

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 083**

51 Int. Cl.:
A61K 49/10 (2006.01)
A61K 49/20 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08787477 .2**
96 Fecha de presentación: **26.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2180902**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.05.2010**

54 Título: **MEDIO DE FORMACIÓN DE IMAGEN QUE COMPRENDE 13C-ACETAT-HIPERPOLARIZADO Y USO DEL MISMO.**

30 Prioridad:
27.08.2007 NO 20074367

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
GE Healthcare Limited
Amersham Place Little Chalfont
Buckinghamshire HP7 9NA , GB

72 Inventor/es:
GISSELSSON, Anna;
HANSSON, Georg;
MÅNSSON, Sven;
IN'T ZANDT, René;
KARLSSON, Magnus;
JENSEN, Pernille, R. y
LERCHE, Mathilde, H.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 083 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

Medio de formación de imagen que comprende ^{13}C -acetat hiperpolarizado y uso del mismo

La invención se refiere a un procedimiento de detección de ^{13}C -RM que usa un medio de formación de imagen que comprende ^{13}C -acetato hiperpolarizado.

5 La formación de imagen por resonancia magnética (RMN) (IRM) es una técnica que se ha vuelto particularmente atractiva para los médicos ya que se pueden obtener imágenes del cuerpo o de partes del mismo de un paciente de una forma no invasiva y sin exponer al paciente y al personal médico a una radiación potencialmente dañina, tal como rayos X. Debido a sus imágenes de alta calidad y a su buena resolución espacial y temporal, la IRM es una técnica de formación de imagen favorable para someter a imagen el tejido blando y los órganos.

10 La IRM se puede llevar a cabo con o sin agentes de contraste de RM. Sin embargo, la IRM potenciada con contraste permite normalmente la detección de cambios tisulares mucho más pequeños, lo que hace que sea una herramienta potente para la detección de cambios tisulares de fase temprana como, por ejemplo, tumores pequeños o metástasis.

15 Se han usado varios tipos de agentes de contraste en IRM. Los quelatos de metales paramagnéticos solubles en agua, por ejemplo, quelatos de gadolinio como Omniscan™ (GE Healthcare) son agentes de contraste de RM ampliamente usados. Debido a su bajo peso molecular, se distribuyen rápidamente en el espacio extracelular (es decir, la sangre y el intersticio) cuando se administran en la vasculatura. También se eliminan de forma relativamente rápida del organismo.

20 Por otra parte, los agentes de contraste de RM de acumulación de sangre, por ejemplo, partículas de óxido de hierro superparamagnético, quedan retenidos en la vasculatura durante un tiempo prolongado. Se ha probado que son extremadamente útiles para potenciar el contraste en el hígado, pero también para detectar anomalías de permeabilidad capilar, por ejemplo, paredes capilares "en fuga" en tumores que son resultado de una angiogénesis tumoral.

25 El documento WO-A-99/35508 da a conocer un procedimiento investigación de RM de un paciente usando una solución hiperpolarizada de un agente de T_1 alto como agente de contraste de IRM. El término "hiperpolarización" significa que se potencia la polarización nuclear de los núcleos activos de RMN presentes en el agente T_1 alto, es decir, núcleos con espín nuclear distinto de cero, preferentemente núcleos de ^{13}C o ^{15}N . Después de potenciar la polarización nuclear de los núcleos activos de RMN, la diferencia de población entre estados de espín excitado y normal de estos núcleos disminuye significativamente y por tanto, la intensidad de señal de RM se amplifica por un factor de cien y más. Cuando se usa un agente de T_1 alto enriquecido con ^{13}C y/o ^{15}N hiperpolarizado, no habrá esencialmente interferencia de señales de fondo ya que la abundancia natural de ^{13}C y/o ^{15}N es insignificante y, por tanto, el contraste por formación de imagen será ventajosamente alto. La diferencia principal entre agentes de contraste de IRM convencionales y estos agentes de T_1 alto hiperpolarizados es que en los primeros, se provocan cambios en el contraste que afectan a los tiempos de relajación de los protones de agua en el cuerpo, mientras que se puede considerar que el último tipo de agentes son marcadores no radioactivos, ya que la señal obtenida aumenta únicamente del agente.

35 Se dan a conocer varios agentes de T_1 alto posibles para su uso como agentes de formación de imagen de RM en el documento WO-A-99/35508, incluyendo compuestos no endógenos y endógenos. Como ejemplos de los últimos, se mencionan intermedios en ciclos metabólicos normales que se dice que se prefieren para someter a imagen la actividad metabólica. Por formación de imagen *in vivo* de actividad metabólica, se puede obtener la información del estado metabólico de un tejido y se puede usar dicha información, por ejemplo, para discriminar entre tejido sano y enfermo.

45 Por ejemplo, el piruvato es un compuesto que desempeña un papel en el ciclo del ácido cítrico y la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en sus metabolitos ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada se puede usar para el estudio de RM *in vivo* de procesos metabólicos en el cuerpo humano. Por ejemplo, el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se puede usar como un agente de formación de imagen de RM para formación de imagen tumoral *in vivo*, como se describe en detalle en el documento WO-A-2006/011810 y para evaluar la viabilidad del tejido miocárdico por imagen de RM, como se describe en detalle en el documento WO-A-2006/054903.

50 El documento WO-A-92/01937 da a conocer la medida de la contribución de sustratos marcados con ^{13}C administrados de forma exógena para acetil-CoA in vivo o in vitro, por ejemplo, para estudios de utilización de sustrato. El sustrato puede ser 2- ^{13}C -acetato o 1,2- ^{13}C -acetato. Después de la administración de los compuestos marcados, se mide el patrón de enriquecimiento en uno o más productos metabólicos.

55 La conversión metabólica de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en sus metabolitos ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada se puede usar para el estudio de RM *in vivo* de procesos metabólicos en el cuerpo humano ya que se ha encontrado que dicha conversión es lo suficientemente rápida como para permitir la detección de señales del compuesto original, es decir ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, y sus metabolitos.

La cantidad de alanina, bicarbonato y lactato depende del estado metabólico del tejido bajo investigación. La intensidad de señal de RM de ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada está relacionada con la cantidad de estos compuestos y el grado de polarización que queda en el momento de la detección, por tanto monitorizando la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es posible estudiar procesos metabólicos *in vivo* en el cuerpo de un ser humano o de animal no humano usando formación de imagen de RM no invasiva o espectroscopía de RM.

Las amplitudes de señal de RM que surgen de los diferentes metabolitos de piruvato varían dependiendo del tipo de tejido. Se puede usar único patrón de pico metabólico formado por alanina, lactato, bicarbonato y piruvato como identificador para el estado metabólico del tejido a examen.

Sin embargo, la producción de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado que es adecuado como agente de formación de imagen *in vivo* no está exenta de problemas. El ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se obtiene preferentemente por polarización nuclear dinámica (DNP) de ácido ^{13}C -pirúvico o bien de una sal de ^{13}C -piruvato, como se describe en detalle en el documento WO-A1-2006/011809.

El uso de ácido ^{13}C -pirúvico simplifica el proceso de polarización ya que no cristaliza tras congelación/enfriamiento (la cristalización conduce a una polarización nuclear dinámica baja o a ninguna polarización). Como consecuencia, no se necesitan disolventes ni formadores de vidrio para preparar una composición para el procedimiento de DNP y, por tanto, se puede usar una muestra de ácido ^{13}C -pirúvico altamente concentrada. Sin embargo, debido a su bajo pH es necesario el uso de un agente de DNP que sea estable en el ácido fuerte. Además, es necesaria una base fuerte para disolver y convertir el ácido ^{13}C -pirúvico hiperpolarizado sólido después de la polarización en ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. Tanto el ácido pirúvico fuerte como la base fuerte requieren una selección cuidadosa de los materiales (por ejemplo, depósito del medio de disolución, pipetas, etc.) con los que están en contacto los compuestos.

De forma alternativa, se puede usar una sal de ^{13}C -piruvato en el procedimiento de DNP. Desafortunadamente, el ^{13}C -piruvato de sodio cristaliza después de la congelación/enfriamiento, lo que hace necesaria la adición de formadores de vidrio. Si se pretende usar el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado como agente de formación de imagen *in vivo*, la concentración de piruvato en la composición que contiene el piruvato y los formadores de vidrio es desfavorablemente baja. Además, los formadores de vidrio también se han de eliminar para su uso *in vivo*.

Por tanto, las sales preferidas que se pueden usar para la DNP son los ^{13}C -piruvatos que comprenden un catión inorgánico del grupo que consiste en NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} , preferentemente NH_4^+ , K^+ , Rb^+ o Cs^+ , más preferentemente K^+ , Rb^+ , Cs^+ y lo más preferentemente Cs^+ , como se describe en detalle en el documento WO-A-2007/111515. La mayoría de estas sales no están comercialmente disponibles y necesitan sintetizarse por separado. Además, si se usa el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado *in vivo*, se prefiere que la formación de imagen de RM intercambie el catión inorgánico del grupo que consiste en NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} por un catión fisiológicamente muy tolerable como Na^+ o meglumina. Por lo tanto, se requiere una etapa adicional después de la disolución del ^{13}C -piruvato hiperpolarizado sólido durante la que decae la polarización.

Otras sales preferidas son ^{13}C -piruvato de un compuesto de amina o amino orgánico, preferentemente TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -piruvato o meglumina- $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, como se describe en detalle en el documento WO-A-2007/069909. De nuevo, estas sales necesitan sintetizarse por separado.

Por tanto, existe una necesidad de encontrar agentes de formación de imagen hiperpolarizados alternativos que se puedan usar para obtener información sobre la actividad metabólica.

Los inventores han encontrado que se puede usar ^{13}C -acetato hiperpolarizado como un agente de formación imagen de este tipo.

El ^{13}C -acetato de sodio es un compuesto disponible comercialmente que se puede usar directamente para la DNP, ya que no cristaliza después del enfriamiento/congelación. Puesto que esto elimina la necesidad de formadores de vidrio y/o altas cantidades de disolvente(s) en la muestra, se puede preparar una muestra altamente concentrada y usar en el procedimiento de DNP. También, las muestras de ^{13}C -acetato de sodio son justo ligeramente básicas y, por tanto, se pueden usar varios agentes de DNP. El acetato es un compuesto endógeno que es muy bien tolerado y el uso de ^{13}C -acetato hiperpolarizado como agente de formación de imagen es ventajoso desde una perspectiva de seguridad.

Comparado con el piruvato, el acetato se puede usar para conseguir información de diferentes vías metabólicas que el primero. Por tanto, el acetato se puede usar para obtener información sobre el metabolismo de energía de ácidos grasos y para el estudio de la glucólisis. Esta información se puede usar para identificar otros estados de enfermedad que los que se pueden identificar usando piruvato. De forma alternativa, se puede combinar esta información con la información que se obtiene usando piruvato y por tanto ayudar a identificar enfermedades pronto y/o más precisamente.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de detección de ^{13}C -RM usando un medio de formación de imagen que comprende ^{13}C -acetato hiperpolarizado en el que se detectan señales de

^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato.

La expresión "se detectan señales de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato" significa que en el procedimiento de la invención, sólo se detecta la señal de ^{13}C -acetilcarnitina o se detectan las señales de ^{13}C -acetilcarnitina y ^{13}C -acetil-CoA o se detectan las señales de ^{13}C -acetilcarnitina y ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato.

El término "detección de ^{13}C -RM" denota formación de imagen de ^{13}C -RM o espectroscopía de ^{13}C -RM o formación de imagen de ^{13}C -RM y espectroscopía de ^{13}C -RM combinadas, es decir, formación de imagen espectroscópica de ^{13}C -RM. El término denota además formación de imagen espectroscópica de ^{13}C -RM en distintos puntos de tiempo.

El término "medio de formación de imagen" denota una composición líquida que comprende ^{13}C -acetato hiperpolarizado como agente activo de RM, es decir, agente de formación de imagen.

El medio de formación de imagen usado en el procedimiento de la invención se puede usar como un medio de formación de imagen para la detección de ^{13}C -RM in vivo, es decir, en seres humanos y animales no humanos vivos. Además, el medio de formación de imagen usado en el procedimiento de la invención se puede usar como medio de formación de imagen para detección de ^{13}C -RM *in vitro*, por ejemplo, de cultivos celulares, muestras como por ejemplo orina, saliva o sangre, tejido *ex vivo*, por ejemplo tejido *ex vivo* obtenido de una biopsia u órganos aislados, todos derivados de un cuerpo de ser humano o animal no humano vivo.

El término " ^{13}C -acetato" denota una sal de ácido ^{13}C -acético que está isotópicamente enriquecida con ^{13}C , es decir, en la que la cantidad de isótopo ^{13}C es mayor que en su abundancia natural. A menos que se establezca de otro modo, los términos " ^{13}C -acetato" y "ácido ^{13}C -acético" denotan un compuesto que está enriquecido con ^{13}C en cualquiera de los dos átomos de carbono presentes en la molécula, es decir, en la posición C1 y/o la posición C2.

El enriquecimiento isotópico del ^{13}C -acetato hiperpolarizado usado en el procedimiento de la invención es preferentemente de al menos un 75%, más preferentemente de al menos un 80% y en especial preferentemente de al menos un 90%, siendo lo más preferido un enriquecimiento isotópico de más de un 90%. Idealmente, el enriquecimiento es de un 100%. El ^{13}C -acetato usado en el procedimiento de la invención puede estar isotópicamente enriquecido en la posición C1 (indicado en lo siguiente como $^{13}\text{C}_1$ -acetato), en la posición C2 (indicado en lo siguiente como $^{13}\text{C}_2$ -acetato) o en la posición C1 y la C2 (indicado en lo siguiente como $^{13}\text{C}_{1,2}$ -acetato). Se prefiere el enriquecimiento isotópico en la posición C1 o en la posición C1 y la C2 y el enriquecimiento isotópico en la posición C1 es el más preferido.

Además, se puede usar ^{13}C -acetato deuterado en el procedimiento de la invención, es decir, uno o más átomos de hidrógeno en ^{13}C -acetato se pueden intercambiar por átomos de deuterio. En una realización preferida, se usa $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 en el procedimiento de la invención, es decir $^{13}\text{C}_1$ -acetato en el que los tres átomos de hidrógeno del grupo metilo están intercambiados por átomos de deuterio.

En una realización preferida, el medio de formación de imagen de acuerdo con la invención comprende $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado o $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 .

El término " ^{13}C -acetilcarnitina" denota 3-acetiloxi-4-trimetilamoniobutanoato que está isotópicamente enriquecido con ^{13}C , es decir, en el que la cantidad de isótopo ^{13}C es mayor que en su abundancia natural. A menos que se establezca de otro modo, el término " ^{13}C -acetilcarnitina" denota un compuesto que está enriquecido con ^{13}C en cualquiera de los dos átomos de carbono del grupo acetiloxi, es decir, en el grupo metilo o el grupo deuterometilo, si se usó $^{13}\text{C}_1$ -acetato deuterado en el procedimiento de la invención, y/o el grupo carbonilo de dicho grupo acetiloxi.

El término " ^{13}C -acetil-CoA" denota el tioéster de coenzima A y ácido acético que está isotópicamente enriquecido con ^{13}C , es decir, en el que la cantidad de isótopo ^{13}C es mayor que en su abundancia natural. A menos que se establezca de otro modo, el término " ^{13}C -acetyl-CoA" denota un compuesto que está enriquecido con ^{13}C en cualquiera de los dos átomos de carbono del grupo acetilo, es decir, en el grupo metilo o el grupo deuterometilo, si se usó $^{13}\text{C}_1$ -acetato deuterado en el procedimiento de la invención, y/o el grupo carbonilo de dicho grupo acetilo.

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

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

De forma similar, el nivel de polarización para el ^{13}C -acetato hiperpolarizado se puede determinar por medidas de RNM de estado líquido. De nuevo, la intensidad de la señal del ^{13}C -acetato hiperpolarizado disuelto se compara con la intensidad de señal del ^{13}C -acetato disuelto antes de la polarización. El nivel de polarización se calcula entonces a partir de la proporción de las intensidades de señal de ^{13}C -acetato antes y después de la polarización. La hiperpolarización de los núcleos de ^{13}C activos de RMN se puede lograr por diferentes procedimientos, que se describen, por ejemplo, en los documentos WO-A-98/30918, WO-A-99/24080 y WO-A-99/35508. Los procedimientos de hiperpolarización conocidos en la técnica son, transferencia de polarización a partir de un gas noble, "fuerza bruta", refrigeración de espín, el procedimiento parahidrógeno y polarización nuclear dinámica (DNP).

Para obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado, se prefiere polarizar el ^{13}C -acetato directamente. También se puede polarizar el ácido ^{13}C -acético, sin embargo, el ácido ^{13}C -acético polarizado se debe convertir posteriormente en ^{13}C -acetato polarizado, por ejemplo, por neutralización con una base, que es una etapa adicional y por tanto esta realización es menos preferida. Las sales de ^{13}C -acetato, por ejemplo, ^{13}C -acetato de sodio, están comercialmente disponibles. El ácido ^{13}C -acético también está comercialmente disponible; también se puede obtener protonando un ^{13}C -acetato comercialmente disponible, por ejemplo, ^{13}C -acetato de sodio.

Una forma de obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado es la transferencia de polarización a partir de un gas noble hiperpolarizado que se describe en el documento WO-A-98/30918. Los gases nobles que tienen un espín nuclear distinto de cero se pueden hiperpolarizar por el uso de luz polarizada de forma circular. Un gas noble hiperpolarizado, preferentemente He o Xe, o una mezcla de estos gases, se puede usar para efectuar la hiperpolarización de núcleos de ^{13}C . El gas hiperpolarizado puede estar en fase gas, se puede disolver en un líquido/disolvente, o propio gas hiperpolarizado puede servir como disolvente. De forma alternativa, el gas se puede condensar sobre una superficie sólida enfriada y usar en esta forma, o se deja que se sublime. Se prefiere la mezcla íntima del gas hiperpolarizado con ^{13}C -acetato o ácido ^{13}C -acético.

Otra forma para obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado es que la polarización se imparta en los núcleos de ^{13}C por equilibrio termodinámico a una temperatura muy baja y un campo alto. La hiperpolarización comparada con el campo de operación y la temperatura del espectrómetro de RMN se efectúa por el uso de un campo muy alto y una temperatura baja (fuerza bruta). La fuerza de campo magnético usado debe ser la más alta posible, adecuadamente mayor de 1 T, preferentemente mayor de 5 T, más preferentemente 15 T o más y en especial preferentemente 20 T o más. La temperatura debe ser muy baja, por ejemplo, 4,2 K o menos, preferentemente 1,5 K o menos, más preferentemente 1,0 K o menos, en especial preferentemente 100 mK o menos.

Otra forma para obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado es el procedimiento de refrigeración de espín. Este procedimiento cubre la polarización de espín de un compuesto sólido o sistema por polarización por refrigeración de espín. El sistema se activa con o se mezcla íntimamente con materiales paramagnéticos cristalinos adecuados, tales como iones de Ni^{2+} , lantánido o actínido con un eje de simetría de orden tres o más. La instrumentación es más sencilla que la requerida para DNP sin necesidad de un campo magnético uniforme ya que no se aplica campo de excitación de resonancia. El procedimiento se lleva a cabo rotando físicamente la muestra alrededor de un eje perpendicular a la dirección del campo magnético. El prerrequisito para este procedimiento es que la especie paramagnética tiene un factor g altamente anisotrópico. Como resultado de la rotación de la muestra, la resonancia paramagnética electrónica se pondrá en contacto con los espines nucleares, lo que conduce a una disminución en la temperatura de espín nuclear. La rotación de la muestra se lleva a cabo hasta que la polarización de espín nuclear ha alcanzado un nuevo equilibrio.

En una realización preferida, se usa la DNP (polarización nuclear dinámica) para obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado. En la DNP, la polarización de núcleos activos de RMN en un compuesto que se va a polarizar está afectada por un agente de polarización o denominado agente de DNP, un compuesto que comprende electrones desapareados. Durante el procedimiento de DNP, se proporciona energía, normalmente en forma de radiación de microondas, que excitará inicialmente el agente de DNP. Después de que decaiga hasta el normal, hay una transferencia de polarización del electrón desapareado del agente de DNP a los núcleos activos de RMN del compuesto que se va a polarizar, por ejemplo, a los núcleos de ^{13}C en el ^{13}C -acetato. En general, se usan un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja en el procedimiento de DNP, por ejemplo, llevando a cabo el procedimiento de DNP en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. De forma alternativa, se pueden emplear un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se logre una suficiente potenciación de la polarización. La técnica de DNP se describe además en el documento WO-A-98/58272 y en el documento WO-A-01196895.

Para polarizar una entidad química, es decir, compuesto, por el procedimiento de DNP, se prepara una composición del compuesto que se va a polarizar y un agente de DNP, que después se congela opcionalmente y se inserta en un polarizador de DNP (en el que se congelará si no se ha congelado antes) para la polarización. Después de la polarización, la composición hiperpolarizada sólida congelada se transfiere rápidamente al estado líquido fundiéndola o bien disolviéndola en un medio de disolución adecuado. Se prefiere la disolución, y el procedimiento de disolución de una composición hiperpolarizada congelada y los dispositivos adecuados para ello se describen en detalle en el documento WO-A-02/37132. El procedimiento de fundido y los dispositivos adecuados para el fundido se describen por ejemplo en el documento WO-A-02/36005.

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

En una realización, se usa ácido ^{13}C -acético, preferentemente ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético o $^{13}\text{C}_1$ -acético- d_3 (ácido acético-1- ^{13}C ,2,2,2- d_3) como material de partida para obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado por el procedimiento de DNP.

En una realización preferida, se usa ^{13}C -acetato, preferentemente $^{13}\text{C}_1$ -acetato o $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 como material de partida para obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado por el procedimiento de DNP. Los ^{13}C -acetatos adecuados son ^{13}C -acetato de sodio y ^{13}C -acetatos que comprenden un catión inorgánico del grupo que consiste en NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} . Las últimas sales se describen en detalle en el documento WO-A-2007/1111515. De forma alternativa, se pueden usar ^{13}C -acetatos de un compuesto de amina o amino orgánico, preferentemente TRIS- ^{13}C -acetato o meglumina- ^{13}C -acetato. Estas sales se describen en detalle en el documento WO-A-2007/069909.

En una realización más preferida, se usa TRIS- ^{13}C -acetato opcionalmente deuterado o ^{13}C -acetato de sodio opcionalmente deuterado y aún más preferentemente TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato, TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 , $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio o $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio como material de partida para obtener ^{13}C -acetato hiperpolarizado por el procedimiento de DNP.

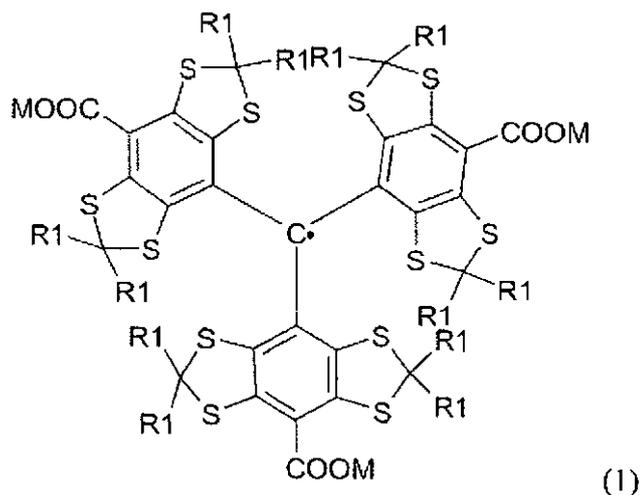
El término "TRIS" denota 2-amino-2-hidroxiometil-1,3-propanodiol y el término "TRIS- ^{13}C -acetato" denota una sal que contiene ^{13}C -acetato como anión y un catión de TRIS, es decir, amonio de TRIS (amonio de 2-hidroxiometil-1,3-propanodiol).

Para la hiperpolarización de ^{13}C -acetato por el procedimiento de DNP, se prepara una composición que comprende ^{13}C -acetato o ácido ^{13}C -acético y un agente de DNP.

El agente de DNP desempeña un papel decisivo en el procedimiento de DNP ya que su elección tiene un gran impacto sobre el nivel de polarización que se puede obtener en el ^{13}C -acetato. Se conocen muchos agentes de DNP (denominados en el documento WO-A-99/35508 como "agentes de contraste de OMRI"). El uso de radicales tritilo estables basados en oxígeno, basados en azufre o basados en carbono, como se describen en el documento 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, ha dado como resultado niveles altos de polarización en muchas muestras diferentes.

En una realización preferida, se obtiene el ^{13}C -acetato hiperpolarizado usado en el procedimiento de la invención por DNP y el agente de DNP usado es un radical tritilo. Como se menciona brevemente antes, la polarización de espín electrónico grande del agente de DNP, es decir, radical tritilo, se convierte en polarización de espín nuclear de núcleos de ^{13}C en ^{13}C -acetato o ácido ^{13}C -acético por medio de irradiación de microondas próxima a la frecuencia de Larmor de electrón. Las microondas estimulan la comunicación entre sistemas de espines electrónicos y nucleares por medio de transiciones e-e y e-n. Para una DNP eficaz, es decir, para lograr un nivel alto de polarización en ^{13}C -acetato o ácido ^{13}C -acético, el radical tritilo ha de ser estable y soluble en estos compuestos para lograr dicho contacto íntimo entre ^{13}C -acetato o ácido ^{13}C -acético y el radical tritilo, que es necesario para la comunicación mencionada anteriormente entre los sistemas de espín electrónico y nuclear.

En una realización preferida, el radical tritilo es un radical de fórmula (1)



en la que

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

R1 que es igual o diferente representa un grupo alquilo C₁-C₆ ramificado o de cadena lineal opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo o un grupo -(CH₂)_n-X-R2,

5 en el que n es 1, 2 ó 3;

X es O o S; y

R2 es un grupo alquilo C₁-C₄ ramificado o de cadena lineal, opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo.

10 En una realización preferida, M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable. El término "catión fisiológicamente tolerable" denota un catión que es tolerado por el cuerpo vivo de un ser humano o animal no humano. Preferentemente, M representa hidrógeno o un catión alcalino, un ión de amonio o un ión de amina orgánica, por ejemplo, meglumina. Lo más preferentemente, M representa hidrógeno o sodio.

15 Si se usa ¹³C-acetato como material de partida para obtener ¹³C-acetato hiperpolarizado por el procedimiento de DNP, R1 preferentemente es igual, más preferentemente un grupo alquilo C₁-C₄ ramificado o de cadena lineal, lo más preferentemente metilo, etilo o isopropilo; o R1 preferentemente es igual, más preferentemente un grupo alquilo C₁-C₄ ramificado o de cadena lineal que se sustituye con un grupo hidroxilo, lo más preferentemente -CH₂-CH₂-OH; o R1 preferentemente es igual y representa -CH₂-OC₂H₄OH.

Si se usa ácido ¹³C-acético como material de partida para obtener ¹³C-acetato hiperpolarizado por el procedimiento de DNP, R1 es igual o diferente, preferentemente igual y preferentemente representa -CH₂-OCH₃, -CH₂-OC₂H₅, -CH₂-CH₂-OCH₃, -CH₂-SCH₃, -CH₂-SC₂H₅ o -CH₂-CH₂-SCH₃, lo más preferentemente -CH₂-CH₂-OCH₃.

20 El radical tritilo mencionado anteriormente de fórmula (1) se puede sintetizar como se describe en detalle en los documentos WO-A-88/10419, WO-A-90/00904, WO-A-91/12024, WO-A-93/02711, WO-A-96/39367, WO-A-97/09633, WO-A-98/39277 y WO-A- 2006/011811.

25 Para el procedimiento de DNP, se prepara una solución del material de partida, es decir, ácido ¹³C-acético o ¹³C-acetato (en lo siguiente denominado "muestra") y el agente de DNP, preferentemente un radical tritilo, más preferentemente un radical tritilo de fórmula (1). Se puede usar un disolvente o una mezcla de disolventes para promover la disolución del agente de DNP en la muestra. Sin embargo, si se pretende usar el ¹³C-acetato hiperpolarizado como agente de formación de imagen para detección de ¹³C-RM *in vivo*, se prefiere mantener la cantidad de disolvente al mínimo o, si es posible, evitar el uso de disolventes. Para usar como agente de formación de imagen *in vivo*, el ¹³C-acetato polarizado se administra normalmente en concentraciones relativamente altas, es decir, una muestra altamente concentrada se usa preferentemente en el procedimiento de DNP y, por lo tanto, la cantidad de disolvente se mantiene preferentemente al mínimo. En este contexto, también es importante mencionar que la masa de la composición que contiene la muestra, es decir, el agente de DNP, muestra y si es necesario disolvente, se mantiene lo más pequeña posible. Una masa alta tendrá un impacto negativo sobre la eficacia del procedimiento de disolución, si se usa la disolución para convertir la composición sólida que contiene el ácido ¹³C-acético o ¹³C-acetato hiperpolarizado después del procedimiento de DNP en el estado líquido, por ejemplo, para usarlo como agente de formación de imagen para la detección de ¹³C-RM. Esto es debido al hecho de que para un volumen dado de medio de disolución en el procedimiento de disolución, la proporción de la masa de la composición con respecto al medio de disolución disminuye, cuando la masa de la composición se incrementa. Además, el uso de determinados disolventes puede requerir su retirada antes de administrar el ¹³C-acetato hiperpolarizado usado como agente de formación de imagen de RM a un ser humano o animal no humano ya que podrían no ser fisiológicamente tolerables.

35 Si se usa ácido ¹³C-acético como material de partida para obtener ¹³C-acetato hiperpolarizado por medio de DNP, se prepara una solución del agente de DNP, preferentemente un radical tritilo y más preferentemente un radical tritilo de fórmula (1) en ácido ¹³C-acético. El ácido ¹³C-acético es líquido a temperatura ambiente y el agente de DNP se disuelve preferentemente en dicho líquido. Ya que el ácido ¹³C-acético cristaliza después de la congelación, se añade una pequeña cantidad de formador de vidrio, preferentemente glicerol. La mezcla íntima de los compuestos se puede promover por varios medios conocidos en la técnica, tales como agitación, agitación con vórtex (mezcla por giro) o sonicación y/o calentamiento suave.

40 Si se usa un ¹³C-acetato que es sólido a temperatura ambiente como material de partida para obtener ¹³C-acetato hiperpolarizado por medio de DNP, se ha de añadir un disolvente para preparar una solución del agente de DNP y el ¹³C-acetato. Preferentemente, se usa un vehículo acuoso y lo más preferentemente agua como disolvente. En una realización, se disuelve el agente de DNP y posteriormente se disuelve el ¹³C-acetato en el agente de DNP disuelto. Se prefiere esta realización si se usan ¹³C-acetatos que comprenden un catión inorgánico del grupo que consiste en NH₄⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Ca²⁺, Sr²⁺ y Ba²⁺ y ¹³C-acetatos de un compuesto de amina o amino orgánico. En otra realización, se disuelve el ¹³C-acetato en el disolvente y posteriormente se añade el agente de DNP (como compuesto seco o, en solución) y se disuelve en el ¹³C-acetato disuelto. Se prefiere esta realización cuando se usa ¹³C-acetato de sodio. En

una realización más preferida, se disuelve ^{13}C -acetato de sodio en agua y se calienta suavemente la solución. Esto conducirá a una solución super-saturada de viscosidad relativamente alta que no cristaliza después del enfriamiento/congelación. Si se usan los ^{13}C -acetatos mencionados antes, es decir, ^{13}C -acetato de sodio, ^{13}C -acetatos que comprenden un catión inorgánico del grupo que consiste en NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} y ^{13}C -acetatos de un compuesto de amina o amino orgánico, no se tienen que añadir formadores de vidrio, ya que una composición que contiene estos ^{13}C -acetatos no cristaliza después del enfriamiento/congelación. De nuevo, la mezcla íntima de los compuestos se puede promover por varios medios conocidos en la técnica, tales como agitación, agitación con vórtex o sonicación y/o calentamiento suave.

Si se obtiene el ^{13}C -acetato hiperpolarizado usado en el procedimiento de la invención por DNP, la composición que se va a polarizar que comprende ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato y un agente de DNP puede comprender además un ión metálico paramagnético. Se ha encontrado que la presencia de iones metálicos paramagnéticos puede dar como resultado un incremento en los niveles de polarización en el compuesto que se va a polarizar por DNP, como se describe en detalle en el documento WO-A2-2007/064226.

El término "ión metálico paramagnético" denota iones metálicos paramagnéticos en forma de sus sales o en forma quelada, es decir, quelatos paramagnéticos. Estos últimos son entidades químicas que comprenden un quelante y un ión metálico paramagnético, en las que dicho ión metálico paramagnético y dicho quelante forman un complejo, es decir, un quelante paramagnético.

En una realización preferida, el ión metálico paramagnético es una sal o quelante paramagnético que comprende Gd^{3+} , preferentemente un quelante paramagnético que comprende Gd^{3+} . En una realización más preferida, dicho ión metálico paramagnético es soluble y estable en la composición que se va a polarizar.

Como con el agente de DNP descrito antes, el ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato que se va a polarizar debe estar en contacto íntimo con el ión metálico paramagnético también. La composición usada para la DNP que comprende ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato, un agente de DNP y un ión metálico paramagnético se puede obtener de varias formas. En una primera realización, se disuelve el ^{13}C -acetato en un disolvente adecuado para obtener una solución; de forma alternativa, se usa ácido ^{13}C -acético líquido, como se analizó antes. A esta solución de ^{13}C -acetato o al ácido ^{13}C -acético líquido se le añade el agente de DNP y se disuelve. El agente de DNP, preferentemente un radical tritilo, se puede añadir como un sólido o en solución, preferentemente como un sólido. En una etapa posterior, se añade el ión metálico paramagnético. El ión metálico paramagnético se puede añadir como un sólido o en solución, preferentemente como un sólido. En otra realización, el agente de DNP y el ión metálico paramagnético se disuelven en disolventes adecuados o un disolvente adecuado y a esta solución se le añade ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato. En otra realización más, el agente de DNP (o el ión metálico paramagnético) se disuelve en un disolvente adecuado y se añade a ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato. En una etapa posterior, se añade el ión metálico paramagnético (o el agente de DNP) a esta solución, como un sólido o bien en solución, preferentemente como un sólido. Preferentemente, la cantidad de disolvente para disolver el ión metálico paramagnético (o el agente de DNP) se mantiene en un mínimo. De nuevo, la mezcla íntima de los compuestos se puede promover por varios medios conocidos en la técnica, tales como agitación, agitación con vórtex o sonicación y/o calentamiento suave.

Si se usa un radical tritilo como agente de DNP, una concentración adecuada de este radical tritilo es de 1 a 25 mM, preferentemente de 2 a 20 mM, más preferentemente de 10 a 15 mM en la composición usada para la DNP. Si se añade un ión metálico paramagnético a la composición, una concentración adecuada de este ión metálico paramagnético es de 0,1 a 6 mM (ión metálico) en la composición, y se prefiere una concentración de 0,5 a 4 mM.

Después de haber preparado una composición que comprende ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato, el agente de DNP y opcionalmente un ión metálico paramagnético, dicha composición se congela por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, congelándolo en un congelador, en nitrógeno líquido o sencillamente colocándolo en el polarizador de DNP, en donde el helio líquido lo congelará. En otra realización, la composición se congela como "perlas" antes de que se inserte en el polarizador. Estas perlas se pueden obtener añadiendo la composición gota a gota a nitrógeno líquido. Se ha observado una disolución más eficaz de estas perlas, lo que es especialmente importante si se polarizan grandes cantidades de ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato, por ejemplo, cuando está destinado el uso del ^{13}C -acetato polarizado en un procedimiento de detección de ^{13}C -RM in vivo.

Si un ión metálico paramagnético está presente en la composición, dicha composición se puede desgasificar antes de congelar, por ejemplo, burbujeando gas helio a través de la composición (por ejemplo, durante un periodo de tiempo de 2 - 1 min), pero se puede efectuar la desgasificación por otros procedimientos comunes conocidos.

La técnica de DNP se describe, por ejemplo, en el documento WO-A-98/58272 y en el documento WO-A-01/96895. En general, se usan un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja en el procedimiento de DNP, por ejemplo, llevando a cabo el procedimiento de DNP en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. De forma alternativa, se puede emplear un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se logre una suficiente potenciación de la polarización. En una realización preferida, el procedimiento de DNP se lleva a cabo en helio líquido y a un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. Las unidades de polarización adecuadas se describen, por ejemplo, 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 ondas a una fuente de microondas en un orificio central rodeado por un medio que produce campo magnético tal como un imán superconductor. El orificio se extiende verticalmente hacia abajo hasta un nivel de una región P cerca del imán superconductor donde la fuerza de campo magnético es suficientemente alta, por ejemplo, entre 1 y 25 T, para que la polarización de los núcleos de muestra tenga lugar. El orificio para la sonda (es decir, la composición congelada que se va a polarizar) es preferentemente sellable y se puede evacuar a presiones bajas, por ejemplo, presiones del orden de 1 mbar (100 Pa) o menos. Un medio de introducción de sonda, tal como un tubo de transporte desmontable, puede estar contenido en el interior del orificio y este tubo puede estar insertado desde la parte superior del orificio hasta una posición dentro de la cámara de microondas en la región P. La región P se enfría con helio líquido a una temperatura lo suficientemente baja para que tenga lugar la polarización, preferentemente temperaturas del orden de 0,1 a 100 K, más preferentemente de 0,5 a 10 K, lo más preferentemente a 5 K. El medio de introducción de sonda es preferentemente sellable en su extremo superior de cualquier forma adecuada para mantener el vacío parcial en el orificio. Un recipiente de retención de sonda, tal como un vaso de retención de sonda, se puede ajustar de forma desmontable dentro del extremo inferior del medio de introducción de sonda. El recipiente de retención de sonda se fabrica preferentemente de un material ligero con una capacidad calorífica específica baja y propiedades criogénicas buenas, tales como, por ejemplo, Kelf (policlorotrifluoro-etileno) o PEEK (polieteretercetona) y se puede diseñar de forma que pueda sujetar más de una sonda.

La sonda se inserta en el recipiente de retención de sonda, sumergido en el helio líquido e irradiado con microondas. La frecuencia de microondas se puede determinar a partir de la línea de EPR del agente de DNP, que depende del campo magnético del imán como 28,0 GHz/T. La frecuencia de microondas óptima se puede determinar ajustando la frecuencia para la señal de RMN máxima. Preferentemente, la frecuencia de microondas óptima está aproximadamente en 94 GHz para un imán cargado a 3,35 T, 110 GHz para un imán cargado a 4 T, 140 GHz para un imán cargado a 5 T y 200 GHz para un imán cargado a 7 T. La potencia se puede elegir entre 50 y 200 mW, dependiendo del tamaño de la sonda. El nivel de polarización se puede monitorizar como se describió antes, por ejemplo, obteniendo señales de ^{13}C -RMN de estado sólido de la sonda durante la irradiación de microondas. En general, se obtiene una curva de saturación en una gráfica que muestra señal de RMN frente al tiempo. Por tanto, es posible determinar cuándo se alcanza el nivel de polarización óptimo. Una medida de ^{13}C -RMN de estado sólido consiste de forma adecuada en una secuencia de RMN obtenida por pulsos usado un ángulo de inclinación bajo. La intensidad de señal de los núcleos de polarización nuclear dinámica, es decir, núcleos de ^{13}C en ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato se compara con la intensidad de señal de los núcleos de ^{13}C en ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato antes de la DNP. Después, se calcula la polarización a partir de la proporción de las intensidades de señal antes y después de la DNP.

Después del procedimiento de DNP, la composición sólida que comprende el ácido ^{13}C -acético o ^{13}C -acetato hiperpolarizado se transfiere desde un estado sólido a un estado líquido, es decir, licuado. Esto se puede realizar por disolución en un disolvente apropiado o una mezcla de disolventes (medio de disolución) o fundiendo la composición sólida. Se prefiere la disolución, y el procedimiento de disolución y los dispositivos adecuados para ello se describen en detalle en el documento WO-A-02/37132. El procedimiento de fusión y los dispositivos adecuados para la fusión se describen por ejemplo en el documento WO-A-02/36005. En resumen, se usa una unidad de disolución/unidad de fusión que está físicamente separada del polarizador o bien es una parte de un aparato que contiene el polarizador y la unidad de disolución/unidad de fusión. En una realización preferida, la disolución/fusión se lleva a cabo en un campo magnético elevado, por ejemplo, dentro del polarizador, para mejorar la relajación y retener un máximo de la hiperpolarización. Se deben evitar los nodos de campo y un campo bajo puede conducir a una potenciación en la relajación a pesar de las medidas anteriores.

Si se ha usado ^{13}C -acetato como material de partida para la polarización nuclear dinámica y si la composición sólida que comprende el ^{13}C -acetato hiperpolarizado se licúa por disolución, se usa de forma adecuada como disolvente un vehículo acuoso, preferentemente un vehículo acuoso fisiológicamente tolerable y aceptado farmacéuticamente como agua, una solución de tampón o solución salina, en especial preferentemente si el ^{13}C -acetato hiperpolarizado está destinado para su uso en un medio de formación de imagen para detección de ^{13}C -RM *in vivo*. Para aplicaciones *in vitro*, también se pueden usar disolventes o mezclas de disolventes no acuosos, por ejemplo DMSO o metanol o mezclas que comprenden un vehículo acuoso y un disolvente no acuoso, por ejemplo, mezclas de DMSO y agua o metanol y agua.

Si se ha usado ácido ^{13}C -acético como el material de partida para la polarización nuclear dinámica, el ácido ^{13}C -acético hiperpolarizado obtenido se ha de convertir en ^{13}C -acetato. Si la composición sólida que comprende el ácido ^{13}C -acético hiperpolarizado se licúa por disolución, el medio de disolución es preferentemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua o una solución de tampón, preferentemente una solución de tampón fisiológicamente tolerable o que comprende un vehículo acuoso, por ejemplo, agua o una solución de tampón, preferentemente una solución de tampón fisiológicamente tolerable. Los términos "solución de tampón" y "tampón" se usan en el presente documento de manera intercambiable. En el contexto de esta solicitud "tampón" denota uno o más tampones, es decir, también mezclas de tampones.

Los tampones preferidos son tampones fisiológicamente tolerables, más preferentemente tampones que tamponan en el intervalo de aproximadamente pH 7 a 8, como por ejemplo 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.

Para convertir el ácido ^{13}C -acético hiperpolarizado en ^{13}C -acetato hiperpolarizado, en general se hace reaccionar el ácido ^{13}C -acético con una base. En una realización, se hace reaccionar el ácido ^{13}C -acético con una base para convertirlo en ^{13}C -acetato y, posteriormente se añade un vehículo acuoso. En otra realización preferida, el vehículo acuoso y la base se combinan en una solución y se añade esta solución al ácido ^{13}C -acético, disolviéndolo y convirtiéndolo en ^{13}C -acetato al mismo tiempo. En una realización preferida, la base es una solución acuosa de NaOH, Na_2CO_3 o NaHCO_3 , lo más preferido, la base es NaOH.

En otra realización preferida, el tampón de vehículo acuoso o (donde proceda) la solución de vehículo acuoso/base combinados comprende además uno o más compuestos que pueden unirse a o complejar iones paramagnéticos libres, por ejemplo agentes quelantes como DTPA o EDTA.

Si se lleva a cabo la hiperpolarización por el procedimiento de DNP, el agente de DNP, preferentemente un radical tritilo y el ión metálico paramagnético opcional se pueden retirar del líquido que contiene el ^{13}C -acetato hiperpolarizado. Se prefiere la retirada de estos compuestos si el ^{13}C -acetato hiperpolarizado está destinado para su uso en un medio de formación de imagen para uso *in vivo*. Si el ácido ^{13}C -acético fue un material de partida para la DNP, se prefiere convertir en primer lugar el ácido ^{13}C -acético hiperpolarizado en ^{13}C -acetato y retirar el agente de DNP y el ión metálico paramagnético opcional después de que tenga lugar dicha conversión.

En la técnica se conocen procedimientos que son útiles para retirar el radical tritilo y el ión metálico paramagnético y se describen en detalle en el documento WO-A2-2007/064226 y WO-A1-2006/011809.

En una realización preferida, el ^{13}C -acetato hiperpolarizado usado en el procedimiento de la invención se obtiene por polarización nuclear dinámica de una composición que comprende TRIS- ^{13}C -acetato o ^{13}C -acetato de sodio y más preferentemente TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato, TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 , $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio o $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio, un radical tritilo de fórmula (1) y opcionalmente un quelante paramagnético que comprende Gd^{3+} . En esta realización preferida, se prepara una solución del radical tritilo y, si se usa, el quelante paramagnético que comprende Gd^{3+} . El radical tritilo disuelto y el quelante paramagnético disuelto opcional se añaden al ^{13}C -acetato de sodio o TRIS- ^{13}C -acetato y la composición preferentemente se somete a sonicación o se mezcla por giro y se calienta suavemente para promover la mezcla íntima de todos los componentes.

El medio de formación de imagen de acuerdo con el procedimiento de la invención se puede usar como medio de formación de imagen para detección de ^{13}C -RM *in vitro*, por ejemplo, detección de ^{13}C -RM de cultivos celulares, muestras, tejido *ex vivo* u órganos aislados procedentes del cuerpo de un ser humano o animal no humano. Para este propósito, el medio de formación de imagen se proporciona como una composición que es adecuada para añadirse, por ejemplo, a cultivos celulares, muestras como orina, sangre o saliva, tejidos *ex vivo* como tejidos para biopsia u órganos aislados. Un medio de formación de imagen de este tipo comprende preferentemente, además del agente de formación de imagen, es decir, ^{13}C -acetato hiperpolarizado, un disolvente que es compatible con y se usa para ensayos tisulares y celulares *in vitro*, por ejemplo DMSO o metanol o mezclas de disolventes que comprenden un vehículo acuoso y un disolvente no acuoso, por ejemplo, mezclas de DMSO y agua o una solución de tampón o metanol y agua o una solución de tampón. Como es evidente para el experto en la técnica, pueden estar presentes vehículos, excipientes y coadyuvantes de formulación farmacéuticamente aceptables en un medio de formación de imagen de este tipo, pero no se requieren para este propósito.

Además, el medio de formación de imagen de acuerdo con el procedimiento de la invención se puede usar como medio de formación de imagen para detección de ^{13}C -RM *in vivo*, es decir, detección de ^{13}C -RM llevada a cabo sobre seres humanos o animales no humanos vivos. Para este propósito, el medio de formación de imagen necesitar ser adecuado para su administración a un cuerpo humano o de animal no humano vivo. Por tanto, un medio de formación de imagen de este tipo comprende preferentemente, además del agente de formación de imagen, es decir, ^{13}C -acetato hiperpolarizado, un vehículo acuoso, preferentemente un vehículo acuoso fisiológicamente tolerable y farmacéuticamente aceptable como agua, una solución de tampón o solución salina. Un medio de formación de imagen de este tipo puede comprender además vehículos o excipientes farmacéuticos o veterinarios, por ejemplo, coadyuvantes de formulación tales como estabilizantes, agentes de ajuste de la osmolalidad y agentes de solubilización que son convencionales para composiciones de diagnóstico en medicina humana o veterinaria.

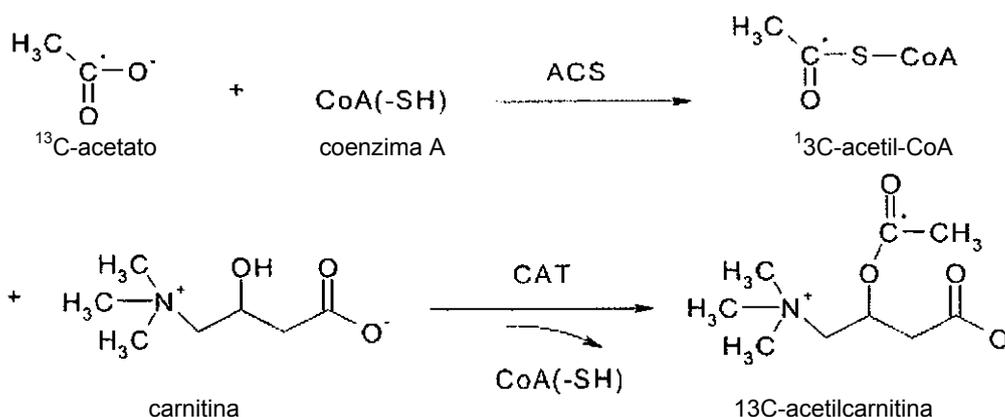
Si el medio de formación de imagen usado en el procedimiento de la invención se usa para detección de ^{13}C -RM *in vivo*, es decir en un cuerpo humano o animal no humano vivo, dicho medio de formación de imagen se administra preferentemente a dicho cuerpo por vía parenteral, preferentemente por vía intravenosa. En general, el cuerpo a examen se posiciona en un imán de RM. Las bobinas de RF de ^{13}C -RM dedicadas se posicionan para cubrir el área de interés. La dosificación y concentración exactas del medio de formación de imagen dependerá de una serie de factores tales como toxicidad y vía de administración. En general, el medio de formación de imagen se administra en una concentración de acetato de hasta 1 mmol por kg de peso corporal, preferentemente de 0,01 a 0,5 mmol/kg, más preferentemente de 0,1 a 0,3 mmol/kg. A menos de 400 s después de la administración, preferentemente menos de 120 s, más preferentemente menos de 60 s después de la administración, en especial preferentemente de 20 a 50 s se aplica una secuencia de imagen de RM que codifica el volumen de interés a una frecuencia y forma selectiva espacial

combinadas. El tiempo exacto de aplicación de una secuencia de RM es altamente dependiente del volumen de interés y de la especie.

5 En el procedimiento de acuerdo con la invención, se detectan señales de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C - acetil-CoA y ^{13}C -acetato. En una realización preferida, se detectan señales de ^{13}C -acetilcarnitina y ^{13}C -acetil-CoA.

La conversión metabólica de acetato en acetil-CoA y acetilcarnitina se demuestra en el esquema 1 para $^{13}\text{C}_1$ -acetato; * denota la marca de ^{13}C : El ^{13}C -acetato reacciona con coenzima A para formar ^{13}C -acetil-CoA en una reacción catalizada por acetil CoA ligasa (ACS, CE 6.2.1.1).

10 Después, ^{13}C -acetil-CoA reacciona con carnitina para ^{13}C -acetilcarnitina y coenzima A en una reacción catalizada por carnitina acetiltransferasa (CAT, CE 2.3.1.7).



Esquema 1.

El término "señal" en el contexto de la invención se refiere a la amplitud de la señal de RM o a la integral o área de pico con respecto al ruido de picos en un espectro de ^{13}C -RM que representa ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato. En una realización preferida, la señal es el área de pico.

15 En una realización preferida del procedimiento de la invención, las señales de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato se usan para generar un perfil metabólico de un ser humano o animal no humano vivo. Dicho perfil metabólico puede proceder de todo el cuerpo, por ejemplo, obtenido por detección de ^{13}C -RM *in vivo*. De forma alternativa, dicho perfil metabólico se genera por una región o volumen de interés, es decir, un determinado tejido, órgano o parte de dicho cuerpo de ser humano o de animal no humano.

20 En otra realización preferida del procedimiento de la invención, las señales mencionadas anteriormente de ^{13}C -acetil-carnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato se usan para generar un perfil metabólico de células en un cultivo celular, de muestras como orina, sangre o saliva, de tejido *ex vivo* como tejido para biopsia o de un órgano derivado de un ser humano o animal no humano. Después, dicho perfil metabólico se genera por detección de ^{13}C -RM *in vitro*.

25 Por tanto, en una realización preferida, se proporciona un procedimiento de detección de ^{13}C -RM usando un medio de formación de imagen que comprende ^{13}C -acetato hiperpolarizado y señales de detección de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato, en el que dichas señales se usan para generar un perfil metabólico.

30 En una realización preferida, se usan las señales de ^{13}C -acetilcarnitina y ^{13}C -acetil-CoA para generar dicho perfil metabólico.

35 En una realización, las intensidades de señal espectral de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato se usan para generar el perfil metabólico. En otra realización, las integrales de señal espectral de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C - acetil-CoA y ^{13}C -acetato se usan para generar el perfil metabólico. En otra realización, las intensidades de señal de imágenes separadas de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C - acetil-CoA y ^{13}C -acetato se usan para generar el perfil metabólico. En otra realización más, las intensidades de señal de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato se obtienen en dos o más puntos de tiempo para calcular la tasa de cambio de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato.

40 En otra realización, el perfil metabólico incluye o se genera usando datos de señales procesadas de ^{13}C - acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato, por ejemplo, proporciones de señales, señales

corregidas, información de constantes de velocidad dinámicas o metabólicas deducidas del patrón de señal de detecciones de RM múltiples, es decir, espectros o imágenes. Por tanto, en una realización preferida, una señal de ^{13}C -acetilcarnitina corregida, es decir, una señal de ^{13}C -acetilcarnitina con respecto a ^{13}C -acetato o una señal de ^{13}C -acetilcarnitina con respecto a ^{13}C -acetil-CoA, se incluye en o se usa para generar el perfil metabólico. En otra forma de realización preferida, una señal de ^{13}C -acetilcarnitina corregida con respecto a ^{13}C -carbono total se incluye en o se usa para generar el perfil metabólico siendo la señal de ^{13}C -carbono total la suma de las señales de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato. En una realización más preferida, la proporción de ^{13}C -acetilcarnitina y ^{13}C -acetil-CoA se incluyen en o se usan para generar el perfil metabólico.

El perfil metabólico generado en la realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención proporciona información sobre la actividad metabólica del cuerpo, parte del cuerpo, células, tejido, muestra corporal, etc. a examen y dicha información se puede usar en una etapa posterior, por ejemplo, para identificar enfermedades.

Esta enfermedad puede ser un tumor ya que el tejido tumoral normalmente se caracteriza por una actividad metabólica mayor que el tejido sano. Esta actividad metabólica mayor sería evidente de la comparación del perfil metabólico de un tumor o de una muestra *ex vivo* de un tumor con el perfil metabólico de tejido sano (por ejemplo, tejido adyacente o tejido *ex vivo* sano) y se puede manifestar en el perfil metabólico por señales altas de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o señal de ^{13}C -acetilcarnitina corregida alta o proporción alta de ^{13}C -acetilcarnitina con respecto a ^{13}C -acetil-CoA o a ^{13}C -acetato o carbono total o una tasa metabólica alta de aumento de ^{13}C -acetilcarnitina.

Otra enfermedad puede ser isquemia en el corazón ya que el tejido miocárdico isquémico se caracteriza normalmente por una actividad metabólica menor que el tejido miocárdico sano. De nuevo, esta actividad metabólica menor sería evidente de la comparación del perfil metabólico de tejido miocárdico isquémico con el perfil metabólico de tejido miocárdico sano de forma similar como se describe en el párrafo anterior.

Otra enfermedad puede ser la enfermedad de Alzheimer u otras enfermedades y trastornos del cerebro y/o relacionadas con la función cerebral, cognición y/o memoria ya que la ^{13}C -acetilcarnitina desempeña un papel metabólico central potenciado en estas enfermedades o trastornos. Se puede esperar que un perfil metabólico de un cerebro o de partes del mismo que esté afectado por estas enfermedades o trastornos que se obtiene por el procedimiento de la invención sea diferente de un perfil metabólico de un cerebro sano o de partes del mismo y que estas enfermedades o trastornos se manifiesten en el perfil metabólico por señales altas de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o señal de ^{13}C -acetilcarnitina corregida alta o proporción alta de ^{13}C -acetilcarnitina con respecto a ^{13}C -acetil-CoA o a ^{13}C -acetato o carbono total o una tasa metabólica alta de aumento de ^{13}C -acetilcarnitina.

Otra enfermedad puede ser diabetes, ya que una de las enzimas fundamentales en el metabolismo del acetato, carnitina acetiltransferasa, desempeña un papel crucial en la oxidación de ácidos grasos y es una diana prometedor para el desarrollo de fármacos antidiabetes y antiobesidad. De forma adecuada, el hígado sería el órgano de elección para generar un perfil metabólico de acuerdo con el procedimiento de la invención para identificar diabetes y la enfermedad se manifiesta en dicho perfil metabólico por señales altas de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o señal de ^{13}C -acetilcarnitina corregida alta o proporción alta de ^{13}C -acetilcarnitina con respecto a ^{13}C -acetil-CoA o a ^{13}C -acetato o carbono total o una tasa metabólica alta de aumento de ^{13}C -acetilcarnitina.

Otra enfermedad puede ser enfermedades relacionadas con el hígado, tales como fibrosis hepática o cirrosis hepática. En estas enfermedades, es característico un incremento en la cantidad de carnitina esterificada y por tanto un perfil metabólico de un hígado enfermo mostraría señales altas de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o señal de ^{13}C -acetilcarnitina corregida alta o proporción alta de ^{13}C -acetilcarnitina con respecto a ^{13}C -acetil-CoA o a ^{13}C -acetato o carbono total o una tasa metabólica alta de aumento de ^{13}C -acetilcarnitina.

Se puede incluir información anatómica y/o (si es adecuado) de perfusión en el procedimiento de la invención para la identificación de enfermedades. La información anatómica se puede obtener, por ejemplo, obteniendo un protón o imagen de ^{13}C -RM con o sin el empleo de un agente de contraste adecuado antes o después del procedimiento de la invención.

Si la enfermedad es isquemia en el corazón, se puede determinar la perfusión relativa en el miocardio usando un agente de contraste de R similar, por ejemplo, Omniscan™. De forma análoga, en la técnica se conocen técnicas de imagen de RM para la medida de la perfusión sin la administración de un agente de contraste. En una realización preferida, se usa un agente de contraste de ^{13}C hiperpolarizado no metabolizado para determinar la perfusión cuantitativa. Las técnicas adecuadas y los agentes de contraste se describen, por ejemplo, en el documento WO-A-02/23209.

En otra realización preferida, el medio de formación de imagen que comprende ^{13}C -acetato hiperpolarizado se administra repetidamente, permitiendo por tanto estudios dinámicos. Esta es una ventaja adicional del procedimiento de acuerdo con la invención en comparación con otros procedimientos de detección de RM que usan agentes de contraste de RM que (en dosis altas) pueden mostrar efectos tóxicos. Debido a la baja toxicidad del acetato y a su perfil de seguridad favorable, las dosis de este compuesto son bien toleradas por el paciente.

Como se estableció anteriormente, el perfil metabólico proporciona información sobre la actividad metabólica del

cuerpo, parte del cuerpo, células, tejido, muestra corporal, etc. a examen y dicha información se puede usar en una etapa posterior, por ejemplo, para identificar enfermedades. Sin embargo, un médico también puede usar esta información en una etapa adicional para elegir el tratamiento apropiado para el paciente a examen.

5 Además, dicha información se puede usar para monitorizar la respuesta de tratamiento, por ejemplo, éxito en el tratamiento, de las enfermedades mencionadas anteriormente, y su sensibilidad hace que el procedimiento sea especialmente adecuado para monitorizar una respuesta al tratamiento temprana, es decir, respuesta al tratamiento poco después de su inicio.

10 En otra realización, el procedimiento de la invención se puede usar para evaluar la eficacia del fármaco. En dicha realización, los fármacos potenciales para curar una determinada enfermedad se pueden someter a prueba en un estado muy temprano en el examen de fármacos, por ejemplo *in vitro* en un cultivo celular que es un modelo relevante para esta determinada enfermedad o en tejido *ex vivo* enfermo o un órgano aislado enfermo. De forma alternativa, se pueden someter a prueba fármacos potenciales para curar una determinada enfermedad en un estadio temprano en el examen de fármacos *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal que es relevante para esta determinada enfermedad. Comparando el perfil metabólico de dicho cultivo celular, tejido *ex vivo*, animal de prueba o aislado antes y después del tratamiento con un fármaco potencial, se puede determinar la eficacia de este fármaco y por tanto, la respuesta al tratamiento y el éxito, lo que por supuesto proporciona información valiosa en el examen de fármacos potenciales.

15 También se da a conocer una composición que comprende $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio, $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio, TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 , ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético o ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético- d_3 , un radical tritilo y opcionalmente un ión metálico paramagnético.

20 En una primera divulgación, dicha composición comprende $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio o $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio o TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 , un radical tritilo y opcionalmente un ión metálico paramagnético. En una realización preferida, dicho radical tritilo es un radical tritilo de fórmula (1) en el que M representa hidrógeno o sodio y R1 es preferentemente igual, más preferentemente una un grupo alquilo C1-C4 ramificado o de cadena lineal, lo más preferentemente etilo, etilo o isopropilo; o R1 es preferentemente igual, más preferentemente una un grupo alquilo C₁-C₄ ramificado o de
25 cadena lineal que está sustituido con un grupo hidroxilo, lo más preferentemente -CH₂-CH₂-OH; o R1 es preferentemente igual y representa -CH₂-OC₂H₄OH. En otra realización preferida, dicha composición comprende un ión metálico paramagnético, preferentemente una sal o quelante paramagnético que comprende Gd³⁺ y más un quelante paramagnético que comprende Gd³⁺. De forma adecuada, dicha composición comprende además un disolvente o disolventes; preferentemente un vehículo acuoso y lo más preferentemente se usa agua como disolvente.
30 Se pueden usar las composiciones mencionadas anteriormente para obtener $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio o $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio o TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado por polarización nuclear dinámica (DNP) con un nivel de polarización alto.

35 En una segunda divulgación, dicha composición comprende ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético o ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético- d_3 , un radical tritilo y opcionalmente un ión metálico paramagnético. En una realización preferida, dicho radical tritilo es un radical tritilo de fórmula (1), en el que M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual o diferente, preferentemente igual y preferentemente representa -CH₂-OCH₃, -CH₂-OC₂H₅, -CH₂-CH₂-OCH₃, -CH₂-SCH₃, -CH₂-SC₂H₅ o -CH₂-CH₂-SCH₃, lo más preferentemente -CH₂-CH₂-OCH₃. En otra realización preferida, dicha composición comprende un ión metálico paramagnético, preferentemente una sal o quelante paramagnético que comprende Gd³⁺ y más un quelante paramagnético que comprende Gd³⁺. Dicha composición puede o no comprender un disolvente o disolventes; en una
40 realización preferida, se usa un vehículo acuoso y lo más preferentemente agua como disolvente. Se pueden usar las composiciones mencionadas anteriormente para obtener ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético hiperpolarizado o ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético- d_3 hiperpolarizado por polarización nuclear dinámica (DNP) con un nivel de polarización alto. Dicho ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético hiperpolarizado o ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético- d_3 hiperpolarizado se puede convertir en $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado o $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado por disolución con una base, por ejemplo, NaOH.

45 También se da a conocer una composición que comprende $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio hiperpolarizado, $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio hiperpolarizado, TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado, ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético hiperpolarizado o ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético- d_3 hiperpolarizado, un radical tritilo y opcionalmente un ión metálico paramagnético, en el que dicha composición se obtiene por polarización nuclear dinámica.

50 También se da a conocer $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio hiperpolarizado, TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado, ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético hiperpolarizado o ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético- d_3 hiperpolarizado. Una divulgación preferida de este aspecto es $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio hiperpolarizado o TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado, que se puede usar como agente de formación de imagen en una composición (medio de formación de imagen) para su uso en un procedimiento de detección de ^{13}C -RM.

55 También se da a conocer un medio de formación de imagen que comprende $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio hiperpolarizado o TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado.

Se puede usar el medio de formación de imagen para su uso en el procedimiento de acuerdo con la invención como medio de formación de imagen en un procedimiento de detección de ^{13}C -RM.

El medio de formación de imagen de acuerdo con el procedimiento de la invención se puede usar como medio de formación de imagen para detección de ^{13}C -RM *in vitro*, por ejemplo, detección de ^{13}C -RM de cultivos celulares, muestras, tejido *ex vivo* u órganos aislados procedentes del cuerpo de un ser humano o animal no humano. Para este propósito, el medio de formación de imagen se proporciona como una composición que es adecuada para añadirse, por ejemplo, a cultivos celulares, muestras como orina, sangre o saliva, tejidos *ex vivo* como tejidos para biopsia u órganos aislados. Un medio de formación de imagen de este tipo comprende preferentemente, además del agente de formación de imagen, es decir, $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio hiperpolarizado o TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado, un disolvente que es compatible con y se usa para ensayos tisulares y celulares *in vitro*, por ejemplo DMSO o metanol o mezclas de disolventes que comprenden un vehículo acuoso y un disolvente no acuoso, por ejemplo, mezclas de DMSO y agua o una solución de tampón o metanol y agua o una solución de tampón. Como es evidente para el experto en la técnica, pueden estar presentes vehículos, excipientes y coadyuvantes de formulación farmacéuticamente aceptables en un medio de formación de imagen de este tipo, pero no se requieren para este propósito.

Además, el medio de formación de imagen de acuerdo con el procedimiento de la invención se puede usar como medio de formación de imagen para detección de ^{13}C -RM *in vivo*, es decir, detección de ^{13}C -RM llevada a cabo sobre seres humanos o animales no humanos vivos. Para este propósito, el medio de formación de imagen necesita ser adecuado para su administración a un cuerpo humano o de animal no humano vivo. Por tanto, este medio de formación de imagen comprende preferentemente, además del agente de formación de imagen, es decir $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 de sodio o TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado, un vehículo acuoso, preferentemente un vehículo acuoso fisiológicamente tolerable y farmacéuticamente aceptable como agua, una solución tampón o solución salina. Un medio de formación de imagen de este tipo puede comprender además vehículos o excipientes farmacéuticos o veterinarios, por ejemplo, coadyuvantes de formulación tales como estabilizantes, agentes de ajuste de la osmolalidad y agentes de solubilización que son convencionales para composiciones de diagnóstico en medicina humana o veterinaria.

Breve descripción de los dibujos:

La FIG. 1 muestra el aumento y la disminución de la señal de $^{13}\text{C}_1$ -acetato y $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina con el tiempo. Los datos se recogieron con una bobina de superficie colocada sobre el corazón del ratón.

La FIG. 2 muestra intensidades de señal de $^{13}\text{C}_1$ -acetato, $^{13}\text{C}_1$ -acetil-CoA y $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina tomadas 10 s después de una inyección intravenosa de $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado. Los datos se recogieron con una bobina de superficie colocada sobre el corazón del ratón.

La FIG. 3 muestra las proporciones de $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina con respecto a $^{13}\text{C}_1$ -acetil-CoA medidas en el corazón y el hígado del ratón con una bobina de superficie colocada sobre estos órganos.

La FIG. 4 muestra las proporciones de $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina con respecto a $^{13}\text{C}_1$ -acetato medidas en una pata trasera de un ratón, antes de un periodo isquémico de 30 min, 5 min después del periodo isquémico y 1 hora después del periodo isquémico.

La invención se representa por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1a Producción de $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio hiperpolarizado por el procedimiento de DNP en presencia de un Gd-quelato como ión metálico paramagnético y un radical tritilo como agente de DNP

A un microtubo de ensayo se le añadió $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio (Aldrich, 24,9 mg, 0,30 mmol) y 16 μl de agua. Se calentó suavemente el tubo de ensayo y se sometió a sonicación para disolver el $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio. Se preparó una solución acuosa de sal sódica de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(hidroxietil)-benzo-[1,2-4,5']-bis-(1,3)-ditiol-4-il)-metilo (radical tritilo) que se había sintetizado de acuerdo con el ejemplo 7 del documento WO-A1-98/39277 (139 $\mu\text{mol/g}$ de solución) y se añadieron 3,4 mg de esta solución al $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio disuelto en el tubo. Además, se preparó una solución acuosa del Gd-quelato de 1,3,5-tris-(N-(DO3A-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metilfenil)-[1,3,5]triazinano-2,4,6-triona (ión metálico paramagnético) que se había sintetizado de acuerdo con el ejemplo 4 del documento WO-A-2007/064226 (14,6 $\mu\text{mol/g}$ de solución) y se añadieron 1,2 mg de esta solución al tubo de ensayo con el $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio y el radical tritilo. Se sometió a sonicación la composición resultante y se calentó suavemente para disolver todos los compuestos. Se transfirió la composición (37 μl , 12,5 mM en radical tritilo y 1,41 mM en Gd^{3+}) desde el tubo a un vaso de muestras y se insertó el vaso de muestras en el polarizador de DNP. Se polarizó la composición bajo condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T bajo irradiación con microondas (93,89 GHz). Se siguió la polarización con ^{13}C -RMN de estado sólido y se determinó que la polarización de estado sólido fue de más de un 20%.

Ejemplo 1b Producción de un medio de formación de imagen que comprende $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio hiperpolarizado

Después de 75 minutos de polarización nuclear dinámica, se disolvió la composición polarizada congelada obtenida en 6 ml de tampón fosfato (20 mM, pH 7, 100 mg/l de EDTA, 0,9% de NaCl). El pH de la solución final que contenía la composición disuelta fue de $7,3 \pm 0,1$. La concentración de $^{13}\text{C}_1$ -acetato de sodio en dicha solución final fue de 50 mM.

Se determinó que la polarización de estado líquido por ^{13}C -RMN de estado líquido a 400 MHz fue de un 19%.

5 Ejemplo 2a Preparación de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato

Se disolvió ácido $^{13}\text{C}_1$ -acético (Aldrich, 474 mg, 7,7 mmol) en 50 ml de agua. Se añadió TRIS a la solución (946 mg, 7,80 mmol). Después de la disolución del sólido, se diluyó la solución en 200 ml de agua y se secó por congelación. Se caracterizó el producto secado por congelación TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato por RMN: pureza 93%, 1,12 eq. TRIS.

10 Ejemplo 2b Producción de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado por el procedimiento de DNP en presencia de un Gd- quelato como ión metálico paramagnético y un radical tritilo como agente de DNP

A un microtubo de ensayo se le añadió TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato que se preparó de acuerdo con el ejemplo 2a (54,6 mg, 0,30 mmol) y 10 μl de agua. Se calentó suavemente el tubo de ensayo y se sometió a sonicación para disolver el TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato. Se preparó una solución acuosa de sal sódica de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(hidroxietil)-benzo-[1,2-4,5']-bis-(1,3)-ditiol-4-il)-metilo (radical tritilo) que se había sintetizado de acuerdo con el ejemplo 7 del documento WO-A1-98/39277 (139 $\mu\text{mol/g}$ de solución) y se añadieron 6,0 mg de esta solución al TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato disuelto en el tubo. Además, se preparó una solución acuosa del Gd-quelato de 1,3,5-tris-(N-(DO3A-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metilfenil)-[1,3,5]triazinano-2,4,6-triona (ión metálico paramagnético) que se había sintetizado de acuerdo con el ejemplo 4 del documento WO-A-2007/064226 (14,6 $\mu\text{mol/g}$ de solución) y se añadieron 1,3 mg de esta solución al tubo de ensayo con el TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato y el radical tritilo. Se sometió a sonicación la composición resultante y se calentó suavemente para disolver todos los compuestos. Se transfirió la composición (65 μl , 12,8 mM en radical tritilo y 0,9 mM en Gd^{3+}) desde el tubo a un vaso de muestras y se insertó el vaso de muestras en el polarizador de DNP. Se polarizó la composición bajo condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T bajo irradiación con microondas (93,89 GHz). Se siguió la polarización con ^{13}C -RMN de estado sólido y se determinó que la polarización de estado sólido fue de más de un 25 %.

25 Ejemplo 2c Producción de un medio de formación de imagen que comprende TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado

Después de 75 minutos de polarización nuclear dinámica, se disolvió la composición polarizada congelada obtenida en 6 ml de tampón fosfato (20 mM, pH 7, 100 mg/l de EDTA, 0,9% de NaCl). El pH de la solución final que contenía la composición disuelta fue de $7,3 \pm 0,1$. La concentración de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato en dicha solución final fue de 50 mM.

30 Ejemplo 3a Producción de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado por el procedimiento de DNP en presencia de un Gd- quelato como ión metálico paramagnético y un radical tritilo como agente de DNP

A un microtubo de ensayo se le añadió TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 que se preparó como se describe el ejemplo 2a (55,5 mg, 0,30 mmol) y 10 μl de agua. Se calentó suavemente el tubo de ensayo y se sometió a sonicación para disolver el TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 . Se preparó una solución acuosa de sal sódica de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(hidroxietil)-benzo-[1,2-4,5']-bis-(1,3)-ditiol-4-il)-metilo (radical tritilo) que se había sintetizado de acuerdo con el ejemplo 7 del documento WO-A1-98/39277 (139 $\mu\text{mol/g}$ de solución) y se añadieron 6,0 mg de esta solución al TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 disuelto en el tubo. Además, se preparó una solución acuosa del Gd-quelato de 1,3,5-tris-(N-(DO3A-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metilfenil)-[1,3,5]triazinano-2,4,6-triona (ión metálico paramagnético) que se había sintetizado de acuerdo con el ejemplo 4 del documento WO-A-2007/064226 (14,6 $\mu\text{mol/g}$ de solución) y se añadieron 1,3 mg de esta solución al tubo de ensayo con el TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 y el radical tritilo. Se sometió a sonicación la composición resultante y se calentó suavemente para disolver todos los compuestos. Se transfirió la composición (65 μl , 12,8 mM en radical tritilo y 0,9 mM en Gd^{3+}) desde el tubo a un vaso de muestras y se insertó el vaso de muestras en el polarizador de DNP. Se polarizó la composición bajo condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T bajo irradiación con microondas (93,89 GHz). Se siguió la polarización con ^{13}C -RMN de estado sólido y se determinó que la polarización de estado sólido fue de más de un 25 %.

Ejemplo 3b Producción de un medio de formación de imagen que comprende TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 hiperpolarizado

Después de 75 minutos de polarización nuclear dinámica, se disolvió la composición polarizada congelada obtenida en 6 ml de tampón fosfato (20 mM, pH 7, 100 mg/l de EDTA, 0,9% de NaCl). El pH de la solución final que contenía la composición disuelta fue de $7,3 \pm 0,1$. La concentración de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato- d_3 en dicha solución final fue de 50 mM.

Se determinó que la polarización de estado líquido por ^{13}C -RMN de estado líquido a 400 MHz fue de un 32 %.

Ejemplo 4 Espectroscopía de ^{13}C -RM *in vivo* en ratones (corazón) usando un medio de formación de imagen que comprende TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado

Se inyectaron 200 μl de un medio de formación de imagen que se preparó como se describe en el ejemplo 3a en un ratón C57B1/6 durante un periodo de tiempo de 6 s. La concentración de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato en dicho medio de formación de imagen fue de 75 mM y la polarización fue de un 20% en el momento de la inyección. Se colocó una bobina de superficie de ^{13}C (diámetro de 12 mm) sobre el miocardio del ratón. Se usó una bobina de cuerpo de ^1H de rata para imágenes de referencia anatómico y compensación localizada. Se llevó a cabo la espectroscopía de ^{13}C -RM con un espectrómetro Bruker de 2,4 T. Se obtuvo un conjunto dinámico de espectros de ^{13}C -RM (en total 30) cada 3 s con un pulso de RF de 30 grados. A partir de este experimento, se observó claramente un aumento en la señal de $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina con el transcurso del experimento (FIG. 1).

Ejemplo 5 Espectroscopía de ^{13}C -RM *in vivo* en ratones (corazón) usando un medio de formación de imagen que comprende TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado

Se inyectaron 200 μl de un medio de formación de imagen que se preparó como se describe en el ejemplo 3a en un ratón C57B1/6 durante un periodo de tiempo de 6 s. La concentración de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato en dicho medio de formación de imagen fue aprox. de 50 mM. En ambos experimentos ($n = 2$) se colocó una bobina de superficie de ^{13}C (diámetro de 12 mm) sobre el miocardio del ratón y se llevó a cabo una espectroscopía de ^{13}C -RM en un espectrómetro Bruker de 2,4 T. Se obtuvo un espectro 10 s después de haber inyectado el medio de formación de imagen con un pulso de RF de 90 grados. A partir de estos dos experimentos, tanto $^{13}\text{C}_1$ -acetil-CoA como $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina se pudieron identificar (FIG 2) y cuantificar (FIG 3). La proporción de $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina con respecto a $^{13}\text{C}_1$ -acetil-CoA fue aproximadamente 3 veces mayor en el corazón que en el hígado, véase el ejemplo 6.

Ejemplo 6 Espectroscopía de ^{13}C -RM *in vivo* en ratones (hígado) usando un medio de formación de imagen que comprende TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado

Se inyectaron 200 μl de un medio de formación de imagen que se preparó como se describe en el ejemplo 3a en un ratón C57B1/6 durante un periodo de tiempo de 6 s. La concentración de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato en dicho medio de formación de imagen fue aprox. de 50 mM. En ambos experimentos ($n = 2$) se colocó una bobina de superficie de ^{13}C (diámetro de 12 mm) sobre el hígado del ratón y se llevó a cabo una espectroscopía de ^{13}C -RM en un espectrómetro Bruker de 2,4 T. Se obtuvo un espectro 10 s después de haber inyectado el medio de formación de imagen con un pulso de RF de 90 grados. A partir de estos dos experimentos, tanto $^{13}\text{C}_1$ -acetil-CoA como $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina se pudieron identificar (FIG 2) y cuantificar (FIG 3). La proporción de $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina con respecto a $^{13}\text{C}_1$ -acetil-CoA fue aproximadamente 3 veces menor en el corazón que en el hígado, véase el ejemplo 5.

Ejemplo 7 Espectroscopía de ^{13}C -RM *in vivo* en ratones (músculo esquelético) usando un medio de formación de imagen que comprende TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato hiperpolarizado

Se inyectaron 200 μl de un medio de formación de imagen que se preparó como se describe en el ejemplo 3a en un ratón C57B1/6 durante un periodo de tiempo de 6 s. La concentración de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato en dicho medio de formación de imagen fue aprox. de 50 mM. Se colocó una bobina de superficie de ^{13}C (diámetro de 9 mm) sobre la pata trasera del ratón y se llevó a cabo una espectroscopía de ^{13}C -RM en un espectrómetro Bruker de 2,4 T. Se obtuvieron 20 pulsos con un ángulo de inclinación de 25° cápsula cada 4 s. Se llevaron a cabo tres experimentos: 1) antes de un periodo isquémico de 30 min, 2) 5 min después el periodo isquémico y 3) 1 hora después del periodo isquémico. A partir de experimentos se pudo cuantificar una proporción entre $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina y $^{13}\text{C}_1$ -acetato, véase la FIG. 4. Se observó una disminución de la señal de $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina de aproximadamente un factor de 10 justo después del periodo isquémico y después de una hora de reperusión la señal aún fue muy baja comparada con el músculo de control.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de ^{13}C -RM usando un medio de formación de imagen que comprende ^{13}C -acetato hiperpolarizado en el que se detectan señales de ^{13}C -acetilcarnitina y opcionalmente ^{13}C -acetil-CoA o ^{13}C -acetil-CoA y ^{13}C -acetato.
- 5 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se detectan señales de ^{13}C -acetilcarnitina y ^{13}C -acetil-CoA.
3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que se usan dichas señales para generar un perfil metabólico.
- 10 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho procedimiento es un procedimiento de detección de ^{13}C -RM *in vivo* y dicho perfil metabólico es un perfil metabólico de un ser humano o animal no humano vivo.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho procedimiento es un procedimiento de detección de ^{13}C -RM *in vivo* y dicho perfil metabólico es un perfil metabólico de células en un cultivo celular, de muestras, de tejido *ex vivo* o de un órgano aislado procedente de un ser humano o animal no humano.

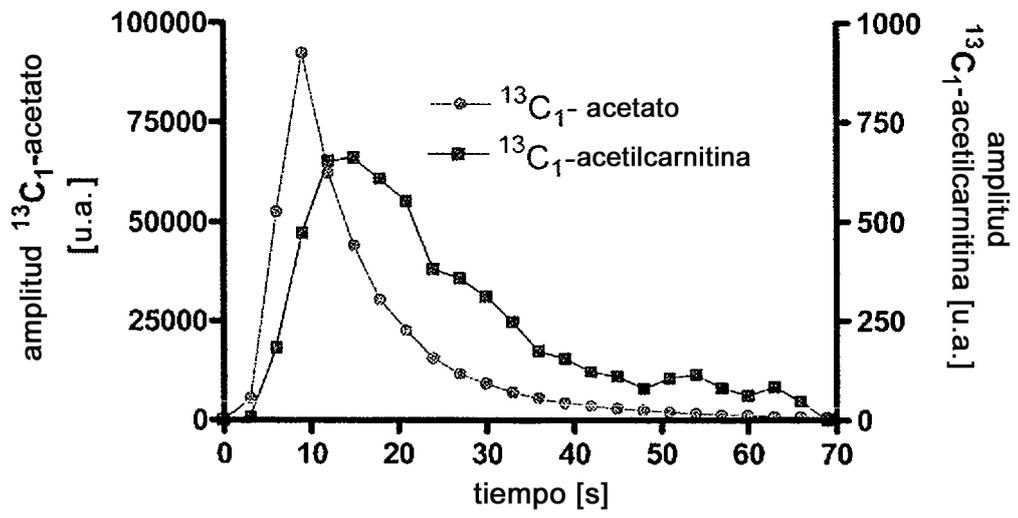


FIG. 1

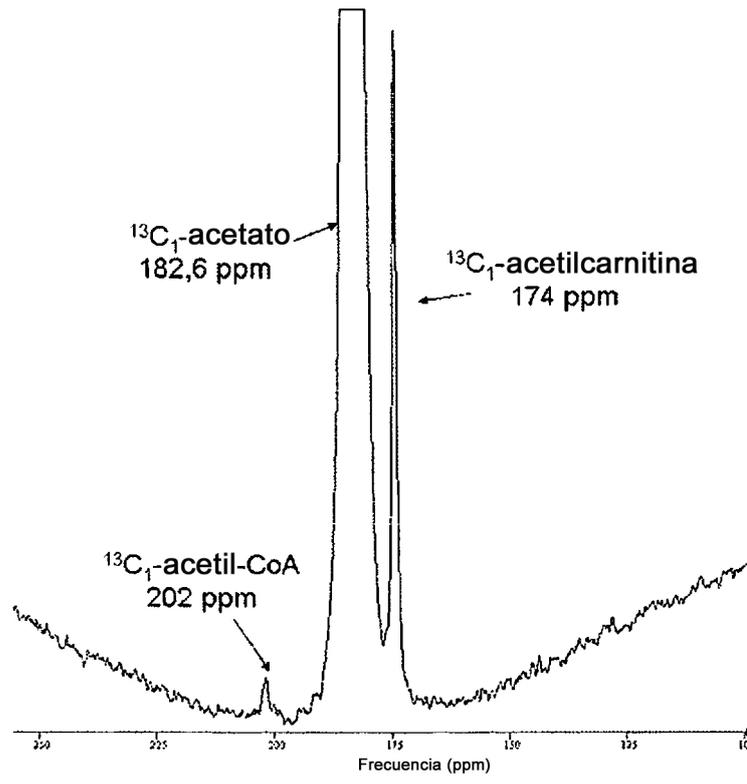


FIG. 2

Proporción de $^{13}\text{C}_1$ -acetilcarnitina con respecto a $^{13}\text{C}_1$ -acetil-CoA

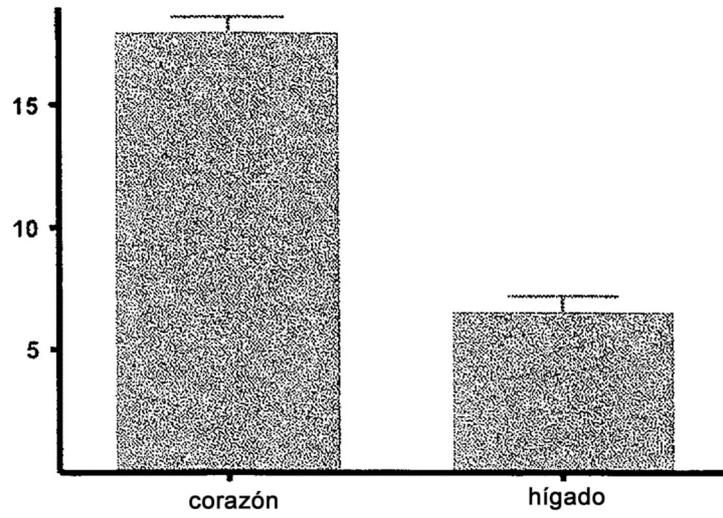


FIG. 3

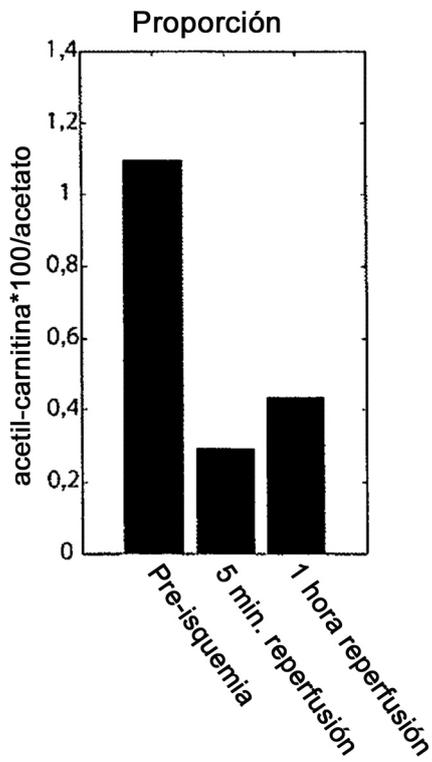


FIG. 4