

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 529**

51 Int. Cl.:

C07C 51/41 (2006.01) **C07C 233/47** (2006.01)
C07C 53/10 (2006.01) **A61K 49/10** (2006.01)
C07C 59/08 (2006.01)
C07C 67/283 (2006.01)
C07C 69/14 (2006.01)
C07C 69/155 (2006.01)
C07C 69/716 (2006.01)
C07C 227/20 (2006.01)
C07C 229/08 (2006.01)
C07C 231/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2014 PCT/EP2014/072983**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063020**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2014 E 14790572 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3063119**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de compuestos de carboxilato hiperpolarizado**

30 Prioridad:

28.10.2013 EP 13190409

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**BRACCO IMAGING S.P.A. (100.0%)
Via Egidio Folli 50
20134 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**AIME, SILVIO;
CERUTTI, ERIKA;
BOI, TOMMASO y
REINERI, FRANCESCA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 745 529 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

Procedimiento para la preparación de compuestos de carboxilato hiperpolarizado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de la formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI). Más particularmente, la invención se refiere a un procedimiento que usa la técnica de polarización inducida por parahidrógeno (PHIP) para la preparación de compuestos de carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés diagnóstico como sondas metabólicas de RM.

Estado de la técnica

10 La formación de imágenes mediante resonancia magnética es una herramienta poderosa muy consolidada para investigaciones médicas y biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*. El principal inconveniente de esta técnica es debido a la baja sensibilidad intrínseca de la espectroscopía de RMN en la que se basa la MRI. De hecho, la intensidad de las señales de RMN depende de la diferencia entre las poblaciones de los estados de espín nuclear de los núcleos formadores de imágenes. Según la ecuación bien conocida de Boltzman ($\Delta N = \gamma \hbar B_0 / (2\pi kT)$), esta diferencia es función de la temperatura y del campo magnético aplicado, y, en el equilibrio térmico, es del orden de 10^{-5} , es decir, muy baja.

15 El uso de moléculas hiperpolarizadas se ha propuesto recientemente como una posible solución del mencionado inconveniente, y, en años recientes, se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo de procedimientos de hiperpolarización de RM tanto factibles como eficaces.

20 La fuerza conductora en el desarrollo registrado surge en el potencial que esta técnica ofrece para superar las limitaciones de sensibilidad de la formación de imágenes mediante RM convencional, abriendo un número de aplicaciones innovadoras tanto en química como, especialmente, en biología.

25 De hecho, la mejora significativa de la fuerza de la señal permitida por esta técnica para compuestos detectables que representan moléculas claves en los procesos metabólicos condujo al desarrollo de procedimientos de RM innovadores que aprovecha la detección de metabolitos clave que informan directamente sobre etapas específicas de procesos celulares (formación de imágenes metabólicas). Por ejemplo, la formación de imágenes *in vivo* se ha llevado a cabo usando una sustancia metabólica adecuadamente hiperpolarizada, y se ha observado la formación de imágenes en tiempo real del metabolismo con piruvato marcado con $1\text{-}^{13}\text{C}$ como marcador metabólico (véase, por ejemplo, Goldman K. et al, Real time metabolic imaging. PNAS 2006, 103 (30), 11270-11275), sugiriendo fuertemente el uso ventajoso posible de este (y otros) metabolito clave en el diagnóstico tumoral *in vivo* por medio de formación de imágenes de resonancia magnética (RM) de ^{13}C hiperpolarizada (Albers MJ. et al., Hyperpolarized ^{13}C lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading; Cancer Research 2008, 68(20): 8607-15).

30 Al mismo tiempo, el desarrollo de métodos para la hiperpolarización de ^{13}C ha abierto un nuevo campo en estudios de perfusión *in vivo* usando moléculas hiperpolarizadas marcadas con ^{13}C (Mansson, S. et al, Eur. Radiol., 2006, 16, 57-67).

35 Hasta este punto, el enfoque de hiperpolarización más usado se basa en la aplicación del procedimiento de polarización nuclear dinámica (DNP) que consiste, esencialmente, en las siguientes etapas: i) preparar una disolución vítrea sólida del sustrato de interés con un radical orgánico estable; ii) llevar la disolución sólida hasta una temperatura baja (próxima a 1K) en un imán, e irradiar a la frecuencia de la transición de resonancia paramagnética del electrón (e.p.r.) del radical orgánico durante varios minutos a fin de transferir la polarización del electrón a los núcleos activos de RMN de las moléculas sustrato; iii) disolver rápidamente el material hiperpolarizado; iv) administrar las moléculas hiperpolarizadas *in vivo* y adquirir el espectro de RMN y la imagen para informar sobre su distribución y transformación metabólica.

40 Se han polarizado varios metabolitos por medio del método de disolución de DNP, entre ellos piruvato, acetato, fumarato, glutamato, y muchas otras moléculas metabólicamente interesantes. Comúnmente, la resonancia detectada es la del átomo de carbono de ^{13}C del resto de carboxilato, que tiene un valor T1 en el intervalo de 20-60 s.

45 En conjunto, a pesar de la posibilidad de hiperpolarizar, en principio, cualquier sustrato, el método de disolución de DNP requiere un equipo sofisticado y caro. Otro inconveniente de esta técnica está representado por los largos ciclos de polarización, de alrededor de 1 hora, que son necesarios para alcanzar una polarización nuclear satisfactoria.

50 El método alternativo de polarización inducida por parahidrógeno (PHIP) se basa en la adición de una molécula de para-hidrógeno (o parahidrógeno, como se usa aquí de forma intercambiable) a un sustrato insaturado, que permite transformar el orden del espín del parahidrógeno en hiperpolarización de los heteronúcleos.

A diferencia del método de DNP, el procedimiento de hiperpolarización basado en el uso de parahidrógeno es bastante fácil de manipular y requiere un equipo simple, y ofrece preparaciones más rápidas con ciclos de hiperpolarización tan cortos como 1 min., produciendo mejoras de la señal a ruido de hasta 10^5 con solamente un pequeño esfuerzo técnico.

- 5 Un cuello de botella en el uso de esta técnica está representado más bien por la disponibilidad limitada de precursores moleculares insaturados relevantes que son necesarios para la adición molecular de parahidrógeno que actúa, como se ha dicho, como una fuente de orden del espín.

Los precursores de sustratos óptimos para preparar moléculas hiperpolarizadas de ^{13}C o ^{15}N (a considerar como preferibles para aplicaciones *in vivo* por tener una señal de fondo de alrededor de cero y tiempos de relajación T1 más prolongados, a fin de limitar la pérdida de polarización debido a relajación) consisten en enlaces $-\text{C}=\text{C}-$ o $-\text{C}\equiv\text{C}-$ insaturados adyacentes al heteronúcleo a polarizar. Para compuestos de ^{13}C , esto representa una limitación de tres carbonos representada con éxito, por ejemplo, por el resto de acrilato, que conduce, tras la parahidrogenación, a compuestos de propionato que encuentran aplicación útil para formación de imágenes angiográficas (Goldman, M. et al., C. R. Phys. 2005, 6, 575-581). Sin embargo, la necesidad de sustratos adecuados que incluyan enlaces dobles o triples hidrogenables ha limitado fuertemente en la práctica el número de moléculas hiperpolarizadas obtenibles mediante el uso de esta técnica de polarización.

Otro aspecto que contribuye a reducir adicionalmente los precursores insaturados atractivos está representado por la inestabilidad debida a un reordenamiento intramolecular constante de los mismos, la denominada tautomería cetoenólica, que convierte alcoholes vinílicos en los aldehídos correspondientes. La parahidrogenación de PHIP de una forma enólica estabilizada mediante formación de un fosfato, a saber, fosfoenolpiruvato, que forma, tras la adición de parahidrógeno, fosfolactato hiperpolarizado, se da a conocer por Chekmenev et al., por ejemplo en J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 3957-3960.

Más recientemente, se ha introducido una nueva forma para obtener moléculas hiperpolarizadas por medio de parahidrógeno, denominada SABRE, que permite lograr la polarización en moléculas mediante formación reversible de aductos ternarios del sustrato de hiperpolarización, parahidrógeno y un compuesto organometálico. (Adams, R. W. et al., Science 2009, 323, 1708-1711). Este método permite lograr la polarización en moléculas sin que tenga lugar la adición de hidrógeno, de manera que se puede evitar uno de los límites principales de la aplicación de PHIP. Además, en el documento WO 2010/037771, el solicitante describe un método de una etapa para obtener una disolución acuosa de moléculas parahidrogenadas que se basa en la parahidrogenación, en fase orgánica, de un precursor alquénico o alquinílico del producto alquílico o alquénico hiperpolarizado deseado, seguido de su transformación rápida en la molécula final y la extracción en una fase acuosa. Al usar este método, se ha obtenido, por ejemplo, una disolución acuosa de ácido succínico mediante parahidrogenación de anhídrido maleico en una mezcla de cloroformo/acetona, seguido de la dilución con una disolución acuosa básica y la transferencia de fase.

Sin embargo, según nuestro entender, las moléculas con ^{13}C hiperpolarizado de interés diagnóstico, tales como, especialmente, acetato y piruvato con ^{13}C hiperpolarizado, actualmente solo están disponibles con la técnica de hiperpolarización de DNP (Kohler, S.J. et al.; Magn Reson. Med. 2007, 58, 65-69), mientras que su preparación con la técnica de PHIP está considerada enormemente desafiante, si no irrealizable (véase el J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 3957-3960 mencionado anteriormente).

Sumario de la invención

40 Ahora se han identificado, descritos aquí, sustratos insaturados adecuados y un procedimiento de preparación que permiten obtener moléculas que contienen carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés diagnóstico que no son directamente obtenibles con la técnica de PHIP mediante adición de para-hidrógeno a su un precursor directo insaturado, y de este modo se obtienen actualmente por medio de la técnica de hiperpolarización de DNP.

45 En particular, se propone aquí un procedimiento de polarización alternativo a base de PHIP que comprende usar ésteres insaturados apropiados, identificados aquí, como precursores de sustratos hidrogenables adecuados para preparar moléculas que contienen carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés diagnóstico.

Según el procedimiento propuesto, un éster insaturado adecuado de la molécula de carboxilato de interés se obtiene y se hidrogena con para-hidrógeno molecular, dando de ese modo el éster parahidrogenado correspondiente; entonces se induce una transferencia de polarización desde los átomos de H añadidos a la señal de ^{13}C del átomo de carbono de carboxilato por medios conocidos, por ejemplo mediante la aplicación de un ciclo de campo, produciendo el éster hidrogenado [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado que se convierte, por eliminación del grupo hidrogenado, en la molécula de carboxilato libre de [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado deseada, que se recoge finalmente en una disolución acuosa como tal, o en forma protonada, como el ácido carboxílico correspondiente.

55 Las moléculas que contienen carboxilato de interés diagnóstico según la invención son tanto los compuestos de carboxilato que encuentran aplicación adecuada como sondas de RM en formación de imágenes mediante resonancia magnética (MRI) o espectroscopía de resonancia magnética (MRS), típicamente en formación de imágenes vasculares, cartografiado de perfusión, formación de imágenes de intervención o formación de imágenes moleculares, como las moléculas de carboxilato que son parte clave de procesos biológicos y rutas metabólicas,

tales como, por ejemplo, el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) (también conocido como ciclo del ácido cítrico), glicólisis, oxidación beta, ciclo de la urea y rutas metabólicas de cetocuerpos, que encuentran, en su lugar, un uso siempre creciente como marcadores de MR metabólicos.

5 Los ésteres insaturados óptimos para el uso de la invención, a saber, como precursores de sustratos hidrogenables adecuados de la molécula que contiene el carboxilato anterior, son ésteres vinílicos, que tienen el átomo de carbono de ^{13}C carboxilato a la distancia de tres enlaces deseable desde el protón añadido con para-hidrogenación del grupo vinilo.

10 Sin embargo, debido a la imposibilidad de tener fácilmente un etanol o alcohol etinólico adecuado debido al equilibrio cetoenólico, algunas veces es apenas factible una preparación conveniente del éster vinílico apropiado de la molécula de carboxilato de interés, como es el caso, por ejemplo, del piruvato, o es irrealizable en una escala para satisfacer una demanda médica siempre creciente.

15 Ahora hemos observado inesperadamente que, a pesar de mover la insaturación hidrogenable a una distancia del átomo de carbono de ^{13}C carboxilato que excede los tres enlaces óptimos usados convenientemente y recomendados como necesarios para tener una transferencia de polarización satisfactoria, se puede preparar convenientemente una familia diferente de ésteres insaturados, incluyendo, por ejemplo, ésteres alílicos y propargílicos, y se pueden usar como moléculas precursoras hidrogenables adecuadas que permiten obtener las moléculas de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondientes de interés, o el ácido carboxílico correspondiente, con un buen rendimiento y un grado de polarización satisfactorio, que se ha mostrado que es sustancialmente el mismo que el obtenible con un enlace carbono-carbono insaturado adyacente, tal como, por ejemplo, el de un éster vinílico.

20 La hidrogenación con para-hidrógeno molecular de estos ésteres insaturados de las moléculas que contienen carboxilato de interés ha demostrado de hecho que permite una preparación conveniente a base de PHIP de las moléculas de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondientes, o de los ácidos carboxílicos correspondientes, que se pueden recoger finalmente en disoluciones acuosas listas para el uso en aplicaciones de RM *in vivo*.

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere generalmente a un procedimiento que hace uso de la técnica de polarización inducida por para-hidrógeno para la preparación de moléculas que contienen carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado de interés diagnóstico, que comprende hidrogenar con para-hidrógeno molecular un éster alquénico o alquinílico de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturado de la molécula de carboxilato concernida, usado como un precursor de sustrato hidrogenable adecuado de la molécula de carboxilato de interés.

30 Más particularmente, en una realización, la invención se refiere a un procedimiento de PHIP para la preparación de moléculas que contienen carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado para uso en aplicaciones de diagnóstico mediante RM, que comprende las etapas de:

35 a) obtener un éster alquénico o alquinílico de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturado de la molécula que contiene carboxilato de interés, y hacer reaccionar el éster insaturado con para-hidrógeno molecular, para dar el éster parahidrogenado correspondiente;

b) inducir una transferencia de polarización desde H polarizado añadido a la señal de ^{13}C del átomo de carbono de $[1-^{13}\text{C}]$ -carboxilato del éster para-hidrogenado, para dar el éster de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondiente;

40 c) eliminar el resto de éster hidrogenado, y recoger una disolución acuosa de la molécula que contiene carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado, o del ácido carboxílico $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondiente.

45 La disolución acuosa recogida de la molécula de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado de interés se puede emplear para la evaluación mediante RM *in vivo* o *in vitro*, *ex vivo* de parámetros biológicos o perfiles metabólicos de interés diagnóstico. En una realización adicional, la invención se refiere al uso de ésteres alquénicos o alquinílicos de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturados como precursor de sustrato hidrogenable adecuado para la preparación de moléculas que contienen carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado de interés diagnóstico para aplicaciones de RM por medio de la técnica de PHIP.

En otra realización, la invención se refiere a ésteres alquílicos o alílicos parahidrogenados según la invención como compuestos intermedios en un procedimiento de PHIP para preparar moléculas que contienen carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado para uso como marcadores metabólicos.

50 En una realización todavía adicional, la invención se refiere a un método para la evaluación *in vitro* (*ex vivo*) basada en RM de un parámetro biológico o un perfil metabólico de interés diagnóstico según la reivindicación 21.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática del procedimiento de hiperpolarización según la invención para preparar una disolución acuosa de una molécula de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado por medio de la parahidrogenación: a) un éster vinílico de la molécula carboxílica en un medio acuoso; b) un éster

propargílico de la molécula carboxílica en un medio acuoso; c) un éster propargílico de la molécula carboxílica en un medio orgánico, y aislamiento del compuesto de carboxilato hiperpolarizado correspondiente en una fase acuosa.

5 Figura 2. Espectros de RMN ^{13}C (14 T, 298 K, D_2O) de acetato de etilo tras la parahidrogenación en agua del éster vinílico, que muestra que, antes de la aplicación del ciclo de campo, las únicas señales de ^{13}C detectables son las de los átomos de carbono alifáticos del grupo etilo que se ven afectados por los átomos de para-hidrógeno enlazados a ellos, mientras que la señal de carbonilo no se ve afectada, y, por tanto, no está polarizada.

10 Figura 3. Espectros de RMN ^{13}C (14 T, 298 K, D_2O) a) señal de ^{13}C hiperpolarizado del acetato de etilo tras la parahidrogenación en agua del éster vinílico y sometimiento a un ciclo de campo; b) acetato de sodio obtenido a partir de la hidrólisis de acetato de etilo hiperpolarizado en agua; c) acetato de alilo procedente de la parahidrogenación de acetato de propargilo en agua, y aplicación de ciclo de campo; d) acetato de Na procedente de la hidrólisis de acetato de alilo.

15 Figura 4. Señales de ^{13}C de carbonilo de los productos de parahidrogenación de piruvato de propargilo tras someterlo a un ciclo de campo. La parahidrogenación se lleva a cabo en agua añadida con 15% de metanol. Son detectables claramente tres señales en la región carbonílica debido a éster alílico de piruvato (160 ppm: estructura a) en la figura, la forma hidratada (172 ppm: estructura b) en la figura), y el hemiacetal (171 ppm: estructura c) en la figura).

Figura 5. Forma acetálica del piruvato en metanol.

20 Figura 6. a) Señal de ^{13}C hiperpolarizado proporcionada por el piruvato de propargilo parahidrogenado en metanol: la señal más intensa corresponde a la forma acetálica en el medio metanólico; b) señal de ^{13}C hiperpolarizado tras la adición de 200 μl de NaOD 1M.

25 Figura 7. a) Señal de ^{13}C hiperpolarizado de piruvato de propargilo hidrogenado (es decir, piruvato de alilo) obtenido en metanol/ CDCl_3 : forma carbonílica de piruvato de alilo (163,8 ppm) y forma hidratada (174,2 ppm); b) tras la hidrólisis básica (NaOD 1M) y acidificación con HCl (1M) pH = 2: ácido pirúvico, forma carbonílica (164,5 ppm), forma hidratada (174 ppm) y forma hemiacetálica (173 ppm); c) tras la hidrólisis básica con NaOD y adición de ácido con HCl pH = 4: piruvato de sodio (168 ppm); d) espectro registrado en la región relevante de MeOH, que confirma la ausencia de cualquier señal de MeOH detectable.

30 Figura 8. Señal de ^{13}C polarizado de carbonilo (167 ppm) de TFA-etilglicina parahidrogenado, obtenido mediante adición de para-hidrógeno a la glicina vinílica correspondiente y tratamiento con ciclo de campo, en MeOH.

Figura 9. Espectros de RMN ^{13}C de la disolución acuosa recogida directamente del ensayo del Ejemplo 5, que muestra la señal de ^{13}C polarizado (181 ppm) obtenida mediante hidrólisis básica del TFA-alilglicina ^{13}C hiperpolarizado, atribuida a glicina libre. No se observa la señal de metanol (49,5 ppm).

35 Figura 10. Espectro de RMN ^1H del producto de hidrogenación piruvato de alilo: c, c' 5,75 ppm (m); e, e' 5,15 ppm (dd, $^2\text{J}=17,5$ Hz, $^3\text{J}=17$ Hz); d, d' 5,07 ppm (dd, $^2\text{J}=17,5$ Hz, $^3\text{J}=10$ Hz); b 4,49 ppm (d $^3\text{J}=5,93$ Hz); b' 5,54 ppm (d, $^3\text{J}=5,5$ Hz); a 2,27 ppm (s); a' 1,28 ppm (s); COA ciclooctano derivado del catalizador de hidrogenación).

40 Figura 11. Espectro de ^{13}C del producto de hidrogenación piruvato de alilo en el disolvente de hidrogenación MeOD/ CDCl_3 . A: 26 ppm; A' 24 ppm; D: 66,5 ppm; D' 66 ppm; B' 96 ppm; E, F 119, 131 ppm; E', F' 132, 118 ppm; C 160 ppm; C' 171 ppm; B 192 ppm; la señal de octano observada procede del catalizador de hidrogenación en la disolución orgánica.

45 Figura 12. Espectros de RMN ^{13}C (14 T, 298 K, D_2O) de lactato de etilo ^{13}C hiperpolarizado tras la parahidrogenación del éster vinílico y tratamiento con ciclo de campo (espectro superior), y tras la hidrólisis subsiguiente del éster hiperpolarizado (espectro inferior). En el espectro superior, la señal de ^{13}C polarizado de carbonilo del éster etílico del ácido 2-acetoxi-propiónico (3) es detectable a 173 ppm; en el espectro inferior, la señal de ^{13}C -hiperpolarizado del lactato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado es detectable a 177,5 ppm.

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se refiere a ésteres alquénlicos o alquínlicos de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturados y a un procedimiento de polarización inducida por para-hidrógeno que los usa como precursor de sustrato hidrogenable para la preparación de molécula que contiene carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés diagnóstico, especialmente como sondas metabólicas de RM.

Las moléculas que contienen carboxilato según la invención (cuyos derivados [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizados se pueden preparar convenientemente mediante el uso del procedimiento de polarización inducida por para-hidrógeno

propuesto por la presente invención) incluyen preferiblemente compuestos carboxílicos que tienen la fórmula general (I)



en la que

- 5 C* representa el átomo de carbono de carboxilato que sufre ¹³C hiperpolarización según el procedimiento propuesto;
- R es una cadena de alquilo de C₁-C₅ lineal o ramificada, que está opcionalmente interrumpida por, o sustituida con, uno o más grupos seleccionados de carbonilo (-CO-), hidroxilo (-OH), amino (-NHR₁), átomo o átomos de halógeno y grupo o grupos halo-alquilo, o por un anillo carbocíclico alifático o aromático, que a su vez está opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo;
- 10 R₁ es H, o un grupo protector de amino, tal como, por ejemplo, trifluoroacetilo, acetilo, benzoílo, carbobenzoxi, carbonato de terc-butilo, y, preferiblemente, trifluoroacetilo, y las sales fisiológicamente aceptables de los mismos.
- 15 Con cadena alquílica de C₁-C₅ lineal o ramificada, o resto de alquilo de C₁-C₅, como se usa aquí, se pretende significar cualquiera de los restos de alquilo de C₁-C₅, que incluye así metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, 2-metilbutilo, en los que se prefieren metilo, etilo, propilo e isopropilo. Con halógenos (o átomos de halógeno, como se usa aquí de forma intercambiable), ya sea solos o como parte de un grupo (por ejemplo, halógeno-alquilo), nos referimos a cloro, bromo y flúor, prefiriéndose este último.
- 20 Los grupos halógeno-alquilo según la invención incluyen, por ejemplo, restos alquílicos de C₁-C₃ perfluorados, es decir, cualesquiera restos alquílicos de C₁-C₃ en los que todos los átomos de hidrógeno se sustituyen por átomos de flúor, como, por ejemplo, grupos -CF₃ -C₂F₅, y -C₃F₇, en el que se prefiere -CF₃ (es decir, trifluorometilo).
- Los ejemplos de anillos carbocíclicos según la invención incluyen, por ejemplo, anillos de C₆ miembros alifáticos o aromáticos, tales como, preferiblemente, anillos fenílicos.
- 25 Preferiblemente, en la fórmula (I) anterior, R representa un grupo seleccionado de un resto alquílico de C₁-C₅, un metilcarbonilo de fórmula CH₃C(O)-, un hidroxialquilo tal como, preferiblemente, el resto hidroxietilo de fórmula CH₃CH(OH)-, y un resto aminoalquilo de fórmula R₂-CH(NHR₁)-, en la que R₁ es como se define anteriormente, y R₂ es H o una cadena de alquilo de C₁-C₄ lineal o ramificada, tal como, preferiblemente, metilo, etilo, propilo, isopropilo, sec-butilo, e iso-butilo, que está opcionalmente sustituida con un grupo hidroxilo (-OH), o un anillo fenílico o hidroxifenílico.
- 30 Más preferiblemente, R se selecciona del grupo que consiste en metilo, propilo, hidroxietilo, metilcarbonilo y un resto aminoalquilo de fórmula R₂-CH(NHR₁)-, en la que R₁ es H y R₂ es H o una cadena de alquilo de C₁-C₄ lineal o ramificada como se define anteriormente, que está opcionalmente sustituida con un grupo hidroxilo (-OH), o un anillo fenilo o hidroxifenilo, tal como, lo más preferible, isopropilo, iso-butilo, sec-butilo, 1-hidroxietilo, hidroximetilo y p-hidroxibencilo.
- 35 En una realización preferida, en la fórmula (I) anterior, R es un resto metilo (-CH₃), y la molécula que contiene carboxilato de interés según la invención es el acetato.
- En otra realización preferida, en la fórmula (I) anterior, R es el resto hidroxietilo de fórmula CH₃CH(OH)-, y la molécula que contiene carboxilato de interés según la invención es el lactato.
- 40 En una realización preferida adicional, en la fórmula (I) anterior, R es un grupo aminoalquilo de fórmula R₂-CH(NHR₁)-, en la que R₁ es H y R₂ es H, o un grupo seleccionado de isopropilo, iso-butilo, sec-butilo, hidroximetilo, 1-hidroxietilo y p-hidroxibencilo, y la molécula que contiene carboxilato de interés según la invención es un aminoácido natural.
- En una realización especialmente preferida de la invención, en la fórmula (I) anterior, R es un grupo metilcarbonilo de fórmula CH₃C(O)-, y la molécula que contiene carboxilato de interés según la invención es el piruvato.
- 45 Las moléculas que contienen carboxilato según la invención comprenden además, como se ha dicho anteriormente, las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la fórmula (I) anterior.
- Con sal farmacéuticamente aceptable, como se usa aquí, nos referimos a derivados de los compuestos de carboxilato de la fórmula (I) anterior en los que el grupo carboxílico, todavía no neutralizado internamente, está en forma de una sal estable no tóxica, que no destruye o afecta la actividad del compuesto hiperpolarizado.
- 50 Los ejemplos adecuados de las mencionadas sales incluyen típicamente sales alcalinas u orgánicas del resto ácido carboxílico de fórmula (I).

En este punto, los cationes preferidos de bases inorgánicas que se pueden usar adecuadamente para satisfacer los compuestos de la invención comprenden iones de metales alcalinos o alcalino-térreos, tales como potasio, sodio, calcio o magnesio. Los cationes preferidos de bases orgánicas comprenden, entre otros, aquellos de aminas primarias, secundarias y terciarias, tales como etanolamina, dietanolamina, morfolina, glucamina, N-metilglucamina, N,N-dimetilglucamina. Los cationes preferidos de aminoácidos comprenden, por ejemplo, aquellos de los ácidos aspártico y glutámico.

Se prefieren particularmente las sales de sodio y de potasio.

Los compuestos de carboxilato expuestos mediante la fórmula (I) anterior no incluyen un enlace carbono-carbono insaturado en el resto R; de este modo, no pueden ser hiperpolarizados por la adición adecuada de para-hidrógeno molecular a un enlace insaturado existente y la transferencia de polarización al átomo de carbono de ^{13}C del grupo carboxilato.

La solución propuesta por la presente invención comprende obtener ésteres alquénlicos o alquinílicos lineales o ramificados de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturados de los compuestos de carboxilato anteriores de fórmula (I), y usar los ésteres insaturados obtenidos como precursores de sustratos hidrogenables convenientes de las moléculas de carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado deseadas.

Dentro de los alcances de la presente invención, las expresiones "precursor de sustrato" o "precursor hidrogenable" o "precursor insaturado" o, simplemente, "precursor", usadas aquí de forma intercambiable, se refieren a una molécula insaturada que incluye un enlace insaturado, por ejemplo un doble o triple enlace carbono-carbono, que produce el producto hiperpolarizado deseado mediante hidrogenación del mencionado enlace insaturado con para-hidrógeno molecular, transferencia de la polarización a un núcleo no protónico, y conversión del compuesto hidrogenado obtenido en el producto hiperpolarizado deseado.

Los ejemplos de núcleo no protónico hiperpolarizable (o heteronúcleo) incluyen típicamente un ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N o ^{29}Si . Según la presente invención, excepto que se proporcione de otro modo, con la expresión heteronúcleo hiperpolarizable nos referimos a un ^{13}C , y, más particularmente, nos referimos al átomo de carbono ^{13}C -carboxílico (o átomo $1\text{-}^{13}\text{C}$ -carbono) de la molécula de carboxilato de interés.

Los precursores de sustratos para uso de la presente invención son ésteres alquénlicos o alquinílicos insaturados de la molécula de carboxilato de interés, a saber, ésteres que incluyen un enlace insaturado, por ejemplo un enlace doble o triple carbono-carbono en la cadena R' hidrocarbonada del resto de éster $\text{-O-R}'$, y son fácilmente hidrogenables.

Un objeto de la presente invención se refiere así al uso de un éster alquénlico o alquinílico insaturado de una molécula que contiene carboxilato de interés diagnóstico como precursor de sustrato hidrogenable para la preparación de la molécula que contiene carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondiente mediante uso de la técnica de PHIP.

Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento de PHIP para la preparación de moléculas que contienen carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado de interés diagnóstico, que comprende hidrogenar con para-hidrógeno molecular éster alquénlico o alquinílico insaturado de la molécula de carboxilato concernida.

En este punto, los ésteres alquénlicos o alquinílicos insaturados según la invención, a saber, para uso como precursor de sustrato hidrogenable para la preparación de compuesto de carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado con la técnica de PHIP, son ésteres alquénlicos o alquinílicos lineales o ramificados de $\text{C}_2\text{-C}_4$ de la molécula que contiene carboxilato de interés que, preferiblemente, se seleccionan de ésteres vinílicos, alílicos o propargílicos de la mencionada molécula de carboxilato concernida.

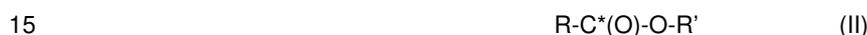
Según una realización preferida, los ésteres insaturados según la invención están enriquecidos en ^{13}C , o marcados con ^{13}C , como se usa aquí de forma intercambiable. El término "enriquecido" o, como alternativa, "marcado", significa que la concentración del núcleo de espín no nulo en el compuesto está por encima del valor típico de abundancia natural de dichos núcleos, preferiblemente por encima de alrededor de 10% de abundancia natural, más preferiblemente por encima de al menos 25%, e incluso más preferiblemente por encima de al menos 75% de su abundancia natural, y lo más preferible por encima de al menos 90% de su abundancia natural. Según la presente invención, el enriquecimiento está concentrado en el átomo de carbono 1-C carboxílico del éster que se enriquece en ^{13}C (o se enriquece en $[1\text{-}^{13}\text{C}]$, como se usa aquí de forma intercambiable). Dicho núcleo de ^{13}C no nulo confiere a la molécula que contiene carboxilato obtenida (o producto de carboxilato, o, simplemente, producto, como se usa aquí de forma intercambiable) un tiempo de relajación T_1 de al menos 5 segundos (indicado con s), preferiblemente de al menos 10 s, preferiblemente de al menos 20 s, preferiblemente de al menos 30 s, e incluso más preferiblemente de al menos 40 s, medido en una disolución sometida a un campo magnético de alrededor de 0,5 mT a alrededor de 20 T (Tesla). El enriquecimiento de ^{13}C apropiado puede ser natural, cuando el éster de carboxilato está enriquecido de forma natural en $1\text{-}^{13}\text{C}$, o puede incluir el enriquecimiento selectivo (o marcaje de ^{13}C , como se usa aquí de forma alternativa) del átomo de carbono 1-C carboxílico de la molécula. En este punto, se pueden emplear adecuadamente precursores enriquecidos comercialmente disponibles, o, en el caso, el enriquecimiento de elección se puede lograr mediante síntesis química, o marcaje biológico, según enseñanzas de

la técnica anterior bien conocidas.

5 Los ésteres insaturados para el uso de la actual invención como precursor de sustrato deberían ser muy polarizables. En particular, los ésteres preferidos son polarizables hasta un grado que corresponde a al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, y más preferiblemente de al menos 20% o incluso mayor, y son capaces de mantener una magnetización neta de ^{13}C en el producto de carboxilato dentro de los límites anteriores tras la eliminación del resto hidrogenado y el aislamiento de la molécula de carboxilato hiperpolarizado libre de interés diagnóstico.

10 En este punto, tras la hidrogenación con para-hidrógeno molecular y la transferencia de la polarización al átomo de carbono ^{13}C carboxílico, el éster insaturado preferido según la invención debería permitir la eliminación fácil del resto hidrogenado en un medio acuoso, típicamente mediante hidrólisis, permitiendo así un aislamiento rápido de una disolución acuosa de la molécula de carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado libre, lista para uso en aplicaciones de RM *in vivo*.

Los ésteres insaturados para el uso de la invención se pueden representar, preferiblemente, mediante la siguiente fórmula general (II)



en la que:

C^* representa el átomo de carbono de carboxilato enriquecido de forma natural en ^{13}C , u, opcionalmente, marcado en ^{13}C , que sufre hiperpolarización de ^{13}C ,

R es como se define anteriormente para la fórmula (I), y

20 R' es una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada de $\text{C}_2\text{-C}_4$ que comprende un enlace doble o triple carbono-carbono.

Preferiblemente, en la fórmula (II) anterior, R' es un resto alquenílico o alquínico seleccionado de vinilo (de fórmula -CH=CH_2), alilo (de fórmula $\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$) y propargilo (de fórmula $\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$).

Más preferiblemente, R' es un resto vinílico o propargílico.

25 En una realización preferida, la invención se refiere a ésteres insaturados de la fórmula (II) anterior en la que R' es un resto vinílico.

En otra realización preferida, la invención se refiere a ésteres insaturados de fórmula (II) en la que R' es un resto propargílico.

30 Un objeto adicional de la invención se refiere a un procedimiento que comprende hidrogenar con para-hidrógeno molecular un éster alquenílico o alquínico insaturado, preferiblemente que tiene la fórmula (II) anterior, para preparar moléculas que contienen carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés diagnóstico, especialmente como sondas metabólicas de RM, mediante el uso de la técnica de polarización inducida por para-hidrógeno.

Más particularmente, en una realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de moléculas que contienen carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de fórmula (I), que comprende las etapas de:

35 a) obtener un éster alquenílico o alquínico de $\text{C}_2\text{-C}_4$ de la molécula que contiene carboxilato de interés, y hacer reaccionar el éster insaturado con para-hidrógeno molecular, para dar el éster parahidrogenado correspondiente;

b) inducir una transferencia de polarización desde el para-hidrógeno añadido al átomo de carbono [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-carboxilato del éster para-hidrogenado, para dar el éster [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado correspondiente;

40 c) eliminar el resto de éster hidrogenado y recoger una disolución acuosa de la molécula que contiene carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado, o del ácido carboxílico [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado correspondiente.

Preferiblemente, el éster insaturado obtenido en la etapa a) del procedimiento es un éster alquenílico o alquínico de la fórmula (II) anterior.

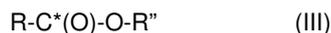
45 En este punto, los ésteres insaturados adecuados de la fórmula (II) anterior pueden estar comercialmente disponibles, como es el caso, por ejemplo, del acetato de vinilo, o se pueden obtener convenientemente usando procedimientos de preparación convencionales, fácilmente disponibles para aquellos expertos en técnicas de química orgánica sintética. La preparación de ejemplos no limitantes de ésteres insaturados representativos según la invención se proporciona además en la sección experimental que sigue.

50 La hidrogenación del éster insaturado según la etapa a) del procedimiento de la invención se lleva a cabo mediante el uso de una técnica de PHIP, en presencia de un catalizador de hidrogenación adecuado. Típicamente, este último

se usa en cantidades catalíticas conocidas por una persona experta, por ejemplo en una relación de sustrato/catalizador que oscila de 10:1 a 5:1.

Una realización adicional de la invención se refiere por lo tanto a ésteres alquílicos o alílicos parahidrogenados, por ejemplo obtenidos hidrogenando con para-hidrógeno molecular ésteres insaturados según la invención, preferiblemente de la fórmula (II) anterior, que encuentran aplicación como compuestos intermedios en un procedimiento de PHIP para preparar moléculas hiperpolarizadas, por ejemplo para preparar moléculas que contienen carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado para uso como marcadores metabólicos de RM.

Más particularmente, en una realización adicional, la presente invención se refiere a un éster para-hidrogenado de fórmula (III)



en la que C^* y R son como se definen anteriormente, y R'' es un etilo, propilo o alilo parahidrogenado, y, preferiblemente, etilo o alilo, por ejemplo obtenido mediante hidrogenación con para-hidrógeno molecular de un éster insaturado de la fórmula (II) anterior en la que R' representa, respectivamente, un vinilo, un alilo o un propargilo, y, lo más preferible, un resto vinílico o propargílico, así como su uso en un procedimiento de PHIP, por ejemplo como compuesto intermedio para la preparación de moléculas que contienen carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado.

En una realización adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de moléculas hiperpolarizadas mediante el uso de la técnica de polarización inducida por para-hidrógeno, que comprende obtener un éster para-hidrogenado de fórmula (III) como compuesto intermedio.

Los ejemplos adecuados de los intermedios para-hidrogenados de fórmula (III) según la invención incluyen, por ejemplo, el acetato de etilo obtenido mediante adición de para-hidrógeno molecular a un precursor de acetato de vinilo, cuya caracterización mediante RMN ^{13}C se proporciona en la Figura 2, el piruvato de alilo obtenido mediante adición de para-hidrógeno molecular a un precursor de piruvato de propargilo, cuya caracterización mediante RMN ^1H se proporciona en la Figura 10, mientras que el espectro de ^{13}C se proporciona en la Figura 11.

Según el procedimiento de la presente invención, la hidrogenación del éster insaturado con para-hidrógeno molecular se puede llevar a cabo convenientemente en un medio acuoso, o en un disolvente orgánico, o en mezclas adecuadas de disolventes orgánicos.

En una realización de la invención, la etapa a) del procedimiento, que incluye hacer reaccionar el éster insaturado con para-hidrógeno molecular, se lleva a cabo en un disolvente acuoso y en presencia de un catalizador de hidrogenación soluble en agua, según procedimientos de hidrogenación conocidos en la técnica.

En este punto, con la expresión "disolvente acuoso" o "medio acuoso", como se usa aquí de forma intercambiable, nos referimos al agua y, preferiblemente, a agua estéril, que puede estar opcionalmente amortiguada de forma apropiada, por ejemplo a un valor de pH aproximadamente neutro, por ejemplo comprendido entre 6 y 8, y, preferiblemente, de alrededor de 7, mediante el uso de amortiguadores apropiados, tales como, por ejemplo, amortiguador de fosfato ($\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$).

Los ejemplos de catalizadores adecuados para el uso en disolventes acuosos incluyen complejos de rodio(I) de fórmula $[\text{Rh}(\text{difosfina})\text{dieno}]^+[\text{anión}]^-$, en los que la difosfina es una fosfina quelante seleccionada preferiblemente de (1,4-bis(R_1R_2)etano), (1,4-bis(R_1R_2)butano), en los que R_1 y R_2 , iguales o diferentes entre sí, comprenden grupos sulfonados tales como, por ejemplo, DPPETS (1,2-bis[bis(m-sodiosulfonatofenil)fosfino]etano)(1,2-bis(difenilfosfino)etano), DPPBTS (1,4-bis(difenilfosfino)butano tetrasulfonado, en el que $\text{R}_1=\text{R}_2$), DAPBTS (bis(dianilfosfino)butano tetrasulfonado), difosfinas sulfonadas quirales tales como, por ejemplo, CHIRAPHOS sulfonado (2,3-bis[bis(m-sodiosulfonatofenil)fosfino]butano), y BINAP sulfonado (2,2'-bis[bis(m-sodiosulfonatofenil)fosfino]-1,1'-binaftilo). El dieno se selecciona preferiblemente de 1,5-ciclooctadieno y norbornadieno, y el anión puede ser cualquier anión, pero, preferiblemente, tetrafluoroborato o trifluorometilsulfonato.

Se prefieren catalizadores de hidrogenación en los que el grupo fosfina es difenilfosfinobutano, y se prefiere particularmente $[\text{Rh}(\text{NBD})\text{phos}][\text{BF}_4]$ (en la que NBD es norbornadieno, y phos es la sal disódica de 1,4-bis[(fenil-3-propanosulfonato)fosfina]butano). Según una implementación práctica, la reacción de hidrogenación del sustrato insaturado según el procedimiento de la invención se lleva a cabo adecuadamente mediante uso de un hiperpolarizador en el que se introduce hidrógeno a presión elevada, típicamente mayor que 6, y preferiblemente de al menos 8 bares, en una cámara reactiva que provoca la nebulización de la disolución que contiene el sustrato y el catalizador, y que permite optimizar la solubilidad del hidrógeno. La reacción de hidrogenación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida entre 30°C y 90°C , y más preferiblemente de 60°C a 90°C .

Está claro para los expertos en la técnica que cuando la reacción de hidrogenación se lleva a cabo en un medio acuoso, como se describe anteriormente, el catalizador de hidrogenación o la molécula sustrato insaturada debería ser soluble en este medio.

En este punto, se puede añadir al medio acuoso una pequeña cantidad de un alcohol de cadena corta, tal como, por

ejemplo, metanol o etanol, o, como alternativa, de cualquier disolvente orgánico soluble en agua, tal como, preferiblemente, acetona, en una cantidad al menos mayor que 10%, preferiblemente que oscila de 10% a 30%, y más preferiblemente de 10% a 20% de la cantidad del disolvente total, a fin de incrementar tanto la eficacia del catalizador como la solubilidad del sustrato y del hidrógeno gaseoso en el medio acuoso.

- 5 Como alternativa, se puede usar adecuadamente como disolvente de la reacción de hidrogenación un alcohol de cadena corta, tal como, preferiblemente, metanol o etanol, y más preferiblemente metanol. En este caso, el catalizador de hidrogenación preferido es $[\text{Rh}(\text{COD})\text{dppb}][\text{BF}_4]$, en el que COD es ciclo-1,5-octadieno y dppb es 1,4-bis(difenilfosfino)butano).

- 10 Al hidrogenar el éster insaturado con para-hidrógeno, la polarización se transfiere desde el H polarizado añadido a la señal de ^{13}C del átomo de carbono $[1-^{13}\text{C}]$ -carboxilato vía acoplamiento escalar (o efecto Overhauser nuclear) mediante el uso de medios conocidos.

- 15 En este punto, a fin de usar provechosamente un compuesto parahidrogenado como un agente de contraste de ^{13}C MRI eficaz, es necesario que la señal "antifásica" del átomo de carbono hiperpolarizado, obtenida a través de la transferencia de polarización desde el parahidrógeno añadido, se convierta totalmente en una señal "en fase", útil para la adquisición de imágenes. Esta etapa se puede llevar a cabo usando una secuencia de pulsos apropiada, como se enseña, por ejemplo, por Goldman M. et al, en la referencia citada anteriormente (C. R. Phisique 2005, 6, 575), o aplicando un procedimiento de ciclo de campo apropiado al producto parahidrogenado. Este último incluye introducir rápidamente (no adiabáticamente) la muestra hidrogenada en una pantalla magnética (intensidad de campo = 0,1 μT), y después retirar lentamente (adiabáticamente) la pantalla para llevar la muestra a valores de campo que corresponden al campo magnético de la Tierra (50 μT) (a este respecto, véase, por ejemplo, C. R. Phisique 2004, 5, 315).

- 20 Según una realización preferida, la etapa b) del procedimiento de la invención se lleva a cabo aplicando un procedimiento de ciclos de campo apropiado al éster para-hidrogenado obtenido en la etapa a) del procedimiento, a fin de promover la transferencia de polarización desde los núcleos protónicos (que derivan de la adición de parahidrógeno al éster insaturado) al núcleo no protónico de interés, a saber, el átomo de $[1-^{13}\text{C}]$ -carbono de la molécula de carboxilato para dar la molécula de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondiente.

- 25 Merece la pena señalar que, en términos generales, la transferencia de polarización desde el para-hidrógeno al heteronúcleo de interés se lleva a cabo principalmente mediante acoplamiento escalar (o acoplamiento j), y un heteroátomo adyacente a la insaturación actúa típicamente como receptor de la transferencia de polarización desde los protones del para-hidrógeno acoplados escalarmente (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 2). En este punto, la intensidad de la polarización heteronuclear depende de todos los acoplamientos j implicados en los sistemas de espín formados. De este modo, por ejemplo, para compuestos ^{13}C , se ha calculado (Barkemeyer J.; Haake, M.; Bargon J. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 2927-2928) que la transferencia máxima de polarización desde los protones de parahidrógeno (indicados con A y A') a un heteroátomo (indicado con X) que forman un sistema de espín AA'X con los protones de parahidrógeno se puede alcanzar cuando los acoplamientos J entre todos los núcleos permanecen en una relación definida. En particular, siendo $J_{\text{AX}}-J_{\text{A'X}}$ la diferencia entre el acoplamiento escalar de los dos protones y el heteroátomo, y siendo $J_{\text{AA'}}$ el acoplamiento escalar entre los dos protones en el producto, la transferencia de polarización es máxima cuando la relación $|J_{\text{AX}} - J_{\text{A'X}}|/J_{\text{AA'}}$ es $\sqrt{8}$.

- 30 Puesto que la constante $J_{\text{AA'}}$ está en un intervalo de 5 a 15 Hz, entonces la diferencia óptima entre el acoplamiento J heteronuclear (acoplamiento protón-carbono) está en el intervalo 15-45 Hz. Tales valores elevados de acoplamiento escalar se pueden lograr cuando los dos protones de parahidrógeno se añaden a una distancia de dos o tres (enlaces) desde el heteroátomo al que se transfiere la polarización, y disminuye gradualmente al aumentar la distancia desde los protones de parahidrógeno añadidos.

- 35 A partir de lo anterior, una persona experta en la técnica nunca habría esperado que se pudiese observar una polarización heteronuclear satisfactoria, útil para aplicaciones diagnósticas mediante RM y para evaluaciones de RM metabólicas, mediante transferencia de polarización desde protones de parahidrógeno situados a una distancia de más de dos o tres enlaces desde el átomo de carbono ^{13}C de interés. Aún peor, nadie habría esperado ser capaz de observar una polarización de ^{13}C heteronuclear sustancialmente equivalente o comparable a la obtenida con un heteronúcleo situado a la distancia óptima (identificada anteriormente) con átomos de carbono ^{13}C situados más bien a una distancia de 4-5 enlaces desde los protones de parahidrógeno añadidos.

- 40 En su lugar, hemos observado inesperadamente que, tras la aplicación del ciclo de campo magnético, se puede lograr una hiperpolarización sustancialmente idéntica de la señal de ^{13}C del átomo de carbono de $[1-^{13}\text{C}]$ -carboxilato mediante transferencia de polarización tanto desde los núcleos de protón H polarizados del éster vinílico parahidrogenado (que tiene la distancia de 3 enlaces recomendada hasta el heteronúcleo de ^{13}C implicado) como de los núcleos de protón H polarizados del éster propargílico parahidrogenado correspondiente, que tiene una mayor distancia (4-5 enlaces) hasta el heteronúcleo de interés, como se muestra, por ejemplo, en la Figura 3, que compara la intensidad de las señales de ^{13}C carboxílicas obtenidas de ésteres vinílicos y propargílicos parahidrogenados tras la aplicación del ciclo de campo.

Por el contrario, como se muestra en la Figura 2, en ausencia de una transferencia de polarización inducida, (es decir, antes de la aplicación del ciclo de campo), las únicas señales de ^{13}C detectables son las de los átomos de carbono adyacentes alifáticos del grupo etilo que están enlazados a, y por tanto afectados por, los átomos de parahidrógeno añadidos al resto vinílico, mientras que no se observa ninguna señal detectable para el átomo de carbono ^{13}C carboxílico, situado a una mayor distancia, y de este modo no afectado sustancialmente.

Estos resultados inesperados hacen posible preparar ésteres adecuadamente hiperpolarizados en el átomo de carbono $[1-^{13}\text{C}]$ -carboxílico, y, a su vez, obtener moléculas que contienen carboxilato adecuadamente $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado de interés diagnóstico a partir de precursores alílicos o propargílicos insaturados de los mismos, permitiendo de ese modo obtener compuestos de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado dotados con un grado satisfactorio de polarización mediante el uso de la técnica de Phip incluso en ausencia de un precursor insaturado directo de los mismos, así como de un éster vinílico apropiado.

Directamente tras su preparación, el éster $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado, por ejemplo obtenido en la etapa b) del procedimiento de la invención, se convierte cuantitativamente en el compuesto de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado deseado, o en el ácido carboxílico $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondiente, que entonces se recoge en una disolución acuosa lista para uso en aplicaciones *in vivo*. Dicha conversión cuantitativa se lleva a cabo mediante eliminación hidrolítica del resto de éster hidrogenado, produciendo el carboxilato libre de interés, o el ácido carboxílico correspondiente.

En este punto, la expresión "conversión cuantitativa" se usa aquí para indicar una transformación química (preferiblemente una hidrólisis) en la cantidad de 20% o más, preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 75% o más, e incluso más preferiblemente de al menos 90%, siendo particularmente preferida una transformación de al menos 95% del precursor de éster en el carboxilato libre correspondiente.

El término "hidrólisis", como se usa aquí, se refiere a una reacción química en la que el agua reacciona con un compuesto de partida para producir uno o más compuestos resultantes; típicamente implica la división de un enlace (el enlace de éster) en el compuesto de partida y la adición opcional de un catión de hidrógeno y/o de un anión de hidróxido a la estructura del compuesto de partida, para obtener el compuesto o compuestos resultantes. Hablando de forma general, la reacción de hidrólisis se puede llevar a cabo en condiciones ácidas ($\text{pH} < 7$), básicas ($\text{pH} > 7$), o incluso neutras ($\text{pH} = 7$), mientras que las condiciones básicas, por ejemplo que corresponden a una disolución de pH comprendida preferiblemente entre 7 y 14, más preferiblemente entre 8 y 14, y lo más preferible, entre 10 y 14, se han de considerar como particularmente preferidas para el procedimiento de la invención, como se describirá aquí más abajo con más detalle.

En línea con todo lo anterior, la etapa c) del procedimiento de la invención comprende hidrolizar el éster $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado obtenido en la etapa b) del procedimiento al compuesto que contiene carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado soluble en agua correspondiente, que entonces se recoge en una disolución acuosa.

Más particularmente, según una implementación preferida, la etapa c) del procedimiento de la invención se lleva a cabo añadiendo el éster $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado obtenido en la etapa b) del procedimiento en una disolución acuosa con una cantidad adecuada de una base, por ejemplo NaOH , o NaHCO_3 , o Na_2CO_3 , así como compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen reacción acuosa básica (por ejemplo, trimetilolaminometano, también conocido como trometamina, o fosfato trisódico), por ejemplo como se esquematiza en los esquemas a) y b) de la Figura 1.

Para el alcance de la actual invención, se prefiere particularmente el uso de NaOH acuoso.

Por ejemplo, una disolución acuosa del éster hiperpolarizado obtenido en la etapa b) del procedimiento con una concentración 10-100 mM se hidroliza en presencia de NaOH 0,1-1 M, que se añade a la disolución acuosa a una temperatura que oscila de alrededor de 20°C a 100°C , preferiblemente de 40°C a 80°C , y lo más preferible de 60°C a 80°C , conduciendo de ese modo a una disolución acuosa del compuesto de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado.

En este punto, se debe considerar que, para aplicaciones de RM *in vivo*, se requiere la biocompatibilidad de las disoluciones acuosas obtenidas de productos hiperpolarizados. Por lo tanto, tras las etapas a) a c), el procedimiento anterior según la invención, que comprende llevar a cabo la polarización de ^{13}C de la molécula de éster precursor en un medio acuoso como se describe anteriormente, incluye preferiblemente una etapa d) adicional que comprende eliminar el catalizador de hidrogenación y el codisolvente o codisolventes orgánicos opcionales de la disolución acuosa del compuesto de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado obtenido en la etapa c), obteniendo de ese modo una disolución acuosa de la molécula que contiene carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado de interés adecuada para uso en aplicaciones *in vivo*.

Esta última tarea se puede lograr, por ejemplo, mediante evaporación rápida de la disolución acuosa del producto hiperpolarizado, por ejemplo pulverizando la disolución en una cámara o matraz conectado a una bomba de vacío. La eliminación del complejo de Rh(I) potencialmente tóxico se puede llevar a cabo convenientemente entonces, por ejemplo mediante elución de la disolución acuosa (de la molécula hiperpolarizada) que resulta de la eliminación de cualquier disolvente o codisolvente orgánico opcional en una microcolumna que contiene menos de 1 ml de una resina de intercambio catiónico, que retiene el catalizador de hidrogenación cargado positivamente.

Para superar todas las etapas de purificación anteriores, según una realización particularmente preferida, la etapa a) del procedimiento de la invención, que incluye hacer reaccionar el éster insaturado con para-hidrógeno molecular, se lleva a cabo en un disolvente orgánico, o una mezcla adecuada de disolventes orgánicos, y en presencia de un catalizador de hidrogenación soluble en un medio orgánico e insoluble en un disolvente acuoso.

5 Los disolventes orgánicos adecuados para los fines de la invención son inmiscibles con agua, y comprenden preferiblemente disolventes organoclorados, tales como, por ejemplo, cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, éteres tales como, por ejemplo, éter dietílico, éter diisopropílico y éter butílico, e hidrocarburos alifáticos tales como, por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano y ciclohexano, acetato de etilo, etc.

10 Entre ellos, se prefieren disolventes clorados, en los que se prefieren particularmente cloroformo y diclorometano así como mezclas adecuadas de los mismos, u opcionalmente mezclas de los disolventes anteriores con una cantidad mínima de un alcohol de cadena corta tal como, típicamente, etanol o, preferiblemente, metanol, o, como alternativa, de acetona. En este punto, con cantidad mínima, como se usa aquí, pretendemos decir una cantidad que es menor que 30%, preferiblemente que oscila de 10% a 30%, y más preferiblemente de 10 a 20% de la cantidad total de disolvente, que conduce a residuos indetectables en las disoluciones acuosas de las moléculas que contienen carboxilato hiperpolarizado finalmente recuperadas. Por otro lado, las trazas opcionales, por ejemplo obtenidas usando mayores cantidades de disolventes miscibles con agua, se pueden eliminar adecuadamente de la disolución acuosa recogida de la molécula hiperpolarizada deseada, por ejemplo mediante su evaporación rápida o mediante secado por pulverización, como se explica anteriormente.

20 Los ejemplos de catalizadores adecuados para el uso en el procedimiento de la presente invención incluyen complejos de rodio de fórmula $[\text{Rh}(\text{difosfina})\text{dieno}][\text{anión}]$, en los que la difosfina se selecciona preferiblemente de DPPB (1,4-bis(difenilfosfino)butano), DPPE (1,2-bis(difenilfosfino)etano), y sus derivados, incluyendo, por ejemplo, las fosfinas quirales tales como DINAP (2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo), CHIRAPHOS (2,3-difenilfosfinobutano), DIOP (1,4-bis(difenilfosfino)-1,4-bisdesoxi-2,3-O-isopropiliden-L-treitol) y DIPAMP (1,2-bis[(2-metoxifenil)(fenilfosfino)etano]); el dieno se selecciona preferiblemente de 1,5-ciclooctadieno y norbornadieno, y el anión puede ser cualquier anión, pero, preferiblemente, tetrafluoroborato o trifluorometilsulfonato.

Entre ellos, se prefieren catalizadores en los que el grupo fosfina es difenilfosfinobutano, mientras que se prefiere particularmente $[\text{bis}(\text{difenilfosfinobutano})(1,5\text{-ciclooctadieno})\text{Rh}(\text{I})]$.

30 En términos prácticos, la hidrogenación del sustrato insaturado se lleva a cabo, por ejemplo, pulverizando la disolución orgánica que comprende el sustrato y el catalizador en una cámara de reacción previamente presurizada con para- H_2 a una presión comprendida preferiblemente entre 6 y 10, más preferiblemente entre 8 y 10, y lo más preferible alrededor de 10 atm de para-hidrógeno. La reacción de hidrogenación se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura comprendida entre 40^o y 90^oC, y más preferiblemente entre 70^o y 90^o.

Directamente con la hidrogenación del éster insaturado con para-hidrógeno, la polarización se transfiere desde el H polarizado añadido a la señal de ^{13}C del átomo de carbono de $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -carboxilato.

35 En este punto, según una implementación preferida, la transferencia de polarización según la etapa b) del procedimiento de la invención se lleva a cabo mediante aplicación de un procedimiento de ciclo de campo apropiado al éster parahidrogenado, por ejemplo obtenido en la etapa a) del procedimiento, como se explica anteriormente, promoviendo la transferencia de polarización deseada desde los núcleos protónicos añadidos al átomo de carbono $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ de la molécula de carboxilato (es decir, el éster hidrogenado), dando así una disolución orgánica del éster $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondiente.

La eliminación hidrolítica del resto de éster hidrogenado se lleva a cabo entonces según la etapa c) del procedimiento propuesto, produciendo el compuesto de carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado soluble en agua deseado, o el correspondiente ácido carboxílico $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado, que entonces se recoge como una disolución acuosa, lista para uso en aplicaciones *in vivo*.

45 Según una realización preferida, la etapa c) del procedimiento de la invención se lleva a cabo diluyendo simplemente la disolución orgánica del éster hiperpolarizado obtenido preferiblemente, como se ha dicho, en la etapa b) del procedimiento con una disolución acuosa apropiada que promueve la hidrólisis del éster $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado hasta el compuesto de carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado soluble en agua correspondiente, o el ácido carboxílico correspondiente, por ejemplo como se muestra esquemáticamente en la Figura 1, esquema c).

50 A partir de lo anterior parece que, según una realización particularmente preferida, el procedimiento de la invención comprende obtener un éster $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado insoluble o apenas soluble en agua en un medio orgánico, por ejemplo a partir de un éster insaturado de fórmula (II) soluble en un disolvente orgánico pero insoluble o apenas soluble en agua, por ejemplo como se describe anteriormente; convertirlo cuantitativamente en el compuesto de carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado soluble en agua correspondiente mediante eliminación hidrolítica del resto de éster hidrogenado llevada a cabo mediante dilución de la disolución orgánica (del éster hiperpolarizado) con una disolución acuosa adecuada, y entonces recoger el compuesto de carboxilato $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado obtenido en la fase acuosa, mediante extracción por transferencia de fase, como una disolución acuosa libre de impurezas lista para uso en aplicación *in vivo*.

Según la presente invención, y excepto que se indique de otro modo, las expresiones “pobrementemente soluble en agua” o “apenas soluble en agua”, usadas aquí de forma intercambiable con referencia a un éster insaturado de fórmula (II) o un éster [1-¹³C]-hiperpolarizado según la invención, se refieren a un compuesto que tiene una solubilidad mínima en agua, preferiblemente menor que 20%, más preferiblemente, menor que 5%, e incluso lo más preferible, menor que 1% de la cantidad total del compuesto.

Por otro lado, y excepto que se indique de otro modo, las expresiones “disolución acuosa” o “disolución acuosa adecuada” o “disolución acuosa apropiada”, como se usan aquí de forma intercambiable, se refieren a agua estéril o disolución salina, opcionalmente amortiguada de forma apropiada, en cualquier caso fisiológicamente tolerable y adecuada para uso en aplicaciones de diagnóstico *in vivo*, o, además, una disolución acuosa como se define anteriormente, que incluye además una cantidad adecuada de un reactivo seleccionado apropiadamente capaz de promover la conversión rápida y selectiva del éster hidrogenado en el compuesto de carboxilato [1-¹³C]-hiperpolarizado, soluble en agua, correspondiente, y generar, como resultado, una disolución acuosa fisiológicamente aceptable del mismo, adecuada para uso como tal en aplicaciones de diagnóstico *in vivo*, sin que requiera purificación adicional. Los ejemplos adecuados de disolución acuosa según la actual invención, capaz de promover la hidrólisis del sustrato parahidrogenado al compuesto de carboxilato correspondiente, comprenden una cantidad mínima de una base, por ejemplo NaOH o NaHCO₃, o Na₂CO₃, así como compuestos orgánicos o inorgánicos con reacción acuosa básica (por ejemplo trimetilolaminometano, también conocido como trometamina, o fosfato trisódico) o las moléculas deuteradas correspondientes. Para el alcance de la actual invención, se prefieren particularmente disoluciones acuosas de NaOH o de la molécula deuterada correspondiente.

Sin embargo, está claro a partir de lo anterior que, cuando el reactivo usado para promover la hidrólisis del éster según la etapa c) del procedimiento de la invención no es él mismo fisiológicamente aceptable, tal como es el caso del NaOH, su cantidad en la disolución acuosa añadida se debe determinar de forma precisa, en base a la estequiometría de la propia reacción, para que se use completamente en la reacción de conversión del éster parahidrogenado al carboxilato libre soluble en agua y fisiológicamente compatible (a una condición de pH fisiológico), o la cantidad excedente se ha de neutralizar de forma adecuada (por ejemplo mediante adición de una cantidad adecuada de un ácido que genera con la base una sal fisiológicamente aceptable) a fin de dar como resultado una disolución acuosa fisiológicamente aceptable del compuesto de carboxilato deseado, que está lista para uso como tal en aplicaciones *in vivo*, sin requerir ninguna purificación adicional y/o formulación subsiguiente.

De este modo, una disolución acuosa de la molécula que contiene carboxilato [1-¹³C]-hiperpolarizado (o ácido carboxílico) se recoge directamente de la etapa c) del procedimiento preferido anterior según la invención, que está libre de impurezas y es utilizable como tal en la formación de imágenes de diagnóstico mediante MRI *in vivo*, sin la necesidad de una purificación adicional.

A este respecto, no se han observado trazas detectables de impurezas o disolventes orgánicos en las disoluciones acuosas de moléculas que contienen carboxilato [1-¹³C]-hiperpolarizado recogidas tras la hidrólisis procedentes de ensayos experimentales en los que el éster hiperpolarizado se obtiene en un disolvente orgánico, aunque comprenda metanol o acetona como codisolvente orgánico. De hecho, no se encuentran restos de estos codisolventes, al menos en niveles detectables, en disoluciones acuosas obtenidas de ensayos del Ejemplo 3 (véase la Figura 7C) y del Ejemplo 5 (véase la Figura 9) usando MeOH como codisolvente de hidrogenación.

Por tanto, según una realización especialmente preferida, la actual invención se refiere a un procedimiento de polarización inducida por para-hidrógeno para la preparación de moléculas que contienen carboxilato [1-¹³C]-hiperpolarizado de interés diagnóstico, que comprende:

a) obtener un éster alquenílico o alquinílico insaturado adecuado de la molécula de interés que contiene carboxilato opcionalmente enriquecida en [1-¹³C] en un disolvente orgánico (o mezcla de disolventes) inmisible con el agua, que puede incluir opcionalmente una cantidad mínima de un alcohol de cadena corta o acetona, y hacer reaccionar el éster obtenido con para-hidrógeno molecular, en presencia de un catalizador soluble en el disolvente orgánico pero insoluble en agua, para dar el éster parahidrogenado correspondiente;

b) aplicar un procedimiento de ciclo de campo apropiado al éster parahidrogenado obtenido para dar una disolución orgánica del éster [1-¹³C]-hiperpolarizado correspondiente,

c) diluir la disolución orgánica del éster [1-¹³C]-hiperpolarizado con una disolución acuosa adecuada que promueve la hidrólisis del éster hiperpolarizado a la molécula que contiene carboxilato [1-¹³C]-hiperpolarizado soluble en agua correspondiente, o el ácido carboxílico correspondiente, que se extrae entonces, por ejemplo mediante transferencia de fase, en la fase acuosa y se recoge directamente como una disolución acuosa libre de impurezas lista para uso como tal en aplicación *in vivo*.

De forma interesante, el compuesto de carboxilato [1-¹³C]-hiperpolarizado obtenido según el procedimiento de la invención como una disolución acuosa lista para uso como tal en aplicaciones *in vivo*, tiene al menos 50% de polarización a fin de proporcionar suficiente sensibilidad en la formación de imágenes *in vivo*. Preferiblemente, la polarización obtenida es al menos 10%, y más preferiblemente, al menos 15%. Por otro lado, la disolución acuosa libre de impurezas de una molécula hiperpolarizada obtenida según el procedimiento de la invención es estable

durante un período de tiempo clínicamente aceptable; en particular, preferiblemente al menos 10% de esta polarización se mantiene en el momento de la inyección, que se lleva a cabo de forma habitual directamente tras la preparación del carboxilato hiperpolarizado, más preferiblemente, se mantiene al menos alrededor de 30% de la polarización, lo más preferible, se mantiene al menos alrededor de 80% de la polarización.

- 5 En este punto, estará claro que el método de polarización propuesto aquí debería llevarse a cabo en el marco de tiempo en el que la molécula de carboxilato hiperpolarizado permanece significativamente polarizada, poco tiempo después de ser sometida a la conversión química (por ejemplo hidrólisis) del precursor. Por lo tanto, la administración de tal sustrato activo, y la medida de RM subsiguiente, se efectúan preferiblemente de forma tan rápida como sea posible. Esto significa que la muestra, ya sea cuerpo de animal no humano o humano, debería estar disponible próxima al área en la que tiene lugar la polarización.

10 Las disoluciones acuosas obtenidas según el procedimiento de la actual invención incluyen preferiblemente la molécula hiperpolarizada de interés en una concentración que oscila entre 0,002 y 1,0 M, y preferiblemente entre 0,01 y 0,5 M. La disolución acuosa libre de impurezas de una molécula hiperpolarizada obtenida, por ejemplo, según la etapa d), o recogida directamente de la etapa c) del procedimiento, puede encontrar un uso ventajoso como tal (es decir, sin purificación adicional y/o formulación subsiguiente) en formación de imágenes de diagnóstico de RM *in vitro*, *ex vivo* y, especialmente, *in vivo* de un órgano, fluido, región o tejido corporal de un ser humano o animal, así como para la evaluación diagnóstica de parámetros fisiológicos de interés diagnóstico en un paciente individual, humano o animal.

15 Incluso más preferiblemente, pueden encontrar un uso ventajoso en el campo emergente referido a la evaluación de perfiles metabólicos de interés diagnóstico en un paciente individual mediante uso de técnicas de formación de imágenes de RM. En particular, la evaluación de la conversión metabólica de un carboxilato hiperpolarizado concernido puede permitir proporcionar una evaluación de los procesos metabólicos en un paciente individual y/o la información sobre el estado metabólico de un tejido u órgano del paciente (sano o patológico).

20 Se describe un agente de contraste de RM que se caracteriza por que comprende, o, preferiblemente, consiste en la disolución acuosa libre de impurezas del compuesto de carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado recogido según la etapa d), o, más preferiblemente, recogido directamente de la etapa c) del procedimiento, según una realización particularmente preferida de la invención.

En una realización particularmente preferida, el compuesto de carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado es el lactato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado.

25 En una realización alternativa, igualmente preferida, el compuesto de carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado es el acetato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado.

En una realización especialmente preferida, el compuesto de carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado según la invención es el piruvato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado.

30 También se describe un procedimiento de polarización inducida por para-hidrógeno que, además de las etapas del procedimiento de a) a c) o de a) a d), que permite obtener una disolución acuosa libre de impurezas de la molécula de carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés como se describe anteriormente, comprende además emplear la disolución acuosa recogida para la formación de imágenes de diagnóstico de RM de un paciente individual, o para la evaluación mediante RM *in vivo* o *in vitro*, *ex vivo*, de parámetros biológicos o perfiles metabólicos de interés diagnóstico.

35 Más particularmente, dicho procedimiento de polarización inducida por para-hidrógeno comprende:

i) recoger una disolución acuosa de una molécula [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizada de interés según la etapa d), o, más preferiblemente, directamente de la etapa c) de un procedimiento según la invención, como se describe anteriormente, el mencionado procedimiento, además, comprende adicionalmente:

40 ii) administrar la disolución acuosa recogida de la molécula de carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés a un paciente individual, o poner en contacto la mencionada disolución acuosa con una muestra *ex vivo* de un órgano, fluido o tejido corporal de un paciente individual;

iii) exponer el paciente individual administrado (o muestra *ex vivo*) a una frecuencia de radiación que permita excitar el átomo de carbono ^{13}C -marcado hiperpolarizado de la molécula de carboxilato;

45 iv) registrar la intensidad de señal generada por el núcleo excitado de la molécula de carboxilato administrada y/o de cualquier metabolito o catabolito adecuado de la misma, y

v) obtener una imagen del órgano, región o tejido corporal del paciente individual, o estimaciones adecuadas del parámetro biológico o perfil metabólico de interés a partir de los valores registrados de la intensidad de señal.

En este punto, las etapas del procedimiento anterior, que incluyen exponer el paciente administrado o muestra *ex*

5 *vivo* a una radiación de excitación apropiada, registrar la intensidad de señal generada por el núcleo excitado, y obtener una imagen del órgano, región o tejido corporal del paciente individual, o estimaciones adecuadas del parámetro biológico o perfil metabólico de interés a partir de los valores registrados de la intensidad de la señal, se pueden llevar a cabo adecuadamente según técnicas convencionales y procedimientos operativos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica pertinente.

Además, la invención se refiere a un método para la evaluación *in vitro*, *ex vivo*, mediante RM de parámetros biológicos o perfiles metabólicos de interés diagnóstico como se expone en la reivindicación 21.

10 Se describe un método que puede comprender como alternativa exponer a una frecuencia de radiación que excita la molécula de carboxilato ^{13}C -hiperpolarizado, un paciente pretratado con una cantidad apropiada de disolución acuosa de la molécula de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado, y registrar entonces la intensidad de señal generada por el núcleo de ^{13}C excitado, o todavía de forma alternativa, puede incluir obtener valores de intensidad de señal (y, a su vez, estimaciones de parámetros biológicos o perfiles metabólicos de interés diagnóstico) a partir de una colección de señales de MRI adquiridas, en el momento apropiado, mediante un paciente individual tratado apropiadamente con una cantidad eficaz de disolución acuosa de la molécula de carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado y expuesto adecuadamente a una frecuencia de radiación que permite excitar la señal de ^{13}C hiperpolarizado de la molécula de carboxilato, y entonces almacenada digitalmente en la memoria de una consola de un tomógrafo, o en un disolución de almacenamiento de datos digital local o remoto.

15 A este respecto, excepto que se indique de otro modo, por "paciente individual" o "paciente", como se usa aquí, nos referimos a un paciente humano o animal, y preferiblemente a un ser humano que se somete a evaluación diagnóstica mediante RM.

20 Por otro lado, con "cantidad eficaz" o "cantidad adecuada", como se usa aquí de forma intercambiable, nos referimos a cualquier cantidad de la disolución acuosa de la molécula hiperpolarizada recogida según el procedimiento de la invención, y, preferiblemente, recogida directamente de la etapa c) de la implementación del procedimiento preferida que es suficiente para satisfacer su fin o fines de diagnóstico pretendidos: es decir, por ejemplo, para adquirir la señal generada por el núcleo excitado de la molécula de carboxilato y/o de cualquier metabolito o catabolito de la misma adecuado.

25 La disolución acuosa libre de impurezas del carboxilato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado (o ácido carboxílico) obtenido mediante uso del procedimiento de la presente invención se puede administrar como tal en el sistema vascular, o directamente en un órgano o tejido muscular, por vía subdérmica o subcutánea, según sea el caso. Después, la muestra se puede exponer a un campo magnético uniforme (también conocido como "campo magnético primario") con radiación de una frecuencia seleccionada para excitar las transiciones de espín nuclear en la mencionada señal de ^{13}C -carboxílica hiperpolarizada. La hiperpolarización de la señal de ^{13}C del éster carboxílico, y consiguientemente de la molécula de carboxilato correspondiente, da como resultado un aumento en la diferencia de población entre los estados de espín nuclear excitado y de base de aquellos núcleos que son responsables de las señales de resonancia magnética. Puesto que la intensidad de la señal de RM es proporcional a esta diferencia de población, las señales de RM detectadas finales dan como resultado señales de mayor amplitud. La amplitud de las señales de RM inducidas también depende de otros varios factores, tales como la fuerza del campo magnético, la temperatura de la muestra, la naturaleza isotrópica y el entorno químico de los núcleos formadores de imágenes, y similares.

30 La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que están destinados a ser ilustrativos y de ningún modo limitantes del alcance de la invención.

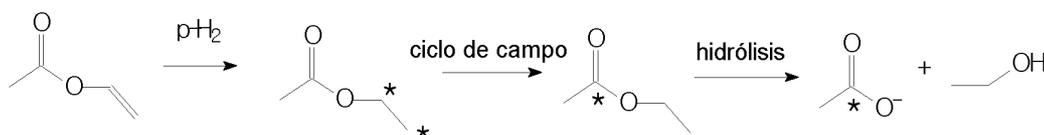
PARTE EXPERIMENTAL

Todos los espectros de RMN ^{13}C se adquieren en un espectrómetro Bruker de 600 MHz, que opera a 14,1 T, y 298 K).

EJEMPLOS

45 Todas las sustancias químicas y reactivos usados están comercialmente disponibles o se pueden preparar según métodos bien conocidos de la técnica.

Ejemplo 1: Preparación de acetato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado a partir de éster vinílico: la $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarización se lleva a cabo en un medio acuoso



50 Parahidrogenación de acetato de vinilo

La parahidrogenación de acetato de vinilo (adquirido por Sigma-Aldrich; código de referencia V1505) se ha llevado a cabo en agua usando el catalizador soluble en agua [Rh(NBD)phos][BF₄] (NBD = norbornadieno, phos = sal disódica de 1,4-bis[(fenil-3-propanosulfonato)fosfina]butano) (disolución en agua deuterada 2,5 mM (este catalizador se puede preparar, por ejemplo, según el procedimiento dado a conocer en Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med. 22, 123-34 (2009)). La reacción de parahidrogenación se ha llevado a cabo en un tubo de RMN equipado con una válvula de Young cargado con 0,3 ml de catalizador, 0,03 mmoles de sustrato (3 μl, concentración final alrededor de 100 mM), 0,05 ml de metanol y 8 bares de parahidrógeno (enriquecido a 77K, enriquecimiento del 50%).

Preparación del éster etílico [1-¹³C]-hiperpolarizado

Tras calentar la disolución a 90°C, el tubo de RMN se agitó vigorosamente durante 10", después se adquirió inmediatamente el espectro de 13C. En la Figura 2 se puede observar que la hiperpolarización se produce solamente en las señales de 13C alifáticas. Entonces se repitió un experimento como se describe anteriormente, en el que, tras agitar el tubo de RMN, se aplicó un ciclo de campo. En términos prácticos, el tubo de RMN se dejó caer en un apantallamiento de campo magnético de metal μ, después se extrajo lentamente del apantallamiento en alrededor de 5". El espectro de RMN ¹³C se adquirió entonces inmediatamente (de la disolución obtenida) con un espectrómetro Bruker de 600 MHz. La Figura 3a da a conocer el espectro de RMN 13C registrado, que muestra la resonancia de ¹³C-carboxilato hiperpolarizado del éster etílico [1-¹³C]-hiperpolarizado formado a 176 ppm.

Preparación del acetato [1-¹³C]-hiperpolarizado

Para obtener el acetato [1-¹³C]-hiperpolarizado correspondiente, se repitió la reacción de para-hidrogenación como se describió anteriormente, con una segunda cantidad de acetato de vinilo. El éster [1-¹³C]-hiperpolarizado obtenido se hidrolizó entonces mediante adición de 0,05 ml de NaOD 6M inmediatamente después del procedimiento del ciclo de campo, y entonces se adquirió el espectro de RMN 13C. La Figura 3b) da a conocer el espectro de RMN 13C del acetato obtenido, como sal sódica, en el que la señal ¹³C-hiperpolarizada del acetato es detectable a 181 ppm. De forma interesante, la intensidad de la señal polarizada lograda es bastante comparable con la observada para el acetato de etilo progenitor mostrado en la Figura 3a).

25 Ejemplo 2: Preparación de acetato [1-¹³C]-hiperpolarizado a partir del éster propargílico: [1-¹³C]-hiperpolarización llevada a cabo en un medio acuoso

Síntesis de acetato de propargilo



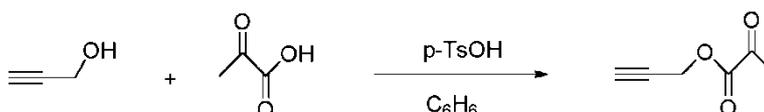
Se calentaron ácido acético (2,00 g, 34,1 mmoles) y alcohol propargílico (2,29 g, 40,9 mmoles) durante 4 h a reflujo en C₆H₆ (120 cm³) en presencia de una cantidad catalítica de p-TsOH (0,32 g, 1,7 mmoles) usando un aparato Dean-Stark. La reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se lavó con NaHCO₃ saturado (2 x 100 ml), y después con agua (2 x 100 ml). La capa orgánica se recogió y se secó (con Na₂SO₄ anhidro), se filtró, y se concentró para producir el producto bruto como un aceite amarillo móvil inodoro (1,67 g, 50%), que se usó sin purificación posterior.

35 Preparación del acetato [1-¹³C]-hiperpolarizado

La reacción de parahidrogenación del éster propargílico obtenido se ha llevado a cabo en un medio hidroalcohólico como se describió previamente en el Ejemplo 1 para la molécula de acetato, y como se esquematiza en el esquema b) de la figura 1 (en el que R es CH₃). Tras aplicar el ciclo de campo, llevado a cabo como se describe anteriormente en el Ejemplo 1, se obtiene una ¹³C-polarización del átomo de carbono de carboxilato, comparable a la observada con el éster vinílico, respectivamente antes (Figura 3c) y después (Figura 3d) de la hidrólisis, llevada a cabo, esta última, como se describió anteriormente en el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Preparación de piruvato [1-¹³C]-hiperpolarizado a partir de éster propargílico: [1-¹³C]-hiperpolarización llevada a cabo en un medio acuoso y en metanol/CDCl₃

Síntesis de piruvato de propargilo



Se calentaron ácido pirúvico (3,00 g, 34,1 mmoles) y alcohol propargílico (2,29 g, 40,9 mmoles) durante 4 h a reflujo en C₆H₆ (120 cm³) en presencia de una cantidad catalítica de p-TsOH (0,32 g, 1,7 mmoles) usando un aparato Dean-Stark. La reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se lavó con NaHCO₃ sat. (2 x 100 ml), y después con agua (2 x 100 ml). La capa orgánica se recogió y se secó (Na₂SO₄ anh.), se filtró, y se concentró para

producir el producto bruto como un aceite amarillo móvil inodoro (2,08 g, 49%), que no se purificó posteriormente.

Preparación del piruvato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado

Preparación del éster alílico [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado en medio acuoso

5 La parahidrogenación del piruvato de propargilo se ha llevado a cabo en un medio de hidrogenación hidroalcohólico (15% de metanol en agua) usando el catalizador soluble en agua $[\text{Rh}(\text{NBD})\text{phos}][\text{BF}_4]$ (disolución en agua deuterada 2,5 mM).

La reacción de parahidrogenación se ha llevado a cabo en un tubo de RMN equipado con una válvula de Young cargado con 0,3 ml de catalizador, 0,03 mmoles de sustrato (3 μl , concentración de alrededor de 70 mM), 0,05 ml de metanol y 8 bares de parahidrógeno (enriquecido a 77 K, enriquecimiento del 50%).

10 Tras calentar la disolución a 90°C, el tubo de RMN se agitó vigorosamente durante 10", después se dejó caer en un apantallamiento de campo magnético de metal μ y se extrajo lentamente de forma sucesiva desde el apantallamiento en alrededor de 5". Entonces se adquirió inmediatamente el espectro de RMN ^{13}C en un espectrómetro Bruker de 600 MHz. El piruvato de alilo [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado se obtiene como se esquematiza en la Figura 1, esquema b, en el que $\text{R} = \text{CH}_3\text{-CO}$.

15 En el espectro de ^{13}C adquirido inmediatamente tras la aplicación del ciclo de campo (mostrado en la Figura 4), hay claramente visibles tres señales en la región carbonílica, que se pueden adscribir al éster alílico de piruvato (160 ppm: estructura a) de la Figura 4), a la forma hidratada (172 ppm: estructura b)), y al hemiacetal (171 ppm: estructura c)). La última especie es debida a la presencia de 15% de metanol en agua, añadido para facilitar la disolución del sustrato en agua y mejorar la eficiencia del catalizador, que promueve su formación.

20 Preparación del éster alílico [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado en metanol

La reacción de parahidrogenación se ha llevado a cabo entonces en metanol, como disolvente de reacción, usando el catalizador comercial $[\text{Rh}(\text{COD})\text{dppb}][\text{BF}_4]$ (COD = ciclo-1,5-octadieno, dppb = 1,4-bis(difenilfosfino)butano). La reacción de parahidrogenación se ha llevado a cabo en un tubo de RMN equipado con una válvula de Young cargado con 2 mg de catalizador y 0,4 ml de metanol- d_3 . El catalizador se activó mediante hidrogenación del COD coordinado, después se añadieron 3 μl de sustrato, y el tubo de RMN se sometió a presión con 8 bares de parahidrógeno (enriquecido a 77K, enriquecimiento del 50%).

Tras calentar la disolución a RT, el tubo de RMN se agitó vigorosamente durante 10", se aplicó un ciclo de campo magnético como se describe en el ejemplo 1, y después se adquirió el espectro de ^{13}C . Como se puede observar a partir del espectro registrado, mostrado como la Figura 6, la mayoría del producto polarizado es debido a la forma acetálica del piruvato, que tiene la estructura de la Figura 5.

30 Preparación del éster alílico [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado en metanol/ CDCl_3

La reacción de parahidrogenación del piruvato de propargilo se llevó a cabo entonces en un medio orgánico a fin de aprovecharse de una extracción de transferencia de fase del piruvato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado, que permite eliminar el catalizador de hidrogenación y reducir hasta valores sustancialmente no detectables las cantidades de codisolventes alcohólicos (o miscibles con agua) opcionales en la mezcla acuosa final, conduciendo de ese modo a una disolución acuosa sustancialmente libre de impurezas del piruvato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado deseado.

Más particularmente, la reacción de parahidrogenación del piruvato de propargilo se llevó a cabo en una mezcla de metanol/ CDCl_3 (75 μl de metanol y 500 μl de CDCl_3) con [bis(difenilfosfinobutano)(1,5-ciclooctadieno)] $\text{Rh}(\text{I})$ comercial como catalizador de hidrogenación. La reacción de parahidrogenación se ha llevado a cabo en un tubo de RMN equipado con válvula de Young cargado con 2 mg de catalizador y 0,05 ml de metanol- d_3 . El catalizador se activó mediante hidrogenación del dieno coordinado, después se añadieron CDCl_3 y el sustrato (3 μl del éster propargílico en 25 μl de metanol), el tubo se sometió a presión con 8 bares de para- H_2 . Tras calentar la disolución a 90°, el tubo de RMN se agitó vigorosamente durante 10" para dar el intermedio parahidrogenado de la Figura 10 (espectro de RMN 1H) y 11 (espectro de RMN ^{13}C) en la forma acetálica (debida al metanol en disolución). El experimento se repitió entonces como se describió anteriormente con una segunda cantidad de piruvato de propargilo, en la que, tras calentar la disolución a 90° y agitar el tubo de RMN durante 10", se aplicó un ciclo de campo magnético como se describe en el ejemplo 1, conduciendo a la obtención del éster [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado. Entonces se llevó a cabo la hidrólisis básica del éster hiperpolarizado mediante adición de 0,5 ml de NaOD 1M a la mezcla de reacción mantenida a alrededor de 90°C. Preferiblemente, la adición se lleva a cabo mediante inyección rápida de la disolución acuosa de NaOD a través de la fase orgánica, obteniendo de ese modo el mezclamiento más rápido deseado de las dos fases, la orgánica y la acuosa.

La disolución básica obtenida se llevó entonces a pH ácido (pH 4) mediante adición de 0,5 ml de HCl. La fase acuosa se recogió entonces, y se registró inmediatamente un espectro de ^{13}C que muestra la señal polarizada de ^{13}C del piruvato (Figura 7, espectro c)) a alrededor de 168 ppm, libre de impurezas.

A fin de que la disolución acuosa recogida de piruvato hiperpolarizado se pueda usar en aplicaciones *in vivo*, es necesario que la disolución acuosa se amortigüe adecuadamente a un pH fisiológico (pH ~ 7). Sin embargo, la disolución básica del piruvato hiperpolarizado (obtenido tras la adición de NaOD (1M)) preferiblemente se acidifica en primer lugar hasta pH ácido, por ejemplo mediante adición de DCl, como se menciona anteriormente, a fin de restaurar el grupo metilo de la molécula de piruvato desde piruvato α -desprotonado y su forma hidratada correspondiente formada opcionalmente en condiciones hidrolíticas básicas (pH > 8). Después, la disolución ácida se amortigua adecuadamente a pH ~ 7, por ejemplo con amortiguador de fosfato 0,1 M, obteniendo de ese modo una disolución libre de impurezas y fisiológicamente aceptable del piruvato hiperpolarizado, lista para uso en aplicaciones *in vivo*.

10 Ejemplo 4: Preparación de éster etílico de TFA-glicina [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado: [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarización llevada a cabo en MeOH y en acetona

a) Síntesis de las moléculas sustrato

i) Ácido 2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acético (preparado como se describe en Tetrahedron, 2003, 59, 9019-9029).

15 A una suspensión agitada de 2 g (25,5 mmoles) de glicina en 6 ml de una disolución al 30% p/p de metóxido sódico en metanol, se añadieron lentamente a 0°C 10 ml (51,10 mmoles) de trifluoroacetato de etilo. Después, la temperatura se incrementó lentamente hasta la temperatura ambiente, y la disolución se agitó durante 4 horas. Después se evaporó el metanol, y el residuo se repartió entre HCl acuoso 1M y éter dietílico. La fase orgánica se extrajo con éter dietílico (2 x 100 ml), y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (3 x 100 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 , y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo un sólido blanco (3,61 g, 79%), y se usó sin purificación posterior.

Caracterización mediante RMN: RMN ^1H (acetona- d_6 400 MHz) d 8,90 (1H, bs, NH), 4,06 (2H, d, J=5,86 Hz, CH_2)

RMN ^{13}C (acetona- d_6 , 100 MHz) d 169,7 [C, $\text{C}=\text{O}$], 158,0 [C, q, $^2\text{J}_{\text{C-F}}=36,8$ Hz, $\text{C}=\text{O}$], 117,0 [C, q, $\text{J}_{\text{C-F}}=285,3$ Hz, COCF_3], 41,4 [CH_2],

RMN ^{19}F (acetona- d_6 376 MHz) d -76,44

25 ii) 2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetato de vinilo (TFA-Gly-OVinilo) (preparado como se describe, por ejemplo, en Org. Process Research and Development, 2009, 13, 706-709).

30 A una suspensión agitada del compuesto intermedio obtenido de la etapa i) (1,30 g, 7,60 mmoles) en 15 ml de acetato de vinilo, se añadieron $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,02 g, 0,08 mmoles) y KOH (0,04 g, 0,76 mmoles) en una atmósfera de argón. La disolución se agitó toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla se paralizó entonces con agua, y se añadió éter dietílico. La fase acuosa se extrajo con éter dietílico (2 x 50 ml), se lavó con salmuera (3 x 50 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se evaporó el disolvente. La reacción bruta se purificó entonces sobre gel de sílice usando como eluyente éter dietílico/éter de petróleo (40/60) para dar el producto deseado como un sólido amarillo pálido (0,37 g, 25%).

Caracterización mediante RMN:

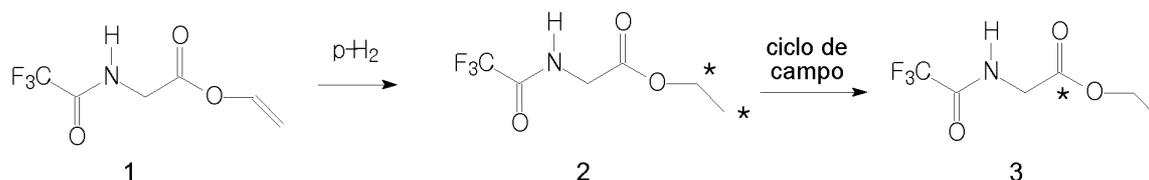
35 RMN ^1H (acetona- d_6 400 MHz) d 9,00 (1H, s, NH), 7,26 (1H, dd $\text{J}_{\text{cis}}=6,16$ Hz, $\text{J}_{\text{trans}}=13,76$ Hz CH), 4,93 (1H, $\text{J}_{\text{trans}}=13,76$ Hz, CH_2), 4,68 (1H, d, $\text{J}_{\text{cis}}=6,16$ Hz, CH_2), 4,25 (2H, d, J=4,25, CH_2)

RMN ^{13}C (acetona- d_6 , 100 MHz) d 166,6 [C, $\text{C}=\text{O}$], 158,3 [C, $^2\text{J}_{\text{C-F}}=36,7$ Hz, $\text{C}=\text{O}$], 141,8 [CH], 116,9 [C, $\text{J}_{\text{C-F}}=285,2$ Hz, COCF_3], 99,0 [$\text{CH}=\text{CH}_2$], 41,5 [NHCH_2]

RMN ^{19}F (acetona- d_6 376 MHz EK 492) d -76,5.

40 b) Parahidrogenación del éster vinílico de trifluoro-acetil-glicina en acetona y metanol.

La reacción de hidrogenación del éster etílico de trifluoro-acetil-glicina **1** obtenido como se describe anteriormente se llevó a cabo en acetona o en metanol según el siguiente esquema de reacción



45 Usando, con ambos disolventes, el catalizador de hidrogenación comercial $[\text{Rh}(\text{COD})\text{dppb}]$ y, en ambos casos, mediante el siguiente procedimiento ya usado para la preparación del éster alílico [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado en metanol, como se describe en el Ejemplo 3. Tras la aplicación del ciclo de campo, se observó en ambos disolventes

una señal carbonílica ^{13}C polarizada (167 ppm), como se observa, por ejemplo, en el espectro de RMN ^{13}C de la Figura 8 registrado a partir de la reacción de hidrogenación llevada a cabo en metanol.

Ejemplo 5: Preparación de glicina $[1-^{13}\text{C}]$ hiperpolarizada a partir de éster propargílico: $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarización llevada a cabo en una mezcla de metanol/ CDCl_3

- 5 a) Preparación del 2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetato de prop-2-inilo (TFA-Gly-OPropargilo) (preparado, por ejemplo, según J. Org. Chem, 2009, 74, 3406-3413)

En una atmósfera de argón, se añadieron 0,2 ml (3,51 mmoles) de alcohol propargílico y 0,02 g (0,18 mmoles) de DMAP ((dimetilamino)piridina) a una disolución agitada de compuesto 1 en diclorometano seco. La temperatura se redujo a 0°C , y se añadieron 2,63 g (2,63 mmoles) de DCC (diciclohexilcarbodiimida). La temperatura se incrementó lentamente hasta la temperatura ambiente, y la disolución se agitó durante 3 horas. El precipitado blanco formado se separó por filtración, y el diclorometano se evaporó a presión reducida. El bruto se purificó sobre gel de sílice usando como eluyente éter dietílico/éter de petróleo (50:50), dando 0,25 g (68%) del producto deseado como un sólido blanco.

Caracterización mediante RMN:

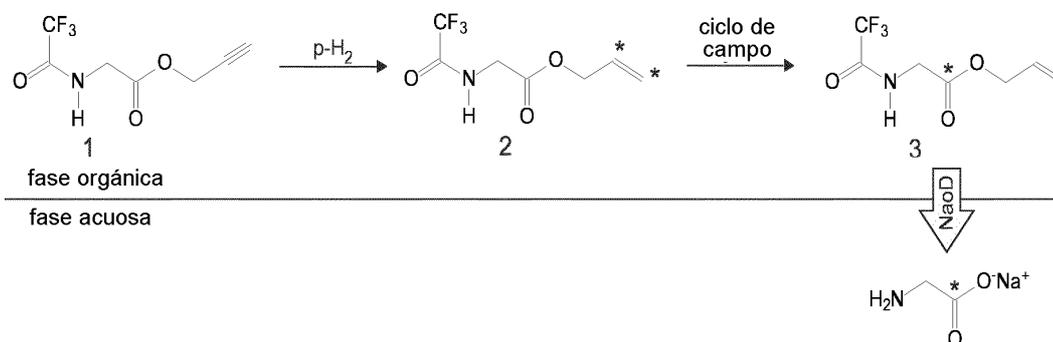
- 15 RMN ^1H (acetona- d_6 400 MHz, EK 473) d 8,89 (1H, bs, NH), 4,79 (2H, d, $J^4=2,36$ Hz, COOCH_2), 4,17 (2H, d, $J=5,88$, NHCH_2), 3,05 (1H, t, $J^4=2,36$ Hz, CH)

RMN ^{13}C (acetona- d_6 , 100 MHz, EK 473) d 168,4 [C, COO-propargilo], 158,3 [C, $^2J_{\text{C-F}}=36,7$ Hz, COCF_3], 116,9 [C, q, $J_{\text{C-F}}=285,2$ Hz, COCF_3], 78,2 [C, CCH], 76,8 [CH, CCH], 53,3 [CH_2 , COOCH_2], 41,5 [CH_2 , NHCH_2]

RMN ^{19}F (acetona- d_6 376 MHz EK 492) d -76,4

- 20 b) Preparación de una disolución acuosa libre de impurezas de la glicina $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizada

Esquema de reacción:



La parahidrogenación del TFA-Gly-OPropargilo 1 obtenido se ha llevado a cabo usando el catalizador comercial $[\text{Rh}(\text{COD})\text{dppb}]$ en una mezcla de metanol/ CDCl_3 (200 μl /500 μl), usando el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 3 para la preparación del éster alílico $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado en metanol/ CDCl_3 , con 200 μl de metanol- d_3 en lugar de 75 μl . Tras la aplicación del ciclo de campo, la hidrólisis del éster TFA-Gly-OAlil $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado se ha llevado a cabo mediante adición de 1 ml de NaOD 2M a fin de eliminar tanto el resto de éster hidrogenado (a saber, alcohol alílico) como el grupo protector TFA (ácido trifluoroacético). Entonces se registró un espectro de RMN ^{13}C de la fase acuosa recogida directamente, mostrado en la Figura 9. En el espectro registrado se observa una señal de ^{13}C polarizado, a 181 ppm, que corresponde a la glicina libre $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizada, libre de impurezas. De forma interesante, a pesar de registrarla en la fase acuosa recogida directamente tras la hidrólisis del éster hidrogenado y la extracción mediante transferencia de fase de la glicina $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizada, el espectro registrado está desprovisto de cualquier impureza detectable, incluyendo cualquier residuo detectable instrumentalmente del metanol usado como codisolvente de hidrogenación.

Ejemplo 6: Preparación de lactato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado en un medio acuoso

- a) Preparación de la molécula sustrato éster vinílico del ácido 2-acetoxi-propiónico (lactato de vinilo).

A una suspensión agitada de ácido 2-acetoxi-propiónico (3,0 g, 23 mmoles) en 66 ml de acetato de vinilo, se añadieron en una atmósfera de nitrógeno $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0,076 g, 0,34 mmoles) y KOH (0,200 g, 3,5 mmoles). La disolución se agitó durante 48 horas a temperatura ambiente. La mezcla se paralizó entonces con agua, el catalizador se filtró, y se añadió éter dietílico. La fase acuosa se extrajo con éter dietílico (3 x 40 ml), se lavó con salmuera (3 x 50 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró, y se evaporó el disolvente. El bruto se purificó entonces sobre

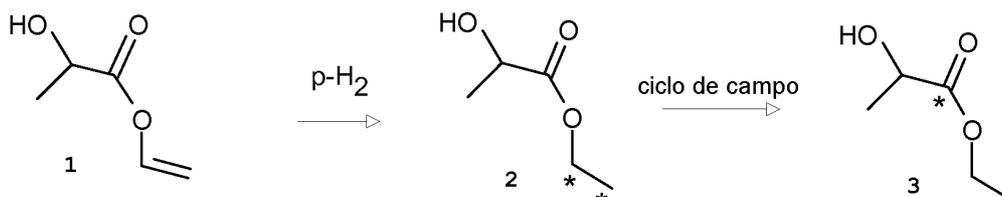
gel de sílice usando como eluyente éter dietílico/éter de petróleo (1/4) para dar el producto deseado como un aceite amarillo pálido (0,579 g, 16%).

RMN ^1H (CDCl_3 400 MHz) 7,2 (1H, dd, CH_2), 5,1 (1H, q, CH) 4,95 (1H, d CH), 4,65 (1H, d CH_2), 2,12 (3H, s, CH_3), 1,5 (3H, d, CH_3).

5 RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) d 171 [C, COOVinilo], 168 [C, COOCH_3], 141 [CH], 100 [CHCH_2], 67 [CH], 20 [CH_3], 17 [CH_3]

b) Preparación del lactato de etilo $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado

Esquema de reacción:



10 La parahidrogenación de éster vinílico del ácido 2-acetoxi-propiónico (1) se ha llevado a cabo en agua con el catalizador soluble en agua $[\text{Rh}(\text{NBD})\text{phos}][\text{BF}_4]$, según el mismo procedimiento dado a conocer en el Ejemplo 1 para la preparación del éster etílico $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado de acetato, usando 0,05 ml de acetona en lugar de metanol.

15 Tras la aplicación del ciclo de campo magnético, se observó una señal carbonílica ^{13}C polarizada (173 ppm) de éster etílico del ácido 2-acetoxi-propiónico (3) (figura 12, espectro superior).

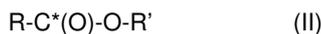
c) Preparación del lactato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado

Par obtener el lactato $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado correspondiente, la reacción de para-hidrogenación se repitió como se describe anteriormente con una segunda cantidad de éster vinílico (1), y el éster $[1-^{13}\text{C}]$ -hiperpolarizado obtenido se hidroliza mediante adición de 0,05 ml de NaOD 12M inmediatamente después del procedimiento del ciclo de campo.

20 La disolución obtenida se acidifica entonces mediante adición de 0,05 ml de DCI 12M, y el espectro de RMN ^{13}C se adquiere inmediatamente. La Figura 12 (parte inferior) da a conocer el espectro de RMN ^{13}C del lactato obtenido, en el que la señal ^{13}C hiperpolarizada de lactato es detectable a 177,5 ppm.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de polarización inducida por para-hidrógeno para la preparación de una molécula que contiene carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado de interés diagnóstico, que comprende hidrogenar con para-hidrógeno molecular un éster alquénico o alquínico de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturado de dicha molécula que contiene carboxilato.
- 5 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el éster alquénico o alquínico de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturado se selecciona de ésteres vinílicos, alílicos y propargílicos.
3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el éster insaturado tiene la siguiente fórmula general (II)



10 en la que:

C^* representa el átomo de carbono de carboxilato enriquecido naturalmente con ^{13}C , u, opcionalmente, marcado con ^{13}C , que sufre hiperpolarización de ^{13}C ;

R' es un resto vinílico, o alílico, o propargílico;

15 R es una cadena de alquilo de $\text{C}_1\text{-C}_5$ lineal o ramificada, que está opcionalmente interrumpida por, o sustituida con, uno o más grupos seleccionados de carbonilo ($-\text{CO}-$), hidroxilo ($-\text{OH}$), amino ($-\text{NHR}_1$), átomo o átomos de halógeno y grupo o grupos halo-alquilo, y por un anillo carbocíclico alifático o aromático, que a su vez está opcionalmente sustituido con uno o más grupos hidroxilo;

R_1 es H, o un grupo protector de amino seleccionado del grupo que consiste en trifluoroacetilo, acetilo, benzoilo, carbobenzoxi, carbonato de terc-butilo;

20 y las sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que R se selecciona del grupo que consiste en alquilo de $\text{C}_1\text{-C}_5$ lineal o ramificado, metilcarbonilo, hidroxietilo, y aminoalquilo de fórmula $\text{R}_2\text{-CH}(\text{NHR}_1)-$, en la que R_1 es H y R_2 es H o una cadena alquílica lineal o ramificada de $\text{C}_1\text{-C}_4$, opcionalmente sustituido con un hidroxilo, un fenilo, o un anillo hidroxifenílico.

25 5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que R es metilo, metilcarbonilo, aminoalquilo de fórmula $\text{R}_2\text{-CH}(\text{NHR}_1)-$ o hidroxietilo de fórmula $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})-$.

6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 previas, que comprende las etapas de:

30 a) obtener un éster alquénico o alquínico de $\text{C}_2\text{-C}_4$ insaturado de la molécula que contiene carboxilato de interés, y hacer reaccionar dicho éster insaturado con para-hidrógeno molecular, para dar el éster parahidrogenado correspondiente;

b) inducir una transferencia de polarización desde el hidrógeno polarizado añadido al átomo de carbono de [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-carboxilato del éster para-hidrogenado, para dar el éster [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado correspondiente;

c) eliminar el resto de éster hidrogenado, y recoger una disolución acuosa de la molécula que contiene carboxilato [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado, o del ácido carboxílico [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado correspondiente.

35 7. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el éster insaturado con para-hidrógeno molecular en un disolvente acuoso, que incluye opcionalmente una cantidad de 10% a 30% de un disolvente orgánico soluble en agua seleccionado de un alcohol de cadena corta y acetona, y en presencia de un catalizador de hidrogenación soluble en agua.

40 8. Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que el catalizador de hidrogenación se selecciona del grupo que consiste en complejos de rodio de fórmula $[\text{Rh}(\text{difosfina})\text{dieno}]^+[\text{anión}]$, en la que la difosfina es una fosfina quelante seleccionada de (1,4-bis(R_1R_2)etano) y (1,4-bis(R_1R_2)butano) en las que R_1 y R_2 , iguales o diferentes entre sí, comprenden grupos sulfonados seleccionados de DPPETS, DPPBTS y DAPBTS, difosfinas sulfonadas quirales seleccionadas de CHIRAPHOS sulfonado y BINAP sulfonado; el dieno se selecciona de 1,5-ciclooctadieno y norbornadieno, y el anión puede ser cualquier anión.

45 9. Un procedimiento según la reivindicación 6, en el que la etapa a) comprende hacer reaccionar el éster insaturado con parahidrógeno molecular en un disolvente orgánico, o una mezcla adecuada de disolventes orgánicos, y en presencia de un catalizador de hidrogenación soluble en el disolvente orgánico e insoluble en un disolvente acuoso.

50 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que el catalizador de hidrogenación se selecciona del grupo que consiste en complejos de rodio de fórmula $[\text{Rh}(\text{difosfina})\text{dieno}]^+[\text{anión}]$, en la que la difosfina se selecciona de 1,4-bis(difenilfosfino)butano, 1,2-bis(difenilfosfino)etano, y sus derivados, incluyendo las fosfinas quirales 2,2'-

bis(difenilfosfino)1,1'-binaftilo, 2,3-difenilfosfinobutano, 1,4-bis(difenilfosfino)-1,4-bisdesoxi-2,3-O-isopropiliden-L-treitol, y 1,2-bis[(2-metoxifenil)(fenilfosfino)]etano; el dieno se selecciona de 1,5-ciclooctadieno y norbornadieno, y el anión es cualquier anión.

5 11. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que el disolvente orgánico es un disolvente organoclorado seleccionado de cloroformo, diclorometano, tetracloruro de carbono, y mezclas de los mismos, y mezclas de estos disolventes con una cantidad de 10% a 30% de un alcohol de cadena corta o acetona, y el catalizador de hidrogenación es $[Rh(COD)dppb][BF_4]$, en el que COD es ciclo-1,5-octadieno y dppb es 1,4-bis(difenilfosfino)butano).

10 12. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en el que la etapa b) se lleva a cabo aplicando un procedimiento de ciclo de campo al éster para-hidrogenado obtenido en la etapa a) del procedimiento, para dar el éster $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado correspondiente.

13. Un procedimiento según la reivindicación 12, en el que la etapa c) del procedimiento comprende hidrolizar el éster $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado obtenido en la etapa b).

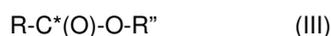
15 14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que la etapa c) se lleva a cabo diluyendo la disolución orgánica del éster $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado obtenido en la etapa b) con una disolución acuosa que promueve la hidrólisis del éster a la molécula que contiene carboxilato $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado soluble en agua correspondiente, o el ácido carboxílico correspondiente, y recogiendo entonces, mediante extracción por transferencia de fase, la disolución acuosa libre de impurezas del compuesto de interés $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado, que está lista para uso en aplicaciones *in vivo*.

20 15. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en el que la etapa c) del procedimiento se lleva a cabo añadiendo a la disolución acuosa del éster $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado obtenido en la etapa b) una base que promueve su hidrólisis, para dar una disolución acuosa de la molécula de interés que contiene carboxilato $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado.

25 16. Un procedimiento según la reivindicación 15, que comprende además una etapa d) que incluye eliminar el catalizador de hidrogenación y el disolvente orgánico opcional de la disolución acuosa obtenida, para dar una disolución acuosa de la molécula de interés que contiene carboxilato $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado lista para uso en aplicaciones *in vivo*.

30 17. Uso de un éster alquenílico o alquinílico insaturado de fórmula (II), como se define en la reivindicación 3, como un precursor de sustrato hidrogenable adecuado para la preparación de molécula que contiene carboxilato $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado de interés diagnóstico para aplicaciones de RM mediante el uso de la técnica de PHIP.

18. Un éster para-hidrogenado de fórmula (III)



en la que C^* y R son como se definen anteriormente en la reivindicación 3, y

R'' es un resto etílico, propílico o alílico parahidrogenado.

35 19. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 previas, o el uso según la reivindicación 17, en el que el éster alquenílico o alquinílico insaturado de la molécula de interés que contiene carboxilato es un éster propargílico.

20. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la molécula que contiene carboxilato $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado concernida es el piruvato.

40 21. Un método para la evaluación mediante RM *in vitro*, *ex vivo*, de parámetros biológicos o perfiles metabólicos de interés diagnóstico, que comprende el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, y comprende además:

45 i) recoger una disolución acuosa de una molécula que contiene carboxilato $[1-^{13}C]$ -hiperpolarizado de la etapa d), del procedimiento según la reivindicación 16, o directamente de la etapa c) del procedimiento según la reivindicación 14;

ii) poner en contacto la mencionada disolución acuosa con una muestra *ex vivo* de un órgano, fluido o tejido corporal de un paciente individual;

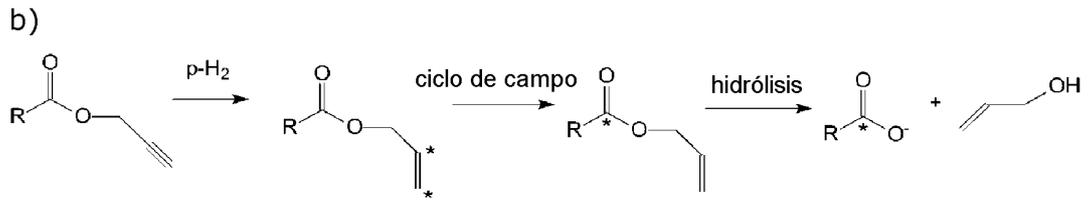
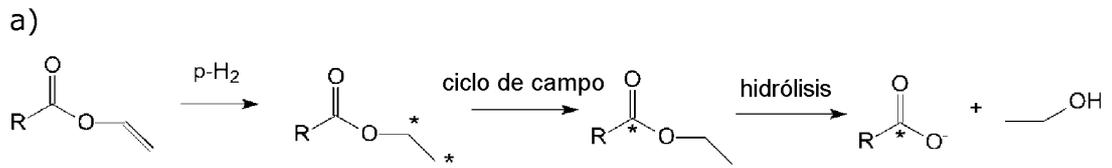
iii) exponer la muestra *ex vivo* a una frecuencia de radiación que permita excitar el átomo de carbono ^{13}C -marcado hiperpolarizado de la molécula de carboxilato;

50 iv) registrar la intensidad de señal generada por el núcleo excitado de la molécula de carboxilato y/o de cualquier metabolito o catabolito adecuado de la misma; y

v) obtener estimaciones adecuadas del parámetro biológico o perfil metabólico de interés a partir de los valores registrados de la intensidad de señal.

22. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la molécula que contiene carboxilato [$1-^{13}\text{C}$]-hiperpolarizado concernida es el lactato.

Figura 1/12



c)

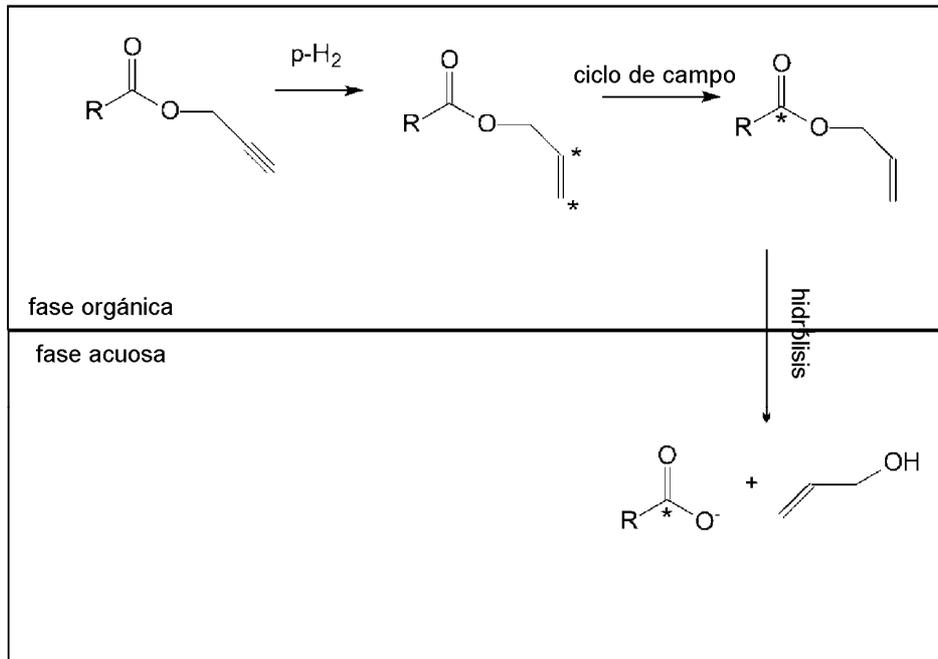


Figura 2/12

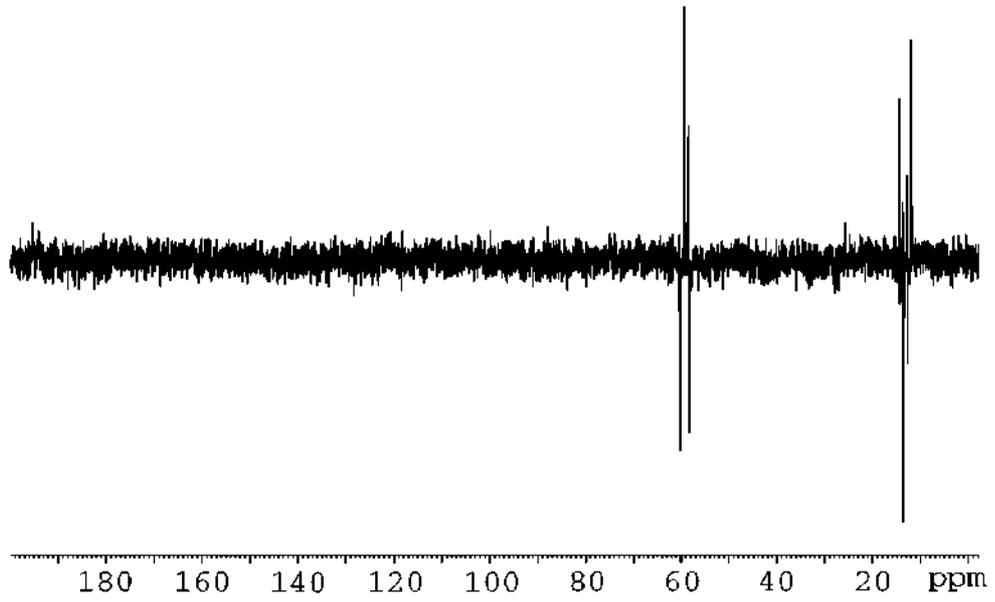


Figura 3/12

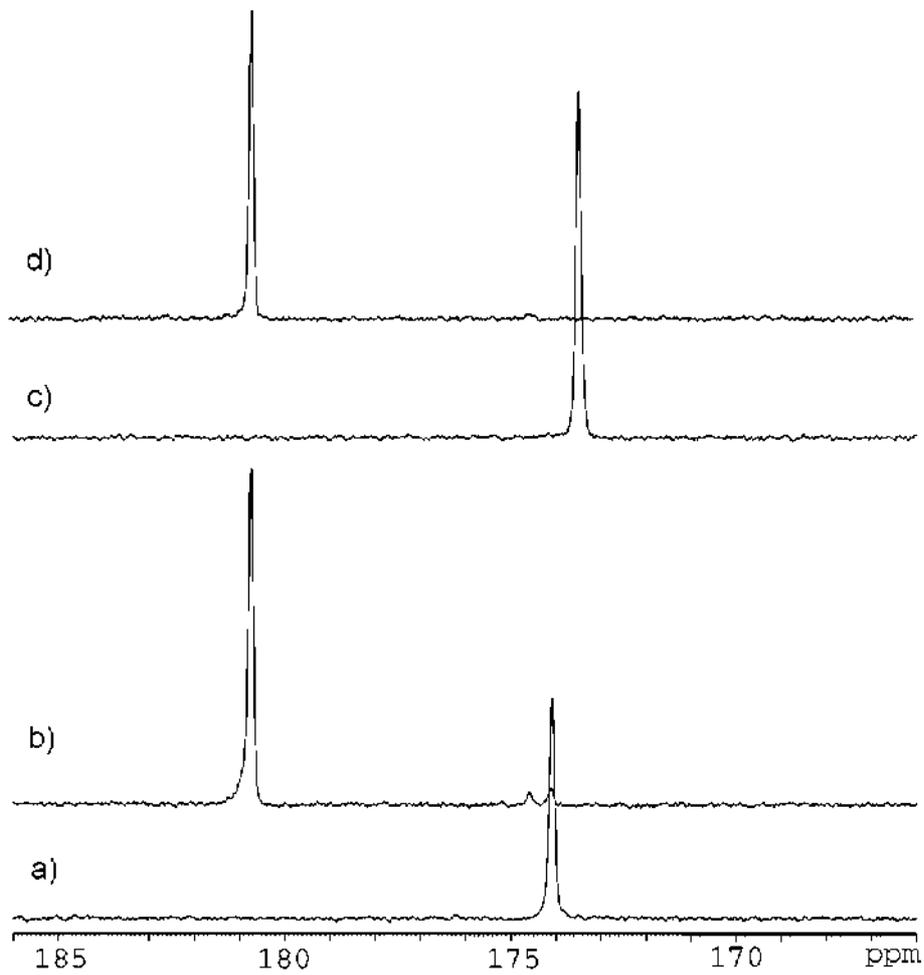
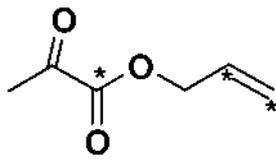
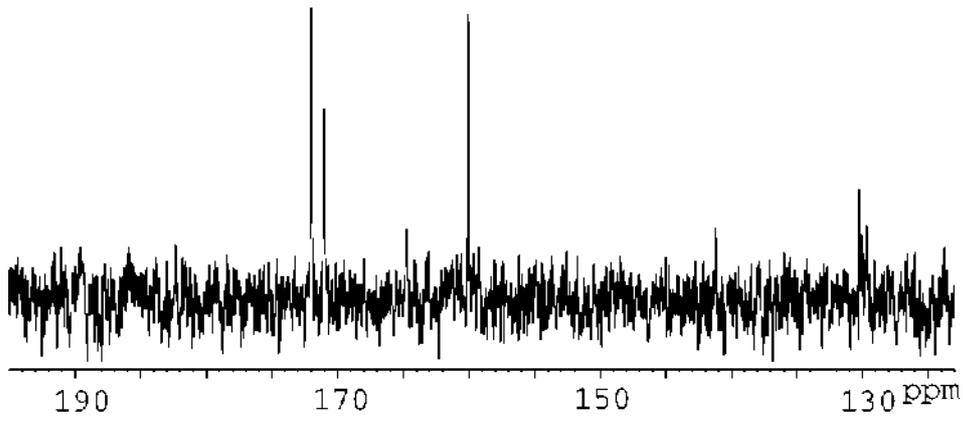
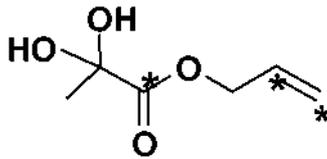


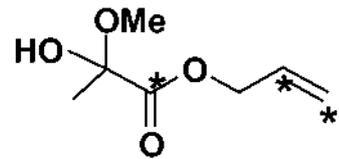
Figura 4/12



a)



b)



c)

Figura 5/12

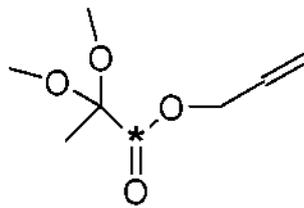


Figura 6/12

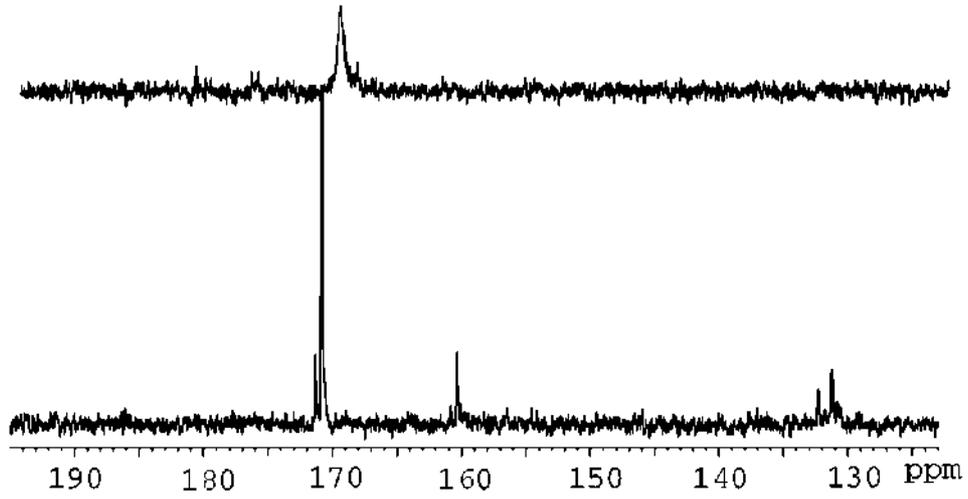


Figura 7/12

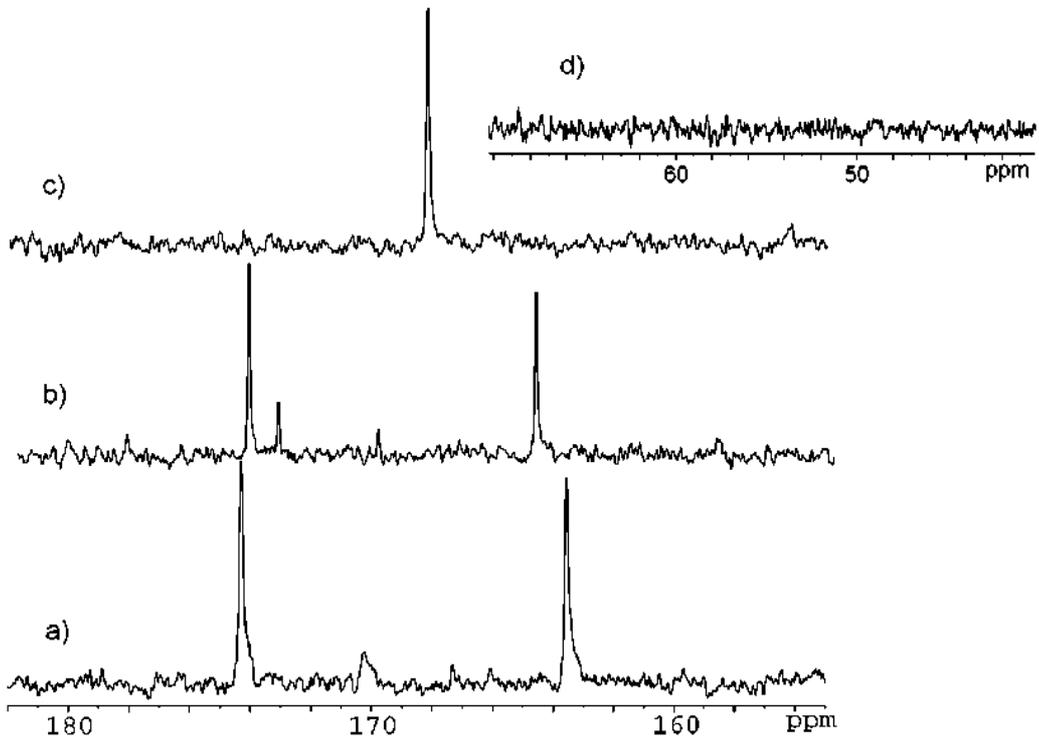


Figura 8/12

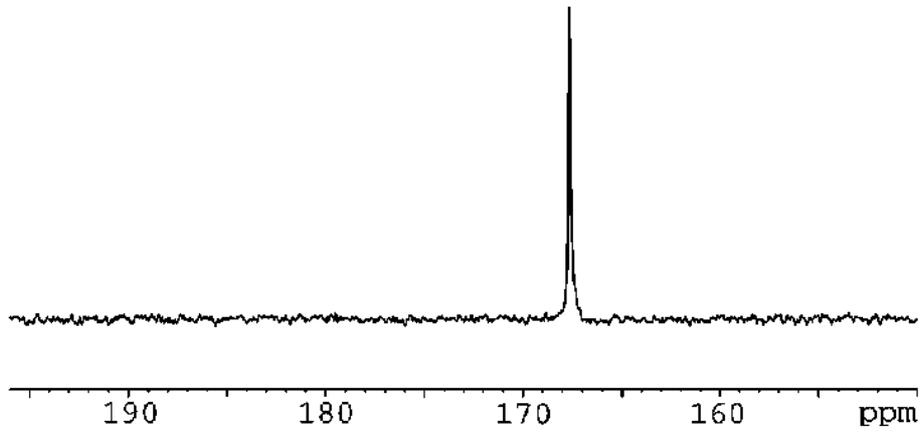


Figura 9/12

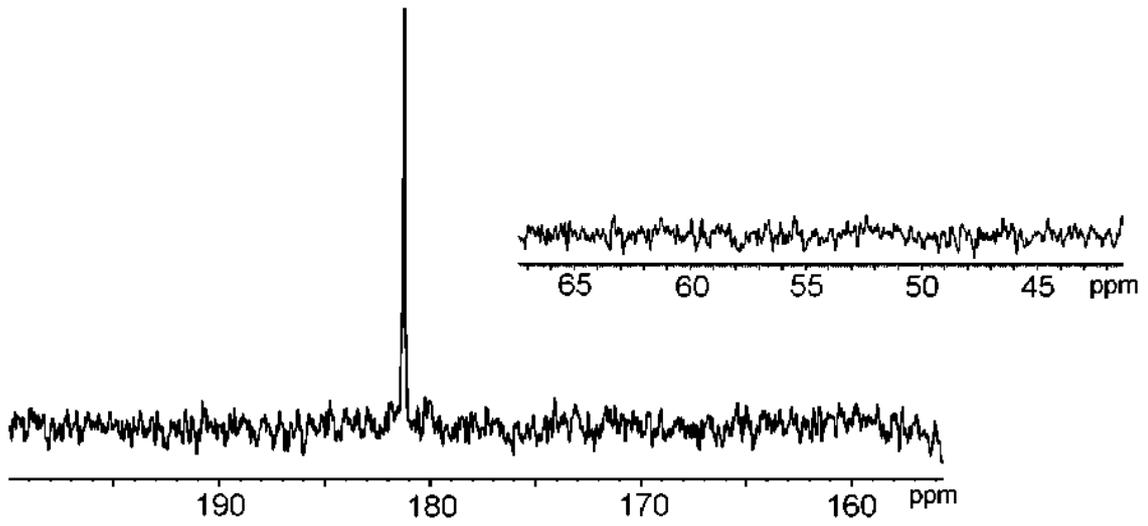


Figura 10/12

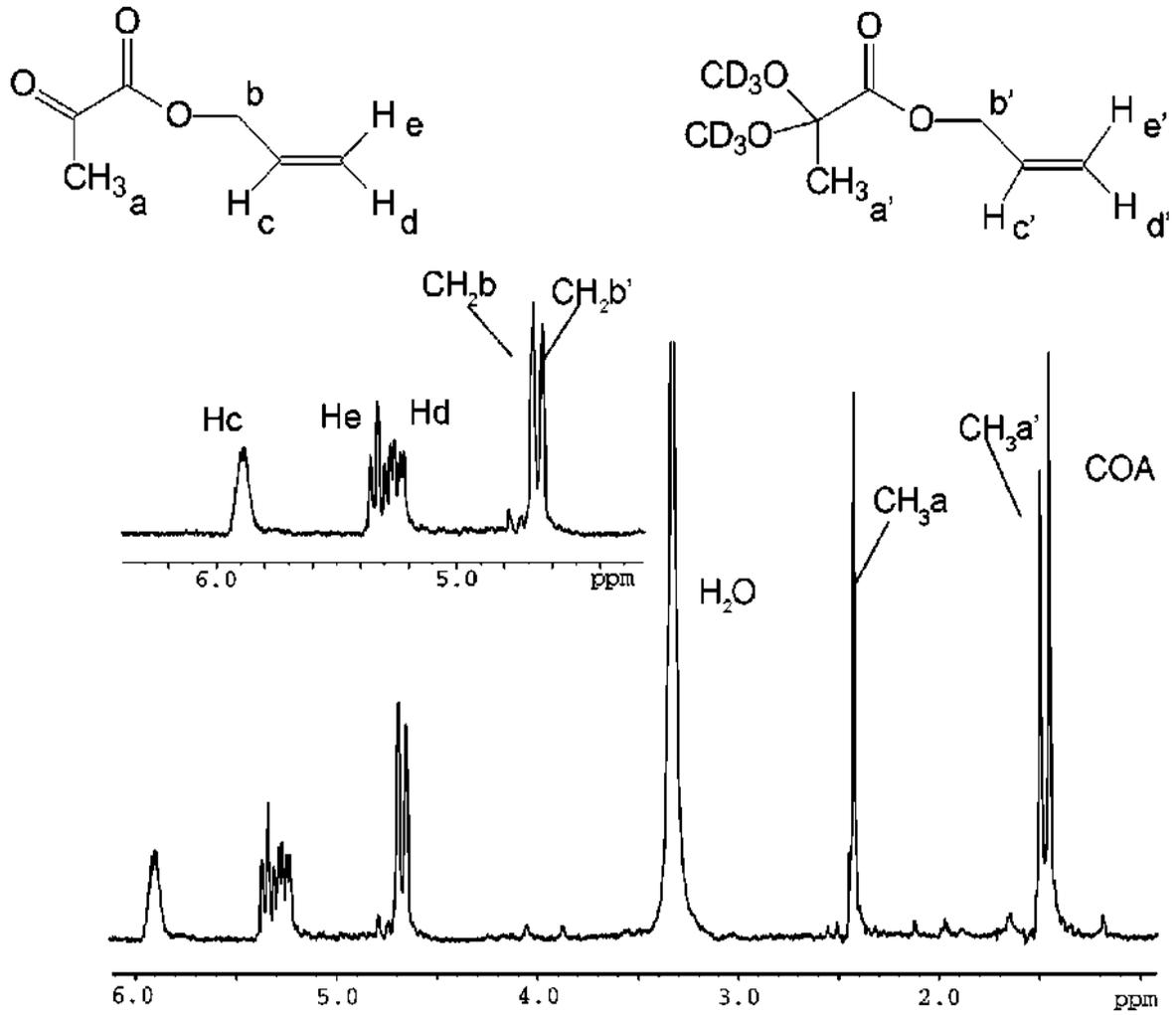


Figura 11/12

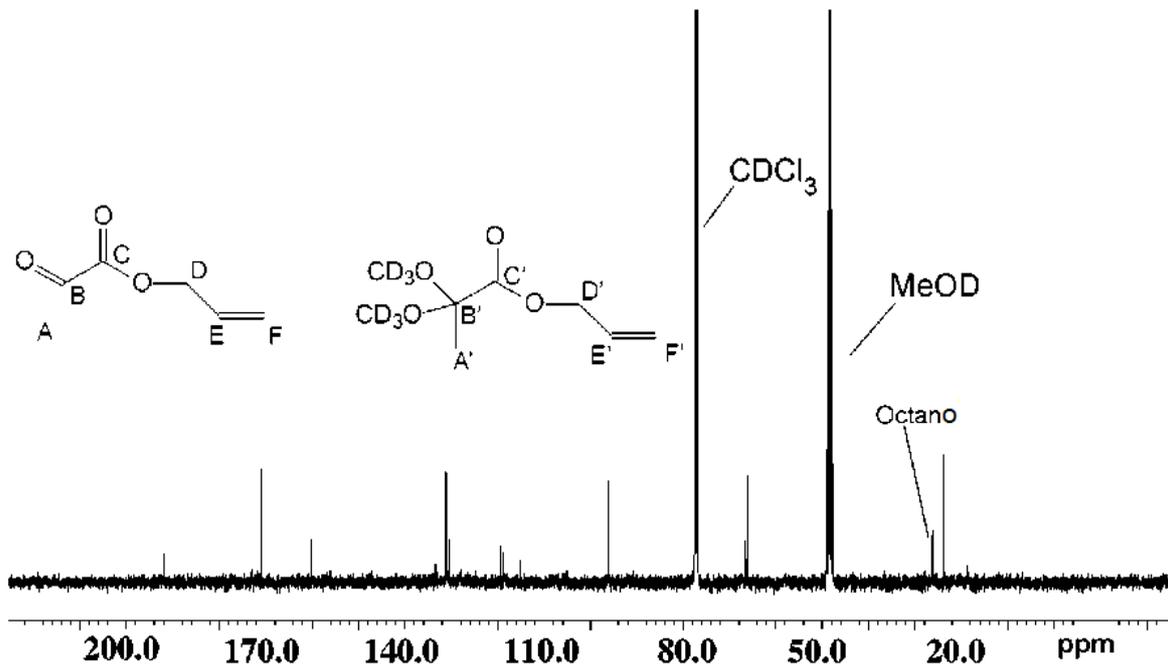


Figura 12/12

