

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-514313

(P2011-514313A)

(43) 公表日 平成23年5月6日 (2011.5.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 C	4 C 0 8 5
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 B 5/05 3 8 3	4 C 0 9 6
G O 1 R 33/28 (2006.01)	G O 1 N 24/02 B	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2010-544727 (P2010-544727)	(71) 出願人	305040710 ジーイー・ヘルスケア・リミテッド イギリス国エイチビー7・9エヌエイ、バ ッキンガムシャー、リトル・チャルフォン ト、アメルシャム・プレイス
(86) (22) 出願日	平成21年2月3日 (2009.2.3)	(74) 代理人	100137545 弁理士 荒川 聡志
(85) 翻訳文提出日	平成22年7月29日 (2010.7.29)	(74) 代理人	100105588 弁理士 小倉 博
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/051172	(74) 代理人	100129779 弁理士 黒川 俊久
(87) 国際公開番号	W02009/098191	(72) 発明者	レルシュ、マチルド・エイチ デンマーク、ディーケー-1903・フレ ドリクスベルグ・シー、1、サンクト・ク ヌッツ・ヴェジ、24番
(87) 国際公開日	平成21年8月13日 (2009.8.13)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	08002001.9		
(32) 優先日	平成20年2月4日 (2008.2.4)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 過分極アミノ酸及びアミノスルホン酸の製造方法

(57) 【要約】

本発明は、過分極アミノ酸及びアミノスルホン酸を製造する動的核分極 (DNP) 法、並びにその方法に使用する組成物に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料、DNP 剤及び任意には常磁性金属イオンを含み、試料が、アミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩、アミノスルホン酸のスルホン酸塩又はそれらの混合物である、組成物。

【請求項 2】

試料が、アミノ酸のアンモニウム塩若しくはアミノ酸のカルボン酸塩又はそれらの混合物である、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

アミノ酸のアンモニウム塩若しくはアミノスルホン酸のアンモニウム塩は、塩化アンモニウム塩であり及び／又はアミノ酸のカルボン酸塩若しくはアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、カルボン酸ナトリウム塩若しくはスルホン酸ナトリウム塩である、請求項 1 又は請求項 2 記載の組成物。

10

【請求項 4】

試料は、MR 活性核の同位体が濃縮され、好ましくは ^{13}C 及び／又は ^{15}N の同位体が濃縮されている、請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 5】

溶媒若しくは溶媒混合物及び／又はガラス形成剤をさらに含む、請求項 1 乃至請求項 4 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 6】

DNP 剤が、安定な酸素系、硫黄系又は炭素系のトリチルラジカルである、請求項 1 乃至請求項 5 のいずれか 1 項記載の組成物。

20

【請求項 7】

常磁性金属イオンを含む、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 8】

動的核分極により過分極アミノ酸又は過分極アミノスルホン酸の製造方法に使用するための、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 9】

試料が過分極試料である、請求項 1 乃至請求項 8 のいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 10】

過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物。

30

【請求項 11】

MR 活性核の同位体が濃縮され、好ましくは ^{13}C 及び／又は ^{15}N の同位体が濃縮されている、請求項 10 記載の過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物。

【請求項 12】

動的核分極により得られる、請求項 10 又は請求項 11 記載の過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物。

【請求項 13】

インビトロ又はインビボ MR 検出用の造影媒体に使用するための、請求項 10 乃至請求項 12 のいずれか 1 項記載の過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物。

40

【請求項 14】

請求項 10 乃至請求項 12 のいずれか 1 項記載の過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物と、細胞又は組織のインビトロアッセイに適合し、そのアッセイに使用される溶媒、好ましくは水性担体、さらに好ましくは水又は DMSO 若しくはメタノール、或いは水性担体及び非水性溶媒を含んだ溶媒混合物とを含む、インビトロ MR 検出用の造影媒体。

【請求項 15】

請求項 10 乃至請求項 12 のいずれか 1 項記載の過分極アミノ酸若しくは過分極アミノス

50

ルホン酸又はそれらの混合物と、水性担体、好ましくは生理的に許容され、医薬として受容される水性担体、さらに好ましくは水、緩衝液又は塩水とを含む、インビボMR検出用の造影媒体。

【請求項16】

請求項10乃至請求項12のいずれか1項記載の過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物の製造方法であって、

a) 試料、DNP剤及び任意には常磁性金属イオンを含む溶液を調製する段階であって、試料が、アミノ酸のアモニウム塩、アミノスルホン酸のアモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩、アミノスルホン酸のスルホン酸塩又はそれらの混合物である段階、

b) 溶液を凍結する段階、

c) 凍結溶液に対して動的核分極を実施し、過分極試料を含む凍結溶液を得る段階、

d) 任意には段階c) で得られた凍結溶液を液化し、中和する段階

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、過分極アミノ酸及びアミノスルホン酸を製造する動的核分極(DNP)法、並びにその方法に使用する組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

磁気共鳴(MR)画像法(MRI)は、非侵襲的に、しかもX線などの潜在的に有害な放射線に患者及び医療従事者を曝すことなく、患者の身体又はその部分の画像を得ることができるので、医者にとって特に魅力的になった技術である。高品質の画像及び空間的にも時間的にも良好な分解能のために、MRIは、軟質の組織及び器官を映像化する好ましいイメージング技術である。

【0003】

MRIは、MR造影剤を用いて又は用いずに実施し得る。しかし、コントラスト強調MRIは、普通、遥かに小さい組織変化の検出を可能にし、そのため、例えば小さな腫瘍又は転移のような初期組織変化を検出する強力な手段となる。

【0004】

数種類の造影剤が、MRIにおいて使用されてきた。水溶性の常磁性金属キレート、例えば、Omniscan(商標)(GE Healthcare)のようなガドリニウムキレートは、汎用されているMR造影剤である。分子量が低いために、そうした造影剤は、血管系内に投与した際、細胞外空間(即ち、血液及び間質)中に迅速に分布する。それらは、体内から比較的迅速に除去もされる。

【0005】

他方、血液プールMR造影剤、例えば超常磁性の酸化鉄粒子は、血管系内に長期間保持される。造影剤は、肝臓内のコントラストを強調するだけでなく、毛細血管の透過性異常、例えば、腫瘍の血管形成で生じる腫瘍内の「漏出性」毛細血管壁を検出するためにも、極めて有用であることが分かった。

【0006】

上述の造影剤の議論の余地ない優れた性質にも関わらず、その使用に全く危険性がないわけではない。常磁性金属キレートは、普通高い安定度定数を有するが、投与後に有毒な金属イオンが体内に放出されることは可能である。さらに、この種の造影剤は低い特異性を示す。

【0007】

国際公開第99/35508号は、MRI造影剤として高T₁剤の過分極溶液を用いた患者のMR検査法を開示している。用語「過分極」とは、高T₁剤中に存在するNMR活性核、即ち核スピンの0でない核、好ましくは¹³C又は¹⁵N核の核分極を増強することを意味する。NMR活性核の核分極を増強した際、こうした核の励起及び基底核スピン状態

10

20

30

40

50

間の母集団差が有意に増加し、その結果MRシグナル強度が、百倍以上増幅される。過分極 ^{13}C 及び／又は ^{15}N 濃縮高 T_1 剤を用いた場合、 ^{13}C 及び／又は ^{15}N の天然存在度が無視できるので、バックグラウンドシグナルによる妨害は本質的になく、したがって画像コントラストは、有利なことに高くなろう。従来のMRI造影剤とこれらの過分極高 T_1 剤との主要な相違は、前者ではコントラストの変化が、体内の水プロトンの緩和時間に影響することにより起こるのに対して、後者の部類の薬剤は、得られるシグナルが薬剤だけから生じるので、非放射性トレーサーと見なすことができることである。

【0008】

MR造影剤として使用が可能な各種の高 T_1 剤が、非内因性及び内因性化合物を含め、国際公開第99/35508号に開示されている。後者の例として、代謝活性の映像化に好ましいと言われている、正常な代謝サイクルの中間体が挙げられている。代謝活性のインビボ映像化により、組織の代謝状態に関する情報を取得し、情報を、例えば、健常組織と疾患組織との識別に使用し得る。

【0009】

例えば、ピルビン酸塩は、クエン酸サイクルにおいて役割を果たす化合物であり、過分極 ^{13}C －ピルビン酸塩のその代謝産物である過分極 ^{13}C －乳酸塩、過分極 ^{13}C －重炭酸塩及び過分極 ^{13}C －アラニンへの変換は、人体における代謝過程のインビボMR研究に使用することができる。

【0010】

過分極 ^{13}C －ピルビン酸塩のその代謝産物である過分極 ^{13}C －乳酸塩、過分極 ^{13}C －重炭酸塩及び過分極 ^{13}C －アラニンへの代謝変換は、親化合物、即ち $^{13}\text{C}_1$ －ピルビン酸塩及びその代謝産物からシグナル検出を可能にするのに十分に速いことが判明したので、人体における代謝過程のインビボMR研究に使用することができる。アラニン、重炭酸塩及び乳酸塩の量は、検査している組織の代謝状態に依存する。過分極 ^{13}C －乳酸塩、過分極 ^{13}C －重炭酸塩及び過分極 ^{13}C －アラニンのMRシグナル強度は、これらの化合物の量及び検出時に残った分極度に関係しており、そのため過分極 ^{13}C －ピルビン酸塩の過分極 ^{13}C －乳酸塩、過分極 ^{13}C －重炭酸塩及び過分極 ^{13}C －アラニンへの変換をモニターすることにより、人体内又は人間外動物体内のインビボ代謝過程を、非侵襲的なMR画像法及び／又はMR分光法を用いて研究することが可能である。

【0011】

異なるピルビン酸塩代謝産物から生じるMRシグナル振幅は、組織型に応じて変化する。アラニン、乳酸塩、重炭酸塩及びピルビン酸塩により形成される独特な代謝ピークパターンは、検査している組織の代謝状態の指紋として使用することができる。

【0012】

過分極 ^{13}C －ピルビン酸塩は、例えば、国際公開第2006/054903号に詳細に記載されているように、心筋組織の生存性をMR画像法により評価するため及び国際公開第2006/011810号に詳細に記載されているように、インビボで腫瘍を映像化するためのMR造影剤として使用し得る。

【0013】

しかし、インビボ造影剤として適切な過分極 ^{13}C －ピルビン酸塩の製造には、難題がないわけではない。過分極 ^{13}C －ピルビン酸塩は、 ^{13}C －ピルビン酸又は ^{13}C －ピルビン酸の塩いずれかの動的核分極(DNP)により得るのが好ましく、これについては、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2006/011809号に詳細に記載されている通りである。

【0014】

^{13}C －ピルビン酸の使用は、それが凍結／冷却した際に結晶化しない(結晶化は、動的核分極がほとんど又は全く起こらない)ので、分極プロセスを簡潔にする。その結果、溶媒及び／又はガラス形成剤が、DNPプロセス用組成物の調製に不要であり、したがって高濃度の ^{13}C －ピルビン酸試料を使用することができる。しかし、pHが低いために、強酸中で安定なDNP剤を使用する必要がある。さらに、分極後の固体過分極 ^{13}C －ピルビ

10

20

30

40

50

ン酸を溶解し、過分極 ^{13}C ーピルビン酸塩に変換するために、強塩基が必要である。強ピルビン酸及び強塩基の双方は、こうした化合物が接触する材料（例えば、溶解媒体貯液槽、チューブ等）の慎重な選択を必要とする。

【0015】

或いは、 ^{13}C ーピルビン酸の塩をDNPプロセスに使用してもよい。遺憾ながら、 ^{13}C ーピルビン酸ナトリウムは、凍結／冷却した際に結晶化するため、ガラス形成剤の添加が必要になる。過分極 ^{13}C ーピルビン酸塩をインビボ造影剤として使用するつもりであれば、そのピルビン酸塩及びガラス形成剤を含有する組製物のピルビン酸塩濃度は、不利なほどに低い。その上、ガラス形成剤をインビボ使用のために除去することも必要になり得る。

10

【0016】

したがって、DNPに使用し得る好ましい塩は、PCT／NO第07／00109号に詳細に記載されているように、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 及び Ba^{2+} 、好ましくは NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 又は Cs^+ 、さらに好ましくは K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、最も好ましくは Cs^+ からなる群の無機陽イオンを含む ^{13}C ーピルビン酸塩である。これらの塩の大部分は、市販されておらず、個別に合成する必要がある。さらに、過分極 ^{13}C ーピルビン酸塩をインビボMR画像法に使用する場合、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 及び Ba^{2+} からなる群の無機陽イオンを、 Na^+ 又はメグルミンのような生理的に非常に良く許容される陽イオンに交換することが好ましい。そのため、追加の段階が、固体過分極 ^{13}C ーピルビン酸塩の溶解後に必要となるが、その間に分極が崩壊する。

20

【0017】

他の好ましい塩は、国際公開第2007／069909号に詳細に記載されているように、有機アミン又はアミノ化合物の ^{13}C ーピルビン酸塩、好ましくは $\text{TRIS-}^{13}\text{C}_1$ ーピルビン酸塩又はメグルミン $^{13}\text{C}_1$ ーピルビン酸塩である。これらの塩は、やはり個別に合成する必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

したがって、代謝活性に関する情報を得るために使用できる、代替的な過分極造影剤の必要性が存在する。

30

【0019】

タンパク質代謝においては、タンパク質は、プロテアーゼ酵素により分解されて構成アミノ酸になる。これらのアミノ酸は、細胞内に取り込まれ、クエン酸サイクル中に集められることにより、エネルギー源になり得る。さらに、アミノ酸は、体内の数種の代謝経路中で使用されて、他の（非標準的）アミノ酸、例えば、尿素サイクル中のシトルリンのようなアミノ酸又は他の各種化合物、例えば、チロシンからカテコールアミン、トリプトファンからナイアシンのようなビタミン、若しくはグリシンからポルフィリンを生合成する。したがって、アミノ酸は重要な代謝マーカーであり、過分極アミノ酸は、代謝活性に関する情報を得るための有用な薬剤になり得る。

【課題を解決するための手段】

40

【0020】

今回、本発明者らは、動的核分極（DNP）による過分極アミノ酸の製造方法を見出した。本方法を用いて、過分極アミノ酸の高濃度試料を得ることができる。これは、インビボMR検出、例えばMR画像法又はMR分光法又はMR分光画像法用に、薬剤として使用することを意図した過分極アミノ酸を、高濃度で患者に投与する必要がある、即ち、高濃度試料が、この分極法において使用されなければならないので重要である。さらに、本発明の方法により得られるアミノ酸は、高度に分極している、即ち、高い分極度を示す。

【0021】

過分極造影剤のシグナルは、緩和及び（患者の体に投与した際の）希釈のために崩壊することを強調しなければならない。したがって、分極度が高いほど、薬剤が患者体内の標

50

的部位に達した際に、それから得ることのできるMRシグナルが高くなる。

【発明を実施するための形態】

【0022】

したがって第1の態様において、本発明は、過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物の製造方法であって、

a) 試料、DNP剤及び任意には常磁性金属イオンを含む溶液を調製する段階であって、試料が、アミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩、アミノスルホン酸のスルホン酸塩又はそれらの混合物である段階、

b) 溶液を凍結する段階、

c) 凍結溶液に対して動的核分極を実施し、過分極試料を含む凍結溶液を得る段階、

d) 任意には段階c)で得られた凍結溶液を液化し、中和する段階を含む方法を提供する。

10

【0023】

本発明の方法により得られる過分極アミノ酸及び／又はアミノスルホン酸は、MR検出法において使用し得る。用語「MR検出」とは、インビトロ及びインビボMR検出を指し、インビトロでの固体又は液体NMR分光法、MR画像法若しくはMR分光法又はMR画像法とMR分光法との組合せ、即ちMR分光画像法を示す。この用語は、様々な時点でのMR分光画像化も示す。

【0024】

用語「過分極」及び「分極」は、以後で互換的に使用され、0.1%を超える、さらに好ましくは1%を超える、最も好ましくは10%を超える核分極を示す。

20

【0025】

分極度は、例えば、凍結した過分極試料におけるNMR核の固体NMR測定により決定し得る。例えば、過分極試料のNMR活性核が ^{13}C であれば、固体 ^{13}C -NMR測定が実施される。固体 ^{13}C -NMR測定は、低フリップ角を用いた単純なパルス収集NMRシーケンスからなるのが好ましい。 ^{13}C -NMRスペクトルにおける過分極試料のシグナル強度は、DNP分極プロセスの前に収集した ^{13}C -NMRスペクトルにおけるその試料のシグナル強度と比較する。次いで、分極前後のシグナル強度の比率から分極度を計算する。

【0026】

同様にして、液体過分極試料の分極度は、液体過分極試料におけるNMR活性核の液体NMR測定により決定し得る。やはり、液体過分極試料のシグナル強度は、分極前のその液体試料のシグナル強度と比較する。次いで、分極前後のシグナル強度の比率から分極度を計算する。

30

【0027】

用語「試料」とは、アミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩、アミノスルホン酸のスルホン酸塩又はそれらの混合物を示す。

【0028】

本発明に関する用語「アミノ酸」とは、1以上のアミノ基及び1以上のカルボキシ基を含む化学物質を示す。1以上のアミノ基は、一級アミノ基、二級アミノ基又は三級アミノ基でもよい。本発明によるアミノ酸の一例は、1つのアミノ基及び1つのカルボキシ基を含む化学物質である。一実施形態では、1つのアミノ基及び1つのカルボキシ基は、同一の炭素原子に付いており、例としては、標準又はタンパク質原性のアミノ酸のような α -アミノ酸、例えばアラニン、グリシン、ロイシン、メチオニン又はシステインである。D及びL異性体は共に、本発明の方法において使用することができる。この実施形態の更なる例は、サルコシン(N-メチルグリシン)、ホモシステイン又はベタイン(トリメチルグリシン)のような非標準的アミノ酸である。別の実施形態では、1つのアミノ基及び1つのカルボキシ基は、異なる炭素原子に付いており、この実施形態の例としては、GABA(γ -アミノ酪酸)又はアミノレブリン酸である。さらに別の実施形態では、本発明の方法において使用されるアミノ酸は、2以上のアミノ基及び／又は2以上のカルボキシ基を含む。例としては、アルギニン、リシン、アスパラギン、オルニチン、グルタミン、シ

40

50

トルリン、クレアチン、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアルギニノコハク酸である。

【0029】

本発明に関する用語「アミノスルホン酸」とは、1以上のアミノ基及び1以上のスルホ基、即ち $-S(O)_2OH$ 基を含む化学物質を示す。1以上のアミノ基は、一級アミノ基、二級アミノ基又は三級アミノ基でもよい。アミノスルホン酸の例は、1-ピペリジンスルホン酸、N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸、1,4-ピペラジンビスエタンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸又はタウリン(2-アミノエタンスルホン酸)である。

【0030】

用語「アミノ酸のアンモニウム塩」及び「アミノスルホン酸のアンモニウム塩」とは、アミノ酸のアンモニウムイオン又はアミノスルホン酸のアンモニウムイオンを、陽イオンとして含む塩を示す。例えば、本発明の方法を用いて過分極アラニンを製造する場合、段階a)において、アラニンのアンモニウム塩を含む溶液を調製し得るが、アンモニウム塩は、陽イオンとしてアラニニウム、即ち $H_3N^+-C(CH_3)(H)-COOH$ を含む。さらに、例えば、本発明の方法を用いて過分極タウリンを製造する場合、段階a)において、タウリンのアンモニウム塩を含む溶液を調製し得るが、アンモニウム塩は、陽イオンとしてタウリニウム、即ち $H_3N^+-CH_2-CH_2-S(O)_2-OH$ を含む。

【0031】

用語「アミノ酸のカルボン酸塩」とは、陰イオンとしてアミノ酸のカルボキシレートを含む塩を示す。用語「アミノスルホン酸のスルホネート」とは、陰イオンとしてアミノ酸のスルホネートを含む塩を示す。例えば、本発明の方法を用いて過分極アラニン、即ち2-アミノプロパン酸を製造する場合、段階a)において、アラニンのカルボン酸塩を含む溶液を調製し得るが、カルボン酸塩は、陰イオンとして2-アミノプロパノエートを含む。例えば、本発明の方法を用いて過分極タウリン、即ち2-アミノエタンスルホン酸を製造する場合、段階a)において、タウリンのスルホン酸塩を含む溶液を調製し得るが、スルホン酸塩は、陰イオンとして2-アミノエタンスルホネートを含む。

【0032】

用語「アミノ酸のアンモニウム塩」、「アミノスルホン酸のアンモニウム塩」、「アミノ酸のカルボン酸塩」及び「アミノスルホン酸のスルホン酸塩」は、単数形で書いているが、単一の化学物質又は異なる数種の化学物質を示す。したがって、単一の化学物質は、例えば、ある種のアミノ酸のアンモニウム塩若しくはカルボン酸塩又はある種のアミノスルホン酸のアンモニウム塩若しくはスルホン酸塩である。異なる数種の化学物質は、例えば、異なる数種のアミノ酸のアンモニウム塩若しくはカルボン酸塩又は異なる数種のアミノスルホン酸のアンモニウム塩若しくはスルホン酸塩である。これは、アミノ酸について次の段落に例示しているが、アミノスルホン酸にも同様に当てはまる。

【0033】

したがって、一例としてアラニンがある種のアミノ酸であり、本発明の方法を用いて過分極アラニンを、段階a)において、アラニンのアンモニウム塩又はアラニンのカルボン酸塩を含む溶液を調製することにより、製造することができる。ある種のアミノ酸の別の例はGABAであり、本発明の方法を用いて過分極GABAを、段階a)において、GABAのアンモニウム塩又はGABAのカルボキシレートを含む溶液を調製することにより、製造することができる。更なる例としてアラニン及びGABAが異なる数種のアミノ酸であり、本発明の方法を用いて過分極アラニン及び過分極GABAの混合物を、GABAのアンモニウム塩及びアラニンのアンモニウム塩又はGABAのカルボン酸塩及びアラニンのカルボン酸塩を含む溶液を調製することにより、製造することができる。

【0034】

上記の定義に沿って、用語「又はそれらの混合物」とは、ある種のアミノ酸又は異なる数種のアミノ酸のアンモニウム塩若しくはカルボン酸塩と、ある種のアミノスルホン酸又は異なる数種のアミノスルホン酸のアンモニウム塩若しくはスルホン酸塩との混合物を示す。これは、次の段落で例示する。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明に関する混合物は、例えば以下の通りである。

- i) アラニンのアンモニウム塩とタウリンのアンモニウム塩との混合物。
- i i) アラニンのアンモニウム塩と、G A B Aのアンモニウム塩と、タウリンのアンモニウム塩と、1-ピペリジンスルホン酸のアンモニウム塩との混合物。
- i i i) アラニンのカルボン酸塩とタウリンのカルボン酸塩との混合物。
- i v) アラニンのカルボン酸塩と、G A B Aのカルボン酸塩と、タウリンのカルボン酸塩と、1-ピペリジンスルホン酸のカルボン酸塩との混合物。
- v) アラニンのアンモニウム塩とタウリンのアンモニウム塩との混合物。
- v i) アラニンのカルボン酸塩とタウリンのアンモニウム塩との混合物。
- v i i) アラニンのアンモニウム塩と、G A B Aのカルボン酸塩と、タウリンのアンモニウム塩と、1-ピペリジンスルホン酸のカルボン酸塩との混合物。
- v i i i) アラニンのカルボン酸塩と、G A B Aのアンモニウム塩と、タウリンのカルボン酸塩と、1-ピペリジンスルホン酸のアンモニウム塩との混合物。

10

【0036】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、過分極アミノ酸若しくは数種の過分極アミノ酸の混合物又は過分極アミノスルホン酸若しくは数種の過分極アミノスルホン酸の混合物を製造するために使用される。

【0037】

さらに好ましい実施形態では、本発明の方法は、過分極アミノ酸又は過分極アミノスルホン酸を製造するために使用される。

20

【0038】

好ましくは、本発明の方法は、過分極アミノ酸、さらに好ましくは過分極 α -アミノ酸を製造するために使用される。

【0039】

本発明の方法で使用されるアミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩は、市販の化合物である、例えば、多くの α -アミノ酸がHCl塩又はHBr塩として市販されている。或いは、本発明の方法で使用されるアミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩は、アミノ酸又はアミノスルホン酸をある酸と反応させることにより、一般に得ることができる。原理的には、アミノ酸のカルボキシル基又はアミノスルホン酸のスルホ基よりpKaが低い任意の酸を使用して、これらの化合物をアンモニウム塩に変換することができる。アミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩の溶解性は、これらのアンモニウム塩を得るために使用する酸の対イオンが、大きい及び／又は親油性である場合、抑制される恐れがある。好ましい酸は、強酸であり、さらに好ましい酸は、塩酸(HCl)、臭化水素酸(HBr)、ヨウ化水素酸(HI)又は硫酸(H₂SO₄)のような無機強酸である。最も好ましい酸は、安価で入手容易なためHClである。アミノ酸又はアミノスルホン酸をHClと反応させることにより、塩化物が人体又は人間外動物体に良く許容されるため、インビボMRに好ましく使用される塩化アンモニウム塩が得られる。しかし、何らかの理由で許容度が低い陰イオンを使用する場合、陰イオンを、本発明の方法の段階d)後又はそれと同時に、当技術分野で公知の方法、例えば陰イオン交換カラムの使用により、塩化物のような生理的に良好に許容される陰イオンで交換してもよい。このような一理由は、より高い濃度及び／又はより高い分極度の試料が、アンモニウム塩の調製のために特定の酸を使用することで得ることができることと思われる。一例として、HIの使用により非常に高濃度の試料を得ることができるが、生理的な許容度となると、ヨウ化物は好ましい陰イオンではない。そのため、ヨウ化物を、生理的な許容度のより良好な陰イオン、例えば塩化物で交換してもよい。

30

40

【0040】

本発明の方法において、アミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩が市販化合物でない場合、それを調製し、単離してもよいし、或いは得られたアンモニウム塩を単離せずにその場で調製してもよい。段階a)の溶液を調製する前にアンモニ

50

ウム塩を単離する利点は、単離塩の特性を決定でき、実際にアンモニウム塩に変換されたアミノ酸／アミノスルホン酸の量を求められることである。さらに、段階 a) の溶液を調製するために、アンモニウム塩を調製するための溶媒以外の溶媒を使用する場合も、アンモニウム塩を単離することが好ましい。

【0041】

本発明の方法で使用されるアミノ酸のカルボン酸塩又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、アミノ酸又はアミノスルホン酸を塩基と反応させることにより、一般に得ることができる。原理的には、アミノ酸又はアミノスルホン酸のアミノ基より強い塩基である任意の塩基を使用して、これらの化合物を各々のカルボン酸塩及びスルホン酸塩に変換することができる。カルボン酸塩又はスルホン酸塩の溶解性は、これらのカルボン酸塩又はスルホン酸塩を得るために使用する酸の対イオンが、大きい及び／又は親油性である場合、抑制される恐れがやはりある。好ましい塩基は、無機塩基、さらに好ましい塩基は、水酸化ナトリウム (NaOH)、水酸化カリウム (KOH)、水酸化セシウム (CsOH)、水酸化カルシウム ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 又は水酸化ストロンチウム ($\text{Sr}(\text{OH})_2$) の水溶液のようなアルカリ金属又はアルカリ土類金属水酸化物の水溶液である。最も好ましい塩基は、安価で容易に入手できるため NaOH である。アミノ酸又はアミノスルホン酸を NaOH と反応させることにより、ナトリウム陽イオンが人体又は人間外動物体に良く許容されるため、インビボ MR に好ましく使用されるカルボン酸ナトリウム又はスルホン酸ナトリウムが得られる。しかし、何らかの理由で許容度が低い陽イオンを使用する場合、陽イオンを、本発明の方法の段階 d) 後又はそれと同時に、陽イオン交換カラムの使用のような当技術分野で公知の方法により、 Na^+ 又はメグルミンのような生理的に非常に良好に許容される陽イオンで交換してもよい。このような一理由は、より高い濃度の試料及び／又は分極度が、カルボン酸塩又はスルホン酸塩の調製のために特定の塩基を使用することで得ることができることと思われる。

【0042】

本発明の方法において、アミノ酸のカルボン酸塩又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、調製し、単離してもよいし、或いは得られたカルボン酸塩／スルホン酸塩を単離せずにその場で調製してもよい。段階 a) の溶液を調製する前にその塩を単離する利点は、単離塩の特性を決定でき、実際にカルボン酸塩／スルホン酸塩に変換されたアミノ酸／アミノスルホン酸の量を求められることである。さらに、段階 a) の溶液を調製するために、カルボン酸塩／スルホン酸塩を調製するための溶媒以外の溶媒を使用する場合も、カルボン酸塩／スルホン酸塩を単離することが好ましい。

【0043】

本発明の方法で使用されるアミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩及びアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、 ^{13}C 及び／又は ^{15}N のような MR 活性核の同位体を濃縮しても、濃縮しなくてもよい。本発明の方法で得られる過分極アミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボ MR に使用する場合、MR 活性核の同位体濃縮は好ましい。

【0044】

本発明の方法で使用されるアミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩及びアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、分子の 1 つの位置だけで、好ましくは濃縮度 10 % 以上、より適切には 25 % 以上、さらに好ましくは 75 % 以上、最も好ましくは 90 % 以上で同位体を濃縮し得る。理想的には、濃縮度は 100 % である。

【0045】

好ましくは、のアミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩及びアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、 ^{13}C 及び／又は ^{15}N が濃縮される。

【0046】

同位体濃縮の最適位置は、NMR 活性核の緩和時間に依存する。好ましくは、本発明の

方法で使用されるアミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩及びアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、長い T_1 緩和時間を有する位置で同位体が濃縮される。 ^{13}C 濃縮については、そのような位置は、カルボキシル C 原子、カルボニル C 原子又は四級 C 原子であるが、カルボキシル C 原子が好ましい。 ^{15}N 濃縮については、そのような位置は、好ましくは直接プロトンとカップリングしておらず、したがって三級アミンが好ましい。

【0047】

同位体濃縮は、例えば、化学合成又は生物学的標識により達成でき、両者の方法は当技術分野で公知であり、適当な方法は、同位体濃縮すべき特定のスルホネートに応じて選択し得る。

【0048】

アンモニウム塩（以下では酸性標品とも称する）又はカルボキシレート／スルホネート（以下では塩基性標品とも称する）を本発明の方法で使用するか否かは、幾つかの要因に依存する。

【0049】

塩基性（酸性）標品は、分極すべきアミノ酸又はアミノスルホン酸が、酸性（塩基性）条件に耐えられない、例えば、このような条件下で化学的に不安定である場合に選択されることは明らかである。

【0050】

α -アミノ酸については、高い緩和速度及びそれに伴う分極の喪失が、 pH が7を超える溶液、即ち塩基性溶液中で観察された。したがって、 α -アミノ酸の塩基性標品をDNPに使用する場合、固体過分極 α -アミノ酸の液化は、分極の喪失を避けるために、注意深く実施する必要がある。これは、塩基性標品は、液化後に素早い中和又は同時の中和／液化を行う必要があることを意味する。しかし、本発明者等は、塩基性標品が、調製及び取扱い、例えば凍結前の取扱いが普通、よりし易いことを認めた。酸性標品は、分極 α -アミノ酸の緩和速度に対する影響から見てそれほど決定的ではなく、このような酸性標品は、液化後のいつでも pH 調整することができる。

【0051】

上述したように、本発明の方法は、動的核分極（DNP）によって過分極アミノ酸又はアミノスルホン酸を製造する方法である。DNPにおいては、分極すべき化合物中のMR活性核の分極は、分極剤又は不対電子を含む化合物である、いわゆるDNP剤により影響される。DNPプロセス中に、普通マイクロ波放射線の形態のエネルギーが供給され、最初にDNP剤を励起することになろう。基底状態に崩壊する際、DNP剤の不対電子から、分極すべき化合物中のNMR活性核へ、例えば、試料、即ちアミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩及びアミノスルホン酸のスルホン酸塩中の ^{13}C 核及び／又は ^{15}N 核のようなNMR活性核へ、分極の移動が起こる。一般に、中又は高磁場及び超低温が、DNPプロセスにおいて、例えば、液体ヘリウム及び約1 T以上の磁場の中でDNPプロセスを実施することにより使用される。或いは、中磁場及び十分な分極増強が達成する任意の温度を採用してもよい。DNP技術は、例えば、双方とも参照により本明細書に組み込まれる国際公開第98/58272号及び国際公開第01/96895号にさらに記載されている。

【0052】

一般に、化学物質、即ち化合物をDNP法により分極するために、分極すべき化合物とDNP剤との組成物を調製し、次いで任意には凍結し、DNP分極器（予め凍結していない場合、そこで凍結されることになろう）中に分極するために挿入する。分極後、凍結した固体過分極組成物を溶融するか、或いは適切な溶解媒体中で溶解することにより、速やかに液体状態に移す。溶解が好ましく、凍結した固体過分極組成物の溶解プロセス及びそのための適切な装置は、国際公開第02/37132号に詳細に記載されている。溶融プロセス及び溶融ための適切な装置は、例えば国際公開第02/36005号に記載されている。

10

20

30

40

50

【0053】

分極すべき化合物の高い分極度を得るために、化合物及びDNP剤は、DNPプロセス中に密接に接触している必要がある。これは、組成物が凍結又は冷却した際に結晶化するならば、当てはまらない。結晶化を避けるために、ガラス形成剤を組成物中に存在させる必要があるか、或いは凍結したときに結晶化せずにガラスを形成する化合物を、分極のために選択する必要がある。

【0054】

本出願に関する用語「ガラス形成剤」とは、溶液、即ち本発明の方法の段階a)による溶液に添加した際、ガラス化を促進し、溶液を冷却又は凍結した際にその結晶化を防止する化合物を意味する。本発明に関する好ましいガラス形成剤の例は、グリコール、即ち2個以上のヒドロキシ基を含有する、エチレングリコール、プロピレングリコール及びグリセロールなどのアルコール又はDMSOである。

【0055】

DNP剤は、その選定が、試料、即ちアミノ酸又はアミノスルホン酸において達成できる分極度に主たる影響を及ぼすので、DNPプロセスで決定的な役割を果たす。各種のDNP剤（国際公開第99/35508号では「OMRI造影剤」という名称である）が知られており、それらは、クロム(V)イオンなどの遷移金属、磁性粒子又はニトロキシドラジカル若しくはトリチルラジカルなどの有機フリーラジカルのようなものである。国際公開第99/35508号、国際公開第88/10419号、国際公開第90/00904号、国際公開第91/12024号、国際公開第93/02711号又は国際公開第96/39367号に記載されているような、酸素系、硫黄系又は炭素系の安定なトリチルラジカルの使用は、各種の異なる化学物質において高度の分極を生じた。

【0056】

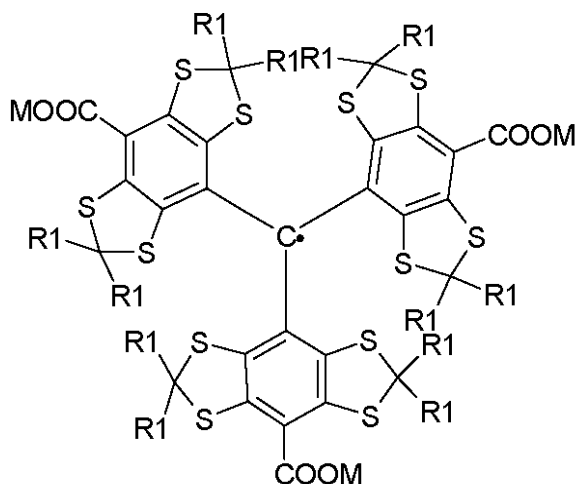
本発明の方法の好ましい実施形態では、トリチルラジカルがDNP剤として使用される。簡潔に上述したように、DNP剤、例えばトリチルラジカルの大きな電子スピン分極が、電子のラーモア周波数に近いマイクロ波照射を介して、試料中のNMR活性核の核スピン分極に変換される。そのマイクロ波は、 $e-e$ 及び $e-n$ 遷移を介して電子スピン系と核スピン系との連絡を刺激する。有効なDNPのために、即ち試料中の高度の分極を達成するために、トリチルラジカルは、電子スピン系と核スピン系との連絡に必要である、試料とトリチルラジカルとの密接な接触を達成するように、試料中又は試料溶液中で安定であり、溶解していなければならない。

【0057】

好ましい実施形態では、トリチルラジカルは、式(1)のラジカルである。

【0058】

【化1】



(1)

式中

Mは、水素又は1当量の陽イオンを表し、

R 1は、同一又は異なるもので、任意には1以上のヒドロキシ基又は $-(CH_2)_n-X-$ R 2で置換されていてもよい直鎖又は枝分れ $C_1 \sim C_6$ アルキル基を表す（ただし、nは1、2又は3であり、XはO又はSであり、R 2は、任意には1以上のヒドロキシ基で置換されていてもよい直鎖又は枝分れ $C_1 \sim C_4$ アルキル基である。）。

【0059】

好ましい実施形態では、Mは、水素又は生理的に許容される陽イオン1当量を表す。用語「生理的に許容される陽イオン」とは、人間又は人間外動物の生体により許容される陽イオンを示す。好ましくは、Mは、水素又はアルカリ陽イオン、アンモニウムイオン、若しくは有機アミンイオン、例えばメグルミンを表す。最も好ましくは、Mは、水素又はナトリウムを表す。

10

【0060】

更なる好ましい実施形態では、R 1は、好ましくは同一であって、さらに好ましくは直鎖又は枝分れ $C_1 \sim C_4$ アルキル基、最も好ましくはメチル、エチル若しくはイソプロピルであるか、或いはR 1は、好ましくは同一であって、さらに好ましくは、1つのヒドロキシ基で置換された直鎖又は枝分れ $C_1 \sim C_4$ アルキル基、最も好ましくは $-CH_2-CH_2-OH$ であるか、或いはR 1は、好ましくは同一であって、 $-CH_2-OC_2H_4OH$ を表す。

【0061】

式(1)のトリチルラジカルは、国際公開第88/10419号、国際公開第90/00904号、国際公開第91/12024号、国際公開第93/02711号、国際公開第96/39367号、国際公開第97/09633号、国際公開第98/39277号及び国際公開第2006/011811号に詳細に記載されているように、合成し得る。

20

【0062】

本発明の方法の段階a)において、試料及びDNP剤の溶液を調製する。DNP剤及び試料の溶解を促進するために、溶媒又は溶媒混合物を使用する必要がある。過分極アミノ酸又はアミノスルホン酸を、インビボMR検出用の造影剤として使用することを意図する場合、溶媒の量を最小限に抑えることが好ましい。インビボ造影剤として使用するために、分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸は、比較的高い濃度で普通投与される、即ち、高濃度の試料が、好ましくは本発明の方法の段階c)であり、したがって溶媒の量は、段階a)において溶液を調製する際、最小限に抑えることが好ましい。これに関して、試料、DNP剤、溶媒及び任意には常磁性金属イオンを含有する組成物の質量は、できる限り小さく保つと言及することも重要である。例えば、過分極アミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボMR検出用の造影剤として使用するために、溶解を用いてDNPプロセス後の過分極試料を含有する固体組成物を液体状態に変換する場合、大きな質量は、溶解プロセスの効率に負の影響を及ぼすことになろう。これは、溶解プロセスにおける所与体積の溶解媒体について、組成物の質量が増加するとき、組成物の質量対溶解媒体の比率が減少するという事実に起因する。さらに、ある種の溶媒を使用すると、ある種の溶媒が生理的に許容されないことがあるため、MR造影剤として使用する過分極アミノ酸又はアミノスルホン酸を人間又は人間外動物に投与する前に、それを除く必要があり得る。

30

40

【0063】

本発明の方法において使用する試料が、アミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩であれば、塩は、適切な溶媒、好ましくは、水若しくはグリセロールやグリコールのようなガラス形成剤、又は水とガラス形成剤の混合物に溶解している市販の塩でもよい。その試料が市販の塩でなければ、段階a)で溶液の調製に使用する前に、その塩を調製し、単離することが好ましい。例えば、 $^{13}C_1$ -アラニン、即ち1位の炭素原子（カルボキシル炭素）が ^{13}C 濃縮されたアラニンのアンモニウム塩は、酸、例えば塩酸を、溶媒、例えばエタノールの適宜存在下で $^{13}C_1$ -アラニンに添加することにより、調製し得る。 $^{13}C_1$ -アラニンの得られたアンモニウム塩は、例えばエーテル沈殿化によ

50

り単離し、乾燥することができる。次いで、取得したアミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩（例えば、 $^{13}\text{C}_1$ -アラニンのアンモニウム塩、 $^{13}\text{C}_1$ -アラニウム塩化物）は、適切な溶媒、好ましくは、水若しくはグリセロールやグリコールのようなガラス形成剤、又は水とガラス形成剤の混合物に溶解する。DNP剤、好ましくはトリチルラジカル、さらに好ましくは式（１）のトリチルラジカルは、溶解したアミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩に、固体又は溶液として添加し得る。或いは、DNP剤を適切な溶媒、好ましくは、水若しくはグリセロールやグリコールのようなガラス形成剤、又は水とガラス形成剤の混合物に溶解し、固体のアミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩を溶解したDNP剤に添加する。こうした化合物の密接な混合は、攪拌、渦流発生若しくは超音波発生及び／又は穏やかな加熱などの当技術分野で公知の幾つかの手段によって、促進することができる。

10

【0064】

本発明の方法において使用する試料が、アミノ酸のカルボン酸塩又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩であれば、塩は、適切な溶媒、好ましくは、水若しくはグリセロールやグリコールのようなガラス形成剤、又は水とガラス形成剤の混合物に溶解している市販の塩でもよい。その試料が市販の塩でなければ、その塩をその場で調製し、段階a)の溶液の調製において、単離せずに使用することが好ましい。例えば、 $^{13}\text{C}_1$ -グリシン、即ち1位の炭素原子（カルボキシル炭素）が ^{13}C 濃縮されたグリシンのナトリウム塩は、塩基、例えばNaOHの水溶液を、溶媒、例えば水の適宜存在下で $^{13}\text{C}_1$ -グリシンに添加することにより、調製し得る。次いで、取得したアミノ酸のカルボン酸塩（例えば、 $^{13}\text{C}_1$ -グリシンのナトリウム塩、 $^{13}\text{C}_1$ -アミノエタン酸ナトリウム）又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩に、DNP剤、好ましくはトリチルラジカル、さらに好ましくは式（１）のトリチルラジカルを固体として添加する。或いは、DNP剤を適切な溶媒、好ましくは、水若しくはグリセロールやグリコールのようなガラス形成剤、又は水とガラス形成剤の混合物に溶解し、次いで溶解したDNP剤を、取得したアミノ酸のカルボン酸塩又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩に添加する。こうした化合物の密接な混合は、攪拌、渦流発生若しくは超音波発生及び／又は穏やかな加熱などの当技術分野で公知の幾つかの手段によって、促進することができる。

20

【0065】

段階a)の溶液は、常磁性金属イオンをさらに含んでもよい。常磁性金属イオンの存在は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2007/064226号に詳細に記載されているように、DNPにより分極すべき化合物の分極度を増加させ得ることが判明した。

30

【0066】

用語「常磁性金属イオン」とは、塩形又はキレート形、即ち常磁性キレートの常磁性金属イオンを示す。後者は、キレート剤及び常磁性金属イオンを含み、常磁性金属イオン及びキレート剤が、錯体、即ち常磁性キレートを形成している化学物質である。

【0067】

好ましい実施形態では、常磁性金属イオンは、 Gd^{3+} を含む塩又は常磁性キレート、好ましくは Gd^{3+} を含む常磁性キレートである。さらに好ましい実施形態では、常磁性金属イオンは、段階a)の溶液に可溶であり、安定である。

40

【0068】

したDNP剤の場合と同様に、試料は、常磁性金属イオンとも密接に接触していなければならない。試料、DNP剤及び常磁性金属イオンを含む溶液は、幾つかの方法で取得し得る。

【0069】

第1の実施形態では、試料を適切な溶媒中に溶解して、溶液を得る、或いは上述したように、試料を適切な溶媒中でその場で生成する。こうした試料溶液に、DNP剤を添加して溶解する。DNP剤、好ましくはトリチルラジカルは、固体として又は溶液として添加してもよい、例えば、適切な溶媒、好ましくは、水若しくはグリセロールやグリコールの

50

ようなガラス形成剤、又は水とガラス形成剤の混合物に溶解して添加してもよからう。続く段階で、常磁性金属イオンを添加する。常磁性金属イオンは、固体として又は溶液として添加してもよい、例えば、適切な溶媒、好ましくは、水若しくはグリセロールやグリコールのようなガラス形成剤、又は水とガラス形成剤の混合物に溶解して添加してもよからう。別の実施形態では、DNP剤及び常磁性金属イオンを適切な溶媒に溶解し、この溶液に、試料を、固体として又は適切な溶媒に溶解して添加する。さらに別の実施形態では、DNP剤（又は常磁性金属イオン）を適切な溶媒に溶解し、適宜溶解した試料に添加する。続く段階で、常磁性金属イオン（又はDNP剤）を、この溶液に固体又は溶液として添加する。好ましくは、常磁性金属イオン（又はDNP剤）を溶解する溶媒の量は、最小限に抑える。こうした化合物の密接な混合は、攪拌、渦流発生若しくは超音波発生及び／又は穏やかな加熱などの当技術分野で公知の幾つかの手段によって、やはり促進することができる。

10

【0070】

トリチルラジカルをDNP剤として使用する場合、このようなトリチルラジカルの適切な濃度は、DNPに使用する組成物中で1～25mM、好ましくは2～20mM、さらに好ましくは10～15mMである。常磁性金属イオンを組成物に添加する場合、このような常磁性金属イオンの適切な濃度は、組成物中で0.1～6mM（金属イオン）であり、0.3～4mMの濃度が好ましい。

【0071】

本発明の方法の段階a)で溶液を調製した後、溶液を段階b)で凍結する。溶液は、当技術分野で公知の方法、例えば、冷凍機中、液体窒素中で凍結することによって、又は溶液をプローブ保持カップ（試料カップ）に添加し、試料カップをDNP分極器中に入れるだけによって、そこで液体ヘリウムにより凍結されると見込まれるので、凍結することができる。一実施形態では、溶液は、「ビーズ」として凍結した後に、試料カップに添加し、分極器中に挿入する。このようなビーズは、液体窒素に溶液を滴下で添加することにより、取得し得る。このようなビーズのより効率的な溶解が、観察されており、それは、例えば、分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸を、インビボMR検出手順において使用することを意図するとき、より多量の試料を分極する場合に特に適している。

20

【0072】

常磁性金属イオンが組成物中に存在する場合、組成物は、凍結する前に、例えば、組成物の中にヘリウムガスをバブリングする（例えば、2～15分の間）ことにより、脱気し得るが、脱気は、他の公知の一般的方法により行うことができる。

30

【0073】

既述したように、 α -アミノ酸の塩基性標品の液化は、分極の喪失を避けるためにpH制御することが重要である。これは、例えば、段階d)において、凍結した塩基性標品を液化し、同時に、酸を含有する溶解媒体の補助で塩基性標品を中和することにより、達成し得る。或いは、酸を、プローブ保持カップに、即ち、段階c)の動的核分極プロセスにおいて段階b)の凍結溶液を保持するカップに添加してもよい。これは、本発明の方法の段階b)で溶液をプローブ保持カップ中で凍結し、凍結溶液の上部に酸を添加し、酸を凍結することにより、行うことができる。或いは、酸をプローブ保持カップ中で凍結し、本発明の方法の段階a)で調製した溶液を凍結酸の上部に添加し、次いで段階b)で凍結してもよい。この手順は、中和に必要な酸と塩基性標品とを密に近接させ、段階d)で凍結溶液を液化する際、中和が直ちに行われる。

40

【0074】

DNP技術は、例えば、双方とも参照により本明細書に含まれる、国際公開第98/58272号及び国際公開第01/96895号に記載されている。一般に、中又は高磁場及び超低温が、DNPプロセスにおいて、例えば、液体ヘリウム及び約1T以上の磁場の中でDNPプロセスを実施することにより使用される。或いは、中磁場及び十分な分極増強が達成する任意の温度を採用してもよい。好ましい実施形態では、本発明の方法の段階c)におけるDNPプロセスは、液体ヘリウム及び約1T以上の磁場の中で実施される。

50

適切な分極ユニットは、例えば、国際公開第02/37132号に記載されている。好ましい実施形態では、分極ユニットは、低温保持装置及び分極手段、例えば、マイクロ波源に導波管で接続され、超伝導磁石などの磁場発生手段に囲まれた中央ボアにあるマイクロ波チャンバーを備える。そのボアは、超伝導磁石に近い少なくとも領域Pのレベルまで鉛直下方に延びており、その領域の磁場強度は、NMR活性試料核の分極を起こすのに十分に高い、例えば1~25 Tの間にある。プローブ（即ち、分極すべき凍結溶液）用のボアは、好ましくは密封可能であり、低い圧力、例えば、1 mbar以下程度の圧力まで脱気することができる。取外し可能な輸送管などのプローブ導入手段は、ボア内に収容でき、この管は、領域Pのマイクロ波チャンバー内部の位置まで、ボア上部から下へ挿入することができる。領域Pは、液体ヘリウムによって、分極を起こすのに十分に低い温度、好ましくは0.1~100 K程度の温度、さらに好ましくは0.5~10 K、最も好ましくは1~5 Kまで冷却される。プローブ導入手段は、ボア内の部分真空を保持するために、適切な任意の方法で上端で密封できるのが好ましい。プローブ保持カップ又は試料カップなどのプローブ保持容器は、プローブ導入手段の下端内部に取外し可能なように嵌め込むことができる。プローブ保持容器は、比熱容量が低く、低温特性が良好な軽量材料、例えばKel F（ポリクロロトリフルオロエチレン）又はPEEK（ポリエーテルエーテルケトン）などで作製されているのが好ましく、その容器は、2以上のプローブを保持できるように設計し得る。

10

【0075】

プローブは、プローブ保持容器中に挿入し、液体ヘリウム中に沈め、好ましくは200 mWで約94 GHzの周波数のマイクロ波で照射する。分極度は、例えば、過分極試料を含む凍結溶液中のNMR活性核の固体NMR測定により、モニターし得る。例えば、過分極試料中のNMR活性核が ^{13}C であれば、固体 ^{13}C -NMR測定が実施される。固体 ^{13}C -NMR測定は、低フリップ角を用いた単純なパルス収集NMRシーケンスからなるのが好ましい。 ^{13}C -NMRスペクトルにおける過分極試料のシグナル強度は、DNP分極プロセスの前に収集した ^{13}C -NMRスペクトルにおけるその試料のシグナル強度と比較する。次いで、分極前後のシグナル強度の比率から分極度を計算する。

20

【0076】

DNPプロセスの後、過分極試料を含む凍結溶液は、本発明の方法の段階d)で適宜液化する。用語「液化」とは、固体状態から液体状態への移行を意味する。

30

【0077】

過分極試料を固体NMR分光で使用する場合は、適宜の段階d)は実施しない。固体NMR分光では、過分極固体試料は、静止又はマジック角回転いずれかの固体NMR分光により分析し得る。

【0078】

過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸を液体MR検出に使用するつもりであれば、段階d)を実施し、液化は、適当な溶媒若しくは溶媒混合物（溶解媒体）に溶解することにより、又は固体凍結溶液を融解することにより達成することができる。溶解が好ましく、溶解プロセス及びそのための適切な装置は、国際公開第02/37132号に詳細に記載されている。融解プロセス及び融解のための適切な装置は、例えば、国際公開第02/36005号に記載されている。手短に言えば、分極器から物理的に分離されているか、又は分極器及び溶解ユニット／融解ユニットを収容した装置の一部をなす、溶解ユニット／融解ユニットが使用される。好ましい実施形態では、溶解／融解は、緩和を改善し、過分極を最大に保持するために、高い磁場、例えば分極器内部で実施する。磁場ノードは回避すべきであり、低磁場は、上記手段に関わらず緩和を促進する恐れがある。

40

【0079】

過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸を得るには、過分極試料をのアミノ酸又はアミノスルホン酸に変換する必要がある。変換は、液化、即ち段階d)と同時に又はその後に実施してもよい。したがって、一実施形態では、液化を融解又は溶解によって実施し、変換を段階d)の後に実施する。別の実施形態では、液化及び変換は、同時に、例えば、段

50

階 c) で得た凍結溶液を、過分極試料をアミノ酸又はアミノスルホン酸に変換できる化合物である溶解媒体又はその化合物を含有する溶解媒体中に、溶解することにより実施する。

【0080】

試料が、アミノ酸又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩であれば、塩を、塩基との反応（中和）により、対応するアミノ酸又はアミノスルホン酸に変換することができる。原理的には、のアミノ酸又はアミノスルホン酸のアミノ基より強い塩基である任意の塩基が、中和に使用することができる。好ましい塩基は、無機塩基、さらに好ましい塩基は、 NaOH 、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 、 KOH 、 CsOH 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 又は $\text{Sr}(\text{OH})_2$ の水溶液のようなアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸水素塩又は炭酸塩の水溶液である。最も好ましい塩基は、安価で容易に入手できるため NaOH である。さらに、過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボMRに使用する場合、生成するナトリウム塩（例えば、塩化ナトリウム）が人体又は人間外動物体に普通良く許容されるため、 NaOH が好ましい。

10

【0081】

試料が、アミノ酸のカルボン酸塩又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩であれば、塩を、酸との反応（中和）により、対応するアミノ酸又はアミノスルホン酸に変換することができる。原理的には、アミノ酸のカルボキシ基又はアミノスルホン酸のスルホ基より低い pK_a を有する任意の酸が、中和に使用することができる。好ましい酸は、強酸であり、さらに一段と好ましい酸は、塩酸（ HCl ）、臭化水素酸（ HBr ）、ヨウ化水素酸（ HI ）又は硫酸（ H_2SO_4 ）のような無機強酸である。最も好ましい酸は、安価で入手容易なため HCl である。さらに、過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボMRに使用する場合、生成する塩化物（例えば、塩化ナトリウム）が人体又は人間外動物体に普通良く許容されるため、 HCl が好ましい。

20

【0082】

試料が、アンモニウム塩及びカルボン酸塩又はスルホン酸塩の混合物であれば、アンモニウム塩を、塩基との反応（中和）により、対応するアミノ酸又はアミノスルホン酸に変換する必要があり、カルボキシレート又はスルホン酸塩を、酸との反応（中和）により、対応するアミノ酸又はアミノスルホン酸に変換する必要がある。好ましくは、中和はその後に実施される。試料が α -アミノ酸のカルボキシレートを含む場合、酸による中和を最初に行った後、試料中に存在するアンモニウム塩の中和を塩基により行うことが好ましい。

30

【0083】

上記に明示したように、段階 d) の液化は、溶媒又は溶媒混合物である、又はそれを含む溶解媒体、好ましくは水性担体で溶解することにより、実施するのが好ましい。さらに好ましくは、生理的に許容され、医薬として受容される、水又は塩水のような担体を使用され、最も好ましくは、特に、過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボMR検出用の造影剤に使用する場合、緩衝液が使用される。インビボMR検出のために、非水性の溶媒又は溶媒混合物も、溶解媒体として又はその中で使用し得るが、例えば、 DMSO 若しくはメタノール、又は水性担体及び非水性溶媒を含む混合物、例えば、 DMSO 及び水、若しくはメタノール及び水である。別の好ましい実施形態では、溶解媒体は、遊離の常磁性イオンと結合又は錯形成できる1種以上の化合物、例えば DTPA 又は EDTA のようなキレート剤をさらに含んでもよい。

40

【0084】

好ましい実施形態では、段階 d) の液化は、好ましくは、溶解媒体による、好ましくは、試料の中和、即ち対応するアミノ酸又はアミノスルホン酸への試料の変換に適切な塩基又は酸を含む緩衝液による、溶解により実施される。試料が、アミノ酸又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩であり、好ましくは、過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボMR検出に使用する場合、 pH が約6.8～7で塩基を有する緩衝液を含む溶解媒体を使用して、段階 d) を実施することが好ましい。適切な緩衝液は、例えば、リン酸

50

緩衝液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$)、ACES、PIPES、イミダゾール/HCl、BES、MOPS、HEPES、TES、TRIS、BIS-TRIS、HEPPS又はTRICINである。試料が、アミノ酸のカルボン酸塩又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩であり、好ましくは、過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボMR検出に使用する場合、pHが生理的pHよりやや低い、即ちpHが約6.8〜7.2で、酸を有する緩衝液を含む溶解媒体を使用して、段階d)を実施することが好ましい。適切な緩衝液は、例えば、リン酸緩衝液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$)、ACES、PIPES、イミダゾール/HCl、BES、MOPS、HEPES、TES、TRIS、BIS-TRIS、HEPPS又はTRICINである。

【0085】

10

本発明の方法の段階d)の後、DNP剤、好ましくはトリチルラジカル及び適宜の常磁性金属イオンを、過分極試料又は過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸を含有する液体から、除去してもよい。こうした化合物の除去は、過分極したアミノ酸又はアミノスルホン酸をインビボMR検出用の造影剤に使用する場合、好ましい。過分極試料を対応するアミノ酸又はアミノスルホン酸に先ず変換し、変換を行った後、DNP剤及び適宜の常磁性金属イオンを除去することが好ましい。

【0086】

トリチルラジカル及び常磁性金属イオンの除去に有用な方法は、当技術分野で公知であり、国際公開第2007/064226号及び国際公開第2006/011809号に詳細に記載されている。

20

【0087】

本発明の方法に従って製造される過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物を含む液体は、「従来の」MR造影剤、即ち、インビボでの、即ち人間又は人間外動物の生体における解剖学的映像化に、優れたコントラスト促進を与える造影剤として使用し得る。これは、過分極したアミノ酸若しくはアミノスルホン酸が代謝しない場合、又は代謝がMR検出でモニターできない時間尺度で起こる場合に、特に当てはまる。

【0088】

さらに、本発明の方法に従って製造される過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物を含む液体は、インビトロ及びインビボでの代謝活性をMR検出するための造影剤としても使用し得る。アミノ酸は、クエン酸サイクル中に集められることにより、エネルギー源になり得る。さらに、アミノ酸は、体内の数種の代謝経路中で使用されて、他の（非標準的）アミノ酸、例えば、尿素サイクル中のシトルリンのようなアミノ酸、又は他の各種化合物、例えば、チロシンからカテコールアミン、トリプトファンからナイアシンのようなビタミン、若しくはグリシンからポルフィリンを生合成する。したがって、アミノ酸は重要な代謝マーカーであり、そのため過分極アミノ酸は、MR検出による代謝活性に関する情報を得るための有用な薬剤になり得る。

30

【0089】

本発明の別の態様は、試料、DNP剤及び適宜の常磁性金属イオンを含み、試料が、アミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩、アミノスルホン酸のスルホン酸塩、又はそれらの混合物である、組成物である。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、溶媒若しくは溶媒混合物及び／又はガラス形成剤をさらに含んでもよい液体組成物である。好ましい実施形態では、試料は、アミノ酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩、又はそれらの混合物である。

40

【0090】

更なる好ましい実施形態では、アミノ酸のアンモニウム塩若しくはアミノスルホン酸のアンモニウム塩は、塩化アンモニウム塩であり及び／又はアミノ酸のカルボン酸塩若しくはアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、カルボン酸ナトリウム塩若しくはスルホン酸ナトリウム塩である。

【0091】

50

さらに別の好ましい実施形態では、DNP剤は、トリチルラジカル、好ましくは式(1)のトリチルラジカルである。別の好ましい実施形態では、本発明による組成物は、常磁性金属イオン、好ましくは Gd^{3+} を含んだ塩又は常磁性キレートを含む。

【0092】

本発明による組成物は、本発明の方法における使用、即ち、過分極したアミノ酸若しくはアミノスルホン酸又はそれらの混合物の動的核分極による製造に適している。このような組成物の更なる好ましい実施形態は、本出願で既に考察してきた。

【0093】

本発明のさらに別の態様は、過分極試料、DNP剤及び適宜の常磁性金属イオンを含み、試料が、アミノ酸のアンモニウム塩、アミノスルホン酸のアンモニウム塩、アミノ酸のカルボン酸塩、アミノスルホン酸のスルホン酸塩、又はそれらの混合物である、組成物である。本発明による組成物は、好ましくは本発明による方法により得られる。

【0094】

好ましい実施形態では、本発明の組成物は、溶媒若しくは溶媒混合物及び／又はガラス形成剤をさらに含んでもよい固体凍結溶液である。この好ましい実施形態については、本発明による組成物は、好ましくは、段階a)～c)を含む本発明による方法により得られる。

【0095】

好ましい実施形態では、アミノ酸のアンモニウム塩又はアミノスルホン酸のアンモニウム塩は、塩化アンモニウムであり、アミノ酸のカルボン酸塩又はアミノスルホン酸のスルホン酸塩は、カルボン酸ナトリウム若しくはスルホン酸ナトリウムである。

【0096】

さらに別の好ましい実施形態では、DNP剤は、トリチルラジカル、好ましくは式(1)のトリチルラジカルである。別の好ましい実施形態では、本発明による組成物は、常磁性金属イオン、好ましくは Gd^{3+} を含んだ塩又は常磁性キレートを含む。

【0097】

本発明のさらに別の態様は、過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物である。の過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物は、好ましくは本発明による方法により得られ、適宜の段階d)が方法に含まれる。

【0098】

本発明に関する用語「アミノ酸」とは、1以上のアミノ基及び1以上のカルボキシ基を含む化学物質を示す。1以上のアミノ基は、一級アミノ基、二級アミノ基又は三級アミノ基でもよい。本発明によるアミノ酸の一例は、1つのアミノ基及び1つのカルボキシ基を含む化学物質である。一実施形態では、1つのアミノ基及び1つのカルボキシ基は、同一の炭素原子に付いており、例としては、標準又はタンパク質原性のアミノ酸のような α -アミノ酸、例えばアラニン、グリシン、ロイシン、メチオニン又はシステインである。D及びL異性体は共に、本発明の方法において使用することができる。この実施形態の更なる例は、サルコシン(N-メチルグリシン)、ホモシステイン又はベタイン(トリメチルグリシン)のような非標準的アミノ酸である。別の実施形態では、1つのアミノ基及び1つのカルボキシ基は、異なる炭素原子に付いており、この実施形態の例としては、GABA(γ -アミノ酪酸)又はアミノレブリン酸である。さらに別の実施形態では、本発明の方法において使用されるアミノ酸は、2以上のアミノ基及び／又は2以上のカルボキシ基を含む。例としては、アルギニン、リシン、アスパラギン、オルニチン、グルタミン、シトルリン、クレアチン、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアルギニノコハク酸である。

【0099】

本発明に関する用語「アミノスルホン酸」とは、1以上のアミノ基及び1以上のスルホ基、即ち $-S(O)_2OH$ 基を含む化学物質を示す。1以上のアミノ基は、一級アミノ基、二級アミノ基又は三級アミノ基でもよい。アミノスルホン酸の例は、1-ピペリジンスルホン酸、N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸、1,4-ピペラジジビスエタンスルホン酸、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、2-(N-モルホ

10

20

30

40

50

リノ) エタンスルホン酸又はタウリン (2-アミノエタンスルホン酸) である。

【0100】

単数形で書かれているが、用語「過分極アミノ酸」及び「過分極アミノスルホン酸」は、単一の過分極化学物質、又は異なる数種の過分極化学物質を示す。したがって、単一の化学物質は、例えば、過分極グリシン若しくは過分極アラニンのようなある種の過分極アミノ酸、又は過分極タウリン若しくは過分極N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸のような過分極アミノスルホン酸である。異なる数種の化学物質は、例えば、過分極グリシン及び過分極アラニンのような異なる数種の過分極アミノ酸、又は過分極タウリン及び過分極N-(2-アセタミド)-2-アミノエタンスルホン酸のような過分極アミノスルホン酸である。

10

【0101】

本発明のさらに別の態様は、過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物を含む造影媒体である。

【0102】

本発明による造影媒体は、インビトロMR検出、例えば、人体又は人間外動物体に由来する細胞培養物、試料、エキスビボ組織又は単離器官のMR検出を行うための造影媒体として使用し得る。このために、造影媒体は、例えば、細胞培養物、尿、血液若しくは唾液のような試料、生検組織のようなエキスビボ組織、又は単離器官への添加に適切な組成物として供給される。このような造影媒体は、造影剤、即ち、過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物以外に、細胞又は組織のインビトロアッセイに適合し、そのアッセイに使用される溶媒、例えば、水のような水性担体、DMSO若しくはメタノール、又は水性担体及び非水性担体を含む溶媒混合物、例えば、DMSO及び水若しくは緩衝液、又はメタノール及び水若しくは緩衝液の混合物を含むことが好ましい。当業者には明らかなように、医薬として許容される担体、賦形剤及び製剤用助剤は、このような造影媒体中に存在してもよいが、このような目的には必要ない。

20

【0103】

さらに、本発明の方法による造影媒体は、インビボMR検出、即ち、人間又は人間外動物の生体に関して実施するMR検出を行うための造影媒体として使用し得る。このために、造影媒体は、人間又は人間外動物の生体へ投与するのに適している必要がある。したがって、このような造影媒体は、造影剤、即ち、過分極アミノ酸若しくは過分極アミノスルホン酸又はそれらの混合物以外に、水性担体、好ましくは、生理的に許容され、医薬として受容される、水、緩衝液又は塩水のような水性担体を含むことが好ましい。このような造影媒体は、従来の医薬又は動物薬用担体又は賦形剤、例えば、人間又は動物の医療における診断用組成物に慣用されている安定剤、浸透圧調整剤、可溶化剤などの製剤用助剤をさらに含んでいてもよい。

30

【実施例】

【0104】

アミノ酸の酸性標品

実施例 1 過分極¹³C₁-アラニンの調製

実施例 1 a ¹³C₁-アラニンのアンモニウム塩 (¹³C₁-アラニニウム塩化物) の調製

¹³C₁-アラニン (100 mg、1.1 mol、Cambridge Isotopes) を 10 ml 遠心管に添加した後、濃塩酸 (145 µl、12 M) 及びエタノール (1 ml、95%) を添加した。¹³C₁-アラニンの溶解 (超音波処理が必要な場合もある) 後、生成した¹³C₁-アラニンの塩化アンモニウム塩 (¹³C₁-アラニニウム塩化物) をジエチルエーテル (およそ 5 ml) の添加により沈殿させた。沈殿を遠心分離で集め、上清を捨てた。沈殿をジエチルエーテルで洗浄し、真空中で乾燥した。回収収量: 白色粉末 12.5 mg (微細針状晶として 90%) 。

40

【0105】

実施例 1 b ¹³C₁-アラニニウム塩化物、DNP 剤及び常磁性金属イオンを含む溶液の調製及び DNP 分極

50

実施例 1 a で得た $^{13}\text{C}_1$ -アラニン塩酸塩 32.5 mg (0.258 mmol) をマイクロ試験管内原液 42 mg に添加した。原液は、国際公開第 98/39277 号の実施例 7 に従って合成した DNP 剤 (トリチルラジカル) のトリス (8-カルボキシ-2, 2, 6, 6-(テトラ (ヒドロキシエチル) -ベンゾ- [1, 2-4, 5'] -ビス-(1, 3)-ジチオール-4-イル) -メチルナトリウム塩と、国際公開第 2007/064226 号の実施例 4 に従って合成した常磁性金属イオン (1, 3, 5-トリス-(N-(DO3A-アセトアミド)-N-メチル-4-アミノ-2-メチルフェニル)-[1, 3, 5] トリアジナン-2, 4, 6-トリオン) の Gd キレート) とをグリセロール中に、トリチルラジカル 26 mM 及び Gd キレート 0.52 mM のグリセロール溶液が得られるように、調製しておいた。生成した組成物を超音波処理して、 $^{13}\text{C}_1$ -アラニン塩酸塩を溶解し、透明な溶液を作製した。その溶液 (65 μl 中、 $^{13}\text{C}_1$ -アラニン塩酸塩 4 M、トリチルラジカル 17 mM 及び Gd³⁺ 0.9 mM) をピペットで試験カップ中に移し、そのカップを素早く液体窒素中に下ろして、溶液を凍結し、次いで DNP 分極器中に挿入した。凍結溶液は、マイクロ波 (93.90 Hz) で照射しながら、1.2 K で 3.35 T の磁場中の DNP 条件下で分極した。分極は、固体 ^{13}C -NMR で追跡し、固相分極は、40% であることが判明した。

10

【0106】

実施例 1 c 液化及び中和

150 分間の動的核分極をした後、得られた凍結分極溶液を、リン酸緩衝液 (20 mM、pH 6.8、100 mg/l EDTA) 6 ml、NaOH 水溶液 (12 M 溶液 27 μl 、1 当量) 及び NaCl 30 mg を含有する溶解媒体中に溶解した。最終液の pH は 6.8 であった。

20

【0107】

液相分極は、400 MHz の液体 ^{13}C -NMR によって 35% であることが判明した。

【0108】

以下のアミノ酸は、実施例 1 に従って酸性標品として分極した。

【0109】

【表 1】

30

アミノ酸	試料濃度 (M)	固相分極 (%)	液化後のアミノ 酸濃度 (mM)	液相分極 (%)
$^{13}\text{C}_1$ -グルタミン	3	ndt	40	6
$^{13}\text{C}_1$ -メチオニン	3	41	40	26
$^{13}\text{C}_1$ -システイン	3	25	50	17
$^{13}\text{C}_1$ -プロリン	3	ndt	16	16
$^{13}\text{C}_1$ -グリシン	4	16	50	16

40

ndt = 測定せず

アミノ酸の塩基性標品実施例 2 過分極 $^{13}\text{C}_1$ -グルタミンの調製

実施例 2 a $^{13}\text{C}_1$ -2-アミノ-4-カルバモイルブタン酸ナトリウム ($^{13}\text{C}_1$ -グルタミンのカルボン酸塩)、DNP 剤及び常磁性金属イオンを含む溶液の調製及び DNP 分極

$^{13}\text{C}_1$ -グルタミン (45.5 mg、0.30 mmol、Cambridge Isotopes) をマイクロ試験管中に秤り取り、水 23.5 μl 及び NaOH 水溶液 (12 M

50

）25 μ l に溶解した。混合物を超音波処理し、穏やかに加熱して、透明溶液を作製した。この溶液に、トリス（8-カルボキシ-2, 2, 6, 6-（テトラ（ヒドロキシエチル）-ベンゾ- [1, 2-4, 5'] -ビス-（1, 3）-ジチオール-4-イル）-メチルナトリウム塩（トリチルラジカル、139 μ mol / g 溶液）の水溶液 5.7 mg と、1, 3, 5-トリス-（N-（DO3A-アセトアミド）-N-メチル-4-アミノ-2-メチルフェニル）- [1, 3, 5] トリアジナン-2, 4, 6-トリオンの Gd キレート（常磁性金属イオン、14.5 μ mol / g 溶液）の水溶液 2.1 mg とを添加した。生成した組成物を超音波処理し、穏やかに加熱して、透明溶液を作製した。その溶液（およそ 75 μ l 中、 $^{13}\text{C}_1$ -2-アミノ-4-カルバモイルブタン酸ナトリウム 4 M、トリチルラジカル 11 mM 及び Gd^{3+} 0.4 mM）をピペットで試験カップ中に移し、そのカップを素早く液体窒素中に下ろして、溶液を凍結した。試験カップを液体窒素から取り出し、HCl 水溶液（12 M）25 μ l を試験カップに添加した。試験カップを素早く液体窒素中に下ろし、次いで DNP 分極器中に挿入した。凍結溶液は、マイクロ波（93.90 Hz）で照射しながら、1.2 K で 3.35 T の磁場中の DNP 条件下で分極した。分極は、固体 ^{13}C -NMR で追跡し、固相分極は、35% であることが判明した。

10

【0110】

実施例 2 b 液化及び中和

120 分間の動的核分極をした後、得られた凍結分極溶液を、リン酸緩衝液（40 mM、pH 7、100 mg / l EDTA、0.9% NaCl）6 ml を含有する溶解媒体中に溶解した。溶解組成物を含有する最終溶液の pH は 7 であった。

20

【0111】

液相分極は、400 MHz の液体 ^{13}C -NMR によって 30% であることが判明した。

【0112】

以下のアミノ酸は、実施例 2 に従って塩基性標品として分極した。

【0113】

【表 2】

アミノ酸	試料濃度 (M)	固相分極 (%)	液化後のアミノ 酸濃度 (mM)	液相分極 (%)
$^{13}\text{C}_1$ -アラニン	6	18	40	16
$^{13}\text{C}_1$ -ロイシン	3	35	45	21
$^{13}\text{C}_1$ -グリシン	8	19	40	18

30

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/051172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K49/10	A61K49/18	A61K49/20 G01N33/50
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/052274 A2 (KATZ-BRULL RACHEL [IL] BRAIN WATCH LTD [IL]; KATZ-BRULL RACHEL [IL]) 10 May 2007 (2007-05-10) page 10, paragraph 2 - page 11, paragraph 1 page 17, paragraph 3 page 24, paragraph 3 page 25, paragraph 2 page 29, paragraph 1-2 page 31, paragraph 2-3 page 32, paragraph 3 - page 34, paragraph 1 page 36, last paragraph - page 38, paragraph 1 page 41, paragraph 2-3 page 47, paragraph 2 page 48, paragraph 4 examples 1,4 claims 3,4 -/-	1-2,4-6, 8-16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 July 2009		Date of mailing of the international search report 10/11/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cielen, Elsie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2009/051172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	figures 2,5,8,19,20,25,26,37	
X	WO 2007/069909 A2 (GE HEALTHCARE AS [NO]; THANING MIKKEL [NO]; GRAM KARL ANDREAS [NO]) 21 June 2007 (2007-06-21) cited in the application page 9, lines 20-25 page 10, lines 7-15 page 10, line 28 - page 11, line 17 page 12, lines 9-12 page 19, lines 24-27 page 21, lines 14-21 example 14 claims 1,2,4,7,10,12,16-21	1-2,4-16
X	WO 2007/111515 A2 (GE HEALTHCARE AS [NO]; LERCHE MATHILDE H [DK]; KARLSSON MAGNUS [SE]) 4 October 2007 (2007-10-04) cited in the application page 5, lines 23-27 page 6, lines 1-15 page 10, lines 1-11 page 10, line 26 - page 11, line 5 page 14, lines 8-14 page 29, lines 18-33 page 30, line 30 - page 31, line 6 claims 1,3-6,8-12,14-21	1-2,4-16
X	WO 2005/024440 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; GRIFFIN ROBERT G [US]; HU KAN-NIAN) 17 March 2005 (2005-03-17) page 1, lines 13-16 page 3, lines 13-18 page 9, line 26 - page 10, line 9 claims 1,10,11,13,22,23,25,28	10-15
X	WO 03/023432 A1 (AMERSHAM HEALTH AS [NO]; PETERSSON STEFAN [SE]; MAANSSON SVEN [SE]) 20 March 2003 (2003-03-20). page 2, paragraph 2 page 4, paragraph 5 - page 5, paragraph 5 page 7, last paragraph - page 8, paragraph 1 page 16, paragraph 4 - page 17, paragraph 2 claims 1,13	10-15
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/051172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/064226 A2 (GE HEALTHCARE AS [NO]; THANING MIKKEL [NO]; SERVIN ROLF [SE]) 7 June 2007 (2007-06-07) page 4, lines 4-17 page 5, line 30 - page 6, line 11 page 7, lines 6-12, 20-23 page 10, line 24 - page 11, line 1 page 13, lines 20-25 examples 16,17 claims 1-3,10,11,15,17 -----	10-15
X,P	WO 2008/086534 A1 (HUNTINGTON MEDICAL RES INST [US]; ROSS BRIAN D [US]; BHATTACHARYA PRAT) 17 July 2008 (2008-07-17) page 8, lines 22-25 table 1 page 13, line 31 - page 14, line 11 table 2 examples 7-9,11 page 20, lines 20-26 claims 1,4-5,15,18 -----	10-15
X,P	WO 2008/026937 A1 (GE HEALTHCARE AS [NO]; GLOEGAARD CHRISTIAN [NO]; SERVIN ROLF [SE]; THA) 6 March 2008 (2008-03-06) page 9, lines 11-24 page 11, lines 4-7,14-23 page 20, line 22 - page 21, line 27 page 23, lines 18-22 page 28, lines 8-16 page 28, line 31 - page 29, line 9 claims 1,5-7,9-14,17-18 -----	10-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/051172**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

see annex

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2009 /051172

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-16(partially)

Composition comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is an ammonium salt of an amino acid.

A hyperpolarised amino acid.

Imaging medium for in vitro MR detection comprising a hyperpolarised amino acid according to claims 10 to 12 and a solvent which is compatible with and used for in vitro cell or tissue assays.

Imaging medium for in vivo MR detection comprising a hyperpolarised amino acid according to claims 10 to 12 and an aqueous carrier.

Method of producing a hyperpolarised amino acid according to claims 10 to 12, the method comprising

a) preparing a solution comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is an ammonium salt of an amino acid;

b) freezing the solution;

c) carrying out dynamic nuclear polarisation on the frozen solution to obtain a frozen solution comprising the hyperpolarised sample; and

d) optionally liquefying and neutralizing the frozen solution obtained in step c).

2. claims: 1, 3-16(partially)

International Application No. PCT/EP2009/051172

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Composition comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is an ammonium salt of an aminosulphonic acid, as far as not included in invention 1.

A hyperpolarised aminosulphonic acid, as far as not included in invention 1.

Imaging medium for in vitro MR detection comprising a hyperpolarised aminosulphonic acid according to claims 10 to 12 and a solvent which is compatible with and used for in vitro cell or tissue assays, as far as not included in invention 1.

Imaging medium for in vivo MR detection comprising a hyperpolarised aminosulphonic acid according to claims 10 to 12 and an aqueous carrier as far as not included in invention 1.

Method of producing a hyperpolarised aminosulphonic acid according to claims 10 to 12 as far as not included in invention 1, the method comprising

- a) preparing a solution comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is an ammonium salt of an aminosulphonic acid;
- b) freezing the solution;
- c) carrying out dynamic nuclear polarisation on the frozen solution to obtain a frozen solution comprising the hyperpolarised sample; and
- d) optionally liquefying and neutralizing the frozen solution obtained in step c).

3. claims: 1-9, 16(partially)

Composition comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is a carboxylate salt of an amino acid, as far as not comprised in invention 1.

Method of producing a hyperpolarised amino acid according to claims 10 to 12 as far as not comprised in invention 1, the method comprising

- a) preparing a solution comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is a carboxylate salt of an amino acid;
- b) freezing the solution;
- c) carrying out dynamic nuclear polarisation on the frozen solution to obtain a frozen solution comprising the hyperpolarised sample; and
- d) optionally liquefying and neutralizing the frozen solution obtained in step c).

4. claims: 1, 3-9, 16(partially)

International Application No. PCT/EP2009/051172

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Composition comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is a sulphonate salt of an aminosulphonic acid, as far as not comprised in invention 1.

Method of producing a hyperpolarised aminosulphonic acid according to claims 10 to 12 as far as not comprised in invention 1, the method comprising

- a) preparing a solution comprising a sample, a DNP agent and optionally a paramagnetic metal ion, wherein the sample is a sulphonate salt of an aminosulphonic acid;
- b) freezing the solution;
- c) carrying out dynamic nuclear polarisation on the frozen solution to obtain a frozen solution comprising the hyperpolarised sample; and
- d) optionally liquefying and neutralizing the frozen solution obtained in step c).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/051172

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007052274	A2	10-05-2007	AU 2006310100 A1 CA 2628608 A1 EP 1948248 A2 JP 2009514946 T US 2008287774 A1	10-05-2007 10-05-2007 30-07-2008 09-04-2009 20-11-2008
WO 2007069909	A2	21-06-2007	CN 101378784 A EP 1962912 A2 JP 2009519329 T US 2008292551 A1	04-03-2009 03-09-2008 14-05-2009 27-11-2008
WO 2007111515	A2	04-10-2007	CN 101415446 A EP 1998813 A2 JP 2009531422 T	22-04-2009 10-12-2008 03-09-2009
WO 2005024440	A2	17-03-2005	CA 2577909 A1 US 2005107696 A1	17-03-2005 19-05-2005
WO 03023432	A1	20-03-2003	AU 2002326217 B2 CA 2456726 A1 CN 1554028 A EP 1425596 A1 JP 2005502404 T US 2004171928 A1	26-10-2006 20-03-2003 08-12-2004 09-06-2004 27-01-2005 02-09-2004
WO 2007064226	A2	07-06-2007	AU 2006321057 A1 CA 2628539 A1 EP 1954321 A2 JP 2009517688 T KR 20080072692 A US 2008260649 A1	07-06-2007 07-06-2007 13-08-2008 30-04-2009 06-08-2008 23-10-2008
WO 2008086534	A1	17-07-2008	NONE	
WO 2008026937	A1	06-03-2008	CN 101506179 A EP 2057131 A1 KR 20090042821 A	12-08-2009 13-05-2009 30-04-2009

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 カールソン, マグナス

スウェーデン、エスーエスイー 2 1 2 ・ 4 3 ・ マルモ、ライッタレガタン、1 番シー

(72)発明者 ジェンセン, ペルニル・アール

デンマーク、ディーケー 2 2 0 0 ・ コペンハーゲン・エン、4、オディンス・ツヴェルガデ、5 番

Fターム(参考) 4C085 HH07 JJ01 KA28 KA30 KB44 KB52

4C096 AA11 AB04 FC14