[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 49/10 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780030593.4

[43] 公开日 2009 年 8 月 12 日

[11] 公开号 CN 101505802A

[22] 申请日 2007.8.17
[21] 申请号 200780030593.4
[30] 优先权
[32] 2006.8.18 [33] NO [31] 20063701
[86] 国际申请 PCT/NO2007/000287 2007.8.17
[87] 国际公布 WO2008/020765 英 2008.2.21
[85] 进入国家阶段日期 2009.2.17
[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 K·M·布林德尔 S·E·戴
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 健 黄可峻
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 1 页

[54] 发明名称

含有乳酸盐类和超极化的^{13}C-丙酮酸盐的成像介质

[57] 摘要

本发明涉及含有乳酸盐类和超极化的^{13}C-丙酮酸盐的成像介质，制备所述成像介质的方法，所述成像介质的应用，以及其中使用所述成像介质的^{13}C-MR 成像和/或^{13}C-MR 光谱的方法。

1. 包含乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质。

2. 权利要求 1 的成像介质，其中所述成像介质包含大约相等或相等浓度的乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐。

3. 权利要求 1 或 2 的成像介质，其中所述乳酸盐类选自乳酸、乳酸钠或乳酸锂。

4. 权利要求 1-3 任一项的成像介质，其中所述成像介质还包含水载体。

5. 权利要求 1-4 任一项的成像介质，其中所述成像介质还包含常规可药用载体和/或赋形剂和/或制剂助剂。

6. 用于体内 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的权利要求 1-5 任一项的成像介质。

7. 权利要求 1-4 任一项的成像介质，其中所述成像介质还包含一种或多种非水溶剂，优选 DMSO 和/或甲醇。

8. 用于体外 ^{13}C- MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的权利要求 1-4 和 7 任一项的成像介质。

9. 权利要求 1-6 任一项的成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物身体中代谢过程体内研究中的应用。

10. 权利要求 7-8 任一项的成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物身体中肿瘤组织体内鉴定中的应用。

11. 权利要求 1-6 任一项的成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物身体中心肌组织存活力的体内评估中的应用。

12. 权利要求 1-6 任一项的成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物身体中细胞死亡的体内检测中的应用。

13. 权利要求 7 和 8 任一项的成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的细胞培养物、得自人或非人身体的样本或离体组织中代谢过程体外研究中的应用。

14. 权利要求 7 和 8 任一项的成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的细胞培养物、得自人或非人身体的样本或离体组织中肿瘤细胞的体外鉴定中的应用。

15. 权利要求 7 和 8 任一项的成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或

^{13}C-MR 光谱的细胞培养物、得自人或非人身体的样本或离体组织中细胞死亡的体外检测中的应用。

16. 制备权利要求 1-8 任一项的成像介质的方法，其中通过 ^{13}C-丙酮酸或 ^{13}C-丙酮酸盐的动态核极化获得超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，并且将乳酸盐类加到所述超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的溶液中。

17. 使用权利要求 1-8 任一项的成像介质的 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的方法。

含有乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质

本发明涉及含有乳酸盐类（lactate）和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质，制备所述成像介质的方法，所述成像介质的应用，以及其中应用所述成像介质的 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱学的方法。

磁共振(MR)成像(MRI)已成为对医师特具吸引力的成像技术，因为它可以以非侵入性的方式获得患者的身体或其部分的图像，并且不会使得患者和医护人员暴露于可能有害的射线诸如 X-射线中。由于它的高质量图像和良好的时空分辨率，MRI 是对于成像软组织和器官有利的成像技术。

可用或不用 MR 造影剂进行 MRI。然而，对比增强的 MRI 通常使探测更小的组织变化成为可能，这使其成为探测早期组织变化例如小的肿瘤或转移的强有力工具。

几种类型的造影剂已被用于 MRI。可溶于水的顺磁性金属螯合剂，例如，钆螯合物，如 Omniscan™ (GE Healthcare)是广泛使用的 MR 造影剂。由于它们的低分子量，当将它们给予血管系统内时，它们迅速分布于细胞外空间(即血液和间隙组织)内。它们也相当迅速地从身体中清除。

另一方面，血池 MR 造影剂，例如超顺磁性氧化铁颗粒，在血管系统中长时间滞留。已经证明，它们在肝脏中非常有益于增强对比，但也检测出毛细血管渗透性异常，如，由肿瘤血管生成引起的肿瘤中“渗漏的”毛细血管壁。

尽管上述的造影剂具有无异议的卓越特性，但是它们的应用并非无任何风险。虽然顺磁性金属螯合物通常具有高度稳定性常数，但在给药后毒性金属离子可能在体内释放。再有，这些类型的造影剂表现出不佳的特异性。

WO-A-99/35508 公开了对患者采用高 T_1 剂的超极化溶液作为 MRI 造影剂的 MR 研究方法。术语“超极化”意指，提高存在于高 T_1 剂中的 NMR 活性核，即具有非零核自旋的核，优选 ^{13}C-或 ^{15}N-核的核极化。一旦提高了 NMR 活性核的核极化，这些核的激发态和基态核自旋状态之间的总体差(population difference)显著增加，因此 MR 信号强度成百

倍因数及以上的地放大。当使用超极化的富含 ^{13}C-和/或 ^{15}N-高 T_1 剂时，它们将基本上不受背景信号的影响，因为 ^{13}C 和/或 ^{15}N 的天然丰度可以忽略不计，因此图像对比将有利地高。常规 MRI 造影剂和这些超极化的高 T_1 剂的主要差别是，前者的对比变化是通过影响身体中水质子的弛豫时间引起的，而后一类试剂可被认为是非放射性示踪剂，因为获得的信号单独由该试剂引起。

在 WO-A-99/35508 中，公开了用作 MR 成像剂的多种可能的高 T_1 剂，包括非内源性和内源性化合物，如乙酸盐、丙酮酸盐、草酸盐或葡糖酸盐，糖如葡萄糖或果糖，脲，酰胺，氨基酸如谷氨酸盐、甘氨酸、半胱氨酸或天冬氨酸盐，核苷、维生素如抗坏血酸，青霉素衍生物和磺胺类。还据称诸如柠檬酸循环之类的代谢循环中的中间体是用于代谢活性的 MR 成像的优选成像剂。

在人和非人动物体内代谢过程起作用的超极化的 MR 成像剂具有重大的意义，因为这些超极化的成像剂可用于体内 MR 研究中以获得有关组织代谢状态的信息，即它们用于代谢活动的体内成像。例如，组织代谢状态的信息可被用于辨别健康和病变组织。

丙酮酸盐是在柠檬酸循环和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐转化为其代谢物超极化的 ^{13}C-乳酸盐类中起作用的化合物，超极化的 ^{13}C-碳酸氢盐和超极化的 ^{13}C-丙氨酸可用于人体代谢过程的体内 MR 研究。例如，如在 WO-A-2006/011810 中详细描述的那样，超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐可用作体内肿瘤成像的 MR 成像剂，并且如在 WO-A-2006/054903 中详细描述的那样，通过 MR 成像用于评估心肌组织生存能力。

丙酮酸盐是内源性化合物，甚至在高浓度情况下也被人体非常良好地耐受。作为柠檬酸循环中的前体，丙酮酸盐在人体中起重要的代谢作用。丙酮酸盐被转化为不同的化合物：其氨基交换生成丙氨酸，经由氧化脱羧作用，丙酮酸盐被转化为乙酰辅酶 A 和二氧化碳(其进一步被转化成碳酸氢盐)，丙酮酸盐的还原生成乳酸盐类，并且其羧基化生成草酰乙酸盐。

而且，超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐代谢转化为其代谢物超极化的 ^{13}C-乳酸盐类、超极化的 ^{13}C-碳酸氢盐(仅在 $^{13}C_1$-丙酮酸盐、$^{13}C_{1,2}$-丙酮酸盐或 $^{13}C_{1,2,3}$-丙酮酸盐情况下)和超极化的 ^{13}C-丙氨酸，可用于人体代谢过程的体内 MR 研究。^{13}C-丙酮酸盐在人全血中于 37°C 具有约 42 秒的

T1 弛豫，然而，已发现超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐转化为超极化的 ^{13}C-乳酸盐类、超极化的 ^{13}C-碳酸氢盐和超极化的 ^{13}C-丙氨酸足够迅速，以致能检测来自 ^{13}C-丙酮酸盐母体化合物及其代谢物的信号。丙氨酸、碳酸氢盐和乳酸盐类的量取决于被研究组织的代谢状态。超极化的 ^{13}C-乳酸盐类、超极化的 ^{13}C-碳酸氢盐和超极化的 ^{13}C-丙氨酸的 MR 信号强度与在检测时剩下的这些化合物的量和极化的程度相关，因此，通过监测超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐向超极化的 ^{13}C-乳酸盐类、超极化的 ^{13}C-碳酸氢盐和超极化的 ^{13}C-丙氨酸的转化，使通过使用非侵入性 MR 成像或 MR 光谱学研究人或非人动物体内代谢过程成为可能。

由不同的丙酮酸盐发生的 MR 信号振幅因组织的类型而异。由丙氨酸、乳酸盐类、碳酸氢盐和丙酮酸盐形成的独特的代谢峰图样能够用作被检查组织的代谢状态的指纹(fingerprint)。

现在已经发现，含有非超极化的乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的 MR 成像剂，较之单独的超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，具有更好的特性。这样的成像剂的使用导致可观察到的 ^{13}C-乳酸盐类的量增加，因而从 ^{13}C-乳酸盐类产生的 MR 信号增强。如 WO-A-2006/011810 中所描述的那样，由 ^{13}C-乳酸盐类产生的信号是监测 MR 肿瘤成像的信号，其中肿瘤组织是通过高 ^{13}C-乳酸盐类信号指示的。因为由 ^{13}C-乳酸盐类产生的信号增强，所以可以在非常早的阶段探测较小的肿瘤或肿瘤组织。如 WO-A-2006/054903 中所描述，由 ^{13}C-乳酸盐类产生的信号也是监测 MR 心脏成像的信号，其中心肌组织濒临危险，即由最低的 ^{13}C-碳酸氢盐信号和/或最高的 ^{13}C-乳酸盐类信号鉴定的缺血性心肌组织。此外，由 ^{13}C-乳酸盐类产生的信号是监测细胞死亡的 MR 成像的信号，其中死亡组织是通过低 ^{13}C-乳酸盐类信号或没有 ^{13}C-乳酸盐类信号指示的。

因此，在本发明的第一个方面，提供了使用含有乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质的 ^{13}C-MR 成像或 ^{13}C-MR 光谱的方法。

术语“超极化”和“极化”在下文中可交互使用，表示核的极化水平过量 0.1%，更优选过量 1%，最优选过量 10%。

可以通过固态超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，例如通过 ^{13}C-丙酮酸盐的动态核极化(DNP)获得的固态超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐中的固态 ^{13}C-NMR 测量值来确定极化水平。固态 ^{13}C-NMR 测量值优选由使用低倾倒角(low flip angle)的单脉冲捕获 NMR 序列(simple pulse-acquire NMR

sequence)组成。将 NMR 光谱中的超极化 ^{13}C-丙酮酸盐的信号强度与极化过程前获得的 NMR 光谱中的 ^{13}C-丙酮酸盐的信号强度进行比较。然后由极化前和极化后的信号强度的比率计算极化水平。

采用类似的方法，可以通过液态 NMR 测量值，来确定溶解的超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的极化水平。再次将溶解的超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的信号强度与极化前的溶解的 ^{13}C-丙酮酸盐的信号强度比较。然后从极化前和极化后的 ^{13}C-丙酮酸盐的信号强度的比率计算极化水平。

术语“成像介质”是指含有超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐作为 MR 活性剂，即成像剂和非超极化的乳酸盐类的液体组合物。本发明成像介质可以在 MR 成像中用作成像介质或者在 MR 光谱中用作 MR 光谱剂。

可以将用于本发明方法的成像介质用作体内 ^{13}C-MR 成像或光谱的成像介质，即在活的人或非人动物中。而且，可以将用于本发明方法的成像介质用作体外 ^{13}C-MR 成像或光谱的成像介质，例如在细胞培养物，得自人或非人体的样本例如尿、唾液、血液，或者在离体(*ex vivo*)组织例如得自活组织检查的离体组织中。

用于本发明方法的超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的同位素富集优选是至少 75%，更优选至少 80%，而特别优选至少 90%，超过 90%的同位素富集是最优选的。理想地，富集是 100%。用于本发明方法的 ^{13}C-丙酮酸盐可以在 C1-位(下文表示为 $^{13}C_1$-丙酮酸盐)，在 C2-位(下文表示为 $^{13}C_2$-丙酮酸盐)，在 C3-位(下文表示为 $^{13}C_3$-丙酮酸盐)，在 C1-和 C2-位(下文表示为 $^{13}C_{1,2}$-丙酮酸盐)，在 C1-和 C3-位(下文表示为 $^{13}C_{1,3}$-丙酮酸盐)，在 C2-和 C3-位(下文表示为 $^{13}C_{2,3}$-丙酮酸盐)或在 C1-、C2-和 C3-位(下文表示为 $^{13}C_{1,2,3}$-丙酮酸盐)是同位素富集的。在 C1-位上的同位素富集是优选的，因为与在其他 C-位上同位素富集的 ^{13}C-丙酮酸盐相比，$^{13}C_1$-丙酮酸盐在人全血中于 37℃具有更高的 T_1 驰豫(约 42 s)。

NMR 活性 ^{13}C-核的超极化可以通过不同的方法来实现，所述方法描述于 WO-A-98/30918、WO-A-99/24080 和 WO-A-99/35508 中，所述专利引入本文以供参考，并且超极化方法是由稀有气体，“强制力”，自旋冷冻，仲氢方法和动态核极化(DNP)的极化转移。

为了获得超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，优选直接极化 ^{13}C-丙酮酸盐，或者将 ^{13}C-丙酮酸极化并将 ^{13}C-丙酮酸转化为极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，例如通过用碱中和来进行转化。

获得超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的一种适宜的方法是从 WO-A-98/30918 中描述的超极化的稀有气体的极化转移。通过使用循环偏振光可以将具有非零核自旋的稀有气体超极化。可以用超极化的稀有气体，优选 He 或 Xe，或者这样的气体的混合物来进行 ^{13}C-核的极化。超极化的气体可以是气相，可以溶解在液体/溶剂中，或者超极化的本身可以作为溶剂。或者，可以将气体冷凝到冷的固体表面上并以这样的方式使用，或者让之升华。优选将超极化的气体与 ^{13}C-丙酮酸盐或 ^{13}C-丙酮酸充分混合。因此，如果 ^{13}C-丙酮酸是极化的，其在室温是液体，那么优选将超极化的气体溶解在液体/溶剂中或者作为溶剂。如果 ^{13}C 丙酮酸盐是极化的，那么优选将超极化的气体溶解在也溶解丙酮酸盐的液体/溶剂中。

获得超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的另一种适宜的方法是通过在非常低的温度下和高场中的热力学平衡将 ^{13}C-核极化。与 NMR 光谱计的工作场和温度相比，超极化是通过使用非常高的场和非常低的温度(强制力)来进行。使用的磁场强度应当尽可能的高，适宜地高于 1 T，优选高于 5 T，更优选 15 T 或更高，而特别优选 20 T 或更高。温度应当非常低，例如 4.2 K 和更低，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。

获得超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的另一方法是旋转冷冻法。该方法涉及通过旋转冷冻极化将固体化合物或系统旋转极化。将系统用合适的结晶顺磁性材料掺杂或成分混合，所述结晶顺磁性材料具有三级或更高级对称轴，并且是例如 Ni^{2+}、镧系元素或锕系元素离子。该仪器操作比 DNP 所需的仪器操作简单，不需要均匀磁场，因为施加没有施加任何共振激发。该方法通过将样本沿着垂直于磁场方向的轴物理旋转来进行。该方法的必要条件是，顺磁物质具有高的各项异性 g-因子。作为样本旋转的结果，电子顺磁共振将与核自旋接触，导致核自旋温度下降。进行样本旋转直至 & 自旋极化达到新的平衡。

在优选的实施方案中，使用 DNP (动态核共振)来获得超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐。在 DNP 中，欲极化的化合物中 MR 活性核的极化通过极化剂或所谓的 DNP 剂来进行，DNP 剂是包含未配对电子的化合物。在 DNP 处理期间，提供能量，通常是以微波辐射形式提供能量，能量最初将激发 DNP 剂。在衰退到基态后，极化从 DNP 剂的未配对电子上

转移到欲极化的化合物的 NMR 活性核上，例如 ^{13}C-丙酮酸盐中的 ^{13}C 核上。通常，在 DNP 方法中使用中等或高的磁场以及非常低的温度，例如在液氦以及约 1T 或更高的磁场中进行 DNP 方法。或者，可以采用中等磁场以及实现足够极化提高的任何温度。DNP 技术例如进一步描述在 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中，二者均引入本文以供参考。

为了通过 DNP 方法将化合物极化，制备欲极化的化合物与 DNP 剂的混合物(“样本”)，然后将其冷冻，并且插到用于极化的 DNP 偏振器内。极化后，通过熔化或者通过溶解在合适的溶解介质中而将冷冻固体极化样本迅速转化成液态。溶解是优选的，并且冷冻极化样本的溶解方法及其合适的装置详细描述在 WO-A-02/37132 中。熔化方法以及用于熔化的合适的装置例如描述在 WO-A-02/36005 中。

为了在欲极化的化合物中获得高的极化水平，在 DNP 方法期间，需要将所述化合物与 DNP 剂充分接触。如果样本在冷冻或冷却之后结晶，则不是这样。为了避免结晶，样本中需要存在玻璃状物前体或者需要针对极化来选择冷冻后不会结晶而是形成玻璃状物的化合物。

如上所述，^{13}C-丙酮酸或 ^{13}C-丙酮酸盐是适于获得超极化 ^{13}C-丙酮酸盐的原料。

同位素富集的 ^{13}C-丙酮酸盐可商购获得，例如作为 e.g. as sodium ^{13}C-丙酮酸钠商购获得。或者，其可以按照 S. Anker，J. Biol. Chem 176，1948，133-1335 中描述的方法来合成。

合成 $^{13}C_1$-丙酮酸的几种方法是本领域已知的。简言之，Seebach 等人，Journal of Organic Chemistry 40(2)，1975，231-237 描述了一种合成途径，该合成途径依赖含羰基原料作为 S,S-缩醛，例如 1,3-二噻烷或 2-甲基-1,3-二噻烷的保护和激活。将该噻烷金属化，并且与含有甲基的化合物和/或 $^{13}CO_2$ 反应。如该参考文献所述，通过使用合适的同位素富集的 ^{13}C-成分，可以获得 $^{13}C_1$-丙酮酸盐、$^{13}C_2$-丙酮酸盐或 $^{13}C_{1,2}$-丙酮酸盐。然后通过使用该文献中描述的常规方法将羰基官能团释放出来。不同的合成途径由乙酸开始，首先将乙酸转化成乙酰溴，然后与 $Cu^{13}CN$ 反应。将所获得的腈经由酰胺转化成丙酮酸(参见例如 S.H. Anker 等人，J. Biol. Chem. 176 (1948)，1333 或 J. E. Thirkettle，Chem Commun. (1997)，1025)。此外，^{13}C-丙酮酸可以通过将商购获得的 ^{13}C-

丙酮酸钠质子化，例如通过 US 专利 6,232,497 中描述的方法或者通过 WO-A-2006/038811 中描述的方法来质子化。

通过 DNP 将 ^{13}C-丙酮酸超极化详细描述于 WO-A1-2006/011809 中，该文献引入本文以供参考。简言之，^{13}C-丙酮酸可以直接用于 DNP，因为其在冷冻时形成玻璃状物。在 DNP 之后，冷冻的超极化的 ^{13}C-丙酮酸需要溶解和中和，即转化成 ^{13}C-丙酮酸盐。对于该转化，需要强碱。此外，因为 ^{13}C-丙酮酸是强酸，需要选择在该强酸中是稳定的 DNP 剂。优选的碱是氢氧化钠，并且用氢氧化钠转化超极化的 ^{13}C-丙酮酸，会生成超极化的 ^{13}C-丙酮酸钠，对于用于体内 MR 成像和/或光谱的成像介质，即在人或非人动物活体中进行的 MR 成像和/或光谱，其是优选的 ^{13}C-丙酮酸盐。

或者，^{13}C-丙酮酸盐，即 ^{13}C-丙酮酸的盐可用于 DNP。优选的盐是这样的 ^{13}C-丙酮酸盐，其包含选自下列的无机阳离子：NH_4^+、K^+、Rb^+、Cs^+、Ca^{2+}、Sr^{2+}和 Ba^{2+}，优选 NH_4^+、K^+、Rb^+或 Cs^+，更优选 K^+、Rb^+、Cs^+，最优选 Cs^+，如 PCT/NO07/00109 中详细描述，该文献引入本文以供参考。这些优选的 ^{13}C-丙酮酸盐的合成还公开在 PCT/NO07/00109 中。如果在用于体内 MR 成像和/或光谱的成像介质中使用超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，优选通过生理非常耐受的阳离子例如 Na^+或葡甲胺交换选自下列的无机阳离子：NH_4^+、K^+、Rb^+、Cs^+、Ca^{2+}、Sr^{2+}和 Ba^{2+}。这可通过本领域已知的方法，例如使用阳离子交换柱来进行。

另外优选的盐是有机胺或氨基化合物的 ^{13}C-丙酮酸盐，优选 TRIS-$^{13}C_1$-丙酮酸盐或葡甲胺-$^{13}C_1$-丙酮酸盐，如 WO-A-2007/069909 中详细描述，该文献引入本文以供参考。这些优选的 ^{13}C-丙酮酸盐的合成也公开在 WO-A-2007/069909 中。

如果在本发明方法中使用的超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐是通过 DNP 获得的，则包含 ^{13}C-丙酮酸或 ^{13}C-丙酮酸盐和 DNP 剂的欲极化样本还可以包含顺磁性金属离子。已经发现，在欲通过 DNP 极化的组合物中存在顺磁性金属离子导致 ^{13}C-丙酮酸/^{13}C-丙酮酸盐中的极化水平增，如 WO-A-2007/064226 中详细描述，该文献引入本文以供参考。

如上所述，根据本发明方法的成像介质可以用作用于体内 MR 成像和/或光谱，即在人或非人动物活体中进行的 MR 成像和/或光谱的成像介质。除了 MR 活性剂 ^{13}C-丙酮酸盐以外，这样的成像介质优选还

包含水载体，优选生理可耐受和生理可接受的水载体，例如水、缓冲溶液或盐水。这样的成像介质还可以包含常规药用或兽药用载体或赋形剂，例如制剂助剂，如常用于人药用或兽药用诊断组合物中的制剂助剂。

此外，根据本发明方法的成像介质可以用作用于体外 MR 成像和/或光谱，例如用于检测细胞培养物或离体组织中的细胞死亡的成像介质。除了 MR 活性剂 ^{13}C-丙酮酸盐以外，这样的成像剂优选还包含与体外细胞或组织分析相容并且用于体外细胞或组织的溶剂，例如 DMSO 或甲醇或包含水载体与非水溶剂的溶剂混合物，例如 DMSO 与水或缓冲溶液的混合物，或者甲醇与水或缓冲溶液的混合物。对于本领域技术人员来说显而易见的是，在这样的成像介质中可以存在可药用载体、赋形剂以及制剂助剂，但是对于这样的目的，这不是必需的。

用于本发明方法的成像介质包含乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐。乳酸盐类是非超极化的。在极化方法之后，将乳酸盐类适当地加到超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐中。加入乳酸盐类的几种方法是可能的。当极化方法生成包含超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的液体组合物时，可以将乳酸盐类溶解在所述液体组合物中，或者可以将乳酸盐类在合适的溶剂，优选水载体中的溶液加到液体组合物中。如果极化方法生成包含超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的固体组合物，可以将乳酸盐类溶解在用于溶解该固体组合物的溶解介质内。例如，可以将通过 DNP 方法极化的 ^{13}C-丙酮酸盐溶解在包含乳酸盐类的水载体例如水或缓冲溶液中。如果已经通过动态核极化获得了超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，则优选将乳酸盐类加到最终的液体组合物中，即在溶解/熔化之后加到液体组合物中，或者在除去 DNP 剂和/或任选顺磁性金属离子之后加到液体组合物中。也可以将乳酸盐类作为固体加到液体组合物中，或者优选溶解在合适的溶剂例如水载体如水或缓冲溶液中。为了促进乳酸盐类的溶解，可以使用本领域已知的几种手段例如搅拌、涡旋或超声处理。然而，迅速并且不需要混合装置或者有助于和液体组合物接触的方法是优选的。因此，方法例如涡旋或超声处理是优选的。

适当地，乳酸盐类以乳酸或乳酸的盐，优选乳酸锂或乳酸钠，最优选乳酸钠的形式加入。超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐和乳酸盐类在用于本发明方法的成像介质中的浓度是大约相等或相等的，或者乳酸盐类以

比 ^{13}C-丙酮酸盐低或高的浓度存在。如果例如成像剂含有 x M ^{13}C-丙酮酸盐，则其含有 x M 或大约 x M 或更低浓度的乳酸盐类，但是优选不低于 x M 的十分之一浓度的乳酸盐类，或更高浓度的乳酸盐类，但优选不超过 x M 的三倍浓度的乳酸盐类。在优选的实施方案中，乳酸盐类在用于本发明方法的成像介质中的浓度大约等于或者等于超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的浓度。术语“大约相等的浓度”是指乳酸盐类浓度是 ^{13}C-丙酮酸盐浓度的 100%+/- 30%，优选 100%+/- 20%，更优选 100%+/- 10%。

为了在本发明方法中用作用于体内 ^{13}C-MR 成像或 ^{13}C-MR 光谱的成像介质，将包含乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质作为适于给予人或非人动物活体的组合物来提供。成像介质优选包含水载体例如上述缓冲液或缓冲液的混合物。成像介质还可以包含常规可药用载体、赋形剂和制剂助剂。因此，成像介质可以例如包括稳定剂、渗透压调节剂、助溶剂等。

如果在本发明方法中使用的成像介质是用于体内 MR 成像或光谱，例如在人或非人动物活体中使用，则所述成像介质优选通过胃肠外途径，优选静脉内给予所述体内。通常，处于检查的身体的位置是位于 MR 磁体中。专用 ^{13}C-MR RF-线圈覆盖所关注的区域。成像介质的剂量和浓度将取决与多种因素，例如毒性和给药途径。适当地，成像介质以最高达 1 mmol ^{13}C-丙酮酸盐/kg 体重，优选 0.01-0.5 mmol/kg，更优选 0.1-0.3 mmol/kg 的剂量给药。给药速度优选小于 10 ml/s，更优选小于 6 ml/min，最优选为 5 ml/s-0.1 ml/s。在给药后不到 400 s，优选在给药后不到 120 s，更优选在给药后不到 60 s，尤其优选在给药后 20-50 s，施加 MR 成像程序，该成像程序以合并的频率和空间选择途径来编码所关注的体积。这将产生 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的代谢图像。施加 MR 程序的精确时间高度取决与所关注的体积。

为了在本发明方法中用作用于体外 ^{13}C-MR 成像或 ^{13}C-MR 光谱的成像介质，将包含乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质作为适于加到例如细胞培养物、得自人或非人身体的样本或离体组织例如活组织检查组织的组合物来提供。对于本领域技术人员来说，成像介质中还可以存在常规可药用载体、赋形剂和制剂助剂，但是对于这样的目的来说，这不是必需的，因此优选包含水载体例如上述缓冲液或

缓冲液的混合物和/或一种或多种与细胞培养物或组织相容的非水溶剂例如 DMSO 或甲醇。用于细胞培养物、得自人或非人身体的样本或离体组织例如活组织检查组织的成像介质优选包含 10 mM-100 mM 的 ^{13}C-丙酮酸盐，更优选 20 mM-90 mM，最优选 40-80 mM 的 ^{13}C-丙酮酸盐。

在进一步的方面，本发明提供了包含乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质。

在进一步优选的实施方案中，本发明成像介质包含大约相等或相等浓度的乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，或者包含浓度比 ^{13}C-丙酮酸盐低或高的乳酸盐类。如果例如成像剂含有 x M ^{13}C-丙酮酸盐，则其含有 x M 或大约 x M 或更低浓度的乳酸盐类，但是优选不低于 x M 的十分之一浓度的乳酸盐类，或更高浓度的乳酸盐类，但优选不超过 x M 的三倍浓度的乳酸盐类。在优选的实施方案中，乳酸盐类在本发明成像介质中的浓度大约等于或者等于超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的浓度。术语“大约相等的浓度”是指乳酸盐类浓度是 ^{13}C-丙酮酸盐浓度的 100%+/-30%，优选 100%+/-20%，更优选 100%+/-10%。

在另一个优选的实施方案中，乳酸盐类选自乳酸、乳酸锂或乳酸钠。

成像介质优选用于 ^{13}C-MR 成像或 ^{13}C-MR 光谱。

如果本发明成像介质是用作体内成像介质，即给予活的人或非人动物，则所述成像介质优选还包含水载体例如上述缓冲液或缓冲液的混合物。成像介质还可以包含常规可药用载体、赋形剂和制剂助剂。因此，成像介质可以例如包含稳定剂、渗透压调节剂、助溶剂等。

如果本发明成像介质是用于体外 ^{13}C-MR 成像或 ^{13}C-MR 光谱，其还可以如上所述包含可药用载体、赋形剂和制剂助剂。然而，对于本领域技术人员来说显而易见的是，对于这样的目的，可药用载体、赋形剂和制剂助剂不是必须存在。因此，成像介质优选还包含水载体例如上述缓冲液或缓冲液的混合物和/或一种或多种与细胞培养物或组织相容的非水溶剂例如 DMSO 或甲醇。

本发明的另一个方面是制备包含乳酸盐类和超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐的成像介质的方法，其中通过 ^{13}C-丙酮酸或 ^{13}C-丙酮酸盐的动态核极化来获得超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐，并且将乳酸盐类加到所述超极化的

^{13}C-丙酮酸盐的溶液中。

本发明的另一个方面是本发明成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物体内代谢过程的体内研究中的应用。

本发明的另一个方面是本发明成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的细胞培养物、得自人或非人动物身体的样本或离体组织中代谢过程的体外研究中的应用。

本发明的另一个方面是本发明成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物身体中肿瘤组织体内鉴定中的应用。

本发明的另一个方面是本发明成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的细胞培养物、得自人或非人动物身体的样本或离体组织中肿瘤细胞体外鉴定中的应用。

用于肿瘤组织的体内鉴定和肿瘤细胞的体外鉴定的合适的 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱方案描述在 WO-A-2006/011810 中。

本发明的另一个方面是本发明成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物身体中心肌组织存活力的体内评估中的应用。

用于人或非人动物身体中心肌组织存活力的体内评估的合适的 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱方案描述在 WO-A-2006/054903 中。

本发明的另一个方面是本发明成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的人或非人动物身体中细胞死亡的体内检测中的应用。

本发明的另一个方面是本发明成像介质在使用 ^{13}C-MR 成像和/或 ^{13}C-MR 光谱的细胞培养物、得自人或非人动物身体的样本或离体组织中细胞死亡的体外检测中的应用。

细胞死亡(例如细胞程序死亡和坏死)可以通过本发明方法，根据 ^{13}C-丙酮酸盐的信号及其代谢物 ^{13}C-乳酸盐类的信号随着时间的改变来检测。在活细胞中，^{13}C-丙酮酸盐信号随着时间而衰退。^{13}C-乳酸盐类信号首先由于 ^{13}C-丙酮酸盐代谢转化为 ^{13}C-乳酸盐类而增加，然后由于驰豫而缓慢地降低。在死亡细胞中，^{13}C-丙酮酸盐代谢转化为 ^{13}C-乳酸盐类大大地降低，并且，虽然 ^{13}C-丙酮酸盐信号随着时间而衰退，但是根据细胞死亡的程度/垂死/死亡细胞的量，^{13}C-乳酸盐类信号只有轻微的增加，或者可能根本检测不到。虽然不希望受缚于理论，但是我们相信这是由于乳酸脱氢酶的活性损失所致，乳酸脱氢酶催化丙酮

酸盐与乳酸盐类的相互转化，伴随 NADH 与NAD^+的相互转化，和/或由于辅因子 NADH 和NAD^+的损失和/或由于细胞乳酸盐类浓度下降所致。

通过用依托泊苷处理而被诱导以经历细胞死亡的 EL-4 鼠淋巴瘤细胞的酸提取物的 ^{31}P-NMR 测量已经证实了，当与未处理的对照细胞相比，从 NAD(H)产生的共振强度下降。NAD(H)的损失可以通过酶聚-ADP-核糖聚合酶(PARP)的 DNA 损害诱导的激活来解释，该酶将多种不同的蛋白聚腺苷酸化，并且使用 NAD^+作为底物。从糖酵解中间体果糖-1,6-二磷酸(FBP)产生的共振也增加，这可通过糖酵解酶甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)通过其辅酶 NAD(H)的损失的抑制来解释。使用竞争性抑制剂(20 mM 烟酰胺)或 3-氨基苯甲酰胺(10 mM)抑制 PARP 活性抑制了 NAD(H)的损失，并且在细胞程序死亡的细胞中观测到的 FBP 浓度增加。

这种由于 PARP 激活而导致的 NAD(H)损失应当还抑制乳酸脱氢酶(LDH)活性，以及因此测量的在丙酮酸盐与乳酸盐类之间的 ^{13}C-标记的通量。与该假设一致的是，观察到用烟酰胺与依托泊苷或者 3-氨基苯甲酰胺与依托泊苷处理的细胞保持了他们在丙酮酸盐与乳酸盐类池之间转移超极化的 ^{13}C-标记的能力，同时仍然表现出如使用荧光显微镜检查所检测的垂死细胞的共有形态学特征。

如果本发明成像介质用于在体外检测细胞死亡，例如用于在细胞培养物、得自人或非人动物身体的样本或离体组织中检测细胞死亡，则成像介质包含 10 mM-50 mM 的 ^{13}C-丙酮酸盐，优选 20 mM-40 mM。

如果本发明成像介质用于在体内检测细胞死亡，即用于在活的人或非人动物身体中检测细胞死亡，则本发明成像介质优选通过胃肠外途径，优选静脉内给予所述体内。通常，处于检查的身体的位置是位于 MR 磁体中。专用 ^{13}C-MR RF-线圈覆盖所关注的区域。成像介质的剂量和浓度将取决与多种因素，例如毒性和给药途径。适当地，成像介质以最高达 1 mmol ^{13}C-丙酮酸盐/kg 体重，优选 0.01-0.5 mmol/kg，更优选 0.1-0.3 mmol/kg 的剂量给药。给药速度优选小于 10 ml/s，更优选小于 6 ml/min，最优选为 5 ml/s-0.1 ml/s。在给药后不到 400 s，优选在给药后不到 120 s，更优选在给药后不到 60 s，尤其优选在给药后 20-50 s，施加 MR 成像程序，该成像程序以合并的频率和空间选择途

径来编码所关注的体积。这将产生 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的代谢图像/光谱。对于检测细胞程序死亡，施加 MR 程序的精确时间高度取决与所关注的体积。

施加以合并的频率和空间选择途径来编码所关注体积的 MR 成像程序，在从加入成像剂(t=0)到约 10 分钟，优选 6 分钟，更优选 5 分钟的期间内，通过 MR 成像或光谱来测定 ^{13}C-丙酮酸盐的 ^{13}C-MR 信号之后。在相同时间期间内，监测 ^{13}C-乳酸盐类信号的出现、增加以及随后的下降。为了达到定量评估，可以进行健康细胞或组织的 MR 成像或光谱，并且可以比较结果–即在给定时间期间内形成的乳酸盐类的量。

所关注体积的编码可以通过使用所谓的光谱成像程序来实现，如例如 T.R. Brown 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79，3523-3526 (1982)；A. A. Maudsley，等人，J. Magn. Res 51，147-152 (1983)中所述。光谱图像数据含有多个体积元素，其中每个元素含有完全的 ^{13}C-MR 光谱。^{13}C-丙酮酸盐及其代谢物 ^{13}C-乳酸盐类在 ^{13}C-MR 光谱中具有其独特的位置，并且其共振频率可以用于鉴定它们。该峰在其共振频率的积分与 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的量直接相关。当使用如 L. Vanhamme 等人，J Magn Reson 129，35-43 (1997)中描述的时域拟合方法评估 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的量时，可以产生有关 ^{13}C-丙酮酸盐和 13C-乳酸盐类的图像，其中彩色编码或灰色编码代表所测量的 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的量。

虽然已经证明了光谱成像方法在使用所有种类 MR 核例如 ^{1}H、^{31}P、^{23}Na 产生代谢图像中的价值，但是完全编码光谱图像所需要的重复的量使得该方法较不适于超极化的 ^{13}C。必须小心以保证在整个 MR 数据获得期间能够获得超极化的 ^{13}C-信号。在降低信噪比的代价下，这可通过降低在每一相位编码步骤中施加的 RF-脉冲角来实现。较高的矩阵尺寸需要更多的相位编码步骤和较长的扫描时间。

基于在数据获取期间施加读出梯度的 P.C. Lauterbur (Nature，242，190-191，(1973)和 P. Mansfield (J. Phys. C. 6，L422-L426 (1973))的开创工作的成像方法容许较高的信噪比图像或同等物，较高的空间分辨图像。然而，以其基本形式的这些成像方法将不能产生有关 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的单独的图像，即不能鉴定出特异性代谢物。

在优选的实施方案中，使用成像程序，该成像程序利用了多个回显(echoes)来编码频率信息。可以产生单独的水和脂肪 ^{1}H-图像的程序描述在例如 G. Glover，J Magn Reson Imaging 1991；1：521–530 和 S.B. Reeder 等人，MRM 51 35-45 (2004)中。因为欲检测的代谢物以及其本身的 MR 频率是已知的，所以在上面的参考文献中描述的方法可以用于获得 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的直接图像。该方法更有效地利用了超极化的 ^{13}C-MR 信号，给出了与光谱成像相比更好的信号质量、更高的空间分辨率以及更快的获取时间。

在优选的实施方案中，细胞死亡的检测包括从预先给予本发明成像介质的人或非人动物身体，或者从其中已加入本发明成像介质的细胞培养物、得自人或非人身体的样本或离体组织获得 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的直接的 ^{13}C-MR 图像或光谱。通过低的来自 ^{13}C-乳酸盐类的 ^{13}C-信号强度或者不存在来自 ^{13}C-乳酸盐类的信号或者降低的 ^{13}C-乳酸盐类形成速度来鉴定和检测细胞死亡。

为了校正丙酮酸盐信号，可以在每一个单独的图像中将乳酸盐类和丙酮酸盐图像归一化至最大值。然后，将归一化的乳酸盐类图像乘以倒置的丙酮酸盐图像，例如图像中最大丙酮酸盐信号减去每一像素的丙酮酸盐水平。作为最后一个步骤，将在上述操作中获得的中间结果乘以最初的乳酸盐类图像。或者，可以将在其各自图像的每个像素中的丙酮酸盐和乳酸盐类峰强度拟合到丙酮酸盐与乳酸盐类之间的 ^{13}C 标记通量的动力学模型中，以获得有关标记通量和自旋点阵驰豫时间的速度常数。至于多个 RF 脉冲对于极化损失的影响，可能需要作出校正。

如果使用该方法来在体内检测细胞死亡，则解剖学和/或灌注信息可以包括在细胞死亡的检测中。解剖学信息可以例如通过采用或不采用合适的造影剂获取质子或 ^{13}C-MR 图像来获得。相对灌注可以通过使用 MR 造影剂例如 Omniscan™ 来确定。同样，不给予造影剂的用于灌注测量的 MR 成像技术是本领域已知的。在优选的实施方案中，使用未代谢的超极化的 ^{13}C-造影剂来定量测定灌注。合适的技术和造影剂例如描述在 WO-A-02/23209 中。在更优选的实施方案中，使用超极化的 ^{13}C-丙酮酸盐来定量测定灌注。

在另一个优选的实施方案中，反复给药本发明成像介质，由此容

许动态研究。由于丙酮酸盐的低毒性及其有利的安全性，反复剂量的该化合物被患者良好地耐受。

获得的结果例如容许医生给检查的患者选择合适的治疗，或者容许医生确定治疗是否成功。

附图简述:

图 1 描绘了在用依托泊苷处理的 EL4 细胞悬浮液中以及在未处理的 EL4 细胞悬浮液中 $^{13}C_1$-丙酮酸盐和 $^{13}C_1$-乳酸盐类的峰强度对时间。图 1 中的曲线编号代表下列:

1: 在未处理的对照细胞和依托泊苷处理的细胞悬浮液中的 $^{13}C_1$-丙酮酸盐强度(除以 100)

2: 对照细胞悬浮液中的 $^{13}C_1$-乳酸盐类强度

3: 依托泊苷处理的细胞悬浮液中的 $^{13}C_1$-乳酸盐类强度

图 2 显示了依托泊苷和依托泊苷/烟酰胺处理对于 EL4 细胞对细胞死亡诱导药物依托泊苷的反应的影响。图 2 中的柱状图代表 3 个实验+/-标准偏差。

图 2 中的柱编号代表下列:

1: 未处理的 EL4 细胞悬浮液

2: 依托泊苷处理的 EL4 细胞悬浮液

3: 依托泊苷/烟酰胺处理的 EL4 细胞悬浮液

实施例

在下文中，术语丙酮酸盐、^{13}C-丙酮酸盐和 $^{13}C_1$-丙酮酸盐交替使用，并且都是指 $^{13}C_1$-丙酮酸盐。同样，术语丙酮酸、^{13}C-丙酮酸和 $^{13}C_1$-丙酮酸也是交替使用，并且都是指 $^{13}C_1$-丙酮酸。

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']二-(1,3)二硫杂环戊二烯-4-基)甲基钠盐，一种 DNP 剂

在氩气氛下将已经根据 WO-A1-98/39277 的实施例 7 合成的 10 g (70 mmol)三(8-羧基-2,2,6,6-(四(羟基乙基)苯并-[1,2-4,5']-二-(1,3)-二硫杂环戊二烯-4-基)甲基钠盐悬浮在 280 ml 二甲基乙酰胺中。依次加入氢

化钠(2.75 g)和甲基碘(5.2 ml)，并且让轻微放热的该反应在 34°C 水浴中进行 1 小时。用相同量的每一化合物重复两次氢化钠和甲基碘的加入，并且在最后一次加入之后，将该混合物在室温搅拌 68 小时，然后倒入 500 ml 水内。使用 1 M NaOH (水溶液)将 pH 调节至 pH > 13，并且将该混合物在室温搅拌 15 小时以水解所形成的甲基酯。然后使用 50 ml 2 M HCl (水溶液)将该混合物酸化至 pH 为约 2，并且用乙酸乙酯(500 ml 和 2 × 200 ml)萃取 3 次。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥，然后蒸发至干。将粗产物(24 g)通过制备 HPLC 纯化，使用乙腈/水作为洗脱剂。~~将合并的级份蒸发以除去乙腈。使用乙酸乙酯萃取~~剩余水相，并且将有机相用 Na_2SO_4 干燥，然后蒸发至干。将水(200 ml)加到残余物中，并且用 0.1 M NaOH (水溶液)将 pH 小心地调节至 7，在该处理期间残余物缓慢地溶解。中和之后，将水溶液冷冻干燥。

实施例 2：制备包含乳酸盐类和超极化的 $^{13}C_1$-丙酮酸盐的成像介质

通过将实施例的产物溶解在 $^{13}C_1$-丙酮酸(44 mg，91%)中来制备 15 mM 溶液。将该样本混合至均匀，把该溶液置于样本杯中，并且插到 DNP 偏振器内。

将样本在 DNP 条件下于 1.2 K 在 3.35 T 磁场中，在微波(分别是 94 GHz 和 100 mW)辐射下极化。极化之后进行固态 NMR。90 分钟超极化之后，将样本溶解在 6 ml 94 mM NaOH、30 mM NaCl、40 mM HEPES 和 50 mg/升 EDTA 的水溶液中。溶解的样本的 pH 为 7.4，最终的 $^{13}C_1$-丙酮酸盐浓度是 75 mM。

将 2 ml 所得溶液与含有 18 mg 乳酸锂的 500 µl 水合并，获得包含 60 mM 超极化的 $^{13}C_1$-丙酮酸盐和 75 mM 乳酸盐类的成像介质。

实施例 3：在细胞培养物中检测细胞死亡

3.1 制备 EL4 细胞

将 EL4 鼠淋巴瘤细胞(10^8 个细胞)用 15 µM 依托泊苷(PCH Pharmachemie BV，Harleem)处理 16 小时，依托泊苷是一种已知诱导细胞死亡的化合物。将一组单独的细胞用 15 µM 依托泊苷加 20 mM 烟酰胺——一种已知 PARP 抑制剂处理 16 小时。通过吖啶橙和二碘化丙锭染色来证实细胞死亡(细胞程序死亡和坏死)。将细胞用含有 10% FCS 的

RPMI 1640 生长培养基于 37°C 洗涤 3 次，并且向 2 ml 依托泊苷和依托泊苷/烟酰胺处理的 EL4 细胞悬浮液中加入 2 ml 根据实施例 2 的成像介质。因此，最终的细胞悬浮液含有 30 mM 超极化的 $^{13}C_1$-丙酮酸盐和 37.5 mM 乳酸盐类。

3.2 EL4 细胞的 ^{13}C-MR 光谱

在如 3.1 中所描述的依托泊苷处理的 EL4 细胞悬浮液中，在从加入成像介质的时间开始的 240 秒时间期间内，监测 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的 ^{13}C-信号强度。对于总共 240 个光谱，在 9.4 T 使用低倾倒角脉冲每秒获得一个 ^{13}C 光谱。还如上所述检测非依托泊苷处理的(未处理的) EL4 淋巴瘤细胞的对照，并且将未处理和依托泊苷的 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的峰强度在图上绘图(图 1)。

3.3 EL4 细胞的 ^{13}C-MR 光谱

在如 3.1 中所描述的依托泊苷处理和依托泊苷/烟酰胺处理的 EL4 细胞悬浮液中，在从加入成像介质的时间开始的 240 秒时间期间内，监测 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的 ^{13}C-信号强度。对于总共 240 个光谱，在 9.4 T 使用低倾倒角脉冲每秒获得一个 ^{13}C 光谱。还如上所述检测非依托泊苷处理的(未处理的) EL4 淋巴瘤细胞的对照，并且比较未处理、依托泊苷处理和依托泊苷/烟酰胺处理的 EL4 细胞的 ^{13}C-丙酮酸盐和 ^{13}C-乳酸盐类的峰强度。基于修饰的 Bloch 公式将数据拟合到双位点交换模型中，并且测定正向和反向交换 ^{13}C-通量的速度常数。图 2 中的柱状图代表 3 个实验+/-标准偏差。

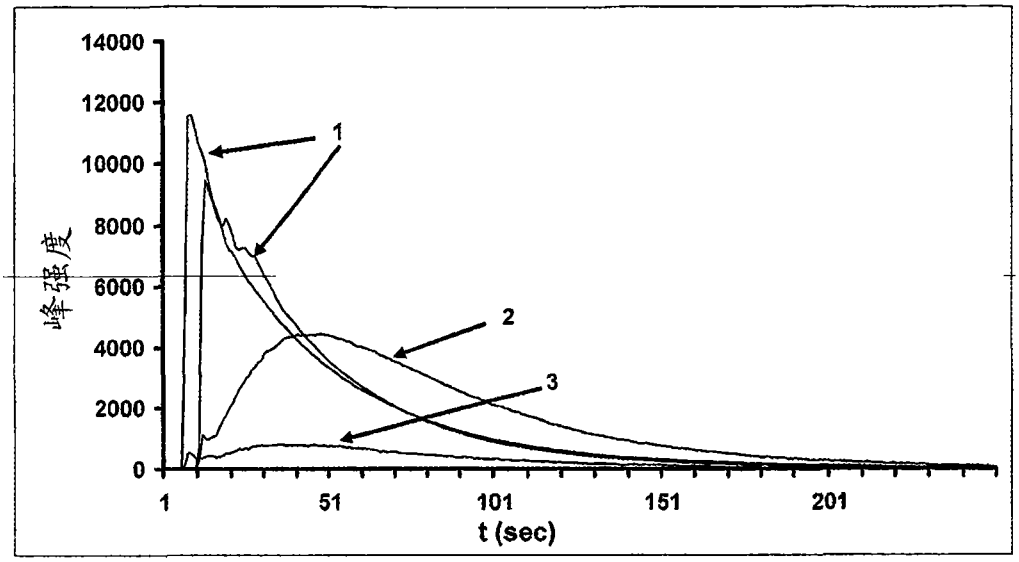

14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
峰强度
1
2
3
1
51
101
151
201
t (sec)

图 1

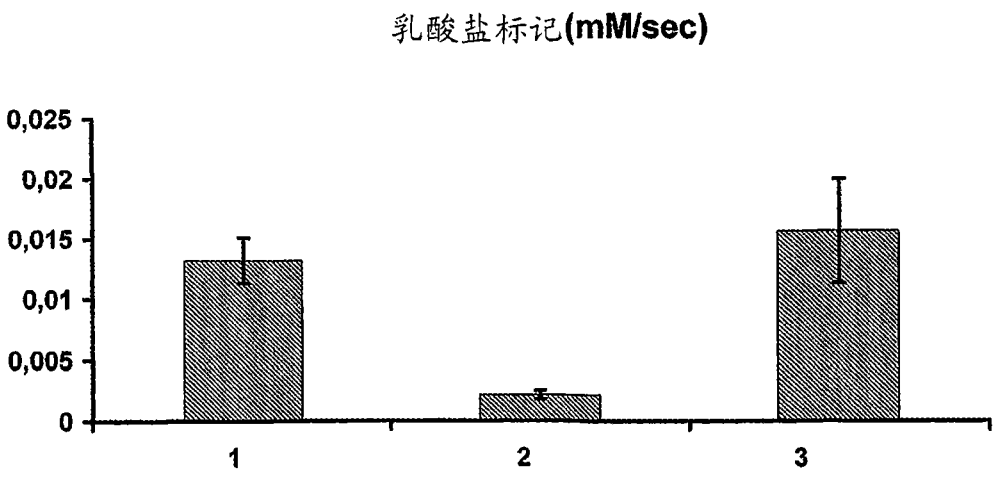

乳酸盐标记(mM/sec)
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
1
2
3

图 2