

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 335**

51 Int. Cl.:
G01R 33/465 (2006.01)
G01R 33/62 (2006.01)
A61K 49/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01938393 .4**
96 Fecha de presentación: **12.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1290461**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

54 Título: **Procedimiento para investigar el destino de un compuesto de ensayo con espectroscopia de RMN**

30 Prioridad:
14.06.2000 GB 0014463

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2012

73 Titular/es:
**GE HEALTHCARE LIMITED
AMERSHAM PLACE LITTLE CHALFONT
BUCKINGHAMSHIRE HP7 9NA, GB**

72 Inventor/es:
**COOK, Neil;
SANTOS, Albie;
BOSWORTH, Nigel;
WOLBER, Jan;
LOOKER, Mike;
KNOX, Peter;
ARDENKJAER-LARSEN, Jan H. y
GOLMAN, Klaes**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 381 335 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para investigar el destino de un compuesto de ensayo con espectroscopia de RMN

Esta invención se refiere a la espectroscopia de RMN. Los espectros de núcleos activos de RMN varían dependiendo de su entorno. La presente invención proporciona un procedimiento para obtener información respecto al destino de un compuesto de ensayo potenciando la polarización nuclear de núcleos activos de RMN del compuesto de ensayo (de aquí en adelante, denominado "hiperpolarización") antes del análisis de RMN.

El término "compuesto de ensayo" como se usa de aquí en adelante, designa un compuesto orgánico que comprende una abundancia enriquecida artificialmente de ^{13}C a una abundancia de al menos un 5%.

El término "destino" como se usa de aquí en adelante, cuando se aplica a un compuesto de ensayo, comprende metabolismo, absorción y excreción en un sistema biológico.

El término "sistema biológico" como se usa de aquí en adelante es un animal íntegro.

Debido a la revolución genómica, las colecciones químicas combinatorias y el cribado de alto rendimiento, un número exponencialmente creciente de nuevas entidades químicas está entrando ahora o está ya en las fases de ensayo necesarias antes de comercializarse como nuevos fármacos. Esta rápida evolución de fármacos potencialmente beneficiosos ha conducido a una presión aumentada sobre los procesos de evaluación tanto de eficacia como de seguridad. Existe una búsqueda intensiva continua de nuevas tecnologías que puedan optimizar la eficacia de dichas evaluaciones.

La farmacocinética y ensayos toxicológicos tienen dos requisitos clave, que son la identificación de los metabolitos formados a partir del compuesto original y la valoración de la toxicidad tanto del compuesto original como de sus metabolitos. Durante los ensayos preclínicos y las fases de ensayo clínico del desarrollo de fármacos, es esencial investigar (mediante detección/control) si los fármacos de ensayo mismos o sus metabolitos dan lugar a reacciones adversas en sistemas de ensayo *in vitro*, animales, voluntarios sanos o pacientes. Es también necesario establecer si las reacciones potencialmente indeseables e incluso peligrosas están relacionadas con la concentración o distribución del fármaco o de uno o más de sus metabolitos en el organismo. Además, dichas evaluaciones pueden realizarse en pacientes seleccionados para determinar si grupos particulares de pacientes, por ejemplo con defectos identificados en una o más enzimas metabolizadoras del fármaco (que pueden representar una minoría muy pequeña de las poblaciones de ensayo preclínico y clínico), tienen un riesgo aumentado de desarrollar reacciones adversas a fármacos. Es un aspecto importante de cualquiera de dichas investigaciones determinar el destino de una sustancia farmacológica una vez se ha administrado, concretamente, su absorción, distribución en tejido, velocidad y sitio(s) del metabolismo, caracterización de la estructura y abundancia relativa de metabolitos y las rutas de excreción. Existe la necesidad de nuevos procedimientos para estudiar el destino de un compuesto de ensayo.

Uno de los procedimientos que puede usarse para estudiar el destino de un compuesto de ensayo en un sistema biológico es identificar las estructuras de sus metabolitos. Las técnicas actuales para identificar la estructura de metabolitos se basan en gran medida en la espectroscopia de masas (EM) en combinación con cromatografía líquida. Sin embargo, la espectroscopia de masas, por sí sola, a menudo no es capaz de caracterizar la estructura de metabolitos total e inequívocamente. Los datos derivados de la espectroscopia de RMN son a menudo complementarios de los obtenidos a partir de EM y, cuando se usan en combinación, estas técnicas pueden permitir determinar la estructura de metabolitos. Desgraciadamente, la RMN actual es relativamente insensible. En muchos casos, la sensibilidad relativamente baja de la RMN crea problemas fundamentales que afectan al tiempo de adquisición necesario para conseguir una señal deseada y al límite inferior de detección (LID) del analito a una relación de señal:ruido definida (por ejemplo, 3:1).

En términos prácticos, la mala sensibilidad de las técnicas de RMN actuales limita su aplicación en estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Durante las etapas tempranas del desarrollo de fármacos, el suministro de candidato a fármaco, y por tanto sus metabolitos, es limitado y a menudo no hay material disponible suficiente para análisis por RMN. Además, la concentración de metabolitos producidos mediante cribados *in vitro* e *in vivo* es baja y a menudo está muy por debajo del nivel necesario para análisis por RMN. No es aconsejable aumentar la dosificación porque las rutas metabólicas pueden cambiar en dichas condiciones no fisiológicas y los metabolitos formados no serán representativos de los producidos en regímenes de tratamiento del paciente estándares.

Actualmente, es necesario aumentar la escala del procedimiento de ensayo y concentrar los metabolitos a partir de grandes volúmenes de fluidos biológicos (por ejemplo, sobrenadantes de cultivo celular, perfundidos de órganos, plasma, bilis, orina, etc.) para caracterizar los nuevos candidatos a fármacos por RMN. Esto consume mucho tiempo, así que en la práctica a menudo no tiene lugar hasta tardíamente en la fase de desarrollo del fármaco. Esto conduce a muchos de los costosos fracasos de candidato a fármaco de fase tardía. Idealmente, la RMN tiene que incorporarse como herramienta analítica rutinaria junto con la EM lo antes posible en la evaluación de las características de ADME de nuevas entidades químicas. Sin embargo, esto no es factible con la sensibilidad de las técnicas de RMN convencionales. La presente invención que usa núcleos activos de RMN hiperpolarizados se enfrenta a muchas de las limitaciones anteriormente mencionadas y por tanto ofrece muchas ventajas en comparación con las técnicas de RMN convencionales, como se discutirá a continuación.

Además de las aplicaciones de ADME, las evaluaciones de toxicidad (Tox) son también básicas para el proceso de aprobación de fármacos. La situación actual con respecto al ensayo de Tox podría decirse que es aún más problemática que en ADME. Se encuentra que muchos candidatos a fármacos exhiben una toxicidad inaceptable tardíamente en ensayos clínicos, e incluso ocasionalmente tras el lanzamiento. Está ampliamente aceptado en la industria farmacéutica que los cribados toxicológicos preclínicos actuales son inadecuados. Los cribados *in vitro* actuales son poco predictivos de la situación *in vivo*. Consiguientemente, la toxicidad de los nuevos candidatos a fármacos debe evaluarse concienzudamente en dos especies animales antes de ensayo a gran escala en seres humanos. Esto es costoso y consume tiempo. Además, los resultados del ensayo animal no son siempre predictivos para seres humanos. Existe la necesidad urgente de procedimientos de cribado de toxicidad mejorados.

Los enfoques bioanalíticos para evaluar la eficacia y seguridad de fármacos incluyen actualmente medidas de las respuestas de sistemas vivos a los candidatos a fármacos a nivel genético o a nivel de expresión de proteínas celulares, usando los denominados procedimientos genómico y proteómico, respectivamente. Sin embargo, puesto que ambos procedimientos ignoran el estado metabólico dinámico de la célula, tejido u organismo entero, incluso en combinación, la genómica y proteómica pueden no proporcionar suficiente información sobre la función celular integrada en sistemas vivos para valorar exactamente el destino y perfil toxicológico de un candidato a fármaco. Se ha sugerido un enfoque de alta resolución basado en RMN-¹H (*Xenobiotica*, 1999, vol. 29, 1181-1189, J.K. Nicholson *et al.*) y se le ha denominado metabonómica. La metabonómica se define como la medida cuantitativa de la respuesta metabólica multiparamétrica dinámica de sistemas vivos ante estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas. Se prevé que dichos análisis destaquen los patrones de variaciones de compuestos endógenos producidos en respuesta a toxinas conocidas. Esto debería posibilitar predecir la toxicidad de los nuevos candidatos a fármacos por comparación. Los procedimientos según la presente invención que usan RMN hiperpolarizada deberían proporcionar mejoras a los análisis metabonómicos del efecto de los nuevos candidatos a fármacos sobre la distribución, metabolismo y excreción de compuestos endógenos en comparación con las técnicas empleadas actualmente. La RMN hiperpolarizada posibilitará la utilización de RMN-¹³C para estos tipos de estudios. Actualmente, solo es practicable el uso de RMN-¹H (debido a la insensibilidad de detección de ¹³C usando RMN convencional) y el contenido de información del análisis está limitado por el intervalo de desplazamiento químico del ¹H. En comparación, la RMN-¹³C ofrece un intervalo mucho más amplio de desplazamientos químicos. Las mejoras obtenidas por los procedimientos de la presente invención pueden ser en términos de velocidad y sensibilidad y cualquier combinación de las mismas.

Los perfiles de patrones de RMN es una técnica que se usa para adquirir información sobre el estado de un sistema biológico (*J. Pharm. Biomed. Anal.* marzo de 1995; 13(3): 205-11, Anthony ML *et al.*; *Mol. Pharmacol.* julio de 1994; 46(1): 199-211, Anthony ML *et al.*; *Naturwissenschaften* enero de 1975; 62(1): 10-4, Kowalski BR y Bender CF). Típicamente, se compara un patrón de RMN, que puede ser un espectro o una imagen de un sistema que se ha sometido a alguna clase de perturbación en su estado, con el patrón de RMN del mismo tipo de sistema en su estado habitual. Los cambios en el patrón pueden correlacionarse entonces con el cambio en el estado del sistema. El cambio en el estado del sistema puede ser, por ejemplo, exposición a una sustancia farmacológica, cambio en el entorno o una enfermedad, o un cambio en la etapa de desarrollo del sistema. El análisis de perfiles puede usarse para comparar dos sistemas para determinar si están en el mismo o diferentes estados. Una vez está disponible la información sobre el patrón exhibido por un tipo de sistema en una variedad de estados, puede usarse el análisis de perfiles para determinar el estado de un sistema de ensayo de ese tipo comparando el patrón exhibido por el sistema de ensayo con patrones conocidos para ese tipo de sistema. La información se almacena convenientemente de forma electrónica y pueden usarse análisis algorítmicos para comparar el patrón del sistema de ensayo con patrones conocidos. Los análisis algorítmicos se llevan a cabo adecuadamente usando un ordenador y el software apropiado. El análisis de patrones de RMN es una técnica potencialmente potente para adquirir una pluralidad de informaciones sobre un sistema, incluso cuando las entidades individuales, por ejemplo metabolitos, no puedan identificarse individualmente de forma inequívoca. Sin embargo, su utilidad ha estado limitada por la incapacidad de la tecnología actual de detectar y resolver diferencias en los espectros individuales debido a la sensibilidad relativamente baja de la técnica de RMN. La presente invención que usa núcleos activos de RMN hiperpolarizados se enfrenta a esta limitación y por tanto posibilita potencialmente usar un análisis de perfiles de patrones RMN para obtener más información que la disponible usando técnicas de RMN convencionales con respecto, por ejemplo, a la salud del sistema, el estado funcional y metabólico y los mecanismos que acontecen en el sistema.

La presente invención está limitada a la polarización nuclear dinámica (PND (documento WO 98/58272, Nycomed Imaging AS)) para polarizar los núcleos activos de RMN.

Los isótopos de gases nobles que tienen un espín nuclear no nulo pueden hiperpolarizarse, concretamente, potenciarse su polarización por encima de la polarización de equilibrio, por ejemplo, mediante el uso de luz polarizada circularmente. Las técnicas preferidas para hiperpolarización incluyen el intercambio de espín con un vapor de metal alcalino bombeado ópticamente y el intercambio de metaestabilidad. Los gases nobles a que puede aplicarse esta técnica incluyen ³He y ¹²⁹Xe. La polarización nuclear potenciada de un gas noble puede transferirse a otra especie activa de RMN en estrecha proximidad mediante interacción espín-espín. El documento WO 97/37239 (Lawrence Berkeley National Laboratory) describe procedimientos para transferir polarización nuclear desde un gas noble hiperpolarizado hasta espines nucleares de un compuesto diana, conduciendo a una potenciación de las correspondientes señales de RMN o IRM. El documento WO 98/30918 (Nycomed Imaging AS) se refiere a la polarización nuclear dinámica *ex vivo* (PND) o a la polarización cruzada por efecto nuclear Overhauser (ENO) desde un gas hiperpolarizado hasta un agente de IRM, en que el gas se separa del agente de IRM antes de administrar al cuerpo.

Aunque el procedimiento de espectroscopia de RMN de la presente invención proporciona tipos similares de información sobre el destino de un compuesto de ensayo que la RMN o IRM convencionales, ofrece ventajas potenciales. Están entre estas ventajas: a) sensibilidad de análisis aumentada y b) velocidad de adquisición de espectros de RMN (o imágenes) aumentada. El análisis de fármacos/metabolitos o compuestos fisiológicos que contienen un núcleo activo de RMN puede proporcionar información adicional suministrada anteriormente solo estudiando los correspondientes compuestos marcados con ^{14}C , estando exento de los problemas asociados con los isótopos radiactivos.

Además, en comparación con estudios que usan reactivos fluorescentes y tecnología de marcaje relacionada, por ejemplo, la presente invención no requiere la síntesis de un aducto que comprenda un informador, por ejemplo flúor, y el compuesto de ensayo para posibilitar la detección. Por lo tanto, la presente invención ofrece las siguientes ventajas frente a los sistemas de detección basados en fluorescencia convencionales:

1. No hay alteración de la estructura química de los fármacos novedosos o compuestos fisiológicos. Existe siempre una desventaja con las técnicas tales como los procedimientos fluorescentes en que el componente químico adicional puede influir en la medida. Específicamente, el marcador fluorescente puede ser de un tamaño significativo cuando se compara con el compuesto de ensayo, y a veces tan grande como o más grande que el compuesto de ensayo. Consiguientemente, el destino del compuesto de ensayo marcado puede ser bastante diferente del compuesto no marcado.

2. La medida de fluorescencia puede no ser específica, por ejemplo, debido a escapes de tinte, compartimentalización del tinte, inactivación de la señal y autofluorescencia.

De forma similar, aunque el procedimiento de análisis de perfiles de patrones de RMN de la presente invención proporciona tipos similares de información sobre el estado de un sistema cuando se compara con procedimientos de análisis de perfiles de patrones de RMN existentes, ofrece también ventajas potenciales. Están entre estas ventajas potenciales: a) sensibilidad de análisis aumentada y b) velocidad de adquisición de espectros de RMN (o imágenes) aumentada. El detalle aumentado de los perfiles de patrones puede concebirse como la consecuencia de una sensibilidad aumentada tal que vuelve visibles rasgos en los espectros que no serían discernibles del ruido con RMN convencional. El aumento de sensibilidad posibilita la utilización de RMN- ^{13}C así como de RMN- ^1H , que colectivamente proporcionarían información adicional respecto a los perfiles de RMN- ^1H solos. Usando el procedimiento según la presente invención, pueden observarse cambios en patrones que no son visibles en perfiles de patrones obtenidos usando técnicas de RMN convencionales. Estos cambios pequeños pueden ser particularmente importantes, por ejemplo, cuando se estudia la toxicidad o se lleva a cabo un ensayo de control de calidad en cultivos celulares.

El artículo de Kazuri Akira *et al.*, "Direct Detection of Antipyrine Metabolites in Rat Urine By ^{13}C Labeling And NMR Spectroscopy", Drug Metabolism And Disposition, 1999, vol. 27, nº 11, pág. 1248-1253 da a conocer un procedimiento para investigar el destino de un compuesto de ensayo que contiene al menos un núcleo activo de RMN, en el que dicho núcleo activo de RMN es ^{13}C y dicho compuesto de ensayo es un compuesto orgánico que comprende una abundancia artificialmente enriquecida de ^{13}C a una abundancia de al menos un 5%, comprendiendo dicho procedimiento administrar el compuesto de ensayo a un sistema biológico en el que se va a estudiar su destino, en el que dicho sistema es un animal entero, e hiperpolarizar los núcleos activos de RMN en muestras de orina extraídas del sistema a intervalos de tiempo. Se efectúa la hiperpolarización mediante un aumento sin distorsión por transferencia de polarización (ADTP) y se analizan las muestras mediante espectroscopia RMN- ^{13}C en estado líquido.

Un aspecto de la presente invención que se refiere a un procedimiento según la reivindicación 1 se refiere a un procedimiento para controlar cualquier aspecto del destino de un compuesto de ensayo, incluyendo el metabolismo, comprendiendo dicho procedimiento polarizar uno o más núcleos activos de RMN del compuesto de ensayo y detectar los cambios en los espectros de los núcleos. El compuesto de ensayo puede ser un compuesto exógeno tal como un fármaco o una sustancia "nativa" endógena. Los cambios pueden detectarse continuamente o como una serie de medidas discretas o como una medida única. Se incluyen las medidas tanto cuantitativas como cualitativas, especialmente el patrón de aclaramiento dinámico de cualquier metabolito usando muestras, por ejemplo, de gases respiratorios exhalados, sangre, plasma sanguíneo, orina u otros fluidos corporales. Los núcleos adecuados son aquellos con espín nuclear no nulo. Se usa ^{13}C según la invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para investigar el destino de un compuesto de ensayo según la reivindicación 1.

Por ejemplo, pueden tomarse muestras de sangre u orina. Las muestras pueden purificarse antes de la espectroscopia de RMN, pero esto no es siempre necesario. Es una ventaja importante de los procedimientos según la presente invención que, al contrario que los procedimientos de la técnica anterior, la espectroscopia puede llevarse a cabo directamente en la muestra biológica bruta sin necesidad de etapas de fraccionamiento, purificación o concentración.

Este procedimiento es particularmente adecuado para estudios dinámicos, ya que se toman muestras a intervalos de tiempo, se hiperpolarizan y pueden compararse entonces los espectros de RMN de las diversas muestras para mostrar los cambios a lo largo del tiempo.

El compuesto de ensayo es preferiblemente exógeno al sistema biológico en el que se va a estudiar su destino, por ejemplo, un fármaco o candidato a fármaco.

Un compuesto de ensayo para uso en un procedimiento según la invención es un compuesto orgánico que comprende una abundancia enriquecida artificialmente de ^{13}C , generalmente o al menos en una posición específica, a una abundancia de al menos un 5%, adecuadamente de al menos un 10%, más adecuadamente de al menos un 50%, preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 90% e idealmente cercana a un 100%.

5 Aunque podría esperarse que, debido a que los centros de ^{13}C diferentes en un compuesto de ensayo enriquecido uniformemente se relajan a velocidades muy diferentes, se encontrarán intensidades de señal muy diferentes en cualquiera de los espectros de RMN producidos, sorprendentemente se han observado picos incluso para los centros de ^{13}C que se esperaba que se relajaran demasiado rápidamente para aparecer en los espectros. Por tanto, puede observarse un pico para cada centro de carbono en los espectros producidos según una realización preferida de la
10 invención en la que los núcleos de RMN son ^{13}C .

El grado de hiperpolarización de los núcleos activos de RMN o núcleos según la invención puede medirse mediante su factor de potenciación en comparación con el equilibrio térmico en el campo espectrométrico y la temperatura. Adecuadamente, el factor de potenciación es al menos 10, preferiblemente es al menos 50 y más preferiblemente es al menos 100. Sin embargo, pueden seguir efectuándose útilmente procedimientos de ensayo en que se consiguen
15 potenciaciones aún menores debido al corto tiempo necesario para la medida total en comparación con los procedimientos convencionales. Si la potenciación es reproducible y la medida de polarización/RMN puede repetirse, puede mejorarse la relación de señal a ruido de una señal de RMN. En dicho caso, el factor de potenciación de RMN mínimo depende de: a) la técnica de polarización y b) la concentración del compuesto de ensayo. La potenciación tiene que ser suficientemente alta para que la señal de RMN del compuesto de ensayo pueda detectarse. En este contexto,
20 resulta evidente que una potenciación de 10 o menos de 10, que es alcanzable en un experimento de múltiples tomas, puede ser muy útil debido al tiempo ahorrado en la adquisición de datos en comparación con la RMN convencional.

Las etapas de análisis de los procedimientos anteriormente mencionados se llevan a cabo mediante una serie de medidas discretas que se llevan a cabo a intervalos de tiempo adecuados. Por tanto, pueden controlarse los cambios en los espectros o imágenes a lo largo del tiempo y correlacionarse con eventos dinámicos. Dichos eventos dinámicos
25 pueden incluir eventos metabólicos, cambios en la distribución, progresión de la absorción y progresión de la excreción del compuesto de ensayo. Los procedimientos anteriormente mencionados pueden usarse para controlar el destino dinámico de cualquier compuesto de ensayo, así como los metabolitos endógenos o metabolitos de un compuesto de ensayo exógeno, usando muestras, por ejemplo, de sangre, orina u otros fluidos corporales.

Puede ser posible, al llevar a cabo los análisis a lo largo del tiempo, identificar muchos y preferiblemente todos los cambios conocidos en el metabolismo o aparición de metabolitos individuales del compuesto de ensayo. Debería ser posible asignar picos específicos en el espectro a metabolitos conocidos. La sensibilidad aumentada de la técnica puede dar como resultado picos adicionales (en comparación con los espectros obtenidos usando RMN convencional) debido a productos metabólicos minoritarios anteriormente no reconocidos que aparecen en el espectro. Esto es importante porque, incluso en pequeñas cantidades, los metabolitos tóxicos pueden causar que un candidato a fármaco exhiba efectos secundarios dañinos. Este procedimiento será por tanto una herramienta muy útil para evaluar el patrón
30 metabólico/tóxico de un fármaco u otras sustancias, así como para aportar información mecanística.

Las muestras de sangre y orina son particularmente adecuadas. Estudiar muestras de orina tiene la ventaja de posibilitar observar los efectos acumulados.

Los procedimientos serán particularmente útiles cuando algunos de los metabolitos no sean conocidos anteriormente. El desplazamiento químico de los núcleos activos de RMN polarizados puede ayudar a identificar la naturaleza de los nuevos metabolitos.
40

Además, los procedimientos pueden ser también útiles incluso si no es posible identificar los diferentes metabolitos inequívocamente porque, en algunas situaciones, el patrón de aclaramiento dinámico de los metabolitos desconocidos puede tener también un valor significativo.

45 Cuando el destino del compuesto de ensayo para estudiar es la absorción, típicamente se extraen muestras de diferentes localizaciones del animal y se analizan por espectroscopia de RMN.

Si el destino del compuesto de ensayo para investigar es la excreción, se prefiere administrar el compuesto de ensayo a un animal entero y extraer entonces muestras, por ejemplo, de bilis, saliva, heces, orina o aire exhalado. Estas muestras se hiperpolarizan antes del análisis de RMN. La espectroscopia de RMN debería emplearse en estudios de este tipo.

50 La presente invención proporciona un procedimiento para transferencia de polarización que usa el procedimiento de PND efectuado por un agente de PND para efectuar la polarización nuclear del compuesto de ensayo o sistema que comprende al menos un núcleo activo de RMN. Los mecanismos de PND incluyen el efecto Overhauser, el denominado efecto sólido y el efecto de mezclado térmico.

Pueden usarse la mayoría de compuestos paramagnéticos conocidos como "agente de PND" en esta realización de la invención, por ejemplo, metales de transición como iones de cromo (V), iones de magnesio (II), radicales libres orgánicos tales como radicales nitróxido y radicales tritilo (documento WO 98/58272) u otras partículas que tienen electrones libres asociados. Cuando el agente de PND es un radical libre paramagnético, el radical puede prepararse
55

convenientemente *in situ* a partir de un precursor radicalico estable mediante una etapa generadora de radicales poco antes de la polarización o, como alternativa, mediante el uso de radiación ionizante. Durante el proceso de PND, se proporciona energía, normalmente en forma de radiación de microondas, que inicialmente excitará la especie paramagnética. Tras la degradación al estado fundamental, hay una transferencia de polarización a un núcleo activo de RMN del material diana. El procedimiento puede utilizar un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja, por ejemplo, llevando a cabo el proceso de PND en helio líquido y con un campo magnético de aproximadamente 1 T o mayor. Como alternativa, puede emplearse un campo magnético moderado a cualquier temperatura a la que se consiga una potenciación de RMN suficiente para posibilitar llevar a cabo los estudios deseados. El procedimiento puede llevarse a cabo usando un primer imán para proporcionar el campo magnético polarizante y un segundo imán para proporcionar el campo primario para espectroscopia/formación de imágenes de RM.

Podría esperarse que la presencia de un radical paramagnético causara un engrosamiento de la línea y desplazamientos de susceptibilidad en los espectros de RMN producidos al analizar la muestra. Afortunadamente, esto no ocurre en los experimentos llevados a cabo hasta la fecha. Este buen resultado puede explicarse por la baja relajabilidad del radical usado y su baja concentración en la muestra final. Por lo tanto, se prefiere usar un radical de PND con baja relajabilidad en aquellas realizaciones de la invención en que se requiera un radical de PND.

Si el compuesto, muestra o sistema no es sólido, puede congelarse convenientemente en una mezcla de disolventes apropiada antes de la transferencia de polarización mediante uno de los procedimientos que tiene que llevarse a cabo en estado sólido. Las mezclas de disolventes se han encontrado particularmente adecuadas, especialmente si la mezcla forma un vidrio amorfo. Se emplea la matriz amorfa para asegurar un mezclado íntimo homogéneo de radical y diana en el sólido mientras la muestra se somete a polarización de PND.

Una vez se ha hiperpolarizado el compuesto, muestra o sistema, puede retirarse rápidamente de la cámara de polarización y disolverse entonces en un disolvente adecuado. Es ventajoso usar disolventes que no interfieran con las imágenes, o más habitualmente, los espectros producidos en la etapa de análisis. Son particularmente adecuados disolventes deuterados tales como D₂O. Pueden usarse agitación, burbujeo, sonicación u otras técnicas conocidas para mejorar la velocidad de disolución. Adecuadamente, se mantienen la temperatura y pH de la solución para permitir una disolución óptima y un largo tiempo de relajación nuclear.

Preferiblemente, se mantienen el compuesto, muestra o sistema, y entonces la solución de los mismos, en un campo de retención durante todo el periodo entre la polarización y el análisis para evitar la relajación. Un campo de retención proporciona un campo mayor que el campo magnético de la Tierra y adecuadamente mayor de 10 mT. Es adecuadamente uniforme en la región de la muestra. Aunque no se requiere un campo de retención para todos los compuestos de ensayo, se obtienen resultados mucho mejores para algunos compuestos de ensayo cuando se usa dicho campo, y es difícil prever por adelantado cuáles compuestos requerirán dicho campo de retención, especialmente si la estructura del compuesto no es conocida *a priori*. Por lo tanto, es preferible usar un campo de retención siempre que un sistema o muestra está polarizado y se transfiere entonces a análisis. Las condiciones óptimas dependerán de la naturaleza del compuesto, muestra o sistema. La solución se transfiere posteriormente para examen mediante análisis de RMN en fase de solución estándar. El proceso de transferencia está preferiblemente automatizado. Como alternativa, las etapas de transferencia de polarización y disolución se integran adecuadamente en una única unidad automatizada. En una realización adecuada adicional, las etapas de transferencia de polarización y disolución de muestra están automatizadas y los instrumentos de detección de RMN están también albergados en la misma unidad individual totalmente integrada. No se requerirá un campo de retención con dicho sistema totalmente integrado.

Los diferentes centros de ¹³C se relajan a muy diferentes velocidades. Por consiguiente, se esperaría que aparecieran muy diferentes intensidades de señal en los espectros de RMN resultantes si la relajación nuclear ocurriera durante la transferencia desde la unidad de hiperpolarización al espectrómetro de RMN. Sorprendentemente, se ha observado que las alturas de pico de diferentes centros de moléculas enriquecidas uniformemente con ¹³C son del mismo orden. Una posible explicación es que el efecto puede ser debido a una redistribución de la polarización potenciada mediante relajación cruzada en ciertos centros de carbono. Esto es útil, porque permite obtener más información de lo que se habría esperado de otro modo. No es irrazonable suponer que cualquier centro de carbono de un compuesto dado se detectará con sensibilidad similar.

La invención se ilustrará ahora por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

50 Ejemplos

Radical tritilo

Los reactivos de triarilmetilo estables son particularmente adecuados para potenciaciones de PND. El radical usado en los siguientes ejemplos es la sal de sodio de tris-(8-carboxil-2,2,6,6,-tetra-(2(1-hidroxietil))benzo[1,2-*d'*:4,5-*d'*]bis-(1,3)ditiol-4-il)metilo (de aquí en adelante llamado radical tritilo). Este se preparó según los procedimientos descritos en el documento WO98/39277.

Se prepararon soluciones madre de radical tritilo en glicerol deuterado para cada ejemplo.

Se añadió radical tritilo (6,28 mg) a glicerol-D₈ (200 µl). Se disolvió el radical por agitación con calentamiento suave y una breve sonicación y se almacenó en un vial cerrado hasta que fue necesario. Esto proporcionó una solución madre de 22 mM que se usó en el estudio del ácido benzoico (ejemplo 1); la concentración de radical tritilo final usada para la etapa de PND fue de 13,2 mM. Se calentaron suavemente muestras de la solución de radical tritilo para facilitar la posterior dispensación. Se preparó de forma similar una solución madre de radical tritilo de 22,25 mM y se empleó esta para ácido hipúrico en la muestra de orina (ejemplo 4) con una concentración de radical final de 14,9 mM para la etapa de PND. Adicionalmente, se preparó una disolución madre de 25 mM y se usó esta para los estudios restantes (ejemplos 2, 3, 5 y 6), con concentraciones de radical finales de 15 mM para las etapas de PND.

Se adquirió deutóxido de sodio al 40% p/v en la compañía química SIGMA/ALDRICH y se diluyó 100 veces en D₂O para preparar una disolución madre al 0,4% p/v que se usó en los ejemplos 1, 2 y 3.

Los reactivos glicerol-D₈, D₂O y DMSO-D₆ se adquirieron en SIGMA/ALDRICH.

EJEMPLO 1. Estudio de ácido (¹³C-carboxil)benzoico aislado de orina de rata

Se adquirió ácido (¹³C-carboxil)benzoico en la compañía química SIGMA/Aldrich. Se añadió una muestra a orina de rata a aproximadamente 5 mg por ml y se aisló entonces mediante extracción en fase sólida (EFS) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (HPLC-FI, C18 Kromasil, 25 X 1 cm, 5 µm) usando elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en metanol. Se secó entonces el material aislado y se reanalizó una alícuota por HPLC-FI, indicando una pureza de un 94%, con el componente principal coeluyendo con el material portador, controlado mediante detección UV en línea (a 254 nm) y proporcionando el ión (M-H)⁻ esperado a 122 unidades de masa mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización en línea (EM-IE).

Se disolvió una muestra de ácido (¹³C-carboxil)benzoico (89 µg, 0,72 µmol), obtenida como se describe anteriormente, en deutóxido de sodio en D₂O (0,4% p/v, 7,5 µl, aproximadamente 1,5 equivalentes) y D₂O (7,5 µl). Se añadió radical tritilo disuelto en glicerol-D₈ (24 µl, 22 mM) a la solución de ácido benzoico y se mezcló el conjunto posterior hasta homogeneidad con una pipeta de plástico desechable. Se congeló rápidamente la muestra en pequeñas gotas que gotean por una pipeta de plástico fina en un baño de nitrógeno líquido. Se recogieron las gotas de muestra congeladas usando pinzas pequeñas, se pusieron en una cubeta de Kel-F enfriada por nitrógeno líquido y se transfirieron para polarización de muestra. Se polarizó la muestra durante una noche en un campo magnético de 3,354 T y a una frecuencia de microondas de 93,925 GHz. La potencia de microondas era de 100 mW y la temperatura de muestra se mantuvo a 1,25K durante el periodo de polarización. Se disolvió la muestra de ensayo en D₂O caliente (aproximadamente 5 ml) *in situ* y se transfirió rápidamente una porción (aproximadamente 1 ml en un tubo de RMN de 5 mm, la temperatura estimada de la muestra es de 333 K) a un espectrómetro INOVA a 400 MHz para la medida del espectro de RMN en estado líquido. Se expuso la muestra al campo magnético de la Tierra durante el tránsito al espectrómetro (aproximadamente 20 segundos de tiempo de transferencia). La señal a ruido estimada para el carbono de carboxilo del pico de ácido (¹³C-carboxil)benzoico, observado a 176,0 ppm es de aproximadamente 440. Se obtuvo el espectro de RMN en una sola adquisición (el tiempo de adquisición fue de 1,2 s, amplitud de barrido de 25 kHz, después de un pulso de RF de 6 µs, con desacoplamiento protónico WALTZ aplicado durante el pulso y la adquisición; se aplicó un engrosamiento de línea de 1 Hz y se determinó la señal a ruido mediante el software Vnmr de Variant). Se analizó posteriormente la misma muestra mediante RMN no potenciada con desacoplamiento de protón en el mismo espectrómetro. Se obtuvo una señal de equilibrio térmico del carbono de carbonilo con una señal a ruido de aproximadamente 8. Se adquirió este espectro de control en 37 horas (promediando 168000 barridos), con una velocidad de repetición de barrido de 0,8 s y un ángulo de giro de 11,2°, concretamente en condiciones angulares de Ernst.

Se retuvo la muestra usada para análisis de RMN y se reanalizó posteriormente mediante HPLC-FI (C18 Kromasil, 25 X 0,46 cm, 5 µm) con elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en acetonitrilo y mediante EM-IE.

El reanálisis indicó predominantemente ácido (¹³C)-benzoico y el material proporcionó el ión molecular esperado mediante el análisis de EM.

Resultados

Se obtuvo el espectro de la Figura 1. El pico destacado del sitio de ácido benzoico marcado con ¹³COOH es claramente visible a 176,0 ppm. Las señales destacadas aproximadamente a 71,9 ppm y aproximadamente a 62,3 ppm se identifican como picos de disolvente del glicerol. El tiempo de adquisición de este espectro era del orden de segundos, en comparación con los días que serían necesarios mediante RMN convencional. El espectro ilustra una relación de señal a ruido excepcional.

Conclusiones

La relación de señal a ruido observada del espectro de RMN potenciada, en comparación con la relación de señal a ruido del espectro de RMN convencional de la misma muestra, confirma que el procedimiento según la invención procura una mejora sustancial. Se estima que la potenciación es del orden de varios miles de veces. De forma similar, el tiempo de adquisición de datos notablemente corto es prueba de que los procedimientos según la invención pueden

usarse para llevar a cabo estudios que llevarían simplemente demasiado tiempo para realizar en la práctica usando RMN convencional.

5 Las líneas del espectro son muy estrechas y están situadas como se esperaba en el espectro. Por lo tanto, puede deducirse que el radical de PND no afecta a la calidad del espectro de RMN. Esto es importante, porque muestra que la potenciación de señal obtenida usando este procedimiento de hiperpolarización de la invención no está comprometida por artefactos en el espectro potenciado obtenido.

EJEMPLO 2. Estudio de ácido (¹³C-carboxil)hipúrico (metabolito primario de ácido benzoico) aislado de orina de rata después de la administración iv de ácido (¹³C-carboxil)benzoico

Realización sin un campo magnético de retención

10 Se administró ácido (¹³C-carboxil)benzoico por vía intravenosa a 10 mg/kg (a las 0 y 2 h) a 4 ratas anestesiadas; se recogió la orina de las uretras canuladas. Se aisló el metabolito principal ácido (¹³C-carboxil)hipúrico mediante EFS y HPLC-FI. Se secó entonces el material aislado y se reanalizó una alícuota mediante HPLC-FI, indicando una pureza de un 99%, con el componente principal coeluyendo con material portador auténtico, controlado mediante detección UV en línea (254 nm) y proporcionando el ión (M-M)⁻ esperado a 179 unidades de masa mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización en línea (EM-IE).

15 Se disolvió una muestra de ácido (¹³C-carboxil)hipúrico (463 µg, 2,57 µmol), obtenida como se describe anteriormente, en deutóxido de sodio en D₂O (0,4% p/v, 17,5 µl, aproximadamente 0,97 eq.). Se añadió radical tritilo disuelto en glicerol-D₈ (26 µl, 25 mM) a la solución de ácido hipúrico y se mezcló el conjunto posterior hasta homogeneidad con una pipeta de plástico desechable. Se congeló rápidamente la muestra en pequeñas gotas que gotean por una pipeta de plástico fina en un baño de nitrógeno líquido. Se recogieron las gotas de muestra congeladas usando pinzas pequeñas, se pusieron en una cubeta de Kel-F enfriada por nitrógeno líquido y se transfirieron para polarización de muestra. Se polarizó la muestra durante 4 horas en un campo magnético de 3,354 T y a una frecuencia de microondas de 93,925 GHz. La potencia de microondas era de 100 mW y la temperatura de muestra se mantuvo a 1,25K durante el periodo de polarización. Se disolvió la muestra de ensayo en D₂O caliente (2-3 ml) *in situ* y se transfirió rápidamente una porción (aproximadamente 1 ml en un tubo de RMN de 5 mm, la temperatura estimada de la muestra es de 333 K) a un espectrómetro INOVA a 400 MHz para la medida del espectro de RMN en estado líquido.

Resultados

30 Se obtuvo el espectro de RMN en una sola adquisición (el tiempo de adquisición fue de 1,2 s, amplitud de barrido 25 kHz, después de un pulso de RF de 6 µs; se empleó el desacoplamiento de ¹H como anteriormente; se aplicó el engrosamiento de línea de 1 Hz y se determinó la señal a ruido mediante el software Vnmr de Varian). Se obtuvo un espectro de RMN muy ruidoso a partir de ácido hipúrico. La señal a ruido estimada para el pico de carbono de carboxilo del ácido (¹³C-carboxil)hipúrico, observado a aproximadamente 170 ppm, es menor de 4. Se observaron señales fuertes de glicerol.

Resultados

35 **EJEMPLO 3. Estudio de ácido (¹³C-carboxil)hipúrico (metabolito del ácido benzoico) aislado de orina de rata después de la administración iv de ácido (¹³C-carboxil)benzoico. Realización que usa un imán de retención.**

40 Se disolvió una muestra de ácido (¹³C-carboxil)hipúrico (463 µg, 2,57 µmol), obtenida como se describe anteriormente, en deutóxido de sodio en D₂O (0,4% p/v, 17,5 µl, aproximadamente 0,97 eq.). Se añadió radical tritilo disuelto en glicerol-D₈ (26 µl, 25 mM) a la solución de ácido hipúrico y se mezcló el conjunto posterior hasta homogeneidad con una pipeta de plástico desechable. Se congeló rápidamente la muestra en pequeñas gotas que gotean por una pipeta de plástico fina en un baño de nitrógeno líquido. Se recogieron las gotas de muestra congeladas usando pinzas pequeñas, se pusieron en una cubeta de Kel-F enfriada por nitrógeno líquido y se transfirieron para polarización de muestra. Se polarizó la muestra durante 4 horas en un campo magnético de 3,354 T y a una frecuencia de microondas de 93,925 GHz. La potencia de microondas era de 100 mW y la temperatura de muestra se mantuvo a 1,25K durante el periodo de polarización. Se disolvió la muestra de ensayo en D₂O caliente (2-3 ml) *in situ* y se transfirió rápidamente una porción (aproximadamente 1 ml en un tubo de RMN de 5 mm, la temperatura estimada de la muestra es de 333 K) a un espectrómetro INOVA a 400 MHz para la medida del espectro de ¹³C-RMN en estado líquido. Se mantuvo la muestra en un campo magnético de retención de 10 mT durante el tránsito al espectrómetro (aproximadamente 20 segundos de tiempo de transferencia). La señal a ruido estimada para el carbono de carboxilo del pico de ácido (¹³C-carboxil)hipúrico, observado a 171,2 ppm es de aproximadamente 1500. Se obtuvo un espectro de RMN en una sola adquisición (el tiempo de adquisición fue de 1,2 s, amplitud de barrido de 25 kHz, después de un pulso de RF de 6 µs; se empleó el desacoplamiento de ¹H como anteriormente, se aplicó el engrosamiento de línea de 1 Hz y se determinó la señal a ruido mediante el software Vnmr de Varian).

55 Se retuvo la muestra usada para análisis de RMN y se reanalizó posteriormente mediante HPLC-FI (C18 Kromasil, 25 X 0,46 cm, 5 µm) con elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en acetonitrilo y mediante EM-IE. El reanálisis indicó predominantemente ácido hipúrico (¹³C) y el material proporcionó el ión molecular esperado mediante análisis de EM.

Resultados

Se muestra el espectro de RMN potenciada en la Figura 2. Se obtuvo una relación de señal a ruido para la señal de RMN de ácido hipúrico mucho mayor en este ejemplo usando un campo de retención que en el ejemplo 2, en que no se usó campo de retención.

5 Afortunadamente, se observaron picos además de los esperados para el marcador.

La diferencia de desplazamiento químico de la señal de RMN para el marcador de ácido hipúrico en comparación con el del marcador de ácido benzoico era como se esperaba a partir de estudios de RMN convencionales.

Conclusiones

10 Es beneficioso usar un campo de retención cuando se analizan algunos compuestos mediante una técnica en que la muestra se polariza en una localización y el análisis de RMN tiene lugar en otra. Puesto que no es siempre posible predecir por adelantado cuáles compuestos se beneficiarán del uso de dicho campo de retención, debería usarse rutinariamente cuando se empleen técnicas de hiperpolarización *ex situ*.

15 La presencia de picos adicionales de ácido hipúrico en el espectro de RMN potenciada indica que los procedimientos de la invención son adecuados para estudiar compuestos de ensayo a dosis menores que las que serían posibles usando la RMN convencional. Esto es potencialmente significativo para estudiar la toxicidad y/o el metabolismo de fármacos y candidatos a fármacos, en que algunos metabolitos pueden estar presentes solo a muy bajas concentraciones.

Además, puede suponerse a partir de la presencia de picos adicionales que los procedimientos de la invención pueden ser adecuados para uso con compuestos de ensayo en los que hay un menor grado de enriquecimiento o incluso una abundancia natural de núcleos activos de RMN.

20 La observación de las señales de RMN en las posiciones de desplazamiento químico esperadas confirma que este procedimiento de la invención no introduce artefactos y puede usarse para estudiar el destino del compuesto de ensayo.

EJEMPLO 4. Ácido (¹³C-carboxil)hipúrico (analizado directamente después de pipetear en orina de rata)

Se sintetizó ácido (¹³C-carboxil)hipúrico en el laboratorio a partir de ácido (¹³C-carboxil)benzoico y glicina.

25 Se añadió una muestra a orina de rata aproximadamente a 5 mg/ml, que era el nivel medido en orina (recogida de 0-2 h) en el estudio del metabolismo de ácido benzoico descrito anteriormente. Se disolvió una muestra que contenía 95 µg de ácido (¹³C-carboxil)hipúrico sintético en aproximadamente 20 µl de orina de rata. Se añadió radical tritilo disuelto en glicerol-D₈ (30 µl, 22,25 mm) a la solución de ácido hipúrico y se mezcló el conjunto posterior hasta homogeneidad con una pipeta de plástico desechable. Se congeló rápidamente la muestra en pequeñas gotas que gotean por una pipeta de plástico fina en un baño de nitrógeno líquido. Se recogieron las gotas de muestra congeladas usando pinzas pequeñas, se pusieron en una cubeta de Kel-F enfriada por nitrógeno líquido y se transfirieron para polarización de muestra. Se polarizó la muestra durante 4 horas en un campo magnético de 3,354 T y a una frecuencia de microondas de 93,925 GHz. La potencia de microondas era de 100 mW y la temperatura de muestra se mantuvo a 1,25K durante el periodo de polarización. Se disolvió la muestra de ensayo en D₂O caliente (2-3 ml) *in situ* y se transfirió rápidamente una porción (aproximadamente 1 ml en un tubo de RMN de 5 mm, la temperatura estimada de la muestra es de 333 K) a un espectrómetro INOVA a 400 MHz para la medida del espectro de ¹³C-RMN en estado líquido. Se mantuvo la muestra en un campo magnético de retención de 10 mT durante el tránsito al espectrómetro (aproximadamente 20 segundos de tiempo de transferencia).

40 La señal a ruido estimada para el carbono de carboxilo del pico de ácido (¹³C-carboxil)hipúrico, observado a 171,1ppm, es de aproximadamente 534. Se obtuvo un espectro de RMN en una sola adquisición (el tiempo de adquisición fue de 1,2 s, amplitud de barrido 25 kHz, después de un pulso de RF de 6 µs; se empleó el desacoplamiento de ¹H como anteriormente; se aplicó el engrosamiento de línea de 1 Hz y se determinó la señal a ruido mediante el software Vnmr de Varian).

45 Se retuvo la muestra usada para análisis de RMN y se reanalizó posteriormente mediante HPLC-FI (C18 Kromasil, 25 X 0,46 cm, 5 µm) con elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en acetonitrilo y mediante EM-IE. El reanálisis indicó predominantemente ácido (¹³C)-hipúrico y el material proporcionó el ión molecular esperado mediante análisis de EM.

Resultados

50 Se observaron dos señales de RMN, una que surge del ácido hipúrico a 170,7 ppm y una señal de RMN de singlete menor a 163,1 ppm que puede asignarse provisionalmente a la urea, porque su desplazamiento químico es consistente con el desplazamiento predicho usando el software de ACD Labs, y esta sustancia es conocida por ser el constituyente mayoritario de la orina.

Conclusiones

5 En este caso, se analizó directamente un compuesto de ensayo en una matriz biológica, concretamente orina de rata. El hecho de que se obtuviera una señal clara es muy alentador y confirma que podrían analizarse las muestras recogidas a lo largo del tiempo, posibilitando así estudios dinámicos. Otra conclusión es que las muestras no tienen que fraccionarse antes del análisis de RMN.

No es irrazonable suponer que, si hubiera estado presente ácido benzoico en la muestra, también se habría detectado. Por consiguiente, podrían emprenderse estudios farmacocinéticos usando los procedimientos de la invención.

EJEMPLO 5. (U-¹³C)-Paracetamol aislado de orina de rata

10 Se sintetizó (U-¹³C)-paracetamol. Se añadió este material a orina de rata aproximadamente a 5 mg por ml y se aisló entonces mediante extracción en fase sólida (EFS) y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (HPLC-FI, C18 Kromasil, 25 X 1 cm, 5 µm) usando elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en metanol.

15 Se secó entonces el material aislado y se reanalizó una alícuota mediante HPLC-FI, indicando una pureza de un 94%, coeluyendo el componente principal con material portador controlado mediante detección UV en línea (a 254 nm) y proporcionando el ión (M+H)⁺ esperado a 160 unidades de masa mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización en línea (EM-IE).

20 Se disolvió una muestra de (U-¹³C)-paracetamol (312 µg, 1,96 µmol), obtenida como se describe anteriormente, en DMSO-D₆ (10 µl) y D₂O (14 µl). Se añadió radical tritilo disuelto en glicerol-D₈ (36 µl, 25 mM) a la solución de (U-¹³C)-paracetamol y se mezcló el conjunto posterior hasta homogeneidad con una pipeta de plástico desechable. Se congeló rápidamente la muestra en pequeñas gotas que gotean por una pipeta de plástico fina en un baño de nitrógeno líquido. Se recogieron las gotas de muestra congeladas usando pinzas pequeñas, se pusieron en una cubeta de Kel-F enfriada por nitrógeno líquido y se transfirieron para polarización de muestra. Se polarizó la muestra durante 4 horas en un campo magnético de 3,354 T y a una frecuencia de microondas de 93,925 GHz. La potencia de microondas era de 100 mW y la temperatura de muestra se mantuvo a 1,25K durante el periodo de polarización. Se disolvió la muestra de ensayo en D₂O caliente (2-3 ml) *in situ* y se transfirió rápidamente una porción (aproximadamente 1 ml en un tubo de RMN de 5 mm, la temperatura estimada de la muestra es de 333 K) a un espectrómetro INOVA a 400 MHz para la medida del espectro de ¹³C-RMN en estado líquido. Se mantuvo la muestra en un campo magnético de retención de 10 mT durante el tránsito al espectrómetro (aproximadamente 20 segundos de tiempo de transferencia). Se obtuvo un espectro de RMN en una sola adquisición (el tiempo de adquisición fue de 1,2 s, se empleó el desacoplamiento de ¹H como anteriormente, amplitud de barrido de 25 kHz, después de un pulso de RF de 6 µs).

30 Se retuvo la muestra usada para análisis de RMN y se reanalizó posteriormente mediante HPLC-FI (C18 Kromasil, 25 X 0,46 cm, 5 µm) con elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en acetonitrilo y mediante EM-IE. El reanálisis indicó predominantemente (¹³C)-paracetamol y el material proporcionó el ión molecular esperado mediante análisis de EM.

Resultados

35 Se observó potenciación, estando todos los picos presentes en posiciones consistentes con la predicción.

EJEMPLO 6. Estudio de sulfato de (U-¹³C)-paracetamol aislado de bilis de rata después de la administración iv de (U-¹³C)-paracetamol

40 Se administró (U-¹³C)-paracetamol por vía intravenosa a 20 mg/kg (a las 0 y 3 h) a 4 ratas anestesiadas, se recogió la orina de la uretra canulada y se recogió la bilis del conducto biliar canulado (solo 2 ratas) a las 0-3 y 3-6 horas. Se extrajo la bilis (3-6 h) con diclorometano y se fraccionó entonces mediante HPLC-FI (C18 Kromasil, 25 X 1 cm, 5 µm) usando elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en metanol.

45 Se recogieron varios metabolitos. Se identificó el sulfato de paracetamol mediante EM-IE en línea a partir de su ión (M+H)⁺ a 240 unidades de masa. Se secó entonces el material aislado y se reanalizó la alícuota mediante HPLC-FI, indicando una pureza de pico de un 96,7%, controlado mediante detección UV en línea (a 254 nm) y procuró el ión (M+H)⁺ esperado de 240 unidades de masa mediante espectrometría de masas con ionización por electropulverización en línea (EM-IE).

50 Se disolvió una muestra de sulfato de (U-¹³C)-paracetamol (100 µg, 0,42 µmol), obtenida como se describe anteriormente, en D₂O (24 µl). Se añadió radical tritilo disuelto en glicerol-D₈ (36 µl, 25 mM) a la solución de (U-¹³C)-paracetamol y se mezcló el conjunto posterior hasta homogeneidad con una pipeta de plástico desechable. Se congeló rápidamente la muestra en pequeñas gotas que gotean por una pipeta de plástico fina en un baño de nitrógeno líquido. Se recogieron las gotas de muestra congeladas usando pinzas pequeñas, se pusieron en una cubeta de Kel-F enfriada por nitrógeno líquido y se transfirieron para polarización de muestra. Se polarizó la muestra durante 4 horas en un campo magnético de 3,354 T y a una frecuencia de microondas de 93,925 GHz. La potencia de microondas era de 100 mW y la temperatura de muestra se mantuvo a 1,25K durante el periodo de polarización. Se disolvió la muestra de ensayo en D₂O caliente (2-3 ml) *in situ* y se transfirió rápidamente una porción (aproximadamente 1 ml en un tubo de

5 RMN de 5 mm, la temperatura estimada de la muestra es de 333 K) a un espectrómetro INOVA a 400 MHz para la medida del espectro de ^{13}C -RMN en estado líquido. Se mantuvo la muestra en un campo magnético de retención de 10 mT durante el tránsito al espectrómetro (aproximadamente 20 segundos de tiempo de transferencia). Se adquirió un espectro de RMN en una sola adquisición (el tiempo de adquisición fue de 1,2 s, amplitud de barrido de 25 kHz después de un pulso de RF de 6 μs , se aplicó el desacoplamiento de ^1H como anteriormente).

Se retuvo la muestra usada para análisis de RMN y se reanalizó posteriormente mediante HPLC-FI (C18 Kromasil, 25 X 0,46 cm, 5 μm) con elución en gradiente con ácido fórmico en agua y ácido fórmico en acetonitrilo y mediante EM-IE. El reanálisis indicó un componente principal con un tiempo de retención consistente con el sulfato de paracetamol de análisis previos, y el material proporcionó el ión de peso molecular esperado mediante análisis de EM.

10 Resultados

Se muestra en la Figura 3 el espectro de RMN potenciada. Se observaron diferencias en el espectro de sulfato de paracetamol en comparación con paracetamol. En particular, las posiciones de desplazamiento químico para las señales de RMN- ^{13}C que surgen de sitios aromáticos son significativamente diferentes.

Las alturas de pico de los centros de carbono eran del mismo orden.

15 Conclusiones

20 El sulfato de paracetamol se había producido por el metabolismo en la rata y se recogió de la bilis. La bilis es una matriz biológica diferente que la orina (de la que se recogieron ácido hipúrico y ácido benzoico). Los resultados indican que pueden observarse potenciaciones de RMN independientemente de la matriz biológica de la derive el compuesto de ensayo. El hecho de que se obtuviera un espectro diferente en comparación con el paracetamol confirma que puede ser posible diferenciar los picos de compuestos originales y sus metabolitos en una mezcla, incluso en el caso de diferencias estructurales sutiles entre ellos.

Fue una observación agradable que, como en todos los demás ejemplos, no se observaran señales surgidas del radical.

25 Fue sorprendente ver que las alturas de pico de los centros de carbono fueran del mismo orden. Puesto que los diferentes centros de carbono se degradan a velocidades muy diferentes, se esperaba que las intensidades de señal de los centros de carbono fueran muy diferentes. Es más, no se esperaba que fuera posible observar los picos de metilo en absoluto. Por lo tanto, se obtuvo más información del experimento que la prevista. No es irrazonable suponer que cualquier centro de carbono de un compuesto de ensayo dado fuera detectable con sensibilidad similar por el procedimiento de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para investigar el destino de un compuesto de ensayo que contiene al menos un núcleo activo de RMN, en el que dicho núcleo activo de RMN es ^{13}C y dicho compuesto de ensayo es un compuesto orgánico que comprende una abundancia enriquecida artificialmente de ^{13}C a una abundancia de al menos un 5%, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5
- administrar el compuesto de ensayo a un sistema biológico en el que se va a estudiar su destino, en el que dicho sistema es un animal íntegro,
 - hiperpolarizar los núcleos activos de RMN en muestras extraídas del sistema a intervalos de tiempo mediante transferencia de polarización usando polarización nuclear dinámica (PND) en estado sólido efectuada por un agente de PND; y
 - 10 - analizar cada una de las muestras hiperpolarizadas mediante espectroscopia de RMN- ^{13}C en estado líquido.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento es para investigar el metabolismo del compuesto de ensayo.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha hiperpolarización se lleva a cabo a una temperatura de 4,2K o menos usando una fuerza de campo magnético superior a 1 T.
- 15 4. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se comparan los espectros de RMN de las diversas muestras para mostrar los cambios a lo largo del tiempo.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que el procedimiento implica la detección de cambios en los espectros de núcleos activos de RMN.
- 20 6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de ensayo es exógeno del sistema biológico en el que se va a estudiar.
7. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto de ensayo es un fármaco o un candidato a fármaco.
8. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas muestras son muestras de sangre u orina.
- 25 9. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra hiperpolarizada se retiene en un campo de retención en el periodo desde la hiperpolarización hasta el análisis.
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que dicho campo de retención proporciona un campo mayor que el campo magnético de la Tierra.
- 30 11. Un procedimiento según la reivindicación 11, en el que dicho campo de retención proporciona un campo mayor de 10 mT.
12. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho agente de PND es un radical tritilo.
13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho radical tritilo es la sal de sodio de tris-(8-carboxil-2,2,6,6,-tetra-(2(1-hidroxietil))benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis-(1,3)ditiol-4-il)metilo.
- 35 14. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que es observable un pico para cada centro de carbono en el compuesto de ensayo.
15. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se disuelve la muestra hiperpolarizada en un disolvente adecuado antes del análisis mediante espectroscopia de RMN.
16. Un procedimiento según la reivindicación 15 en el que dicho disolvente adecuado es D_2O .

FIGURA 1

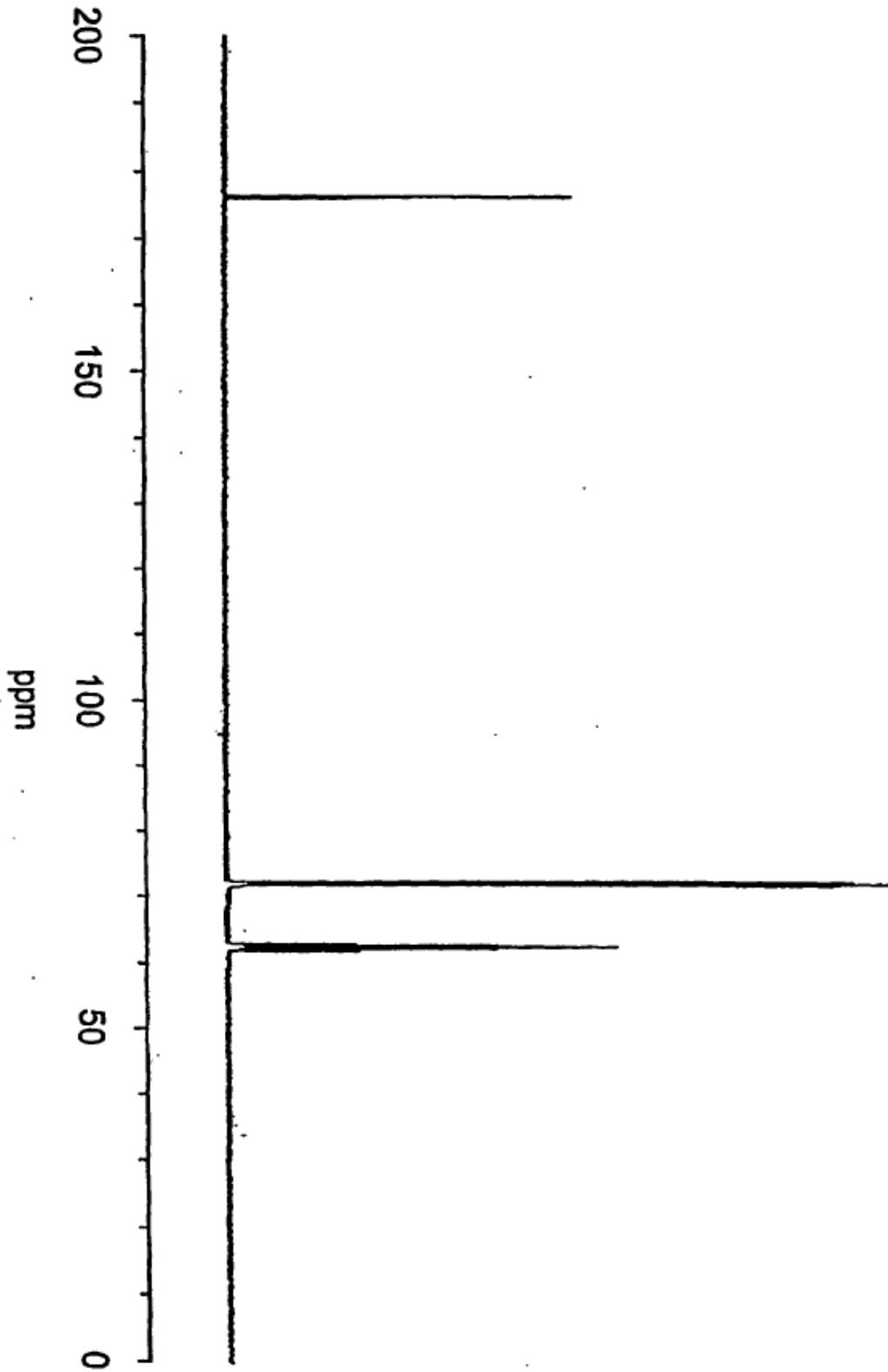


FIGURA 2

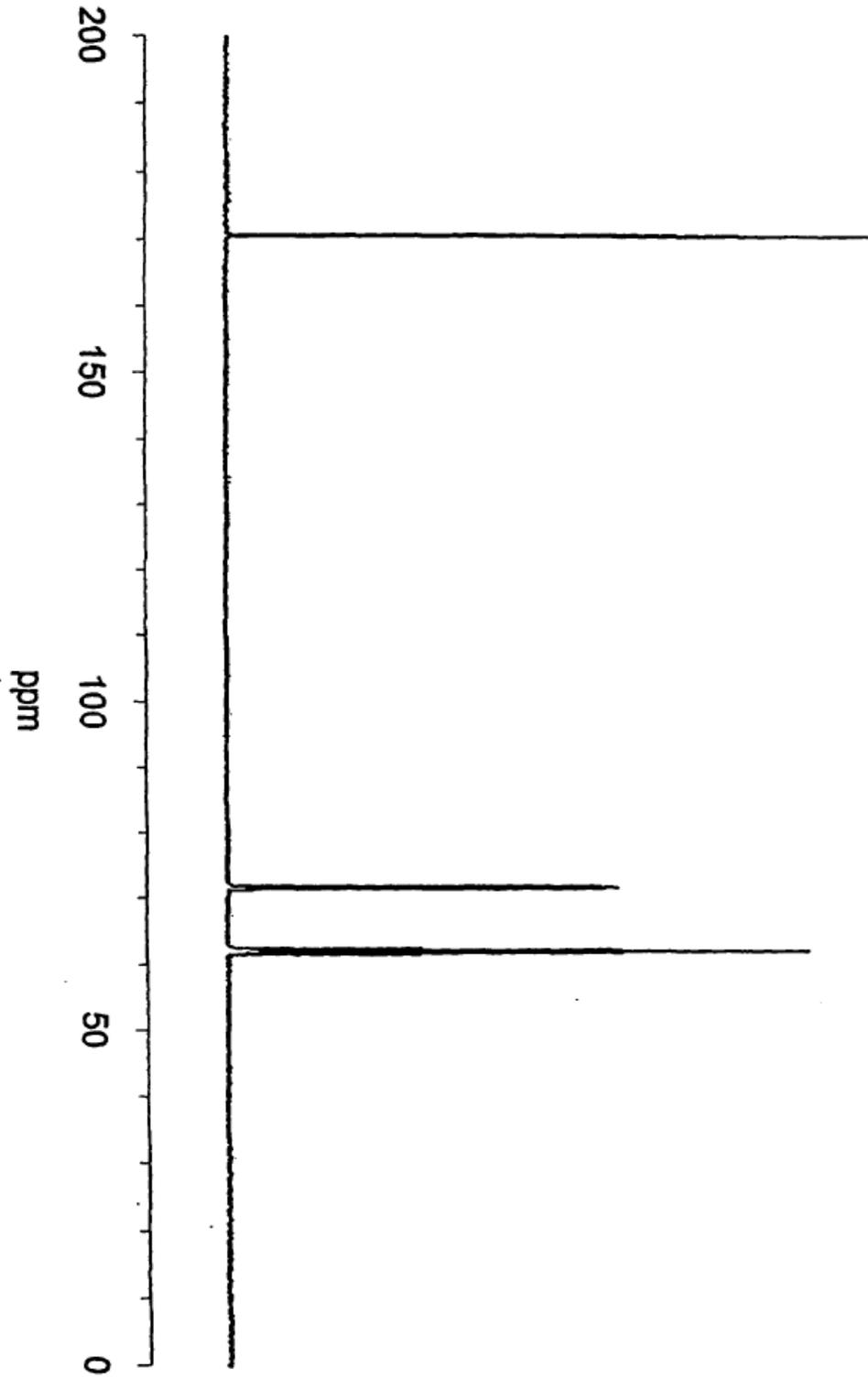


FIGURA 3

