



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102565735 B

(45) 授权公告日 2016.02.10

(21) 申请号 201110462899.5

(22) 申请日 2005.07.28

(30) 优先权数据

20043226 2004.07.30 NO

(62) 分案原申请数据

200580033184.0 2005.07.28

(73) 专利权人 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·萨宁 R·I·詹德特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 林毅斌

(51) Int. Cl.

G01R 33/485(2006.01)

G01R 33/56(2006.01)

A61K 51/04(2006.01)

(56) 对比文件

US 6466814 B1, 2002.10.15,

CN 1224502 A, 1999.07.28,

US 5671741 A, 1997.09.30,

EP 0659056 B1, 1998.09.30,

GOULD P.C-13 MR tracers show potential for functional diagnostics. 《DIAGNOSTIC IMAGING》. 2004, www.diagnosticimaging.com/molecularimagingoutlook/2004jun/04.jhtml.

审查员 张小伟

权利要求书1页 说明书13页 附图2页

(54) 发明名称

超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐在制备用于辨别健康和肿瘤组织的组合物中的用途

(57) 摘要

本发明涉及使用超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐作为 MR 成像剂的肿瘤成像方法,该方法可以辨别肿瘤组织和健康组织。

1. 超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐在制备用于辨别健康和肿瘤组织的组合物中的用途,所述辨别包括

(a)从预先给予含有超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐的该组合物的患者获得  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐及其含有  $^{13}\text{C}$ - 的代谢物丙氨酸和乳酸盐的直接  $^{13}\text{C}$ -MR 图像,

(b)通过将乳酸盐图像乘以倒转的丙酮酸盐和 / 或丙氨酸盐图像,将乳酸盐图像针对丙酮酸盐和 / 或丙氨酸的量做校正,所述经校正的乳酸盐图像中的乳酸盐相对于丙酮酸盐和 / 或乳酸盐相对于丙氨酸的高加权信号表示肿瘤组织。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中通过 DNP 方法超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸和 / 或  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐来获得超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐。

3. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中含有  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐的组合物进一步含有一种或多种缓冲剂,该缓冲剂选自磷酸盐缓冲剂、ACES、PIPES、咪唑盐酸缓冲液、BES、MOPS、HEPES、TES、TRIS、HEPPS 和 TRICIN。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中在步骤 (a) 中将利用多回波来编码频率信息的成像程序用于获取直接  $^{13}\text{C}$ - 图像。

5. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中在给予含有  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐的组合物后少于 400s 时获取步骤 (a) 中的直接  $^{13}\text{C}$ - 图像。

6. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中另外获取用或不用质子 MRI 造影剂的质子图像。

7. 根据权利要求 1 的用途,其中通过以下来进行所述步骤 (b) 中的校正:

(i) 将各个单独图像中的乳酸盐和丙酮酸盐和 / 或丙氨酸图像归一化至最大值;

(ii) 将归一化的乳酸盐图像乘以倒转的丙酮酸和 / 或丙氨酸图像;和

(iii) 将步骤(ii)的结果乘以初始乳酸盐图像。

8. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中肿瘤是脑瘤、乳房肿瘤、结肠肿瘤、肺肿瘤、肾脏肿瘤、头颈部肿瘤、肌肉肿瘤、卵巢肿瘤、胃肿瘤、胰腺肿瘤、食道肿瘤或前列腺肿瘤。

9. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中所述组合物用于体内 MR 肿瘤治疗监控和 / 或肿瘤分级。

10. 根据权利要求 3 的用途,其中所述磷酸盐缓冲剂为  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 。

## 超极化 $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐在制备用于辨别健康和肿瘤组织的组合物中的用途

[0001] 本申请是专利申请号为 200580033184.0、国际申请日为 2005 年 7 月 28 日（国际申请号为 PCT/N02005/000282）、发明名称为“肿瘤成像方法”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及使用超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐作为 MR 成像剂的肿瘤成像方法，该方法可以辨别肿瘤组织和健康组织。

### 背景技术

[0003] 核磁共振 (MR) 成像 (MRI) 已经成为对内科医生特别有吸引力的成像技术，因为其允许以非入侵的方式获得患者身体或其部分的图像而没有将患者和医务人员暴露于潜在有害的辐射如 X- 射线。由于其高质量的图像，MRI 是软组织和器官的有利成像技术，且其可以区分正常组织和患病组织，例如肿瘤和损伤。

[0004] 可以用或不用 MR 造影剂来进行 MR 肿瘤成像。在没有使用造影剂摄取 MR 图像时，大小约 1-2 厘米和更大的肿瘤显现地相当清楚。然而，造影增强 MRI 能够观察到更小的组织改变，即，更小的待检测的肿瘤，这使得造影增强 MR 成像成为早期肿瘤检测和转移检测的有力工具。

[0005] 几种造影剂已经用于 MR 肿瘤成像中。水溶性顺磁金属螯合物，例如钆螯合物，如 Ominiscan<sup>TM</sup> (Amersham Health)，是广泛使用的 MR 造影剂。如果给予脉管系统中，由于它们的低分子量，它们将快速分布至胞内空间中（即血液和间质）。它们还可以相对快速地从身体中清除。已经发现钆螯合物在提高转移、小肿瘤的检测率和提高肿瘤分类中特别有用，通过可以从中心坏死和从周围水肿或肉眼可见的未涉及组织中区分出活的肿瘤组织（充分灌注的和 / 或削弱的血脑屏障）来实现后者（参见，例如，C. Claussen 等，Neuroradiology 1985 ;164-171）。

[0006] 另一方面，血池 MR 造影剂，例如超顺磁氧化铁颗粒，在脉管系统内保持延长的时间。已经证明它们对提高肝脏中的造影以及检测毛细血管渗透性异常非常有用，例如，肿瘤中“渗漏的”毛细血管壁，例如作为血管生成的结果。

[0007] 尽管上述造影剂毫无疑问的卓越特性，但它们的使用不是没有任何风险。尽管顺磁金属螯合复合物通常具有高稳定性常数，但可能在给予后毒性金属离子在体内释放。此外，这些种类的造影剂显示出差的特异性。

[0008] WO-A-99/35508 公开了 MR 研究患者的方法，使用高  $T_1$  剂的超极化溶液作为 MR 成像剂。术语“超极化”意思是提高高  $T_1$  剂中存在的 NMR 活性核的核极化，即，具有非零核自旋的核，优选  $^{13}\text{C}$ - 或  $^{15}\text{N}$ - 核。提高 NMR 活性核的核极化时，这些核的激发核自旋状态和基础核自旋状态之间的群体差异显著提高，并因此将 MR 信号强度扩大了百倍和更多倍。使用超极化的  $^{13}\text{C}$ - 和 / 或  $^{15}\text{N}$ - 富集的高  $T_1$  剂时，本质上没有背景信号的干扰，因为  $^{13}\text{C}$  和 / 或  $^{15}\text{N}$  的天然丰度是可以忽略的，因此图像对比度有利的高。公开了各种适用于超极化和随后用

作 MR 成像剂的可能高  $T_1$  剂,包括但不限于,非内源或内源化合物如醋酸盐、丙酮酸盐、草酸盐或葡萄糖酸盐,糖类如葡萄糖或果糖,脲,酰胺,氨基酸如谷氨酸盐、甘氨酸、半胱氨酸或天冬氨酸盐,核苷酸,维生素如抗坏血酸,青霉素衍生物和磺胺。进一步描述了正常代谢循环如柠檬酸循环中的中间产物,如富马酸和丙酮酸,是用于代谢活动成像的优选成像剂。

[0009] 不得不强调的是由于松弛以及 - 给予患者体内时 - 稀释,超极化成像剂的信号衰减。因此生物流体(例如血液)中成像剂的  $T_1$  值 必须足够长来确保试剂以高度超极化的状态分布至患者体内的目标部位。

## 发明内容

[0010] 我们现在令人惊讶地发现了一种可以辨别肿瘤组织和健康组织的 MR 肿瘤成像方法,其中将超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐用作成像剂。

[0011] 因此,本发明提供了用于辨别健康和肿瘤组织的方法,所述方法包括

[0012] (a) 从预先给予含有超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐组合物的患者获得  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐及其含有  $^{13}\text{C}$ - 的代谢物丙氨酸、乳酸盐和任选碳酸氢盐的直接  $^{13}\text{C}$ -MR 图像,

[0013] (b) 任选将乳酸盐信号针对丙酮酸盐和 / 或丙氨酸的量做校正来获得乳酸盐相对于丙酮酸盐和 / 或乳酸盐相对于丙氨酸的加权图像,

[0014] 其中通过最高的乳酸盐信号和 / 或,如果进行了步骤 (b) 中的校正,通过乳酸盐相对于丙酮酸盐和 / 或乳酸盐相对于丙氨酸的高加权信号来鉴定所述  $^{13}\text{C}$ - 图像中的肿瘤组织。

## 附图说明

[0015] 图 1 显示了一只成像大鼠的典型系列图像,(1) 质子参照图像,其中箭头表示肿瘤位置,(2)  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐图像,(3)  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐图像,(4)  $^{13}\text{C}$ - 丙氨酸图像,(5) 对  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐校准的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐图像和 (6) 对  $^{13}\text{C}$ - 丙氨酸校准的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐图像。将图像 (2) 至 (6) 与质子参照图像融合。

[0016] 图 2 显示了相同系列的图像,然而,图像 (2) 至 (6) 没有与解剖质子图像融合。

## 具体实施方式

[0017] 可以通过不同的方法(例如,W0-A-99/35508 中所述的)来实现 NMR 活性  $^{13}\text{C}$ - 核的超极化,优选的方法是来自惰性气体、“强力”、旋转冷却核 DNP 的极化转移。为了获得超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐,优选直接极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐或极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸并将极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸转化成极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐,例如,通过使用碱的中和作用。

[0018] 获得超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐的优选方式是来自超极化惰性气体的极化转移。可以将具有非零核自旋的惰性气体超极化,即,将它们的极化提高超过平衡极化,例如,使用循环极化光。可以使用超极化惰性气体,优选 He 或 Xe,来实现  $^{13}\text{C}$ - 核的超极化。还可以通过使用同位素富集的超极化惰性气体优选  $^3\text{He}$  或  $^{129}\text{Xe}$  来实现超极化。超极化气体可以在气相中,可以溶解于液体 / 溶剂中,或超极化气体自身可以作为溶剂。或者,可以将气体冷凝至冷却的固体表面上并以该形式使用,或使其升华。优选将超极化气体和待极化的化合物均匀混合。因此,如果  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸得到极化,其在室温是液体,优选将超极化气体溶解于液体

/ 溶剂中或作为溶剂。如果  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐得到极化, 优选将超极化气体溶解于也可以溶解丙酮酸盐的液体 / 溶剂中。

[0019] 另一种获得超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐的优选方式是通过非常低温和高磁场下的热力学平衡将极化给予 NMR 活性核。使用非常高磁场和非常低温 (强力) 来实现与 NMR 分光计的运行磁场和温度相比较的超极化。所用的磁场强度尽可能地高, 合适地高于 1T, 优选高于 5T, 更优选 15T, 或更优选且特别优选 20T 或更高。温度应当非常低, 例如 4.2K 或更低, 优选 1.5K 或更低, 更优选 1.0K 或更低, 特别优选 100mK 或更低。

[0020] 另一种获得超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐的优选方式是旋转冷却法。该方法包括固体化合物或系统通过旋转冷却极化的旋转极化。将系统与合适的顺次材料如约三或更大对称轴的晶体形式的  $\text{Ni}^{2+}$ 、镧系元素或铜系元素离子掺杂或均匀混合。设备比 DNP 需要的简单, 不需要均匀的磁场, 因为没有使用共振激发磁场。通过将样品围绕垂直于磁场方向的轴物理旋转来进行该方法。该方法预先需要的是顺磁物质具有高度各向异性 g- 因素。作为样品旋转的结果, 电子顺磁共振引起与核旋转的接触, 导致核旋转温度降低。进行样品旋转直至核自旋极化达到新的平衡。

[0021] 更优选的实施方案中, 使用 DNP (动态核极化) 方法来获得超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐。通过称为顺磁剂或 DNP 剂的顺磁化合物实现了样品的极化。在 DNP 处理的过程中, 通常以微波辐射的形式提供了能量, 其最初激发了顺磁剂。衰减至基态时, 存在从顺磁剂的未配对电子至样品 NMR 活性核的极化转移。通常, 在 DNP 处理中使用中磁场或高磁场和非常低的温度, 例如, 在液氦和约 1T 或以上的磁场中进行 DNP 处理。或者, 可以使用中磁场和获得足够极化增强的任何温度。DNP 技术例如描述于 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中, 其中两篇都在此包括作为参考。为了通过 DNP 方法获得超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐, 可以将  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐和 / 或  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸用作待极化的化合物。

[0022] 本发明的方法中使用  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸和 / 或  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐主要取决于 DNP 处理中所用的顺磁剂。如果顺磁剂在  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸中是可溶的, 那么优选使用  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸, 且液体混合物优选是顺磁剂和  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸形成的液体溶液。如果顺磁剂不溶于  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸中, 那么使用  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐和 / 或  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸和至少一种共溶剂来形成液体混合物, 优选液体溶液。已经发现 DNP 的成功且因此极化的水平取决于待极化的化合物和顺磁剂的相互密切接触。因此, 共溶剂优选是溶解顺磁剂和  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸和 / 或  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐两者的共溶剂或共溶剂混合物。对于  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐, 优选将水用作共溶剂。

[0023] 此外, 已经发现当混合物冷却 / 冷冻时形成玻璃而不是结晶样品时, 获得较高的极化水平。再次, 玻璃的形成允许顺磁剂和待极化化合物的更密切接触。 $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸是良好的玻璃前体并因此优选用于 DNP 处理中, 只要自由基在  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸中是可溶的。 $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐是一种盐, 且  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐的水溶液和顺磁剂的液体混合物在冷冻时将形成结晶样品。为了防止这, 优选加入更多的是良好玻璃前体的共溶剂如甘油、丙二醇或乙二醇。

[0024] 因此, 在一实施方案中, 将  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐溶解于水中来获得水溶液, 并加入顺磁剂、甘油和任选的再一种共溶剂来形成液体混合物。在优选的实施方案中, 将  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸、顺磁剂和共溶剂混合来形成液体混合物。最优选的实施方案中, 将  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸和顺磁剂混合来形成液体混合物。通过本领域已知的几种方法可完成混合物的充分混合, 如搅拌、涡旋或超声处理。

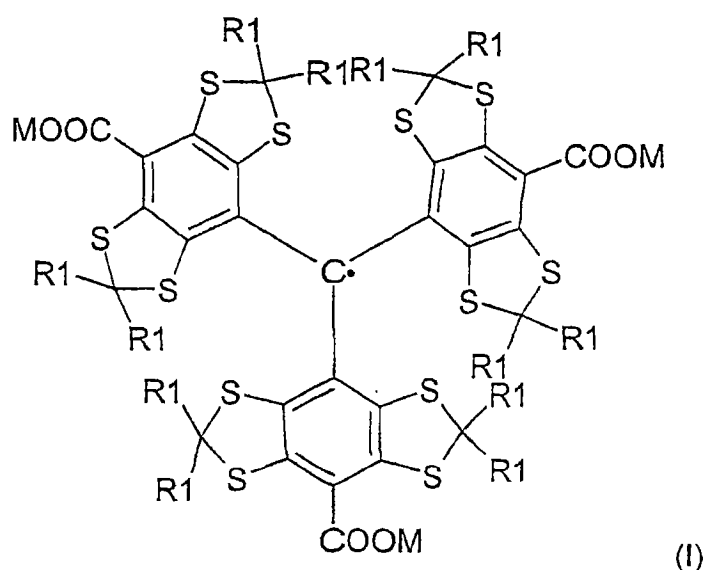
[0025] 然后在进行 DNP 处理之前将液体混合物冷冻。通过本领域已知的方法来完成液体混合物的冷却 / 冷冻, 例如, 通过将液体混合物在液氮中冷冻或通过简单地置于偏振器中, 其中液氮将冷冻样品。

[0026] 如之前所述的, 动态核极化 (DNP) 是一种极化方法, 其中通过 DNP 剂, 即顺磁剂 / 化合物来实现待极化化合物的极化。

[0027] 许多已知的顺磁化合物可以用作 DNP 剂, 例如, 过渡金属如铬 (V) 离子、有机自由基如硝基氧自由基、三苯甲基自由基或磁性颗粒。这样的 DNP 剂描述于例如 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。

[0028] 优选实施方案中, 将通式 (I) 的三苯甲基自由基用作顺磁剂以通过 DNP 方法来获得  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐,

[0029]



[0030] 其中

[0031] M 表示氢或一当量阳离子 ; 且

[0032] R1 相同或不同并表示直链或支链的任选羟基化的  $\text{C}_1\text{-C}_6$ - 烷基或  $-(\text{CH}_2)_n\text{-X-R}_2$  基团,

[0033] 其中 n 是 1、2 或 3 ; X 是 O 或 S, 且 R2 是直链或支链的, 任选羟基化的  $\text{C}_1\text{-C}_4$ - 烷基。

[0034] 优选的实施方案中, M 表示氢或一当量生理学上可耐受的阳离子。术语“生理学上可耐受的阳离子”表示人或非人动物活体可以耐受的阳离子。优选, M 表示氢或碱金属、铵离子或有机胺离子, 例如葡甲胺。最优选, M 表示氢或钠。

[0035] 再一优选的实施方案中, R1 相同或不同, 优选相同, 并表示直链或支链的任选羟基化的  $\text{C}_1\text{-C}_4$ - 烷基, 最优选甲基、乙基、异丙基、羟甲基或羟乙基。

[0036] 再一优选的实施方案中, R1 相同或不同, 优选相同并表示  $-\text{CH}_2\text{-O-(C}_1\text{-C}_3\text{- 烷基)}$ 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{-O-CH}_3$ 、 $-(\text{C}_1\text{-C}_3\text{- 烷基})\text{-O-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-S-(C}_1\text{-C}_3\text{- 烷基)}$ 、 $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-CH}_3$ 、 $-(\text{C}_1\text{-C}_3\text{- 烷基})\text{-S-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-O-C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_2\text{-O-C}_2\text{H}_4\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{-S-C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_2\text{-S-C}_2\text{H}_4\text{OH}$  或  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$ , 最优选  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$ 。

[0037] 更优选的实施方案中, M 表示氢或钠, 且 R1 相同并表示  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$ 。

[0038] 可以如 WO-A-91/12024、WO-A-96/39367、WO97/09633 和 WO-A-98/39277 中详细描述的进行合成通式 (I) 的三苯甲基自由基。简而言之,通过将三摩尔当量的金属酸盐化的单体芳基化合物和一摩尔当量合适保护的羧酸衍生物反应来形成三聚中间产物。将这种中间产物金属酸盐化并随后与例如二氧化碳反应来形成三-羧酸三苯基甲醇,在进一步的步骤中,用强酸处理来产生三芳甲基阳离子。然后将该阳离子还原形成稳定的三苯甲基自由基。

[0039] 含有  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和 / 或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和任选溶剂的液体组合物优选含有 5 至 100mM 通式 (I) 的三苯甲基自由基,更优选 10 至 20mM,特别优选 12 至 18mM,最优选 13 至 17mM。已经发现使用较高含量的自由基时,用于 DNP 处理中的极化增强时间较短,然而,获得的极化水平较低。因此,必须将这两种影响彼此平衡。

[0040] DNP 技术例如描述于 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/95895 中,在此包括两者作为参考。通常,在 DNP 过程中使用中磁场或高磁场和非常低的温度,例如,在液氦和约 1T 或以上的磁场中进行 DNP 处理。或者,可以使用中磁场和获得足够极化增强的任何温度。本发明方法的优选实施方案中,在液氦和约 1T 或以上的磁场中进行 DNP 处理。合适的极化设备例如描述于 WO-A-02/37132 中。优选的实施方案中,极化设备包括低温恒温器和极化装置,例如通过导波器连接微波源的微波室,微波源处于由磁场产生装置如超导磁铁围绕的中心孔中。孔垂直向下延伸至至少超导磁铁附近的 P 区域水平,其中磁场强度足够高,例如 1 至 25T,用于  $^{13}\text{C}$  核极化的进行。样品孔优选是可密封的并可以抽成低压,例如约 1mbar 或更低的气压。在孔的内部可以包含引入样品(即,含有顺磁剂和  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和 / 或  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸的混合物)的装置,如可移动的运送样品的管子,这管子可以从孔的顶部向下插入区域 P 中的微波室内部。通过液氦将区域 P 冷却至足够低的温度来用于进行极化,优选约 0.1 至 100K 的温度,更优选 0.5 至 10K,最优选 1 至 5K。样品引入装置优选在其上端是可密封的,以任何合适的方式来保持孔中的部分真空。样品保持容器,如保持样品的杯子,可以可移动地装配于样品引入装置下端的内部。保持样品的容器优选由具有低特异性热容和良好保持低温特性的轻质材料构成,例如, KelF(聚氯三氟乙烯)或 PEEK(聚醚醚酮)。样品容器可以保持一种或多种待极化的样品。

[0041] 将样品插入样品保持容器中,浸入液氦中并用微波照射,优选 200mW 的约 94GHz 频率。可以通过获得微波照射过程中样品的固态  $^{13}\text{C}$ -NMR 信号来监控极化水平,因此优选使用含有极化元件的装置来获得步骤 b) 中固态  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱。通常,在显示  $^{13}\text{C}$ -NMR 信号对时间的图中获得饱和曲线。因此,可以测定什么时候达到了最佳的极化水平。

[0042] 如果通过需要样品处于固态的方法来进行超极化,例如,通过 DNP 方法,必须将固体样品转化成液态来用于本发明的方法中。将固体极化混合物溶解,例如 WO-A-02/37312 中所述的,或熔化,例如 WO-A-02/36005 中所述的。优选固体超极化样品的溶解,更优选溶解于缓冲剂中,优选生理学上可耐受的缓冲剂,来获得液体组合物。本申请内容中的术语“缓冲剂”表示一种或多种缓冲剂,即,也可以是缓冲剂的混合物。

[0043] 优选的缓冲剂是生理学上可耐受的缓冲剂,更优选在约 pH7 至 8 范围内缓冲的缓冲剂,例如磷酸盐缓冲剂 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ )、ACES、PIPES、咪唑 /HCl、BES、MOPS、HEPES、TES、TRIS、HEPPS 或 TRICIN。更优选的缓冲剂是磷酸盐缓冲剂和 TRIS,最优选的是 TRIS。另一实施方案中,使用多于一种的上述优选缓冲剂,即,缓冲剂的混合物。

[0044] 将  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸用作待极化的化合物时,溶解还包括  $^{13}\text{C}$  丙酮酸至  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的转

化。为了完成此,将 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸与碱反应。一实施方案中,将 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸与碱反应,将其转化成 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐并随后加入缓冲剂。另一个优选的实施方案中,将缓冲剂和碱混合于一种溶液中并将该溶液加入 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸中,将其溶解并同时将其转化成 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐。优选的实施方案中,碱是 $\text{NaOH}$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 或 $\text{NaHCO}_3$ 的水溶液,最优选的碱是 $\text{NaOH}$ 。特别优选的实施方案中,将含有 TRIS 缓冲剂的 $\text{NaOH}$ 溶液用于溶解 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸并将其转化成 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸的钠盐。

[0045] 另一个优选的实施方案中,缓冲剂或-其中适用的-混合的缓冲剂/碱溶液进一步包括一种或多种能够结合或复合游离顺磁离子的化合物,例如,螯合剂,如 DTPA 或 EDTA。已经发现游离的顺磁离子可以引起超极化化合物 $T_1$ 的缩短,优选将其避免。

[0046] 优选使用 WO-A-02/37132 中所公开的方法和/或装置来进行溶解。如果通过 DNP 方法来进行超极化,可以使用溶解部件,其与偏振器在物理上隔开或是包含偏振器和溶解部件的装置的一部分。优选的实施方案中,在升高的磁场进行溶解来改善松弛和保持最大的超极化。尽管以上的测量,应当避免场结点,且低磁场可以导致松弛。

[0047] 如果通过 DNP 方法进行超极化,优选从含有 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的溶液中除去顺磁剂和/或其反应产物。可以部分、连续或理想地完全去除顺磁剂和/或反应产物,优选全部去除。例如通式(I)的三苯甲基自由基的反应产物可以是酯,其在丙酮酸与含有羟基的通式(I)的自由基反应时形成。可用于除去顺磁剂和/或其反应产物的方法是本领域已知的。通常,方法的适用取决于顺磁剂和/或其反应产物的性质。极化后固体样品溶解时,自由基可能沉淀并可以通过过滤将其容易地从液体组合物中分离出来。如果雌性颗粒用作顺磁剂,这些可以也可以通过过滤容易地去除。如果没有发生沉淀,可以通过色谱分离技术例如液相色谱如反相或离子交换色谱或通过萃取来除去顺磁剂。

[0048] 因为通式(I)的三苯甲基自由基具有特征性的 UV/可见吸收光谱,可以使用 UV/可见吸收测量作为检测去除后液体组合物中存在的方法。为了获得定量结果,即,溶解的超极化样品中存在的自由基浓度,可以校准光学分光计,使得从液体组合物样品在特定波长的吸收得到样品中相应的自由基浓度。

[0049] 用于本发明方法中的 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐和/或优选用于通过 DNP 方法获得超极化 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸的同位素富集优选是至少 75%,更优选至少 80%,特别优选至少 90%,最优选超过 90%的同位素富集。理想地,富集是 100%。可以在 $\text{C}_1$ -位置(此后称为 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐)、 $\text{C}_2$ -位置(此后称为 $^{13}\text{C}_2$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_2$ -丙酮酸盐)、 $\text{C}_3$ 位置(此后称为 $^{13}\text{C}_3$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_3$ -丙酮酸盐)、 $\text{C}_1$ -和 $\text{C}_2$ -位置(此后称为 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸盐)、 $\text{C}_1$ -和 $\text{C}_3$ -位置(此后称为 $^{13}\text{C}_{1,3}$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_{1,3}$ -丙酮酸盐)、 $\text{C}_2$ -和 $\text{C}_3$ -位置(此后称为 $^{13}\text{C}_{2,3}$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_{2,3}$ -丙酮酸盐)或在 $\text{C}_1$ -、 $\text{C}_2$ -和 $\text{C}_3$ -位置(此后称为 $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -丙酮酸盐)同位素富集 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸和/或 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐; $\text{C}_1$ -位置是优选的。

[0050] 几种合成 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸和 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐的方法是本领域已知的。简而言之,Seebach等,Journal of Organic Chemistry 40(2),1975,231-237描述了依赖于含羰基原料如 S, S'-乙缩醛例如 1,3-二噻烷或 2-甲基-1,3-二噻烷的保护和激活的合成途径。将二噻烷金属酸盐化并与含甲基的化合物和/或 $^{13}\text{CO}_2$ 反应。使用该参考文献中列出的合适同位素富集的 $^{13}\text{C}$ -成分,可以获得 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}_2$ -丙酮酸盐或 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸盐。随后使

用文献中所述的常规方法来释放羰基官能。一种不同的合成途径从醋酸开始,其首先转化成溴乙酰,然后与  $\text{Cu}^{13}\text{CN}$  反应。将获得的腈通过酰胺转化成丙酮酸(参见,例如, S. H. Anker 等, J. Biol. Chem. 176(1948), 1333 或 J. E. Thirkettle, Chem Commun. (1997), 1025)。此外,可以通过将可购得的  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐质子化获得  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸,例如,通过 US 专利 6, 232, 497 中所述的方法。

[0051] 为了用于本发明的方法中,作为适于给予活的人或非人动物体的组合物来提供超极化  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐。组合物优选包括如上所述的缓冲剂或缓冲剂混合物。组合物可以进一步包括常规的药物学上可接受的载体、赋形剂和制剂辅助剂。因此,组合物可以例如包括稳定剂、渗透压调节剂、增溶剂等。

[0052] 丙酮酸盐是内源化合物,人体非常耐受,甚至在高浓度。作为柠檬酸循环中的前体,丙酮酸盐在人体内起着重要的代谢作用。丙酮酸盐转化成不同的化合物:转氨作用形成丙氨酸,通过氧化性脱羧化作用,丙酮酸盐转化成乙酰-CoA 和碳酸氢盐,丙酮酸盐的还原形成乳酸盐及其羧化形成草酰乙酸盐。

[0053] 已经发现超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐至超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐(只在  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸盐或  $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -丙酮酸盐的情况中)和超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸的转化可以用于使用体内 MR 成像来辨别肿瘤组织和健康组织。这是令人惊讶的,因为本领域技术人员必须记住的是超极化化合物的  $T_1$  由于松弛和稀释而退化。 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐在  $37^\circ\text{C}$  人体全血中具有约 42s 的  $T_1$  松弛,然而,已经发现超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸至超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐和超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸的转化足够快以允许检测  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐母体化合物及其代谢物的信号。丙氨酸、碳酸氢盐和乳酸盐的含量取决于研究下的组织代谢状态。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 信号强度与检测时这些化合物的含量和剩余的极化水平程度相关,因此通过使用非侵入性 MR 成像监控超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐至超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐、超极化  $^{13}\text{C}$ -碳酸氢盐和超极化  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸的转换可以研究人或非人动物体中的体内代谢过程。

[0054] 已经发现由不同丙酮酸盐代谢物引起的 MR 信号振幅根据组织类型而改变。由丙氨酸、乳酸盐、碳酸氢盐和丙酮酸盐形成的独特代谢峰模式可以用作检测下组织代谢状态的指印,并因此可以区分健康组织和肿瘤组织。这使得根据本发明的组合物对于体内 MR 肿瘤成像是极好的试剂。

[0055] 通常,将检测的主体例如患者或动物置于 MR 磁铁中。放置专用的  $^{13}\text{C}$ -MR RF-线圈来覆盖目标部位。

[0056] 将含有超极化  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物非肠道给药,优选静脉内、动脉内或直接给予目标部位或器官。根据本发明的组合物的剂量和浓度将取决于各种因素,如毒性、器官靶向能力和给药途径。通常,组合物的给药浓度高达 1mmol 丙酮酸盐每 kg 体重,优选 0.01 至 0.5mmol/kg,更优选 0.1 至 0.3mmol/kg。给药速率优选低于 10ml/s,更优选低于 6ml/min,最优选 5ml/s 至 0.1ml/s。给药后低于 400s,优选低于 120s,更优选给药后低于 60s,特别优选给药后 20 至 50s,最优选给药后 30 至 40s,应用以结合频率和空间选择性方式编码目标体积的 MR 成像程序。这将形成  $^{13}\text{C}$ -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。在相同的时间段内,可以获取用或不用质子 MRI 造影剂的质子图像来获得解剖和 / 或灌注信息。

[0057] 使用通常所说的光谱成像程序来获得目标体积的编码,例如 T. R. Brown 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3523-3526 (1982); A. A. Maudsley, 等, J. Magn. Res 51, 147-152 (1983) 所述的。光谱成像数据包含多个体积元素,其中每个元素含有全部  $^{13}\text{C}$ -MR 谱。 $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐及其  $^{13}\text{C}$ - 代谢物在  $^{13}\text{C}$ -MR 谱中全部具有它们独特的位置,且它们的共振频率可以用于鉴定它们。处于共振频率的峰的积分各自与  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐及其  $^{13}\text{C}$ - 代谢物的含量直接相关。如 L. Vanhamme 等, J Magn Reson 129, 35-43 (1997) 中所述的,使用例如时间结构域适合程序估算  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐和各自  $^{13}\text{C}$ - 代谢物的含量时,可以产生对于  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐和各种  $^{13}\text{C}$ - 代谢物的图像,其中 彩色编码或灰色编码表示所测量的  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐和各种  $^{13}\text{C}$ - 代谢物的含量。

[0058] 尽管光谱成像方法已经证明了它们在使用各种各样的 MR 核,例如,  $^1\text{H}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{23}\text{Na}$  产生代谢图像中的价值,但全部编码光谱图像需要的副本含量使得这种方法不太适于超极化  $^{13}\text{C}$ 。在整个 MR 数据获取过程中必须小心地确保超极化  $^{13}\text{C}$ - 信号是可获得的。以降低信号至噪声为代价,通过减小每个相编码步骤中所用的 RF- 脉冲角可以获得这。矩阵尺度越大,需要越多的相编码步骤和越长的扫描时间。

[0059] 基于 P. C. Lauterbur (Nature, 242, 190-191, (1973) 和 P. Mansfield (J. Phys. C. 6, L422-L426 (1973)) 初创工作的成像方法,意味着在数据获取过程中施用读出梯度,将允许较高的信号至噪声图像或相等的较高空间分辨率图像。然而,这些成像方法的基础形式对于  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐及其  $^{13}\text{C}$ - 代谢物不能产生分开的图像,而是含有  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐及其所有  $^{13}\text{C}$ - 代谢物的图像,即,不可能鉴定特定的代谢物。

[0060] 优选的实施方案中,使用多回波来编码频率信息的成像程序。可以产生分开的水和脂肪  $^1\text{H}$ - 图像的程序例如描述于 G. Glover, J Magn Reson Imaging 1991;1:521-530 和 S. B. Reeder 等, MRM 5135-45 (2004)。因为待检测的代谢物及其 MR 频率是已知的,以上参考文献中讨论的方法可以用来获取  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐、 $^{13}\text{C}$  丙氨酸和  $^{13}\text{C}$  乳酸盐的直接图像,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。该方法使得更有效地使用超极化  $^{13}\text{C}$ -MR 信号,获得与传统光谱成像技术相比较更好的信号质量,更高的空间分辨率和更快的获取时间。

[0061] 肿瘤组织的特征通常在于提高的灌注和较高的代谢活性。由于较高的代谢需要和 / 或离毛细管较大的距离不能获得足够的可以提供维持能量体内平衡需要能量的物质,细胞诱导了递增的脉管床、血管形成过程。在这个部位中,细胞具有产生足够能量的问题,预期代谢模式的显著改变。具有维持能量体内平衡问题的组织将该改变能量代谢,这特别地导致了提高的乳酸盐产生。令人惊讶地,在可获得的短 MR 成像时间窗口内使用超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐使得这种代谢改变成为可见的,即,使用肿瘤部位中的高  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐信号来区分肿瘤和健康组织。因为灌注在肿瘤组织中是不均匀的,优选将  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐信号做相同部位中可获得丙酮酸盐含量 ( $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸盐信号) 的校正。通过这种校正,获得乳酸盐相对于丙酮酸盐的加权图像。这将允许强调相对于丙酮酸盐信号具有相对高乳酸盐信号组织中的部位并因此提高肿瘤组织和健康组织之间的辨别。

[0062] 为了对丙酮酸盐信号校正,将各个单个图像中的乳酸盐和丙酮酸盐图像都归一化至最大值。其次,将归一化的乳酸盐图像乘以倒转的丙酮酸盐图像,例如,对于每个像素将图像中的最大丙酮酸盐信号减去丙酮酸盐水平。最后一步,将上述操作中获得的中间产物

结果乘以初始乳酸盐图像。

[0063] 为了强调代谢改变的部位,可以将高  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐信号结合降低的  $^{13}\text{C}$ - 丙氨酸信号用于和上一段落中所述的相似操作中,借此获得乳酸盐相对于丙氨酸的加权图像。令人惊讶地,通过这种校正还提高了肿瘤部位的鉴定,即,肿瘤组织和健康组织的区分。为了对丙氨酸信号校正,将各个单个图中的乳酸盐和丙氨酸图像归一化至最大值。其次,将归一化的乳酸盐图像乘以倒转的丙氨酸图像,例如,对于每个像素将图像中的最大丙氨酸信号减去丙氨酸水平。最后一步,将以上操作中获得的中间产物结果乘以初始乳酸盐图像。以相似的方式,还可以将  $^{13}\text{C}$ - 碳酸氢盐信号包括于分析中。此外,可以将用或不用质子 MRI 造影剂获得的质子图像包括于分析中来获得解剖和 / 或灌注信息。

[0064] 另一个优选的实施方案中,重复给药含有超极化  $^{13}\text{C}$ - 丙酮酸的组合物,因此可以动态研究。这是组合物与其它 MR 成像剂相比较 的再一优势,由于其它 MR 成像剂在患者体内相对长的循环,不允许这样的动态研究。

[0065] 根据本发明的组合物进一步用作体内 MR 肿瘤分级的成像剂。如之前段落中所述的相同代谢图像和 / 或代谢比例图像可以用于该目的,合适的 cut off 分类限定取决于肿瘤大小和代谢活性。

[0066] 此外,根据本发明的方法可以用于体内 MR 肿瘤治疗监控,例如,通过监控治疗性抗肿瘤剂治疗和 / 或化疗或结合任何类型的干预技术时肿瘤代谢模式的直接改变,用或不用任何种类的消融,即化学消融结合无线电频率、微波或超声。

[0067] 通常通过以干扰蛋白质代谢、脂质代谢或能量代谢的方式准备患者或动物,可以影响和改进根据本发明方法的肿瘤 MR 成像。获得这的方式是本领域已知的,例如,通过禁食 (例如,过夜)、葡萄糖输注等。

[0068] 优选的实施方案中,将根据本发明的方法用于脑肿瘤、乳房肿瘤、结肠 / 结直肠肿瘤、肺肿瘤、肾脏肿瘤、头颈部肿瘤、肌肉肿瘤、胃肿瘤、食道肿瘤、卵巢肿瘤、胰腺肿瘤和前列腺肿瘤的体内 MR 肿瘤成像、肿瘤监控和肿瘤分级。进一步发现根据本发明的方法对于体内 MR 前列腺肿瘤成像,即前列腺肿瘤诊断和 / 或前列腺肿瘤分级和 / 或前列腺肿瘤治疗监控特别有用。

[0069] 当患有尿道疼痛或不适的男性去看医生时,怀疑是前列腺癌。如果男性超过 50 岁,进行前列腺特异性抗原 (PSA) 测试。基于升高的 PSA 和 / 或异常数码直肠检测 (DRE) 来怀疑前列腺癌。如果 PSA 测试是阳性的,请患者去看专家 (泌尿科医师),使用超声波指导的活体检查来诊断。每年在 US 和欧洲进行的两百万活体检查程序中,各自 6 个中的 5 个和 3 个中的 2 个是阴性的。在早期检测时,这些患者的五年存活率是 100%。因为前列腺癌是最常见的癌症,是男性癌症死亡的第二大诱因,对能够在早期检测前列腺肿瘤且可以帮助降低活体检测程序数量的诊断前列腺肿瘤的方法存在强烈的医学需要。

[0070] 前列腺的  $^{13}\text{C}$ - 成像需要收发两用体积  $^{13}\text{C}$ -RF- 线圈,优选,使用结合只接受直肠内 RF- 线圈 MR 的发送体积  $^{13}\text{C}$ -RF- 线圈,更优选,使用发射 - 接受相阵列体积  $^{13}\text{C}$ -RF- 线圈结合只接受直肠内  $^{13}\text{C}$ -RF- 线圈的 MR。特别优选的线圈使得在  $^{13}\text{C}$ - 成像后可以获取  $^1\text{H}$ - 前列腺图像。

[0071] 实施例

[0072] 实施例 1 :三 (8- 羧基 -2,2,6,6-( 四 ( 甲氧基 ) 苯并 -[1,2-4,5' ] 双 -(1,3) 二

硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐的合成

[0073] 将根据 W0-A1-98/39277 的实施例 7 合成的 10g(70mmol) 三(8-羧基-2,2,6,6-(四(甲氧基)苯并-[1,2-4,5']双-(1,3)二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐在氩气氛下悬浮于 280ml 二甲基乙酰胺中。将氢化钠(2.75g)接着甲基碘(5.2ml)加入并使轻微放热的反应进行 1 小时,34℃水浴 60 分钟。重复两次加入氢化钠和甲基碘,各自化合物的含量相同,在最后一次加入后,将混合物在室温搅拌 68 小时,然后倒入 500ml 水中。使用 40ml 1M NaOH(水溶液)将 pH 调节至 pH > 13,并将混合物在环境温度下搅拌 15 小时来水解所形成的甲酯。然后使用 50ml 2M HCl(盐酸)将混合物酸化至约 2 的 pH,并用乙酸乙酯提取 3 次(500ml 和 2×200ml)。将合并的有机相通过 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,然后蒸发至干。通过制备性 HPLC 使用乙腈/水作为洗脱剂来纯化粗产物(24g)。将收集的级分蒸发来除去乙腈。用乙酸乙酯提取剩余的水相,并将有机相通过 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,然后蒸发至干。将水(200ml)加入残余物中,并用 0.1M NaOH(aq)将 pH 小心地调节至 7,残余物在该过程中缓慢溶解。中和后,将水溶液冷冻干燥。

[0074] 实施例 2:使用 <sup>13</sup>C-丙酮酸和实施例 1 的三苯甲基自由基通过 DNP 方法生产含有超极化 <sup>13</sup>C-丙酮酸盐的组合物

[0075] 通过将 5.0mg 实施例 1 的自由基溶解于 <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-丙酮酸(164 μl)中来制得 20mM 溶液。将样品混合至均匀,并将等份溶液(41mg)置于样品杯中,插入 DNP 偏振器中。

[0076] 将样品在微波(93.950GHz)照射下的 3.35T 磁场中 1.2K 的 DNP 条件下极化。2 小时后,停止极化,并使用根据 W0-A-02/37132 的溶解装置将样品溶解于氢氧化钠和三(羟甲基)-氨基甲烷(TRIS)的等份溶液中来提供超极化 <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-丙酮酸钠的中性溶液。用 <sup>13</sup>C-NMR 快速分析溶解的样品来评定极化,获得 19.0%的 <sup>13</sup>C 极化。

[0077] 实施例 3:使用 <sup>13</sup>C-丙酮酸和实施例 1 的三苯甲基自由基通过 DNP 方法生产含有超极化 <sup>13</sup>C-丙酮酸盐的组合物

[0078] 通过将实施例 1 的自由基(209.1mg)溶解于 <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-丙酮酸(553mg)和未标记丙酮酸(10.505g)的混合物中来制得 15mM 溶液。将样品混合至均匀并将等份溶液(2.015g)置于样品杯中,插入 DNP 偏振器中。

[0079] 将样品在微波(93.950GHz)照射下的 3.35T 磁场中 1.2K 的 DNP 条件下极化。4 小时后,停止极化,并使用根据 W0-A-02/37132 的溶解装置将样品溶解于氢氧化钠和三(羟甲基)-氨基甲烷(TRIS)的等份溶液中来提供超极化 <sup>13</sup>C<sub>1</sub>-丙酮酸钠的中性溶液,100mM TRIS 缓冲剂中总丙酮酸盐浓度为 0.5M。在使用溶解装置的系列中,连接色谱柱。柱子由 Varian 供应的含有疏水性包装材料(Bondesil-C18,400UM Part#:12213012)的筒构成。迫使溶解的样品通过选择性吸附自由基的柱子。用 <sup>13</sup>C-NMR 快速分析滤过的溶液来评定极化,获得 16.5%的极化。随后用 UV 分光光度计在 469nm 分析剩余自由基浓度并决定低于 0.1 μM 的检测极限。

[0080] 实施例 4:使用 <sup>13</sup>C-丙酮酸和三(8-羧基-2,2,6,6-(四(羟乙氧基)甲基-苯并[1,2-d:4,5'-d']双(1,3)二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐通过 DNP 方法生产超极化 <sup>13</sup>C-丙酮酸盐

[0081] 如 W0-A-97/09633 的实施例 29 中所述的合成三(8-羧基-2,2,6,6-(四(羟乙氧基)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。

[0082] 通过将三(8-羧基-2,2,6,6-(四(羟乙氧基)甲基-苯并[1,2-d:4,5'-d']-双-(1,3)二硫杂环戊烯-4-基)甲基钠盐溶解于 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸(83.1mg)中来制得20mM溶液。将样品混合至均匀,置于样品杯中并插入DNP偏振器中。将样品在微波(93.950GHz)照射下的3.35T磁场中1.2K的DNP条件下极化。使用Varian Inova-200NMR分光计获得样品的 $^{13}\text{C}$ -NMR信号。从热平衡 $^{13}\text{C}$ -NMR信号和增强的NMR信号的测量计算DNP增强。获得16%的 $^{13}\text{C}$ 极化。

[0083] 实施例5:使用含有超极化 $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐的组合物作为成像剂的肿瘤成像

[0084] 5.1 肿瘤动物模型和肿瘤制备

[0085] R3230AC是可以维持于雌性Fischer 344大鼠中的大鼠乳腺癌。为了建立动物肿瘤模型,将含有R32030细胞的RPMI 1640、10% FBS和10% DMSO的冷冻小瓶在37℃快速融化。此后,将细胞溶液转移至FBS中并加入递增体积的RPMI 1640。最后,将细胞悬浮液转移至25cm<sup>2</sup>的生长烧瓶中并放入37℃,5% CO<sub>2</sub>的培养箱中。每隔一天更换生长培养基。在大鼠感染的那天,通过机械力或通过胰蛋白酶来进行细胞的去除。使用缺少钙和镁的磷酸盐缓冲液洗涤细胞。加入胰蛋白酶(0.02% EDTA中的0.05%胰蛋白酶)2-5分钟。然后,加入5ml FBS并将细胞转移至含有RPMI 1640的烧杯中,RPMI 1640含有FCS和抗生素(100IU/ml青霉素、100IU/ml链霉素和2.5g/ml两性霉素B)。将细胞溶液离心并将细胞沉淀物重悬浮于20ml含有FCS和抗生素的RPMI 1640中,并重复离心和重悬浮。然后将细胞等分至小瓶中,含有4×10<sup>6</sup>个细胞/ml RPMI1640。为了获得供体肿瘤,将雌性Fischer 344大鼠(Charles River,180-200g)麻醉并将0.3ml细胞悬浮液皮下注射至两侧的腹股沟部位中。15和22天后,如F. A. Burgener等,Invest Radiol 22/6(1987),472-478;S. Saini等,J. Magn. Reson. 129/1(1997),35-43中所述的制得肿瘤块。在受体雌性Fischer大鼠的腹部形成两个切口。将肿瘤块插入每个袋中并将切口缝合。在肿瘤移植后的12-14天将大鼠成像。

[0086] 5.2 大鼠准备和质子MR成像

[0087] 使用异氟烷(2-3%)将称重的大鼠麻醉并保持在加热的桌子上来确保约37℃的体温。将导管引入尾静脉中并进入左颈总动脉中。将大鼠转移至MR仪并置于通过循环FC-104Fluorinert加热至约37℃的自制垫子上。这种液体在 $^1\text{H}$ -和 $^{13}\text{C}$ -MR成像中没有引起背景信号。以0.4L/min的速率通过长管将1-2%异氟烷传送至开放的呼吸系统来继续麻醉。通过T-管将动脉管连接压力记录仪和传送盐水的泵(速率0.15L/min)来防止导管堵塞。将大鼠置于大鼠MR线圈中(Rapid Biomedical, Germany)并使用标准质子MR成像程序成像来获得解剖信息和测定肿瘤的位置。

[0088] 5.3  $^{13}\text{C}$ -MR成像

[0089] 基于通过MR系统发现的质子频率,根据以下等式来计算 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的MR频率:

[0090] 频率 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸=0.25144×[(系统频率质子×1.00021)-0.000397708]

[0091] 将计算的频率置于 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸共振产生引起的MR信号, $^{13}\text{C}_1$ -乳酸盐在左边和 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐共振在 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的右边。运行未定位的MR程序来确保 $^{13}\text{C}$ -MR线圈和系统MR频率已经得到正确地设定。放置 $^{13}\text{C}$ -图像位置来覆盖肿瘤(切片厚度10mm,平面像素大小5×5mm<sup>2</sup>)。在重建阶段中,将图像数据补零来形成2.5×2.5×10mm<sup>3</sup>分辨率。在12s的时间段过程中以10ml/kg的剂量注射TRIS缓冲剂中的 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐(90mM),以最小体

积 2ml 注射至尾静脉中,注射开始后 30s(即,注射结束后 18s),开始化学位移  $^{13}\text{C}$ -MR 程序。

#### [0092] 5.4MR 成像数据的分析

[0093] MR 成像形成含有  $16 \times 16$  元素的矩阵,其中每个元素或三维像素/像素含有  $^{13}\text{C}$ -MR 谱。在重建阶段中,将矩阵补零至  $32 \times 32$ ,这是一种帮助提高空间分辨率的数学操作。待分析的数据集包含 1024 个谱,输出成 Dicom®格式(DICOM 是 National Electrical Manufacture Association(国家电机制造协会)为了关于医学信息数字通信的标准出版物登记的商标)用于进一步分析。这些谱中约一半不含有 MR 信号,因为这些三维像素的位置在动物外部。动物内部的定位揭示了具有高丙酮酸盐信号和可忽略不计的乳酸盐和丙氨酸信号的三维像素(血池),而其他三维像素显示出约相等强度的丙酮酸盐、丙氨酸和乳酸盐。

[0094] 使用时间域拟合程序估算丙酮酸盐、丙氨酸和乳酸盐的振幅,其包括以下的:零级相在数据集中是恒定的,第一级相是 1.4ms,允许时间域中的线宽或阻尼可以在 0.5 至 3 倍之间改变,整个数据集的平均线宽对于每种代谢物是独立地,且关于整个数据集对于必须通过使用者来鉴定的最高峰建立的平均频率,允许频率在两个方向改变 20Hz。

[0095] 记录矩阵中的乳酸盐、丙氨酸和丙酮酸盐振幅,并再次取样来配合质子解剖 MR 图像的分辨率。将  $^{13}\text{C}$ -MR 图像投影在解剖图像上,使用自动化程序来获得与操作者无关的结果。将该结果展示于包含大鼠肿瘤解剖质子图像的图像组中,将丙酮酸盐、乳酸盐和丙氨酸的代谢  $^{13}\text{C}$ -图像投影在解剖图像上,图像显示每个像素

[0096] a)  $([\text{乳酸盐}]_{\text{norm}} \times ([\text{丙酮酸盐}]_{\text{max}} - [\text{丙酮酸盐}]_{\text{norm}}) \times [\text{乳酸盐}]$  和

[0097] b)  $([\text{乳酸盐}]_{\text{norm}} \times ([\text{丙氨酸}]_{\text{max}} - [\text{丙氨酸}]_{\text{norm}}) \times [\text{乳酸盐}]$

[0098] 其中术语“ $[\dots]_{\text{norm}}$ ”表示归一化振幅,即与代谢图像中最高值成比例的振幅,  $[\text{乳酸盐}]$  表示计算出的振幅。

[0099] 将区分代谢  $^{13}\text{C}$ -MR 图像中肿瘤组织和健康组织的成功结果定义为肿瘤部位中最高的乳酸盐信号或肿瘤部位中乳酸盐相对于丙酮酸盐的高加权比和相同像素位置中乳酸盐相对于丙氨酸的高加权比。

#### [0100] 5.5 生物分析

[0101] 目测肿瘤部位来检测出血的信号。将肿瘤从大鼠体内释放出来,称重并切成两半。目测肿瘤内部来测定均匀、坏死和出血。将肿瘤组织存储于 4%福尔马林中。

[0102] 如果符合以下标准就认为带有肿瘤的大鼠适于评价:肿瘤重量  $> 100\text{mg}$ ,在肿瘤内部没有可见的坏死或孢囊,在 MR 研究时体温高于  $35^\circ\text{C}$  且平均动脉血压高于  $60\text{mmHg}$ 。

#### [0103] 5.6 结果

[0104] 将 18 只大鼠中总共 30 个不同的肿瘤成像。1 只大鼠和 3 个肿瘤不符合前一段落 5.5 中所述的生物标准。剩余的 17 只大鼠中的 26 个肿瘤是均匀的并具有结实的非坏死内部。注射时的  $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐平均极化是  $21.2 \pm 2.9\%$  (平均  $\pm$  SD),和 pH 是  $8.08 \pm 0.14$  (平均  $\pm$  SD)。

[0105] 图 1 显示了一只成像大鼠的典型系列图像,(1) 质子参照图像,其中箭头表示肿瘤位置,(2)  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐图像,(3)  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐图像,(4)  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸图像,(5) 对  $^{13}\text{C}$ -丙酮酸盐校准的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐图像和 (6) 对  $^{13}\text{C}$ -丙氨酸校准的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐图像。将图像 (2) 至 (6) 与质子参照图像融合。

[0106] 图 2 显示了相同系列的图像,然而,图像 (2) 至 (6) 没有与解剖质子图像融合。

[0107] 结果,由于高代谢活性,通过高丙酮酸盐信号 (2) 来表示肿瘤位置。然而,乳酸盐信号 (3) 最终鉴定了肿瘤的正确位置。丙氨酸在骨骼肌中是可见的,但不存在于肿瘤组织中 (4)。丙酮酸盐和丙氨酸校准的乳酸盐图像 (5) 和 (6) 对于肿瘤也形成了极好的造影。

[0108] 因此证明了通过高乳酸盐信号、高的对丙酮酸校准的乳酸盐信号和高的对丙氨酸校准的乳酸盐信号来显示代谢图像中的肿瘤位置。

[0109] 代谢  $^{13}\text{C}$ -MR 图像的分析揭示了肿瘤部位中的代谢造影:

[0110] • 对于乳酸盐信号,26 个肿瘤中 24 个

[0111] • 对于丙酮酸盐校准的乳酸盐信号,26 个肿瘤中 26 个 (5.5, a)

[0112] • 对于丙氨酸校准的乳酸盐信号,26 个肿瘤中 26 个 (5.5, b)

[0113] 对于该研究的总体成功比例为 26 个中 26 个,或 100%。

[0114] 使用该研究,证明了使用在可以使化合物及其代谢物成像的时间段内到达目标区域 (肿瘤) 的超极化  $^{13}\text{C}_1$ - 丙酮酸盐可以鉴定肿瘤。

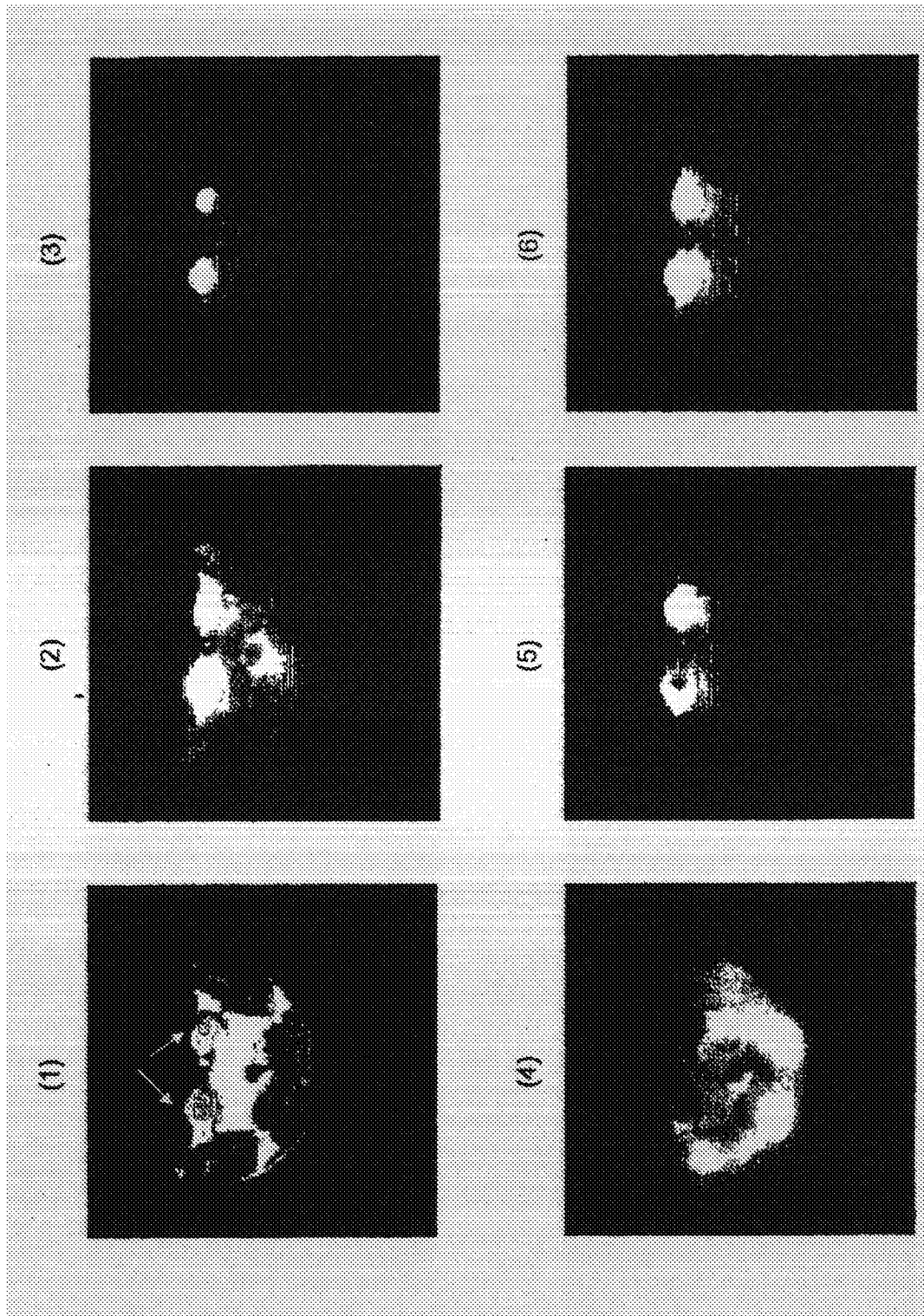


图 1

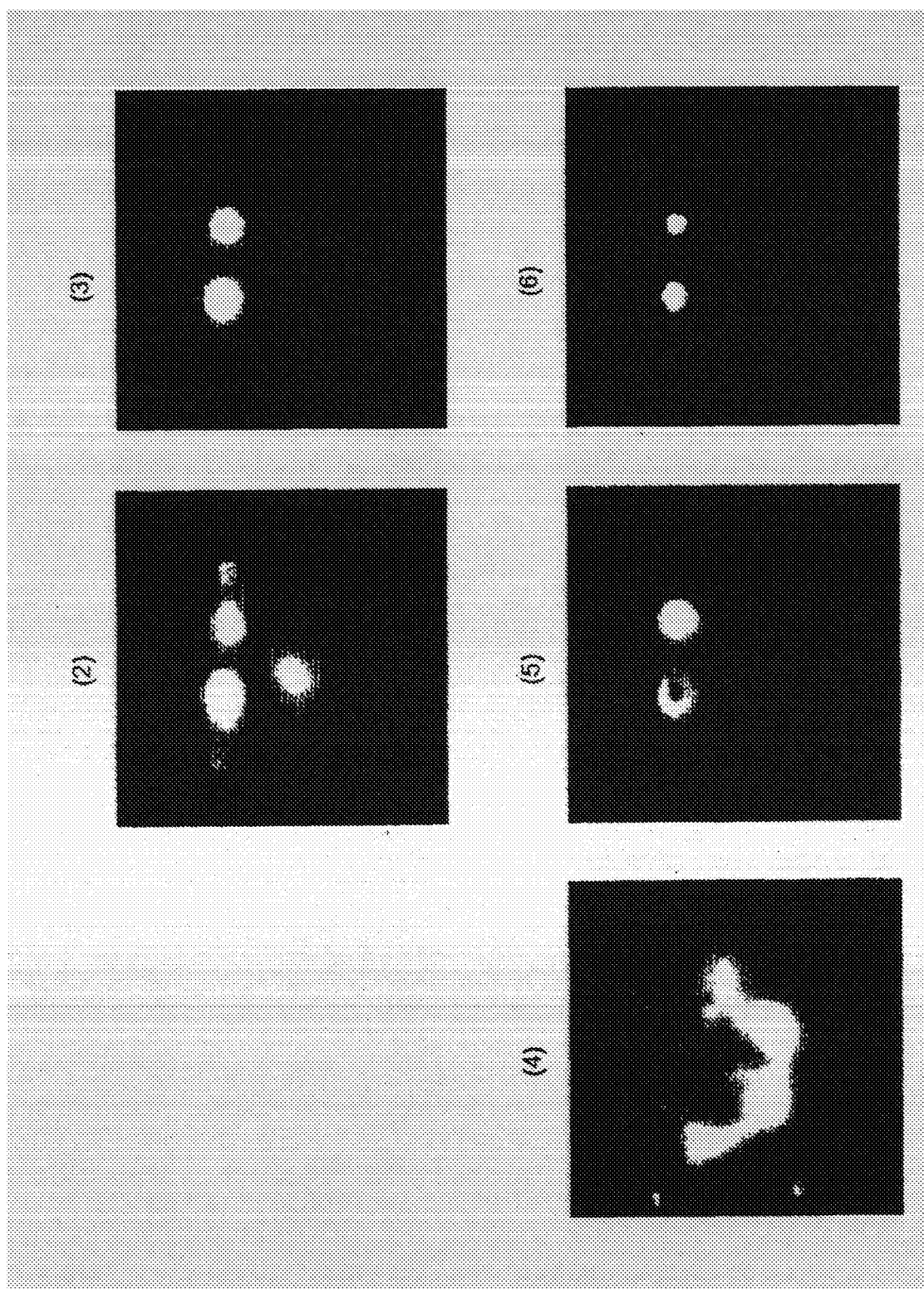


图 2