



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 123 449**

② Número de solicitud: 9700496

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: G01R 33/48

A61B 5/055

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **06.03.97**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.99**

Fecha de concesión: **02.07.99**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.99**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.09.99**

⑰ Titular/es: **Universidad Nacional de  
Educación a Distancia  
Bravo Murillo, 38 - 4ª Pta.  
28015 Madrid, ES  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑱ Inventor/es: **Ballesteros García, Paloma;  
Gil González, M<sup>a</sup> Soledad;  
Zaderenko Partida, Paula;  
Cerdán García-Esteller, Sebastián;  
Alvarez Pérez, José;  
Gillies, Robert J.;  
Natarajan, Raghumand;  
Van Sluis, Robert y  
Bhjjwala, Zaver**

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Procedimiento para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por resonancia magnética con indicadores extrínsecos conteniendo <sup>1</sup>H ó <sup>19</sup>F.**

㉖ Resumen:

Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo <sup>1</sup>H ó <sup>19</sup>F. El abordaje consiste en la obtención de una imagen o espectro MR de cualquier propiedad de MR sensible al pH de moléculas impermeables a la membrana. Normalmente se utiliza el desplazamiento químico de un núcleo localizado en, o en la proximidad de, un grupo ionizable de una molécula no permeante como "resonancia informadora del pH" en el espacio extracelular. Varios métodos de MR (CSI-imagen selectiva del desplazamiento químico o SI-imagen espectroscópica) permiten la determinación de la distribución en el espacio de la "resonancia informadora", y por tanto la distribución del pH extracelular en la muestra. Esta información resulta útil, entre otras, en situaciones clínicas como las distrofias musculares, la isquemia, la transformación tumoral y las metástasis.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 123 449 B1

## DESCRIPCION

Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por resonancia magnética con indicadores extrínsecos conteniendo  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$ .

5

**Sector de la técnica**

Medicina Física, Sector Farmacéutico, Investigación Biomédica, Diagnóstico por imagen.

**Estado de la técnica**

10

Las aplicaciones biomédicas de la Resonancia Magnética (MR) han experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas (1). Se han utilizado tanto la Espectroscopia (MRS) como la Imagen (MRI) por Resonancia Magnética para estudiar no invasivamente procesos fisiológicos y patológicos en animales y seres humanos (2). También ha sido posible extender las aplicaciones de la MR a estudios sobre la fisiología y patología al nivel celular (3). Tomados en su conjunto, estos avances han hecho posible estudiar por MR, de una manera integrada, algunos aspectos fundamentales de la Biología y la Medicina, incluyendo la proliferación y diferenciación celular y la transformación tumoral. Estos procesos ocurren con cambios concomitantes en el pH intra y extracelular. Adicionalmente, el pH es una variable fisiológica crucial en otros procesos fundamentales como el ejercicio y la fatiga muscular, el control metabólico y la transducción del mensaje hormonal (4).

20

La concentración de protones intracelulares es el resultado del balance entre los procesos de producción y consumo intracelular de protones, la captación ó extrusión de protones al medio extracelular y la capacidad de tamponamiento intracelular (5). Dado que esta última es normalmente constante, un aumento en la producción de protones intracelulares se puede compensar por la extrusión de ácido ó captación de base del medio extracelular y un aumento en la producción intracelular de base se podría compensar por el mecanismo opuesto. Por tanto, cambios en el pH extracelular reflejan normalmente modificaciones en el pH intracelular y las medidas del pH extracelular proporcionan una herramienta muy útil para monitorizar alteraciones en la homeostasis del pH intracelular.

30

Los métodos disponibles actualmente para la determinación del pH en muestras biológicas incluyen métodos potenciométricos (electrodos de pH), técnicas radiométricas, métodos ópticos y abordajes de Resonancia Magnética (ver ref. 6 para una revisión). La utilización de una sonda molecular impermeable a la membrana, ya sea radioactiva, cromófora, fluorescente, fosforescente ó activa en MR permite a cualquiera de estos métodos medir exclusivamente el pH extracelular. Sin embargo, entre la variedad de los métodos disponibles, tan sólo la MR permite la obtención de imágenes no invasivas de la totalidad del volumen tridimensional de muestras ópticamente opacas. Estas características hacen de la MR el método de elección para la determinación no invasiva del pH extracelular en especímenes biológicos. En esta patente describimos el uso y aplicaciones de una nueva serie de moléculas indicadoras que permiten la determinación del pH intracelular y el pH extracelular por métodos de MRS y MRI.

40

Los abordajes previos han utilizado principalmente  $^{31}\text{P}$  MRS y el desplazamiento químico del fosfato inorgánico para la medida del pH intracelular en suspensiones celulares, órganos perfundidos, tejidos, animales intactos o incluso seres humanos (7). Una variante de este método ha permitido medir exclusivamente el pH extracelular por 1D- $^{31}\text{P}$  MRS en suspensiones de células utilizando fosfonatos impermeables a la membrana plasmática (8). Por otro lado, se han propuesto técnicas de  $^{31}\text{P}$  MRS localizada que permiten obtener espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN de una región espacial especificada (voxel) dentro de un animal intacto, y así determinar por el desplazamiento químico del  $\text{P}_i$ , el pH intracelular promedio en la región seleccionada (9-11). También se han desarrollado metodologías de imagen multivoxel por  $^{31}\text{P}$  MRS. Estas técnicas permiten obtener simultáneamente, espectros de  $^{31}\text{P}$  RMN de una colección de voxels adyacentes que cubren completamente el volumen tridimensional del espécimen, proporcionando así, mapas tridimensionales de la distribución del pH a través de la muestra (12-16).

45

A pesar de estos progresos, la aplicación de los métodos de  $^{31}\text{P}$  MRS para la determinación del pH ha estado tradicionalmente limitada por la baja sensibilidad del núcleo de  $^{31}\text{P}$ . Así, los métodos de  $^{31}\text{P}$  MRS requieren tiempos de adquisición largos y tamaños de voxel grandes para obtener una adecuada relación señal/ruido. Estas dos circunstancias reducen significativamente la resolución temporal y espacial de la medida de pH por  $^{31}\text{P}$  MRS. Ambas limitaciones se pueden aliviar mediante el uso de  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$ , dos núcleos inherentemente más sensibles en MR que  $^{31}\text{P}$  (17). Este aumento de sensibilidad de  $^1\text{H}$  ( $^{19}\text{F}$ ) MRS frente a  $^{31}\text{P}$  MRS permitiría obtener espectros ó imágenes 1-D, 2-D ó 3-D, similares a los de  $^{31}\text{P}$  en señal/ruido, pero 4(3), 16(12), o 64(43) veces más rápido que con  $^{31}\text{P}$  MRS. También se podría obtener, utilizando  $^1\text{H}$  ( $^{19}\text{F}$ ) MRS una reducción significativa del tamaño de voxel empleado en adquisiciones con

60

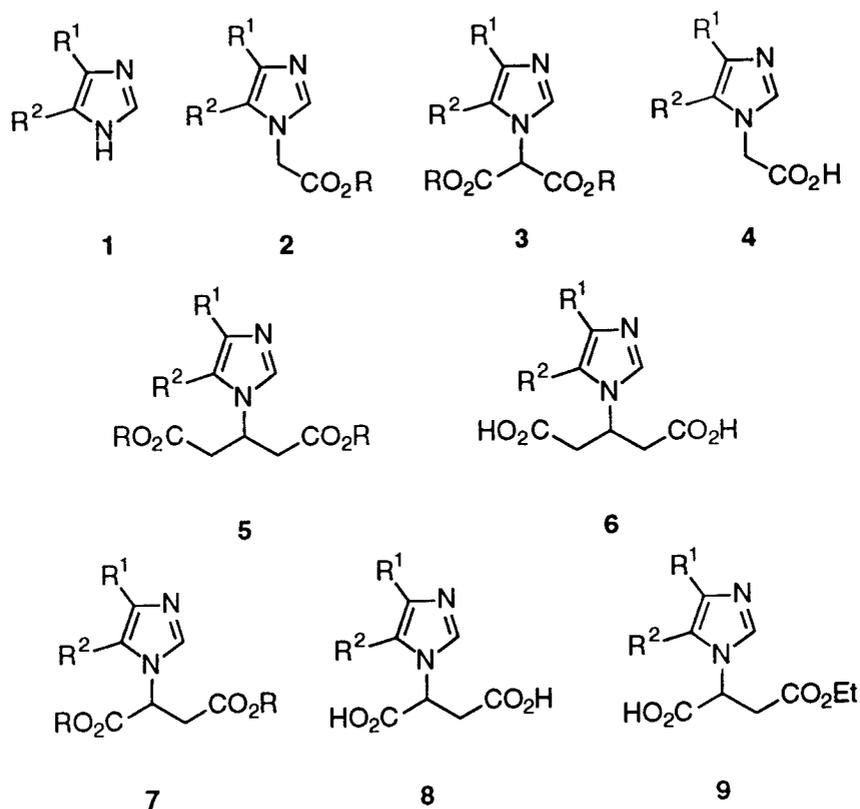
$^{31}\text{P}$  MRS, manteniendo las mismas condiciones de señal/ruido. Sin embargo, la presencia de metabolitos intrínsecos conteniendo resonancias de  $^1\text{H}$  apropiadas es excepcional (18) y no existen naturalmente metabolitos conteniendo  $^{19}\text{F}$ . Estas circunstancias hacen indispensable el uso de sondas extrínsecas conteniendo núcleos de  $^1\text{H}$  (19) ó  $^{19}\text{F}$  (20) sensibles al pH para poder implementar con éxito las técnicas de  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$  MRS ó MRI en la medida del pH intracelular.

### Breve descripción de la invención.

Algunos de nosotros hemos descrito recientemente la síntesis de una nueva serie de indicadores para la medida del pH intracelular, pH extracelular y volumen celular por  $^1\text{H}$  RMN en suspensiones celulares (21-23). En esta patente, se describen algunas propiedades farmacológicas y toxicológicas de estas moléculas útiles para su empleo como indicadores de pH en cultivos celulares y animales enteros y se demuestran los procedimientos de obtención de imágenes del pH tanto *in vitro* en sistemas modelo como *in vivo* en ratones portadores de tumores RIF-1. La utilización de estos nuevos indicadores en conjunción con tecnologías de  $^1\text{H}$  MR como la imagen de desplazamiento químico (CSI) ó la imagen espectroscópica (SI) permiten una disminución considerable en los tiempos de adquisición y un aumento significativo en la resolución de las medidas de pH en comparación con los métodos previos basados en la utilización de  $^{31}\text{P}$  MR.

### 20 Descripción detallada de la invención.

El esquema 1 muestra las estructuras de algunas moléculas indicadoras útiles en medidas del pH por  $^1\text{H}$  MRS. Los compuestos más relevantes como sondas permeables para la medida simultánea del pH intra- y extracelular son; el imidazol (1,  $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$ ) y el ácido imidazol-1-ilacético (4,  $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$ ), y como sonda no permeable para medidas del pH extracelular; el ácido imidazol ( $\pm$ )-3-(etoxicarbonil) propiónico (9,  $\text{R}^1=\text{R}^2=\text{H}$ ,  $\text{R}=\text{Et}$ ).



## Esquema 1

$R^1$  y  $R^2$  se refieren a hidrógeno o a cualquier sustituyente alquilo conteniendo o no  $^{19}F$ . R se refiere a cualquier sustituyente alquilo.

La preparación y propiedades RMN de algunas de estas moléculas se han descrito en detalle previamente (21-23). En general, la medida del pH se basa en la determinación del desplazamiento químico del protón H2 de estos compuestos que actúa como "resonancia informadora" en el medio biológico y su comparación con el desplazamiento químico del protón H2 del mismo compuesto en soluciones modelo de pH conocido. La Figura 1 muestra la dependencia del desplazamiento químico del protón H2 del compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) con el pH. Una extensión de este procedimiento consiste en obtener imágenes MR del protón H2. Estas imágenes se pueden obtener por medio de una excitación selectiva de H2 y posterior codificación en imagen (métodos de desplazamiento químico-CSI) ó mediante la excitación no selectiva de todo el espectro de protón en diversos voxels contiguos que cubren toda la muestra (métodos de imagen espectroscópica-SI). Ambos métodos revelan la distribución espacial de la resonancia H2 de estos compuestos en la muestra y por tanto la distribución del pH.

En esta invención, describimos la utilización de estos compuestos para la obtención de imágenes y espectros de  $^1H$  RMN que revelan el pH extracelular en diversos sistemas biológicos; incluyendo orgánulos subcelulares y células aisladas ó cultivadas de animales o plantas, órganos perfundidos, animales intactos y seres humanos. Estos dos últimos aspectos en particular requieren una exploración de la toxicidad y farmacocinética de estos compuestos así como una demostración fehaciente de la eficacia de los procedimientos de obtención de imágenes de pH *in vitro* e *in vivo*. Esta patente describe; 1) las propiedades toxicológicas de algunas sondas útiles de pH extracelular 2) las cinéticas de distribución en sangre e incorporación a tejidos del compuesto menos tóxico de esta nueva serie y 3) los procedimientos *in vitro* e *in vivo* de imagen MR de desplazamiento químico (CSI) e imagen espectroscópica (SI) que permiten obtener imágenes MR del pH extracelular en muestras modelo y en ratones portadores de tumores RIF-1.

*Estudios de toxicidad en cultivos celulares y ratones.*

La toxicidad de los compuestos 5 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ), 6 ( $R^1=R^2=H$ ) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) se determinó en cultivos celulares utilizando el siguiente procedimiento. Se crecieron fibroblastos de ratón NIH 3T3 en el medio esencial de cultivo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS, Hyclone, Logan, Utah, USA). Una vez alcanzada la confluencia, se añadieron al medio de cultivo los compuestos 5 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ), 6 ( $R^1=R^2=H$ ) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) en un intervalo de concentraciones de 0 a 20mM. Después, de 72h de incubación, se determinó el número de células supervivientes en el cultivo mediante el método de Gillies y cols. (24). Los resultados se presentan en la Tabla 1. El compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) no resultó tóxico, puesto que los números de células viables en presencia de 20 mM 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ), no fueron significativamente diferentes del control (0 mM). Sin embargo, el compuesto 5 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) mostró una fuerte toxicidad, induciendo muerte celular casi completa en concentraciones de 15 mM (DL<sub>50</sub> 6,8 mM). Finalmente, el compuesto 6 ( $R^1=R^2=H$ ) mostró una toxicidad moderada, con una reducción significativa del número de células viables observable tan sólo en la concentración más alta de 20 mM.

TABLA 1

*Efecto de concentraciones crecientes de los compuestos 5 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ), 6 ( $R^1=R^2=H$ ) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) en la supervivencia celular.*

| Concentración (mM) | Compuesto 5 ( $R^1=R^2=H$ , $R=Et$ ) | Compuesto 6 ( $R^1=R^2=H$ ) | Compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ , $R=Et$ ) |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 0,0                | 1,54±0,04                            | 1,39±0,31                   | 1,65±0,12                            |
| 1,0                | 1,52±0,10                            | 1,50±0,22                   | 1,68±0,04                            |

## ES 2 123 449 B1

TABLA 1 (Continuación)

*Efecto de concentraciones crecientes de los compuestos 5 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ), 6 ( $R^1=R^2=H$ ) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) en la supervivencia celular.*

5

10

15

20

25

| Concentración (mM) | Compuesto 5 ( $R^1=R^2=H$ , $R=Et$ ) | Compuesto 6 ( $R^1=R^2=H$ ) | Compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ , $R=Et$ ) |
|--------------------|--------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 5,0                | 1,02±0,08                            | 1,34±0,11                   | 1,38±0,06                            |
| 10,0               | 0,37±0,08                            | 1,40±0,14                   | 1,52±0,13                            |
| 15,0               | 0,27±0,01                            | 1,29±0,13                   | 1,60±0,13                            |
| 20,0               | 0,20±0,05                            | 1,10±0,06                   | 1,54±0,09                            |

Las determinaciones de supervivencia celular se llevaron a cabo midiendo la densidad óptica media (una medida del número de células) como se indica en la ref. 24. Los resultados son media±SD de determinaciones en cuatro placas distintas por cada concentración.

30

35

40

También se determinó la toxicidad ( $LD_{50}$ ) de los compuestos 1 ( $R^1=R^2=H$ ), 4 ( $R^1=R^2=H$ ) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) en animales enteros. Estos resultados aparecen recogidos en la Tabla 2. Se inyectaron intraperitonealmente 1 ( $R^1=R^2=H$ ), 4 ( $R^1=R^2=H$ ) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) en ratones machos Swiss albino (30-40 g peso corporal) en dosis crecientes de hasta 3g/Kg peso corporal. Se utilizaron al menos siete dosis diferentes para cada compuesto administradas a seis ratones por cada dosis, colocando los seis ratones correspondientes a cada dosis en jaulas independientes. La  $LD_{50}$  se determinó una semana después de la inyección mediante el método de Miller and Tainter (25). El compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) que es, por sus propiedades RMN y su comportamiento en suspensiones de eritrocitos, un indicador muy útil del pH extracelular, no resultó tóxico hasta dosis de 3 g/Kg peso corporal, y se observó un comportamiento similar en el compuesto 4 ( $R^1=R^2=H$ ). El compuesto 1 ( $R^1=R^2=H$ ) resultó tóxico en el rango de concentraciones ensayadas, pero con una  $DL_{50}$  relativamente alta. Por tanto el compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) presenta propiedades toxicológicas muy apropiadas para su utilización como molécula indicadora del pH extracelular en animales y seres humanos.

45

TABLA 2

*Valores de  $LD_{50}$  para los compuestos 1 ( $R^1=R^2=H$ ), 4 ( $R^1=R^2=H$ ) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ )*

50

55

60

| Compuesto                 | $LD_{50}$ (mg/Kg peso corporal) |
|---------------------------|---------------------------------|
| 1( $R^1=R^2=H$ )          | 250                             |
| 4( $R^1=R^2=H$ )          | > 3000                          |
| 9( $R^1=R^2=H$ , $R=Et$ ) | > 3000                          |

Las determinaciones de LD<sub>50</sub> se llevaron a cabo por el método de Miller y Tainter (25).

#### *Farmacocinética.*

5 La Figura 2 (paneles A-F) muestra los cambios de concentración de los compuestos 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H) y 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et) en el plasma y en diversos tejidos después de la administración de 1mmol de estos compuestos a ratas adultas. En el experimento que muestra el panel 2A, se inyectaron 0,5 ml de una solución 2M de 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H; pH:7,0) o 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et; pH:7,0) en la vena yugular derecha de ratas macho Wistar (277-312 g peso corporal) y se extrajeron muestras de sangre (0,2 ml) de la vena  
10 yugular izquierda, antes de la inyección y después de 1, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 minutos. Se prepararon las correspondientes muestras de plasma, se liofilizaron, se resuspendieron en 0,5 ml D<sub>2</sub>O (99,9%D) y se analizaron por <sup>1</sup>H NMR (360,13 MHz, 22°C, pH 7,2).

El compuesto 1(R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H) desapareció más lentamente (t<sub>1/2</sub>= 17 min) del plasma que el com-  
15 puesto 9(R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et, t<sub>1/2</sub>= 6 min). Las concentraciones más altas de 1(R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, 1,5 mM) y 9(R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et, 6,6 mM) se alcanzaron, 2 min y 1 min después de la inyección, respectivamente. No se observaron síntomas de toxicidad durante el experimento.

Los paneles 2B-2F muestran las cinéticas de incorporación de 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H) y 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et)  
20 en diferentes tejidos. En estos experimentos, se inyectó 1 mmol de 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H) ó 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et) a tiempo 0 en la vena yugular derecha de ratas Wistar (machos adultos, 250-300 g peso corporal). A los tiempos indicados, se sacrificaron los animales, se aislaron los órganos indicados, y se prepararon y analizaron extractos de metabolitos solubles en ácido perclórico (6%) y por <sup>1</sup>H NMR (360,13 MHz, 22°C, pH 7,2) según hemos descrito previamente (21). Las concentraciones de los compuestos en cada tejido se  
25 determinaron comparando las intensidades de los protones imidazólicos del compuesto con la intensidad de la resonancia del TSP utilizado como referencia interna (1 mM), corrigiendo en todos los casos para la cantidad de tejido extraído.

El compuesto 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H) se encontró en todos los tejidos analizados, alcanzando concentraciones  
30 relativamente altas (μmols/g peso corporal) en el cerebro (15,1), corazón (12,8), músculo esquelético (5,3), riñón (12,1) e hígado (2,2). Las concentraciones alcanzadas en los tejidos fueron superiores a las alcanzadas en plasma (panel 2A) indicando que 1 tiende a acumularse en los espacios intracelulares. Después de abandonar el plasma, las concentraciones más altas de 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H) se encontraron primero  
35 en hígado (10 min), después en músculo esquelético y corazón (10-20 min) y finalmente en cerebro y riñón (30 min). En contraste, 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et), no se pudo detectar en el cerebro, se detectaron trazas en hígado (<0,2) y corazón (<0,5) y alcanzó concentraciones comparables a 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H) en  
40 músculo esquelético (5,8) y riñón (13,9). Las trazas de 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et) encontradas en corazón e hígado reflejan muy probablemente la contaminación con sangre en estos órganos. Las concentraciones máximas de 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et) en tejidos se alcanzaron primero en el riñón (a los 10 min) y después  
45 en el músculo esquelético (a los 20 min). Tan sólo en el riñón 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et) alcanza una concentración similar a la detectada en plasma, indicando que este compuesto es un buen marcador del espacio extracelular especialmente en el cerebro, hígado y corazón. Por último 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et) alcanzó su concentración más alta en riñón más rápidamente que 1 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H), pero en el músculo esquelético  
ocurrió lo contrario.

#### *Imágenes de pH por Resonancia Magnética; <sup>1</sup>H CSI y <sup>1</sup>H SI.*

La Figura 3 muestra la obtención de una imagen de pH utilizando <sup>1</sup>H CSI (imagen de desplazamiento  
50 químico) y el compuesto 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et). Esta es, hasta lo que conocemos, la primera imagen de la distribución espacial del pH tomada con técnicas de CSI y una sonda molecular extrínseca. En este experimento, se colocó una solución 0,3M de 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et; pH 7,4) en agua en un tubo de RMN de 5mm que contenía en su interior un capilar de 2mm de diámetro lleno de agua. Se obtuvo una imagen de RMN de un corte coronal perpendicular al eje mayor del tubo, utilizando una sonda comercial  
55 de microimagen (Bruker Analytische Messtechnik, Rheinstetten, Alemania) provista de un inserto para tubos de 5 mm y un dispositivo de gradientes magnéticos ortogonales protegidos activamente contra corrientes de Eddy. Las condiciones de adquisición fueron, 8.4 Teslas de Campo Magnético estático (B<sub>0</sub>), 22°C de temperatura, 500 μ de sección perpendicular al eje z, excitación selectiva de la resonancia H2 de 9 (R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H, R=Et; 8,04 ppm) mediante una secuencia de eco de espín y codificación en imagen del  
60 eco resultante utilizando un gradiente de lectura constante (eje x) y un gradiente de fase variable (eje y), respectivamente (12,13). La imagen de desplazamiento químico muestra que la resonancia H2 está presente exclusivamente en la porción más externa del tubo, sin contaminar apreciablemente el espacio

ocupado por el capilar coaxial que contiene exclusivamente agua. Dado que la distribución de la resonancia H2 es uniforme en el espacio periférico al capilar, es posible concluir que el pH de 7.4 revelado por la resonancia H2 de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) es homogéneo en toda la solución. Este resultado demuestra que es posible obtener una imagen de aquellas regiones de una muestra que muestran idéntico pH utilizando métodos de CSI y la resonancia H2 del compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ). Se pueden obtener resultados similares utilizando las otras sondas indicadas en el esquema 1 ó extender estos resultados a nuevas sondas conteniendo  $^{19}F$  mediante  $^{19}F$  CSI.

Finalmente, llevamos a cabo experimentos de imagen espectroscópica (SI) de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) en ratones portadores de tumores. Se inocularon subcutáneamente 0,5 ml de tampón Hank's conteniendo  $1 \times 10^6$  células de Fibrosarcoma inducido por radiación (RIF-1) en los flancos de ratones C3H/Hen de 6-8 semanas de edad. Se dejaron crecer los tumores durante 1-2 semanas hasta alcanzar volúmenes de 400-900  $mm^3$ , determinados con medidas en tres direcciones ortogonales del tumor. Se prepararon los ratones para el experimento de imagen espectroscópica con una inyección intraperitoneal de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ; 0,15 ml de una solución 1M pH=7,0). Dos a cinco minutos después de la inyección, se anestesiaron los ratones con cetamina (50 mg/Kg) y acepromazina (5mg/Kg), inmovilizándolos en una camilla para animales con una bobina solenoidal de  $^1H$  apropiada para su utilización en el imán horizontal de 4,7 Teslas. Se ayudó a mantener la temperatura corporal del ratón anestesiado mediante una bolsa de agua caliente recirculante colocada debajo del ratón.

La camilla para animales y la bobina de  $^1H$  están diseñadas para espectroscopia e imagen de  $^1H$  en general y no contienen características específicas para la utilización de los derivados de imidazol como sonda de pH extracelular. Se pueden utilizar otros diseños y sondas equivalentes con igual facilidad para este propósito. La imagen espectroscópica se adquirió utilizando la secuencia BASSALE (15,16).

La imagen espectroscópica (SI) mostrada en la Figura 4 se obtuvo de voxels de tamaño  $2 \times 2 \times 4$   $mm^3$ . Cada espectro ( $x1,y1$ ) hasta ( $x12,y12$ ) representa un voxel diferente en el tumor. La parte superior (12 ppm-5,5 ppm) muestra la distribución espacial de una de las resonancias de los protones imidazólicos de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ; ver voxels  $x10-y8$ ,  $x11-y8$ ,  $x10-y7$  y  $x11-y7$ ). La parte inferior muestra la distribución de la resonancia del agua (a 4,7 ppm) en los mismos voxels.

Se puede calcular un valor para el pH en cada voxel a partir de los espectros de la parte superior y las curvas de titulación de los desplazamientos químicos de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) frente a pH (20, ver Figura 1). Dado que los desplazamientos químicos de este protón no son iguales en cada voxel y que 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) permanece en el espacio extracelular, la variación entre los diversos voxels del desplazamiento químico de 9 refleja heterogeneidad de pH en las diversas zonas del tumor.

En resumen, los resultados presentados en esta patente demuestran un nuevo procedimiento para obtener imágenes de la distribución del pH extracelular en muestras biológicas, no transparentes, utilizando una nueva serie de indicadores extrínsecos y métodos de Resonancia Magnética. Mostramos que algunos de estos indicadores no son tóxicos y permiten determinaciones de pH mediante métodos de imagen de desplazamiento químico (CSI) ó imagen espectroscópica (SI) en volúmenes de hasta 0,2  $\mu l$  con resoluciones de pixel de  $20 \mu \times 20 \mu$  en un campo magnético de 8,4 Teslas. Los resultados de la aplicación de esta metodología *in vivo* en ratones portadores de tumores han proporcionado las primeras evidencias de heterogeneidad de pH *in situ* en tumores RIF-1 implantados en ratones C3H/Hen.

## Bibliografía

- Andrew, E.R., Bydder, G., Griffiths, J., Iles, R. y Styles, P. Eds. (1990) *Clinical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy*. John Wiley and Sons. New York.
- Gillies, R.J. Ed. (1994) *NMR in Physiology and Biomedicine*, Academic Press, New York.
- Gillies, R.J., Gallons, J.P., McGovern, K.A., Scherrer, P.G., Lien, Y.H., Job, C., R., Chapa, F., Cerdán, S. y Dale, B.E. (1993) *NMR in Biomedicine* 6,95-104.
- Roos, A. y Boron, W.F (1981) *Physiol. Rev* 61, 296-696.
- Moldes, M., Cruz, F., Chapa, F. y Cerdán S. (1995) *Quart. Mag. Res. in Biol. Med.* 2,5-17.
- Henderson, R.M. y Graf, J (1988) In pH Homeostasis: Mechanisms and Control (Häussinger, D. Ed.) Academic Press, pg 5-26.
- Moon, R.B. y Richards, J.H. (1973) *J. Biol. Chem* 248, 7276-7278.

## ES 2 123 449 B1

8. Gillies, R.J., Liu, Z. y Bhujwalla, Z (1994) *Am.J.Physiol.* 267,C195-C203.
9. Aue, W.P. (1986) *Rev. Mag. Res. Med.* 1:21-72.
- 5 10. Ordidge, R.J., Connelly, A. y Lohman, J.A.B. (1986) *J. Mag. Res.* 66:283-294.
11. Frahm, J., Bruhn, H., Gyngell, M.N.L., Merboldt, K.D., Hanike, W. y Sauter, R (1989) *Mag. Res. Med.* 9:79-93.
12. Brown, T.R., Kincaid, B.M. y Ugurbil, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:3523-3526.
- 10 13. Maudsley, A.A., Hilal, SK, Perman, W.H. y Simon, H.E. (1983). *J. Mag. Res.* 66:283-294.
14. Vigneron, D.B., Nelson, S.J., Nat, R, Murphy-Boesch, J.,Keiley, D.A.C., Kessler, H.B., Brown, T.R. y Taylor, J.S. (1990) *Radiology* 177:643-649.
- 15 15. Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1994) *Mag. Res. in Med.* 32, 277-84.
16. Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1993) *Mag. Res. in Med.* 30, 661-71.
17. Gadian, D.G. (1982) *Nuclear Magnetic Resonance and its applications to living systems.* Oxford University Press. pg 8.
- 20 18. Yoshizaki, K., Seo, Y. y Nishikawa, H. (1981) *Biochim. Bipphys. Acta.* 678, 283-291.
19. Rabenstein, D.L. e Isab, A. (1982) *Anal. Biochem.* 121, 423.
- 25 20. Deutsch, C., Taylor, J.S. y Wilson, D.F. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79, 7944.
21. Gil, M.S., Cruz, F., Cerdán, S. y Ballesteros, P. (1992) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2, 1117-1722.
22. Gil, M.S., Zaderenko, P., Cruz, F., Cerdán, S. y Ballesteros, P (1994) *Bioorg. Med. Chem.* 2,305-14.
- 30 23. Zaderenko, P, Gil, M.S., Ballesteros, P. y Cerdán, S. (1994) *J. Org. Chem.* (1994) 59,6268-73.
24. Gillies, R.J., Didier, N. y Denton, M. (1986) *Anal.Biochem.* 159:109-113.
25. Vallette, G. (1966) *Manual of Pharmacodynamics.* Masson et Cie, Eds. Paris, VI<sup>e</sup>, pg 70.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

REIVINDICACIONES

1. Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$ .

5

2. Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$  según la reivindicación 1, **caracterizados** por su utilización en fisiopatología de microorganismos, orgánulos subcelulares, células aisladas ó en cultivo, órganos perfundidos, animales intactos y seres humanos.

10

3. Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$  según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizados** por la utilización de la serie de compuestos 1-9 del esquema 1 como indicadores extrínsecos y  $^1\text{H}$  MRS,  $^1\text{H}$  MRI o cualquier combinación de estos métodos; ó  $^{19}\text{F}$ MRS y  $^{19}\text{F}$ FMRI si se incluye  $^{19}\text{F}$  como sustituyente en el indicador extrínseco.

15

4. Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$ . Según las reivindicaciones 1, 2, 3, **caracterizados** por sus aplicaciones de diagnóstico clínico en distrofias musculares, patologías isquémicas y en la evaluación de la respuesta a diversas terapias; en transformación tumoral benigna ó maligna, metástasis y en la evaluación de la respuesta tumoral a terapias; en fisiología y medicina del ejercicio y del deporte; o por extensión en cualquier otra situación fisiológica, patológica o terapéutica que involucre modificaciones en el pH intra y extracelular.

20

5. Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo  $^1\text{H}$  ó  $^{19}\text{F}$  según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 adaptados para la medida del pH intracelular y obtención de imágenes del pH intracelular mediante el uso de indicadores del esquema 1 modificados para permanecer atrapados en el espacio intracelular.

25

30

35

40

45

50

55

60

**Descripción detallada de los dibujos.**

Figura 1

Curva de titulación del compuesto 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ) en  $D_2O$  (99,9%D). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del protón H2 se midieron por  $^1H$  MRS (360,13 MHz, 22°C) con respecto a TSP interno a 0 ppm. Las medidas de pH no están corregidas para el efecto del D.

Figura 2

Concentraciones en plasma y tejidos de 1 ( $R^1=R^2=H$ , puntos blancos) y 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ , puntos negros) después de la inyección intravenosa de 1 mmol de cada compuesto en ratas macho Wistar. A: Plasma, B: Hígado, C: Corazón, D: Músculo esquelético (gastrocnemio izquierdo), E: Cerebro y F: Riñón.

Figura 3

Imagen de pH 7,2 de un objeto modelo. Esta imagen muestra las regiones del espécimen que tienen pH=7,2. El objeto es un tubo de RMN de 5 mm de diámetro con una solución 0,3M de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ , pH 7,2) que contiene insertado un capilar de 2mm de diámetro con agua destilada. La imagen se obtuvo a 8,4 Teslas utilizando una secuencia convencional de eco de spin con excitación selectiva de la señal del protón H2 (8,08 ppm) en una sección coronal con  $500\mu$  de espesor (eje z). En el dominio del tiempo se recogieron 256 ecos, conteniendo 256 puntos/eco cada uno en presencia de un gradiente constante de lectura (eje x) y de 256 incrementos del gradiente de fase (eje y), respectivamente. La imagen se obtuvo después de una transformación de Fourier bidimensional de la matriz resultante (256x256) utilizando cálculo de magnitud. En la adquisición se empleó una sonda comercial Bruker equipada con gradientes protegidos activamente y un inserto de 5mm. El tamaño del voxel es (x,y,z)  $20\mu \times 20\mu \times 500\mu$  (0.2  $\mu$ L de volumen) conteniendo 60 nmols de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ). Nótese que el capilar interno que contiene agua (a 4,8 ppm) no muestra sangrado de señal H2. El tiempo de adquisición fue aproximadamente 60 minutos.

Figura 4

Imágenes espectroscópicas (SI) de la distribución de 9 ( $R^1=R^2=H$ ,  $R=Et$ ; A) y agua (B) en un tumor RIF-1 implantado en ratones C3H/Hen. La imagen se obtuvo a 4,7 Tesla como se indica en las referencias 15 y 16.

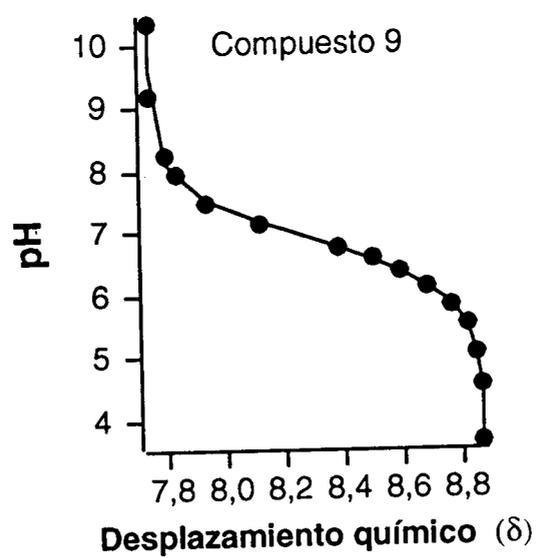


Figura 1

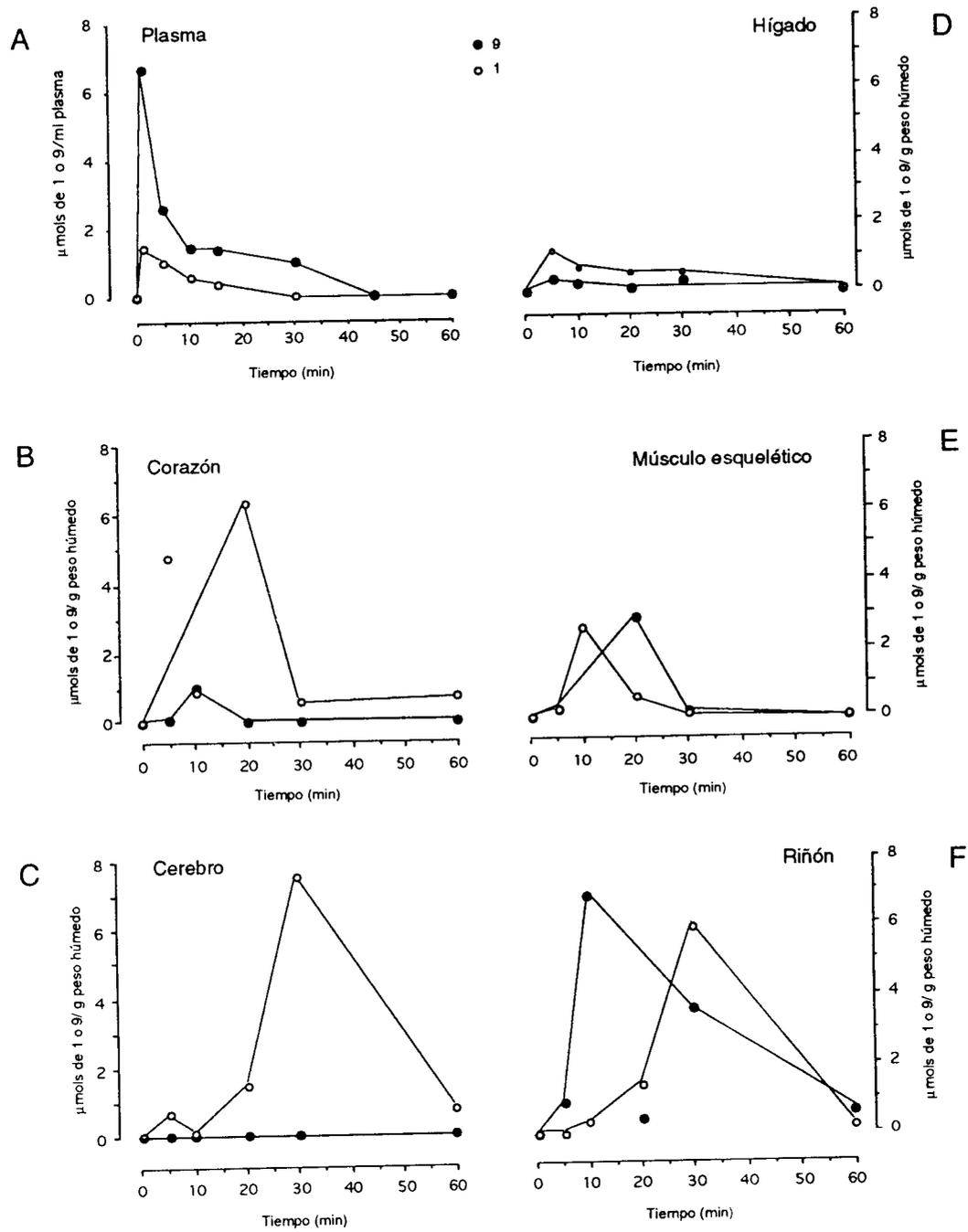
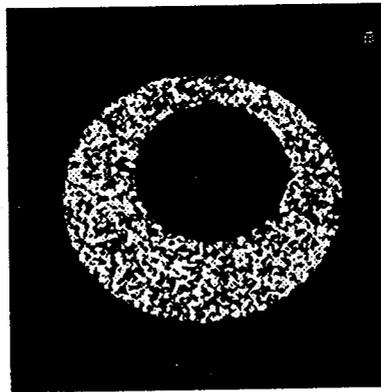


Figura 2



**Figura 3**

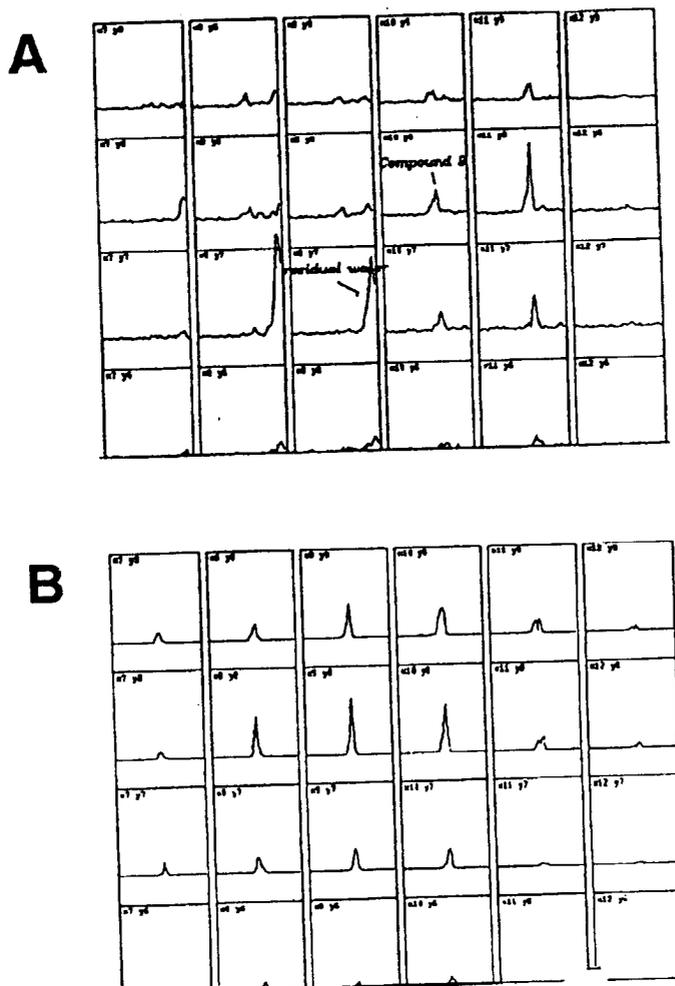


Figura 4



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: G01R 33/48, A61B 5/055

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| P,X       | US 5639906 A (LONDON et al.) 17.06.1997, columna 3, línea 6 - columna 15, línea 40; columna 35, línea 35 - columna 44, línea 49. | 1                          |
| P,A       |  | 2,4,5                      |
| X         | EP 0368429 A (SCHERING A.G.) 16.05.1990, página 3, línea 1 - página 11, línea 11; página 46, líneas 15-48.                       | 1                          |
| A         |  | 2,4,5                      |
| A         | WO 9517910 A (BRACCO S.P.A.) 06.07.1995, reivindicaciones 1,9.   | 1,2                        |
| A         | EP 0095124 A (BRUKER MEDIZINTECHNIK) 30.11.1983, reivindicación 2; página 12, líneas 1-25.                                       | 1,2                        |
| A         | WO 9604249 A (SRI INTERNATIONAL) 15.02.1996, todo el documento.  | 1,3,4                      |
| A         | WO 9303771 A (MALLINCKRODT MEDICAL) 04.03.1993   |                            |

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

23.11.98

**Examinador**

A. Cardenas Villar

**Página**

1/1