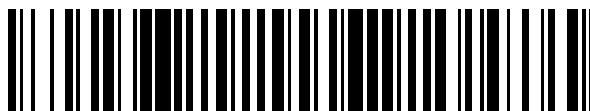


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 558**

51 Int. Cl.:

A61K 49/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2005 E 05816233 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1824523**

54 Título: **Método de obtención de imágenes cardíacas con el uso de ¹³C-piruvato hiperpolarizado**

30 Prioridad:

19.11.2004 NO 20045058

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.09.2013

73 Titular/es:

**GE HEALTHCARE AS (100.0%)
INTELLECTUAL PROPERTY DEPT. PO BOX 4220,
NYDALEN NYCOVEIEN 1-2
0401 OSLO, NO**

72 Inventor/es:

**LERCHE, MATHILDE;
ZANDT, RENÉ;
GOLMAN, KLAES;
THANING, MIKKEL;
ARDENKJÆR-LARSEN, JAN-HENRIK y
PETERSSON STEFAN**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 422 558 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

Método de obtención de imágenes cardíacas con el uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

La invención se refiere a la reivindicación 1.

- 5 La obtención de imágenes por resonancia magnética (RM) (IRM) es una técnica de obtención de imágenes que se ha vuelto particularmente atractiva para médicos ya que permite obtener imágenes del cuerpo de un paciente o partes del mismo de un modo no invasivo y sin exponer al paciente y al personal médico a radiación potencialmente dañina tal como rayos X. Debido a sus imágenes de alta calidad, la IRM es la técnica de obtención de imágenes favorable de órganos y tejidos blandos, tales como por ejemplo el corazón.
- 10 Las enfermedades y lesiones relacionadas con isquemia en el corazón representan la mayoría de las muertes en los países occidentales. La isquemia miocárdica es un estado grave y sólo una rápida identificación y localización temprana de la isquemia miocárdica puede prevenir que el paciente padezca daños miocárdicos irreversibles.
- 15 El tejido cardíaco, como otro tejido metabólicamente activo, es particularmente vulnerable a lesiones isquémicas. La fase inicial del infarto de miocardio agudo está asociada en general con una pérdida de la función contráctil normal, que se manifiesta por sí misma como discinesia regional. Esto puede deberse a una disminución abrupta en la presión de perfusión coronaria, lo que induce un estado de hibernación agudo, y al rápido cese del transporte de iones transmembrana normal. La reperfusión del miocardio isquémico antes de la aparición de la lesión irreversible puede conducir a un retorno rápido o retardado (aturdimiento) a la función y el metabolismo cardíaco normales.
- 20 La obtención de imágenes por resonancia magnética se ha establecido como una técnica de obtención de imágenes cardíacas útil. Aunque las técnicas de RM que usan obtención de imágenes de eco de espín pueden mostrar la anatomía del corazón, es necesario el uso de agentes de contraste para la detección de infarto e isquemia miocárdicos. Una clase de agentes de contraste de RM son agentes de contraste paramagnéticos, que comprenden un ión de metal paramagnético, en forma de una sal o en un complejo con un resto quelante/complejante.
- 25 El agente de contraste paramagnético GdDTPA (Magnevist™) se ha sometido a pruebas clínicas para su uso en la obtención de imágenes del miocardio. Aunque se ha mostrado que este complejo metálico mejora la identificación de infartos de miocardio agudos en imágenes de RM en animales y seres humanos, su uso clínico en la obtención de imágenes del miocardio es limitado debido a su rápida excreción y distribución dentro del espacio del fluido extracelular.
- 30 Se ha usado Mn^{2+} , un ión de metal paramagnético, como agente de contraste para su uso en la obtención de imágenes por RM del miocardio. Compite con Ca^{2+} por la entrada en el miocardio en contracción a través de canales de Ca^{2+} lentos, dando como resultado un acortamiento significativo del tiempo de relajación T_1 y por tanto un aumento de la intensidad de señal en tejido miocárdico normal. El flujo de entrada total de Mn^{2+} por unidad de tiempo se eleva durante el aumento de la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción. Sin embargo, en miocardio isquémico, se capta mucho menos Mn^{2+} debido a la reducción en el flujo de sangre y la disminución en la contractilidad. Por tanto, puede detectarse miocardio isquémico y distinguirse del tejido miocárdico normal mediante obtención de imágenes por RM usando Mn^{2+} paramagnético como agente de contraste.
- 35 Sin embargo, el uso de Mn^{2+} tiene determinadas desventajas. El uso de sales de manganeso, por ejemplo MnCl_2 , está asociado con un riesgo de seguridad debido a la toxicidad cardíaca de estas sales (véase por ejemplo Hu *et al.* Magn. Res. in Medicine 46, (2001), 884-890). Se han hecho intentos para compensar los efectos tóxicos de las sales de manganeso o bien añadiendo sales de calcio o bien administrando las sales en forma de una infusión lenta. La desventaja de usar calcio en la formulación de agente de contraste es que compite con el manganeso por la entrada en los miocitos a través de los canales de calcio. Esto puede conducir a una reducción de la eficacia y a una necesidad posterior de inyectar dosis superiores del agente de contraste para compensar este efecto.
- 40 El documento WO-A-99/01162 describe un método de detección de isquemia miocárdica usando complejos de manganeso en combinación con generación de imágenes rápida. Se dice que el procedimiento de obtención de imágenes se lleva a cabo convenientemente en el plazo de un periodo de desde 3 hasta 6 horas tras la inyección. Aunque este método parece no estar asociado con problemas de toxicidad, la obtención de resultados a partir del procedimiento de obtención de imágenes se retrasa por el periodo de tiempo relativamente largo entre la administración del agente de contraste y el comienzo del procedimiento de obtención de imágenes. Esto da como resultado el retraso del tratamiento posiblemente necesario.
- 45 El documento WO 2004/054623 describe un método para identificar áreas que padecen isquemia miocárdica usando determinados complejos de manganeso. Un régimen de estrés físico y/o farmacéutico es parte de este método ya que aumenta la diferencia de contraste entre miocardio normal e isquémico y permite por tanto el uso de dosis inferiores de agente de contraste. Sin embargo, un régimen de estrés genera tensión fisiológica adicional en el paciente.
- 50 Por tanto, es necesario un agente que va a usarse en un método de obtención de imágenes por RM que permita la distinción entre tejido miocárdico isquémico y tejido miocárdico normal permitiendo por tanto la evaluación de la

viabilidad de dicho tejido a nivel celular. El agente debe tener además un perfil de seguridad favorable, es decir, no mostrar ningún efecto secundario tóxico a dosis clínicas. Además, hay una necesidad de un método de obtención de imágenes por RM que permita la evaluación rápida y fácil de la viabilidad del tejido miocárdico sin generar estrés adicional para el paciente y sin retrasar el comienzo de las medidas de tratamiento.

- 5 PNAS, 2 de septiembre de 2003, vol. 100, n.º 18, 10435-10439, da a conocer sustancias endógenas marcadas con ^{13}C hiperpolarizadas por DNP que van a usarse en métodos de obtención de imágenes por RM. Sugiere usar ^{13}C -acetato como trazador del consumo de oxígeno miocárdico regional.

- 10 Gould P: "C-13 MR tracers show potential for functional diagnostics", junio de 2004, XP002363324, se refiere a un estudio en ratas usando piruvato hiperpolarizado que ha revelado un papel prometedor para la obtención de imágenes de C-13 en la evaluación de la viabilidad tisular. Menciona que el piruvato se metaboliza para dar alanina y lactato en los músculos del cuerpo y que la tasa metabólica global y la proporción de cada metabolito formado pueden indicar si el tejido está sano, enfermo o es canceroso. Sin embargo, la descripción no menciona que el piruvato se metabolice para dar bicarbonato y que la cantidad de bicarbonato formada pueda indicar si el tejido cardíaco está sano, en riesgo o muerto.

- 15 El documento WO-A-99/35508 da a conocer un método de investigación por RM de un paciente usando una disolución hiperpolarizada de un agente de T_1 alto como agente de obtención de imágenes por RM. El término "hiperpolarización" significa potenciar la polarización nuclear de núcleos activos de RMN presentes en el agente de T_1 alto, es decir, núcleos con espín nuclear distinto de cero, preferiblemente núcleos de ^{13}C o ^{15}N . Con la potenciación de la polarización nuclear de núcleos activos de RMN, la diferencia en la población entre estados de espín nuclear excitado y fundamental de estos núcleos aumenta significativamente y de ese modo la intensidad de la señal de RM se amplifica en un factor de cien y más. Cuando se usa un agente de T_1 alto enriquecido en ^{13}C y/o ^{15}N hiperpolarizado, no habrá esencialmente interferencias de las señales de fondo ya que la abundancia natural de ^{13}C y/o ^{15}N es insignificante y por tanto el contraste de imágenes será ventajosamente alto. Se dan a conocer una variedad de posibles agentes de T_1 alto adecuados para hiperpolarización y posterior uso como agentes de obtención de imágenes por RM incluyendo pero sin limitarse a compuestos endógenos y no endógenos tales como acetato, piruvato, oxalato o gluconato, azúcares tales como glucosa o fructosa, urea, amidas, aminoácidos tales como glutamato, glicina, cisteína o aspartato, nucleótidos, vitaminas tales como ácido ascórbico, derivados de penicilina y sulfonamidas. Se establece además que productos intermedios en ciclos metabólicos normales tales como el ciclo del ácido cítrico como ácido fumárico y ácido pirúvico son agentes de obtención de imágenes preferidos para la obtención de imágenes de la actividad metabólica.

Tiene que recalcar que la señal de un agente de obtención de imágenes hiperpolarizado decae debido a la relajación y (tras la administración al cuerpo de un paciente) dilución. Por tanto, el valor de T_1 de los agentes de obtención de imágenes en fluidos biológicos (por ejemplo sangre) debe ser lo suficientemente alto como para permitir que el agente se distribuya al sitio diana en el cuerpo del paciente en un estado altamente hiperpolarizado.

- 35 Hemos encontrado ahora sorprendentemente que puede usarse ^{13}C -piruvato hiperpolarizado como agente de obtención de imágenes para evaluar la viabilidad de tejido miocárdico. Las amplitudes de las señales de RM que surgen de los diferentes metabolitos del piruvato varían dependiendo del estado metabólico del tejido miocárdico. Por tanto, el patrón de picos metabólicos único formado por estos metabolitos puede usarse como huella para el estado metabólico del tejido cardíaco en examen y por tanto permite la distinción entre tejido miocárdico viable y no viable. Esto hace que el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado sea un agente excelente para la obtención de imágenes por RM *in vivo* para evaluar la viabilidad de tejido miocárdico, por ejemplo identificando "tejido en riesgo" tras isquemia miocárdica o ataques al corazón. Esta información que va más allá de la evaluación de la perfusión o identificación de tejido miocárdico muerto es importante para que un médico comience un tratamiento adecuado de un paciente para prevenir daño adicional del miocardio.

- 45 Por tanto, la presente invención se refiere a la "reivindicación 1".

- ^{13}C -piruvato tiene un perfil de seguridad excelente y, como compuesto endógeno, se tolera bien por el cuerpo humano. El uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en el método de la invención permite obtener resultados inmediatos ya que no se requiere retraso entre la administración y el procedimiento de obtención de imágenes por RM. Esto significa que el paciente puede someterse a tratamiento lo antes posible, aumentando por tanto las posibilidades de supervivencia y recuperación. No es necesario un régimen de estrés en el método de la invención, lo que es un beneficio adicional para los pacientes.

- 55 La hiperpolarización de núcleos de ^{13}C activos de RMN puede lograrse mediante diferentes métodos (por ejemplo descritos en el documento WO-A-99/35508), métodos preferidos son transferencia de polarización desde un gas noble, "fuerza bruta", refrigeración de espín, el método de parahidrógeno y DNP. Para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, se prefiere o bien polarizar ^{13}C -piruvato directamente o bien polarizar ^{13}C -ácido pirúvico y convertir el ^{13}C -ácido pirúvico polarizado en ^{13}C -piruvato polarizado, por ejemplo mediante neutralización con una base.

Un modo preferido para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es la transferencia de polarización desde un gas noble hiperpolarizado. Pueden hiperpolarizarse gases nobles que tienen un espín nuclear distinto de cero, es decir,

potenciarse su polarización con respecto a la polarización en equilibrio, por ejemplo mediante el uso de luz polarizada circularmente. Puede usarse un gas noble hiperpolarizado, preferiblemente ^3He o ^{129}Xe , o una mezcla de tales gases, para realizar la hiperpolarización de núcleos de ^{13}C . La hiperpolarización también puede lograrse usando un gas noble hiperpolarizado enriquecido isotópicamente, preferiblemente ^3He o ^{129}Xe . El gas hiperpolarizado puede estar en la fase de gas, puede disolverse en un líquido/disolvente o el propio gas hiperpolarizado puede servir como disolvente. Alternativamente, el gas puede condensarse sobre una superficie sólida enfriada y usarse en esta forma, o dejarse que se sublime. Se prefiere el mezclado íntimo del gas hiperpolarizado con el compuesto que va a polarizarse. Por tanto, si se polariza ^{13}C -ácido pirúvico, que es un líquido a temperatura ambiente, el gas hiperpolarizado se disuelve preferiblemente en un líquido/disolvente o sirve como disolvente. Si se polariza ^{13}C -piruvato, el gas hiperpolarizado se disuelve preferiblemente en un líquido/disolvente, que también disuelve el piruvato.

Otro modo preferido para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es que la polarización se confiera a núcleos activos de RMN por equilibrado termodinámico a muy baja temperatura y alto campo. La hiperpolarización en comparación con el campo de funcionamiento y la temperatura del espectrómetro de RMN se realiza mediante el uso de un campo muy alto y una temperatura muy baja (fuerza bruta). La fuerza del campo magnético usado debe ser tan alta como sea posible, adecuadamente superior a 1 T, preferiblemente superior a 5 T, más preferiblemente 15 T o más y de manera especialmente preferible 20 T o más. La temperatura debe ser muy baja, por ejemplo de 4,2 K o menos, preferiblemente 1,5 K o menos, más preferiblemente 1,0 K o menos, de manera especialmente preferible 100 mK o menos.

Otro modo preferido para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado es el método de refrigeración de espín. Este método cubre la polarización de espín de un sistema o compuesto sólido mediante polarización por refrigeración de espín. El sistema se dopa o se mezcla íntimamente con materiales paramagnéticos adecuados tales como iones Ni^{2+} , lantánidos o actínidos en forma de cristal con un eje de simetría de orden tres o más. La instrumentación es más sencilla que la requerida para DNP sin necesidad de un campo magnético uniforme puesto que no se aplica un campo de excitación de resonancia. El procedimiento se lleva a cabo rotando físicamente la muestra alrededor de un eje perpendicular a la dirección del campo magnético. El requisito previo de este método es que la especie paramagnética tenga un factor g altamente anisotrópico. Como resultado de la rotación de la muestra, la resonancia paramagnética electrónica se pondrá en contacto con los espines nucleares, conduciendo a una disminución en la temperatura del espín nuclear. La rotación de la muestra se lleva a cabo hasta que la polarización del espín nuclear ha alcanzado un nuevo equilibrio.

En un modo más preferido, se usa el método de DNP (polarización nuclear dinámica) para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. La polarización se realiza mediante un compuesto paramagnético, el denominado agente paramagnético o agente de DNP. Durante el procedimiento de DNP, se proporciona energía, normalmente en forma de radiación de microondas, que inicialmente excitará al agente paramagnético. Tras el decaimiento hasta el estado fundamental, hay una transferencia de polarización desde el electrón desapareado del agente paramagnético hasta los núcleos activos de RMN 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. Alternativamente, puede emplearse un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se logre suficiente potenciación de la polarización. La técnica de DNP se describe por ejemplo en el documento WO-A-98/58272 y en el documento WO-A-01/96895. Para obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado mediante el método de DNP, puede usarse o bien ^{13}C -piruvato y/o bien ^{13}C -ácido pirúvico como el compuesto que va a polarizarse.

Si se usa ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato depende principalmente del agente paramagnético empleado en el procedimiento de DNP. Si el agente paramagnético es soluble en ^{13}C -ácido pirúvico, entonces se usa preferiblemente ^{13}C -ácido pirúvico y se forma una mezcla líquida, preferiblemente una disolución líquida, mediante el agente paramagnético y ^{13}C -ácido pirúvico. Si el agente paramagnético no es soluble en ^{13}C -ácido pirúvico, entonces se usan ^{13}C -piruvato y/o ^{13}C -ácido pirúvico y al menos un codisolvente para formar una mezcla líquida, preferiblemente una disolución líquida. Se ha encontrado que el éxito de la DNP y por tanto el nivel de polarización depende del compuesto que va a polarizarse y del agente paramagnético que están en contacto íntimo entre sí. Por tanto, el codisolvente es preferiblemente un codisolvente o mezcla de codisolventes que disuelve tanto el agente paramagnético como ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato. Para ^{13}C -piruvato, se usa preferiblemente agua como codisolvente.

Además, se ha encontrado que se logran niveles de polarización superiores mediante el método de DNP cuando la mezcla de muestra tras enfriamiento/congelación forma un vidrio en vez de una muestra cristalizada. De nuevo, la formación de un vidrio permite un contacto más íntimo del agente paramagnético y el compuesto que va a polarizarse. El ^{13}C -ácido pirúvico es un buen formador de vidrio y por tanto se usa preferiblemente en el procedimiento de DNP, siempre que el agente paramagnético sea soluble en ^{13}C -ácido pirúvico. El ^{13}C -piruvato es una sal y una mezcla líquida de una disolución acuosa de ^{13}C -piruvato y un agente paramagnético dará como resultado una muestra cristalizada tras congelar. Para evitar esto, se prefiere añadir codisolventes adicionales que sean buenos formadores de vidrio tales como glicerol, propanodiol o glicol.

Por tanto, puede disolverse ^{13}C -piruvato en agua para obtener una disolución acuosa y se añaden un agente

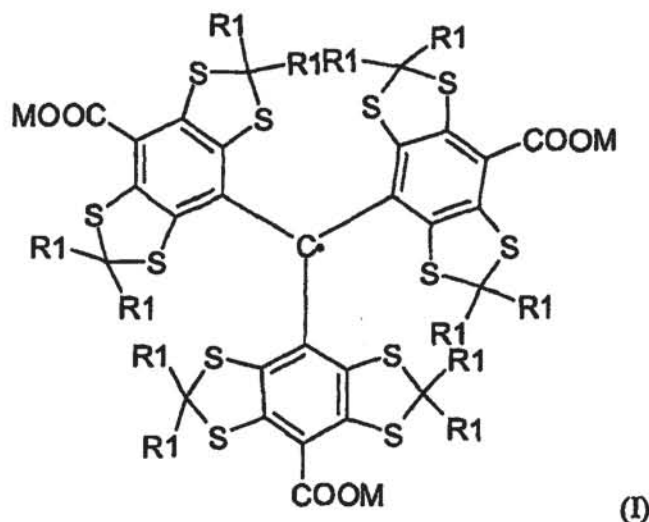
paramagnético, glicerol y opcionalmente un codisolvente adicional para formar una mezcla líquida. En un modo preferido, se combinan ^{13}C -ácido pirúvico, un agente paramagnético y un codisolvente para formar una mezcla líquida. En el modo más preferido, se combinan ^{13}C -ácido pirúvico y un agente paramagnético para formar una mezcla líquida. El mezclado íntimo de los compuestos puede lograrse por varios medios conocidos en la técnica, tales como agitación, agitación con vórtex o sonificación.

Entonces se congela la mezcla líquida antes de que se lleve a cabo el procedimiento de DNP. El enfriamiento/congelación de la mezcla líquida puede lograrse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo congelando la mezcla líquida en nitrógeno líquido o simplemente colocándola en el polarizador, en el que helio líquido congelará la muestra.

Tal como se describió anteriormente, la polarización nuclear dinámica (DNP) es un método de polarización en el que la polarización del compuesto que va a polarizarse se realiza mediante un agente de DNP, es decir, un agente/compuesto paramagnético.

Pueden usarse muchos agentes paramagnéticos conocidos como agentes de DNP, por ejemplo metales de transición tales como iones cromo (V), radicales libres orgánicos tales como radicales nítrógeno, radicales tritilo o partículas magnéticas. Tales agentes de DNP 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.

En un modo preferido, se usa un radical tritilo de fórmula (I)



en la que

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

R1 que es igual o diferente representa un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente hidroxilado ramificado o de cadena lineal o un grupo $-(\text{CH}_2)_n\text{-X-R}_2$, en el que n es 1, 2 ó 3; X es O o S y R2 es un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ opcionalmente hidroxilado, ramificado o de cadena lineal

como agente paramagnético para obtener ^{13}C -piruvato mediante el método de DNP.

En un modo preferido, M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable. El término "catión fisiológicamente tolerable" indica un catión que se tolera por el cuerpo vivo de ser humano o de animal no humano. Preferiblemente, M representa hidrógeno o un catión alcalino, un ión amonio o un ión amina orgánica, por ejemplo meglumina. Lo más preferiblemente, M representa hidrógeno o sodio.

En un modo preferido adicional, R1 es igual o diferente, preferiblemente igual y representa un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$ opcionalmente hidroxilado ramificado o de cadena lineal, lo más preferiblemente metilo, etilo, isopropilo, hidroximetilo o hidroxietilo.

En un modo preferido adicional, R1 es igual o diferente, preferiblemente igual y representa $-\text{CH}_2\text{-O}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_3)$, $-(\text{CH}_2)_2\text{-O-CH}_3$, $-(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_3)\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S}(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_3)$, $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-CH}_3$, $-(\text{alquilo } \text{C}_1\text{-C}_3)\text{-S-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-O-C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{-O-C}_2\text{H}_4\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-S-C}_2\text{H}_5$, $-\text{CH}_2\text{-S-C}_2\text{H}_4\text{OH}$ o $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$, lo más preferiblemente $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$.

En un modo más preferido, M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual y representa $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_3$.

Los radicales tritilo de fórmula (I) pueden sintetizarse tal como se describe en detalle en los documentos WO-A-

91/12024, WO-A-96/39367, WO 97/09633 y WO-A-98/39277. En resumen, los radicales pueden sintetizarse haciendo reaccionar tres equivalentes molares de un compuesto de arilo monomérico metalado con un equivalente molar de un derivado de ácido carboxílico adecuadamente protegido para formar un producto intermedio trimérico. Este producto intermedio se metala y posteriormente se hace reaccionar con, por ejemplo, dióxido de carbono para dar como resultado un carbinol de tritilo tricarbólico que, en una etapa adicional, se trata con un ácido fuerte para generar un catión de triarilmetilo. Entonces se reduce este catión para formar el radical tritilo estable.

Una mezcla líquida que comprende ^{13}C -piruvato y/o ^{13}C -ácido pirúvico y opcionalmente un disolvente contiene preferiblemente radicales tritilo de fórmula (I) de 5 a 100 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, de manera especialmente preferible de 12 a 18 mM y lo más preferiblemente de 13 a 17 mM. Se ha encontrado que el tiempo de acumulación para la polarización en el procedimiento de DNP es más corto usando cantidades superiores de radical, sin embargo, el nivel de polarización que puede lograrse es inferior. Por tanto, estos dos efectos tienen que equilibrarse uno con otro.

La técnica de DNP se describe por ejemplo en el documento WO-A-98/58272 y en el documento 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. Alternativamente, puede emplearse un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se logre suficiente potenciación de la polarización. En una realización preferida del método de la invención, el procedimiento de DNP se lleva a cabo en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. Se describen unidades de polarización adecuadas por ejemplo en el documento WO-A-02/37132. En una realización preferida, la unidad de polarización comprende un criostato y medios de polarización, por ejemplo una cámara de microondas conectada mediante una guía de ondas a una fuente de microondas en un orificio central rodeado por medios que producen un campo magnético tales como un imán superconductor. El orificio se extiende verticalmente hacia abajo hasta al menos el nivel de una región P próxima al imán superconductor en la que la fuerza del campo magnético es suficientemente alta, por ejemplo entre 1 y 25 T, para que tenga lugar la polarización de los núcleos de ^{13}C . Preferiblemente el orificio de la muestra puede sellarse y puede evacuarse a bajas presiones, por ejemplo presiones del orden de 1 mbar o menos. Puede estar contenido un medio de introducción de muestras (es decir, la mezcla que comprende el agente paramagnético y ^{13}C -piruvato y/o ^{13}C -ácido pirúvico) tal como un tubo de transporte de muestras extraíble en el interior del orificio y este tubo puede insertarse desde la parte superior del orificio hacia abajo hasta una posición en el interior de la cámara de microondas en la región P. La región P se enfría mediante helio líquido hasta una temperatura suficientemente baja como para que tenga lugar la polarización, preferiblemente temperaturas del orden de 0,1 a 100 K, más preferiblemente de 0,5 a 10 K, lo más preferiblemente de 1 a 5 K. Preferiblemente, el medio de introducción de muestras puede sellarse en su extremo superior de cualquier modo adecuado para retener el vacío parcial en el orificio. Un recipiente de retención de muestras, tal como una cubeta de retención de muestras, puede ajustarse de manera extraíble en el interior del extremo inferior del medio de introducción de muestras. El recipiente de retención de muestras está hecho preferiblemente de un material liviano con una baja capacidad calorífica específica y buenas propiedades criogénicas tal como, por ejemplo Kelf (policlorotrifluoroetileno) o PEEK (polieteretercetona). El recipiente de muestras puede contener una o más muestras que van a polarizarse.

La muestra se inserta en el recipiente de retención de muestras, se sumerge en el helio líquido y se irradia con microondas, preferiblemente a una frecuencia de aproximadamente 94 GHz a 200 mW. El nivel de polarización puede monitorizarse adquiriendo las señales de ^{13}C -RMN de estado sólido de la muestra durante la irradiación con microondas, por tanto se prefiere el uso de un medio que contiene una unidad de polarización para adquirir los espectros de ^{13}C -RMN de estado sólido en la etapa b). Generalmente, se obtiene una curva de saturación en un gráfico que muestra la señal de ^{13}C -RMN frente al tiempo. Por tanto, es posible determinar cuándo se alcanza el nivel de polarización óptimo.

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

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

Cuando se usa ^{13}C -ácido pirúvico como compuesto que va a polarizarse, la disolución también abarca la conversión de ^{13}C -ácido pirúvico en ^{13}C -piruvato. Para lograr esto, se hace reaccionar ^{13}C -ácido pirúvico con una base. Puede hacerse reaccionar ^{13}C -ácido pirúvico con una base para convertirlo en ^{13}C -piruvato y posteriormente se añade un tampón. En otro modo preferido, se combinan el tampón y la base en una disolución y se añade esta disolución a

¹³C-ácido pirúvico, disolviéndolo y convirtiéndolo en ¹³C-piruvato al mismo tiempo. En un modo preferido, la base es una disolución acuosa de NaOH, Na₂CO₃ o NaHCO₃, lo más preferido la base es NaOH. En un modo particularmente preferido, se usa una disolución de tampón TRIS que contiene NaOH para disolver ¹³C-ácido pirúvico y convertirlo en la sal de sodio de ¹³C-piruvato.

- 5 En otro modo preferido, el tampón o, cuando sea aplicable, la disolución de tampón/base combinados comprende además uno o más compuestos que pueden unirse a, o complejar, iones paramagnéticos libres, por ejemplo agentes quelantes tales como DTPA o EDTA. Se ha encontrado que iones paramagnéticos libres pueden provocar el acortamiento del T₁ del compuesto hiperpolarizado, lo que preferiblemente se evita.

- 10 La disolución puede llevarse a cabo preferiblemente usando los métodos y/o dispositivos dados a conocer en el documento WO-A-02/37132. Si la hiperpolarización se llevó a cabo mediante el método de DNP, puede usarse una unidad de disolución que o bien está físicamente separada del polarizador o bien es una parte de un aparato que contiene el polarizador y la unidad de disolución. En un modo preferido, la disolución se lleva a cabo a un campo magnético elevado para mejorar la relajación y retener un máximo de la hiperpolarización. Deben evitarse nodos de campo y un campo bajo puede conducir a una relajación potenciada a pesar de las medidas anteriores.

- 15 Si la hiperpolarización se lleva a cabo mediante el método de DNP, el agente paramagnético y/o los productos de reacción del mismo se eliminan preferiblemente de la disolución que contiene ¹³C-piruvato. El agente paramagnético y/o los productos de reacción pueden eliminarse parcialmente, de manera sustancial o idealmente de forma completa, se prefiere la eliminación completa. Los productos de reacción por ejemplo de radicales tritilo de fórmula (I) pueden ser ésteres que pueden formarse tras la reacción de ácido pirúvico con radicales de fórmula (I) que comprenden grupos hidroxilo. En la técnica se conocen métodos que pueden usarse para eliminar el agente
20 paramagnético y/o los productos de reacción del mismo. Generalmente, los métodos aplicables dependen de la naturaleza del agente paramagnético y/o sus productos de reacción. Con la disolución de la muestra sólida tras la polarización, el radical puede precipitar y puede separarse fácilmente de la composición líquida mediante filtración. Si se usan partículas magnéticas como agentes paramagnéticos, estas partículas también se eliminan fácilmente
25 mediante filtración. Si no se produce precipitación, el agente paramagnético puede eliminarse mediante técnicas de separación cromatográficas, por ejemplo cromatografía de fase líquida tal como cromatografía de intercambio iónico o en fase inversa o mediante extracción.

- Ya que los radicales tritilo de fórmula (I) tienen un espectro de absorción UV/visible característico, es posible usar la medición de la absorción UV/visible como método para comprobar su existencia en la composición líquida tras su
30 eliminación. Con el fin de obtener resultados cuantitativos, es decir, la concentración del radical presente en la muestra hiperpolarizada disuelta, el espectrómetro óptico puede calibrarse de manera que la absorción a una longitud de onda específica a partir de una muestra proporcione la concentración de radical correspondiente en la muestra.

- El enriquecimiento isotópico del ¹³C-piruvato usado en el método de la invención, y/o el ¹³C-ácido pirúvico que se
35 usa preferiblemente para obtener ¹³C-piruvato hiperpolarizado mediante el método de DNP, es preferiblemente de al menos el 75%, más preferiblemente de al menos el 80% y de manera especialmente preferible de al menos el 90%, siendo lo más preferido un enriquecimiento isotópico de más del 90%. Idealmente, el enriquecimiento es del 100%. Pueden enriquecerse isotópicamente ¹³C-ácido pirúvico y/o ¹³C-piruvato en la posición C1 (a continuación indicado ¹³C₁-ácido pirúvico y ¹³C₁-piruvato), en la posición C2 (a continuación indicado ¹³C₂-ácido pirúvico y ¹³C₂-piruvato),
40 en la posición C3 (a continuación indicado ¹³C₃-ácido pirúvico y ¹³C₃-piruvato), en la posición C1 y la posición C2 (a continuación indicado ¹³C_{1,2}-ácido pirúvico y ¹³C_{1,2}-piruvato), en la posición C1 y la posición C3 (a continuación indicado ¹³C_{1,3}-ácido pirúvico y ¹³C_{1,3}-piruvato), en la posición C2 y la posición C3 (a continuación indicado ¹³C_{2,3}-ácido pirúvico y ¹³C_{2,3}-piruvato) o en la posición C1, C2 y C3 (a continuación indicado ¹³C_{1,2,3}-ácido pirúvico y ¹³C_{1,2,3}-piruvato); siendo la posición C1 la preferida.

- 45 En la técnica se conocen varios métodos para la síntesis de ¹³C₁-ácido pirúvico y ¹³C₁-piruvato. En resumen, Seebach *et al.*, Journal of Organic Chemistry 40(2), 1975, 231-237 describen una ruta sintética que se basa en la protección y activación de un material de partida que contiene carbonilo tal como un S,S-acetal, por ejemplo 1,3-ditiano o 2-metil-1,3-ditiano. El ditiano se metala y se hace reaccionar con un compuesto que contiene metilo y/o ¹³CO₂. Usando el componente de ¹³C isotópicamente enriquecido apropiado tal como se explica resumidamente en
50 esta referencia, es posible obtener ¹³C₁-piruvato, ¹³C₂-piruvato o ¹³C_{1,2}-piruvato. Posteriormente se libera la función carbonilo mediante el uso de métodos convencionales descritos en la bibliografía. Una ruta sintética diferente comienza a partir de ácido acético, que se convierte en primer lugar en bromuro de acetilo y entonces se hace reaccionar con Cu¹³CN. Se convierte el nitrilo obtenido en ácido pirúvico a través de la amida (véase por ejemplo S.H. Anker *et al.*, J. Biol. Chem. 176 (1948), 1333 o J. E. Thirkettle, Chem Commun. (1997), 1025). Además, puede
55 obtenerse ¹³C-ácido pirúvico protonando ¹³C-piruvato de sodio disponible comercialmente, por ejemplo mediante el método descrito en la patente estadounidense 6.232.497.

- Para usarse en el método de la invención, el ¹³C-piruvato hiperpolarizado se proporciona como una composición que es adecuada para su administración a un cuerpo vivo de ser humano o de animal no humano. La composición
60 comprende preferiblemente un tampón o una mezcla de tampones tal como se describió anteriormente. La composición puede comprender además portadores, excipientes y adyuvantes de formulación farmacéuticamente

aceptables convencionales. Por tanto, la composición puede incluir por ejemplo estabilizadores, agentes de ajuste de la osmolalidad, agentes solubilizantes y similares.

El piruvato es un compuesto endógeno que se tolera muy bien por el cuerpo humano, incluso en altas concentraciones. Como precursor en el ciclo del ácido cítrico, el piruvato desempeña un papel metabólico importante en el cuerpo humano. El piruvato se convierte en diferentes compuestos: su transaminación da como resultado alanina, mediante descarboxilación oxidativa, el piruvato se convierte en acetil-CoA y bicarbonato, la reducción del piruvato da como resultado lactato y su carboxilación oxaloacetato.

Se ha encontrado ahora que la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado (sólo en el caso de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato o $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -piruvato) y ^{13}C -alanina hiperpolarizada puede usarse para la distinción entre tejido miocárdico viable y no viable usando obtención de imágenes por RM *in vivo*. Esto es sorprendente ya que hay que tener en cuenta que el T_1 de los compuestos hiperpolarizados decae debido a relajación y dilución. El ^{13}C -piruvato tiene una relajación T_1 en sangre humana completa a 37°C de aproximadamente 42 s, sin embargo, se ha encontrado que la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es lo suficientemente rápida como para permitir la detección de la señal del compuesto ^{13}C -piruvato original y sus metabolitos. La cantidad de alanina, bicarbonato y lactato depende del estado metabólico del tejido miocárdico en 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 queda en el momento de la detección, por tanto monitorizando la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es posible estudiar procesos metabólicos *in vivo* en el tejido cardíaco de animal no humano o de ser humano usando obtención de imágenes por RM no invasiva.

A continuación, los términos " ^{13}C -piruvato hiperpolarizado", " ^{13}C -piruvato" y "piruvato" se usan de manera intercambiable. Lo mismo se aplica a los términos " ^{13}C -lactato hiperpolarizado", " ^{13}C -lactato" y "lactato"; " ^{13}C -alanina hiperpolarizada", " ^{13}C -alanina" y "alanina"; " ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado", " ^{13}C -bicarbonato" y "bicarbonato" y " ^{13}C -metabolito(s) hiperpolarizado(s)", " ^{13}C -metabolito(s)" y "metabolito(s)".

Se ha encontrado que las amplitudes de las señales de RM que surgen de los diferentes metabolitos de piruvato varían dependiendo del estado metabólico del tejido miocárdico. Por tanto, puede usarse el patrón de picos metabólicos único formado por alanina, lactato, bicarbonato y piruvato como huella para el estado metabólico del tejido cardíaco en examen y por tanto permite la distinción entre tejido miocárdico viable, no viable y en riesgo. Esto hace que una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado sea un agente excelente para la obtención de imágenes por RM *in vivo* para evaluar la viabilidad del tejido miocárdico. Determinar la viabilidad del tejido miocárdico es por supuesto importante tras isquemia miocárdica o ataques cardíacos pero también en pacientes con por ejemplo diabetes y síndrome metabólico, ambas enfermedades en las que pueden producirse daños en el tejido miocárdico.

Ya que la arteriopatía coronaria (CAD) tiene una variedad de presentaciones clínicas, que oscilan entre angina estable y muerte súbita, es de beneficio inmediato un método de diagnóstico que notifique sobre el estado de viabilidad de las células. Entre los dos estados más "extremos" (células viables normales y células muertas), existe una gama de diferentes estados en el tejido miocárdico isquémico al nivel celular que a su vez se manifiestan en dicha variedad de presentaciones clínicas. Es importante identificar estos diferentes estados en tejido miocárdico isquémico, también denominado "tejido miocárdico en riesgo", es decir, tejido que si la isquemia se prolonga dejándola sin tratar se volverá necrótico, para proporcionar al paciente el tratamiento apropiado para prevenir la necrosis.

Dos estados diferentes pero muy graves de un corazón isquémico son hibernación y aturdimiento. La hibernación es un estado isquémico crónico en el que se reduce el flujo de sangre al miocardio y también se reduce la función del corazón. Normalmente, las células del miocardio oxidan principalmente ácidos grasos. En células en hibernación, hay un aumento de la captación de glucosa (conocido de estudios de FDG-PET), lo que sugiere que el piruvato será un sustrato preferido para estas células. El miocardio aturdido tiene por otro lado una isquemia aguda (por ejemplo una oclusión coronaria importante) en la que el flujo de sangre es normal pero la función disminuye. Esto debe dar como resultado una baja concentración de lactato debido a la actividad metabólica relativamente baja. Se ha encontrado que usando el método de la invención puede identificarse tejido miocárdico en riesgo debido a que tiene una señal de ^{13}C -bicarbonato baja y/o una señal de ^{13}C -lactato alta.

La isquemia puede producir diversos grados de disfunción miocárdica, y si es grave y prolongada, conducirá a necrosis de las células. En este último caso, las células están muertas y no tiene lugar metabolismo en absoluto, por ejemplo, tras la administración de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, sólo se espera esta señal mientras que no están presentes señales de posibles metabolitos en una imagen y/o espectro de ^{13}C .

Generalmente, el sujeto en examen, por ejemplo un paciente o un animal, se coloca en el imán de RM. Se colocan bobinas de RF de ^{13}C -RM especializadas para cubrir el área de interés.

Un medio de obtención de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato y uno o más portadores, excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales se administra por vía parenteral, preferiblemente por vía intravenosa o por vía intraarterial. También es posible la administración directa al corazón, por ejemplo inyectando el medio de obtención de imágenes mediante un catéter colocado en las arterias coronarias. La dosificación y concentración del medio de obtención de imágenes dependerá de una gama de factores tales como la toxicidad y la vía de administración. Generalmente, el medio de obtención de imágenes se administra en una concentración de hasta 1 mmol de piruvato por kg de peso corporal, preferiblemente de 0,01 a 0,5 mmol/kg, más preferiblemente de 0,1 a 0,3 mmol/kg. La velocidad de administración es preferiblemente inferior a 10 ml/s, más preferiblemente inferior a 6 ml/min. y lo más preferible de desde 5 ml/s hasta 0,1 ml/s. A menos de 400 s tras la administración, preferiblemente menos de 120 s, más preferiblemente menos de 60 s tras la administración, de manera especialmente preferible de 20 a 50 s tras la administración y lo más preferiblemente de 30 a 40 s tras la administración, se aplica una secuencia de obtención de imágenes por RM que codifica el volumen de interés de una manera selectiva para espacio y frecuencia combinada. Esto da como resultado imágenes metabólicas de ^{13}C -lactato, ^{13}C -alanina, ^{13}C -bicarbonato y ^{13}C -piruvato.

La codificación del volumen de interés puede lograrse usando las denominadas secuencias de obtención de imágenes espectroscópicas tal como se describe por ejemplo en T.R. Brown *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3523-3526 (1982); A. A. Maudsley, *et al.*, J. Magn. Res 51, 147-152 (1983). Los datos de imágenes espectroscópicas contienen varios elementos de volumen en los que cada elemento contiene un espectro de ^{13}C -RM completo. El ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos tienen todos su posición única en un espectro de ^{13}C -RM y puede usarse su frecuencia de resonancia para identificarlos. La integral del pico a su frecuencia de resonancia está vinculada directamente a la cantidad de ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos, respectivamente. Cuando se estima la cantidad de ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito usando rutinas de ajuste del dominio de tiempo tal como se describe por ejemplo en L. Vanhamme *et al.*, J Magn Reson 129, 35-43 (1997), pueden generarse imágenes para ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito en las que una codificación de color o codificación de grises es representativa de la cantidad de ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito medida.

Aunque los métodos de obtención de imágenes espectroscópicas han demostrado su valor en la producción de imágenes metabólicas usando toda clase de núcleos de RM, por ejemplo ^1H , ^{31}P , ^{23}Na , la cantidad de repeticiones necesarias para codificar completamente la imagen espectroscópica hace que este enfoque sea menos adecuado para ^{13}C hiperpolarizado. Debe tenerse cuidado para garantizar que esté disponible la señal de ^{13}C hiperpolarizado durante toda la adquisición de datos de RM. A expensas de una señal reducida con respecto al ruido, esto puede lograrse reduciendo el ángulo de pulso de RF que se aplica en cada etapa de codificación de fases. Tamaños de matriz superiores requieren más etapas de codificación de fases y tiempos de exploración más largos.

Los métodos de obtención de imágenes basados en el trabajo pionero de P. C. Lauterbur (Nature, 242, 190-191, (1973) y P. Mansfield (J. Phys. C. 6, L422-L426 (1973)), que implican aplicar un gradiente de lectura durante la adquisición de datos, permitirán imágenes de señal superior con respecto a ruido o las imágenes equivalentes de resolución espacial superior. Sin embargo, estos métodos de obtención de imágenes en su forma básica no podrán producir imágenes separadas para ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos sino una imagen que contiene las señales de ^{13}C -piruvato y todos sus ^{13}C -metabolitos, es decir, no es posible la identificación de metabolitos específicos.

En una realización preferida, se usan secuencias de obtención de imágenes que hacen uso de múltiples ecos para codificar la información de frecuencia. Se describen por ejemplo secuencias que pueden producir imágenes de ^1H de agua y grasa separadas en G. Glover, J Magn Reson Imaging 1991;1:521-530 y S. B. Reeder *et al.*, MRM 51 35-45 (2004). Puesto que se conocen los metabolitos que van a detectarse y como tales se conocen sus frecuencias de RM, puede aplicarse el enfoque comentado en las referencias anteriores para adquirir imágenes directas de ^{13}C -piruvato, ^{13}C -alanina, ^{13}C -lactato y ^{13}C -bicarbonato. Este procedimiento hace un uso más eficaz de la señal de ^{13}C -RM hiperpolarizado, dando una mejor calidad de señal en comparación con la obtención de imágenes espectroscópicas, una resolución espacial superior y tiempos de adquisición más rápidos.

Tal como se describió anteriormente, el tejido cardíaco viable se caracteriza por una alta actividad metabólica. Tras la isquemia, es decir, la disminución del flujo de sangre al tejido, las células tienen un suministro inadecuado de oxígeno y los procesos metabólicos a nivel celular disminuyen. Sorprendentemente, es posible hacer que este cambio en el metabolismo sea visible dentro de la corta ventana temporal de obtención de imágenes por RM usando ^{13}C -piruvato hiperpolarizado. Cambios especialmente significativos en la señal de ^{13}C -lactato y ^{13}C -bicarbonato en el tejido miocárdico, que dependen del estado metabólico de las células individuales, permiten la evaluación de la viabilidad de las células del miocardio.

Por tanto, en una realización preferida, el método según la invención comprende

- (a) adquirir imágenes de ^{13}C -RM directas de ^{13}C -piruvato y sus metabolitos que contienen ^{13}C alanina, lactato y bicarbonato a partir de un sujeto al que se le administra previamente un medio de obtención de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, y
- (b) opcionalmente correlacionar la señal de ^{13}C de un metabolito con la señal de ^{13}C de cualquier otro metabolito detectado para obtener un contraste basado en la diferencia en la intensidad de señal de dos, preferiblemente tres, lo más preferiblemente cuatro ^{13}C -metabolitos;

en el que el tejido miocárdico en riesgo en dichas imágenes de ^{13}C se indica mediante la señal de ^{13}C -bicarbonato más baja y/o la señal de ^{13}C -lactato más alta.

Por tanto, en una realización preferida adicional, el método según la invención comprende

- 5 (a) adquirir imágenes de ^{13}C -RM directas de ^{13}C -piruvato y sus metabolitos que contienen ^{13}C alanina, lactato y bicarbonato a partir de un sujeto al que se le administra previamente un medio de obtención de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, y
- (b) opcionalmente correlacionar la señal de ^{13}C de un metabolito con la señal de ^{13}C de cualquier otro metabolito detectado para obtener un contraste basado en la diferencia en la intensidad de señal de dos, preferiblemente tres, lo más preferiblemente cuatro ^{13}C -metabolitos; y
- 10 (c) identificar tejido miocárdico en riesgo en dichas imágenes identificando la señal de ^{13}C -bicarbonato más baja y/o la señal de ^{13}C -lactato más alta.

Para corregir la señal de piruvato, se normalizan las imágenes tanto de metabolitos (lactato, alanina y bicarbonato) como de piruvato al valor máximo en cada imagen individual. En segundo lugar, se multiplica la imagen de lactato normalizada por la imagen de piruvato invertida, por ejemplo la señal de piruvato máxima en la imagen menos el nivel de piruvato para cada píxel. Como última etapa, se multiplica el resultado intermedio obtenido en la operación anterior por la imagen de lactato original.

Como ejemplo, para corregir la señal de bicarbonato, se normalizan las imágenes tanto de lactato como de bicarbonato al valor máximo en cada imagen individual. En segundo lugar, se multiplica la imagen de lactato normalizada por la imagen de bicarbonato invertida, por ejemplo la señal de bicarbonato máxima en la imagen menos el nivel de bicarbonato para cada píxel. Como última etapa, se multiplica el resultado intermedio obtenido en la operación anterior por la imagen de lactato original. De una manera similar, también puede incluirse en el análisis la señal de alanina y también puede usarse el hallazgo de una señal de bicarbonato baja junto con una señal de alanina sin cambios como indicación de tejido miocárdico en riesgo.

Para enfatizar regiones con metabolismo alterado, puede usarse cualquier combinación de señal de metabolito aumentada en relación con una señal de metabolito reducida en una operación similar a como se describió en el párrafo anterior, mediante lo cual se obtiene una imagen de metabolito ponderada. Sorprendentemente, la evaluación de la viabilidad del tejido miocárdico, es decir, la distinción entre tejido miocárdico viable, dañado y no viable también mejora mediante esta correlación.

Puede incluirse información anatómica y/o de perfusión en la evaluación de la viabilidad del tejido miocárdico según el método de la invención. Por ejemplo, puede obtenerse información anatómica adquiriendo una imagen de protón o ^{13}C -RM con o sin el empleo de un agente de contraste adecuado. La perfusión relativa en el miocardio puede determinarse usando un agente de contraste de RM tal como por ejemplo Omniscan™. Asimismo, se conocen en la técnica técnicas de obtención de imágenes por RM para la medición de la perfusión sin la administración de un agente de contraste. En una realización preferida, se usa un agente de contraste de ^{13}C hiperpolarizado no metabolizado para determinar la perfusión cuantitativa. Se describen técnicas y agentes de contraste adecuados por ejemplo en el documento WO-A-02/23209. En una realización más preferida, se usa ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para determinar la perfusión cuantitativa.

En otra realización preferida, el medio de obtención de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se administra repetidamente, permitiendo así estudios dinámicos. Esto es una ventaja adicional del método según la invención en comparación con otros métodos de obtención de imágenes cardíacas por RM que usan agentes a base de manganeso que, en dosis superiores, muestran efectos cardiotoxicos. Debido a la baja toxicidad del piruvato y su perfil de seguridad favorable, dosis repetidas de este compuesto se toleran bien por el paciente.

Los resultados obtenidos en el método de la invención permiten al médico elegir el tratamiento apropiado para el paciente en examen. En una realización preferida adicional, el método de la invención se usa para determinar si el tratamiento es satisfactorio.

También se notifica que el piruvato tiene efectos inotrópicos. Como tal, el compuesto puede usarse simultáneamente como agente terapéutico y de diagnóstico en el caso del miocardio aturdido en el que se supone que radicales libres de oxígeno desempeñan un papel.

Vista desde un aspecto adicional, la invención proporciona la reivindicación 1.

50 La fabricación de un medio de obtención de imágenes que contiene ^{13}C hiperpolarizado como agente de obtención de imágenes se describe en detalle en las páginas 6 a 8.

La fabricación y las realizaciones preferidas de la fabricación de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado a partir de ^{13}C -ácido pirúvico o ^{13}C -piruvato se describe en detalle en las páginas 3 a 6.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de 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

Se suspendieron 10 g (70 mmol) de sal de sodio de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(hidroxietil)benzo-[1,2-4,5']bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo que se había sintetizado según el ejemplo 7 del documento WO-A1-98/39277 en 280 ml de dimetilacetamida bajo una atmósfera de argón. Se añadió hidruro de sodio (2,75 g) seguido por yoduro de metilo (5,2 ml) y se dejó que avanzara la reacción que es ligeramente exotérmica durante 1 hora en un baño de agua a 34°C durante 60 min. Se repitió dos veces la adición de hidruro de sodio y yoduro de metilo con las mismas cantidades de cada uno de los compuestos y, tras la adición final, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 68 horas y entonces se vertió en 500 ml de agua. Se ajustó el pH a pH > 13 usando 40 ml de NaOH (ac.) 1 M y se agitó la mezcla a temperatura ambiental durante 15 horas para hidrolizar los ésteres metílicos formados. Se acidificó entonces la mezcla usando 50 ml de HCl (ac.) 2 M hasta un pH de aproximadamente 2 y se extrajo 3 veces el acetato de etilo (500 ml y 2 x 200 ml). Se secó la fase orgánica combinada sobre Na₂SO₄ y entonces se evaporó hasta sequedad. Se purificó el producto bruto (24 g) mediante HPLC preparativa usando acetonitrilo/agua como eluyentes. Se evaporaron las fracciones recogidas para eliminar el acetonitrilo. Se extrajo la fase acuosa restante con acetato de etilo y se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y entonces se evaporó hasta sequedad. Se añadió agua (200 ml) al residuo y se ajustó cuidadosamente el pH con NaOH (ac.) 0,1 M a 7, disolviéndose lentamente el residuo durante este procedimiento. Tras la neutralización, se liofilizó la disolución acuosa.

Ejemplo 2: Producción de una composición que comprende ¹³C-piruvato hiperpolarizado mediante el método de DNP usando ¹³C-ácido pirúvico y el radical tritilo del ejemplo 1

Se preparó una disolución 20 mM disolviendo 5,0 mg del radical del ejemplo 1 en ¹³C₁-ácido pirúvico (164 µl). Se mezcló la muestra hasta la homogeneidad y se colocó una alícuota de la disolución (41 mg) en una cubeta de muestras y se insertó en el polarizador de DNP.

Se polarizó la muestra en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T con irradiación con microondas (93,950 GHz). Tras 2 horas, se detuvo la polarización y se disolvió la muestra usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una disolución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) para proporcionar una disolución neutra de ¹³C₁-piruvato de sodio hiperpolarizado. Se analizó rápidamente la muestra disuelta con ¹³C-RMN para evaluar la polarización y se obtuvo una polarización de ¹³C del 19,0%.

Ejemplo 3: Producción de una composición que comprende ¹³C-piruvato hiperpolarizado mediante el método de DNP usando ¹³C-ácido pirúvico y el radical tritilo del ejemplo 1

Se preparó una disolución 15 mM disolviendo el radical del ejemplo 1 (209,1 mg) en una mezcla de ¹³C₁-ácido pirúvico (553 mg) y ácido pirúvico no marcado (10,505 g). Se mezcló la muestra hasta la homogeneidad y se colocó una alícuota de la disolución (2,015 g) en una cubeta de muestras y se insertó en el polarizador de DNP.

Se polarizó la muestra en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T con irradiación con microondas (93,950 GHz). Tras 4 horas, se detuvo la polarización y se disolvió la muestra usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una disolución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) para proporcionar una disolución neutra de ¹³C₁-piruvato de sodio hiperpolarizado con una concentración de piruvato total de 0,5 M en tampón TRIS 100 mM. Se conectó una columna cromatográfica en serie con el dispositivo de disolución. La columna consiste en un cartucho (D = 38 mm; h = 10 mm) que contiene material de empaquetamiento hidrófobo (Bondesil-C18, 40UM pieza n.º: 12213012) suministrado por Varian. Se forzó la muestra disuelta a través de la columna que absorbía selectivamente el radical. Se analizó rápidamente la disolución filtrada con ¹³C-RMN para evaluar la polarización, se obtuvo una polarización de ¹³C del 16,5%. Posteriormente se analizó la concentración de radical residual con un espectrofotómetro UV a 469 nm y se determinó que estaba por debajo del límite de detección de 0,1 µM.

Ejemplo 4: Producción de ¹³C-piruvato hiperpolarizado mediante el método de DNP usando ¹³C-ácido pirúvico y sal de sodio de tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metil-benzo[1,2-d:4,5-d']bis(1,3)ditiol-4-il)metilo

Se sintetizó la sal de sodio de tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metil-benzo[1,2-d:4,5-d']bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo tal como se describe en el ejemplo 29 en el documento WO-A-97/09633.

Se preparó una disolución 20 mM disolviendo la sal de sodio de tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxietoxi)metil-benzo[1,2-d:4,5-d']bis-(1,3)-ditiol-4-il)metilo en ¹³C₁-ácido pirúvico (83,1 mg). Se mezcló la muestra hasta la homogeneidad, se colocó en una cubeta de muestras y se insertó en el polarizador de DNP. Se polarizó la muestra en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T con irradiación con microondas (93,950 GHz). Se adquirió la señal de ¹³C-RMN de la muestra usando un espectrómetro de RMN Inova-200 de Varian. Se calculó la potenciación de DNP a partir de una medición de la señal de ¹³C-RMN en equilibrio térmico y la señal de RMN potenciada. Se obtuvo una polarización de ¹³C del 16%.

Ejemplo 5: Procedimiento de obtención de imágenes cardíacas según la invención

5.1 Preparación del cerdo

Se anestesió el cerdo (25 kg) usando un cóctel que contenía NaCl isotónico (al 26% en vol.), Ketalar (50 mg/ml) (Pfizer AB) (al 42% en vol.), Norcuron (10 mg + 5 ml de agua estéril) (Organon) (al 21% en vol.) y Midazolam (5 mg/ml) (Pharma Hameln) (al 11% en vol.) administrado usando una bomba de infusión a una velocidad de 0,6 ml/min.

- 5 Tras la primera inyección con $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, se retiró el cerdo del escáner de RM. Con orientación por rayos X, se insertó un catéter de balón en la arteria coronaria izquierda y se bloqueó la arteria circunfleja durante un periodo de 15 minutos. Durante toda la operación, se midieron el ECG y la tensión arterial. 90 minutos tras el final del periodo isquémico, se obtuvieron de nuevo imágenes del cerdo y se adquirieron imágenes de ^{13}C de (aproximadamente) la misma ubicación en la que se llevó a cabo la medición control.

10 5.2 Obtención de imágenes por RM de protón

Se colocó el cerdo en una bobina de RM para cerdos (Rapid Biomedical, Alemania) y se obtuvieron imágenes usando una biblioteca de secuencias de obtención de imágenes por RM de protón cardíacas clínicas convencional para conseguir información anatómica y para conseguir la orientación de vista de eje corto del miocardio (véase la imagen de referencia de protón en las figuras para observar un ejemplo de vista de eje corto).

15 5.3 Obtención de imágenes de ^{13}C -RM

Basándose en la frecuencia de protón hallada mediante el sistema de RM, se calculó la frecuencia de RM para $^{13}\text{C}_1$ -alanina según la siguiente ecuación:

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

- 20 La frecuencia calculada colocó la señal de RM que surge de $^{13}\text{C}_1$ -alanina en resonancia con $^{13}\text{C}_1$ -lactato a la izquierda y resonando $^{13}\text{C}_1$ -piruvato y $^{13}\text{C}_1$ -bicarbonato a la derecha de $^{13}\text{C}_1$ -alanina. Se ejecutó una secuencia de espectroscopia de RM no localizada para garantizar que la bobina de ^{13}C -RM y la frecuencia de RM del sistema se habían establecido correctamente. Se colocó la ubicación de la imagen de ^{13}C para cubrir el miocardio (vista de eje corto) (grosor de corte de 20 mm, tamaño de píxel en plano de $7,5 \times 7,5 \text{ mm}^2$). En la fase de reconstrucción, se rellenan con ceros los datos de imágenes dando como resultado una resolución de $3,75 \times 3,75 \times 20 \text{ mm}^3$. Se inyectaron 16 ml de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato (327 mM) (0,22 mmol/kg) durante un periodo de 12 s (1,3 ml/s) por vía i.v. en la pata frontal y 30 s tras el inicio de la inyección (es decir, 18 s tras acabar la inyección), se inició la secuencia de ^{13}C -RM de desplazamiento químico.

5.4 Análisis de los datos de obtención de imágenes por RM

- 30 La obtención de imágenes por RM dio como resultado una matriz que contenía 16×16 elementos en la que cada elemento o vóxel/píxel contiene un espectro de ^{13}C -RM. En la fase de reconstrucción, se relleno con ceros la matriz hasta 32×32 , una operación matemática que ayuda a mejorar la resolución espacial. Se analizó el conjunto de datos en el escáner de IRM con software proporcionado por el fabricante. Los resultados son imágenes metabólicas para ^{13}C -piruvato, ^{13}C -alanina, ^{13}C -lactato y ^{13}C -bicarbonato.

5.5 Resultados

- 35 En las figuras adjuntas se muestran y se resumen los resultados del experimento antes y después de la oclusión de la arteria circunfleja.

La figura 1 muestra imágenes y un espectro obtenidos en el cerdo antes del periodo isquémico

mostrando la figura 1a una imagen de ^{13}C -piruvato

mostrando la figura 1b una imagen de ^{13}C -lactato

- 40 mostrando la figura 1c una imagen de ^{13}C -alanina

mostrando la figura 1d una imagen anatómica de referencia de protón

mostrando la figura 1e una imagen de ^{13}C -bicarbonato y

mostrando la figura 1f un espectro de ^{13}C -RMN del píxel seleccionado de la imagen presentada en la figura 1e.

La figura 2 muestra imágenes y un espectro obtenidos del cerdo después del periodo isquémico

- 45 mostrando la figura 2a una imagen de ^{13}C -piruvato

mostrando la figura 2b una imagen de ^{13}C -lactato

mostrando la figura 2c una imagen de ^{13}C -alanina

mostrando la figura 2d una imagen anatómica de referencia de protón

mostrando la figura 2e una imagen de ^{13}C -bicarbonato y

mostrando la figura 2f un espectro de ^{13}C -RMN del píxel seleccionado de la imagen presentada en la figura 2e.

- 5 Las figuras muestran que no hay ninguna diferencia en la imagen de referencia de protón antes y después del periodo isquémico. Además una señal de bicarbonato fuertemente reducida (en comparación con el control) y un contraste positivo para la señal de lactato indican el tejido miocárdico en riesgo. No se observa ninguna diferencia en las imágenes de alanina y piruvato antes y después de los periodos isquémicos.

5.6 Conclusión

- 10 Mediante el uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado como agente de obtención de imágenes en un examen de obtención de imágenes por RM, puede identificarse tejido miocárdico en riesgo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para la fabricación de un medio de obtención de imágenes por RM para su uso en un método para evaluar la viabilidad de tejido miocárdico, en el que dicho método comprende:
 - 5 (a) adquirir imágenes de ^{13}C -RM directas de ^{13}C -piruvato y sus metabolitos que contienen ^{13}C alanina, lactato y bicarbonato, a partir de un sujeto al que se le administra previamente dicho medio de obtención de imágenes; y
 - (b) opcionalmente, correlacionar la señal de ^{13}C de un metabolito con la señal de ^{13}C de cualquier otro metabolito detectado para obtener un contraste basado en la diferencia en la intensidad de señal de dos, preferiblemente tres, lo más preferiblemente cuatro ^{13}C -metabolitos.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que la etapa b) de dicho método es obligatoria.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que la etapa b) de dicho método comprende además corregir la señal de lactato para la cantidad de bicarbonato para obtener una imagen de lactato con respecto a bicarbonato ponderada.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que la señal de lactato se corrige para la cantidad de bicarbonato:
 - 15 - normalizando las imágenes tanto de lactato como de bicarbonato al valor máximo en cada imagen individual; y
 - multiplicando la imagen de lactato normalizada por la imagen de bicarbonato invertida.
5. Uso según la reivindicación 1, en el que el ^{13}C -piruvato hiperpolarizado se obtiene hiperpolarizando ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato mediante el método de DNP.
- 20 6. Uso según las reivindicaciones 1, en el que el medio de obtención de imágenes comprende además uno o más tampones seleccionados del grupo que consiste en ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), ACES, PIPES, imidazol/HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, HEPPS y TRICIN.
7. Uso según la reivindicación 1, en el que se usan secuencias de obtención de imágenes, que hacen uso de múltiples ecos para codificar la información de frecuencia, para adquirir las imágenes de ^{13}C directas en la etapa a).
- 25 8. Uso según la reivindicación 1, en el que las imágenes de ^{13}C directas en la etapa a) se adquieren a menos de 400 s tras la administración del medio de obtención de imágenes.
9. Uso según la reivindicación 1, en el que se adquieren además una o más imágenes de protón con o sin un agente de contraste de IRM de protón o en el que se adquieren además una o más imágenes de ^{13}C con un agente de contraste de ^{13}C -RM hiperpolarizado para obtener información anatómica y/o de perfusión.
- 30 10. Uso según la reivindicación 9, en el que se adquieren además imágenes de protón con o sin un agente de contraste de IRM de protón para determinar la perfusión relativa en el miocardio.
11. Uso según la reivindicación 9, en el que se adquieren además imágenes de ^{13}C usando un agente de contraste de ^{13}C -RM hiperpolarizado no metabolizado para determinar la perfusión cuantitativa en el miocardio.
- 35 12. Uso según la reivindicación 9, en el que se adquieren además imágenes de ^{13}C usando ^{13}C -piruvato hiperpolarizado para determinar la perfusión cuantitativa en el miocardio.
13. Uso según la reivindicación 1, en el que el medio de obtención de imágenes que comprende ^{13}C -piruvato se administra repetidamente.
- 40 14. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho método es para distinguir entre tejido miocárdico viable, dañado y no viable.

