

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A61K 49/06 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580046903.2

[43] 公开日 2008年1月9日

[11] 公开号 CN 101102799A

[22] 申请日 2005.11.18

[21] 申请号 200580046903.2

[30] 优先权

[32] 2004.11.19 [33] NO [31] 20045058

[86] 国际申请 PCT/NO2005/000434 2005.11.18

[87] 国际公布 WO2006/054903 英 2006.5.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.19

[71] 申请人 通用电气医疗集团股份有限公司

地址 挪威奥斯陆

[72] 发明人 M·勒彻 R·詹德特 K·戈尔曼

M·萨宁

J·-H·阿登克耶尔-拉森

S·彼得森

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 黄可峻

权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 2 页

[54] 发明名称

使用超极化<sup>13</sup>C-丙酮酸盐的心脏成像方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用超极化<sup>13</sup>C-丙酮酸盐作为MR成像剂的心脏成像方法,该方法能够确定心肌细胞的存活力。

1. 一种评价心肌组织存活力的 MR 成像方法, 其中超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐用作 MR 成像剂。

2. 权利要求 1 的方法, 所述方法包括

(a) 将含超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物预给予受试者, 从受试者获取  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐及其含  $^{13}\text{C}$  的代谢产物丙氨酸、乳酸盐和任选的碳酸氢盐的直接  $^{13}\text{C}$ -MR 图像,

(b) 任选将一种代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号与检测到的任何其它代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号相关联, 对比两个、优选三个、最优选四个  $^{13}\text{C}$  代谢产物间的信号强度差别。

3. 权利要求 2 的方法, 所述方法进一步包括

(c) 通过鉴别最低  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐信号和/或最高  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐信号, 从而在所述图像中鉴别出有风险的心肌组织。

4. 权利要求 1 或 3 的方法, 其中超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐通过用 DNP 方法将  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和/或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐超极化得到。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法, 其中含  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物还含有一种或多种选自以下的缓冲剂:  $(\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4)$ 、ACES、PIPES、咪唑/HCl、BES、MOPS、HEPES、TES、TRIS、HEPPS 和 TRICIN。

6. 权利要求 1-5 中任一项的方法, 其中用多回波编码频率信息的成像序列被用来摄取步骤 a) 中的直接  $^{13}\text{C}$ -图像。

7. 权利要求 1-6 中任一项的方法, 其中步骤 a) 中的直接  $^{13}\text{C}$ -图像在给予含  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物之后 400s 内摄取。

8. 权利要求 1-7 中任一项的方法, 其中摄取另外的一种或多种用或不用质子 MRI 对照剂的质子图像, 或摄取另外的一种或多种用超极化  $^{13}\text{C}$ -MR 对照剂的  $^{13}\text{C}$  图像, 以获取解剖学和/或灌注信息。

9. 权利要求 8 的方法, 其中另外的质子图像用或不用质子 MRI

对照剂摄取，以确定心肌中的相对灌注。

10. 权利要求 8 的方法，其中另外的  $^{13}\text{C}$ -图像用非代谢性超极化  $^{13}\text{C}$ -MR 对照剂摄取，以确定心肌中的定量灌注。

11. 权利要求 8 的方法，其中另外的  $^{13}\text{C}$ -图像用超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐摄取，以确定心肌中的定量灌注。

12. 权利要求 1-11 中任一项的方法，其中步骤 b)还包括将乳酸盐信号进行碳酸氢盐的量方面的校正，得到经碳酸氢盐加权的乳酸盐图像。

13. 权利要求 12 的方法，所述方法还包括  
(c)通过鉴别最低  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐信号和/或最高  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐信号，从而在所述图像中鉴别出有风险的心肌组织。

14. 权利要求 1-13 中任一项的方法，其中步骤 b)为必须的。

15. 权利要求 1-14 中任一项的方法，其中  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐为  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐。

## 使用超极化 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的心脏成像方法

本发明涉及一种用超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐作为 MR 成像剂的心脏成像方法，该方法能够确定心肌细胞的存活力。

磁共振(MR)成像(MRI)是一种成像技术，医生特别倾向于用它以非侵入性方式，摄取受试者身体整体或其部分图像，无需像 X-射线一样将受试者和医护人员暴露于潜在的有害放射线中。由于其高质量的图像，MRI 成为颇受欢迎的软组织和器官如心脏的成像技术。

局部缺血相关的心脏损伤和疾病是西方国家中死亡的主要原因。心肌局部缺血是一种严重的疾病，只有在早期快速鉴别和定位心肌局部缺血，才能防止受试者患上不可逆性心肌损害。

心脏组织，与其它代谢活性组织一样，特别容易出现局部缺血损伤。急性心肌梗死的早期阶段通常伴随有正常收缩功能丧失，通过局部运动障碍表现出来。这可能是由于冠状灌注压陡然降低，诱发急性心肌冬眠状态，以及正常跨膜离子转运的快速停止。不可逆性损伤开始之前的局部缺血心肌的再灌注可快速或缓慢恢复(心肌功能丧失)至正常心脏代谢和功能。

磁共振成像已经发展成一种实用的心脏成像技术。尽管 MR 技术用自旋-回波成像，能够显示心脏的解剖结构，但是对照剂的使用也是检测心肌局部缺血和梗死必不可少的。一类 MR 对照剂为顺磁对照剂，其中包括顺磁金属离子，为盐形式或为与螯合/络合部分络合的络合物形式。

顺磁对照剂 GdDTPA (Magnevist™)已经成为心肌成像用临床测试的主体。尽管该金属络合物已经表现出能够改善动物和人的 MR 图像中的急性心肌梗死的鉴别，但是，由于其快速排出并分布于细胞外液间隙，其心肌成像的临床应用受到限制。

$Mn^{2+}$ 作为一种顺磁金属离子已经用作对照剂应用于心肌 MR 成像中。它与  $Ca^{2+}$  竞争通过慢钙离子通道进入收缩中的心肌，产生显著缩短的弛豫时间  $T_1$  并因此增强正常心肌组织中的信号强度。在心率和收缩力增加期间，每时间单位的  $Mn^{2+}$  流入量提高。但是，在局部缺血心肌中，由于血流减小、收缩力降低， $Mn^{2+}$  的摄入大大降低。因此，用顺磁  $Mn^{2+}$  作为对照剂进行 MR 成像，可检测出局部缺血心肌并将其与正常心肌组织相区别。

但是，用锰离子存在某些缺点。用锰盐，如二氯化锰等盐具有心脏毒性，从而带来安全性问题(见例如 Hu et al. *Magn. Res. in Medicine* 46, (2001), 884-890)。已经做了尝试来补偿锰盐的毒性作用，方法是添加钙盐或以慢输注形式给予该盐。在对照剂制剂中使用钙的缺点在于，其与锰竞争钙通道进入心肌细胞。这种方法导致效率降低，并随后需要高剂量的对照剂来补偿该作用。

WO-A-99/01162 描述了一种检测心肌局部缺血的方法，使用锰络合物快速成像。成像过程据称简便易行，在注射后 3-6 小时内完成。尽管该方法似乎没有毒性问题，但是从成像序列得到结果要延迟相当长的时间，因为从成像序列开始到给予对照剂要较长的时间。

WO 2004/054623 描述了一种用某些锰络合物鉴别心肌局部缺血面积的方法。生理学和/或药理学应激方案是该方法的一部分，因为其增大了正常和局部缺血心肌间的对照差异，从而得以使用低对照剂剂量。但是，该应激方案加重了受试者的心理性紧张。

因此，需要一种在 MR 成像方法中使用的药剂，来增大正常和局部缺血组织间的差异，进而在细胞水平评价该组织的存活力。该药剂还应具有安全性，即在其临床剂量时没有毒副作用。此外，还需要快速简便评价心肌组织，同时不给受试者带来额外应激，也不延迟治疗检测开始的 MR 成像方法。

WO-A-99/35508 公开了一种用高  $T_1$  剂作为 MR 成像剂的超极化溶液考察受试者 MR 的方法。术语“超极化”是指增强存在于高  $T_1$

剂中的 NMR 活性核(即非零核自旋的核, 优选  $^{13}\text{C}$ -或  $^{15}\text{N}$ -核)的核极化作用。通过增强 NMR 活性核的核极化作用, 这些核的激发和基态核自旋状态间的总体差别显著扩大, 从而使 MR 信号强度扩增到 100 倍以上。当用超极化  $^{13}\text{C}$ -和/或  $^{15}\text{N}$ -富集的高  $T_1$  剂时, 基本上没有来自本底信号的干扰, 因为 C 和/或 N 的天然丰度可以忽略不计, 所以成像对比度非常高。公开了各种适于超极化并随后用作 MR 成像剂的可能的高  $T_1$  剂, 其中包括但不限于非内源性和内源性化合物如乙酸盐、丙酮酸盐、乙二酸盐或葡萄糖酸盐, 糖如葡萄糖或果糖, 脲, 酰胺, 氨基酸如谷氨酸、甘氨酸、半胱氨酸或天冬氨酸, 核苷酸, 维生素如抗坏血酸, 盘尼西林衍生物和磺酰胺等。要进一步说明的是, 柠檬酸循环等正常代谢循环中的中间体如富马酸和丙酮酸是优选的用于代谢活性成像的成像剂。

要着重说明的是, 超极化成像剂由于弛豫以及-给予受试者身体时的-稀释而衰减。因此, 成像剂的  $T_1$  值在生物流体(例如血液)中必须足够高, 应足以使成像剂以高度的超极化状态分布于受试者身体的靶位点。

我们已经出人意料地发现, 超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐可用作评价心肌组织存活力的成像剂。由不同的丙酮酸盐代谢产物产生的 MR 信号振幅随心肌组织的代谢状态而变化。因此, 由这些代谢产物形成的独特的代谢峰图式可用作待检测心脏组织代谢状态的指纹图谱, 以区分存活和非存活心肌组织。这就使超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐成为极佳的评价心肌组织存活力的体内 MR 成像剂, 例如用于鉴别心肌局部缺血或心脏病发作之后的“有危险的组织”。这种超出灌注评价或死亡心肌组织鉴别的信息对医生开始适当的治疗以防止受试者心肌进一步损害非常重要。

因此, 在第一方面, 本发明提供了一种用超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐作为成像剂评价心肌组织存活力的方法。

$^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐非常安全, 并且作为内源性化合物, 人体耐受性

良好。在本发明方法中使用超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐，能够快速获得结果，给药和 MR 成像序列之间不需延时。这就意味着，受试者可立即接受治疗，从而提高存活和康复机会。本发明方法中不需要应激方案，从而对受试者更有益。

NMR 活性  $^{13}\text{C}$ -核的超极化可通过各种方法达到(例如，见 WO-A-99/35508)，优选的方法是从惰性气体极化转移、“暴力式”、自旋冷冻、仲氢法和 DNP。为得到超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐，优选直接将  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐极化，或将  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸极化并将极化的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸转化为极化的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐，例如通过用碱中和。

获得超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的优选的方法是从超极化惰性气体极化转移。惰性气体具有非-零核自旋，可被超极化，例如用循环极化光，可使其极化水平超过平衡极化水平。超极化惰性气体，优选  $^3\text{He}$  或  $^{129}\text{Xe}$  或其混合气体，可用于实行  $^{13}\text{C}$ -核的超极化。超极化也可通过使用同位素富集的超极化惰性气体获得，优选  $^3\text{He}$  或  $^{129}\text{Xe}$ 。超极化气体可以是气相；也可以溶于液体/溶剂中，或者超极化气体本身可用作溶剂。再者，该气体可冷凝于预冷的固体表面并以这种形式使用，或者使其升华。优选将超极化气体与该化合物充分混合进行极化。因此，如果极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸，因为它在室温为液体，所以超极化气体优选溶于液体/溶剂中或用作溶剂。如果极化  $^{13}\text{C}$  丙酮酸盐，超极化气体优选溶于同样溶解丙酮酸盐的液体/溶剂中。

获得超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的另一优选方法是，在非常低的温度下，在高场中，用热动力学平衡使 NMR 活性核极化。相比于操作场和 NMR 谱的温度，超极化作用通过使用极高场和极低温度(暴力式)来完成。所用的磁场强度应尽量高，通常高于 1T，优选高于 5T，更优选高于 15T，或更特别优选高于 20T 或更高。温度应尽量低，如 4.2 K 或更低，优选 1.5 K 或更低，更优选 1.0 K 或更低，特别优选 100 mK 或更低。

获得超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的另一方法是自旋冷冻法。该方法涵

盖用自旋冷冻极化使固体化合物或系统自旋极化。该系统掺有或均匀混有合适的顺磁材料如晶体形式的 Ni、镧或铜系离子，具有规则的三个或更多个对称轴。仪器操作比 DNP 简单，不需均匀的磁场，因为不需应用共振激发场。通过将样品围绕垂直于磁场方向的轴旋转进行操作。该方法的前提条件是，该顺磁物质有高度的各向异性  $g$  因子。作为样品旋转的结果，使得电子顺磁共振与核自旋相接触，导致核自旋温度的下降。继续旋转样品，直至核自旋极化达到新的平衡。

在一个更优选的实施方案中，用 DNP (动力核极化)法来获得超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐。极化由顺磁化合物，又称为顺磁剂或 DNP 剂产生。在 DNP 法中，能量通常以微波照射形式提供，用来开始激发顺磁剂。在衰减至基态后，极化就从顺磁剂的未配对电子转移至样品的 NMR 活性核。通常，在 DNP 方法中使用中或高磁场和极低温度，例如在液体氮和约 1T 或更高的磁场中进行 DNP 操作。或者，也可以使用可获得足够的极化增益的中度磁场和任何温度。DNP 技术在 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中有描述，两者都通过引用并入本文。为通过 DNP 法获得超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐，可使用  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和/或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸作为待极化化合物。

如果使用  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和/或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐，则主要取决于 DNP 方法中的所用的顺磁剂。如果顺磁剂可溶于  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸，则优选使用  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和液体混合物，优选由顺磁剂和  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸形成的液体溶液。如果顺磁剂不溶于  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸，则  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和/或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和至少一种共溶剂可用来形成液体混合物，优选液体溶液。已经发现，DNP 的成功和极化作用的水平取决于待极化的化合物和与其相互密切接触的顺磁剂。因此，共溶剂优选可溶解顺磁剂和  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和/或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的共溶剂或共溶剂混合物。就  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐而言，优选用水作为共溶剂。

此外，还发现，当样品混合物在冷却/冷冻后形成玻璃状物质而



非结晶样品时，通过 DNP 法获得了高极化水平。同时，形成玻璃样物质使得顺磁剂和待极化的混合物更密切地接触。 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸是一种良好的玻璃样物质形成剂，因此每当顺磁剂可溶于  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸时，优选用于 DNP 方法中。 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐是一种盐，并且  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的水溶液和顺磁剂的液体混合物冷冻后会产生结晶样品。为避免这一点，优选添加另外的良好的玻璃样物质形成剂，如甘油、丙二醇或乙二醇。

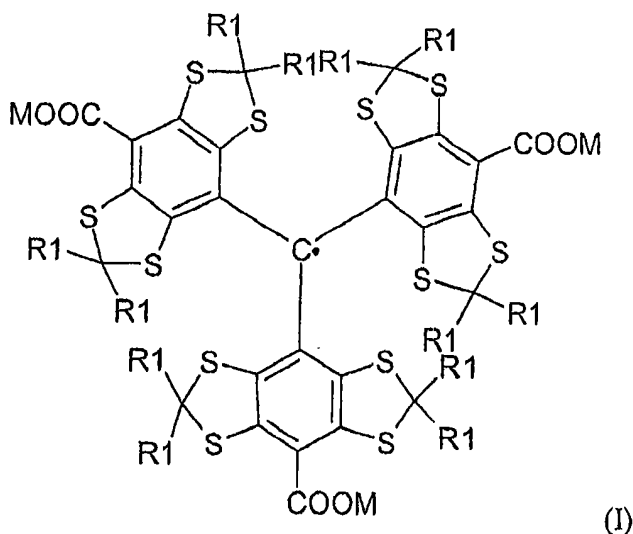
因此在一个实施方案中， $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐溶于水得到水溶液，加入顺磁剂、甘油和任选的其它共溶剂形成液体混合物。在一个优选的实施方案中， $^{13}\text{C}$ -丙酮酸、顺磁剂和共溶剂结合在一起形成液体混合物。在一个最优选的实施方案中， $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和顺磁剂结合在一起形成液体混合物。该化合物的充分混合可通过几种已知的方法达到，例如搅拌、涡悬或超声。

进行 DNP 方法前，要对液体化合物进行冷冻。液体混合物的冷却/冷冻可通过本领域已知的方法获得，例如将液体混合物在液氮中冷冻，或直接将其置于极化器中，其中的液体氮将冷冻该样品。

如上所述，动力核极化法(DNP)是一种将待极化的混合物通过 DNP 剂，即顺磁剂/化合物来完成极化作用的方法。

许多已知的化合物可用作 DNP 剂，例如过渡金属如铬(V)离子，有机自由基如氮氧自由基(nitroxideradicals)、三苯甲基基团(trityl radicals)或磁性颗粒。举例而言，这类 DNP 剂在 WO-A-99/35508、WO-A-88/10419、WO-A-90/00904、WO-A-91/12024、WO-A-93/02711 或 WO-A-96/39367 中有叙述。

在一个优选的实施方案中，式(I)的三苯甲基基团



其中

M 表示氢或一价阳离子；且

R1 可相同或不同，表示直链或支链的任选羟基化的  $C_1$ - $C_6$ -烷基或 $-(CH_2)_n-X-R_2$ ，其中 n 为 1、2 或 3；X 为 O 或 S，R2 为直链或支链的  $C_1$ - $C_4$ -烷基。

用作顺磁剂，以通过 DNP 方法获得  $^{13}C$ -丙酮酸盐。

在一个优选的实施方案中，M 表示氢或一价生理可耐受阳离子。术语“生理可耐受阳离子”是指人或非人动物活体可耐受的阳离子。优选地，M 表示氢或碱阳离子、铵离子或有机胺离子，例如葡甲胺离子。最优选地，M 表示氢或钠。

在另一个优选的实施方案中，R1 可相同或不同，优选相同，并且表示直链或支链的任选羟基化的  $C_1$ - $C_4$ -烷基，最优选甲基、乙基、异丙基、羟基甲基或羟基乙基。

在另一个优选的实施方案中，R1 可相同或不同，优选相同，并且表示 $-CH_2-O-(C_1-C_3-烷基)$ 、 $-(CH_2)_2-O-CH_3-(C_1-C_3-烷基)-O-CH_3$ 、 $-CH_2-S-(C_1-C_3-烷基)$ 、 $-(CH_2)_2-S-CH_3$ 、 $-(C_1-C_3-烷基)-S-CH_3$ 、 $-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-O-C_2H_5$ 、 $-CH_2-O-C_2H_4OH$ 、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_3$ 、 $-CH_2-S-C_2H_5$ 、 $-CH_2-S-C_2H_4OH$  或 $-CH_2-CH_2-S-CH_3$ ，最优选 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 。

在一个更优选的实施方案中，M 表示氢或钠，R1 为相同的，并表示-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>。

式(I)的三苯基甲基基团的合成可参见 WO-A-91/12024、WO-A-96/39367、WO 97/09633 和 WO-A-98/39277。简言之，可通过将三摩尔当量的金属化的单芳基化合物与一摩尔当量的适当保护的羧酸衍生物反应，形成三聚中间体来合成上述基团。这种中间体是金属化的，并随后与二氧化碳等反应得到三羧基三苯甲基甲醇，在另外的步骤中，其与羧酸反应产生三芳基甲基阳离子。该阳离子随后被还原形成稳定的三苯甲基基团。

包含 <sup>13</sup>C-丙酮酸盐和/或 <sup>13</sup>C-丙酮酸和任选的溶剂的液体混合物，优选含有 5-100 mM 式(I)的三苯甲基基团，更优选 10-20 mM，特别优选 12-18 mM，最优选 13-17 mM。现已发现，DNP 方法中用较高量的基团的极化作用的完成时间较短，但是其达到的极化水平较低。因此，这两种作用相互平衡。

这种 DNP 技术在 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中有描述，两者都通过引用并入本文。一般而言，DNP 法中使用中或高磁场与极低温度，例如在液氮中及约 1T 或更高的磁场中进行 DNP 操作。或者，可使用能达到足够的极化增益的中磁场和任何温度。在本发明方法的一个优选的实施方案中，DNP 法在液氮和约 1T 或以上的磁场进行。合适的极化单位描述于 WO-A-02/37132。在一个优选的实施方案中，极化单位包含低温恒温器和极化装置，例如微波室通过微波导向装置连接于中心孔中的微波源，而该中心孔周围围绕着磁场产生装置如超导磁体。该孔垂直向下延伸至至少接近于超导磁体的 P 区的水平，该处的磁场强度足够高，例如 1-25T 之间，足以使 <sup>13</sup>C-核发生极化。样品孔优选可密封，并且可用低压排空，例如约 1 mbar 或更低量级的压力。样品(即含顺磁剂 <sup>13</sup>C-丙酮酸盐和/或 <sup>13</sup>C-丙酮酸的混合物)导入装置例如可移动样品转运管，可包含于该孔中，且该管可从该孔的顶部向下插入 P 区中微波室内部的的位置。P

区用液氮冷却至足够低的温度，以使产生极化作用，优选温度的量级为 0.1-100 K，更优选 0.5-10 K，最优选 1-5 K。优选样品导入装置的上端可密封，可采用任何合适的密封方式以达到孔中的部分真空。样品保留容器，如样品保留杯，可自由移动以适应样品导入装置下端的内部。样品保留容器优选由低比热容量和良好的低温性质的轻质材料，例如 KeIF (聚氯三氟乙烯)或 PEEK (聚醚醚酮)制成。样品容器可容纳一种或多种待极化的样品。

将样品插入样品保留容器中，浸没于液氮中并用微波照射，优选在 200 mW 下，频率为约 94 GHz。极化水平可在微波照射期间摄取样品的固体  $^{13}\text{C}$ -NMR 信号来监测，因此使用含极化单位的装置来获取步骤 b)中的固态 C-NMR 光谱为优选。通常，用  $^{13}\text{C}$ -NMR 信号对时间作图，来获得饱和曲线。因此，有可能确定何时达到优化的极化水平。

如果一种极化方法例如 DNP 法需要固态的样品，则固态样品必须转化成液体，以在本发明方法中使用。或者将固体极化混合物溶解，如 WO-A-02/37132 所述，或者将其熔融，如 WO-A-02/36005 所述。优选将固体超极化样品溶解，更优选溶于缓冲液中，优选生理耐受性缓冲液中，以获得液体组合物。本申请中的术语“缓冲液”是指一种或多种缓冲液，即也称为缓冲液混合物。

优选的缓冲液是生理耐受性缓冲液，更优选约 pH 7-8 的缓冲液，例如磷酸盐缓冲液( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、ACES、PIPES、咪唑/HCl、BES、MOPS、HEPES、TES、TRIS、HEPPS 或 TRICIN。更优选的缓冲液为磷酸盐缓冲液和 TRIS，最优选为 TRIS。在另一个实施方案中，使用一种以上上述优选的缓冲液，即缓冲液混合物。

当  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸用作待极化的化合物时，溶解还包括将  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸转化为  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐。为达到这一目的，将  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸与碱反应。在一个实施方案中， $^{13}\text{C}$ -丙酮酸与碱反应，转化为  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐并随后加入缓冲液。在另一实施方案中，缓冲液和碱在同一溶液中混合，

将该溶液加入到  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸中，同时将其溶解并转化成  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐。在一个优选的实施方案中，碱为  $\text{NaOH}$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  或  $\text{NaHCO}_3$  的水溶液，最优选的碱为  $\text{NaOH}$ 。在一个特别优选的实施方案中，用含  $\text{NaOH}$  的 TRIS 缓冲液来溶解  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸并将其转化为  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸钠。

在另一个优选的实施方案中，缓冲液或组合缓冲液/碱溶液(如果使用)还包含一种或多种可与游离顺磁离子结合或络合的化合物，例如 DTPA 或 EDTA 等螯合剂。现已发现，游离顺磁离子可缩短超极化化合物的  $T_1$ ，这一点要优选避免。

优选用 WO-A-02/37132 中公开的方法和/或装置进行溶解。如果用 DNP 法进行超极化，则溶解单位可与极化器在物理上分离，或者可为含极化器和溶解单位的装置的一部分。在一个优选的实施方案中，溶解在高磁场中进行，以增加弛豫并保持最大超极化。应避免场节(node)，同时低场可导致弛豫增强而不管上述测量值如何。

如果通过 DNP 法进行超极化，顺磁剂和/或其反应产物优选从含  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的溶液中去除。顺磁剂和/或其反应产物可部分、基本或完全去除，优选完全去除。反应产物如式(I)的三苯甲基基团可为酯，该酯可通过丙酮酸与式(I)含羟基基团反应形成。用于去除顺磁剂和/或其反应产物的方法是本领域已知的。一般而言，适用的方法取决于顺磁剂和/或其反应产物的性质。极化后溶解固体样品时，该基团可发生沉淀，易于通过过滤从液体组合物中分离。如果磁性颗粒用作顺磁剂，这些颗粒同样易于通过过滤除去。如果没有沉淀发生，可通过色谱分离技术除去顺磁剂，该技术有液相色谱如反向或离子交换色谱，或者通过提取去除。

由于式(I)的三苯甲基基团具有紫外可见吸收光谱，有可能使用紫外可见吸收法检测其去除后存在于液体组合物中的量。为了获得定量结果，即溶解的超极化样品中存在的该基团的浓度，可将分光光度计校准以使特定波长的吸收量精确对应于样品中相应基团的浓

度。

本发明方法中使用的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和/或优选用于通过 DNP 法获得超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸, 其同位素富集优选至少 75%, 更优选至少 80%, 特别优选至少 90%, 同位素富集超过 90% 是最优选的。最理想的富集为 100%。 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和/或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的同位素可富集在 C1-位(以下表示为  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐)、C2-位(以下表示为  $^{13}\text{C}_2$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}_2$ -丙酮酸盐)、C3-位(以下表示为  $^{13}\text{C}_3$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}_3$ -丙酮酸盐)、C1-和 C2-位(以下表示为  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸盐)、C1-和 C3-位(以下表示为  $^{13}\text{C}_{1,3}$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}_{1,3}$ -丙酮酸盐)、C2-和 C3-位(以下表示为  $^{13}\text{C}_{2,3}$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}_{2,3}$ -丙酮酸盐)或 C1-、C2-和 C3-位(以下表示为  $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐); C1-位为优选。

$^{13}\text{C}$ -丙酮酸和  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐的几种合成方法为本领域已知。简言之, Seebach et al., *Journal of Organic Chemistry* 40(2), 1975, 231-237 描述了其合成途径, 该途径依赖于保护和活化含羰基的原料如 S,S-乙缩醛, 如 1,3-二噻烷或 2-甲基-1,3-二噻烷。所述二噻烷为金属化的, 并与含甲基化合物和/或  $^{13}\text{CO}_2$  反应。通过使用本文列出的适当同位素富集的  $^{13}\text{C}$ -化合物有可能获得  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}_2$ -丙酮酸盐或  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸盐。羰基功能随后通过使用文献中描述的常规方法恢复。从乙酸开始有不同的合成途径, 首先转化为乙酰溴, 然后与  $\text{Cu}^{13}\text{CN}$  反应。所得的腈经酰胺转化为丙酮酸(见例如 S. H. Anker et al., *J. Biol. Chem.* 176 (1948), 1333 or J. E. Thirkettle, *Chem Commun.* (1997), 1025)。此外,  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸可用美国专利 6,232,497 中所述的方法将市售的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐质子化得到。

为了在本发明方法中使用, 超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐作为适于给予活体人或非人动物体的组合物的形式提供。该组合物优选包含上述缓冲液或缓冲液的混合物。该组合物还包含常规药学可接受载体、赋形剂和制剂助剂。

因此,所述组合物可例如包括稳定剂、渗透调节剂、增溶剂等。

丙酮酸盐是内源性化合物,人体耐受性良好,甚至高浓度时也是如此。作为柠檬酸循环中的前体,丙酮酸盐在人体中发挥了重要的代谢作用。丙酮酸盐转化为不同的化合物:其转氨基作用产生丙氨酸,经氧化脱羧基作用,丙酮酸盐转化为乙酰-CoA 和碳酸氢盐,其还原作用产生乳酸盐,其羧基化作用产生草酰乙酸盐。

现已发现,超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐转化为超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐(仅在  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸盐或  $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -丙酮酸盐的情况下)和超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸的转化过程,可在体内 MR 成像中用来区分有活力和非活力心肌组织。这一点是出人意料的,因为人们普遍认为超极化化合物的  $T_1$  由于驰豫和稀释而衰减。人  $37^\circ\text{C}$  全血中,  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的  $T_1$  驰豫时间为约 42 s,但是发现超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐转化为超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐和超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸的转化过程的速度快到足以使来自  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐母体化合物及其代谢产物的信号得以检测。丙氨酸、碳酸氢盐和乳酸盐的量取决于待考察心肌组织的代谢状态。超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐和超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸的 MR 信号强度与这些化合物的量以及检测时剩余的极化程度有关,因此通过监测超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐转化为超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐和超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸的转化过程,有可能用非侵入性 MR 成像研究人或非人动物心脏组织的体内代谢工程。

下文中,术语"超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐"、" $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐"和"丙酮酸盐"可互换使用。同样适用的还有术语"超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐"、" $^{13}\text{C}$ -乳酸盐"和"乳酸盐"; "超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸"、" $^{13}\text{C}$ -丙氨酸"和"丙氨酸"; "超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐"、" $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐"和"碳酸氢盐"和"超极化  $^{13}\text{C}$ -代谢产物"、" $^{13}\text{C}$ -代谢产物"和"代谢产物"。

现已发现,不同的丙酮酸盐代谢产物产生的 MR 信号振幅的变化,取决于心肌组织的代谢状态。因此,丙氨酸、乳酸盐、碳酸氢

盐和丙酮酸盐的独特代谢峰图式可用作待检测心肌组织代谢状态的指纹图谱，从而区分有活力、非活力和有危险的心肌组织。确定心肌组织的存活力，在心肌局部缺血或心脏病发作后是非常重要的，对于患糖尿病和代谢综合征的受试者也很重要，这些疾病都可产生心肌组织损伤。

由于冠心病(CAD)有多种临床表现，从稳定型绞痛至突然死亡，因此可报告细胞存活状态的诊断方法可带来直接的益处。在正常稳定细胞和死亡细胞这两种“极端”的情况之间，在局部缺血心肌组织中还存在许多细胞水平的不同情况，这些情况又导致多种临床表现。很重要的是，鉴别这些局部缺血心肌组织中的不同情况，又称为“有危险的心肌组织”，即不治疗局部缺血会加重导致坏死的组织，以向受试者提供适当的治疗从而防止坏死的发生。

局部缺血心脏的两种不同但非常严重的状态是心肌冬眠和心肌功能丧失。心肌冬眠是一种慢性局部缺血状态，其中心肌血流减少，心脏功能相应降低。心肌细胞正常情况下可氧化绝大多数脂肪酸。在心肌冬眠细胞中，葡萄糖的摄取增加(从 FDG-PET 研究中得知)，提示丙酮酸盐将是这些细胞优选的底物。心肌功能丧失是另一种急性局部缺血(例如主冠状动脉阻塞)，其血流正常但功能降低。由于相对低的代谢活性，这将导致低乳酸盐。现已发现，由于其具有低<sup>13</sup>C-碳酸氢盐和/或高<sup>13</sup>C-乳酸盐信号，因此用本发明方法可鉴别有危险的心肌组织。

局部缺血可产生不同程度的心肌功能障碍，并且如果严重且拖得过久，会导致细胞坏死。后一种情况下，细胞死亡并且根本不发生代谢，例如给予超极化<sup>13</sup>C-丙酮酸盐时，在<sup>13</sup>C-谱和/或图像中只能得到该信号而不存在可能代谢产物的信号。

一般而言，待检测的受试者，例如受试者或动物，被置于 MR 磁体中。用专用<sup>13</sup>C-MR RF-线圈围绕待检测区域。

包含<sup>13</sup>C-丙酮酸盐和一种或多种常规药理学载体、赋形剂和/或添



加剂的成像介质经胃肠外给予，优选静脉内或动脉内给予。直接给予心脏也是可能的，例如将成像介质经置于冠状动脉的中的导管注入。成像介质的剂量和浓度取决于多种因素，例如毒性和给药途径。通常，成像介质的给药浓度最高达 1 mmol 丙酮酸盐/kg 体重，优选 0.01-0.5 mmol/kg，更优选 0.1-0.3 mmol/kg。给药速率优选低于 10 ml/s，更优选低于 6 ml/min，最优选 5 ml/s-0.1 ml/s。给药后 400s 内，优选 120 s 内，更优选 60 s 内，特别优选 20-50 s，最优选 30-40 s，应用以频率和空间选择性方式组合编码待检测体积的 MR 成像序列 (sequence)。这将产生  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、 $^{13}\text{C}$ -丙氨酸和  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的代谢图像，更优选  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、 $^{13}\text{C}$ -丙氨酸、 $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐和  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的代谢图像。

可使用称为分光镜成像序列，如下文所述得到待检测体积的编码(T.R. Brown et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3523-3526 (1982); A. A. Maudsley, et al., J. Magn. Res 51, 147-152 (1983))。分光镜成像数据含一定数量的提及元素，其中每个元素含有全 C-MR 谱。C-丙酮酸盐及其  $^{13}\text{C}$ -代谢产物在  $^{13}\text{C}$ -MR 谱中都具有其独特的位置，并且它们的共振频率可用来鉴别它们。在其共振频率的峰的积分分别与  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐及其  $^{13}\text{C}$ -代谢产物的量直接相关。当用时间域拟合途径，如 L. Vanhamme et al., J Magn Reson 129, 35-43 (1997)所述评估  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和每个  $^{13}\text{C}$ -代谢产物的量时，可产生  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和每个  $^{13}\text{C}$ -代谢产物的图像，其中有色译码或灰色译码代表了所检测的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和每个  $^{13}\text{C}$ -代谢产物的量。

虽然分光镜成像方法在用各种 MR 核例如  $^1\text{H}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{23}\text{Na}$  产生代谢图像中体现出其价值，但是完全编码分光镜图像的所需的重复量使得该方法不适于超极化  $^{13}\text{C}$ 。在摄取总体 MR 数据的过程中，必须小心操作以确保超极化  $^{13}\text{C}$ -信号有效。以相对于噪音减少信号为代价，通过减少每个相编码步骤中应用的 RF-脉冲角来获得这一点。高基质尺寸需要更多相编码步骤和更长的扫描时间。

基于 P. C. Lauterbur (Nature, 242, 190-191, (1973) and P. Mansfield (J. Phys. C. 6, L422-L426 (1973)) 的开创性工作的成像方法, 意味着在数据获取过程中应用读取梯度, 使得能够获得相对于噪音图像或其等价物提高的信号, 提高的空间分辨图像。但是, 这些成像方法的基本形式不能得出独立的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和其  $^{13}\text{C}$ -代谢产物图像, 只能得出含有  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐及其所有  $^{13}\text{C}$ -代谢产物信号的图像, 即特定代谢产物的鉴别是不可能的。

在一个优选的实施方案中, 使用了成像序列, 该序列使用多回波来编码频率信息。该序列可产生独立的水和脂肪  $^1\text{H}$ -图像, 例如在 G. Glover, J Magn Reson Imaging 1991;1:521-530 and S. B. Reeder et al., MRM 51 35-45 (2004) 中有叙述。既然待检测的代谢产物以及其 MR 频率是已知的, 该参考文献中讨论的方法可用来获取  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}$ -丙氨酸和  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐, 优选  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}$ -丙氨酸、 $^{13}\text{C}$ -乳酸盐和  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐的直接图像。该过程更有效地利用超极化  $^{13}\text{C}$ -MR 信号, 相比于分光镜成像, 其给出更好的信号质量, 更高的空间分辨率和更快的摄取时间。

如前所述, 有活力的心脏组织的特征在于高代谢活性。局部缺血时, 即组织中血流减少时, 细胞供氧不足, 细胞水平的代谢作用降低。出人意料地, 有可能将这种在短 MR 成像时间窗内可见的代谢的变化, 用超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐加以利用。心肌组织中特别显著的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐和  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐信号变化取决于个体细胞的代谢状态, 能够评价心肌细胞的存活力。

因此, 在一个优选的实施方案中, 本发明的方法包括:

(a) 将含超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物预给予受试者, 从受试者获取  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐及其含  $^{13}\text{C}$  的代谢产物丙氨酸、乳酸盐和任选的碳酸氢盐的直接  $^{13}\text{C}$ -MR 图像,

(b) 任选将一种代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号与检测到的其它代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号相关联, 对比两个、优选三个、最优选四个  $^{13}\text{C}$  代谢产物间

的信号强度差别。

因此，在另一个优选的实施方案中，本发明的方法包括：

(a)将含超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物预给予受试者，从受试者获取  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐及其含  $^{13}\text{C}$  的代谢产物丙氨酸、乳酸盐和任选的碳酸氢盐的直接  $^{13}\text{C}$ -MR 图像，

(b)任选将一种代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号与检测到的任何其它代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号相关联，对比两个、优选三个、最优选四个  $^{13}\text{C}$  代谢产物间的信号强度差别。

(c)通过鉴别最低  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐信号和/或最高  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐信号，从而在所述图像中鉴别出有风险的心肌组织。

为校正丙酮酸盐信号，将代谢产物(乳酸盐、丙氨酸和碳酸氢盐)和丙酮酸盐图像规范化(normalized)为每个个体图像中的最大值。第二，将规范化的乳酸盐图像乘以(multiplied)丙酮酸盐倒像(inverted pyruvate image)，例如图像中最大的丙酮酸盐信号减去每个像素中丙酮酸盐电平(level)。最后，上述操作中获得的中间结果乘以初始的乳酸盐图像。

举例说明，为校正碳酸氢盐信号，将乳酸盐和碳酸氢盐图像规范化为每个图像中的最大值。将规范化的乳酸盐图像乘以丙酮酸盐倒像，例如图像中最大的丙酮酸盐信号减去每个像素中丙酮酸盐电平。最后，上述操作中获得的中间结果乘以初始的乳酸盐图像。按照类似的方式，可将丙氨酸信号包括于分析中，发现低碳酸氢盐信号以及不变的丙氨酸信号也可用作心肌组织有危险的指征。

为着重强调代谢有改变的区，可将提高的代谢产物信号与降低的代谢产物信号组合在一起应用于以上段落中描述的类似操作中，进而得到加权的代谢产物图像。出人意料的是，对心肌组织存活力的评价，即对有活力、有损伤和无活力心肌组织间的区分，通过校正同样得到改善。

解剖学和/或灌注信息可根据本发明方法纳入心肌组织存活力评

价中。解剖学信息可通过用或不用合适的对照剂来摄取质子或  $^{13}\text{C}$ -MR 图像来获得。心肌中的相对灌注可通过用 MR 对照剂例如 Omniscan™ 确定。同样，无需给予对照剂的灌注测定 MR 成像技术是本领域已知的。在一个优选的实施方案中，非代谢的超极化  $^{13}\text{C}$ -对照剂用来确定定量灌注。合适的技术和对照剂描述于 WO-A-02/23209。在一个更优选的实施方案中，超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐用来确定定量灌注。

在另一个优选的实施方案中，包含超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的成像介质被重复给予。这是本发明方法的有一个优点，而其它 MR 成像方法使用基于锰的药物，该药物在高剂量时表现出心脏毒性作用。由于丙酮酸盐的毒性低而安全性高，受试者能够很好地耐受重复给药。

本发明方法中得到的结果能够使医生通过对受试者的检查选择合适的治疗。在另一个优选的实施方案中，本发明方法用来确定治疗是否成功。

也有报道称丙酮酸盐能够影响收缩力。因此，该化合物可在氧自由基可能起一定作用的心肌功能丧失的情况下同时用作诊断和治疗剂。

另一方面，本发明提供了超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的用途，用于制备在 MR 成像方法中使用以评价细胞存活力的成像介质。

含超极化  $^{13}\text{C}$  作为成像剂的成像介质详述于第 11-14 页。

另一方面，本发明提供了  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的用途，用于制备在 MR 成像方法中作为成像剂使用以评价细胞存活力的超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐。

从  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐制备超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的制备和优选的实施方案详述于第 5-11 页。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的用途，用于制备在 MR 成像方法中使用以评价细胞存活力的成像

介质，所述方法包括：

(a)将含超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物预给予受试者，从受试者获取  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐及其含  $^{13}\text{C}$  的代谢产物丙氨酸、乳酸盐和任选的碳酸氢盐的直接  $^{13}\text{C}$ -MR 图像，

(b)任选将一种代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号与检测到的任何其它代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号相关联，对比两个、优选三个、最优选四个  $^{13}\text{C}$  代谢产物间的信号强度差别。

在一个进一步优选的实施方案中，本发明提供了  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的用途，用于制备在 MR 成像方法中作为成像剂使用以评价细胞存活力的超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐，所述方法包括：

(a)将含超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物预给予受试者，从受试者获取  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐及其含  $^{13}\text{C}$  的代谢产物丙氨酸、乳酸盐和任选的碳酸氢盐的直接  $^{13}\text{C}$ -MR 图像，

(b)任选将一种代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号与检测到的其它代谢产物的  $^{13}\text{C}$  信号相关联，对比两个、优选三个、最优选四个  $^{13}\text{C}$  代谢产物间的信号强度差别。

上述方法和该方法的优选的实施方案详细描述于第 17-20 页。

### **实施例**

**实施例 1: 合成三(8-羧基-2,2,6,6-(四(甲氧基乙基)苯并-[1,2-4,5']双-(1,3)二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐**

将 10 g 按照 WO-A1 -98/39277 的实施例 7 的方法合成的(70 mmol)三(8-羧基-2,2,6,6-(四(羟基乙基)苯并-[1,2-4,5']-双-(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐，在氩气下悬浮于 280 ml 二甲基乙酰胺中。加入氢化钠(2.75 g)，然后加入甲基碘(5.2 ml)，将轻微放热的反应进行 1 小时，在 34°C 水浴中 60 分钟。将氢化钠和甲基碘每种以相同的量再添加两次，最后一次添加后，将混合物室温搅拌 68 小时，然后倒入 500 ml 水中。将 pH 用 1 M NaOH (aq)调至 pH > 13，将混合物室温搅拌 15 小时，水解形成的甲基酯。然后将混合物用 50 ml 2 M

HCl (aq)酸化至 pH 约为 2, 用乙酸乙酯萃取 3 次(500 ml 和 2 x 200 ml)。合并的有机相用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 然后蒸发至干。粗产物(24 g)通过制备型 HPLC 用乙腈/水作为洗脱剂纯化。蒸发收集的流分, 除去乙腈。其余的水相用乙酸乙酯萃取, 有机相用硫酸钠干燥, 然后蒸发至干。残留物中加入水(200 ml), 用 0.1 M NaOH (aq)将 pH 小心调节至 7, 该过程中残留物缓缓溶解。中和后, 将含水溶液冻干。

### 实施例 2: 通过 DNP 方法用 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和实施例 1 的三苯甲基基团制备含超极化 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物

将 5.0 mg 实施例 1 的基团溶于  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸(164  $\mu\text{l}$ )中制备 20 mM 的溶液。将样品混匀, 将溶液(41 mg)的等分试样放入样品杯中并插入 DNP 极化器中。

样品在 DNP 条件下, 于 1.2 K, 在 3.35 T 磁场中, 用微波照射(93.950 GHz)。2 小时后停止极化, 将样品用溶解装置按照 WO-A-02/37132 溶于氢氧化钠和三(羟基甲基)-氨基甲烷(TRIS)的水溶液中, 得到超极化  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸钠的中性溶液。溶解的样品用  $^{13}\text{C}$ -NMR 快速分析评价极化效果, 得到 19.0 %的  $^{13}\text{C}$  极化率。

### 实施例 3: 通过 DNP 方法用 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和实施例 1 的三苯甲基基团产生含超极化 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物

将实施例 1 的基团(209.1 mg)溶于  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸(553 mg)和未标记的丙酮酸(10.505 g)的混合物中制备 15 mM 的溶液。将样品混匀, 将溶液(2.015 g)的等分试样放入样品杯中并插入 DNP 极化器中。

样品在 DNP 条件下, 于 1.2 K, 在 3.35 T 磁场中, 用微波照射(93.950 GHz)。4 小时后停止极化, 将样品用溶解装置按照 WO-A-02/37132 溶于氢氧化钠和三(羟基甲基)-氨基甲烷(TRIS)的水溶液中, 得到超极化  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸钠的中性溶液, 在 100 mM TRIS 缓冲液中的丙酮酸盐的总浓度为 0.5 M。将溶解装置与色谱柱相串联。色谱柱为含疏水填充材料(Bondesil-C18, 40UM Part #:12213012)(Varian)的柱(D = 38 mm; h = 10 mm)。溶液的样品通过选择性吸收该基团的

色谱柱。过滤的溶液用  $^{13}\text{C}$ -NMR 快速分析, 评价极化效果, 得到 16.5% 的  $^{13}\text{C}$  极化率。残留的基团浓度随后用 UV 分光光度计在 469 nm 分析, 确定其低于 0.1  $\mu\text{M}$  的检测限。

**实施例 4: 通过 DNP 方法用  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和三(8-羧基-2,2,6,6-四(羟基-乙氧基)甲基-苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐产生超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐**

三(8-羧基-2,2,6,6-四(羟基乙氧基)甲基-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐的合成如 WO-A-97/09633 的实施例 29 所述。

将三(8-羧基-2,2,6,6-四(羟基乙氧基)甲基-苯并[1,2-d:4,5-d']-双(1,3)-二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐溶于  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸(83.1 mg)中制备 20 mM 的溶液。将样品混匀, 放入样品杯中并插入 DNP 极化器中。样品在 DNP 条件下, 于 1.2 K, 在 3.35 T 磁场中, 用微波照射(93.950 GHz)。用 Varian Inova-200 NMR 光谱仪获取样品的  $^{13}\text{C}$ -NMR 信号。用  $^{13}\text{C}$ -NMR 信号和增强的 NMR 信号的热平衡测定值计算 DNP 增益 (enhancement)。得到 16% 的  $^{13}\text{C}$  极化率。

**实施例 5: 本发明的心脏成像序列**

### 5.1 猪制备

用输注泵以 0.6 ml/min 的速率用含等渗的 NaCl (26 vol %)、Ketalar (50 mg/ml)(Pfizer AB)(42 vol %)、Norcuron (10 mg + 5ml 无菌水)(Organon)(21 vol %)和咪达唑仑(5 mg/ml)(Pharma Hameln)(11 %vol)的鸡尾酒制剂对猪(25 kg)进行麻醉。

首次注射  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐后, 将猪从 MR 扫描仪取下。在 X 射线引导下, 将气球导管插入左冠状动脉, 将旋动脉(circumflexa)堵塞 15 分钟。在整个操作过程中测量 ECG 和血压。局部缺血阶段结束后 90 分钟, 再次对猪成像, 获取与对照(大致)相同位置的  $^{13}\text{C}$ -图像。

### 5.2 质子 MR 成像

将猪置于猪 MR 线圈中(Rapid Biomedical, Germany)并用标准临

床心脏质子 MR 成像序列文库成像, 得到解剖学信息, 并得到心肌的短轴方向的视图(参见图中的质子参比图像, 可见到短轴视图的实例)。

### 5.3 $^{13}\text{C}$ -MR 成像

基于 MR 系统测得的质子频率, 按照以下方程式计算  $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的 MR 频率:

$$^{13}\text{C}_1\text{-丙氨酸的频率} = 0.25144 \times [(\text{系统质子频率} \times 1.00021) - 0.000397708]$$

计算所得的频率, 确定了  $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸产生 MR 信号在共振中的位置,  $^{13}\text{C}_1$ -乳酸盐位于  $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的左边,  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐与  $^{13}\text{C}_1$ -碳酸氢盐共振位于  $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的右边。运行未定位的 MR 光谱序列, 以确保  $^{13}\text{C}$ -MR 线圈和系统 MR 频率被正确设置。 $^{13}\text{C}$ -图像位置覆盖于心肌上(短轴视图)(切片厚度 20 mm, 平面像素尺寸  $7.5 \times 7.5 \text{ mm}^2$ )。在重新构建阶段, 对图像数据进行零点充填(zero-filled), 以产生  $3.75 \times 3.75 \times 20 \text{ mm}^3$  分辨率。在 12 s (1.3 ml/s) 时间内, 将 16 ml 的  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐 (327 mM) 静脉注射 (0.22 mmol/kg) 入前腿内, 注射开始 30 s 后(即注射结束后 18 s), 开始化学位移  $^{13}\text{C}$ -MR 序列。

### 5.4 MR 成像数据的分析

MR 成像产生含  $16 \times 16$  元素的矩阵, 其中每个元素或体素/像素包含  $^{13}\text{C}$ -MR 光谱。在重新构建阶段, 矩阵被零点充填至  $32 \times 32$ , 一种帮助改善空间分辨率的数学操作。在 MRI 扫描仪上用生产商提供的软件分析数据组。产生  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}$ -丙氨酸、 $^{13}\text{C}$ -乳酸盐和  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐的代谢图像。

### 5.5 结果

在堵塞旋动脉之前和之后所得的试验结果显示并总结于附图中。

图 1 显示了局部缺血阶段之前, 猪的图像和谱图, 其中图 1a 显示  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐图像



图 1b 显示  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐图像

图 1c 显示  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸图像

图 1d 显示质子参比解剖学图像

图 1e 显示  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐图像, 以及

图 1f 显示选自图 1e 中所示图像的像素的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱图

图 2 显示了局部缺血阶段之后, 猪的图像和谱图, 其中

图 2a 显示  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐图像

图 2b 显示  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐图像

图 2c 显示  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸图像

图 2d 显示质子参比解剖学图像

图 2e 显示  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐图像, 以及

图 2f 显示选自图 2e 中所示图像的像素的  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱图。

附图显示出, 局部缺血阶段之前和之后的质子参比图像没有差异。此外, 碳酸氢盐信号(相比于对照)显著减少, 以及乳酸盐信号的阳性对比表明心肌组织有危险。局部缺血阶段之前和之后的丙氨酸和丙酮酸盐图像没有差异。

## 5.6 结论

通过使用超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐作为 MR 成像检验中的成像剂, 可鉴别有危险的心肌组织。

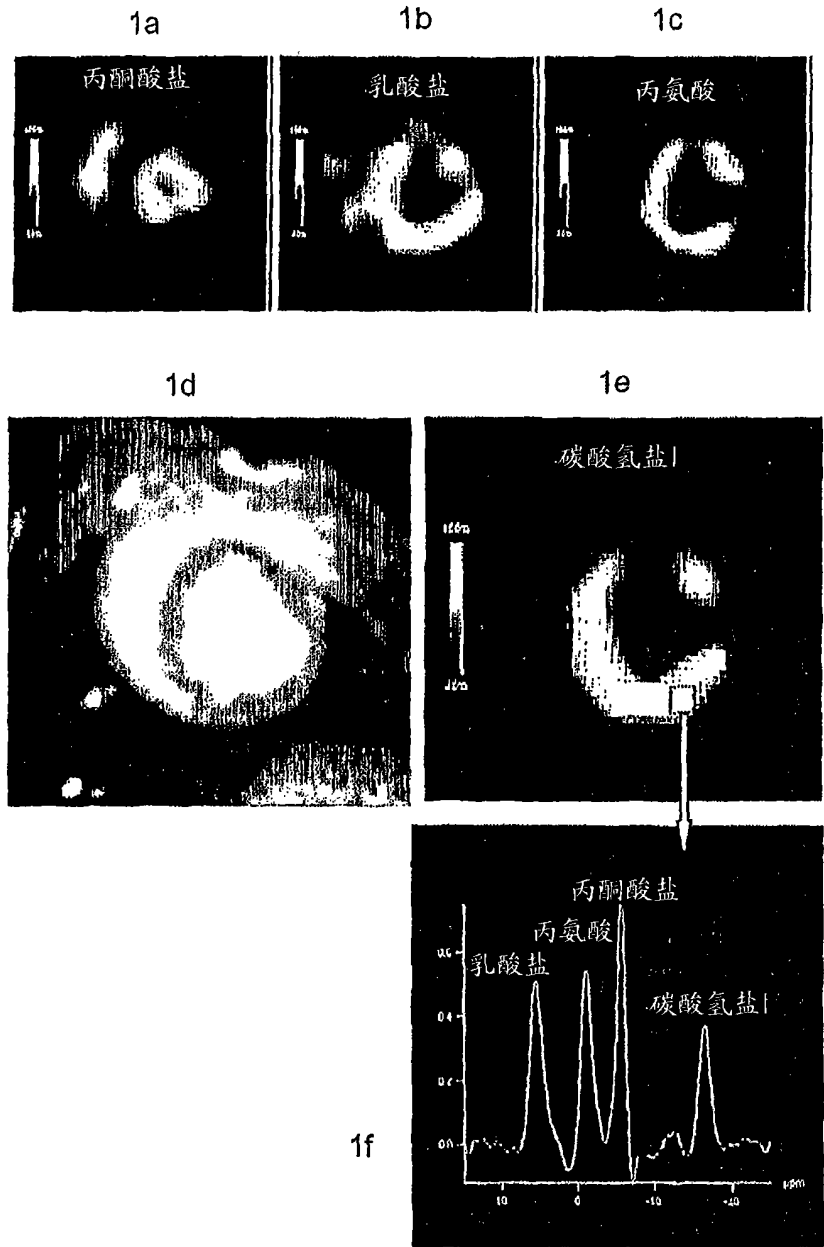


图 1

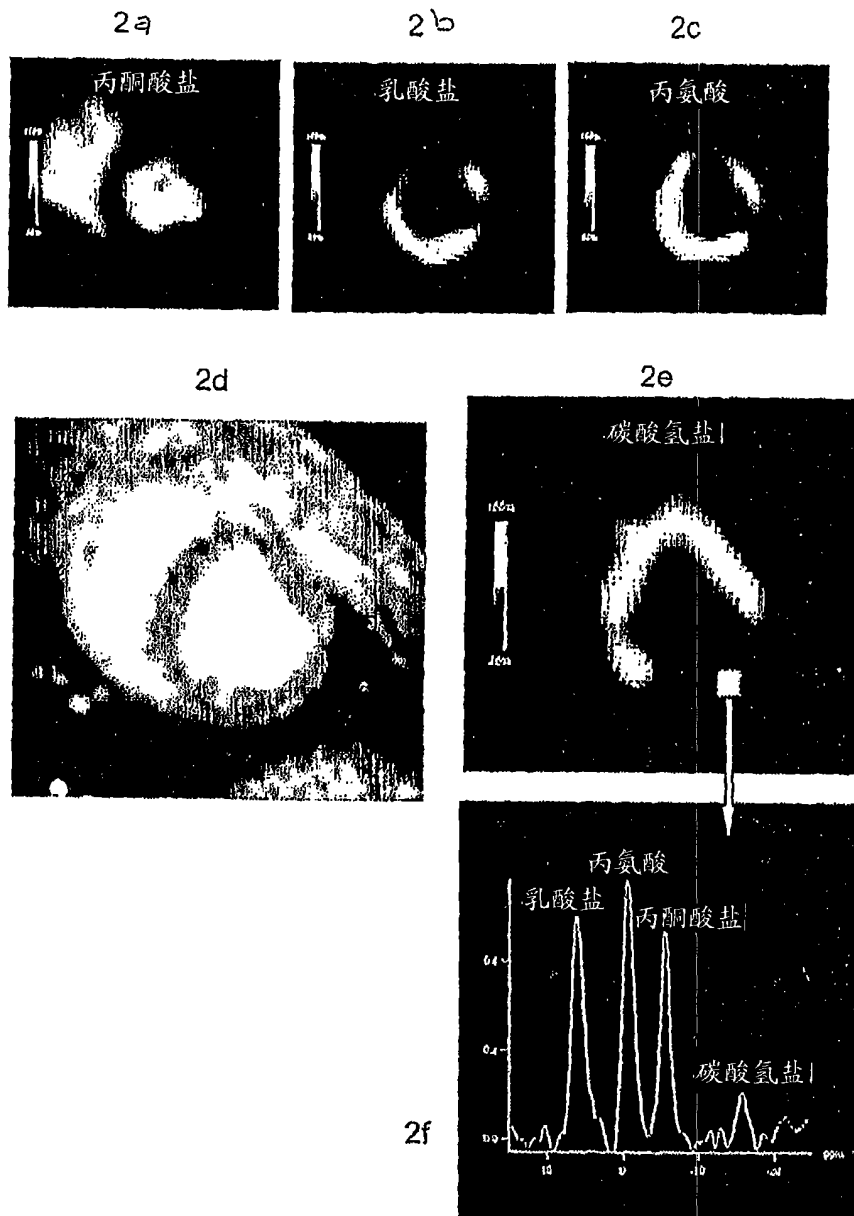


图 2