



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

A61B5/055 (2006.01)

A61K49/06 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 09.02.2015 - действует  
Пошлина: учтена за 10 год с 19.11.2014 по 18.11.2015

(21), (22) Заявка: **2007118383/14, 18.11.2005**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**18.11.2005**(30) Конвенционный приоритет:  
**19.11.2004 NO 20045058**(43) Дата публикации заявки: **27.12.2008**(45) Опубликовано: **10.06.2010**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: de ROOS A et al. *Magnetic resonance techniques for assessment of myocardial viability*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1996; 28 Suppl 1, p.37-44. WO 9935508 A1, 15.07.1999. СЕВЕРИН Е.С. Биохимия. - М.: ГЭОТАР-МЭД, 2003, с.291, 340-343. GOULD P., C-13 MR tracers show potential for functional diagnostics. June 2004 [он-лайн] [Найдено 2009.05.12] найдено изИнтернет: <http://www.diagnosticimaging.com/molecularimagingoutlook/2004jun/04.jhtm>. GOLMAN K. et al. *Molecular imaging using hyperpolarized 13C*, *BRITISH JOURNAL OF RADIOLOGY*.

**BRITISH INSTITUTE OF RADIOLOGY. LONDON. GB, vol. 76, № 2, 2003, p.118-1.**

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
**19.06.2007**(86) Заявка РСТ:  
**NO 2005/000434 20051118**(87) Публикация РСТ:  
**WO 2006/054903 20060526**

Адрес для переписки:  
**191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ", пат.пов.**

**А.В.Поликарпову, рег. № 9**

(72) Автор(ы):  
**ЛЕРКЕ Матильде (DK),  
ЗАНДТ Рене (SE),  
ГОЛЬМАН Клаэс (DK),  
ТАНИНГ Миккель (SE),  
АРДЕНКЪЯЭР-ЛАРСЕН Ян-Хенрик (DK),  
ПЕТЕРСОН Стефан (SE)**

(73) Патентообладатель(и):  
**Джи-И Хелткер АС (NO)**

## (54) СПОСОБ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СЕРДЦА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИПЕРПОЛЯРИЗОВАННОГО <sup>13</sup>C-ПИРУВАТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и предназначено для оценки жизнеспособности ткани миокарда. Получают прямые <sup>13</sup>C-MР изображения <sup>13</sup>C-пирувата и его <sup>13</sup>C-содержащих метаболитов аланина, лактата и возможно бикарбоната у субъекта, которому предварительно введена композиция, содержащая гиперполяризованный <sup>13</sup>C-пируват. Проводят коррелирование <sup>13</sup>C сигнала метаболита с <sup>13</sup>C сигналом любого другого обнаруженного метаболита для получения контраста на основе разницы интенсивности сигналов двух, предпочтительно трех, наиболее предпочтительно четырех <sup>13</sup>C метаболитов. Способ позволяет идентифицировать подверженную риску ткань миокарда. 12 з.п. ф-лы, 2 ил.

Изобретение относится к способу визуализации сердца с использованием гиперполяризованного <sup>13</sup>C-пирувата в качестве МР визуализирующего агента, позволяющему определять жизнеспособность клеток в миокарде.

Магнитно-резонансная (МР) визуализация (МРВ) представляет собой метод визуализации, который стал особенно привлекательным для врачей, поскольку он позволяет получать изображения организма пациентов или его частей неинвазивным способом, не подвергая пациента и медицинский персонал воздействию потенциально опасного излучения, такого как рентгеновское излучение. Благодаря высокому качеству изображений, МРВ является предпочтительным методом визуализации мягких тканей и органов, например сердца.

Связанные с ишемией повреждения и заболевания сердца являются причиной большинства смертельных случаев в западных странах. Ишемия миокарда представляет собой серьезное состояние, и только ранняя быстрая идентификация и локализация ишемии миокарда может предотвратить развитие необратимых повреждений миокарда у пациента.

Подобно другим метаболически активным тканям ткань сердца особенно восприимчива к ишемическим повреждениям. Начальная фаза острого инфаркта миокарда обычно связана с потерей нормальной сократительной функции, которая проявляет себя в виде регионарной дискинезии. Это может быть следствием резкого снижения коронарного перфузионного давления, которое индуцирует острое состояние гибернации, и быстрого прекращения нормального трансмембранного транспорта ионов. Реперфузия ишемического миокарда до начала необратимого повреждения может приводить к быстрому или замедленному возврату (оглушение) к нормальному метаболизму и функции сердца.

Магнитно-резонансная визуализация признана полезным методом визуализации сердца. Несмотря на то, что МР методы с использованием спин-эхо визуализации способны показывать анатомию сердца, для определения ишемии миокарда и инфаркта необходимо использовать контрастные агенты. Одним классом МР контрастных агентов являются парамагнитные контрастные агенты, которые содержат ион парамагнитного металла, в форме соли или в комплексе с хелатирующей/комплексообразующей группировкой.

Парамагнитный контрастный агент GdDTPA (Magnevist<sup>™</sup>) был объектом клинического испытания в отношении его использования в визуализации миокарда. Хотя было показано, что этот металлический комплекс улучшает идентификацию острых инфарктов миокарда на МР изображениях у животных и людей, его клиническое применение в визуализации миокарда ограничено из-за его быстрой экскреции и распределения в жидкости внеклеточного пространства.

Mn<sup>2+</sup>, ион парамагнитного металла, был использован в качестве контрастного агента для использования в МР визуализации миокарда. Он конкурирует с Ca<sup>2+</sup> за входение в сокращающийся миокард через медленные Ca<sup>2+</sup> каналы, что приводит к значительному сокращению времени релаксации T<sub>1</sub> и, в результате, увеличивает интенсивность сигнала в ткани нормального миокарда. Общий приток Mn<sup>2+</sup> в единицу времени растёт при увеличении частоты сердечных сокращений и силы контракции. Однако в ишемическом миокарде поглощается значительно меньше Mn<sup>2+</sup> из-за снижения тока крови и уменьшения сократимости. Следовательно, ишемический миокард можно определять и отличать от ткани нормального миокарда МР визуализацией с использованием парамагнитного Mn<sup>2+</sup> в качестве контрастного агента.

Однако использование Mn<sup>2+</sup> имеет некоторые недостатки. Использование солей марганца, например

MnCl<sub>2</sub>, связано с риском для безопасности вследствие токсичности этих солей для сердца (см., например, Hu et al. Magn. Res. in Medicine 46, (2001), 884-890). Предпринимались попытки компенсировать токсические эффекты солей марганца либо путем добавления солей кальция, либо путем введения этих солей медленной инфузией. Недостатком использования кальция в препарате контрастного агента является то, что он конкурирует с марганцем за кальциевые каналы при вхождении в миоциты. Это может приводить к снижению эффективности и к последующей необходимости инъектировать более высокие дозы контрастного агента, чтобы компенсировать этот эффект.

В WO-A-99/01162 описан способ обнаружения ишемии миокарда с использованием комплексов марганца в комбинации с быстрым формированием изображений. Говорится, что процедуру визуализации обычно проводят за промежуток времени от 3 до 6 часов после инъекции. Несмотря на то, что этот способ, по-видимому, не связан с проблемами токсичности, получение результатов процедуры визуализации задерживается на относительно длительный промежуток времени между введением контрастного агента и началом процедуры визуализации. Это приводит к задержке возможно необходимого лечения.

В WO 2004/054623 описан способ идентификации участков, претерпевающих ишемию миокарда, с использованием определенных комплексов марганца. Режим физического и/или фармацевтического напряжения является частью этого способа, так как он увеличивает разницу в контрасте между нормальным и ишемическим миокардом и, таким образом, позволяет использовать более низкие дозы контрастного агента. Режим напряжения, однако, создает дополнительную физиологическую нагрузку на пациента.

Следовательно, существует потребность в агенте для использования в способе МР визуализации, который позволяет различать ткань ишемического миокарда и ткань нормального миокарда, давая возможность, таким образом, оценивать жизнеспособность указанной ткани на клеточном уровне. Агент должен дополнительно иметь благоприятные характеристики безопасности, т.е. не показывать каких-либо токсических побочных эффектов в клинических дозах. Существует также потребность в способе МР визуализации, обеспечивающем быструю и легкую оценку жизнеспособности ткани миокарда без создания дополнительного напряжения для пациента и без задержки начала мероприятий по лечению.

В WO-A-99/35508 раскрыт способ МР исследования пациента с использованием гиперполяризованного раствора агента с высоким T<sub>1</sub> в качестве МР визуализирующего агента. Термин "гиперполяризация" означает усиление ядерной поляризации ЯМР активных ядер, присутствующих в агенте с высоким T<sub>1</sub>, то есть ядер с ненулевым ядерным спином, предпочтительно ядер <sup>13</sup>C или <sup>15</sup>N. При усилении ядерной поляризации ЯМР активных ядер разница между населенностями возбужденного и основного ядерных спиновых состояний этих ядер значительно увеличивается, и, в силу этого, интенсивность МР сигнала усиливается в сто и более раз. При использовании гиперполяризованного <sup>13</sup>C- и/или <sup>15</sup>N-обогащенного агента с высоким T<sub>1</sub> помехи от фоновых сигналов будут практически отсутствовать, поскольку распространенность <sup>13</sup>C и/или <sup>15</sup>N в природе пренебрежимо мала, и поэтому контрастность изображения будет преимущественно высокой. Раскрыт целый ряд возможных агентов с высоким T<sub>1</sub>, подходящих для гиперполяризации и последующего использования в качестве МР визуализирующих агентов, включая, но не ограничивая ими, неэндогенные и эндогенные соединения, такие как ацетат, пируват, оксалат или глюконат, сахара, такие как глюкоза или фруктоза, мочевины, амиды, аминокислоты, такие как глутамат, глицин, цистеин или аспартат, нуклеотиды, витамины, такие как аскорбиновая кислота, производные пенициллина и сульфонамиды. Утверждается также, что промежуточные соединения в нормальных метаболических циклах, таких как цикл лимонной кислоты, такие как фумаровая кислота и пировиноградная кислота, являются предпочтительными визуализирующими агентами для визуализации метаболической активности.

Необходимо подчеркнуть, что сигнал от гиперполяризованного визуализирующего агента ослабевает из-за релаксации и, после введения в организм пациента, из-за разбавления. Следовательно, значение T<sub>1</sub> визуализирующих агентов в биологических жидкостях (например, в крови) должно быть достаточно высоким, чтобы обеспечить распределение агента в сайт-мишень в организме пациента в высоко гиперполяризованном состоянии.

Теперь авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что гиперполяризованный <sup>13</sup>C-пируват можно использовать в качестве визуализирующего агента для оценки жизнеспособности ткани миокарда. Амплитуды МР сигналов от разных метаболитов пирувата варьируют в зависимости от метаболического состояния ткани миокарда. Следовательно, уникальная картина метаболических пиков, образуемых этими метаболитами, может быть использована в качестве характерного признака для идентификации метаболического состояния исследуемой ткани сердца и дает возможность различать жизнеспособную и нежизнеспособную ткань миокарда. Это делает гиперполяризованный <sup>13</sup>C-пируват превосходным агентом для МР визуализации in vivo для оценки жизнеспособности ткани

миокарда, например для идентификации «подверженной риску ткани» после ишемии миокарда или сердечных приступов. Эта информация, которая выходит за пределы оценки перфузии или идентификации мертвой ткани миокарда, важна для врача, чтобы начать адекватное лечение пациента для предупреждения дальнейшего повреждения миокарда.

Таким образом, в первом аспекте настоящего изобретения предложен способ МР визуализации для оценки жизнеспособности ткани миокарда с использованием гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата в качестве визуализирующего агента.

$^{13}\text{C}$ -пируват имеет превосходный профиль безопасности и, в качестве эндогенного соединения, хорошо переносится организмом человека. Использование гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата в способе по изобретению обеспечивает получение немедленных результатов, так как задержка между введением и процедурой МР визуализации не требуется. Это означает, что пациент может быть подвергнут лечению настолько возможно быстро, что увеличивает шансы выживания и восстановления. В способе по изобретению не нужен режим напряжения, что является дополнительным преимуществом для пациентов.

Гиперполяризация ЯМР активных  $^{13}\text{C}$ -ядер может быть достигнута различными методами (например, методами, описанными в WO-A-99/35508). Предпочтительными методами являются метод переноса поляризации от благородного газа, "метод грубой силы", метод замораживания спинов, параводородный метод и метод динамической поляризации ядер (ДПЯ). Предпочтительно для получения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата либо поляризуют непосредственно сам  $^{13}\text{C}$ -пируват, либо поляризуют  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту и превращают поляризованную  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту в поляризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват, например нейтрализацией основанием.

Предпочтительным методом получения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата является перенос поляризации от гиперполяризованного благородного газа. Благородные газы, имеющие ненулевой ядерный спин, могут быть гиперполяризованы, то есть их поляризация может быть повышена относительно равновесной поляризации, например, в результате использования поляризованного в круговую света. Для осуществления гиперполяризации  $^{13}\text{C}$ -ядер можно использовать гиперполяризованный благородный газ, предпочтительно  $^3\text{He}$  или  $^{129}\text{Xe}$ , или смесь таких газов. Гиперполяризация может быть достигнута также с использованием обогащенного изотопом гиперполяризованного благородного газа, предпочтительно  $^3\text{He}$  или  $^{129}\text{Xe}$ . Гиперполяризованный газ может находиться в газовой фазе, он может быть растворенным в жидкости/растворителе, или гиперполяризованный газ сам может служить растворителем. Альтернативно этот газ можно конденсировать на охлажденную твердую поверхность и использовать в этой форме или дать ему возможность сублимироваться. Тщательное перемешивание гиперполяризованного газа с соединением, которое должно быть поляризовано, является предпочтительным. Следовательно, если поляризуют  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту, которая при комнатной температуре является жидкостью, гиперполяризованный газ предпочтительно растворен в жидкости/растворителе или служит растворителем. Если поляризуют  $^{13}\text{C}$ -пируват, гиперполяризованный газ предпочтительно растворен в жидкости/растворителе, которая(ый) растворяет также и пируват.

Другой предпочтительный метод получения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата заключается в поляризации ЯМР активных ядер в результате термодинамического уравнивания при очень низкой температуре и в очень сильном поле. Гиперполяризацию осуществляют, используя очень сильное поле и очень низкую температуру (метод грубой силы) по сравнению с рабочими полем и температурой ЯМР спектрометра. Напряженность используемого магнитного поля должна быть как можно более высокой, приемлемо выше 1 Тл, предпочтительно выше 5 Тл, более предпочтительно 15 Тл или выше и особенно предпочтительно 20 Тл или выше. Температура должна быть очень низкой, например 4,2 К или ниже, предпочтительно 1,5 К или ниже, более предпочтительно 1,0 К или ниже, особенно предпочтительно 0,1 К или ниже.

Другим предпочтительным методом получения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата является метод замораживания спинов. Этот метод включает поляризацию спина твердого соединения или системы путем поляризации замораживанием спина. В систему вводят подходящие парамагнитные вещества или систему смешивают до гомогенного состояния с подходящими парамагнитными веществами, такими как  $\text{Ni}^{2+}$ , ионы лантанидов или актинидов, в кристаллической форме с осью симметрии третьего или более порядка. Аппаратура проще, чем требуется для ДПЯ, не требуется однородное магнитное поле, поскольку поле резонансного возбуждения не прикладывается. Этот процесс осуществляют физическим вращением образца вокруг оси, перпендикулярной направлению магнитного поля. Предварительным условием для этого метода является то, что парамагнитные вещества должны иметь высокоанизотропный g-фактор. В результате вращения образца электронный парамагнитный резонанс входит в контакт с ядерными спинами, что приводит к уменьшению температуры ядерного спина.

Вращение образца выполняют до тех пор, пока поляризация ядерного спина не достигает нового равновесия.

В более предпочтительном воплощении для получения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата используют метод динамической поляризации ядер (ДПЯ). Поляризацию осуществляют парамагнитным соединением, так называемым парамагнитным агентом или ДПЯ агентом. Во время осуществления процесса ДПЯ подводят энергию, обычно в форме микроволнового излучения, которая первоначально возбуждает парамагнитный агент. При угасании до исходного состояния происходит перенос поляризации от неспаренного электрона парамагнитного агента к ЯМР активным ядрам образца. Обычно в процессе ДПЯ используют умеренное или сильное магнитное поле и очень низкую температуру, например, проводят процесс ДПЯ в жидком гелии и в магнитном поле около 1 Тл или выше. Альтернативно можно использовать умеренное магнитное поле и любую температуру, при которой достигается достаточное усиление поляризации. Методика ДПЯ описана, например, в международных публикациях WO-A-98/58272 и в WO-A-01/96895, которые обе включены в данное описание изобретения, ссылкой на них. Для получения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата методом ДПЯ в качестве поляризуемого соединения используют либо  $^{13}\text{C}$ -пируват, либо  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту.

В зависимости в основном от используемого в процессе ДПЯ парамагнитного агента используют  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту и/или  $^{13}\text{C}$ -пируват. Если парамагнитный агент растворим в  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоте, то предпочтительно используют  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту и образуют жидкую смесь, предпочтительно жидкий раствор, парамагнитного агента и  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты. Если парамагнитный агент не растворяется в  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоте, то используют  $^{13}\text{C}$ -пируват и/или  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту и по меньшей мере один соразтворитель для образования жидкой смеси, предпочтительно жидкого раствора. Было установлено, что успешное осуществление ДПЯ и, следовательно, уровень поляризации зависит от нахождения поляризуемого соединения и парамагнитного агента в тесном контакте друг с другом. Следовательно, соразтворителем предпочтительно является соразтворитель или смесь соразтворителей, который(ая) растворяет как парамагнитный агент, так и  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту и/или  $^{13}\text{C}$ -пируват. Для  $^{13}\text{C}$ -пирувата в качестве соразтворителя предпочтительно используют воду.

Было также обнаружено, что более высокие уровни поляризации достигаются методом ДПЯ, когда образец-смесь при охлаждении/замораживании образует стекло, а не кристаллизованный образец. Опять же образование стекла обеспечивает более тесный контакт парамагнитного агента и подвергаемого поляризации соединения.  $^{13}\text{C}$ -пировиноградная кислота является хорошим стеклообразующим веществом, и поэтому предпочтительно ее используют в процессе ДПЯ, когда парамагнитный агент растворим в  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоте.  $^{13}\text{C}$ -пируват представляет собой соль, и при замораживании жидкой смеси водного раствора  $^{13}\text{C}$ -пирувата и парамагнитного агента будет образовываться кристаллизованный образец. Чтобы предотвратить это, предпочтительно добавлять также соразтворители, которые являются хорошими стеклообразующими веществами, такие как глицерин, пропандиол или гликоль.

Таким образом, в одном воплощении  $^{13}\text{C}$ -пируват растворяют в воде с получением водного раствора и добавляют парамагнитный агент, глицерин и возможно также соразтворитель с образованием жидкой смеси. В предпочтительном воплощении  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту, парамагнитный агент и соразтворитель объединяют с образованием жидкой смеси. В наиболее предпочтительном воплощении  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту и парамагнитный агент объединяют с образованием жидкой смеси. Тщательного смешивания соединений можно достичь несколькими способами, известными в данной области, такими как перемешивание, вортексирование или обработка ультразвуком.

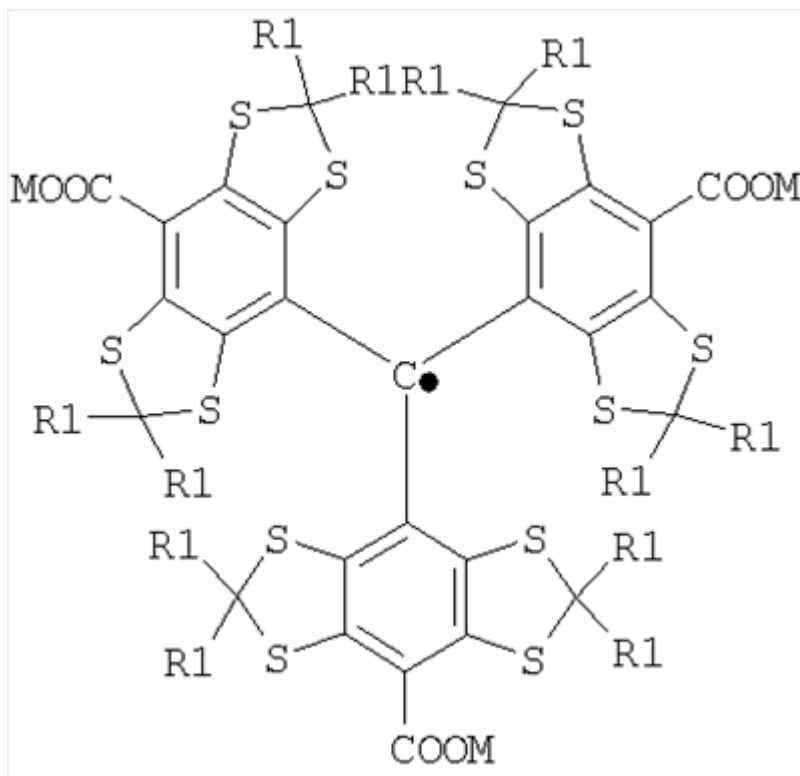
Жидкую смесь затем замораживают перед проведением процесса ДПЯ. Охлаждение/замораживание жидкой смеси может быть достигнуто способами, известными в данной области, например замораживанием жидкой смеси в жидком азоте или просто помещением ее в поляризатор, где образец будет заморожен жидким гелием.

Как описано выше, динамическая поляризация ядер (ДПЯ) представляет собой метод поляризации, когда поляризацию соединения, которое нужно поляризовать, осуществляют ДПЯ агентом, например парамагнитным агентом/соединением.

В качестве ДПЯ агентов можно использовать многие известные парамагнитные соединения, например переходные металлы, такие как ионы хрома(V), органические свободные радикалы, такие как нитроксидные радикалы, тритильные радикалы или магнитные частицы. Такие ДПЯ агенты описаны, например, в WO-A-99/35508, WO-A-88/10419, WO-A-90/00904, WO-A-91/12024, WO-A-93/02711 или WO-

A-96/39367.

В предпочтительном воплощении тритильный радикал формулы (I)



где

M представляет собой водород или один эквивалент катиона; и

R1, которые являются одинаковыми или разными, каждый представляет собой возможно гидроксильную C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкильную группу с прямой или разветвленной цепью или группу -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X-R2, где n равно 1, 2 или 3;

X представляет собой O или S; и

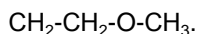
R2 представляет собой возможно гидроксильную C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкильную группу с прямой или разветвленной цепью,

используют в качестве парамагнитного агента для получения <sup>13</sup>C-пирувата методом ДПЯ.

В предпочтительном воплощении M представляет собой водород или один эквивалент физиологически переносимого катиона. Термин "физиологически переносимый катион" означает катион, который переносится живым организмом человека или животного, не являющегося человеком. Предпочтительно M представляет собой водород или катион щелочного металла, ион аммония или ион органического амина, например меглумина. Наиболее предпочтительно M представляет собой водород или натрий.

В другом предпочтительном воплощении R1 являются одинаковыми или разными, предпочтительно одинаковыми и каждый представляет собой возможно гидроксильную C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкильную группу с прямой или разветвленной цепью, наиболее предпочтительно метильную, этильную, изопропилную, гидроксиметильную или гидроксипропилную.

В другом предпочтительном воплощении R1 являются одинаковыми или разными, предпочтительно одинаковыми и представляют собой -CH<sub>2</sub>-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил), -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил)-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил), -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>, -(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-алкил)-S-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>-O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>-S-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>, наиболее предпочтительно -



В более предпочтительном воплощении М представляет собой водород или натрий, и R1 являются одинаковыми и каждый представляет собой  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$ .

Тритильные радикалы формулы (I) могут быть синтезированы способами, которые подробно описаны в WO-A-91/12024, WO-A-96/39367, WO 97/09633 и WO-A-98/39277. Коротко, радикалы могут быть синтезированы путем взаимодействия трехмольных эквивалентов металлизированного мономерного арильного соединения с одним мольным эквивалентом соответствующим образом защищенного производного карбоновой кислоты с образованием тримерного промежуточного соединения. Это промежуточное соединение металлируют и затем подвергают взаимодействию, например, с диоксидом углерода с получением трикарбокситритилкарбинола, который на следующей стадии обрабатывают сильной кислотой с образованием триарилметильного катиона. Этот катион затем восстанавливают с образованием стабильного тритильного радикала.

Жидкая смесь, содержащая  $^{13}\text{C}$ -пируват и/или  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту и возможно растворитель, предпочтительно содержит от 5 до 100 мМ тритильных радикалов формулы (I), более предпочтительно от 10 до 20 мМ, особенно предпочтительно от 12 до 18 мМ и наиболее предпочтительно от 13 до 17 мМ. Было обнаружено, что время нарастания для поляризации в процессе ДПЯ короче при использовании большего количества радикала, однако достигается более низкий уровень поляризации. Следовательно, эти два эффекта должны быть сбалансированы один относительно другого.

Методика ДПЯ описана, например, в международных публикациях WO-A-98/58272 и в WO-A-01/96895, которые обе включены в данное описание ссылкой на них. Обычно в процессе ДПЯ используют умеренное или сильное магнитное поле и очень низкую температуру, например, проводят процесс ДПЯ в жидком гелии и в магнитном поле примерно 1 Тл или выше. Альтернативно можно использовать умеренное магнитное поле и любую температуру, при которой достигается достаточное усиление поляризации. В предпочтительном воплощении способа по изобретению процесс ДПЯ проводят в жидком гелии и в магнитном поле примерно 1 Тл или выше. Подходящие установки для поляризации описаны, например, в WO-A-02/37132. В предпочтительном воплощении установка для поляризации содержит криостат и поляризующее устройство, например микроволновую камеру, соединенную волноводом с источником микроволнового излучения, в центральном канале, окруженном создающим магнитное поле устройством, таким как сверхпроводящий магнит. Канал тянется вертикально вниз до по меньшей мере уровня области Р рядом со сверхпроводящим магнитом, где сила магнитного поля достаточно высока, например от 1 до 25 Тл, для осуществления поляризации  $^{13}\text{C}$ -ядер. Канал для образца предпочтительно выполнен с возможностью герметизации, и его можно откачивать до низких давлений, например давлений порядка 1 мбар (100 Па) или менее. Внутри этого канала может быть помещено устройство для ввода образца (например, смеси, содержащей парамагнитный агент и  $^{13}\text{C}$ -пируват или  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту), например извлекаемая транспортирующая трубка, и эта трубка может быть вставлена в канал сверху вниз до позиции внутри микроволновой камеры в области Р. Область Р охлаждают жидким гелием до температуры, достаточно низкой для того, чтобы происходила поляризация, предпочтительно до температуры порядка 0,1-100 К, более предпочтительно 0,5-10 К, наиболее предпочтительно 1-5 К. Устройство для ввода образца предпочтительно выполнено с возможностью герметизации на его верхнем конце любым подходящим способом для сохранения частичного вакуума в канале. В нижнем конце устройства для ввода образца может быть установлен с возможностью извлечения удерживающий образец контейнер, например удерживающий образец стакан. Удерживающий образец контейнер предпочтительно изготовлен из легкого по массе материала с низкой удельной теплоемкостью и хорошими криогенными свойствами, такого как, например, Kelf (полихлортрифторэтилен) или РЕЕК (полиэфирэфиркетон). Контейнер для образца может вмещать в себя один или более чем один подлежащий поляризации образец.

Образец вставляют в удерживающий образец контейнер, погружают в жидкий гелий и подвергают микроволновому облучению, предпочтительно при частоте примерно 94 ГГц при 200 мВт. Мониторинг уровня поляризации можно выполнять путем получения  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сигналов от образца в твердом состоянии во время микроволнового облучения, поэтому на стадии (б) предпочтительно используют установку для поляризации, содержащую устройство для получения  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектров в твердом состоянии. Обычно получают кривую насыщения на графике зависимости  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сигнала от времени. Следовательно, можно определить, когда достигается оптимальный уровень поляризации.

Если гиперполяризацию проводят методом, который требует, чтобы образец находился в твердом состоянии, например методом ДПЯ, твердый образец должен быть переведен в жидкое состояние для его использования в способе по изобретению. Твердую поляризованную смесь либо растворяют подобно тому, как описано, например, в WO-A-02/37132, либо расплавляют, как описано, например, в WO-A-02/36005. Предпочтительным является растворение твердого гиперполяризованного образца,

более предпочтительно растворение в буфере, предпочтительно в физиологически переносимом буфере с получением жидкой композиции. Термин "буфер" в контексте данной заявки означает один или более буферов, то есть также смеси буферов.

Предпочтительными буферами являются физиологически переносимые буферы, более предпочтительно буферы, которые обеспечивают pH в пределах примерно от 7 до 8, такие как, например, фосфатный буфер ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), ACES, PIPES, имидазол/HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, HEPPS или TRICIN. Более предпочтительными буферами являются фосфатный буфер и TRIS, наиболее предпочтительным является TRIS. В еще одном воплощении используют более чем один из вышеуказанных предпочтительных буферов, то есть смесь буферов.

Когда в качестве соединения, подлежащего поляризации, используют  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту, растворение также включает превращение  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты в  $^{13}\text{C}$ -пируват. Чтобы достичь этого,  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту подвергают взаимодействию с основанием. В одном воплощении  $^{13}\text{C}$ -пировиноградную кислоту подвергают взаимодействию с основанием с превращением ее в  $^{13}\text{C}$ -пируват, а затем добавляют буфер. В другом предпочтительном воплощении буфер и основание объединяют в одном растворе, и этот раствор добавляют к  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоте, при этом она растворяется и превращается в  $^{13}\text{C}$ -пируват одновременно. В предпочтительном воплощении основание представляет собой водный раствор NaOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  или  $\text{NaHCO}_3$ , и наиболее предпочтительным основанием является NaOH. В особенно предпочтительном воплощении для растворения  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты и ее превращения в натриевую соль  $^{13}\text{C}$ -пирувата используют раствор буфера TRIS, содержащий NaOH.

В другом предпочтительном воплощении буфер или, где это применимо, объединенный раствор буфер/основание дополнительно содержит одно или более чем одно соединение, которое способно связывать свободные парамагнитные ионы или образовывать с ними комплексы, например хелатирующие агенты, такие как ДТРА (диэтилентриаминпентауксусная кислота) или EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота). Было обнаружено, что свободные парамагнитные ионы могут вызывать уменьшение  $T_1$  гиперполяризованного соединения, и этого предпочтительно избегают.

Растворение может быть осуществлено предпочтительно с использованием методов и/или устройств, раскрытых в WO-A-02/37132. Если гиперполяризацию проводят методом ДПЯ, то может быть использована установка для растворения, которая либо физически отделена от поляризатора, либо является частью аппарата, который содержит поляризатор и установку для растворения. В предпочтительном воплощении растворение осуществляют при повышенном магнитном поле для улучшения релаксации и сохранения максимума гиперполяризации. Узлов магнитного поля следует избегать, и, несмотря на вышеуказанные меры, слабое поле может приводить к усилению релаксации.

Если гиперполяризацию проводят методом ДПЯ, то парамагнитный агент и/или его реакционные продукты предпочтительно удаляют из раствора, содержащего  $^{13}\text{C}$ -пируват. Парамагнитный агент и/или реакционные продукты могут быть удалены частично, в значительной степени или в идеале полностью, причем полное удаление является предпочтительным. Реакционными продуктами, например, тритильных радикалов формулы (I) могут быть сложные эфиры, которые могут образовываться в результате реакции пировиноградной кислоты с радикалами формулы (I), содержащими гидроксильные группы. Способы, используемые для удаления парамагнитного агента и/или его реакционных продуктов, известны в данной области. Как правило, выбор способа зависит от природы парамагнитного агента и/или его реакционных продуктов. При растворении твердого образца после поляризации радикал может осаждаться, и его легко можно выделить из жидкой композиции фильтрованием. Если в качестве парамагнитных агентов используют магнитные частицы, то эти частицы также без труда удаляют фильтрованием. Если осаждение не происходит, парамагнитный агент может быть удален хроматографическими методами разделения, например жидкостной хроматографией, такой как хроматография с обращенными фазами, прямофазная или ионообменная хроматография, или экстракцией.

Так как тритильный радикал формулы (I) имеет характеристический спектр поглощения в УФ-видимой области, можно использовать измерение поглощения в УФ-видимой области в качестве метода проверки его присутствия в жидкой композиции после его удаления. Для получения количественных результатов, то есть концентрации радикала, присутствующего в растворенном гиперполяризованном образце, оптический спектрометр может быть откалиброван таким образом, что поглощение при конкретной длине волны для образца дает соответствующую концентрацию радикала в образце.

Изотопное обогащение  $^{13}\text{C}$ -пирувата, используемого в способе по изобретению, и/или  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты, которую предпочтительно используют для получения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата методом ДПЯ, предпочтительно составляет по меньшей мере 75%, более



предпочтительно по меньшей мере 80% и особенно предпочтительно по меньшей мере 90%, причем изотопное обогащение свыше 90% является наиболее предпочтительным. В идеале обогащение составляет 100%.  $^{13}\text{C}$ -пировиноградная кислота и/или  $^{13}\text{C}$ -пируват могут быть обогащены изотопом в положении С1 (что ниже обозначено как  $^{13}\text{C}_1$ -пировиноградная кислота и  $^{13}\text{C}_2$ -пируват), в положении С2 (что ниже обозначено как  $^{13}\text{C}_2$ -пировиноградная кислота и  $^{13}\text{C}_2$ -пируват), в положениях С1 и С2 (что ниже обозначено как  $^{13}\text{C}_3$ -пировиноградная кислота и  $^{13}\text{C}_3$ -пируват), в положениях С1 и С3 (что ниже обозначено как  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -пировиноградная кислота и  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -пируват), в положениях С2 и С3 (что ниже обозначено как  $^{13}\text{C}_{1,3}$ -пировиноградная кислота и  $^{13}\text{C}_{1,3}$ -пируват), в положениях С1, С2 и С3 (что ниже обозначено как  $^{13}\text{C}_{2,3}$ -пировиноградная кислота и  $^{13}\text{C}_{2,3}$ -пируват) или в положениях С1, С2 и С3 (что ниже обозначено как  $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -пировиноградная кислота и  $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -пируват), причем положение С1 является предпочтительным.

В данной области известно несколько способов синтеза  $^{13}\text{C}_1$ -пировиноградной кислоты. Коротко, в Seebach et al. Journal of Organic Chemistry 40(2), 1975, 231-237 описан путь синтеза, основанный на защите и активации карбонилсодержащего исходного вещества в виде S,S-ацеталя, например 1,3-дитиана или 2-метил-1,3-дитиана. Дитиан металлируют и подвергают взаимодействию с метилсодержащим соединением и/или  $^{13}\text{CO}_2$ . С использованием соответствующего обогащенного изотопом  $^{13}\text{C}$ -компонента, как описано в этой ссылке, может быть получен  $^{13}\text{C}_1$ -пируват,  $^{13}\text{C}_2$ -пируват или  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -пируват. Карбонильную функциональную группировку затем высвобождают общепринятыми способами, описанными в литературе. Другие пути синтеза начинаются с уксусной кислоты, которую сначала превращают в ацетилбромид, а затем подвергают взаимодействию с  $\text{Cu}^{13}\text{CN}$ . Полученный нитрил превращают в пировиноградную кислоту через амид (см., например, S.H. Anker et al. J. Biol. Chem. 176 (1948), 1333 или J. E. Thirkettle, Chem Commun. (1997), 1025).  $^{13}\text{C}$ -пировиноградная кислота может быть получена также протонированием коммерчески доступного  $^{13}\text{C}$ -пирувата натрия, например, способом, описанным в патенте США 6232497.

Для использования в способе по изобретению гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват предоставляется в виде композиции, которая подходит для введения в живой организм человека или животного, не являющегося человеком.

Композиция предпочтительно содержит буфер или смесь буферов, как описано выше. Композиция может дополнительно содержать традиционные фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты и вспомогательные вещества, используемые для приготовления препаратов. Так, композиция может содержать, например, стабилизаторы, агенты, регулирующие осмотическое давление, солюбилизирующие агенты и тому подобное.

Пируват является эндогенным соединением, которое организм человека переносит очень хорошо даже в высоких концентрациях. В качестве предшественника в цикле лимонной кислоты пируват играет важную метаболическую роль в организме человека. Пируват превращается в разные соединения: в результате его трансаминирования образуется аланин, в результате окислительного декарбоксилирования пируват превращается в ацетил-КоА и бикарбонат, в результате восстановления пирувата образуется лактат, а в результате его карбоксилирования образуется оксалоацетат.

Теперь обнаружено, что превращение гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата в гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -лактат, гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -бикарбонат (только в случае  $^{13}\text{C}_1$ -пирувата,  $^{13}\text{C}_{1,2}$ -пирувата или  $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -пирувата) и гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -аланин может быть использовано для различения опухолевой ткани и здоровой ткани с использованием МР визуализации *in vivo*. Это неожиданно, поскольку известно, что  $T_1$  гиперполяризованных соединений снижается из-за релаксации и разбавления. В цельной крови человека при 37°C  $^{13}\text{C}$ -пируват имеет релаксацию  $T_1$  примерно 42 с, однако было обнаружено, что превращение гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата в гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -лактат, гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -бикарбонат и гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -аланин является достаточно быстрым, чтобы иметь возможность детектировать сигнал от  $^{13}\text{C}$ -пируватного исходного соединения и его метаболитов. Количество аланина, бикарбоната и лактата зависит от метаболического статуса исследуемой ткани. Интенсивность МР сигнала гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -лактата, гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната и гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -аланина связана с количеством этих соединений и степенью поляризации, оставшейся к моменту детектирования. Следовательно, мониторинг превращения гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата в гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -лактат, гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -бикарбонат и гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -аланин дает возможность исследовать метаболические процессы *in vivo* в организме человека или животного, не являющегося человеком, с использованием неинвазивной МР визуализации.

Далее термины «гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$  С-пируват», « $^{13}\text{C}$ -пируват» и «пируват» используются взаимозаменяемо. То же самое относится к терминам «гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -лактат», « $^{13}\text{C}$ -лактат» и «лактат»; «гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -аланин», « $^{13}\text{C}$ -аланин» и «аланин»; «гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -

бикарбонат», «<sup>13</sup>C-бикарбонат» и «бикарбонат» и «гиперполяризованный <sup>13</sup>C-метаболит(ы)», «<sup>13</sup>C-метаболит(ы)» и «метаболит(ы)».

Было обнаружено, что амплитуды МР сигналов от разных метаболитов пирувата меняются в зависимости от метаболического состояния ткани миокарда. Следовательно, уникальная картина метаболических пиков, образуемая аланином, лактатом, бикарбонатом и пируватом, может быть использована в качестве характерного признака для идентификации метаболического состояния исследуемой ткани сердца и дает возможность различать жизнеспособную и нежизнеспособную ткань миокарда. Это делает композицию, содержащую <sup>13</sup>С-пируват, превосходным агентом для МР визуализации in vivo для оценки жизнеспособности ткани миокарда. Определение жизнеспособности ткани миокарда, разумеется, является важным после ишемии миокарда или сердечных приступов, а также у пациентов с, например, диабетом или метаболическим синдромом, заболеваниями, при которых могут происходить повреждения ткани миокарда.

Поскольку коронарно-артериальное заболевание (КАЗ) имеет целый ряд клинических проявлений, варьирующих от стабильной стенокардии до внезапной смерти, непосредственную пользу дает способ диагностики, который предоставляет информацию о статусе жизнеспособности клеток. Между двумя самыми «крайними» состояниями - нормальными жизнеспособными клетками и мертвыми клетками - в ишемической ткани миокарда на клеточном уровне существует целый ряд различных состояний, которые, в свою очередь, обнаруживаются при указанных различных клинических проявлениях. Важно идентифицировать эти разные состояния в ишемической ткани миокарда, также называемой «подверженной риску тканью миокарда», т.е. в ткани, которая станет некротической, если ишемия продолжается, оставаясь не вылеченной, чтобы дать пациенту надлежащее лечение для предупреждения некроза.

Двумя разными, но очень тяжелыми состояниями ишемического сердца являются гибернация и оглушение. Гибернация представляет собой хроническое ишемическое состояние, при котором миокардиальный ток крови снижен, и функция сердца также снижена. Клетки миокарда обычно окисляют, главным образом, жирные кислоты. В гибернирующих клетках имеет место повышенное поглощение глюкозы (известное из исследований методом FDG-PET (**позитронно-эмиссионная томография** с фтордезоксиглюкозой)), которое свидетельствует о том, что пируват будет предпочтительным субстратом для этих клеток. Оглушенный миокард, с другой стороны, характеризуется острой ишемией (например, значительной окклюзией коронарной артерии), когда ток крови нормальный, но функция снижена. Это должно приводить к низкому уровню лактата из-за относительно низкой метаболической активности. Было обнаружено, что при использовании способа по изобретению подверженную риску ткань миокарда можно идентифицировать благодаря тому, что она имеет слабый сигнал <sup>13</sup>C-бикарбоната и/или сильный сигнал <sup>13</sup>C-лактата.

Ишемия может привести к различным уровням дисфункции миокарда, и если она тяжелая и длительная, то приведет к некрозу клеток. В последнем случае клетки мертвые, и метаболизм вообще не идет, например, при введении гиперполяризованного <sup>13</sup>C-пирувата, только этот сигнал ожидается, а сигналы от возможных метаболитов в <sup>13</sup>С-спектре и/или на изображении отсутствуют.

Субъекта, которого подвергают исследованию, например пациента или животное, обычно помещают в МР магнит. Специально предназначенные <sup>13</sup>C-МР радиочастотные катушки расположены так, что они охватывают интересующую область.

Визуализирующую среду, содержащую <sup>13</sup>C-пируват и один или более общепринятых фармацевтических носителей, эксципиентов и/или добавок, вводят парентерально, предпочтительно внутривенно или внутриартериально. Прямое введение в сердце также возможно, например, инъекцией визуализирующей среды через катетер, введенный в коронарные артерии. Дозировка и концентрация визуализирующей среды зависят от целого ряда факторов, таких как токсичность и путь введения. Обычно визуализирующую среду вводят в концентрации вплоть до 1 ммоль пирувата на кг массы тела, предпочтительно от 0,01 до 0,5 ммоль/кг, более предпочтительно от 0,1 до 0,3 ммоль/кг. Скорость введения составляет предпочтительно менее 10 мл/с, более предпочтительно менее 6 мл/с и наиболее предпочтительно от 5 мл/с до 0,1 мл/с. Через менее чем 400 с после введения, предпочтительно менее чем 120 с, более предпочтительно менее чем 60 с после введения, особенно предпочтительно через 20-50 с после введения и наиболее предпочтительно через 30-40 с после введения применяют последовательность МР визуализации, которая кодирует интересующий объем объединенным избирательным по частоте и пространственным характеристикам способом. Это приводит к получению метаболических изображений <sup>13</sup>С-лактата, <sup>13</sup>С-аланина и <sup>13</sup>С-пирувата и, более предпочтительно, метаболических изображений <sup>13</sup>С-лактата, <sup>13</sup>С-аланина, <sup>13</sup>С-бикарбоната и <sup>13</sup>С-пирувата.

Кодирование интересующего объема может быть достигнуто с использованием так называемой

последовательности спектроскопической визуализации, как описано, например, в T.R.Brown et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3523-3526 (1982); A.A.Maudsley et al. J. Magn. Res 51, 147-152 (1983). Данные спектроскопического изображения содержат множество элементов объема, при этом каждый элемент содержит полный  $^{13}\text{C}$ -MP спектр.  $^{13}\text{C}$ -пируват и его  $^{13}\text{C}$ -метаболиты все имеют свою уникальную позицию в  $^{13}\text{C}$ -MP спектре, и их резонансная частота может быть использована для их идентификации. Интеграл от пика при его резонансной частоте прямо связан с количеством  $^{13}\text{C}$ -пирувата и его  $^{13}\text{C}$ -метаболитов соответственно. Когда количество  $^{13}\text{C}$ -пирувата и каждого  $^{13}\text{C}$ -метаболита оценивают с использованием, например, рутинных методов выравнивания во временной области, как описано, например, в L.Vanhamme et al. J.Magn. Reson. 129, 35-43 (1997), можно генерировать изображения для  $^{13}\text{C}$ -пирувата и каждого  $^{13}\text{C}$ -метаболита, в которых цветовое кодирование или яркостное кодирование является характерным для измеряемого количества  $^{13}\text{C}$ -пирувата и каждого  $^{13}\text{C}$ -метаболита.

Хотя методы спектроскопической визуализации доказали свою ценность в создании метаболических изображений с использованием всех видов MP ядер, например  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{23}\text{Na}$ , количество повторов, необходимых для полного кодирования спектроскопического изображения, делает этот подход менее подходящим для гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ . Необходимо обеспечивать наличие сигнала от гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$  в течение всего периода получения MP данных. Этого можно достичь за счет снижения отношения сигнал/шум в результате уменьшения угла РЧ-импульса, что применяют в каждой фазе стадии кодирования. Чем выше размеры матрицы, тем больше фаз стадий кодирования и более длительные периоды времени сканирования требуются.

Способы визуализации, основанные на пионерской работе P.C.Lauterbur (Nature, 242, 190-191 (1973) и P. Mansfield (J. Phys. C. 6, L422-L426 (1973)), предусматривающие использование градиента считывания в процессе сбора данных, должны обеспечить получение изображений с более высоким отношением сигнал/шум или, что эквивалентно, изображений с более высоким пространственным разрешением. Однако эти способы визуализации в их основной форме способны продуцировать не отдельные изображения для  $^{13}\text{C}$ -пирувата и его  $^{13}\text{C}$ -метаболитов, а изображение, содержащее сигналы от  $^{13}\text{C}$ -пирувата и всех его  $^{13}\text{C}$ -метаболитов, то есть идентификация конкретных метаболитов невозможна.

В предпочтительном воплощении применяют последовательности визуализации с использованием множественного эха для кодирования в отношении частотной информации. Последовательности, которые могут продуцировать отдельные  $^1\text{H}$ -изображения воды и жира, описаны, например, в G. Glover, J. Magn. Reson. Visualization 1991:1:521-530 и S.B.Reeder et al., MRM 51 35-45 (2004). Поскольку подлежащие обнаружению метаболиты и, по существу, их MP частоты известны, подход, рассмотренный в указанных ссылках, можно применять к получению прямых изображений  $^{13}\text{C}$ -пирувата,  $^{13}\text{C}$ -аланина и  $^{13}\text{C}$ -лактата и предпочтительно  $^{13}\text{C}$ -пирувата,  $^{13}\text{C}$ -аланина,  $^{13}\text{C}$ -лактата и  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната. Этот метод делает более эффективным использование гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -MP сигнала, обеспечивая по сравнению с классической спектроскопической методикой визуализации лучшее качество сигнала, более высокое пространственное разрешение и более короткое время обнаружения.

Как было описано ранее, жизнеспособная сердечная ткань характеризуется высокой метаболической активностью. При ишемии, т.е. при пониженном токе крови к ткани, клетки неадекватно снабжаются кислородом, и метаболические процессы на клеточном уровне ослабевают. Неожиданно это изменение метаболизма можно сделать видимым в пределах короткого временного окна MP визуализации, которое доступно при использовании гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата. Особенно значительные изменения сигнала  $^{13}\text{C}$ -лактата и  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната в ткани миокарда, которые зависят от метаболического статуса отдельных клеток, позволяют оценить жизнеспособность клеток миокарда.

Следовательно, в предпочтительном воплощении способ согласно данному изобретению включает:

(а) получение прямых  $^{13}\text{C}$ -MP изображений  $^{13}\text{C}$ -пирувата и его  $^{13}\text{C}$ -содержащих метаболитов аланина, лактата и возможно бикарбоната у субъекта, которому предварительно введена композиция, содержащая гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват,

(б) возможно коррелирование  $^{13}\text{C}$  сигнала метаболита с  $^{13}\text{C}$  сигналом любого другого обнаруженного метаболита для получения контраста на основе разницы интенсивности сигналов двух, предпочтительно трех, наиболее предпочтительно четырех  $^{13}\text{C}$  метаболитов,

где на подверженную риску ткань миокарда в указанных  $^{13}\text{C}$  изображениях указывает самый слабый сигнал  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната и/или самый сильный сигнал  $^{13}\text{C}$ -лактата.

Следовательно, в другом предпочтительном воплощении способ согласно изобретению включает:

(а) получение прямых  $^{13}\text{C}$ -МР изображений  $^{13}\text{C}$ -пирувата и его  $^{13}\text{C}$ -содержащих метаболитов аланина, лактата и возможно бикарбоната у субъекта, которому предварительно введена композиция, содержащая гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват,

(б) возможно коррелирование  $^{13}\text{C}$  сигнала метаболита с  $^{13}\text{C}$  сигналом любого другого обнаруженного метаболита для получения контраста на основе разницы интенсивности сигналов двух, предпочтительно трех, наиболее предпочтительно четырех  $^{13}\text{C}$  метаболитов; и

(в) идентификацию подверженной риску ткани миокарда на указанных изображениях путем идентификации самого слабого сигнала  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната и/или самого сильного сигнала  $^{13}\text{C}$ -лактата.

Для корректирования пируватного сигнала изображения как метаболитов (лактата, аланина и бикарбоната), так и пирувата нормализуют по отношению к максимальному значению в каждом отдельном изображении. Во-вторых, нормализованное лактатное изображение умножают на инвертированное пируватное изображение, например на максимальный пируватный сигнал в изображении минус пируватный уровень для каждого пиксела. На последней стадии промежуточный результат, полученный в вышеуказанной операции, умножают на исходное лактатное изображение.

В качестве примера для корректирования бикарбонатного сигнала как лактатное, так и бикарбонатное изображения нормализуют по отношению к максимальному значению в каждом отдельном изображении. Во-вторых, нормализованное лактатное изображение умножают на инвертированное бикарбонатное изображение, например на максимальный бикарбонатный сигнал в изображении минус бикарбонатный уровень для каждого пиксела. На последней стадии промежуточный результат, полученный в вышеуказанной операции, умножают на исходное лактатное изображение. Подобным образом в анализ также может быть включен аланиновый сигнал, а обнаружение слабого бикарбонатного сигнала совместно с неизменным аланиновым сигналом также может быть использовано как указание на подверженную риску ткань миокарда.

Для выделения областей с измененным метаболизмом любую комбинацию усиленного сигнала метаболита в связи с ослабленным сигналом метаболита можно использовать в операции, аналогичной той, которая описана в приведенном выше абзаце, посредством чего получают взвешенное изображение метаболита. Неожиданно оценка жизнеспособности ткани миокарда, т.е. различение жизнеспособной, поврежденной и нежизнеспособной ткани миокарда, также улучшается за счет этого корректирования.

В оценку жизнеспособности ткани миокарда согласно способу по изобретению может быть включена анатомическая и/или перфузионная информация. Анатомическая информация может быть получена, например, путем сбора протонных или  $^{13}\text{C}$ -МР изображений с использованием подходящего контрастного агента или без него. Относительная перфузия в миокарде может быть определена с

использованием МР контрастного агента, такого как, например, Omniscan<sup>™</sup>. Подобным образом, в данной области известны методики МР визуализации для измерения перфузии без введения контрастного агента. В предпочтительном воплощении для количественного определения перфузии используют неметаболизируемый гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -контрастный агент. Подходящие методики и контрастные агенты описаны, например, в WO-A-02/23209. В более предпочтительном воплощении для количественного определения перфузии используют гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват.

В другом предпочтительном воплощении визуализирующую среду, содержащую гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват, вводят повторно, обеспечивая таким образом проведение динамических исследований. Это является дополнительным преимуществом способа по изобретению по сравнению с другими способами МР визуализации сердца с использованием агентов на основе марганца, которые, в более высоких дозах, оказывают кардиотоксические эффекты. Благодаря низкой токсичности пирувата и его благоприятного профиля безопасности повторные дозы этого соединения хорошо переносятся пациентом.

Результаты, полученные способом по изобретению, дают возможность врачу выбрать подходящее лечение для наблюдаемого пациента. В другом предпочтительном воплощении способ по изобретению используют для определения, является ли лечение успешным.

Сообщается также, что пируват имеет инотропные эффекты. Данное соединение, как таковое, можно одновременно использовать в качестве диагностического и терапевтического агента в случае

оглушенного миокарда, когда предполагается, что свободные радикалы кислорода играют роль.

В другом аспекте изобретения предложено применение гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата для изготовления визуализирующей среды для использования в способе МР визуализации для оценки жизнеспособности клеток.

Изготовление визуализирующей среды, содержащей гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$  C-пируват в качестве визуализирующего агента, подробно описано на страницах 12-16.

В еще одном аспекте изобретения предложено применение  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты или  $^{13}\text{C}$ -пирувата для изготовления гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата для использования в качестве визуализирующего агента в способе МР-визуализации для оценки жизнеспособности клеток.

Изготовление и предпочтительные воплощения изготовления гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата из  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты или  $^{13}\text{C}$ -пирувата подробно описаны на страницах 5-11.

В предпочтительном воплощении изобретения предложено применение гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата для изготовления визуализирующей среды для использования в способе МР-визуализации для оценки жизнеспособности клеток, включающем:

(а) получение прямых  $^{13}\text{C}$ -МР изображений  $^{13}\text{C}$ -пирувата и его  $^{13}\text{C}$ -содержащих метаболитов аланина, лактата и возможно бикарбоната у субъекта, которому предварительно введена композиция, содержащая гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват,

(б) возможно коррелирование  $^{13}\text{C}$  сигнала метаболита с  $^{13}\text{C}$  сигналом любого другого обнаруженного метаболита для получения контраста на основе разницы интенсивности сигналов двух, предпочтительно трех, наиболее предпочтительно четырех  $^{13}\text{C}$  метаболитов.

В еще одном предпочтительном воплощении изобретения предложено применение  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты или  $^{13}\text{C}$ -пирувата для изготовления гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата для применения в качестве визуализирующего агента в способе МР-визуализации для оценки жизнеспособности клеток, включающем:

(а) получение прямых  $^{13}\text{C}$ -МР изображений  $^{13}\text{C}$ -пирувата и его  $^{13}\text{C}$ -содержащих метаболитов аланина, лактата и возможно бикарбоната у субъекта, которому предварительно введена композиция, содержащая гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват,

(б) возможно коррелирование  $^{13}\text{C}$  сигнала метаболита с  $^{13}\text{C}$  сигналом любого другого обнаруженного метаболита для получения контраста на основе разницы интенсивности сигналов двух, предпочтительно трех, наиболее предпочтительно четырех  $^{13}\text{C}$  метаболитов.

Вышеуказанный способ и предпочтительные воплощения этого способа подробно описаны на страницах 19-22.

## Примеры

Пример 1. Синтез натриевой соли трис(8-карбокситетра(метоксиэтил)бенз-[1,2-4,5']бис-(1,3)дифенил-4-ил)-метила

В 280 мл диметилацетамида в атмосфере аргона суспендировали 10 г (70 ммоль) натриевой соли трис(8-карбокситетра(гидроксиэтил)бенз-[1,2-4,5']бис-(1,3)дифенил-4-ил)-метила, которую синтезировали согласно Примеру 7 WO-A1-98/39277. Добавляли гидрид натрия (2,75 г), с последующим добавлением метилйодида (5,2 мл), и реакции, которая является слегка экзотермической, давали возможность протекать в течение 1 часа на водяной бане при  $34^\circ\text{C}$  в течение 60 мин. Добавление гидрида натрия и метилйодида повторяли дважды с такими же количествами каждого соединения, и после последнего добавления смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 68 часов и затем вливали в 500 мл воды. рН доводили до  $\text{pH} > 13$ , используя 40 мл 1М NaOH (водн.), и смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 15 часов для гидролиза образовавшихся метиловых эфиров. Затем данную смесь подкисляли с использованием 50 мл 2М HCl (водн.) до рН примерно 2 и экстрагировали 3 раза этилацетатом (500 мл и  $2 \times 200$  мл). Объединенную органическую фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем упаривали досуха. Неочищенный продукт (24 г) очищали препаративной ВЭЖХ с использованием ацетонитрила/воды в качестве элюентов. Собранные фракции

упаривали для удаления ацетонитрила. Оставшуюся водную фазу экстрагировали этилацетатом, органическую фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и затем упаривали досуха. К остатку добавляли воду (200 мл) и pH осторожно доводили до pH 7, используя 0,1 М NaOH (водн.), и во время этого процесса остаток медленно растворялся. После нейтрализации водный раствор подвергали сублимационной сушке.

Пример 2. Получение композиции, содержащей гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват, способом ДПЯ с использованием  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты и тритильного радикала из Примера 1

20 мМ раствор получали растворением 5,0 мг радикала из Примера 1 в  $^{13}\text{C}_1$ -пировиноградной кислоте (164 мкл). Образец перемешивали до гомогенного состояния, и аликвоту раствора (41 мг) помещали в кювету для образца и вставляли в ДПЯ-поляризатор.

Данный образец поляризовали в условиях ДПЯ при 1,2 К в магнитном поле 3,35 Тл под воздействием микроволнового излучения (93,950 ГГц). Через 2 часа поляризацию прекращали, и образец растворяли, используя установку для растворения согласно WO-A-02/37132, в водном растворе гидроксида натрия и трис(гидроксиэтил)аминометана (TRIS) с получением нейтрального раствора гиперполяризованного  $^{13}\text{C}_1$ -пирувата натрия. Растворенный образец быстро анализировали методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для оценки поляризации и получили  $^{13}\text{C}$  поляризацию 19,0%.

Пример 3. Получение композиции, содержащей гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват, способом ДПЯ с использованием  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты и тритильного радикала из Примера 1

15 мМ раствор получали растворением радикала из Примера 1 (209,1 мг) в смеси  $^{13}\text{C}_1$ -пировиноградной кислоты (553 мг) и немеченой пировиноградной кислоты (10,505 г). Образец перемешивали до гомогенного состояния, и аликвоту раствора (2,015 г) помещали в кювету для образца и вставляли в ДПЯ-поляризатор.

Данный образец поляризовали в условиях ДПЯ при 1,2 К в магнитном поле 3,35 Тл под воздействием микроволнового излучения (93,950 ГГц). Через 4 часа поляризацию прекращали, и образец растворяли, используя установку для растворения согласно WO-A-02/37132, в водном растворе гидроксида натрия и трис(гидроксиэтил)аминометана (TRIS) с получением нейтрального раствора гиперполяризованного  $^{13}\text{C}_1$ -пирувата натрия с общей концентрацией пирувата 0,5 М в 100 мМ TRIS-буфере. Хроматографическую колонку последовательно соединяли с установкой для растворения. Данная колонка состоит из картриджа (диаметр = 38 мм; высота = 10 мм), содержащего гидрофобный наполнитель (Bondesil-C18, 40UM Part #:12213012), поставляемый фирмой Varian. Растворенный образец прокачивали через колонку, которая избирательно адсорбировала радикал. Фильтрованный раствор быстро анализировали методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР для оценки поляризации и получили  $^{13}\text{C}$  поляризацию 16,5%. Затем концентрацию остаточного радикала анализировали на УФ-спектрофотометре при 469 нм и определили, что она ниже предела детектирования 0,1 мкМ.

Пример 4. Получение гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата способом ДПЯ с использованием  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты и натриевой соли трис(8-карбокситетра(гидроксиэтокси)метил-бенз[1,2-d:4,5-d']бис(1,3)дитиол-4-ил)-метила

Натриевую соль трис(8-карбокситетра(гидроксиэтокси)метил-бенз[1,2-d:4,5-d']бис(1,3)-дитиол-4-ил)-метила синтезировали как описано в Примере 29 в WO-A-97/09633.

20 мМ раствор получали растворением натриевой соли трис(8-карбокситетра(гидроксиэтокси)метил-бенз[1,2-d:4,5-d']бис(1,3)-дитиол-4-ил)-метила в  $^{13}\text{C}_1$ -пировиноградной кислоте (83,1 мг). Образец перемешивали до гомогенного состояния, помещали в кювету для образца и вставляли в ДПЯ-поляризатор. Образец поляризовали в условиях ДПЯ при 1,2 К в магнитном поле 3,35 Тл под воздействием микроволнового излучения (93,950 ГГц).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сигнал от образца получали, используя ЯМР спектрометр Varian Inova-200. Усиление ДПЯ вычисляли, исходя из результатов измерения  $^{13}\text{C}$ -ЯМР сигнала при тепловом равновесии и усиленного ЯМР сигнала. Получили  $^{13}\text{C}$  поляризацию 16%.

Пример 5. Процедура визуализации сердца согласно изобретению

#### 5.1 Подготовка поросенка

Поросенка (25 кг) подвергали анестезии коктейлем, содержащим изотонический NaCl (26 об.%), кеталар (50 мг/мл) (Pfizer AB) (42 об.%), норкурон (10 мг + 5 мл стерильной воды) (Organon) (21 об.%) и мидазолам (5 мг/мл) (Pharma Hameln) (11 об.%), который вводили с использованием инфузионного

насоса со скоростью 0,6 мл/мин.

После первой инъекции  $^{13}\text{C}_1$ -пирувата поросенка извлекали из МР-сканера. Под рентгеновским контролем в левую коронарную артерию вставляли баллонный катетер, и огибающую артерию блокировали в течение периода 15 минут. На протяжении всей операции измеряли ЭКГ и кровяное давление. Через 90 минут после окончания ишемического периода поросенка вновь подвергали визуализации, и  $^{13}\text{C}$ -изображения получали с (примерно) того же самого места, где проводили контрольные измерения.

## 5.2 Протонная МР визуализация

Поросенка размещали в МР катушке для поросят (Rapid Biomedical, Germany) и подвергали визуализации с использованием стандартной клинической библиотеки последовательностей протонной МР визуализации сердца для получения анатомической информации и для получения вида ориентации миокарда вдоль короткой оси (см. эталонное протонное изображение на чертежах, чтобы увидеть пример вида вдоль короткой оси).

## 5.3 $^{13}\text{C}$ -МР визуализация

Исходя из протонной частоты, найденной МР системой, вычисляли МР частоту для  $^{13}\text{C}_1$ -аланина согласно следующему уравнению:

$$\text{Частота } ^{13}\text{C}_1\text{-аланина} = 0,25144 \times [(\text{системная частота протона} \times 1,00021) - 0,000397708].$$

Вычисленная частота позиционировала МР сигнал от  $^{13}\text{C}_1$ -аланина на резонанс с  $^{13}\text{C}_1$ -лактатным слева и с  $^{13}\text{C}_1$ -пируватным, и  $^{13}\text{C}_1$ -бикарбонатным, резонирующими справа от  $^{13}\text{C}_1$ -аланина. Выполняли последовательность нелокализованной МР спектроскопии, чтобы убедиться в том, что  $^{13}\text{C}$ -МР катушка и системная МР частота установлены правильно. Локализацию  $^{13}\text{C}$ -изображения позиционировали так, чтобы охватить миокард (вид вдоль короткой оси) (толщина среза 20 мм, размер пиксела в плоскости  $7,5 \times 7,5 \text{ мм}^2$ ). В фазе реконструкции видеоданные заполняли нулями, чтобы в результате иметь разрешение  $3,75 \times 3,75 \times 20 \text{ мм}^3$ . 16 мл  $^{13}\text{C}_1$ -пирувата (327 мМ) инъецировали (0,22 ммоль/кг) внутривенно за период времени 12 с (1,3 мл/с) в переднюю ногу и через 30 с после начала инъекции (т.е. через 18 с после окончания инъекции) начинали  $^{13}\text{C}$ -МР последовательность химических сдвигов.

## 5.4 Анализ данных МР визуализации

МР визуализация дала матрицу, содержащую  $16 \times 16$  элементов, в которой каждый элемент, или воксел/пиксел, содержит  $^{13}\text{C}$ -МР спектр. В фазе реконструкции матрицу заполняли нулями до  $32 \times 32$ , что является математической операцией, которая помогает улучшить пространственное разрешение. Совокупность данных анализировали на МРВ сканере с программным обеспечением, предоставленным производителем. Результаты представляют собой метаболические изображения  $^{13}\text{C}$ -пирувата,  $^{13}\text{C}$ -аланина,  $^{13}\text{C}$ -лактата и  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната.

## 5.5 Результаты

Результаты эксперимента до и после окклюзии огибающей артерии показаны и суммированы на прилагаемых чертежах.

На Фиг.1 представлены изображения и спектр, полученные у поросенка перед ишемическим периодом, при этом

Фиг.1а демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -пирувата,

Фиг.1б демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -лактата,

Фиг.1в демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -аланина,

Фиг.1г демонстрирует протонное эталонное анатомическое изображение,

Фиг.1д демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната, и

Фиг.1е демонстрирует  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектр пиксела, выбранного из изображения, показанного на Фиг.1д.

Фиг.2 демонстрирует изображения и спектр, полученный от поросенка после ишемического периода, при этом

Фиг.2а демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -пирувата,

Фиг.2б демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -лактата,

Фиг.2в демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -аланина,

Фиг.2г демонстрирует протонное эталонное анатомическое изображение,

Фиг.2д демонстрирует изображение  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната, и

Фиг.2е демонстрирует  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектр пиксела, выбранного из изображения, показанного на Фиг.2д.

Эти чертежи показывают, что нет различий в протонном эталонном изображении до и после ишемического периода. Кроме того, сильно сниженный бикарбонатный сигнал (по сравнению с контролем) и положительный контраст для лактатного сигнала указывают подверженную риску ткань миокарда. Не видно различий между изображениями аланина и пирувата до и после ишемических периодов.

## 5.6 Заключение

Используя гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват в качестве визуализирующего агента в исследовании методом МР визуализации, можно идентифицировать подверженную риску ткань миокарда.

### Формула изобретения

1. Способ магнитно-резонансной (МР) визуализации для оценки жизнеспособности ткани миокарда, при котором в качестве визуализирующего агента используют гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват, включающий

(а) получение прямых  $^{13}\text{C}$ -МР изображений  $^{13}\text{C}$ -пирувата и его  $^{13}\text{C}$ -содержащих метаболитов аланина, лактата и возможно бикарбоната у субъекта, которому предварительно введена композиция, содержащая гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват,

(б) коррелирование  $^{13}\text{C}$  сигнала метаболита с  $^{13}\text{C}$  сигналом любого другого обнаруженного метаболита для получения контраста на основе разницы интенсивности сигналов двух, предпочтительно трех, наиболее предпочтительно четырех  $^{13}\text{C}$  метаболитов.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий

(в) идентификацию подверженной риску ткани миокарда на указанных изображениях путем идентификации самого слабого сигнала  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната и/или самого сильного сигнала  $^{13}\text{C}$ -лактата.

3. Способ по п.1, где гиперполяризованный  $^{13}\text{C}$ -пируват получают путем гиперполяризации  $^{13}\text{C}$ -пировиноградной кислоты и/или  $^{13}\text{C}$ -пирувата методом динамической поляризации ядер (ДПЯ).

4. Способ по п.1 где композиция, содержащая  $^{13}\text{C}$ -пируват, дополнительно содержит один или более чем один буфер, выбранный из группы, состоящей из ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), ACES, PIPES, имидазол/HCl, BES, MOPS, HEPPES, TES, TRIS, HEPPS и TRICIN.

5. Способ по п.1, где для получения прямых  $^{13}\text{C}$ -изображений на стадии (а) используют последовательности визуализации с множественным эхом для частотного кодирования информации.

6. Способ по п.1, где прямые  $^{13}\text{C}$ -изображения на стадии (а) получают через менее чем 400 с после введения композиции, содержащей  $^{13}\text{C}$ -пируват.



7. Способ по п.1, где для получения анатомической и/или перфузионной информации дополнительно получают одно или более чем одно протонное изображение с использованием или без использования контрастного агента для МРВ, или где дополнительно получают одно или более чем одно  $^{13}\text{C}$ -изображение с гиперполяризованным  $^{13}\text{C}$ -МР контрастным агентом.

8. Способ по п.7, где для определения относительной перфузии в миокарде дополнительно получают протонные изображения с использованием или без использования контрастного агента для протонной МРВ.

9. Способ по п.7, где для определения количественной перфузии в миокарде дополнительно получают  $^{13}\text{C}$ -изображения с использованием неметаболизируемого гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -МР контрастного агента.

10. Способ по п.7, где для определения количественной перфузии в миокарде дополнительно получают  $^{13}\text{C}$ -изображения с использованием гиперполяризованного  $^{13}\text{C}$ -пирувата.

11. Способ по п.1, где стадия (б) дополнительно включает корректирование лактатного сигнала в отношении количества бикарбоната с получением взвешенного лактата относительно бикарбонатного изображения.

12. Способ по п.11, дополнительно включающий

(в) идентификацию подверженной риску ткани миокарда на указанных изображениях путем идентификации самого слабого сигнала  $^{13}\text{C}$ -бикарбоната и/или самого сильного сигнала  $^{13}\text{C}$ -лактата.

13. Способ по пп.1-12, где  $^{13}\text{C}$ -пируват представляет собой  $^{13}\text{C}_1$ -пируват.

## РИСУНКИ

