

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780012437.5

[51] Int. Cl.

A61K 49/10 (2006.01)

A61K 49/18 (2006.01)

A61K 49/20 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月22日

[11] 公开号 CN 101415446A

[22] 申请日 2007.3.21

[21] 申请号 200780012437.5

[30] 优先权

[32] 2006.3.29 [33] NO [31] 20061435

[86] 国际申请 PCT/NO2007/000109 2007.3.21

[87] 国际公布 WO2007/111515 英 2007.10.4

[85] 进入国家阶段日期 2008.10.6

[71] 申请人 通用电气医疗集团股份有限公司

地址 挪威奥斯陆

[72] 发明人 M·H·勒切 M·卡尔森

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 李连涛

权利要求书 3 页 说明书 36 页

[54] 发明名称

生产超极化的羧酸盐和磺酸盐的方法

[57] 摘要

本发明涉及用于生成超极化的羧酸盐或磺酸盐或其混合物的动态核极化方法，其中所述用于本发明的方法的羧酸盐或磺酸盐包含某些无机阳离子。本发明还涉及用于该方法中的组合物。

1. 包含羧酸盐或磺酸盐或其混合物、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的组合物, 其中所述羧酸盐或磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。
2. 依据权利要求 1 的组合物, 其中所述组合物包含羧酸盐, 优选内源性羧酸盐和更优选在人体或非人动物体内的代谢过程中起作用的内源性羧酸盐。
3. 依据权利要求 2 的组合物, 其中所述羧酸盐是富含 ^{13}C 的羧酸盐。
4. 依据权利要求 2 和 3 的组合物, 其中所述羧酸盐是苹果酸盐、乙酸盐、反丁烯二酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、丙酮酸盐、碳酸氢盐、丙二酸盐、碳酸盐、丁二酸盐、草酰乙酸盐、 α -酮戊二酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐或异柠檬酸盐。
5. 依据权利要求 1-4 中任一项的组合物, 其中所述无机阳离子是 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ , 优选是 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ 和更优选是 Rb^+ 或 Cs^+ 。
6. 依据权利要求 1-5 中任一项的组合物, 其中所述组合物溶解于一种溶剂或多种溶剂中, 从而形成溶液。
7. 依据权利要求 6 的组合物, 其中所述溶液为至少 5 摩尔浓度的羧酸盐或磺酸盐或其混合物。
8. 依据权利要求 1-7 中任一项的组合物, 其中所述 DNP 剂是稳定的氧基、硫基或碳基三苯甲基自由基。
9. 依据权利要求 1-8 中任一项的组合物, 其中所述组合物包含顺磁性金属离子, 优选原子序号 58-70 的镧系金属或原子序号 21-29、42 或 44 的过渡金属的顺磁性金属离子。
10. 依据权利要求 9 的组合物, 其中所述顺磁性金属离子呈整合的形式或呈盐的形式。

11. 依据权利要求 1-10 中任一项的组合物, 其用于动态核极化。

12. 包含超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐或其混合物的组合物, 其中所述超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。

13. 依据权利要求 12 的组合物, 其中所述组合物包含超极化的羧酸盐, 优选超极化的内源性羧酸盐和更优选超极化的在人体或非人动物体内的代谢过程中起作用的内源性羧酸盐。

14. 依据权利要求 13 的组合物, 其中所述超极化的羧酸盐是富含 ^{13}C 的羧酸盐。

15. 依据权利要求 13 或 14 的组合物, 其中所述超极化的羧酸盐是选自苹果酸盐、乙酸盐、反丁烯二酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、丙酮酸盐、碳酸氢盐、丙二酸盐、碳酸盐、丁二酸盐、草酰乙酸盐、 α -酮戊二酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐或异柠檬酸盐的超极化的羧酸盐。

16. 依据权利要求 12-15 中任一项的组合物, 其中所述无机阳离子是 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ , 优选是 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ 和更优选是 Rb^+ 或 Cs^+ 。

17. 依据权利要求 12-16 中任一项的组合物, 其中所述组合物溶解于一种溶剂或多种溶剂中以形成液体。

18. 依据权利要求 17 的组合物, 其中所述溶剂是水性载体或非水性溶剂。

19. 依据权利要求 12-18 中任一项的组合物, 所述组合物还包含 DNP 剂和任选的顺磁性金属离子。

20. 依据权利要求 12-19 中任一项的组合物, 所述组合物通过动态核极化获得。

21. 生产超极化的羧酸盐或磺酸盐或其混合物的方法, 所述方法包括

-
- a) 制备包含羧酸盐或磺酸盐或其混合物、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液，其中所述羧酸盐和/或磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子；
 - b) 使该溶液冷冻；
 - c) 对冷冻的溶液实施动态核极化，以得到包含超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐或它们的混合物的冷冻溶液；和
 - d) 任选使在步骤 c) 中获得的冷冻溶液液化。

生产超极化的羧酸盐和磺酸盐的方法

本发明涉及用于生产超极化的羧酸盐或磺酸盐或其混合物的动态核极化方法，其中所述用于本发明的方法的羧酸盐或磺酸盐包含某些无机阳离子。本发明还涉及用于该方法的组合物。

磁共振(MR)成像(MRI)已成为特别吸引医师的成像技术，因为它以非侵入性的方式获得患者的身体或其部分的图像，并且不会使得患者和医护人员暴露于可能有害的射线诸如 X-线中。由于它的高质量图像，MRI 是对于软组织和器官有利的成像技术，并且它能辨别正常与病变组织，例如肿瘤和损伤。

可用或不用 MR 造影剂进行 MRI。然而，经对比增强的 MRI 通常使探测更小的组织变化成为可能，这使其成为探测早期变化如小的肿瘤或转移的强大工具。

几种类型的造影剂已经用于 MRI。可溶于水的顺磁性金属螯合剂，例如，钆螯合物，如 Omniscan™ (GE Healthcare) 是广泛使用的 MR 造影剂。由于它们的低分子量，当将它们给予血管时，它们迅速分布于细胞外间质(即血液和组织间隙)。它们也相当迅速地从身体中清除。

另一方面，血池 MR 造影剂，例如超顺磁性氧化铁颗粒，滞留在血管中延长的时间。已经证明，它们在肝脏中非常有益于增强反差，但也检测出毛细血管渗透性异常，如，为肿瘤血管新生引起的肿瘤中“渗漏的”毛细血管壁。

尽管上述的造影剂具有无异议的卓越特性，但是它们的应用并非无任何风险。虽然顺磁性金属螯合物通常具有高度稳定性常数，但在给药后毒性金属离子可能在体内释放。再有，这些类型的造影剂显示差的特异性。

WO-A-99/35508 公开对患者采用高 T_1 剂的超极化溶液作为 MRI 造影剂的 MR 研究方法。术语“超极化”意指，提高存在于高 T_1 剂中的 NMR 活性核，即具有非零核自旋的核，优选 ^{13}C -或 ^{15}N -核的核极化。一旦提高了 NMR 活性核的核极化，这些核的激发态和基态核自旋状态之间的总体粒子数差(population difference)显著增加，因此 MR 信号强度成百倍因子及以上的地放大。当使用超极化的富含 ^{13}C -和/或 ^{15}N -高 T_1 剂时，它们将基本上不受背景信号的影响，因为自然丰富的 ^{13}C 和/或 ^{15}N 可以忽略不计，因此图像反差将有利地大。常规 MRI 造影剂和这些超极化的高 T_1 剂的主要差别是，前者的对比变化是由于影响身体中水质子的弛豫时间引起的，而后一类试剂可被认为是非放射性示踪剂，因为获得的信号单独由该试剂引起。

在 WO-A-99/35508 中，公开了用作 MR 成像剂的多种可能的高 T_1 剂，包括非-内源性和内源性化合物，如乙酸盐、丙酮酸盐、草酸盐或葡糖酸盐、糖如葡萄糖或果糖、脲、酰胺、氨基酸如谷氨酸盐、甘氨酸、半胱氨酸或天冬氨酸盐、核苷、维生素如抗坏血酸、青霉素衍生物和磺胺类。还声称代谢循环，诸如柠檬酸循环中的中间体如反丁烯二酸和丙酮酸是用于代谢活性的 MR 成像的优选成像剂。

在人和非人动物体内代谢过程起作用的超极化的 MR 成像剂具有重大的意义，因为这些超极化的成像剂可用于体内 MR 研究中获得有关组织代谢状态的信息，即它们用于代谢活动的体内成像。例如，组织代谢状态的信息可被用于辨别健康和病变组织。

丙酮酸盐是在柠檬酸循环和超极化的 ^{13}C -丙酮酸盐转化为其代谢物超极化的 ^{13}C -乳酸盐中起作用的化合物，超极化的 ^{13}C -碳酸氢盐和超极化的 ^{13}C -丙氨酸可用于人体代谢过程的体内 MR 研究。例如，如在 WO-A-2006/011810 中详细描述的那样，超极化的 ^{13}C -丙酮酸盐可用作体内肿瘤成像的 MR 成像剂，并且如在 WO-A-2006/054903 中详细描述的那样，通过 MR 成像用于评估心肌组织生存能力。

必须强调的是,超极化成像剂的信号由于弛豫以及(当给予患者体内时)被稀释而衰减。因此生物体液(如血液)中的成像剂 T_1 值必须充分长(或用 WO-A-99/35508 的话来说是充分高),以使试剂能够以高度超极化的状态分布至患者身体中的靶位点。除了成像剂具有长 T_1 值外,达到高度极化水平是非常重要的和有利的。

在 WO-A-99/35508 中公开了几种超极化技术,其中之一是动态核极化(DNP)技术,由极化剂或所谓的 DNP 剂,含未成对电子的化合物,对将要被极化的化合物,即样品中的 MR 活性核产生极化。在 DNP 方法中,通常以微波辐射形式提供能量,这将开始激活 DNP 剂。一旦衰减至基态,极化就从 DNP 剂的未成对电子转移至样品中的 NMR 活性核。一般, DNP 方法中使用中度或高度磁场和非常低的温度,如,通过在液氮和约 1 T 或更高的磁场中实施 DNP 方法。作为选择,可采用中度磁场和达到充分的极化增强的任何温度。DNP 技术描述于,例如 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中,两者均通过引用包括在本文中。

DNP 剂在 DNP 方法中起决定性作用,因为它的选择对可达到的极化水平起主要影响。在 WO-A-99/35508 中表示为“OMRI 造影剂”的多种 DNP 剂是已知的。如应用在 WO-A-99/35508、WO-A-88/10419、WO-A-90/00904、WO-A-91/12024、WO-A-93/02711、WO-A-98/39277 和 WO-A-96/39367 中被描述为 DNP 剂的氧基、硫基或碳基稳定的三苯甲基自由基,在多种不同样品中引起高水平的极化。

还已发现,在 DNP 方法中,为了使极化从 DNP 剂转化至样品的 NMR 活性核,必须将 DNP 剂和样品进行紧密接触。该紧密接触可通过选择可溶解于样品中的 DNP 剂实现。再有,使 DNP 剂在样品中均匀分布是重要的。因为样品在冷却/冷冻时会结晶,得到低的极化水平甚至无极化产生。然而,较早已有报告,可通过加入玻璃形成剂,提高在冷却/冷冻时结晶的样品中的极化水平,因为在冷却/冷冻时, DNP

剂、样品和玻璃形成剂的混合物形成非晶态固体(“玻璃”)
(Ardenkjær-Larsen 等, PNAS 100(18), 10158-10163, 2003)。

适宜的玻璃形成剂为例如丙三醇、丙二醇或二醇。然而, 玻璃形成剂的添加通常被维持在必须的最低限度, 因为该添加“稀释”样品, 这对于某些应用, 如使用超极化的样品作为 MRI 中的成像剂不利。在此情况下, 必须以高浓度给予患者超极化的样品, 即必须用于 DNP 方法的高度浓缩的样品。在本文的上下文中, 将冷冻的、含样品的组合物(即 DNP 剂、样品和如果需要时的玻璃形成剂和/或溶剂)的质量维持在尽可能小的水平也是重要的, 因为如果在 DNP 过程后采用溶解将固体超极化的组合物转化成液态, 如将其用作成像剂, 大的质量将对溶解过程的效果产生不利影响。这是由于以下事实, 对于溶解过程中的溶剂的给定体积而言, 在样品质量增加时, 样品质量对溶剂的比例减少。再有, 如果意欲将极化的样品用作成像剂, 则在给予患者成像剂之前, 可能需要除去加入的玻璃形成剂。

相当大量的具代谢活性的化合物是羧酸盐, 即羧酸的盐。实例是丙酮酸盐、乳酸盐、碳酸氢盐、丁二酸盐、苹果酸盐、反丁烯二酸盐、柠檬酸盐、异柠檬酸盐、 α -酮戊二酸盐或草酰乙酸盐。这些化合物以其钠盐的形式易于从商业上获得, 并且它们中的大多数可溶解于水以及与 DNP 剂混合, 以制备 DNP 方法所用的组合物。然而, 一旦冷却/冷冻, 这些混合物(没有加入玻璃形成剂)可结晶, 导致极化水平太低, 以致不能使用经极化的羧酸盐作为用于代谢活性的 MR 成像的 MR 成像剂。一些前述化合物如丙酮酸盐和乳酸盐可以其游离酸的形式被极化, 因为这些酸在室温下是液体, 这使得有可能将 DNP 剂直接溶解在这些液体中。该液体酸/DNP 混合物在冷却/冷冻时不结晶, 因此加入玻璃形成剂不是必须的。缺点是, DNP 剂在这些酸中必须是稳定的, 此标准使适宜的 DNP 剂的范围相当地缩窄。再有, 在溶解步骤或其后的过程中, 必须用碱使游离酸转化为羧酸盐。这还需要可耐强酸和碱的耗材(consumables)(容器、瓶子、管道等)。

本申请人现在发现, 不加入玻璃形成剂而使羧酸盐极化的方法。已经发现, 不加入玻璃形成剂, 可使含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的羧酸盐溶液通过动态核极化作用而被极化, 因为这样的溶液在冷却/冷冻时不结晶。优点在于由任何玻璃形成剂所致极化的羧酸盐的稀释以及从极化的羧酸盐中去除玻璃形成剂不再是一个问题。因此, 对于给定尺寸的、盛装将由 DNP 极化的样品的样品杯而言, 可使更高浓度的羧酸盐极化。羧酸盐的直接极化的再一个优点是, 可避免极化游离羧酸的间接途径以及上段中概述的这个途径的所有缺点。此导致可能使用范围更广的 DNP 剂, 因为这些药物不再必须在将要被极化的酸中是稳定的。还已经发现, 如上描述的该方法还可被用于磺酸盐的 DNP 极化。

因此, 从一方面看来, 本发明提供生成超极化的羧酸盐或磺酸盐或其混合物的方法, 所述方法包括

a) 制备包含羧酸盐或磺酸盐或其混合物、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液, 其中所述羧酸盐和/或磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子;

b) 使该溶液冷冻;

c) 对冷冻的溶液实施动态核极化, 以得到包含超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐或它们的混合物的冷冻溶液; 和

d) 任选使在步骤 c) 中获得的冷冻溶液液化;

术语“超极化”和“极化”在下文中可交互使用, 表示核的极化水平过量 0.1%, 更优选过量 1% 和最优选过量 10%。

例如, 可通过测量冷冻的、经超极化的样品中的 NMR 活性核的固态 NMR 的测量值, 确定极化水平。例如, 如果超极化的样品中的 NMR 活性核是 ^{13}C , 则可获得所述样品的固态 ^{13}C -NMR。固态 ^{13}C -NMR 测量值优选由使用低反转角 (low flip angle) 的单一脉冲捕获 NMR 序列 (simple pulse-acquire NMR 序列) 组成。将 NMR 光谱中的经超极化样品的信号强度与动态核极化过程前获得的 NMR 光谱中的样品的信号

强度进行比较。然后从 DNP 前和 DNP 后的信号强度的比率计算极化水平。

以类似的方法，可通过经超极化的液体样品中的 NMR 活性核的液态 NMR 测量，测定溶解的、经超极化样品的极化水平。再将溶解的、经超极化样品的信号强度与动态核极化过程前的溶解的样品的信号强度进行比较。然后从 DNP 前和 DNP 后的样品的信号强度的比率计算极化水平。

术语“羧酸盐”指羧酸的盐，术语“磺酸盐”指磺酸的盐。盐是含有阳离子和阴离子的离子化合物。在本发明的方法中，所述阳离子是选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子和所述阴离子是羧酸根阴离子或磺酸根阴离子。在下面，术语“羧酸盐”和“磺酸盐”指羧酸/磺酸的盐或者羧酸阴离子/磺酸阴离子。从上下文中明显看出所述术语何时指盐或指盐的阴离子。

用于以下段落中的术语“一种羧酸盐/磺酸盐”意指与在这些段落的陈述同样适用于多种羧酸盐和磺酸盐。

虽然书写为单数形式，术语“羧酸盐”和“磺酸盐”指单个化学实体或多个化学实体，如某个羧酸盐或某个磺酸盐，也指几个不同的羧酸盐或几个不同的磺酸盐，即几个不同的羧酸盐的混合物或几个不同的磺酸盐的混合物。此在以下段落中对羧酸盐进行举例说明，这样的说明也同样应用于磺酸盐。

作为实例，丙酮酸盐是某一羧酸盐，并且可用本发明的方法通过在步骤 a) 中制备包含丙酮酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液，生成超极化的丙酮酸盐，所述丙酮酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。这样的溶液的具体实例是例如包含 Cs-丙酮酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液或包含 Sr-丙酮酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液。某一羧酸盐的另一个实例是碳酸氢盐，并且可用本发明的方法通过在步骤 a) 中制备包含碳酸氢盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液，所述碳酸氢盐

含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。这样的溶液的具体实例是例如包含 Cs-碳酸氢盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液或包含 Rb-碳酸氢盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液。

再有，作为实例，丙酮酸盐和乳酸盐是几种不同的羧酸盐，并且可用本发明的方法通过在步骤 a) 中制备包含丙酮酸盐和乳酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液，生成超极化的丙酮酸盐和超极化的乳酸盐的混合物，所述丙酮酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子，及乳酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。这样的溶液的具体实例是例如包含 Cs-丙酮酸盐、Rb-乳酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液或包含 Cs-丙酮酸盐、Cs-乳酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子的溶液。

与以上提供的定义一致，术语“或其混合物”指 i) 某一羧酸盐和某一磺酸盐的混合物，或 ii) 几种不同的羧酸盐和某一磺酸盐的混合物，或 iii) 某一羧酸盐和几种不同的磺酸盐的混合物，或 iv) 几种不同的羧酸盐和几种不同的磺酸盐的混合物。此在以下段落中举例说明。

作为 i) 的实例，在本发明的方法的步骤 a) 中制备溶液，其中所述溶液包含了含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的丙酮酸盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的甲烷磺酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子。作为 ii) 的实例，在本发明的方法的步骤 a) 中制备溶液，其中所述溶液包含了含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的丙酮酸盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的碳酸氢盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的甲烷磺酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子。作为 iii) 的实例，在本发明的方法的步骤 a) 中制备溶液，其中所述溶液包含了含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的

丙酮酸盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的甲烷磺酸盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的苯磺酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子。作为 iv)的实例,在本发明的方法的步骤 a)中制备溶液,其中所述溶液包含了含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的丙酮酸盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的碳酸氢盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的甲烷磺酸盐、含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子的苯磺酸盐、DNP 剂和任选的顺磁性金属离子。

在优选的实施方案中,在本发明的方法的步骤 a)中制备的溶液包含羧酸盐,即某一羧酸盐或几种不同的羧酸盐,所述羧酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。

优选的无机阳离子是 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ ,更优选的无机阳离子是 K^+ 、 Rb^+ 和 Cs^+ 和最优选的无机阳离子是 Rb^+ 和 Cs^+ 。

本发明上下文中的羧酸盐可为单羧酸,例如碳酸、乙酸、棕榈酸、油酸、丙酮酸或乳酸的盐。在另一个实施方案中,所述羧酸盐可为二或多羧酸,如苹果酸、反丁烯二酸、丁二酸、丙二酸或柠檬酸的盐。在羧酸盐是二或多羧酸的盐的情况下,该盐可为单羧酸盐、二羧酸盐或多羧酸盐。例如,在柠檬酸(一种三羧酸)的情况下,该羧酸盐可为(单)柠檬酸盐,即具有 2 个游离羧基,二柠檬酸盐,具有 1 个游离羧基,或三柠檬酸盐,即没有游离羧基。如果用于本发明的方法的羧酸盐是二或多羧酸的羧酸盐,则优选羧酸盐不具有任何游离羧基。如以上给出的实例所明示的,羧酸盐可为饱和羧酸,如乙酸的盐,为不饱和羧酸,如棕榈酸的盐,或为包含其它官能团,如在乳酸中的羟基,或如在丙酮酸中的羰基,或如在 γ -羧基谷氨酸中的氨基的羧酸的盐。对于存在氨基,氨基酸,即 α -氨基羧酸在本发明的方法中是不优选的,因为它们倾向形成内盐。然而,某些氨基酸,如天门冬氨酸和谷氨酸是

用于本发明的方法的适宜的氨基酸。再有，羧酸盐可包含杂原子，实例是例如，含2个氮原子的吡啶-2,3-二羧酸(喹啉酸)。

磺酸盐的实例是甲烷磺酸或对-甲苯磺酸的盐。磺酸盐还可为包含其它官能团如羟基的磺酸的盐。

优选的羧酸盐/磺酸盐是候选药物，优选小分子，如小于200 Da，并且经超极化的候选药物可用于NMR分析，以例如测定对一定受体或在酶分析中的结合亲和力。这样的分析在WO-A-2003/089656或WO-A-2004/051300中描述，并且它们优选基于使用液态NMR光谱，这意味着超极化的固体候选药物在极化后必须液化，优选通过溶解或熔化而液化。羧酸盐/磺酸盐可以是或可以不是富含同位素的。

在另一个优选的实施方案中，羧酸盐/磺酸盐是适宜为成像剂的化合物，并且意欲将超极化的羧酸盐/磺酸盐用作人或非人动物活体中MR成像和/或化学位移成像中的成像剂。在该实施方案中，优选的羧酸盐/磺酸盐是内源性羧酸盐/磺酸盐，因为内源性羧酸盐是优选的化合物。对于代谢过程的成像，在人或非人动物体代谢过程中起作用的内源性羧酸盐是优选的。优选的羧酸盐是苹果酸盐、乙酸盐、反丁烯二酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、丙酮酸盐、碳酸氢盐、丙二酸盐、碳酸盐、丁二酸盐、草酰乙酸盐、 α -酮戊二酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐和异柠檬酸盐。最优的羧酸盐是碳酸氢盐、反丁烯二酸盐、碳酸盐、乙酸盐、乳酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐和丙酮酸盐。

如果将在人或非人动物体内代谢过程中起作用的内源性羧酸盐用作本发明的方法中的将要被极化的化合物，则通过本发明方法获得的经超极化羧酸盐优选用作在人或非人动物活体内代谢活动的体内分子MR成像和/或化学位移成像的MR成像剂。这些羧酸盐中，优选的是含经极化的NMR活性核的那些羧酸盐，它们表现出缓慢纵向弛豫(T_1)，以致极化维持足够长时间以转移入人或非人动物体内而随后

成像。优选的羧酸盐含有在 0.01-5 T 磁场强度和 20-60 °C 范围的温度下的纵向弛豫时间常数(T_1)大于 10 秒、优选大于 30 秒和甚至更优选大于 60 秒的 NMR 活性核。

一般地, 意欲用作体内 MR 成像和/或化学位移成像的成像剂的羧酸盐, 优选为富含同位素的羧酸盐, 同位素富集更优选是富含同位素的 NMR 活性核, 如果至少存在氮原子, 优选是 ^{13}C 和/或 ^{15}N 。同位素富集可包括或者在羧酸盐中的一个或多个位点的选择性富集或者在所有位点的均衡富集。例如, 可通过化学合成或生物标记的方法实现富集, 两种方法为本领域所知, 并且可依据要富含同位素的具体羧酸盐选择适宜的方法。

意欲用作 MR 成像/化学位移成像的成像剂的羧酸盐的优选的实施方案, 是仅在分子的一个位置上富集同位素的羧酸盐, 优选富集至少 10%, 更适宜至少 25%, 更优选至少 75% 和最优选至少 90%。理想富集是 100%。

同位素富集的最佳位置取决于 NMR 活性核的弛豫时间。羧酸盐优选在具有长 T_1 弛豫时间的位置上富集同位素。优选采用在羧基-C-原子、羰基-C-原子或季 C-原子上富集的 ^{13}C -富集的羧酸盐。

用作 MR 成像/化学位移成像的成像剂的特别优选的羧酸盐是 ^{13}C -丙酮酸盐、 ^{13}C -乙酸盐、 ^{13}C -乳酸盐、 ^{13}C -碳酸氢盐、 ^{13}C -碳酸盐和 ^{13}C -反丁烯二酸盐, 最优选 ^{13}C -丙酮酸盐。 ^{13}C -丙酮酸盐可在 C1-位($^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐)、在 C2-位($^{13}\text{C}_2$ -丙酮酸盐)、在 C3-位($^{13}\text{C}_3$ -丙酮酸盐)、在 C1-和 C2-位($^{13}\text{C}_{1,2}$ -丙酮酸盐)、在 C1-和 C3-位($^{13}\text{C}_{1,3}$ -丙酮酸盐)、在 C2-和 C3-位($^{13}\text{C}_{2,3}$ -丙酮酸盐)或在 C1-、C2-和 C3-位($^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -丙酮酸盐)富含同位素。C1-位是 ^{13}C 同位素富集的优选的位置。

如以上提到的, 磺酸盐也可用作人或非人动物活体中的 MR 成像剂。这样的磺酸盐优选是富含同位素的, 同位素富集更优选是 NMR 活性核, 优选 ^{13}C 的同位素富集。同位素富集可包括或者在磺酸盐中的一个或多个位点的选择性富集或者在所有位点的均衡富集。例如,

可通过化学合成或生物标记的方法实现富集，两种方法均为本领域所知，并且可依据要富含同位素的具体磺酸盐选择适宜的方法。

意欲用作 MR 成像/化学位移成像的成像剂的磺酸盐的优选实施方案，是仅在分子的一个位置上富集同位素的磺酸盐，优选富集至少 10%，更适宜至少 25%，更优选至少 75%和最优选至少 90%。理想的富集是 100%。

磺酸盐中同位素富集的最佳位置取决于 NMR 活性核的弛豫时间。磺酸盐优选在具有长 T_1 弛豫时间的位置上富集同位素。 ^{13}C -富集的磺酸盐是优选的，并且优选采用在羧基-C-原子、羰基-C-原子或季 C-原子上富集的磺酸盐，当然条件是这些基团存在于该分子中。

对于在人或非人动物活体中用作 MR 成像剂的超极化的羧酸盐或磺酸盐，优选的是选择生理上可耐受的无机阳离子。用于 MR 成像剂和已知生理上很好耐受的阳离子是，例如 Na^+ 或葡甲胺，并且任何用于本发明的方法的无机阳离子，通过本领域已知的方法，如采用阳离子交换柱，可被这样的生理上很好耐受的阳离子交换。

在另一个优选的实施方案中，通过本发明的方法获得的超极化的羧酸盐/磺酸盐用于固态 NMR 波谱，即不实施任意的步骤 d)。在固态 NMR 波谱中，可通过或者静态或者魔角旋转(magic angle spinning)固态 NMR 波谱对经超极化的固体羧酸盐/磺酸盐进行分析。对于固态 NMR，羧酸盐/磺酸盐不限于具有某些特性或化学结构的羧酸盐/磺酸盐，并且任何大小和类型的羧酸根阴离子/磺酸根阴离子可用作本发明方法中的羧酸盐/磺酸盐。

将要用于本发明的方法的许多羧酸盐/磺酸盐是商业上可获得的化合物。为了获得特别的羧酸盐/磺酸盐，可将商业上可获得的羧酸盐/磺酸盐用作起始原料，以及可通过本领域已知的方法，例如通过采用离子交换柱或筒，用 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 交换包含在商业上可获得的化合物中的阳离子。简要地说，为了制备需要的羧酸盐/磺酸盐，在第一个步骤中，通过用选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、

Ca²⁺、Sr²⁺或Ba²⁺的所需无机阳离子对适宜的色谱柱进行装填，制备离子交换柱。在第二个步骤中，将商业上可获得的羧酸盐/磺酸盐溶解于适宜的溶剂中并将所获得的溶液流经离子交换柱。收集洗出液和通过本领域已知的方法，如，例如蒸发或冷冻干燥优选去除溶剂，获得将要用于本发明的方法的、含有选自NH₄⁺、K⁺、Rb⁺、Cs⁺、Ca²⁺、Sr²⁺和Ba²⁺的无机阳离子的羧酸盐/磺酸盐。

在本发明方法中的步骤 a)中制备的溶液优选是水溶液，尤其是在如果羧酸盐/磺酸盐意欲用作体内 MR 成像和/或化学位移成像的成像剂时，更是如此。在另一个实施方案中，所述溶液是非水溶液。用于这样的非水溶液的适宜的溶剂或溶剂混合物是或包含，例如 DMSO 或甲醇。在另一个实施方案中，所述溶液包含溶剂和水的混合物，如 DMSO 和/或甲醇和水的混合物。

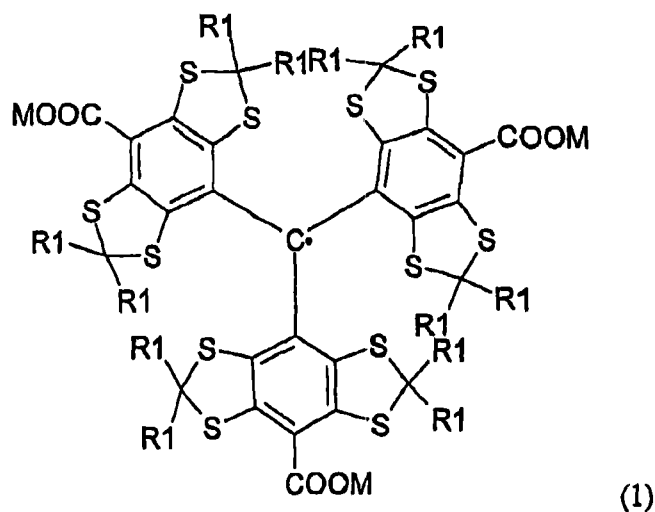
对于意欲用作体内 MR 成像和/或化学位移成像的成像剂的超极化的羧酸盐/磺酸盐，特别重要的是获得高浓度的经超极化的羧酸盐/磺酸盐，即通过制备将要用于 DNP 方法的浓缩溶液来获得。因此，对于该实施方案，在本发明的方法的步骤 a)中制备的溶液在羧酸盐/磺酸盐中至少是 3 摩尔，更优选至少是 5 摩尔和最优选至少是 7 摩尔。可在文献(例如"默克索引(Merck Index)" 第 13 版，John Wiley 和 Sons (2001))中获得的溶解度数据，用于挑选对于特定的应用的最适宜的阳离子。如果，意欲将例如超极化的乙酸盐用作体内 MR 成像/化学位移成像的成像剂，则 Cs-乙酸盐或 K-乙酸盐优选用于本发明的方法，因为这些化合物在水中比例如 NH₄-乙酸盐或 Ca-乙酸盐具有较高的溶解性，从而可制备较高浓度的乙酸盐水溶液。

在本发明的方法的步骤 a)中制备的溶液还包含在 DNP 方法中是重要的 DNP 剂。为了在要极化的羧酸盐/磺酸盐中实现高的核极化水平，DNP 剂必须是稳定的和可溶于溶解的羧酸盐/磺酸盐中。在上下文中，稳定的三苯甲基自由基是优选的 DNP 剂并且这样的稳定的氧基、硫基或碳基三苯甲基自由基，例如在 WO-A-99/35508、

WO-A-88/10419、WO-A-90/00904、WO-A-91/12024、WO-A-93/02711、WO-A-96/39367、WO-A-98/39277 和 WO-A-2006/011811 中有描述。

DNP 剂的最佳选择取决于几个方面。如之前提及的，DNP 剂和羧酸盐/磺酸盐必须紧密接触，以便在羧酸盐中产生最佳极化水平。因此，在优选的实施方案中，DNP 剂在溶解的羧酸盐中是可溶的。适宜地，如果要极化的羧酸盐/磺酸盐是亲脂性的(亲水性的)化合物，则 DNP 剂应该也是亲脂性(亲水性的)。如果 DNP 剂是三苯甲基自由基，则所述三苯甲基自由基的亲脂性或亲水性可受适宜的亲脂性或亲水性基团的选择的影响。再有，DNP 剂在溶解的羧酸盐/磺酸盐存在下必须是稳定的。因此，如果羧酸盐/磺酸盐包含反应性基团，则应该使用对这些反应性基团相对惰性的 DNP 剂。从前述得知，显然 DNP 剂的选择高度依赖于羧酸盐/磺酸盐的化学性质和特性。

在优选的实施方案中，丙酮酸盐在本发明的方法中用作羧酸盐，更优选的是 ^{13}C -丙酮酸盐和最优选的是 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸盐并且无机阳离子是 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ ，优选 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ ，更优选 Rb^+ 或 Cs^+ 和最优选 Cs^+ 。在本例中，DNP 剂优选为式(1)的三苯甲基自由基



其中

M 表示氢或一价阳离子；和

R1 相同或不同，表示直链或支链 C₁-C₆-烷基、C₁-C₆-羟基烷基或基团-(CH₂)_n-X-R2，其中

n 是 1、2 或 3；

X 是 O 或 S；和

R2 是直链或支链 C₁-C₄-烷基。

在优选的实施方案中，M 表示氢或一价生理学上可耐受的阳离子。术语“生理学上可耐受的阳离子”表示被人或非人动物活体耐受的阳离子。优选地，M 表示氢或碱性阳离子、铵离子或有机胺离子，例如葡甲胺。最优选，M 表示氢或钠。

在更优选的实施方案中，R1 是相同的，更优选为直链或支链 C₁-C₄-烷基，最优选甲基、乙基或异丙基，或 C₁-C₄-羟基烷基，最优选羟基甲基或羟基乙基。

在更优选的实施方案中，R1 相同或不同，优选相同并表示 -CH₂-OCH₃、-CH₂-OC₂H₅、-CH₂-CH₂-OCH₃、-CH₂-SCH₃、-CH₂-SC₂H₅ 或 -CH₂-CH₂-SCH₃，最优选 -CH₂-CH₂-OCH₃。

按照在 WO-A-88/10419、WO-A-90/00904、WO-A-91/12024、WO-A-93/02711、WO-A-96/39367、WO-A-98/39277 和 WO-A-2006/011811 中的详述可合成这样的三苯甲基自由基。

可通过将羧酸盐/磺酸盐溶解于适宜的溶剂或溶剂混合物中，优选获得在本发明方法的步骤 a) 中制备的溶液。向该溶液中加入 DNP 剂并使其溶解于其中。DNP 剂可能作为固体或溶解于适宜的溶剂中而加入。优选地，使溶解羧酸盐/磺酸盐的溶剂以及，如果溶解，DNP 剂的量保持最小。在另一个优选的实施方案中，将 DNP 剂溶解于适宜的溶剂中并将羧酸盐/磺酸盐加入到该溶液中。通过本领域已知的几种方法，诸如搅拌、涡流或超声，可促进化合物的密切混合。

再有，在本发明方法的步骤 a) 中制备的溶液任选包含顺磁性金属离子。优选存在顺磁性金属离子，因为如在 PCT/NO06/00449 中详细解释的，它导致羧酸盐/磺酸盐中极化水平提高。

用于本发明方法中的顺磁性金属离子是原子序号 58-70 的镧系金属或原子序号 21-29、42 或 44 的过渡金属的顺磁性金属离子。可使用一种或几种不同金属的顺磁性金属离子，然而，优选使用一种金属的顺磁性金属离子。适宜的顺磁性离子包括例如 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Nd^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Gd^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Er^{3+} 和 Yb^{3+} 。在优选的实施方案中，顺磁性金属离子选自 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Gd^{3+} 和 Tb^{3+} ，在更优选的实施方案中，选自 Cr^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Gd^{3+} 。

适宜地，采用呈螯合的形式或它们的盐的形式的顺磁性金属离子。这样，术语“顺磁性金属离子”指包含作为阳离子的顺磁性金属离子和或者是有机阴离子或者是无机阴离子的阴离子的盐。再有，术语“顺磁性金属离子”也指呈螯合形式的顺磁性金属离子，即所谓的顺磁性螯合物。顺磁性螯合物是顺磁性金属离子和螯合剂的络合物。

如果意欲将要极化的羧酸盐/磺酸盐用于固态 NMR，则优选使用其盐的形式的顺磁性金属离子。适宜的盐是例如， CrCl_3 、 MnCl_2 、 FeCl_2 、 FeCl_3 、 GdCl_3 或顺磁性金属羧酸盐/磺酸盐，优选被极化的那些羧酸盐/磺酸盐。因此，如果要极化的是乙酸盐，则可将顺磁性金属乙酸盐，例如乙酸 Fe(III) 用作顺磁性金属离子。选择可溶于羧酸盐/磺酸盐的溶液和 DNP 剂中的顺磁性金属盐是有优势的。在另一个实施方案中，可加入螯合形式的顺磁性金属离子。

对于液态 NMR 或在人或动物活体中用作成像剂，通过本发明方法获得的固体超极化的羧酸盐/磺酸盐必须溶解或熔化以形成溶液或液体。然而，在这样的溶液或液体中游离的，即未螯合的顺磁性金属离子极大地缩短羧酸盐/磺酸盐中的极化核的 T_1 弛豫时间，即加速极化的自然衰减，并因此，缩短极化的羧酸盐/磺酸盐提供高 MR 信号强度的时间。再者，如果意欲将要极化的羧酸盐/磺酸盐用作在人或动物活体中的成像剂，则游离顺磁性金属离子常常不是生理上耐受的或生理上耐受性差的，并且因此，具有不需要的的作用，如，毒性作用。

为了克服游离顺磁性金属离子的上述作用,可在本发明的方法中采用呈螯合形式的顺磁性金属离子,即顺磁性螯合物。其优点是不必从液体超极化的羧酸盐/磺酸盐中去除这样的顺磁性螯合物。然而,如果需要从液体超极化的羧酸盐/磺酸盐中去除顺磁性螯合物,所述的去除不必要在如此高时间压力(time pressure)下进行,以避免如上所讨论的 T_1 缩短。通过使用依据本发明方法的羧酸盐/磺酸盐而不是使游离羧酸/磺酸盐极化,也可能使用相当广泛的顺磁性螯合物,由于通常存在于螯合剂中的氮原子和羧基的质子化作用,大多数螯合物在游离羧酸/磺酸盐中不稳定。

通过使用呈其盐形式的顺磁性金属离子并且在溶解或熔化固态超极化的羧酸盐/磺酸盐后迅速去除顺磁性金属离子,可进一步克服上述作用。去除顺磁性金属离子的方法在本申请书中稍后公开。

在另一个实施方案中,可通过使用呈其盐形式的顺磁性金属离子和加入螯合剂至固体超极化的羧酸盐/磺酸盐所要溶解的溶解媒介中,以快速络合游离顺磁性金属离子,克服上述作用。在此情况下,应该选择在溶解媒介中可溶的和稳定的并且与游离顺磁性金属离子快速形成稳定的络合物的螯合剂。

如上所述,顺磁性金属离子可以螯合形式,即由顺磁性金属离子和螯合剂组成的顺磁性螯合物用于本发明方法中。

已知多种螯合剂适合于此目的。一般,可使用通常含杂原子如 N、O、P 或 S 的环状和非环状螯合剂,优选环状螯合剂。适宜的非环状螯合剂是例如 DTPA 及其化合物,如 DTPA-BMA、DTPA-BP、DTPA-BMEA、EOB-DTPA、BOPTA 和 MS-325, EDTA 及其化合物,如 EDTA-BMA、DPDP、PLED、HPTA, 酰胺或二酰胺,如 TOGDA、穴状配体(cryptands)或磺酸盐。适宜的环状螯合剂是例如 PCTA-[12]、PCTP-[12]、PCTP-[13]、DOTA、DO3A 及其化合物,如 HP-DO3A 和 DO3A-丁三醇(butriol)。DOTA、DO3A 及其化合物是优选的环状螯合

剂。这些螯合剂是本领域已知的并且熟练的技术人员能够找到有关这些螯合剂及其制备的大量文献。

在另一个实施方案中，使用相对惰性的化学实体的螯合剂，例如富勒烯(fullerenes)或沸石。如果要极化的羧酸盐/磺酸盐包含能与更具反应性的螯合剂起反应的反应性官能团，则这样的螯合剂(包囊(encapsulating)顺磁性金属离子如 Gd^{3+})是优选的。

在本发明方法中，顺磁性螯合物可或者是单体顺磁性螯合物，即由螯合剂和单个顺磁性金属离子组成的化学实体，例如 GdDTPA-BMA 或 MnDPDP。另一方面，顺磁性螯合物可为多聚体顺磁性螯合物，即由两个或更多个亚单位组成的化学实体，其中每个亚单位由螯合剂和单个顺磁性金属离子组成。

如之前描述的 DNP 剂那样，要极化的羧酸盐/磺酸盐也必须与顺磁性金属离子紧密接触。以下，除了另外说明或特指，术语“顺磁性金属离子”用于指以其盐和顺磁性螯合物形式存在的两种顺磁性金属离子。可通过几条途径制备本发明方法的步骤 a) 中的溶液。在第一个实施方案中，将羧酸盐/磺酸盐溶解于一种或多种适宜的溶剂中，以获得溶液。向该溶液中加入 DNP 剂并使之溶解。DNP 剂可作为固体或在溶液中的形式加入。优选地，使溶解 DNP 剂的溶剂的量保持最小。在后续步骤中，加入顺磁性金属离子。顺磁性金属离子可作为固体或在溶液中的形式加入。再有，优选地，使溶解顺磁性金属离子的溶剂的量保持最小。在另一个实施方案中，将 DNP 剂和顺磁性金属离子溶解于一种或多种适宜的溶剂中以形成溶液并将羧酸盐/磺酸盐加入该溶液中。在另一个实施方案中，将 DNP 剂(或顺磁性金属离子)溶解于一种或多种适宜的溶剂中以形成溶液并将羧酸盐/磺酸盐加入该溶液中。在后续步骤中，将作为固体或溶解于一种或多种适宜的溶剂中的顺磁性金属离子(或 DNP 剂)加至该溶液中。优选地，使溶解顺磁性金属离子(或 DNP 剂)的溶剂的量保持最小。通过本领域已知的几种方法，诸如搅拌、涡流或超声，可促进化合物的密切混合。

优选使用溶解于羧酸盐/磺酸盐溶液和 DNP 剂的顺磁性金属离子。如果要极化的羧酸盐/磺酸盐是亲脂性(亲水性)的化合物和如果所用的顺磁性金属离子是顺磁性螯合物,则所述螯合物也应该是亲脂性(亲水性)的。顺磁性螯合物的亲脂性或亲水性可例如受包含适宜的亲脂性或亲水性残基的螯合剂的选择的影响。更优选的是,在羧酸盐/磺酸盐的存在下,顺磁性螯合物是稳定的,因为顺磁性螯合物的离解(去螯合)将导致游离顺磁性离子对如上述液化的超极化羧酸盐/磺酸盐中的极化衰减和因此的极化水平具有损害的结果,除非在固体经超极化羧酸盐/磺酸盐被液化后,迅速去除游离顺磁性金属离子。如果要极化的羧酸盐/磺酸盐包含反应性基团,应该使用对这些反应性基团相对惰性的顺磁性金属离子。从前述得知,显然顺磁性金属离子的选择高度依赖于羧酸盐/磺酸盐的化学性质及其最终用途(固体 NMR、液体 NMR 或体内使用的 MR 成像剂/化学位移剂)。

如果三苯甲基自由基被用作 DNP 剂,则这样的三苯甲基自由基在步骤 a)制备的溶液中的适宜浓度是 5-25 mM,优选 10-20 mM。如果在步骤 a)制备的溶液中存在顺磁性金属离子,则这样的顺磁性金属离子的适宜浓度是 0.1-6 mM (金属离子),并且 0.5-4 mM 的浓度是优选的。

在本发明的方法中,在步骤 a)中已经制备溶液后,将所述溶液于步骤 b)中冷冻。此可通过本领域已知的方法进行,如通过在冷冻器中、在液氮中,优选如由将步骤 a)中制备的溶液滴加入液氮中获得的“珠子”,或简单地将溶液放入适宜的容器中并将其插入 DNP 极化器(其中液氮将使其冷冻)中。含高浓度的羧酸盐/磺酸盐的溶液具有低凝固点,并且在约-18 °C 温度的冷冻器中使这样的溶液冷冻将足以得到冷冻的溶液。

如果顺磁性金属离子存在于溶液中,则可在冷冻前将所述溶液除气。可通过将氦气鼓泡通入该溶液(如 2-15 分钟的时间周期)实现除气,但可通过其它已知普通方法实现除气。

在本发明方法的步骤 c) 中, 对冷冻的溶液实施动态核极化(DNP), 所述动态核极化产生包含经超极化的羧酸盐或经超极化的磺酸盐或其混合物的冷冻溶液。

DNP 技术在例如 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中描述, 此两个文献通过引用结合于本文中。通常, 例如通过在液氮和约 1 T 或更高的磁场中实施 DNP 方法, 在 DNP 方法中采用中或高磁场以及极低的温度。作为选择, 可采用实现增强充分极化的中磁场和任何温度。在优选的实施方案中, 在液氮和约 1 T 或更高的磁场中实施 DNP 方法。适宜的极化装置(=极化器(polarisers))在例如 WO-A-02/37132 中描述。在优选的实施方案中, 极化器包括低温恒温器和极化设备, 如, 通过波导管连着被磁场产生装置诸如超导磁体环绕的中心孔腔(bore)中的微波源的微波室。孔腔垂直向下延伸到至少接近超导磁体的 P 区水平, 此处磁场强度足够高, 如在 1 和 25 T 之间, 足以使 NMR 活性核的极化发生。探头的孔腔(=要极化的冷冻溶液)优选可密封的并且可抽空至低压, 如 1 mbar 或更低的数量级的压力。探头引入工具, 诸如可移动的传送管可包含在孔腔内, 并且可将此管从孔腔顶向下插入至微波室内 P 区中的位置。通过液氮将 P 区冷却足够低以致发生极化的温度, 优选 0.1-100 K, 更优选 0.5-10 K, 最优选 1-5 K 数量级的温度。探头传导工具优选可在其上端以任何适宜的方式密封, 以保持孔腔中部分真空。容纳探头的容器(probe-retaining container), 诸如容纳探头的帽, 可为可拆卸地安装在探头传导工具的低端内。容纳探头的容器优选由轻质材料制备, 所述材料具有低的比热容和良好的低温特性, 诸如, Kelf (聚氯三氟乙烯)或 PEEK (聚醚醚酮), 并且可将其设计为可持有多个探头的方式。

将探头(液体或已经冷冻的)插入容纳探头的容器中, 淹没在液氮中, 并用优选于 200 mW 下约 94 GHz 频率微波辐照。例如, 可通过在微波辐照过程中获取探头的固态 NMR 信号, 监测极化水平。一般, 在显示 NMR 信号对时间的图中得到饱和曲线。因此, 可能测定何时

达到最佳极化水平。固态 NMR 测定，例如固态 ^{13}C -NMR 测定优选由使用低反转角的单一脉冲捕获 NMR 序列组成。将 NMR 光谱中的经超极化的羧酸盐/磺酸盐的信号强度与动态核极化过程前获得的 NMR 光谱中的羧酸盐/磺酸盐的信号强度进行比较。然后从 DNP 前和 DNP 后的信号强度的比率计算极化水平。

如果意欲将经超极化的羧酸盐/磺酸盐用作 MR 成像剂/化学位移剂或用于液态 NMR 波谱中，则需要将含经超极化的羧酸盐/磺酸盐的冷冻溶液从固态转变为液态，即液化。因此，本发明的方法可包括进一步的步骤 d)，其中将在步骤 c) 中获得的冷冻溶液液化。此可通过将在步骤 c) 中获得的冷冻溶液溶解于适当的溶剂或溶剂混合物中得以实现。水性载体，优选生理上可耐受的和药学上可接受的水性载体，如水、缓冲溶液或盐水适宜用作溶剂，优选地，如果经超极化的羧酸盐/磺酸盐意欲用作体内 MR 成像剂/化学位移剂。再有，可使用非水溶剂或溶剂混合物，例如像 DMSO 或甲醇或包含水性载体和非水溶剂的混合物的溶剂，例如 DMSO 和水或甲醇和水的混合物。作为选择，可在步骤 d) 中通过融化使冷冻溶液液化。

溶解是优选的并且因此含 DNP 极化的化合物的冷冻溶液的溶解方法以及适宜的装置在 WO-A-02/37132 中有详细描述。融化方法以及用于融化的适宜的装置在例如 WO-A-02/36005 中有描述。

在优选的实施方案中，将在步骤 c) 获得并包含经超极化的羧酸盐/磺酸盐的冷冻溶液溶解于水。

动态核极化后，通过使冷冻溶液液化，得到包含经超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐或其混合物的液体，其中经超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。

在后续步骤中，可从所述液体中去除 DNP 剂和任选存在的顺磁性金属离子。如果意欲将超极化的羧酸盐/磺酸盐用作体内 MR 成像剂

/化学位移剂，则从所述液体中优选去除 DNP 剂，优选去除三苯甲基自由基和顺磁性金属离子。

用于部分去除、基本去除或完全去除三苯甲基自由基和顺磁性金属离子方法是本领域已知的。一般，依据三苯甲基自由基和顺磁性金属离子的性质应用该方法。一旦冷冻的溶液溶解和依据所用的溶剂的化学性质，可使三苯甲基自由基和/或顺磁性金属离子沉淀，并因此可通过过滤轻易从包含超极化的羧酸盐/磺酸盐的液体中分离。

如果没有发生沉淀，则可通过色谱分离技术，如液相色谱如反相色谱、离子交换色谱、(固相)萃取法或本领域已知的其它色谱分离技术，去除三苯甲基自由基和顺磁性金属离子。一般，优选采用在一个步骤中能够去除三苯甲基自由基和顺磁性金属离子两者的方法，因为由于 T_1 弛豫，液体中的羧酸盐/磺酸盐的极化衰减。从液体中去除不需要的化合物越快和越有效，则保留在羧酸盐/磺酸盐中的极化水平越高。因此，选择具有相似的化学性质的三苯甲基自由基和顺磁性金属离子(如两者均是亲脂性或亲水性的化合物，或具有某些常见的官能团)是有益的。如果例如使用亲脂性三苯甲基自由基和亲脂性顺磁性螯合物，可通过反相液相色谱去除两种化合物。

如果游离顺磁性金属离子存在于所述液体(如由于使用顺磁性金属盐)中，则优选通过使用如由 O. Vigneau 等, *Anal. Chim. Acta* 435(1), 2001, 75-82 中所述的阳离子交换柱或离子印迹化树脂去除这些离子。另一个可能的方法是如由 A. Sorin 等, *J. Membrane Science* 267(1-2), 2005, 41-49 公开的，通过在荷电的有机膜上选择性络合游离顺磁性金属离子的纳米滤膜技术(nano-filtration)。再有，以类似于由 S. Donald 等. *J. Inorg. Biochem.* 56(3), 1994, 167-171 公开的亲和色谱法，可去除游离的顺磁性金属离子。

因为三苯甲基自由基具有特征性 UV/可见吸收光谱，有可能使用 UV/可见光吸收检测作为一个方法，以检验在去除三苯甲基自由基后所述液体中它们的存在。为了获得定量结果，即存在于液体中的三

苯甲基自由基的浓度,可对光谱仪进行校准,这样从液体样品在特定波长的吸收值得到样品中相应的三苯甲基自由基浓度。如果将包含经超极化的羧酸盐/磺酸盐的液体用作体内成像剂/化学位移剂,则去除三苯甲基自由基是特别优选的。

荧光或UV/可见光吸收检测可被用作检验顺磁性螯合物的存在的方法,条件是螯合物含有(强的)发色团。另一个检验顺磁性螯合物的存在的途径是电化学探测,条件是螯合物中存在电活性部分。

如果顺磁性金属盐用于制备本发明方法的步骤a)中的溶液,可用荧光检测去检验从液体中去除它们后的游离顺磁性金属离子。如果例如使用 Gd^{3+} -盐,则激发波长275 nm的荧光和发射波长314 nm的监测荧光可用作检测具有高度特异性的游离 Gd^{3+} 的方法。再有,可通过与比色剂PAR(4-(2-吡啶基偶氮)-间苯二酚)络合后用530-550 nm可见光吸收检测游离 Gd^{3+} 。适宜于其它顺磁性金属离子的其它比色剂为本领域已知并且可以同样的方式使用。

以下,描述了依据本发明的方法的优选实施方案。在该优选实施方案中,本发明方法的步骤a)中制备的溶液,是包含 ^{13}C -丙酮酸盐,优选 $^{13}C_1$ -丙酮酸盐或 ^{13}C -碳酸氢盐和选自 K^+ 、 Rb^+ 和 Cs^+ ,优选 Cs^+ 的阳离子的水溶液。为了简化的理由,本文以下的优选的实施方案对 Cs - ^{13}C -丙酮酸盐进行阐述。所述水溶液还包含三苯甲基自由基,优选式(1)三苯甲基自由基以及或者包含 Gd^{3+} (Gd -螯合物)或者 Gd^{3+} -盐(Gd -盐)如 $GdCl_3$ 作为顺磁性金属离子的顺磁性螯合物。通过将商业上可获得的 ^{13}C -丙酮酸盐,优选 Na - ^{13}C -丙酮酸盐进行阳离子交换,使 Na - ^{13}C -丙酮酸盐的水溶液流经通过用可溶性 Cs -盐如 $CsCl$ 的水溶液装填的离子交换柱或筒,制备 Cs - ^{13}C -丙酮酸盐。将这样制备的 Cs - ^{13}C -丙酮酸盐冷冻干燥。通过各自将三苯甲基自由基和 Gd -螯合物或 Gd -盐以最少的水溶解,制备用于本发明方法的水溶液。制备 Cs - ^{13}C -丙酮酸盐水溶液,所述水溶液在丙酮酸盐中优选至少为5摩尔。然后将该水溶液与溶解的三苯甲基自由基和溶解的 Gd -螯合物或 Gd -盐合并。在步骤

b)中, 将得到的水溶液例如在冷冻器中冷冻, 然后用于步骤 c)的动态核极化。在步骤 d)中, 在 DNP 过程后, 将包含经超极化的 Cs-¹³C-丙酮酸盐的冷冻溶液溶解于水性载体中, 优选水中, 由此获得包含经超极化的 Cs-¹³C-丙酮酸盐的液体。如果已将 Gd-盐用作顺磁性金属离子, 则从溶解的经超极化的 Cs-¹³C-丙酮酸盐中尽快去除 Gd³⁺离子是重要的, 特别是经超极化的 Cs-¹³C-丙酮酸盐将要用作体内 MR 成像剂/化学位移剂时尤为重要。适宜的方法是通过使用由 O. Vigneau 等, *Anal. Chim. Acta* 435(1), 2001, 75-82 中公开的阳离子交换柱或离子印迹化树脂进行去除。另一个可能的方法是如由 A. Sorin 等, *J. Membrane Science* 267(1-2), 2005, 41-49 公开的, 通过在荷电的有机膜上选择性络合游离 Gd³⁺的纳米滤膜技术。再有, 通过由 S. Donald 等, *J. Inorg. Biochem.* 56(3), 1994, 167-171 公开的亲和色谱法, 可去除游离 Gd³⁺。

如果已经将 Gd-螯合物用作顺磁性金属离子, 和式(1)三苯甲基自由基, 则可通过使用反相液相色谱, 在使式(1)三苯甲基自由基去除的同时, 去除螯合物。

检验含经超极化的 Cs-¹³C-丙酮酸盐的液体中残留的游离 Gd³⁺、Gd-螯合物和式(1)三苯甲基自由基的适宜的方法在第 25/26 页描述。

如果意欲将包含经超极化的 Cs-¹³C-丙酮酸盐的液体用作体内 MR 成像剂/化学位移剂, 可值得以已知为生理上可耐受的其它类型的阳离子, 如钠或葡甲胺交换 Cs⁺, 并且因而使用例如经超极化的 ¹³C-丙酮酸钠作为体内 MR 成像剂/化学位移剂。进行这样的阳离子交换的方法为本领域已知, 并且优选使用快速方法, 因为经超极化的 ¹³C-丙酮酸盐的极化随着时间衰减。在优选的实施方案中, 使用以需要的阳离子, 如钠或葡甲胺装填的阳离子交换柱或筒, 并且使含经超极化的 Cs-¹³C-丙酮酸盐的液体流经通过该柱或筒, 进行阳离子交换。适宜地, 阳离子交换的总时间少于 10 秒, 优选少于 7 秒和更优选少于 5 秒。

依据本发明的方法生成的包含经超极化的 ¹³C-丙酮酸的液体, 可用作“常规”MR 成像剂, 即为解剖学成像提供极好的对比增强值。依

据本发明方法生成的液体超极化的¹³C-丙酮酸盐的再一个优点是，丙酮酸盐即使在更高浓度下也是人或非人动物体也耐受良好的内源性化合物。作为柠檬酸循环中的前体，丙酮酸盐在人/哺乳动物体中起重要的代谢作用，在那里丙酮酸盐被转化为不同的化合物：其转氨作用产生丙氨酸；经由氧化去羧基作用，丙酮酸盐转化成乙酰-CoA 和碳酸氢盐，丙酮酸盐的还原生成乳酸盐和其羧基化作用生成草酰乙酸盐。

再有，超极化的¹³C-丙酮酸盐代谢转化为超极化的¹³C-乳酸盐、超极化的¹³C-碳酸氢盐(仅就¹³C₁-丙酮酸盐、¹³C_{1,2}-丙酮酸盐或¹³C_{1,2,3}-丙酮酸盐举例)和超极化的¹³C-丙氨酸，可被用于人体代谢过程的体内MR研究。¹³C-丙酮酸盐在人全血中于37°C具有约42秒的T1弛豫，然而，已发现超极化的¹³C-丙酮酸盐转化为超极化的¹³C-乳酸盐、超极化的¹³C-碳酸氢盐和超极化的¹³C-丙氨酸足够迅速，以致能检测选自¹³C-丙酮酸盐母体化合物及其代谢物的信号。丙氨酸、碳酸氢盐和乳酸盐的量取决于被研究组织的代谢状态。超极化的¹³C-乳酸盐、超极化的¹³C-碳酸氢盐和超极化的¹³C-丙氨酸的MR信号强度与在检测时剩下的这些化合物的量和极化的程度相关，因此，通过监测超极化的¹³C-丙酮酸盐向超极化的¹³C-乳酸盐、超极化的¹³C-碳酸氢盐和超极化的¹³C-丙氨酸的转化，使通过使用非侵入性MR成像研究人或非人动物体内代谢过程成为可能。

已经发现，由不同丙酮酸盐代谢物引起的MR信号振幅依组织类型的不同而异。由丙氨酸、乳酸盐、碳酸氢盐和丙酮酸盐形成的独特的代谢峰图案可用作被检查组织的代谢状态的指纹图，并且因此考虑健康组织和肿瘤组织之间的区别。此使得依据本发明的组合物成为体内MR肿瘤成像的卓越试剂。丙酮酸盐在肿瘤成像的应用已经在WO-A-2006/011810中详细描述。

再有，超极化的¹³C-丙酮酸盐在心脏成像的应用已在WO-A-2006/054903中描述。

本发明的另一个方面是包含羧酸盐或磺酸盐或其混合物、DNP 剂、优选三苯甲基自由基和任选的顺磁性金属离子的组合物，其中所述羧酸盐或磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。

优选地，所述组合物包含羧酸盐，即某一羧酸盐或几个不同的羧酸盐，优选内源性羧酸盐和更优选在人体或非人动物体内的代谢过程中起作用的内源性羧酸盐。在更优选的实施方案中，所述羧酸盐是富集 ^{13}C 的羧酸盐，优选是在羧基原子、羰基原子或季 C-原子富集 ^{13}C 的羧酸盐。

优选的羧酸盐是苹果酸盐、乙酸盐、反丁烯二酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、丙酮酸盐、碳酸氢盐、丙二酸盐、碳酸盐、丁二酸盐、草酰乙酸盐、 α -酮戊二酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐或异柠檬酸盐。最优选的羧酸盐是碳酸氢盐、反丁烯二酸盐、碳酸盐、乙酸盐、乳酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐和丙酮酸盐。

优选的无机阳离子是 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ ，更优选是 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ 和最优选是 Rb^+ 或 Cs^+ 。

在优选的实施方案中，将本发明组合物溶解于溶剂或溶剂的混合物中以产生溶液，优选水溶液。或者该溶液是非水溶液。用于这样的非水溶液的适宜溶剂或溶剂混合物是或包含，例如 DMSO 或甲醇。在还一个实施方案中，该溶液包含溶剂，如 DMSO 和/或甲醇以及水的混合物。优选的溶剂是水。

在还一个实施方案中，所述溶液至少是 3 摩尔浓度，更优选至少 5 摩尔浓度和最优选至少 7 摩尔浓度的羧酸盐或磺酸盐或其混合物。

在依据本发明的组合物的还一个实施方案中，DNP 剂是稳定的氧基、硫基或碳基三苯甲基自由基和/或所述组合物包含顺磁性金属离子，优选原子序号 58-70 的镧系金属或原子序号 21-29、42 或 44 的过

渡金属的顺磁性金属离子。适宜地，顺磁性金属离子呈螯合的形式或呈盐的形式。

本发明的组合物可被用于动态核极化。

在本申请书的第 7-20 页中描述本发明的方法的定义和优选的实施方案，同样适用于以上描述的组合物。

本发明的再一方面是包含超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐或其混合物的组合物，其中所述超极化的羧酸盐或超极化的磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。

在优选的实施方案中，所述组合物包含超极化的羧酸盐，即某一羧酸盐或几个不同的羧酸盐，优选超极化的内源性羧酸盐和更优选在人体或非人动物体内的代谢过程中起作用的超极化的内源性羧酸盐。优选所述超极化的羧酸盐是富集 ^{13}C 的羧酸盐，优选是在羧基原子、羰基原子或季 C-原子富集 ^{13}C 的羧酸盐。

在另一个实施方案中，所述超极化的羧酸盐是超极化的、选自苹果酸盐、乙酸盐、反丁烯二酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、丙酮酸盐、碳酸氢盐、丙二酸盐、碳酸盐、丁二酸盐、草酰乙酸盐、 α -酮戊二酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐或异柠檬酸盐的羧酸盐。最优选的超极化的羧酸盐是超极化的、选自碳酸氢盐、反丁烯二酸盐、碳酸盐、乙酸盐、乳酸盐、2-氧代丁酸盐、2-氧代-5-甲基戊酸盐、 γ -羧基谷氨酸盐、吡啶-2,3-二羧酸盐和丙酮酸盐的羧酸盐。

优选地，无机阳离子是 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ ，优选是 K^+ 、 Rb^+ 或 Cs^+ 和更优选是 Rb^+ 或 Cs^+ 。

在另一个实施方案中，所述组合物还包含 DNP 剂和任选的顺磁性金属离子，并且通过动态核极化获得。

在还一个实施方案中，将包含超极化的羧酸盐或磺酸盐或其混合物的组合物溶解于一种或多种溶剂中，其中所述超极化的羧酸盐或磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。

优选地,所述溶剂是水性载体,更优选是生理上可耐受的和药理学上可接受的水性载体,如水、缓冲溶液或盐水,或非水溶剂。在另一个优选的实施方案中,所述溶剂是非水溶剂。如果使用多于一个溶剂,则所述溶剂可例如为 DMSO 或甲醇的混合物,或包含水性载体和非水溶剂的溶剂混合物,例如 DMSO 和水或甲醇和水的混合物。

在优选的实施方案中,将包含超极化的羧酸盐或磺酸盐或其混合物的组合物溶解于水性载体中,其中所述超极化的羧酸盐或磺酸盐含有选自 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的无机阳离子。在更优选的实施方案中,所述溶解的组合物被用作体内 MR 成像剂/化学位移剂。无机阳离子可任选被人或非人活体很好耐受的阳离子,例如葡甲胺或钠阳离子交换。

再就是,在本申请书的第 7-21 页中描述本发明的方法的定义和优选的实施方案,同样适用于以上描述的组合物。

实施例

实施例 1 制备装填铯的离子交换柱

用 1 柱体积的甲醇,随后用 1 柱体积的水漂洗 Varian Bond Elution SCX 色谱柱(60ml, 10 g, 8.7 meq)。让 1 柱体积的氯化铯水溶液(0.8 M, 48 mmol)缓慢通过该柱。第一部分洗出液是强酸性的(pH 0),但 pH 在离子交换过程中提高。最后几个毫升的洗出液的 pH 为 4-5。离子交换完成后,用 2 柱体积水漂洗该柱。

实施例 2 制备丙酮酸铯

将 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸钠(425 mg, 3.8 mmol)溶解于 20 ml 水中。让得到的溶液流经通过实施例 1 的湿柱。收集洗出液(第一洗出液)。用 20 ml 的水漂洗柱并收集漂洗过程中的洗出液,合并第一部分洗出液。使合并的洗出液冷冻干燥。获得总量为 0.9 g 的灰白色盐样丙酮酸铯。

分析:

^{133}Cs -NMR 分析: 将一次脉冲实验的积分与标准铯溶液进行比较,计算获得的丙酮酸铯的纯度为 97-98%。

^{23}Na -NMR 分析: 仅可探测到非常弱的钠信号

^1H -NMR 分析揭示水含量小于 1 摩尔/摩尔的丙酮酸盐。丙酮酸盐的甲基在 2.2 ppm 共振。除此之外, 在 1.3 ppm 的共振峰, 也在用于实施例 2 的市售丙酮酸钠溶液中存在, 并且在 1.4 ppm 和 3.0-3.2 ppm 出现次要峰。这些峰由丙酮酸盐(1.3 ppm)的水合物和对位丙酮酸盐(1.2 和 3.0-3.2 ppm)产生。制剂中的对位丙酮酸盐的量少于 4%。

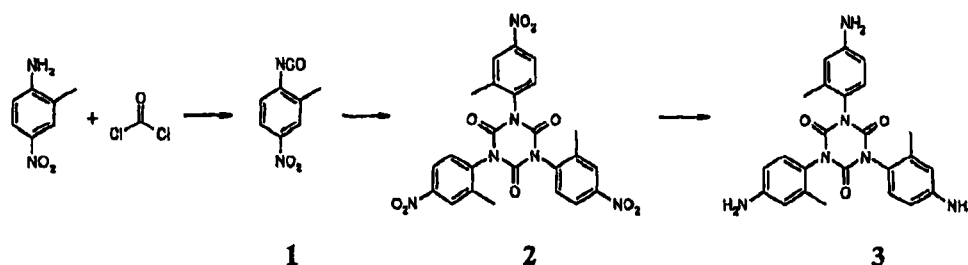
实施例 3 含丙酮酸铯和作为 DNP 剂的三苯甲基自由基的水溶液的动态核极化

将 $^{13}\text{C}_1$ -丙酮酸铯(99 mg, 0.45 mmol)溶解于 16 μl 水中。加入如在 WO-A-98/39277 的实施例 7 中描述制备的、于水(67.3 mM)中的 16 μl 的三苯甲基自由基三-(8-羧基-2,2,6,6-四(1-羟基乙基)苯并-[1,2-d:4,5d']双(1,3)二硫杂环戊烯(dithiole) 4-基)甲基钠盐溶液, 产生于三苯甲基自由基的 14.5 mM 的水溶液。从该溶液中转移出含 94 mg/95%的丙酮酸铯(因此为 7 摩尔浓度的丙酮酸盐)的 70 μl 至探头帽并插入 DNP 极化器中。于 DNP 条件下, 于 3.35 T 磁场中 1.2 K, 在微波辐照(93.950 GHz)下, 使冷冻的探头极化。2 小时后, 极化停止。

停止极化后, 将冷冻的探头溶解于含 100 mg/l EDTA 的 7 ml 水中, 并通过液态 ^{13}C -NMR, 于 400 MHz 测定超极化的丙酮酸铯中的 ^{13}C 核的液态极化为 15%。

实施例 4 1,3,5-三-(N-(DO3A-乙酰氨基)-N-甲基-4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮的 Gd-螯合物(10)的合成

4a) 2-甲基-4-硝基苯基异氰酸盐(1)的制备



将 2-甲基-4-硝基苯胺(35.0 g, 230 mmol)溶解于乙酸乙酯(400 ml)并冷却至 0 $^{\circ}\text{C}$ 。用 30 分钟逐滴加入碳酰氯(180 ml, 20%于甲苯中),

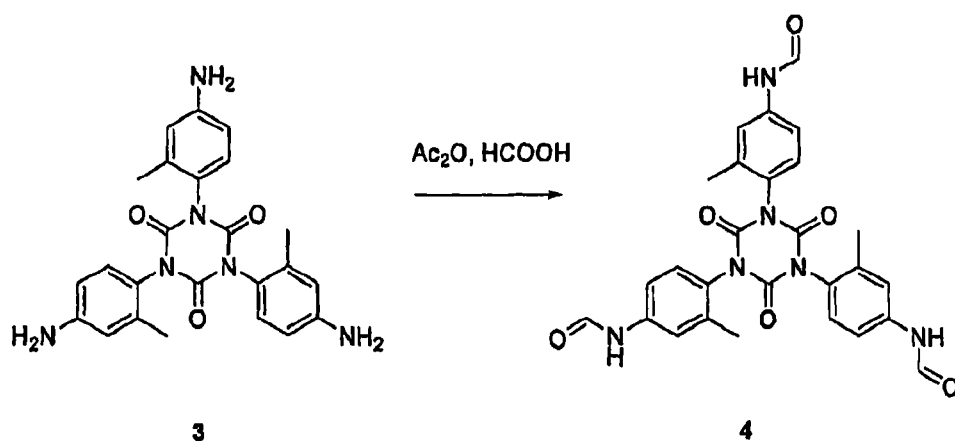
随后立即出现白色盐沉淀。在最后加入后，使温度缓慢回升至室温，然后将反应混合物回流(~ 100 °C)。回流 2 小时 30 分钟，此后在温度降至 80 °C 之前蒸馏出 200 ml 溶剂，并逐滴加入碳酰氯(140 ml, 20 % 于甲苯中)。在最后加入后，使反应溶液回流 3 小时，使之冷却至室温并浓缩至干。将棕色/黄色原料溶解于乙醚(250 ml)中，过滤和浓缩，得到浅棕色粉末(36 g, 88 %)。

4b) 1,3,5-三-(4-硝基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(2)的制备

向于 250 ml 烧瓶中的异氰酸 2-甲基-4-硝基苯基酯(36.0 g)中加入 DMSO (50 ml)，且用经塑料夹固定就位的玻璃塞将该烧瓶密封。立即将该烧瓶放入加热至 85 °C 的油浴中，并将深棕色反应溶液加热 16 小时 30 分钟。移开油浴并使反应溶液冷却至室温，然后将其倾入水(800 ml)中，超声处理，并滤去沉淀。将乙醇(500 ml)加至滤饼并回流 4 小时，然后使之冷却至室温，滤掉产物得到灰白色粉末(28.1 g, 78 %)。

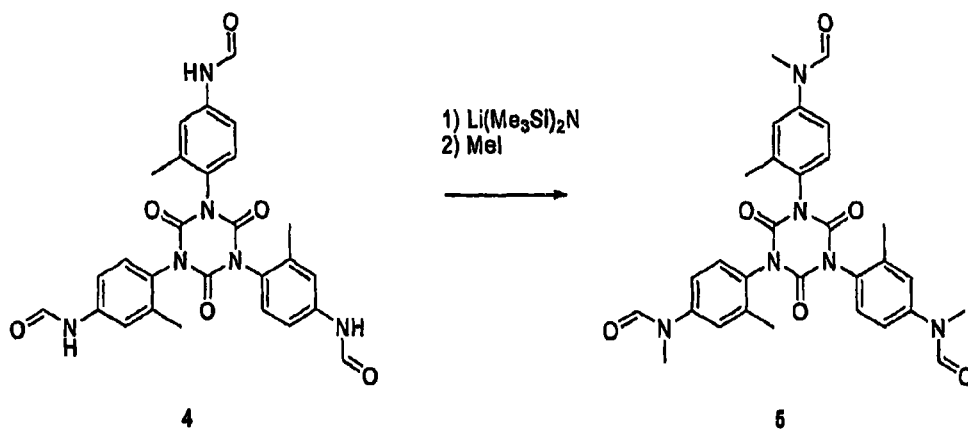
4c) 1,3,5-三-(4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(3)的制备

将 1,3,5-三-(4-硝基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(2.86 g, 5.4 mmol)溶解于 THF (70 ml)。加入 HCl (4.5 ml, 6 M)、水(18 ml)和 Pd/C (0.6 g, 10 %)。将反应容器抽真空并在 3 个周期中填充氩气，随后在帕尔氢化装置(Parr hydrogenation apparatus) (60 psi)上氢化。2 小时后，用隔膜泵抽去过量的氢并滤去 Pd/C (10 %)。将澄清的反应溶液浓缩直至不再残留 THF，用 NaHCO₃ (~ 3.7 g)将 pH 调节至 7。用乙酸乙酯(3 x 100 ml)提取水相，并用 MgSO₄ 干燥合并的有机相，过滤和浓缩得到棕色粉末。将该粗产物用甲醇再结晶得到灰白色粉末样产物(1.9 g, 80 %)。



4d) 1,3,5-三-(4-甲酰氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(4)的制备

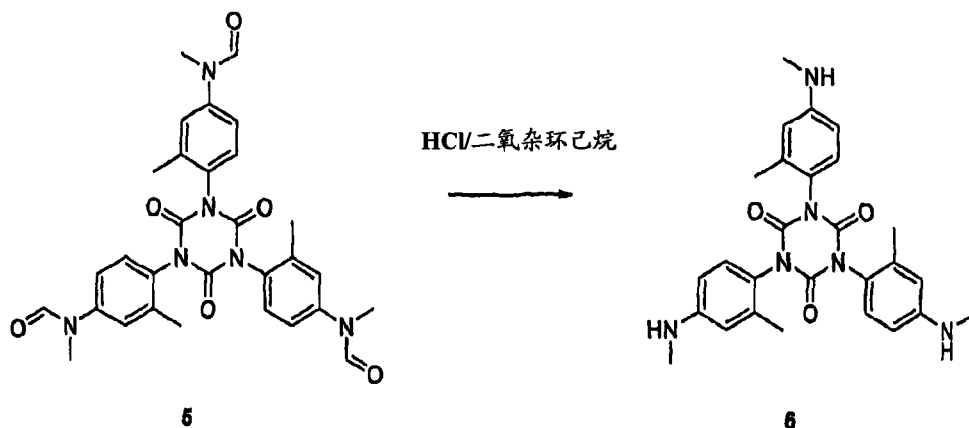
将甲酸(175 ml)放进冰冷的 500 ml 圆底烧瓶中。加入乙酐(15 ml, 0.16 mol)且将该黄色溶液于 0 °C、氩气氛下搅拌 1 小时。将三胺 3 (8.7 g, 0.020 mol)加至该溶液中并移去冰浴。室温、氩气氛下搅拌 30 分钟后, HPLC 显示完全反应。真空下去除溶剂, 将棕色、粘性残余物悬浮于 H₂O 中并滤去。然后用 H₂O 充分清洗保证去除所有的酸。产物为淡棕色固体(10.2 g, 99%)。



4e) 1,3,5-三-(N-甲酰-N-甲基-4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(5)的制备

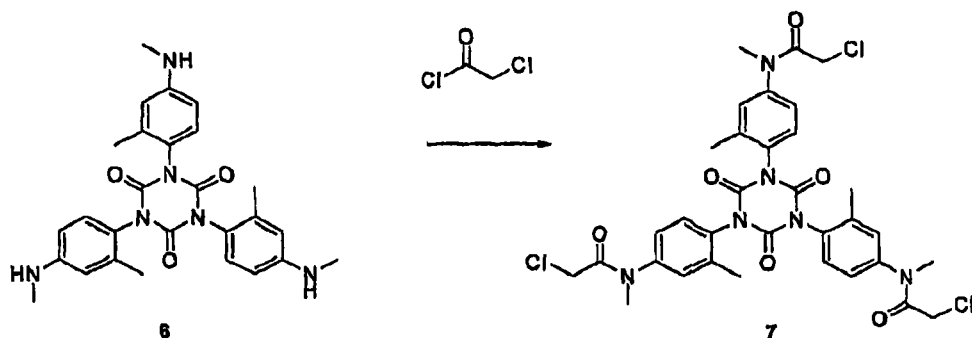
将所有玻璃器皿在烤箱中小心干燥并将 DMF 干燥通过 4Å 分子筛。将 Li(Me₃Si)₂N (116 ml, 0.116 mol, 1 M 于正己烷中)加至 500 ml

圆底烧瓶中的 **4** (10.2 g, 0.0193 mol) 的 DMF-溶液(115 ml)中。将由浅棕色溶液转变为砖红色浆液的反应混合物于氩气氛下搅拌 1 小时。加入碘甲烷(12.2 ml, 0.196 mol), 将反应混合物搅拌 2 小时或直至 HPLC 上可显示完全甲基化。然后在旋转蒸发器上去除正己烷, 并将残余物倾入剧烈搅拌下的 NaH_2PO_4 (1300ml, 100 mM) 溶液中。滤出形成的沉淀 **5**, 为灰白色固体(6.7 g, 60%)。



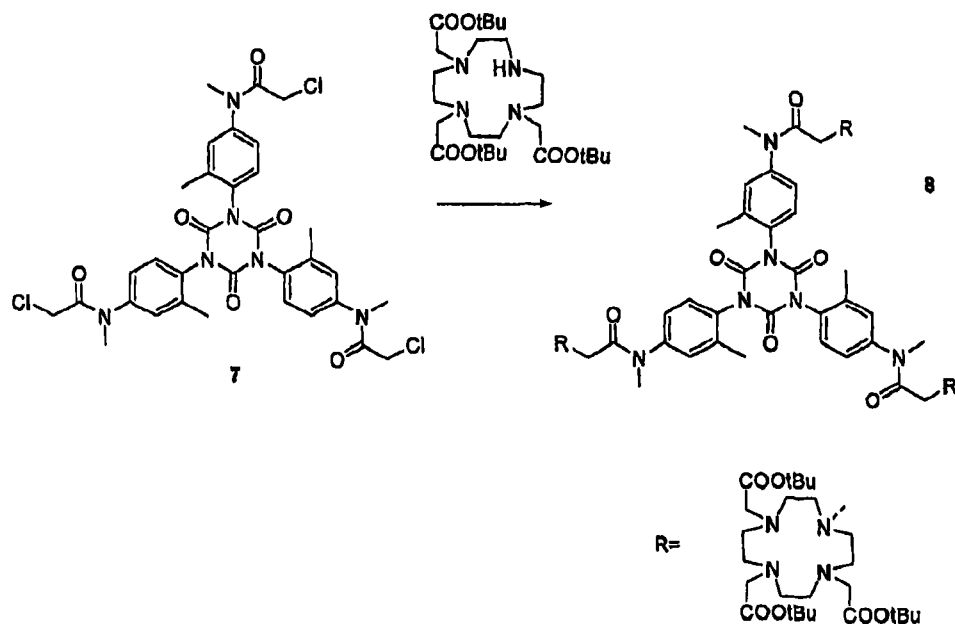
4f) 1,3,5-三-(N-甲基-4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(**6**)的制备

将二氧杂环己烷(52 ml)、HCl (52 ml, 6 M)和 **5** (6.5 g, 11 mmol) 于 250 ml 圆底烧瓶中混合以形成灰白色浆液。于氩气氛下将该反应混合物加热至回流 30 分钟。将此时的黄色溶液冷却至室温, 然后在旋转蒸发器上去除溶剂。然后将橙色残余物溶解于 500 ml H_2O 中, 并于剧烈搅拌下用 NaHCO_3 (饱和) 溶液中和。滤去形成的沉淀并用 H_2O 洗涤数次, 得到苍白色固体(4.7 g, 84%)。



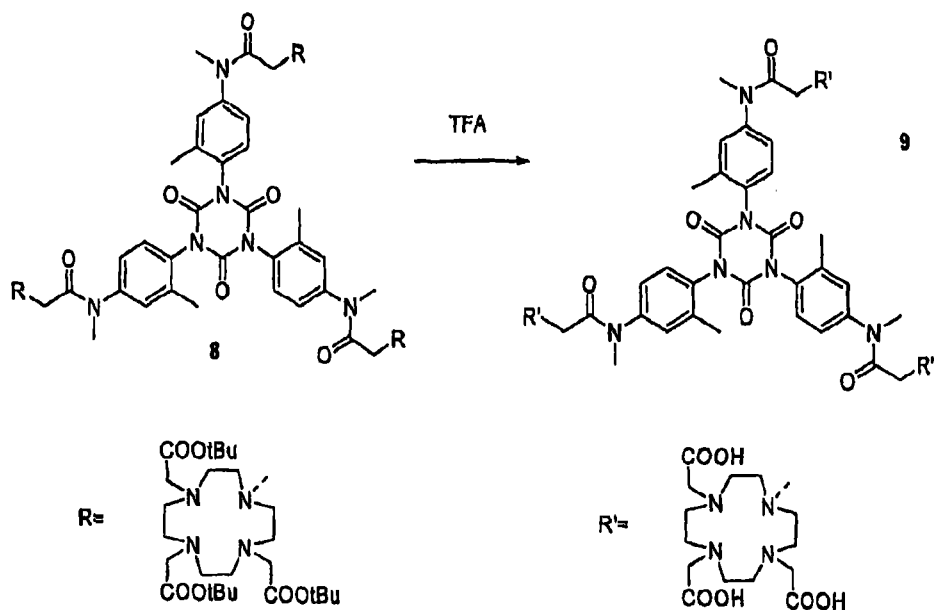
4g) 1,3,5-三-(N-氯乙酰-N-甲基-4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(7)的制备

在 100 ml 圆底烧瓶中, 将 6 (4.6 g, 9.5 mmol) 溶解于 DMA (15 ml) 并于 0 °C、搅拌下加入氯乙酰氯(2.6 ml, 33 mmol)。于 RT、氩气氛下搅拌反应物 30 分钟, 或直至 HPLC 上显示完全氯乙酰化。然后将该浆液倾入在剧烈机械搅拌下的、有水(500 ml)的大烧杯中。滤去形成的沉淀, 并在 0.3 mbar 下真空干燥(6.3 g)。将灰白色固体溶解于 70 ml 乙腈中, 并在剧烈机械搅拌下倾入 500 ml H₂O 中。滤出形成的沉淀并将其置于干燥器中干燥(6.1 g, 89%)。



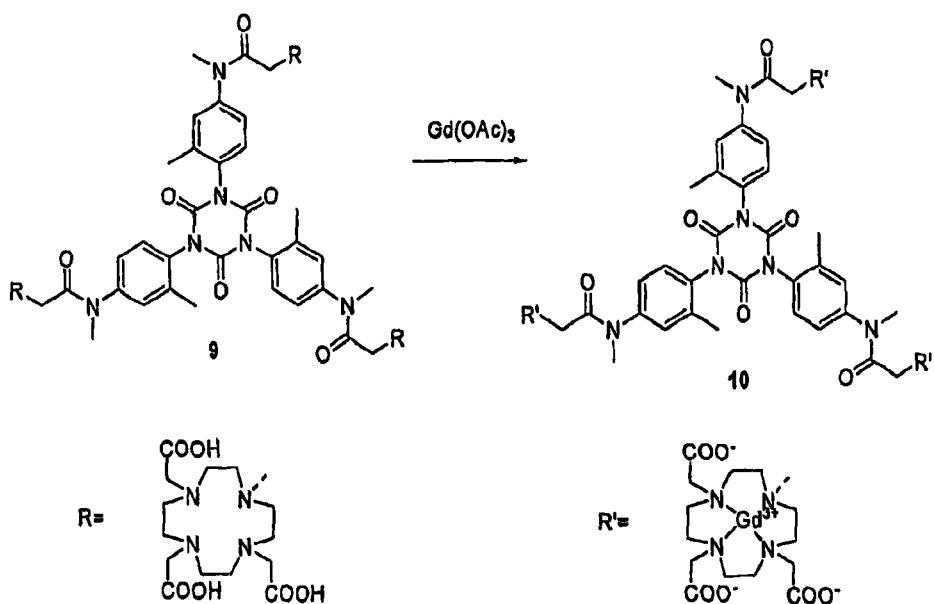
4h) 1,3,5-三-(N-(DO3A 叔丁酯-乙酰氨基)-N-甲基-4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(8)的制备

在 50 ml 圆底烧瓶中, 将 7 (0.50 g, 0.70 mmol) 与 DO3A 叔丁酯(2.5 g, 4.2 mmol)、二异丙基乙基胺(910 μ l, 5.2 mmol)和乙腈(15 ml)悬浮在一起。经超声处理后, 于 75 °C、氩气氛下搅拌该反应混合物直至 LC/MS 显示完全偶合。然后在旋转蒸发器上去除溶剂, 粗产物(2.9 g)用于后续反应。



4i) 1,3,5-三-(N-(DO3A-乙酰氨基)-N-甲基-4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮(9)的制备

将粗产物 **8** (1.9 g) 溶解于 TFA (130 ml) 和 CH_2Cl_2 (130 ml) 并于 50°C 、氩气氛下搅拌。搅拌溶液 1 小时或直至 LC/MS 显示完全去保护。然后在旋转蒸发器上去除溶剂，残余物于真空下干燥过夜。然后将粗产物 (2.4 g) 用于最后步骤。



4j) 1,3,5-三-(N-(DO3A-乙酰氨基)-N-甲基-4-氨基-2-甲基-苯基)-[1,3,5]三嗪烷-2,4,6-三酮的钆螯合物(10)的制备

搅拌下,将粗产物 9 (2.4 g)溶解于水并加入 $Gd(OAc)_3$ (1.4 g, 4.2 mmol)。然后抽真空(0.3 mbar),用 LC/MS 连续监测该反应。当检测到完全络合时,则真空去除溶剂。然后用制备型 HPLC 纯化 3.1 g 粗产物(410 mg, 42 %自 7)。

实施例 5 含丙酮酸铯、作为 DNP 剂的三苯甲基自由基和作为顺磁性金属离子的 Gd-螯合物的水溶液的动态核极化

制备如在实施例 3 中描述的含 Cs-丙酮酸盐和三苯甲基自由基的水溶液。向该溶液中加入 3 μ l 实施例 4 的 Gd-螯合物的水溶液。最终的水溶液为约 14 mM 浓度的三苯甲基自由基和约 0.7 mM 浓度的实施例 4 的 Gd-螯合物(2.1 mM Gd^{3+})。从该溶液中转移 65 μ l 至探头帽并插入 DNP 极化器中。于 DNP 条件下,于 3.35 T 磁场中 1.2 K,微波辐照(93.950 GHz)下,使冷冻的探头极化。2 小时后,极化停止。

已经停止极化后,将冷冻的探头溶解于含 100 mg/l EDTA 的 7 ml 水中,并通过液态 ^{13}C -NMR,于 400 MHz 测定超极化的丙酮酸铯中的 ^{13}C 核的液态极化为 24%。

实施例 6 含丙酮酸铯、作为 DNP 剂的三苯甲基自由基和作为顺磁性金属离子的 Gd-螯合物的水溶液的动态核极化以及铯的离子交换

如实施例 5 中描述的进行 DNP 和溶解。溶解后,将含超极化的丙酮酸铯的液体加压通入类似于实施例 1 已制备的、装填了钠的离子交换柱。放出最初 2 ml 洗出液。离子交换过程的总时间约为 4-5 秒。

通过液态 ^{13}C -NMR,于 400 MHz 测定超极化的丙酮酸钠中的 ^{13}C 核的液态极化为 17%。

实施例 7 含碳酸氢铯和作为 DNP 剂的三苯甲基自由基的水溶液的动态核极化

通过将如在 WO-A-97/09633 的实施例 29 描述制备的三-(8-羧基-2,2,6,6-四(羟基乙氧基)甲基苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫醇-4-基)甲基

钠盐溶液，溶解于 21 mg ^{13}C -碳酸氢铯于 5 μl 丙三醇和 8 μl 水的溶液中，制备 10 mM 浓度的三苯甲基自由基的溶液。通过旋涡、光加热和超声联合处理，使该溶液混合均匀，将该溶液置于探头帽并插入 DNP 极化器中。于 DNP 条件下，于 3.35 T 磁场中 1.2 K，微波辐照(93.890 GHz)下，使冷冻的探头极化。3 小时后，极化停止。

通过固态 ^{13}C -NMR 测定超极化的 ^{13}C -碳酸氢铯中的 ^{13}C 核的固态极化为 70 (积分/mmol ^{13}C)。

实施例 8 含碳酸氢铯、作为 DNP 剂的三苯甲基自由基和作为顺磁性金属离子的 Gd-螯合物的水溶液的动态核极化

依据实施例 7 制备溶液。向该溶液中加入实施例 4 的 Gd-螯合物，生成于实施例 4 的 0.7 mM 浓度的 Gd-螯合物(2.1 mM Gd^{3+})的溶液。通过旋涡、光加热和超声联合处理，使该溶液混合均匀，将该溶液置于探头帽并插入 DNP 极化器中。如实施例 7 中描述进行 DNP。

通过固态 ^{13}C -NMR 测定超极化的 ^{13}C -碳酸氢铯中的 ^{13}C 核的固态极化为 390 (积分/mmol ^{13}C)。

实施例 9 含碳酸氢铯、作为 DNP 剂的三苯甲基自由基和作为顺磁性金属离子的 Gd-螯合物的水溶液的动态核极化

通过将如在 WO-A-97/09633 的实施例 29 描述制备的三苯甲基自由基三-(8-羧基-2,2,6,6-四(羟基乙氧基)甲基苯并[1,2-d:4,5-d']双(1,3)二硫醇-4-基)甲基钠盐溶解于 0.205 mmol ^{13}C -碳酸氢铯于 12 μl 丙三醇和 16 μl 水的溶液中，制备 12 mM 浓度的三苯甲基自由基的溶液。向该溶液中加入实施例 4 的 Gd-螯合物，生成 0.2 mM 浓度的 Gd-螯合物(0.6 mM，于 Gd^{3+} 中)的溶液。通过旋涡、光加热和超声联合处理，使该溶液混合均匀，将该溶液置于探头帽并插入 DNP 极化器中。于 DNP 条件下，于 3.35 T 磁场中 1.2 K，微波辐照(93.890 GHz)下，使冷冻的探头极化。3 小时后，极化停止，并用依据 WO-A-02/37132 的溶解装置将冷冻的溶液溶解于水溶液中。得到 10 mM 的超极化的 ^{13}C -碳酸氢铯溶液。

通过液态 ^{13}C -NMR, 于 400 MHz 测定超极化的碳酸氢铯中的 ^{13}C 核的液态极化为 18%。