



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102858377 B

(45) 授权公告日 2015.04.15

(21) 申请号 201180022128.2

(22) 申请日 2011.05.02

(30) 优先权数据

10161740.5 2010.05.03 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.11.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/056945 2011.05.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/138269 EN 2011.11.10

(73) 专利权人 通用电气健康护理有限公司

地址 英国白金汉郡

(72) 发明人 K.M. 布林德尔 M.I. 克图宁

B.W.C. 肯尼迪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 徐晶 林森

(51) Int. Cl.

A61K 49/10(2006.01)

A61K 49/20(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

(56) 对比文件

US 5439803 A, 1995.08.08,

WO 2009/013350 A2, 2009.01.29,

US 5439803 A, 1995.08.08,

WO 2009/013350 A2, 2009.01.29,

审查员 张丽芳

权利要求书1页 说明书12页 附图8页

(54) 发明名称

测定 LDH 活性的超极化的乳酸盐造影剂

(57) 摘要

本发明涉及新的超极化的 MR 成像介质和涉及使用这样的介质用于测定乳酸脱氢酶 (LDH) 活性的  $^{13}\text{C}$ -MR 检测方法。造影剂含超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐。

1. 超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐在制造用于通过测定 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的 LDH- 催化的交换经由  $^{13}\text{C}$ -MR 检测测定 LDH 活性的成像介质中的用途。
2. 依据权利要求 1 的用途, 其中所述 LDH 活性是人类或非-人类动物的体内活性。
3. 依据权利要求 1 的用途, 其中所述 LDH 活性是在源于人类或非-人类的动物的细胞培养物、身体样本、离体组织或分离的器官中的体外活性。
4. 依据权利要求 1-3 中任一项的用途, 其中信号用于产生 LDH 活性的绘图。
5. 依据权利要求 1-4 中任一项的用途, 其中 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的 LDH- 催化的交换采用异核  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  自旋回波成像来监测。
6. 依据权利要求 1-4 中任一项的用途, 其中 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的 LDH- 催化的交换采用异核双回波成像来监测。
7. 包含超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐同位素异位体的 MR 成像介质。
8. 依据权利要求 7 的 MR 成像介质, 其中 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐同位素异位体选自 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、[ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、[ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、[ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2, 3\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、[ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2, 3\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐和 [  $3\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2, 3\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐。
9. 依据权利要求 7 的 MR 成像介质, 其中超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐同位素异位体的 C1、C2 和 C3 位置中多于一个是  $^{13}\text{C}$  标记的且其中 C2 位置或 C2 和 C3 位置是氘标记的。
10. 依据权利要求 7-9 的任一项的 MR 成像介质, 其还包含三苯甲基自由基和任选的顺磁性金属离子。
11. 依据权利要求 10 的 MR 成像介质, 其中存在所述顺磁性金属离子并且是含  $\text{Gd}^{3+}$  的顺磁性螯合物。
12. 通过动态核极化获得的依据权利要求 10-11 的任一项的 MR 成像介质。

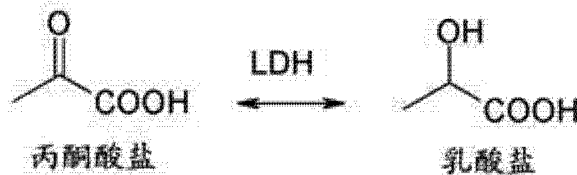
## 测定 LDH 活性的超极化的乳酸盐造影剂

[0001] 本发明涉及新的超极化的成像剂和涉及可用于测定乳酸脱氢酶 (LDH) 活性的  $^{13}\text{C}$ -MR 检测方法。

[0002] 前期的研究已经证明,超极化的  $[1-^{13}\text{C}]$  丙酮酸盐代谢可使用  $^{13}\text{C}$  磁共振光谱成像 ( $^{13}\text{C}$  MR 成像) 在体内成像。例如 W02006/011809 公开包含  $^{13}\text{C}$  丙酮酸盐的组合物和在  $^{13}\text{C}$  MR 成像中使用其的方法。

[0003] 在肿瘤中,检测丙酮酸盐和乳酸盐之间的超极化  $^{13}\text{C}$  标记物的乳酸脱氢酶 (LDH)-催化的流量,已经与肿瘤评级和对治疗的应答相关,参见如 Albers, M. J., 等,超极化的  $^{13}\text{C}$  乳酸盐、丙酮酸盐和丙氨酸:前列腺癌检测 and 分级的非侵入性生物标志 (Hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading), *Cancer Res* 68, 8607-8615 (2008)。体内磁化传递检测和体外肿瘤细胞悬浮液的研究已经清楚明白地证明,丙酮酸盐和乳酸盐之间的同位素交换,与净化学流量相对比,对观察到的丙酮酸盐和乳酸盐之间的超极化  $^{13}\text{C}$  标记物的流量产生显著贡献。此与以下的长期存在的观测相一致,即 LDH 催化细胞中接近平衡的反应,和酶的机制是规则的三元 (ordered ternary) 复杂机制,其中辅酶  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADH}$  分别在之前结合丙酮酸盐和乳酸盐。因此,LDH 催化容易可逆的、伴随着  $\text{NADH}$  和  $\text{NAD}^+$  的互换的丙酮酸盐和乳酸盐的互换,如流程 1 中所示,

[0004]



[0005] 流程 1:

[0006] 丙酮酸盐是检测 LDH-催化流量的卓越的超极化的底物,原因是其无毒性,此使极化易于达到高水平,该极化具有相对长的寿命且转运入细胞的过程快速。然而,丙酮酸盐具有许多重要的限制。虽然它是内源性分子,但没有证据显示在相对高浓度用于超极化的  $^{13}\text{C}$  体内成像实验时是有毒的,尽管如此,使用乳酸盐去检测 LDH-催化的流量将仍然是更优选的,因为乳酸盐以比丙酮酸盐高得多的浓度自然存在,并且也更迅速地被转运进细胞。使用标记的丙酮酸盐检测 LDH 活性的再一个缺点是,酶受到用于超极化的  $^{13}\text{C}$  成像实验的高浓度的丙酮酸盐的抑制。然而,应用乳酸盐的企图相当不成功,因为在丙酮酸盐中检测到非常少的标记物。此可能是由于组织中稳态丙酮酸盐浓度非常低,因此仅有一小池用于要交换的乳酸盐中的超极化的  $^{13}\text{C}$  标记物。

[0007] Simpson, R. J., Brindle, K. M., Brown, F. F., Campbell, I. D. & Foxall, D. L. 质子核磁共振 (pmr) 同位素-交换方法研究在完整细胞中脱氢酶的动力学特性 (A pmr isotope-exchange method for studying the kinetic-properties of dehydrogenases in intact-cells). *Biochemical Journal* 202, 573-579 (1982) 和 Simpson, R. J., Brindle, K. M., Brown, F. F., Campbell, I. D. & Foxall, D. L. 乳酸盐-脱氢酶在纯化

状态和在完整红细胞中的研究。*Biochemical Journal* 202, 581-587 (1982) 均描述了丙酮酸盐和乳酸盐之间的同位素标记物的 LDH- 催化的交换。 $^1\text{H}$  MRS 用于这些实验中以检测人红细胞悬浮液中的甲基氘化的丙酮酸盐 ( $[3\text{-}^2\text{H}_3]$  丙酮酸盐) 与质子化的乳酸盐的交换。在添加甲基氘化的丙酮酸盐和质子化的乳酸盐至红细胞悬浮液中后, 有来自丙酮酸盐的甲基质子信号增加和来自乳酸盐的甲基质子信号的相应的减少, 因为氘标记物在两种分子之间交换。

[0008] 随后不是通过检测丙酮酸盐和乳酸盐之间标记物交换, 而是通过检测以它们的甲基标记 ( $^1\text{H}$  或  $^2\text{H}$ ) 为特征的、两个不同的同位素标记的乳酸盐核素的 C2 位置之间氘标记物的交换, 实施在具有  $[3\text{-}^2\text{H}_3]$  丙酮酸盐和质子化乳酸盐的  $^1\text{H}$  MRS 实验中 LDH 的丙酮酸盐抑制 (Brindle, K. M. 等, 由人红细胞中乳酸脱氢酶表达的活性的  $^1\text{H}$  NMR 研究. *Eur. J. Biochem.* 158, 299-305 (1986)。该实验使用自旋回波脉冲序列,  $\tau = 1/2J$ , 其中 J 是乳酸盐甲基和 C2 质子之间的  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  耦合常数 (7.4 Hz) 而  $\tau$  是  $90^\circ$  和  $180^\circ$  脉冲之间的延迟 (68 ms)。在这些情况下, 在得到的光谱中完全反转乳酸盐甲基共振。乳酸盐 C2 质子对氘 (D) 的交换去除质子耦联和甲基共振的相位调制, 其现在假定为正相。从而, 可在同核  $^1\text{H}$  自旋回波实验中经由自旋 - 耦联的甲基质子的相位调制检测乳酸盐 C2 碳的质子化状态。例如, 如果将等摩尔的过氘化的和质子化的乳酸盐的混合物, 加至含乳酸脱氢酶和  $\text{NAD}^+$  的溶液中, 则  $^1\text{H}$  光谱将最初显示自质子化的乳酸盐的反转的甲基共振。在质子化的和氘化的乳酸盐核素之间的 C2 位置的氘标记物的 LDH- 催化的交换之后, 在同位素平衡上将存在以下的乳酸盐核素的混合物:  $[3\text{-}^2\text{H}_3, 2\text{-}^2\text{H}_1]$  乳酸盐、 $[3\text{-}^2\text{H}_3, 2\text{-}^1\text{H}_1]$  乳酸盐、 $[3\text{-}^1\text{H}_3, 2\text{-}^2\text{H}_1]$  乳酸盐和  $[3\text{-}^1\text{H}_3, 2\text{-}^1\text{H}_1]$  乳酸盐。仅观察到甲基质子化的核素, 且这些中的一半在 C2 位置将具有质子, 从而将反转甲基共振, 且一半将在 C2 位置具有氘, 从而甲基共振将具有正相。这些甲基质子共振将增加给出无信号 (有微小的氘位移, 从而信号并未完全消除)。可用  $[3\text{-}^1\text{H}_3, 2\text{-}^2\text{H}_1]$  乳酸盐和  $[3\text{-}^2\text{H}_3, 2\text{-}^1\text{H}_1]$  乳酸盐开始实施相同的实验。在这种情况下, 观察到的乳酸盐甲基共振最初具有正相, 由于 C2 氘核, 且此在 C2 位置的标记物交换之后衰减至零。

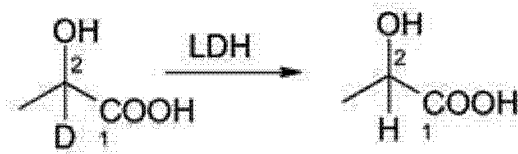
[0009] 现在已经惊奇地发现, 可实施采用超极化的  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$  乳酸盐的实验, 其中监测组织中超极化的  $[1\text{-}^{13}\text{C}, 2\text{-}^2\text{H}_1]$  乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的  $^2\text{H}$  标记物的交换。在本发明中, 发明人提议使用超极化的  $[1\text{-}^{13}\text{C}, 2\text{-}^2\text{H}_1]$  乳酸盐或其他双重 - 标记的同位素异位体, 以检测 LDH 活性, 此处, 在异核  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  自旋回波实验中, 经由在 C1 或在其他乳酸盐碳上的自旋 - 耦联的超极化的  $^{13}\text{C}$  标记物的相位调制, 检测乳酸盐 C2 碳的质子化状态。

[0010] 存在由升高的 LDH 所指示的紊乱, 诸如多种类型的癌症。

[0011] 因此, 存在对新的改良的、测定 LDH 活性, 尤其是体内 LDH 活性的方法的需求。

[0012] 发明人在本文描述了一种造影剂和通过检测  $[1\text{-}^{13}\text{C}, 2\text{-}^2\text{H}]$  乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的 LDH- 催化的交换, 而避免使用丙酮酸盐的使 LDH 活性成像的方法。已经发现, 可将超极化的  $[^{13}\text{C}, ^2\text{H}]$  乳酸盐用作经采用  $^{13}\text{C}\text{-MR}$  检测在体内和体外测定 LDH 活性的试剂。流程 2 显示在 C2 位置具有氘标记物的乳酸盐是如何代谢为质子化的 (未标出) 乳酸盐的。所述 C1 位置可为  $^{13}\text{C}$  富集的, 然后此位置被超极化。也可将  $^{13}\text{C}$  标记物置于 C2 或 C3 位置, 此处也将显示与 C2 质子的自旋 - 自旋耦联。乳酸盐甲基 (C3) 质子也可被氘交换, 这样仅存在于 C1、C2 或 C3 位置的 C2 质子和  $^{13}\text{C}$  之间自旋 - 自旋耦联,

[0013]



[0014] 流程 2 :

[0015] 已经发现,超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐 (即  $^{13}\text{C}$ - 氘标记的乳酸盐) 的向超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ] 乳酸盐 (即  $^{13}\text{C}$ - 质子化的乳酸盐) 的代谢转化,可用于采用 MR 研究人和非 - 人的动物体的代谢过程。已经发现超极化的  $^{13}\text{C}$ - 氘标记的乳酸盐向超极化的  $^{13}\text{C}$ - 质子化的乳酸盐的转化足够快,以允许进行来自氘化的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐母体化合物及其质子化的产物的信号检测。检测的  $^{13}\text{C}$ - 氘标记的乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的 LDH- 催化的交换,应该取决于研究中的组织的代谢状况。超极化的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐的 MR 信号强度与该物质的浓度和检测时留下的极化程度相关,因此,通过监测超极化的  $^{13}\text{C}$ - 氘标记的乳酸盐向超极化的  $^{13}\text{C}$ - 质子化的乳酸盐的转化,有可能采用非 - 侵入性 MR 成像或 MR 光谱学研究人或非 - 人的动物体内的 LDH 活性。

[0016] 因而,在本发明的第一个方面,提供了包含超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐的成像介质。这样的通常称为 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐的经同位素标记的分子选自 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、 [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、 [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2, 3\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐、 [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2, 3\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐和 [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2, 3\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐,或选自其中 C1、C2 和 C3 位置中多于一个为  $^{13}\text{C}$  标记的且其中 C2 位置或 C2 和 C3 位置是氘标记的分子。包含 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐且特别是超极化的 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐的成像介质是优选的。

[0017] 乳酸盐是内源性化合物且其在人血液中的浓度相当高 (1-3 mM),局部浓度为 10 mM 且更高。因此,乳酸盐应该是非常好耐受的,因此从安全角度来看,采用超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ]- 乳酸盐作为成像剂是有利的。

[0018] 在本发明的第二个方面,提供通过  $^{13}\text{C}$ -MR 检测,采用包含超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐的成像介质测定 LDH 活性的方法,其中检测 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的 LDH- 催化的交换。

[0019] 更优选地,检测在 C2 位置的氘标记物的 LDH- 催化的交换,所述交换在 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐或在 C2 位置被氘标记的其他  $^2\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$ - 标记的乳酸盐同位素异位体和内源性未标记的乳酸盐之间进行。

[0020] 通过本发明方法检测的细胞和组织中的 LDH 活性是明显的活性,因为此取决于转运进细胞中乳酸盐和内源性乳酸盐浓度的比率以及 LDH 活性。在体内该比率也可取决于传送至正在被研究的组织的标记的乳酸盐的比率。

[0021] 术语“测定 LDH 活性”表示比率的检测,用在超极化的 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐中的质子,或在 C2 位置氘标记的其他  $^2\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$ - 标记的乳酸盐同位素异位体交换 C2 氘标记物,且其取决于转运进细胞的乳酸盐的比率、内源性乳酸盐浓度和 LDH 活性。在体内,该比率也可取决于传送至正在被研究的组织的标记的乳酸盐的比率。

[0022] 在本发明的方法的优选实施方案中,经由在异核  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  自旋回波实验中,在 C1 上的或在其他乳酸盐碳上的自旋 - 耦合的超极化的  $^{13}\text{C}$  标记物的相位调制,检测乳酸盐 C2 碳的质子化状态。

[0023] 术语“ $^{13}\text{C}$ -MR 检测”表示  $^{13}\text{C}$ -MR 成像或  $^{13}\text{C}$ -MR 光谱学或联合  $^{13}\text{C}$ -MR 成像和  $^{13}\text{C}$ -MR 光谱学,即  $^{13}\text{C}$ -MR 光谱成像。该术语还表示在多个时间点的  $^{13}\text{C}$ -MR 光谱成像。

[0024] 术语“成像介质”表示含超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ], 诸如 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐或在 C2 位置被氘标记的其他  $^2\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$ - 标记的乳酸盐同位素异位体的液体组合物,如 MR 活性剂,即成像剂。

[0025] 用于本发明的方法的成像介质可被用作体内,即在活体人类或非 - 人类的动物中  $^{13}\text{C}$ -MR 检测的成像介质。此外,用于本发明的方法的成像介质可被用作体外  $^{13}\text{C}$ -MR 检测的成像介质,如在细胞培养物、身体样本,诸如血液或脑脊液、离体组织,例如从尸检或分离的器官中获得的离体组织(所有这些均源于人或非 - 人的动物体)中进行的  $^{13}\text{C}$ -MR 检测。

[0026] 术语“乳酸盐”和“乳酸”,优选表示 L- 异构体 (L- 乳酸盐、L- 乳酸),因为它是由哺乳动物 LDH 同工型特定使用的异构体。D- 异构体 (D- 乳酸盐、D- 乳酸) 是由微生物乳酸脱氢酶使用的,因而以上描述的标记的乳酸盐同位素异位体的 D 异构体可用于检测哺乳动物组织中细菌感染存在。因此,依据本发明的成像介质可从而包含超极化的  $^{13}\text{C}$ -L- 乳酸盐或超极化的  $^{13}\text{C}$ -D- 乳酸盐,这取决于是否分别检测哺乳动物或微生物 LDH 活性的意图而定。

[0027] 用于本发明方法的乳酸盐同位素异位体的同位素的  $^{13}\text{C}$  富集为优选至少 75%,更优选至少 80% 而尤其优选至少 90%,超过 90% 的同位素富集为最优选的。理想的是,富集为 100%。用于本发明方法的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐可在以下位置上为同位素富集的: C1- 位置(表示 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐)、C2- 位置(表示 [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐)、C3- 位置(表示 [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐)、C1- 和 C2- 位置(表示 [ $1, 2\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐)、C1- 和 C3- 位置(表示 [ $1, 3\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐)、C2- 和 C3- 位置(表示 [ $2, 3\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐)或 C1-、C2- 和 C3- 位置(表示 [ $1, 2, 3\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐)。在 C1- 位置上的同位素的富集是最优选的,因为于  $37^\circ\text{C}$ , 在人血液中,比起在其他 C- 位置富集同位素的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐, [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐具有更长的  $T_1$  弛豫。

[0028] 用于本发明方法的乳酸盐的同位素  $^2\text{H}$  富集为优选至少 75%、更优选至少 80% 和尤其优选至少 90%,超过 90% 的同位素富集为最优选的。理想的是,富集为 100%。用于本发明方法的乳酸盐为在 C2 位置或在 C2 位置和 C3 位置上同位素氘富集的。

[0029] 在优选的实施方案中,依据本发明的成像介质包含超极化的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸钠,更优选 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸钠或在 C2 位置上氘标记的其他  $^2\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$ - 标记的乳酸盐同位素异位体。

[0030] 在制备包含超极化的 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐的依据本发明的成像介质中,可将 [ $1\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] 乳酸钠用作起始原料,因为它是商业上可获得的化合物。

[0031] 对于氘标记的,即 [ $1\text{-}^{13}\text{C}_1$ ,  $2\text{-}^2\text{H}_1$ ] 乳酸盐的制备,将 L- [ $1\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] 乳酸钠溶解于  $^2\text{H}_2\text{O}$  中。通过添加适当的缓冲剂,诸如磷酸盐缓冲剂调节 pH。其他相应的缓冲剂为 ACES、PIPES、咪唑类, /HCl、BES、MOPS、HEPES、TES、HEPPS 或 TRICIN。此外,可将螯合剂,诸如 EDTA (乙二胺四乙酸) 或 DTPA 纳入制备的组合物中,以从溶液中螯合金属离子。EDTA 是优选的。此加工步骤在实施例 1 中进一步概述。硫辛酰胺 (Lipoamide) 脱氢酶,在此实施例中来自猪的心脏,催化 NADH 的烟酰胺环中的 C4 位置上的质子与溶剂氘的交换。然后,在由 LDH 催化的反应中,这种氘与 L- [ $1\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] 乳酸盐中的 C2 质子交换。这种耦联酶反应确保 L- [ $1\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] 乳酸盐的 C2 位置上的质子与溶剂  $^2\text{H}_2\text{O}$  中的很大的蓄积 (much larger pool) 的氘核交换。

[0032] 因此,在一个方面,本发明提供制备超极化的 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐的方法,该方法

包括步骤：

[0033] i) 用氘标记  $[1-^{13}\text{C}_1]$  乳酸钠产生  $[1-^{13}\text{C}_1, 2-^2\text{H}_1]$  乳酸盐，

[0034] ii) 使  $[1-^{13}\text{C}_1, 2-^2\text{H}_1]$  乳酸盐超极化。

[0035] 术语“超极化的”和“极化的”可在下文互换用于表示  $^{13}\text{C}$ -核的极化并表示核极化水平超过 0.1%，更优选超过 1% 和最优选超过 10%。

[0036] 可例如通过在固体超极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐，如经  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的动态核极化 (DNP) 获得的固体超极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐中的固态  $^{13}\text{C}$ -NMR 检测，测定极化的水平。固态  $^{13}\text{C}$ -NMR 检测优选由使用低倾角脉冲的简单脉冲获得 NMR 序列组成。将超极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐在 NMR 光谱中的信号强度与在极化过程前获得的 NMR 光谱中的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的信号强度比较。然后，从极化前和极化后的信号强度比率计算极化的水平。

[0037] 同理，可通过液态 NMR 检测，测定溶解的超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的极化的水平。再将溶解的超极化  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的信号强度与极化前或极化已经衰减后溶解的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的信号强度进行比较。然后，从极化之前和极化之后的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的信号强度比率计算极化的水平。

[0038] 可通过不同的方法实现 NMR 活性的  $^{13}\text{C}$ -核的超极化，所述方法例如在 WO-A-98/30918、WO-A-99/24080 和 WO-A-99/35508 中描述，所述全部文献通过参考均结合于本文，以及本领域还已知的超极化方法，诸如自惰性气体极化转移、“强力 (brute force)”、自旋冷藏、仲氢法和动态核极化 (DNP)。优选 DNP。

[0039] 为了获得超极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐，优选直接使  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐极化。也可使  $^{13}\text{C}$ -乳酸极化，然而，极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸需要转化为极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐，如通过用碱中和实现。 $^{13}\text{C}$ -乳酸盐是商业上可获得的，如  $^{13}\text{C}$ -乳酸钠。 $^{13}\text{C}$ -乳酸也是商业上可获得的；也可通过使商业上可获得的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐，如商业上可获得的  $^{13}\text{C}$ -乳酸钠质子化获得。

[0040] 获得超极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的一种途径是，通过在 WO-A-98/30918 中描述的、自超极化的惰性气体的极化转移。可通过采用圆偏振光使具有非 - 零核自旋的惰性气体超极化。超极化的惰性气体，优选 He 或 Xe，或这样的气体的混合物，可用于实现  $^{13}\text{C}$ -核的超极化。超极化的气体可处于气相，可将其溶解于液体 / 溶剂中，或超极化的气体自身可作为溶剂使用。或者，可将所述气体压缩在冷却的固体表面和以此形式使用，或允许其升华。优选超极化的气体与  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐或  $^{13}\text{C}$ -乳酸紧密混合。

[0041] 获得超极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的另一种途径是，通过在非常低的温度和高磁场下的热力学平衡将极化赋予  $^{13}\text{C}$ -核。与 NMR 光谱仪的操作场 (operating field) 和温度比较，超极化，受非常强的磁场和非常低的温度 (“强力”) 的应用的影响。所用的磁场强度应该尽可能地高，适宜高于 1 T，优选高于 5 T，更优选 15 T 或更多且尤其优选 20 T 或更多。温度应该非常低，如 4.2 K 或更低，优选 1.5 K 或更低，更优选 1.0 K 或更低，尤其优选 100 mK 或更低。

[0042] 获得超极化的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐的另一种途径是自旋冷藏法。该方法涵盖经自旋冷藏极化的固体化合物或系统的自旋极化。该系统掺杂或紧密混合了适宜的结晶顺磁性材料，诸如  $\text{Ni}^{2+}$ 、镧系元素或铜类离子，具有第三 (order three) 或更多对称轴。与 DNP 所需要的比较，使用仪器更加简单，无需均强磁场，因为不用施用共振激发场。通过物理上绕垂直于磁场方向的轴旋转样本，实施该过程。该方法的先决条件是顺磁性核素具有高度各向异性 g- 因子。作为样本旋转的结果，将使得电子顺磁共振与核自旋接触，导致核自旋温度降低。

进行样本旋转,直至核自旋极化已经达到新的平衡。

[0043] 在优选的实施方案中, DNP (动态核极化) 用于获得超极化的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐。可直接用于 DNP 的  $^{13}\text{C}$ - 乳酸钠是商业上可获得的化合物, 因为其不经冷却 / 冷冻结晶。由于此消除了样本中成玻璃材料和 / 或大量溶剂的需求, 可制备高度浓缩的样本并将其用于 DNP 方法中。此外,  $^{13}\text{C}$ - 乳酸钠样本为 pH 中性的, 因此可使用多种 DNP 试剂。在 DNP 中, 通过极化剂或所谓的 DNP 试剂, 一种含不成对电子的化合物, 实现将要被极化的化合物中 MR 活性核的极化。在 DNP 过程中, 提供通常以微波辐射形式呈现的能量, 其将最初激发 DNP 试剂。一旦衰变到基态, 极化从 DNP 试剂的不成对电子转移至将要被极化的化合物的 NMR 活性核, 如转移至  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐中的  $^{13}\text{C}$  核。一般来说, 中等或高磁场和非常低的温度用于 DNP 方法中, 如通过在真空和约 1 T 或更的磁场中, 在液体氦中实施 DNP 方法。或者, 可应用中等磁场和达到充分的极化增强的任何温度。在例如 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中还描述了 DNP 技术, 所述两篇文献均通过参考纳入本文中。

[0044] 为了使化学实体, 即化合物通过 DNP 方法极化, 制备含将要被极化的化合物和 DNP 试剂的组合物, 然后将其冷冻并插入 DNP 极化器中极化。极化后, 或者通过熔化或者通过将其溶解于适宜的溶解介质, 迅速将冷冻的固体超极化的组合物转移成液态。优选溶解, 且因此在 WO-A-02/37132 中详细描述了冷冻的超极化组合物的溶解过程和适宜的装置。例如在 WO-A-02/36005 中描述了熔化过程和适宜的熔化装置。

[0045] 为了在将要被极化的化合物中获得高的极化水平, 在 DNP 过程中需要将所述化合物和 DNP 试剂密切接触。如果组合物一经冷冻或冷却就结晶则不是这样。为了避免结晶, 或者在组合物中必需存在成玻璃材料, 或者必需选择化合物用于极化, 所述化合物在冷冻时不结晶而是形成玻璃。 $^{13}\text{C}$ - 乳酸钠是特别优选的, 因为含  $^{13}\text{C}$ - 乳酸钠的组合物在冷冻 / 冷却时不结晶。

[0046] 如果通过 DNP 获得用于本发明方法的超极化的  $^{13}\text{C}$ - $^2\text{H}$  乳酸盐, 则将待极化的样本, 即  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐和 DNP 试剂还可包含顺磁性金属离子。已经发现, 在要经 DNP 极化的组合物中存在的顺磁性金属离子导致  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐中极化水平提高, 如在 WO-A2-2007/064226 (其通过参考结合于本文) 中描述的那样。因此, 在本发明优选的实施方案中, MR 成像介质包含 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐, 诸如 [1- $^{13}\text{C}$ , 2- $^2\text{H}$ ] 乳酸盐、三苯甲游基和任选的顺磁性金属离子。当存在所述顺磁性金属离子时, 则优选以含  $\text{Gd}^{3+}$  的顺磁性螯合物的形式存在。优选经动态核极化获得这样的 MR 成像介质。

[0047] 如较早提及的那样, 依据本发明的成像介质可被用作经  $^{13}\text{C}$ -MR 检测的、体内, 即在活体人类或非 - 人类的动物体内测定 LDH 活性的成像介质。为此目的, 提供作为适宜给予活体人或非 - 人的动物体的组合物的成像介质。这样的成像介质优选除了包含 MR 活性剂之外, 还包含 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ]- 乳酸盐、水性载体, 优选生理学上可耐受的且药理学上可接受的水性载体, 如水、缓冲溶液或盐水。这样的成像介质还可包含常规的药用或兽用载体或赋形剂, 如制剂助剂 (formulation aids), 诸如为在人或兽医中常规用于诊断组合物。

[0048] 此外, 依据本发明方法的成像介质可被用作经  $^{13}\text{C}$ -MR 检测的体外, 即在细胞培养物、身体样本, 诸如血液样本、离体组织, 诸如尸检组织或分离的器官的 LDH 活性测定的成像介质。为此目的, 提供作为适宜加至例如细胞培养物、血液样本、离体组织如尸检组织或分离的器官的组合物的成像介质。这样的成像介质优选除了包含 MR 活性剂之外, 还包含



$^{13}\text{C}$ - 乳酸盐,一种与体外细胞或组织相容并用于体外细胞或组织分析的溶剂,例如 DMSO 或甲醇或含水性载体和非水性溶剂的溶剂混合物,例如 DMSO 和水或缓冲溶液的混合物或甲醇和水或缓冲溶液的混合物。如专业技术人员明白的是,药学上可接受的载体、赋形剂和制剂助剂可以存在于这样的成像介质中,但不必用于这样的目的。

[0049] 如果用于本发明的方法的成像介质用于体内,即在活体人类或非-人类的动物体内测定 LDH 活性,则优选将所述成像介质经胃肠外,优选静脉给予所述身体。一般来说,使处于实验的身体位于 MR 磁体中。将专用的  $^{13}\text{C}$ -MR 和  $^1\text{H}$ -MR 或双调谐的  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  RF-线圈定位以覆盖感兴趣的面积。成像介质的精确剂量和浓度将取决于一系列因素,诸如毒性和给药途径。在给药后少于 400 s,优选给药后少于 120 s,更优选少于 60 s,施用 MR 成像序列,优选以合并频率和空间选择性方式编码感兴趣的容积的 MR 成像序列。施用 MR 序列的精确时间高度依赖于感兴趣的容积和物质。

[0050] 如果用于本发明的方法的成像介质被用于 LDH 活性的体外测定,则所述成像介质为在  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐中 1 mM 至 100 mM,更优选在  $^{13}\text{C}$ - 乳酸盐中 20 mM 至 90 mM 和最优选 40 至 80 mM。

[0051] 在本发明的方法的一个实施方案中,采用异核  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  自旋回波实验,监测  $[1-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}]$  乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的 LDH-催化的交换。在该项实验中,将  $180^\circ$  脉冲同时施用于  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  自旋,并在  $\tau = 1/2J$  下观察到  $^{13}\text{C}$  共振,此处 J 是 C2 质子和 C1 碳-13 之间的  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  耦合常数,将反转  $^{13}\text{C}$  共振。在两种乳酸盐核素之间氘标记物的 LDH-催化的交换之后,且假定两种均以相等浓度存在,则在同位素平衡上,将有等摩尔的  $[1-^{13}\text{C}_1, 2-^2\text{H}_1]$  乳酸盐、 $[1-^{13}\text{C}_1, 2-^1\text{H}_1]$  乳酸盐、 $[2-^2\text{H}_1]$  乳酸盐和  $[2-^1\text{H}_1]$  乳酸盐的混合物。在  $^{13}\text{C}$  实验中,仅观察到  $^{13}\text{C}$ -标记的核素,且这些  $[1-^{13}\text{C}_1, 2-^2\text{H}_1]$  乳酸盐将产生具正相的  $^{13}\text{C}$  共振,而  $[1-^{13}\text{C}_1, 2-^1\text{H}_1]$  乳酸盐产生具负相的  $^{13}\text{C}$  共振,其将在很大程度上取消。当然,在体内所述浓度未必相等,然而,可在同位素交换时期的任何位点,通过获取在存在和缺乏  $180^\circ$   $^1\text{H}$  脉冲中获得的异核自旋回波差 (spin echo difference) 光谱,测定  $[1-^{13}\text{C}_1, 2-^1\text{H}_1]$  乳酸盐核素的浓度。因此,在本发明的一个实施方案中,异核  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  自旋回波成像的方法用于监测  $[1-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}]$  乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间的氘标记物的交换。

[0052] 如果使用  $[1-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}]$  乳酸盐同位素异位体,则  $^1\text{H}$  脉冲必须是频率选择性的,以避免由于  $^{13}\text{C}$  核和 C3 甲基质子之间自旋-自旋耦联的相位调制。如果使用其中也把甲基质子交换成氘的乳酸盐同位素异位体,则去除频率-选择性  $^1\text{H}$  脉冲的必要条件。

[0053] 在本发明的又一个实施方案中,异核双回波成像脉冲序列可用于体内检测  $[1-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}]$  乳酸盐的 C2 质子化状态,其中的回波用读出器读出和标准回波平面成像序列中的相位编码梯度获取。不用  $^1\text{H}$  脉冲所获得的  $^{13}\text{C}$  成像将具有自  $^{13}\text{C}$ -标记的 C2 氘化的乳酸盐加上  $^{13}\text{C}$ -标记的 C2 质子化的乳酸盐的信号,而用  $^1\text{H}$  脉冲所获得的  $^{13}\text{C}$  成像将具有自  $^{13}\text{C}$ -标记的 C2 氘化的乳酸盐减去  $^{13}\text{C}$ -标记的 C2 质子化的乳酸盐的信号。这些图像的增加将给出总的  $^{13}\text{C}$ -标记的 C2 氘化的乳酸盐而减少将给出  $^{13}\text{C}$ -标记的 C2 质子化的乳酸盐。因此,在本发明的另一个实施方案中,异核双回波成像用于监测  $[1-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}]$  乳酸盐和内源性未标记的乳酸盐之间氘标记物的交换。

[0054] 在本发明的方法的优选的实施方案中,获得一系列以上提及的图像,且在 C2 质子化的和 C2 氘化的乳酸盐浓度成像中的信号强度的逐像素 (pixel-by-pixel) 匹配,与动力

学模型拟合以获得组织中 LDH 活性的绘图。这样,表观 LDH 活性可取决于标记的乳酸盐向组织中的传送速率、乳酸盐转运跨过细胞膜的比率和内源性乳酸盐浓度。如果在体内,即在活体人类或非-人类的动物中实施本发明的方法,所述 LDH 活性绘图可源于全身,如通过全身在体  $^{13}\text{C}$ -MR 检测所获得的那样。或者,所述 LDH 活性绘图产生于感兴趣的区域或容积,即所述人或非-人的动物体的某个组织、器官或部分。

[0055] 在本发明方法的另一个优选的实施方案中,以上提及的  $^{13}\text{C}$ -乳酸盐信号用于在源于人类或非-人类的动物的身体样本,诸如血液样本、离体组织如尸检组织或分离的器官的细胞培养物中测定细胞的 LDH 活性。然后,通过体外  $^{13}\text{C}$ -MR 检测产生所述 LDH 活性。

[0056] 因此,在优选的实施方案中,本发明提供通过  $^{13}\text{C}$ -MR 检测,采用包含超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐,诸如 [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ,  $2\text{-}^2\text{H}$ ] 乳酸盐的成像介质,测定 LDH 活性的方法,其中检测 C2 质子化状态且其中所述信息用于产生 LDH 活性的绘图或点测量。

[0057] 在依据本发明的方法的优选实施方案中,所产生的 LDH 活性绘图或检测值是在检测中的身体、身体的部分、细胞、组织、身体样本等的 LDH 活性的指标,且获得的所述信息可被用于多种目的的后续步骤。

[0058] 这些目的之一可为改变 LDH 活性的化合物,优选提高 LDH 活性的化合物的评估。这些可为改善组织生存能力的药物,人们将应期望看见 LDH 活性的增加。

[0059] 在一个实施方案中,在体外实施本发明的方法,并将所获得的信息用于评估改变 LDH 活性的潜在药物的功效,如用于药物发现和 / 或筛选过程。在这样的实施方案中,可在适宜的细胞培养物或组织中实施本发明的方法。使细胞或组织与潜在药物接触并依据本发明的方法经  $^{13}\text{C}$ -MR 检测测定 LDH 活性。可通过将处理的细胞或组织的 LDH 活性与非-处理的细胞或组织的 LDH 活性比较,获得有关潜在药物的功效的信息。或者,可通过测定处理前后细胞或组织的 LDH 活性,确定 LDH 活性的变化。可在例如微量滴定板上,进行这样的药物功效评估,其将允许平行测试多种潜在药物和 / 或潜在药物的多个剂量,从而使其适宜高通量筛选。

[0060] 在另一个实施方案中,在体内实施本发明的方法,并将所获得的信息用于评估改变体内 LDH 活性的潜在药物的功效。在这样的实施方案中,可在例如,试验动物或在临床试验的志愿者中实施本发明的方法。给予试验动物或志愿者以潜在药物并通过依据本发明的方法的  $^{13}\text{C}$ -MR 检测,测定 LDH 活性。可通过测定治疗前后 LDH 活性的变化,如在某个时期经重复治疗,获得有关潜在药物的功效的信息。可在临床前研究(试验动物)或临床试用中实施这样的药物功效评估。

[0061] 在另一个实施方案中,在体内或体外实施本发明的方法,并将所获得的信息用于评估对治疗的应答和 / 或用于在处于对其疾病经受治疗的患病患者中测定治疗功效。

[0062] 如前所述,可将通过本发明的方法所获得的信息用于后续步骤的多种目的。另一个目的可为洞悉疾病状态,即鉴别处于风险中的患者、疾病的早期检测、评估疾病进展、严重程度和与疾病相关的并发症。

[0063] 在还一个实施方案中,在体内或体外实施本发明的方法,并将所获得的信息用于监测疾病的进展。此对于疾病或紊乱可以是有用的,其中所述疾病尚未进展到指示或推荐治疗的水平,例如由于与所述治疗相关联的严重的副作用。在这样的情形下,行动的选择是“观察等待治疗 (watchful waiting)”,即密切监测患者的疾病进展和恶化的早期检测。在

该实施方案中,可用本发明的方法测定最初的 LDH 活性和以某种频率在一段时期测定后续  
的 LDH 活性。可期望的是,LDH 活性的下降可预示疾病进展和恶化,并且医师可将所述下降  
用于决定治疗的开始。或者,LDH 活性增加可预示疾病的恶化,例如在癌症中,特别是对于  
前列腺癌,LDH 和乳酸盐浓度可随疾病进展而增加,所述疾病将增加通过本发明的方法检测  
到的表观 LDH 活性。为了以上提及的体外的目的实施本发明的方法,需要可获得的来自接  
受治疗的患者的适宜的样本,如组织样本或身体样本如血液样本。

[0064] 在优选的实施方案中,依据本发明的方法被用于脑瘤、乳腺肿瘤、结肠肿瘤、肺肿  
瘤、肾肿瘤、头和颈肿瘤、肌肉肿瘤、卵巢肿瘤、胃肿瘤、胰腺肿瘤、食道肿瘤和前列腺肿瘤的  
体内 MR 肿瘤成像、肿瘤治疗监测和 / 或肿瘤分期。还已经发现,依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 / 或前列腺肿瘤分期和 / 或前列腺肿瘤治疗监  
测是尤其有用的。

[0065] 在又一个实施方案中,在体内或体外实施本发明的方法,并将所获得的信息用于  
确定疾病的严重程度。疾病自其起病常常随时间的推移而进展。依赖于症状的种类和 / 或  
某些临床标志的发现,疾病的特征在于某些阶段,如早期(轻度)、中期(中度)和严重(晚  
期)阶段。对于某些疾病而言,更为精确的阶段是共同的。多种临床标志已知将被用于对  
疾病分期,所述临床标志包括更特别的标志如某些酶或蛋白表达,但也为更一般的标志如  
血液值、电解质水平等。在上下文中,LDH 活性可为这样的临床标志,可单独与其他标志  
和 / 或症状联合使用它们,以确定疾病阶段,从而确定疾病的严重程度。因此,可为可能  
的是,使用本发明的方法以在患者中以定量方式测定 LDH 活性,并且从获得的 LDH 活性值对患  
者的疾病分期。可通过依据本发明的方法测定 LDH 活性,在患有例如早期、中期和晚期疾  
病的患者中确定为某个疾病阶段的特征的 LDH 范围,和定义为某一阶段的特征的 LDH 活性的  
范围。

[0066] 在再一个实施方案中,在体内或体外实施本发明的方法,并将所获得的信息用于  
鉴别和评估与疾病相关的并发症。采用发明的方法,可以器官-特异性的方式,例如通过用  
置于心脏或肾上面的表面线圈实施的体内  $^{13}\text{C}$ -MR 检测,测定 LDH 活性。

[0067] 当在体内实施时,可将解剖学的和 / 或在适宜时,灌注信息纳入本发明的方法中。  
可例如,通过在本发明的方法之前或之后,用或不用适宜的造影剂获取质子或  $^{13}\text{C}$ -MR 成像,  
获得解剖学的信息。

[0068] 在又一个方面,本发明提供包含超极化的 [ $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ] 乳酸盐的成像介质在通过  
 $^{13}\text{C}$ -MR 检测的 LDH 活性的测定中的应用。

[0069] 图的简述:

[0070] 图 1:A - L-[ $1-^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐的  $^{13}\text{C}$  光谱。B - 用 C2 质子取代氘核后。

[0071] 图 2:异核  $^{13}\text{C}$  /  $^1\text{H}$  自旋回波脉冲序列。

[0072] 图 3:导致 C1  $^{13}\text{C}$  共振的相转化的 C2 质子选择性质子脉冲。

[0073] 图 4:异核  $^{13}\text{C}$  /  $^1\text{H}$  双回波光谱。

[0074] 图 5:异核  $^{13}\text{C}$  /  $^1\text{H}$  双回波光谱。L-[ $1-^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐和 L-[ $1-^{13}\text{C}$ ,  $2-^2\text{H}_1$ ] 乳酸盐的混  
合物。

[0075] 图 6:自等摩尔的超极化的 L-[ $1-^{13}\text{C}$ ] 乳酸盐和 L-[ $1-^{13}\text{C}$ ,  $2-^2\text{H}_1$ ] 乳酸盐的混合物  
的多重异核  $^{13}\text{C}$  /  $^1\text{H}$  双回波光谱。

[0076] 图 7:超极化的 L-[1-<sup>13</sup>C] 乳酸盐信号强度对时间的作图(体内)。

[0077] 图 8:自用于体内评价 T<sub>2s</sub> 的多重回波实验得到的衰变曲线。

[0078] 图 9:在体内不同的 T<sub>2</sub> 组分对作为回波时间函数的乳酸盐信号的贡献

[0079] 实施例:

[0080] 实施例 1:L-[1-<sup>13</sup>C, 2-<sup>2</sup>H] 乳酸盐的制备

[0081] 将 L-[1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] 乳酸钠 (250 mg, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) 溶解于 99.8% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) 中的 pH\* 5.5 (pH\* 是未校正的 pH 计读数) 的 25 ml 0.02 M 磷酸钠缓冲液 (Fisher Scientific, Loughborough, UK) 中,该缓冲液含 50 mg EDTA (二-钠盐, Sigma Aldrich, Gillingham, UK)、10 mg 二硫苏糖醇 (Melford Laboratories, Ipswich, UK)、25 mg NAD<sup>+</sup> (游离酸, Roche Diagnostics, West Sussex, UK)、1 mg (~ 900 单位) 兔肌肉乳酸脱氢酶 (Sigma Aldrich, Gillingham, UK) 和 5 mg (~ 30 单位) 猪心硫辛酰胺脱氢酶 (冻干粉末, 来自 Calzyme, San Luis Obispo, CA, USA)。于室温孵育得到的溶液大约一周。通过将该溶液置于沸水浴中 10 min 终止孵育。经 0.22 μm 孔径膜过滤去除沉淀的蛋白,并通过用浓盐酸使该溶液酸化,随后通过用碱式碳酸锌中和,提供锌盐 (Sigma Aldrich, Gillingham, UK)。然后过滤该溶液、冻干,且得到的乳酸锌经从水 / 乙醇混合物中再结晶纯化。使用过量的离子-交换树脂 (Dowex 50Wx8, Na<sup>+</sup> 形式, Sigma Aldrich, Gillingham, UK) 和经冻干法分离制备钠盐。在 NADH- 联试验法中经分光光度法和经 <sup>1</sup>H NMR 光谱法分析乳酸盐。

[0082] 实施例 2:检测乳酸盐 C2 质子化的异核 <sup>13</sup>C 自旋回波实验

[0083] L-[1-<sup>13</sup>C] 乳酸盐的 <sup>13</sup>C 光谱显示 C2 质子 (J = 3.3 Hz) 和 C3 甲基质子 (J = 4.1 Hz) 之间的自旋-自旋耦合。从而 <sup>13</sup>C 共振是双重四峰 (图 1A)。C2 质子对氘的取代仅留下与甲基质子的自旋-自旋耦合 (图 1B)。

[0084] 异核 <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H 自旋回波脉冲序列示于图 2a) 中。在与 180° <sup>13</sup>C 脉冲,于 τ = 1/2J 相同时间施用 <sup>1</sup>H 180° 脉冲,导致观察到 <sup>1</sup>H- 耦合 <sup>13</sup>C 共振的相位调制。使用双回波序列 (图 2b),因为此确保实验结束时沿着 z 轴至 ±z 轴残存的极化重现。

[0085] 异核 <sup>13</sup>C 双回波实验的获得 (图 2 b),至回波的时间 300 ms,和施用 C2- 质子选择性质子脉冲导致 C1 <sup>13</sup>C 共振的相转化 (图 3)。类似地,施用 C3- 质子选择性质子脉冲导致 C1 <sup>13</sup>C 共振的相转化 (于至回波的时间 240 ms)。在 L-[1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>, 2-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>] 乳酸盐中,用氘核取代 C2 质子,去除由于 C2 质子耦合的相位调制 (图 3)。

[0086] 对于图 3,样本含 10 mM 的或者 L-[1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>, 2-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>] 乳酸盐或者 L-[1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] 乳酸盐 (非极化的)。氘化的乳酸盐的 T<sub>1</sub> 是 55.8 +/- 2.2 s (n = 1) 而 T<sub>2</sub> 是 1.33 +/- 0.10 s (n = 4) 和 C2 质子化的乳酸盐的 T<sub>1</sub> 是 46.9 +/- 4.0 s (n = 1) 而 T<sub>2</sub> 是 1.49 +/- 0.13 s (n = 2) (于 9.4 T)。采用集中于或者 C2 或者 C3 乳酸盐质子共振的 10 μs 90° <sup>13</sup>C 脉冲、5 ms 绝热的 180° <sup>13</sup>C 脉冲 (带宽 ~ 2kHz) 和 10 ms 绝热的 <sup>1</sup>H 脉冲 (带宽 ~ 1 kHz),获得异核 <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H 双回波光谱 (图 2b)。TR 是 20 s。初始虚拟扫描 (dummy scans) 产生稳态 z 磁化。光谱带宽为 8 kHz 和将数据收集入 2048 个复合点 (complex points)。测量乳酸盐 <sup>13</sup>C 共振的相位-和振幅校正的峰积分。回波时间等同于 2 τ。

[0087] 实施例 3:添加 Gd<sup>3+</sup> 的 L-[1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] 乳酸盐

[0088] 采用在 (Chen, A. P., 等,使用超极化的 [1-C-13] 乳酸盐作为体内代谢 C-13 MRSI

研究的底物的可行性。*Magnetic Resonance Imaging* 26, 721-726 (2008) 中描述用添加  $Gd^{3+}$  所制备的 DMSO 使  $L-[1-^{13}C_1]$  乳酸盐超极化。简言之, 将 70 mg 的  $\sim 50\%$  w/w  $L-[1-^{13}C_1]$  乳酸钠溶液 (0.31 mmol) (Sigma Aldrich, Gillingham, UK) 加至 27 mg DMSO (0.36 mmol) (Sigma Aldrich, Gillingham, UK)、2 mg OX 63 自由基 (1.4  $\mu$ mol) (GE Healthcare) 和 2.7mg 的 50 mmol/L 的 Dotarem  $Gd^{3+}$  螯合物溶液 (Guerbet, Roissy, France) 中。对于体外实验, 于最佳微波频率使得到的溶液的三分之一极化至最大限度。一旦极化达最大限度, 用添加 100 mg/L EDTA 的 6mL 的 40 mmol/L Tris 基缓冲剂 (pH = 7.6) 实现溶解。那时超极化的  $L-[1-^{13}C_1]$  乳酸盐的终浓度大约为 17 mmol/L。异核  $^{13}C/^1H$  双回波光谱的获得 (TE = 300 ms), 用和不用  $180^\circ$   $^1H$  脉冲, 给出示于图 4 的光谱。

[0089] 图 4 显示使用 1  $\mu$ s  $6^\circ$   $^{13}C$  脉冲、5 ms 绝热的  $180^\circ$   $^{13}C$  脉冲 (带宽  $\sim 2$  kHz) 和 10 ms 绝热的  $180^\circ$   $^1H$  脉冲 (带宽  $\sim 1$  kHz) 从超极化的  $L-[1-^{13}C_1]$  乳酸盐获得的两个连续的  $^{13}C/^1H$  异核双回波光谱 (TE = 300 ms), 所述脉冲集中于 C2 乳酸盐质子共振。用和不用  $180^\circ$   $^1H$  脉冲获得光谱。在获得期间应用质子解耦。TR = 1 sec。

[0090] 制备  $L-[1-^{13}C_1]$  乳酸盐和  $L-[1-^{13}C_1, 2-^2H_1]$  乳酸盐的等摩尔混合物并使其极化至  $\sim 26 \pm 0.5\%$  ( $n = 2$ )。NMR 管中的乳酸盐终浓度为 10 mM。

[0091] 图 5 显示使用 1  $\mu$ s  $6^\circ$   $^{13}C$  脉冲、5 ms 绝热的  $180^\circ$   $^{13}C$  脉冲 (带宽  $\sim 2$  kHz) 和 10 ms 绝热的  $180^\circ$   $^1H$  脉冲 (带宽  $\sim 1$  kHz), 自超极化的  $L-[1-^{13}C_1]$  乳酸盐和  $L-[1-^{13}C_1, 2-^2H_1]$  乳酸盐的等摩尔混合物获得的  $^{13}C/^1H$  异核自旋回波光谱 (TE = 300 ms), 所述脉冲集中于 C2 乳酸盐质子共振。用和不用  $180^\circ$   $^1H$  脉冲获得光谱。在指定的获得期间应用质子解耦。TR = 1 sec。

[0092] 一系列这些在极化寿命期间获得的光谱的获得, 给出示于图 6 的结果。绝热的  $^{13}C$  脉冲的使用确保没有采样的  $^{13}C$  极化沿着  $z$  轴保留。然而, 从这些数据估计的  $T_1$ s, 对于  $^2H$ -乳酸盐是 27 s 而对于  $^1H$ -乳酸盐是 25 s, 比非-极化的材料估计的  $T_1$ s 短得多 (图 3) 和推测起来反映在双曲正割脉冲中不完整性。它们也可反映缺乏对多重低倾角脉冲的校正。

[0093] 如在图 6 的图例中描述的, 自超极化的  $L-[1-^{13}C_1]$  乳酸盐和  $L-[1-^{13}C_1, 2-^2H_1]$  乳酸盐的等摩尔混合物获得多重异核  $^{13}C/^1H$  双回波光谱。顶部绘图显示在缺乏  $^1H$  脉冲时获得的总的  $^{13}C$  信号, 在存在  $^1H$  脉冲 ( $^{13}C+^1H$ ) 时获得的  $^{13}C$  信号和计算的 C2 质子化的和氘化的乳酸盐物质的浓度。这些值的对数示于较低的绘图中。

[0094] 实施例 4: 使用  $[1-^{13}C_1, 2-^2H_1]$  乳酸盐的体内实验

[0095] 对于体内检测  $[1-^{13}C_1, 2-^2H_1]$  乳酸盐的 C2 质子化状态的异核  $^{13}C/^1H$  双回波实验,  $^{13}C$  共振必须具有足够长的  $T_1$  和  $T_2$ 。

[0096] 体内  $T_1$  检测

[0097] 如由 Chen, A. P., 等, 使用超极化的  $[1-C-13]$  乳酸盐作为体内代谢 C-13 MRSI 研究的底物的可行性。*Magnetic Resonance Imaging* 26, 721-726 (2008) 描述的, 使  $L-[1-^{13}C]$  乳酸盐极化, 并经荷 EL4 肿瘤小鼠的尾静脉注射 200  $\mu$ l。采用置于肿瘤上面的 24-mm 直径表面线圈收集非-层面选择性光谱 (slice selective spectra)。使用 5 度的评估的倾角和 1 s 的重复时间 (TR) 用于首个 32 光谱, 其后经 TR 为 2 s 的 16 光谱, 然后经 10 度倾角和 2 s 的 TR 的 16 光谱。作为时间的函数对乳酸盐峰积分作图 (图 7) 并将数据与所产生的  $T_1$  和倾角的估计值的模型拟合。估计肿瘤中的乳酸盐  $T_1$  为 33 s ( $n =$

1)。

[0098] 体内  $T_2$  检测

[0099] 异核自旋回波实验中至回波的时间是 300 ms (见图 3), 因此重要的是  $^{13}\text{C}$  共振具有长的  $T_2$ 。发明人此前已经于 9.4 T 检测注射  $[1-^{13}\text{C}]$  丙酮酸盐后体内 EL4 淋巴瘤中的  $[1-^{13}\text{C}]$  乳酸盐的横向弛豫时间, 参见 Kettunen, M. I., 等. 在鼠科动物淋巴瘤中的超极化  $[1-^{13}\text{C}]$  丙酮酸盐和  $[1-^{13}\text{C}]$  乳酸盐之间交换的磁化传递检测。 *Magn Reson Med* 63, 872-880 (2010)。观察到乳酸盐和丙酮酸盐共振的多指数 (Multi-exponential)  $T_2$  弛豫 (图 8)。

[0100] 就乳酸盐 ( $n = 8$ ) 而言, 将三个组分与实验数据拟合 (图 9), 短的  $T_2$  组分 ( $0.13 \pm 0.09$  s,  $31 \pm 21\%$ )、中等的  $T_2$  组分 ( $0.75 \pm 0.20$  s,  $52 \pm 16\%$ ) 和长的  $T_2$  组分 ( $2.2 \pm 0.7$  s,  $23 \pm 15\%$ )。也已经报告于 3 T 的类似的多指数表现, 参见 Yen, Y., 等. 在采用多层面 FSEPSI 序列的低剂量超极化的  $^{13}\text{C}$  成像中的信号增强, 于 *Proc Int'l Soc Mag Res Med*, Vol. 16 890 (Toronto, 2008)。

[0101] 因此, 将保留具有 300 ms 回波时间的、几乎 60% 的总的  $[1-^{13}\text{C}]$  乳酸盐信号。

[0102] 在可用于体内检测  $[1-^{13}\text{C}, 2-^2\text{H}]$  乳酸盐的 C2 质子化状态的异核双回波成像脉冲序列中, 将用读出器和在标准 EPI 序列中的相位编码梯度获得回波。通过使用绝热的  $^{13}\text{C}$  脉冲, 发明人确保未取样的  $^{13}\text{C}$  极化沿着  $z$  轴保留, 并通过使用双回波序列, 发明人确保该极化在脉冲序列的末尾恢复到  $+z$  轴。将切断  $^1\text{H}$  脉冲对交替获取 (alternate acquisitions) 的共振, 其将关闭  $^{13}\text{C}$  信号对交替获取的相位调制 (见图 3)。没有  $^1\text{H}$  脉冲所获得的  $^{13}\text{C}$  图像将具有自  $^{13}\text{C}$ - 标记的 C2 氘化的乳酸盐加上  $^{13}\text{C}$ - 标记的 C2 质子化的乳酸盐的信号, 而有  $^1\text{H}$  脉冲所获得的  $^{13}\text{C}$  成像将具有自  $^{13}\text{C}$ - 标记的 C2 氘化的乳酸盐减去  $^{13}\text{C}$ - 标记的 C2 质子化的乳酸盐的信号。这些图像的相加将给出总的  $^{13}\text{C}$ - 标记的 C2 氘化的乳酸盐, 而相减将给出  $^{13}\text{C}$ - 标记的 C2 质子化的乳酸盐。

乳酸盐的  $^{13}\text{C}_1$  峰

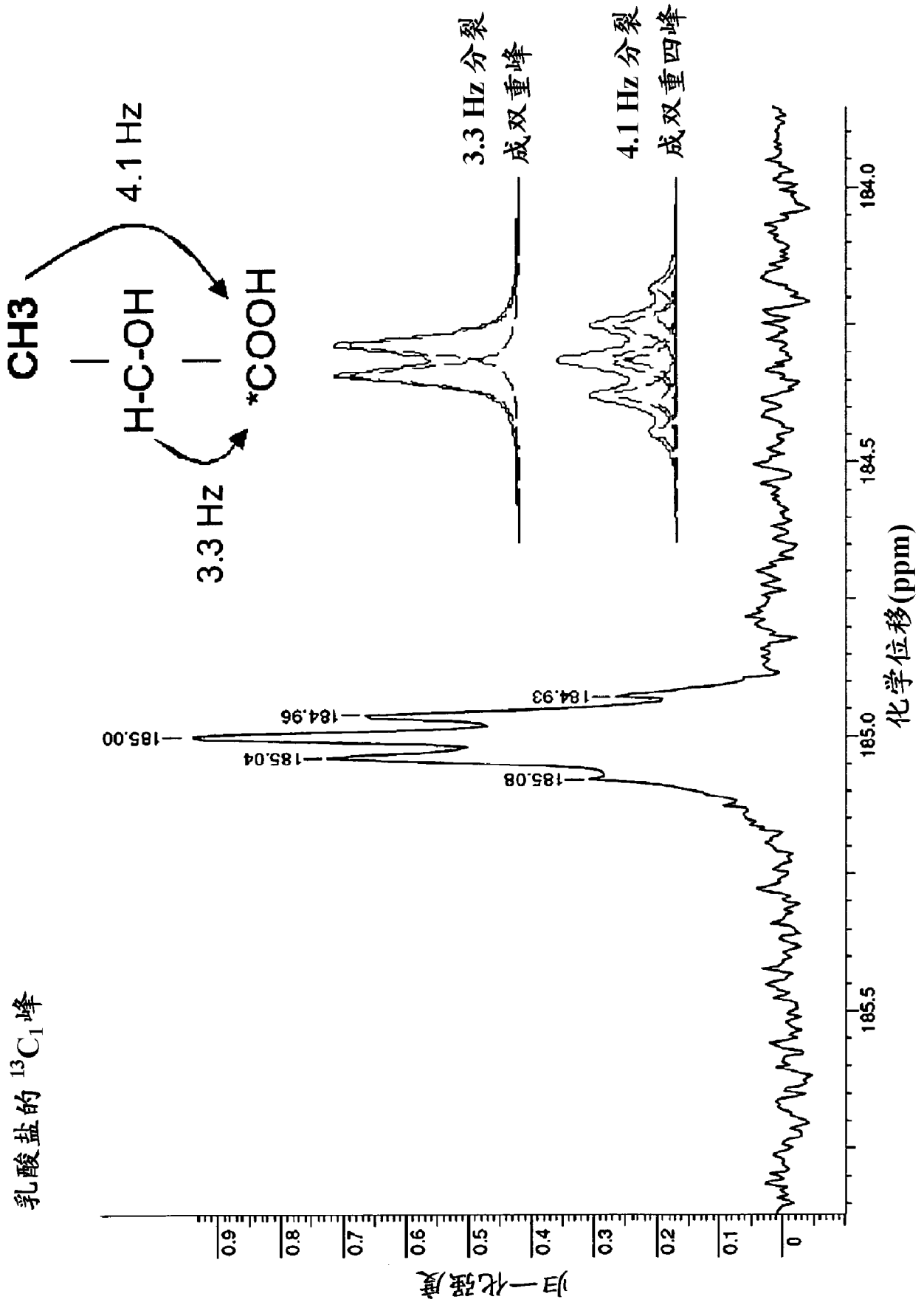


图 1A

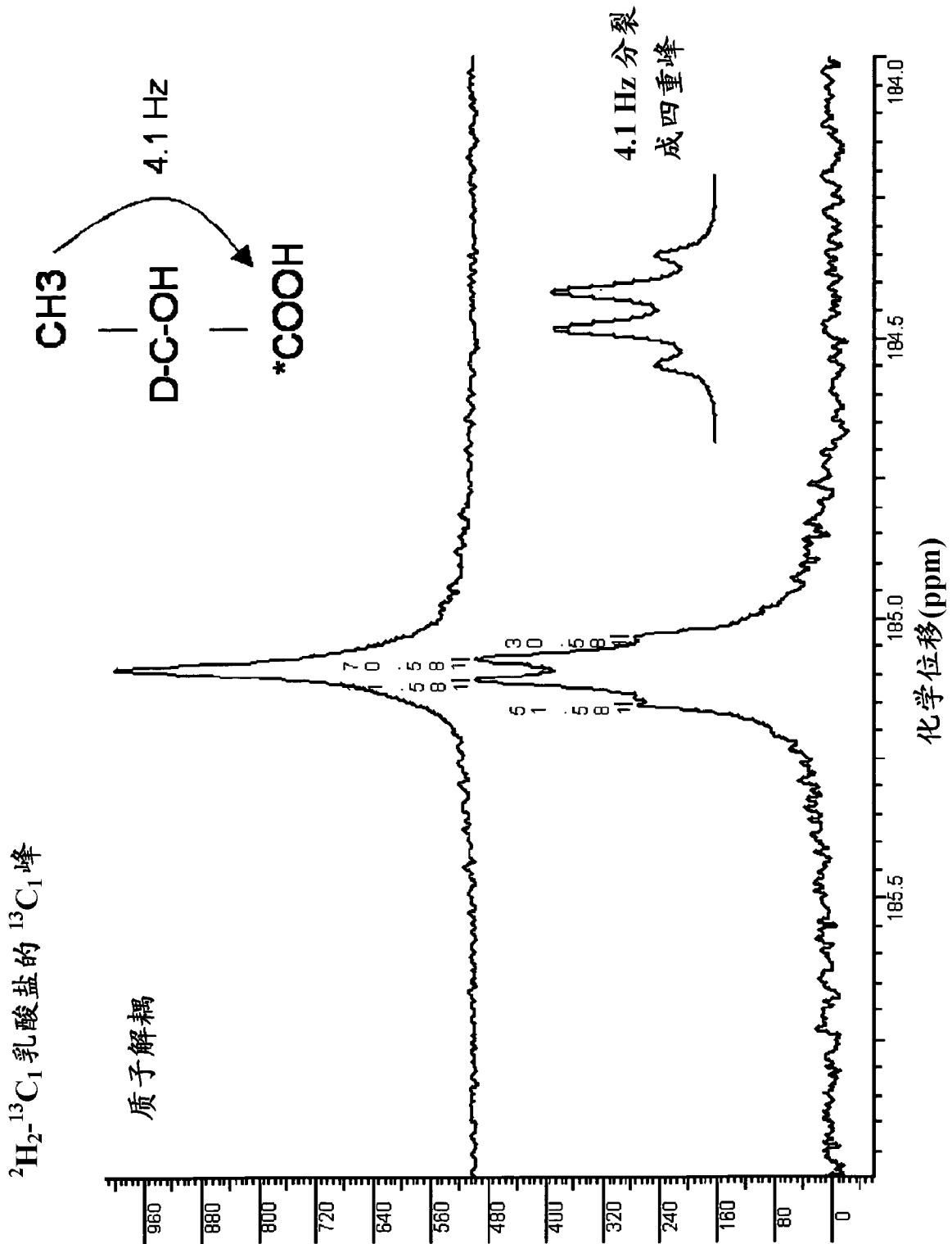
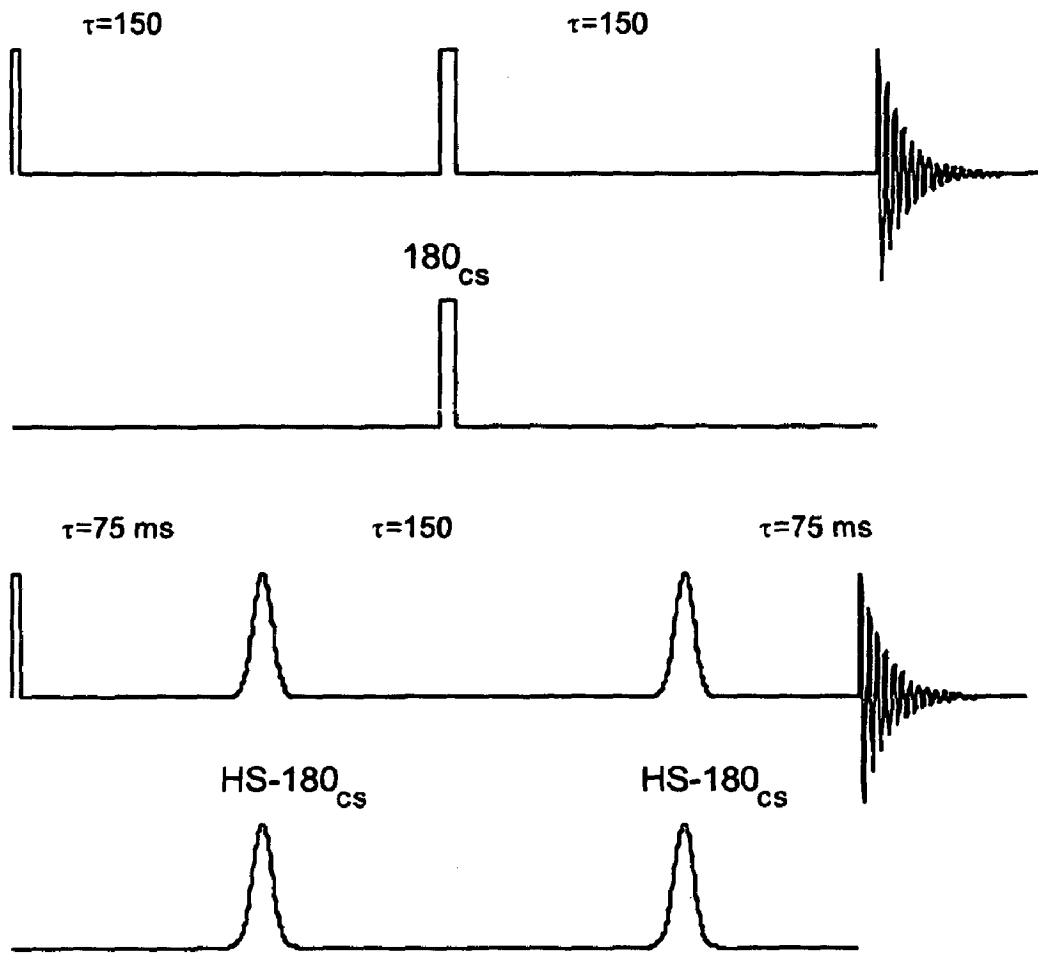


图 1A 和 1B:  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$  乳酸盐的  $^{13}\text{C}$  共振的分裂应归因于  $^1\text{H}$  耦联至 C2 和 C3 质子(A)。用氘取代 C2 质子仅留下耦联至 C3 质子的自旋-自旋耦联(B)。在这些相对低的分辨率谱图下,  $^{13}\text{C}$  和 C2 氘核之间的自旋-自旋耦联明显太小而观察不到。

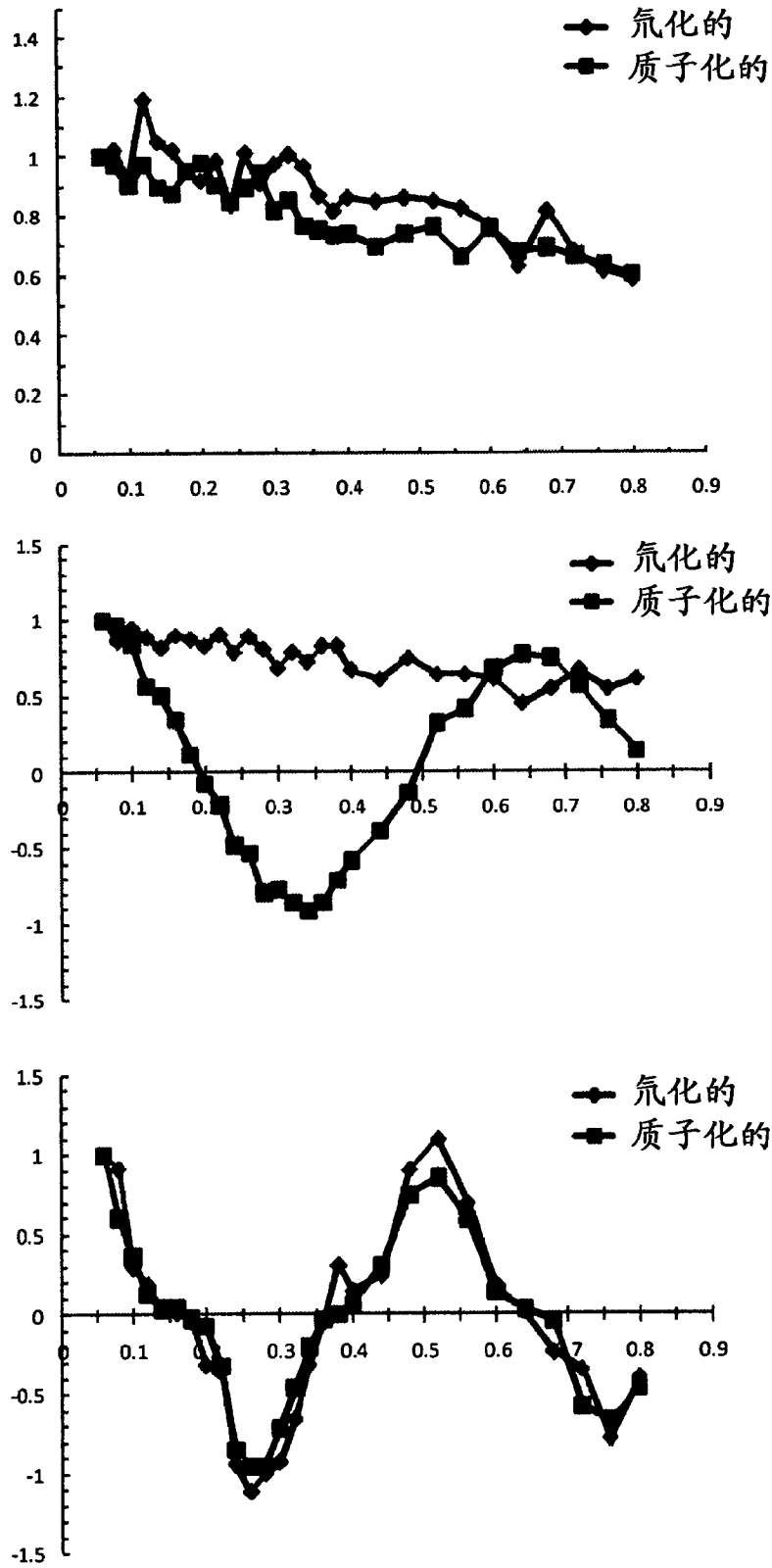
图 1B





初始脉冲或者是用于采用非极化的材料的实验的  $90^\circ$  脉冲，或者是用于采用超极化 L-[1- $^{13}\text{C}$ ]乳酸盐的实验的低倾角脉冲。CS 指化学位移选择性脉冲而 HS 指双曲正割脉冲。

图 2



采用集中于或者 C2 或者 C3 乳酸盐质子共振的  $10 \mu\text{s } 90^\circ \text{ }^{13}\text{C}$  脉冲、5 ms 绝热的  $180^\circ \text{ }^{13}\text{C}$  脉冲(带宽~2kHz)和 10 ms 绝热的  $^1\text{H}$  脉冲(带宽~1 kHz), 获得异核  $^{13}\text{C}/^1\text{H}$  双回波光谱。

图 3

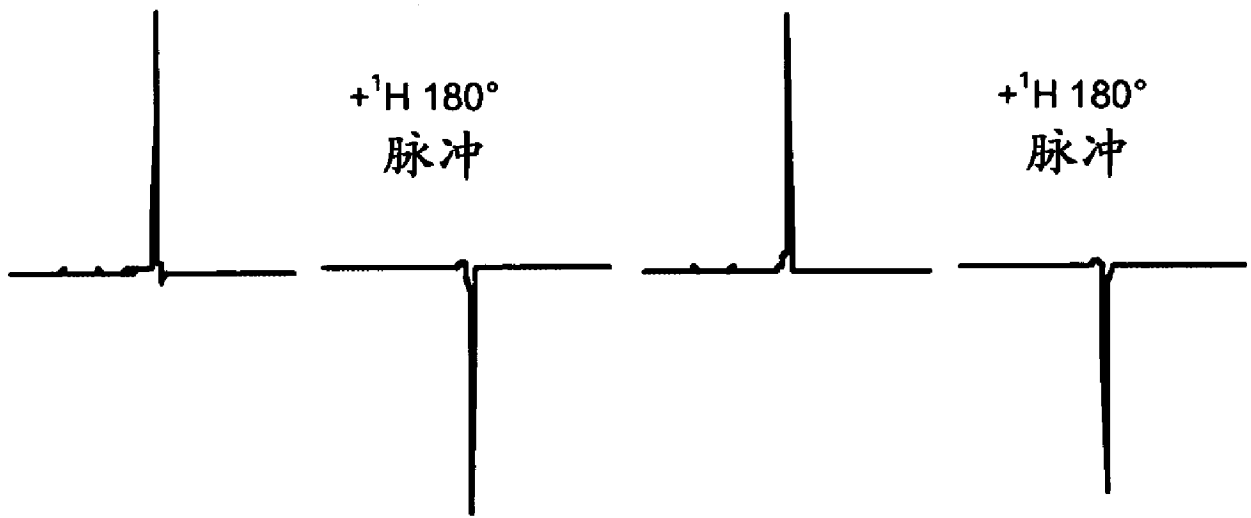


图 4

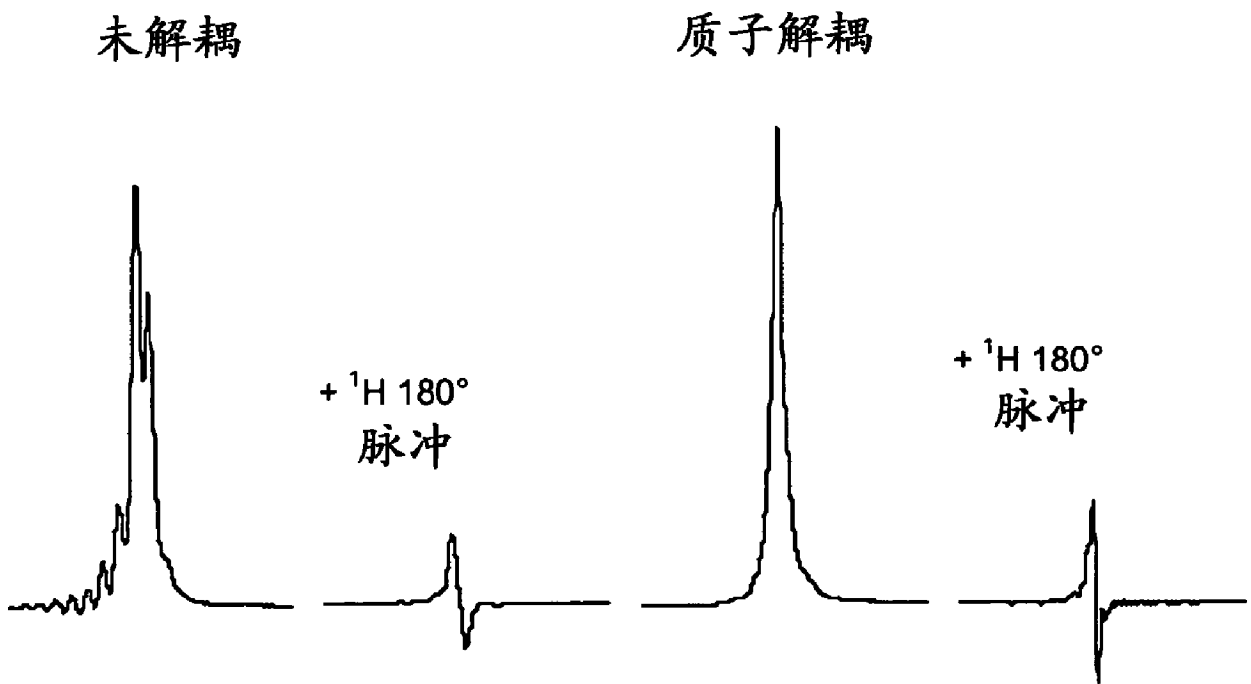


图 5

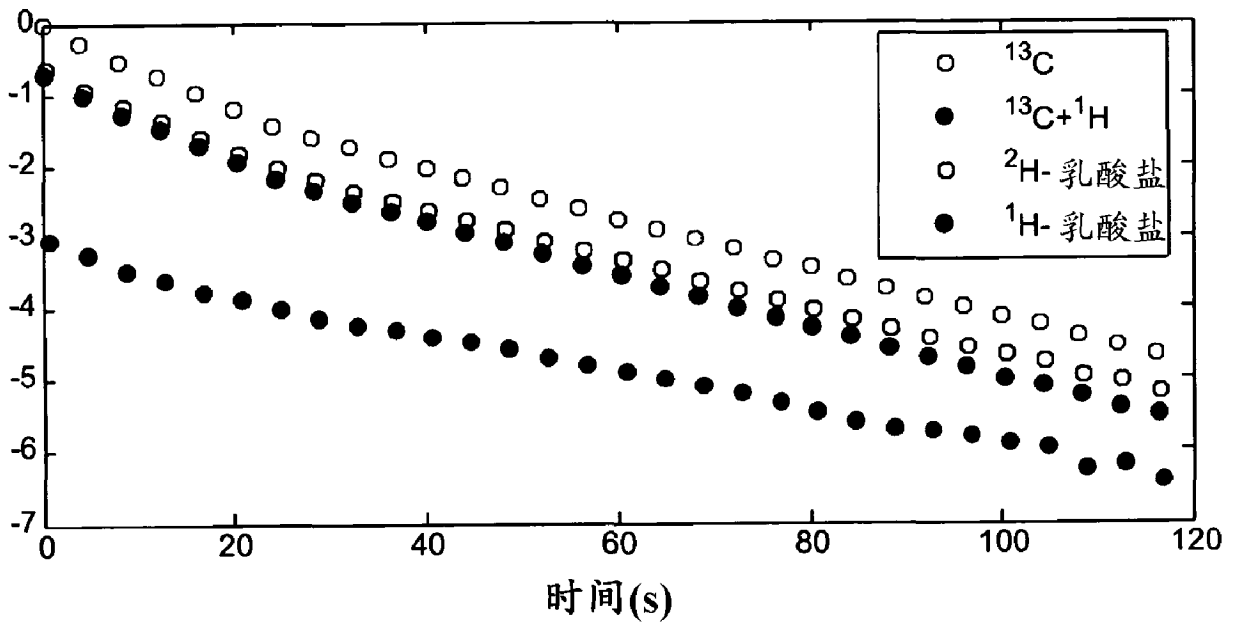
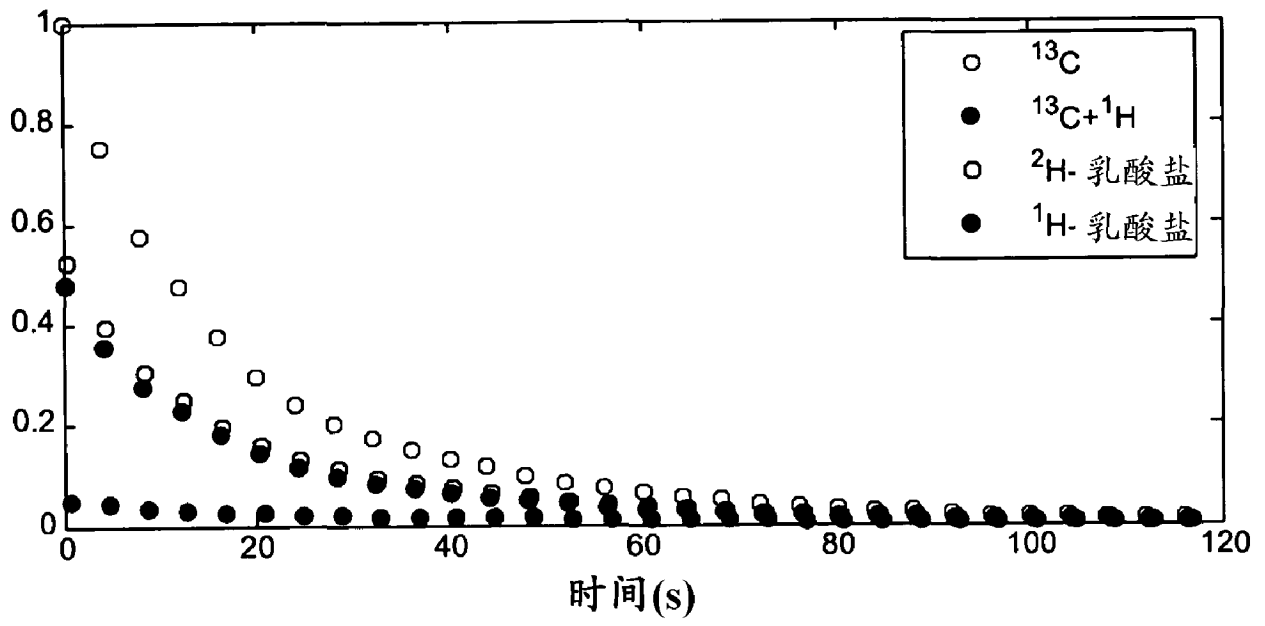
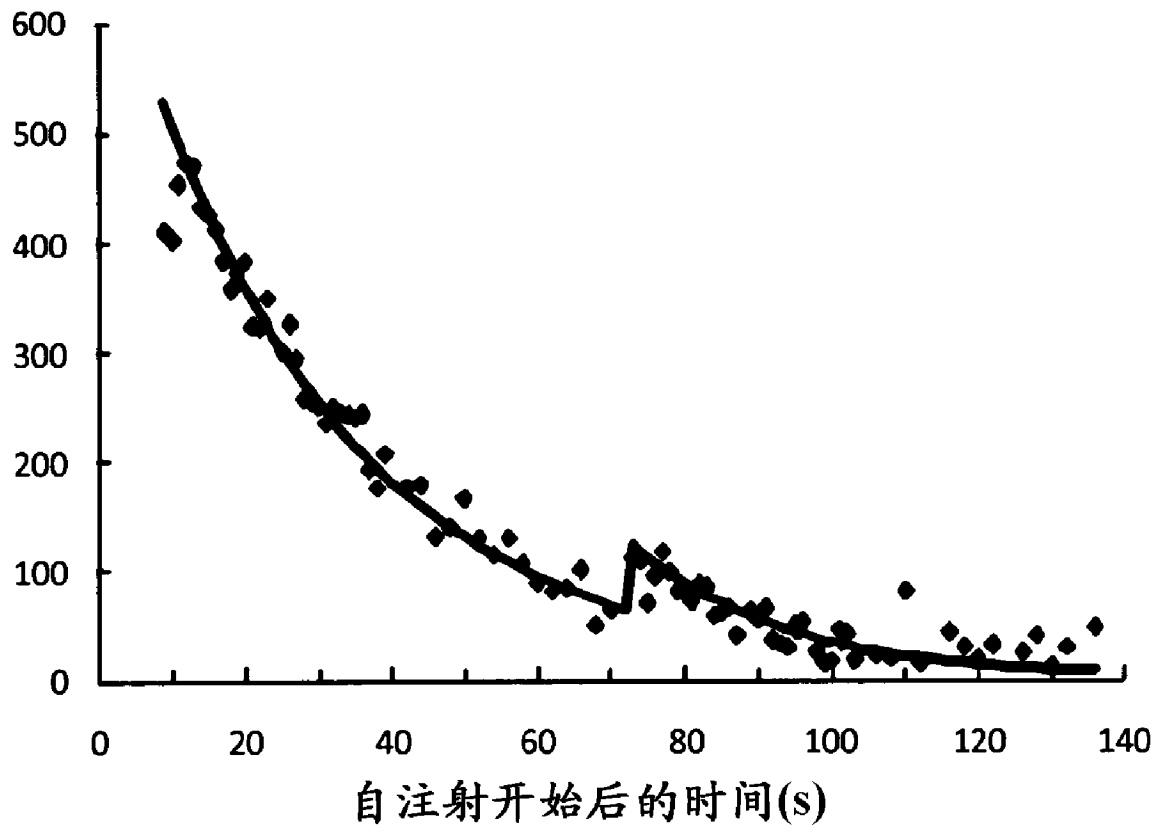
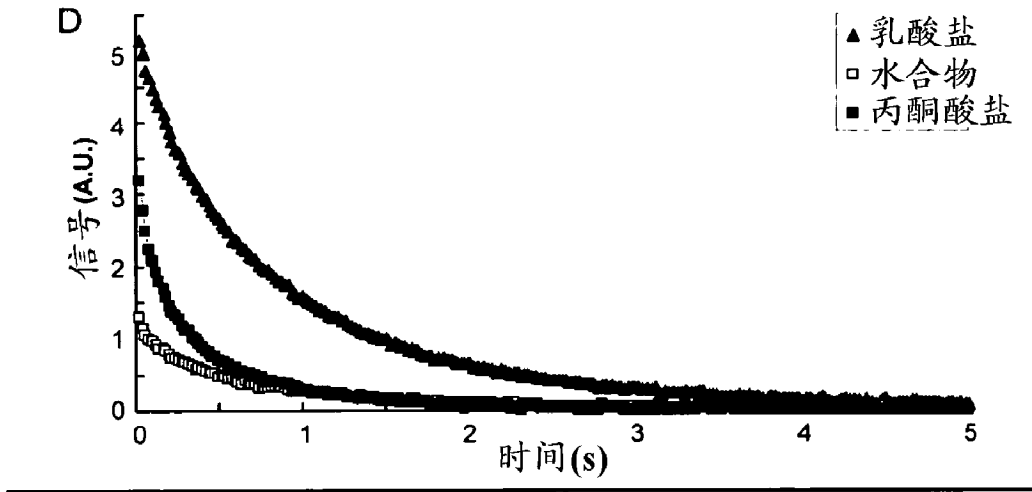


图 6



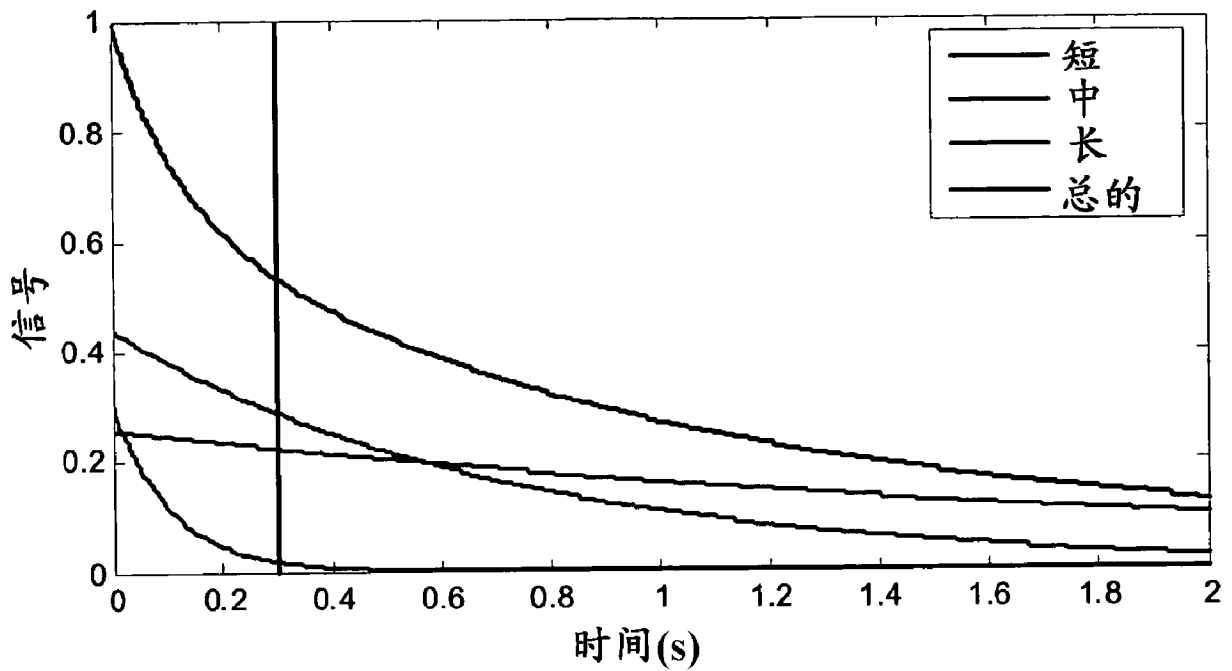
在体内的超极化的 L-[1-<sup>13</sup>C]乳酸盐信号强度对时间的作图。

图 7



来自体内的多重回波实验的典型的衰变曲线，该实验用于评价乳酸盐、丙酮酸盐和丙酮酸盐水合物共振的  $T_2$  值。

图 8



在体内不同的  $T_2$ -组分对作为回波时间函数的乳酸盐信号的贡献。

图 9