

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 968**

51 Int. Cl.:

**A61K 49/00** (2006.01)

**A61B 5/055** (2006.01)

**G01R 33/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2007 E 07743284 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2020244**

54 Título: **Medio de contraste de resonancia magnética que utiliza polietilenglicol y método de captación de imágenes de resonancia magnética**

30 Prioridad:

**17.05.2006 JP 2006138236**

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

**14.04.2014**

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
9, Kandatsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8535, JP**

72 Inventor/es:

**SUZUKI, YOSHIKAZU;  
MIURA, IWAO y  
IIDA, MITSURU**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 454 968 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Medio de contraste de resonancia magnética que utiliza polietilenglicol y método de captación de imágenes de resonancia magnética.

5

### Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de obtención de imágenes por resonancia magnética que utiliza agentes de contraste con polietilenglicol, es decir, agentes de contraste de resonancia magnética para captar de manera continua señales de resonancia magnética mediante la aplicación de impulsos de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos (preferentemente 1 segundo o menos, más preferentemente 250 milisegundos o menos, y todavía más preferentemente 100 milisegundos o menos). La invención se refiere además a un método para captar señales de resonancia magnética utilizando el agente de contraste de resonancia magnética.

15

### Antecedentes de la técnica

Recientemente en el diagnóstico por imagen con agentes de contraste en la práctica se han utilizado técnicas de obtención de imágenes con positrones o agentes de contraste marcados radioactivamente (tales como PET, SPECT y similares) y la IRM (imagen por resonancia magnética) que utiliza la resonancia magnética nuclear. Aunque resulta posible obtener información cuantitativa sobre una lesión utilizando PET o SPECT, estas técnicas resultan desventajosas en el aspecto de que los agentes de contraste no pueden almacenarse establemente porque la radioactividad de los agentes de contraste se deterioran según su vida media. Además, estas técnicas no resultan deseables para el sujeto debido a que los compuestos radioactivos pueden presentar un efecto perjudicial para el cuerpo humano. Por otra parte, la IRM, al utilizar mediciones de núcleos de isótopos estables, es una técnica de obtención de imágenes que resulta segura para el cuerpo humano y que además permite evitar ventajosamente la problemática inestabilidad de los isótopos radioactivos. Por estos motivos se espera que la utilización de la IRM se expanda todavía más.

La IRM típicamente ha utilizado  $^1\text{H}$  como los núcleos diana de la resonancia magnética nuclear y entre los agentes de contraste conocidos para la misma se incluyen los agentes de contraste de Gd, que son compuestos de coordinación del gadolinio (Gd), las preparaciones coloidales de óxido de hierro superparamagnético (SPIO) que utiliza partículas de óxido de hierro, y similares. Estos agentes de contraste utilizan el principio de que el tiempo de relajación del  $^1\text{H}$  de la molécula de agua presente en un sujeto se acorta, visualizando indirectamente de esta manera la presencia de  $^1\text{H}$ . Sin embargo, la IRM que utiliza  $^1\text{H}$  como los núcleos diana de la resonancia magnética nuclear no presenta una linealidad perfecta de las señales de resonancia magnética procedentes de  $^1\text{H}$  y la concentración del agente de contraste, dificultando la obtención de imágenes que permitan el análisis cuantitativo en la obtención de imágenes moleculares y similares. Respecto a los nucleidos diferentes del protón, los núcleos  $^{19}\text{F}$ , que presentan una sensibilidad prácticamente equivalente a la del protón, se están estudiando para aplicaciones de obtención de imágenes moleculares mediante IRM; sin embargo, el  $^{19}\text{F}$  no ha sido utilizado en la práctica por problemas tales como la dificultad para sintetizar compuestos que contienen flúor. Además, al utilizar agentes de contraste que utilizan óxido de hierro o gadolinio, o agentes de contraste que utilizan átomos tales como flúor, debe considerarse hasta cierto punto su toxicidad.

La obtención de imágenes IRM también puede ponerse en práctica mediante la introducción de moléculas que contienen  $^{13}\text{C}$  en el cuerpo del sujeto y después midiendo las señales de resonancia magnética procedentes del  $^{13}\text{C}$ ; por lo tanto, es conocido que las moléculas que contienen  $^{13}\text{C}$  son utilizables como agentes de contraste para IRM. Las señales de resonancia magnética de  $^{13}\text{C}$  presentan un nivel de fondo bajo en el sujeto en comparación con la señales de  $^1\text{H}$  y por lo tanto se consideran utilizables en la obtención de imágenes utilizadas para las evaluaciones cuantitativas. Sin embargo, la señal de resonancia magnética del  $^{13}\text{C}$  resulta fácilmente afectada por la estructura de la molécula. Por lo tanto, al introducir una pluralidad de núcleos de  $^{13}\text{C}$  en una única molécula para incrementar las señales de resonancia magnética del  $^{13}\text{C}$ , el desplazamiento químico de cada núcleo de  $^{13}\text{C}$  en la molécula puede dispersarse, reduciendo la precisión de las mediciones. Además, la unión de una molécula que contiene  $^{13}\text{C}$  a una proteína con un peso molecular relativamente elevado, tal como un anticuerpo, puede causar una atenuación de las señales de resonancia magnética procedentes del  $^{13}\text{C}$ .

Además, la obtención de imágenes IRM ha requerido la captación de las imágenes de resonancia magnética en un periodo de tiempo corto con el fin de, por ejemplo, reducir la carga para el sujeto; por lo tanto, la utilización de moléculas con un tiempo de relajación  $T_1$  convenientemente corto (relajación longitudinal) como agentes de contraste IRM se considera eficaz. Sin embargo, al captar señales de resonancia magnética utilizando una molécula que contiene  $^{13}\text{C}$ , el tiempo de relajación  $T_1$  depende en gran medida de la estructura molecular y similares; sin embargo, no se conocen moléculas de una estructura que presenten un tiempo de relajación  $T_1$  corto y que resulten eficaces para la obtención en continuo de imágenes de resonancia magnética en un periodo de tiempo corto.

A partir de la técnica anterior anteriormente descrita, resulta deseable desarrollar una técnica que resulte altamente segura, utilizable para evaluaciones cuantitativas y capaz de captar en continuo señales de resonancia magnética en

un periodo de tiempo corto.

El documento WO 98/57578 A1 se refiere a un método que utiliza un reactivo proteico enriquecido isotópicamente en  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  o  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  dirigido a tejidos como agente de contraste diagnóstico en la obtención de imágenes por resonancia magnética para la mejora del contraste de un sitio diana en un tejido de mamífero.

El documento WO 96/07670 A1 se refiere a carbonatos de polietilenglicol mixtos que se sintetizan mediante la conversión de polietilenglicol primero en cloroformato y después mediante la reacción con el grupo hidroxilo de N-hidroxibenzotriazol o 2-hidroxipirimidina o N-hidroxi-2-pirrolidona. Las fórmulas estructurales de estos carbonatos mixtos se indica que permiten que reaccionen sin dificultades con los grupos amino en aminoglicanos y proteínas y superficies que contienen amino, formando enlaces carbamato estables y resistentes a la hidrólisis.

J. Am. Chem. Soc. 120:10453-10462, 1998, se refiere a la evolución de la matriz de densidad bajo el Hamiltoniano medio establecido bajo la secuencia de impulsos de 2D-MELODRAMA, y expresiones en forma cerrada para la dependencia de la intensidad de picos cruzados como función del tiempo de mezcla dipolar.

### Exposición de la invención

#### Problema que debe resolver la invención

Un objetivo de la invención consiste en proporcionar un método de obtención de imágenes por resonancia magnética que utiliza un agente de contraste que resulta seguro y cuantitativo y que puede captar de manera continua señales de resonancia magnética con un tiempo de repetición corto y proporcionar un método para captar señales de resonancia magnética.

#### Medios para resolver el problema

Se ha llevado a cabo una investigación exhaustiva para resolver el objetivo anteriormente indicado y se ha descubierto que la utilización de un agente de contraste que comprende un polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con el polietilenglicol, permite medir cuantitativamente de manera continua las señales de resonancia magnética del  $^{13}\text{C}$  mediante la aplicación repetida de impulsos de excitación, con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos (preferentemente 1 segundo o menos, y más preferentemente 100 milisegundos o menos) y obtener de esta manera imágenes por resonancia magnética utilizables para el análisis cuantitativo en un periodo de tiempo corto. La presente invención se ha llevado a cabo basándose en este resultado y mejoras posteriores del mismo.

Un aspecto de la invención proporciona un método de obtención de imágenes por resonancia magnética tal como se define a continuación.

Punto 1. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética que comprende aplicar, a un sujeto al que se ha administrado un agente de contraste de resonancia magnética que comprende un polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con el polietilenglicol, impulsos de un campo magnético de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos, captando de manera continua así las señales de resonancia magnética con el fin de obtener una imagen.

Punto 2. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según el punto 1, en el que la proporción de  $^{13}\text{C}$  en el polietilenglicol es de entre 20% y 100% de los átomos de carbono totales.

Punto 3. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según el punto 1 o 2, en el que el polietilenglicol presenta un peso molecular medio en peso de entre 470 y 10.000.000.

Punto 4. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según cualquiera de los puntos 1 y 3, en el que el compuesto es un anticuerpo marcado con el polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural.

Todavía otro aspecto de la invención proporciona un método para captar señales de resonancia magnética tal como se define a continuación.

Punto 5. Método para captar señales de resonancia magnética, que comprende aplicar, en un sujeto en el que se ha administrado un agente de contraste de resonancia magnética que comprende un polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con el polietilenglicol, impulsos de un campo magnético de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos, captando así de manera continua señales de resonancia magnética.

Punto 6. Método según el punto 5, en el que la proporción de  $^{13}\text{C}$  en el polietilenglicol es de entre 20% y 100% del total de átomos de carbono.

Punto 7. Método según el punto 5 o 6, en el que el polietilenglicol presenta un peso molecular medio en peso de entre 470 y 10.000.000.

5 Punto 8. Método según cualquiera de los puntos 5 a 7, en el que el compuesto es un anticuerpo marcado con el polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural.

10 Todavía otro aspecto de la invención proporciona la utilización de un polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con el polietilenglicol, tal como se define a continuación.

15 Punto 9. Utilización de un polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con el polietilenglicol, en un método para captar en continuo señales de resonancia magnética con el fin de obtener una imagen en la que se aplican impulsos de un campo magnético de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos.

Punto 10. Utilización según el punto 9, en la que la proporción de  $^{13}\text{C}$  en el polietilenglicol es de entre 20% y 100% del total de átomos de carbono.

20 Punto 11. Utilización según el punto 9 o 10, en el que el polietilenglicol presenta un peso molecular medio en peso de entre 470 y 10.000.000.

Punto 12. Utilización según cualquiera de entre los puntos 9 y 11, en el que el compuesto es un anticuerpo marcado con el polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural.

25

### Efectos de la invención

30 El agente de contraste utilizado en el método de la presente invención permite captar señales de resonancia magnética muy precisas incluso al aplicar impulsos de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos (preferentemente de 1 segundo o menos, más preferentemente de 250 milisegundos o menos, y particularmente preferentemente de 100 milisegundos o menos) y por lo tanto resulta útil para obtener imágenes de resonancia magnética nítidas a alta velocidad.

35 Aunque el polietilenglicol para la utilización en el agente de contraste utilizado en el método de la invención contiene una pluralidad de núcleos de  $^{13}\text{C}$ , el desplazamiento químico de cada núcleo de  $^{13}\text{C}$  no resulta dispersado y se concentra en un desplazamiento químico, permitiendo la captación de señales de resonancia magnética muy precisas. Además, el agente de contraste utilizado en el método de la invención utiliza señales de resonancia magnética del  $^{13}\text{C}$ , que presentan un nivel de fondo bajo en el sujeto, en comparación con señales del  $^1\text{H}$ , permitiendo de esta manera la captación de imágenes que permiten evaluaciones cuantitativas.

40 Además, el polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  en una proporción superior a la abundancia natural, aunque se encuentre unido a otros compuestos de alto peso molecular, tales como proteínas y similares, prácticamente no afecta a las señales de resonancia magnética. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención permite llevar a cabo en un periodo de tiempo corto, por ejemplo, el diagnóstico, determinación y visualización tal como se indica en los puntos (1) a (4) a continuación.

45 (1) Se une el polietilenglicol a un anticuerpo que reconoce específicamente una lesión específica, y el compuesto resultante se utiliza como agente de contraste para visualizar la lesión con el fin de realizar un diagnóstico.

50 (2) El polietilenglicol se une a un anticuerpo que reconoce específicamente células específicas, y el compuesto resultante se utiliza como agente de contraste para visualizar la dinámica de las células *in vivo*.

55 (3) El polietilenglicol o un compuesto que presenta polietilenglicol unido al mismo se incorpora en una preparación DDS, tal como una preparación de liposomas, y la preparación resultante se administra con el fin de determinar el grado de acumulación de la preparación en el sitio diana.

60 (4) Un polietilenglicol que contiene  $^{13}\text{C}$  se administra directamente a un ser humano para permitir la acumulación del polietilenglicol en un órgano o sitio específico durante un periodo de tiempo determinado y visualizar de esta manera el órgano o sitio específico.

65 Además, debido a que el agente de contraste utilizado en el método de la invención utiliza  $^{13}\text{C}$ , resulta altamente seguro y estable incluso con el paso del tiempo, en comparación con agentes de contraste que contienen compuestos radioactivos tales como los utilizados en PET, SPECT, etc.; por lo tanto, el agente de contraste ventajosamente permite que transcurra un periodo de tiempo prolongado para después obtener las imágenes de resonancia magnética.

**Mejor modo de poner en práctica la invención**

El agente de contraste utilizado en el método de la invención comprende un polietilenglicol que contiene <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural (en adelante, "<sup>13</sup>C-PEG"), o un compuesto marcado con <sup>13</sup>C-PEG.

<sup>13</sup>C-PEG para la utilización en la invención puede ser cualquiera que contenga <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural (es decir, aproximadamente 1% o más del total de átomos de carbono). Con el fin de mejorar la sensibilidad de detección de las señales de resonancia magnética, la proporción de <sup>13</sup>C en el total de átomos de carbono es de entre 20% y 100%, preferentemente de entre 50% y 100%, más preferentemente de entre 90% y 100%, y particularmente preferentemente de prácticamente 100%. El polietilenglicol está compuesto de la unidad repetida -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- y presenta el mismo entorno químico para la totalidad de los átomos de carbono. Por lo tanto, el polietilenglicol resulta ventajoso en el aspecto de que, aunque exista una pluralidad de núcleos de <sup>13</sup>C en una molécula, el desplazamiento químico de cada núcleo de <sup>13</sup>C no resulta dispersado y se concentra en un solo desplazamiento químico, permitiendo la detección de señales de resonancia magnética mejoradas.

El peso molecular de <sup>13</sup>C-PEG para la utilización en la invención no se encuentra limitado y puede fijarse convenientemente según la proporción de <sup>13</sup>C y similar. Por ejemplo, en el caso de que la proporción de <sup>13</sup>C sea baja, el peso molecular de <sup>13</sup>C-PEG preferentemente es elevado, mientras que en el caso de que la proporción de <sup>13</sup>C sea alta, el peso molecular de <sup>13</sup>C-PEG puede ser bajo. Un ejemplo de <sup>13</sup>C-PEG para la utilización en la invención es <sup>13</sup>C-PEG con un peso molecular medio en peso de entre 470 y 10.000.000, y preferentemente de entre 6.000 y 2.000.000.

Aunque el <sup>13</sup>C-PEG anteriormente indicado puede utilizarse por sí solo, también puede utilizarse un compuesto marcado con el <sup>13</sup>C-PEG (en adelante, "compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG"). La expresión "compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG" en la presente memoria se refiere a un compuesto al que se une <sup>13</sup>C-PEG directamente o mediante un grupo conector. En dichos compuestos modificados con <sup>13</sup>C-PEG, entre los ejemplos de compuestos marcados con <sup>13</sup>C-PEG (unido) se incluyen anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales; los fragmentos Fab de estos anticuerpos, proteínas séricas tales como albúmina y transferrina; proteínas farmacológicamente activas tales como interferón, eritropoyetina, interleuquina, M-CSF, G-CSF, insulina y adipoquina; compuestos de bajo peso molecular, tales como EP-1873 (Epix Pharma), azul de Evans, rojo de Congo, tioflavina-S, (E,E)-1-bromo-2,5-bis(3-hidroxicarbonil-4-hidroxi)estirilbenceno (BSB) y (E,E)-1-fluoro-2,5-bis(3-hidroxicarbonil-4-hidroxi)estirilbenceno (FSB); compuestos que forman liposomas capaces de encapsular farmacéuticos, etc. Por ejemplo, un compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG que presenta un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una lesión específica (tal como, por ejemplo, cáncer, arterioesclerosis o inflamación) unido a la misma puede permitir visualizar la lesión específica. Además, la utilización de un compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG que presenta una proteína farmacológicamente activa unida al mismo permite tratar el grado de acumulación de la proteína farmacológicamente activa en el sitio diana.

El compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG se preparó mediante la unión de <sup>13</sup>C-PEG a un compuesto que debe marcarse, siguiendo un procedimiento conocido. En el caso de que el compuesto que debe marcarse presente un grupo amino (más concretamente, en el caso de que el compuesto sea un anticuerpo o una proteína farmacológicamente activa), un ejemplo adecuado de un procedimiento incluye convertir el polietilenglicol en un éster activado utilizando N-hidroxisuccinimida (NHS) para formar un enlace amida con el compuesto que debe marcarse.

En el compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG, el número de moléculas de <sup>13</sup>C-PEG unidas al compuesto que debe marcarse no se encuentra limitado con la condición de que la actividad deseada del compuesto que debe marcarse no resulte afectada negativamente. Por ejemplo, el compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG puede presentar una o más moléculas de <sup>13</sup>C-PEG unidas al compuesto que debe marcarse.

El agente de contraste utilizado en el método de la invención se prepara mediante la disolución de <sup>13</sup>C-PEG o compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG en un solvente farmacológica o químicamente aceptable, tal como una solución salina, un tampón de fosfato isotónico o similar. La concentración del polietilenglicol o compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG en el agente de contraste puede ajustarse convenientemente según el método de formación de imágenes, el método de medición, el sitio que debe medirse, y similares. Por ejemplo, la concentración de <sup>13</sup>C-PEG o de compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG puede ser de entre 0,0001% y 100% en peso, preferentemente de entre 0,001% y 50% en peso, y más preferentemente de entre 0,01% y 10% en peso, basado en la cantidad total de agente de contraste.

El agente de contraste utilizado en el método de la invención puede comprender además, además de los componentes anteriormente indicados, aditivos tales como un solubilizador, un emulsionante, un modificador de la viscosidad, un tampón, y similares.

El agente de contraste se administra en el sujeto por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral o por otras vías. La dosis del agente de contraste se ajusta convenientemente según el contenido de <sup>13</sup>C del <sup>13</sup>C-PEG o compuesto modificado con <sup>13</sup>C-PEG, el sitio que debe medirse utilizando la técnica de obtención de imágenes por

resonancia magnética, y similares. Por ejemplo, la dosis del agente de contraste puede ajustarse de manera que el número de átomos de  $^{13}\text{C}$  del 13C-PEG o compuesto modificado con 13C-PEG en el sitio que debe medirse sea de  $1 \times 10^{-12}$  moles o más, preferentemente de  $1 \times 10^{-8}$  moles o más, y más preferentemente de  $1 \times 10^{-6}$  moles o más, por cada  $1 \text{ cm}^3$ .

El agente de contraste utilizado en el método de la invención se utiliza para captar de manera continua señales de resonancia magnética mediante la aplicación de impulsos de un campo magnético de excitación (ondas de RF) con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos. La expresión "tiempo de repetición" (TR) en la presente memoria se refiere al periodo total de tiempo necesario para una única secuencia de pulsos. Concretamente, TR se refiere al intervalo de tiempo desde el inicio de una secuencia de impulsos y el inicio de la siguiente secuencia de impulsos en la adquisición repetida de la señal de resonancia. El 13C-PEG o el compuesto modificado con 13C-PEG utilizado en el agente de contraste utilizado en el método de la invención muestra ventajosamente un tiempo de relajación T1 convenientemente corto, permitiendo de esta manera la captación de manera continua de imágenes de resonancia magnética, fijando un tiempo de repetición tan corto como se ha indicado anteriormente. Con el fin de captar de manera continua señales de resonancia magnética a una velocidad todavía más alta, el agente de contraste utilizado en el método de la invención permite fijar el tiempo de repetición a preferentemente 1 segundo o menos, más preferentemente 250 milisegundos o menos, y particularmente preferentemente 60 a 100 milisegundos. De esta manera, el agente de contraste permite utilizar un tiempo de repetición corto y la adquisición continua de señales de resonancia magnética, convirtiéndolo en adecuado para la utilización en la obtención de imágenes a alta velocidad.

Las señales de resonancia magnética captadas utilizando el agente de contraste pueden utilizarse directamente para un diagnóstico y similar. Las señales de resonancia magnética también pueden convertirse en imágenes de resonancia magnética, las cuales pueden utilizarse para diversos diagnósticos.

Otras condiciones para captar señales de resonancia magnética utilizando el agente de contraste utilizado en el método de la invención, tales como el tiempo de duración de impulso de un campo magnético de excitación o el método de medición de la señal de resonancia magnética, pueden seleccionarse convenientemente de entre las condiciones utilizadas generalmente para captar señales de resonancia magnética. Para la obtención de imágenes de señales de resonancia magnética, las condiciones pueden seleccionarse convenientemente de entre las utilizadas generalmente para obtener imágenes de resonancia magnética.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el agente de contraste de la invención puede aplicarse a métodos de obtención de imágenes conocidos y, más concretamente, a métodos tales como la obtención de imágenes por desplazamiento químico, la obtención de imágenes por desplazamiento químico de  $^{13}\text{C}$  con detección de protones, el método de eco de espín rápido, el método de eco de gradiente, y similares.

### Ejemplos

A continuación se describe en detalle la presente invención haciendo referencia a los ejemplos; sin embargo, la invención no se encuentra limitada a los mismos. En los Ejemplos siguientes, la proporción (%) proporcionada antes de la notación "13C-PEG" se refiere a la proporción de  $^{13}\text{C}$  en el 13C-PEG respecto al total de átomos de carbono. El valor numérico proporcionado después de la notación "13C-PEG" se refiere al peso molecular del 13C-PEG.

#### Ejemplo 1

Se llevaron a cabo los experimentos siguientes con el fin de examinar las características espectrales de RMN de los 13C-PEG. En 13C-PEG6000 (en adelante "99% 13C-PEG6000", obtenido de Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL)), en el que prácticamente la totalidad de los átomos de carbono son  $^{13}\text{C}$ , se disolvió en agua pesada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) hasta una concentración de 2,2 mg/ml y se midió el espectro de RMN de la muestra resultante. Además, se disolvió 13C-PEG6000 que contenía  $^{13}\text{C}$  en la abundancia natural (1%) (en adelante "1% 13C-PEG6000") en agua pesada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) hasta una concentración de 2,2 mg/ml y se midió el espectro de RMN de la muestra resultante.

El espectrómetro de RMN y las condiciones de las mediciones eran las siguientes.

Sistema: un espectrómetro de RMN de alta resolución.

Consola: Varian Unity INOVA  
Imán: Oxford 300 MHz.

Condiciones de las mediciones: frecuencia observada de 75 Hz, temperatura medida:  $23^\circ\text{C}$ , método de impulso único (desacoplamiento de protones), retardo de captación: 1 s, medido con impulsos a  $45^\circ$ .

Se muestran los resultados en la figura 1. Aunque el 99% 13C-PEG6000 es una macromolécula, muestra una señal de RMN muy estrecha (ver la figura 1a). Además, el 99% 13C-PEG6000 presenta el mismo ambiente químico para todos los átomos de carbono, permitiendo que sus desplazamientos químicos se concentren en un punto, resultando en una elevada intensidad de señal. Por otra parte, el 1% 13C-PEG6000, con una concentración 10 veces más alta

que la de 99% 13C-PEG6000, mostraba una intensidad de señal de aproximadamente un décimo de la de 99% 13C-PEG6000. Ello confirmó que la intensidad de señal derivada de 13C era proporcional al número de núcleos de 13C y que era extremadamente cuantitativa.

## 5 Ejemplo 2

Se disolvió 99% 13C-PEG6000 en solvente agua pesada (D<sub>2</sub>O) hasta una concentración de 2,5 mg/ml y utilizando la muestra resultante, el efecto de reducir un intervalo del retardo de captación que sigue a la radiación de los impulsos (impulsos de 90°) y la captación de FID (1,3 s) (el tiempo requerido desde que se completa el tiempo de captación del eco hasta la siguiente excitación; tiempo muerto; retardo de captación) sobre la intensidad de señal se examinó bajo las condiciones de medición mostradas posteriormente. A título comparativo, se disolvió 13C-ácido pirúvico (piruvato sódico (1-13C, 99%), de CIL) en agua pesada hasta una concentración de 25 mg/ml y una glucosa en la que el carbono en la posición 1 es 13C (D-glucosa (1-13C, 99%), de CIL; en adelante "13C-glucosa") se disolvió en agua pesada hasta una concentración de 2,2 mg/ml. Cada una de estas soluciones resultantes se sometió a ensayo a modo de muestras de la manera indicada anteriormente.

Sistema: un espectrómetro de RMN de alta resolución

Consola: Varian Unity INOVA  
Imán: Oxford 300 MHz

Condiciones de las mediciones: frecuencia observada de 75 MHz, temperatura medida: 23°C, método de impulso único (desacoplamiento de protones), medido con impulsos a 45°.

Se muestran los resultados en las figuras 2 y 3. Tal como se muestra en la figura 2a, con ácido 13C-pirúvico, la intensidad de señal se reduce abruptamente al reducir el retardo de captación a 60 segundos o menos. Lo anterior se debe a que el tiempo de relajación T1 del ácido 13C-pirúvico es muy prolongado (el tiempo de relajación T1 del carbono al que no se encuentran unidos directamente protones es prolongado). En contraste, con 99% 13C-PEG6000, tal como se muestra en las figuras 2b y 3b, aunque el intervalo de retardo de captación se redujo a aproximadamente 20 ms, prácticamente no se redujo la intensidad de señal. Se cree que ello se debe a que el tiempo de relajación T1 del 99% 13C-PEG6000 es relativamente corto.

Con la 13C-glucosa, se observaron señales del carbono de tanto el isómero  $\alpha$  como el isómero  $\beta$  de la glucosa. Debido a que el carbono de ambos isómeros presenta protones unidos covalentemente de manera directa al mismo, los tiempos T1 de estos isómeros son más cortos que los del ácido pirúvico. Por lo tanto, aunque el intervalo de retardo de captación se había reducido, no se produjo una reducción abrupta, tal como se observó en el ácido pirúvico con un intervalo de 60 segundos o menos. Sin embargo, las intensidades de señal para el carbono de la posición 1 de tanto el isómero  $\alpha$  como el  $\beta$  mostraban reducciones debido a los menores intervalos de retardo de captación (ver la figura 3a). La suma de las intensidades de señal del carbono de tanto el isómero  $\alpha$  como  $\beta$  de la glucosa mostró una reducción de 21% al reducir el intervalo de retardo de captación de 200 segundos a 20 milisegundos, mientras que la intensidad de señal de 99% 13C-PEG6000 mostró una reducción de tan sólo 3,9%. Por lo tanto, el fenómeno observado en 99% 13C-PEG6000, de que la intensidad de señal no se reducía por la reducción del intervalo de retardo de captación a 20 milisegundos, se cree que se debe a la característica de tiempo de relajación T1 del 13C-PEG.

## 45 Ejemplo 3

Se disolvió 99% 13C-PEG6000 en un solvente agua pesada (D<sub>2</sub>O) hasta una concentración de 2,5 mg/ml y utilizando la muestra resultante se examinó el efecto de la aplicación de impulsos con un tiempo de repetición de 60 a 200 milisegundos utilizando un sistema de RMI con una intensidad de campo de 7 Tesla, bajo las condiciones indicadas posteriormente. A título comparativo, se disolvió 13C-glucosa en agua pesada hasta una concentración de 2,2 mg/ml y la muestra resultante se sometió a ensayo de manera similar.

Sistema: sistema de RMI (intensidad de campo: 7 Tesla)

Consola: Varian Unity INOVA  
Imán: JASTEC 7T

Condiciones de las mediciones: frecuencia observada de 75 MHz, temperatura medida: 23°C, método de impulso único (desacoplamiento de protones), medido con impulsos de 40°.

Se muestran los resultados en la figura 4. Tal como se pone de manifiesto en la figura 4, en las mediciones con impulsos de 40°, la intensidad de señal de la glucosa mostró una reducción de aproximadamente 30% al reducir el intervalo de impulso de 200 milisegundos a 100 milisegundos, mientras que la intensidad de señal del 99% 13C-PEG6000 mostró una reducción de sólo aproximadamente 4% al reducir el intervalo de impulso a 100 milisegundos. Estos resultados revelaron que también en un sistema de RMI, puede utilizarse la capacidad del 13C-PEG6000 de

acortar el tiempo de repetición.

#### Ejemplo 4

5 Se marcó IgG con cada uno de 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG5000NH<sub>2</sub> y 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG20000NHS (ambos de Nippon Oil & Fats Co., Ltd.), que se obtuvieron mediante la conversión de un grupo hidroxilo terminal de 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG a un grupo NHS. Tras la reacción de marcaje, el producto resultante se sometió a etapas de purificación utilizando la filtración en gel y una columna de proteína A para eliminar de esta manera 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG no reaccionado (ver la figura 5a). Tal como resulta evidente a partir de la imagen de SDS-PAGE mostrada en la figura 5a, se observaron varias bandas en el intervalo de elevado peso molecular, confirmando que 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG realmente se había unido como marcaje a IgG mediante un enlace covalente.

15 La IgG marcada con 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG5000 obtenida de esta manera se disolvió en agua pesada hasta una concentración de 14,1 mg/ml y se disolvió IgG marcada con 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG20000 en agua pesada hasta una concentración de 5,1 mg/ml. A continuación se midió el espectro de RMN de cada una de las muestras resultantes. El espectrómetro de RMN y las condiciones de medición eran las siguientes:

Sistema: un espectrómetro de RMN de alta resolución.

20 Consola: Varian Unity INOVA  
Imán: Oxford 300 MHz

Condiciones de las mediciones: frecuencia observada de 75 MHz, temperatura medida: 23°C, método de impulso único (desacoplamiento de protones), retardo de captación: 1 s, medido con impulsos de 45°.

25 Se muestran los resultados en las figuras 5b y 6. Tal como resulta evidente a partir de la figura 5b, se confirmó que 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG5000 y 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG20000 unidos a IgG, al igual que los casos no unidos a IgG, mostraban señales muy intensas que se concentraban en un desplazamiento químico. Además, tal como puede observarse a partir de la figura 6, la anchura a mitad del máximo de la señal del 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG5000 prácticamente no resultó afectada por la unión de 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG5000 a IgG. Estos resultados revelaron que la unión de PEG a proteínas macromoleculares tales como IgG no causaba problemas tales como una intensidad reducida de la señal del PEG, espectros ensanchados, etc.

#### Ejemplo 5

35 El cambio de intensidad y de anchura a mitad del máximo de una señal de RMN conjuntamente con un incremento del peso molecular del PEG se examinaron utilizando PEG que contenían  $^{13}\text{C}$  en una abundancia natural (1%). Se utilizaron tres tipos de PEG, con pesos moleculares medios de 35.000, 500.000 y 2.000.000. Se llevaron a cabo mediciones de espectros de RMN utilizando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear de alta resolución. Las condiciones de las mediciones fueron las siguientes:

Sistema: JEOL JNM-ECA500

Imán: Oxford (11,7 Tesla, 500 MHz)

45 Condiciones de las mediciones:

Frecuencia observada: 125 MHz

Temperatura: 25°C

50 Anchura observada: 31 KHz

Puntos de datos: 32 K

Secuencia de impulsos: desacoplamiento de impulsos únicos

Ángulo de giro: 45°

Retardo de captación: 2 s

55 Tiempo de captación de datos: 1 s.

Se muestran los resultados en la figura 7. Todos los PEG con diferentes pesos moleculares presentaban una concentración de 0,5 mg/ml (solvente: D<sub>2</sub>O). Se añadió  $^{13}\text{C}$ -alanina 0,5 mM (de CIL, el carbono del ácido carboxílico es  $^{13}\text{C}$ ) a cada muestra a modo de control interno y después se llevaron a cabo las mediciones. La señal del carbono del ácido carboxílico de la  $^{13}\text{C}$ -alanina se observó en 176,5 ppm, y las señales de todos los PEG con diferentes pesos moleculares se observaron próximos a 69,5 ppm (con una desviación de aproximadamente 0,1 ppm según el peso molecular). La señal de cada PEG era muy estrecha y la medición de la anchura a mitad del máximo de la señal de RMN de cada PEG reveló que PEG35000, PEG500000 y PEG2000000 mostraban anchuras a mitad del máximo de 2,99, 3,03 y 3,25 Hz, respectivamente, mostrando que la anchura a mitad del máximo prácticamente no variaba aunque se incrementase el peso molecular. Al evaluar la intensidad de la señal de RMN de cada PEG en términos de la altura de la señal, bajo la premisa de que la señal del ácido carboxílico de la  $^{13}\text{C}$ -



alanina era de 1, cada uno de los PEG mostraba una intensidad de señal (altura del pico) de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 10, y no se observó diferencia significativa de intensidades de señal (altura de picos) debido a las diferencias de peso molecular entre las soluciones de PEG de muestra con la misma concentración (figuras 7a, 7b y 7c). Concretamente, se demostró experimentalmente que, aunque el PEG presenta un peso molecular de hasta aproximadamente 2.000.000, la intensidad de la señal de RMN del carbono en la molécula no resulta atenuada en absoluto. En términos de concentración molar, las concentraciones de las muestras de PEG35000, PEG500000 y PEG2000000 eran de 14,2  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  y 0,25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Al evaluar la altura de señal por cada molécula de cada PEG basándose en estas concentraciones molares, bajo la premisa de que la altura de señal de la 13C-alanina era de 1, las alturas de señal de PEG35000, PEG500000 y PEG2000000 se calculó que eran de 283, 4.000 y 19.400, respectivamente. El resultado muestra que la intensidad de señal (altura de pico) se incrementaba de manera sustancialmente proporcional al peso molecular del PEG. Estos resultados revelaron que la intensidad de señal (altura de pico) de la señal de RMN del PEG se incrementaba de manera sustancialmente proporcional al peso molecular del PEG, con la condición de que no resulte necesario considerar la viscosidad de la solución.

### 15 Ejemplo 6

Se disolvió 99% 13C-PEG6000 en agua pura ( $\text{H}_2\text{O}$ ) hasta una concentración de 33 mg/ml y la solución se utilizó como muestra. Se inyectaron 0,1 ml de la muestra en el músculo temporal de ratas (ratas SD macho de 14 semanas de edad, obtenidas de CLEA Japan) y se obtuvieron imágenes de RMI bajo las condiciones siguientes:

20 Sistema: consola de RM Varian Unity INOVA, imán: JASTEC 7T

Secuencia de impulsos: imágenes de desplazamiento químico 2D del 13C con desacoplamiento de protones (sin selección de secciones)

25 Fase de codificación: 8x8

Campo de fotografía (FOV): 50x50 mm<sup>2</sup>

Matriz: 32x32

Número de acumulación: ocho

30 Tiempo total de medición: 8 min., 32 s.

Se muestran los resultados en la figura 8. Estos resultados confirmaron que 99% 13C-PEG6000 posibilita la obtención de imágenes claras en el músculo temporal de ratas y la visualización de las mismas incluso con tiempos de repetición de tan sólo 1 segundo.

### 35 Ejemplo 7

Se disolvió 99% 13C-PEG6000 en una solución salina hasta 0,05 mg/ml, 0,5 mg/ml o 5 mg/ml y se añadió 1 ml de cada una de estas muestras a cubetas cuadradas de 1 cm. Se obtuvieron imágenes de RMI de las cubetas que contenían cada solución de 99% 13C-PEG6000 bajo las condiciones mostradas a continuación. A título comparativo, las imágenes de RMI se obtuvieron de manera similar utilizando una solución salina que contenía 13C-glucosa al 10% en peso o una solución salina sola.

45 Sistema: consola de RM Varian Unity Inova, imán: JASTEC 7T

Secuencia de impulsos: imágenes de desplazamiento químico 2D del 13C con desacoplamiento de protones (sin selección de secciones)

50 Fase de codificación: 8x8

Campo de fotografía (FOV): 50x50 mm<sup>2</sup>

Tiempo de repetición: 1 s.

Matriz: 32x32

Tiempo de repetición: 250 ms.

Número de acumulación: 128

55 Tiempo total de medición: 34 min.

Se muestran los resultados en la figura 9. Tal como puede apreciarse a partir de la figura 9, se visualizaron las soluciones de 99% 13C-PEG6000 a una concentración de 5 mg/ml o 0,5 mg/ml en cubetas cuadradas de 1 cm con un contraste suficiente. Por otra parte, la solución de 99% 13C-PEG6000 a una concentración de 0,5 mg/ml mostró una reducción considerable de la proporción SR (proporción señal a ruido), aunque de todas maneras se visualizó en un grado en que las posiciones de las cubetas que contenían 99% 13C-PEG6000 podían observarse suficientemente.

### 65 Ejemplo 8

Mediante la utilización de soluciones acuosas de 99% 13C-PEG6000, se obtuvieron imágenes de RMI utilizando

algunos métodos de obtención de imágenes y se compararon las imágenes resultantes. Más concretamente, se disolvió 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000 en agua pura ( $\text{H}_2\text{O}$ ) hasta una concentración de 30 mg/ml o 5 mg/ml y se cargaron cubetas de  $1\text{ cm}^3$  con una de estas soluciones y después se obtuvieron imágenes de las mismas. Se utilizaron cuatro tipos de métodos de obtención de imágenes: imágenes por desplazamiento químico del  $^{13}\text{C}$  (13C-CSI), imágenes por desplazamiento químico del  $^{13}\text{C}$  de detección de protones (13C-CSI con detección de H), eco de gradiente de  $^{13}\text{C}$  (13C-GRE) y eco de espín rápido de  $^{13}\text{C}$  (13C-FSE). La obtención de imágenes utilizando estos métodos se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes:

13C-CSI. Matriz:  $8 \times 8$ , FOV:  $50 \times 50\text{ mm}^2$ , tiempo de repetición: 1 s, tiempo de medición: 128 s.

13C-CSI con detección de  $^1\text{H}$ . Matriz:  $8 \times 8$ , FOV:  $50 \times 50\text{ mm}^2$ , tiempo de repetición: 1 s, tiempo de medición: 128 s.

13C-GRE. Matriz:  $64 \times 64$ , FOV:  $50 \times 50\text{ mm}^2$ , tiempo de repetición: 30 ms, tiempo de medición: 123 s, desacoplamiento de protones.

13C-FSE. Matriz:  $32 \times 32$ , FOV:  $50 \times 50\text{ mm}^2$ , tiempo de repetición: 1 s, tren de ecos: 8, espacio de eco: 5 ms, captación céntrica, tiempo de medición: 64 s, desacoplamiento de protones.

Se muestran los resultados en la figura 10. La figura 10a muestra una imagen obtenida utilizando el método de obtención de imágenes por desplazamiento químico del  $^{13}\text{C}$  (13C-CSI); la figura 10b muestra una imagen obtenida utilizando el método de obtención de imágenes por desplazamiento químico del  $^{13}\text{C}$  con detección de protones (13C-CSI con detección de  $^1\text{H}$ ); la figura 10c muestra una imagen obtenida utilizando el método de eco de gradiente de  $^{13}\text{C}$  (13C-GRE), y la figura 10d muestra una imagen obtenida utilizando el método del eco de espín rápido del  $^{13}\text{C}$  (13C-FSE). Cada una de las imágenes mostradas en las figuras 10a a 10d incluye una cubeta superior cargada con la solución 5 mg/ml de 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000 y una cubeta inferior cargada con la solución 30 mg/ml de 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000.

Aunque se visualizó cada una de las cubetas cargadas con la solución 5 mg/ml o 30 mg/ml de 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000, se confirmó que la solución 30 mg/ml se visualizaba más claramente bajo las condiciones de obtención de imágenes en periodo corto, tal como en el presente caso. Una comparación entre 13C-CSI (figura 10a) y 13C-CSI con detección de  $^1\text{H}$  (figura 10b) no mostró ninguna diferencia significativa en términos de proporción SR, resolución y similares. Por otra parte, las imágenes obtenidas utilizando 13C-GRE y 13C-FSE permitieron reconocer claramente la forma cuadrada de las cubetas. Estos resultados confirmaron que las mediciones mediante 13C-GRE y 13C-FSE permiten la captación de imágenes de alta resolución en el mismo tiempo integral o incluso en un tiempo integral más corto, en comparación con 13C-CSI y 13C-CSI con detección de  $^1\text{H}$ . Los resultados anteriormente proporcionados demuestran que al utilizar 13C-PEG como agente de contraste, pueden captarse imágenes de alta resolución en un tiempo más corto mediante la aplicación conveniente de un método tal como 13C-GRE o 13C-FSE.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  del 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000 (2,2 mg/ml) y del 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000 (22 mg/ml) medidos en el ejemplo 1.

La figura 2 es un diagrama que muestra los resultados de las mediciones realizadas en el ejemplo 2, es decir, la relación entre la intensidad de señal de  $^{\text{RMN}}\text{-}^{13}\text{C}$  y el retardo de captación de 13C-ácido pirúvico y de 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000.

La figura 3 es un diagrama que muestra los resultados de las mediciones realizadas en el ejemplo 2, es decir, la relación entre la intensidad de señal de RMN- $^{13}\text{C}$  y el retardo de captación de la 13C-glucosa y el 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000.

La figura 4 es un diagrama que muestra los resultados de las mediciones realizadas en el ejemplo 3, es decir, las intensidades de señal de RMN- $^{13}\text{C}$  de la 13C-glucosa y el 99%  $^{13}\text{C}$ -PEG6000 al variar el tiempo de repetición de 60 a 960 milisegundos utilizando impulsos de  $40^\circ$ .

La figura 5a muestra una fotografía de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) de muestras de IgG marcadas con 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG20000 obtenidas en diversas etapas de purificación, en la que el carril a la izquierda muestra el marcador de peso molecular, el carril siguiente muestra IgG no marcada ("IgG" en la figura), el carril siguiente muestra IgG marcada con 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG20000 filtrada en gel (Sephacryl S-200, Pharmacia) tras la reacción de marcaje ("gelfilt" en la figura), y el carril siguiente muestra la IgG marcada con 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG20000 obtenida mediante purificación por afinidad de la muestra filtrada en gel utilizando una columna de proteína A ("Pro A" en la figura), y la figura 5b muestra los resultados de los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  de IgG marcada con 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG5000 y IgG marcada con 1%  $^{13}\text{C}$ -PEG20000 medidos en el Ejemplo 4.

La figura 6 muestra diagramas que comparan las anchuras a mitad del máximo de las señales de IgG marcadas

con 99% 13C-PEG6000 y con 1% 13C-PEG5000.

La figura 7 muestra diagramas que muestran los espectros de RMN obtenidos en el ejemplo 5, en el que la figura 7a muestra el espectro de RMN de 1% 13C-PEG35000, 0,5 mg/ml (14,2  $\mu$ M); la figura 7b muestra el espectro de RMN de 1% 13C-PEG500000, 0,5 mg/ml (1,0  $\mu$ M) y la figura 7c muestra el espectro de RMN de 1% 13C-PEG2000000, 0,5 mg/ml (0,25  $\mu$ M).

La figura 8 muestra imágenes de RMI obtenidas en el ejemplo 6, en el que la figura 8a muestra una imagen de protones; la figura 8b muestra una imagen de desplazamiento químico del 13C de 99% 13C-PEG6000, señalada en azul; la figura 8c muestra una imagen de desplazamiento químico de la grasa endógena del músculo temporal de la rata, señalada en rojo; la figura 8d muestra una imagen de desplazamiento químico del 13C de 99% 13C-PEG6000 y una imagen de desplazamiento químico del 13C de la grasa endógena, superpuestas sobre la imagen de protones; la figura 8e muestra una imagen de desplazamiento químico del 13C de 99% 13C-PEG6000 superpuesta sobre la imagen de protones; y la figura 8f muestra una imagen desplazamiento químico del 13C de la grasa interna superpuesta sobre la imagen de protones.

La figura 9 muestra imágenes de RMI obtenidas en el ejemplo 7, en el que la figura 9a muestra una imagen de 5 mg/ml de 99% 13C-PEG6000. (La fotografía superior es una imagen de protones; la cubeta superior izquierda contiene 13C-glucosa al 10% en peso, la cubeta superior derecha contiene 5 mg/ml de 13C-PEG6000 y la cubeta inferior contiene una solución salina. La fotografía inferior es una imagen de CSI de 13C-PEG6000). La figura 9b muestra una imagen de 0,5 mg/ml de 99% 13C-PEG6000. (La fotografía superior es una imagen de protones; la cubeta izquierda contiene una solución salina y la cubeta derecha contiene 0,5 mg/ml de 13C-PEG6000. La fotografía inferior es una imagen de CSI de 13C-PEG6000). La figura 9c muestra una imagen de 0,05 mg/ml de 99% 13C-PEG6000. (La fotografía superior es una imagen de protones; la cubeta izquierda contiene una solución salina y la cubeta derecha contiene 0,05 mg/ml de 99% 13C-PEG6000. La fotografía en la parte intermedia es una imagen de CSI de 99% 13C-PEG6000. La fotografía inferior es una imagen obtenida mediante la reducción del nivel de ruido de la imagen intermedia utilizando procesamiento de imágenes; la imagen permite identificar claramente la presencia de 0,05 mg/ml de 99% 13C-PEG6000).

La figura 10 muestra imágenes de RMI obtenidas en el ejemplo 8, en el que la figura 10a es una imagen obtenida utilizando el método de obtención de imágenes por desplazamiento químico del 13C (13C-CSI); la figura 10b es una imagen obtenida utilizando el método de obtención de imágenes por desplazamiento químico del 13C con detección de protones (13C-CSI con detección de 1H); la figura 10c muestra una imagen obtenida utilizando el método de eco de gradiente de 13C (13C-GRE), y la figura 10d muestra una imagen obtenida utilizando el método del eco de espín rápido de 13C (13C-FSE); en cada una de las imágenes de 10a a 10d, se dispusieron verticalmente dos cubetas, conteniendo la cubeta superior 5 mg/ml de 99% 13C-PEG6000, y la cubeta inferior, 30 mg/ml de 99% 13C-PEG6000.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética que comprende aplicar, a un sujeto al que se ha administrado un agente de contraste de resonancia magnética que comprende un polietilenglicol que contiene <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con dicho polietilenglicol, impulsos de un campo magnético de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos, captando de manera continua así unas señales de resonancia magnética con el fin de obtener una imagen.
- 10 2. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según la reivindicación 1, en el que la proporción de <sup>13</sup>C en el polietilenglicol es de 20 a 100% del total de átomos de carbono.
- 15 3. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según la reivindicación 1 o 2, en el que el polietilenglicol presenta un peso molecular medio en peso de 470 a 10.000.000.
- 20 4. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto es un anticuerpo marcado con el polietilenglicol que contiene <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural.
- 25 5. Método para la captación de señales por resonancia magnética, que comprende aplicar, a un sujeto al que se ha administrado un agente de contraste de resonancia magnética que comprende un polietilenglicol que contiene <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con dicho polietilenglicol, impulsos de un campo magnético de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos, captando de manera continua así unas señales de resonancia magnética.
- 30 6. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según la reivindicación 5, en el que la proporción de <sup>13</sup>C en el polietilenglicol es de 20 a 100% del total de átomos de carbono.
- 35 7. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según la reivindicación 5 o 6, en el que el polietilenglicol presenta un peso molecular medio en peso de 470 a 10.000.000.
- 40 8. Método de obtención de imágenes por resonancia magnética según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el compuesto es un anticuerpo marcado con el polietilenglicol que contiene <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural.
- 45 9. Utilización de un polietilenglicol que contiene <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural, o un compuesto marcado con el polietilenglicol, en un método para captar de manera continua señales de resonancia magnética con el fin de obtener una imagen, en la que se aplican impulsos de un campo magnético de excitación con un tiempo de repetición de 60 segundos o menos.
10. Utilización según la reivindicación 9, en la que la proporción de <sup>13</sup>C en el polietilenglicol es de 20 a 100% del total de átomos de carbono.
11. Utilización según la reivindicación 9 o 10, en la que el polietilenglicol presenta un peso molecular medio en peso de 470 a 10.000.000.
12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el compuesto es un anticuerpo marcado con el polietilenglicol que contiene <sup>13</sup>C en una proporción superior a la abundancia natural.

Fig. 1

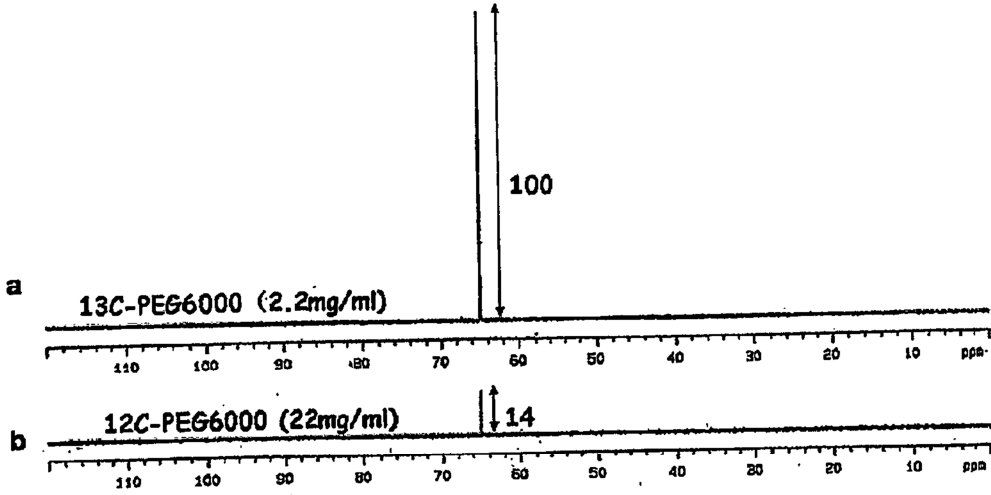


Fig. 2

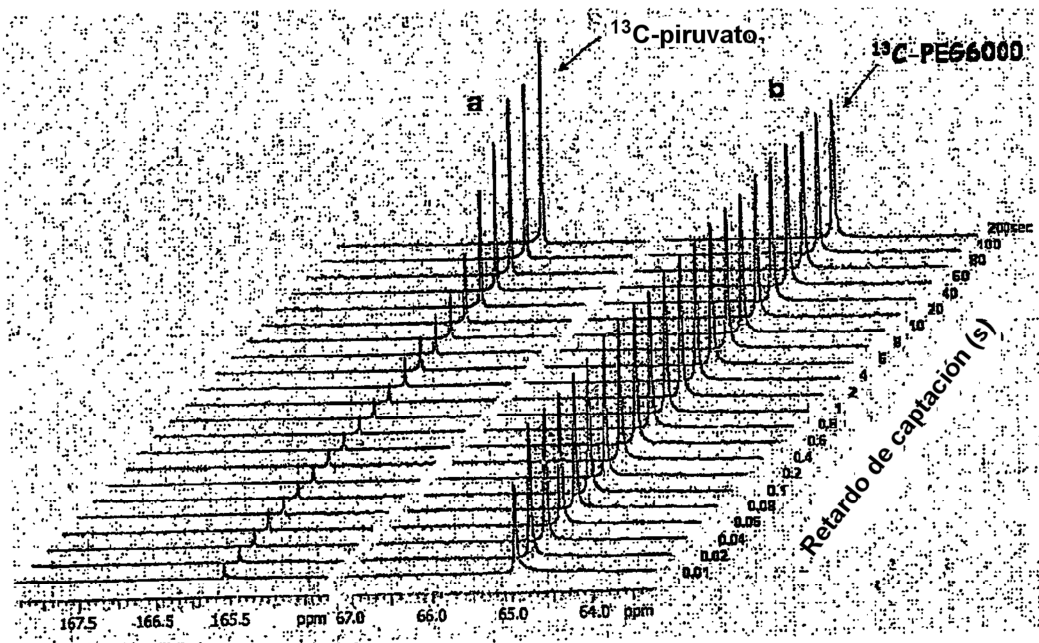


Fig. 3

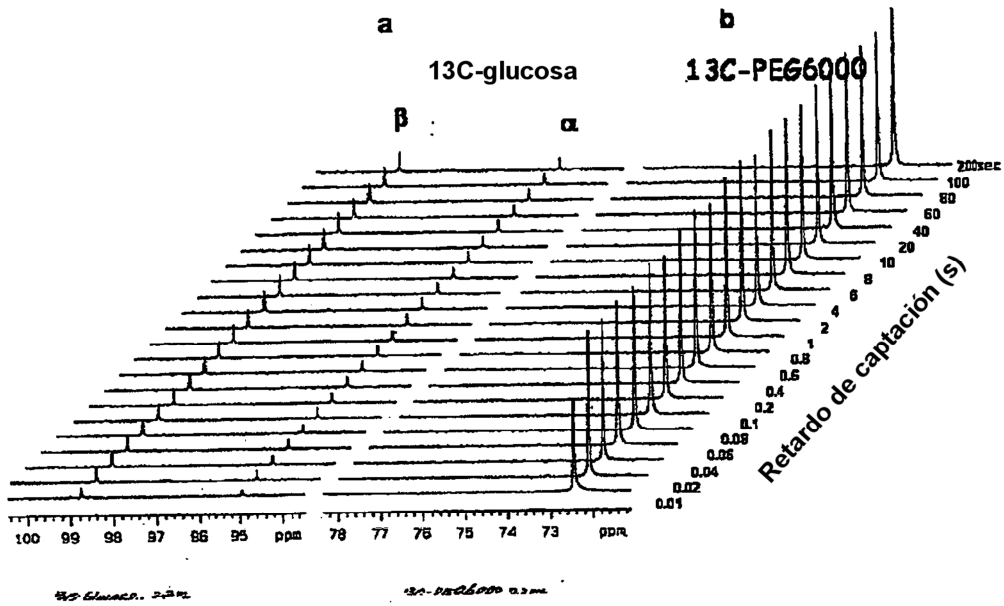


Fig. 4

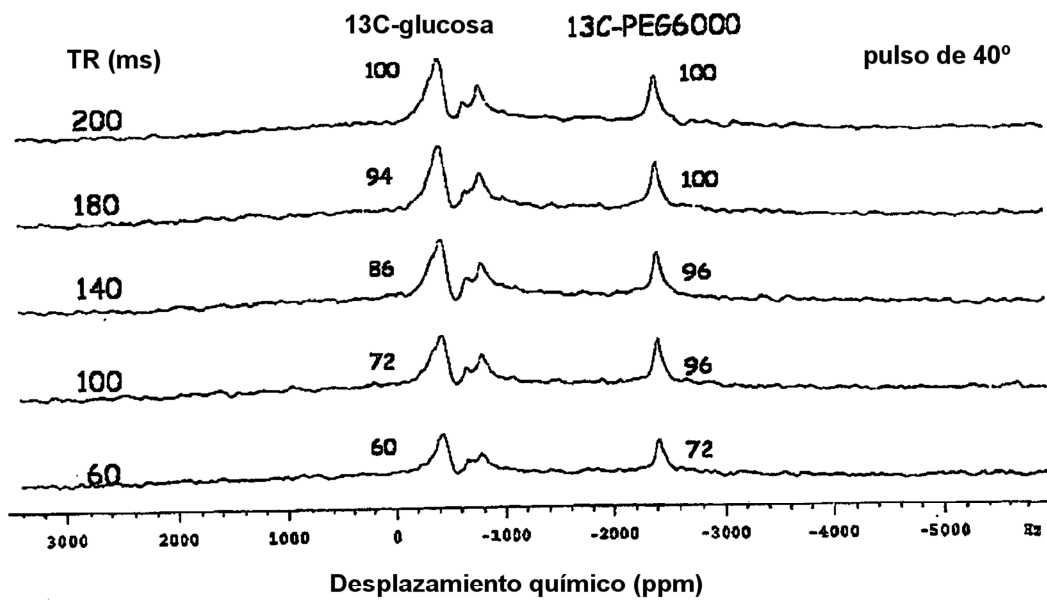


Fig. 5

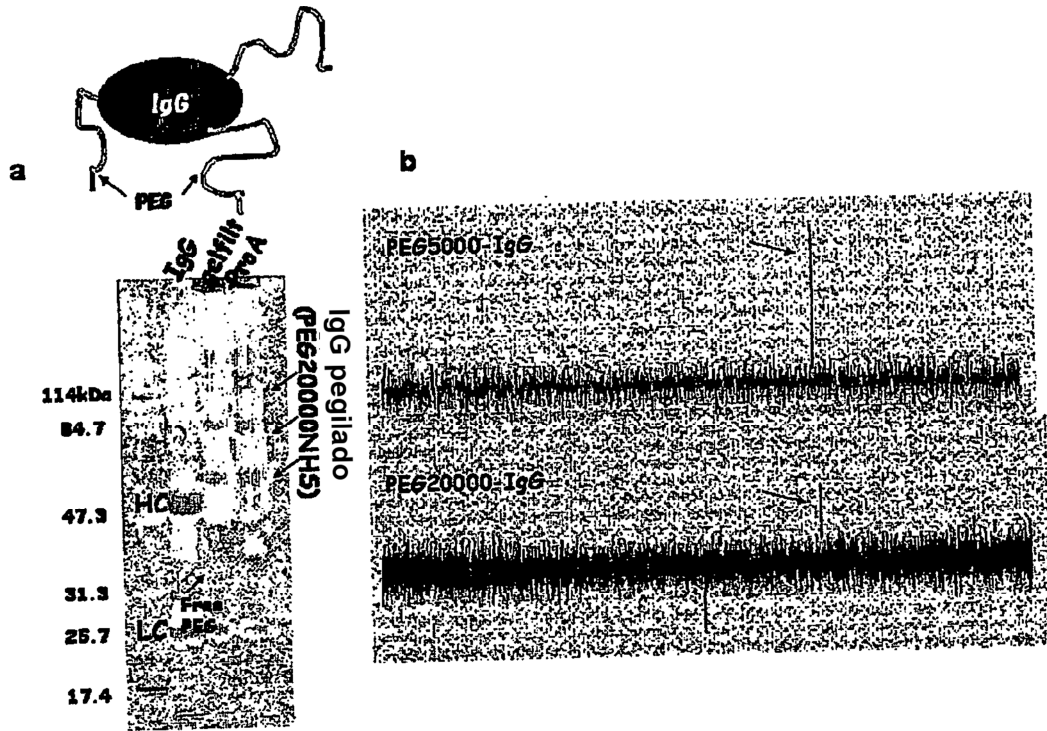


Fig. 6

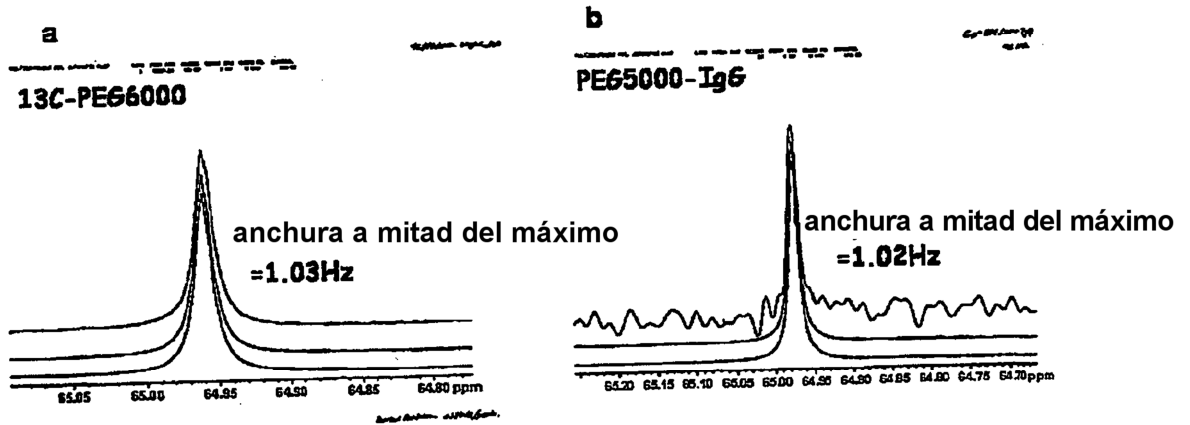
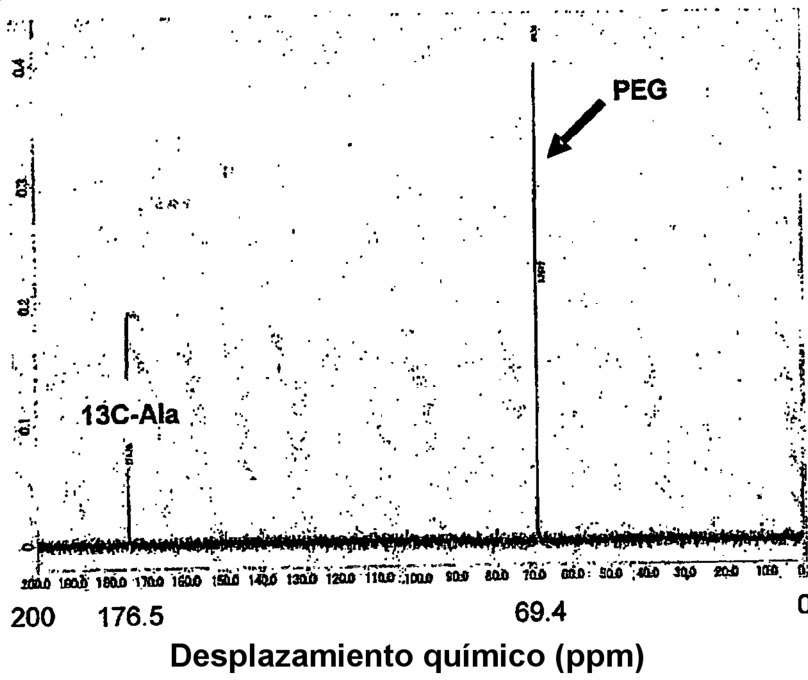
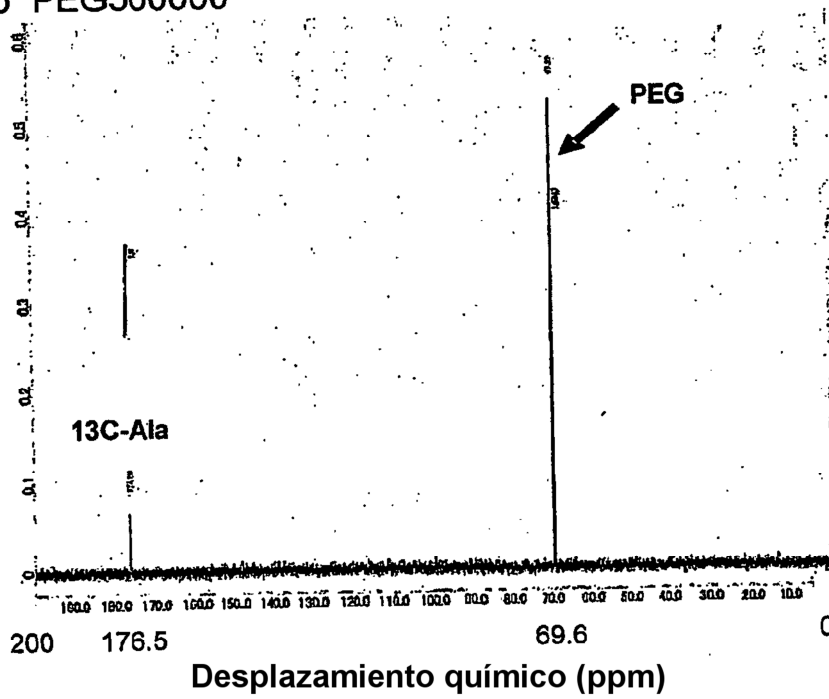


Fig. 7

a PEG35000



b PEG500000





c PEG2000000

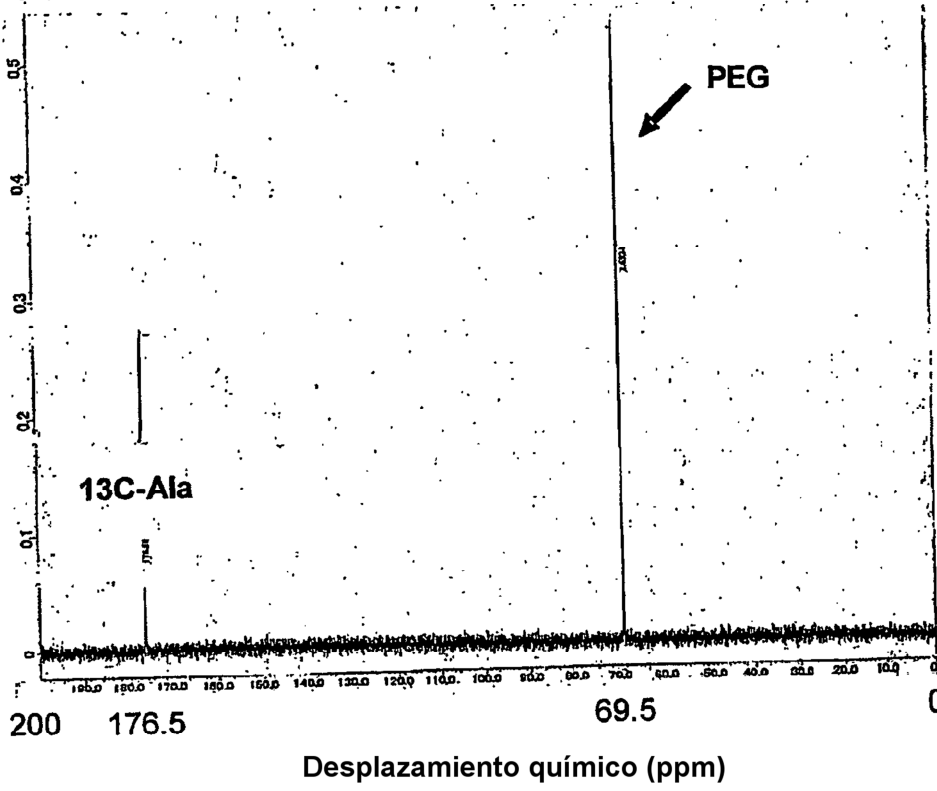


Fig. 8

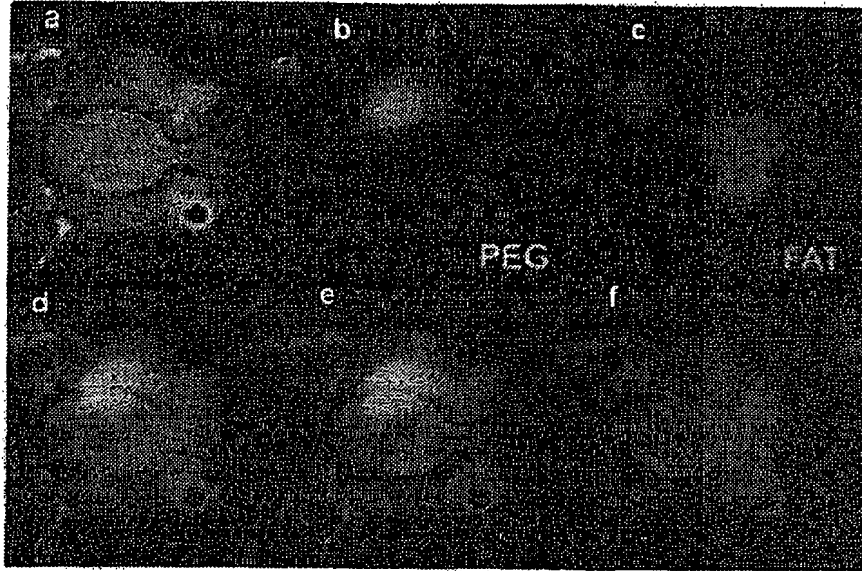


Fig. 9

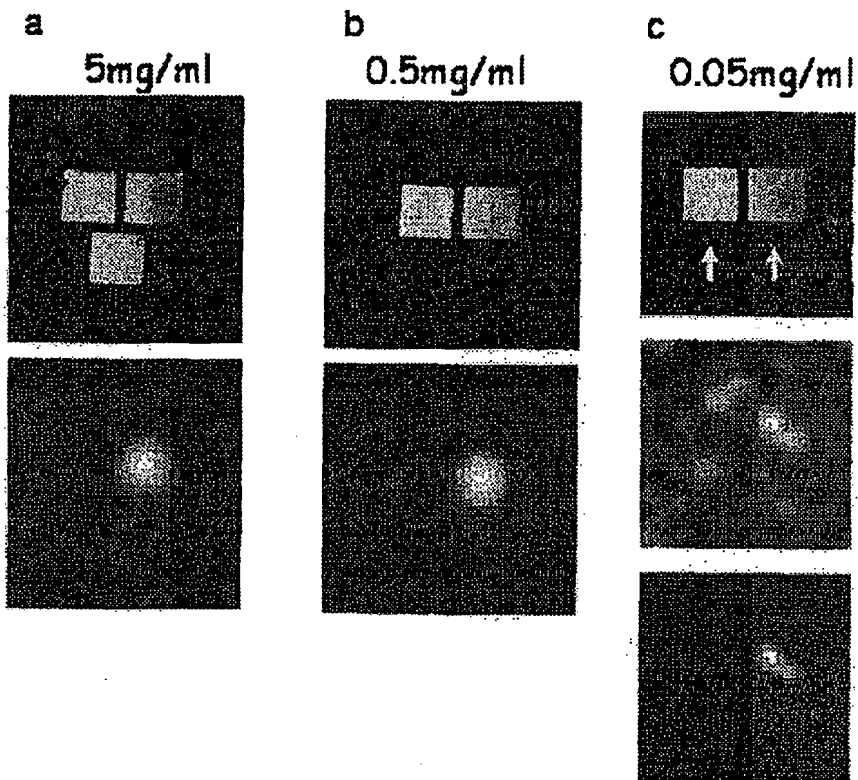


Fig. 10

