

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 724**

51 Int. Cl.:

A61K 49/06 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

C01B 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2017 E 17174204 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3251702**

54 Título: **Detección in vivo de una molécula jaula enlazante del xenón**

30 Prioridad:

03.06.2016 US 201662345098 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.04.2020

73 Titular/es:

**LAKEHEAD UNIVERSITY ECONOMIC
DEVELOPMENT AND INNOVATION OFFICE
(100.0%)
955 Oliver Road
Thunder Bay, ON P7B 5E1, CA**

72 Inventor/es:

**ALBERT, MITCHELL y
HANE, FRANCIS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 751 724 T3

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).

DESCRIPCIÓN

Detección *in vivo* de una molécula jaula enlazante del xenón

La invención se refiere a jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón para su uso como biosensores en la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) *in vivo* y especialmente a IRM de transferencia de saturación por intercambio químico de xenón hiperpolarizado (HiperCEST). Las jaulas supramoleculares para xenón son preferiblemente jaulas de cucurbiturilos. La invención se refiere además a un método de obtención de por resonancia magnética (IRM) *in vivo* que hace uso de las jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón de la invención.

Antecedentes de la invención

Los biosensores para la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) basados en un gas hiperpolarizado (HP) tienen el potencial de detectar concentraciones muy pequeñas de dianas moleculares en el cuerpo (1). Dichos biosensores deben ser capaces de visualizar una amplia gama de patologías desde el cáncer hasta la inflamación, basándose en al menos un biomarcador distinto (2). La sensibilidad extrema de estos biosensores es una combinación de la hiperpolarización de los gases nobles, tales como ^{129}Xe (3, 4), y la capacidad de las moléculas jaula para intercambiar rápidamente átomos de gas polarizados que pueden estar "saturados", lo que permite su detección mediante la aplicación del método de Transferencia de Saturación por Intercambio de Compuestos Químicos Hiperpolarizados (HiperCEST) (5, 6). La combinación de estas dos técnicas da como resultado un aumento de la relación señal-ruido de hasta 10^9 sobre el gas noble ^{129}Xe térmicamente polarizado (7).

Varios grupos han demostrado la síntesis de biosensores para la obtención de imágenes y los han probado *in vitro* (1, 8-10). Estos biosensores comprenden una molécula jaula que encapsula ^{129}Xe conjugada a una etiqueta de afinidad que puede unirse a una pequeña molécula de interés, como un ion o una proteína (2). Las moléculas jaula y las nanoestructuras adecuadas para HiperCEST que han sido estudiadas por RMN de ^{129}Xe incluyen criptófanos (1, 11-13), cucurbiturilos (14, 15), vesículas de gas (8), bromuro de perfluorooctilo (16) y esporas bacterianas (17). Los criptófanos se han conjugado con etiquetas de afinidad para unirse a dianas tales como zinc (9), iones metálicos tóxicos (10), células CD14 (7), el receptor HER2 asociado al cáncer (8), la metaloproteinas-7 de la matriz (Wei et al.: "Designing ^{129}Xe NMR biosensors for matrix metalloproteinase detection", J. Am. Chem. Soc. 2006, 128(49): 13274-13283), y el receptor periférico de benzodiazapeno que marca la inflamación (PBR) (18) entre otros (19-21). La traducción de experimentos *in vitro* a imágenes *in vivo* requiere superar una serie de retos, que incluyen la toxicidad potencial, la solubilidad y la despolarización rápida de ^{129}Xe en sangre (22-25). A pesar de los retos asociados con la relajación mejorada en la sangre, varios grupos han informado con éxito de otros sistemas tales como cultivos celulares (1, 8, 26-29) y el plasma sanguíneo (14, 30). Estos experimentos se completaron en espectrómetros de RM de alta resolución, campo pequeño, diámetro pequeño. Los experimentos de los presentes inventores se completaron utilizando un escáner clínico 3T RM de cuerpo entero, que es un buen augurio para la traducción clínica de esta técnica. Hane F. et al. (International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 22 de abril de 2016, No. 814) describen una detección por hiperCest *in vivo* de cucurbit[6]urilo en abdomen de rata en un entorno artificial, ya que la jaula de cucurbit [6]urilo se precargó *in vitro* con ^{129}Xe y el biosensor se detectó a continuación después de la inyección intraperitoneal en el abdomen sin una diana específica y sin aplicar la secuencia de pulsos de hiperCest o adquirir imágenes de RM con pulsos de control fuera de resonancia y pulsos de saturación en resonancia.

Los biosensores para la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) de xenón hiperpolarizado (HP) (4) tienen el potencial de proporcionar imágenes, de alta sensibilidad y alta resolución, de patologías dentro del cuerpo (8, 35). La base de estos biosensores para la obtención de imágenes es una molécula jaula, que actúa como un agente de contraste de IRM, que es un anfitrión supramolecular que puede encapsular reversiblemente un átomo de xenón HP huésped. Estas propiedades proporcionan un desplazamiento químico de la frecuencia de resonancia magnética (RM) único y detectable para el átomo de xenón dentro de la jaula (5, 36). En combinación con la hiperpolarización, que crea una polarización de espín nuclear de xenón mucho más allá de las condiciones de equilibrio térmico, estos biosensores tienen el potencial de proporcionar una mejora de la señal de hasta mil millones de veces por encima de la RM convencional del xenón (5), proporcionando así imágenes de RM de alta resolución con una sensibilidad similar a la Tomografía de Emisión de Positrones (TEP), aún con la resolución espacial de IRM. A pesar de esta promesa, los biosensores de xenón aún tienen que ser detectados dentro de un modelo animal vivo después de su administración intravenosa.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para la obtención de imágenes de resonancia magnética *in vivo* que comprende: inyectar en un individuo una solución que comprende jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón; mientras que se ventila a dicho individuo con una mezcla de gas oxígeno y gas xenón hiperpolarizado tal que el xenón en las jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón se intercambia con el gas xenón hiperpolarizado, formando de este modo jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón hiperpolarizado, teniendo dichas jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón hiperpolarizado una frecuencia de desplazamiento químico; aplicar un pulso a la frecuencia del desplazamiento químico, despolarizando de este modo el xenón en las jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón hiperpolarizado; generar una imagen de resonancia magnética de xenón en resonancia del individuo a la frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un pulso a una frecuencia fuera

de resonancia; generar una imagen de resonancia magnética de xenón fuera de resonancia del individuo a la frecuencia fuera de resonancia; y restar la imagen fuera de resonancia de la imagen en resonancia, obteniendo de este modo una imagen de la localización de las jaulas supramoleculares etiquetadas de xenón dentro del individuo.

5 Como se discute en la presente memoria, la obtención de imágenes puede ser de una región de interés del individuo, por ejemplo, un órgano específico o una porción de tejido. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

Las jaulas supramoleculares etiquetadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en jaulas de cucurbiturilos etiquetadas, jaulas de criptófanos etiquetadas, jaulas de calixararenos etiquetadas, jaulas de pillarenos etiquetadas, jaulas de rotaxanos etiquetadas y jaulas de pseudo-rotaxanos etiquetadas.

En algunas realizaciones, las jaulas supramoleculares marcadas son jaulas de cucurbiturilos etiquetadas.

10 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la obtención de imágenes de resonancia magnética *in vivo* que comprende: inyectar en un individuo una solución que comprende jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón; mientras que se ventila a dicho individuo con una mezcla de gas oxígeno y gas xenón hiperpolarizado tal que el xenón en las jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón se intercambia con el gas xenón hiperpolarizado, formando de este modo jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón hiperpolarizado, teniendo
15 dichas jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón hiperpolarizado una frecuencia de desplazamiento químico; aplicar un prepulso a la frecuencia de desplazamiento químico, despolarizando de este modo el xenón en las jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón hiperpolarizado; generar una imagen de resonancia magnética de xenón en resonancia del individuo a la frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un pulso a una frecuencia fuera de resonancia; generar una imagen de resonancia magnética de xenón fuera de resonancia del individuo a la frecuencia fuera de resonancia; y restar la imagen fuera de resonancia de la imagen en resonancia, obteniendo de este modo
20 una imagen de la localización de las jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón dentro del individuo.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - (Izquierda) La población de núcleos de Xe representados en rojo se hiperpolariza, de lo que se deriva que hay más núcleos en el estado de espín abajo que de espín arriba. La población de núcleos de Xe representados en azul está despolarizada (o saturada) y tiene un número aproximadamente igual de espines arriba y abajo. Espectro de RMN de ^{129}Xe de intercambio de Xe en cucurbit[6]urilo. El xenón disuelto en el plasma está representado por un pico a +191,4 ppm. El ^{129}Xe hiperpolarizado se intercambia continuamente entrando y saliendo del CB6 dando como resultado un pico Xe-CB6 a 124,3 ppm. El complejo xenón-glóbulo rojo está representado por un pico a +219,4 ppm. (Derecha) se aplica un pulso HiperCEST al pico Xe-CB6 de +124,3 ppm (-68 ppm del pico de xenón disuelto) correspondiente al desplazamiento químico del pico CB6. El xenón encapsulado por el CB6 se despolariza y se intercambia con el pozo de disolvente de xenón hiperpolarizado. Ahora se encuentran menos átomos de xenón hiperpolarizado en el pozo de disolvente, lo que resulta en una gran reducción en el pico de Xe disuelto a +191,4 ppm.

Figura 2 - Espectro de reducción HiperCEST de CB6 en sangre. Un mínimo local a +124,3 ppm indica una reducción de la señal del 74% cuando la solución se pulsa a +124,3 ppm, el desplazamiento químico del complejo xenón-CB6. Obsérvese una reducción casi completa de HiperCEST entre +180 ppm y +207 ppm, que corresponde al xenón disuelto en el plasma.

Figura 3 - Reducción de HiperCEST de CB6 en función de la concentración de CB6 en sangre completa de bovino. Se observó una reducción de HiperCEST del 80% a 2,5 mM. Esta reducción se redujo al 14% a 250 μM . Se observó un efecto de reducción de HiperCEST a una concentración de CB6 de 10 μM .

Figura 4: (A) Una imagen control de eco de gradiente de 2D fuera de resonancia de CB6 2,5 mM en sangre. Dentro del FOV (campo de visión), el círculo izquierdo es una jeringa de 30 mL que contiene CB6 en una solución de sangre. El círculo derecho es una jeringa que contiene sólo la solución de sangre, pero no CB6. Ambas jeringas contienen cantidades iguales de ^{129}Xe HP. Los dos semicírculos en la parte inferior de la imagen son artefactos de desplazamiento químico del xenón en fase gaseosa presente en la jeringa. (B) La misma configuración que (A) pero una adquisición de imagen tomada después de pre-pulsos de saturación de RF en resonancia en el desplazamiento químico de Xe-CB6 (124,3 ppm). (C) Un mapa de saturación HiperCEST de la imagen B sustraída de la imagen A y dividiendo cada píxel entre la imagen de control (A) fuera de resonancia.

Figura 5. A) El xenón se polariza utilizando el Bombeo Óptico con Intercambio de Espín (BOIS). En BOIS, el xenón fluye hacia una cámara que contiene vapor de gas rubidio en presencia de un campo magnético. Un láser sintonizado a la transición D del Rb excita al rubidio. El Xe que colisiona con el Rb da como resultado un intercambio de espín, por lo que una mayor proporción de átomos de Xe están en el estado de espín de menor energía (rojo). B) La solución de CB6 se inyecta intravenosamente en la vena de la cola y se deja distribuir biológicamente. C) La rata se ventila mecánicamente con una mezcla de xenón 80%/ oxígeno 20%. La rata inhala el gas Xe HP que entra en la red vascular a través de los pulmones. El Xe HP interactúa con la jaula de CB6, difundiéndose hacia dentro y hacia fuera de la jaula. D) Se aplica un prepulso de saturación HiperCEST a la frecuencia del desplazamiento químico del complejo Xe-CB6 (124,3 ppm), despolarizando el Xe en la jaula (azul). Debido al intercambio, esto da como resultado una reducción de la señal en el reservorio disuelto. E) Durante la toma de imágenes, se aplica un pulso de RF en el desplazamiento químico de Xe-CB6, despolarizando solo el Xe dentro de la jaula de CB6. A medida que el xenón despolarizado se

intercambia saliendo de la jaula de CB6, se reduce el conjunto de átomos de Xe (rojo) polarizados (detectables). La reducción de la señal de RM en comparación con una señal de control indica la presencia de jaulas de CB6.

5 Figura 6- Espectros e imágenes de RM del abdomen de una rata Sprague-Dawley después de la inyección IV de 3 mL de solución de CB6 10 mM. A) Decaimiento libre de la inducción (FID) adquirida después de la aplicación de un prepulso fuera de resonancia (control) a +260,3 ppm. B) FID adquirido después de la aplicación de un pulso HiperCEST en resonancia a +124,3 ppm. Obsérvese la reducción en la RSR del pico primario que indica una reducción HiperCEST. C) Una imagen de ^1H RM de Turbo Espín Eco del localizador del abdomen. D) Una imagen de 2D de RM de eco de gradiente (GE) de Xe después de la aplicación de un prepulso fuera de resonancia (+260,3 ppm). E) Igual que D) pero después de un prepulso de saturación HiperCEST en resonancia (+124,3), que destruye la polarización de Xe en la jaula de CB6. A medida que estos átomos de Xe despolarizados salen de la jaula, reducen el conjunto de Xe polarizado en la sangre, reduciendo de este modo la señal de RM. F) Un mapa de saturación construido restando, píxel por píxel, la imagen HiperCEST en resonancia de la imagen de control fuera de resonancia y dividiendo entre la imagen de control fuera de resonancia. Esto mide la reducción de la señal e indica la localización de la molécula de la jaula CB6.

15 Figura 7- Espectros e imágenes de RM del cerebro de una rata Sprague-Dawley después de la inyección IV de 3 mL de solución de CB6 10 mM. Las leyendas para todos los paneles son idénticas a la Figura 6, pero en el cerebro en lugar del abdomen.

20 Figura 8 - A) Mapa de saturación HiperCEST de un abdomen de rata superpuesto en una imagen de ^1H RM que muestra la localización del agente de contraste de la jaula CB6. Se observa acumulación en el corazón, pulmones, aorta, riñones y vejiga. B) Igual que A) pero del cerebro de rata. Se observa una señal fuerte en el cerebro y una señal bilateral más débil desde la musculatura o desde las arterias carótidas.

Descripción de las realizaciones preferidas

25 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica o prueba de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

30 En este documento se demuestra el primer ejemplo de la detección *in vivo* de un agente de contraste de IRM de un gas HP usando IRM de ^{129}Xe mejorada con HiperCEST, de la molécula jaula cucurbit[6]urilo (CB6), dentro de la red vascular de una rata viva. Al hacer que la rata respire gas xenón, que se disuelve en la sangre e interactúa con las jaulas de CB6 inyectadas que circulan en la red vascular, se pudo detectar con éxito la presencia de CB6 en el cerebro, corazón, aorta, arterias carótidas, riñones y finalmente se produjo su aclaramiento renal en la vejiga. Estos resultados traducen esta técnica desde estudios *in vitro* a estudios preclínicos y, por lo tanto, al uso clínico. Este trabajo demuestra la viabilidad de emplear biosensores de IRM de gases HP como un posible reemplazo de las imágenes PET debido a su superior resolución, fácil síntesis, menor costo y ausencia de radiación ionizante. Los resultados de este documento formarán la base para el desarrollo de biosensores de imágenes dirigidos que pueden detectar áreas específicas de patologías dentro del cuerpo utilizando IRM de xenón HP. Estos resultados se traducen en una detección más temprana de patologías específicas y proporcionan seguimiento del tratamiento en estudios longitudinales.

35 La técnica de IRM de Transferencia de Saturación por Intercambio Químico de Xenón Hiperpolarizado (HiperCEST) multiplica la mejora de la señal de la hiperpolarización de ^{129}Xe (37) con la mejora de la señal de intercambio químico producida por la secuencia de pulsos CEST IRM (5). Este método aprovecha la difusión continua de átomos de xenón HP hacia dentro y hacia fuera de la molécula jaula, lo que proporciona un desplazamiento químico único de la frecuencia de los átomos de xenón HP disueltos en solución. Se aplica un prepulso de saturación HiperCEST a la frecuencia del desplazamiento químico del xenón dentro de la molécula jaula, despolarizando de este modo los átomos de xenón. A medida que los átomos de xenón despolarizados salen de la molécula jaula por intercambio, son reemplazados por átomos polarizados del reservorio de átomos de ^{129}Xe disueltos en solución. Esto da como resultado una disminución de los núcleos polarizados en el reservorio de xenón en la fase disuelta, reduciendo de este modo su señal. Al restar la señal HiperCEST en resonancia de la señal de control fuera de resonancia se obtiene una mejora de la señal de hasta 4 órdenes de magnitud por encima de la mejora de la señal que ofrece el proceso de hiperpolarización (5). Similarmente, en la obtención de las imágenes, al restar la imagen de control de xenón fuera de resonancia de la imagen saturada, pulsada y en resonancia, se puede crear un mapa de saturación HiperCEST, que muestra la localización de las moléculas jaula. Conjugando la molécula jaula con una etiqueta de afinidad, se puede crear un biosensor para la obtención imágenes por RM de xenón HP que puede localizar espacialmente áreas de patología (7, 8, 26, 35).

55 En este trabajo se adquieren espectros de RMN de ^{129}Xe , reducción HiperCEST, imágenes de RM y mapas de saturación de imágenes HiperCEST de una molécula jaula CB6 dentro de la red vascular de una rata viva. Se demuestra una nueva secuencia pulsada de prepulso de saturación que puede superar algunos de los retos potenciales asociados con los biosensores de ^{129}Xe HP. Estos desarrollos demuestran que puede usarse en animales una amplia variedad de moléculas jaula y biosensores de imágenes propuestos.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de obtención de imágenes de resonancia magnética *in vivo* que comprende: inyectar en un individuo una solución que comprende jaulas supramoleculares etiquetadas; mientras que se ventila a dicho individuo con una mezcla de gas oxígeno y gas xenón hiperpolarizado tal que el xenón en las jaulas supramoleculares etiquetadas de xenón se intercambia con el gas xenón hiperpolarizado, formando de este modo jaulas supramoleculares etiquetadas de xenón hiperpolarizado, teniendo dichas jaulas supramoleculares etiquetadas de xenón hiperpolarizado una frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un pulso a la frecuencia de desplazamiento químico, despolarizando de este modo el xenón en las jaulas supramoleculares etiquetadas de xenón hiperpolarizado; generar una imagen de resonancia magnética de xenón en resonancia del individuo a la frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un pulso a una frecuencia fuera de resonancia; generar una imagen de resonancia magnética de xenón fuera de resonancia del individuo a la frecuencia fuera de resonancia; y restar la imagen fuera de resonancia de la imagen en resonancia, obteniendo de este modo una imagen de la localización de las jaulas supramoleculares etiquetadas de xenón dentro del individuo.

En algunas realizaciones, las jaulas supramoleculares etiquetadas son jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón.

Como se discute en la presente memoria, la obtención de imágenes puede ser de una región de interés del individuo, por ejemplo, un órgano específico o una porción de tejido. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método de obtención de imágenes de resonancia magnética *in vivo* que comprende: inyectar en un individuo una solución que comprende jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón; mientras que se ventila a dicho sujeto con una mezcla de gas oxígeno y gas xenón hiperpolarizado de manera que el xenón en las jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón se intercambia con el gas xenón hiperpolarizado, formando de este modo jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón hiperpolarizado, teniendo dichas jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón hiperpolarizado una frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un prepulso a la frecuencia del desplazamiento químico, despolarizando de este modo el xenón en las jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón hiperpolarizado; generar una imagen de resonancia magnética de xenón en resonancia del individuo a la frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un pulso a una frecuencia fuera de resonancia; generar una imagen de resonancia magnética de xenón fuera de resonancia del individuo a la frecuencia fuera de resonancia; y restar la imagen fuera de resonancia de la imagen en resonancia, obteniendo de este modo una imagen de la localización de las jaulas de cucurbiturilos etiquetadas para xenón dentro del individuo.

Como apreciará un experto en la técnica, el individuo puede ser un sujeto humano. Además, la obtención de imágenes puede ser de todo el cuerpo del individuo o puede ser de una región específica del cuerpo, por ejemplo, una región específica de tejido o un tipo de tejido o un órgano o miembro específico o área vascular o similar.

El cucurbiturilo puede ser cualquier cucurbiturilo adecuado conocido en la técnica (14, 15). Por ejemplo, el cucurbiturilo puede ser, pero de ninguna manera limitarse a, cucurbit[6]urilo, cucurbit[7]urilo, cucurbit[8]urilo, cucurbit[9]urilo, o cucurbit[10]urilo. En algunas realizaciones, el cucurbiturilo es cucurbit[6]urilo o CB6.

Alternativamente, dentro de la invención se pueden usar otras jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón, tales como, por ejemplo, pero de ninguna manera limitadas a, criptófanos, calixerenos, liposomas, ciclodextrinas, vesículas de gas, bromuro de perfluorooctilo, esporas bacterianas y virus. Específicamente, como apreciará un experto en la técnica, dentro de la invención puede usarse cualquiera de estos tipos de jaula que no sean tóxicas para el individuo que está siendo fotografiado.

Como se usa en el presente documento, una "etiqueta" se refiere a cualquier molécula que pueda unirse a una pequeña molécula de interés, tal como un ion, proteína o similar. Por ejemplo, la "etiqueta" puede ser una etiqueta de afinidad, un anticuerpo, un ligando u otro compuesto adecuado similar para interactuar con o unirse a una diana específica.

Como sabrán los expertos en la técnica, se encontró que una serie de agentes de contraste HiperCEST anteriores ensayados, incluidos los criptófanos, tenían efectos tóxicos cuando se ensayaron *in vivo*. Como apreciarán los expertos en la técnica, es muy difícil predecir de antemano qué moléculas no serán tóxicas debido a la complejidad de las interacciones *in vivo*.

Además, CB6 también podría haber sido ineficaz *in vivo*. Por ejemplo, CB6 podría no haberse disuelto en solución o separarse en la sangre por precipitación o disociarse en la sangre, haciendo de este modo que CB6 sea inútil para obtener imágenes *in vivo*.

Aún más, es posible que la intensidad del campo de RF pudiera no haber sido lo suficientemente fuerte para despolarizar las moléculas de xenón en la jaula o que no se hubiera generado suficiente señal del xenón en el cuerpo debido a la despolarización a causa de la interacción con el gas oxígeno.

En algunas realizaciones, es una mezcla de no más que aproximadamente 80% de xenón y al menos aproximadamente 20% de oxígeno. Como será evidente para los expertos en la técnica, el uso de menos que 20% de oxígeno podría potencialmente asfixiar al sujeto.

En otras realizaciones, la mezcla puede ser de aproximadamente 70 a aproximadamente 80% de xenón y

aproximadamente 20 a aproximadamente 30% de oxígeno.

Como será evidente para un experto en la técnica, dentro del alcance de la invención se puede usar una amplia variedad de condiciones de pulso, específicamente, condiciones de pulso HiperCEST. Por ejemplo, el pulso puede ser un tren de pulsos o continuo o una onda o una onda continua o cualquier otra disposición adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones de la invención, el prepulso es un tren de prepulsos de dieciséis pulsos sinc de 3 lóbulos de 6 ms con intervalos entre pulsos de 3 ms.

Como será apreciado por un experto en la técnica, la frecuencia específica del desplazamiento químico de una jaula etiquetada específica de cucurbituril-xenón puede depender de varios factores, por ejemplo, el cucurbiturilo específico utilizado, así como la etiqueta usada para la construcción de la jaula. Sin embargo, la frecuencia específica del desplazamiento químico para una construcción de jaula dada se puede determinar fácilmente usando los métodos descritos en este documento. Además, una amplia variedad de frecuencias fuera de resonancia es adecuada para ser utilizada dentro de la invención, como será fácilmente evidente para un experto en la técnica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el pulso en resonancia activa puede aplicarse a +215 ppm y el pulso fuera de resonancia puede aplicarse a +124,3 ppm.

Como será evidente para un experto en la técnica, se requerirían dosis proporcionalmente mayores de cucurbiturilos para obtener imágenes en seres humanos. Dichas dosis dependerán, por supuesto, de muchos factores, que incluyen, pero de ninguna manera se limitan a, la edad, el peso, la altura y el estado general del individuo. Además, se mantiene que dicha optimización es una experimentación de rutina y está dentro del alcance de la invención. Si desear ligarse a ninguna teoría o hipótesis particular, los inventores creen que, por ejemplo, serían adecuados aproximadamente 10 mL de cucurbiturilo por kilogramo de peso corporal del paciente humano y aproximadamente 1 L de xenón.

Combinando las moléculas jaula activas en RM con un anticuerpo u otra etiqueta de afinidad como agente de direccionamiento, se crearía un biosensor para la obtención imágenes de RM de xenón HP para localizar espacialmente áreas de patología dentro del cuerpo. Tales biosensores proporcionan el soporte basado en imágenes para la medicina personalizada. La medicina personalizada y la radiología de precisión requieren modalidades de imágenes especializadas que proporcionan los biomarcadores de imágenes (39). Estos biomarcadores de imágenes permiten la estratificación de los pacientes de acuerdo con sus características fenotípicas, que es un requisito de la medicina personalizada.

Por ejemplo, podrían usarse anticuerpos que se sabe que se unen a antígenos específicos relacionados con el cáncer como la etiqueta dentro de la invención para el diagnóstico en etapa temprana de ciertos cánceres. Alternativamente, a modo de ilustración, la "etiqueta" podría ser serotonina, que se unirá a áreas de aterosclerosis, o tioflavina que se une a áreas de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro o desoxiglucosa para la detección del cáncer. Por supuesto, otras etiquetas adecuadas para usar en la obtención de imágenes *in vivo* serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

En la actualidad, la obtención de imágenes moleculares en tejido profundo se ha restringido principalmente a PET y SPECT; sin embargo, estas modalidades tienen una serie de inconvenientes significativos. Además, ambos requieren grandes inversiones de capital en forma de escáneres y ciclotrones dedicados para producir radioisótopos. Si bien el equipo de polarización no es barato, es menos caro que el equipo PET (40). Lo más significativo es que la IRM de xenón HP es capaz de una resolución espacial mucho más alta que la obtención de imágenes por PET, lo que hace posible la localización de pequeñas lesiones. Los escáneres de PET dependen de la resolución espacial de los escáneres de CT o de IRM para la localización anatómica; la IRM de xenón HP tiene la capacidad de obviar esa necesidad. Además, dado que no se utiliza ninguna radiación ionizante, los estudios de obtención de imágenes mediante biosensores de IRM con un gas HP se pueden realizar más frecuentemente que las técnicas de obtención de imágenes moleculares basadas en ionización.

Con la demostración *in vivo* de un agente de contraste para IRM de biosensores de xenón HP, el desarrollo y la demostración *in vivo* exitosa de biosensores de IRM de gases HP dirigidos que pueden obtener imágenes de enfermedades localizadas en el conjunto de organismos vivos es una predicción sólida.

La invención se ilustrará ahora adicionalmente por medio de ejemplos; sin embargo, la invención no se limita necesariamente a los Ejemplos.

En una solución de CB6 2,5 mM disuelta en sangre y PBS, se observó un pico a +192,4 ppm con respecto al pico del xenón en fase gaseosa, el cual corresponde al xenón disuelto en plasma sanguíneo (Figura 1, panel izquierdo). Adicionalmente, se observó un pico correspondiente al CB6 que encapsula al xenón a +124,3 ppm (Figura 1, panel izquierdo). Se observó un pico a +219,4 ppm que corresponde al ^{129}Xe unido a los glóbulos rojos (GR) (Figura 1). Después de la aplicación de un tren pulsado de prepulsos de saturación de dieciséis pulsos sinc de 3 lóbulos de 6 ms con intervalos entre pulsos de 3 ms a +124,3 ppm, se adquirió el espectro de RMN de ^{129}Xe mostrado en la Figura 1. Después de un prepulso de saturación HiperCEST, se observó una gran reducción (84%) en la señal de xenón en la fase disuelta que indica el intercambio de polarización desde el CB6 hacia adentro y hacia afuera de las moléculas de la jaula CB6.

Se continuó recolectando espectros HiperCEST mediante la aplicación de prepulsos de saturación a frecuencias que

se compensaron con respecto a las frecuencias de los picos de CB6. La reducción de la señal para cada frecuencia de compensación de prepulsos de saturación se muestra en el espectro de reducción de HiperCEST mostrado en la Figura 2. Obsérvese una alta reducción de la señal correspondiente al CB6 y al pico de xenón-plasma a +191,4 ppm con menor reducción a medida que la frecuencia de prepulso de saturación se aplica más lejos de estos picos. Se observa un mínimo local a +124,3 ppm, que corresponde al desplazamiento químico del complejo CB6/Xe.

Inicialmente, se planteó la hipótesis de que se observaría una reducción de HiperCEST cuando se aplicaran pulsos de saturación en el pico de los GR debido al intercambio entre el conjunto de xenón disuelto y el xenón unido a los GR. Algo contrarintuitivamente, no se observó este efecto. Bifone et al. calcularon una velocidad de intercambio Xe-GR de 50 s^{-1} (22), que es considerablemente más lenta que el intercambio Xe-CB6 de 1470 s^{-1} (14). Este intercambio más lento podría ser la razón por la cual no se pudo observar una reducción de HiperCEST cuando el pico de los GR estaba saturado.

Se hicieron diluciones en serie del CB6/sangre de la presente invención y se midió la reducción de HiperCEST en función de la concentración. Se ensayaron concentraciones de hasta $10 \mu\text{M}$ de CB6 en sangre. Se midió un efecto HiperCEST del 14% a una concentración de $250 \mu\text{M}$ (Figura 3). La reducción de HiperCEST fue medible hasta $10 \mu\text{M}$.

Se obtuvieron imágenes de RM de dos jeringas dentro del mismo campo de visión: una llena con una solución de CB6 en sangre, la otra con solo una solución de sangre y sin moléculas de CB6 (Figura 4). La señal del plasma, la fase gaseosa y el xenón unido a los GR está presente en la imagen de control (Figura 4A). Se observó un artefacto de desplazamiento químico en fase gaseosa, compensado por 43 píxeles de $67,1 \text{ mm}$. Adicionalmente, se observó una señal más fuerte en fase gaseosa en la solución control (jeringa derecha) que en la jeringa de CB6 (jeringa izquierda). Este fenómeno se atribuyó a las diferencias en el grado de formación de espuma en sangre entre las dos soluciones. La solución de control produjo más espuma que la solución de CB6, que proporcionó un reservorio de xenón hiperpolarizado gaseoso para intercambiar con el xenón disuelto en el plasma proporcionando una señal xenón-plasma más fuerte. Una vez que se aplicó un tren de prepulsos de saturación (Figura 4B), hubo una reducción casi completa de la señal de xenón en la fase disuelta. Se produjo un mapa de saturación (Figura 4C) normalizando cada imagen mediante su propio ruido de fondo y restando la imagen de control fuera de resonancia de la imagen de saturación HiperCEST y normalizando píxel por píxel la imagen fuera de resonancia. La intensidad del color en el mapa de saturación es proporcional a la cantidad de reducción de la señal que se ha producido como resultado del prepulso de HiperCEST. El mapa de saturación muestra una fuerte reducción de la señal HiperCEST de CB6. La jeringa control no muestra ninguna reducción y en el mapa de saturación se indica como una "señal" ausente.

Se preparó una solución 10 mM de la molécula jaula CB6 disuelta en PBS 1X (pH 7,2). Se inyectaron 3 mL de la solución de CB6 en el catéter de la vena de la cola de una rata Sprague-Dawley y se dejó que se distribuyera biológicamente durante 30 minutos. Se colocó quirúrgicamente un tubo endotraqueal en la rata anestesiada, y la rata se ventiló con oxígeno al 100% usando un ventilador hecho a medida. La rata se colocó en una bobina de RF de rata de cuerpo entero hecha a medida. Cinco segundos antes de la adquisición de la imagen de RM de xenón, la rata fue ventilada con una mezcla de gases de xenón 80%/oxígeno 20%. Se adquirieron espectros de resonancia magnética (ERM) de decaimiento libre de la inducción (FID) (Figs. 5 y 6, A&D) tanto del abdomen como de la cabeza de la rata. El espectro de RM del abdomen reveló tres picos resolubles a +184 ppm, +192,5 ppm y +207 ppm con respecto a la frecuencia del desplazamiento químico del ^{129}Xe en fase gaseosa (referenciada a 0 ppm) (Figura 6A). No se observó un pico correspondiente al pico ^{129}Xe -CB6, como se informó anteriormente (10). Esto se atribuyó a una variedad de efectos de susceptibilidad y de ensanchamiento de línea que ocurren *in vivo*. Al aplicar un pre-pulso HiperCEST a la frecuencia de desplazamiento químico conocida de ^{129}Xe -CB6 (+124,3 ppm) (38), se adquirió un espectro de RM con una reducción del 86% en la intensidad de la señal en comparación con el espectro de control fuera de resonancia (Figura 6D). Se repitió esta técnica después de que la rata se colocara en una bobina de RF de cabeza de rata hecha a medida (Figuras 7A y D). Al aplicar un pre-pulso HiperCEST (+124,3 ppm), se observó una reducción del 38% en la intensidad de la señal de RM del cerebro de la rata.

Se obtuvo un espectro de reducción HiperCEST de CB6 dentro del abdomen y del cerebro de la rata mediante la recopilación de una serie de espectros FID a varias compensaciones de frecuencias de desplazamientos químicos con prepulsos de saturación en resonancia. La rata se ventiló con la mezcla de xenón/oxígeno y se adquirieron espectros FID secuenciales con prepulsos de saturación fuera de y en resonancia. El espectro de reducción HiperCEST indicó una reducción HiperCEST máxima a -66 ppm.

A continuación, se adquirieron imágenes de ^1H RM de turbo espín eco (TSE) para correlacionar la señal del xenón con su localización anatómica. Inmediatamente antes de la adquisición de la imagen de ^{129}Xe , la rata fue ventilada con xenón como se describió anteriormente. La secuencia de obtención de imágenes comenzó con un prepulso de saturación que constaba de dieciséis pulsos sinc de 3 lóbulos de 20 ms con un intervalo entre pulsos de 3 segundos aplicado a las frecuencias del desplazamiento químico en resonancia (+215 ppm) y fuera de resonancia (+124,3 ppm). Las imágenes de eco de gradiente (EG) de ^{129}Xe se adquirieron con prepulsos de saturación en resonancia y fuera de resonancia (Figuras 6 y 7, B y E). Las imágenes de RM fuera de resonancia revelaron la distribución de xenón en todas las áreas de la anatomía de la rata que se sabe que tienen altas velocidades de perfusión, como el cerebro, la aorta, los riñones, los pulmones y el corazón (Figuras 6 y 7B). Al aplicar los pulsos de saturación HiperCEST, se observó una reducción de la señal en áreas que contenían las moléculas de CB6 (Figuras 6 y 7E). Restando las imágenes de control en resonancia de las imágenes de HiperCEST fuera de resonancia (Figuras 6 y 7F), y registrando

las imágenes ^1H del localizador (Figuras 6 y 7C), se tomaron imágenes selectivamente de las áreas de las moléculas de CB6 que estaban localizadas en el cerebro, corazón, pulmones, aorta, arterias carótidas y riñones (Figura 8). Curiosamente, también se observó una mejora débil de la señal de HiperCEST desde la vejiga de la rata (Figura 8A). Esta observación apoya la hipótesis de que CB6 es excretada por los riñones y termina en la orina contenida en la vejiga. También se creó un mapa de saturación HiperCEST en el cerebro de la rata (Figura 8B).

Se calculó la TAE (tasa de absorción específica) de esta secuencia de pulsos y se obtuvo una TAE de 0,025 W/kg, que está muy por debajo del límite TAE de la FDA de 4 W/kg.

Este trabajo es el primer informe para obtener datos por HiperCEST de una molécula jaula que encapsula xenón en sangre completa y dentro de la red vascular de una rata viva.

10 Experimental

Preparación de la muestra

Se preparó una solución 2,5 mM de cucurbit[6]urilo (CB6) disolviendo 50 mg de CB6 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) en 10 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X a pH 7,2 a temperatura ambiente. La mezcla se agitó suavemente. Se mezclaron diez mL de la solución de CB6-PBS con 10 mL de sangre fresca de bovino con citrato (Cederlane, Burlington CA) dentro de una jeringa de 30 mL para crear una solución de CB6 2,5 mM en una solución de sangre. La muestra de control se preparó de manera idéntica a la solución de CB6, excepto que se omitió el CB6. La muestra de control contenía 10 mL de PBS y 10 mL de sangre de bovino.

Se hicieron diluciones en serie de CB6 en sangre añadiendo una cantidad apropiada de sangre a la solución madre 2,5 mM.

20 Espectros de RMN de ^{129}Xe

Se polarizó al 30% gas ^{129}Xe usando un polarizador Xemed (Xemed, Durham, NH). Se introdujeron en la jeringa 7,5 mL de gas ^{129}Xe HP durante 5 s desde la bolsa Tedlar en la cámara de presión que se presurizó a 20,69 kPa (3 psi) por encima de la presión atmosférica. La solución y el gas se mezclaron agitando la jeringa durante aproximadamente 12 s. Aproximadamente 3 mL de ^{129}Xe disuelto en el disolvente de sangre/PBS, el ^{129}Xe no disuelto restante se expulsó de la jeringa, produjeron una concentración de ^{129}Xe efectiva de 7,5 mM. El procedimiento se repitió para cada adquisición espectral para el espectro de reducción HiperCEST. La jeringa de 30 mL que contenía la solución de CB6-sangre se colocó dentro de una bobina de RF personalizada sintonizada a la frecuencia Larmor del ^{129}Xe (35,33 MHz) a 3T. Se utilizó un escáner clínico Philips Achieva 3T para adquirir todos los espectros de RMN y las imágenes de RM. Se registró el decaimiento libre de la inducción (FID) y se observó el desplazamiento químico del complejo $^{129}\text{Xe}/\text{CB6}$. Ref B₁ es un parámetro de los escáneres RM de Philips y se utiliza para calcular la longitud del pulso de RF. El escáner utiliza la longitud del pulso y el ángulo de giro para determinar la amplitud del pulso de RF y la intensidad del campo. Para estos experimentos, el escáner estableció una intensidad de campo B₁ de 1,18 μT . Para los espectros e imágenes de RMN, se aplicó un tren pulsado de prepulsos de saturación, que constaba de 16 pulsos de 6 ms de 3 lóbulos sinc con intervalos entre pulsos de 3 ms, fuera de la resonancia +124,3 ppm del pico de fase gaseosa que corresponde al desplazamiento químico del Complejo CB6-Xe. Para las mediciones iniciales del decaimiento de HiperCEST, se recogieron los espectros de control con un pre-pulso de saturación fuera de resonancia de 258 ppm. Se registró el espectro de decaimiento HiperCEST midiendo el decaimiento HiperCEST a varias compensaciones de desplazamiento desde el pico CB6/Xe. Se recolectó un mínimo de 3 espectros en cada desplazamiento químico y se representó gráficamente el decaimiento medio de la señal en función de la frecuencia de la compensación del desplazamiento químico. La relación señal-ruido (RSR) de cada espectro se calculó utilizando MATLAB (MathWorks, Natick MA). Los valores de decaimiento de la señal debidos al efecto HiperCEST se midieron restando la RSR del espectro de saturación HiperCEST de la RSR del espectro de control y dividiendo entre la RSR del control.

Preparación de la rata

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité para el Cuidado de Animales de la Universidad de Lakehead. Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley ($n = 6$) (Charles River, Sherbrook QC) que pesaban entre 300-400 g usando 4 LPM de isoflurano hasta que su reflejo corneal desapareció. Una vez que las ratas estuvieron anestesiadas, se colocó un catéter en la vena de la cola y se inició una infusión intravenosa (IV) de propofol (45 mg/kg/h). Se insertó un segundo catéter en la vena de la cola (en la segunda vena de la cola) para el acceso IV.

Se realizó una incisión en la línea media en el cuello de la rata y se localizó la tráquea. Se realizó una incisión semi circunscrita de 1 mm en la tráquea y se insertó un catéter endotraqueal en la tráquea. El cuello fue cerrado por suturación. El tubo endotraqueal se conectó a un ventilador hecho a medida y la rata se colocó en oxígeno a 60 respiraciones por minuto con un volumen corriente de 5 mL. Se midió una Presión de Expiración Final Positiva de 20 mbar.

Se inyectaron 3 mL de solución de CB6 10 mM durante 2 minutos en el catéter de la vena de la cola.

55 Se colocaron las ratas dentro de una bobina de RF Birdcage personalizada de doble sintonización ($^1\text{H}/^{129}\text{Xe}$) con un

diámetro de 80 mm.

Después de la adquisición de datos, las ratas fueron sacrificadas por inyección IV de pentobarbital.

Obtención de imágenes por resonancia magnética

5 Se utilizó un escáner clínico Philips Achieva 3T para adquirir todos los espectros de RM y las imágenes de RM. El gas ^{129}Xe se polarizó al 30% usando un polarizador Xemed (Xemed, Durham, NH).

El campo magnético del escáner Philips Achieva 3T se reflejó en la señal de ^1H usando un fantasma de aceite mineral de aproximadamente el mismo tamaño que la rata para corregir las faltas de homogeneidad B_0 con el fin de mejorar la resolución espectral de las adquisiciones.

10 Se obtuvieron imágenes multicorte 1H turbo espín eco (TSE) ponderadas en T2 (TR = 2 s, TE = 1,67 ms, ángulo de giro de 12 grados, espesor de corte de 2 mm) localizadas en el espacio intraperitoneal de la rata con un campo de visión de 150 mm x 150 mm y un tamaño de matriz de 256 x 256, que dieron una resolución en el plano de 0,586 mm.

15 30 minutos después de la inyección de CB6, el ventilador se ajustó para dispensar xenón a la rata. Se proporcionó un período de lavado con xenón de 5 segundos, seguido por la administración de una mezcla de xenón 80%/oxígeno 20% durante la exploración de RM. Se obtuvieron imágenes de eco de gradiente 2D de xenón con un campo de visión de 150 mm x 150 mm con un tamaño de matriz de 64 x 64 y una resolución en el plano de 2,34 mm, TR = 197 ms, TE = 1,67 ms, un ángulo de giro de 40 grados, ancho de banda 300 Hz/píxel. Como se indicó anteriormente, los prepulsos de saturación de resonancia y de fuera de resonancia (+124,3 ppm y +260,3 ppm, respectivamente) se aplicaron como parte de la secuencia de impulsos de adquisición. Se proporcionó un período de espera de 5 minutos entre las imágenes en resonancia y fuera de resonancia para asegurar que todo el gas xenón se había eliminado del torrente sanguíneo. Para algunas adquisiciones, las imágenes con prepulsos de saturación fuera de resonancia se aplicaron primero, seguidas de las imágenes con prepulsos de saturación en resonancia. En otras adquisiciones, las imágenes con prepulsos de saturación en resonancia se aplicaron primero. Esto se hizo para tener en cuenta un posible efecto de orden para asegurar que realmente se estaba midiendo la despolarización de Xe debido a los prepulsos de saturación y no la despolarización del xenón con el tiempo. Las imágenes fueron recolectadas y analizadas utilizando MATLAB. Se aplicó un filtro de convolución que consistía en una matriz de 5x5 que se aproxima a una distribución gaussiana con un factor de normalización para mantener la intensidad de la señal. Las imágenes fueron umbralizadas para capturar toda la señal de xenón disuelto en la sangre. Los mapas de saturación se produjeron comparando imágenes de ^{129}Xe fuera de resonancia y en resonancia. El ruido de la señal de fondo fue segmentado y eliminado para mayor claridad de la imagen usando una máscara para todas las imágenes.

20

25

30 Los mapas de saturación HiperCEST se superpusieron en la imagen de ^1H usando el software de procesamiento de imágenes GIMP.

Espectros de reducción de HiperCEST

35 30 minutos después de la inyección de CB6, el ventilador se ajustó para dispensar continuamente a la rata una mezcla de xenón 80%/oxígeno 20%. Después de un período de lavado de 15 segundos, se adquirieron espectros de decaimiento libre de la inducción de ^{129}Xe (FID) con prepulsos de saturación fuera de y en resonancia (16x20 ms, intervalo de pulso de 5 ms, pulso de 3 lóbulos sinc) en una variedad de compensaciones de desplazamientos químicos. Para eliminar la posibilidad de los efectos de orden, se alternó el orden de adquisición fuera de resonancia y en resonancia. La relación señal/ruido (RSR) de cada espectro se calculó utilizando MATLAB. Se calculó la reducción de HiperCEST en cada compensación de desplazamiento químico y se representó gráficamente utilizando Microsoft Excel.

40

Simulaciones de la tasa de absorción específica (TAE)

45 Se colocaron cuatro bolsas de solución salina de 1 L en una bobina para cabezas de doble sintonización ^1H - ^{129}Xe (Clinical MR Solutions LLC, Brookfield WI) para simular una cabeza de ser humano. Se aplicaron pulsos de presaturación sinc de 3 lóbulos y de adquisición de eco de gradiente. Se midieron P_{for} y P_{rev} y se calculó la potencia promedio, P_{avg} . La TAE se calculó dividiendo P_{avg} entre 4 kg, el peso medio de una cabeza de ser humano.

REFERENCIAS

1. Stevens T, K, Palaniappan M, Ramirez M, Francis D, Wemmer and A, Pines
HyperCEST Detection of a ^{129}Xe -Based Contrast Agent Composed of Cryptophane-
A Molecular Cages on a Bacteriophage Scaffold. *Magn. Reson. Med.* 2013; 69: 1245–
5 1252.
2. Spence M, S, Rubin I, Dimitrov E, Ruiz D, Wemmer A, Pines S, Yao F, Tian
and P, Schultz Functionalized xenon as a biosensor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98:
10654–10657.
3. Walker T, and W, Happer Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei.
10 *Rev. Mod. Phys.* 1997; 69: 629–642.
4. Albert M,S, G,D, Cates B, Driehuys W, Happer B, Saam C,S, Springer and A,
Wishnia Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized ^{129}Xe . *Nature.*
1994; 370: 199–201.
5. Schröder L, T, Lowery C, Hilty D, Wemmer and A, Pines Molecular Imaging
15 Using a Targeted Magnetic Resonance Hyperpolarized Biosensor. *Science.* 2006;
314: 446–449.
6. Kunth M, C, Witte A, Hennig and L, Schroder Identification, classification, and
signal amplification capabilities of high-turnover gas binding hosts in ultra-sensitive
NMR. *Chem. Sci.* 2015; .
- 20 7. Rose H,M, C, Witte F, Rossella S, Klippel C, Freund and L, Schröder
Development of an antibody-based , modular biosensor for ^{129}Xe NMR molecular
imaging of cells at nanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014; 111:
11697–11702. DOI: 10.1073/pnas.1406797111.
8. Shapiro M,G, R,M, Ramirez L,J, Sperling G, Sun J, Sun A, Pines D, V Schaffer
25 and V,S, Bajaj Genetically encoded reporters for hyperpolarized xenon magnetic
resonance imaging. *Nat. Chem.* 2014; 6: 629–634. DOI: 10.1038/nchem.1934.
9. Kotera N, N, Tassali E, Léonce C, Boutin P, Berthault T, Brotin J,P, Dutasta L,
Delacour T, Traoré D,A, Buisson F, Taran S, Coudert and B, Rousseau A sensitive
zinc-activated ^{129}Xe MRI probe. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2012; 51: 4100–4103.
30 DOI: 10.1002/anie.201109194.
10. Tassali N, N, Kotera Y, Boulard B, Rousseau E, Dubost T, Brotin J, Dutasta
and P, Berthault Smart Detection of Toxic Metal Ions, Pb^{2+} and Cd^{2+} , Using a ^{129}Xe
NMR-Based Sensor. *Anal. Chem.* 2014; 86: 1783–1788.
11. Chaffee K,E, H, a. Fogarty T, Brotin B,M, Goodson and J,-P,P, Dutasta
35 Encapsulation of small gas molecules by cryptophane-111 in organic solution. 1. Size-
and shape-selective complexation of simple hydrocarbons. *J. Phys. Chem. A.* 2009;
113: 13675–13684. DOI: 10.1021/jp903452k.
12. Mynar J,L, T,J, Lowery D,E, Wemmer A, Pines and J,M,J, Fréchet Xenon
biosensor amplification via dendrimer-cage supramolecular constructs. *J. Am. Chem.*
40 *Soc.* 2006; 128: 6334–5. DOI: 10.1021/ja061735s.
13. Bai Y, P,A, Hill and I,J, Dmochowski Utilizing a water-soluble cryptophane with
fast xenon exchange rates for picomolar sensitivity NMR measurements. *Anal. Chem.*
2012; 84: 9935–41. DOI: 10.1021/ac302347y.
14. Wang Y, and I, Dmochowski Cucurbit[6]uril is an ultrasensitive ^{129}Xe NMR
45 contrast agent. *Chem. Commun.* 2015; 51: 8982–8985. DOI: 10.1039/C5CC01826A.

15. Schnurr M, J, Sloniec-Myszk J, Döpfert L, Schröder and A, Hennig Supramolecular Assays for Mapping Enzyme Activity by Displacement-Triggered Change in Hyperpolarized (^{129}Xe) Magnetization Transfer NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2015; 54: 13444–7. DOI: 10.1002/anie.201507002.
- 5 16. Stevens T,K, R,M, Ramirez and A, Pines Nanoemulsion contrast agents with sub-picomolar sensitivity for xenon NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 2013; 135: 9576–9579. DOI: 10.1021/ja402885q.
17. Bai Y, Y, Wang M, Goulian A, Driks and I,J, Dmochowski Bacterial spore detection and analysis using hyperpolarized ^{129}Xe chemical exchange saturation transfer (Hyper-CEST) NMR. *Chem. Sci.* 2014; 5: 3197–3203. DOI: 10.1039/b000000x/Bai.
- 10 18. Dowhos K,M, M,S, Fox I,K, Ball T, Li G, Gajawada J, Wentzell B, DeBoef and M,S, Albert Enhanced ^{129}Xe Hyper-CEST Efficiency Using PK11195 Functionalized Cryptophane-A. *Int. Soc. Magn. Reson. Med. Annu. Meet.* 2014; In: International Society for Magnetic Resonance in Medicine Annual Meeting. . p. 3537.
- 15 19. Wang Y, B,W, Roose J,P, Philbin J,L, Doman and I,J, Dmochowski Programming A Molecular Relay for Ultrasensitive Biodetection through ^{129}Xe NMR. *Angew. Chemie.* 2015; : n/a–n/a. DOI: 10.1002/ange.201508990.
- 20 20. Riggle B,A, Y, Wang and I,J, Dmochowski A “Smart” ^{128}Xe NMR Biosensor for pH-Dependent Cell Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* 2015; 137: 5542–8. DOI: 10.1021/jacs.5b01938.
21. Seward G,K, Y, Bai N,S, Khan and I,J, Dmochowski Cell-compatible, integrin-targeted cryptophane-(^{129}Xe) NMR biosensors. *Chem. Sci.* 2011; 2: 1103–1110. DOI: 10.1039/C1SC00041A.
- 25 22. Bifone A, Y,Q, Song R, Seydoux R,E, Taylor B,M, Goodson T, Pietrass T,F, Budinger G, Navon and A, Pines NMR of laser-polarized xenon in human blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93: 12932–12936.
23. Wolber J, A, Cherubini a S, Dzik-Jurasz M,O, Leach and A, Bifone Spin-lattice relaxation of laser-polarized xenon in human blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 30 1999; 96: 3664–3669.
24. Albert M,S, D, Balamore D, Kacher A, Venkatesh and F, Jolesz Hyperpolarized ^{129}Xe T1 in oxygenated and deoxygenated blood. *NMR Biomed.* 2000; 13: 407–414.
25. Albert M, D, Kacher D, Balamore A, Venkatesh and F, Jolesz T1 of (^{129}Xe) in blood and the role of oxygenation. *J. Magn. Reson.* 1999; 140: 264–273. DOI: 35 10.1006/jmre.1999.1836.
26. Witte C, V, Martos H,M, Rose S, Reinke S, Klippel L, Schröder and C, Hackenberger Angewandte Live-cell MRI with Xenon Hyper-CEST Biosensors Targeted to Metabolically Labeled Cell-Surface Glycans. 2015; : 2806–2810. DOI: 10.1002/anie.201410573.
- 40 27. Klippel S, J, Döpfert J, Jayapaul M, Kunth F, Rossella M, Schnurr C, Witte C, Freund L, Schröder J, Döpfert J, Jayapaul M, Kunth F, Rossella M, Schnurr C, Witte C, Freund and L, Schroder Cell tracking with caged xenon: Using cryptophanes as MRI reporters upon cellular internalization. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2014; 53: 493–496. DOI: 10.1002/anie.201307290.
- 45 28. Schnurr M, K, Sydow H,M, Rose M, Dathe and L, Schröder Brain Endothelial

- Cell Targeting Via a Peptide-Functionalized Liposomal Carrier for Xenon Hyper-CEST MRI. 2015; : 40–45. DOI: 10.1002/adhm.201400224.
29. Boutin C, A, Stopin F, Lenda T, Brotin J,P, Dutasta N, Jamin A, Sanson Y, Boulard F, Leteurtre G, Huber A, Bogaert-Buchmann N, Tassali H, Desvaux M, Carrire and P, Berthault Cell uptake of a biosensor detected by hyperpolarized ^{129}Xe NMR: The transferrin case. *Bioorganic Med. Chem.* 2011; 19: 4135–4143. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.05.002.
- 5 30. Hill P,A, Q, Wei R,G, Eckenhoff and I,J, Dmochowski Thermodynamics of Xenon Binding to Cryptophane in Water and Human Plasma Thermodynamics of Xenon Binding to Cryptophane in Water and Human. *Biopolymers.* 2007; : 9262–9263. DOI: 10.1021/ja072965p.
- 10 31. Kunth M, C, Witte and L, Schröder Continuous-wave saturation considerations for efficient xenon depolarization. *NMR Biomed.* 2015; 28: 601–606. DOI: 10.1002/nbm.3307.
- 15 32. Alon L, C,M, Deniz R, Brown D,K, Sodickson and Y, Zhu Method for in situ characterization of radiofrequency heating in parallel transmit MRI. *Magn. Reson. Med.* 2013; 69: 1457–1465.
33. Tseng C, S, Peled L, Nascimben E, Oteiza R, Walsworth and F, Jolesz NMR of laser-polarized ^{129}Xe in blood foam. *J. Magn. Reson.* 1997; 126: 79–86.
- 20 34. Meldrum T, V,S, Bajaj D,E, Wemmer and A, Pines Band-selective chemical exchange saturation transfer imaging with hyperpolarized xenon-based molecular sensors. *J. Magn. Reson.* 2011; 213: 14–21. DOI: 10.1016/j.jmr.2011.06.027.
35. Khan, N. S., Riggle, B. A., Seward, G. K., Bai, Y. & Dmochowski, I. J. Cryptophane-Folate Biosensor for ^{129}Xe NMR. *Bioconjug. Chem.* **26**, 101–109 (2015).
- 25 36. Bartik, K., Luhmer, M., Dutasta, J. P., Collet, A. & Reisse, J. ^{129}Xe and ^1H NMR study of the reversible trapping of xenon by cryptophane-A in organic solution. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 784–791 (1998).
37. Happer, W. Optical Pumping. *Rev. Mod. Phys.* 44, 169–240 (1972).
- 30 38. Hane, F. et al. HyperCEST Detection of Cucurbit[6]uril in Whole Blood Using an Ultrashort Saturation Pre-pulse Train. *Contrast Media Mol. Imaging* (2016).
39. Radiology, E. S. of. Medical imaging in personalised medicine: a white paper of the research committee of the European Society of Radiology (ESR). *Insights Imaging* 6, 141–155 (2015).
- 35 40. Keppler, J. & S, C. P. A Cost Analysis of Positron Emission Tomography. *Pract. Radiol.* 177, 31–40 (2001).

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de imágenes por resonancia magnética *in vivo*, que comprende: inyectar en un individuo una solución que comprende jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón; mientras que se ventila a dicho individuo con una mezcla de gas oxígeno y gas xenón hiperpolarizado tal que el xenón en las jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón se intercambia con el gas xenón hiperpolarizado, formando de este modo jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón hiperpolarizado, teniendo dichas jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón hiperpolarizado una frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un pulso a la frecuencia del desplazamiento químico, despolarizando de este modo el xenón en las jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón hiperpolarizado; generar una imagen de resonancia magnética de xenón en resonancia del individuo a la frecuencia del desplazamiento químico; aplicar un pulso a una frecuencia fuera de resonancia; generar una imagen de resonancia magnética de xenón fuera de resonancia del individuo a la frecuencia fuera de resonancia; y restar la imagen fuera de resonancia de la imagen en resonancia, obteniendo de este modo una imagen de la localización de las jaulas supramoleculares etiquetadas para xenón dentro del individuo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que las jaulas supramoleculares etiquetadas se seleccionan del grupo que consiste en: jaulas de cucurbiturilos etiquetadas, jaulas de criptófanos etiquetadas o jaulas de calixararenos etiquetadas.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el cucurbiturilo se selecciona del grupo que consiste en: cucurbit[6]urilo, cucurbit[7]urilo, cucurbit[8]urilo, cucurbit[9]urilo, and cucurbit[10]urilo; y preferiblemente es cucurbit[6]urilo (CB6).
4. El método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla de gas oxígeno y gas xenón hiperpolarizado es no más que aproximadamente xenón al 80% y al menos aproximadamente oxígeno al 20%.
5. El método según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla es xenón de aproximadamente 70 a aproximadamente 80% y oxígeno de aproximadamente 20 a aproximadamente 30%.
6. El método según las reivindicaciones 3 a 5, en el que la jaula supramolecular es una jaula de cucurbit[6]urilo (CB6) y el pulso a la frecuencia del desplazamiento químico se aplica a +124,3 ppm.
7. El método según las reivindicaciones 3 a 6, en el que la jaula supramolecular es una jaula de cucurbit[6]urilo (CB6) y el pulso a la frecuencia fuera de resonancia se aplica a +215 ppm.

Figura 1

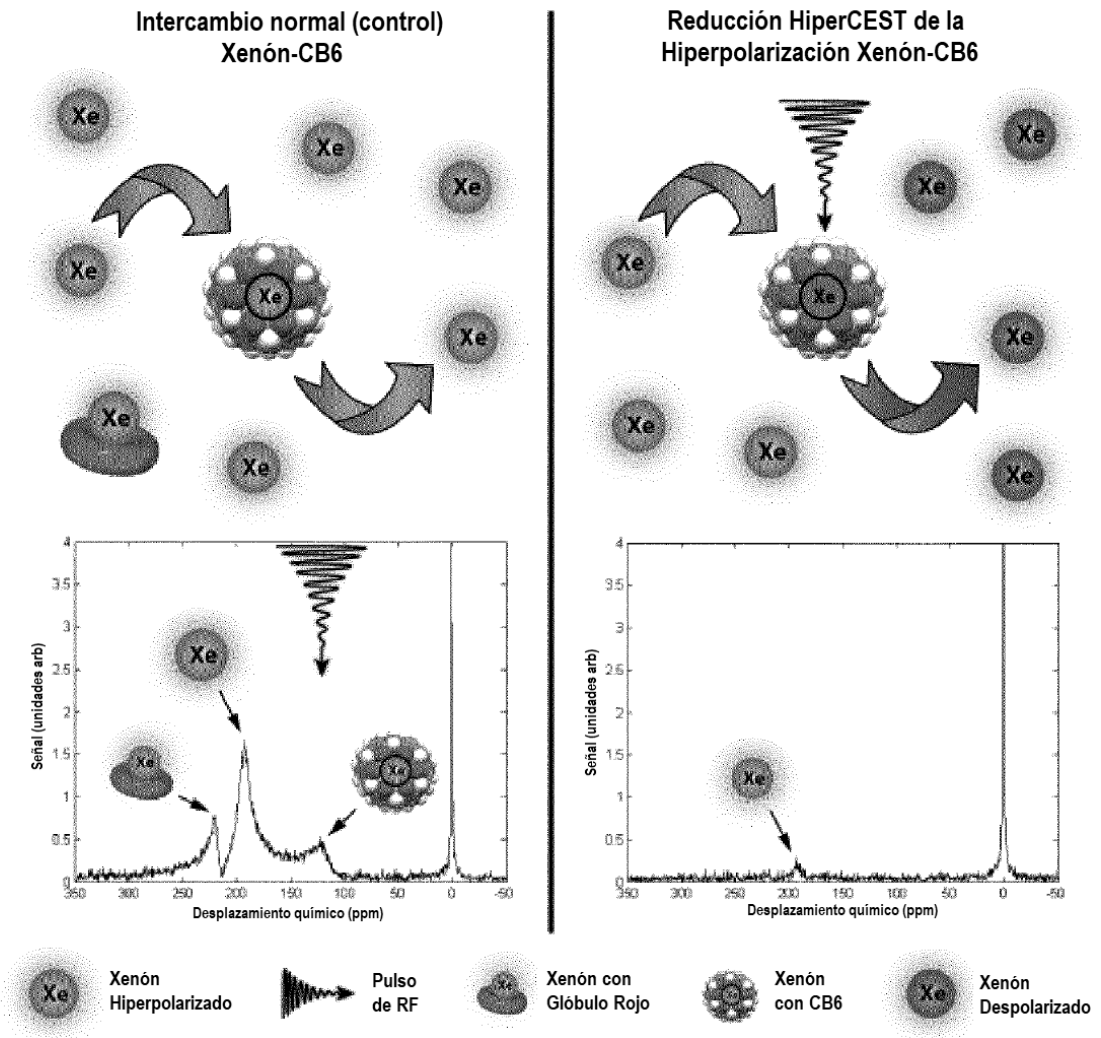


Figura 2

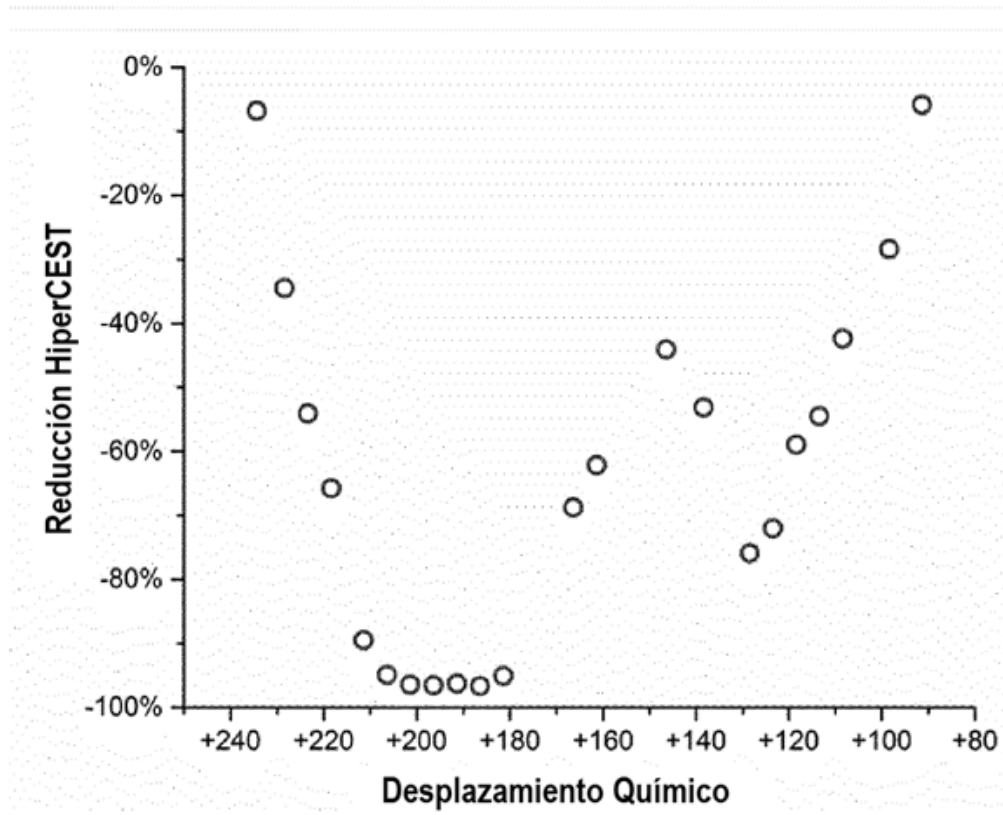


Figura 3

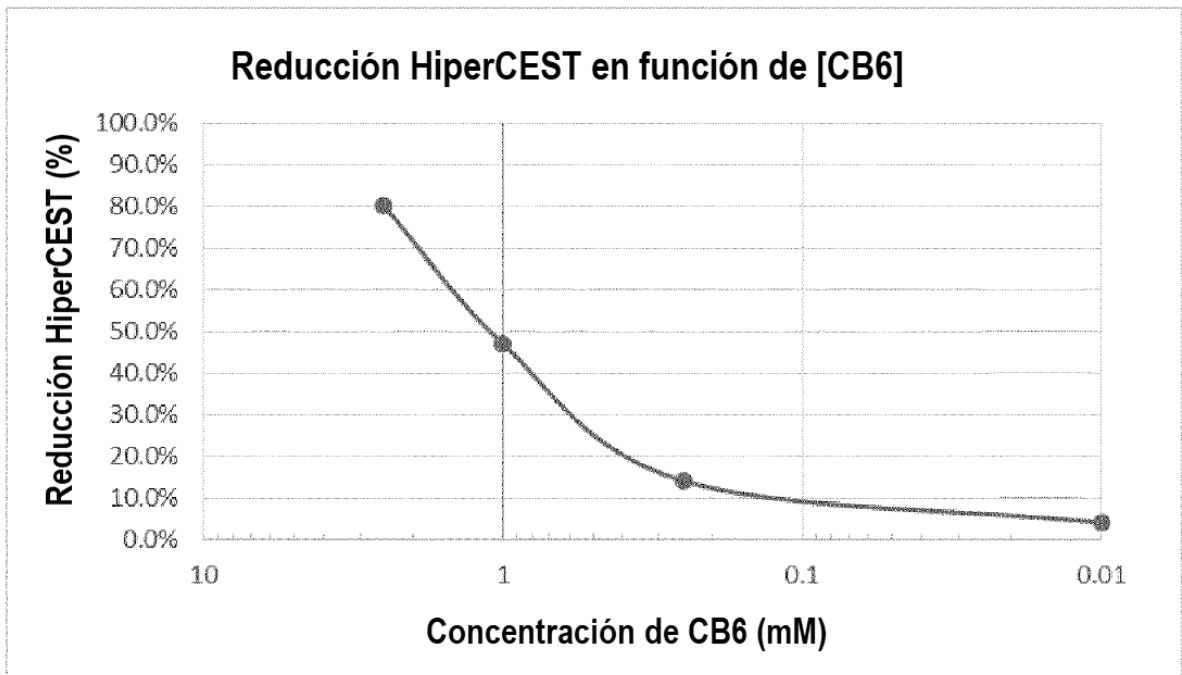


Figura 4

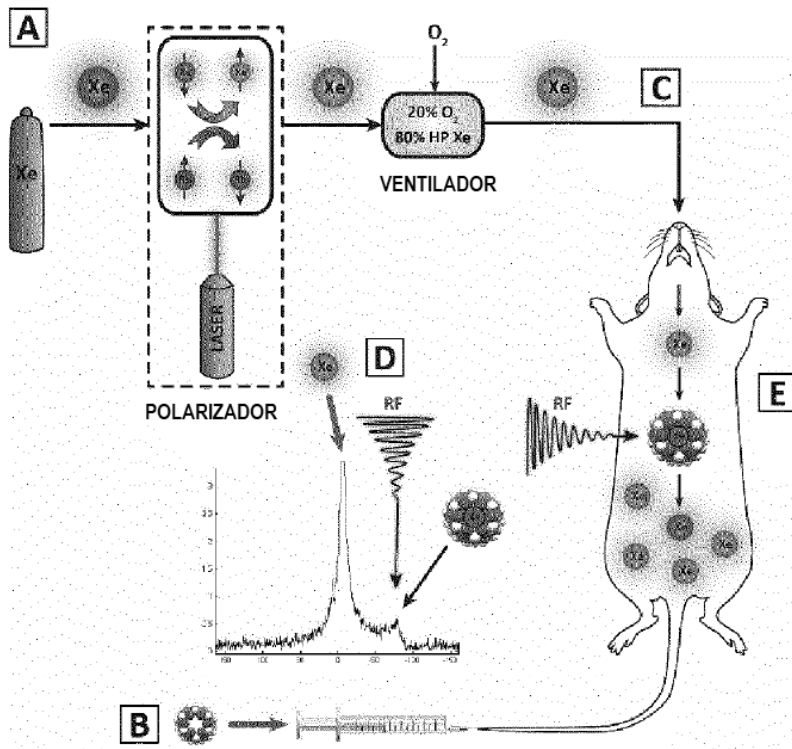


Figura 5

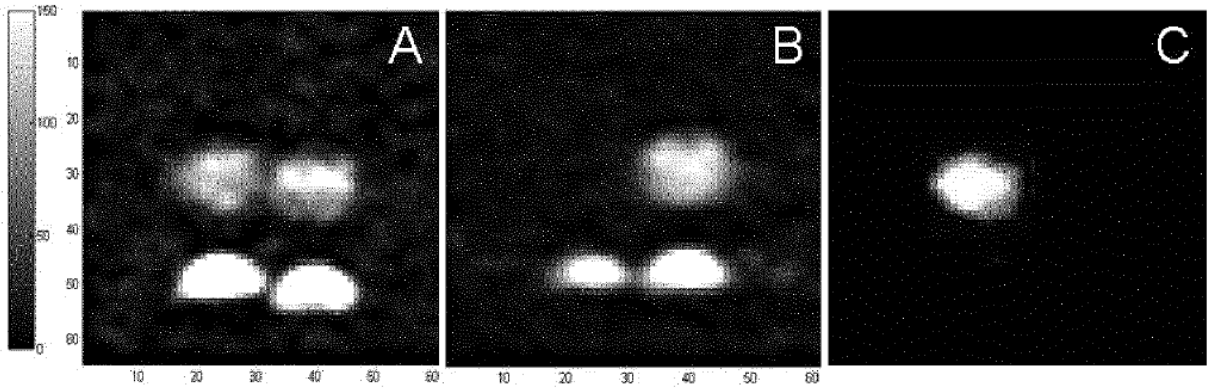


Figura 6

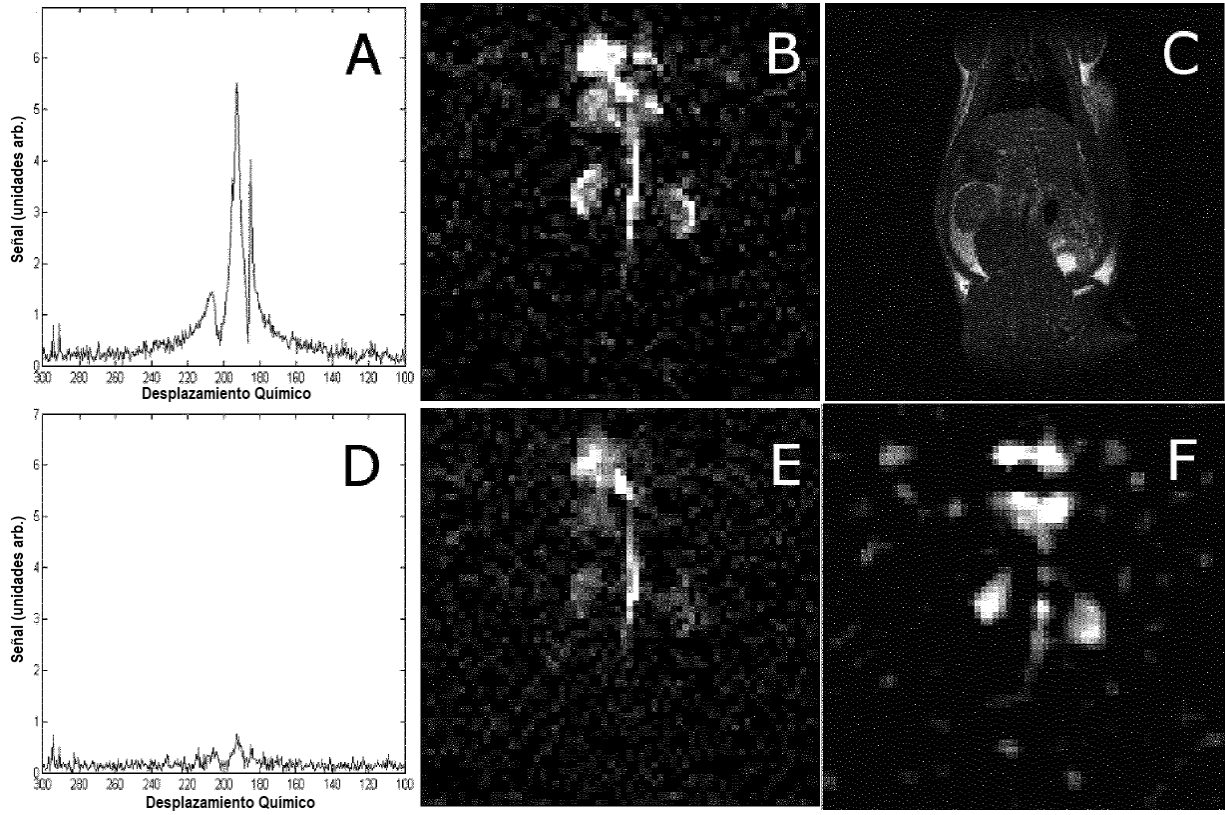


Figura 7

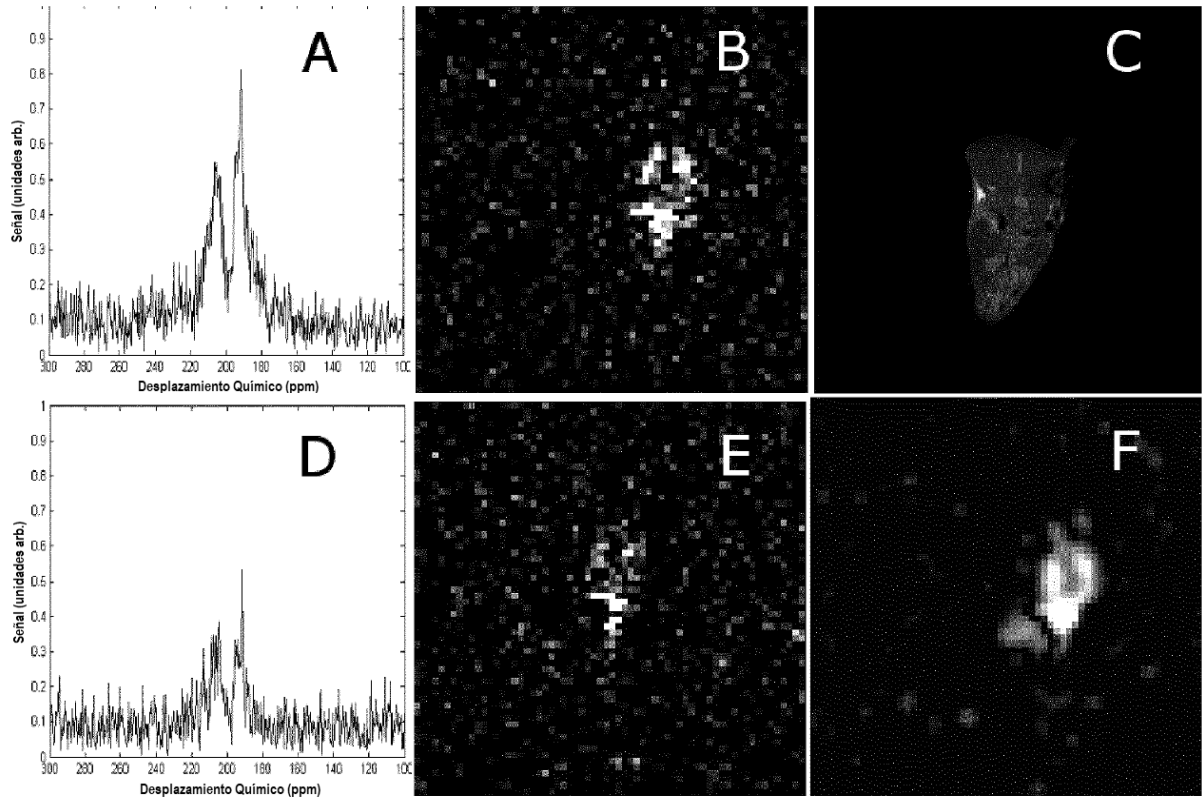


Figura 8

