

Magnetresonanztomographie

In vivo-Stoffwechselbildung mit [1-¹³C]Pyruvat-d₃, hyperpolarisiert durch reversiblen Austausch mit Parawasserstoff**

Henri de Maissin[#], Philipp R. Groß[#], Obaid Mohiuddin[#], Moritz Weigt[#], Luca Nagel, Marvin Herzog, Zirun Wang, Robert Willing, Wilfried Reichardt, Martin Pichotka, Lisa Heß, Thomas Reinheckel, Henning J. Jessen, Robert Zeiser, Michael Bock, Dominik von Elverfeldt, Maxim Zaitsev, Sergey Korchak, Stefan Glögger, Jan-Bernd Hövener, Eduard Y. Chekmenev, Franz Schilling, Stephan Knecht,* und Andreas B. Schmidt*

Abstract: Die metabolische Magnetresonanztomographie (MRT) mit hyperpolarisiertem (HP) Pyruvat wird zu einer vielversprechenden, nicht-invasiven Technik für die Diagnose, die Charakterisierung und die Überwachung bei Behandlung von Krebs, sowie bei anderen Erkrankungen. Die klinisch etablierte Methode zur Herstellung HP-Pyruvats, die dynamische Kernpolarisation, ist jedoch ein komplexes und langwieriges Verfahren. Die Signalverstärkung durch reversiblen Austausch (SABRE) ist eine ultraschnelle und kostengünstige Methode, die auf einem schnellen chemischen Austausch beruht. Hier demonstrieren wir zum ersten Mal eine in vivo-Anwendung, sowie auch metabolische MRT mit SABRE. Wir präsentieren eine neuartige Routine zur Herstellung von wässrigem HP-[1-¹³C]Pyruvat-d₃ innerhalb von sechs Minuten, zur Anwendung in lebenden Organismen. Die injizierte Lösung war steril, ungiftig, pH-neutral und enthielt ≈ 30 mM [1-¹³C]Pyruvat-d₃, polarisiert auf ≈ 11 % (Rückstände von 250 mM Methanol und 20 μ M Katalysator). Es wurde durch schnelle Lösungsmittelverdampfung und Metallfiltrierung gewonnen, die wir in diesem Manuskript ausführlich beschreiben. Diese Ergebnisse machen die HP-Pyruvat-MRT für eine breite biomedizinische Gemeinschaft zur schnellen metabolischen Bildgebung von lebenden Organismen verfügbar.

[*] H. de Maissin,[#] P. R. Groß,[#] O. Mohiuddin,[#] Dr. M. Weigt,[#] M. Herzog, Z. Wang, R. Willing, Dr. W. Reichardt, Dr. M. Pichotka, Prof. Dr. M. Bock, Prof. D. von Elverfeldt, Prof. Dr. M. Zaitsev, Dr. A. B. Schmidt

Abteilung Medizinphysik, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Killianstr. 5a, 79106 Freiburg (Deutschland)
E-mail: andreas.schmidt@uniklinik-freiburg.de

H. de Maissin,[#] R. Willing, Prof. Dr. T. Reinheckel, Prof. Dr. R. Zeiser, Dr. A. B. Schmidt
Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Partnerstandort Freiburg und Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (Deutschland)

L. Nagel, Prof. Dr. F. Schilling
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München
Ismaninger Str. 22, 81675 München (Deutschland)

Dr. L. Heß, Prof. Dr. T. Reinheckel
Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Stefan-Meier-Str. 17, 79104 Freiburg (Deutschland)

Prof. Dr. H. J. Jessen
Bioorganische Chemie, Institut für Organische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstrasse 21, 79104 Freiburg (Deutschland)

Prof. Dr. R. Zeiser
Hematology and Oncology, Department of Medicine I, Medical Center, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Hugstetter Strasse 55, 79106 Freiburg (Deutschland)

Dr. S. Korchak, Dr. S. Glögger
NMR Signal Enhancement Group, Max Planck Institute for Multidisciplinary Sciences
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)

Dr. S. Korchak, Dr. S. Glögger
Center for Biostructural Imaging of Neurodegeneration der Universitätsmedizin Göttingen (UMG)
Von-Siebold-Str. 3 A, 37075 Göttingen (Deutschland)

Prof. Dr. J.-B. Hövener
Sektion Biomedizinische Bildgebung, Molecular Imaging North Competence Center MOINCC, Klinik für Radiologie und Neuroradiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Universität Kiel
24105 Kiel (Deutschland)

Prof. Dr. E. Y. Chekmenev, Dr. A. B. Schmidt
Department für Chemie, Integrative Biosciences (Ibio), Karmanos Cancer Institute (KCI), Wayne State University
Detroit, MI 48202 (USA)

Prof. Dr. F. Schilling
Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Partnerstandort München und Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (Deutschland)

Dr. S. Knecht
NVision Imaging Technologies GmbH
89081 Ulm (Deutschland)
E-mail: stephan@nvision-imaging.com

[[#]] Co-Erstautoren.

[**] Eine frühere Version dieses Manuskripts ist auf einem Preprint-Server hinterlegt worden (<https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-9trxb>).

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Einleitung

Nicht-invasive bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) werden in der Onkologie in großem Umfang zur Charakterisierung von Tumoren vor der Behandlung, zur Therapieplanung, zur Überwachung des Tumorverlaufs, zur Bewertung des Ansprechens auf die Behandlung und zur Nachsorge eingesetzt. Die meisten klinischen Leitlinien stützen sich auf morphologische Kriterien wie Größe und Lage des Tumors, z.B. die RECIST-Kriterien.^[1] Viele wirksame Therapien, darunter auch vielversprechende Immuntherapien, zeigen jedoch keine frühen morphologischen Veränderungen wie z.B. eine Verkleinerung des Tumors, selbst wenn der Patient gut auf die Behandlung anspricht.^[2] Die aktuellen Fortschritte in der molekularen Tumorbiologie, Genetik und Bildgebungstechnologie haben zu einem bedeutenden Paradigmenwechsel in der Onkologie geführt, bei dem die molekulare Bildgebung zur Ableitung überlegener diagnostischer und prognostischer Marker für das Krebsstadium, das Ansprechen auf die Behandlung und das Überleben eingesetzt wird. Die [¹⁸F]Fluorodesoxyglucose (FDG)-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) ist das am häufigsten klinisch angewandte molekulare Bildgebungsverfahren, das Aufschluss über einen gestörten Energiestoffwechsel gibt, der ein Merkmal vieler Krebsarten ist. Trotz einiger Einschränkungen (u.a. lange Untersuchungszeiten von mehr als 1 Stunde und der Einsatz ionisierender Strahlung) hat dieser radioaktive Tracer die Behandlung und das Management vieler Krebsarten revolutioniert. Sein Erfolg hängt von der FDG-Aufnahme ab, die in wuchernden Tumoren erhöht ist. PET ist jedoch nicht in der Lage, zwischen Stoffwechselprodukten zu unterscheiden. Es werden nicht-radioaktive molekulare Kontrastmittel benötigt, die tiefere Einblicke in den abweichenden Stoffwechsel bei schnellerer Scanzeit ermöglichen. Die hyperpolarisierte (HP) [¹⁻¹³C]Pyruvat-MRT hat sich als vielversprechend für die nicht-invasive, nicht-ionisierende molekulare Bildgebung erwiesen, z.B. zur Einstufung von Tumoren oder zur Beurteilung des Therapieansprechens.^[3-6] Ein solcher molekularer MRT-Scan dauert etwa eine Minute und verwendet nicht-ionisierende Strahlung. Daher wurde sie als molekulare Bildgebungsmodalität der nächsten Generation anerkannt. Ähnlich wie FDG ist Pyruvat ein wichtiger Metabolit an der Schnittstelle des zellulären Energiestoffwechsels. Die hohe Bildgebungsgeschwindigkeit der HP-Pyruvat-MRT beruht auf der Fähigkeit, die Umwandlung von Metaboliten in nachgeschaltete Produkte *in vivo* sichtbar zu machen und zu unterscheiden, wodurch die Notwendigkeit einer Kontrastmittel-Clearance aus dem umgebenden Gewebe verringert wird. Seit der ersten Demonstration am Menschen 2013 hat die HP-[¹⁻¹³C]Pyruvat-MRT bemerkenswerte Fortschritte gemacht, und diese Technik wird laut clinicaltrials.gov derzeit in über 30 klinischen Studien untersucht. Darüber hinaus hat die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) kürzlich HP ¹²⁹Xe-Gas für die Bildgebung der Lunge zugelassen. Nach dieser bahnbrechenden Entscheidung ist zu erwarten, dass HP-[¹⁻¹³C]Pyruvat bald auch für den Einsatz in der Onkologie zugelassen werden könnte.

Der Erfolg der HP-[¹⁻¹³C]Pyruvat-MRT wurde durch die dynamische Kernpolarisation (dDNP) ermöglicht, die die führende Technik zur Herstellung von HP-Pyruvat ist.^[7] Zwar entwickelt sich diese Polarisationsmethode sehr schnell und in den letzten Jahren wurden wesentliche Verbesserungen vorgestellt.^[8-10] Gleichwohl sind die Instrumentierung und die HP-Bolusvorbereitung immer noch sehr aufwendig und erfordern supraleitende Magnete (>1T), kryogene Temperaturen (<2 K) und Mikrowellenbestrahlung für die Polarisation des Wirkstoffs in der festen Phase, gefolgt von schnellem Auftauen und Auflösen der Probe, wobei typischerweise überhitztes Wasser verwendet wird, um die HP-Metaboliten in die flüssige, wässrige Phase zu übertragen. Außerdem benötigt die derzeitige dDNP etwa eine Stunde, um einen Bolus von HP-[¹⁻¹³C]Pyruvat zu erzeugen (obwohl z.B. die ¹H-¹³C-Kreuzpolarisation diese Zeit zu verkürzen verspricht^[10]). Daher sind schnellere, kostengünstigere und einfachere Technologien wünschenswert, um den Zugang der biomedizinischen Gemeinschaft zu diesem vielversprechenden molekularen Kontrastmittel zu verbessern.

Parawasserstoff-induzierte Polarisierungstechniken (PHIP) haben sich als vielversprechende Kandidaten erwiesen, um diesen Bedarf an effizienten Polarisationsmethoden zu erfüllen.^[11-14] PHIP nutzt das Kernspin-Singlet-Isomer des molekularen Wasserstoffs, Parawasserstoff (pH₂), der dabei als kostengünstige Hyperpolarisationsquelle fungiert. Im Gegensatz zu dDNP benötigt PHIP weder kryogene Temperaturen noch starke Magnetfelder, sondern stützt sich stattdessen auf pH₂ und chemische Reaktionen. Aufgrund dieser Eigenschaften ist PHIP von Grund auf weniger komplex und kostengünstiger als dDNP. Eine Möglichkeit, diese Quelle der Spin-Ordnung zu nutzen, beruht auf dem schnellen, permanenten anfügen von pH₂, d.h., Hydrierung eines ungesättigten Vorläufermoleküls – eine Methode, die oft als hydrierende PHIP bezeichnet wird, die seit den 1980er Jahren bekannt ist und kürzlich von Reineri et al. für Pyruvat durch Seitenarmhydrierung (PHIP-SAH) eines Pyruvatesters ermöglicht wurde.^[15] 2009 leisteten Duckett und Mitarbeitende Pionierarbeit mit einem "nichthydrierenden" PHIP-Ansatz, der als Signalverstärkung durch reversiblen Austausch (SABRE) bezeichnet wird.^[16] SABRE basiert auf dem reversiblen, gleichzeitigen chemischen Austausch von pH₂ und dem zu hyperpolarisierenden Zielmolekül mit einem Austauschkomplex auf Iridiumbasis, so dass die von pH₂ abgeleitete Hyperpolarisierung auf einen Substratkern übertragen wird.^[17-22] 2019 demonstrierten Duckett et al. die Herstellung von HP-[¹⁻¹³C]Pyruvat-h₃ über SABRE, indem sie den Katalysator mit einem Dimethylsulfoxid (DMSO) Ko-Liganden dotierten, um die Bindungseigenschaften von Pyruvat als zweizahnigem Liganden zu verbessern (Abbildung 1a).^[23] Dieser Durchbruch hat großes Interesse an der Verwendung von SABRE-HP-Pyruvat für metabolische Bildgebungsstudien geweckt.^[24-27] Allerdings werden bei der SABRE-Technik in der Regel organische Lösungsmittel wie Methanol für den Hyperpolarisierungsprozess verwendet, wodurch das erzeugte HP-[¹⁻¹³C]Pyruvat für die Verabreichung *in vivo* zu toxisch ist. Frühere Studien haben gezeigt, dass die direkte SABRE-Polarisierung in biokompatiblen Lösungsmitteln wie wässrigen Medien deutlich geringer ist (um eine Größenordnung

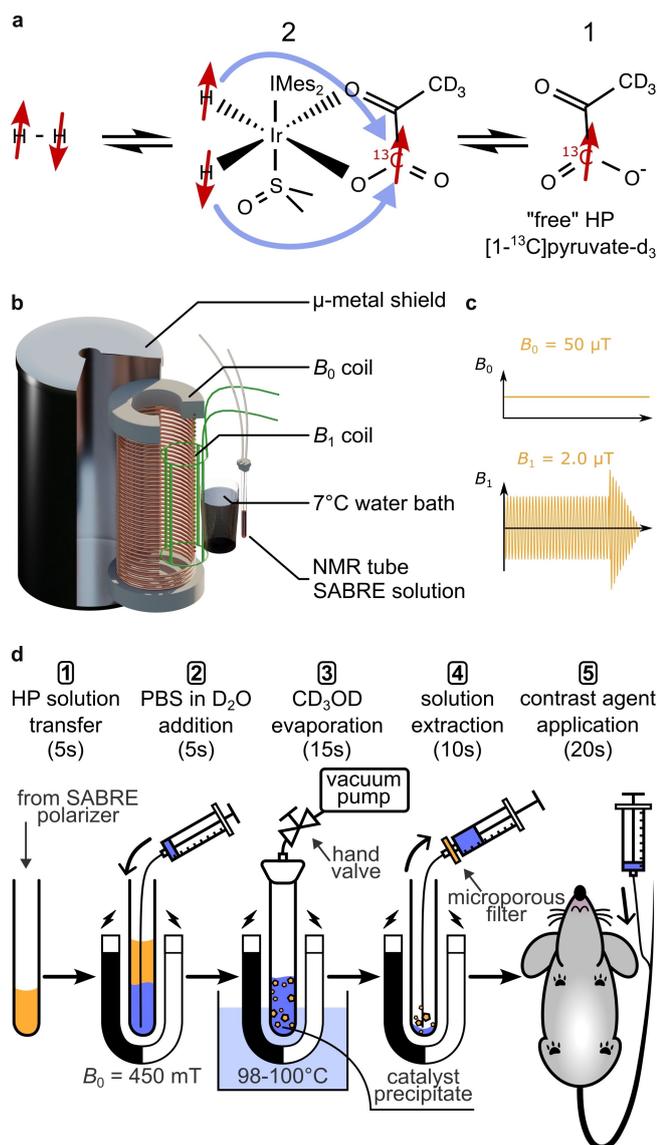


Abbildung 1. Prozess der SLIC-SABRE-Hyperpolarisation und Reinigung von $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 -Proben. **a**, schematische Darstellung der SABRE-Hyperpolarisationsreaktion, welche die Bindung von pD_2 und $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 an den SABRE-Katalysator zur Polarisationsübertragung auf Pyruvat beinhaltet. **b**, Versuchsaufbau für die SLIC-SABRE-Methode, welcher das statische Magnetfeld B_0 , das Hochfrequenzfeld B_1 , das NMR-Röhrchen mit Gas-Sprudelsystem zur Einführung von pD_2 in die Pyruvat in Methanol- d_4 Lösung und ein Mu-Metall zur Abschirmung externer Felder umfasst. **c**, während SLIC-SABRE wurde B_0 konstant auf $50 \mu\text{T}$ und die B_1 -Amplitude auf $2 \mu\text{T}$ eingestellt. Nach dem SLIC-Puls wurde ein adiabatischer Puls appliziert. **d**, schrittweises Reinigungs- und Applikationsprotokoll, bestehend aus der Zugabe von gepuffertem D_2O , der Verdampfung des Lösungsmittels unter Vakuum in einem heißen Wasserbad, der Filtration der Lösung und der In vivo-Verabreichung. Weitere Einzelheiten zum Experiment finden Sie in den Hintergrundinformationen.

oder mehr) als in Methanol. Dieser Rückgang der Polarisation ist wahrscheinlich auf die geringere Wasserstofflöslichkeit und andere Faktoren zurückzuführen.^[28–30] Da die SABRE-Hyperpolarisation Katalysatoren auf Iridiumbasis erfordert, muss für biokompatible Formulierungen das ver-

bleibende Iridium in der injizierbaren Lösung entfernt werden (Ir, unter 1 ppm oder weniger). Ansätze zur Entfernung von Metallen haben gezeigt, dass die Ir-Konzentration reduziert werden kann, aber sie haben weder die Herstellung von HP $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat ermöglicht noch den Bedarf an Methanol reduziert.^[31,32]

Kürzlich haben wir eine Methode vorgestellt, die auf der Pyruvat-Ausfällung und einem Phasentrennungsansatz basiert, der sowohl das toxische Lösungsmittel als auch das Ir in SABRE-HP-Pyruvatlösungen reduziert. Dieser Ansatz führte jedoch immer noch zu einem zu hohen Methanolgehalt ($\approx 5 \text{ M}$), niedrigen Pyruvatkonzentrationen ($\approx 6 \text{ mM}$) und $44 \mu\text{M}$ Ir in den endgültigen Lösungen.^[27] Folglich gibt es bis heute keine Studien, die über zufriedenstellend saubere Lösungen mit zufriedenstellend hohen Polarisationsgraden von SABRE-polarisiertem Pyruvat berichten, geschweige denn über eine In vivo-Anwendung oder metabolische Bildgebung.

In der vorliegenden Arbeit befassen wir uns mit diesen Herausforderungen bei der Umsetzung von SABRE und zeigen zum ersten Mal metabolische Bildgebung mit SABRE in gesunden Mäusen unter Verwendung von gereinigtem SABRE-polarisiertem Pyruvat. Diese Ergebnisse wurden durch die Entwicklung eines schnellen physikalisch-chemischen Prozesses ermöglicht, der die *spin-lock induced crossing* (SLIC) SABRE Methode^[33,34] bei Mikrotetra-Magnetfeldern verwendet (Abb. 1b c),^[35,36] und hier bis zu $\approx 16\%$ ^{13}C -Polarisation von $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 liefert. Wir erreichten eine schnelle Reinigung durch Lösungsmittelverdampfung und Metallfiltration, wodurch Methanol und Katalysator unter akut toxische Werte reduziert wurden (Abbildung 1d). Die Verabreichung des Wirkstoffs in die Schwanzvene und die Bildgebung der Pyruvatfolgeprodukte über ihre chemischen Verschiebungen ermöglichten eine metabolische Kartierung der nachgeschalteten HP Laktat und Alanin, was die Eignung und das Potenzial dieser Technik für die Praxis zeigt. Alle Versuchstiere haben die Injektionen gut vertragen.

Ergebnisse und Diskussion

Effiziente SABRE-Hyperpolarisation

Wir erhielten eine mittlere ^{13}C -Polarisationen für $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 von $13 \pm 3\%$ ($N=5$ Proben, jede hyperpolarisiert und die Polarisation dreimal vor der Reinigung quantifiziert) mit einem Maximum von 16.3% zum Zeitpunkt der Detektion ($5\text{--}8 \text{ s}$ nach der Produktion) in Methanol- d_4 unter Verwendung des in den Hintergrundinformationen beschriebenen Aufbaus und Protokolls (Abbildung 2a und Abbildung 2b). Man beachte, dass die Polarisation im thermischen Gleichgewicht bei 1 T nur 0.000086% beträgt. Die hohen Polarisationswerte wurden durch die langen Relaxationszeiten während des SLIC-SABRE-Polarisationsprozesses von $T_{1\rho} = 113.3 \pm 0.3 \text{ s}$ (Abbildung 2c) ermöglicht, die einen effektiven Polarisationsaufbau über einen Zeitraum von 5 Minuten erlaubten (siehe Hintergrundinformationen Abbildung S5).^[36]

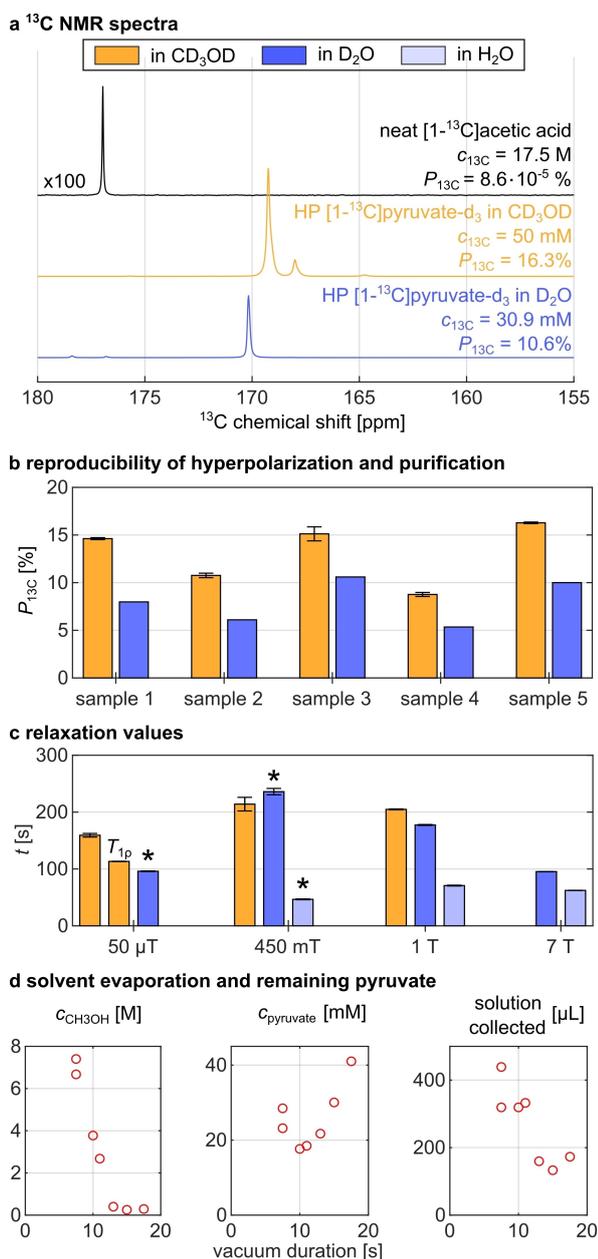


Abbildung 2. SABRE-Hyperpolarisation und Reinigung von $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 . **a**, ^{13}C NMR -Spektren von $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 in Methanol- d_4 vor (orange) und in pH-gepuffertem D_2O nach der Reinigung (blau) im Vergleich zu einer externen ^{13}C -angereicherten Referenzlösung (schwarz) bei 1 T. **b**, Reproduzierbarkeit der SLIC-SABRE-Hyperpolarisation und Aufreinigung, untersucht an fünf unabhängigen Proben. **c**, longitudinale Relaxationszeiten T_1 und T_{10} in Gegenwart des SLIC-Pulses bei verschiedenen Feldern in Methanol- d_4 (orange), phosphatgepuffertem D_2O (blau) und phosphatgepuffertem H_2O (hellblau). *diese Messungen wurden mit thermisch polarisierten Proben durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen). **d**, verbleibende Konzentrationen von Methanol und Pyruvat nach Anlegen eines Vakuums und eines 98°C -Wasserbads für verschiedene Zeiträume an eine $600 \mu\text{L}$ Probe der SABRE-Lösung (mit 50 mM Natriumpyruvat in 24.75 M Methanol) gemischt mit $600 \mu\text{L}$ phosphatgepuffertem D_2O (siehe Hintergrundinformationen Abbildung S7 und S11). Die Fehlerbalken in **b** stellen die Standardabweichung dar, die aus drei Messungen der entsprechenden Probe gewonnen wurde. Die Fehlerbalken in **c** entsprechen dem Fehler der angepassten Exponentialkurven (siehe Hintergrundinformationen).

Schnelle Aufreinigung

Ermutigt durch diese hohen Polarisationswerte und inspiriert durch eine kürzlich durchgeführte Studie von Ding et al.,^[37] untersuchten wir die Entfernung von Methanol aus den Proben durch schnelle Lösungsmittelverdampfung. Da Methanol und Wasser kein Azeotrop bilden und daher bei unterschiedlichen Siedepunkten verdampfen, fügten wir wir phosphatgepuffertes D_2O zu der in einem NMR-Röhrchen gelagerten HP SABRE-Probe hinzu und legten das Gemisch in ein heißes Wasserbad, während wir ein Vakuum anlegten ($\approx 5 \text{ mbar}$, Abbildung 1d). Das Evakuieren der Probe für 15 Sekunden bei 98°C reduzierte das Methanol von 24.75 M auf 250 mM , während $\approx 30 \text{ mM}$ des Pyruvats in der resultierenden $\approx 150 \mu\text{L}$ wässrigen Lösung erhalten blieben (Abbildung 2d und Abbildung S7 und S11). Eine längere Verdampfungszeit erhöhte zwar die Pyruvatkonzentration (Hintergrundinformationen Abbildung S12), gleichzeitig ging aber auch Wasser verloren, so dass das Volumen für die Injektion zu gering war.

Zur Verringerung der Polarisationsverluste während der Reinigungsprozedur, die aus 15 Sekunden Vakuum und etwa 40 Sekunden Probenhandhabung (einschließlich der Filtration der Lösung durch einen mikroporösen $1.2 \mu\text{m}$ Spritzenfilter) bestand, wurde die Prozedur größtenteils bei einem erhöhten Magnetfeld von $\approx 450 \text{ mT}$ durchgeführt. Außerdem mischten wir das Pyruvat in phosphatgepuffertem D_2O anstelle von phosphatgepuffertem H_2O , welches in den untersuchten Feldern kürzere Lebenszeiten aufweist (Abbildung 2c). Mit diesem Ansatz erzielten wir reproduzierbar einen Faktor von 0.60 ± 0.07 der anfänglichen ^{13}C -Polarisation der ungereinigten Probe (Mittelwert und Standardabweichung von $N=5$ unabhängigen Proben), und die endgültigen $\approx 30 \text{ mM}$ Pyruvat in den extrahierten Proben wiesen eine Polarisierung von bis zu $\approx 11 \%$ auf (Abbildung 2b). Mit diesem hochgradig optimierten, beschleunigten und die Spin-Ordnung erhaltenden Reaktionsschema konnten wir eine Dosis hochpolarisierten, frisch gereinigten, injektionsfertigen Pyruvats in nur sechs Minuten herstellen.

Analyse der wässrigen Probe

Nachdem der Methanolgehalt auf $\approx 250 \text{ mM}$ reduziert worden war, fiel der Katalysator sichtbar aus der Lösung aus. Als zusätzliche Maßnahme wurde die Lösung durch einen $1.2 \mu\text{m}$ -Filter geleitet, wodurch der ausgefallene Katalysator effektiv entfernt wurde und eine klare Lösung entstand (Hintergrundinformationen Abbildung S9). Während der In vivo-Experimente fanden wir diese beiden visuellen Inspektionen der Probe, eine vor und eine nach der Filtration, hilfreich, um festzustellen, ob Methanol und Katalysator erfolgreich reduziert wurden.

Wir verwendeten die optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES), um den verbleibenden Iridiumgehalt in den Proben zu quantifizieren, was eine erfolgreiche Reduktion von 6 mM auf $20 \mu\text{M}$, d.h. auf $< 0.5 \text{ ppm}$ nach der Reinigung, zeigte. Die Temperatur

der Lösungen wurde zum Zeitpunkt unmittelbar vor der Verabreichung auf $35 \pm 2^\circ\text{C}$ gemessen.

Wir haben die gereinigten Lösungen untersucht um festzustellen, ob sie für In vivo-Anwendungen geeignet sind. Unsere Analyse ergab, dass die resultierenden wässrigen Lösungen steril waren (siehe Hintergrundinformationen Abbildung S13) und einen neutralen pH-Wert und eine neutrale Osmolarität aufwiesen (siehe Hintergrundinformationen Abbildung S10). Zytotoxizitätstests zeigten keine nachteiligen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit von Zellen, wenn sie den gereinigten SABRE-Pyruvatlösungen vergleichbaren oder doppelten Konzentrationen ausgesetzt waren, die nach der Injektion in vivo im Blutkreislauf erreicht wurden. Eine Toxizität wurde allerdings bei einer 10-fach höheren Konzentration beobachtet und war wahrscheinlich auf den restlichen Katalysator und die hohe Pyruvatkonzentration zurückzuführen (siehe Hintergrundinformationen Abbildung S14).

In vivo-Stoffwechselbildung

Um zu zeigen, dass unser gereinigtes SLIC-SABRE-[$1\text{-}^{13}\text{C}$]Pyruvat- d_3 für die In vivo-Stoffwechsel-Bildgebung geeignet ist, führten wir erste Experimente an gesunden Mäusen mit einem speziellen Maus-Quadraturresonator und einem präklinischen 7-T-MRT-System durch. Um ein hohes ^{13}C -Signal in vivo zu erhalten, entschieden wir uns, eine HP-Probe nur dann zu verwenden, wenn die Polarisation vor der Reinigung $\geq 15\%$ war und das gereinigte Probenvolumen $\approx 150\ \mu\text{L}$ betrug (Produktionszeit ≈ 6 min pro Dosis). Alle ^{13}C -Bilder wurden nach Injektion eines einzelnen Bolus von bis zu $5\ \mu\text{L/g}$ einer HP-Pyruvatlösung durch die Schwanzvene gewonnen. 15 s nach Beginn der Verabreichung wurde eine zentriert-phasencodierte ^{13}C -CSI-Sequenz (*Chemical Shift Imaging*) mit einem Flip-Winkel von 12° aus einer 3-mm-Axialschicht aufgenommen, welche die Nieren sowie Teile der Leber und des Darms abdeckte (Abbildung 3). Es wurde ein starkes HP- ^{13}C -Signal von Pyruvat und seinen Metaboliten beobachtet, und es wurden ^{13}C -Spektren und metabolische Karten rekonstruiert. Das ^{13}C -Signal von Pyruvat wurde hauptsächlich in der Aorta und der Vena cava gemessen. Während in der Niere hauptsächlich Laktat beobachtet wurde, enthielten Leber und Darm beträchtliche Mengen an Alanin.

In einem zweiten Experiment testeten wir die metabolische Bildgebung mit höherer räumlicher und zeitlicher Auflösung unter Verwendung einer schnellen, metabolitenselektiven $3\text{D-}^{13}\text{C}$ *balanced Steady-State Free Precession* (bSSFP)-Sequenz.^[38] Hier konzentrierten wir uns auf die Umwandlung von Pyruvat in Laktat und starteten eine Messserie von abwechselnden ^{13}C -Pyruvat- und Laktat-MRT-Akquisitionen etwa 15 s vor Beginn der Injektion von HP-[$1\text{-}^{13}\text{C}$]Pyruvat- d_3 , was eine zeitliche Auflösung von etwa 0.87 Hz ergab (Abbildung 4). Diese Einstellung ermöglichte es uns, die Umwandlungskinetik zu beobachten, wobei das Eintreffen des HP-Pyruvat-Bolus und die anschließende Bildung von Laktat deutlich zu erkennen waren. Aus den zeitaufgelösten 3D-Daten rekonstruierten wir Bilder, die zeigen, dass Pyruvat

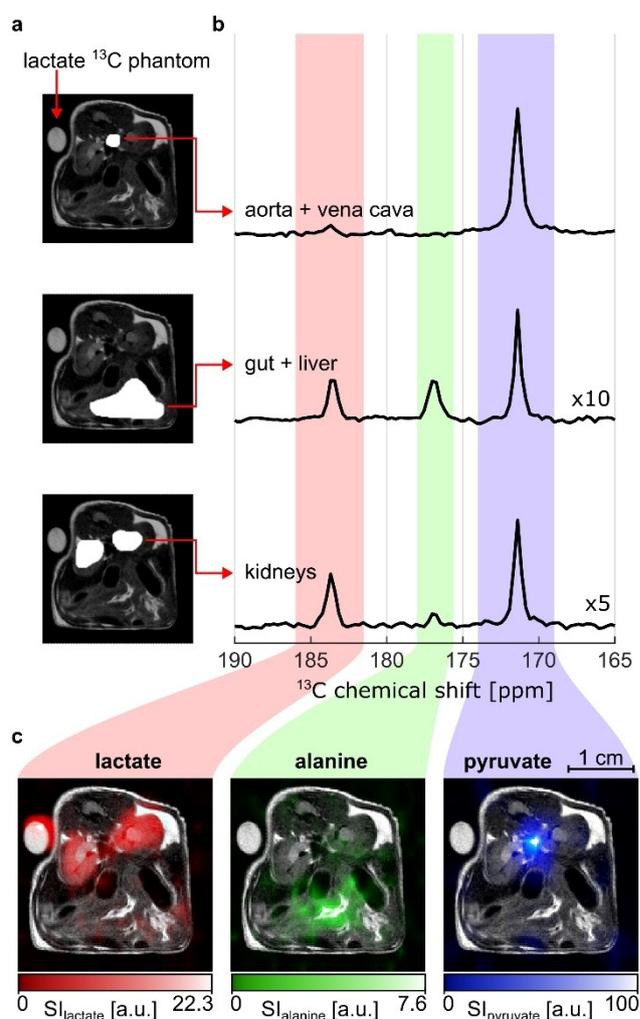


Abbildung 3. In vivo-Bildgebung des Stoffwechsels mit SABRE-hyperpolarisiertem [$1\text{-}^{13}\text{C}$]Pyruvat- d_3 , aufgenommen 15 s nach Beginn der HP-Bolusinjektion. **a**, anatomische ^1H -MRT mit den für die Berechnung der ^{13}C -Spektren verwendeten Regionen (weiß): Aorta und Vena cava (oben), Darm und Leber (Mitte) und Nieren (unten). **b**, entsprechende summierte ^{13}C -NMR-Spektren aus diesen Regionen mit den ^{13}C -Signalen der Metaboliten Pyruvat (blau), Alanin (grün) und Laktat (rot). **c**, 2D-Metaboliten-Karten von Laktat, Alanin und Pyruvat (dieselben Farben wie in **b**), überlagert mit einer anatomischen ^1H -MRT desselben axialen Schnitts (^{13}C CSI Sequenzparameter: 3-mm Schichtdicke, 20×14 Matrix, $1.5 \times 1.5\ \text{mm}^2$ Auflösung in der Ebene). Die unbearbeiteten ^{13}C -MRT-Daten sind im Anhang aufgeführt.

hauptsächlich im Herzen, in der Aorta und in der Hohlvene und Laktat hauptsächlich in den Nieren gebildet wurde.

Insgesamt führten wir bei vier Mäusen eine metabolische MRT durch und beobachteten für den Rest der MRT-Untersuchung ($\approx 20\text{--}30$ min) keine nachteiligen Auswirkungen der Injektion. Während des Bildgebungsexperiments beobachteten wir nur einen vorübergehenden Anstieg der Atemfrequenz nach der Injektion (siehe Hintergrundinformationen Abbildung S19). Nach etwa 1–2 Minuten kehrte die Atemfrequenz zu den Werten vor der Injektion zurück und blieb während des gesamten Experiments stabil. Dieser Bolus-induzierte vorübergehende Anstieg der Atemfrequenz

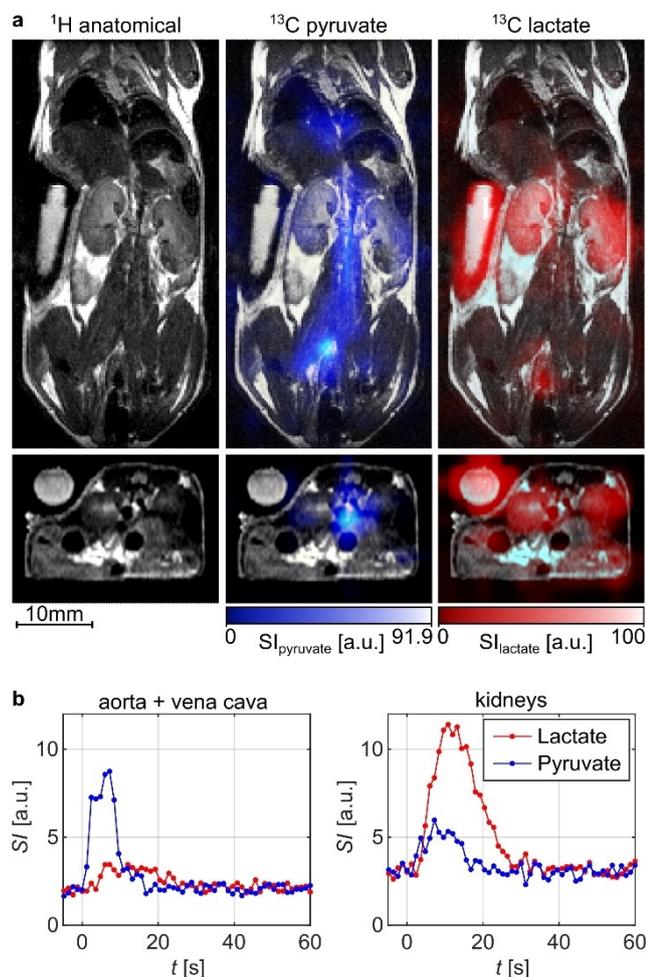


Abbildung 4. Dynamische 3D-In vivo- ^{13}C -Stoffwechsel-Bildgebung der Umwandlung von Pyruvat in Laktat. **a**, koronale (oben) und axiale Ansicht (unten) der anatomischen ^1H -MRT (links), überlagert mit dem zeitlich aufsummierten ^{13}C -Pyruvat- (Mitte) und ^{13}C -Laktat-Signal (rechts). **b**, Kinetik der Metabolitenumwandlung von Pyruvat und Laktat in Aorta und Vena cava (links) und in den Nieren (rechts). ^{13}C -MRT: $21 \times 11 \times 8$ Matrix, $2.5 \times 2.5 \times 2.5 \text{ mm}^3$ Auflösung, zeitliche Auflösung von $\approx 0.87 \text{ Hz}$. Die Messung wurde vor Beginn der Injektion gestartet. Die unbearbeiteten Daten sind im Anhang abgebildet.

ist eine häufig beobachtete Nebenwirkung des erhöhten Volumens, das in den rechten Ventrikel und den Lungenkreislauf gelangt. Die Mäuse wurden am Ende des Bildgebungsexperiments geopfert.

Insgesamt bestätigten unsere in vivo-Experimente, dass sich SABRE-polarisiertes Pyruvat gut für die metabolische Bildgebung eignet und eine leistungsfähige Methode zur Überwachung von Stoffwechselprozessen in vivo ist.

Diskussion

Wir stellen hier eine Methode zur Gewinnung von SABRE-hyperpolarisiertem Pyruvat in sterilen wässrigen Medien vor und demonstrieren ihre Anwendbarkeit für die metabolische MRT in vivo. Nach unserem Kenntnisstand ist dies das erste

Mal, dass eine hyperpolarisierte, injizierbare Dosis Pyruvat innerhalb von Minuten und ohne konforme Veränderungen des Moleküls hergestellt werden konnte.

Unser neuer SABRE-Ansatz wurde von den früheren PHIP-SAH-Fortschritten zur Gewinnung wässriger HP- $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat-Lösungen inspiriert. Beide Methoden nutzen die pH_2 -Spinordnung und eine chemische Reaktion in organischen Lösungsmitteln (häufig Aceton oder Chloroform für PHIP-SAH und Methanol für SABRE) in Gegenwart eines Katalysators auf Metallbasis (typischerweise Rhodium für PHIP-SAH und der Ir-Mes-Austauschkatalysator für SABRE). Anschließend wird die Polarisation auf den $[1-^{13}\text{C}]$ -Kern übertragen und die toxische Lösung wird gereinigt, um den Gehalt an organischen Lösungsmitteln und Katalysatoren zu reduzieren. Trotz erheblicher Unterschiede in der Chemie der Hyperpolarisation zeichnen sich beide Methoden durch einen schnellen Polarisationsaufbau aus, der eine kontinuierliche oder quasi-kontinuierliche Abgabe von HP-Molekülen ermöglicht.^[39,40] Ein Vorteil von SABRE ist, dass keine konforme Veränderung des Moleküls (Pyruvat) erforderlich ist – ein wichtiger Aspekt, wenn es um regulatorische Überlegungen geht (keine Wirkstoffsynthese während des Polarisationsprozesses).^[12]

Unser SABRE-Ansatz ermöglicht es uns derzeit, eine Dosis HP-Pyruvat in etwa sechs Minuten oder mehrere Dosen während einer Bildgebungssitzung (d.h. in der Dauer einer Anästhesie) zu polarisieren. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Methoden liegt in der Übertragung der pH_2 -Spinordnung: SABRE nutzt die reversible temporäre Bindung von pH_2 und Pyruvat an den Katalysator, während PHIP-SAH die permanente paarweise Addition durch Hydrierung mit pH_2 nutzt. Um den "hydrierenden" PHIP-Ansatz zu ermöglichen, wird die Seitenarm-Hydrierung verwendet, da Pyruvat keinen direkten ungesättigten Vorläufer hat. Daher erfordert diese Methode die Synthese geeigneter veresterter Edukte für die permanente Addition von pH_2 .^[11,12] Infolgedessen umfasst die Aufreinigung für PHIP-SAH in der Regel eine schnelle Abspaltung des Ester-Seitenarms, um das HP-Pyruvat zu erhalten.^[15] Hier haben wir isotonenangereichertes $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 verwendet, das im Handel erhältlich ist und für die SABRE-Hyperpolarisation keine weiteren chemischen Modifikationen erfordert. Die kommerzielle Verfügbarkeit des Substrats und der Wegfall der Seitenarmspaltung bei der Aufreinigung sind vielversprechende Vorteile.

Wir haben uns für unsere Studien für das deuterierte Pyruvat-Isotopolog entschieden, da unsere jüngsten Untersuchungen eine etwa doppelt so starke Polarisierung im Vergleich zur protonierten Form ergeben haben. Darüber hinaus beobachteten wir in unserer früheren Studie längere ^{13}C T_1 -Relaxationszeiten für Pyruvat- d_3 im Vergleich zu Pyruvat- h_3 (ca. 220 s gegenüber ca. 140 s bei 1.9 T),^[36] was wir hier als vorteilhaft erachteten, um die ^{13}C -Polarisationswerte nach dem ca. 1-minütigen Reinigungsprozess zu maximieren. Es ist bemerkenswert, dass die metabolische Umwandlungskinetik von Pyruvat durch das Vorhandensein von Deuteriumisotopen nicht beeinträchtigt wird, wie frühere Studien gezeigt haben.^[41] Daher kann Pyruvat- d_3 für metabolische HP-MRT

erfolgreich anstelle von nicht deuteriertem Pyruvat verwendet werden.

Hier beobachteten wir eine Verringerung der Polarisation während des Reinigungsprozesses um einen Faktor von 0.60 ± 0.07 . Der größte Teil dieses Verlusts kann der longitudinalen Relaxation zugeschrieben werden: Angesichts der gemessenen T_1 -Werte bei 450 mT würden wir einen Reduktionsfaktor von ≈ 0.75 erwarten. Zusätzliche Verluste können durch Faktoren wie T_1 -Änderungen bei höheren Temperaturen, kürzere T_1 -Werte während des Transfers und der Handhabung bei niedrigeren Magnetfeldern, sowie potenziell durch zusätzliche, durch den ausgefällten Ir-Katalysator entstehende Relaxationseffekte während und nach der Entfernung des Lösungsmittels verursacht worden sein. Diese Aspekte müssen im Rahmen unserer laufenden systematischen Studien weiter untersucht werden. Während eine schnellere Probenhandhabung und -reinigung die Polarisationsverluste minimieren würde, konnten wir bereits ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis für die In vivo-Überwachung des Pyruvat-Stoffwechsels bei Mäusen mit ^{13}C -MRT erreichen.

Obwohl wir diesen bedeutenden Durchbruch erzielt haben, gibt es immer noch Einschränkungen bei unserer derzeitigen Methode. Dazu gehört die beobachtete große Polarisationsvariabilität zwischen den einzelnen Proben, mit einer mittleren ^{13}C -Polarisation von $13 \pm 3\%$. Diese Abweichung ist ähnlich wie in früheren Studien, wie z.B. $8 \pm 2\%$ ^[27] und $10 \pm 1\%$ ^[24] für 30 mM [^{13}C]Pyruvat- h_3 in Methanol mit SABRE SHEATH. Für das präklinische DNP-Gerät der neuesten Generation wurde ein Variationskoeffizient von 15% für ^{13}C -Pyruvat berichtet.^[42] Der Ursprung dieser Variabilität ist derzeit spekulativ, aber wir glauben, dass experimentelle Variationen wie unterschiedliche Probenpositionen im SLIC-SABRE-Setup, Verunreinigungen aus früheren Experimenten und die Positionierung des Sprudelkatheters, die zu unterschiedlichen pH_2 -Gas-Lösungsmittel-Oberflächen führt, zu den Faktoren beitragen können. Diese Effekte sollten weiter untersucht werden, um die Konsistenz und Reproduzierbarkeit unserer Methode zu verbessern. Weitere Einschränkungen unserer derzeitigen Methode sind (a) das extrahierte Volumen und (b) die Pyruvatkonzentration, die $\approx 150\ \mu\text{L}$ bzw. $\approx 30\ \text{mM}$ betragen. Diese Mengen sind ausreichend für in vivo-Studien an Mäusen, für Messungen an Ratten oder Großtieren sind jedoch größere Mengen erforderlich. Derzeit ist die Größe unseres Versuchsaufbaus der begrenzende Faktor für die Herstellung größerer Dosen, für die wir keine grundlegenden Hindernisse sehen. Durch die Vergrößerung der Reaktionsgefäße, der Anschlüsse, der B_0 - und B_1 -Spulen und des μ -Metallschildes dürften größere Volumina möglich sein. Sobald größere Volumina hergestellt sind, kann die Pyruvatkonzentration weiter erhöht werden, indem die Verdampfungszeit verlängert wird, wie wir bereits gezeigt haben (Abbildung S12). Ein anderer Ansatz wäre die Erhöhung der Anfangskonzentration von Pyruvat, obwohl für eine effiziente SABRE-Polarisierung auch die pH_2 -Konzentration in Methanol erhöht werden müsste, z.B. durch Anwendung eines höheren Drucks.^[24,43] Daher müssten in Zukunft spezielle Hochdruckreaktoren entwickelt werden, um das gewünsch-

te Injektionsvolumen zu ermöglichen und die Lösungsverluste zu minimieren.^[44,45]

Das hier vorgeschlagene Reinigungsverfahren ist schnell und einfach zu installieren und reduziert sowohl Methanol als auch Katalysator unter akut toxische Werte. Wir gehen daher davon aus, dass diese Technik vielen Forschenden zur Verfügung stehen wird. In Zukunft könnte eine schnellere und vollständigere Verdampfung des Methanols durch die Optimierung von Vakuum und Temperatur, die Verwendung größerer Verdampfungskammern und die Vergrößerung der Oberfläche zwischen der Flüssig- und der Gasphase erreicht werden. Es ist zu beachten, dass eine Verringerung des Methanolgehalts auch zu einer weiteren Verringerung des derzeitigen Iridiumgehalts führen kann. Dabei ist es wichtig zu bedenken, dass unser spezifischer Ansatz die geringe Löslichkeit des verwendeten Katalysators in Wasser ausnutzt, die dazu führt, dass er sich beim Verdampfen des Methanols abscheidet. Daher ist die von uns vorgeschlagene Reinigungsmethode möglicherweise nicht geeignet, um den Katalysator für SABRE-Ansätze zu reduzieren, die darauf abzielen, die Polarisierung direkt in wässrigen Medien mit wasserlöslichen Katalysatoren zu erzeugen.^[28–30]

Schließlich wollen wir noch die aktuellen Mengen an Restmethanol und Katalysator in den gereinigten Proben diskutieren. Unser derzeitiges Reinigungsverfahren führt zu einer Methanolkonzentration von etwa 12.5 mM oder 400 mg/L im Blutkreislauf der injizierten Mäuse, was 40 mg/kg Methanol pro Mausgewicht entspricht. Diese Konzentration liegt bereits jetzt deutlich unter den für Nagetiere berichteten Werten für die orale LD50 (5.628 g/kg) und LD00 (143 mg/kg)^[46] und nahe an der Schwelle, ab der Menschen nach einer Methanolvergiftung behandelt werden (300 mg/L Blut).^[47] In Bezug auf den SABRE-Katalysator konnten wir in der Literatur keine Toxizitätsstudien finden. Unsere Tests haben jedoch nur bei Konzentrationen, die höher sind als die Endkonzentration im Blut, eine Toxizität für Zellen ergeben. Für präklinische und möglicherweise irgendwann in der Zukunft auch für klinische Anwendungen müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. In Bezug auf Methanol und Iridium empfehlen die Richtlinien des *international council for harmonization* (ICH) akzeptable Mengen von 3.000 ppm Methanol und 10 μg Ir.^[48,49] Im Vergleich zu den hier, bei dieser ersten Demonstration, erreichten Werten, müsste der Methanolgehalt um mindestens das Dreifache und der Iridiumgehalt um mindestens das Zwanzigfache reduziert werden (siehe Hintergrundinformationen). Mit den derzeitigen Konzentrationen können zwar erste präklinische Studien durchgeführt werden, aber es sind weitere Maßnahmen erforderlich, um Konzentrationen zu erreichen, die für eine Anwendung beim Menschen akzeptabel sind. Daher werden wir auch in Zukunft auf eine Verringerung dieser Werte hinarbeiten.

Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass eine nicht-invasive In vivo-Stoffwechselbildgebung mit SABRE-hyperpolarisiertem Pyruvat, das in wässriger Lösung hergestellt wird, möglich ist. Die damit verbundene biologische Belastung

scheint gering zu sein, während der Produktionsprozess im Vergleich zu einem dDNP-Experiment viel schneller (< 10 min) und relativ einfach zu installieren ist.

Die effiziente Hyperpolarisierung von Pyruvat und ihre Translation in die präklinische Bildgebung sind seit der Entdeckung der SABRE-Methode im Jahr 2009 ein Schwerpunkt Forschung gewesen. In dieser Studie haben wir [^{13}C]Pyruvat- d_3 mit SLIC-SABRE bei einem Mikrotessla-Magnetfeld erfolgreich hyperpolarisiert,^[36] und die langfristige Polarisation ermöglichte es uns, hoch-hyperpolarisiertes [^{13}C]Pyruvat- d_3 in gereinigten wässrigen Lösungen zu gewinnen. Dieser Ansatz ermöglichte es uns, die erste metabolische in vivo-MRT mit hyperpolarisiertem SABRE-Pyruvat durchzuführen. Wir weisen auch darauf hin, dass eine Gruppe der North Carolina State University zur gleichen Zeit erste In-vivo-Daten mit SABRE-polarisiertem Pyruvat liefern konnte, was unsere Schlussfolgerungen und die methodische Eignung von SABRE weiter belegt.^[56] Dies ist ein vielversprechendes Ergebnis, da Pyruvat die am häufigsten verwendete HP-MRI-Substanz ist.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass SABRE jetzt eine praktikable Option für die präklinische metabolische Pyruvat-MRT ist, mit einem ausreichend hohen Signal-Rausch-Verhältnis, um den Pyruvat-Stoffwechsel in Mäusen genau zu überwachen. Wir gehen davon aus, dass diese Technik von Forschenden in großem Umfang eingesetzt wird und den Weg für eine verbesserte metabolische Bildgebung und ein besseres Verständnis der metabolischen Veränderungen bei Krebs und anderen Krankheiten ebnet.

Hintergrundinformationen

Weitere experimentelle Details sowie Daten zur Probencharakterisierung, MRT und Relaxation finden Sie in den Hintergrundinformationen. Die Autoren haben zusätzliche Referenzen in den Hintergrundinformationen angegeben.^[50–55]

Danksagung

Die Forschung in dieser Publikation wurde gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Förderprogramms “Quantentechnologien – von der Grundlagenforschung zum Markt” unter dem Projekt “QuE-MRT” (Vertragsnummer: 13 N16448), dem Deutschen Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), B.E.S.T. Fluidsysteme GmbH I Swagelok Stuttgart und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG #SCHM 3694/1-1, #SCHM 3694/2-1, #SFB1479 Project ID: 441891347SFB1160, #423813989/GRK2606). ABS und MP danken der Forschungskommission des Universitätsklinikums Freiburg für die Unterstützung. EYC dankt der NSF CHE-1904780. ABS und EYC danken der Wayne State University für ein Postdoktorandenstipendium. JBH bedankt sich für die Unterstützung durch die DFG, das BMBF BlueHealthTech und die medizinische Fakultät der Universität Kiel (HO-4602/2, HO-4602/3, EXC2167, FOR5042, 03WIR6208 A). FS erhielt Un-

terstützung von der DFG (#391523415) und der Jungen Akademie der Bayerischen Akademie der Wissenschaften. EU-Vorschlag Nr. ERC-2022-ADG Projekt: 101094168 – AlloCure (ERC Advanced grant, RZ). Die Autoren danken dem ‘Preclinical Imaging Research Center – Core Facility’ (AMIRCF; DFG-RISources No RI_00052) und der Freiburger MagRes-Union für die Unterstützung bei der Datenakquisition. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Conflict of Interest

SK ist Mitarbeiter der NVision Imaging Technologies GmbH. FS ist Mitglied des wissenschaftlichen Beirats der NVision Imaging Technologies GmbH. EYC hält eine Beteiligung an XeUS Technologies Ltd. und ist Mitglied des wissenschaftlichen Beirats von Visma Life Sciences LLC. SK und SG sind Mitbegründer von MagniKeen, einem Spin-off des Max-Planck-Instituts für multidisziplinäre Naturwissenschaften, Göttingen. Die anderen Autoren haben keine potenziellen Interessenkonflikte anzugeben.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind auf begründete Anfrage beim Autor erhältlich.

Stichwörter: Hyperpolarisierung · Metabolische Bildgebung · Pyruvat · SABRE · Parawasserstoff

- [1] E. A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbut, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij, *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 228–247.
- [2] S. E. Day, M. I. Kettunen, F. A. Gallagher, D.-E. Hu, M. Lerche, J. Wolber, K. Golman, J. H. Ardenkjaer-Larsen, K. M. Brindle, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1382–1387.
- [3] Z. J. Wang, M. A. Ohliger, P. E. Larson, J. W. Gordon, R. A. Bok, J. Slater, J. E. Villanueva-Meyer, C. P. Hess, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, *Radiology* **2019**, *291*, 273.
- [4] J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, J. H. Ardenkjaer-Larsen, J. A. Bankson, K. Brindle, C. H. Cunningham, F. A. Gallagher, K. R. Keshari, A. Kjaer, C. Laustsen, D. A. Mankoff, M. E. Merritt, S. J. Nelson, J. M. Pauly, P. Lee, S. Ronen, D. J. Tyler, S. S. Rajan, D. M. Spielman, L. Wald, X. Zhang, C. R. Malloy, R. Rizi, *Neoplasia* **2019**, *21*, 1–16.
- [5] R. Woitek, M. A. McLean, S. Ursprung, O. M. Rueda, R. Manzano Garcia, M. J. Locke, L. Beer, G. Baxter, L. Rundo, E. Provenzano, J. Kaggie, A. Patterson, A. Frary, J. Field-Rayner, V. Papalouka, J. Kane, A. J. V. Benjamin, A. B. Gill, A. N. Priest, D. Y. Lewis, R. Russell, A. Grimmer, B. White, B. Latimer-Bowman, I. Patterson, A. Schiller, B. Carmo, R. Slough, T. Lanz, J. Wason, R. F. Schulte, S.-F. Chin, M. J. Graves, F. J. Gilbert, J. E. Abraham, C. Caldas, K. M. Brindle, E. Sala, F. A. Gallagher, *Cancer Res.* **2021**, *81*, 6004–6017.
- [6] N. Sushentsev, M. A. McLean, A. Y. Warren, A. J. V. Benjamin, C. Brodie, A. Frary, A. B. Gill, J. Jones, J. D. Kaggie, B. W. Lamb, M. J. Locke, J. L. Miller, I. G. Mills, A. N. Priest, F. J. L. Robb, N. Shah, R. F. Schulte, M. J. Graves, V. J.

- Gnanapragasam, K. M. Brindle, T. Barrett, F. A. Gallagher, *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 466.
- [7] J.-H. Ardenkjaer-Larsen, G. S. Boebinger, A. Comment, S. Duckett, A. S. Edison, F. Engelke, C. Griesinger, R. G. Griffin, C. Hilty, H. Maeda, G. Parigi, T. Prisner, E. Ravera, J. van Bentum, S. Vega, A. Webb, C. Luchinat, H. Schwalbe, L. Frydman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9162–9185.
- [8] J. H. Ardenkjaer-Larsen, S. Bowen, J. R. Petersen, O. Rybalko, M. S. Vinding, M. Ullisch, N. Chr Nielsen, *Magn. Reson. Med.* **2019**, *81*, 2184–2194.
- [9] A. Capozzi, T. Cheng, G. Boero, C. Roussel, A. Comment, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15757.
- [10] S. Jannin, A. Bornet, R. Melzi, G. Bodenhausen, *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *549*, 99–102.
- [11] F. Reineri, E. Cavallari, C. Carrera, S. Aime, *Magn. Reson. Mater. Phys. Biol. Med.* **2021**, *34*, 25–47.
- [12] A. B. Schmidt, C. R. Bowers, K. Buckenmaier, E. Y. Chekmenev, H. de Maissin, J. Eills, F. Ellermann, S. Glöggler, J. W. Gordon, S. Knecht, I. V. Koptiyug, J. Kuhn, A. N. Pravdivtsev, F. Reineri, T. Theis, K. Them, J.-B. Hövener, *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 479–502.
- [13] P. Saul, L. Schröder, A. B. Schmidt, J.-B. Hövener, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2023**, *15*, e1879.
- [14] J. Eills, D. Budker, S. Cavagnero, E. Y. Chekmenev, S. J. Elliott, S. Jannin, A. Lesage, J. Matysik, T. Meersmann, T. Prisner, J. A. Reimer, H. Yang, I. V. Koptiyug, *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 1417–1551.
- [15] F. Reineri, T. Boi, S. Aime, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 5858.
- [16] R. W. Adams, J. A. Aguilar, K. D. Atkinson, M. J. Cowley, P. I. P. Elliott, S. B. Duckett, G. G. R. Green, I. G. Khazal, J. López-Serrano, D. C. Williamson, *Science* **2009**, *323*, 1708–1711.
- [17] T. Theis, M. L. Truong, A. M. Coffey, R. V. Shchepin, K. W. Waddell, F. Shi, B. M. Goodson, W. S. Warren, E. Y. Chekmenev, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 1404–1407.
- [18] V. V. Zhivonitko, I. V. Skovpin, I. V. Koptiyug, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2506–2509.
- [19] A. N. Pravdivtsev, A. V. Yurkovskaya, H. Zimmermann, H.-M. Vieth, K. L. Ivanov, *Chem. Phys. Lett.* **2016**, *661*, 77–82.
- [20] S. Knecht, A. S. Kiryutin, A. V. Yurkovskaya, K. L. Ivanov, *J. Magn. Reson.* **2018**, *287*, 10–14.
- [21] J. R. Lindale, S. L. Eriksson, C. P. N. Tanner, Z. Zhou, J. F. P. Colell, G. Zhang, J. Bae, E. Y. Chekmenev, T. Theis, W. S. Warren, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 395.
- [22] S. L. Eriksson, J. R. Lindale, X. Li, W. S. Warren, *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabl3708.
- [23] W. Iali, S. S. Roy, B. J. Tickner, F. Ahwal, A. J. Kennerley, S. B. Duckett, *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 10377–10381.
- [24] P. TomHon, M. Abdulmojeed, I. Adelabu, S. Nantogma, M. S. H. Kabir, S. Lehmkuhl, E. Y. Chekmenev, T. Theis, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 282–287.
- [25] I. Adelabu, P. TomHon, M. S. H. Kabir, S. Nantogma, M. Abdulmojeed, I. Mandzhieva, J. Ettetdgui, R. E. Swenson, M. C. Krishna, T. Theis, B. M. Goodson, E. Y. Chekmenev, *ChemPhysChem* **2022**, *23*, e202100839.
- [26] S. Nantogma, S. L. Eriksson, I. Adelabu, I. Mandzhieva, A. Browning, P. TomHon, W. S. Warren, T. Theis, B. M. Goodson, E. Y. Chekmenev, *J. Phys. Chem. A* **2022**, *126*, 9114–9123.
- [27] A. B. Schmidt, H. de Maissin, I. Adelabu, S. Nantogma, J. Ettetdgui, P. TomHon, B. M. Goodson, T. Theis, E. Y. Chekmenev, *ACS Sens.* **2022**, *7*, 3430–3439.
- [28] J.-B. Hövener, N. Schwaderlapp, R. Borowiak, T. Lickert, S. B. Duckett, R. E. Mewis, R. W. Adams, M. J. Burns, L. A. R. Highton, G. G. R. Green, A. Olaru, J. Hennig, D. von Elverfeldt, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1767–1774.
- [29] J. F. P. Colell, M. Emondts, A. W. J. Logan, K. Shen, J. Bae, R. V. Shchepin, G. X. Ortiz, P. Spannring, Q. Wang, S. J. Malcolmson, E. Y. Chekmenev, M. C. Feiters, F. P. J. T. Rutjes, B. Blümich, T. Theis, W. S. Warren, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 7761–7767.
- [30] P. Spannring, I. Reile, M. Emondts, P. P. M. Schleker, N. K. J. Hermkens, N. G. J. van der Zwaluw, B. J. A. van Weerdenburg, P. Tinnemans, M. Tessari, B. Blümich, F. P. J. T. Rutjes, M. C. Feiters, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 9277–9282.
- [31] D. A. Barskiy, L. A. Ke, X. Li, V. Stevenson, N. Widarman, H. Zhang, A. Truxal, A. Pines, *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 2721–2724.
- [32] B. E. Kidd, J. L. Gesiorski, M. E. Gemeinhardt, R. V. Shchepin, K. V. Kovtunov, I. V. Koptiyug, E. Y. Chekmenev, B. M. Goodson, *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 16848–16852.
- [33] S. J. DeVience, R. L. Walsworth, M. S. Rosen, *Phys. Rev. Lett.* **2013**, *111*, 173002.
- [34] T. Theis, M. Truong, A. M. Coffey, E. Y. Chekmenev, W. S. Warren, *J. Magn. Reson.* **2014**, *248*, 23–26.
- [35] A. N. Pravdivtsev, K. Buckenmaier, N. Kempf, G. Stevanato, K. Scheffler, J. Engelmann, M. Plaumann, R. Koerber, J.-B. Hövener, T. Theis, *J. Phys. Chem. C* **2023**, *127*, 6744–6753.
- [36] A. B. Schmidt, J. Eills, L. Dagsy, M. Gierse, M. Keim, S. Lucas, M. Bock, I. Schwartz, M. Zaitsev, E. Y. Chekmenev, S. Knecht, *J. Phys. Chem. Lett.* **2023**, *14*, 5305–5309.
- [37] Y. Ding, S. Korchak, S. Mamone, A. P. Jagtap, G. Stevanato, S. Sternkopf, D. Moll, H. Schroeder, S. Becker, A. Fischer, E. Gerhardt, T. F. Outeiro, F. Opazo, C. Griesinger, S. Glöggler, *Chem. Methods* **2022**, *2*, e202200023.
- [38] J. G. Skinner, G. J. Topping, L. Nagel, I. Heid, C. Hundshammer, M. Grashei, F. H. A. van Heijster, R. Braren, F. Schilling, *Magn. Reson. Med.* **2023**, *90*, 894–909.
- [39] J.-B. Hövener, N. Schwaderlapp, T. Lickert, S. B. Duckett, R. E. Mewis, L. A. R. Highton, S. M. Kenny, G. G. R. Green, D. Leibfritz, J. G. Korvink, J. Hennig, D. von Elverfeldt, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2946.
- [40] A. B. Schmidt, M. Zimmermann, S. Berner, H. de Maissin, C. A. Müller, V. Ivantsev, J. Hennig, D. von Elverfeldt, J.-B. Hövener, *Commun. Chem.* **2022**, *5*, 21.
- [41] A. M. Funk, X. Wen, T. Hever, N. R. Maptue, C. Khemtong, A. D. Sherry, C. R. Malloy, *J. Magn. Reson.* **2019**, *301*, 102–108.
- [42] A. Ferrari, J. Peters, M. Anikeeva, A. Pravdivtsev, F. Ellermann, K. Them, O. Will, E. Peschke, H. Yoshihara, O. Jansen, J.-B. Hövener, *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 11694.
- [43] A. Duchowny, J. Denninger, L. Lohmann, T. Theis, S. Lehmkuhl, A. Adams, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2465.
- [44] A. B. Schmidt, S. Berner, M. Braig, M. Zimmermann, J. Hennig, D. von Elverfeldt, J.-B. Hövener, *PLoS One* **2018**, *13*, e0200141.
- [45] S. Berner, A. B. Schmidt, F. Ellermann, S. Korchak, E. Y. Chekmenev, S. Glöggler, D. von Elverfeldt, J. Hennig, J.-B. Hövener, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 2320–2330.
- [46] PubChem, “Methanol,” can be found under <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/887>.
- [47] B. Mégarbane, *Open Access Emerg. Med. OAEM* **2010**, *2*, 67–75.
- [48] ICH HARMONISED GUIDELINE Q3 C(R8), **2021**.
- [49] ICH HARMONISED GUIDELINE Q3D(R2), **2022**.
- [50] J.-B. Hövener, S. Bär, J. Leupold, K. Jenne, D. Leibfritz, J. Hennig, S. B. Duckett, D. von Elverfeldt, *NMR Biomed.* **2013**, *26*, 124–131.
- [51] R. Savka, H. Plenio, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 891–893.
- [52] A. B. Schmidt, D. L. Andrews, A. Rohrbach, C. Gohn-Kreuz, V. N. Shatokhin, V. G. Kiselev, J. Hennig, D. von Elverfeldt, J.-B. Hövener, *J. Magn. Reson.* **2016**, *268*, 58–67.
- [53] A. S. Kiryutin, G. Sauer, S. Hadjiali, A. V. Yurkovskaya, H. Breitzke, G. Buntkowsky, *J. Magn. Reson.* **2017**, *285*, 26–36.
- [54] H. Wolinsky, S. Glagov, *Circ. Res.* **1967**, *20*, 99–111.

- [55] S. J. Nelson, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, P. E. Z. Larson, A. L. Harzstark, M. Ferrone, M. van Criekinge, J. W. Chang, R. Bok, I. Park, G. Reed, L. Carvajal, E. J. Small, P. Munster, V. K. Weinberg, J. H. Ardenkjaer-Larsen, A. P. Chen, R. E. Hurd, L.-I. Odegardstuen, F. J. Robb, J. Tropp, J. A. Murray, *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 108.
- [56] K. MacCulloch, A. Browning, D. O. Guarin Bedoya, S. J. McBride, M. B. Abdulmojeed, C. Dedesma, B. M. Goodson, M. S. Rosen, E. Y. Chekmenev, Y.-F. Yen, P. TomHon, T. Theis, *J. Magn. Reson. Open* **2023**, *16–17*, 100129, <https://doi.org/10.1016/j.jmro.2023.100129>.

Manuskript erhalten: 27. März 2023

Akzeptierte Fassung online: 13. Juli 2023

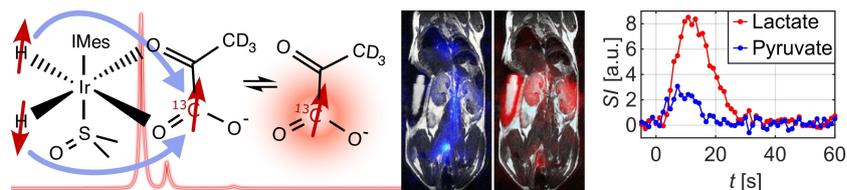
Endgültige Fassung online: ■ ■ ■ ■

Forschungsartikel

Magnetresonanztomographie

H. de Maissin, P. R. Groß, O. Mohiuddin, M. Weigt, L. Nagel, M. Herzog, Z. Wang, R. Willing, W. Reichardt, M. Pichotka, L. Heß, T. Reinheckel, H. J. Jessen, R. Zeiser, M. Bock, D. von Elverfeldt, M. Zaitsev, S. Korchak, S. Glögger, J.-B. Hövener, E. Y. Chekmenev, F. Schilling, S. Knecht,* A. B. Schmidt* — e202306654

In vivo-Stoffwechselbildung mit $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 , hyperpolarisiert durch reversiblen Austausch mit Parawasserstoff



Schnelle und kostengünstige Parawasserstoff-Hyperpolarisation mittels Signalverstärkung durch reversiblen Austausch (SABRE) ermöglicht In vivo-Magnetresonanztomographie-Stoffwechselbildung. Wir demonstrieren die erste In vivo-Anwendung von SABRE-hyperpolarisiertem $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 in einer gerei-

nigten, wässrigen Lösung mit ≈ 30 mM $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvat- d_3 , polarisiert auf $\approx 11\%$, erhalten durch schnelle Lösungsmittelverdampfung und Metallfilterung. Diese Errungenschaft ebnet den Weg für erschwingliche und weit verbreitete Anwendungen der metabolischen Bildgebung.