios en animales ^{18}F -Flurpiridaz PET:

[0053] Todos los estudios PET se pueden realizar usando cualquier método de análisis adecuado. Por ejemplo, un método de análisis incluye la tomografía por emisión de positrones y la tomografía computarizada (PET-CT). Antes del estudio PET, se puede realizar una toracotomía en el quinto espacio intercostal izquierdo para insertar un catéter en la aurícula izquierda para la inyección de las microesferas durante los estudios PET. El animal puede someterse a un estudio PET dinámico durante 120 minutos con una dosis inyectada de 10 mCi de ^{18}F -Flurpiridaz. Sin embargo, los plazos para el estudio y la dosis de ^{18}F -Flurpiridaz pueden variar según el resultado deseado del estudio. Las microesferas radiactivas se pueden inyectar a través de un catéter en la aurícula izquierda, para proporcionar una medición de flujo de referencia. Durante el estudio PET, se pueden tomar muestras de sangre arterial para medir la función de entrada de referencia (consulte el Ejemplo 1: función de entrada de plasma). Al final del estudio de PET, se puede sacrificar el cerdo. Los corazones extirpados se pueden infundir primero con azul monastral a través de la RCA para teñir el miocardio intacto y luego recortar las aurículas y el ventrículo derecho. El corazón extirpado se puede reorientar en el eje largo vertical principal - referencial del eje largo horizontal para realizar el corte del miocardio en el eje corto en cortes de igual grosor (p. ej., 8 cortes). Cada rebanada se puede subdividir en secciones lo suficientemente grandes como para proporcionar una buena precisión para ensayos in vitro y de microesferas, por ejemplo, alrededor de 25 secciones. Cada sección puede teñirse con cloruro de trifenil tetrazolio y caracterizarse por su estado isquémico. Las muestras de tejido se pueden contar en un contador de pocillos para medir el flujo de microesferas. Después de eso, las muestras de tejido se pueden usar en el ensayo de actividad MC-I. El análisis de ROI se puede utilizar para extraer historiales de concentración para el análisis de compartimentos. Las ROI se pueden dibujar para que coincidan estrechamente con las secciones de corte post mortem utilizadas en el análisis in vitro. En un aspecto, los parámetros K_1 , k_2 , k_3 , k_4 y PA pueden medirse mediante el ajuste de mínimos cuadrados de PET. Sin embargo, se pueden utilizar otras técnicas de medición adecuadas.

[0054] El software de visualización de imágenes automatizado se ha desarrollado para este trabajo, y se puede utilizar para orientar el miocardio a la visualización de eje corto y largo estándar, así como para la generación de mapas polares por métodos de segmentación automatizados. Se han establecido métodos para tal automatización. Estos métodos pueden ser importantes en el análisis de datos y validación de los parámetros medidos de manera que las variaciones entre observadores pueden ser eliminados.

En la validación vitro de MC-I con ensayos bioquímicos:

[0055] Las muestras de tejido, cada uno de miocardio normal, en hibernación e infartado (200 mg/muestra), se pueden aislar por análisis de transferencia Western MC-I, para calcular el error medio y estándar de la muestra de la media. En un aspecto, se pueden aislar 20 muestras de tejido para obtener resultados estadísticamente significativos. También se puede realizar un análisis patológico de la porción central de cada muestra (por ejemplo, 2x2 mm/muestra). En resumen, para el análisis de patología, la porción central de cada muestra puede conservarse, por ejemplo, en paraformaldehído al 4% durante la noche, seccionarse y analizarse para confirmar las características del tejido normal, en hibernación e infartado.

[0056] En algunos aspectos, el análisis de transferencia Western puede ser una herramienta útil para evaluar concentraciones de proteína tanto cuantitativa como cualitativamente. Por ejemplo, las muestras de tejido (por ejemplo, 200 mg) pueden congelarse rápidamente en nitrógeno líquido, luego homogeneizarse en varios (por ejemplo, 9) volúmenes de tampón a 4°C para crear lisados de tejido. La proteína total puede extraerse y cuantificarse a 15 µg

de proteína por muestra y tratarse con tabletas de cóctel inhibidor de proteasa. El nivel de expresión del complejo multimérico MC-I intacto por 15 µg de proteína total puede analizarse mediante SDS-PAGE 1-D (Novex) al 4-12%, transferirse a una membrana de PDVF, bloquearse de forma no específica, probarse con anticuerpo monoclonal MC-I anti-bovino de ratón primario contra la subunidad de 8 kDa específica para MC-I (Mitosciences, MS109, dilución 1:500 en TBS, Tween 20 al 0,1%, BSA al 5%) durante 2 horas a 25°C. Sin embargo, cualquier otra sonda adecuada que se una a MC-I puede sustituirse o usarse además de la sonda mencionada anteriormente. En un aspecto, la actina y la porina puede servir como estándares de limpieza mitocondriales, y 4 µg de las mitocondrias de la especie bovina aislada (Mitosciences, MS802) puede servir como control positivo. La membrana puede lavarse varias veces, incubarse con anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences) durante 2 horas a 25°C, lavarse y revelarse usando el kit de detección de transferencia Western ECL (Amersham Biosciences). Algunos anticuerpos primarios anti-MC-I son reactivos contra MC-I de bovino, humano, ratón y rata, y también son específicos contra MC-I de cerdo.

[0057] El enfoque descrito, que no forma parte de la invención reivindicada, ni las realizaciones reivindicadas, puede permitir la cuantificación y la comparación de niveles de expresión de proteínas MC-I (es decir, el número de sitios de unión de trazador BMS) en condiciones de miocardio normal, en hibernación e infartado. Con base en un trabajo informado anteriormente, se prevé una reducción del complejo MC-I del 70% en el miocardio infartado y del 20-40% en el miocardio hibernado.

[0058] Los métodos descritos pueden tener dos limitaciones posibles. En primer lugar, la sangre periférica contaminante no se puede eliminar por completo debido a la oclusión de vasos pequeños de microesferas; puede ser importante tener en cuenta las diferencias en el flujo sanguíneo del miocardio, que se pueden medir para cada muestra de tejido utilizada. Sin embargo, esta no es una limitación importante dependiendo de la cantidad de microesferas utilizadas y puede ser una limitación menor para una cantidad mínima de microesferas.

[0059] En segundo lugar, si la cuantificación diferencial por transferencia Western de los complejos MC-I en cada tipo de tejido miocárdico no tiene éxito, se puede identificar la expresión proteica relativa de las 44 subunidades de la cadena respiratoria y 3 factores de ensamblaje específicos de MC-I en cada muestra de tejido miocárdico usando espectrometría de masas de proteínas, por ejemplo, usando una biblioteca MC-I.

[0060] *Cuantitativamente comparar la diferencia de expresión FSM y MC-I en tres estados de miocardio (normal, isquémico, infartado) y evaluar el rendimiento del enfoque propuesto para una tarea clínicamente relevante:*

[0061] La curva de tiempo-actividad de cada segmento se puede ajustar al modelo de dos compartimentos descrito en este documento, en donde la función de entrada se extrae del análisis factorial generalizado de secuencias dinámicas (GFADS) y se corrige para la concentración plasmática. Los parámetros K_1 y PA se pueden calcular para cada segmento del miocardio. A partir de los datos de PET, puede haber alrededor de 25 valores de K_1 y PA para cada uno de los sujetos en cuestión (por ejemplo, alrededor de 200 valores para 8 cerdos). A partir del análisis in vitro de la actividad de microesferas y MC-I, puede haber aproximadamente 25 valores correspondientes de FSM y aproximadamente 25 valores de nivel de expresión de MC-I por sujeto/cerdo. Se pueden realizar varios análisis con un nivel creciente de complejidad e importancia clínica.

[0062] Un análisis posible, que no forma parte de la invención reivindicada, ni parte de las realizaciones reivindicadas de la invención, es el método dentro. Aquí, la condición del segmento puede clasificarse como normal, isquémica o infractada según la inspección visual del miocardio teñido con tetrazolio. Los ensayos de flujo sanguíneo y MC-I in vitro se pueden comparar por separado. El análisis estadístico puede seguir un diseño de bloque, con el sujeto (cerdo) representando el bloque y condicionando la variable categórica. Se prevé que los valores normales, isquémicos e infractores pueden ser significativamente diferentes. Se puede realizar un análisis similar para el flujo sanguíneo PET y PA.

[0063] Un segundo análisis posible es un análisis combinado. En este análisis, los puntos finales in vitro se pueden representar frente a los puntos finales de la PET. Por ejemplo, considerando las estimaciones de transferencia Western del nivel de expresión de MC-I y PET PA como variables correspondientes, cada segmento de cada sujeto (cerdo) contribuye con una medición del nivel de expresión de MC-I. La trama puede, en un ejemplo, contener aproximadamente 200 puntos. Al agrupar los datos, la clasificación en condiciones deja de ser importante. No obstante, los datos pueden identificarse por sujeto (cerdo), lo que permite tener en cuenta las diferencias atribuibles a la muestra individual (cerdo). Dado que tanto las estimaciones de PET como las in vitro tienen ruido, puede que no sea posible utilizar técnicas de regresión simples; en su lugar, se puede utilizar un enfoque de mínimos cuadrados totales. A pesar de estas advertencias, la trama puede revelar una correlación. En un resultado posible, la PET con ^{18}F -Flurpiridaz dinámica MC-I y FSM calculadas para todos los segmentos miocárdicos se correlacionan fuerte y positivamente ($r > 0,8$) con las medidas obtenidas mediante un ensayo in vitro y microesferas mediante análisis de correlación. Para $N = 200$, puede ser deseable lograr una potencia estadística del 89% para $\alpha = 0,05$.

[0064] Un tercer método de análisis posible implica el análisis discriminante. Se puede realizar un análisis discriminante para determinar, en ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada ni de las realizaciones reivindicadas, el poder discriminante que se puede lograr al discriminar entre miocardio normal, en hibernación e

infringido utilizando variables MC-I o FSM como así como un vector de dos variables, a saber, el potencial de unión de MC-I y el FSM medido por PET, como El Fakhri G, Kijewski MF, Albert MS, Johnson KA, Moore SC. La SPECT cuantitativa conduce a un mejor desempeño en tareas de discriminación relacionadas con la enfermedad de Alzheimer prodrómica. J Nucl Med. Diciembre de 2004; 45 (12): 2026-2031. Se puede hacer una comparación para el poder discriminante logrado con PET y el poder discriminante de referencia que puede lograrse usando el ensayo de MC-I in vivo y las mediciones de microesferas.

EJEMPLO 3

Estudio preliminar en un modelo de primate con ^{18}F -Flurpiridaz

[0065] Basándose en los datos preliminares de un estudio primate usando ^{18}F -Flurpiridaz, la precisión de parámetro para estimar el FSM y PA_A se evaluó. Según el protocolo IACUC aprobado, se llevó a cabo un estudio dinámico de 100 minutos con ^{18}F -Flurpiridaz (1,25 mCi) en un mono cynomolgus de 4,1 kg, utilizando un microPET P4.

[0066] El sistema de 4 anillos de primates microPET (P4) es un tomógrafo PET animal con una extensión axial 7,8 cm, un campo transaxial 19 cm de diámetro de visión (FOV) y un puerto de animales 22 cm. El sistema está compuesto por 168 módulos detectores, cada uno con una matriz de 8 x 8 de cristales de oxiortosilicato de lutecio de 2,2 x 2,2 x 10 mm³, dispuestos como 32 anillos de cristal de 26 cm de diámetro. Los cristales detectores se acoplan a un Hamamatsu R5900-C8 PS-PMT a través de un haz de fibra óptica de 10 cm de largo. Los detectores tienen una resolución temporal de 3,2 ns, una resolución energética media del 26% y una resolución espacial intrínseca media de 1,75 mm. El sistema opera en modo 3D sin septos entre planos, adquiriendo datos en modo lista. La resolución espacial de la imagen reconstruida varía entre 1,8 mm en el centro y 3 mm con un desplazamiento radial de 4 cm. El tomógrafo tiene una sensibilidad máxima del sistema del 2,25% en el centro del campo de visión con una ventana de energía de 250-750 keV. La tasa de recuento de ruido equivalente alcanza un máximo de 100-290 kcps para tamaños de objetos representativos.

[0067] La Fig. 2A muestra las imágenes sumadas del miocardio en los ejes corto y largo. Las funciones de entrada del ventrículo izquierdo (VL) y del ventrículo derecho (VD) se extrajeron con GFADS. La Fig. 2B muestra la función de entrada del VL extraída con GFADS en comparación con las muestras de sangre y la función de entrada basada en ROI. La función de entrada de GFADS se alinea bien con los datos de GFADS y tiene menos efecto de volumen parcial y menos contaminación por derrame.

[0068] La curva de tiempo-actividad de una región de interés dibujada sobre el miocardio se ajustó al modelo de 2 compartimentos. El parámetro DT se calcula a partir de la matriz de covarianza asintótica derivada del ajuste de mínimos cuadrados no lineales. Los parámetros estimados son: $K_1 = 0,51$ (DT = 1,5%), $k_2 = 0,075$ (DT = 4,7%), $k_3 = 0,026$ (DT = 10,2%), $k_4 = 0,016$ (DT = 10,4%), $k_3/k_4 = 1,65$ (DE = 4,0%). La Fig. 3A muestra la curva de tiempo-actividad ajustada. Para evaluar la precisión de K_1 y PA_A , se utilizaron diferentes duraciones de estudio que van desde un minuto a 100 minutos para estimar K_1 y PA como se representa para K_1 en la Fig. 3B y para PA_A en la Fig. 3C. Se encontró que, con 10 minutos de datos, la estimación de K_1 es capaz de lograr una alta precisión (DE <10%). Por otro lado, PA puede requerir un período de medición más largo.

[0069] La selección de modelo también ha sido probada por evaluar cuantitativamente la calidad del ajuste con diferentes configuraciones de modelo. El modelo reversible de 2 compartimentos tiene varios parámetros (seis, incluidas las fracciones de derrame de VL y VD) para estimar, pero puede reducir el residuo en comparación con el modelo irreversible de 2 compartimentos (cinco parámetros para estimar con k_4 ignorado) y el modelo de 1 compartimento (sin vinculación, cuatro parámetros para estimar). El criterio de información de Akaike (AIC) y la prueba F se pueden utilizar para determinar objetiva y cuantitativamente si se prefiere un modelo más complejo y reducir significativamente el residuo. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1: Comparación de la bondad de ajuste utilizando 3 configuraciones de modelo.

	RMSE	Relación F	Relación AIC
Modelo reversible de 2 compartimentos	1,12		
Modelo irreversible de 2 compartimentos	1,78	28,29*	0,83
Modelo de 1 compartimento	5,41	22,96**	0,58

[0070] En la Tabla 1, RMSE se calcula a través de mínimos cuadrados ponderados con pesos aproximados por varianza de datos. La relación F se calcula a partir de la prueba F entre el modelo reversible de 2 componentes y los otros dos modelos. Los valores críticos son 4,06 (*) y 3,2 (**) respectivamente ($\alpha=0,05$). Cuando la relación F es mayor que el valor crítico, se prefiere el modelo más complejo y reduce significativamente el residual. Las relaciones del criterio de información de Akaike (AIC) se calculan a partir de la relación entre el AIC del modelo reversible de 2 componentes y los AIC de los otros dos modelos. Una relación AIC inferior a uno indica que el modelo más complejo es el modelo preferido.

[0071] Se encontró que el modelo reversible de 2 compartimentos tiene el error cuadrático medio (RMSE) más bajo, reduce significativamente el residual en la prueba F y AIC. Los tres criterios confirman que, al ajustar los datos del estudio de primates, es preferible el modelo de 2 compartimentos con mecanismos de unión, lo que indica que la unión es un componente que puede ser importante tener en cuenta cuando la duración del estudio es relativamente larga.

EJEMPLO 4

Análisis preliminar para FSM en estudios clínicos con ^{18}F -Flurpiridaz:

[0072] FSM se calculó con análisis de modelación cinética en un grupo de sujetos en la fase II de ensayos clínicos de ^{18}F -Flurpiridaz. Los estudios de PET en reposo y estrés se realizaron por separado en 10 sujetos sanos y 6 pacientes con CAD (Figs. 4A-4B). En el ensayo clínico, las imágenes se interrumpieron después de 30 minutos y la determinación de la PA no fue factible. Se estimó la FSM para cada sujeto sobre una región miocárdica viable y, si corresponde, una región isquémica que mostraba un desajuste entre el resto y los estudios de estrés. La FSM estimada para el miocardio en reposo-estrés y el miocardio sano/isquémico se resume en la **Tabla 2**.

TABLA 2: FSM (mL/g/min) estimado en estudios clínicos de ^{18}F -Flurpiridaz.

	Sujetos sanos	Miocardio normal en pacientes	Miocardio isquémico
Reposo	$0,67 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,04$	$0,86 \pm 0,06$
Estrés	$2,84 \pm 0,06$	$1,78 \pm 0,07$	$0,73 \pm 0,07$

[0073] Durante el estudio de reposo, no hubo diferencia significativa en la FSM (prueba t, $\alpha = 0,05$) entre el miocardio sano y el isquémico. Sin embargo, durante el estrés farmacológico, la FSM aumentó más de tres veces en el miocardio sano y permaneció aproximadamente igual en las regiones isquémicas. El FSM medido con modelado cinético para ^{18}F -Flurpiridaz es consistente con el FSM informado anteriormente. Debido a la corta duración de la adquisición de estos estudios, no se logró una precisión satisfactoria de la PA estimada. El análisis cinético del ^{18}F -Flurpiridaz muestra su alto potencial en la cuantificación absoluta de FSM en la PET clínica cardíaca.

EJEMPLO 5

Estudios de simulación preliminares para la medición de PA:

[0074] Un estudio de simulación se realizó para evaluar la precisión de parámetros en diferentes estados de miocardio. Se utilizaron simulaciones de Monte Carlo para generar datos PET dinámicos realistas utilizando curvas de tiempo-actividad simuladas con $\text{PA}_A = 11,3$ para miocardio normal, 8,2 para hibernación (reducción del 30%) y 3,5 para infarto (reducción del 70%). Se repitieron 50 realizaciones de ruido añadiendo las desviaciones de Poisson a los datos del sinograma sin ruido simulado seguido de la reconstrucción. El uso de datos con 60 minutos y 100 minutos produjo un sesgo similar (Fig. 5). La PA_A está subestimada en la región normal (alrededor del -5%) y sobreestimada en la región infartada (alrededor del 10%). Esta diferencia se puede atribuir al menor k_3 en el miocardio infartado; por lo tanto, la estimación precisa de PA_A puede requerir una mayor duración del estudio. En términos de precisión, el ajuste de 60 minutos tiene una DT del 17,1%, 20,4% y 15,9% en miocardio normal, hibernado e infartado, mientras que la DT de 100 minutos es de 3,0%, 4,7% y 7,9% respectivamente. Estos datos preliminares muestran que la PA_A estimada a partir de los tres estados isquémicos sigue la misma tendencia de precisión.

[0075] En un aspecto de los conceptos descritos, el producto será una técnica – sobre la base de formación de imágenes PET con agentes tales como [^{18}F] -Flurpiridaz - para el mapeo de la distribución regional de las mitocondrias. Como se detalla en la solicitud, las búsquedas bibliográficas han revelado una serie de enfermedades en las que está implicada la disfunción de las mitocondrias y para las que esta técnica de imagen sería aplicable para la investigación o la atención clínica.

[0076] En un aspecto de la divulgación, se proporcionan los métodos para cuantificar el nivel de expresión de MC-I a partir de un solo estudio ^{18}F -Flurpiridaz PET. En un aspecto, la sensibilidad del potencial de unión de MC-I calculado puede examinarse en función de la duración del estudio. Basado en el análisis de sensibilidad, se proporciona un protocolo experimental que es clínicamente factible y proporciona una cuantificación confiable de la expresión de MC-I.

[0077] En otro aspecto de la divulgación, un modelo porcino de isquemia miocárdica crónica con diferentes grados de gravedad se puede usar para alterar la expresión MC-I, así como FSM. El nivel de expresión de MC-I y FSM medidos con ^{18}F -Flurpiridaz PET, en un ejemplo que no forma parte de la invención reivindicada ni de las realizaciones reivindicadas, pueden compararse con ensayos in vitro y microesferas de referencia, respectivamente. En un aspecto, se induce isquemia crónica en el miocardio porcino con oclusión parcial y completa en los territorios coronarios LAD y LCX para alterar los niveles de expresión de MC-I. Los niveles de expresión de MC-I pueden cuantificarse mediante PET con ^{18}F -Flurpiridaz y análisis in vitro. En otro aspecto, no formando parte de la invención reivindicada ni realizaciones reivindicadas, el nivel de expresión de MC-I calculado y FSM de parámetros cinéticos de ^{18}F -

Flurpiridaz PET pueden compararse con métodos de laboratorio de referencia para ensayos in vitro para expresión de MC-I y microesferas (FSM).

[0078] En todavía otro aspecto, que no forma parte de la invención reivindicada, ni realizaciones reivindicadas, la diferencia de FSM y expresión MC-I se puede comparar en tres estados de miocardio (normal, isquémico, infartado) para evaluar el rendimiento del enfoque propuesto para la tarea clínica de discriminar entre los tres estados. La exactitud y precisión de la expresión de FSM y MC-I calculada con ^{18}F -Flurpiridaz PET dinámico se evalúa en comparación con microesferas y ensayos in vitro de referencia.

EJEMPLO 6

Estudio de ^{18}F -Flurpiridaz PET cardiaco en cerdo infartado:

[0079] Dos cerdos domésticos fueron estudiados usando procedimientos similares a los descritos en el presente documento. Cada animal se sometió a un infarto quirúrgico y la formación de imágenes PET dinámica con ^{18}F -Flurpiridaz, que se marcó radiactivamente con precursores sintetizados. Las imágenes de PET reconstruidas mostraron un infarto claro del miocardio, tal como la lesión apical-anterosseptal evidente en la FIG. 6A, que se corroboró en la disección (ver fotografía en la FIG. 6B). Las transferencias de Western revelaron una expresión disminuida de MC-I en muestras de tejido dañado en comparación con el miocardio sano (FIG. 6C). Se aplicó GFADS a la serie PET dinámica para extraer curvas del ventrículo izquierdo y derecho. Como se observó en el estudio preliminar en monos, la curva del VI extraída por GFADS concordaba bien con las muestras de sangre arterial. Las curvas de concentración de PET se extrajeron de los datos de PET dinámicos en regiones de interés que delimitan los 17 segmentos estándar del corazón.

[0080] Las curvas de tejido se analizaron usando el modelo de compartimentos de dos tejidos con la unión reversible como se describe anteriormente. De nuevo, similar al estudio de los monos, este modelo se ajusta muy bien a los datos del miocardio sano; además, los ajustes en los tejidos dañados también fueron muy buenos (FIG. 6D). El ajuste de los 17 segmentos de forma independiente produjo estimaciones de PA poco fiables, pero los valores de K_1 y el macroparámetro V_T fueron robustos (COV típico $<10\%$ en todas las regiones) y se redujeron notablemente en el tejido dañado en comparación con el tejido sano. En los tejidos dañados, las reducciones de V_T (alrededor del 75%) fueron mayores que las de K_1 (alrededor del 50%); lo que sugiere que la disminución de V_T no podría ser completamente explicada por perfusión menor: por lo tanto, está implicado la unión reducida de ^{18}F -Flurpiridaz en MC-I.

[0081] El uso del modelo de dos tejidos con k_4 acoplado entre regiones mejoró la precisión de las constantes de velocidad individuales así como los macroparámetros: K_1 , V_T y PA se estimaron de manera confiable en la mayoría de las regiones, aunque permanecieron valores de PA atípicos. El valor global de k_4 fue consistente con la distribución observada en los ajustes desacoplados. K_1 , V_T y PA fueron menores en los tejidos dañados que en los sanos; V_T se redujo de nuevo más que K_1 , en consonancia con la unión específica reducida ahora aparente debido a una estimación más precisa de PA. Los ajustes del modelo a los datos fueron muy buenos, con un efecto casi imperceptible sobre la adecuación del ajuste en la mayoría de las regiones en comparación con los ajustes desacoplados.

[0082] Un gran ajuste que acopla $V_{ND} = K_1/k_2$ a través de regiones produjo un efecto general similar a la utilización de un k_4 común pero con influencia algo mayor en la calidad del ajuste, sobre todo en los segmentos isquémicos e infartados (FIG. 6D). El V_{ND} global fue representativo de los valores obtenidos a partir de ajustes desacoplados. En particular, el ajuste de un V_{ND} común estabilizó las estimaciones de PA incluso más que el acoplamiento de k_4 ; Los valores de PA fueron robustos e indicaron reducciones de unión de hasta un 90% en los tejidos dañados. La combinación de los grandes ajustes para acoplar V_{ND} y k_4 produjo ajustes del modelo que fueron ligeramente peores que los de los ajustes desacoplados o los grandes ajustes en un parámetro, pero aún así fueron satisfactorios. La precisión de los parámetros estimados se mejoró aún más con respecto a los efectos beneficiosos observados al acoplar un único parámetro común y se mantuvieron las diferenciaciones entre los valores regionales de K_1 , V_T y PA en tejido sano, isquémico e infartado. La reducción de la varianza de los parámetros debido al uso de parámetros acoplados fue incluso mayor cuando se evaluaron duraciones de exploración más cortas (por ejemplo, 60 minutos de datos en comparación con 120). Esta observación presenta el acoplamiento de parámetros como una estrategia prometedora en el diseño de un protocolo experimental óptimo y práctico. Estos resultados demuestran (i) la capacidad de ejecutar el modelo porcino de isquemia, (ii) transferencia Western para la cuantificación de la expresión de MC-I, y (iii) que el modelo de compartimento de dos tejidos, en particular para grandes ajustes utilizando parámetros comunes en todas las regiones - proporciona información sobre la perfusión regional y la unión de MC-I en tejido sano y dañado a partir de un único estudio PET dinámico.

[0083] En resumen, una medición de PET de la densidad de receptores MC-I se puede considerar un ensayo in vivo de la densidad de MC-I. La densidad de MC-I se ve afectada por una serie de enfermedades, tanto crónicas como agudas. Como ensayo in vivo, se requieren varios componentes, incluido un procedimiento analítico, que involucra software, para estimar la densidad. Los componentes incluyen el uso de un radiofármaco apropiado; flurpiridaz es un ejemplo conveniente pero no ideal, debido a su lenta cinética. También hay un elemento de laboratorio en el que se escanea al paciente de una manera apropiada para el ensayo, no una sola imagen. Varios ejemplos de la divulgación abarcan todos estos componentes y pueden permitir la cuantificación no invasiva de la actividad mitocondrial.

[0084] Cada referencia identificada en la presente solicitud se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

[0085] La descripción anterior pretende ser ilustrativa, y no limita el alcance de la presente da a conocer conceptos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el ensayo in vivo y la obtención de imágenes de la expresión del complejo mitocondrial I (MC-I), comprendiendo el método:
5 obtener imágenes de un sujeto vivo a quien se le ha administrado un ligando de PET ¹⁸F-Flurpiridaz, que se une reversiblemente a MC-I en los tejidos del sujeto, con un sistema de imagen de tomografía por emisión de positrones (PET) y almacenando al menos una imagen de PET del sujeto en un medio legible por ordenador no transitorio;
10 ajuste de las curvas de tiempo-actividad regionales a un modelo de compartimento de dos tejidos utilizando un procesador de computadora adaptado para calcular los niveles de expresión de MC-I en función de un modelo cinético almacenado en medios legibles por computadora no transitorios, en el que el procesador está adaptado para proporcionar un mapeo cuantitativo de expresión de MC-I, estando basados los niveles de expresión de MC-I en dicha reacción de unión de imagen de PET entre el ligando de PET y MC-I.
15 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además procesar imágenes con un procesador de computadora que calcula un nivel de flujo sanguíneo (FS) dentro del sujeto analizando porciones de las imágenes del sujeto que expresan niveles de presencia del ligando PET.
20 3. El método de la reivindicación 2, en el que los niveles calculados de FS se calculan basándose en un modelo cinético almacenado dentro de un medio legible por ordenador.
 4. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende además identificar estados de al menos uno de un trastorno metabólico, trastorno neurológico, trastorno neuromuscular y trastorno psiquiátrico basado en la interacción identificada entre un ligando de PET y MC-I.
25 5. El método de la reivindicación 2, en el que el FS comprende el flujo sanguíneo del miocardio (FSM).

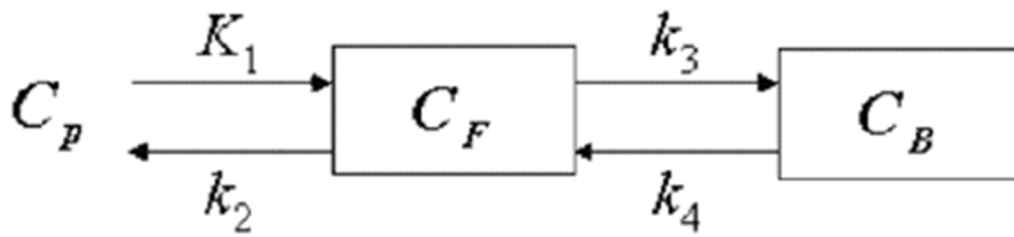


FIG. 1A

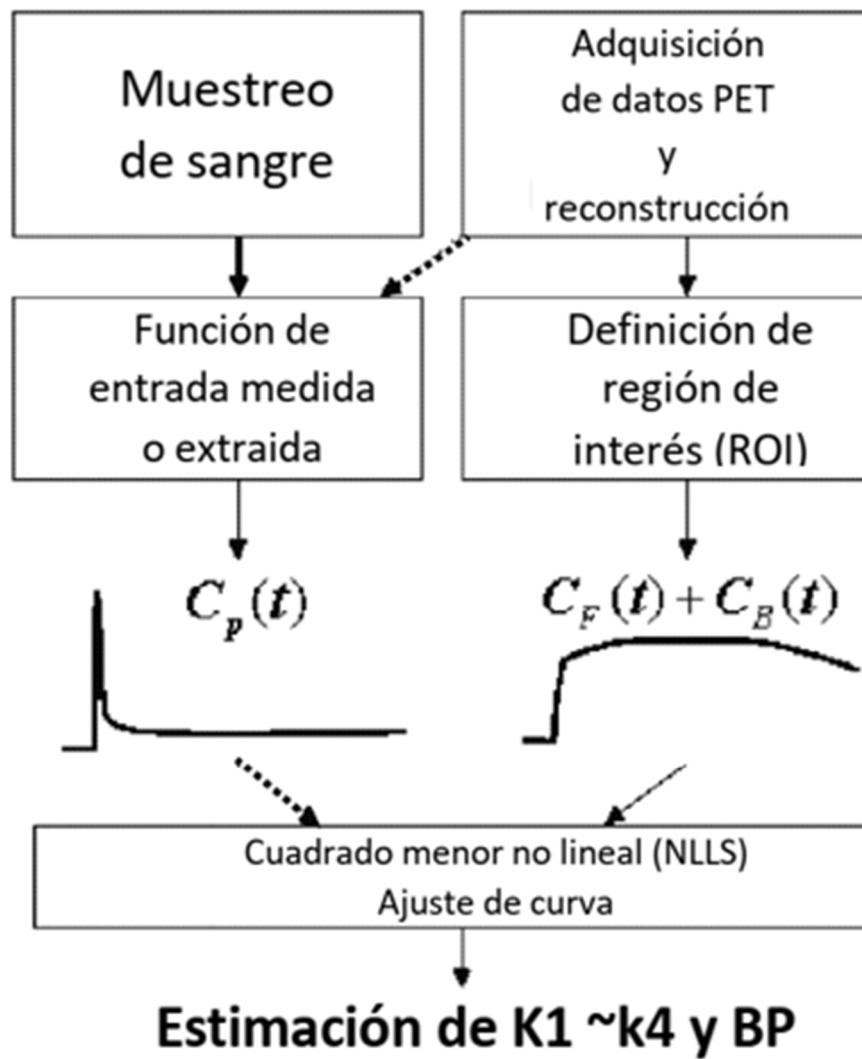


FIG. 1B

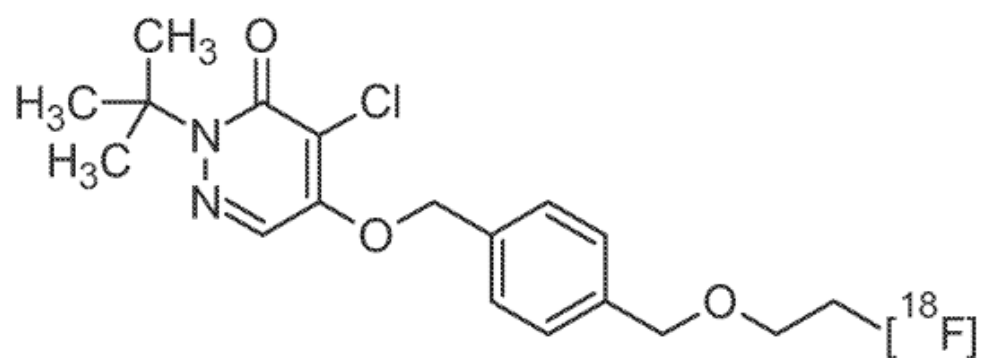


FIG. 1C

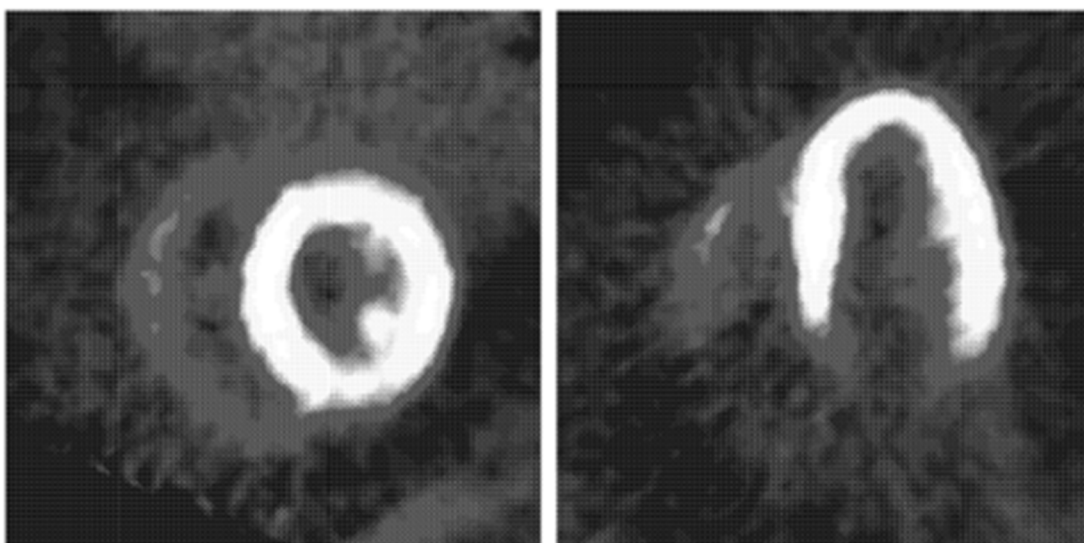


FIG. 2A

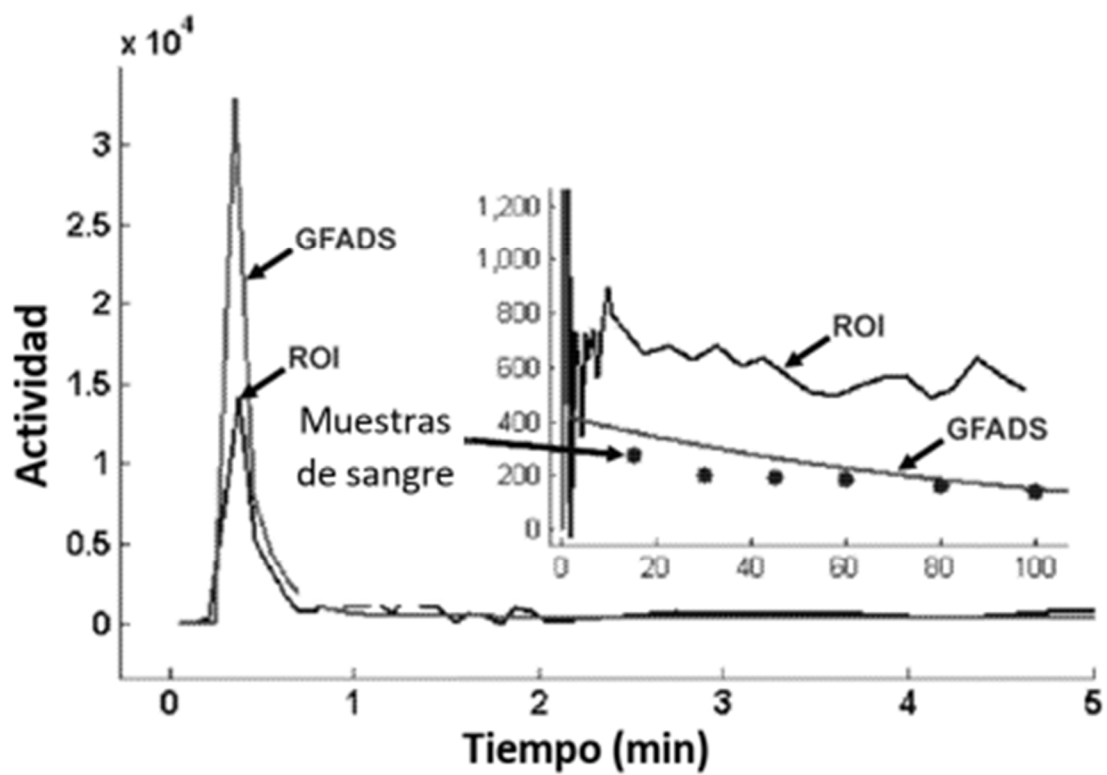


FIG. 2B

FIG. 3A

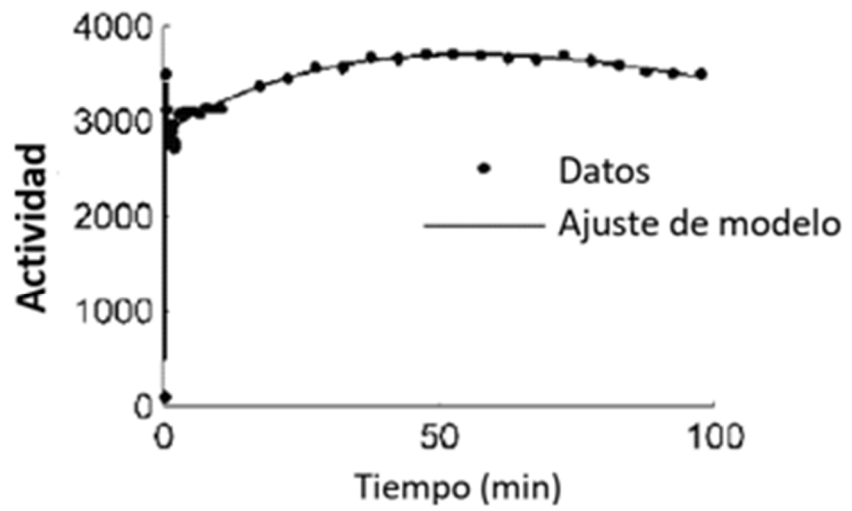


FIG. 3B

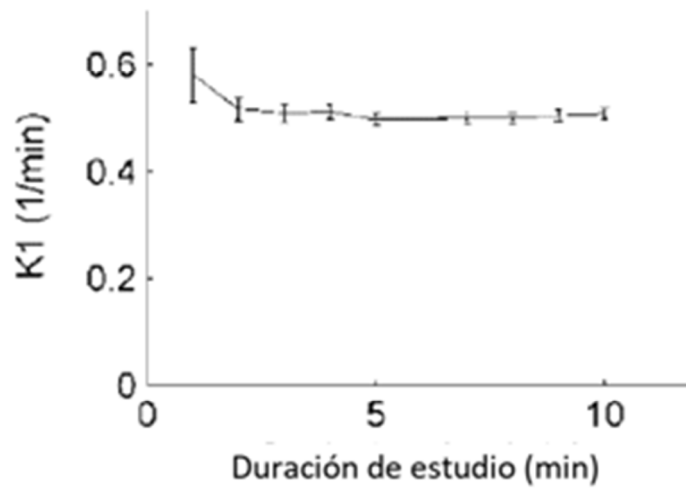
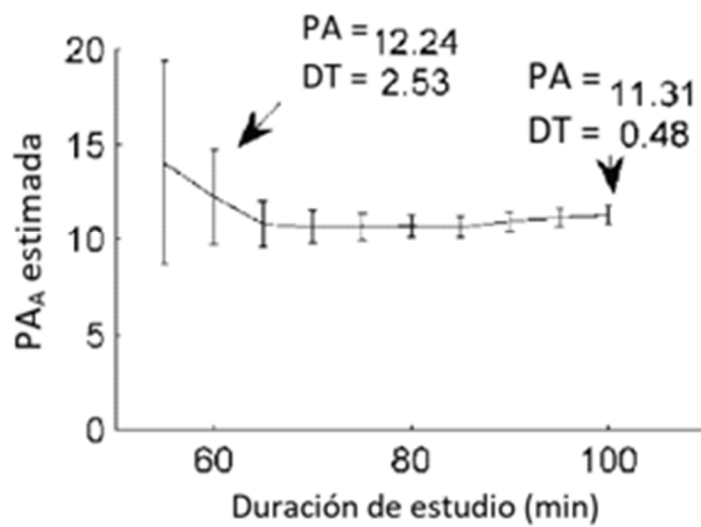


FIG. 3C



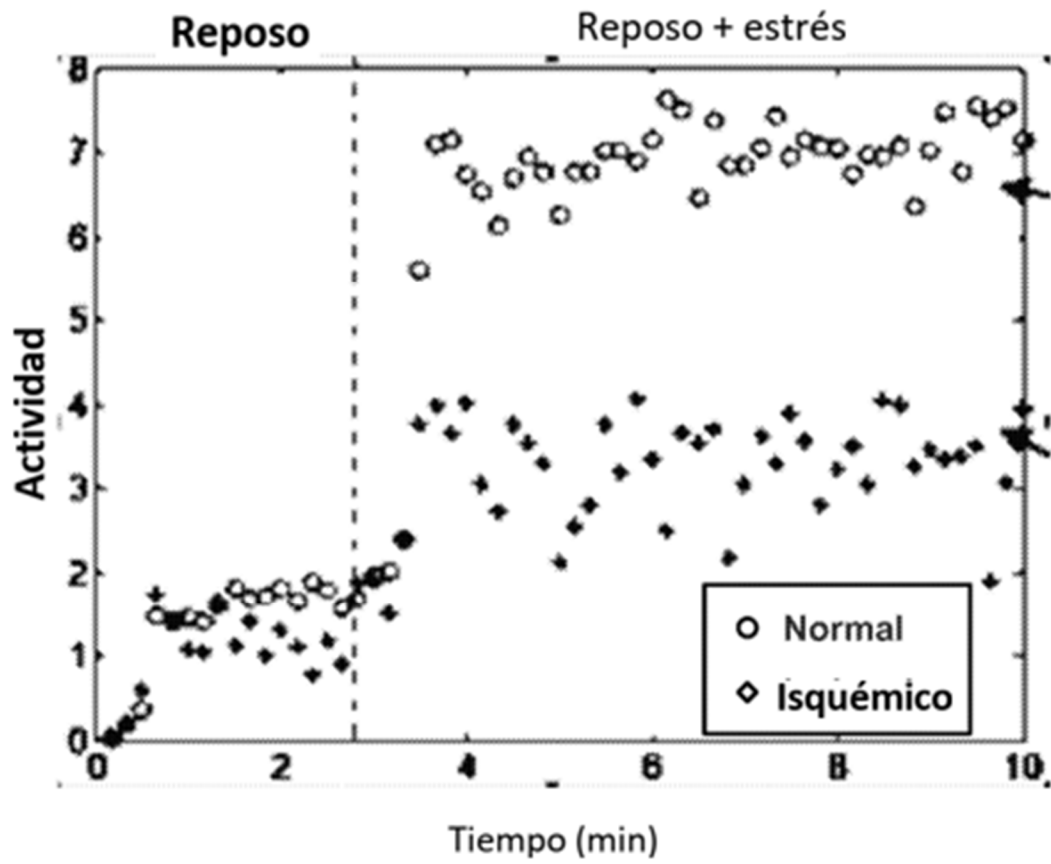


FIG. 4A

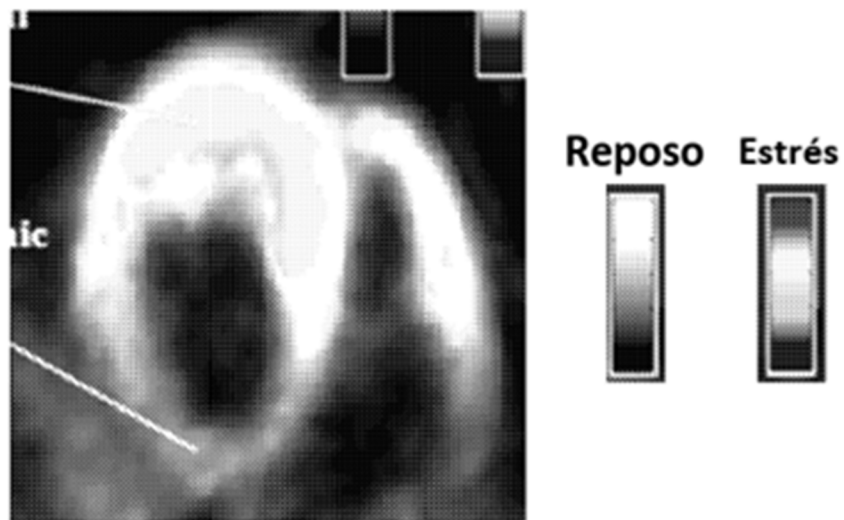


FIG. 4B

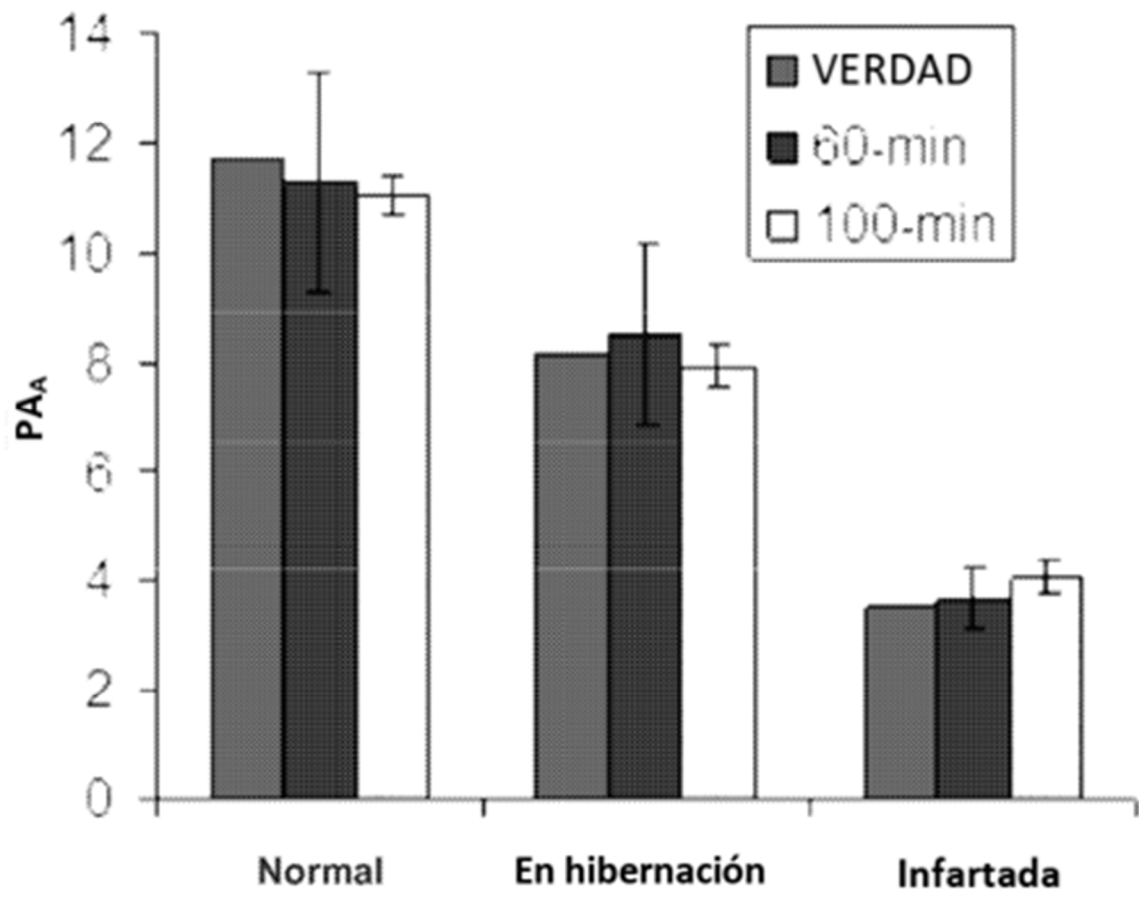


FIG. 5

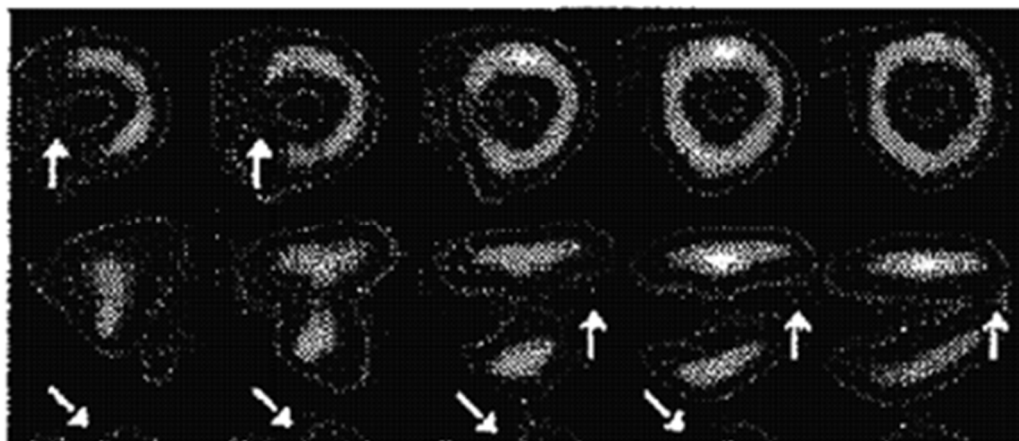


FIG. 6A

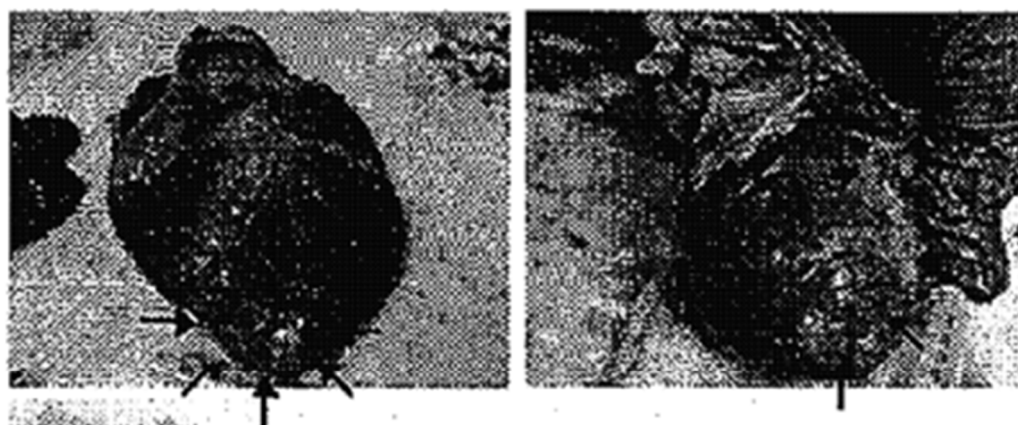


FIG. 6B

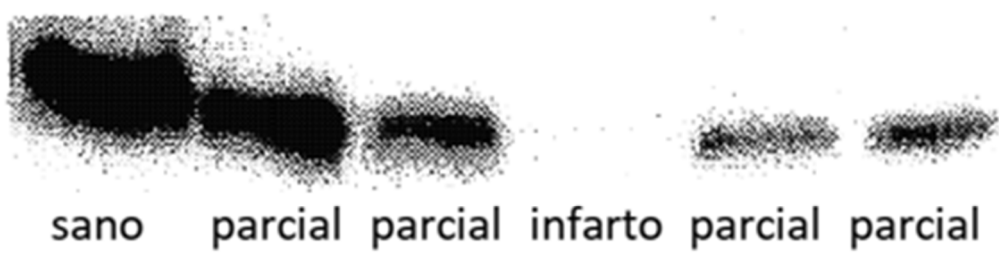


FIG. 6C

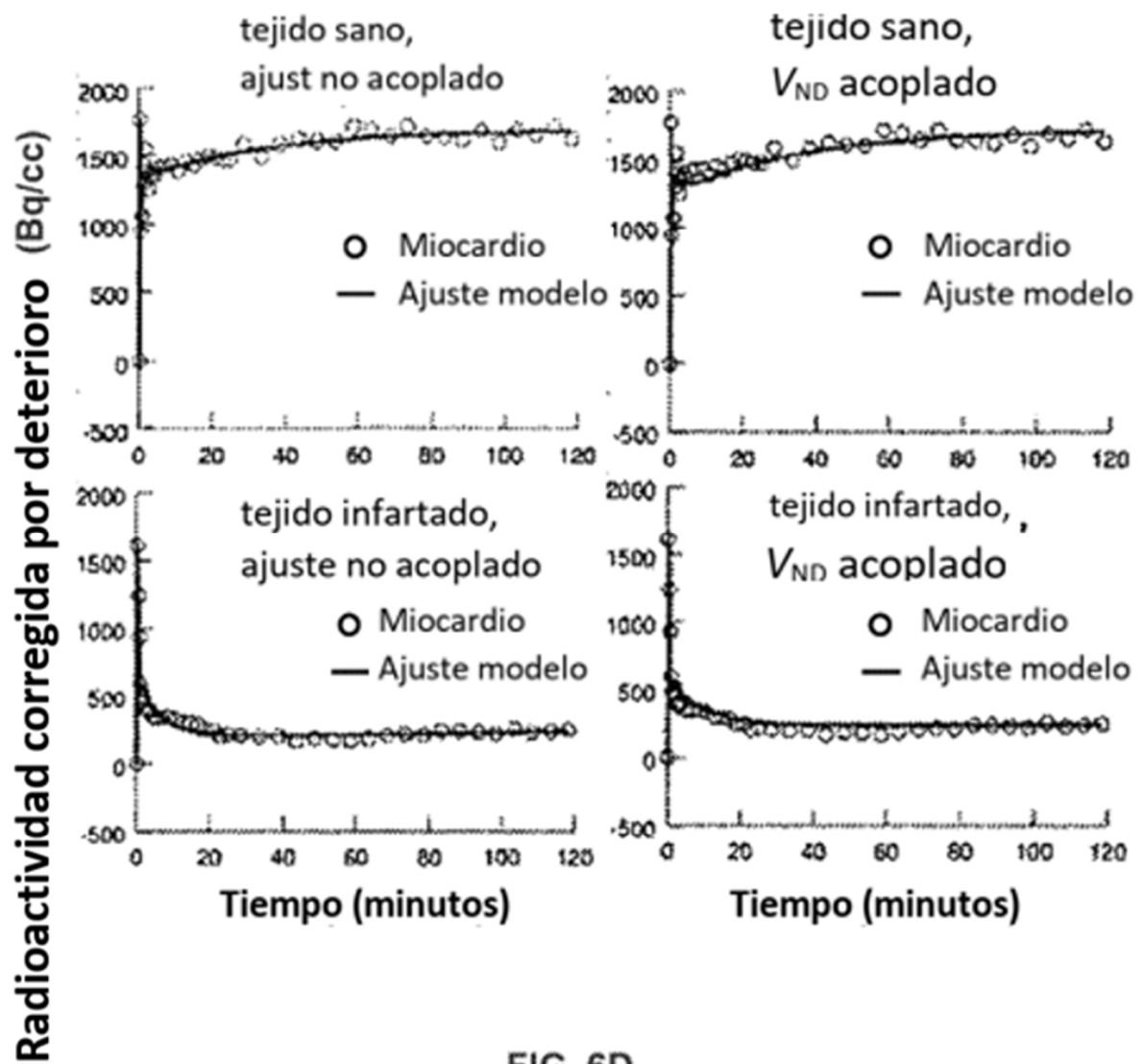


FIG. 6D

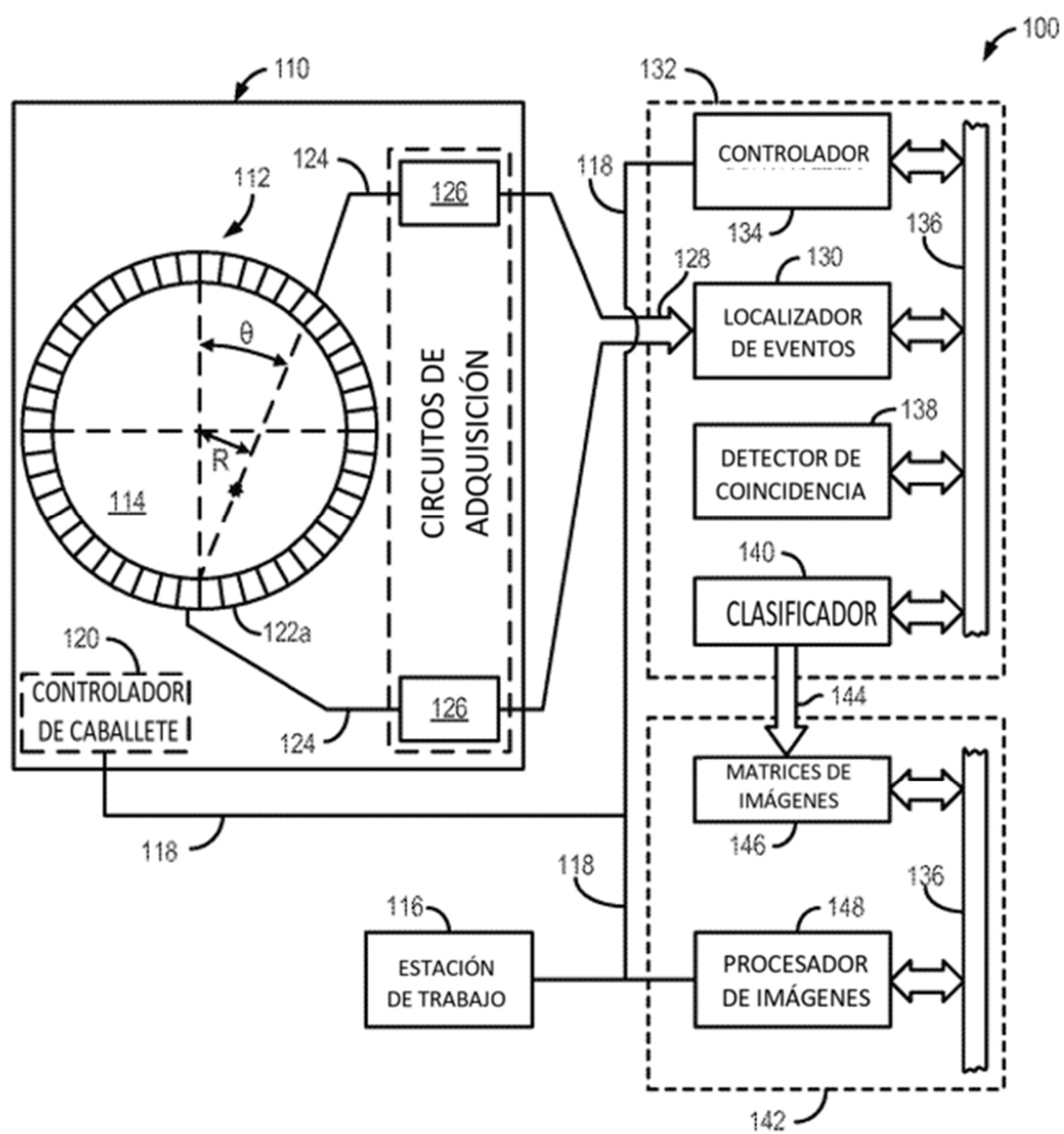


FIG. 7

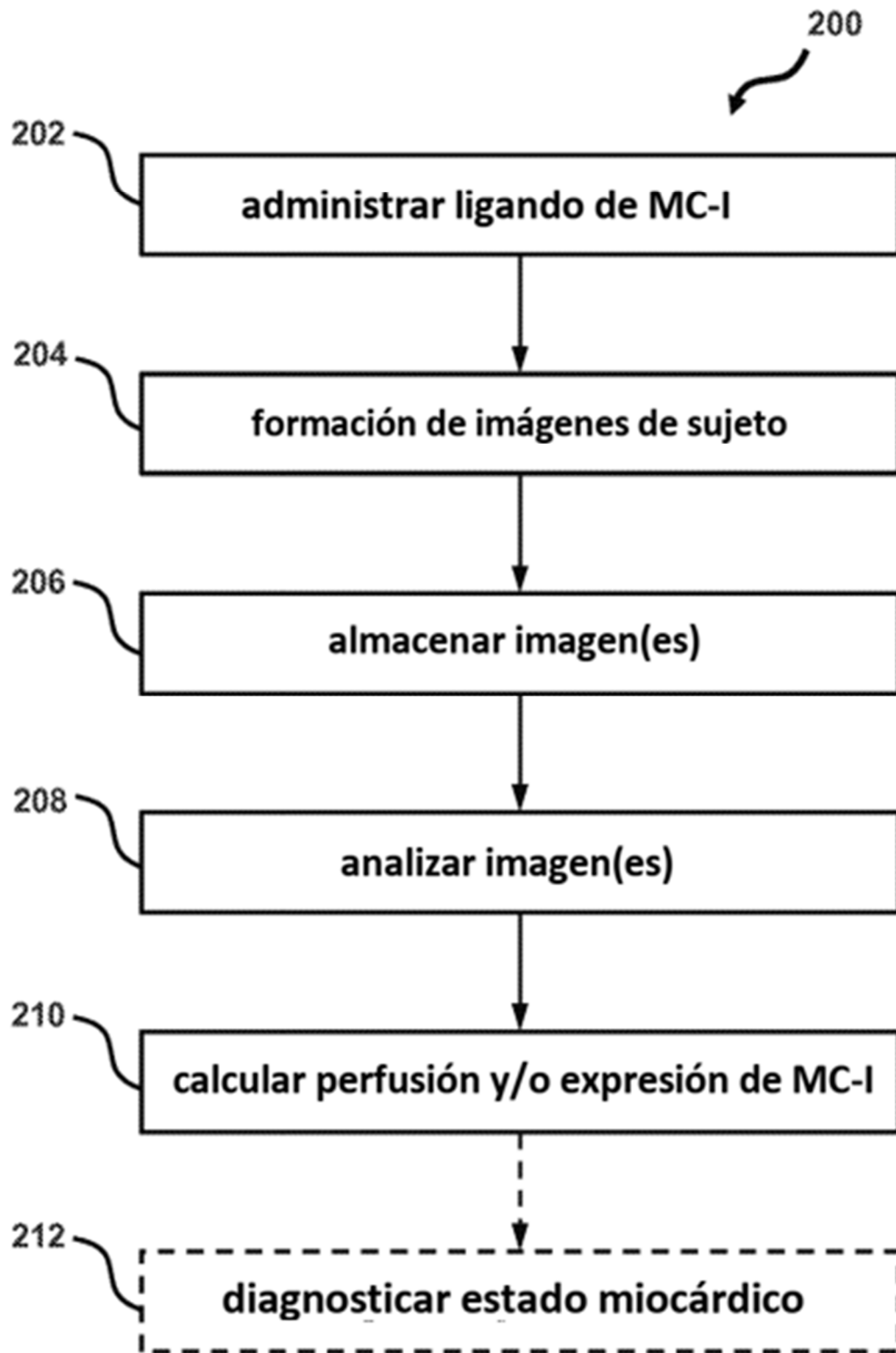


FIG. 8