

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 380**

51 Int. Cl.:
G01R 33/465 (2006.01)
G01R 33/483 (2006.01)
G01R 33/56 (2006.01)
A61B 5/055 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07808605 .5**
96 Fecha de presentación: **17.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2052273**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.2009**

54 Título: **Formación de imágenes de 13C-RM o de espectroscopia de muerte celular**

30 Prioridad:
18.08.2006 NO 20063702

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2012

73 Titular/es:
**GE HEALTHCARE AS
INTELLECTUAL PROPERTY DEPT. PO BOX 4220,
NYDALEN NYCOVEIEN 1-2
0401 OSLO, NO**

72 Inventor/es:
**BRINDLE, Kevin, M.;
DAY, Samuel, Evan y
KETTUNEN, Mikko, livari**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

ES 2 381 380 T3

DESCRIPCIÓN

Formación de imágenes de ^{13}C -RM o de espectroscopía de muerte celular

La invención se refiere a un procedimiento de formación de imágenes de ^{13}C -RM o de espectroscopía de muerte celular usando un medio de formación de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

- 5 La muerte celular puede surgir por una variedad de mecanismos. Varios de estos mecanismos están bien caracterizados, incluyendo apoptosis y necrosis.

10 La apoptosis, o muerte celular programada, desempeña un papel importante en el control de desarrollo y en el mantenimiento de homeostatis en organismos pluricelulares. La apoptosis progresa a través de una serie de etapas que requieren energía y estrechamente reguladas que concluyen con el engullimiento de las células que mueren por las células fagocíticas vecinas, en un procedimiento que permite la reacción inflamatoria causada por la necrosis celular. En células de mamíferos, la apoptosis está mediada por dos principales rutas de señalización: la primera es por una ruta extrínseca iniciada por medio de los receptores de muerte de la superficie celular y la segunda es a través de iniciadores intrínsecos, tales como daño del ADN. Ambas de estas vías convergen en la superficie de la mitocondria.

- 15 La apoptosis es un suceso crítico en numerosos procesos en el cuerpo de los mamíferos. Por ejemplo el desarrollo embrionario es altamente dependiente de apoptosis y los tejidos que se recambian rápidamente requieren regulación estricta para evitar consecuencias patológicas graves. El fallo en regular la apoptosis, es decir, insuficiente o demasiada muerte celular, da como resultado afecciones patológicas como cáncer y enfermedades autoinmunes (insuficiente), o enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (demasiada muerte celular). Así
20 hay un interés en identificar apoptosis no invasivamente *in vivo* en el ser humano o en el animal no humano.

25 La necrosis es una forma de muerte celular accidental que resulta de la exposición prolongada a daño, infección, cáncer, infarto, venenos e inflamación. El daño grave a un sistema esencial en la célula conduce a daño secundario para otros sistemas, una así llamada cascada de efectos. La necrosis se caracteriza por fragmentos de ADN de tamaño al azar, formación de radicales libres, hinchazón de la célula y pérdida de integridad de la membrana celular que da como resultado liberación de contenidos celulares.

30 La necrosis puede surgir a partir de la falta de cuidado apropiado de un sitio de herida, infección o infarto. Los infartos ocurren por ejemplo en el miocardio pero también en otros tejidos, especialmente en el cerebro. Mientras que el infarto puede curarse hasta cierto punto, en el caso de necrosis, sólo las secuelas dañinas para el resto del organismo pueden evitarse o al menos mitigarse. Como con el infarto, conocer la extensión y naturaleza de una necrosis es importante para el tratamiento médico adicional. Así hay un interés en identificar necrosis no invasivamente *in vivo* en el ser humano o en el animal no humano.

35 Se conocen en la técnica varias modalidades de formación de imágenes para formar imágenes de la muerte celular en el cuerpo humano o de animal no humano. Los productos radiofarmacéuticos para formación de imágenes de la muerte celular se han revisado por Lahorte y cols., Eur. J. Nucl. Med. 31 (2004), 887. La formación de imágenes de PET con ^{18}F -FDG, solo o en combinación con CT también se ha usado para la detección de la muerte celular, véase por ejemplo Romer y cols., Blood 91 (1998), 4464 o von Schulthess y cols., Radiology 238 (2006), 405.

40 La detección por resonancia magnética (RM) como por ejemplo formación de imágenes por RM (MRI) y espectroscopía por RM (MRS) podrían ser herramientas valiosas para detectar la muerte celular y estos instrumentos han llegado a ser particularmente atractivos para los médicos ya que ellos permiten obtener imágenes de cuerpo de los pacientes o de partes del mismo en una manera no invasiva y sin exponer al paciente ni al personal médico a radiación potencialmente dañina tal como a rayos X. Debido a sus imágenes de alta calidad y a su buena resolución espacial y temporal, MRI es una técnica de formación de imágenes favorable de tejido blando y órganos.

45 Los procedimientos basados en RM para detectar muerte celular han sido el objeto de revisiones recientes, por ejemplo Kettunen y cols., Prog. Nucl. Mag. Res. Sp. 47 (2005), 175 o Hakumäki y cols., Eur. J. Radiol. 56 (2005), 143.

Ahora se ha encontrado que el ^{13}C -piruvato se puede usar como un agente para detectar la muerte celular en el cuerpo de ser humano o de animal no humano usando formación de imágenes por ^{13}C -RM o espectroscopía de ^{13}C -RM.

50 El piruvato es un compuesto endógeno que está muy bien tolerado por el cuerpo humano, incluso en concentraciones altas. Como un precursor en el ciclo del ácido cítrico, el piruvato juega un papel metabólico importante en el cuerpo humano. El piruvato se convierten en compuestos diferentes: su transaminación da como resultado alanina, por medio de descarboxilación oxidativa, el piruvato se convierte en acetil-CoA y dióxido de carbono (que se convierte adicionalmente a bicarbonato), la reducción de piruvato da como resultado lactato y su carboxilación da como resultado oxalacetato.

Adicionalmente, la conversión metabólica de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en sus metabolitos ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado (en el caso de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato o $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -piruvato sólo) y ^{13}C -alanina hiperpolarizada se puede usar para estudiar los procesos metabólicos en el cuerpo humano usando RM. El $^{13}\text{C}_1$ -piruvato tiene una relajación de T_1 en la sangre completa humana a 37 °C de aproximadamente 42 segundos, sin embargo, la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado a ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada se ha encontrado que es lo suficientemente rápida para permitir la detección de señales a partir del compuesto parental de ^{13}C -piruvato y de sus metabolitos. La cantidad de alanina, bicarbonato y lactato es dependiente del estado metabólico del tejido en investigación. La intensidad de señal de RM de ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada está relacionada con la cantidad de estos compuestos y el grado de polarización que queda en el momento de la detección, por tanto monitorizando la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es posible estudiar procesos metabólicos *in vivo* en el cuerpo de un ser humano o de animal no humano usando imagen de RM no invasiva o espectroscopía de RM.

Se ha encontrado que las amplitudes de señal de RM a partir de los diferentes metabolitos de piruvato varían dependiendo del tipo de tejido. El único patrón de pico metabólico formado por alanina, lactato, bicarbonato y piruvato se puede usar como una huella dactilar del estado metabólico del tejido en examen y así permite la discriminación entre tejido sano y tejido tumoral. El uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para formación de imágenes tumorales que muestran actividad metabólica alta se han descrito en detalle en el documento WO-A-2006/0118 10.

Adicionalmente, el uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para formación de imágenes cardíacas se ha descrito en el documento WO-A-2006/054903.

Así, en un primer aspecto la invención proporciona un procedimiento de formación de imágenes por ^{13}C -RM y/o de espectroscopía de ^{13}C -RM para detectar muerte celular de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1.

El término "muerte celular" denota todas las formas de muerte celular que surgen de una diversidad de mecanismos. El término incluye apoptosis y necrosis.

El término " ^{13}C -piruvato" denota una sal de ácido ^{13}C -pirúvico.

Los términos "hiperpolarizado" y "polarizado" se usan de forma intercambiable en adelante y denotan un nivel de polarización nuclear en exceso de un 0,1 %, más preferido en exceso de un 1 % y lo más preferido en exceso de un 10 %.

El nivel de polarización se puede determinar, por ejemplo, por medidas de ^{13}C -RMN de estado sólido en ^{13}C -piruvato hiperpolarizado sólido, por ejemplo, ^{13}C -piruvato hiperpolarizado sólido obtenido por polarización nuclear dinámica (DNP) de ^{13}C -piruvato. La medida de ^{13}C -RMN de estado sólido consiste preferentemente en una secuencia de RMN obtenida por pulsos simples usado un ángulo de excitación de secuencia de pulso de eco de campo bajo. La intensidad de la señal del ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en el espectro de RMN se compara con la intensidad de señal de ^{13}C -piruvato en un espectro de RMN obtenido antes del procedimiento de polarización. El nivel de polarización se calcula entonces a partir de la proporción de las intensidades de señal de antes y después de la polarización.

De forma similar, el nivel de polarización para el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se puede determinar por medidas de RMN en estado líquido. De nuevo la intensidad de la señal del ^{13}C -piruvato hiperpolarizado disuelto se compara con la intensidad de señal del ^{13}C -piruvato disuelto antes de la polarización. El nivel de polarización se calcula entonces a partir de la proporción de las intensidades de señal de ^{13}C -piruvato antes y después de la polarización.

El término "medio de formación de imágenes" denota una composición líquida que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado como el agente activo de RM. El medio de formación de imágenes de acuerdo con la invención se puede usar como medio de formación de imágenes o como agente de espectroscopía de RM en espectroscopía de RM.

El medio de formación de imágenes de acuerdo con el procedimiento de la invención pueden usarse como medio de formación de imágenes para formación de imágenes de RM *in vivo* y/o para espectroscopía de RM *in vivo*, es decir formación de imágenes de RM y/o espectroscopía de RM llevadas a cabo en seres humanos vivos o en seres animales no humanos vivos. Además, el medio de imagen de acuerdo con el procedimiento de la invención se puede usar como medio de formación de imágenes para formación de imágenes de RM *in vitro* y/o para espectroscopía de RM *in vitro*, por ejemplo, para detectar muerte celular en cultivos celulares o en tejidos *ex vivo*. Los cultivos celulares pueden derivarse de células obtenidas a partir de muestras derivadas del cuerpo humano o del cuerpo de animales no humanos como por ejemplo, sangre, orina o saliva mientras que el tejido *ex vivo* puede obtenerse a partir de biopsias o de procedimientos quirúrgicos.

El enriquecimiento isotópico del ^{13}C -piruvato hiperpolarizado usado en el procedimiento de la invención es preferentemente de al menos un 75 %, más preferentemente de al menos un 80 % y en especial preferentemente de al menos un 90 %, siendo lo más preferido un enriquecimiento isotópico de más de un 90 %. Idealmente, el

- enriquecimiento es de un 100 %. El ^{13}C -piruvato hiperpolarizado usado en el procedimiento de la invención puede estar isotópicamente enriquecido en la posición C1 (en lo sucesivo denotado $^{13}\text{C}_1$ -piruvato), en la posición C2 (en lo sucesivo denotado $^{13}\text{C}_2$ -piruvato), en la posición C3 (en lo sucesivo denotado $^{13}\text{C}_3$ -piruvato), en la posición C1 y en la posición C2 (en lo sucesivo denotado $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato), en la posición C1 y en la posición C3 (en lo sucesivo denotado $^{13}\text{C}_{1,3}$ -piruvato), en la posición C2 y en la posición C3 (en lo sucesivo denotado $^{13}\text{C}_{2,3}$ -piruvato) o en la posición C1, en la posición C2 y en la posición C3 (en lo sucesivo denotado $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -piruvato). Se prefiere el enriquecimiento isotópico en la posición C1 ya que el $^{13}\text{C}_1$ -piruvato tiene un T_1 más alto, relajación en la sangre completa humana a 37 °C (aproximadamente 42 segundos) que el ^{13}C -piruvato que está enriquecido isotópicamente en otras posiciones de C.
- La hiperpolarización de los núcleos con ^{13}C activos de RMN se puede lograr por diferentes procedimientos, que se describen, por ejemplo, en los documentos WO-A-98/30918, WO-A-99/24080 y WO-A-99/35508, que se incorporan en el presente documento por referencia y procedimientos de hiperpolarización son transferencia de polarización a partir de un gas noble, "fuerza bruta", refrigeración de espín, el procedimiento de parahidrógeno y la polarización nuclear dinámica (DNP).
- Para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, se prefiere bien polarizar ^{13}C -piruvato directamente o polarizar el ácido ^{13}C -pirúvico y convertir el ácido ^{13}C -pirúvico polarizado a ^{13}C -piruvato polarizado, por ejemplo mediante neutralización con una base.
- Una forma de obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es la transferencia de polarización a partir de un gas noble hiperpolarizado que se describe en el documento WO-A-98/30918. Los gases nobles que tienen un espín nuclear distinto de cero se pueden hiperpolarizar por el uso de luz polarizada de forma circular. Un gas noble hiperpolarizado, preferentemente He o Xe, o una mezcla de estos gases, se puede usar para efectuar la hiperpolarización de núcleos de ^{13}C . El gas hiperpolarizado puede estar en fase gas, se puede disolver en un líquido/disolvente, o el propio gas hiperpolarizado puede servir como un disolvente. De forma alternativa, el gas se puede condensar sobre una superficie sólida enfriada y usar en esta forma, o se deja que se sublime. Se prefiere la mezcla íntima del gas hiperpolarizado con ^{13}C -piruvato o con ácido ^{13}C -pirúvico. Así, si el ácido ^{13}C -pirúvico está polarizado, que es un líquido a temperatura ambiente, el gas hiperpolarizado está preferentemente disuelto en un líquido/disolvente o sirve como un disolvente. Si el ^{13}C -piruvato está polarizado, el gas hiperpolarizado se disuelve preferentemente en un líquido/disolvente, que también disuelve piruvato.
- Otra forma adecuada para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es que la polarización se imparte a ^{13}C -núcleos por equilibrio termodinámico a una temperatura muy baja y a un campo alto. La hiperpolarización comparada con el campo de operación y la temperatura del espectrómetro de RMN se efectúa por el uso de un campo muy alto y una temperatura muy baja (fuerza bruta). La fuerza de campo magnético usado debe ser tal alta como sea posible, adecuadamente mayor de 1 T, preferentemente mayor de 5 T, más preferentemente 15 T o más y en especial preferentemente 20 T o más. La temperatura debe ser muy baja, por ejemplo, 4,2 K o menos, preferentemente 1,5 K o menos, más preferentemente 1,0 K o menos, en especial preferentemente 100 mK o menos.
- Otra forma adecuada para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es el procedimiento de refrigeración de espín. Este procedimiento cubre la polarización de espín de un compuesto sólido o sistema por polarización por refrigeración de espín. El sistema se activa con o se mezcla íntimamente con materiales paramagnéticos cristalinos adecuados, tales como iones de Ni^{2+} , lantánido o actínido con un eje de simetría de orden tres o más. La instrumentación es más sencilla que la requerida para DNP sin necesidad de un campo magnético uniforme ya que no se aplica campo de excitación de resonancia. El procedimiento se lleva a cabo rotando físicamente la muestra alrededor de un eje perpendicular a la dirección del campo magnético. El prerrequisito para este procedimiento es que la especie paramagnética tiene un factor g altamente anisotrópico. Como resultado de la rotación de la muestra, la resonancia paramagnética electrónica se pondrá en contacto con los espines nucleares, lo que conduce a una disminución en la temperatura de espín nuclear. La rotación de la muestra se lleva a cabo hasta que la polarización de espín nuclear ha alcanzado un nuevo equilibrio.
- En una realización preferida, se usa la DNP (polarización nuclear dinámica) para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. En la DNP, la polarización de núcleos activos de RM en un compuesto que se va a polarizar está afectada por un agente de polarización o un así llamado agente de DNP, un compuesto que comprende electrones desapareados. Durante el procedimiento de DNP, se proporciona energía, normalmente en forma de radiación de microondas, que excitará inicialmente el agente de DNP. Después de que decaiga hasta el estado basal, hay una transferencia de polarización del electrón desapareado del agente de DNP a los núcleos activos de RMN del compuesto que se va a polarizar, por ejemplo, a los núcleos de ^{13}C en el ^{13}C -piruvato. En general, se usan un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja en el procedimiento de DNP, por ejemplo llevando a cabo el procedimiento de DNP en helio líquido y en un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. De forma alternativa, se puede emplear un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se logre una suficiente potenciación de la polarización. La técnica de DNP se describe adicionalmente por ejemplo en el documento WO-A-98/58272 y en el documento WO-A-01/96895.

Para polarizar el compuesto por el procedimiento de DNP, se preparan una mezcla del compuesto a polarizarse y un agente de DNP ("una muestra") que después se congela y se inserta dentro de un polarizador de DNP. Después de la polarización, la composición hiperpolarizada sólida congelada se transfiere rápidamente al estado líquido bien fundiéndola o bien disolviéndola en un medio de disolución adecuado. Se prefieren la disolución y el procedimiento de disolución de una muestra hiperpolarizada congelada y los dispositivos adecuados para ello se describen en detalle en el documento WO-A-02/37132. El procedimiento de fundido y los dispositivos adecuados para el fundido se describen por ejemplo en el documento WO-A-02/36005.

Para obtener un nivel de polarización alto en el compuesto que se va a polarizar, dicho compuesto y el agente de DNP necesitan estar en contacto íntimo durante el procedimiento de DNP. Este no es el caso si la muestra cristaliza después de congelarse o enfriarse. Para evitar la cristalización, se necesita que estén presentes formadores de vidrio en la muestra o bien se necesita escoger compuestos para la polarización que no cristalicen después de congelarse sino más bien que formen un vidrio.

Como se mencionó anteriormente ácido ^{13}C -pirúvico o ^{13}C -piruvato son materiales de partida adecuados para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

El ^{13}C -piruvato isotópicamente enriquecido está comercialmente disponible, por ejemplo en forma de ^{13}C -piruvato de sodio. Alternativamente, puede sintetizarse como se describe por S. Anker, J. Biol. Chem 176, 1948, 133-1335.

Se conocen en la técnica varios procedimientos para la síntesis de ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico. Brevemente, Seebach y cols., Journal of Organic Chemistry 40 (2), 1975, 231-237 describe una vía de síntesis que se basa en la protección y la activación de un material de partida que contiene carbonilo como un S,S-acetal, por ejemplo 1,3-ditiano o 2-metil-1,3-ditiano. El ditiano está metalizado y se hace reaccionar con un compuesto que contiene metilo y/o $^{13}\text{CO}_2$. Usando el ^{13}C -componente isotópicamente enriquecido apropiado como se destaca en esta referencia, es posible obtener $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, $^{13}\text{C}_2$ -piruvato o $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato. La función de carbonilo se libera posteriormente por el uso de procedimientos convencionales descritos en la bibliografía. Una vía sintética diferente comienza a partir de ácido acético, que se convierte primero en bromuro de acetilo y después se hace reaccionar con Cu^{13}CN . El nitrilo obtenido se convierte en ácido pirúvico por medio de la amida (véase por ejemplo, S.H. Anker y cols., J. Biol. Chem. 176 (1948), 1333 o J. P. Thirkettle, Chem Commun. (1997), 1025). Además, el ácido ^{13}C -pirúvico se puede obtener protonando ^{13}C -piruvato de sodio comercialmente disponible, por ejemplo por el procedimiento descrito en el documento US 6.232.497 o por el procedimiento descrito en el documento WO-A-2006/038811.

La hiperpolarización de ácido ^{13}C -pirúvico por DNP se describe en detalle en el documento WO-A1-2006/011809. Brevemente el ácido ^{13}C -pirúvico se puede usar directamente para DNP ya que forma un vidrio cuando se congela. Después de DNP, el ácido ^{13}C -pirúvico hiperpolarizado congelado necesita disolverse y neutralizarse, es decir convertirse a ^{13}C -piruvato. Para la conversión, se necesita una base fuerte. Además, dado que el ácido ^{13}C -pirúvico es un ácido fuerte, necesita elegirse un agente de DNP que es estable en este ácido fuerte. Una base preferida es hidróxido de sodio y la conversión de ácido ^{13}C -pirúvico hiperpolarizado con hidróxido de sodio da como resultado ^{13}C -piruvato de sodio hiperpolarizado, que es el ^{13}C -piruvato preferido para un medio de formación de imágenes que se usa para formación de imágenes de RM *in vivo* y/o para espectroscopía de RM *in vivo*, es decir, se lleva a cabo formación de imágenes de RM o espectroscopía de RM en seres humanos vivos o en seres animales no humanos vivos.

Alternativamente, ^{13}C -piruvato, es decir una sal de ácido ^{13}C -pirúvico se pueden usar para DNP. Las sales preferidas son aquellos ^{13}C -piruvatos que comprenden un catión inorgánico del grupo constituido por NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} , preferentemente NH_4^+ , K^+ , Rb^+ o Cs^+ , más preferentemente K^+ , Rb^+ , Cs^+ y lo más preferentemente Cs^+ . La síntesis de estos ^{13}C -piruvatos preferidos se revela también. Si se usa el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se usa en un medio de formación de imágenes para formación de imágenes de RM *in vivo* y/o para espectroscopía de RM *in vivo* se prefiere para intercambiar el catión inorgánico del grupo constituido por NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} por un catión fisiológicamente muy bien tolerable como Na^+ o meglumina. Esto puede hacerse por procedimiento conocidos en la técnica tales como el uso de una columna de intercambio catiónico.

Además, las sales preferidas son ^{13}C -piruvatos de una amina orgánica o de un compuesto amino, preferentemente TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -piruvato o meglumina- $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, como se describe en detalle en el documento WO-A2-2007/069909. La síntesis de estos ^{13}C -piruvatos preferidos se revela en el documento WO-A2-2007/069909 también.

Si se obtiene el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado usado en el procedimiento de la invención por DNP, la muestra que se va a polarizar que comprende ácido ^{13}C -pirúvico o ^{13}C -piruvato y un agente de DNP puede comprender adicionalmente un ión metálico paramagnético. La presencia de iones metálicos paramagnéticos en composición polarizada por DNP se ha encontrado que da como resultado niveles de polarización incrementada en el ácido ^{13}C -pirúvico/ ^{13}C -piruvato como se describe en detalle en el documento WO-A2-2007/064226.

Según se menciona anteriormente, el medio de imagen de acuerdo con el procedimiento de la invención pueden usarse como medio de formación de imágenes para formación de imágenes de RM *in vivo* y/o para espectroscopía de RM *in vivo*, es decir formación de imágenes de RM y/o espectroscopía de RM llevadas a cabo en seres humanos

vivos o en seres animales no humanos vivos. Un medio tal de formación de imágenes comprende preferentemente además del ^{13}C -piruvato de agente activo de RM un vehículo acuoso, preferentemente un vehículo acuoso fisiológicamente tolerable y farmacéuticamente aceptado como agua, una solución tampón o solución salina. Un medio de formación de imágenes tal puede comprender adicionalmente vehículos o excipientes farmacéuticos o veterinarios convencionales, por ejemplo coadyuvantes de formulación tal como son convencionales para composiciones diagnósticas en medicina humana o veterinaria.

Adicionalmente, el medio de formación de imágenes de acuerdo con el procedimiento de la invención se puede usar como medio de formación de imágenes para formación de imágenes de RM *in vitro* y/o para espectroscopía de RM *in vitro*, por ejemplo para detectar muerte celular en cultivos celulares o en tejidos *ex vivo*. Un medio de formación de imágenes tal comprende preferentemente además del ^{13}C -piruvato de agente de RM activo, un disolvente que es compatible con y se usa para ensayos tisulares y celulares *in vitro*, por ejemplo DMSO o metanol o mezclas de disolventes que comprenden un vehículo acuoso y un disolvente no acuoso, por ejemplo, mezclas de DMSO y agua o una solución tampón o metanol y agua o una solución tampón. Como es evidente para el experto en la técnica, pueden estar presentes vehículos, excipientes y coadyuvantes de formulación farmacéuticamente aceptables en un medio de imagen de este tipo, pero no se requieren para un propósito tal.

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende adicionalmente el uso de lactato no hiperpolarizado, en adelante indicado lactato.

Adecuadamente, se añade lactato en forma de ácido láctico o de una sal de ácido láctico, preferentemente lactato de litio o lactato de sodio, lo más preferentemente lactato de sodio.

La concentración de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado y de lactato en el agente de formación de imágenes usado en el procedimiento de la invención es aproximadamente equivalente o es equivalente o el lactato está presente en una concentración inferior o superior que ^{13}C -piruvato. Si por ejemplo el agente de imagen contiene ^{13}C -piruvato x M, ello contiene lactato x M o aproximadamente lactato x M o menos lactato pero preferentemente no menos de una décima parte de x M o más lactato pero preferentemente no más de tres veces x M. En una realización preferida, la concentración de lactato en el agente de formación de imágenes usado en el procedimiento de la invención es aproximadamente equivalente o es equivalente a la concentración de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. El término "concentración aproximadamente igual" denota una concentración de lactato que es +/- 30 % de la concentración de ^{13}C -piruvato, preferentemente +/- 20 %, más preferentemente +/- 10 %.

El lactato se añade adecuadamente al ^{13}C -piruvato hiperpolarizado después el procedimiento de polarización. Son posibles varias maneras de añadir el lactato. Donde el procedimiento de polarización da como resultado una composición líquida que comprende el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, el lactato puede disolverse en dicha composición líquida o en una solución de lactato en un disolvente adecuado, preferentemente se puede añadir un vehículo acuoso a la composición líquida. Si el proceso de polarización da como resultado una composición sólida que comprende el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, el lactato puede disolverse en el medio de disolución que se usa para disolver la composición sólida. Por ejemplo ^{13}C -piruvato polarizado por el procedimiento de DNP puede disolverse en un vehículo acuoso como agua o en una solución tampón que contiene el lactato. Si se ha obtenido ^{13}C -piruvato hiperpolarizado por DNP, se prefiere añadir lactato a la composición líquida final, es decir a la composición líquida después de la disolución/fusión del ^{13}C -piruvato/ácido ^{13}C -pirúvico polarizado congelado o a la composición líquida después de la eliminación del agente de DNP y/o de un ión metálico paramagnético opcional. De nuevo el lactato puede añadirse como un sólido a la composición líquida o puede disolverse en un disolvente adecuado por ejemplo un vehículo acuoso. Para promover la disolución del lactato, se pueden usar varios medios conocidos en la técnica, tales como agitación, agitación con vórtex o sonicación. Sin embargo, se prefieren procedimientos que son rápidos y que no requieren un dispositivo mezclador o ayudan a poner el contacto con la composición líquida. De este modo se prefieren procedimientos como agitación con vórtex o sonicación.

En otra realización, el medio de formación de imágenes de acuerdo con la invención se administra conjuntamente con lactato. En esta realización, el lactato puede disolverse en un disolvente adecuado, por ejemplo, un vehículo acuoso y puede administrarse a un cuerpo humano o de animal no humano o añadirse a un cultivo celular o a un tejido *ex vivo* antes de la administración/adición del ^{13}C -piruvato hiperpolarizado ("preacondicionamiento") o concomitantemente con la administración/adición del ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

Para preacondicionamiento, se administra preferentemente lactato a un cuerpo humano o de animal no humano 0,5 a 5 minutos antes de la administración de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado y más preferentemente 1 a 2 minutos antes de la administración de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. Lo más preferentemente, se administra lactato a un cuerpo humano o de animal no humano conjuntamente con la administración de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

En caso de un cultivo celular o de un tejido *ex vivo*, la distribución de lactato en las células tiene lugar más rápido que en un cuerpo humano o de animal no humano ya que en estos últimos el lactato debe administrarse a la vasculatura y distribuirse desde el punto de administración al tejido en examen. Por lo tanto, en caso de un cultivo celular o tejido *ex vivo*, se puede añadir lactato a dicho cultivo celular o tejido *ex vivo* inmediatamente antes de que

se añade ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, más preferentemente 2 a 1 minuto antes de que se añada ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, más preferentemente 1 a 0,5 minutos y lo más preferentemente concomitantemente con la adición de ^{13}C -piruvato.

Para usarse como un medio de formación de imágenes para formación de imágenes de RM o espectroscopía de RM *in vivo* en el procedimiento de la invención, el medio de formación de imágenes que comprende el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado y opcionalmente lactato deberá ser adecuado para administración a un cuerpo humano o de animal no humano vivo. El medio de formación de imágenes comprende preferentemente un vehículo acuoso como agua, un tampón o una mezcla de tampones según se describe anteriormente. El medio de formación de imágenes puede comprender adicionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes y ayudas de formulación. Así, el procedimiento de formación de imágenes puede incluir por ejemplo estabilizadores, agentes que ajustan osmolaridad, agentes solubilizantes y similares.

Para usar como un medio de formación de imágenes de RM *in vitro* o para espectroscopía de RM en el procedimiento de la invención, el medio de imagen que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado y opcionalmente lactato debe ser adecuado para añadirse a, por ejemplo, los cultivos celulares o los tejidos *ex vivo* y el medio de formación de imágenes comprende preferentemente un vehículo acuoso como agua, un tampón o una mezcla de tampones como se describe anteriormente.

Si el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se usa como un agente de imagen para la detección de la muerte celular en un procedimiento *in vitro* de formación de imágenes de RM o de espectroscopía de RM, por ejemplo usando cultivos celulares o tejido *ex vivo*, comprendiendo el medio de formación de imágenes el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado que se añade al cultivo celular o el tejido *ex vivo* es 10 mM a 100 mM de ^{13}C -piruvato, más preferentemente 20 mM a 90 mM y lo más preferentemente 40 a 80 mM en ^{13}C -piruvato.

La muerte celular se puede detectar por el procedimiento de la invención siguiendo la señal de ^{13}C -piruvato y la señal de su metabolito ^{13}C -lactato a lo largo del tiempo. En células viables, por ejemplo en células no apoptóticas/no necróticas, la señal de ^{13}C -piruvato decae a lo largo del tiempo. La señal de ^{13}C -lactato se incrementa primero debido a la conversión metabólica de ^{13}C -piruvato a ^{13}C -lactato y después desciende lentamente debido principalmente a relajación. En células que mueren, por ejemplo en células apoptóticas o necróticas, la conversión metabólica de ^{13}C -piruvato a ^{13}C -lactato está grandemente disminuida y aunque la señal de ^{13}C -piruvato decae a lo largo del tiempo, la señal de ^{13}C -lactato sólo aumenta ligeramente o puede no ser detectable en absoluto, dependiendo del grado de muerte celular/de la cantidad de células muertas. Sin querer comprometerse con esta teoría, los autores de la presente invención creen que esto se debe bien a la pérdida de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa que cataliza la interconversión de piruvato y lactato con la interconversión concomitante de NADH y NAD⁺, y/o bien debido a la pérdida los cofactores NADH y NAD⁺, y/o bien debido a una disminución en concentración de lactato celular.

Las medidas de ^{31}P -RMN en extractos ácidos de células de linfoma murino EL-4 inducidas para sufrir muerte celular por tratamiento con etopósido han demostrado un decrecimiento en la intensidad de las resonancias de NAD(H), cuando se comparan con las células control no tratadas. La pérdida de NAD(H) puede explicarse por activación inducida por daño de ADN de la enzima polimerasa de poli-ADP-ribosa (PARP), que poliadenila diversas proteínas y usa NAD⁺ como un sustrato. Hubo también un incremento en las resonancias a partir del intermedio glicolítico, fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), que puede explicarse por inhibición de la enzima glicolítica, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), a través de la pérdida de su coenzima NAD(H). La inhibición de actividad de PARP con un inhibidor competitivo (nicotinamida 20 mM o 3-aminobenzamida 10 mM) inhibió la pérdida de NAD(H) y el incremento en concentración de FBP observada en células que mueren.

Esta pérdida de NAD(H) debida a la activación de PARP también debería inhibir la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) y así el flujo medido de marca ^{13}C entre piruvato y lactato. Consecuente con esta hipótesis es la observación de que las células tratadas tanto con nicotinamida y etopósido como con nicotinamida y 3-aminobenzamida mantuvieron su capacidad para transferir la marca ^{13}C hiperpolarizada entre las reservas de piruvato y de lactato, aunque aún presentan las características morfológicas comunes de las células que mueren, según se detectan usando microscopía de fluorescencia.

Se ha hallado adicionalmente que la adición de lactato -bien estando presente en el medio de formación de imágenes de acuerdo con la invención o bien añadiéndose/administrándose por separado- conduce a una mayor cantidad de ^{13}C -lactato observable y así a una señal de RM incrementada de ^{13}C -lactato.

Como se explica anteriormente, la señal de ^{13}C -lactato es la señal que se controla en medidas de formación de imágenes de RM o de medidas de espectroscopía de RM para detectar la muerte celular y donde el tejido que muere o muerto está indicado por una señal de ^{13}C -lactato baja o ausente, comparada con una señal de ^{13}C -lactato que alguien podría observar a partir de un tejido viable. Una señal incrementada de ^{13}C -lactato hace más fácil distinguir entre una situación de "señal de lactato baja" y de "ninguna señal de lactato", es decir, a distinguir entre ciertos grados de muerte celular.

Se aplica una secuencia de formación de imágenes de RM que codifica el volumen de interés en una frecuencia combinada y espacialmente selectiva y la señal de RM ^{13}C de ^{13}C -piruvato está seguida por la formación de imágenes de RM o por la espectroscopía de RM durante un periodo de tiempo a partir de la adición del agente de formación de imágenes ($t = 0$) a aproximadamente 10 minutos, preferentemente 6 minutos y más preferentemente 5 minutos. En el mismo periodo de tiempo, la aparición, incremento y subsiguiente decrecimiento de la señal de ^{13}C -lactato se somete a seguimiento. Para obtener una evaluación cuantitativa, la formación de imágenes de RM de células sanas o de tejido se puede llevar a cabo y los resultados -es decir la cantidad o tasa de ^{13}C -lactato formado durante un periodo de tiempo dado- se pueden comparar.

Si el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se usa como un agente de formación de imágenes para la detección de la muerte celular en un procedimiento *in vivo* de formación de imágenes de RM o de espectroscopía de RM, por ejemplo en un cuerpo humano o de animal no humano vivo, el medio de formación de imágenes que contiene el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se administra preferentemente a dicho cuerpo parenteralmente, preferentemente intravenosamente. Generalmente, el cuerpo en examen se posiciona en el imán de RM. Las bobinas de RF de ^{13}C -RM dedicadas se posicionan para cubrir el área de interés. La dosificación y la concentración del medio de formación de imágenes dependerán de una serie de factores tales como toxicidad y la vía de administración. Generalmente, el medio de formación de imágenes se administra en una concentración de hasta ^{13}C -piruvato 1 mmol por kg de peso corporal, preferentemente 0,01 a 0,5 mmol/kg, más preferentemente 0,1 a 0,3 mmol/kg. La velocidad de administración es preferentemente menos de 10 ml/s, más preferentemente menos de 6 ml/min y lo más preferentemente desde 5 ml/s a 0,1 ml/s. A menos de 400 segundos después de la administración, preferentemente menos de 120 s, más preferentemente menos de 60 segundos después de la administración, especialmente preferentemente 20 a 50 segundos se aplica una secuencia de formación de imágenes de RM que codifica el volumen de interés en una frecuencia combinada y en una manera selectiva espacial. Esto dará como resultado imágenes metabólicas de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato. El tiempo exacto de aplicación de una secuencia de RM es altamente dependiente del volumen de interés para detectar muerte celular.

La codificación del volumen de interés puede lograrse usando las así llamadas secuencias de formación de imágenes espectroscópicas según se describen en, por ejemplo, T.R. Brown y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3523-3526 (1982); A. A. Maudsley y cols., J. Magn. Res 51, 147-152 (1983). Los datos de imágenes espectroscópicas contienen un número de elementos de volumen en los que cada elemento contiene un espectro de ^{13}C -RM completo. ^{13}C -piruvato y su metabolito ^{13}C -lactato tienen su única posición en un espectro de ^{13}C -RM y su frecuencia de resonancia se pueden usar para identificarlos. La integral del pico en su frecuencia de resonancia está directamente relacionada con la cantidad de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato, respectivamente. Cuando la cantidad de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato se estima usando rutinas de ajuste de dominios temporales según se describen por ejemplo en L. Vanhamme y cols., J Magn Reson 129, 35-43 (1997), se pueden generar imágenes para ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato en el que un código de colores o un código de grises es representativo de la cantidad de ^{13}C -piruvato y de ^{13}C -lactato medida.

Aunque los procedimientos de formación de imágenes espectroscópicas han demostrado su valor en producir imágenes metabólicas usando todas las clases de núcleos de MR por ejemplo ^1H , ^{31}P , ^{23}Na , la cantidad de repeticiones necesarias para codificar totalmente las imágenes espectroscópicas plenamente hace a esta aproximación menos adecuada para ^{13}C hiperpolarizado. Se ha tenido cuidado para asegurar que la señal ^{13}C hiperpolarizada está disponible durante la adquisición de los datos de RM entera. A expensas de una señal reducida a ruido, esto puede lograrse reduciendo el ángulo de pulso de RF que se aplica en cada fase que codifica la etapa. Tamaños de matriz superiores requieren más etapas de codificación de fase y tiempos de exploración más largos.

Los procedimientos de formación de imágenes basados en el trabajo pionero de P. C. Lauterbur (Nature, 242, 190-191, (1973) y P. Mansfield (J. Phys. C. 6, L422-L426 (1973)), que aplican un gradiente de lectura durante la adquisición de datos, permitirán señal más alta que las imágenes de ruido o equivalentes, imágenes de resolución espacial más altas. Sin embargo, estos procedimientos de formación de imágenes no serán capaces de producir imágenes separadas para ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato, es decir la identificación de metabolitos específicos no es posible. En una realización preferida, se usan secuencias de formación de imágenes que harán uso de multiecos para codificar la información de frecuencia. Las secuencias que pueden producir imágenes de ^1H separadas de agua y grasa se describen por ejemplo en G. Glover, J Magn Reson Imaging 1991; 1: 521-530 y S.B. Reeder y cols., MRM 51 35-45 (2004). Dado que se conocen los metabolitos a detectarse y como tales sus frecuencias de RM, la aproximación discutida en las referencias anteriores puede aplicarse para adquirir imágenes directas de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato. Este procedimiento hace más eficiente el uso de señal de ^{13}C -RM hiperpolarizada, dando una calidad de señal mejor comparada con la formación de imágenes espectroscópicas, una resolución espacial superior y tiempos de adquisición más rápidos.

En una realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende adquirir imágenes de ^{13}C -RM directas o espectros de ^{13}C -piruvato y de ^{13}C -lactato a partir de un cuerpo humano o de animal no humano preadministrado con un medio de formación de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado o a partir de un cultivo celular o tejido *ex vivo* se añade el medio de formación de imágenes. En el procedimiento descrito, la

muerte celular se identifica y se detecta por una intensidad de señal de ^{13}C baja a partir de ^{13}C -lactato o una señal de ^{13}C ausente a partir de ^{13}C -lactato o una tasa disminuida de formación de ^{13}C -lactato.

Para corregir la señal de piruvato, tanto las imágenes de lactato como de piruvato pueden normalizarse para el valor máximo en cada imagen individual. Segundo, la imagen de lactato normalizada se multiplica por la imagen de piruvato invertida, por ejemplo la señal de piruvato máxima en la imagen menos el nivel de piruvato para cada pixel. Como una última etapa, el resultado intermedio obtenido en la operación anterior se multiplica por la imagen de lactato original. Alternativamente, las intensidades de pico de piruvato y lactato en cada pixel de sus imágenes respectivas pueden ajustarse a un modelo cinético del flujo de ^{13}C entre piruvato y lactato para obtener constantes de velocidad para flujo de marca y tiempos de relajación reticular de espín. Puede necesitar hacerse corrección para el efecto de pulsos de RF múltiples en la pérdida de polarización.

La información anatómica y/o la información de perfusión pueden incluirse en la detección de muerte celular de acuerdo con el procedimiento de la invención, si el procedimiento se usa para detección de muerte celular *in vivo*. La información anatómica podrá obtenerse por ejemplo adquiriendo una imagen de RM de protones o de ^{13}C con o sin emplear un agente de contraste adecuado. La perfusión relativa se puede determinar usando un agente de contraste de RM como por ejemplo Omniscan™. Asimismo, las técnicas de formación de imágenes de RM para medida de perfusión sin la administración de un agente en contraste se conocen en la técnica. En una realización preferida, se usa un agente de contraste de ^{13}C hiperpolarizado no metabolizado para determinar la perfusión cuantitativa. Las técnicas adecuadas y los agentes de contraste se describen por ejemplo en el documento WO-A-02/23209. En una realización más preferida, el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se usa para determinar la perfusión cuantitativa.

En otra realización preferida, el medio de formación de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato se administra repetidamente, permitiendo así estudios dinámicos. Debido a la baja toxicidad de piruvato y a su perfil de seguridad favorable, las dosis de este compuesto son bien toleradas por el paciente.

Los resultados obtenidos en el procedimiento de la invención permiten por ejemplo al médico elegir el tratamiento apropiado para el paciente a examen. En una realización preferida adicional, el procedimiento de la invención se usa para determinar si el tratamiento es exitoso.

Revisado desde un aspecto adicional, la invención también se refiere a un medio de formación de imágenes de acuerdo con la reivindicación 7.

Breve descripción de los dibujos:

La FIG. 1 representa las intensidades de pico de ^{13}C -piruvato y de ^{13}C -lactato en una suspensión de células EL4 tratadas con etopósido y en una suspensión de células EL4 no tratadas frente al tiempo. Las numeraciones de la curva en la FIG. 1 denotan lo siguiente:

1: intensidades de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato (divididas por 100) en suspensiones de células control no tratadas y de células tratadas con etopósido.

2: intensidades de $^{13}\text{C}_1$ -lactato en una suspensión de células control

3: intensidades de $^{13}\text{C}_1$ -lactato en una suspensión de células tratadas con etopósido

FIG. 2 muestra el efecto de etopósido y el tratamiento de etopósido/nicotinamida en células EL4 para la muestra celular que induce el etopósido de fármacos. Gráficas de barras en FIG. 2 representan 3 experimentos +/- desviación estándar. La numeración de barra en la FIG. 2 denota lo siguiente:

1: suspensión de células EL4 no tratadas 2: suspensión de células EL4 tratadas con etopósido 3: suspensión de células EL4 tratadas con etopósido/nicotinamida

La FIG. 3A muestra una serie representativa de espectros de RM de ^{13}C a partir de un corte de grosor de 5 mm a través de un tumor antes de tratamiento con etopósido tras la inyección i.v. de 0,2 ml de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado. La resonancia a 171 ppm es a partir de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, la resonancia a 183 ppm es a partir de $^{13}\text{C}_1$ -lactato.

La FIG. 3B muestra $^{13}\text{C}_1$ -piruvato de tumor (símbolos cerrados) e intensidades de pico de $^{13}\text{C}_1$ -lactato (símbolos abiertos) tras la inyección i.v. de 0,2 ml de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado 75 mM. Las líneas sólidas muestran el ajuste al modelo de intercambio de dos sitios.

La FIG. 3C muestra la intensidad de pico de $^{13}\text{C}_1$ -lactato/ $^{13}\text{C}_1$ -piruvato tras la inyección intravenosa de 0,2 ml de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado 75 mM en ratones con tumores no tratados (símbolos abiertos) y con tumores tratados con etopósido (símbolos cerrados). Las regiones sombreadas representan una desviación estándar a partir de la media ($n = 8$ para ambos grupos de animales). La barra negra entre 20 y 25 segundos indica el periodo de tiempo cuando la formación de imágenes de RM espectroscópicas de ^{13}C se llevó a cabo.

Ejemplos

En lo que sigue los términos piruvato, ^{13}C -piruvato y $^{13}\text{C}_1$ -piruvato se usan intercambiabilmente y todos denotan $^{13}\text{C}_1$ -piruvato. Asimismo, los términos ácido pirúvico, ácido ^{13}C -pirúvico y ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico se usan intercambiabilmente y todos denotan ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico. Además, los términos lactato, ^{13}C -lactato y $^{13}\text{C}_1$ -lactato se usan intercambiabilmente y todos denotan $^{13}\text{C}_1$ -lactato, a menos que se especifique adicionalmente.

Ejemplo 1: Síntesis de sal sódica de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(metoxietil)benzo-[1,2-4,5']bis-(1,3)ditiol-4-il)metilo, un agente de DNP

10 g (70 mmol) de sal sódica de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(hidroxietil)benzo-[1,2-4,5']bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo que se han sintetizado de acuerdo con el Ejemplo 7 del documento WO-A1-98/39277 se suspendieron en 280 ml de dimetilacetamida en una atmósfera de argón. Se añadió hidruro de sodio (2,75 g) seguido por yoduro de metilo (5,2 ml) y la reacción que es levemente exotérmica se dejó tener lugar durante 1 hora en un baño de agua a 34 °C durante 60 minutos. La adición de hidruro de sodio y yoduro de metilo se repitió dos veces con las mismas cantidades de cada uno de los compuestos y después de la adición final, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 68 horas y después se vertió en 500 ml de agua. El pH se ajustó a pH > 13 usando 40 ml de NaOH (ac.) 1 M y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas hidrolizando los ésteres de metilo formados. La mezcla se acidificó después usando 50 ml de HCl (ac.) 2 M a un pH de aproximadamente 2 y se extrajo el acetato de etilo 3 veces (500 ml y 2 x 200 ml). La fracción orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y después se evaporó a sequedad. El producto en bruto (24 g) se purificó por HPLC preparativa usando acetonitrilo/agua como eluyentes. Las fracciones recogidas se evaporaron eliminando acetonitrilo. La fase acuosa que queda se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y después se evaporó hasta sequedad. Se añadió agua (200 ml) al residuo y el pH se ajustó cuidadosamente con NaOH (ac.) 0,1 M a 7, disolviéndose el residuo lentamente durante este procedimiento. Después de neutralización, la solución acuosa se secó por congelación.

Ejemplo 2: Producción de una composición que comprende $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado obtenido por el procedimiento de DNP usando ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico y el agente de DNP (radical de tritilo) de Ejemplo 1.

Se preparó una solución 20 mM disolviendo la solución de 5,0 mg del radical del Ejemplo 1, en ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico (164 μl). La muestra se mezcló a homogeneidad y una alícuota de la solución (41 mg) se situó en un recipiente de muestras y se insertó en el polarizador de DNP.

Se polarizó la muestra en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T en irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas la polarización se detuvo y la muestra se disolvió usando un dispositivo de disolución de acuerdo con el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) proporcionando una solución neutra de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato de sodio. La muestra disuelta se analizó rápidamente con ^{13}C -RMN evaluando la polarización y se obtuvo una polarización de ^{13}C al 19 %.

Ejemplo 3: Producción de una composición que comprende $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado obtenido por el procedimiento de DNP usando ácido ^{13}C -pirúvico y el agente de DNP (radical de tritilo) de Ejemplo 1.

Se preparó una solución 15 mM disolviendo el radical del Ejemplo 1 (209,1 mg) en una mezcla de ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico (553 mg) y ácido pirúvico no marcado (10,505 g). La muestra se mezcló a homogeneidad y se situó una alícuota de la solución (2,015 g) en un recipiente de muestras y se insertó en el polarizador de DNP.

Se polarizó la muestra en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T en irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 4 horas de la polarización se detuvo y la muestra se disolvió usando un dispositivo de disolución de acuerdo con el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) proporcionando una solución neutra de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato de sodio hiperpolarizado con una concentración de piruvato total de 0,5 M en tampón de TRIS 100 mM. Se conectó en serie con el dispositivo de disolución una columna cromatográfica. La columna consiste en un cartucho (D = 38 mm; h = 10 mm) que contiene material de empaquetado hidrófobo (Bondesil-C18, 40 μm Parte n.º: 12213012) suministrado por Varian. La muestra disuelta se hizo pasar a través de la columna que selectivamente absorbió el radical. La solución filtrada se analizó rápidamente con ^{13}C -RMN valorando la polarización, se obtuvo polarización de ^{13}C al 16,5 %. La concentración de radicales residual se analizó posteriormente con un medidor espectrofotométrico de UV a 469 nm y se determinó que estaba por debajo del límite de detección de 0,1 μM .

Ejemplo 4: Producción de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado por el procedimiento de DNP usando sal sódica de ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico y tris(8-carboxi- 2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metil-benzo[1,2-d: 4,5-d']bis(1,3)ditiol-4-il)metilo como un agente de DNP

Sal sódica de tris(8-carboxi- 2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metil-benzo[1,2-d: 4,5-d']bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo, se sintetizó como se describe en el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633.

Se preparó una solución 20 mM disolviendo sal sódica de tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metil-benzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo en ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico (83,1 mg). La muestra se mezcla a homogeneidad, se sitúa en un recipiente de muestra y se inserta en el polarizador de DNP. Se polarizó la composición en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T en irradiación con microondas (93,950 GHz). La señal de ^{13}C -RMN de la muestra se adquirió usando un espectrómetro de RMN Inova-200 de Varian. La potenciación de DNP se calculó a partir de una medida de la señal de ^{13}C -RMN en equilibrio térmico y de la señal de RMN potenciada. 16 % Se obtuvo polarización de ^{13}C .

Ejemplo 5: Preparación de un medio de formación de imágenes que comprende $^{13}\text{C}_1$ -piruvato y lactato no marcado no hiperpolarizado.

Se preparó una solución 15 mM disolviendo el agente de DNP (radical tritilo) de Ejemplo 1 en ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico (44 mg, al 91 %). La muestra se mezcló a homogeneidad y la solución se situó en un recipiente de muestra y se insertó en el polarizador de DNP.

La muestra se polarizó en condiciones de DNP al 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T en irradiación con microondas (94 GHz y 100 mW, respectivamente). La polarización fue seguida por RMN en el estado sólido. Después de hiperpolarización de 90 minutos, la muestra se disolvió en 6 ml de una solución acuosa de NaOH 94 mM, NaCl 30 mM, HEPES 40 mM y EDTA a 50 mg/litro. El pH de la muestra disuelta fue 7,4 con una concentración de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato final de 75 mM.

Se combinaron 2 ml de solución con una solución de 500 μl de agua que contienen 18 mg de lactato de litio dando como resultado un medio de formación de imágenes que comprenden $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado 60 mM y lactato 75 mM.

Ejemplo 6: Detección de muerte celular en cultivos celulares

6.1 Preparación de células EL4

Las células de linfoma murino EL4 (10^8 células) se trataron con etopósido 15 μM (PCH Pharmachemie BV, Harleem), un compuesto que se sabe que induce muerte celular después de 16 h de exposición. Un grupo de células separado se trató durante 16 horas con etopósido 15 μM más nicotinamida 20 mM, un inhibidor de PARP conocido. La muerte celular (apoptosis y necrosis) se confirmó por tinción con naranja de acridina y yoduro de propidio. Las células se lavaron 3 veces con medio de cultivo RPMI 1640 que contiene FCS al 10 % a 37 °C y se añadieron 2 ml de la suspensión de células EL4 tratadas con etopósido/nicotinamida y 2 ml del medio de formación de imágenes de acuerdo con el Ejemplo 5. La suspensión celular final contenía así $^{13}\text{C}_1$ -piruvato 30 mM hiperpolarizado y lactato 37,5 mM.

6.2 Espectroscopía ^{13}C -RM de células EL4.

Las intensidades de señal de ^{13}C de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato en suspensiones celulares de EL4 tratadas con etopósido según se describen en 6.1 se continuaron durante un periodo de tiempo de 240 segundos desde el momento de la adición del medio de formación de imágenes. Un espectro de ^{13}C por segundo, se adquirió usando pulsos de ángulo de excitación de secuencia de pulso de eco de campo bajos a 9,4 T para un total de 240 espectros. Un control de células de linfoma EL4 no tratadas con etopósido (no tratadas) EL4 se examinaron también, como se destaca anteriormente y las intensidades de pico de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato de las células no tratadas y de las células tratadas con etopósido se trazaron en una gráfica (FIG. 1).

6.3 Espectroscopía ^{13}C -RM de células EL4.

Las intensidades de señal de ^{13}C de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato en suspensiones celulares de EL4 tratadas con etopósido/nicotinamida según se describen en 6.1 se continuaron durante un periodo de tiempo de 240 segundos desde el momento de la adición del medio de formación de imágenes. Un espectro de ^{13}C por segundo, se adquirió usando pulsos de ángulo de excitación de secuencia de pulso de eco de campo bajos a 9,4 T para un total de 240 espectros. Un control de células de linfoma de EL4 no tratadas con etopósido (no tratadas) se examinó también, como se destaca anteriormente y se compararon las intensidades de pico de ^{13}C -piruvato y ^{13}C -lactato de las células EL4 no tratadas, tratadas con etopósido y tratadas con etopósido/nicotinamida. Los datos se ajustaron a modelo de intercambio de dos sitios basado en las ecuaciones de Bloch modificadas y se determinaron las constantes de velocidad para los ^{13}C -flujos de intercambio directo e inverso. Las gráficas de barras en la FIG. 2 representan 3 experimentos +/- desviación estándar.

Ejemplo 7: Preparación de un medio de formación de imágenes que comprende $^{13}\text{C}_1$ -piruvato

Se preparó una solución 15mM disolviendo el agente de DNP (radical tritilo) de Ejemplo 1 en ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico (44 mg, al 91 %). La muestra se mezcló a homogeneidad y la solución se situó en un recipiente de muestra y se insertó en el polarizador de DNP.

La muestra se polarizó en condiciones de DNP al 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T en irradiación con microondas (94 GHz y 100 mW, respectivamente). La polarización fue seguida por RMN en el estado sólido. Después de hiperpolarización de 90 minutos, la muestra se disolvió en 6 ml de una solución acuosa de NaOH 94 mM, NaCl 30 mM, HEPES 40 mM y EDTA a 50 mg/litro. El pH de la muestra disuelta fue 7,4 con una concentración de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato final de 75 mM.

Ejemplo 8: Detección de muerte celular *in vivo*.

Los tumores de linfoma en ratones se produjeron por implantación subcutánea en células EL4. Los ratones se trataron con una inyección i.p. de etopósido a 67 mg/kg. La muerte celular tumoral que sigue al tratamiento con etopósido se valoró histológicamente. Los ratones no tratados con etopósido se usaron como control.

La inyección intravenosa de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado de Ejemplo 7 (0,2 ml) dio como resultado señales fácilmente medibles a partir de ^{13}C -piruvato y lactato en el tumor (FIG. 3A). Se recogieron espectros cada 2 segundos durante dos minutos empezando a partir de 12 segundos después del comienzo de la inyección. Medidas a partir de un corte de formación de imágenes en músculo subyacente y de un corte sobre el tumor, que se hicieron pasar a través del hígado, mostraron señal de piruvato pero sólo señales pequeñas de lactato en animales tratados con etopósido y no tratados. Los cambios dependientes de tiempo en las señales de tumor a partir de lactato y piruvato se ajustaron al modelo de intercambio obteniéndose las constantes de velocidad aparentes y los tiempos de relajación de red de espín (FIG. 3B). Los primeros 10-15 segundos de adquisición de datos se perdieron dado que éste fue el tiempo tomado completando la inyección e insertando el ensamblaje de sonda de bobina de superficie de ^{13}C , conteniendo al animal, en el imán de formación de imágenes.

El tratamiento de animales portadores de tumores EL-4 con etopósido, dio como resultado muerte celular del $37,0 \pm 3,8$ % después del tratamiento con fármacos, según se compara con el $4,8 \pm 0,7$ % del grupo de control ($n = 3$, $P < 0,01$) y hubo un pequeño decrecimiento en volumen de tumor, desde $1,6 \pm 0,4 \text{ cm}^3$ ($n = 8$) en tumores no tratados hasta $1,3 \pm 0,2 \text{ cm}^3$ ($n = 8$) en tumores tratados (determinados a partir de imágenes de eco de espín de ^1H de multicorte). El tratamiento con etopósido dio como resultado un decrecimiento aproximadamente del 25 % en la constante de velocidad k_p^{app} , medida tras la inyección de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. La velocidad constante fue $0,075 \pm 0,011 \text{ s}^{-1}$ en tumores de control y $0,056 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$ en tumores tratados con etopósido ($n = 8$, $p < 0,01$). La diferencia en las constantes de velocidad no puede explicarse por diferencias en administración de piruvato a los tumores, dado que las concentraciones de piruvato determinadas por mediciones de RMN de ^1H en extractos de ácido perclórico de tumores fijados por congelación fueron $0,55 \pm 0,19 \text{ } \mu\text{mol/g}$ de peso húmedo ($n = 8$) en tumores de control y $0,75 \pm 0,48 \text{ } \mu\text{mol/g}$ de peso húmedo ($n = 8$) en tumores tratados con etopósido. El flujo de marca de ^{13}C disminuido entre piruvato y lactato se observó fácilmente a partir de un trazado de las proporciones de lactato/piruvato (FIG. 3C), que mostraron una separación casi completa de los dos grupos de animales. Los datos se recogieron 20 h después del tratamiento de los animales con etopósido. Las desviaciones estándar incrementadas después de 40 segundos reflejan el decrecimiento en relación señal-ruido en las resonancias de lactato y piruvato resultantes de la pérdida de polarización. Las proporciones de lactato/piruvato en el equilibrio calculadas (es decir, L_∞/P_∞ , equivalente a la proporción de concentraciones) mostraron una disminución de $4,0 \pm 0,8$ ($n = 8$) en tumores de control a $2,7 \pm 0,4$ ($n = 8$) ($p < 0,005$) en tumores tratados con etopósido. Se observó un descenso similar en la proporción de lactato/piruvato medida por mediciones de RMN de ^1H en extractos de ácido perclórico de tumores fijados por congelación, donde la proporción disminuyó desde $9,5 \pm 3,5$ ($n = 8$) hasta $5,1 \pm 2,0$ ($n = 8$) ($p < 0,01$). Estos extractos se hicieron inmediatamente tras la finalización de los experimentos de RM. Las concentraciones de lactato en tumores tratados con etopósido y no tratados en animales que no se han inyectado con piruvato fueron $3,6 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{mol/g}$ en peso húmedo y $3,0 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{mol/g}$ de peso húmedo ($n = 3$) respectivamente. Estos valores no fueron estadísticamente significativamente diferentes de los correspondientes valores en animales inyectados con piruvato, que fueron $3,2 \pm 1,3 \text{ } \mu\text{mol/g}$ de peso húmedo y $5,0 \pm 1,9 \text{ } \mu\text{mol/g}$ de peso húmedo respectivamente ($n = 8$). La actividad enzimática de medidas en extractos de proteínas preparados a partir de tumores fijados por congelación mostró un decrecimiento en concentración de LDH desde 350 ± 200 unidades/g de peso húmedo en tumores no tratados ($n = 5$) a 100 ± 20 unidades/g de peso húmedo en tumores tratados con fármacos ($n = 3$) ($p < 0,05$).

En otras series de experimentos, los animales se trataron con etopósido 24 horas después de la formación de imágenes y después de 24 horas después del tratamiento con etopósido se adquirió un segundo grupo de imágenes, así cada animal pudo servir como su propio control. Sin embargo, como con los otros experimentos, hubo variación pequeña dentro de los grupos y se presentan los resultados de grupo. La velocidad constante fue $0,065 \pm 0,017 \text{ s}^{-1}$ antes del tratamiento y $0,040 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$ después del tratamiento ($n = 4$, $p < 0,01$), representando un decrecimiento del 39 % en flujo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de resonancia magnética para detectar muerte celular, comprendiendo el procedimiento
 - (a) administrar o añadir un medio de formación de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para un objeto que contiene células; y adicionalmente
 - 5 (b) administrar o añadir lactato no hiperpolarizado concomitantemente o antes de la administración o adición de dicho agente, respectivamente; y
 - (c) detectar muerte celular sobre la base de imágenes de ^{13}C -RM y/o los espectros de C-piruvato y su metabolito ^{13}C -lactato adquiridos a lo largo del tiempo.

[Insertar las reivindicaciones 2-6 de páginas 27 y 28].
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el medio de formación de imágenes y lactato se administran a un cuerpo humano o de animal no humano y dicha formación de imágenes de ^{13}C -RM y/o espectroscopía de ^{13}C -RM se lleva a cabo para detectar muerte celular en dicho cuerpo humano o de animal no humano.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que el medio de formación de imágenes y lactato se añade a un cultivo celular o a un tejido *ex vivo* y dicha formación de imágenes de ^{13}C -NM y/o espectroscopía de ^{13}C -RM se lleva a cabo para detectar la muerte celular en dicho cultivo celular o tejido *ex vivo*.
- 20 4. El procedimiento según la reivindicación 1 en el que las intensidades de señal de ^{13}C de ^{13}C -piruvato y de ^{13}C -lactato se siguen a partir del punto temporal de administración/adición del medio de formación de imágenes a aproximadamente 10 minutos, preferentemente a aproximadamente 6 minutos y más preferentemente a aproximadamente 5 minutos.
5. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4 en el que la muerte celular se detecta por una intensidad de señal de ^{13}C de ^{13}C -lactato baja o de señal de ^{13}C de ^{13}C -lactato ausente o de una velocidad disminuida de formación de ^{13}C -lactato, comparada con aquello observado de tejido viable.
- 25 6. El procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8 en el que el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se obtiene por polarización nuclear dinámica de ácido ^{13}C -pirúvico o de ^{13}C -piruvato.
7. Medio de formación de imagen para usar en un procedimiento de formación de imágenes ^{13}C -RM y/o de espectroscopía de ^{13}C -RM para detectar muerte celular, conteniendo el medio de formación de imágenes C-piruvato hiperpolarizado y lactato no hiperpolarizado.

FIG. 1

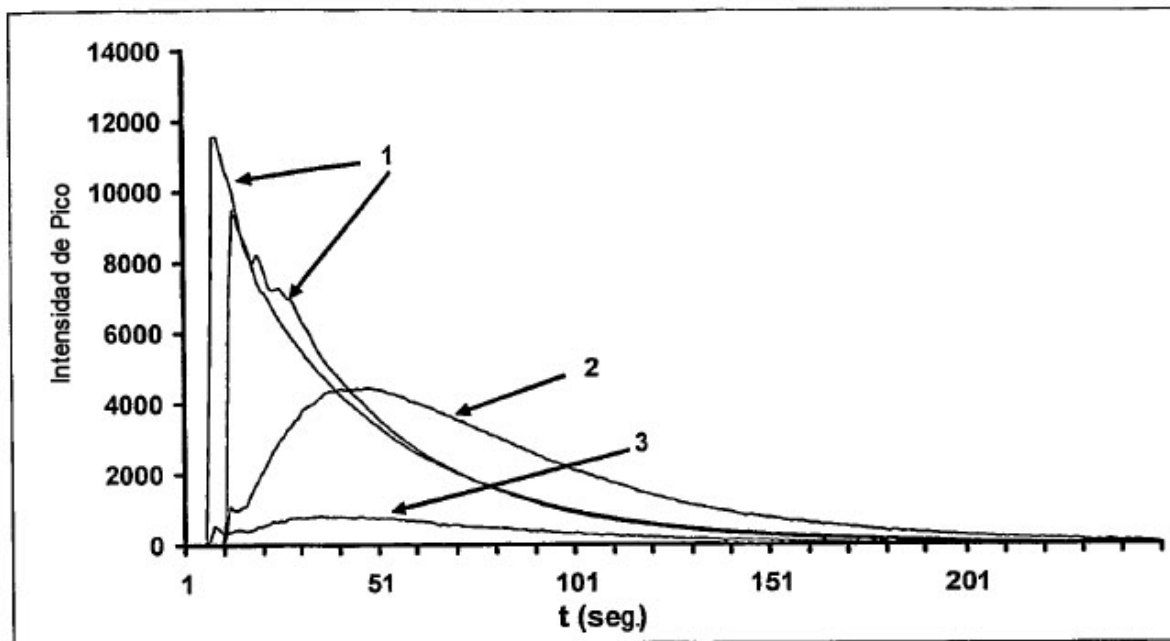
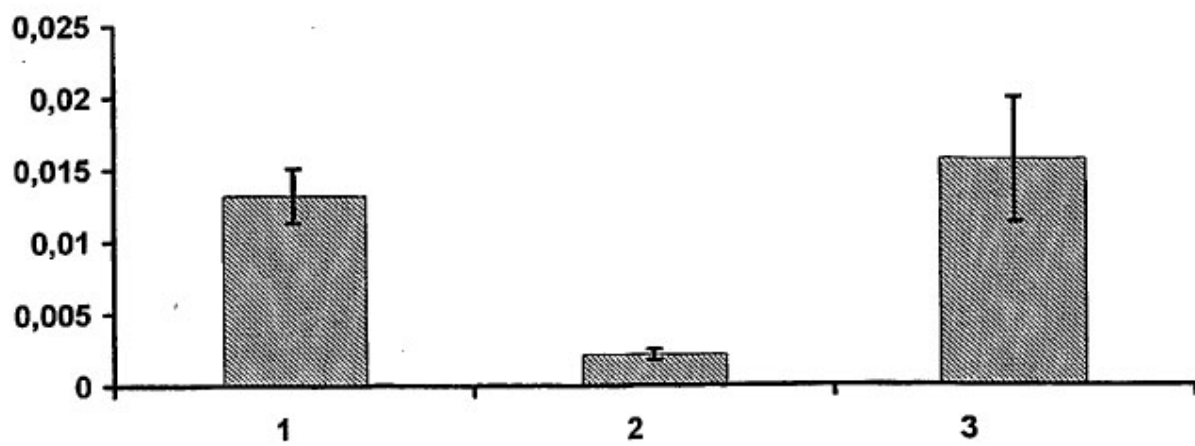


FIG. 2

Marcado con lactato (mM/seg.)



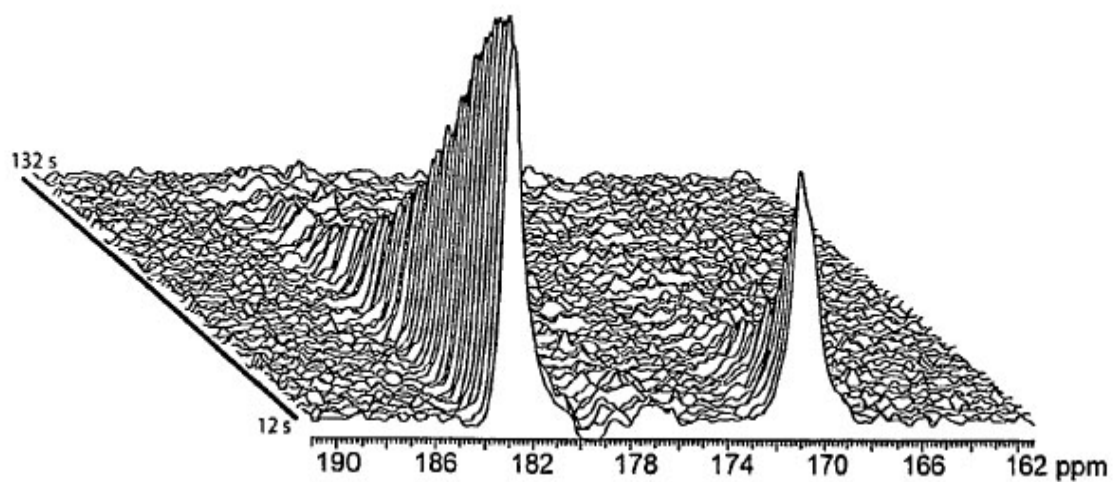


FIG. 3A

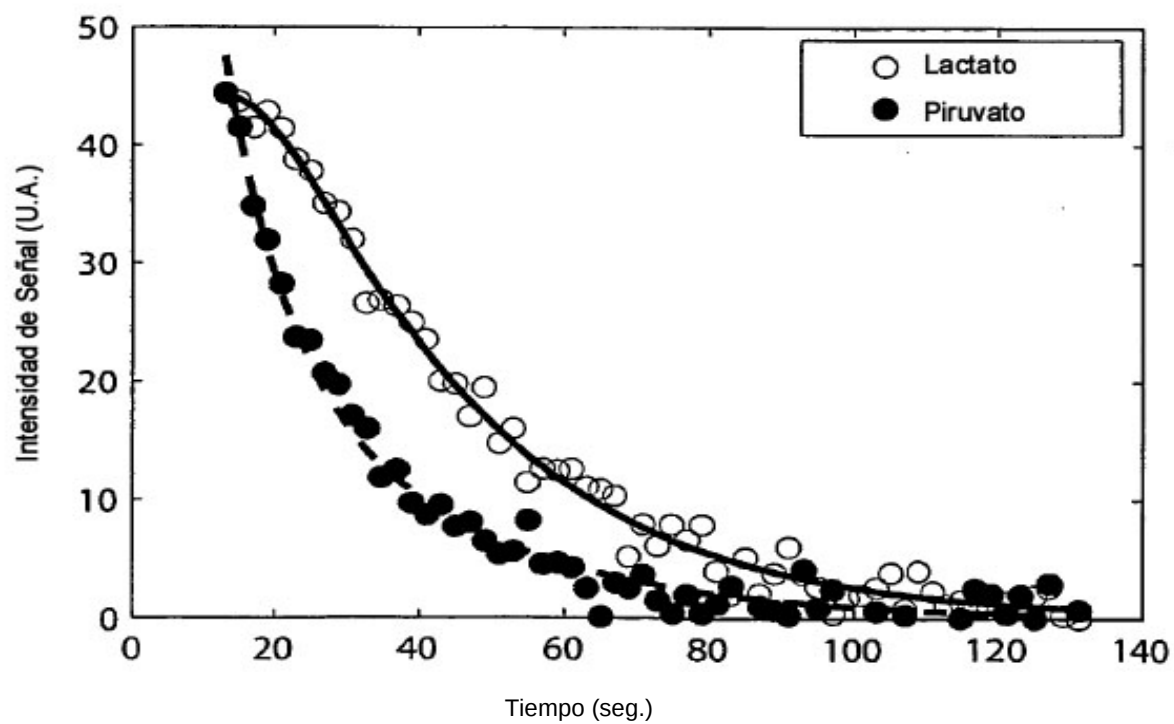


FIG. 3B

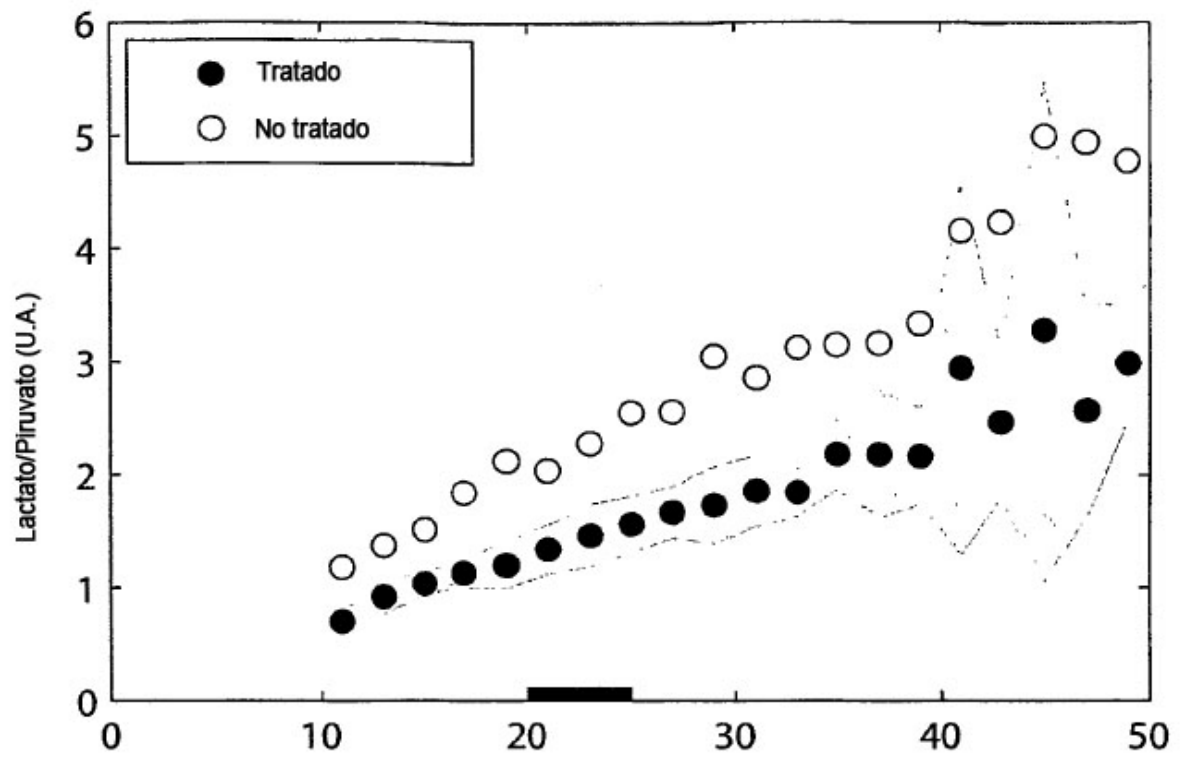


FIG. 3C