

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 260**

51 Int. Cl.:

C07D 519/00 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01)

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2005 E 05771194 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1797102**

54 Título: **Composición que comprende radical triarilmetilo, útil en diagnóstico por IRM**

30 Prioridad:

30.07.2004 NO 20043229

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

09.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

THANING, MIKKEL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 545 260 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

Composición que comprende radical triarilmetilo, útil en diagnóstico por IRM

La invención se refiere a un método de producción de una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, a la composición y a su uso como agente de obtención de imágenes para obtención de imágenes por RM.

5 La obtención de imágenes por resonancia magnética (RM) (IRM) es una técnica de obtención de imágenes que se ha vuelto particularmente atractiva para los médicos ya que permite obtener imágenes del cuerpo de un paciente o partes del mismo de una manera no invasiva y sin exponer al paciente ni al personal médico a radiación potencialmente dañina tal como rayos X. Debido a sus imágenes de alta calidad, la IRM es una técnica de obtención de imágenes favorable de tejido blando y órganos y permite la distinción entre tejido normal y enfermo, por ejemplo tumores y lesiones.

10 La obtención de imágenes de tumores por RM puede llevarse a cabo con o sin agentes de contraste de RM. En una imagen de RM tomada sin agente de contraste, se mostrarán de manera bastante clara tumores de desde aproximadamente 1-2 centímetros de tamaño y más grandes. Sin embargo, la IRM potenciada por contraste permite detectar cambios tisulares mucho más pequeños, es decir tumores mucho más pequeños, lo que hace que la obtención de imágenes por RM potenciada por contraste sea una potente herramienta para la detección de tumores en fase temprana y la detección de metástasis.

15 Se han usado varios tipos de agentes de contraste en la obtención de imágenes de tumores por RM. Los quelatos de metales paramagnéticos solubles en agua, por ejemplo quelatos de gadolinio tales como Omniscan™ (Amersham Health), son agentes de contraste de RM ampliamente usados. Debido a su bajo peso molecular, se distribuyen rápidamente en el espacio extracelular (es decir la sangre y el intersticio) si se administran a la vasculatura. También se eliminan de manera relativamente rápida del organismo. Se ha encontrado que los quelatos de gadolinio son especialmente útiles para aumentar la tasa de detección de metástasis, tumores pequeños, y mejorar la clasificación de tumores, permitiendo esto último la diferenciación de tejido de tumor vital (con buena perfusión y/o barrera hematoencefálica afectada) de necrosis central y de edema circundante o tejido macroscópicamente no implicado (véase por ejemplo C. Claussen *et al.*, *Neuroradiology* 1985; 27: 164-171).

20 Por otro lado, los agentes de contraste de RM de acumulación de sangre, por ejemplo partículas de óxido de hierro superparamagnéticas, se conservan dentro de la vasculatura durante un tiempo prolongado. Se ha demostrado que son extremadamente útiles para potenciar el contraste en el hígado pero también para detectar anomalías de la permeabilidad capilar, por ejemplo paredes capilares "con fugas" en tumores, por ejemplo como resultado de angiogénesis.

25 A pesar de las excelentes propiedades indiscutibles de los agentes de contraste mencionados anteriormente, su uso no carece de riesgos. Aunque los complejos de quelatos de metales paramagnéticos tienen habitualmente altas constantes de estabilidad, es posible que se liberen iones de metales tóxicos en el organismo tras la administración. Además, estos tipos de agentes de contraste muestran escasa especificidad.

35 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 con alto T_1 como agente de obtención de imágenes por RM. El término "hiperpolarización" significa potenciar la polarización nuclear de núcleos activos para RMN presentes en el agente con alto T_1 , es decir núcleos con un espín nuclear distinto de cero, preferiblemente núcleos de ^{13}C o ^{15}N . Al potenciar la polarización nuclear de núcleos activos para RMN, se aumenta significativamente la diferencia de población entre estados de espín nuclear excitado y fundamental de estos núcleos y de ese modo se amplifica la intensidad de la señal de RM en un factor de cien y más. Cuando se usa un agente con alto T_1 enriquecido en ^{13}C y/o ^{15}N hiperpolarizado, no habrá esencialmente ninguna interferencia de señales de fondo, ya que la abundancia natural de ^{13}C y/o ^{15}N es despreciable y por tanto el contraste de la imagen será ventajosamente alto. Se da a conocer una variedad de posibles agentes con alto T_1 adecuados para la hiperpolarización y el posterior uso como agentes de obtención de imágenes por RM incluyendo, pero sin limitarse a, compuestos no endógenos y 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 menciona además que productos intermedios en ciclos metabólicos normales tales como el ciclo del ácido cítrico, tales como ácido fumárico y ácido pirúvico, son agentes de obtención de imágenes preferidos para la obtención de imágenes de la actividad metabólica.

40 Debe destacarse que la señal de un agente de obtención de imágenes hiperpolarizado se degrada debido a la relajación y (tras la administración al cuerpo del paciente) a la dilución. Por tanto, el valor de T_1 de los agentes de obtención de imágenes en líquidos biológicos (por ejemplo sangre) debe ser lo suficientemente grande como para permitir que el agente se distribuya al sitio diana del cuerpo del paciente en un estado altamente hiperpolarizado. Aparte del agente de obtención de imágenes que tiene un alto valor de T_1 , es extremadamente favorable lograr un alto nivel de polarización.

55 En el documento WO-A-99/35508 se dan a conocer varias técnicas de hiperpolarización, siendo una de ellas la técnica de polarización nuclear dinámica (DNP) mediante la cual se realiza la polarización de la muestra 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 la degradación hasta el estado fundamental, hay una transferencia de polarización desde el electrón no apareado del agente paramagnético hasta los núcleos activos para RMN de la muestra.

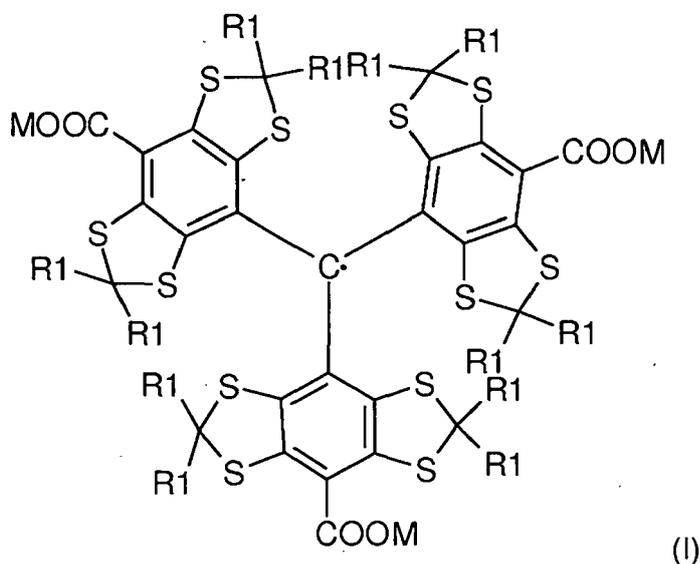
- 5 Generalmente, se usa un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja en el procedimiento de DNP, por ejemplo llevando a cabo el procedimiento de DNP en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o superior. Alternativamente, puede emplearse un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se logre una potenciación de la polarización suficiente. La técnica de DNP se describe por ejemplo, en los documentos WO-A-98/58272 y WO-A-01/96895.
- 10 El agente paramagnético desempeña un papel decisivo en el procedimiento de DNP y su elección tiene un impacto principal sobre el nivel de polarización alcanzado. Se conoce una variedad de agentes paramagnéticos (en el documento WO-A-99/35508 se indican como "agentes de contraste de IRMO"), por ejemplo radicales libres orgánicos a base de oxígeno, a base de azufre o a base de carbono o partículas magnéticas a los que se hace referencia en los documentos WO-A-99/35508, WO-A-88/10419, WO-A-90/00904, WO-A-91/12024, WO-A-93/02711 o WO-A-96/39367.

La publicación Gould, P., Diagnostic Imaging, enero de 2006, cita en Internet XP002363324, describe indicadores de RM de ^{13}C y el posible uso de los mismos para el diagnóstico funcional. No se dan a conocer métodos de producción de una composición líquida que comprenda ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

- 20 Ahora se ha encontrado sorprendentemente un método mejorado para producir una composición líquida que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado que permite obtener ^{13}C -piruvato hiperpolarizado con un nivel de polarización notablemente alto. Además se ha encontrado que una composición de este tipo es especialmente adecuada para la obtención de imágenes de tumores por RM *in vivo*.

Por tanto, considerada desde un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una composición líquida que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, comprendiendo dicho método

- 25 a) formar una mezcla líquida que comprende un radical de fórmula (I), ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato y congelar la mezcla;



en la que

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

- 30 R1 que es igual o diferente representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ hidroxilado y/o alcoxlado, de cadena lineal o ramificado

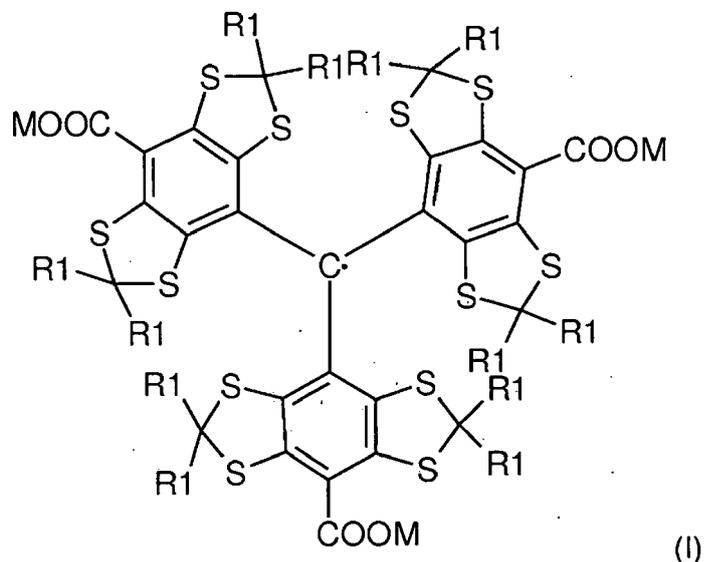
b) potenciar la polarización nuclear de ^{13}C de ácido pirúvico y/o piruvato en la mezcla mediante DNP;

- 35 c) añadir un tampón y una base a la mezcla congelada para disolverla y para convertir el ^{13}C -ácido pirúvico en un ^{13}C -piruvato para obtener una composición líquida o, cuando sólo se usa ^{13}C -piruvato en la etapa a), añadir un tampón a la mezcla congelada para disolverla para obtener una composición líquida; y

d) opcionalmente eliminar el radical y/o los productos de reacción del mismo de la composición líquida.

Los términos “hiperpolarizado” y “polarizado” se usan de manera intercambiable a continuación en el presente documento e indican una polarización hasta un nivel por encima del encontrado a temperatura ambiente y 1 T.

En el método de la invención se usa un radical de fórmula (I)



5 en la que

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

R1 que es igual o diferente representa un grupo hidrocarbonado C₁-C₄ hidroxilado y/o alcoxlado, de cadena lineal o ramificado.

A continuación en el presente documento, el término “radical” se usa para el radical de fórmula (I).

10 En una realización preferida, 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 un ser humano o animal no humano. Preferiblemente, M representa hidrógeno o un catión alcalino, un ión amonio o un ión de amina orgánica, por ejemplo meglumina. Lo más preferiblemente, M representa hidrógeno o sodio.

En una realización adicional preferida, R1 es igual o diferente y representa hidroximetilo o hidroxietilo. En otra
 15 realización preferida, R1 es igual o diferente y representa un grupo hidrocarbonado C₁-C₄ alcoxlado de cadena lineal o ramificado, preferiblemente -CH₂-O-(alquil C₁-C₃), -(CH₂)₂-O-CH₃ o -(alquil C₁-C₃)-O-CH₃. En otra realización preferida, R1 es igual o diferente y representa un grupo hidrocarbonado C₁-C₄ alcoxlado de cadena lineal o ramificado que porta un grupo hidroxilo terminal, preferiblemente -CH₂-O-C₂H₄OH o -C₂H₄-O-CH₂OH. En una
 20 realización más preferida, R1 es igual y representa un grupo hidrocarbonado C₁-C₄ alcoxlado de cadena lineal, preferiblemente metoxilo, -CH₂-OCH₃, -CH₂-OC₂H₅ o -CH₂-CH₂-OCH₃, lo más preferiblemente -CH₂-CH₂-OCH₃.

En la realización más preferida, M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual y representa -CH₂-CH₂-OCH₃.

La síntesis de los radicales se conoce en la técnica y se da a conocer 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
 25 equivalentes molares de un compuesto de arilo monomérico metalado con un equivalente molar de un derivado de ácido carboxílico protegido de manera adecuada para formar un producto intermedio trimérico. Se metala este producto intermedio y posteriormente se hace reaccionar, por ejemplo, con dióxido de carbono para dar como resultado un tritilo-carbinol tricarbóxico que, en una etapa adicional, se trata con un ácido fuerte para generar un catión triarilmetilo. Entonces se reduce este catión para formar el radical tritilo estable.

El enriquecimiento isotópico del ¹³C-ácido pirúvico y/o ¹³C-piruvato usado en el método de la invención es
 30 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%. De manera ideal, el enriquecimiento es del 100%. ¹³C-ácido pirúvico y/o ¹³C-piruvato pueden enriquecerse isotópicamente en la posición C1 (indicado a continuación ¹³C₁-ácido pirúvico y ¹³C₁-piruvato), en la posición C2 (indicado a continuación ¹³C₂-ácido pirúvico y ¹³C₂-piruvato), en la posición C3 (indicado a continuación ¹³C₃-ácido pirúvico y ¹³C₃-piruvato), en la
 35 posición C1 y C2 (indicado a continuación ¹³C_{1,2}-ácido pirúvico y ¹³C_{1,2}-piruvato), en la posición C1 y C3 (indicado a continuación ¹³C_{1,3}-ácido pirúvico y ¹³C_{1,3}-piruvato), en la posición C2 y C3 (indicado a continuación ¹³C_{2,3}-ácido pirúvico y ¹³C_{2,3}-piruvato) o en la posición C1, C2 y C3 (indicado a continuación ¹³C_{1,2,3}-ácido pirúvico y ¹³C_{1,2,3}-piruvato); siendo la posición C1 la preferida.

En la técnica se conocen varios métodos para la síntesis de $^{13}\text{C}_1$ -ácido pirúvico. En resumen, Seebach *et al.*, Journal of Organic Chemistry 40(2), 1975, 231-237 describen una ruta de síntesis 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. Se metala el ditiano y se hace reaccionar con un compuesto que contiene metilo y/o $^{13}\text{CO}_2$. Usando el ^{13}C -componente isotópicamente enriquecido apropiado tal como se expone en esta referencia, es posible obtener $^{13}\text{C}_1$ -piruvato, $^{13}\text{C}_2$ -piruvato o $^{13}\text{C}_{1,2}$ -piruvato. Posteriormente se libera la función carbonilo mediante el uso de métodos convencionales descritos en la bibliografía. Una ruta de síntesis diferente comienza a partir de ácido acético, que se convierte en primer lugar en bromuro de acetilo y después se hace reaccionar con Cu^{13}CN . 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 obtenerse ^{13}C -ácido pirúvico mediante protonación de ^{13}C -piruvato de sodio disponible comercialmente, por ejemplo mediante el método descrito en la patente estadounidense 6.232.497.

Que se use ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato en el método de la invención depende principalmente del radical empleado. Si el radical es soluble en ^{13}C -ácido pirúvico, entonces preferiblemente se usa ^{13}C -ácido pirúvico y se forma una mezcla líquida, preferiblemente una disolución líquida, mediante el radical y ^{13}C -ácido pirúvico. Si el radical no es soluble en ^{13}C -ácido pirúvico, entonces se usa ^{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 polarización en la etapa b) y por tanto el nivel de polarización depende de que el compuesto que va a polarizarse y el radical estén en contacto íntimo entre sí. Por tanto, el codisolvente es preferiblemente un codisolvente o una mezcla de codisolventes que disuelve tanto el radical como el ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato. Para ^{13}C -piruvato, preferiblemente se usa agua como codisolvente.

Además, se ha encontrado que se logran niveles de polarización superiores en la etapa b) cuando la mezcla tras enfriarse/congelarse forma un vidrio en lugar de una muestra cristalizada. De nuevo, la formación de un vidrio permite un contacto más íntimo del radical y el compuesto que va a polarizarse. ^{13}C -ácido pirúvico es un buen agente de formación de vidrio y por tanto se usa preferiblemente en el método de la invención, siempre que el radical sea soluble en ^{13}C -ácido pirúvico. ^{13}C -piruvato es una sal y una mezcla líquida de una disolución acuosa de ^{13}C -piruvato y un radical dará como resultado una muestra cristalizada tras congelarse. Para impedir esto, se prefiere añadir codisolventes adicionales que son buenos agentes de formación de vidrio tales como glicerol, propanodiol o glicol.

Por tanto, en una realización, se disuelve ^{13}C -piruvato en agua para obtener una disolución acuosa y se añaden un radical, glicerol y opcionalmente un codisolvente adicional para formar una mezcla líquida según la etapa a) del método de la invención. En una realización preferida, se combinan ^{13}C -ácido pirúvico, un radical y un codisolvente para formar una mezcla líquida según la etapa a) del método de la invención. En la realización más preferida, se combinan ^{13}C -ácido pirúvico y un radical para formar una mezcla líquida según la etapa a) del método de la invención. El mezclado íntimo de los compuestos puede lograrse mediante varios medios conocidos en la técnica, tales como agitación, agitación con vórtex o sonicación.

La mezcla líquida de la etapa a) según el método de la invención contiene preferiblemente radical de 5 a 100 mM, más preferiblemente radical de 10 a 20 mM, de manera especialmente preferible radical de 12 a 18 mM y lo más preferiblemente radical de 13 a 17 mM. Se ha encontrado que el tiempo de estabilización para la polarización en la etapa b) del método de la invención es más corto usando mayores cantidades de radical, sin embargo, el nivel de polarización que puede alcanzarse es menor. Por tanto, tienen que equilibrarse estos dos efectos uno con respecto al otro.

La mezcla líquida en la etapa a) del método según la invención se congela antes de llevar a cabo la polarización de la etapa b). 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 el helio líquido congelará la muestra.

En la etapa b) del método según la invención, la polarización nuclear de ^{13}C de ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato se potencia mediante DNP. 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 compuesto paramagnético. Con respecto al método de la invención, la polarización se realiza mediante el radical empleado. Durante el procedimiento de DNP, se proporciona energía, preferiblemente en forma de radiación de microondas, que inicialmente excitará el radical. Tras la degradación hasta el estado fundamental, hay una transferencia de polarización desde el electrón no apareado del radical hasta los núcleos de ^{13}C del ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato.

La técnica de DNP se describe, por ejemplo, en los documentos WO-A-98/58272 y WO-A-01/96895. Generalmente, se usa 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 una potenciación de la polarización suficiente. 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.

En el documento WO-A-02/37132, por ejemplo, se describen unidades de polarización adecuadas para llevar a cabo la etapa b) del método de la invención. 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 de producción de campo magnético tales como un imán superconductor. El orificio se extiende verticalmente hacia abajo hasta al menos el nivel de una región P cerca del imán superconductor en la que la intensidad del campo magnético es lo suficientemente alta, por ejemplo de entre 1 y 25 T, para que tenga lugar la polarización de los núcleos de ^{13}C . Preferiblemente, el orificio de muestra puede sellarse y puede evacuarse a bajas presiones, por ejemplo presiones del orden de 1 mbar o inferiores. Unos medios de introducción de muestra (es decir la mezcla congelada de la etapa a) del método de la invención), tales como un tubo de transporte de muestra extraíble, pueden estar contenidos dentro del orificio y este tubo puede insertarse desde la parte superior del orificio hacia abajo hasta una posición dentro de la cámara de microondas en la región P. La región P se enfría mediante helio líquido hasta una temperatura lo bastante 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, los medios de introducción de muestra pueden sellarse en su extremo superior de cualquier manera adecuada para conservar el vacío parcial en el orificio. Un recipiente de contención de muestra, tal como una cubeta de contención de muestra, puede encajarse de manera extraíble del extremo inferior de los medios de introducción de muestra. El recipiente de contención de muestra se fabrica preferiblemente de un material ligero con una baja capacidad de calor específico y buenas propiedades criogénicas tal como, por ejemplo, Kelf (policlorotrifluoroetileno) o PEEK (poli(éter-éter-cetona)). El recipiente de muestra puede contener una o más muestras que van a polarizarse.

La muestra se inserta en el recipiente de contención de muestra, 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 señales de ^{13}C -RMN en estado sólido de la muestra durante la irradiación de microondas, por tanto se prefiere el uso de una unidad de polarización que contiene medios para adquirir espectros de ^{13}C -RMN en 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.

En la etapa c) del método de la invención, se disuelve la mezcla polarizada congelada 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 producen tamponamiento en el intervalo de pH de aproximadamente 7 a 8 tales 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 tampón 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 en el compuesto que va a polarizarse, la etapa c) 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. En una realización, se hace reaccionar ^{13}C -ácido pirúvico con una base para convertirlo en ^{13}C -piruvato y posteriormente se añade un tampón. En otra realización preferida, se combinan el tampón y la base en una disolución y se añade esta disolución a ^{13}C -ácido pirúvico, disolviéndolo y convirtiéndolo en ^{13}C -piruvato al mismo tiempo. En una realización preferida, la base es una disolución acuosa de NaOH, Na_2CO_3 o NaHCO_3 , lo más preferido la base es NaOH. En una realización particularmente preferida, se usa una disolución de tampón TRIS que contiene NaOH para disolver ^{13}C -ácido pirúvico y convertirlo en la sal de sodio de ^{13}C -piruvato.

En otra realización preferida, el tampón o (cuando sea aplicable) la disolución de tampón/base combinada comprende además uno o más compuestos que pueden unir o complejar iones paramagnéticos libres, por ejemplo agentes quelantes tales como DTPA o EDTA. Se ha encontrado que los iones paramagnéticos libres pueden provocar el acortamiento del T_1 del compuesto hiperpolarizado, lo cual es preferible evitar.

La disolución puede llevarse a cabo usando preferiblemente los métodos y/o dispositivos dados a conocer en el documento WO-A-02/37132. En resumen, se usa 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 una realización preferida, la etapa c) se lleva a cabo en un campo magnético elevado para mejorar la relajación y conservar 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.

En la etapa opcional d) del método de la invención, se eliminan el radical y/o los productos de reacción del mismo de la composición líquida obtenida en la etapa c). El radical y/o los productos de reacción pueden eliminarse de manera parcial, sustancial o idealmente de manera completa, prefiriéndose la eliminación completa cuando la composición líquida se usa en un paciente humano. Los productos de reacción del radical pueden ser ésteres que pueden formarse tras la reacción de ácido pirúvico con radicales de fórmula (I) que comprenden grupos hidroxilo. En una realización preferida del método de la invención, la etapa d) es obligatoria. En la técnica se conocen métodos que pueden usarse para eliminar el radical y/o los productos de reacción del mismo. Generalmente, los métodos que

pueden aplicarse dependen de la naturaleza del radical y/o sus productos de reacción. Tras la disolución de la mezcla congelada en la etapa c), el radical puede precipitar y puede separarse fácilmente de la composición líquida mediante filtración. Si no se produce precipitación, el radical puede eliminarse mediante técnicas de separación cromatográfica, por ejemplo cromatografía en fase líquida tal como cromatografía de fase inversa o de intercambio iónico o mediante extracción.

Dado que los radicales de fórmula (I) tienen un espectro de absorción de UV/visible característico, es posible usar una medición de absorción de UV/visible como método para comprobar su existencia en la composición líquida tras su eliminación. Con el fin de obtener resultados cuantitativos, es decir la concentración del radical presente en la composición líquida, puede calibrarse el espectrómetro óptico de tal manera que la absorción a una longitud de onda específica de una muestra de la composición líquida proporciona la concentración de radical correspondiente en la muestra. Se prefiere especialmente la eliminación del radical y/o los productos de reacción del mismo si la composición líquida se usa como agente de obtención de imágenes para la obtención de imágenes por RM *in vivo* de un cuerpo de ser humano o animal no humano.

La presente descripción proporciona una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, preferiblemente ^{13}C -piruvato de sodio hiperpolarizado, y un tampón seleccionado del grupo que consiste en tampón fosfato y TRIS.

El ^{13}C -piruvato hiperpolarizado tiene un nivel de polarización de al menos el 10%, más preferiblemente de al menos el 15%, de manera particularmente preferible de al menos el 20% y lo más preferiblemente de más del 20%.

Tales composiciones son excelentes agentes de obtención de imágenes para la obtención de imágenes por RM *in vivo*, especialmente para el estudio por RM *in vivo* de procesos metabólicos y para la obtención de imágenes de tumores por RM *in vivo* y una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado y un tampón seleccionado del grupo que consiste en tampón fosfato y TRIS que puede usarse como agente de obtención de imágenes por RM forma otro aspecto de la invención.

La composición se produce preferiblemente mediante el método según la reivindicación 1, más preferiblemente usando ^{13}C -piruvato en la etapa a) del método según la reivindicación 1 y un radical de fórmula (I) en la que M es hidrógeno o un catión fisiológicamente tolerable y R1 es igual y representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxilado de cadena lineal o ramificado, preferiblemente metoxilo, $-\text{CH}_2\text{-OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-OC}_2\text{H}_5$ o $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$ y la etapa d) es obligatoria. En una realización particularmente preferida, la composición de la invención se produce mediante el método según la reivindicación 1 en el que en la etapa a) se usan ^{13}C -piruvato y un radical de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno y R1 es igual y representa $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$ y la etapa d) es obligatoria.

Puede usarse una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, preferiblemente ^{13}C -piruvato de sodio hiperpolarizado y un tampón seleccionado del grupo que consiste en tampón fosfato y TRIS para la fabricación de un agente de obtención de imágenes por RM para el estudio *in vivo* de procesos metabólicos en el cuerpo de un ser humano o animal no humano.

Puede usarse una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, preferiblemente ^{13}C -piruvato de sodio hiperpolarizado y un tampón seleccionado del grupo que consiste en tampón fosfato y TRIS para la fabricación de un agente de obtención de imágenes por RM para la obtención de imágenes de tumores *in vivo* en el cuerpo de un ser humano o animal no humano, preferiblemente para el diagnóstico de tumores y/o estadificación de tumores y/o monitorización de la terapia para tumores *in vivo*, más preferiblemente para el diagnóstico de tumor de próstata y/o estadificación de tumor de próstata y/o monitorización de la terapia para tumor de próstata *in vivo*.

La composición según la invención puede usarse como un agente de obtención de imágenes por RM "convencional", es decir que proporciona potenciación del contraste para la obtención de imágenes anatómicas. Una ventaja adicional de la composición según la invención es que el piruvato es un compuesto endógeno que se tolera muy bien por el cuerpo humano, incluso a altas concentraciones. Como precursor en el ciclo del ácido cítrico, el piruvato desempeña un importante papel metabólico 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 de piruvato da como resultado lactato y su carboxilación da como resultado oxaloacetato.

Ahora se ha encontrado 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 el estudio por RM *in vivo* de procesos metabólicos en el cuerpo humano. Esto es sorprendente ya que debe tenerse en cuenta que el T_1 de compuestos hiperpolarizados disminuye debido a la relajación y dilución. ^{13}C -piruvato tiene una relajación de T_1 en sangre completa humana 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 bastante rápida como para permitir la detección de señales a partir del compuesto original ^{13}C -piruvato y sus metabolitos. La cantidad de alanina, bicarbonato y lactato depende del estado metabólico del tejido que está investigándose. 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, mediante la monitorización de la conversión de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado en ^{13}C -lactato hiperpolarizado, ^{13}C -bicarbonato hiperpolarizado y ^{13}C -alanina hiperpolarizada es posible estudiar procesos metabólicos *in vivo* en el cuerpo de un ser humano o animal no humano usando obtención de imágenes por RM no invasiva.

- 5 Se ha encontrado que las amplitudes de la señal de RM que surgen de los diferentes metabolitos de piruvato varían dependiendo del tipo de tejido. El patrón de picos metabólicos únicos formado por alanina, lactato, bicarbonato y piruvato puede usarse como huella para el estado metabólico del tejido que está examinándose y por tanto permite la distinción entre tejido sano y tejido tumoral. Esto hace que la composición según la invención sea un excelente agente para la obtención de imágenes de tumores por RM *in vivo*.
- 10 Generalmente, con el fin de llevar a cabo la obtención de imágenes por RM con la composición según la invención, el sujeto que está examinándose, por ejemplo paciente o un animal, se coloca en el imán de RM. Se colocan bovinas de RF de ^{13}C -RM dedicadas para cubrir la zona de interés.

Una composición que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado y un tampón seleccionado del grupo que consiste en tampón fosfato y TRIS se administra por vía parenteral, preferiblemente por vía intravenosa, por vía intraarterial o directamente en la región u órgano de interés. La dosificación y concentración de la composición según la invención dependerán de una variedad de factores tales como toxicidad, la capacidad de direccionamiento al órgano y la vía de administración. Generalmente, la composición 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 tasa 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. 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 para el volumen de interés de una manera selectiva para la frecuencia y en el espacio combinada. Esto dará como resultado imágenes metabólicas de ^{13}C -lactato, ^{13}C -alanina y ^{13}C -piruvato y más preferiblemente imágenes metabólicas de ^{13}C -lactato, ^{13}C -alanina, ^{13}C -bicarbonato y ^{13}C -piruvato. Dentro del mismo periodo de tiempo, puede adquirirse una imagen de protón con o sin un agente de contraste de IRM de protón para obtener información anatómica y/o de perfusión.

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. Todos de ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos tienen 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 directamente relacionada con la cantidad de ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos, respectivamente. Cuando la cantidad de ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito se estima usando rutinas de ajuste en el dominio temporal 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 colores o codificación de grises es representativa para la cantidad de ^{13}C -piruvato y cada ^{13}C -metabolito medida.

Aunque se ha demostrado que los métodos de obtención de imágenes espectroscópicas son valiosos 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 la señal de ^{13}C hiperpolarizado está disponible durante toda la adquisición de datos de RM. A costa de una relación señal-ruido reducida, esto puede lograrse reduciendo el ángulo de pulso de RF que se aplica en cada etapa de codificación de fase. Tamaños de matriz superiores requieren más etapas de codificación de fase y tiempos de barrido más largos.

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 obtener imágenes con una relación señal-ruido superior o las imágenes equivalentes de mayor resolución espacial. Sin embargo, estos métodos de obtención de imágenes no permitirán, en su forma básica, producir imágenes separadas para ^{13}C -piruvato y sus ^{13}C -metabolitos sino una imagen que contiene las señales de ^{13}C -piruvato y de 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 usarán múltiples ecos para codificar la información de frecuencia. Se describen secuencias que pueden producir imágenes de ^1H de agua y grasa separadas, por ejemplo, en G. Glover, J Magn Reson Imaging 1991:1:521-530 y S. B. Reeder *et al.*, MRM 51 35-45 (2004). Dado que se conocen los metabolitos que van a detectarse, y por tanto sus frecuencias de RM, el enfoque comentado en las referencias anteriores puede aplicarse para obtener directamente imágenes de piruvato, alanina y lactato, y preferiblemente piruvato, alanina, lactato y bicarbonato, y hace un uso más eficaz de la señal de ^{13}C -RM hiperpolarizada, proporcionando una mejor calidad de señal en comparación con la técnica de obtención de imágenes espectroscópicas clásica, una mayor resolución espacial y tiempos de adquisición más rápidos.

El tejido tumoral se caracteriza con frecuencia por una perfusión aumentada y mayor actividad metabólica. El proceso de aumentar el lecho vascular, angiogénesis, se induce por células que, debido a sus mayores necesidades metabólicas y/o su mayor distancia desde un capilar, no pueden obtener suficientes sustratos que puedan proporcionar la energía necesaria para sostener su homeostasis energética. En esta zona, en la que las células tienen problemas para producir suficiente energía, se espera un marcado cambio en el patrón metabólico. El tejido con problemas para sostener la homeostasis energética alterará su metabolismo energético, lo que da particularmente como resultado una producción de lactato aumentada. Sorprendentemente, es posible hacer visible este cambio en el metabolismo usando ^{13}C -piruvato hiperpolarizado dentro del corto intervalo de tiempo de obtención de imágenes por RM disponible, es decir usando la señal de ^{13}C -lactato alta en la zona del tumor para distinguir el tumor del tejido sano. Ya que la perfusión es heterogénea en el tejido tumoral, se prefiere corregir la señal de ^{13}C -lactato con respecto a la cantidad de piruvato (señal de ^{13}C -piruvato) disponible en la misma región. Esto permitirá enfatizar regiones en el tejido con una señal de lactato relativa alta con respecto a la señal de piruvato y por tanto mejorar la distinción entre tejido tumoral y tejido sano.

Para corregir con respecto a la señal de piruvato, se normalizan las imágenes tanto de lactato como de piruvato con respecto 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 por cada píxel. Como última etapa, se multiplica el resultado intermedio obtenido en la operación anterior por la imagen de lactato original.

Para enfatizar regiones con metabolismo alterado, puede usarse la señal de ^{13}C -lactato alta en relación con una señal de ^{13}C -alanina reducida en una operación similar a la descrita en el párrafo anterior. Sorprendentemente, la identificación de la zona del tumor, es decir la distinción entre tejido tumoral y tejido sano, también mejora mediante esta corrección. Para corregir con respecto a la señal de alanina, se normalizan las imágenes tanto de lactato como de alanina con respecto al valor máximo en cada imagen individual. En segundo lugar, se multiplica la imagen de lactato normalizada por la imagen de alanina invertida, por ejemplo la señal de alanina máxima en la imagen menos el nivel de alanina por 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 la señal de ^{13}C -bicarbonato en el análisis. Además, puede incluirse una imagen de protón adquirida con o sin un agente de contraste de IRM de protón en el análisis para obtener información anatómica y/o de perfusión.

En otra realización preferida, la composición según la invención se administra repetidamente, permitiendo por tanto estudios dinámicos. Esto es una ventaja adicional de la composición en comparación con otros agentes de obtención de imágenes por RM que, debido a su circulación relativamente larga en el cuerpo del paciente, no permiten tales estudios dinámicos.

La composición según la invención es adicionalmente útil como agente de obtención de imágenes para la estadificación de tumores por RM *in vivo*. Las mismas imágenes metabólicas y/o imágenes de razón metabólica que las descritas en los párrafos anteriores pueden usarse con este fin con categorías de corte apropiadas definidas dependiendo del tamaño tumoral y la actividad metabólica.

Además, la composición según la invención es útil como agente de obtención de imágenes para la monitorización de la terapia para tumores por RM *in vivo*, por ejemplo monitorizando cambios directos en el patrón metabólico de tumores tras el tratamiento con agentes antitumorales terapéuticos y/o tratamiento por radiación o en relación con cualquier tipo de técnicas de intervención con o sin cualquier clase de ablación, es decir ablación química combinada con radiofrecuencias, microondas o ultrasonidos.

La obtención de imágenes por RM de tumores puede verse influida y mejorarse mediante la preparación del paciente o el animal de una manera que alterará el metabolismo de proteínas, metabolismo de lípidos o metabolismo energético en general. En la técnica se conocen maneras de lograr esto, por ejemplo mediante ayuno (por ejemplo durante la noche), infusión de glucosa y similares.

En una realización preferida, la composición según la invención es útil como agente de obtención de imágenes para la obtención de imágenes de tumores por RM, monitorización de la terapia para tumores y estadificación de tumores *in vivo* de tumores de cerebro, tumores de mama, tumores de colon/colorrectales, tumores de pulmón, tumores de riñón, tumores de cabeza y cuello, tumores musculares, tumores gástricos, tumores de esófago, tumores de ovarios, tumores de páncreas y tumores de próstata. Se ha encontrado además que la composición según la invención es especialmente útil como agente de obtención de imágenes para la obtención de imágenes de tumor de próstata por RM *in vivo*, es decir diagnóstico de tumor de próstata y/o estadificación de tumor de próstata y/o monitorización de la terapia para tumor de próstata.

Cuando un hombre acude al médico con síntomas de molestia o dolor urinario, se sospecha que tiene cáncer de próstata. Si el hombre tiene más de 50 años, se realiza una prueba de antígeno específico de próstata (PSA). Se sospecha cáncer de próstata basándose en PSA elevado y/o tacto rectal (DRE) anómalo. Si la prueba de PSA es positiva, se remite al paciente a un especialista (un urólogo) para el diagnóstico usando biopsia guiada por ultrasonidos. De los dos millones de procedimientos de biopsia realizados al año en EE.UU. y Europa, 5 de cada 6 y 2 de cada 3 son negativos, respectivamente. Cuando se detecta en un estadio temprano, la tasa de supervivencia a

los cinco años para estos pacientes es del 100%. Ya que el cáncer de próstata es el cáncer más común y la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres, hay una fuerte demanda médica de un método para el diagnóstico de tumores de próstata que pueda detectar tumores de próstata en un estadio temprano y que pueda ayudar a reducir el número de procedimientos de biopsia.

- 5 La obtención de imágenes de ^{13}C de la próstata requiere una bovina de ^{13}C -RF de volumen de transmisión-recepción, preferiblemente, se usa una bovina de ^{13}C -RF de volumen de transmisión en combinación con una bovina de RF endorrectal sólo de recepción para RM y más preferiblemente, se usa una bovina de ^{13}C -RF de volumen en fase de transmisión-recepción en combinación con una bovina de ^{13}C -RF endorrectal sólo de recepción para RM. Se prefieren especialmente bobinas que posibilitan la adquisición de una imagen de próstata de ^1H tras la obtención de imágenes de ^{13}C .

Otro aspecto de la invención es una composición que comprende ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato y el radical de fórmula (I).

- 15 En una realización preferida, dicha composición comprende un radical de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable. Preferiblemente, M representa hidrógeno o un catión alcalino, un ión amonio o un ión de amina orgánica, por ejemplo meglumina. Lo más preferiblemente, M representa hidrógeno o sodio.

En una realización adicional preferida, dicha composición comprende un radical de fórmula (I) en la que R1 es igual o diferente y representa hidroximetilo o hidroxietilo.

- 20 En otra realización preferida, R1 es igual o diferente y representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxlado de cadena lineal o ramificado, preferiblemente $-\text{CH}_2\text{-O}(\text{alquil } \text{C}_1\text{-C}_3)$, $-(\text{CH}_2)_2\text{-O-CH}_3$ o $-(\text{alquil } \text{C}_1\text{-C}_3)\text{-O-CH}_3$. En otra realización preferida, R1 es igual o diferente y representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxlado de cadena lineal o ramificado que porta un grupo hidroxilo terminal, preferiblemente $-\text{CH}_2\text{-O-C}_2\text{H}_4\text{OH}$ o $-\text{C}_2\text{H}_4\text{-O-CH}_2\text{OH}$. En una realización más preferida, R1 es igual y representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxlado de cadena lineal, preferiblemente metoxilo, $-\text{CH}_2\text{-OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-OC}_2\text{H}_5$ o $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$, lo más preferiblemente $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$.

- 25 En una realización particularmente preferida, dicha composición comprende un radical de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual y representa $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$.

- 30 En una realización adicional preferida, dicha composición comprende ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato con un enriquecimiento isotópico 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%. De manera ideal, el enriquecimiento es del 100%. ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato pueden enriquecerse isotópicamente en la posición C1, en la posición C2, en la posición C3, en la posición C1 y C2, en la posición C1 y C3, en la posición C2 y C3 o en la posición C1, C2 y C3, siendo la posición C1 la preferida.

- 35 En una realización particularmente preferida, dicha composición comprende ^{13}C -ácido pirúvico y el radical de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual y representa $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$, lo más preferiblemente dicha composición contiene ^{13}C -ácido pirúvico y el radical de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual y representa $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$.

- 40 Las composiciones según la invención que comprenden ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato y el radical de fórmula (I) son particularmente útiles para la producción de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, por ejemplo para la producción de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado según el método de la invención. Por tanto, otro aspecto de la invención es el uso de una composición que comprende ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato y el radical de fórmula (I) para la producción de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

- 45 Se encontró que los radicales de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual y representa $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$ eran particularmente favorables para su uso en el método según la invención debido a las siguientes propiedades: son solubles en ^{13}C -ácido pirúvico y estables cuando se disuelven en el mismo. Además, muestran una alta eficacia de polarización en la etapa b) del método según la invención y son estables durante la etapa c) de disolución, también cuando se usa una base en esta etapa. Pueden eliminarse fácilmente en la etapa d) del método de la invención, por ejemplo, mediante filtración usando un material de filtro hidrófobo.

- 50 Los radicales usados según la invención pueden sintetizarse tal como se describe en el ejemplo 1. 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 protegido de manera adecuada para formar un producto intermedio trimérico. Se metala este producto intermedio y posteriormente se hace reaccionar, por ejemplo, con dióxido de carbono para dar como resultado un tritil-carbinol tricarboxílico que, en una etapa adicional, se trata con un ácido fuerte para generar un catión triarilmetilo. Entonces se reduce este catión para formar el radical tritilo estable.

- 55 Los radicales pueden usarse como agente paramagnético para la hiperpolarización de compuestos en un procedimiento de DNP.

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(hidroxi)etil)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 avanzar la reacción, que era ligeramente exotérmica, durante 1 hora en un baño de agua a 34°C durante 60 min. Se repitió la adición de hidruro de sodio y yoduro de metilo dos veces 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 después 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 ambiente durante 15 horas para hidrolizar los ésteres metílicos formados. Entonces se acidificó la mezcla usando 50 ml de HCl (ac.) 2 M a un pH de aproximadamente 2 y se extrajo 3 veces con acetato de etilo (500 ml y 2 x 200 ml). Se secó la fase orgánica combinada sobre Na₂SO₄ y después 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 después 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 ¹³C-piruvato hiperpolarizado usando ¹³C-ácido pirúvico y el radical 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 muestra 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 ¹³C-piruvato hiperpolarizado usando ¹³C-ácido pirúvico y el radical 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 sin marcar (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 muestra 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. En serie con el dispositivo de disolución se conectó una columna cromatográfica. La columna consistía en un cartucho (D = 38 mm; h = 10 mm) que contenía 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 adsorbió 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 de UV a 469 nm y se determinó que era inferior al límite de detección de 0,1 μM.

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

Se sintetizó sal de sodio de tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)etoxi)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 sal de sodio de tris(8-carboxi-2,2,6,6-tetra(hidroxi)etoxi)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 muestra 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: Obtención de imágenes de tumores usando ¹³C-piruvato hiperpolarizado como agente de obtención de imágenes

5.1 Modelo animal de tumor y preparación de tumor

R3230AC es un adenocarcinoma de mama de rata que puede mantenerse en ratas Fischer 344 hembra. Para establecer el modelo animal de tumor, se descongeló rápidamente a 37°C un vial congelado de células R32030 que contenía RPMI 1640, FBS al 10% y DMSO al 10%. Posteriormente, se transfirió la disolución celular a FBS y se añadieron volúmenes crecientes de RPMI 1640. Finalmente, se transfirió la suspensión celular a un matraz de crecimiento de 25 cm² y se puso en una incubadora a 37°C, CO₂ al 5%. Se cambiaron los medios de crecimiento cada dos días. En el día de la infección de las ratas, se llevó a cabo la retirada de células o bien mediante fuerza mecánica o bien por medio de tripsina. Se lavaron las células usando tampón fosfato que carecía de calcio y magnesio. Se añadió tripsina (tripsina al 0,05% en EDTA al 0,02%) durante 2-5 min. Después se añadieron 5 ml de FBS y se transfirieron las células a un vaso de precipitados que contenía RPMI 1640 con FCS y antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomina 100 UI/ml y anfotericina B 2,5 µg/ml). Se centrifugó la disolución celular y se resuspendió el sedimento celular en 20 ml de RPMI con FBS y antibióticos, se repitieron la centrifugación y la resuspensión. Entonces se colocaron alícuotas de las células en viales que contenían 4 x 10⁶ células/ml de RPMI 1640. Para obtener tumores donantes, se anestesiaron ratas Fischer 344 hembra (Charles River, 180-200 g) y se inyectaron por vía subcutánea 0,3 ml de la suspensión celular en la región inguinal en ambos lados. 15 y 22 días después, se prepararon fragmentos de tumor tal como se describe en F.A. Burgener *et al.*, Invest Radiol 22/6 (1987), 472-478; S. Saini *et al.*, J. Magn. Reson. 129/1 (1997), 35-43. Se realizaron dos incisiones en el abdomen ventral de ratas Fischer hembra receptoras. Se insertó un fragmento de tumor en cada cavidad y se cerraron las incisiones. Se llevaron las ratas para obtener imágenes 12-14 días tras el injerto del tumor.

5.2 Preparación de ratas y obtención de imágenes por RM de protón

Se anestesiaron ratas que se habían pesado usando isoflurano (al 2-3%) y se mantuvieron sobre una mesa calentada para garantizar una temperatura corporal de aproximadamente 37°C. Se introdujo un catéter en la vena de la cola y en la arteria carótida común izquierda. Se transportaron las ratas a la máquina de RM y se colocaron sobre una almohadilla de fabricación propia que se calentó hasta aproximadamente 37°C por medio de FC-104 Fluorinert circulante. Este líquido no dio lugar a señales de fondo en la obtención de imágenes por ¹H y ¹³C-RM. Se continuó la anestesia por medio de isoflurano al 1-2% administrado a través de un tubo largo a un sistema de respiración abierto a una tasa de 0,4 l/min. Se conectó el catéter arterial a través de un tubo en T a un dispositivo de registro de presión y una bomba que administraba solución salina (tasa de 0,15 l/min) para impedir el bloqueo del catéter. Se colocaron las ratas en una bobina de RM para ratas (Rapid Biomedical, Alemania) y se obtuvieron imágenes usando una secuencia obtención de imágenes por RM de protón convencional para obtener información anatómica y para determinar la ubicación del tumor.

5.3 Obtención de imágenes por ¹³C-RM

Basándose en la frecuencia de protón encontrada por el sistema de RM, se calculó la frecuencia de RM para ¹³C₁-alanina según la siguiente ecuación:

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

La frecuencia calculada colocó la señal de RM que surgía de ¹³C₁-alanina en resonancia con ¹³C₁-lactato por la izquierda y resonando ¹³C₁-piruvato a la derecha de ¹³C₁-alanina. Se ejecutó una secuencia de espectroscopía de RM no localizada para garantizar que la bobina de ¹³C-RM y la frecuencia de RM del sistema se habían configurado correctamente. Se colocó la ubicación de la imagen de ¹³C para cubrir el tumor (grosor de corte de 10 mm, tamaño de píxel en plano de 5 x 5 mm²). En la fase de reconstrucción, se rellenaron con ceros los datos de imagen para dar como resultado una resolución de 2,5 x 2,5 x 10 mm³. Se inyectó ¹³C₁-piruvato en tampón TRIS (90 mM) a una dosis de 10 ml/kg durante un periodo de 12 s con un volumen mínimo de 2 ml en la cola de la vena y 30 s tras el inicio de la inyección (es decir 18 s tras terminar la inyección) se inició la secuencia de ¹³C-RM de desplazamiento químico.

5.4 Análisis de los datos de obtención de imágenes por RM

La obtención de imágenes por RM dio como resultado una matriz que contenía 16 x 16 elementos en la que cada elemento o vóxel/píxel contiene un espectro de ¹³C-RM. En la fase de reconstrucción, se rellenó con ceros la matriz hasta 32 x 32, una operación matemática que ayuda a mejorar la resolución espacial. El conjunto de datos que iba a analizarse contenía 1024 espectros según se exportó a formato Dicom[®] (DICOM es la marca registrada de la asociación nacional de fabricantes eléctricos para sus publicaciones de normas referentes a comunicaciones digitales de información médica) para su análisis adicional. Aproximadamente la mitad de estos espectros no contenían señales de RM ya que la posición de estos vóxeles estaba fuera del animal. Una ubicación dentro del animal reveló vóxeles con altas señales de piruvato y señal despreciable de lactato y alanina (acumulación de sangre) mientras que otros vóxeles mostraron piruvato, alanina y lactato aproximadamente con igual intensidad.

Se estimaron las amplitudes para piruvato, alanina y lactato usando procedimientos de ajuste en el dominio temporal que incluyeron lo siguiente: la fase de orden cero es constante a lo largo del conjunto de datos, la fase de primer orden es de 1,4 ms, se permite que la anchura de línea o amortiguamiento en el dominio temporal varíe entre 0,5 y 3 veces la anchura de línea promedio de todo el conjunto de datos para cada metabolito independientemente y se permite que la frecuencia varíe 20 Hz en ambos sentidos con respecto a la frecuencia promedio encontrada a lo

largo de todo el conjunto de datos para el pico más alto, que tiene que identificarlo el usuario.

Se registraron las amplitudes para lactato, alanina y piruvato en una matriz y volvieron a tomarse muestras para coincidir con la resolución de la imagen de RM anatómica de protón. Se proyectaron las imágenes de ^{13}C -RM sobre las imágenes anatómicas usando un procedimiento automatizado para obtener un resultado independiente del operario. Se presentaron visualmente los resultados en conjuntos de imágenes que contenían la imagen de protón anatómica del tumor en la rata, la imagen de ^{13}C metabólica para piruvato, lactato y alanina proyectada sobre la imagen anatómica, imágenes que mostraban para cada píxel

a) $([\text{lactato}]_{\text{norm}} \times ([\text{piruvato}]_{\text{máx}} - [\text{piruvato}]_{\text{norm}}) \times [\text{lactato}]$ y

b) $([\text{lactato}]_{\text{norm}} \times ([\text{alanina}]_{\text{máx}} - [\text{alanina}]_{\text{norm}}) \times [\text{lactato}]$

en las que el término $[\dots]_{\text{norm}}$ representa la amplitud normalizada, es decir ajustada a escala con respecto a su valor más alto en la imagen metabólica, y $[\text{lactato}]$ la amplitud calculada.

Un resultado satisfactorio para la distinción de tejido tumoral y tejido sano en una imagen de ^{13}C -RM metabólica se definió como una señal de lactato más alta en la zona del tumor o una razón ponderada alta de lactato con respecto a piruvato en la zona del tumor y una razón ponderada alta de lactato con respecto a alanina en la misma ubicación de píxel.

5.5 Análisis biológico

Se inspeccionaron visualmente los sitios de tumor para detectar signos de hemorragia. Se extirparon los tumores de los cuerpos de ratas, se pesaron y se cortaron por la mitad. Se inspeccionó visualmente el interior de los tumores evaluando la homogeneidad, necrosis y hemorragia. Se almacenaron los tejidos tumorales en formalina al 4%.

Se consideró que una rata portadora de tumor era apropiada para la evaluación si se cumplían los siguientes criterios: peso tumoral > 100 mg, sin necrosis visible ni quistes en el interior del tumor, una temperatura corporal superior a 35°C y una tensión arterial media superior a 60 mm de Hg en el momento de la investigación por RM.

5.6 Resultados

En total se obtuvieron imágenes de 30 tumores diferentes en 18 ratas. 1 rata no pasó, y 3 tumores no pasaron, los criterios biológicos descritos en el párrafo 5.5 anterior. Los 26 tumores restantes en 17 ratas eran homogéneos y tenían un interior no necrótico macizo. La polarización promedio de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato en el momento de la inyección fue del $21,2 \pm 2,9\%$ (media \pm DE) y el pH fue de $8,08 \pm 0,14$ (media \pm DE).

La figura 1 presenta un conjunto típico de imágenes de una rata de la que se obtuvieron imágenes con (1) la imagen de referencia de protón, en la que las flechas indican las ubicaciones de tumor, (2) la imagen de ^{13}C -piruvato, (3) la imagen de ^{13}C -lactato, (4) la imagen de ^{13}C -alanina, (5) la imagen de ^{13}C -lactato corregida con respecto a ^{13}C -piruvato y (6) la imagen de ^{13}C -lactato corregida con respecto a ^{13}C -alanina. Se fusionaron las imágenes (2) a (6) con la imagen de referencia de protón.

La figura 2 presenta el mismo conjunto de imágenes, sin embargo con las imágenes (2) a (6) sin fusionar con la imagen de protón anatómica.

Como resultado, la ubicación del tumor viene indicada por una señal de piruvato alta (2), debido a una alta actividad metabólica. Sin embargo la señal de lactato (3) identifica en última instancia la ubicación correcta del tumor. La alanina puede observarse en el músculo esquelético y está ausente en el tejido tumoral (4). Las imágenes de lactato corregidas con respecto a piruvato y alanina (5) y (6) también dan como resultado un excelente contraste para el tumor.

Por tanto, se demostró que la ubicación del tumor en las imágenes metabólicas viene indicada por una señal de lactato alta, una señal de lactato corregida con respecto a piruvato alta y una señal de lactato corregida con respecto a alanina alta.

El análisis de las imágenes de ^{13}C -RM metabólicas reveló un contraste metabólico en la zona del tumor en

- 24 de 26 tumores para la señal de lactato

- 26 de 26 tumores para la señal de lactato, corregida con respecto a piruvato (5.5, a))

- 26 de 26 tumores para la señal de lactato, corregida con respecto a alanina (5.5, b)).

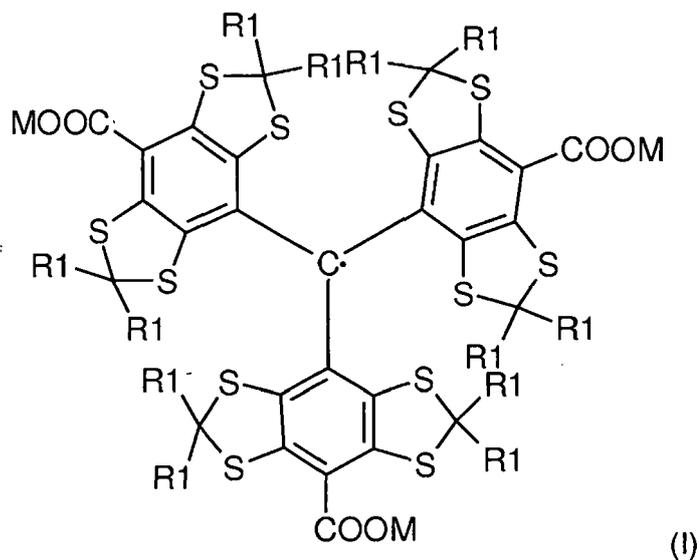
La tasa global de éxito para este estudio fue de 26 de 26, o el 100%.

Con este estudio se demostró que el $^{13}\text{C}_1$ -piruvato hiperpolarizado alcanza la región de interés (tumor) en un periodo de tiempo que hace posible obtener imágenes del compuesto, que pueden obtenerse imágenes del compuesto y de sus metabolitos y que puede obtenerse contraste metabólico.

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una composición líquida que comprende ^{13}C -piruvato hiperpolarizado, comprendiendo dicho método

5 a) formar una mezcla líquida que comprende un radical de fórmula (I), ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato y congelar la mezcla;



en la que

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

10 R1 que es igual o diferente representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ hidroxilado y/o alcoxilado, de cadena lineal o ramificado

b) potenciar la polarización nuclear de ^{13}C de ácido pirúvico y/o piruvato en la mezcla mediante DNP;

c) añadir un tampón y una base a la mezcla congelada para disolverla y convertir el ^{13}C -ácido pirúvico en un ^{13}C -piruvato para obtener una composición líquida o, cuando sólo se usa ^{13}C -piruvato en la etapa a), añadir un tampón a la mezcla congelada para disolverla para obtener una composición líquida; y

15 d) opcionalmente eliminar el radical y/o los productos de reacción del mismo de la composición líquida.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el radical es un radical de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable y R1 es igual o diferente y representa hidroximetilo, hidroxietilo o R1 es igual o diferente y representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxilado de cadena lineal o ramificado que porta un grupo hidroxilo terminal o R1 es igual o diferente y representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxilado de cadena lineal o ramificado.

20

3. Método según la reivindicación 2, en el que R1 es igual y representa un grupo hidrocarbonado $\text{C}_1\text{-C}_4$ alcoxilado de cadena lineal o ramificado, preferiblemente metoxilo, $-\text{CH}_2\text{-OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{-OC}_2\text{H}_5$ o $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OCH}_3$.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato está isotópicamente enriquecido en la posición C1, en la posición C2, en la posición C3, en la posición C1 y C2, en la posición C1 y C3, en la posición C2 y C3 o en la posición C1, C2 y C3, preferiblemente en la posición C1.

25

5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el enriquecimiento isotópico de ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato es de al menos el 75%, preferiblemente de al menos el 90%.

6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tampón es un tampón seleccionado del grupo que consiste en tampón fosfato, ACES, PIPES, imidazol/HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, HEPPS y TRICIN, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en tampón fosfato y TRIS.

30

7. Método según las reivindicaciones 1-6, en el que se usa ^{13}C -ácido pirúvico en la etapa a) y, en el que en la

etapa c) el tampón y la base se combinan en una disolución.

8. Método según las reivindicaciones 1-6, en el que se usa ^{13}C -ácido pirúvico en la etapa a) y la base es NaOH.
9. Método según las reivindicaciones 1-8, en el que la etapa d) es obligatoria.
- 5 10. Método según la reivindicación 9 para la producción de una composición para su uso como agente de obtención de imágenes para la obtención de imágenes por RM *in vivo* de un cuerpo de ser humano o animal no humano.
11. Composición que comprende ^{13}C -ácido pirúvico y/o ^{13}C -piruvato y un radical de fórmula (I).
- 10 12. Composición según la reivindicación 11, que comprende ^{13}C -ácido pirúvico y un radical de fórmula (I) en la que M representa hidrógeno o sodio y R1 es igual y representa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCH}_3$.
13. Uso de la composición según las reivindicaciones 11 y 12 para la producción de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado.

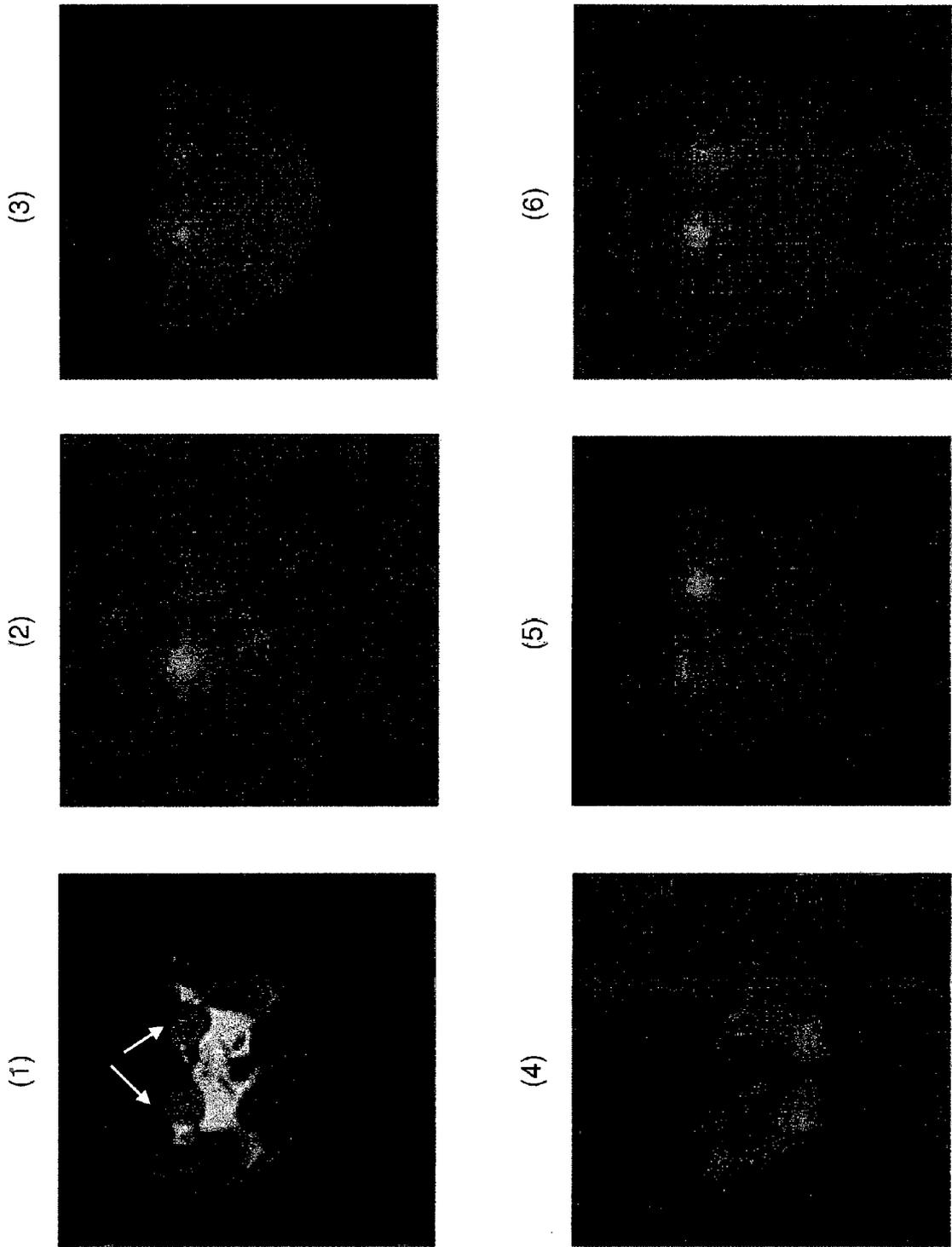


Fig. 1

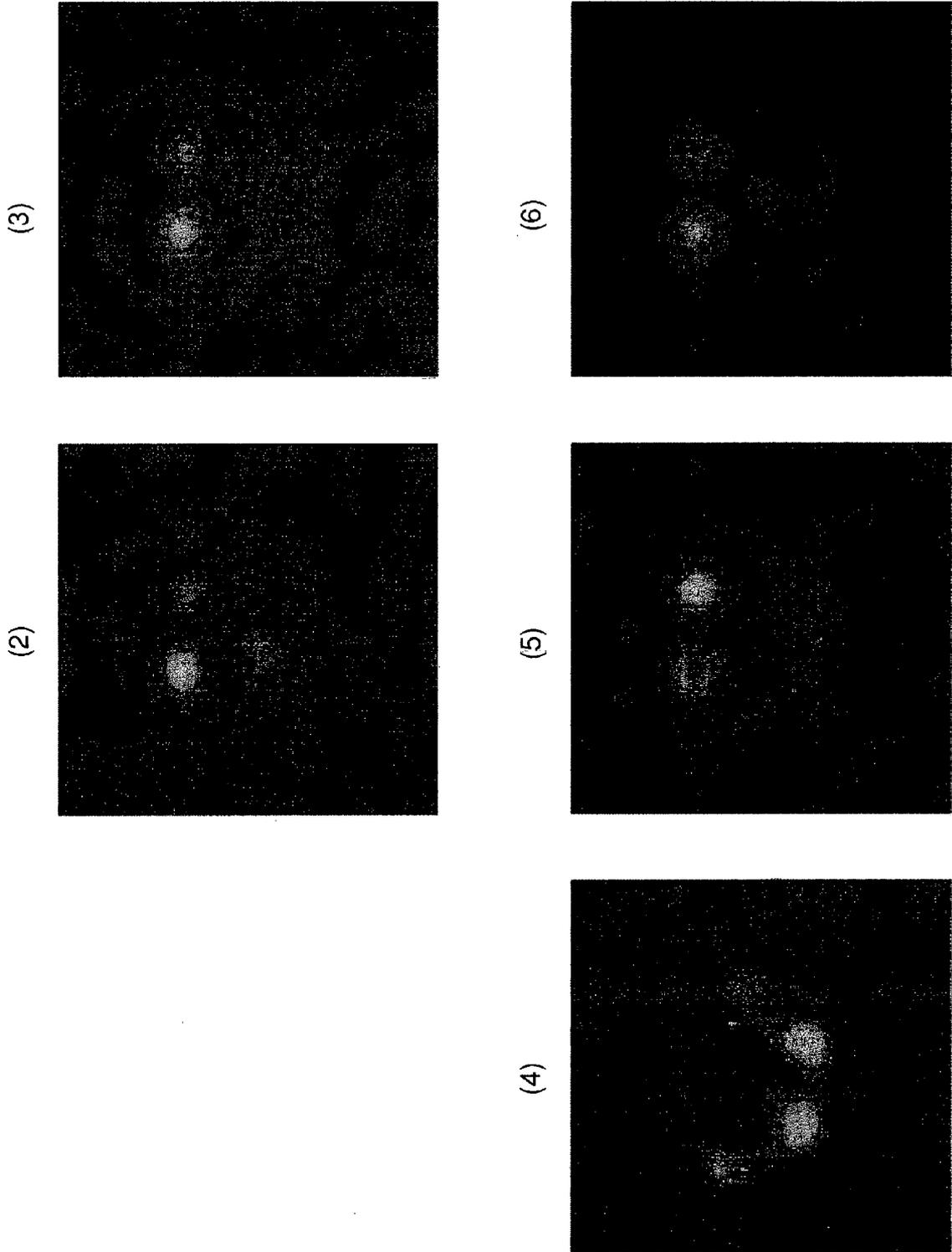


Fig. 2