

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 089**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06824360 .9**
96 Fecha de presentación: **01.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1954321**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE LA POLARIZACIÓN NUCLEAR DINÁMICA(DNP) QUE USA UN RADICAL TRITILLO Y UN IÓN METÁLICO PARAMAGNÉTICO.**

30 Prioridad:
01.12.2005 NO 20055681
02.12.2005 NO 20055705
05.07.2006 NO 20063119

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 AS
NYCOVEIEN 1-2 PO BOX 4220 NYDALEN
0401 OSLO, NO

72 Inventor/es:
THANING, Mikkel y
SERVIN, Rolf

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 089 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 la polarización nuclear dinámica (DNP) que usa un radical tritilo y un ión metálico paramagnético

La invención se refiere a un procedimiento de polarización nuclear dinámica (DNP), que conduce a niveles mejorados de polarización en la muestra a polarizar, y a composiciones y a agentes polarizantes para su uso en el procedimiento.

5 La obtención de imágenes mediante resonancia magnética (RM) (IRM) es una técnica de obtención de imágenes que se ha convertido en particularmente atractiva para los médicos, ya que permite obtener imágenes del cuerpo de un paciente o sus partes en una manera 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, IRM es la técnica propicia de obtención de imágenes de tejidos blandos y órganos, y permite la discriminación entre tejido normal y tejido enfermo,
10 por ejemplo, tumores y lesiones.

IRM puede realizarse con o sin agentes de contraste para RM. Sin embargo, la IRM mejorada con contraste permite, normalmente, la detección de cambios mucho más pequeños en los tejidos, lo que la convierte en una herramienta poderosa para la detección de cambios en los tejidos en las etapas iniciales, tal como, por ejemplo, pequeños tumores o metástasis.

15 Se han usado varios tipos de agentes de contraste en IRM. Los quelatos metálicos paramagnéticos solubles en agua, por ejemplo, quelatos de gadolinio, tales como Omniscan™ (GE Healthcare) son agentes de contraste para RM, usados ampliamente. Debido a su bajo peso molecular, se distribuyen rápidamente en el espacio extracelular (es decir, la sangre y el intersticio) si son administrados dentro del sistema vascular. También son eliminados, de manera relativamente rápida, del cuerpo.

20 Por otra parte, los agentes de contraste para RM en el lecho sanguíneo, por ejemplo, partículas de óxido de hierro super-paramagnético, son retenidos dentro del sistema vascular durante un tiempo prolongado. Han demostrado ser extremadamente útiles para mejorar el contraste en el hígado, y también para detectar anomalías en la permeabilidad capilar, por ejemplo, paredes capilares con "fugas" en tumores, por ejemplo, tal como resultado de una angiogénesis.

25 A pesar de las indiscutibles y excelentes propiedades de los agentes de contraste indicados anteriormente, su uso no está exento de riesgos. Aunque los complejos de quelato metálico paramagnético tienen, normalmente, altas constantes de estabilidad, es posible que iones de metales tóxicos sean liberados en el cuerpo después de la administración. Además, este tipo de agentes de contraste muestran poca especificidad.

El documento WO-A-99/35508 divulga un procedimiento de investigación de un paciente mediante RM, usando una solución hiperpolarizada de un agente de T_1 alto, tal como agente de contraste para IRM. El término "hiperpolarización"
30 se refiere a mejorar la polarización nuclear de los núcleos RMN activos presentes en el agente de T_1 alto, es decir, núcleos con spin nuclear diferente de cero, preferentemente núcleos ^{13}C - o ^{15}N , a un nivel superior al encontrado a temperatura ambiente y 1 T (polarización térmica). Tras mejorar la polarización nuclear de los núcleos RMN activos, la diferencia de población entre los estados excitado y base de spin nuclear de estos núcleos está considerablemente incrementada y, por ello, la intensidad de la señal de RM es amplificada en un factor de cien o superior. Cuando se usa
35 un agente de T_1 alto, hiperpolarizado, enriquecido con ^{13}C y/o ^{15}N , no habrá, esencialmente, interferencias de las señales de fondo, ya que la abundancia natural de ^{13}C y/o ^{15}N es insignificante y, de esta manera, además de la intensidad de la señal, el contraste de la imagen será también ventajosamente alto. La principal diferencia entre los agentes de contraste para IRM convencionales y los agentes de T_1 alto, hiperpolarizados, es que en el primero los cambios en el contraste son causados por un cambio en los tiempos de relajación de los protones del agua en el
40 cuerpo, mientras que la última clase de agentes puede ser considerada como trazadores no radiactivos, ya que la señal de RM obtenida surge solamente desde el agente inyectado.

Una variedad de posibles agentes de T_1 alto, adecuados para su uso como agentes para obtención de imágenes mediante RM, se divulgan en el documento WO-A-99/35508 incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos no endógenos y endógenos, tales como acetato, piruvato, oxalato o gluconato, azúcares, tales como glucosa o fructosa,
45 urea, amidas, aminoácidos, tales como glutamato, glicina, cisteína o aspartato, nucleótidos, vitaminas, tales como ácido ascórbico, derivados de penicilina y sulfonamidas. Se afirma además que los intermediarios en los ciclos metabólicos, tales como el ciclo del ácido cítrico, tal como ácido fumárico, son agentes preferentes para la obtención de imágenes mediante RM de la actividad metabólica.

Se debe destacar que la señal de un agente para obtención de imágenes hiperpolarizado decae debido a la relajación y, después de la administración al cuerpo de un paciente, a la dilución. Por lo tanto, el valor T_1 de los agentes para obtención de imágenes en fluidos biológicos (por ejemplo, sangre) debe ser suficientemente largo (alto) para permitir que el agente se distribuya al sitio objetivo en el cuerpo del paciente, en un estado altamente hiperpolarizado. Además del agente para obtención de imágenes, que tiene un T_1 alto, es extremadamente favorable conseguir un alto nivel
50 polarización.

Varios procedimientos para la obtención de agentes de T₁ alto, hiperpolarizados, se divulgan en el documento WO-A-99/35508; uno de ellos es la técnica de polarización nuclear dinámica (DNP), mediante la cual la polarización de una muestra es realizada por un agente de polarización o un agente denominado agente de DNP, un compuesto que comprende electrones no apareados. Durante el procedimiento de DNP, la energía es proporcionada, normalmente en forma de radiación de microondas, la cual excitará inicialmente el agente de DNP. Tras el decaimiento al estado base, hay una transferencia de polarización desde los electrones no apareados del agente de DNP a los núcleos RMN activos de la muestra. Generalmente, 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. Tal como alternativa, pueden emplearse un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la cual se consigue una mejora suficiente de la polarización. La técnica de DNP se describe, por ejemplo, en los documentos WO-A-98/58272 y WO-A-01/96895.

El agente de DNP juega un papel decisivo en el procedimiento de DNP, ya que su elección tiene un gran impacto sobre el nivel de polarización que puede lograrse en la muestra a polarizar. Se conocen una diversidad de agentes de DNP, a los cuales se hace referencia en el documento WO-A-99/35508 como "agentes de contraste OMRI". El uso de radicales tritilo estables, basados en oxígeno, basados en azufre o basados en carbono, tal como se describe 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 ha tenido como resultado altos niveles de polarización en una diversidad de muestras diferentes.

El documento GB 2 252 245 de Instrumentarium Corporation, divulga composiciones de diagnóstico para su uso en IRM. Una composición sugerida incluye un radical libre estable, tal como un radical libre estable triarilmetilo, y un complejo de quelato metálico paramagnético. En las composiciones del documento GB 2 252 245, no hay una "muestra" presente, es decir, no hay un compuesto enriquecido con ¹³C o ¹⁵N, que funcione como un agente de obtención de imágenes a hiperpolarizar.

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto ahora que la adición de iones de gadolinio a una composición que comprende una muestra a polarizar mediante el procedimiento de DNP y un radical tritilo, tal como agente de DNP, resulta en un nivel de polarización notablemente mayor en la muestra. Esto es especialmente favorable en una situación clínica en la que la muestra polarizada es usada como un agente de obtención de imágenes mediante RM en un procedimiento de examen mediante RM de un paciente. Si, por ejemplo, el nivel de polarización en la muestra pudiera ser mejorado en un factor 2, sólo tendría que usarse la mitad de la concentración de la muestra en el procedimiento de examen mediante RMN. Por supuesto, esto es ventajoso, no sólo desde un punto de vista económico, sino que abre también la posibilidad de usar muestras que hubieran tenido efectos secundarios no deseados a estas concentraciones dobles.

De esta manera, visto desde un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de una muestra sólida hiperpolarizada, que es un compuesto endógeno enriquecido con ¹³C o ¹⁵N, que comprende preparar una composición que comprende la muestra, un radical tritilo basado en carbono y un ión de gadolinio y llevar a cabo una polarización nuclear dinámica sobre la composición.

Los términos "hiperpolarizado" y "polarizado" se usan, de manera intercambiable, en adelante, en la presente memoria, e indican un exceso de nivel de polarización nuclear. Preferentemente, los términos "hiperpolarizado" y "polarizado" indican un exceso de nivel de polarización nuclear del 0,1%, más preferentemente, del 1% y, más preferentemente, del 10%.

El nivel de polarización puede ser determinado, por ejemplo, mediante mediciones de RMN en estado sólido de los núcleos RMN activos en la muestra hiperpolarizada. Por ejemplo, si el núcleo RMN activo en la muestra hiperpolarizada es ¹³C, se adquiere una RMN ¹³C en estado sólido de dicha muestra. La medición de RMN ¹³C en estado sólido consiste, preferentemente, en una simple secuencia de RMN de pulso-adquisición, usando un ángulo de inclinación bajo. La intensidad de la señal de la muestra hiperpolarizada es comparada con el nivel de polarización de la muestra antes del procedimiento de polarización nuclear dinámica. A continuación, el nivel de polarización es calculado a partir de la relación entre las intensidades de la señal de la muestra antes y después de la DNP.

De una manera similar, el nivel de polarización para las muestras hiperpolarizadas disueltas puede ser determinado mediante mediciones de RMN en estado líquido del núcleo RMN activo en la muestra hiperpolarizada. Una vez más, la intensidad de la señal de la muestra hiperpolarizada disuelta es comparada con el nivel de polarización de la muestra disuelta antes del procedimiento de polarización nuclear dinámica. A continuación, el nivel de polarización es calculado a partir de la relación entre las intensidades de las señales de la muestra antes y después de la DNP.

El término "muestra" indica la entidad o entidades moleculares a hiperpolarizar mediante polarización nuclear dinámica (DNP). Generalmente, la muestra es uno o más compuestos químicos.

El procedimiento según la invención conduce a altos niveles de polarización en la muestra a polarizar. En principio, cualquier compuesto químico puede ser usado como la muestra. La muestra puede ser un candidato a medicamento,

de manera adecuada, una pequeña molécula orgánica, por ejemplo, menor de 2.000 Da, o una mezcla de varios candidatos a medicamento y el candidato o los candidatos a medicamentos hiperpolarizados pueden ser usados en ensayos de RMN, por ejemplo, para determinar la afinidad de unión a un receptor determinado o en ensayos enzimáticos. Dichos ensayos se describen en el documento WO-A-2003/089656 o WO-A 2004/051300 y están basados, preferentemente, en el uso de la espectroscopia de RMN en estado líquido, lo que significa que la muestra sólida hiperpolarizada tiene que ser licuada después de la polarización, preferentemente disolviéndolo o fundiéndolo. La muestra puede ser enriquecida o no isotópicamente.

La muestra puede ser un agente de obtención de imágenes o un precursor del mismo, y la muestra hiperpolarizada es usada como agente de obtención de imágenes mediante RM y/o obtención de imágenes mediante desplazamiento químico. Las muestras preferentes son aquellas que contienen núcleos polarizados que exhiben una relajación longitudinal lenta, de manera que la polarización se mantiene durante un período de tiempo suficiente para su transferencia a un organismo y la obtención de imágenes subsiguiente. Las muestras preferentes contienen núcleos con constantes de tiempo de relajación longitudinal (T_1) que son mayores de 10 segundos, preferentemente, mayores de 30 segundos y, aún más preferentemente, mayores de 60 segundos. Dichos agentes, denominados "agentes de T_1 alto" se describen, por ejemplo, en el documento WO-A-99/35508. Tal como alternativa, los valores de T_1 de las posibles muestras pueden encontrarse en la literatura o pueden ser determinados mediante la adquisición de un espectro de RMN de la posible muestra, por ejemplo, un espectro de RMN ^{13}C para determinar el T_1 de una posible muestra etiquetada con ^{13}C .

Las muestras especialmente preferentes son muestras que juegan un papel en los procesos metabólicos en el cuerpo de animales humanos y no humanos. Dichos agentes de obtención de imágenes, hiperpolarizados, pueden ser usados para obtener información sobre el estado metabólico de un tejido en una investigación RM in vivo, es decir, son útiles para obtención de imágenes mediante RM in vivo de una actividad metabólica. La información del estado metabólico de un tejido podría ser usada, por ejemplo, para discriminar entre tejido sano (normal) y enfermo. Las muestras según la invención son compuestos endógenos, más preferentemente, compuestos endógenos que juegan un papel en un proceso metabólico en el cuerpo de animales humanos o no humanos. Las muestras especialmente preferentes son seleccionadas de entre aminoácidos (en forma protonada o desprotonada), preferentemente alanina, glicina, glutamina, ácido glutámico, cisteína, asparagina y ácido aspártico, acetato, ácido pirúvico, piruvato, oxalato, malato, fumarato, lactato, ácido láctico, citrato, bicarbonato, malonato, succinato, oxalacetato, α -cetoglutarato, 3-hidroxitirato, isocitrato y urea. Las muestras indicadas anteriormente están enriquecidas isotópicamente con ^{13}C o ^{15}N .

Una muestra destinada a ser usada como un agente de obtención de imágenes mediante RM es un compuesto enriquecido isotópicamente, siendo el enriquecimiento isotópico un enriquecimiento isotópico de spin nuclear diferente de cero (núcleos MR activos), seleccionados de entre ^{15}N y/o ^{13}C , más preferentemente ^{13}C . El enriquecimiento isotópico puede incluir enriquecimientos selectivos de uno o más sitios dentro de la molécula de compuesto o un enriquecimiento uniforme de todos los sitios. El enriquecimiento puede conseguirse, por ejemplo, mediante síntesis química o etiquetado biológico, siendo ambos procedimientos conocidos en la técnica, y los procedimientos apropiados pueden ser elegidos en función del compuesto a enriquecer isotópicamente.

Una realización preferente de una muestra destinada a ser usada como un agente de obtención de imágenes mediante RM es una muestra que está enriquecida isotópicamente en solo una posición de la molécula, preferentemente con un enriquecimiento de al menos el 10%, de manera más adecuada, de al menos el 25%, más preferentemente, de al menos el 75% y, más preferentemente, de al menos el 90%. Idealmente, el enriquecimiento es del 100%.

La posición óptima para el enriquecimiento isotópico depende del tiempo de relajación de los núcleos RM activos. Preferentemente, los compuestos son enriquecidos isotópicamente en posiciones con un tiempo de relajación T_1 largo. Los compuestos enriquecidos con ^{13}C que están enriquecidos en un carboxilo-átomo C, un carbonilo-átomo C o un átomo C cuaternario, son usados preferentemente.

En una realización preferente, se usa ácido pirúvico o piruvato como una muestra en el procedimiento de la invención. El ácido pirúvico y el piruvato puede estar enriquecidos isotópicamente en la posición C1 ($^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico/-piruvato), en la posición C2 ($^{13}\text{C}_2$ -ácido pirúvico/ -piruvato), en la posición C3 ($^{13}\text{C}_3$ - ácido pirúvico/-piruvato), en la posición C1 y C2 ($^{13}\text{C}_{1,2}$ -ácido pirúvico /-piruvato), en la posición C1 y C3 ($^{13}\text{C}_{1,3}$ -ácido pirúvico/-piruvato), en la posición C2 y C3 ($^{13}\text{C}_{2,3}$ -ácido pirúvico/-piruvato) o en la posición C1, C2 y C3 ($^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -ácido pirúvico/-piruvato). La posición C1 es la preferente para el enriquecimiento isotópico de ^{13}C . Las muestras preferentes adicionales son ^{13}C -alanina, ^{13}C -glicina, ^{13}C -glutamina, ^{13}C -ácido glutámico, ^{13}C -cisteína, ^{13}C -asparagina, ^{13}C -ácido aspártico (todos los aminoácidos en su forma protonada o desprotonada), ^{13}C -acetato, ^{13}C -oxalato, ^{13}C -malato, ^{13}C -fumarato, ^{13}C -lactato, ^{13}C -ácido láctico, ^{13}C -citrato, ^{13}C -bicarbonato, ^{13}C -malonato, ^{13}C -succinato, ^{13}C -oxaloacetato, ^{13}C - α -cetoglutarato, ^{13}C -isocitrato, ^{13}C -3-hidroxitirato y ^{13}C -urea.

En otra realización preferente, la muestra del procedimiento de la invención es usada en una espectroscopia de RMN en estado sólido. Aquí, la muestra sólida hiperpolarizada puede ser analizada mediante espectroscopia de RMN en

estado sólido, estática o con rotación en ángulo mágico.

El radical tritilo, basado en carbono, usado en el procedimiento de la invención, trabaja como un agente de DNP, que es esencial en el procedimiento de DNP conforme la gran polarización de spin de los electrones del agente de DNP es convertida en polarización de espín nuclear de los núcleos dentro de la muestra, a través de una irradiación de microondas cercana a la frecuencia de Larmor de los electrones. Las microondas estimulan la comunicación entre los sistemas de espín electrónico y nuclear mediante transiciones e-e y e-n. Para una DNP efectiva, el agente de DNP tiene que ser estable y ser soluble en la muestra a polarizar, para conseguir el contacto íntimo entre la muestra y el agente de DNP que es necesario para la comunicación, indicado anteriormente, entre los sistemas de espín electrónico y nuclear. En este contexto, los radicales estables de tritilo demostraron ser agentes de DNP de gran utilidad. Los radicales estables de tritilo basados en oxígeno, basados en azufre o basados en carbono, se describen, por ejemplo, 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.

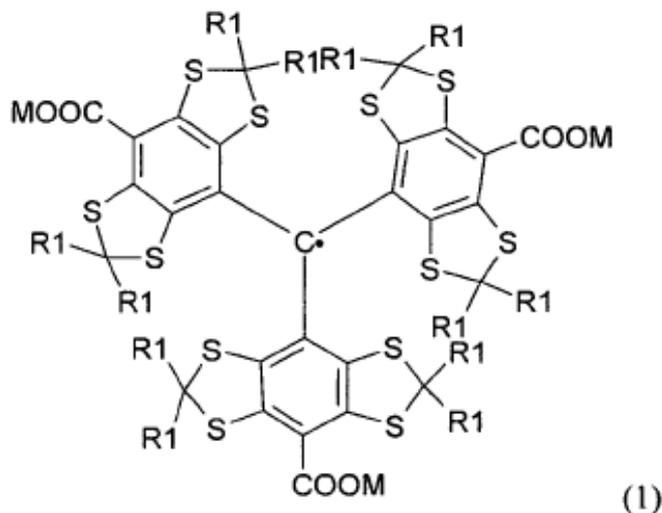
La elección óptima del radical tritilo, basado en carbono, depende de diversos aspectos. Tal como se ha indicado anteriormente, el radical tritilo y la muestra deben estar en contacto íntimo durante la DNP, para que resulte en los niveles de polarización óptimos en la muestra. De esta manera, en una realización preferente, el radical tritilo es soluble en la muestra o en una solución de la muestra. Para preparar dicha una solución de una muestra, pueden usarse un solvente o una mezcla de solventes para disolver la muestra. Sin embargo, si la muestra polarizada es usada para aplicaciones *in vivo*, tal como obtención de imágenes *in vivo* mediante RM, es preferente mantener la cantidad de solvente en un mínimo o, si es posible, evitar el uso de solventes. Esto último podría ser posible si la muestra a polarizar es, por ejemplo, un líquido o si la muestra es transferida al estado líquido, por ejemplo, fundiéndola. Para ser usada como un agente de obtención de imágenes *in vivo*, la muestra polarizada es administrada, normalmente, en una concentración relativamente alta, es decir, preferentemente, se usa una muestra muy concentrada en el procedimiento de DNP y, de esta manera, la cantidad de solvente se mantiene, preferentemente, en un mínimo. En este contexto, es importante mencionar también que la masa de la composición que contiene la muestra (es decir, agente de DNP, muestra y, si es necesario, solvente) se mantiene tan pequeña como sea posible. Una gran masa tendrá un impacto negativo sobre la eficiencia del procedimiento de disolución, si se usa una disolución para convertir la muestra hiperpolarizada sólida después del procedimiento de DNP al estado líquido, por ejemplo, para usarla como un agente de RM. Se ha observado que la eficacia de la disolución y, por lo tanto, la conservación de la polarización conseguida, disminuye conforme aumenta la masa de la composición. Probablemente, esto se debe al hecho de que el volumen de la composición aumenta según la tercera potencia, mientras que la superficie de la composición aumenta según la segunda potencia. Además, el uso de ciertos solventes puede requerir su retirada antes de que la muestra hiperpolarizada, usada como un agente de RM, sea administrada al paciente, ya que podrían no ser fisiológicamente tolerables.

Si la muestra a polarizar es un compuesto lipófilo (hidrófilo), el radical tritilo debería ser también lipófilo (hidrófilo). Puede ejercerse una influencia sobre la lipofilicidad o la hidrofiliicidad del radical tritilo mediante la elección de residuos adecuados, que convierten la molécula de radical tritilo en lipófila o hidrófila. Además, el radical tritilo tiene que ser estable en presencia de la muestra. De esta manera, si la muestra a polarizar es un ácido (una base), el radical tritilo debe ser estable bajo condiciones ácidas (básicas). Si la muestra a polarizar contiene grupos reactivos, debería usarse un radical tritilo que sea relativamente inerte en relación a estos grupos reactivos. De lo indicado anteriormente es evidente que la elección del radical tritilo es altamente dependiente de la naturaleza química de la muestra.

J. J. Ardenkjær-Larsen et al, PNAS 100 (18), 2003, 10158-10163, describe la exitosa polarización mediante DNP de urea marcada con ^{13}C y no marcada, usando el radical tritilo (sal de sodio de Tris {8-carboxil-2,2,6,6-tetra [2-(1-hidroxi-etil)]-benzo (1,2-d:4,5-d')bis(1,3)ditiol-4-il}metilo) (descrito adicionalmente en la patente US No. 6.013.810) y glicerol como solvente, que resultó en altos niveles de polarización en urea.

En el documento WO-A-2006/011811, se divulgan radicales tritilo que son agentes de DNP especialmente útiles para la polarización mediante DNP de compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido láctico o ácido pirúvico.

En una realización preferente del procedimiento según la invención, la muestra es ácido pirúvico, más preferentemente ^{13}C -ácido pirúvico, más preferente $^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico o piruvato, más preferente, ^{13}C -piruvato y, más preferente, $^{13}\text{C}_1$ -piruvato y el radical tritilo, basado en carbono, es un radical de la fórmula (1)



en la que

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión, y

15 R1, que es el mismo o diferente, representa un grupo alquilo C₁-C₆, de cadena lineal o ramificada, o un grupo -(CH₂)_n-X-R₂, en la que n es 1, 2 ó 3;

X es O o S y R2 es un grupo alquilo C₁-C₄ de cadena lineal o ramificada.

20 En una realización preferente, M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable. El término "catión fisiológicamente tolerable" indica un catión que es tolerado por el cuerpo de un animal humano o no humano vivo. Preferentemente, M representa hidrógeno o un catión alcalino, un ion de amonio o un ión de amina orgánica, por ejemplo, meglumina. Más preferentemente, M representa hidrógeno o sodio.

En una realización preferente adicional, R1 es el mismo, más preferentemente, un grupo alquilo C₁-C₄, de cadena lineal o ramificada, más preferentemente, metilo, etilo o isopropilo.

25 En una realización preferente adicional, R1 es el mismo o diferente, preferentemente el mismo, y representa -CH₂-OCH₃, -CH₂-OC₂H₅, -CH₂-CH₂-OCH₃, -CH₂-SCH₃, -CH₂-SC₂H₅ o -CH₂-CH₂-SCH₃, más preferentemente, -CH₂-CH₂-OCH₃.

En una realización más preferente, M representa hidrógeno o sodio y R1 es el mismo y representa -CH₂-CH₂-OCH₃.

Los radicales tritilo usados en el procedimiento de la invención pueden ser sintetizados tal 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 y WO-A-2006/011811.

30 De manera adecuada, los iones de gadolinio son usados en forma de quelatos o en forma de sus sales.

Si la muestra a polarizar está destinada a ser sometida a RMN en estado sólido, los iones de gadolinio son usados, preferentemente, en forma de sus sales. Las sales adecuadas son, por ejemplo, sales inorgánicas u orgánicas de iones de gadolinio, por ejemplo, GdCl₃, acetato de Gd (III) o piruvato de Gd (III). Si la muestra a polarizar es un líquido o una solución de la muestra en un solvente, es beneficioso seleccionar una sal que sea soluble en la muestra líquida o la solución de la muestra. En otra realización, los iones de gadolinio pueden ser añadidos en forma de quelatos.

35

Para un uso en RMN en estado líquido o un uso como un agente de obtención de imágenes en el cuerpo de un ser humano o animal vivo, la muestra sólida hiperpolarizada tiene que ser disuelta o fundida para resultar en una solución o un líquido. Sin embargo, los iones libres de gadolinio en dicha una solución o líquido acortan drásticamente el tiempo de relajación T₁ de los núcleos polarizados en la muestra, es decir, acelerando el decaimiento natural de la polarización y acortando, de esta manera, el tiempo de la muestra, proporcionará intensidades de la señal de RM que son suficientemente altas para convertir la muestra en un agente útil para la obtención de imágenes mediante MR. Por otro lado, los iones libres de gadolinio, si no son eliminados del agente de obtención de imágenes, inyectable, final – no son, frecuentemente, fisiológicamente tolerados o son mal tolerados, y pueden tener efectos no deseados, por ejemplo, efectos tóxicos.

40

Para superar los efectos de los iones libres de gadolinio, indicados anteriormente, los iones de gadolinio pueden ser usados en forma de quelatos. Como alternativa, pueden ser usados en forma de sus sales y pueden ser eliminados rápidamente después de disolver o fundir la muestra hiperpolarizada. Los procedimientos para la rápida eliminación de los iones libres de gadolinio se describen más adelante, en la presente solicitud. En otra realización, los efectos indicados anteriormente pueden ser superados usando iones de gadolinio en forma de sus sales, y añadiendo agentes quelantes al medio de disolución para formar complejos con dichos iones libres de metal galodino. En este caso, debería elegirse un agente quelante que sea a) soluble y estable en el medio de disolución y b) forme rápidamente un complejo estable con el ion libre de metal de gadolinio.

Tal como se ha indicado anteriormente, los iones de gadolinio pueden ser usados en el procedimiento de la invención en forma de quelatos. En adelante, en la presente memoria, la expresión "quelato de gadolinio" indica iones de gadolinio en forma de quelatos, es decir, complejos que comprenden iones de gadolinio y agentes quelantes.

Se conocen diversidad de agentes quelantes para este propósito. Generalmente, pueden usarse agentes quelantes cíclicos y acíclicos, que contienen, frecuentemente, heteroátomos, tales como N, O, P o S, siendo preferentes los agentes quelantes cíclicos. Los agentes quelantes acíclicos adecuados son, por ejemplo, DTPA y sus derivados, tales como DTPA-BMA, DTPA-BP, DTPA-BMEA, EOB-DTPA, BOPTA y MS-325, EDTA y sus derivados, tales como EDTA-BMA, DPDP, PLED, HPTA, amidas o diamidas, tales como TOGDA, sulfonatos o fosfonatos. Los agentes quelantes cíclicos adecuados son, por ejemplo, criptandos, PCTA-[12], PCTP-[12], PCTP-[13], DOTA, DO3A y sus derivados, tales como HP-DO3A y DO3A butriol. DOTA, DO3A y sus derivados son agentes quelantes cíclicos preferentes. Los agentes quelantes indicados anteriormente son conocidos en la técnica y también lo son sus síntesis.

En otra realización preferente, se usan agentes quelantes que son entidades químicas relativamente inertes, tales como, por ejemplo, fullerenos o zeolitas. El uso de dichos agentes quelantes (que encapsulan un ion metálico paramagnético, tal como Gd^{3+}) es preferente si la muestra a polarizar es un compuesto reactivo, por ejemplo, que comprende grupos reactivos que reaccionarían con agentes quelantes que comprenden grupos funcionales, tales como los indicados en el párrafo anterior.

En el procedimiento de la invención, los quelatos de gadolinio pueden ser quelatos monoméricos de gadolinio, es decir, entidades químicas que consisten en un agente quelante y un único ion de gadolinio, tal como, por ejemplo, $GdDTPA-BMA$. Por otro lado, los quelatos de gadolinio pueden ser quelatos multiméricos de gadolinio, es decir, entidades químicas que consisten en dos o más subunidades, en las que cada subunidad consiste en un agente quelante y un único ion de metal de gadolinio. Un ejemplo de un quelato trimérico de gadolinio es 1,3,5-tris-(N-(DO3A-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metilfenil)-[1,3,5]triazinano-2,4,6-triona, un quelato de gadolinio que consiste en un núcleo de triazinatriona con 3 subunidades conectadas a dicho núcleo, en el que cada subunidad comprende Gd^{3+} como el ion metálico paramagnético y un derivado de DO3A como el agente quelante. El uso de este quelato trimérico de gadolinio en la polarización de ácido pirúvico ha resultado en altos niveles de polarización. La síntesis detallada de este quelato trimérico de gadolinio se describe en la sección de Ejemplos de la presente solicitud.

Al igual que con el radical tritilo descrito anteriormente, la muestra a polarizar debe estar en contacto íntimo con el ion de gadolinio. En la descripción siguiente, a menos que se indique o se especifique lo contrario, la expresión "ión de gadolinio" se usa para iones de gadolinio, por ejemplo, en forma de sus sales y quelatos de gadolinio. Si la muestra es un líquido o una solución de la muestra, es preferente usar un ion metálico paramagnético que sea soluble en la muestra líquida o solución de la muestra. Si la muestra a polarizar es un compuesto lipófilo (hidrófilo) y se usa un quelato de gadolinio, el quelato de gadolinio debería ser también lipófilo (hidrófilo). Puede ejercerse una influencia sobre la lipofilicidad o hidrofiliicidad de los quelatos de gadolinio, por ejemplo, eligiendo agentes quelantes que comprenden residuos lipófilos o hidrófilos. Además, es preferente que el quelato de gadolinio sea estable en presencia de la muestra ya que una disociación del complejo (desquelación) conducirá a iones libres de gadolinio, con consecuencias perjudiciales para el decaimiento de la polarización y, de esta manera, el nivel de polarización en una muestra licuada, tal como se ha descrito anteriormente, a menos que los iones libres de gadolinio sean eliminados rápida y eficientemente después de que la muestra sólida hiperpolarizada ha sido licuada o ha formado complejos por medio de los agentes quelantes en el medio de disolución. Además, si la muestra a polarizar es un ácido (una base), los iones de gadolinio deberían ser estables bajo condiciones ácidas (básicas). Si la muestra a polarizar contiene grupos reactivos, debería usarse un ion de gadolinio que sea relativamente inerte en relación a estos grupos reactivos. De la descripción anterior, es evidente que la elección del ión de gadolinio es altamente dependiente de la naturaleza química de la muestra y de su uso final (RMN en estado sólido, RMN en estado líquido o agente de obtención de imágenes).

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para la producción de una muestra líquida hiperpolarizada, que es un compuesto endógeno, enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , en el que el procedimiento comprende preparar una composición que comprende la muestra o un precursor de la misma, un radical tritilo, basado en carbono, y un ion de gadolinio. Llevar a cabo la polarización nuclear dinámica sobre la composición, licuar la composición y, opcionalmente, eliminar el radical tritilo y/o el ion de gadolinio de la composición licuada.

Para llevar a cabo los procedimientos según la invención, la primera etapa es preparar una composición que comprende la muestra, un radical tritilo, basado en carbono, y un ión de gadolinio. Si la muestra usada en el procedimiento de la invención es un líquido a temperatura ambiente, tal como, por ejemplo, ácido pirúvico, la muestra es combinada con el radical tritilo elegido y el ión de gadolinio elegido, para formar una composición en la que los compuestos están en contacto íntimo. Preferentemente, el radical tritilo elegido y el ión de gadolinio son solubles en la muestra líquida. Puede provocarse adicionalmente un mezclado íntimo mediante diversos medios conocidos en la técnica, tales como agitación manual, agitación vorticial o sonicación. Si la muestra usada en el procedimiento de la invención es un sólido a temperatura ambiente, puede ser fundida y la muestra fundida es combinada con el radical tritilo elegido y el ion de gadolinio elegido. En otra realización, puede prepararse una solución de la muestra sólida, por ejemplo, disolviendo la muestra sólida en un solvente o una mezcla de solventes adecuada, preferentemente en un solvente que es un buen formador de vidrio y previene la cristalización de la composición al ser enfriada/congelada. Los formadores de vidrio adecuados son, por ejemplo, glicerol, propanodiol o glicol. Subsiguientemente, la muestra disuelta es combinada con el radical tritilo elegido y el ion de gadolinio elegido. Los formadores de vidrio pueden ser añadidos también a las muestras líquidas o a las muestras disueltas en solventes no formadores de vidrio si la muestra cristalizaría al ser enfriada/congelada. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, la adición de solventes y/o formadores de vidrio debería mantenerse en el mínimo necesario. De esta manera, la manera preferente es seleccionar un radical tritilo y un ión de gadolinio que sean solubles en, o miscibles con, la muestra.

De manera adecuada, la concentración de radical tritilo es de 5 a 25 mM, preferentemente de 10 a 20 mM, en la composición. En relación a la concentración del ión de gadolinio, de 0,1 a 6 mM (ión metálico) en la composición es adecuada y una concentración de 0,5 a 4 mM es preferente.

La composición es enfriada y/o congelada, preferentemente, de manera que se prohíbe la cristalización. El enfriamiento/la refrigeración puede conseguirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, congelando la composición en nitrógeno líquido o, simplemente, colocándola en el polarizador DNP, donde el helio líquido la congelará.

La composición puede ser desgasificada antes de la refrigeración/congelación. La desgasificación puede conseguirse mediante burbujeo de gas helio a través de la composición (por ejemplo, durante un período de tiempo de 2 - 15 min), pero puede llevarse a cabo mediante otros procedimientos conocidos comunes.

La técnica de DNP se describe, por ejemplo, en los documentos WO-A-98/58272 y WO-A-01/96895. Generalmente, 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. Como alternativa, puede emplearse un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se consiga una mejora suficiente de la polarización. En una realización preferente, el procedimiento de DNP es llevado a cabo en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. Las unidades adecuadas de polarización (= polarizadores) se describen, por ejemplo, en el documento WO-A-02/37132. En una realización preferente, la unidad de polarización comprende un criostato y medios de polarización, por ejemplo, una cámara de microondas conectada, por medio de una guía de ondas, a una fuente de microondas en un orificio central rodeado por los medios productores del campo magnético, tales como un imán superconductor. El agujero se extiende verticalmente hacia abajo hasta al menos el nivel de una región "P" cercana al imán superconductor, donde la intensidad del campo magnético es suficientemente alta, por ejemplo, entre 1 y 25 T, para que tenga lugar la polarización de los núcleos de la muestra. Preferentemente, el orificio para la sonda (= composición a polarizar) es sellable y puede ser evacuado a bajas presiones, por ejemplo, presiones del orden de 1 mbar o menos. Unos medios de introducción de sonda, tales como un tubo de transporte extraíble, pueden estar contenidos dentro del orificio y este tubo puede ser insertado desde la parte superior del orificio hasta una posición en el interior de la cámara de microondas en la región P. La región P es enfriada mediante helio líquido a una temperatura suficientemente baja para que tenga lugar la polarización, preferentemente, a temperaturas del orden de 0,1 a 100 K, más preferentemente, de 0,5 a 10 K, más preferentemente, de 1 a 5 K. Los medios de introducción de sonda son, preferentemente, sellables en su extremo superior, en cualquier forma adecuada, para mantener el vacío parcial en el orificio. Un contenedor de retención de sonda, tal como una copa de retención de sonda, puede estar instalada, de manera desmontable, en el interior del extremo inferior de los medios de introducción de sonda. El contenedor de retención de sonda está realizado, preferentemente, en un material ligero, con una baja capacidad calorífica específica y buenas propiedades criogénicas, tal como, por ejemplo, KelF (policlorotrifluoroetileno) o PEEK (polieteretercetona) y puede estar diseñado de manera que puede contener más de una sonda.

La sonda es insertada en el contenedor de retención de sonda, sumergida en helio líquido e irradiada con microondas, preferentemente a una frecuencia de aproximadamente 94 GHz a 200 mW. El nivel de polarización puede ser supervisado, por ejemplo, adquiriendo señales de RMN en estado sólido de la sonda durante la irradiación con microondas, dependiendo de la muestra a polarizar. Generalmente, se obtiene una curva de saturación en un gráfico que muestra la señal RMN en función del tiempo. Por lo tanto, es posible determinar cuándo se alcanza el nivel de polarización óptimo.

Si la muestra polarizada está destinada a ser usada como un agente de obtención de imágenes mediante RM, la composición que contiene la muestra hiperpolarizada es transferida, preferentemente, de un estado sólido a un estado líquido (es decir, es licuada), disolviendo la composición sólida después del procedimiento de DNP en un solvente o en una mezcla de solventes apropiada, por ejemplo, en un portador acuosa, tal como una composición tampón, o fundiéndola, opcionalmente, con una etapa de disolución o una etapa de dilución subsiguiente en un solvente o en una mezcla de solventes adecuada. Los procedimientos y dispositivos adecuados para la disolución de una composición sólida hiperpolarizada se describen, por ejemplo, en el documento WO-A-02/37132. Los procedimientos y dispositivos adecuados para la fusión de una composición sólida hiperpolarizada se describen, por ejemplo, en el documento WO-A-02/36005. Si la muestra hiperpolarizada está destinada a ser usada como un agente de obtención de imágenes mediante RM, la composición sólida que contiene la muestra hiperpolarizada es disuelta, preferentemente, en un portador acuoso o un solvente adecuado, para resultar en una solución fisiológicamente tolerable. Como alternativa, la composición sólida que contiene la muestra hiperpolarizada es fundida y la composición fundida es diluida/disuelta, preferentemente en un portador acuoso o un solvente adecuado, para resultar en una solución fisiológicamente tolerable.

En el contexto de los procedimientos de la invención, el solvente usado para la disolución de la composición sólida que contiene la muestra hiperpolarizada puede convertir también la muestra hiperpolarizada a una entidad química hiperpolarizada diferente. En este caso, la muestra sólida hiperpolarizada es referida como un "precursor de muestra". Si, por ejemplo, se usa un solvente que contiene una base para disolver una composición sólida que comprende un ácido hiperpolarizado (precursor de muestra), el ácido hiperpolarizado es neutralizado y es convertido en una sal. De esta manera, la muestra líquida hiperpolarizada sería una sal del ácido y ya no el propio ácido.

En una etapa subsiguiente del procedimiento según la invención, el radical tritilo y/o el ion de gadolinio y/o sus productos de reacción son eliminados, opcionalmente, de la composición licuada. Si la muestra hiperpolarizada está destinada a ser usada como un agente de obtención de imágenes mediante RM en un ser humano o un animal, tanto el radical tritilo como el ion de gadolinio son eliminados, preferentemente, de la composición licuada.

En la técnica, se conocen procedimientos útiles para eliminar, parcial, sustancial o completamente, el radical tritilo y el ion de gadolinio. Generalmente, los procedimientos aplicables dependen de la naturaleza del radical tritilo y el ión de gadolinio. Tras la disolución o la fusión de la composición sólida que contiene la muestra hiperpolarizada, el radical tritilo y/o el ion de gadolinio podrían precipitar y, de esta manera, pueden ser separados fácilmente del líquido mediante filtración. El hecho de que se produzca o no la precipitación depende, por supuesto, de la naturaleza del solvente y de la naturaleza del radical tritilo y/o el ión de metal paramagnético.

Si no ocurre ninguna precipitación, el radical tritilo y el ión de gadolinio pueden ser eliminados mediante técnicas de separación cromatográficas, por ejemplo, cromatografía en fase líquida en fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, extracción (fase sólida) u otros procedimientos cromatográficos de separación conocidos en la técnica. Generalmente, es preferente usar un procedimiento que sea capaz de eliminar tanto el radical tritilo como el ion de gadolinio en una etapa, ya que la polarización en la muestra líquida decae debido a la relajación T_1 . Cuanto más rápidamente se elimina cualquier compuesto no deseado de la muestra líquida, mayor será el nivel de polarización mantenido en la muestra. Por lo tanto, no sólo desde el punto de vista de tener un contacto íntimo entre la muestra, el radical tritilo y el ión de gadolinio, sino también desde el punto de vista de una eliminación rápida y eficiente, es beneficioso seleccionar un radical tritilo y un ion de gadolinio que tengan propiedades químicas similares, por ejemplo, que ambos sean compuestos químicos lipófilos o hidrófilos. Si, por ejemplo, se usan un radical tritilo lipófilo y un quelato lipófilo de gadolinio, ambos compuestos podrían ser eliminados en una etapa mediante cromatografía líquida en fase reversa en una única columna de cromatografía.

Si hay iones libres de gadolinio presentes en la composición licuada (por ejemplo, debido al uso de una sal de gadolinio), estos iones son eliminados, preferentemente, usando una columna de intercambio catiónico o resinas iónicas impresas, tal como se divulga por O. Vigneau et al., Anal. Chim. Acta 435 (1), 2001, 75-82. Otro posible procedimiento es una nano-filtración por complejación selectiva de iones libres de gadolinio en una membrana orgánica cargada, tal como se divulga por A. Sorin et al., J. Membrane Science 267 (1-2), 2005, 41-49. Además, los iones libres de gadolinio pueden ser eliminados de la composición licuada mediante cromatografía de afinidad, en analogía con lo divulgado por S. Donald et al. J. Inorg. Biochem. 56 (3), 1994, 167-171. En otra realización, los iones de gadolinio pueden ser eliminados mediante extracción polimérica de superficie modificada, Smopex^R. Los captadores Smopex^R contienen grupos captadores activos que están situados, casi exclusivamente, en la superficie de las fibras. Muestran rápidas cinéticas de reacción, alta carga metálica y son mecánica y químicamente estables. En otra realización adicional, los iones libres de gadolinio pueden ser eliminados mediante precipitación, eligiendo un medio de disolución que forma un compuesto de baja solubilidad con el ion libre de gadolinio, por ejemplo, una sal de baja solubilidad o añadiendo un adyuvante de precipitación a la composición antes de que la composición esté polarizada. Si, por ejemplo, la composición comprende una sal Gd^{3+} , tal como $GdCl_3$, Na_3PO_4 podría ser añadida como un adyuvante de precipitación a la composición y la composición, que comprende así la muestra, el radical tritilo, $GdCl_3$ y Na_3PO_4 es sometida a la polarización nuclear dinámica. Tras la disolución, por ejemplo, en un portador acuoso, $GdCl_3$ y Na_3PO_4

formarán un fosfato de Gd de baja solubilidad, que precipita y, de esta manera, puede ser fácil de eliminar mediante filtración. Por otro lado, una composición sólida que comprende la muestra hiperpolarizada, el radical tritilo y $GdCl_3$ puede ser disuelta en un portador acuoso que contiene Na_3PO_4 , para formar un fosfato de Gd de baja solubilidad, que precipita.

- 5 Debido a que los radicales tritilo tienen un espectro de absorción de luz UV/visible característico, es posible usar una medición de absorción de luz UV/visible como un procedimiento para comprobar su presencia en la muestra líquida después de su eliminación. Con el fin de obtener resultados cuantitativos, es decir, la concentración de radical tritilo presente en la muestra líquida, el espectrómetro óptico puede ser calibrado de manera que la absorción en una longitud de onda específica de una parte alícuota de la muestra líquida proporciona la correspondiente concentración de radical tritilo en la muestra. La eliminación del radical tritilo es especialmente preferente si la muestra líquida hiperpolarizada es usada como un agente de obtención de imágenes *in vivo* mediante RM del cuerpo de un ser humano o un animal no humano.

Después de la eliminación del ión de gadolinio y/o el radical tritilo, la muestra líquida puede ser comprobada para ión de gadolinio y/o radical tritilo residual.

- 15 La medición de absorción de fluorescencia o de luz UV/visible puede ser usada como un procedimiento para comprobar la presencia de quelatos de gadolinio, con la condición de que los quelatos contengan un cromóforo (fuerte). Otra manera de comprobar la presencia de quelatos de gadolinio es la detección electroquímica, con la condición de que exista una fracción electroactiva en el quelato.

- 20 Si se usan sales de gadolinio en la composición, pueden usarse mediciones de fluorescencia para realizar una comprobación para iones libres de gadolinio después de su eliminación de la composición líquida. Si, por ejemplo, se usa una sal de Gd^{3+} , puede usarse fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 275 nm y una monitorización de emisión a 314 nm como un procedimiento para detectar Gd^{3+} libre con una alta especificidad. Además, el Gd^{3+} libre puede ser detectado por medio de la absorción visible a 530-550 nm, después de la formación de complejos con el agente colorimétrico PAR (4-(2-piridilazo)resorcinol). Otros agentes colorimétricos para otros iones de metal de gadolinio son conocidos en la técnica y pueden ser usados en la misma manera.

- 25 En una realización preferente del procedimiento según la invención, la composición comprende ^{13}C -ácido pirúvico, preferentemente $^{13}C_1$ -ácido pirúvico como un precursor de muestra o ^{13}C -piruvato, preferentemente $^{13}C_1$ -piruvato como una muestra, un radical tritilo de fórmula (1) y un ión de metal paramagnético que es un quelato de gadolinio que comprende Gd^{3+} o una sal de Gd^{3+} , tal como $GdCl_3$ o piruvato de Gd (III). Una composición es preparada disolviendo el radical tritilo de fórmula (1) y el ion de gadolinio en ^{13}C -ácido pirúvico o en una solución de ^{13}C -piruvato en un solvente, preferentemente agua y, opcionalmente, un formador de vidrio. Los compuestos son mezclados concienzudamente y la composición es enfriada y/o congelada. Después de la polarización nuclear dinámica, la composición sólida que comprende el ^{13}C -ácido pirúvico o ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es disuelta en un portador acuoso, preferentemente una solución acuosa de tampón, o es fundida y disuelta/diluida, subsiguientemente, con un portador acuoso.

- 35 En el caso del ^{13}C -ácido pirúvico (precursor de muestra), la composición es neutralizada con una base para proporcionar ^{13}C -piruvato (muestra). En una realización, la composición sólida que contiene ^{13}C -ácido pirúvico hiperpolarizado se hace reaccionar con una base líquida para, simultáneamente, disolverla y convertirla en ^{13}C -piruvato y, subsiguientemente, se añade una solución tampón para finalizar la disolución y, opcionalmente, convertir el ^{13}C -ácido pirúvico residual a ^{13}C -piruvato. En una realización preferente, la base es una solución acuosa de NaOH. En una realización preferente adicional, la solución tampón es una solución tampón TRIS, una solución tampón de citrato o una solución tampón de fosfato. En otra realización preferente, la solución tampón y la base son combinadas en una solución alcalina y esta solución es añadida a la composición sólida que contiene el ^{13}C -ácido pirúvico hiperpolarizado, disolviendo y convirtiendo el ^{13}C -ácido pirúvico en ^{13}C -piruvato, al mismo tiempo.

- 45 Si se ha usado una sal de Gd^{3+} como ion de gadolinio, es importante eliminar los iones de Gd del ^{13}C -piruvato disuelto tan rápida y eficientemente como sea posible. Los procedimientos adecuados son la eliminación usando una columna de intercambio catiónico o resinas iónicas impresas, tal como se divulga por O. Vigneau et al., Anal. Chim. Acta 435 (1), 2001, 75-82. Otro posible procedimiento es una nano-filtración mediante complejación selectiva de Gd^{3+} en una membrana orgánica cargada, tal como se divulga por A. Sorin et al., J. Membrane Science 267 (1-2), 2005, 41-49. Además, el Gd^{3+} libre puede ser eliminado mediante cromatografía de afinidad, tal como se divulga por S. Donald et al. J. Inorg. Biochem. 56 (3), 1994, 167-171. En una realización preferente adicional, el Gd^{3+} libre es eliminado añadiendo agentes quelantes al medio de disolución que pueden formar complejos, de manera rápida y eficiente, con dicho Gd^{3+} libre, por ejemplo, agentes quelantes tales como DTPA, DTPA-BMA, EDTA o derivados de EDTA y DTPA. Los quelatos de Gd, obtenidos de esta manera, pueden ser eliminados de la muestra disuelta, tal como se describe en el párrafo siguiente.

- 55 Si se ha usado un quelato de Gd como ión de gadolinio, el quelato puede ser eliminado usando cromatografía líquida en fase inversa, lo que permitiría la eliminación simultánea del radical tritilo de fórmula (1) y el quelato de Gd.

En la página 18/19 del original, se describen procedimientos adecuados para realizar comprobaciones para Gd^{3+} libre, quelato de Gd y radical tritilo de fórmula (1) en la muestra líquida purificada.

Si la composición comprende ^{13}C -ácido pirúvico, un radical tritilo de fórmula (1) y una sal de Gd^{3+} y la composición sólida son fundidos, los iones de metal de Gd^{3+} libres son eliminados preferentemente antes de que el ^{13}C -ácido pirúvico hiperpolarizado comprendido en la composición fundida sea neutralizado con una base para producir ^{13}C -piruvato. La conversión a ^{13}C -piruvato y la disolución/dilución pueden llevarse a cabo mediante extracción en fase sólida de intercambio catiónico, por ejemplo, usando columnas o cartuchos adecuados de extracción en fase sólida de intercambio catiónico.

El ^{13}C -piruvato líquido hiperpolarizado, producido según el procedimiento de la invención, puede ser usado como un agente de obtención de imágenes mediante RM "convencional", es decir, que proporciona una mejora de contraste para imágenes anatómicas. Una ventaja adicional del ^{13}C -piruvato líquido hiperpolarizado, producido según el procedimiento de la invención, es que el piruvato es un compuesto endógeno que es muy bien tolerado por el cuerpo humano, incluso en altas concentraciones. Como un precursor en el ciclo del ácido cítrico, el piruvato juega un importante papel metabólico en el cuerpo humano. El piruvato es convertido a diferentes compuestos: su transaminación resulta en alanina, mediante descarboxilación oxidativa, el piruvato es convertido en acetil-CoA y bicarbonato, la reducción de piruvato resulta en lactato y su carboxilación en oxaloacetato.

Además, la conversión metabólica del ^{13}C -piruvato hiperpolarizado a ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado (en el caso de $^{13}C_1$ -piruvato, $^{13}C_{1,2}$ -piruvato o $^{13}C_{1,2,3}$ -piruvato solamente) y ^{13}C -alanina hiperpolarizada puede ser usada para un estudio RM *in vivo* de los procesos metabólicos en el cuerpo humano. El ^{13}C -piruvato tiene una relajación T_1 en sangre total humana a $37^\circ C$ de aproximadamente 42 s, sin embargo, se ha encontrado 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 una detección de señal desde el compuesto ^{13}C -piruvato padre y sus metabolitos. La cantidad de alanina, bicarbonato y lactato depende del estado metabólico de los tejidos bajo investigación. La intensidad de la 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 permanece en el momento de la detección, por lo tanto, monitorizando la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado a ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es posible estudiar *in vivo* los procesos metabólicos en el cuerpo de un ser humano o un animal no humano, usando obtención de imágenes no invasiva mediante RM.

Se ha encontrado que las amplitudes de las señales de RM derivadas de los diferentes metabolitos de piruvato varían dependiendo del tipo de tejido. El patrón de pico metabólico único formado por alanina, lactato, bicarbonato y piruvato puede ser usado como huella identificativa para el estado metabólico del tejido bajo examen y permite, de esta manera, la discriminación entre tejido sano y tejido tumoral. Esto convierte la composición según la invención en un excelente agente para obtención de imágenes *in vivo* mediante RM de un tumor. El uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para obtener imágenes de tumores se ha descrito, en detalle, en el documento WO-A-2006/011810.

Además, el uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para obtención de imágenes cardiacas se ha descrito en el documento WO-A-2006/054903.

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende una muestra que es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , un radical tritilo basado en carbono y un ión de gadolinio.

Todavía otro aspecto de la invención es una composición que comprende una muestra que es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , un radical tritilo basado en carbono y un ión de gadolinio para su uso en una polarización nuclear dinámica.

Todavía otro aspecto de la invención es una composición que comprende una muestra hiperpolarizada que es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , un radical tritilo basado en carbono y un ión de gadolinio, siendo obtenida la composición mediante polarización nuclear dinámica.

Ejemplos

Ejemplo 1 Comparación de la polarización en estado sólido de $^{13}C_1$ -ácido pirúvico con y sin GdDTPA-BMA como un quelato paramagnético

Ejemplo 1a Síntesis del radical tritilo sal de sodio de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(metoxietil)benzo-[1,2-4,5']bis-(1,3)ditiol-4-il)metilo

10 g (70 mmol) de sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(hidroxi)etil)-benzo[1,2-4,5']-bis-(1,3)-ditiol-4-il) metilo, que había sido sintetizada según el ejemplo 7 del documento WO-A1-98/39277, fueron suspendidos en 280 ml de dimetilacetamida bajo una atmósfera de argón. Se añadió hidruro de sodio (2,75 g), seguido de yoduro de metilo (5,2

ml) y se dejó que la reacción, que es ligeramente exotérmica, continuara durante 1 hora en un baño de agua a 34°C durante 60 min. La adición de hidruro de sodio y yoduro de metilo fue repetida dos veces con las mismas cantidades de cada uno de los compuestos y después de la última adición, la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 68 horas y, a continuación fue vertida en 500 ml de agua. El pH fue ajustado a pH > 13 usando 40 ml de 1 M NaOH (acuoso) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 15 horas para hidrolizar los ésteres de metilo formados. A continuación, la mezcla fue acidificada usando 50 ml de 2 M HCl (acuoso) a un pH de aproximadamente 2 y el acetato de etilo fue extraído 3 veces (500 ml y 2 x 200 ml). La fase orgánica combinada fue secada sobre Na₂SO₄ y, a continuación, fue evaporada hasta la sequedad. El producto crudo (24 g) fue purificado mediante HPLC preparativa usando acetonitrilo/agua como eluyentes. Las fracciones recogidas fueron evaporadas para eliminar el acetonitrilo. La fase acuosa restante fue extraída con acetato de etilo y la fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄ y, a continuación, fue evaporada hasta la sequedad. Se añadió agua (200 ml) al residuo y el pH fue ajustado cuidadosamente con 0,1 M de NaOH (acuoso) a 7, disolviéndose el residuo lentamente en este procedimiento. Después de la neutralización, la solución acuosa fue liofilizada.

Ejemplo 1b Producción de ¹³C-ácido pirúvico hiperpolarizado usando el radical del Ejemplo 1a

Una composición de 15 mM en radical tritilo del Ejemplo 1a fue preparada disolviendo el radical tritilo del Ejemplo 1a) en una mezcla de ¹³C₁-ácido pirúvico (553 mg) y ácido pirúvico (10,505 g) no etiquetado. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad y una alícuota de la solución (2,015 g) fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 4 horas, la polarización fue detenida.

Se determinó, mediante ¹³C-RMN en estado sólido, que la polarización en estado sólido era de 5,72 (integral) por mg de composición sólida. La medición ¹³C-RMN en estado sólido consistió en una única secuencia de pulso-adquisición de RMN, usando un ángulo de inclinación bajo. La intensidad de la señal de la muestra polarizada mediante polarización nuclear dinámica es comparada con la muestra polarizada térmicamente, es decir, la polarización natural de la muestra, a temperatura ambiente, antes del inicio del procedimiento de polarización nuclear dinámica. Para determinar cuándo alcanza la muestra su máxima polarización, se adquirieron los espectros ¹³C-RMN en sólido de bajo ángulo de inclinación, en diferentes puntos temporales después del inicio del procedimiento de polarización nuclear. La polarización fue calculada a partir de la relación entre las intensidades de las señales de la muestra polarizada térmicamente y la muestra polarizada mediante polarización nuclear dinámica.

Ejemplo 1c Producción de ¹³C₁-ácido pirúvico hiperpolarizado usando el radical del ejemplo 1a) y GdDTPA BMA

El ejemplo fue realizado según el Ejemplo 1b, excepto que la composición contenía GdDTPA-BMA, que fue disuelta junto con el radical tritilo en la mezcla de ¹³C₁-ácido pirúvico y ácido pirúvico no etiquetado. La composición era de 15 mM en radical y 1,5 mM en Gd³⁺. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 4 horas, la polarización fue detenida.

Se determinó, mediante ¹³C-RMN en estado sólido, llevada a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 9,69 (integral) por mg de la composición sólida.

Debido a la presencia de un ion metálico paramagnético en la composición a polarizar, la polarización en estado sólido de ¹³C-ácido pirúvico casi podría duplicarse.

Ejemplo 2 Comparación de la polarización en estado sólido de ¹³C₁-ácido pirúvico con y sin acetato de Gd (III)

Una composición de 15 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo del Ejemplo 1a en 43,7 mg de ¹³C₁-ácido pirúvico. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz).

Se determinó, mediante ¹³C-RMN en estado sólido, llevada a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 5,72 (integral) por mg de la composición sólida.

En otro experimento, una composición de 15 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo del Ejemplo 1a) en 43,7 mg de ¹³C₁-ácido pirúvico. Además, se añadió acetato de Gd (III) a la mezcla para resultar en una composición de 2 mM en Gd³⁺. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz).

Se determinó, mediante ¹³C-RMN en estado sólido, llevada a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 9,37 (integral) por mg de la composición sólida.

La adición de un ion metálico paramagnético resultó en una mejora en la polarización en estado sólido en un factor de aproximadamente 2.

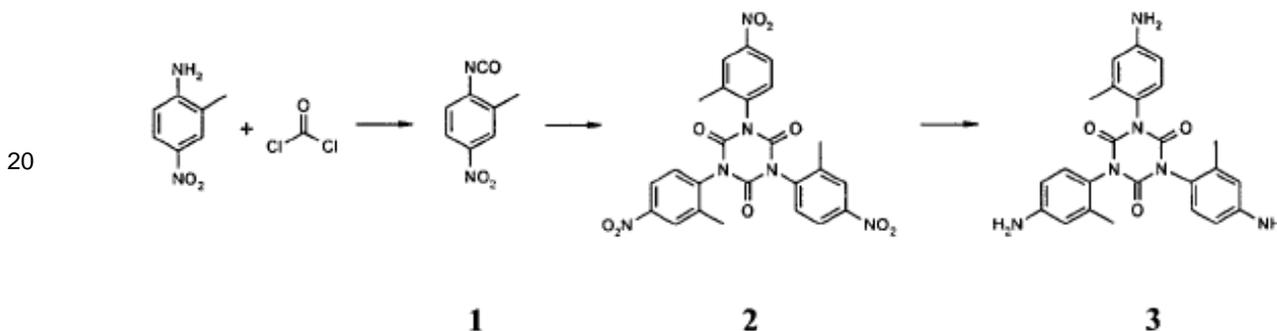
Ejemplo 3 Producción de una solución de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado sin la presencia de un ion metálico paramagnético (Ejemplo comparativo)

5 43 mg de una composición de 18,9 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo del Ejemplo 1a en $^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada en condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas, la polarización fue detenida y la composición fue disuelta usando un dispositivo de disolución según 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 sodio $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado, con una concentración total de piruvato de aproximadamente 78 mM en 40 mM tampón TRIS.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 20,8%.

15 **Ejemplo 4 Síntesis del quelato-Gd de 1,3,5-Tris-(N-(DO3A-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metil-fenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (10)**

4a) Preparación de 2-metil-4-nitrofenilisocianato (1)



25 2-metil-4-nitroanilina (35,0 g, 230 mmol) fue disuelta en acetato de etilo (400 ml) y fue enfriada a 0°C. Se añadió fosgeno (180 ml, 20% en tolueno), gota a gota, durante 30 minutos, siguió instantáneamente una precipitación de una sal blanca. Tras la última adición, la temperatura se dejó subir lentamente a temperatura ambiente y, a continuación, la mezcla de reacción fue llevada a reflujo (~100°C). Fue sometida a reflujo durante 2 h 30 min, después de lo cual, 200 ml de solvente fueron destilados antes de que la temperatura bajara a 80°C y se añadió fosgeno (140 ml, 20% en tolueno) gota a gota. Tras la última adición, la solución de reacción fue sometida a reflujo durante 3 horas, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró hasta la sequedad. El material marrón/amarillo fue disuelto en éter de dietilo (250 ml), fue filtrado y fue concentrado para proporcionar un polvo de color marrón pálido (36 g, 88%).

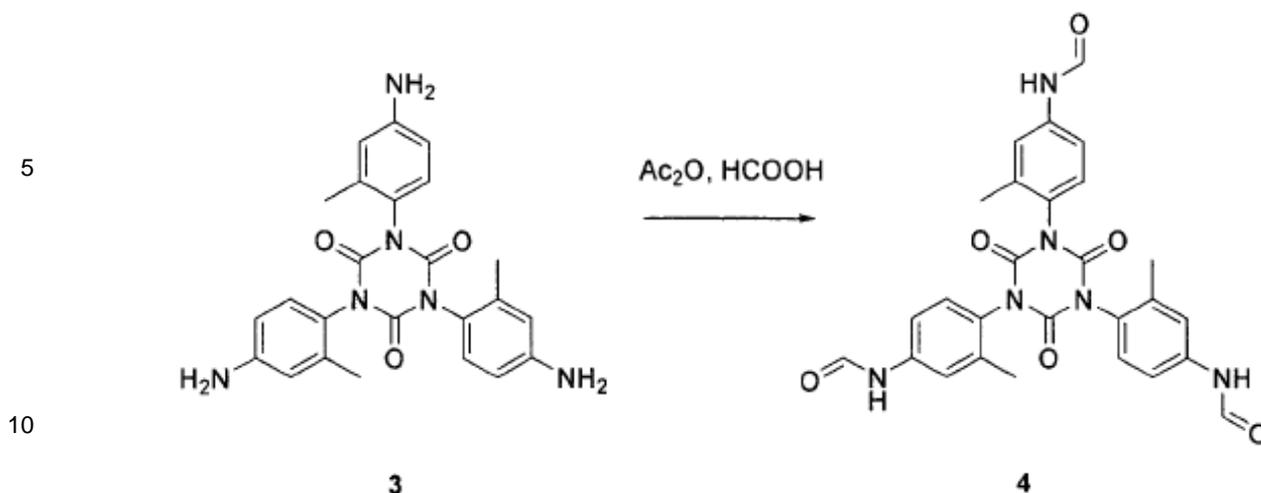
4b) Preparación de 1,3,5-tris-(4-nitro-2-metil-fenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (2)

35 A 2-metil-4-nitrofenilisocianato (36,0 g), en un matraz de 250 ml, se añadió DMSO (50 ml) y el matraz fue sellado con un tapón de vidrio que se mantuvo en su lugar con un clip de plástico. El matraz fue colocado inmediatamente en un baño de aceite calentado a 85°C y la solución de reacción de color marrón oscuro fue calentada durante 16 h 30 min. El baño de aceite fue retirado y la solución de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de ser vertida en agua (800 ml), fue sonicada, y el precipitado fue filtrado. La torta de filtrado fue añadida a etanol (500 ml) y fue sometida a reflujo durante 4 horas, a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente y el producto fue filtrado para proporcionar un polvo blancuzco (28,1 g, 78%).

4c) Preparación de 1,3,5-tris-(4-amino-2-metil-fenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (3)

45 1,3,5-tris-(4-nitro-2-metil-fenil)-[1,3,5]triazinan-2,4,6-triona (2,86 g, 5,4 mmol) fue disuelta en THF (70 ml). Se añadieron HCl (4,5 ml, 6M), agua (18 ml) y Pd/C (0,6 g, 10%). El recipiente de reacción fue evacuado y fue llenado con argón en tres ciclos antes de ser hidrogenado en un aparato de hidrogenación Parr (4,22 Kg/cm²). Después de 2 horas, el exceso de hidrógeno fue evacuado con una bomba de membrana y el Pd/C (10%) fue filtrado. La solución de reacción clara fue concentrada hasta que no quedó más THF y el pH fue ajustado a 7 con NaHCO₃ (~3,7 g). La fase acuosa fue extraída con acetato de etilo (3 x 100 ml) y las fases orgánicas combinadas fueron secadas con MgSO₄, fueron filtradas y concentradas para proporcionar un polvo marrón. El producto crudo fue recristalizado en metanol para proporcionar el

producto como un polvo blancuzco (1,9 g, 80%).

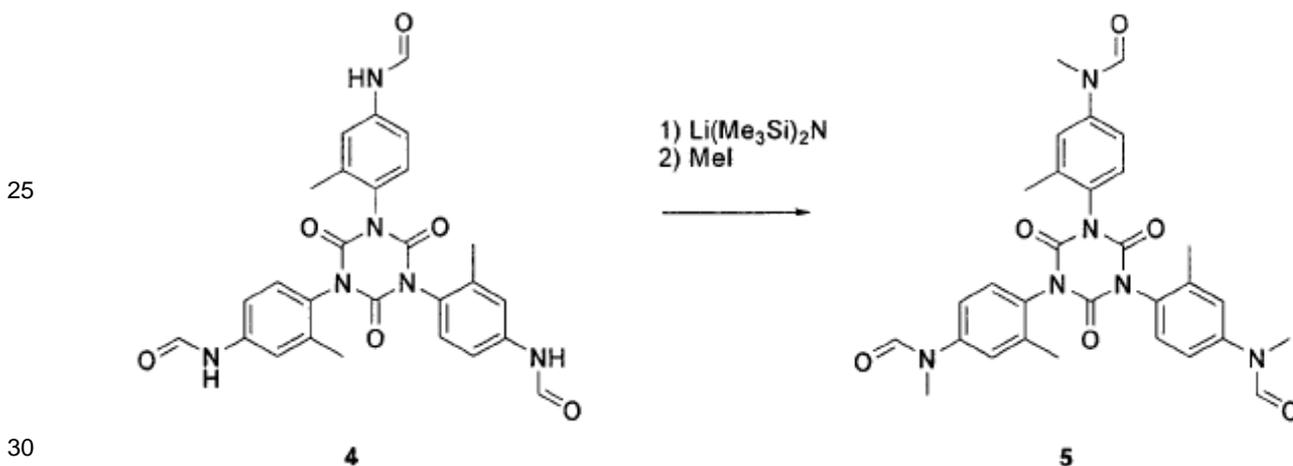


4d) Preparación de 1,3,5-tris-(4-formamido-2-metil-fenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (4)

15

20

El ácido fórmico (175 ml) fue colocado en un matraz de 500 ml, de fondo redondo, enfriado con hielo. Se añadió anhídrido acético (15 ml, 0,16 mol) y la solución amarilla fue agitada bajo atmósfera de argón durante 1 hora a 0°C. Se añadió la triamina **3** (8,7 g, 0,020 mol) a esta solución y se retiró el baño de hielo. Después de agitar bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente, durante 30 minutos, una HPLC mostró que la reacción estaba completada. El solvente fue eliminado en vacío y el residuo marrón, pegajoso, fue suspendido en H₂O y fue filtrado. A continuación, fue lavado concienzudamente con H₂O, para asegurarse de que todo el ácido había sido eliminado. El producto era un sólido marrón pálido (10,2 g, 99%).

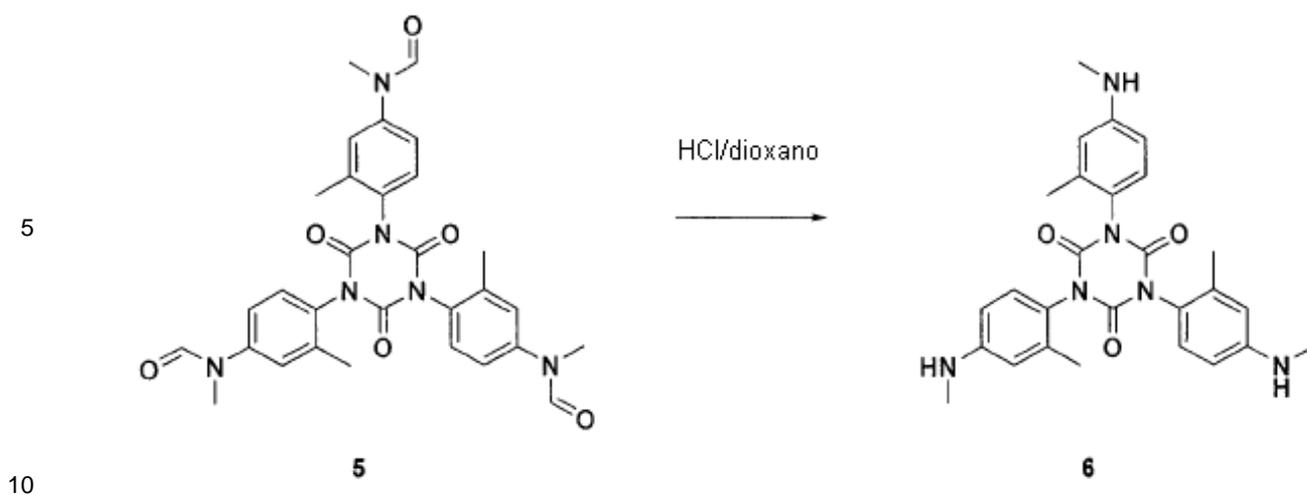


4e) Preparación de 1,3,5-tris-(N-formil-N-metil-4-amino-2-metilfenil)-[1,3,5]triazin-2,4,6-triona (5)

35

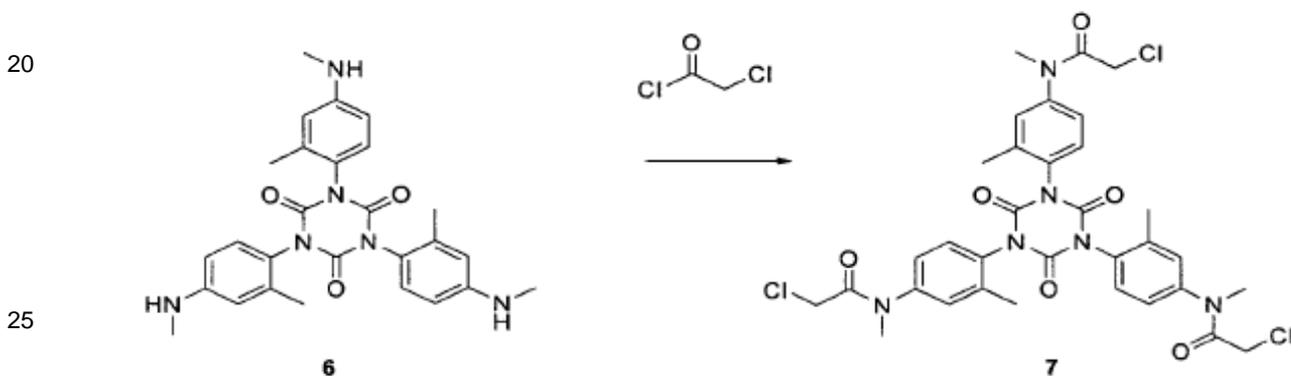
40

Todos los objetos de cristal fueron secados cuidadosamente en un horno y la DMF fue secada sobre tamices moleculares 4 A. Se añadió Li(Me₃Si)₂N (116 ml, 0,116 mol, 1 M en hexano) a una solución de DMF (115 ml) de **4** (10,2 g, 0,0193 mol) en un matraz de 500 ml, de fondo redondo. La mezcla de reacción, que pasó de ser una solución de color marrón claro a una suspensión de color rojo ladrillo, fue agitada bajo atmósfera de argón durante 1 h. Se añadió yoduro de metilo (12,2 ml, 0,196 mol) y la mezcla de reacción fue agitada durante 2 horas o hasta que una HPLC mostró que la metilación estaba completada. A continuación, el hexano fue eliminado en el evaporador rotatorio y el residuo fue vertido en una solución de NaH₂PO₄ (1.300 ml, 100 mM) bajo agitación vigorosa. El precipitado de **5** formado fue filtrado como un sólido pálido (6,7 g, 60%).



4f) Preparación de 1,3,5-tris-(N-metil-4-amino-2-metil-fenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (6)

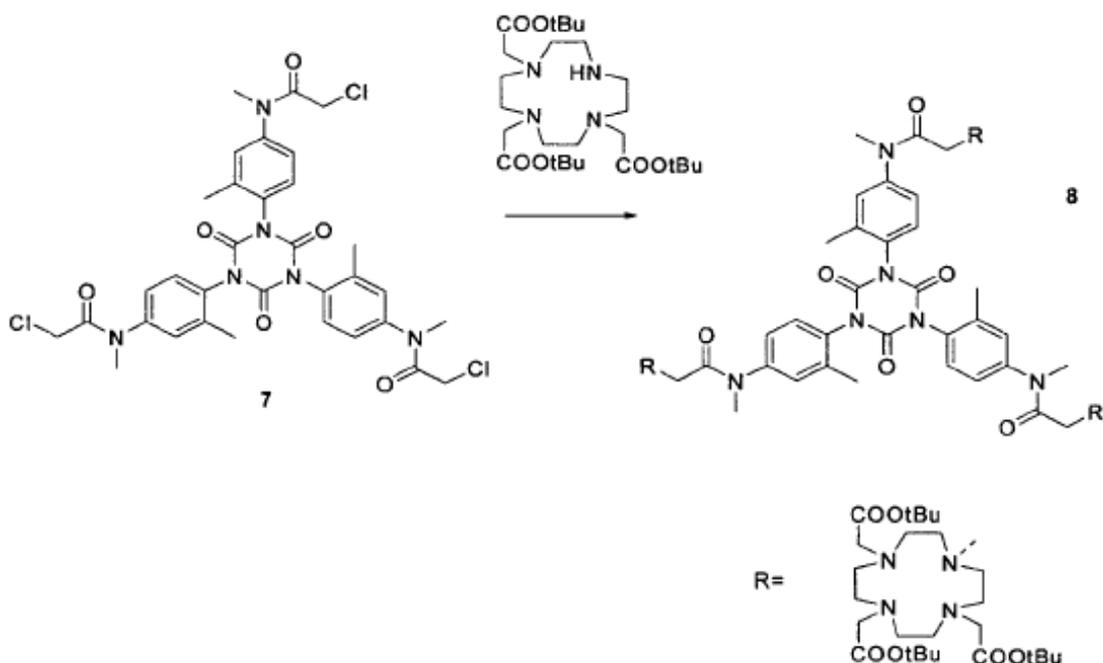
15 Dioxano (52 ml), HCl (52 ml, 6 M) y **5** (6,5 g, 11 mmol) fueron mezclados en un matraz de 250 ml, de fondo redondo, para formar una suspensión acuosa pálida. La mezcla de reacción fue calentada a reflujo durante 30 minutos bajo atmósfera de argón. La ahora solución amarilla se dejó enfriar a temperatura ambiente y, a continuación, los solventes fueron retirados en un evaporador rotativo. A continuación, el residuo naranja fue disuelto en 500 ml de H₂O y fue neutralizado con una solución de NaHCO₃ (saturada) bajo agitación vigorosa. El precipitado formado fue filtrado y lavado varias veces con H₂O, proporcionando un sólido pálido (4,7 g, 84%).



4g) Preparación de 1,3,5-tris-(N-cloroacetil-N-metil-4-amino-2-metilfenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (7)

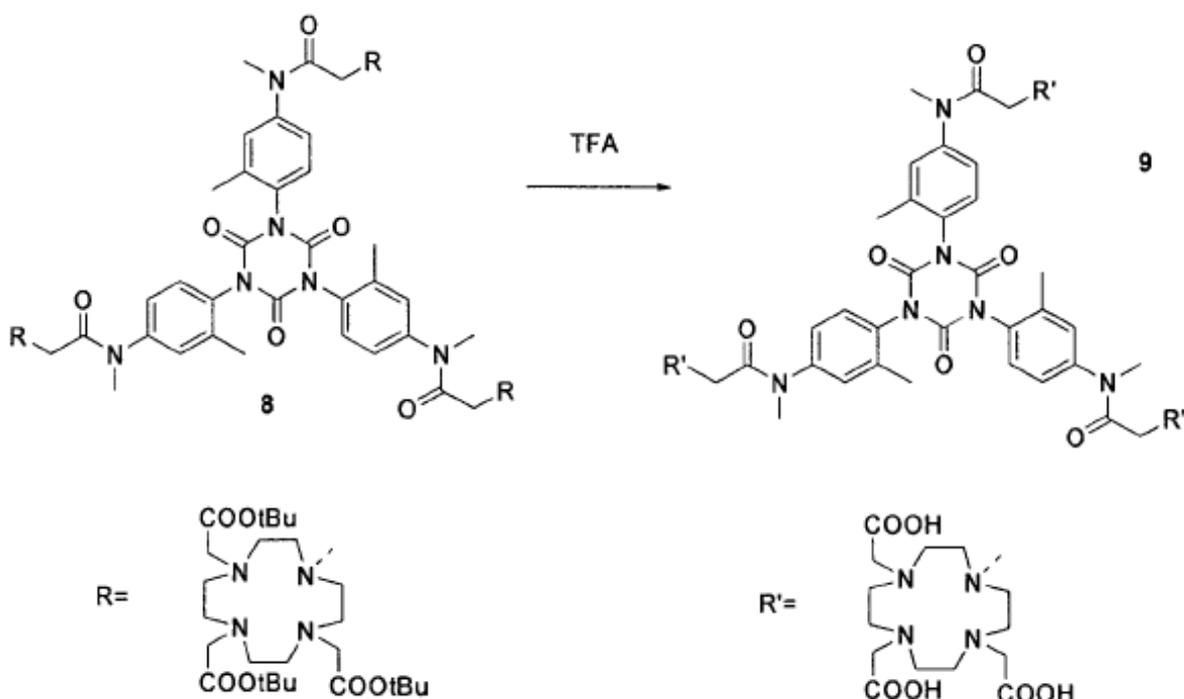
30 En un matraz de 100 ml, de fondo redondo, se disolvió **6** (4,6 g, 9,5 mmol) en DMA (15 ml) y se añadió cloruro de cloroacetilo (2,6 ml, 33 mmol) bajo agitación a 0°C. La reacción fue agitada bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 30 minutos o hasta que una HPLC mostró una cloroacetilación completada. A continuación, la suspensión fue vertida en un vaso de precipitación grande con agua (500 ml), bajo agitación mecánica vigorosa. El precipitado formado fue filtrado y secado en vacío a 0,3 mbar (6,3 g). El sólido pálido fue disuelto en 70 ml de acetonitrilo y fue vertido en 500 ml de H₂O bajo agitación mecánica vigorosa. El precipitado formado fue filtrado y se dejó secar en un desecador (6.1 g, 89%).

35



15 **4h) Preparación de 1,3,5-tris-(N-(DO3A t-butilester-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metil-fenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (8)**

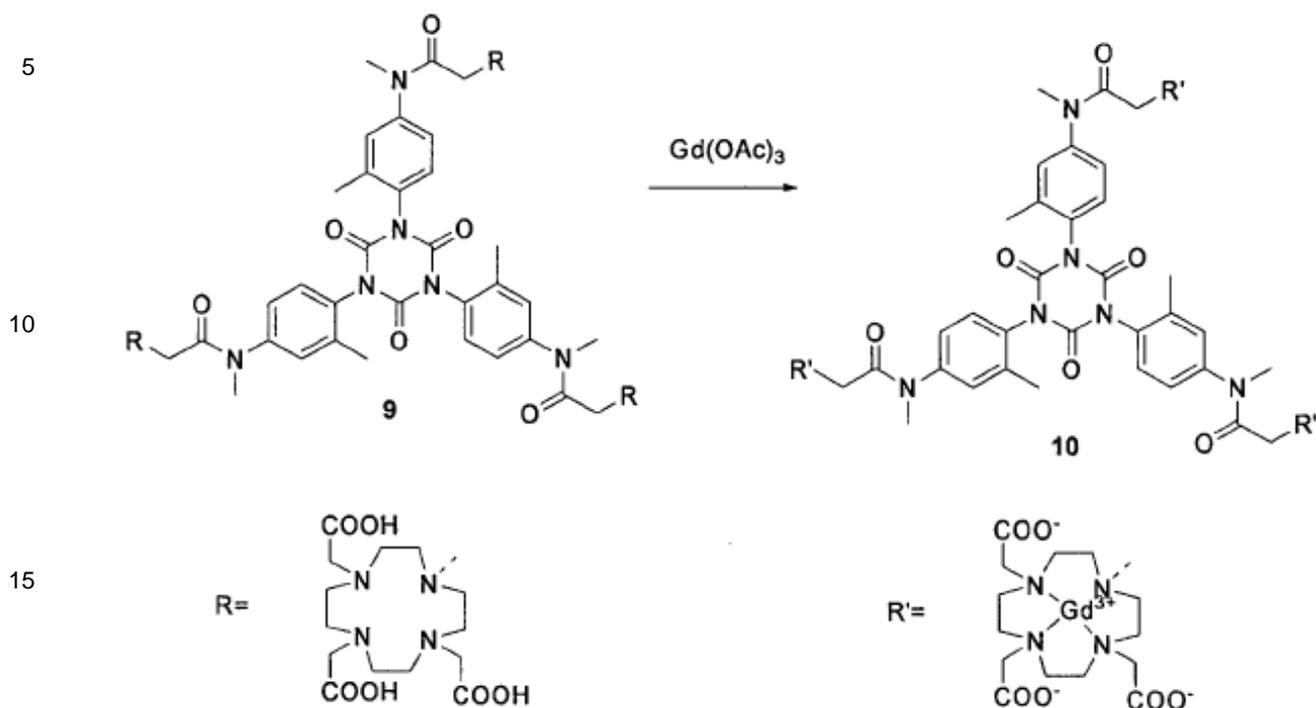
20 En un matraz de 50 ml, de fondo redondo, se suspendió **7** (0,50 g, 0,70 mmol) junto con DO3A t-butil éster (2,5 g, 4,2 mmol), diisopropiletilamina (910 μ l, 5,2 mmol) y acetonitrilo (15 ml). Después de una sonicación, la mezcla de reacción fue agitada a 75°C bajo argón hasta que una LC/MS mostró un acoplamiento completado. A continuación, los solventes fueron retirados en un evaporador rotatorio y el producto bruto (2,9 g) fue usado en la reacción subsiguiente.



4i) Preparación de 1,3,5-tris-(N-(DO3A-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metil-fenil)-[1,3,5]triazinan-2,4,6-triona (9)

El producto crudo de **8** (1,9 g) fue disuelto en TFA (130 ml) y CH_2Cl_2 (130 ml) y fue agitado a 50°C bajo argón. La

solución fue agitada durante 1 hora o hasta que una LC/MS mostró una desprotección completa. A continuación, los solventes fueron retirados en un evaporador rotatorio y el residuo fue secado en vacío durante la noche. El producto crudo (2,4 g) fue usado, a continuación, en la etapa final.



4j) Preparación de quelato de gadolinio de 1,3,5-tris-(N-(DO3A-acetamido)-N-metil-4-amino-2-metil-fenil)-[1,3,5] triazinan-2,4,6-triona (10)

El producto crudo de **9** (2,4 g) fue disuelto en agua y se añadió $\text{Gd}(\text{OAc})_3$ (1,4 g, 4,2 mmol) bajo agitación. A continuación, se aplicó vacío (0,3 mbar) y la reacción fue monitorizada continuamente mediante LC/MS. Cuando se detectó que la formación de complejos estaba completa, los solventes fueron eliminados en vacío. A continuación, el producto crudo de 3,1 g fue purificado mediante HPLC preparativa (410 mg, 42% de **7**)

Ejemplo 5 Producción de una solución de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado en presencia del quelato-Gd del Ejemplo 4

43 mg de una composición de 18,9 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo del Ejemplo 1a en $^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico. El quelato-Gd del Ejemplo 4 fue añadido para resultar en una composición de 0,63 mM en quelato-Gd del Ejemplo 4, es decir, 1,89 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas, la polarización fue detenida y la composición fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y TRIS para proporcionar una solución neutra de sodio $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado con una concentración total de piruvato de aproximadamente 78 mM en 40 mM tampón TRIS.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 44,7%.

La comparación del Ejemplo 3 y el Ejemplo 5 muestra que, debido a la presencia de un ion metálico paramagnético en la composición, el nivel de polarización de la muestra podría ser mejorado en un factor superior a 2.

Ejemplo 6 Producción de una solución de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado en presencia de un ion metálico paramagnético y desgasificación de la composición antes de la polarización

43 mg de una composición de 15 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo del Ejemplo 1a en $^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico. El quelato-Gd del Ejemplo 4 fue añadido para resultar en una composición de 0,5 mM de quelato-Gd del ejemplo 4, es decir, 1,5 mM de Gd^{3+} . La composición fue desgasificada mediante burbujeo de gas helio durante 10 minutos, con el fin de eliminar el aire. La composición fue concentrada, de esta manera, con respecto al radical tritilo y el quelato-Gd, resultando en una composición de 18,9 mM en radical tritilo del Ejemplo 1a) y de 0,63 mM en quelato-Gd

del Ejemplo 4, es decir, 1,89 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas, la polarización fue detenida y la composición fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y TRIS para proporcionar una solución neutra de $^{13}C_1$ -piruvato de sodio hiperpolarizado con una concentración total de piruvato de aproximadamente 78 mM en 40 mM tampón TRIS.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 55,3%.

La comparación del Ejemplo 5 y el Ejemplo 6 muestra que, desgasificando la composición, el nivel de polarización en el $^{13}C_1$ -piruvato podría ser mejorado adicionalmente en aproximadamente un 10%.

10 **Ejemplo 8 Comparación de la polarización en estado sólido de 1,1-bis (hidroximetil) ciclopropano-1- ^{13}C con y sin el quelato-Gd del Ejemplo 4**

Una composición de 15 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra (hidroxietoxi)metilbenzo[1,2-d :4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 9 μ l de 1,1-bis(hidroximetil)ciclopropano-1- ^{13}C y 36 μ l de etilenglicol.

15 La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de composición y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, llevada a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 25,8 (integral).

20 En otro experimento, una composición de 15 mM de radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il) metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en 9 μ l de 1,1-bis(hidroximetil)ciclopropano-1- ^{13}C y 36 μ l de etilenglicol. Además, el quelato-Gd del Ejemplo 4 fue añadido para resultar en una composición de 0,62 mM en el quelato-Gd del Ejemplo 4, es decir, 1,86 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida.

25

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 44,9 (integral).

30 La adición de un ion metálico paramagnético resultó en una mejora de la polarización en estado sólido en un factor de aproximadamente 2.

Ejemplo 9 Comparación de la polarización en estado sólido de $^{13}C_1$ -ácido pirúvico con y sin $GdCl_3$

Una composición de 15 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo 3,1 mg del radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il) metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en 90 μ l de $^{13}C_1$ -ácido pirúvico. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas, la polarización fue detenida.

35

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era del 25%.

40

En otro experimento, una composición de 15 mM de radical tritilo fue preparada disolviendo 3,1 mg del radical sal de sodio de tritilo tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en 90 μ l de $^{13}C_1$ -ácido pirúvico. Además, se añadió $GdCl_3$ (10 μ l de una solución acuosa 10 mM) a la mezcla para resultar en una composición de 1 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas, la polarización fue detenida.

45

Ejemplo 11b Producción de una solución de $^{13}C_1$ -fumarato hiperpolarizada con el quelato-Gd del Ejemplo 4

La composición sólida polarizada del Ejemplo 10b fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio para proporcionar una solución neutra de TRIS- $^{13}C_1$ -fumarato con una concentración total de fumarato de aproximadamente 40 mM en 40 mM tampón TRIS.

50

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 23%.

La adición de un ión metálico paramagnético resultó en una mejora de la polarización en estado líquido en un factor de 2,5.

5 **Ejemplo 12 Comparación de la polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -acetato con y sin el quelato-Gd del Ejemplo 4**

Ejemplo 12a Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -acetato sin el quelato-Gd del Ejemplo 4 (ejemplo de comparación)

10 Una composición de 10 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il) metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,199 mmol TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -acetato y 13 μl de agua. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento lumínico y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida.

15 Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, llevada a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 195 (integral/mmol- ^{13}C).

Ejemplo 12b Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -acetato con el quelato-Gd del Ejemplo 4

20 Una composición de 10 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il) metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,199 mmol TRIS- ^{13}C -acetato y 13 μl de agua. Además, el quelato-Gd del Ejemplo 4 fue añadido para resultar en una composición de 0,2 mM en el quelato-Gd, es decir, 0,6 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada en condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida.

25 Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 450 (integral/mmol- ^{13}C).

La adición de un ion metálico paramagnético resultó en una mejora en la polarización en estado sólido en un factor de 2,3.

30 **Ejemplo 13 Comparación de la polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -bicarbonato con y sin el quelato-Gd del Ejemplo 4**

Ejemplo 13a Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -bicarbonato sin el quelato-Gd del Ejemplo 4 (ejemplo comparativo)

35 Una composición de 10 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tri(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 21 mg de $\text{Cs-}^{13}\text{C}_1$ -bicarbonato, 5 μl de glicerol y 8 μl de agua. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T. Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, según se ha descrito en el ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era del 50%.

40 La adición de un ión metálico paramagnético a la composición a polarizar resultó en una mejora de la polarización en estado sólido de aproximadamente un factor 2 en la muestra.

Ejemplo 10 Comparación de la polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -D₂-fumarato con y sin el quelato-Gd del Ejemplo 4

45 **Ejemplo 10a Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -D₂-fumarato sin quelato-Gd del Ejemplo 4 (ejemplo comparativo)**

50 Una composición de 10 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,21 mmol $^{13}\text{C}_1$ -D₂-ácido fumárico y 0,24 mmol TRIS disuelto en 17 μl de agua. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial,

calentamiento mediante energía lumínica y ultrasonidos, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida.

5 Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, llevada a cabo tal como se ha descrito en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 220 (integral/mmol- ^{13}C).

Ejemplo 10b Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -D₂-fumarato con quelato-Gd del Ejemplo 4

10 En otro experimento, una composición de 10 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi-etoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,21 mmol de $^{13}\text{C}_1$ -D₂-ácido fumárico y 0,24 mmol TRIS disuelto en 17 μl de agua. Además, se añadió el quelato-Gd del Ejemplo 4 para resultar en una composición de 0,7 mM en el quelato-Gd, es decir, 2,1 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y ultrasonidos, y fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida.

15 Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 630 (integral/mmol- ^{13}C).

La adición de un ion metálico paramagnético resultó en una mejora en la polarización en estado sólido en un factor de aproximadamente 3.

20 **Ejemplo 11 Producción de una solución de $^{13}\text{C}_1$ -fumarato hiperpolarizado hiperpolarizada con y sin el quelato-Gd del Ejemplo 4**

Ejemplo 11a Producción de una solución de $^{13}\text{C}_1$ -fumarato hiperpolarizada sin el quelato-Gd del Ejemplo 4 (ejemplo comparativo)

25 La composición sólida polarizada del Ejemplo 10a fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio, para proporcionar una solución neutra de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -fumarato hiperpolarizada con una concentración total de fumarato de aproximadamente 40 mM en 40 mM tampón TRIS.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 9%.

30 Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, realizada tal como se ha descrito en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 70 (integral/mmol- ^{13}C).

Ejemplo 13b Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -bicarbonato con el quelato-Gd del Ejemplo 4

35 Una composición de 10 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi-etoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 21 mg $\text{Cs-}^{13}\text{C}_1$ -bicarbonato, 5 μl de glicerol y 8 μl de agua. Además, se añadió el quelato-Gd del Ejemplo 4 para resultar en una composición de 0,7 mM en el quelato-Gd, es decir, 2,1 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad, mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida.

40 Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 390 (integral/mmol- ^{13}C).

La adición de un ion metálico paramagnético resultó en una mejora en la polarización en estado sólido en un factor de 5,6.

45 **Ejemplo 14 Comparación de la polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -lactato con y sin el quelato-Gd del Ejemplo 4**

Ejemplo 14a Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -lactato sin el quelato-Gd del Ejemplo 4 (ejemplo comparativo)

Una composición de 13 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi-etoxi)metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el

documento WO-A-97/09633 en 0,23 mmol $^{13}\text{C}_1$ -lactato (57% solución de agua). La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada en condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 2 horas, la polarización fue detenida.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, llevada a cabo tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era 28 (integral/mmol- ^{13}C).

Ejemplo 14b Polarización en estado sólido de $^{13}\text{C}_1$ -lactato con el quelato-Gd del Ejemplo 4

Una composición de 13 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo que fue sintetizado según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en 0,23 mmol $^{13}\text{C}_1$ -lactato (57% solución de agua). Además, el quelato-Gd del Ejemplo 4 es añadido para resultar en una composición de 0,4 mM en el quelato-Gd, es decir, 1,2 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en un recipiente de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada en condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 2 horas, la polarización fue detenida.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado sólido, tal como se describe en el Ejemplo 1b, que la polarización en estado sólido era de 178 (integral/mmol- ^{13}C).

La adición de un ion metálico paramagnético resultó en una mejora en la polarización en estado sólido en un factor de 6,4.

Ejemplo 15 Comparación de la polarización en estado líquido de 3-hidroxi-butirato con y sin el quelato-Gd del Ejemplo 4

Ejemplo 15a Polarización en estado líquido de 3-hidroxi-butirato sin el quelato-Gd del Ejemplo 4 (ejemplo comparativo)

Una composición de 13 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,224 mmol 3-hidroxi-butirato (abundancia natural de ^{13}C) y 15 μl de agua. La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial y calentamiento mediante energía lumínica, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida y la composición fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132, en una solución acuosa de 20 mM solución tampón de fosfato, pH 7,4, para proporcionar una solución neutra de 3-hidroxi-butirato hiperpolarizado con una concentración total de aproximadamente 40 mM.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 8%.

Ejemplo 15b Polarización en estado líquido de 3-hidroxi-butirato con el quelato-Gd del Ejemplo 4

Una composición de 13 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,224 mmol 3-hidroxi-butirato (abundancia natural de ^{13}C) y 15 μl de agua. Además, se añadió el quelato-Gd del Ejemplo 4 para resultar en una composición de 0,5 mM en el quelato-Gd, es decir, 1,5 mM de Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida y la composición fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de 20 mM solución tampón de fosfato, pH 7,4, para proporcionar una solución neutra de 3-hidroxi-butirato hiperpolarizado con una concentración total de aproximadamente 40 mM.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 26%.

La adición de un ion metálico paramagnético resultó en una mejora en la polarización en estado líquido en un factor superior a 3.

Ejemplo 16 Polarización en estado líquido de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -glutamato con el quelato-Gd del Ejemplo 4

Una composición de 16 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,06 mmol $^{13}\text{C}_1$ -ácido glutámico, 74 μmol TRIS y 7 μl de agua. Además, el quelato-Gd del Ejemplo 4 fue añadido para resultar en una composición de 0,3 mM en el quelato-Gd, es decir, 0,9 mM en Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida y la composición fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa para proporcionar una solución neutra de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -glutamato hiperpolarizado con una concentración total de aproximadamente 10 mM.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 25%.

Ejemplo 17 Polarización en estado líquido de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -aspartato con el quelato-Gd del Ejemplo 4

Una composición de 16 mM en radical tritilo fue preparada disolviendo el radical tritilo sal de sodio de tris-(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)-metilbenzo[1,2-d:4,5-d']-bis-(1,3-ditiol-4-il)metilo, que fue sintetizada según el Ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633 en una mezcla de 0,058 mmol $^{13}\text{C}_1$ -ácido aspártico, 72 μmol TRIS y 7 μl de agua. Además, el quelato-Gd del Ejemplo 4 fue añadido para resultar en una composición de 0,3 mM en el quelato-Gd, es decir, 0,9 mM de Gd^{3+} . La composición fue mezclada hasta la homogeneidad mediante una combinación de agitación vorticial, calentamiento mediante energía lumínica y sonicación, fue colocada en una copa de sonda y fue insertada en el polarizador DNP. La composición fue polarizada bajo condiciones DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T, bajo irradiación con microondas (93,890 GHz). Después de 3 horas, la polarización fue detenida y la composición fue disuelta usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa para proporcionar una solución neutra de TRIS- $^{13}\text{C}_1$ -aspartato hiperpolarizado, con una concentración total de aproximadamente 10 mM.

Se determinó, mediante ^{13}C -RMN en estado líquido a 400 MHz, que la polarización en estado líquido era del 16%.

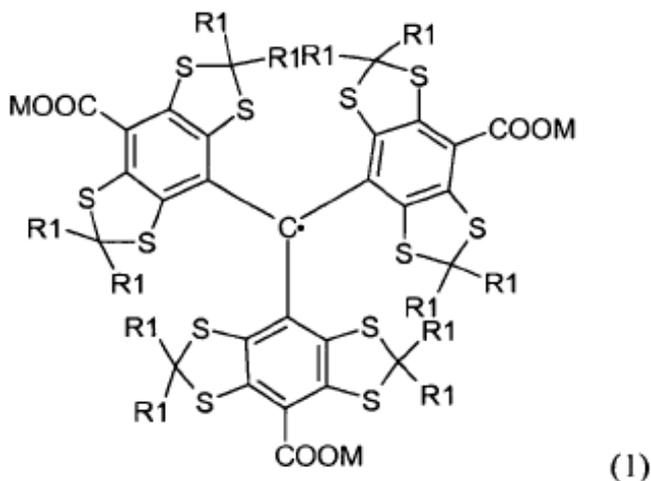
REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una muestra que es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N ; un radical tritilo basado en carbono; e iones de gadolinio.

2. Composición según la reivindicación 1, para su uso en una polarización nuclear dinámica.

3. Composición según las reivindicaciones 1 a 2, en la que la muestra es un compuesto endógeno que juega un papel en un proceso metabólico en el cuerpo de un animal humano o no humano.

4. Composición según las reivindicaciones 1 a 3, en la que 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 el mismo o diferente, representa un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$, de cadena lineal o ramificada, o un grupo $-(\text{CH}_2)_n\text{-X-R}_2$, en la que n es 1, 2 ó 3;

X es O o S y R2 es un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ de cadena lineal o ramificada.

5. Composición según las reivindicaciones 1 a 4, en la que el ión de gadolinio está en forma de quelatos o en forma de una sal.

6. Composición según las reivindicaciones 1 a 5 en la que el ión de gadolinio está en forma de quelatos y el agente quelante es un agente quelante cíclico o acíclico, que contiene, opcionalmente, heteroátomos del grupo que consiste en N, O, S y P.

7. Composición según las reivindicaciones 1 a 6, en la que el ión de gadolinio está en forma de quelatos y el agente quelante es seleccionado de entre el grupo que consiste en DOTA o DO3A.

8. Composición según las reivindicaciones 1 a 7, en la que el ion de gadolinio es soluble en la muestra o en una solución de la muestra.

9. Composición que comprende una muestra hiperpolarizada, que es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , un radical tritilo basado en carbono y un ión de gadolinio, obteniéndose la composición mediante polarización nuclear dinámica.

10. Procedimiento de producción de una muestra sólida hiperpolarizada, que es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende la muestra, un radical tritilo basado en carbono y un ión de gadolinio y llevar a cabo una polarización nuclear dinámica sobre la composición.

11. Procedimiento de producción de una muestra líquida hiperpolarizada, que es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , comprendiendo el procedimiento preparar una composición que comprende la muestra o

un precursor de la misma, un radical tritilo basado en carbono y un ión de gadolinio, llevar a cabo una polarización nuclear dinámica sobre la composición, licuar la composición, preferentemente mediante disolución y, opcionalmente, eliminar el radical tritilo y/o el ión de gadolinio de la composición licuada.

5 12. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra es un compuesto endógeno enriquecido con ^{13}C o ^{15}N , seleccionado de entre el grupo que comprende alanina, glicina, glutamina, ácido glutámico, cisteína, asparagina y ácido aspártico, acetato, ácido pirúvico, piruvato, oxalato, malato, fumarato, lactato, ácido láctico, citrato, bicarbonato, malonato, succinato, oxalacetato, α -cetoglutarato, 3-hidroxi butirato, isocitrato y urea;

un radical tritilo basado en carbono de la reivindicación 4, e

iones de gadolinio.

10