



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101932340 A

(43) 申请公布日 2010.12.29

(21) 申请号 200980103777.8 *A61K 49/18*(2006.01)
(22) 申请日 2009.02.03 *A61K 49/20*(2006.01)
(30) 优先权数据 *G01N 33/50*(2006.01)
08002001.9 2008.02.04 EP
(85) PCT申请进入国家阶段日
2010.08.03
(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2009/051172 2009.02.03
(87) PCT申请的公布数据
W02009/098191 EN 2009.08.13
(71) 申请人 通用电气健康护理有限公司
地址 英国白金汉郡
(72) 发明人 M·H·莱彻 M·卡尔森
P·R·詹森
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 李志东 艾尼瓦尔
(51) Int. Cl.
A61K 49/10(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 16 页

(54) 发明名称
生产超极化的氨基酸和氨基磺酸的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于生产超极化的氨基酸和氨基磺酸的动态核极化(DNP)方法,和用于该方法中的组合物。作为例子,使用氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐、氨基磺酸的磺酸盐或其混合物。

1. 包含样品、DNP 试剂和任选地顺磁金属离子的组合物,其中所述样品是氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐、氨基磺酸的磺酸盐或其混合物。

2. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述样品是氨基酸的铵盐或氨基酸的羧酸盐或其混合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 的组合物,其中所述氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐是氯化铵盐和 / 或所述氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐是羧酸钠盐或磺酸钠盐。

4. 根据权利要求 1-3 的组合物,其中所述样品在 MR 活性核中同位素地富集,优选在 ^{13}C 和 / 或 ^{15}N 中同位素地富集。

5. 根据权利要求 1-4 的组合物,其中所述组合物另外包含溶剂或溶剂和 / 或玻璃形成体的混合物。

6. 根据权利要求 1-5 的组合物,其中所述 DNP 试剂是稳定的基于氧的、基于硫的或基于碳的三苯甲基基团。

7. 根据权利要求 1-6 的组合物,其包含顺磁金属离子。

8. 根据权利要求 1-7 的组合物,用于通过动态核极化生产超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸的方法中。

9. 根据权利要求 1-8 的组合物,其中所述样品是超极化样品。

10. 超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物。

11. 根据权利要求 11 的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物,它在 MR 活性核中同位素地富集,优选在 ^{13}C 和 / 或 ^{15}N 中同位素地富集。

12. 通过动态核极化得到的根据权利要求 10-11 的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物。

13. 用于体外或体内 MR 检测的成像介质中的根据权利要求 10-12 的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物。

14. 用于体外 MR 检测的成像介质,其包含权利要求 10-12 的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物,和与体外细胞或组织试验相容且使用的溶剂,优选水性载体、更优选水或 DMSO 或甲醇,或包含水性载体和非水性溶剂的溶剂混合物。

15. 用于体内 MR 检测的成像介质,其包含权利要求 10-12 的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物和水性载体,优选生理上可耐受的和药学上接受的水性载体、更优选水、缓冲液或盐水。

16. 生产权利要求 10-12 的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物的方法,该方法包含:

a) 制备包含样品、DNP 试剂和任选地顺磁金属离子的溶液,其中所述样品是氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐、氨基磺酸的磺酸盐或其混合物;

b) 冷冻该溶液;

c) 对冷冻溶液进行动态核极化,得到包含超极化样品的冷冻溶液;和

d) 任选地液化和中和在步骤 c) 中得到的冷冻溶液。

生产超极化的氨基酸和氨基磺酸的方法

[0001] 本发明涉及用于生产超极化的氨基酸和氨基磺酸的动态核极化 (DNP) 方法, 和用于该方法中的组合物。

[0002] 磁共振 (MR) 成像 (MRI) 是已经变成对医师特别有吸引力的技术, 因为可以以非侵入方式获得患者身体或其部分的图像, 且不需要将患者和医务人员暴露于潜在有害的辐射例如 X 射线。因为它的高质量图像和良好空间和时间分辨力, MRI 是用于使软组织和器官成像的良好成像技术。

[0003] 可以使用或不使用 MR 造影剂进行 MRI。但是, 对比度提高的 MRI 通常能检测许多更小的组织变化, 这使它成为用于检测早期组织变化 (例如, 小肿瘤或转移灶) 的有力工具。

[0004] 几类造影剂已经用于 MRI。水溶性的顺磁金属螯合物, 例如钆螯合物如 Omniscan™ (GE Healthcare), 是广泛使用的 MR 造影剂。因为它们的低分子量, 当施用进脉管系统时, 它们迅速分布进细胞外间隙 (即血液和间质)。它们也相对迅速地从身体清除。

[0005] 另一方面, 血池 MR 造影剂, 例如超顺磁的氧化铁颗粒, 在脉管系统内长时间停留。已经证实它们对于增强肝中的对比度和检测毛细血管通透性异常 (例如肿瘤中“有漏隙的”毛细血管壁, 它们是肿瘤血管发生的结果) 是非常有用的。

[0006] 尽管前述造影剂具有无可争议的优良性质, 它们的使用不是没有任何风险。虽然顺磁金属螯合物通常具有高稳定性常数, 有毒的金属离子可能在施用后释放在体内。此外, 这些类型的造影剂显示出较差的特异性。

[0007] WO-A-99/35508 公开了使用超极化的高 T_1 试剂溶液作为 MRI 造影剂对患者进行 MR 研究的方法。术语“超极化”是指增强高 T_1 试剂中存在的 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。增强 NMR 活性核的核极化后, 这些核的激发的和基础的核自旋状态之间的群体差异显著提高, 由此使 MR 信号强度放大数百或更高的因子。当使用超极化的 ^{13}C - 和 / 或 ^{15}N - 富集的高 T_1 试剂时, 基本上不存在来自背景信号的干扰, 因为 ^{13}C 和 / 或 ^{15}N 的天然丰度是可忽略的, 因而图像对比度有利地提高。常规 MRI 造影剂和这些超极化的高 T_1 试剂之间的主要差异是, 在前者中, 对比度的变化是通过影响水质子在体内的弛豫时间来实现, 而后一类试剂可以视作非放射性示踪剂, 因为得到的信号仅仅源自试剂。

[0008] 在 WO-A-99/35508 中公开了许多种可能用作 MR 成像剂的高 T_1 试剂, 包括非内源性的和内源性的化合物。作为后者的实例, 可以提及正常代谢循环中的中间体, 据称它们优选地用于对代谢活性成像。通过体内代谢活性成像, 可以得到组织的代谢状态的信息, 所述信息可以例如用于辨别健康的和患病的组织。

[0009] 例如丙酮酸盐是在柠檬酸循环中起作用的化合物, 超极化的 ^{13}C - 丙酮酸盐向它的代谢产物超极化的 ^{13}C - 乳酸盐、超极化的 ^{13}C - 碳酸氢盐和超极化的 ^{13}C - 丙氨酸的转化, 可以用于人体中的代谢过程的体内 MR 研究。

[0010] 超极化的 ^{13}C - 丙酮酸盐向它的代谢产物超极化的 ^{13}C - 乳酸盐、超极化的 ^{13}C - 碳酸氢盐和超极化的 ^{13}C - 丙氨酸的代谢转化, 可以用于人体中的代谢过程的体内 MR 研究, 因为已经发现所述转化快得足以实现来自母体化合物 (即超极化的 $^{13}\text{C}_1$ - 丙酮酸盐) 和它的代

谢产物的信号检测。丙氨酸、碳酸氢盐和乳酸盐的量依赖于要研究的组织的代谢状态。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信号强度与这些化合物的量和在检测时剩余的极化程度有关,因此通过监视超极化的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,可能使用非侵入的磁共振成像和/或磁共振波谱分析,体内地研究人或非人动物体内的代谢过程。

[0011] 从不同丙酮酸盐代谢产物产生的MR信号振幅随组织类型而异。由丙氨酸、乳酸盐、碳酸氢盐和丙酮酸盐形成的独特代谢峰图案,可以用作检查的组织的代谢状态的指纹。

[0012] 超极化的¹³C-丙酮酸盐可以例如用作MR成像剂,用于通过MR成像评估心肌组织的活力(在WO-A-2006/054903中详述)和用于体内肿瘤成像(在WO-A-2006/011810中详述)。

[0013] 但是,适合作为体内成像剂的超极化的¹³C-丙酮酸盐的生产面临挑战。超极化的¹³C-丙酮酸盐优选地通过¹³C-丙酮酸或¹³C-丙酮酸盐的动态核极化(DNP)来得到,这详细描述在WO-A1-2006/011809中,它通过参考引用并入本文。

[0014] ¹³C-丙酮酸的应用,简化了极化过程,因为它在冷冻/冷却后不结晶(结晶导致低动态核极化或根本不极化)。结果不需要溶剂和/或玻璃形成体来制备用于DNP过程的组合物,因而可以使用高浓度的¹³C-丙酮酸样品。但是,由于它的低pH,需要使用在强酸中稳定的DNP试剂。此外,极化成超极化的¹³C-丙酮酸盐后,需要用强碱溶解和转化固态超极化的¹³C-丙酮酸。强丙酮酸和强碱都需要小心选择材料(例如溶解介质容器,试管,等)、接触的化合物。

[0015] 或者,¹³C-丙酮酸盐可以用于DNP过程。不幸地,¹³C-丙酮酸钠在冷冻/冷却后结晶,这使得加入玻璃形成体成为必要。如果要超极化的¹³C-丙酮酸盐用作体内成像剂,含有丙酮酸盐和玻璃形成体的组合物中的丙酮酸盐浓度不利地低。另外,对于体内应用,也可能需要去除玻璃形成体。

[0016] 因而,优选的可以用于DNP的盐是,包含来自下述的无机阳离子的那些¹³C-丙酮酸盐: NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} 和 Ba^{2+} ,优选 NH_4^+ , K^+ , Rb^+ 或 Cs^+ 、更优选 K^+ , Rb^+ , Cs^+ 和最优选 Cs^+ ,这详细描述在PCT/N007/00109。这些盐中的大多数不是可商业获得的,需要分别合成。此外,如果将超极化的¹³C-丙酮酸盐用于体内MR成像,优选地用生理上耐受非常好的阳离子如 Na^+ 或葡甲胺交换来自下述的无机阳离子: NH_4^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 。因此,在溶解固态超极化的¹³C-丙酮酸盐后,需要一个额外的步骤,在这期间极化会衰退。

[0017] 其它优选的盐是有机胺或氨基化合物的¹³C-丙酮酸盐,优选TRIS-¹³C₁-丙酮酸盐或葡甲胺-¹³C₁-丙酮酸盐,这详细描述在WO-A-2007/069909。这些盐也需要分别合成。

[0018] 因此,需要替代性的超极化的成像剂,其可以用于获得关于代谢活性的信息。

[0019] 在蛋白代谢中,蛋白被蛋白酶分解成它们的组分氨基酸。这些氨基酸进入细胞,并通过进入柠檬酸循环,成为能量的来源。此外,氨基酸在体内的几个代谢途径中用于生物合成其它(非标准的)氨基酸,例如鸟氨酸循环中的瓜氨酸等氨基酸,或其它各种其它化合物,例如从酪氨酸生物合成儿茶酚胺,从色氨酸生物合成烟酸等维生素,或从甘氨酸生物合成卟啉。因此,氨基酸是重要的代谢标志物,超极化的氨基酸可以是用于得到关于代谢活性的信息的试剂。

[0020] 我们现在已经发现了通过动态核极化(DNP)生产超极化的氨基酸的方法。利用所

述方法,可以得到高浓度的超极化的氨基酸样品。这是重要的,因为超极化的氨基酸要作用于体内 MR 检测(例如 MR 成像或磁共振波谱分析或 MR 波谱成像)的试剂,所述氨基酸需要在高浓度施用给患者,即在极化过程中必须使用高度浓缩的样品。此外,通过本发明的方法得到的氨基酸是高度极化的,即表现出高水平的极化。

[0021] 必须强调,由于弛豫和给患者身体施用后稀释,超极化的成像剂的信号会衰退。因此,极化水平越高,当它到达患者体内的靶位时从试剂得到的 MR 信号越高。

[0022] 因而,在第一个方面,本发明提供了生产超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物的方法,该方法包含:

[0023] a) 制备包含样品、DNP 试剂和任选地顺磁金属离子的溶液,其中所述样品是氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐、氨基磺酸的磺酸盐或其混合物;

[0024] b) 冷冻该溶液;

[0025] c) 对冷冻溶液进行动态核极化,得到包含超极化样品的冷冻溶液;和

[0026] d) 任选地液化和中和在步骤 c) 中得到的冷冻溶液。

[0027] 通过本发明的方法得到的超极化的氨基酸和 / 或氨基磺酸可以用于 MR- 检测方法。术语“MR 检测”是指体外和体内 MR 检测,表示体外固态或液态 N 磁共振波谱分析,磁共振成像或磁共振波谱分析或组合的磁共振成像和磁共振波谱分析,即 MR 波谱成像。该术语另外表示在不同时间点的 MR 波谱成像。

[0028] 术语“超极化的”和“极化的”在下文中互换地使用,表示超过 0.1%、更优选超过 1% 和最优选超过 10% 的核极化水平。

[0029] 极化水平可以例如通过冷冻的超极化样品中的 NMR 核的固态 NMR 测量来测定。例如,如果超极化样品中的 NMR 活性核是 ^{13}C , 进行固态 ^{13}C -NMR 测量。固态 ^{13}C -NMR 测量优选地包含使用低翻转角单脉冲获取 NMR 序列。将 ^{13}C -NMR 波谱中超极化样品的信号强度与在 DNP 极化过程之前获取的 ^{13}C -NMR 波谱中样品的信号强度相对比。然后,从极化之前和之后的信号强度比计算极化水平。

[0030] 以类似的方式,通过液态超极化样品中 NMR 活性核的液态 NMR 测量,可以测定液态超极化样品的极化水平。再将液态超极化样品的信号强度与极化之前液态样品的信号强度相对比。然后,从极化之前和之后的信号强度比计算极化水平。

[0031] 术语“样品”表示氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐、氨基磺酸的磺酸盐或其混合物。

[0032] 术语“氨基酸”在本发明的上下文中表示包含至少一个氨基和至少一个羧基的化学个体。所述至少一个氨基可以是伯氨基、仲氨基或叔氨基。根据本发明的氨基酸的一个实例是包含一个氨基和一个羧基的化学个体。在一个实施方案中,所述一个氨基和所述一个羧基结合在同一个碳原子上,实例是 α -氨基酸如标准的或蛋白源性的 (proteogenic) 氨基酸,例如丙氨酸,甘氨酸,亮氨酸,蛋氨酸或半胱氨酸。D- 和 L- 异构体都可以用于本发明的方法中。该实施方案的其它实例是非标准的氨基酸如肌氨酸 (N- 甲基甘氨酸), 高半胱氨酸或甜菜碱 (三甲基甘氨酸)。在另一个实施方案中,所述一个氨基和所述一个羧基结合在不同碳原子上,该实施方案的实例是 GABA (γ -氨基丁酸) 或氨基乙酰丙酸。在另一个实施方案中,在本发明的方法中使用的氨基酸包含超过一个氨基和 / 或超过一个羧基。实例是精氨酸,赖氨酸,天冬酰胺,鸟氨酸,谷氨酰胺,瓜氨酸,肌酸,谷氨酸,天冬氨酸或精氨基

琥珀酸。

[0033] 术语“氨基磺酸”在本发明的上下文中表示包含至少一个氨基和至少一个磺基（即 $-S(O)_2OH$ 基团）的化学个体。所述至少一个氨基可以是伯氨基、仲氨基或叔氨基。氨基磺酸的实例是 1- 哌啶磺酸，N-(2- 乙酰胺基)-2- 氨基乙烷磺酸，1,4- 哌嗪 - 双乙烷磺酸，3-(N- 吗啉代) 丙烷磺酸，2-(N- 吗啉代) 乙烷磺酸或牛磺酸 (2- 氨基乙烷磺酸)。

[0034] 术语“氨基酸的铵盐”和“氨基磺酸的铵盐”表示包含氨基酸的铵离子或氨基磺酸的铵离子作为阳离子的盐。例如，如果使用本发明的方法来生产超极化的丙氨酸，在步骤 a) 中可以制备包含丙氨酸的铵盐的溶液，其中所述铵盐包含丙氨酸铵 (alaninium) 作为阳离子，即 $H_3N^+-C(CH_3)(H)-COOH$ 。此外，例如，如果使用本发明的方法来生产超极化的牛磺酸，在步骤 a) 中可以制备包含牛磺酸的铵盐的溶液，其中所述铵盐包含牛磺酸铵 (taurinium) 作为阳离子，即 $H_3N^+-CH_2-CH_2-S(O)_2-OH$ 。

[0035] 术语“氨基酸的羧酸盐”表示包含所述氨基酸的羧酸盐作为阴离子的盐。术语“氨基磺酸的磺酸盐”表示包含所述氨基磺酸的磺酸盐作为阴离子的盐。例如，如果使用本发明的方法来生产超极化的丙氨酸，即 2- 氨基丙酸，在步骤 a) 中可以制备包含丙氨酸的羧酸盐的溶液，其中所述羧酸盐包含 2- 氨基丙酸盐作为阴离子。例如，如果使用本发明的方法来生产超极化的牛磺酸，即 2- 氨基乙烷磺酸，在步骤 a) 中可以制备包含牛磺酸的磺酸盐的溶液，其中所述磺酸盐包含 2- 氨基乙烷磺酸盐作为阴离子。

[0036] 尽管以单数形式书写，术语“氨基酸的铵盐”、“氨基磺酸的铵盐”、“氨基酸的羧酸盐”和“氨基磺酸的磺酸盐”表示单一化学个体或几种不同的化学个体。因而，单一化学个体是例如某种氨基酸的铵盐或羧酸盐或某种氨基磺酸的铵盐或磺酸盐。几种不同的化学个体是例如几种不同氨基酸的铵盐或羧酸盐或几种不同氨基磺酸的铵盐或磺酸盐。在下面的段落中用氨基酸对此加以解释，但是同样适用于氨基磺酸。

[0037] 因而，作为一个实例，丙氨酸是某种氨基酸，本发明的方法可以用于生产超极化的丙氨酸，其中在步骤 a) 中制备包含丙氨酸的铵盐或丙氨酸的羧酸盐的溶液。某种氨基酸的另一个实例是 GABA，本发明的方法可以用于生产超极化的 GABA，其中在步骤 a) 中制备包含 GABA 的铵盐或 GABA 的羧酸盐的溶液。此外，作为一个实例，丙氨酸和 GABA 是几种不同的氨基酸，本发明的方法可以用于生产超极化的丙氨酸和超极化的 GABA 的混合物，其中在步骤 a) 中制备包含 GABA 的铵盐和丙氨酸的铵盐或 GABA 的羧酸盐和丙氨酸的羧酸盐的溶液。

[0038] 与上面提供的定义相一致，术语“或其混合物”表示某种氨基酸或几种不同氨基酸的铵盐或羧酸盐和某种氨基磺酸或几种不同氨基磺酸的铵盐或磺酸盐的混合物。在下面的段落中对此加以解释。

[0039] 混合物在本发明的上下文中是例如下述的：

[0040] i) 丙氨酸的铵盐和牛磺酸的铵盐的混合物

[0041] ii) 丙氨酸的铵盐和 GABA 的铵盐和牛磺酸的铵盐和 1- 哌啶磺酸的铵盐的混合物

[0042] iii) 丙氨酸的羧酸盐和牛磺酸的磺酸盐的混合物

[0043] iv) 丙氨酸的羧酸盐和 GABA 的羧酸盐和牛磺酸的磺酸盐和 1- 哌啶磺酸的磺酸盐的混合物

[0044] v) 丙氨酸的铵盐和牛磺酸的磺酸盐的混合物

[0045] vi) 丙氨酸的羧酸盐和牛磺酸的铵盐的混合物

[0046] vii) 丙氨酸的铵盐和 GABA 的羧酸盐和牛磺酸的铵盐和 1- 哌啶磺酸的磺酸盐的混合物

[0047] viii) 丙氨酸的羧酸盐和 GABA 的铵盐和牛磺酸的磺酸盐和 1- 哌啶磺酸的铵盐的混合物。

[0048] 在一个优选的实施方案中, 本发明的方法用于生产一种超极化的氨基酸或几种超极化的氨基酸的混合物或一种超极化的氨基磺酸或几种超极化的氨基磺酸的混合物。

[0049] 在一个更优选的实施方案中, 本发明的方法用于生产超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸。

[0050] 优选地, 本发明的方法用于生产超极化的氨基酸、更优选超极化的 α -氨基酸。

[0051] 在本发明的方法中使用的氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐是可商业获得的化合物, 例如许多 α -氨基酸可商业获得它们的 HCl- 或 HBr- 盐。或者, 在本发明的方法中使用的氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐通常可以通过使氨基酸或氨基磺酸与酸反应来得到。原则上, 具有比氨基酸中的羧基或氨基磺酸中的磺基更低的 pKa 的任意酸, 都可以用于将这些化合物转化成它们的铵盐。如果用于得到这些铵盐的酸的反荷离子较大和 / 或是亲脂的, 可能妨碍氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐的溶解度。优选的酸是强酸, 更优选强无机酸如盐酸 (HCl), 氢溴酸 (HBr), 氢碘酸 (HI) 或硫酸 (H_2SO_4)。最优选的酸是 HCl, 因为它廉价且容易获得。通过使氨基酸或氨基磺酸与 HCl 反应, 得到氯化铵, 其优选用于体内 MR, 因为人或非人动物体对氯化物的耐受性较好。但是, 如果为了某种原因使用耐受性不太好的阴离子, 可以在本发明方法的步骤 d) 之后或同时, 通过本领域已知的方法, 例如使用阴离子交换柱, 用生理上耐受性较好的阴离子如氯化物交换所述阴离子。一种这样的原因是, 使用用于制备铵盐的特定酸, 可以得到具有更高的浓度和 / 或更高的极化水平的样品。作为使用氢碘酸的一个实例, 可以得到非常高浓度的样品, 但是当考虑生理耐受性时, 碘化物不是优选的阴离子。因此, 可以用具有更好生理耐受性的阴离子例如氯化物交换所述碘化物。

[0052] 在本发明的方法中, 如果氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐不是可商业获得的化合物, 可以制备并分离它, 或原位制备且分离得到的铵盐。在制备步骤 a) 的溶液之前分离铵盐的优点是, 可以表征分离的盐, 且可以确定多少氨基酸 / 氨基磺酸实际上转化成铵盐。此外, 如果使用制备铵盐以外的其它溶剂来制备步骤 a) 的溶液, 优选地也分离铵盐。

[0053] 在本发明的方法中使用的氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐通常可以通过使氨基酸或氨基磺酸与碱反应来得到。原则上, 碱性比所述氨基酸或氨基磺酸中的氨基更强的任意碱可以用于将这些化合物转化成它们各自的羧酸盐和磺酸盐。如果用于得到这些羧酸盐或磺酸盐的酸的反荷离子较大和 / 或是亲脂的, 也可能妨碍羧酸盐或磺酸盐的溶解度。优选的碱是无机碱, 更优选碱金属或碱土金属氢氧化物的水溶液, 如氢氧化钠 (NaOH)、氢氧化钾 (KOH)、氢氧化铯 (CsOH)、氢氧化钙 ($Ca(OH)_2$) 或氢氧化锶 ($Sr(OH)_2$) 的水溶液。最优选的碱是 NaOH, 因为它廉价且容易得到。通过使氨基酸或氨基磺酸与 NaOH 反应, 得到羧酸钠或磺酸钠, 它们优选地用于体内 MR, 因为人或非人动物体对钠离子的耐受性非常好。但是, 如果为了某种原因使用耐受性不太好的阳离子, 可以在本发明方法的步骤 d) 之后或同时, 通过本领域已知的方法, 例如使用阳离子交换柱, 用生理上耐受性非常好的阳离子如 Na^+ 或葡甲胺阳离子交换所述阳离子。一种这样的原因是, 使用用于制备羧酸盐或磺酸盐的特殊碱, 可以得到更高浓度的样品和 / 或更高的极化水平。

[0054] 在本发明的方法中,可以制备并分离氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐,或原位制备且不分离得到的羧酸盐/磺酸盐。在制备步骤 a) 的溶液之前分离盐的优点是,可以表征分离的盐,且可以确定多少氨基酸/氨基磺酸实际上转化成羧酸盐/磺酸盐。此外,如果使用制备羧酸盐/磺酸盐以外的其它溶剂来制备步骤 a) 的溶液,优选地也分离羧酸盐/磺酸盐。

[0055] 在本发明的方法中使用的氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐和氨基磺酸的磺酸盐可以在 MR 活性核(如 ^{13}C 和 / 或 ^{15}N) 中同位素地富集或不如此。如果通过本发明的方法得到的超极化的氨基酸或氨基磺酸是用于体内 MR, MR 活性核同位素富集是优选的。

[0056] 在本发明的方法中使用的氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐和氨基磺酸的磺酸盐可以仅在该分子中的一个位置同位素地富集,优选富集度为至少 10%、更合适地至少 25%、更优选至少 75% 和最优选至少 90%。理想地,富集度为 100%。

[0057] 优选地,所述氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐和氨基磺酸的磺酸盐是 ^{13}C 和 / 或 ^{15}N - 富集的。

[0058] 同位素富集的最佳位置依赖于 NMR 活性核的弛豫时间。优选地,在本发明的方法中使用的氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐和氨基磺酸的磺酸盐是在具有长 T_1 弛豫时间的位置同位素地富集。对于 ^{13}C - 富集,这样的位置是羧基 -C- 原子、羰基 -C- 原子或季 C- 原子,羧基 -C- 原子是优选的。对于 ^{15}N - 富集,这样的位置优选不直接偶联质子,因此叔胺是优选的。

[0059] 同位素富集可以例如通过化学合成或生物标记来实现,两种方法都是本领域已知的,根据要同位素地富集的特定磺酸盐,可以选择适当的方法。

[0060] 在本发明的方法中使用铵盐(在下文中也称作酸性制品)还是羧酸盐/磺酸盐(在下文中也称作碱性制品)取决于几个因素。

[0061] 显然,如果要极化的氨基酸或氨基磺酸不能耐受酸性(碱性)条件,例如在这样的条件下化学不稳定,碱性(酸性)制品是选项。

[0062] 对于 α -氨基酸,在 pH 大于 7 的溶液(即碱性溶液)中观察到高弛豫率和因此丧失极化。因而,如果 α -氨基酸的碱性制品用于 DNP,需要小心地进行固态超极化的 α -氨基酸的液化,以避免丧失极化。这意味着,碱性制品需要在液化后迅速中和,或同时中和/液化。但是我们观察到,碱性制品通常更容易制备和处理,例如在冷冻前处理。在影响极化的 α -氨基酸的弛豫率方面,酸性制品不太关键,这样的酸性制品可以在液化后的任意时间进行 pH 调节。

[0063] 如上所述,本发明的方法是通过动态核极化(DNP)生产超极化的氨基酸或氨基磺酸的方法。在 DNP 中,要极化的化合物中 MR 活性核的极化受到极化剂或所谓的 DNP 试剂(包含未成对电子的化合物)的影响。在 DNP 过程中,提供能量,通常以微波辐射的形式,它最初激发 DNP 试剂。衰退到基础状态后,极化从 DNP 试剂的未成对电子转移至要极化的化合物的 NMR 活性核,例如样品中的 NMR 活性核如 ^{13}C 和 / 或 ^{15}N 核,即氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐和氨基磺酸的磺酸盐。通常,在 DNP 过程中使用中等或高磁场和非常低的温度,例如通过在液态氦和约 1T 或以上的磁场中进行 DNP 过程。或者,可以采用中等磁场和能够实现充分的极化增强的任意温度。DNP 技术进一步描述在例如 WO-A-98/58272

和 WO-A-01/96895 中,它们二者通过参考引用并入本文。

[0064] 通常,为了通过 DNP 方法极化化学个体即化合物,制备要极化的化合物和 DNP 试剂的组合物,然后任选地冷冻,并插入 DNP 偏振器(如果以前没有冷冻,则在这里冷冻)进行极化。极化后,通过熔化它或通过把它溶于合适的溶解介质中,将冷冻的固态超极化的组合物迅速转化成液态。溶解是优选的,冷冻的超极化的组合物的溶解过程和使用的合适的装置详细描述在 WO-A-02/37132 中。熔化过程和适用于熔化的装置描述在例如 WO-A-02/36005 中。

[0065] 为了在要极化的化合物中得到高极化水平,所述化合物和 DNP 试剂需要在 DNP 过程中密切接触。这不适用于组合物在冷冻或冷却后结晶的情况。为了避免结晶,需要在组合物中存在玻璃形成体,或需要选择用于极化的化合物,其在冷冻后不结晶,但是形成玻璃。

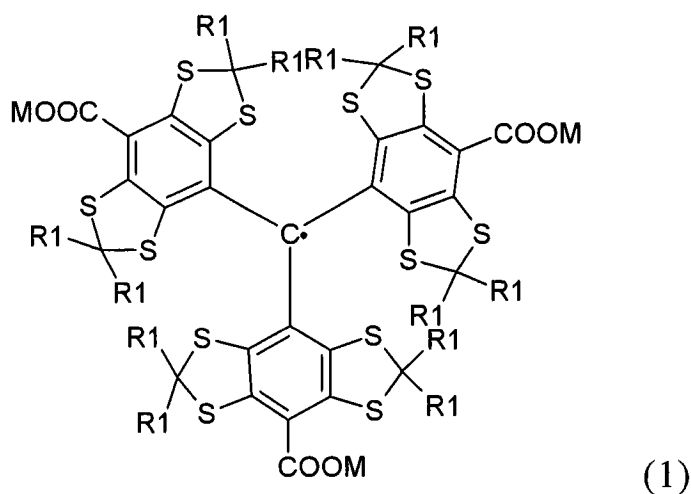
[0066] 术语“玻璃形成体”在本申请的上下文中是指一种化学化合物,其在加入溶液(例如根据本发明方法步骤 a)的溶液)中时,促进玻璃化并预防所述溶液在冷却或冷冻时结晶。在本发明的上下文中优选的玻璃形成体的实例是二醇,即含有至少 2 个羟基的醇,例如乙二醇、丙二醇,和甘油或 DMSO。

[0067] DNP 试剂在 DNP 过程中起决定作用,因为它的选择对在样品(即氨基酸或氨基磺酸)中可以实现的极化水平具有重大影响。已知许多种 DNP 试剂,在 WO-A-99/35508 中称作“OMRI 造影剂”,如过渡金属例如铬(V)离子、磁性颗粒或有机自由基例如氧化亚氮基团或三苯甲基基团。在 WO-A-99/35508、WO-A-88/10419、WO-A-90/00904、WO-A-91/12024、WO-A-93/02711 或 WO-A-96/39367 中所述的基于氧的、基于硫的或基于碳的稳定的三苯甲基基团的应用,已经在许多不同的化学个体中产生高水平的极化。

[0068] 在本发明方法的一个优选的实施方案中,三苯甲基基团用作 DNP 试剂。如上面简单提到的,通过邻近电子拉莫尔频率的微波辐射,DNP 试剂(例如三苯甲基基团)的大电子自旋极化转化成样品中 NMR 活性核的核自旋极化。通过 e-e 和 e-n 跃迁,微波刺激电子和核自旋系统之间的交流。对于有效的 DNP,即为了在样品中实现高水平的极化,三苯甲基基团必须在样品中或在样品溶液中稳定且可溶,以实现所述样品和三苯甲基基团之间的亲密接触,这是前述电子和核自旋系统之间的交流所必需的。

[0069] 在一个优选的实施方案中,三苯甲基基团是式(1)的基团

[0070]



[0071] 其中

[0072] M 代表氢或一价阳离子 ;且

[0073] R1 可以相同或不同,代表任选地被一个或多个羟基取代的直链或支链 C_1-C_6 - 烷基,或基团 $-(CH_2)_n-X-R_2$,

[0074] 其中 n 是 1,2 或 3 ;

[0075] X 是 O 或 S ;且

[0076] R2 是任选地被一个或多个羟基取代的直链或支链 C_1-C_4 - 烷基。

[0077] 在一个优选的实施方案中,M 代表氢或一价生理上可耐受的阳离子。术语“生理上可耐受的阳离子”表示可被人或非人动物活体耐受的阳离子。优选地, M 代表氢或碱阳离子、铵离子或有机胺离子例如葡甲胺。最优选地, M 代表氢或钠。

[0078] 在另一个优选的实施方案中,R1 优选地相同,更优选直链或支链 C_1-C_4 - 烷基,最优选甲基、乙基或异丙基 ;或 R1 优选地相同,更优选被一个羟基取代的直链或支链 C_1-C_4 - 烷基,最优选 $-CH_2-CH_2-OH$;或 R1 优选地相同,代表 $-CH_2-OC_2H_4OH$ 。

[0079] 可以合成前述的式 (1) 的三苯甲基基团,详细描述在 WO-A-88/10419, WO-A-90/00904, WO-A-91/12024, WO-A-93/02711, WO-A-96/39367, WO-A-97/09633, WO-A-98/39277 和 WO-A-2006/011811。

[0080] 在本发明方法的步骤 a) 中,制备样品和 DNP 试剂的溶液。需要使用溶剂或溶剂混合物来促进 DNP 试剂和样品的溶解。如果要超极化的氨基酸或氨基磺酸作用于体内 MR 检测的成像剂,优选地将溶剂的量维持在最小。为了用作体内成像剂,通常以相对较高的浓度施用极化的氨基酸或氨基磺酸,即在本发明方法的步骤 c) 中高浓度的样品是优选的,因此当在步骤 a) 中制备溶液时,优选地将溶剂的量保持在最小。在该上下文中,也重要地提到,含有样品、DNP 试剂、溶剂和任选地顺磁金属离子的组合物的质量维持尽可能小。高质量对溶解过程的效率具有不利影响,如果使用溶解来将 DNP 过程后含有超极化样品的固态组合物转化成液态,例如使用超极化的氨基酸或氨基磺酸作为用于体内 MR 检测的成像剂。这是由于下述事实,即在溶解过程中对于给定体积的溶解介质,当组合物质量增加时,组合物与溶解介质的质量比降低。此外,在将用作 MR 成像剂的超极化的氨基酸或氨基磺酸施用给人或非人动物之前,可能需要去除使用的某些溶剂,因为所述某些溶剂可能不是生理上可耐受的。

[0081] 如果在本发明的方法中使用的样品是氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐,所述盐可以是可商业获得的盐,其溶解在合适的溶剂中,优选水或玻璃形成体如甘油或二醇,或水和玻璃形成体的混合物。如果样品不是可商业获得的盐,优选地在用于制备步骤 a) 的溶液之前制备和分离。作为一个实例, $^{13}C_1$ - 丙氨酸的铵盐,即在位置 1 的碳原子(羧基碳)是 ^{13}C 富集的丙氨酸,可以如下制备:将酸例如盐酸加入 $^{13}C_1$ - 丙氨酸,任选地在有溶剂例如乙醇存在下。得到的 $^{13}C_1$ - 丙氨酸的铵盐可以通过例如醚沉淀来分离,并干燥。然后将得到的氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐(例如 $^{13}C_1$ - 丙氨酸的铵盐, $^{13}C_1$ - 丙氨酸鎓氯化物)溶于合适的溶剂中,优选水或玻璃形成体如甘油或二醇,或水和玻璃形成体的混合物。DNP 试剂,优选三苯甲基基团、更优选式 (1) 的三苯甲基基团,可以加入溶解的氨基酸的铵盐或固体或在溶液中的氨基磺酸的铵盐。或者,将 DNP 试剂溶于合适的溶剂,优选水或玻璃形成体如甘油或二醇,或水和玻璃形成体的混合物,并将固体氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐加入溶解的 DNP 试剂。通过本领域已知的几种方式,例如搅拌、涡旋或声处理和 / 或轻轻加热,可以

促进化合物的亲密混合。

[0082] 如果在本发明的方法中使用的样品是氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐,所述可以是可商业获得的盐,其溶解在合适的溶剂中,优选水或玻璃形成体如甘油或二醇,或水和玻璃形成体的混合物。如果样品不是可商业获得的盐,优选地在原位制备,且不经分离地用于制备步骤 a) 的溶液。作为一个实例, $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的钠盐,即在位置 1 的碳原子(羧基碳)是 ^{13}C 富集的丙氨酸,可以如下制备:将碱例如 NaOH 的水溶液加入 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸,任选地在有溶剂例如水存在下。向得到的氨基酸的羧酸盐(例如 $^{13}\text{C}_1$ -甘氨酸的钠盐, $^{13}\text{C}_1$ -氨基乙酸钠)或氨基磺酸的磺酸盐中,加入固体 DNP 试剂,优选三苯甲基基团、更优选式 (1) 的三苯甲基基团。或者,将 DNP 试剂溶于合适的溶剂,优选水或玻璃形成体如甘油或二醇,或水和玻璃形成体的混合物,然后将溶解的 DNP 试剂加入得到的氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐。通过本领域已知的几种方式,例如搅拌、涡旋或声处理和 / 或轻轻加热,可以促进化合物的亲密混合。

[0083] 步骤 a) 的溶液可以另外包含顺磁金属离子。已经发现,顺磁金属离子的存在,可以在要通过 DNP 极化的化合物中导致提高的极化水平,详细描述在 WO-A2-2007/064226,它通过参考引用并入本文。

[0084] 术语“顺磁金属离子”表示处于它们的盐形式或螯合形式(即顺磁螯合物)的顺磁金属离子。后者是包含螯合剂和顺磁金属离子的化学个体,其中所述顺磁金属离子和所述螯合剂形成络合物,即顺磁螯合物。

[0085] 在一个优选的实施方案中,顺磁金属离子是包含 Gd^{3+} 的盐或顺磁螯合物,优选包含 Gd^{3+} 的顺磁螯合物。在一个更优选的实施方案中,所述顺磁金属离子在步骤 a) 的溶液中是可溶的且稳定的。

[0086] 象前述的 DNP 试剂一样,样品也必须与顺磁金属离子亲密接触。可以以几种方式得到包含样品、DNP 试剂和顺磁金属离子的溶液。

[0087] 在第一个实施方案中,将样品溶于合适的溶剂中,得到溶液,或者在如上所述合适的溶剂中原位制备样品。向样品的这些溶液中,加入并溶解 DNP 试剂。DNP 试剂,优选三苯甲基基团,可以作为固体或在溶液中加入,例如溶解在合适的溶剂中,优选水或玻璃形成体如甘油或二醇,或水和玻璃形成体的混合物。在一个随后的步骤中,加入顺磁金属离子。顺磁金属离子可以作为固体或在溶液中加入,例如溶解在合适的溶剂中,优选水或玻璃形成体如甘油或二醇,或水和玻璃形成体的混合物。在另一个实施方案中,将 DNP 试剂和顺磁金属离子溶解在合适的溶剂中,然后向该溶液加入固体或溶解在合适溶剂中的样品。在另一个实施方案中,将 DNP 试剂(或顺磁金属离子)溶于合适的溶剂中,加入任选地溶解的样品。在一个后续步骤中,将固体或在溶液中的顺磁金属离子(或 DNP 试剂)加入该溶液。优选地,使溶解顺磁金属离子(或 DNP 试剂)的溶剂的量保持最小。通过本领域已知的几种方式,例如搅拌、涡旋或声处理和 / 或轻轻加热,也可以促进化合物的亲密混合。

[0088] 如果使用三苯甲基基团作为 DNP 试剂,这样的三苯甲基基团在用于 DNP 的组合物中的合适浓度是 1-25mM,优选 2-20mM,更优选 10-15mM。如果将顺磁金属离子加入组合物中,这样的顺磁金属离子在组合物中的合适浓度是 0.1-6mM(金属离子),0.3-4mM 的浓度是优选的。

[0089] 在本发明的方法的步骤 a) 中制备溶液后,在步骤 b) 中冷冻所述溶液。通过本领域

域已知的方法可以冷冻溶液,例如通过在冷冻柜、在液氮中冷冻它,或通过简单地把它加入探针保持杯 (probe-retaining cup) (样品杯),并将样品杯置于 DNP 偏振器中,在这里液态氦会冷冻它。在一个实施方案中,将溶液冷冻成“珠子”,然后加入样品杯和插入偏振器。这样的珠子可以通过将溶液逐滴加入液氮中得到。已经观察到这样的珠子的更有效的溶解,如果要极化更大量的样品,这是特别相关的,例如当极化的氨基酸或氨基磺酸预期用于体内 MR 检测操作时。

[0090] 如果在组合物中存在顺磁金属离子,可以在冷冻前将所述组合物脱气,例如通过将氦气鼓泡穿过组合物 (例如 2-15min 的时间段),但是脱气可以通过其它已知的普通方法来实现。

[0091] 如以前提及的,重要的是,α-氨基酸的碱性制品的液化是 pH 控制的,以避免丧失极化。这可以如下实现,例如,在步骤 d) 中,在含有酸的溶解介质的辅助下,溶解冷冻的碱性制品,并同时中和所述碱性制品。或者,可以将所述酸加入探针保持杯,即在步骤 c) 的动态核极化过程中容纳步骤 b) 的冷冻溶液的杯子。这可以如下实现:在探针保持杯中冷冻本发明的方法步骤 b) 中的该溶液,将酸加到冷冻溶液的顶部,并冷冻该酸。或者,可以在探针保持杯中冷冻该酸,可以将在本发明的方法步骤 a) 中制备的溶液加到冷冻的酸的顶部,然后在步骤 b) 中冷冻。该操作导致中和所需的酸和碱性制品的亲密邻近,当在步骤 d) 中溶解冷冻溶液时,立即发生中和。

[0092] DNP 技术描述在例如 WO-A-98/58272 和 WO-A-01/96895 中,它们二者通过参考引用并入本文。通常,在 DNP 过程中使用中等或高磁场和非常低的温度,例如通过在液态氦和约 1T 或以上的磁场中进行 DNP 过程。或者,可以采用中等磁场和能够实现充分的极化增强的任意温度。在一个优选的实施方案中,在液态氦和约 1T 或以上的磁场中进行本发明的方法步骤 c) 中的 DNP 过程。合适的极化装置描述在例如 WO-A-02/37132。在一个优选的实施方案中,极化装置包含低温恒温器和极化装置,例如通过波导管连接微波源的微波室,所述波导管在周围被磁场产生装置例如超导磁体围绕的中心孔中。该孔垂直于向下延伸到至少接近超导磁体的区域 P 的水平,这里的磁场强度足够高,例如 1 至 25T,足以发生 NMR 活性样品核的极化。探针的孔 (即要极化的冷冻溶液) 优选地是可密封的,且可以抽真空至低压,例如 1mbar 量级或更低的压强。在孔内侧可以含有探针引导装置,例如可取出的运输管,该管可以从孔的顶部向下插入到区域 P 中微波室内侧的位置。区域 P 被液态氦冷却至低到足以发生极化的温度,优选 0.1-100K、更优选 0.5-10K,最优选 1-5K 量级的温度。探针引导装置优选在它的上末端是可以通过合适方式密封的,以在孔至保留部分真空。探针保持容器,例如探针保持杯或样品杯,可以可取出地固定在探针引导装置的下末端的内侧。探针保持容器优选地由具有低比热容和良好低温性质的轻重量材料制成,例如 Ke1F (聚三氟氯乙烯) 或 PEEK (聚醚醚酮),可以以它容纳超过一个探针的方式设计它。

[0093] 将探针插入探针保持容器,浸没在液态氦中,并用微波辐照,优选在 200mW 在约 94GHz 的频率。极化水平可以如下监视:例如,通过包含超极化样品的冷冻溶液中 NMR 活性核的固态 NMR 测量。例如,如果超极化样品中的 NMR 活性核是 ^{13}C ,进行固态 ^{13}C -NMR 测量。固态 ^{13}C -NMR 测量优选地包含使用低翻转角单脉冲获取 NMR 序列。将 ^{13}C -NMR 波谱中超极化样品的信号强度与在 DNP 极化过程之前获取的 ^{13}C -NMR 波谱中样品的信号强度相对比。然后,从极化之前和之后的信号强度比计算极化水平。

[0094] DNP 过程后,在本发明的方法步骤 d) 中任选地液化包含超极化样品的冷冻溶液。术语“液化”表示从固态转化成液态。

[0095] 如果超极化样品用于固态 N 磁共振波谱分析中,不进行可选的步骤 d)。在固态 N 磁共振波谱分析中,通过静止的或魔力的角自转固态 N 磁共振波谱分析,可以分析超极化的固体样品。

[0096] 如果超极化的氨基酸或氨基磺酸将要用于液态 MR 检测中,进行步骤 d),通过溶于适当的溶剂或溶剂混合物(溶解介质)或通过熔化固体冷冻溶液,可以实现液化。溶解是优选的,溶解过程和使用的合适的装置详细描述在 WO-A-02/37132 中。熔化过程和适用于熔化的装置描述在例如 WO-A-02/36005 中。简而言之,使用溶解装置/熔化装置,其与偏振器物理地分离,或是含有偏振器和溶解装置/熔化装置的设备的一部分。在一个优选的实施方案中,在高磁场中进行溶解/熔化,例如在偏振器内,以提高弛豫和保留最大程度的超极化。应当避免场结点,低场可能导致增强的弛豫,尽管采取上述措施。

[0097] 为了得到超极化的氨基酸或氨基磺酸,需要将超极化样品转化成所述氨基酸或氨基磺酸。所述转化可以与液化即步骤 d) 同时或在其之后进行。因而,在一个实施方案中,通过熔化或溶解进行液化,在步骤 d) 后进行转化。在另一个实施方案中,同时进行液化和转化,例如通过将在步骤 c) 中得到的冷冻溶液溶于溶解介质,后者是或含有能将超极化样品转化成氨基酸或氨基磺酸的化合物。

[0098] 如果样品是氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐,通过与碱反应(中和),可以将所述盐转化成对应的氨基酸或氨基磺酸。原则上,碱性比所述氨基酸或氨基磺酸中的氨基更强的任意碱都可以用于中和。优选的碱是无机碱,更优选碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸氢盐或碳酸盐的水溶液,如 NaOH、Na₂CO₃、NaHCO₃、KOH、CsOH、Ca(OH)₂ 或 Sr(OH)₂ 的水溶液。最优选的碱是 NaOH,因为它廉价且容易得到。此外,如果超极化的氨基酸或氨基磺酸用于体内 MR,NaOH 是优选的,因为得到的钠盐(例如氯化钠)通常能被人或非人动物体较好地耐受。

[0099] 如果样品是氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐,通过与酸反应(中和),可以将所述盐转化成对应的氨基酸或氨基磺酸。原则上,具有比氨基酸中的羧基或氨基磺酸中的磺基更低的 pKa 的任意酸都可以用于中和。优选的酸是强酸,更优选强无机酸如盐酸(HCl),氢溴酸(HBr),氢碘酸(HI)或硫酸(H₂SO₄)。最优选的酸是 HCl,因为它廉价且容易获得。此外,如果超极化的氨基酸或氨基磺酸用于体内 MR,HCl 是优选的,因为得到的氯化物盐(例如氯化钠)通常能被人或非人动物体较好地耐受。

[0100] 如果样品是铵盐和羧酸盐或磺酸盐的混合物,所述铵盐需要通过碱反应(中和)转化成对应的氨基酸或氨基磺酸,所述羧酸盐或磺酸盐需要通过酸反应(中和)转化成对应的氨基酸或氨基磺酸。优选地,所述中和依次进行。如果样品包含 α-氨基酸的羧酸盐,优选地首先发生与酸的中和,然后用碱中和所述样品中存在的铵盐。

[0101] 如上所述,步骤 d) 中的液化优选地如下进行:用溶解介质溶解,所述溶解介质是或包含溶剂或溶剂混合物,优选水性载体。更优选地,使用生理上可耐受的和药理学上接受的水性载体如水或盐水,最优选缓冲液,具体地如果超极化的氨基酸或氨基磺酸预期用于体内 MR 检测的成像介质。对于体外 MR- 检测,也可以将非水性的溶剂或溶剂混合物用作或用于溶解介质中,例如 DMSO 或甲醇或包含水性载体和非水性溶剂的混合物,例如 DMSO 和水或甲醇和水的混合物。在另一个优选的实施方案中,溶解介质可以另外包含一种或多种能结

合或络合游离的顺磁离子的化合物,例如螯合剂如 DTPA 或 EDTA。

[0102] 在一个优选的实施方案中,在步骤 d) 中的液化优选地如下进行:用溶解介质溶解,优选包含适用于中和样品的碱或酸的缓冲液,所述中和即将样品转化成对应的氨基酸或氨基磺酸。如果样品是氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐,优选地如果超极化的氨基酸或氨基磺酸预期用于体内 MR 检测,优选地使用包含 pH 约 6.8-7 的缓冲液和碱的溶解介质进行步骤 d)。合适的缓冲液是例如磷酸盐缓冲液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), ACES, PIPES, 咪唑 /HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, BIS-TRIS, HEPPS 或 TRICIN。如果样品是氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐,优选地如果超极化的氨基酸或氨基磺酸预期用于体内 MR 检测,优选地使用包含 pH 略低于生理 pH (即 pH 约 6.8-7.2) 的缓冲液和酸的溶解介质进行步骤 d)。合适的缓冲液是例如磷酸盐缓冲液 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), ACES, PIPES, 咪唑 /HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, BIS-TRIS, HEPPS 或 TRICIN。

[0103] 在本发明的方法步骤 d) 之后,可以从含有超极化样品或超极化的氨基酸或氨基磺酸的液体去除 DNP 试剂,优选三苯甲基基团,和可选的顺磁金属离子。如果超极化的氨基酸或氨基磺酸预期用于体内 MR 检测的成像介质中,这些化合物的去除是优选的。优选地首先将超极化样品转化成对应的氨基酸或氨基磺酸,并在已经发生所述转化后,去除 DNP 试剂和可选的顺磁金属离子。

[0104] 用于去除三苯甲基基团和顺磁金属离子的方法是本领域已知的,详细描述在 WO-A2-2007/064226 和 WO-A1-2006/011809。

[0105] 包含根据本发明的方法生产的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物的液体,可以用作“常规的”MR 成像剂,即为体内(即在活的人或非人动物内)解剖学成像提供优良的造影增强。如果超极化的氨基酸或氨基磺酸不被代谢,或如果在不能通过 MR-检测监视到的时间尺度发生代谢,这是特别适用的情况。

[0106] 此外,包含根据本发明的方法生产的超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物的液体,可以用作体外和体内 MR 检测代谢活性的成像剂。通过进入柠檬酸循环,氨基酸可以是能量来源。此外,氨基酸在体内的几个代谢途径中用于生物合成其它(非标准的)氨基酸,例如鸟氨酸循环中的瓜氨酸等氨基酸,或其它各种其它化合物,例如从酪氨酸生物合成儿茶酚胺,从色氨酸生物合成烟酸等维生素,或从甘氨酸生物合成卟啉。因此,氨基酸是重要的代谢标志物,因此超极化的氨基酸可以是用于通过 MR 检测得到关于代谢活性的信息的试剂。

[0107] 本发明的另一个方面是包含样品、DNP 试剂和任选地顺磁金属离子的组合物,其中所述样品是氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐、氨基磺酸的磺酸盐或其混合物。在一个优选的实施方案中,本发明的组合物是液态组合物,其可以另外包含溶剂或溶剂和 / 或玻璃形成体的混合物。

[0108] 在一个优选的实施方案中,样品是氨基酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐或其混合物。

[0109] 在另一个优选的实施方案中,氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐是氯化铵盐和 / 或氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐是羧酸钠盐或磺酸钠盐。

[0110] 在另一个优选的实施方案中,DNP 试剂是三苯甲基基团,优选式 (1) 的三苯甲基基团。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的组合物包含顺磁金属离子,优选包含 Gd^{3+} 的盐或顺磁螯合物。

[0111] 根据本发明的组合物适用于本发明的方法中,即用于通过动态核极化生产超极化的氨基酸或氨基磺酸或其混合物。在本申请的前面已经讨论了这样的组合物的其它优选的实施方案。

[0112] 本发明的另一个方面是包含超极化样品、DNP 试剂和任选地顺磁金属离子的组合物,其中所述样品是氨基酸的铵盐、氨基磺酸的铵盐、氨基酸的羧酸盐、氨基磺酸的磺酸盐或其混合物。根据本发明的组合物优选通过根据本发明的方法得到。

[0113] 在一个优选的实施方案中,本发明的组合物是固体冷冻溶液,其可以另外包含溶剂或溶剂和 / 或玻璃形成体的混合物。为此优选的实施方案,根据本发明的组合物优选通过包含步骤 a) 至 c) 的根据本发明的方法得到。

[0114] 在一个优选的实施方案中,氨基酸的铵盐或氨基磺酸的铵盐是氯化铵,氨基酸的羧酸盐或氨基磺酸的磺酸盐是羧酸钠盐或磺酸钠盐。

[0115] 在另一个优选的实施方案中,DNP 试剂是三苯甲基基团,优选式 (1) 的三苯甲基基团。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的组合物包含顺磁金属离子,优选包含 Gd^{3+} 的盐或顺磁螯合物。

[0116] 本发明的另一个方面是超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物。所述超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物优选通过根据本发明的方法得到,其中所述方法包含可选的步骤 d)。

[0117] 术语“氨基酸”在本发明的上下文中表示包含至少一个氨基和至少一个羧基的化学个体。所述至少一个氨基可以是伯氨基、仲氨基或叔氨基。根据本发明的氨基酸的一个实例是包含一个氨基和一个羧基的化学个体。在一个实施方案中,所述一个氨基和所述一个羧基结合在同一个碳原子上,实例是 α -氨基酸如标准的或蛋白源性的 (proteogenic) 氨基酸,例如丙氨酸,甘氨酸,亮氨酸,蛋氨酸或半胱氨酸。D- 和 L- 异构体都可以用于本发明的方法中。该实施方案的其它实例是非标准的氨基酸如肌氨酸 (N- 甲基甘氨酸),高半胱氨酸或甜菜碱 (三甲基甘氨酸)。在另一个实施方案中,所述一个氨基和所述一个羧基结合在不同碳原子上,该实施方案的实例是 GABA (γ -氨基丁酸) 或氨基乙酰丙酸。在另一个实施方案中,在本发明的方法中使用的氨基酸包含超过一个氨基和 / 或超过一个羧基。实例是精氨酸,赖氨酸,天冬酰胺,鸟氨酸,谷氨酰胺,瓜氨酸,肌酸,谷氨酸,天冬氨酸或精氨基琥珀酸。

[0118] 术语“氨基磺酸”在本发明的上下文中表示包含至少一个氨基和至少一个磺基 (即 $-S(O)_2OH$ 基团) 的化学个体。所述至少一个氨基可以是伯氨基、仲氨基或叔氨基。氨基磺酸的实例是 1- 哌啶磺酸, N-(2- 乙酰胺基)-2- 氨基乙烷磺酸, 1,4- 哌嗪 - 双乙烷磺酸, 3-(N- 吗啉代) 丙烷磺酸, 2-(N- 吗啉代) 乙烷磺酸或牛磺酸 (2- 氨基乙烷磺酸)。

[0119] 尽管以单数形式书写,术语“超极化的氨基酸”和“超极化的氨基磺酸”表示一种超极化的化学个体或几种不同的超极化的化学个体。因而,一种化学个体是例如某种超极化的氨基酸如超极化的甘氨酸或如超极化的丙氨酸或超极化的氨基磺酸如超极化的牛磺酸或如超极化的 N-(2- 乙酰胺基)-2- 氨基乙烷 - 磺酸。几种不同的化学个体是例如几种不同超极化的氨基酸如超极化的甘氨酸和超极化的丙氨酸或超极化的氨基磺酸如超极化的牛磺酸和超极化的 N-(2- 乙酰胺基)-2- 氨基乙烷磺酸。

[0120] 本发明的另一个方面是包含超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物的

成像介质。

[0121] 根据本发明的成像介质可以作用于体外 MR 检测的成像介质,例如细胞培养物、样品、离体组织或从人或非人动物体衍生的分离的器官的 MR 检测。为此目的,作为适合加入例如细胞培养物、样品(如尿、血液或唾液)、离体组织(如活组织检查组织)或分离的器官的组合物,提供成像介质。除了成像剂(即超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物)以外,这样的成像介质优选包含,与体外细胞或组织试验相容且使用的溶剂,例如水性载体如水、DMSO 或甲醇或包含水性载体和非水性溶剂的溶剂混合物,例如 DMSO 和水或缓冲液或甲醇和水或缓冲液的混合物。技术人员会明白,在这样的成像介质中可以存在药学上可接受的载体、赋形剂和制剂辅料,但不是这样的目的所必需。

[0122] 此外,根据本发明的方法的成像介质可以作用于体内 MR 检测的成像介质,即在活的人或非人动物上进行的 MR 检测。为此目的,成像介质必须适合施用给活的人或非人动物体。因此,除了成像剂(即超极化的氨基酸或超极化的氨基磺酸或其混合物)以外,这样的成像介质优选包含水性载体,优选生理上可耐受的和药学上接受的水性载体如水、缓冲液或盐水。这样的成像介质可以另外包含常规药学或兽医载体或赋形剂,例如制剂辅料例如稳定剂,渗透压调节剂,增溶剂等,它们常规地用于人或兽医药物的诊断组合物中。

实施例

[0123] 氨基酸的酸性制品

[0124] 实施例 1 超极化的 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的制备

[0125] 实施例 1a $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的铵盐($^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸氯化物)的制备

[0126] 将 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸(100mg, 1.1mol, Cambridge Isotopes)加入 10ml 离心试管,然后加入浓盐酸(145 μl , 12M)和乙醇(1ml, 95%)。溶解 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸(可能需要声处理)后,通过加入二乙醚(约 5ml),沉淀得到的 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸的氯化铵盐($^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸氯化物)。通过离心收集沉淀,抛弃上清液。用二乙醚洗涤沉淀,真空干燥。回收的产量:125mg 白色粉末(90%,呈细针状)。

[0127] 实施例 1b 包含 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸氯化物、DNP 试剂和顺磁金属离子的溶液的制备和 DNP 极化

[0128] 将 32.5mg(0.258mmol)在实施例 1a 中得到的 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸氯化物加入在微量试管中的 42mg 母液。母液已经如下制备:将已经根据 WO-A1-98/39277 的实施例 7 合成的 DNP 试剂(三苯甲基基团)三(8-羧基-2,2,6,6-(四(羟乙基)-苯并-[1,2-4,5']-二-(1,3)-二硫杂环戊二烯-4-基)-甲基钠盐和已经根据 WO-A-2007/064226 的实施例 4 合成的顺磁金属离子(1,3,5-三-(N-(D03A-乙酰胺基)-N-甲基-4-氨基-2-甲基苯基)-[1,3,5]triazinane-2,4,6-三酮的 Gd-螯合物)溶于甘油,得到含有 26mM 三苯甲基基团和 0.52mM Gd-螯合物的甘油溶液。声处理得到的组合物,以溶解 $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸氯化物,生成澄清溶液。用吸量管将溶液(65 μl , 4M $^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸氯化物, 17mM 三苯甲基基团和 0.9mM Gd^{3+})转入样品杯,将它快速放入液氮中,以冷冻溶液,然后插入 DNP 偏振器。在微波辐射(93.90GHz)下、在 3.35T 磁场中、在 1.2K 的 DNP 条件下,极化冷冻溶液。极化后进行固态 ^{13}C -NMR,测得固态极化是 40%。

[0129] 实施例 1c 液化和中和

[0130] 动态核极化 150 分钟后,将得到的冷冻的极化的溶液溶于含有 6ml 磷酸盐缓冲液 (20mM, pH 6.8, 100mg/l EDTA)、NaOH 水溶液 (27 μ l 12M 溶液, 1eq) 和 30mg NaCl 的溶解介质中。最终液体的 pH 是 6.8。

[0131] 通过 400MHz 的液态 ^{13}C -NMR, 测得液态极化是 35%。

[0132] 极化下面的氨基酸, 作为根据实施例 1 的酸性制品:

[0133]

氨基酸	样品浓度 (M)	固态极化 (%)	液化后氨基酸的浓度(mM)	液态极化 (%)
$^{13}\text{C}_1$ -谷氨酰胺	3	ndt	40	6
$^{13}\text{C}_1$ -蛋氨酸	3	41	40	26
$^{13}\text{C}_1$ -半胱氨酸	3	25	50	17
$^{13}\text{C}_1$ -脯氨酸	3	ndt	16	16
$^{13}\text{C}_1$ -甘氨酸	4	16	50	16

[0134] ndt = 未测定。

[0135] 氨基酸的碱性制品

[0136] 实施例 2 超极化的 $^{13}\text{C}_1$ -谷氨酰胺的制备

[0137] 实施例 2a 包含 $^{13}\text{C}_1$ -2-氨基-4-氨甲酰基-丁酸钠 ($^{13}\text{C}_1$ -谷氨酰胺的羧酸盐)、DNP 试剂和顺磁金属离子的溶液的制备和 DNP 极化

[0138] 将 $^{13}\text{C}_1$ -谷氨酰胺 (45.5mg, 0.30mmol, Cambridge Isotopes) 称量进微量试管, 溶于 23.5 μ l 水和 25 μ l NaOH 水溶液 (12M)。声处理混合物, 轻轻加热, 生成澄清溶液。向该溶液中加入 5.7mg 三(8-羧基-2,2,6,6-(四(羟乙基)-苯并-[1,2-4,5']-二-(1,3)-二硫杂环戊二烯-4-基)-甲基钠盐水溶液 (三苯甲基基团; 139 μ mol/g 溶液) 和 2.1mg 1,3,5-三-(N-(D03A-乙酰胺基)-N-甲基-4-氨基-2-甲基苯基)-[1,3,5]triazinane-2,4,6-三酮) 的 Gd-螯合物水溶液 (顺磁金属离子; 14.5 μ mol/g 溶液), 声处理得到的组合物, 轻轻加热, 生成澄清溶液。用吸量管将溶液 (约 75 μ l, 4M $^{13}\text{C}_1$ -2-氨基-4-氨甲酰基-丁酸钠, 11mM 三苯甲基基团和 0.4mM Gd^{3+}) 转入样品杯, 将它快速放入液氮中, 以冷冻溶液。从液氮中取出样品杯, 将 25 μ l HCl 水溶液 (12M) 加入样品杯。再次将样品杯快速放入液氮中, 然后插入 DNP 偏振器。在微波辐射 (93.90GHz) 下、在 3.35T 磁场中、在 1.2K 的 DNP 条件下, 极化冷冻溶液。极化后进行固态 ^{13}C -NMR, 测得固态极化是 35%。

[0139] 实施例 2b 液化和中和

[0140] 动态核极化 120 分钟后,将得到的冷冻的极化的溶液溶于含有 6ml 磷酸盐缓冲液 (40mM, pH 7, 100mg/l EDTA, 0.9% NaCl) 的溶解介质中。含有溶解的组合物的最终溶液的 pH 是 7。

[0141] 通过 400MHz 的液态 ^{13}C -NMR, 测得液态极化是 30%。

[0142] 极化下面的氨基酸, 作为根据实施例 2 的碱性制品:

[0143]

氨基酸	样品浓度 (M)	固态极化 (%)	液化后氨基酸的浓 度(mM)	液态极 化(%)
$^{13}\text{C}_1$ -丙氨酸	6	18	40	16
$^{13}\text{C}_1$ -亮氨酸	3	35	45	21
$^{13}\text{C}_1$ -甘氨酸	8	19	40	18