

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 377**

51 Int. Cl.:

C07D 519/00 (2006.01)

A61B 5/055 (2006.01)

G01R 33/56 (2006.01)

G01R 33/62 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2005 E 05771195 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1805186**

54 Título: **Radicales y su uso como agentes paramagnéticos en un proceso de polarización nuclear dinámica**

30 Prioridad:

30.07.2004 NO 20043227

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

10.09.2015

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 2 545 377 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

Radicales y su uso como agentes paramagnéticos en un proceso de polarización nuclear dinámica

5 La invención se refiere a nuevos radicales, su uso como agentes paramagnéticos en un método para la polarización nuclear dinámica y un método para la polarización nuclear dinámica de compuestos que comprenden grupos carboxilo.

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

15 La imagenología de tumores por RM se puede llevar a cabo con o sin agentes de contraste de RM. En una imagen de RM tomada sin agente de contraste, los tumores de aproximadamente 1-2 centímetros de tamaño y mayores se mostrarán de forma bastante clara. Sin embargo, la IRM aumentada por contraste permite que se detecten cambios en tejidos muchos menores, es decir, tumores mucho más pequeños lo que hace la imagenología de RM aumentada por contraste una herramienta potente para la detección de tumores de estadio temprano y la detección de
20 metástasis.

Se han usado varios tipos de agentes de contraste en imagenología de tumores por RM. Los quelatos metálicos paramagnéticos solubles en agua, por ejemplo quelatos de gadolinio como Omniscan™ (Amersham Health) son agentes de contraste de RM muy usados. Debido a su bajo peso molecular se distribuyen rápidamente en el espacio
25 extracelular (es decir, la sangre y el intersticio) si se administran en la vasculatura. También se depuran relativamente rápido del cuerpo. Se ha encontrado que los quelatos de gadolinio son especialmente útiles en aumentar la tasa de detección de metástasis, pequeños tumores, y mejorar la clasificación de tumores, lo último al permitir la diferenciación de tejido tumoral vital (bien perfundido y/o barrera hematoencefálica alterada) de necrosis central y del edema circundante o tejido no implicado macroscópicamente (véase, por ejemplo, C. Cläussen et al.,
30 Neuroradiology 1985; 27: 164-171).

Por otra parte, los agente de contraste de RM intravasculares, por ejemplo partículas de óxido de hierro superparamagnéticas, se retienen en la vasculatura durante un tiempo prolongado. Han demostrado ser extremadamente útiles para aumentar el contraste en el hígado pero también para detectar anomalías de
35 permeabilidad capilar, por ejemplo, paredes capilares "permeables" en tumores, por ejemplo, como resultado de angiogénesis.

A pesar de las excelentes propiedades indiscutibles de los agentes de contraste anteriormente mencionados su uso no está exento de riesgos. Aunque los complejos de quelatos metálicos paramagnéticos tienen habitualmente
40 constantes de estabilidad altas, es posible que se liberen iones metálicos tóxicos en el cuerpo después de la administración. Además, este tipo de agentes de contraste muestra mala especificidad.

El documento WO-A-99/35508 divulga un método de investigación de RM de un paciente usando una solución hiperpolarizada de un agente de T_1 alto como agente de contraste de IRM. El término "hiperpolarización" significa
45 aumentar la polarización nuclear de núcleos activos de RMN presentes en el agente de T_1 alto, es decir, núcleos con espín nuclear no cero, preferiblemente núcleos de ^{13}C o ^{15}N . Al aumentar la polarización nuclear de los núcleos activos de RMN, la diferencia de población entre los estados de espín nuclear excitado y fundamental de estos núcleos aumenta significativamente y por tanto la intensidad de la señal de RM se amplifica por un factor de cien o más. Cuando se usa un agente de T_1 alto enriquecido en ^{13}C y/o ^{15}N , esencialmente no habrá interferencia de
50 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 divulgan una variedad de posibles agentes de T_1 alto adecuados para la hiperpolarización y posterior uso como agentes de contraste de RM incluyendo, pero no limitado a compuestos no endógenos y endógenos como acetato, piruvato, oxalato o gluconato, azúcares como glucosa o fructosa, urea, amidas, aminoácidos como glutamato, glicina, cisteína o aspartato, nucleótidos, vitaminas como ácido ascórbico,
55 derivados de penicilina y sulfonamidas. Se indica además que intermedios en ciclos metabólicos tal como el ciclo del ácido cítrico como ácido fumárico y ácido pirúvico son agentes de contraste preferidos para la imagenología de actividad metabólica.

Se debe subrayar que la señal de un agente de contraste hiperpolarizado decae debido a la relajación y - tras
60 administración al cuerpo del paciente - dilución. Por tanto, el valor de T_1 de los agentes de contraste en líquidos biológicos (por ejemplo, sangre) debe ser lo suficientemente largo para permitir que el agente se reparta en el sitio diana en el cuerpo del paciente en un estado muy polarizado. Aparte del agente de contraste que tiene un valor de T_1 alto, es extremadamente favorable alcanzar un alto nivel de polarización.

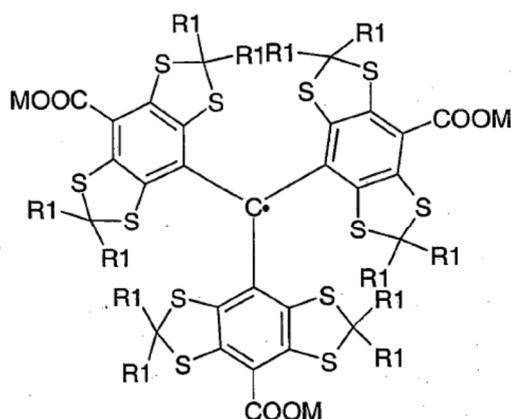
65 Se divulgan varias técnicas de hiperpolarización en el documento WO-A-99/35508 una de ellas es la técnica de polarización nuclear dinámica (DNP) en la que la polarización de la muestra se efectúa por un compuesto

paramagnético, el denominado agente paramagnético o agente de DNP. Durante el proceso de DNP, se suministra energía, normalmente en forma de radiación de microondas, lo que inicialmente excitará el agente paramagnético. Al decaer al estado fundamental, hay una transferencia de polarización del electrón desapareado del agente paramagnético a los núcleos activos de RMN de la muestra. Generalmente, se usan un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja en el proceso de DNP, por ejemplo, llevando a cabo el proceso de DNP en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o por encima. Alternativamente, se pueden emplear un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se alcance suficiente aumento de polarización. La técnica de DNP se describe, por ejemplo, en el documento WO-A-98/58272 y en el documento WO-A-01/96895.

El agente paramagnético desempeña un papel decisivo en el proceso de DNP y su elección tiene un impacto principal en el nivel de polarización alcanzada. Se conocen una variedad de agentes paramagnéticos - en el documento WO-A-99/35508 indicados como "agentes de contraste OMRI" - por ejemplo, radicales libres orgánicos o partículas magnéticas basadas en oxígeno, basadas en azufre o basadas en carbono a las 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.

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que el uso de ciertos radicales como agentes paramagnéticos en la polarización nuclear dinámica de compuestos que comprenden grupos carboxilo permite obtener niveles de polarización notablemente altos.

Por tanto, visto desde un aspecto, la presente invención proporciona un método para la polarización nuclear dinámica (DNP) de un compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo caracterizado en que un radical de fórmula (I)



en donde

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

R1 que es igual o diferente representa un grupo alquilo de C₁-C₆ de cadena lineal o ramificado o un grupo -(CH₂)_n-X-R₂, en donde n es 1, 2, o 3; X es O o S y R₂ es un grupo alquilo de C₁-C₄ de cadena lineal o ramificado,

se usa como agente paramagnético en dicho proceso de DNP.

El método según la invención produce altos niveles de polarización en los compuestos que se van a polarizar. La hiperpolarización de los compuestos que desempeñan un papel en los procesos metabólicos en el cuerpo humano y animal no humano es de gran interés, ya que estos compuestos hiperpolarizados se pueden usar para conseguir información sobre el estado metabólico de un tejido en una investigación de RM *in vivo*, es decir, son potencialmente útiles como agentes de imagenología para imagenología de RM *in vivo* de actividad metabólica. La información del estado metabólico de un tejido se podría por ejemplo usar para distinguir entre tejido sano y tumoral, haciendo de esta manera los compuestos polarizados que desempeñan un papel en procesos metabólicos potencialmente útiles como agentes de imagenología para imagenología tumoral por RM *in vivo*.

Muchos de los compuestos que desempeñan un papel en procesos metabólicos en el cuerpo humano o animal no humano muestran una alta reactividad química. Se ha encontrado ahora que radicales de fórmula (I) son especialmente útiles en la DNP de tales compuestos ya que los radicales de fórmula (I) muestran reactividad muy baja hacia estos tipos de compuestos. Además, se ha encontrado que un contacto estrecho entre el radical de fórmula (I) y el compuesto que se va a polarizar produce una mejora en el nivel de polarización. La solubilidad de un radical está dictada hasta un nivel considerable por el pH en el medio de disolución y se ha encontrado que los radicales de fórmula (I) tienen buena solubilidad en un intervalo de pH particularmente útil en la formulación de estos

tipos de compuestos. En particular, los compuestos que desempeñan un papel en el proceso metabólico con frecuencia comprenden uno o más grupos carboxilo. Se encuentra que los radicales de fórmula (I) son estables hacia los compuestos que comprenden grupos carboxilo y los radicales son bien fácilmente solubles en compuestos que comprenden grupos carboxilo o una solución de un radical de fórmula (I) y un compuesto que comprende grupos carboxilo se puede preparar fácilmente usando solventes o mezclas de solventes apropiados.

En una forma de realización preferida, se usa un radical de fórmula (I) en el método según la invención en donde M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable. El término "catión fisiológicamente tolerable" indica un catión que es tolerado por el cuerpo vivo 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 forma de realización preferida adicional, se usa un radical de fórmula (I) en el método según la invención en donde R1 es igual o diferente, más preferiblemente un grupo alquilo de C₁-C₄ de cadena lineal o ramificado, lo más preferiblemente metilo, etilo o isopropilo.

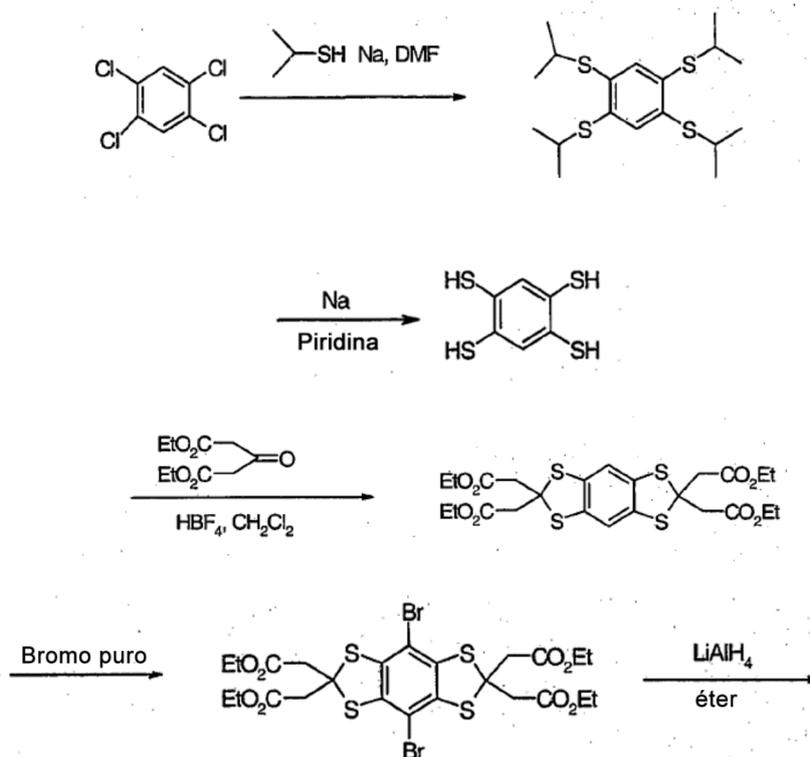
En una forma de realización preferida adicional, se usa un radical de fórmula (I) en el método según la invención en donde R1 es igual o diferente, preferiblemente el mismo y representa -CH₂-OCH₃, -CH₂-OC₂H₅, -CH₂-CH₂-OCH₃, -CH₂-SCH₃, -CH₂-SC₂H₅ o -CH₂-CH₂-SCH₃, lo más preferiblemente -CH₂-CH₂-OCH₃.

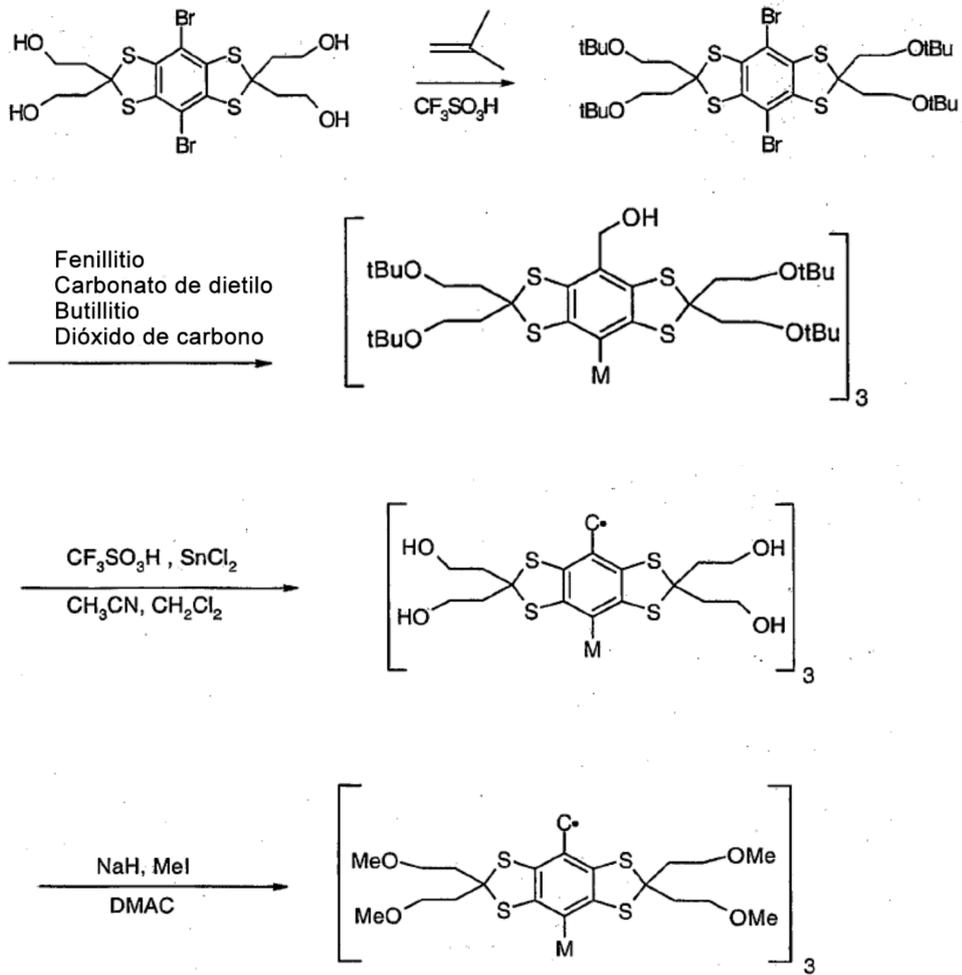
En una forma de realización más preferida, M representa hidrógeno o sodio y R1 es el mismo y representa -CH₂-CH₂-OCH₃.

Los radicales usados en el método de la invención se pueden sintetizar como se describe en detalle en los documentos WO-A-91/12024 y WO-A-96/39367. Brevemente, los radicales se pueden sintetizar haciendo reaccionar tres equivalentes molares de un compuesto arilo monomérico metalado con un equivalente molar de un derivado de ácido carboxílico adecuadamente protegido para formar un intermedio trimérico. Este intermedio se metala y posteriormente se hace reaccionar con, por ejemplo, dióxido de carbono para producir un tritilcarbinol tricarbóxico que, en un paso adicional, se trata con un ácido fuerte para generar un catión triarilmetilo. Este catión se reduce después para formar el radical titilo estable.

Para la síntesis del radical de fórmula (I), en donde M es hidrógeno o sodio y R1 es el mismo y representa -CH₂-CH₂-OCH₃, se pueden usar los siguientes esquemas de reacción y el ejemplo 1, respectivamente:

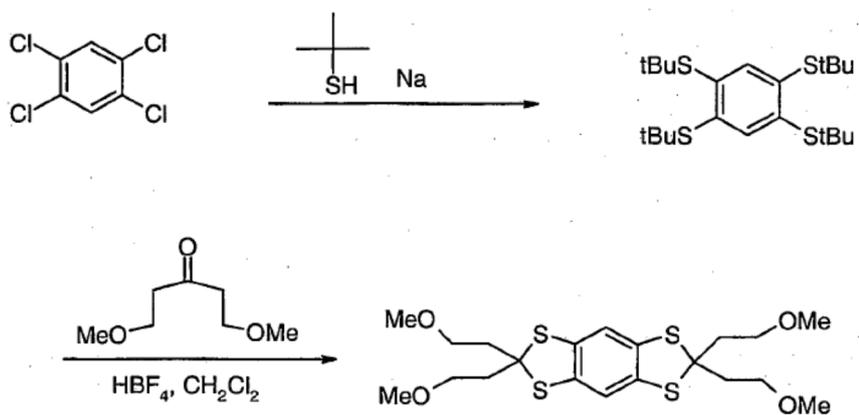
Esquema de reacción 1:

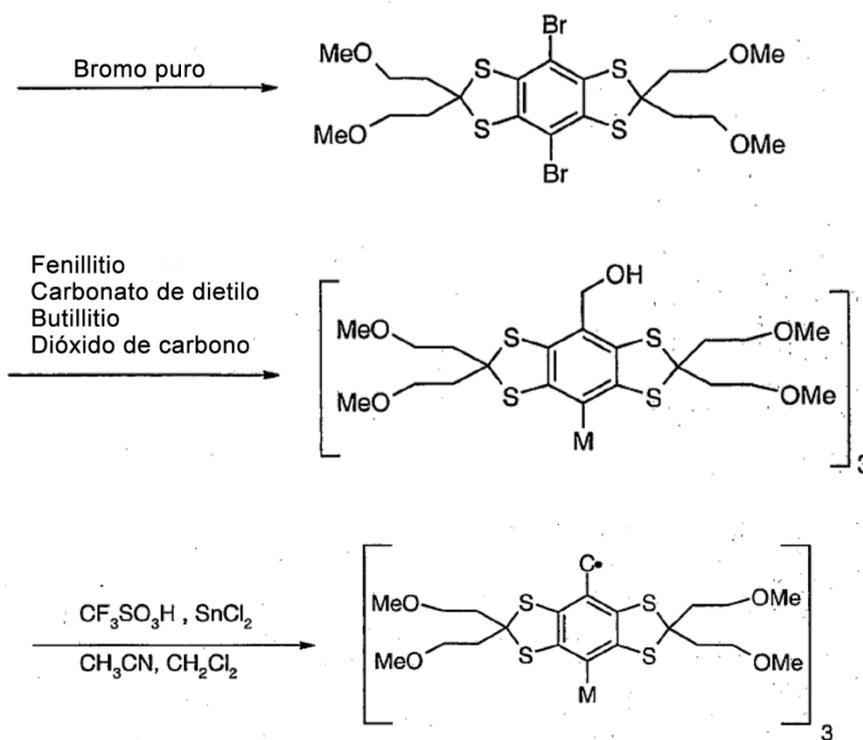




5

Esquema de reacción 2:





- 5 En una forma de realización preferida del método de la invención, el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo es un compuesto endógeno, más preferiblemente un compuesto que desempeña un papel en un proceso metabólico en el cuerpo humano o animal no humano.
- 10 Los compuestos preferidos que comprenden uno o más grupos carboxilo son aminoácidos ácidos como por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico, estos aminoácidos están implicados en el metabolismo de proteínas. Compuestos preferidos adicionales son ácido acético, ácido acetoacético y ácido hidroxibutírico, estos ácidos están implicados en el metabolismo de grasas. Otros compuestos preferidos son ácido láctico y ácido pirúvico que están implicados en el metabolismo de energía y ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico y ácido málico que son intermedios del ciclo del ácido cítrico. Compuestos preferidos adicionales son ácido ascórbico y ácidos grasos, preferiblemente ácido palmítico y ácido oleico.

Los compuestos que comprenden uno o más grupo carboxilo usados en el método de la invención son preferiblemente compuestos isotópicamente enriquecidos, el enriquecimiento isotópico es un enriquecimiento isotópico del núcleos de espín no cero (núcleos activos de RM), preferiblemente ¹⁵N y/o ¹³C, más preferiblemente ¹³C. El enriquecimiento isotópico puede incluir bien enriquecimientos selectivos de uno o más sitios en la molécula del compuesto o enriquecimiento uniforme de todos los sitios. El enriquecimiento se puede lograr, por ejemplo, por síntesis química o marcaje biológico, ambos métodos se conocen en la técnica y los métodos apropiados se pueden elegir dependiendo del compuesto que se va enriquecer isotópicamente.

Preferiblemente, el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo usados en el método de la invención se enriquece isotópicamente en solo una posición de la molécula, preferiblemente con un enriquecimiento de al menos el 10%, más adecuadamente al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 75%, y lo más preferiblemente al menos el 90%. Idealmente, el enriquecimiento es el 100%.

La posición óptima para el enriquecimiento isotópico en el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo usado en el método de la invención depende del tiempo de relajación de los núcleos activos de RM. Preferiblemente, los compuestos están isotópicamente enriquecidos en posiciones con un tiempo de relajación T₁ largo. Se usan preferiblemente compuestos enriquecidos en ¹³C en un átomo de C carboxilo, un átomo de C carbonilo o un átomo de C cuaternario. Si se polariza ácido pirúvico según el método de la invención, se puede enriquecer isotópicamente en la posición C1 (ácido ¹³C₁-pirúvico), en la posición C2 (ácido ¹³C₂-pirúvico), en la posición C3 (ácido ¹³C₃-pirúvico), en la posición C1 y C2, (ácido ¹³C_{1,2}-pirúvico), en la posición C1 y C3, (ácido ¹³C_{1,3}-pirúvico), en la posición C2 y C3, (ácido ¹³C_{2,3}-pirúvico) o en la posición C1, C2 y C3 (ácido ¹³C_{1,2,3}-pirúvico); siendo la posición C1 la preferida para el enriquecimiento isotópico en ¹³C.

40

Se conocen varios métodos para la síntesis de ácido ^{13}C -pirúvico en la técnica. Brevemente, Seebach et al., Journal of Organic Chemistry 40(2), 1975, 231-237 describe una ruta sintética que se basa en la protección y activación de un material de partida que contiene carbonilo como un S-S-acetal, por ejemplo, 1,3-ditiano o 2-metil-1,3-ditiano. El ditiano se metala y reacciona con un compuesto que contiene metilo y/o $^{13}\text{CO}_2$. Usando el componente isotópicamente enriquecido en ^{13}C apropiado como se esboza en esta referencia, es posible obtener ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico, ácido $^{13}\text{C}_2$ -pirúvico o ácido $^{13}\text{C}_{1,2}$ -pirúvico. Una ruta sintética diferente empieza de ácido acético, que primero se convierte en bromuro de acetilo y después se hace reaccionar con Cu^{13}CN . El nitrilo obtenido se convierte 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, el ácido ^{13}C -pirúvico se puede obtener protonando ^{13}C -piruvato de sodio comercialmente disponible, por ejemplo, por el método descrito en la patente en EE UU 6.232.497.

En una forma de realización preferida adicional, los compuestos que comprenden uno o más grupos carboxilo usados en el método de la invención son líquidos a temperatura ambiente, como por ejemplo, ácido pirúvico o ácido láctico y el radical de fórmula (I) se elige de modo que sea soluble en el compuesto líquido. Esto producirá una solución de compuesto/radical concentrada sin la necesidad de que estén presentes solventes adicionales en la mezcla. En una forma de realización más preferida del método de la invención, el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo es ácido ^{13}C -pirúvico, preferiblemente ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico y el radical de fórmula (I) es un radical en donde M es hidrógeno o sodio y R1 es el mismo y representa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCH}_3$.

Si el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo usado en el método de la invención es sólido a temperatura ambiente, se puede fundir y el compuesto fundido se puede mezclar después con el radical de fórmula (I) para disolver el radical en el compuesto fundido. Posteriormente, la solución se enfría y/o congela, preferiblemente de tal manera que se impide la cristalización del compuesto que se va a polarizar. La refrigeración/congelación se puede alcanzar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, congelando la solución en nitrógeno líquido o simplemente colocándola en el polarizador de DNP, donde el helio líquido congelará la solución. En otra forma de realización, el compuesto sólido que comprende uno o más grupos carboxilo se puede disolver en un solvente adecuado o mezcla de solventes, preferiblemente en un solvente que es un buen formador de vidrio y previene la cristalización al refrigerar/congelar. Los formadores de vidrio adecuados son por ejemplo glicerol, propanodiol o glicol. El compuesto disuelto se mezcla después con el radical de fórmula (I) y la solución se enfría y/o congela para el proceso de DNP. La mezcla estrecha se puede fomentar además por varios medios conocidos en la técnica, tal como agitación, agitación vigorosa o sonicación.

La técnica de DNP se describe, por ejemplo en los documentos WO-A-98/58272 y WO-A-01/96895, ambos se incluyen mediante referencia en el presente documento. Generalmente, un campo magnético moderado o alto y una temperatura muy baja se usan en el proceso de DNP, por ejemplo, llevando a cabo el proceso de DNP en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o por encima. Alternativamente, se pueden emplear un campo magnético moderado y cualquier temperatura a la que se alcance suficiente aumento de la polarización. En una forma de realización preferida, el proceso de DNP se lleva a cabo en helio líquido y un campo magnético de aproximadamente 1 T o por encima. Las unidades de polarización adecuadas se describen, por ejemplo en el documento WO-A-02/37132. En una forma de realización preferida, la unidad de polarización comprende un criostato y medios de polarización, por ejemplo, una cámara de microondas conectada por una guía de ondas a una fuente de microondas en un agujero central rodeado por medios productores de campo magnético tal como un imán superconductor. El agujero se extiende verticalmente hacia abajo hasta al menos el nivel de una región P cerca del imán superconductor donde la fuerza del campo magnético es lo suficientemente alta, por ejemplo entre 1 y 25 T, para que la polarización de los núcleos de ^{13}C tenga lugar. El agujero de la muestra es preferiblemente sellable y se puede vaciar a presiones bajas, por ejemplo, presiones en el orden de 1 mbar o menos. Un medio de introducción de la muestra (es decir, la mezcla congelada de compuesto/radical) tal como un tubo transportador de muestra eliminable puede estar contenido dentro del agujero y este tubo se puede insertar desde la parte superior del agujero hacia abajo hasta una posición dentro de la cámara de microondas en la región P. La región P se enfría por helio líquido a una temperatura lo suficientemente baja 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. El medio introductor de la muestra es preferiblemente sellable en su extremo superior y en cualquier modo adecuado para retener el vacío parcial en el agujero. Un contenedor que retiene la muestra, tal como una copa de retención de la muestra, se puede ajustar de forma eliminable dentro del extremo inferior del medio introductor de la muestra. El contenedor de retención de la muestra preferiblemente está hecho de un material de peso ligero con una baja capacidad calorífica específica y buenas propiedades criogénicas tal como, por ejemplo, Kelf (policlorotrifluoroetileno) o PEEK (polietilentercetona) y se puede diseñar de tal modo que pueda contener más de una muestra.

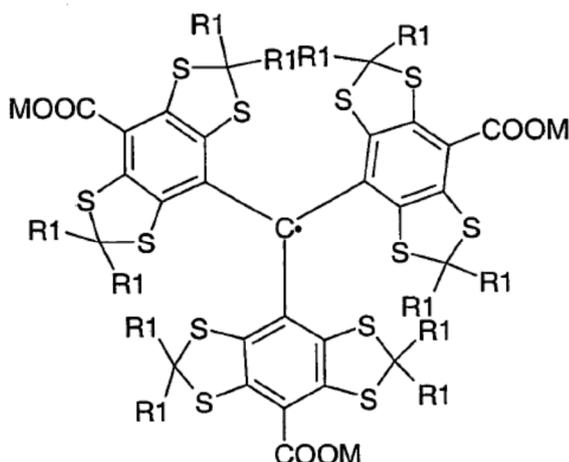
La muestra se inserta en el contenedor de retención de muestra, se sumerge en el helio líquido y se irradia con microondas, preferiblemente a una frecuencia de aproximadamente 94 GHz a 200 mW. El nivel de polarización se puede seguir por ejemplo, adquiriendo señales de RMN de ^{13}C y/o ^{15}N de estado sólido de la muestra durante la irradiación de microondas, dependiendo del compuesto que se va a polarizar. Generalmente, se obtiene una curva de saturación en un gráfico que muestra la señal de RMN frente al tiempo. Por tanto, es posible determinar cuándo se alcanza un nivel óptimo de polarización.

Si el compuesto polarizado según el método de la invención se usa como un agente de imagenología de RM, preferiblemente se transfiere desde un compuesto hiperpolarizado sólido o un compuesto hiperpolarizado líquido, bien disolviéndolo después del proceso de DNP en un solvente apropiado, por ejemplo un soporte acuoso fisiológicamente tolerable como un tampón, la disolución se describe, por ejemplo, en el documento WO-A-02/37132 o fundiéndolo, como se describe, por ejemplo, en el documento WO-A-02/36005.

Además, el radical y o los productos de reacción del mismo se pueden eliminar del compuesto hiperpolarizado líquido. Los métodos utilizables para eliminar, parcial, sustancial o completamente el radical y/o los productos de reacción del mismo se conocen en la técnica. Generalmente, los métodos aplicables dependen de la naturaleza del radical y/o sus productos de reacción. Tras la disolución del compuesto hiperpolarizado sólido, el radical podría precipitar y se puede separar fácilmente del líquido por filtración. Si no produce precipitación, el radical se puede eliminar por técnicas de separación cromatográficas, por ejemplo, cromatografía de fase líquida como fase invertida, fase directa o cromatografía de intercambio iónico o por extracción.

Como los radicales de fórmula (I) tienen un espectro de absorción UV/visible característico, es posible usar medidas de absorción UV/visible como un método para comprobar su existencia en el líquido después de su eliminación. Para obtener resultados cuantitativos, es decir, la concentración del radical presente en el líquido, el espectrómetro óptico se puede calibrar de tal manera que la absorción a una longitud de onda específica de una muestra del líquido proporcione la correspondiente concentración del radical en la muestra. La eliminación del radical y/o los productos de reacción del mismo es especialmente preferida si el compuesto líquido hiperpolarizado se usa como un agente de contraste para imagenología de RM *in vivo* en un cuerpo humano o animal no humano.

Aún otro aspecto de la invención son nuevos radicales de la fórmula (I),



en donde

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

R1 que es el mismo o diferente representa $-(CH_2)_n-X-R_2$,

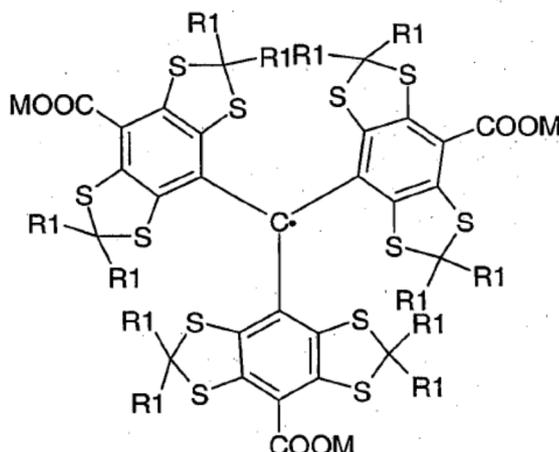
en donde n es 1, 2, o 3;

X es O o S; y

R2 es un grupo alquilo de C₁-C₄ de cadena lineal o ramificado.

Los radicales preferidos de fórmula (I) son radicales en donde M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable, preferiblemente un catión alcalino, un ión amonio o un ión de amina orgánica. Los radicales preferidos adicionales de fórmula (I) son los radicales en donde R1 es el mismo y representa $-CH_2-OCH_3$, $-CH_2-OC_2H_5$, $-CH_2-CH_2-OCH_3$, $-CH_2-SCH_3$, $-CH_2-SC_2H_5$ o $-CH_2-CH_2-SCH_3$, lo más preferiblemente $-CH_2-CH_2-OCH_3$. Los radicales más preferidos de fórmula (I) son los radicales en donde M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable, preferiblemente sodio y R1 es el mismo y representa $-CH_2-CH_2-OCH_3$.

Aún otro aspecto de la invención son composiciones que comprenden un compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo y un nuevo radical de fórmula (I), es decir un radical de fórmula (I)



en donde

M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

5

R1 que es igual o diferente representa $-(CH_2)_n-X-R_2$,

en donde n es 1, 2, o 3;

10 X es O o S; y

R2 es un grupo alquilo de C_1-C_4 de cadena lineal o ramificado.

Ejemplos

15

Ejemplo 1: Síntesis de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(metoxietil)benzo-[1,2-4,5']bis-(1,3)ditiol-4-il)metilo sal sódica

20

Se resuspendieron 10 g de tris(8-carboxi-2,2,6,6-(tetra(hidroxi)etil)benzo-[1,2-4,5']bis-(1,3)ditiol-4-il)metilo sal sódica que se había sintetizado según el ejemplo 7 del documento WO-A-98/39277 en 280 ml de dimetilacetamida en una atmósfera de argón. Se añadió hidruro de sodio (2,75 g) seguido por yoduro de metilo (5,2 ml) y la reacción que es ligeramente exotérmica se dejó seguir durante 1 hora en un baño de agua a 34°C durante 60 min. La adición de hidruro de sodio y yoduro de metilo se repitió dos veces con las mismas cantidades de cada uno de los compuestos y después de la adición final, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 68 horas y después se echó en 500 ml de agua. El pH se ajustó a $pH > 13$ usando 40 ml de NaOH (ac) 1 M y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas para hidrolizar los ésteres metílicos formados. La mezcla se acidificó después usando 50 ml de HCl (ac) 2 M hasta un pH de aproximadamente 2 y se extrajo 3 veces con acetato de etilo (50 ml y 2 x 200 ml). La fase orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 y después se evaporó a sequedad. El producto crudo (24 g) se purificó por HPLC preparativa usando acetonitrilo/agua como eluyentes. Las fracciones recogidas se evaporaron para eliminar el acetonitrilo. La fase acuosa restante se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y después se evaporó a sequedad. Se añadió agua (200 ml) al residuo y el pH se ajustó cuidadosamente con NaOH (ac) 0,1 M a 7, disolviéndose lentamente el residuo durante este proceso. Después de la neutralización, la solución acuosa se liofilizó.

25

30

35 Ejemplo 2: Producción de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado usando ácido ^{13}C -pirúvico y el radical del ejemplo 1

Se preparó una solución 20 mM disolviendo 5,0 mg del radical del ejemplo 1 en ácido $^{13}C_1$ -pirúvico (164 μ l). La muestra se mezcló a homogeneidad y una alícuota de la solución (41 mg) se colocó en una copa de muestra y se insertó en el polarizador de DNP.

40

La muestra se polarizó en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T con irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 2 horas la polarización se paró y la muestra se disolvió usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) para proporcionar una solución neutra de $^{13}C_1$ -piruvato de sodio. La muestra disuelta se analizó rápidamente con ^{13}C -RMN para evaluar la polarización y se obtuvo un 19,0% de polarización de ^{13}C .

45

Ejemplo 3: Producción de ^{13}C -piruvato hiperpolarizado usando ácido ^{13}C -pirúvico y el radical del ejemplo 1

ES 2 545 377 T3

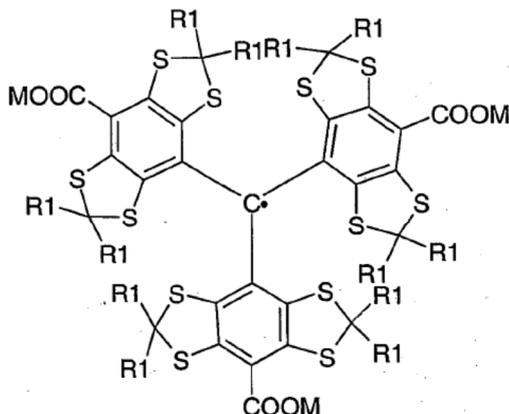
Se preparó una solución 15 mM disolviendo el radical del ejemplo 1 (209,1 mg) en una mezcla de ácido $^{13}\text{C}_1$ -pirúvico (553 mg) y ácido pirúvico sin marcar (10,505 g). La muestra se mezcló a homogeneidad y una alícuota de la solución (2,015 g) se colocó en una copa de muestra y se insertó en el polarizador de DNP.

- 5 La muestra se polarizó en condiciones de DNP a 1,2 K en un campo magnético de 3,35 T con irradiación con microondas (93,950 GHz). Después de 4 horas la polarización se paró y la muestra se disolvió usando un dispositivo de disolución según el documento WO-A-02/37132 en una solución acuosa de hidróxido de sodio y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) para proporcionar una solución neutra de $^{13}\text{C}_1$ -piruvato de sodio hiperpolarizado con una concentración total de piruvato de 0,5 M en tampón TRIS 100 mM. Se conectó una columna de cromatografía en serie con el dispositivo de disolución. La columna consiste en un cartucho (D = 38 mm; h = 10 mm) que contiene material de empaquetado hidrofóbico (Bondesil-C18, 40UM Part #:12213012) suministrado por Varian. La muestra disuelta se forzó a través de la columna que adsorbió selectivamente el radical. La solución filtrada se analizó rápidamente con ^{13}C -RMN para evaluar la polarización, se obtuvo un 16,5% de polarización de ^{13}C . La concentración residual del radical se analizó posteriormente con un espectrofotómetro de UV a 469 nm y se determinó que estaba por debajo del límite de detección de 0,1 μM .
- 10
- 15

REIVINDICACIONES

1. Método para la polarización nuclear dinámica (DNP) de un compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo **caracterizado en que** un radical de fórmula (I)

5



en donde

- 10 M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

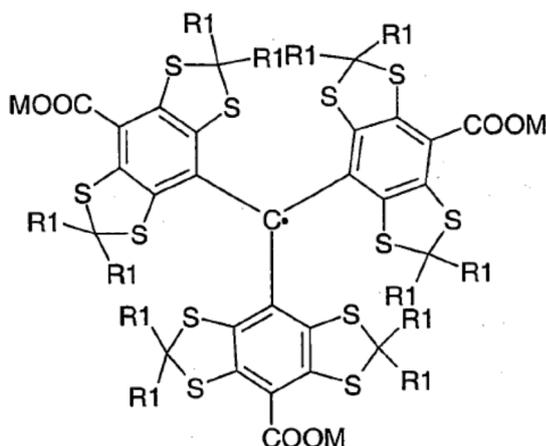
R1 que es el mismo o diferente representa un grupo alquilo de C₁-C₆ de cadena lineal o ramificado o un grupo -(CH₂)_n-X-R2, en donde n es 1, 2, o 3; X es O o S y R2 es un grupo alquilo de C₁-C₄ de cadena lineal o ramificado,

15

se usa como agente paramagnético en dicho proceso de DNP.

2. Método según la reivindicación 1 **caracterizado en que** se usa un radical de fórmula (I) en donde M representa hidrógeno o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable.
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2 **caracterizado en que** se usa un radical de fórmula (I) en donde M representa hidrógeno, un catión alcalino, preferiblemente sodio, un ión amonio o un ión de amina orgánica.
4. Método según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado en que** se usa un radical de fórmula (I) en donde R1 es el mismo.
5. Método según las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado en que** se usa un radical de fórmula (I) en donde R1 es el mismo y representa un grupo alquilo de C₁-C₄ de cadena lineal o ramificado, preferiblemente metilo, etilo o isopropilo.
6. Método según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado en que** se usa un radical de fórmula (I) en donde R1 es el mismo y representa -CH₂-OCH₃, -CH₂-OC₂H₅, -CH₂-CH₂-OCH₃, -CH₂-SCH₃, -CH₂-SC₂H₅ o -CH₂-CH₂-SCH₃, preferiblemente -CH₂-CH₂-OCH₃.
7. Método según las reivindicaciones 1 a 6 en donde el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo es un compuesto endógeno, preferiblemente un compuesto endógeno que desempeña un papel en un proceso metabólico en el cuerpo humano o animal no humano.
8. Método según las reivindicaciones 1 a 7 en donde el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos ácidos, ácido acético, ácido acetoacético, ácido hidroxibutírico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico y ácidos grasos.
9. Método según las reivindicaciones 1 a 8 en donde el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo es ácido pirúvico.
10. Método según las reivindicaciones 1 a 9 en donde el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo está isotópicamente enriquecido con un núcleo de espín no cero, preferiblemente con ¹⁵N y/o ¹³C.

- 50 11. Radicales de fórmula (I)



en donde

5 M representa hidrógeno o un equivalente de un catión; y

R1 que es el mismo o diferente representa $-(CH_2)_n-X-R_2$,

en donde n es 1, 2, o 3;

10

X es O o S; y

R2 es un grupo alquilo de C₁-C₄ de cadena lineal o ramificado

- 15 12. Radicales según la reivindicación 11 en donde M representa hidrógeno, o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable, preferiblemente un catión alcalino, un ión amonio o un ión de amina orgánica.
13. Radicales según la reivindicación 11 y 12 en donde R1 es el mismo y representa $-CH_2-OCH_3$, $-CH_2-OC_2H_5$, $-CH_2-CH_2-OCH_3$, $-CH_2-SCH_3$, $-CH_2-SC_2H_5$ o $-CH_2-CH_2-SCH_3$, lo más preferiblemente $-CH_2-CH_2-OCH_3$.
- 20 14. Radical según las reivindicaciones 11 a 13 en donde M representa hidrógeno, o un equivalente de un catión fisiológicamente tolerable, preferiblemente sodio y R1 es el mismo y representa $-CH_2-CH_2-OCH_3$.
- 25 15. Uso de radicales según las reivindicaciones 11 a 14 como agentes paramagnéticos en un proceso de DNP.
16. Uso de radicales según la reivindicación 15, en donde el compuesto que se va a polarizar en dicho proceso de DNP es un compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo.
- 30 17. Una composición que comprende un radical según las reivindicaciones 11 a 14 y un compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo.
18. Composición según la reivindicación 17 en donde el compuesto que comprende uno o más grupos es un compuesto endógeno, preferiblemente un compuesto endógeno que desempeña un papel en un proceso metabólico en el cuerpo humano o animal no humano.
- 35 19. Composición según las reivindicaciones 17 y 18, en donde el compuesto que comprende uno o más grupos carboxilo es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en aminoácidos ácidos, ácido acético, ácido acetoacético, ácido hidroxibutírico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico y ácidos grasos.
- 40