

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 058**

51 Int. Cl.:
G01R 33/485 (2006.01)
G01R 33/56 (2006.01)
A61B 5/055 (2006.01)
A61K 49/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05771198 .8**
96 Fecha de presentación: **28.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1784227**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE VISUALIZACIÓN DE IMÁGENES RM PARA LA DISCRIMINACIÓN ENTRE TEJIDO SANO Y TUMORAL.**

30 Prioridad:
30.07.2004 NO 20043226

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.01.2012

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

72 Inventor/es:
**THANING, Mikkel y
ZANDT, René in't**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 372 058 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de visualización de imágenes RM para la discriminación entre tejido sano y tumoral

La invención se refiere a un procedimiento de visualización de imágenes del tumor por medio de ¹³C-piruvato hiperpolarizado como agente de visualización de imágenes RM, el procedimiento permite la discriminación entre el tejido tumoral y tejido sano.

La visualización de imágenes de resonancia magnética (RM) (MRI) es una técnica de visualización de imágenes que se ha vuelto particularmente atractiva para los médicos ya que permite obtener imágenes del organismo del paciente o sus partes de una manera no invasiva y sin exponer al paciente y al personal médico a radiación potencialmente perjudicial tal como rayos X. Debido a sus imágenes de alta calidad, MRI es la técnica de visualización de imágenes favorable de tejido blando y órganos y permite la discriminación entre tejido normal y enfermo, por ejemplo, tumores y lesiones.

La visualización de imágenes por RM del tumor se puede realizar con o sin agentes de contraste RM. En una imagen RM tomada sin agente de contraste, los tumores de aproximadamente 1-2 centímetros de tamaño y más grandes se mostrarán en forma relativamente clara. Sin embargo, MRI mejorado por contraste permite visualizar cambios de tejido mucho menores, es decir, se pueden detectar tumores mucho más pequeños lo que convierte a la visualización de imágenes RM mejorada por contraste en una poderosa herramienta para la detección precoz del estadio del tumor y la detección de metástasis.

Se han usado varios tipos de agentes de contraste en la visualización de imágenes RM del tumor. Los quelatos metálicos paramagnéticos hidrosolubles, por ejemplo, quelatos de gadolinio como Omniscan™ (Amersham Health) son agentes de contraste RM ampliamente usados. Debido a su peso molecular bajo se distribuyen rápidamente en el espacio extracelular (es decir, la sangre y el intersticio) si se administran en la vasculatura. Se eliminan relativamente rápido del organismo. Se ha hallado que los quelatos de gadolinio son especialmente útiles para aumentar la velocidad de detección de metástasis, tumores pequeños, y mejorar la clasificación del tumor, esto último al permitir la diferenciación de tejido tumoral vital (bien perfundido y/o deterioro de la barrera hematoencefálica) de la necrosis central y del edema circundante o tejido no involucrado macroscópicamente (ver, por ejemplo C. Claussen et al., *Neuroradiology* 1985; 27: 164-171).

A la inversa, los agentes de contraste RM en la sangre, por ejemplo las partículas de óxido de hierro superparamagnéticas, son retenidas en la vasculatura durante un tiempo prolongado. Se ha demostrado que son extremadamente útiles para mejorar el contraste en el hígado pero también para detectar anomalías de permeabilidad, por ejemplo, paredes capilares "filtrantes" en los tumores, por ejemplo, como resultado de la angiogénesis.

A pesar de las excelentes propiedades indiscutibles de los agentes de contraste mencionados anteriormente, su uso no está exento de riesgos. Si bien los complejos de quelato metálico paramagnético usualmente tienen constantes de estabilidad altas, es posible que se liberen iones metálicos tóxicos en el organismo después de la administración. Además, estos tipos de agente de contraste muestran escasa especificidad.

El documento WO-A-99/35508 desvela un procedimiento de investigación por RM de un paciente mediante el uso de una solución hiperpolarizada de un agente T₁ alto como agente de visualización de imágenes RM. El término "hiperpolarización" significa potenciar la polarización nuclear de los núcleos activos de RMN presentes en el agente de T₁ alto, es decir, núcleos con espín nuclear no cero, preferentemente núcleos de ¹³C- o ¹⁵N. Después de potenciar la polarización nuclear de los núcleos activos de RMN, la diferencia de población entre los estados de espín nuclear excitado y fundamental de estos núcleos está significativamente aumentada y de este modo la intensidad de señal de RM se amplifica con un factor de cien y mayor. Cuando se usa un agente de T₁ alto con ¹³C hiperpolarizado y/o enriquecido en ¹⁵N, no habrá esencialmente interferencia de las señales del fondo ya que la abundancia natural de ¹³C y/o ¹⁵N es despreciable y de este modo el contraste de la imagen será muy ventajoso. Se desvela una variedad de posibles agentes T₁ altos adecuados para la hiperpolarización y posterior uso como agentes de visualización de imágenes RM, que incluyen pero sin limitación compuestos no endógenos y endógenos como acetato, piruvato, oxalato o gluconato, azúcares como glucosa o fructosa, urea, amidas, aminoácidos como glutamato, glicina, cisteína o aspartato, nucleótidos, vitaminas como ácido ascórbico, derivados de penicilina y sulfonamidas. Se establece adicionalmente que los intermedios en los ciclos metabólicos normales tales como ciclo del ácido cítrico como ácido fumárico y ácido pirúvico son agentes de visualización de imágenes preferidos para la visualización de imágenes de la actividad metabólica. El artículo Gould, P, *Diagnostic Imaging*, de junio de 2004 desvela un procedimiento para la discriminación entre tejido sano y tumoral, que comprende obtener las imágenes de ¹³C-RM directas de ¹³C-piruvato y sus metabolitos alanina y lactato que contienen ¹³C de un sujeto al que se preadministró una composición que comprende ¹³C-piruvato hiperpolarizado.

Se debe destacar que la señal de un agente de visualización de imágenes hiperpolarizado decae debido a la relajación y – tras la administración al organismo del paciente - dilución. En consecuencia el valor T₁ de los agentes de visualización de imágenes en los fluidos biológicos (por ejemplo, sangre) debe ser suficientemente alto para permitir que el agente se distribuya en el sitio blanco en el organismo del paciente en un estado altamente

hiperpolarizado.

Los inventores han hallado de modo sorprendente un procedimiento para la visualización de imágenes RM del tumor que permite la discriminación entre tejido tumoral y tejido sano en que el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se usa como agente de visualización de imágenes.

5 En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento para la discriminación entre tejido sano y tumoral, dicho procedimiento comprende

(a) obtener una imagen de ^{13}C -RM de ^{13}C -piruvato, una imagen de ^{13}C -RM de su metabolito alanina que contiene ^{13}C y una imagen ^{13}C -RM de su metabolito lactato que contiene ^{13}C de un sujeto al que se preadministró una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado,

10 (b) corregir la imagen de lactato para la cantidad de piruvato y/o alanina por la multiplicación de la imagen de lactato por la imagen invertida de piruvato y/o alanina, una señal de imagen alta dentro de dicha(s) imagen(es) de lactato corregida es indicativa de tejido tumoral.

La hiperpolarización de los núcleos ^{13}C activos por RMN se puede lograr por diferentes procedimientos (por ejemplo, como se describe en el documento WO-A-99/35508), los procedimientos preferidos son transferencia de la polarización a partir de un gas noble, "fuerza bruta", refrigeración del espín y DNP. Para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, se prefiere polarizar ^{13}C -piruvato directamente o polarizar ácido ^{13}C -pirúvico y convertir el ácido ^{13}C -pirúvico polarizado en ^{13}C -piruvato, por ejemplo, por la neutralizaron con una base.

Una manera preferida para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es la transferencia de polarización a partir de un gas noble hiperpolarizado. Los gases nobles que tienen espín nuclear no cero se pueden hiperpolarizar, es decir, tener su polarización aumentada respecto de la polarización en equilibrio, por ejemplo por el uso de luz polarizada circular. Un gas noble hiperpolarizado, preferentemente He o Xe, o una mezcla de tales gases, se pueden usar para efectuar la hiperpolarización de los núcleos de ^{13}C . La hiperpolarización también se puede obtener por el uso de un gas noble hiperpolarizado isotópicamente enriquecido, preferentemente ^3He o ^{129}Xe . El gas hiperpolarizado puede estar en fase gaseosa, se puede disolver en un líquido/disolvente, o el gas hiperpolarizado mismo puede actuar como un disolvente. De modo alternativo, el gas se puede condensar en una superficie sólida refrigerada y usar en esta forma, o dejar sublimar. Se prefiere la mezcla íntima del gas hiperpolarizado con el compuesto por polarizar. En consecuencia, si el ácido ^{13}C -pirúvico está polarizado, que es un líquido a temperatura ambiente, el gas hiperpolarizado preferentemente se disuelve en un líquido/disolvente o actúa como un disolvente. Si ^{13}C piruvato está polarizado, el gas hiperpolarizado se disuelve preferentemente en un líquido/disolvente, que también disuelve el piruvato.

Otra manera preferida para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es que la polarización sea impartida a los núcleos activos RMN por equilibrio termodinámico a temperatura muy baja y campo alto. La hiperpolarización en comparación con el campo operativo y la temperatura del espectrómetro RMN se efectúa por el uso de un campo muy alto y temperatura muy baja (fuerza bruta). La fuerza de campo magnético usada debería ser la máxima posible, en forma adecuada mayor que 1 T, preferentemente mayor que 5 T, más preferentemente 15 T o más y de especial preferencia 20 T o más. La temperatura deber ser muy baja, por ejemplo 4,2 K o menos, preferentemente 1,5 K o menos, más preferentemente 1,0 K o menos, de especial preferencia 100 mK o menos.

Otra manera preferida para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es el procedimiento de refrigeración del espín. Este procedimiento abarca la polarización del espín de un compuesto sólido o sistema por polarización por refrigeración del espín. El sistema está dopado con o mezclado íntimamente con materiales paramagnéticos tales como iones Ni^{2+} , lantánidos o actínidos en forma de cristal con un eje de simetría del orden de tres o más. La instrumentación es más simple que la requerida para DNP sin necesidad de un campo magnético uniforme ya que no se aplica un campo de excitación por resonancia. El procedimiento se lleva a cabo por rotación física de la muestra alrededor de un eje perpendicular a la dirección del campo magnético. El prerrequisito para este procedimiento es que las especies paramagnéticas tengan un factor g altamente anisotrópico. Como resultado de la rotación de la muestra, la resonancia paramagnética del electrón se pondrá en contacto con los espines nucleares, lo que lleva a una disminución de la temperatura del espín nuclear. La rotación de la muestra se lleva a cabo hasta que la polarización del espín nuclear ha alcanzado un nuevo equilibrio.

En una realización más preferida, el procedimiento DNP (polarización nuclear dinámica) se usa para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. La polarización se efectúa con un compuesto paramagnético, el llamado agente paramagnético o agente de DNP. Durante el procedimiento DNP, se proporciona energía, normalmente en la forma de radiación de microondas, que inicialmente excitará el agente paramagnético. Después del decaimiento al estado fundamental, existe una transferencia de la polarización del electrón no apareado del agente paramagnético al núcleo activo de RMN de la muestra. En general, se usa un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja en el procedimiento de DNP, por ejemplo por la realización del procedimiento DNP en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. De modo alternativo, se puede emplear un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se obtiene un aumento de la polarización suficiente. La técnica de DNP, por ejemplo, se describe en los documentos WO-A-98/58272 y en WO-A-01/96895. Para obtener ^{13}C -piruvato

hiperpolarizado por el procedimiento DNP, se puede usar ^{13}C -piruvato y/o ácido ^{13}C -pirúvico, como el compuesto para polarizar.

5 El uso de ácido ^{13}C -pirúvico y/o ^{13}C -piruvato depende principalmente del agente paramagnético empleado en el procedimiento DNP. Si el agente paramagnético es soluble en ácido ^{13}C -pirúvico, se usa entonces preferentemente ácido ^{13}C -pirúvico y una mezcla líquida, preferentemente se forma una solución líquida con el agente paramagnético y ácido ^{13}C -pirúvico. Si el agente paramagnético no es soluble en ácido ^{13}C -pirúvico, entonces se usan ^{13}C -piruvato y/o ácido ^{13}C -pirúvico y al menos un co-disolvente para formar una mezcla líquida, preferentemente una solución líquida. Se ha hallado que el éxito del DNP y de este modo el nivel de polarización es dependiente del compuesto por polarizar y el agente paramagnético que está en contacto íntimo con el otro. En consecuencia el co-disolvente es
10 preferentemente un co-disolvente o mezcla co-disolvente que disuelve tanto el agente paramagnético como el ácido ^{13}C -pirúvico y/o ^{13}C -piruvato. En el ^{13}C -piruvato se usa preferentemente agua como un co-disolvente.

Además, se ha hallado que se obtienen niveles de polarización más altos por el procedimiento de DNP cuando la mezcla de la muestra después del enfriamiento/congelamiento forma un vidrio más que una forma cristalizada. Nuevamente, la formación de un vidrio permite un contacto más íntimo del agente paramagnético y el compuesto por
15 polarizar. El ácido ^{13}C -pirúvico es un buen formador de vidrio y por ende se usa preferentemente en el procedimiento DNP, a condición de que el agente paramagnético sea soluble en ácido ^{13}C -pirúvico. El ^{13}C -piruvato es una sal y una mezcla líquida de una solución acuosa de ^{13}C -piruvato y un agente paramagnético producirá una muestra cristalizada después de congelar. Para evitar esto, se prefiere añadir co-disolventes adicionales que son buenos formadores de vidrio como glicerol, propanodiol o glicol.

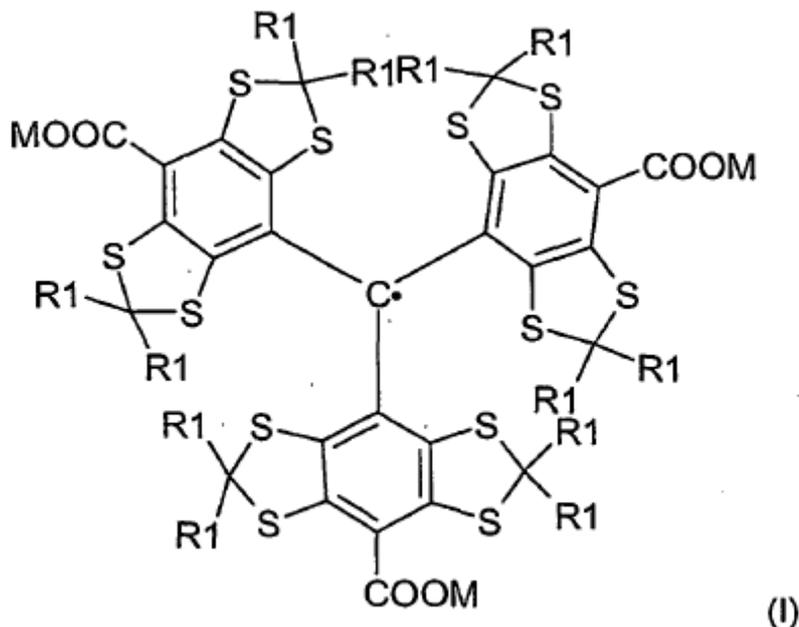
20 En consecuencia, en una realización, ^{13}C -piruvato se disuelve en agua para obtener una solución acuosa y se añade un agente paramagnético, glicerol y opcionalmente un co-disolvente adicional para formar una mezcla líquida. En una realización preferida, el ácido ^{13}C -pirúvico, un agente paramagnético y un co-disolvente se combinan para formar una mezcla líquida. En una realización más preferida, el ácido ^{13}C -pirúvico y un agente paramagnético se combinan para formar una mezcla líquida. La mezcla íntima de los compuestos se puede lograr por varios medios conocidos en la técnica, tales como agitación, agitación con vórtex o sonicación.
25

La mezcla líquida posteriormente se congela antes de realizar el procedimiento DNP. El enfriamiento/congelamiento de la mezcla líquida se puede lograr por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo por congelado de la mezcla líquida en nitrógeno líquido o simplemente por colocación en el polarizador, en el que el helio líquido congelará la muestra.

30 Como se describió previamente, la polarización nuclear dinámica (DNP) es un procedimiento de polarización en la que la polarización del compuesto por polarizar se efectúa con un agente de DNP, es decir, un agente/compuesto paramagnético.

Muchos compuestos paramagnéticos conocidos se pueden usar como agentes de DNP, por ejemplo metales de transición tales como iones cromo (V), radicales libres orgánicos tales como radicales nitróxido, radicales tritilo o
35 partículas magnéticas. Tales agentes de DNP por ejemplo se describen en los documentos WO-A-99/35508, WO-A-88/10419, WO-A-90/00904, WO-A-91/12024, WO-A-93/02711 o WO-A-96/39367.

En una realización preferida, un radical tritilo de fórmula (I)



en la que

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

5 R^1 que es igual o diferente representa un grupo alquilo C_1-C_6 de cadena lineal o ramificada opcionalmente hidroxilado o un grupo $-(CH_2)_n-X-R_2$, en el que n es 1, 2 o 3; X es O o S y R_2 es un grupo alquilo C_1-C_4 de cadena lineal o ramificada opcionalmente hidroxilado

se usa como el agente paramagnético para obtener ^{13}C -piruvato por el procedimiento DNP.

10 En una realización preferida, M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable. El término "catión fisiológicamente tolerable" indica un catión que es tolerado por el organismo animal vivo humano o no humano. Preferentemente, M representa hidrógeno o un catión alcalino, un ion amonio o un ion de amina orgánica, por ejemplo meglumina. Con máxima preferencia, M representa hidrógeno o sodio.

En una realización preferida adicional, R_1 es igual o diferente, preferentemente igual y representa un grupo alquilo C_1-C_4 de cadena lineal o ramificada opcionalmente hidroxilado, con máxima preferencia metilo, etilo, isopropilo, hidroximetilo o hidroxietilo.

15 En una realización preferida adicional, R_1 es igual o diferentes, preferentemente igual y representa $-CH_2-O$ -(alquilo C_1-C_3), $-(CH_2)_2-O-CH_3$, $-(alquilo C_1-C_3)-O-CH_3$, $-CH_2-S$ -(alquilo C_1-C_3), $-(CH_2)_2-S-CH_3$, $-(alquilo C_1-C_3)-S-CH_3$, $-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-O-C_2H_5$, $-CH_2-O-C_2H_4OH$, $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-S-CH_3$, $-CH_2-S-C_2H_5$, $-CH_2-S-C_2H_4OH$ o $-CH_2-CH_2-S-CH_3$, con máxima preferencia $-CH_2-CH_2-O-CH_3$.

En una realización más preferida, M representa hidrógeno o sodio y R_1 es igual y representa $-CH_2-CH_2-O-CH_3$.

20 Los radicales tritilo de fórmula (I) se pueden sintetizar como se describe en detalle en los documentos WO-A-91/12024, WO-A-96/39367 y WO-A-98/39277. En breves palabras, los radicales se pueden sintetizar por la reacción de tres equivalentes molares de un compuesto arilo monomérico metalado con un equivalente molar de un derivado de ácido carboxílico protegido adecuadamente para formar un intermedio trimérico. Este intermedio se metaliza y posteriormente reacciona con, por ejemplo, dióxido de carbono para producir un tritil carbinol tri-carboxílico que, en una etapa posterior, se trata con un ácido fuerte para generar un catión triarilmetilo. Este catión posteriormente se reduce para formar un radical tritilo estable.

Una mezcla líquida que comprende ^{13}C -piruvato y/o ácido ^{13}C -pirúvico y opcionalmente un disolvente preferentemente contiene 5 a 100 mM de radicales tritilo de fórmula (I), más preferentemente 10 a 20 mM, de especial preferencia 12 a 18 mM y con máxima preferencia 13 a 17 mM.

30 Se ha hallado que el tiempo de desarrollo para la polarización en el procedimiento DNP es más corto por medio del uso de cantidades mayores de radical, sin embargo, el nivel de polarización alcanzable es menor. En consecuencia, estos dos efectos se deben equilibrar entre sí.

La técnica de DNP por ejemplo se describe en el documento WO-A-98/58272 y el documento WO-A-01/96895. En general, se usan un campo magnético moderado y bajo y una temperatura muy baja en el procedimiento DNP, por ejemplo por la realización del procedimiento DNP en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. De modo alternativo, se pueden emplear un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se logra una polarización suficiente. En una realización preferida del procedimiento de la invención, el procedimiento DNP se realiza en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1T o superior. Las unidades de polarización adecuadas por ejemplo se describen en el documento WO-A-02/37132. En una realización preferida, la unidad de polarización comprende un criostato y medios de polarización, por ejemplo una cámara de microondas conectada por una guía de onda a una fuente de microondas en un orificio central rodeado por un campo magnético que produce medios tales como un imán superconductor. El orificio se extiende verticalmente hacia abajo a al menos el nivel de una región P cerca del imán superconductor en el que la fuerza del campo magnético es suficientemente alta, por ejemplo entre 1 y 25 T, para que ocurra la polarización de los núcleos ^{13}C . El orificio de la muestra es preferentemente sellable y se puede evacuar a presiones bajas, por ejemplo presiones del orden de 1 mbar o menos. Un medio introductor de muestra (es decir, la mezcla que comprende el agente paramagnético y ^{13}C -piruvato y/o ácido ^{13}C -pirúvico) tal como un tubo transportador de muestras removible puede estar contenido dentro del orificio y este tubo se puede insertar desde la parte superior del orificio hacia abajo a una posición dentro de la cámara de microondas en la región P. La región P se enfría con helio líquido a una temperatura suficientemente baja para que ocurra la polarización, preferentemente temperaturas del orden de 0,1 a 100 K, más preferentemente 0,5 a 10 K, con máxima preferencia 1 a 5 K. El medio introductor de muestra es preferentemente sellable en su extremo superior de cualquier forma adecuada para retener el vacío parcial en el orificio. Un recipiente de retención de muestra, tal como una copa de retención de muestra, se puede proveer de modo removible dentro del extremo inferior del medio introductor de la muestra. El recipiente retenedor de muestra preferentemente se fabrica de un material de peso liviano con una baja capacidad de calor específica y buenas propiedades criogénicas tales como, por ejemplo Kelf (policlorotrifluoroetileno) o PEEK (poliéter-étercetona). El recipiente de muestra puede contener una o más muestras por polarizar.

La muestra se inserta en el recipiente retenedor de muestra, se sumerge en el helio líquido y se irradia con microondas, preferentemente a una frecuencia de aproximadamente 94 GHz a 200 mW. El nivel de polarización se puede controlar por la obtención de señales de ^{13}C -RMN de estado sólido de la muestra durante la irradiación de microondas, en consecuencia se prefiere el uso de una unidad polarizante que contiene medios para obtener los espectros de ^{13}C -RMN en estado sólido de la etapa b). En general, se obtiene una curva de saturación en un gráfico que muestra la señal de ^{13}C -RMN versus tiempo. En consecuencia, es posible determinar cuándo se alcanza el nivel de polarización óptimo.

Si la hiperpolarización se realiza por un procedimiento que requiere que la muestra esté en estado sólido, por ejemplo por el procedimiento DNP, la muestra sólida se debe transferir al estado líquido para emplearla en el procedimiento de la invención. La mezcla polarizada sólida se disuelve, como por ejemplo se describe en el documento WO-A-02/37132 o se funde, como se describe, por ejemplo en el documento WO-A-02/36005. Se prefiere la disolución de la muestra hiperpolarizada sólida, más preferida es la disolución en un tampón, preferentemente un tampón fisiológicamente tolerable, para obtener una composición líquida. El término "tampón" en el contexto de esta solicitud indica uno o más tampones, es decir, también las mezclas de tampones.

Los tampones preferidos son tampones fisiológicamente tolerables, más preferentemente tampones que regulan en el intervalo de aproximadamente pH 7 a 8 como por ejemplo, el tampón fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), ACES, PIPES, imidazol/HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, HEPPS o TRICIN. Los tampones más preferidos son tampón fosfato y TRIS, de máxima preferencia es TRIS. En otra realización, se usa más de uno de los tampones preferidos mencionados anteriormente, es decir, una mezcla de tampones.

Cuando se usó el ácido ^{13}C -pirúvico como el compuesto por polarizar, la disolución también abarca la conversión de ácido ^{13}C -pirúvico a ^{13}C -piruvato. Para obtener esto, el ácido ^{13}C -pirúvico se hace reaccionar con una base. En una realización, el ácido ^{13}C -pirúvico se hace reaccionar con una base para convertirse en ^{13}C -piruvato y posteriormente se añade un tampón. En otra realización preferida el tampón y la base se combinan en una solución y esta solución se añade al ácido ^{13}C -pirúvico, y lo disuelve y convierte en ^{13}C -piruvato al mismo tiempo. En una realización preferida, la base es una solución acuosa de NaOH, Na_2CO_3 o NaHCO_3 , de máxima preferencia la base es NaOH. En una realización particularmente preferida, una solución de tampón TRIS que contiene NaOH se usa para disolver ácido ^{13}C -pirúvico y convertirlo en la sal sódica del ^{13}C -piruvato.

En otra realización preferida, el tampón o – cuando sea aplicable – la solución combinada de tampón/ base además comprende uno o más compuestos que se pueden unir o complejar con iones paramagnéticos libres, por ejemplo agentes quelantes como DTPA o EDTA. Se ha hallado que los iones paramagnéticos libres pueden causar el acortamiento del T_1 del compuesto hiperpolarizado, lo que preferentemente se evita.

La disolución se puede realizar preferentemente por el uso de procedimientos y/o dispositivos desvelados en el documento WO-A-02/37132. Si la hiperpolarización se realizó por el procedimiento DNP, se puede usar una unidad de disolución que está separada físicamente del polarizador o es una parte de un aparato que contiene el polarizador y la unidad de disolución. En una realización preferida la disolución se realiza en un campo magnético elevado para aumentar la relajación y retener un máximo de la hiperpolarización. Los nodos del campo se deben

evitar y el campo bajo puede conducir al aumento de la relajación a pesar de las medidas anteriores.

Si la hiperpolarización se realiza por el procedimiento DNP, el agente paramagnético y/o sus productos de reacción preferentemente se eliminan de la solución que contiene ^{13}C -piruvato. El agente paramagnético y/o los productos de reacción se pueden eliminar en forma parcial, sustancial o idealmente completa, se prefiere la eliminación completa. Los productos de reacción de por ejemplo los radicales trilito de la fórmula (I) podrían ser ésteres que se pueden formar después de la reacción del ácido pirúvico con los radicales de fórmula (I) que comprende grupos hidroxilo. Los procedimientos que se pueden usar para eliminar el agente paramagnético y/o sus productos de reacción son conocidos en la técnica. En general, los procedimientos aplicables dependen de la naturaleza del agente paramagnético y/o sus productos de reacción. Después de la disolución de la muestra sólida después de la polarización, el radical podría precipitar y se puede separar fácilmente de la composición líquida por filtración. Si se usan partículas magnéticas como agentes paramagnéticos, estas partículas también se eliminan fácilmente por filtración. Si no ocurre la precipitación, el agente paramagnético se puede eliminar por las técnicas de separación cromatográfica, por ejemplo, cromatografía en fase líquida tipo fase inversa, fase directa o cromatografía de intercambio iónico o por extracción.

Debido a que los radicales trilito de fórmula (I) tienen un espectro de absorción UV/visible característico, es posible usar la medición de absorción UV/visible como un procedimiento para examinar su existencia en la composición líquida después de su eliminación. A fin de obtener resultados cuantitativos, es decir, la concentración del radical presente en la muestra hiperpolarizada disuelta, se puede calibrar el espectrómetro óptico de modo que la absorción en una longitud de onda específica de una muestra produzca la correspondiente concentración de radical de la muestra.

El enriquecimiento isotópico del ^{13}C -piruvato usado en el procedimiento de la invención - y/o el ácido ^{13}C -pirúvico que se usa preferentemente para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado por el procedimiento DNP, es preferentemente al menos 75%, más preferentemente al menos 80% y de especial preferencia al menos 90%, de máxima preferencia es un enriquecimiento isotópico de más de 90%. En forma ideal, el enriquecimiento es 100% de ácido ^{13}C -pirúvico y/o el ^{13}C -piruvato puede estar isotópicamente enriquecido en la posición C1 (indicados a continuación $^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_1$ -piruvato), en la posición C2 (indicados a continuación $^{13}\text{C}_2$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_2$ -piruvato), en la posición C3 (indicados a continuación $^{13}\text{C}_3$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_3$ -piruvato), en la posición C1 y la posición C2 (indicados a continuación $^{13}\text{C}_{1,2}$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato), en las posiciones C1 y C3 (indicados a continuación $^{13}\text{C}_{1,3}$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_{1,3}$ -piruvato), en la posición C2 y C3 (indicados a continuación $^{13}\text{C}_{2,3}$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_{2,3}$ -piruvato) o en la posición C1, C2 y C3 (indicados a continuación $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -piruvato); se prefiere la posición C1.

Varios procedimientos para la síntesis de $^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico y $^{13}\text{C}_1$ -piruvato son conocidos en la técnica. En breves palabras, Seebach et al., Journal of Organic Chemistry 40(2), 1975, 231-237 describen una vía de síntesis que depende de la protección y activación de un material de partida que contiene carbonilo como un S, S-acetal, por ejemplo 1,3-ditiano o 2-metil-1,3-ditiano. El ditiano está metalado y reacciona con un compuesto que contiene metilo y/o $^{13}\text{CO}_2$. Mediante el uso del componente ^{13}C isotópicamente enriquecido apropiado como se ilustra en esta referencia, es posible obtener $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, $^{13}\text{C}_2$ -piruvato o $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato. La función carbonilo posteriormente se libera por el uso de procedimientos convencionales descritos en la bibliografía. Una vía de síntesis diferente comienza desde ácido acético, que se convierte primero en bromuro de acetilo y posteriormente reacciona con Cu^{13}CN . El nitrilo obtenido se convierte en ácido pirúvico por medio de la amida (ver, por ejemplo S.H. Anker et al., J. Biol. Chem. 176 (1948), 1333 o J. E. Thirkettle, Chem Commun. (1997), 1025). Además, el ácido ^{13}C -pirúvico se puede obtener por la protonación de ^{13}C -piruvato de sodio disponible en el comercio, por ejemplo por el procedimiento descrito en la patente US 6.232.497.

Para su uso en el procedimiento de la invención, el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se proporciona como una composición que es adecuada para la administración a un organismo animal vivo humano o no humano. La composición preferentemente comprende un tampón o una mezcla de tampones como se describió anteriormente. La composición además puede comprender portadores, excipientes y auxiliares de la formulación farmacéuticamente aceptables convencionales. En consecuencia, la composición por ejemplo, puede incluir estabilizantes, agentes de ajuste de osmolalidad, agentes solubilizantes y similares.

El piruvato es un compuesto endógeno que es muy bien tolerado por el organismo humano, incluso en altas concentraciones. Como precursor en el ciclo del ácido cítrico, el piruvato cumple un importante papel metabólico en el organismo humano. El piruvato se convierte en compuestos diferentes: su transaminación produce alanina, por medio de la descarboxilación oxidativa, el piruvato se convierte en acetil-CoA y bicarbonato, la reducción del piruvato produce lactato y su carboxilación en oxaloacetato.

En la actualidad se ha hallado que la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado a ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado (solo en el caso del $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, de $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato o $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -piruvato) y ^{13}C -alanina hiperpolarizada se puede usar para la discriminación entre tejido tumoral y tejido sano por medio de la visualización de imágenes de RM *in vivo*. Esto es sorprendente ya que debe tenerse en cuenta que el T_1 de los compuestos hiperpolarizados decae debido a la relajación y dilución. El $^{13}\text{C}_1$ -piruvato tiene un T_1 de relajación en la sangre entera humana a 37°C de aproximadamente 42 s, sin embargo, se ha hallado que la conversión de ^{13}C -piruvato

- hiperpolarizado a ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es suficientemente rápida para permitir la detección de la señal del compuesto de ^{13}C -piruvato original y sus metabolitos. La cantidad de alanina, bicarbonato y lactato es dependiente del estado metabólico del tejido bajo investigación. La intensidad de señal RM del ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada se relaciona con la cantidad de estos compuestos y el grado de polarización obtenido en el tiempo de detección, de este modo por el control de la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado a ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es posible estudiar los procesos metabólicos *in vivo* en el organismo humano o animal no humano por medio de la visualización de imágenes RM no invasiva.
- Se ha hallado que las amplitudes de la señal de RM que surge de los diferentes metabolitos de piruvato varían de acuerdo con el tipo de tejido. El patrón único del pico metabólico formado por alanina, lactato, bicarbonato y piruvato se puede usar como huella digital para el estado metabólico del tejido bajo examen y de este modo permite la discriminación entre tejido sano y tejido tumoral. Esto hace una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, un agente excelente para la visualización de imágenes RM *in vivo* del tumor.
- En general, el sujeto bajo examen, por ejemplo paciente o animal, se ubica en el imán de RM. Las bobinas de RF de ^{13}C -RM dedicadas se ubican para cubrir el área de interés.
- La composición que comprende ^{13}C -piruvato, se administra por vía parenteral, preferentemente intravenosa, intraarterial o directamente en la región u órgano de interés. La dosis y concentración de la composición de acuerdo con la invención dependerán de una variedad de factores tales como toxicidad, la capacidad de dirigirse al órgano y la vía de administración. En general, la composición se administra en una concentración de hasta 1 mmol de piruvato por kg de peso corporal, preferentemente 0,01 a 0,5 mmol/kg, más preferentemente 0,1 a 0,3 mmol/kg. La velocidad de administración es preferentemente menos que 10 ml/s, más preferentemente menos que 6 ml/min y con máxima preferencia de 5 ml/s a 0,1 ml/s. A menos de 400 s después de la administración, preferentemente menos de 120 s, más preferentemente menos de 60 s después de la administración, de especial preferencia 20 a 50 s después de la administración y con máxima preferencia 30 a 40 s después de la administración, se aplica una secuencia de visualización de imágenes RM que codifica el volumen de interés en una frecuencia combinada y vía selectiva espacial. Esto dará como resultado imágenes metabólicas de ^{13}C -lactato, ^{13}C -alanina y ^{13}C -piruvato y más preferentemente imágenes metabólicas de ^{13}C -lactato, ^{13}C -alanina, ^{13}C -bicarbonato y ^{13}C -piruvato. En el mismo período de tiempo, se puede obtener una imagen protónica con o sin un agente de contraste de MRI protónico para obtener la información anatómica y/o perfusión.
- La codificación del volumen de interés se puede lograr por medio de las llamadas secuencias de visualización de imágenes espectroscópicas que se describen por ejemplo, en 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). Los datos de la imagen espectroscópica contienen numerosos elementos del volumen en que cada elemento contiene un espectro de ^{13}C -RM completo. El ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos tienen su posición única en un espectro ^{13}C -RM y su frecuencia de resonancia se puede usar para identificarlos. La integral del pico en su frecuencia de resonancia se vincula directamente con la cantidad de ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos, respectivamente. Cuando la cantidad de ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito se estima mediante, por ejemplo, rutinas de ajuste del dominio de tiempo que se describen, por ejemplo en L. Vanhamme et al., J Magn Reson 129, 35-43 (1997), se pueden generar imágenes para ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito en el que la codificación del color o codificación del gris es representativa para la cantidad de ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito medidos.
- Si bien los procedimientos de visualización de imágenes espectroscópicas han demostrado su valor para producir las imágenes metabólicas mediante toda clase de núcleos de RM por ejemplo, ^1H , ^{31}P , ^{23}Na , la cantidad de repeticiones necesarias para codificar totalmente la imagen espectroscópica hace este abordaje más adecuado para el ^{13}C hiperpolarizado. Se debe tener cuidado de asegurar que la señal de ^{13}C hiperpolarizado está disponible durante la obtención de datos de RM totales. A expensas de una reducción de la señal a ruido, esto se puede obtener por la reducción del ángulo de pulso de RF que se aplica en cada etapa de codificación de fase. Los tamaños de matriz más altos requieren más etapas de codificación de fases y tiempos de barrido más largos.
- Los procedimientos de visualización de imágenes basados en el trabajo pionero de P. C. Lauterbur (Nature, 242, 190-191, (1973) y P. Mansfield (J. Phys. C. 6, L422-L426 (1973)), que implica aplicar un gradiente de lectura durante la obtención de los datos, permitirá imágenes de señal a ruido más altas o el equivalente, imágenes de mayor resolución espacial. Sin embargo, estos procedimientos de visualización de imágenes en su forma básica no podrán producir imágenes separadas para ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos pero una imagen que contiene las señales de ^{13}C -piruvato y todos sus metabolitos ^{13}C , es decir, la identificación de metabolitos no es posible.
- En una realización preferida, se usan secuencias de visualización de imágenes que utilizarán multiecos para codificar la información de frecuencia. Las secuencias que pueden producir imágenes ^1H de agua y grasa separadas por ejemplo se describen en G. Glover, J Magn Reson Imaging 1991;1:521-530 y S. B. Reeder et al., MRM 51 35-45 (2004). Debido a que los metabolitos detectados y como tal sus frecuencias RM son conocidas, el abordaje descrito en las referencias anteriores se puede aplicar para obtener imágenes directas de ^{13}C -piruvato, ^{13}C -alanina y ^{13}C -lactato y preferentemente ^{13}C -piruvato, ^{13}C -alanina, ^{13}C -lactato y ^{13}C -bicarbonato. Este procedimiento hace uso más

eficiente de la señal ^{13}C -RM hiperpolarizada, proporciona una mejor calidad de señal en comparación con la técnica de visualización de imágenes espectroscópica clásica, una mayor resolución espacial y tiempos de adquisición más rápidos.

5 El tejido tumoral a menudo se caracteriza por un aumento de perfusión y mayor actividad metabólica. El proceso de aumento del lecho vascular, angiogénesis, es inducido por células que debido a sus mayores necesidades metabólicas y/o sus distancias más grandes desde un capilar no pueden obtener suficientes sustratos que pueden proporcionar la energía necesaria para mantener la homeostasis energética. Es en esta área, en la que las células tienen problemas para producir suficiente energía, que se espera un cambio marcado en el patrón metabólico. El tejido con problemas para sostener la homeostasis de energía alterará su metabolismo energético que en particular produce un aumento de la producción de lactato. De modo sorprendente, es posible realizar este cambio en el metabolismo visible por medio de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado dentro de la ventana de tiempo corto de la visualización de imágenes RM disponible, es decir, por medio de la señal de ^{13}C -lactato alta en el área del tumor para discriminar el tumor del tejido sano. Debido a que la perfusión es heterogénea en el tejido tumoral, se prefiere corregir la señal de ^{13}C -lactato por la cantidad de piruvato (señal de ^{13}C -piruvato) disponible en la misma región. 10 Mediante esta corrección, se obtiene una imagen de lactato pesado respecto del piruvato. Esto permitirá poner énfasis en regiones del tejido con una señal de lactato alta relativa con respecto a la señal de piruvato y de este modo mejorar la discriminación entre tejido tumoral y tejido sano. 15

Para corregir la señal de piruvato, las imágenes de lactato y piruvato se normalizan al valor máximo en cada imagen individual. Segundo, la imagen de lactato normalizada se multiplica por la imagen de piruvato invertida, por ejemplo, 20 la señal de piruvato máxima en la imagen menos el nivel de piruvato para cada pixel. Como última etapa, el resultado intermedio obtenido en la operación anterior se multiplica por la imagen de lactato original.

Para enfatizar las regiones con metabolismo alterado, se puede usar la señal de ^{13}C -lactato alta en conexión con una señal de ^{13}C -alanina reducida en una operación similar a la que se describe en una operación similar en el párrafo anterior, a través de la cual se obtiene una imagen de lactato pesada respecto de la alanina. De modo sorprendente, la identificación del área tumoral, es decir, la discriminación entre tejido tumoral y tejido sano también mejora por esta corrección. Para corregir la señal de alanina, las imágenes de lactato y alanina se normalizan al valor máximo en cada imagen individual. Segundo, la imagen de lactato normalizada se multiplica por la imagen de alanina invertida, por ejemplo, la señal de alanina máxima en la imagen menos el nivel de alanina para cada pixel. . 25 Como última etapa, el resultado intermedio obtenido en la operación anterior se multiplica por la imagen de lactato original. De una manera similar, la señal de ^{13}C -bicarbonato también se puede incluir en el análisis. Además se puede incluir una imagen protónica obtenida con o sin un agente de contraste MRI protónico en el análisis para obtener información anatómica y/o perfusión. 30

En otra realización preferida, la composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se administra en forma repetida, de este modo permite estudios dinámicos. Esta es una ventaja adicional del procedimiento de acuerdo con la invención en comparación con otros procedimientos de visualización de imágenes RM del tumor que emplean agentes de visualización de imágenes RM que, debido a su circulación relativamente larga en el organismo del paciente, no permiten tales estudios dinámicos. 35

El procedimiento de acuerdo con la invención también se puede usar para la clasificación del tumor por RM *in vivo*. Las mismas imágenes metabólicas y/o imágenes metabólicas pesadas como se describe en los párrafos precedentes se pueden usar para este fin con categorías de corte apropiadas que se definen dependientes del tamaño tumoral y actividad metabólica. 40

Además, el procedimiento de acuerdo con la invención se puede usar para el control de la terapia tumoral de RM *in vivo*, por ejemplo por el control de los cambios directos en patrón de metabolismo de los tumores después del tratamiento con agentes antitumorales terapéuticos y/o tratamiento de radiación o en relación con cualquier tipo de técnicas de intervención con o sin ninguna clase de ablación, es decir, ablación química combinada con frecuencias de radio, microondas o ultrasonido. 45

La visualización de imágenes RM del tumor de acuerdo con el procedimiento de la invención puede ser influida y mejorada por la preparación del paciente o el animal de una manera que perturbará en general, el metabolismo de la proteína, metabolismo de lípidos o metabolismo de energía. Las maneras de obtener esto son conocidas en la técnica, por ejemplo por ayuno (por ejemplo de toda una noche), infusión de glucosa y similares. 50

En una realización preferida; el procedimiento de acuerdo con la invención se usa en la visualización de imágenes RM del tumor *in vivo*, control de la terapia del tumor y/o clasificación tumoral de los tumores de cerebro, tumores de mamas, tumores de colon, tumores de pulmón, tumores de riñón, tumores de cabeza y cuello, tumores de músculo, tumores de ovarios, tumores gástricos, tumores pancreáticos, tumores esofágicos y tumores de próstata. También se ha hallado que el procedimiento de acuerdo con la invención es especialmente útil para la visualización de imágenes RM del tumor *in vivo*, es decir, diagnóstico de tumor prostático y/o clasificación del tumor prostático y/o control de la terapia del tumor prostático. 55

Cuando un hombre se presenta al médico con síntomas de dolor o malestar urinario, se sospecha de cáncer de

próstata. Si el hombre es mayor de 50 años, se realiza una prueba de Antígeno Específico de Próstata (PSA). Se sospecha de cáncer de próstata sobre la base de un PSA elevado y/o Examen Rectal Digital anormal (DRE). Si la prueba de PSA es positiva, el paciente se remite a un especialista (un urólogo) para el diagnóstico por medio de una biopsia guiada por ultrasonido. De los dos millones de procedimientos de biopsias realizados en los EE.UU. y Europa, 5 de 6 y 2 de 3 son negativos, respectivamente. Cuando se detecta en una etapa temprana, la tasa de supervivencia de cinco años para estos pacientes es 100%. Debido a que el cáncer de próstata es el cáncer más común y la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres, existe una fuerte demanda médica de un procedimiento para el diagnóstico de tumores prostáticos que sea capaz de detectar tumores prostáticos en una etapa temprana y que pueda ayudar a reducir el número de procedimientos de biopsia. La visualización de imágenes ^{13}C de la próstata requiere una bobina de RF de ^{13}C de volumen de transmisión-recepción, preferentemente, se usa una bobina de RF de ^{13}C de volumen de transmisión en combinación con una bobina de RF endorrectal solo de recepción de RM y más preferentemente, se usa una bobina de RF de ^{13}C de volumen de matriz en fase de transmisión-recepción en combinación con una bobina de RF de ^{13}C endorrectal solo de recepción de RM. Especialmente preferidas son las bobinas que realizan la adquisición de una imagen de próstata ^1H posible después de la visualización de imágenes ^{13}C .

Ejemplos

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

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

Ejemplo 2: Producción de una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado por el procedimiento DNP mediante ácido ^{13}C -pirúvico y el radical tritilo del Ejemplo 1

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

La muestra se polarizó en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas se detuvo la polarización y la muestra se disolvió mediante un dispositivo de disolución de acuerdo con el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) para proporcionar una solución neutra de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato de sodio hiperpolarizado. La muestra disuelta se analizó rápidamente con ^{13}C -RMN para evaluar la polarización y se obtuvo una polarización ^{13}C de 19,0%.

Ejemplo 3: Producción de una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado por el procedimiento DNP mediante ácido ^{13}C -pirúvico y el radical tritilo del Ejemplo 1

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

La muestra se polarizó en las condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 4 horas se detuvo la polarización y la muestra se disolvió mediante un dispositivo de disolución de acuerdo con el documento WO-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) para proporcionar una solución neutra de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato de sodio hiperpolarizado con una concentración de piruvato total de 0,5 M en 100 mM de tampón TRIS. Se conectó una columna cromatográfica en serie con el dispositivo de disolución. La columna consiste en un cartucho (D = 38 mm; h = 10 mm) que contiene un material de empaquetado hidrófobo (Bondesil-C18, 40UM Part #: 12213012) provisto por Varian. La muestra disuelta fue empujada a través de la columna que adsorbió selectivamente el radical. La solución filtrada se analizó rápidamente con ^{13}C -RMN para evaluar la polarización, se obtuvo 16,5% de polarización ^{13}C . La

concentración de radical residual se analizó posteriormente con un espectrofotómetro UV a 469 nm y se determinó que es inferior al límite de detección de 0,1 µM.

Ejemplo 4: Producción de ¹³C-piruvato hiperpolarizado por el procedimiento DNP mediante ácido ¹³C-pirúvico y sal sódica de Tris (8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)metil-benzo[1,2-d:4,5-d']bis(1,3)ditiol-4-il)metilo

Se sintetizó la sal sódica de Tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)metil-benzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo como se describió en el Ejemplo 29 del documento WO-A-97/09633.

Se preparó una solución 20 mM por la disolución de la sal sódica de Tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)metil-benzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo en ¹³C₁-ácido pirúvico (83,1 mg). La muestra se mezcló a homogeneidad, se colocó en una copa de muestra y se insertó en el polarizador de DNP. La muestra se polarizó en las condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). La señal de ¹³C-RMN de la muestra se obtuvo mediante un espectrómetro Varian Inova-200 RMN. La mejora del DNP se calculó a partir de una medición de la señal de ¹³C-RMN en equilibrio térmico y la señal de RMN mejorada. Se obtuvo una polarización ¹³C de 16%.

Ejemplo 5: Visualización de imágenes del tumor por medio de una composición que comprende ¹³C-piruvato hiperpolarizado como agente de visualización de imágenes

5.1 Modelo animal del tumor y preparación del tumor

R3230AC es un adenocarcinoma mamario de rata que se puede mantener en ratas hembra Fischer 344. Para establecer el modelo de tumor animal, un vial de células R32030 congeladas que contienen RPMI 1640, 10% de FBS y 10% de DMSO se descongeló rápidamente a 37°C. A partir de este momento, la solución de células se transfirió a FBS y se añadieron volúmenes crecientes de RPMI 1640. Finalmente, la suspensión celular se transfirió a un matraz de crecimiento de 25 cm² y se colocó en un incubador a 37°C, 5% de CO₂. Los medios de crecimiento se cambiaron día por medio. En el día de la infección de la rata, se realizó la extracción de células tanto por fuerza mecánica como por medio de tripsina. Las células se lavaron mediante tampón fosfato que carece de calcio y magnesio. Se añadió tripsina (0,05% de tripsina en 0,02% de EDTA) durante 2-5 min. Posteriormente, se añadieron 5 ml de FBS y las células se transfirieron a un vaso de precipitado que contiene RPMI 1640 con FCS y antibióticos (100 IU/ml de penicilina, 100 IU/ml de estreptomina y 2,5 µg/ml de anfotericina B). La solución de células se centrifugó y el pellet celular se resuspendió en 20 ml de RPMI con FBS y antibióticos, se repitió la centrifugación y resuspensión. Las células posteriormente se alicuotaron en viales que contienen 4 x 10⁶ células/ml de RPMI 1640. Para obtener tumores donantes, las ratas Fischer 344 hembra (Charles River, 180-200 g) se anestesiaron y 0,3 ml de la suspensión celular se inyectó por vía subcutánea en la región inguinal de ambos lados. Los trozos de tumor se prepararon 15 y 22 días después como se describió en F.A. Burgener et al., Invest Radiol 22/6 (1987), 472-478; S. Saini et al., J. Magn. Reson. 129/1 (1997), 35-43). Se realizaron dos incisiones en el abdomen ventral de las ratas hembras Fischer receptoras. Se insertó un fragmento de tumor en cada bolsillo y se cerraron las incisiones. Las ratas se llevaron para la visualización de imágenes 12-14 días después del injerto del tumor.

5.2 Preparación de la rata y visualización de imágenes RM protónica

Las ratas pesadas se anestesiaron mediante isoflurano (2-3%) y se mantuvieron en una mesa calentada para asegurar una temperatura corporal de aproximadamente 37°C. se introdujo un catéter en la vena caudal y en la arteria carótida común izquierda. Las ratas se transportaron a la máquina de RM y se colocaron en una almohadilla de fabricación casera que se calentó a aproximadamente 37°C por medio de FC-104 Fluorinert circulante. Este líquido no originó señales de fondo en la visualización de imágenes de RM 1H- y ¹³C. La anestesia continuó por medio de 1-2% de isoflurano administrado por medio de un tubo largo con un sistema de respiración abierto a una velocidad de 0,4 Umin. El catéter arterial se conectó por medio de un tubo T a un registrador de presión y una bomba de administración de solución salina (velocidad 0,15 Umin) para impedir la coagulación del catéter. Las ratas se ubicaron en un bobina de RM para rata (Rapid Biomedical, Alemania) y se realizó la visualización de imágenes mediante una secuencia de visualización de imágenes de RM estándar protónica para obtener información anatómica y determinar la ubicación del tumor.

5.3 Visualización de imágenes de ¹³C

Sobre la base de la frecuencia protónica hallada por el sistema de RM, la frecuencia de RM para ¹³C₁-alanina se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Frecuencia de } ^{13}\text{C}_1\text{-alanina} = 0,25144 \times [(\text{frecuencia del sistema protónico} \times 1,00021) - 0,000397708]$$

La frecuencia calculada ubicó la señal de RM que surge de la ¹³C₁-alanina sobre la resonancia con ¹³C₁-lactato a la izquierda y ¹³C₁-piruvato que resuena a la derecha de la ¹³C₁-alanina. Se corrió una secuencia de espectroscopia de RM no localizada para asegurar que la bobina de ¹³C-RM y la frecuencia de RM del sistema se han ajustado correctamente. La ubicación de la imagen ¹³C se ubicó para cubrir el tumor (espesor del corte 10 mm, en tamaño de píxel plano de 5 x 5 mm²). En la fase de reconstrucción, los datos de imagen fueron rellenados con cero para

producir la resolución de $2,5 \times 2,5 \times 10 \text{ mm}^3$. Se inyectó $^{13}\text{C}_1$ -piruvato en tampón TRIS (90 mM) en una dosis de 10 ml/kg durante un período de 12 s con un volumen mínimo de 2 ml en la vena caudal y 30 s después del comienzo de la inyección (es decir, 18 s después de terminar la inyección, comenzó la secuencia ^{13}C -RM del desplazamiento químico.

5 5.4 Análisis de los datos de la visualización de imágenes de RM

La visualización de imágenes RM produjo una matriz que contiene 16×16 elementos en los que cada elemento o voxel/pixel contiene un espectro ^{13}C -RM. En la fase de reconstrucción, la matriz fue rellenada con cero a 32×32 , una operación matemática que ayuda a mejorar la resolución espacial. El conjunto de datos para analizar contenía 1024 espectros que se exportaron al formato Dicom® (DICOM es la marca registrada del National Electrical Manufacturers Association para sus publicaciones estándares relacionadas con las comunicaciones digitales de la información médica) para el análisis posterior. Aproximadamente la mitad de estos espectros no contenía señales RM ya que la posición de estos voxels fue externa al animal. Una ubicación dentro del animal reveló voxels con señales de piruvato altas y señal de lactato y alanina despreciable (mezcla de sangre) mientras que otros voxels mostraron piruvato, alanina y lactato en aproximadamente igual intensidad.

Las amplitudes para piruvato, alanina y lactato estimaron por medio de los procedimientos de ajuste del dominio de tiempo que incluyeron los siguientes: la fase de orden cero es constante para el conjunto de datos, la fase de primer orden es 1,4 ms, el ancho de línea o amortiguación del tiempo se permiten variar entre 0,5 y 3 veces el ancho de línea promedio del conjunto de datos para cada metabolito en forma independiente y la frecuencia se permite variar con 20 Hz en ambas direcciones con respecto a la frecuencia promedio hallada en todo el conjunto de datos para el pico más alto, que debe ser identificado por el usuario.

Las amplitudes para lactato, alanina y piruvato se reordenaron en una matriz y se remuestrearon para combinar la resolución de la imagen de RM anatómica protónica. Las imágenes de ^{13}C -MR se proyectaron sobre las imágenes anatómicas por medio de un procedimiento automatizado para obtener un resultado independiente del operador. Los resultados se exhibieron en conjuntos de imágenes que contienen la imagen protónica anatómica del tumor de la rata, la imagen metabólica ^{13}C para piruvato, lactato y alanina proyectada sobre la imagen anatómica, las imágenes se muestran para cada pixel

a) $([\text{lactato}]_{\text{norm}} \times ([\text{piruvato}]_{\text{máx}} - [\text{piruvato}]_{\text{norm}}) \times [\text{lactato}]$ y

b) $([\text{lactato}]_{\text{norm}} \times ([\text{alanina}]_{\text{máx}} - [\text{alanina}]_{\text{norm}}) \times [\text{lactato}]$

en que el término "[...]norm representa la amplitud normalizada, es decir, en escala para su valor más alto en la imagen metabólica y [lactato] la amplitud calculada.

Un resultado exitoso para la discriminación del tejido tumoral y tejido sano en una imagen de ^{13}C -RM metabólica se definió como la señal de lactato más alta en el área tumoral o una relación de peso alta de lactato respecto de piruvato en el área tumoral y una relación de peso alta de lactato respecto de alanina en la misma ubicación de pixel

5.5 Análisis biológico

Los sitios del tumor se inspeccionaron visualmente para detectar signos de sangrado. Los tumores se extrajeron de los cuerpos de las ratas, se pesaron y cortaron a la mitad. Los interiores del tumor se inspeccionaron visualmente para evaluar homogeneidad, necrosis y sangrado. Los tejidos tumorales se conservaron en 4% de formalina.

Se consideró que una rata portadora de tumor es apropiada para la evaluación si se cumplían los siguientes criterios: peso del tumor > 100 mg, necrosis o quistes no visibles en el interior del tumor, una temperatura corporal superior a 35°C y una presión arterial superior a 60 mm Hg en el momento de la investigación de RM.

5.6 Resultados

En total, se analizaron por imagen 30 tumores diferentes de 18 ratas. Una rata no cumplió y 3 tumores no cumplieron los criterios biológicos descritos en el párrafo precedente 5.5. Los restantes 26 tumores de 17 ratas fueron homogéneos y presentaron un interior sin necrosis masiva. La polarización promedio del $^{13}\text{C}_1$ -piruvato en el momento de la inyección fue $21,2 \pm 2,9\%$ (media \pm SD) y el pH fue $8,08 \pm 0,14$ (media \pm SD).

La Figura 1 presenta un conjunto típico de imágenes de una rata examinada por imagen con (1) la imagen de referencia protónica, en la que las flechas indican las ubicaciones del tumor, (2) la imagen de ^{13}C -piruvato, (3) la imagen de ^{13}C -lactato (4) la imagen de ^{13}C -alanina (5) la imagen de ^{13}C -lactato corregida para ^{13}C -piruvato y (6) la imagen de ^{13}C -lactato corregida para ^{13}C -alanina. Las imágenes (2) a (6) se fusionan con la imagen de referencia protónica.

La Figura 2 presenta el mismo conjunto de imágenes, sin embargo con las imágenes (2) a (6) que no se fusionan con la imagen protónica atómica.

Como resultado, la ubicación del tumor se indica con una señal de piruvato alta (2), debido a la actividad metabólica

alta. Sin embargo, la señal de lactato (3) finalmente identifica la correcta ubicación del tumor. La alanina es visible en el músculo esquelético y está ausente en el tejido tumoral (4). Las imágenes de lactato corregidas para piruvato y alanina (5) y (6) también produjeron un excelente contraste para el tumor.

5 En consecuencia se demostró que la ubicación del tumor en las imágenes metabólicas se indica con una señal de lactato alta, una señal de lactato alta corregida para piruvato y una señal de lactato alta corregida para alanina.

El análisis de las imágenes metabólicas de ^{13}C -MR reveló un contraste metabólico en el área del tumor

- 24 de los 26 tumores para la señal de lactato
- 26 de los 26 tumores para la señal de lactato, corregida para piruvato (5,5,a)
- 26 de 26 tumores para la señal de lactato, corregida para alanina (5,5, b))

10 La tasa global de éxito para este estudio fue 26 de 26, o 100%.

Con este estudio, se demostró que los tumores se pueden identificar por medio de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado que alcanza la región de interés (tumor) en un período de tiempo que hace posible visualizar la imagen para el compuesto y sus metabolitos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la discriminación entre tejido sano y tumoral, dicho procedimiento comprende
 - (a) obtener una imagen de ^{13}C -RM de ^{13}C -piruvato, una imagen de ^{13}C -RM de su metabolito alanina que contiene ^{13}C y una imagen de ^{13}C -RM de su metabolito lactato que contiene ^{13}C de un sujeto al que se preadministró una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado,
 - (b) corregir la imagen de lactato por la cantidad de piruvato y/o alanina por la multiplicación de la imagen de lactato por la imagen invertida de piruvato y/o alanina, una señal de imagen alta dentro de dicha imagen de lactato corregida es indicativa de tejido tumoral.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se obtiene por hiperpolarización del ácido ^{13}C -pirúvico y/o ^{13}C -piruvato por el procedimiento DNP.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en el que la composición que comprende ^{13}C -piruvato además comprende uno o más tampones seleccionados del grupo que consiste en tampón fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), ACES, PIPES, imidazol/HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, HEPPS y TRICIN.
4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que las secuencias de las imágenes que utilizan los multiecos para codificar la información de frecuencia se usan para obtener las imágenes ^{13}C en la etapa a).
5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que las imágenes ^{13}C de la etapa a) se obtienen en menos de 400 s después de la administración de la composición que comprende ^{13}C -piruvato.
6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que además se obtiene una imagen protónica con o sin un agente de contraste MRI protónico.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el dicha corrección de la etapa b) se realiza por
 - (i) normalizar las imágenes de lactato y piruvato y/o imágenes de alanina al valor máximo en cada imagen individual
 - (ii) multiplicar la imagen de lactato normalizada por la imagen invertida de piruvato y/o alanina; y
 - (iii) multiplicar los resultados de la etapa (ii) por la imagen de lactato original.
8. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 en el que el tumor es un tumor de cerebro, tumor de mama, tumor de colon, tumor de pulmón, tumor de riñón, tumor de cabeza y cuello, tumor de músculo, tumor de ovario, tumor gástrico, tumor pancreático, tumor esofágico o tumor de próstata.
9. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para el control de la terapia tumoral RM in vivo y/o estadificación del tumor.

30

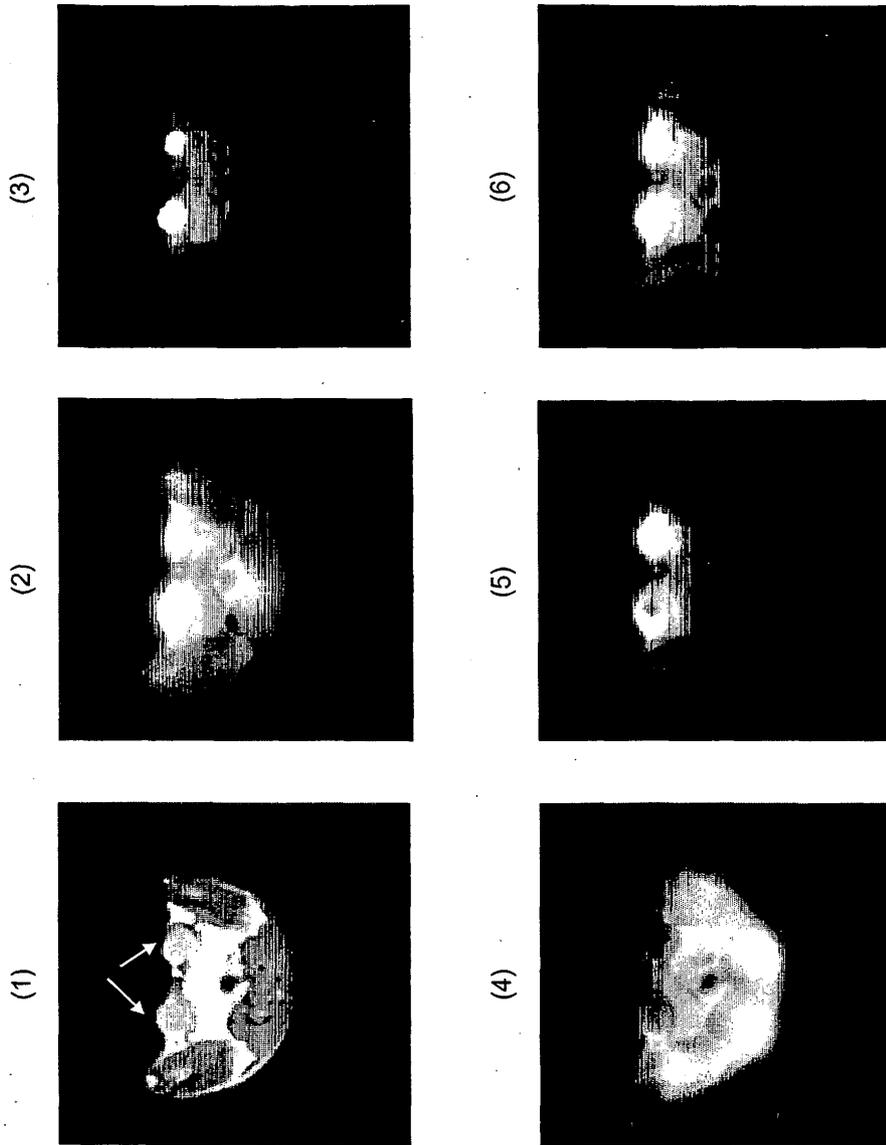


Fig. 1

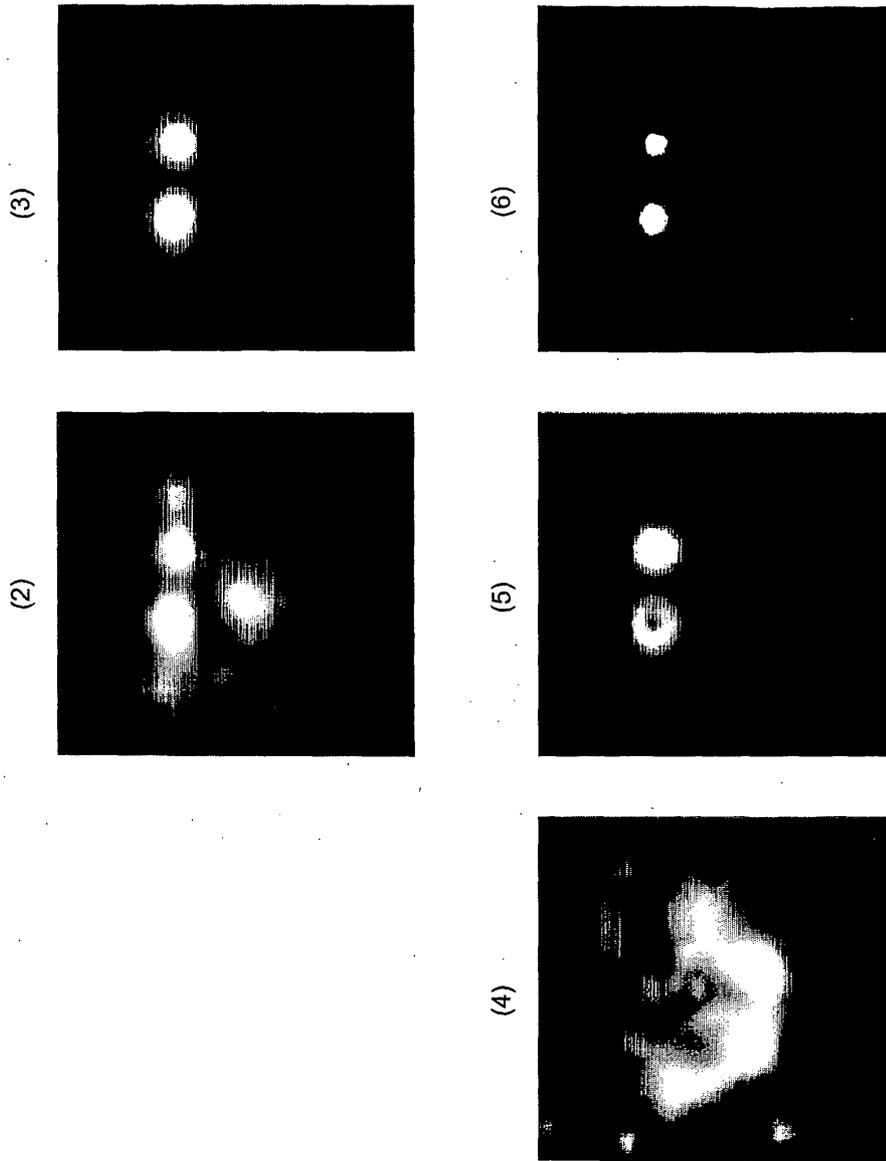


Fig. 2