



Entwicklung eines ^{18}F -markierten Tetrazins mit vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften für die bioorthogonale Positronenemissionstomographie**

Christoph Denk, Dennis Svatunek, Thomas Filip, Thomas Wanek, Daniel Lumpi, Johannes Fröhlich, Claudia Kuntner* und Hannes Mikula*

Abstract: Es wurde ein niedermolekulares ^{18}F -markiertes Tetrazin entwickelt, das im Bereich der bioorthogonalen Bildgebung mithilfe von PET verwendet werden kann. Durch ^{18}F -Fluorierung einer geeigneten Vorstufe konnten die Verwendung von prosthetischen Gruppen und die Notwendigkeit mehrerer radiochemischer Syntheseschritte vermieden werden. Die Reaktionskinetik der Cycloaddition mit trans-Cyclooctenen wurde mithilfe quantenchemischer Rechnungen und Stopped-Flow-Messungen in humanem Plasma untersucht. Eine hohe Stabilität konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, während PET/MR-Untersuchungen an Mäusen eine schnelle homogene Biodistribution offenbarten. Anhand eines In-vivo-Experiments konnte die Bioorthogonalität der neuartigen Tetrazinsonde bestätigt werden. Die hervorragenden Eigenschaften dieser bioorthogonalen Sonde zur Lokalisierung und Visualisierung von Dienophil-markierten Molekülen bilden die Grundlage für viele Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der molekularen Bildgebung.

Die bioorthogonale Bildgebung unter Anwendung von „In-vivo-Klick-Chemie“ hat sich im letzten Jahrzehnt als vielseitige und vorteilhafte Technologie im Bereich der chemischen Biologie und der Biomedizin etabliert.^[1] Seit der Entwicklung der kupferfreien Klick-Chemie unter Anwendung der durch erhöhte Ringspannung begünstigten (strain-promoted) Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC)^[2] wurde diese bioorthogonale Ligation für eine Vielzahl von Anwendungen herangezogen, mit dem Ziel, biologische Prozesse auf molekularer Ebene besser untersuchen und beschreiben zu können.^[3] Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Ligation durch die Entwicklung optimierter Cyclooctene in den letzten Jahren suk-

zessiv verbessert wurde,^[4] ist diese nach wie vor limitiert ($< 5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, Acetonitril, 20°C) und daher für schnelle In-vivo-Biokonjugationen nur unzureichend geeignet. Dennoch wurde In-vivo-SPAAC erst kürzlich für die Entwicklung eines zweistufigen (pretargeted) Positronenemissionstomographie-(PET)-Verfahrens angewendet (erste Stufe: Verabreichung einer sich im Zielgewebe anreichernden Verbindung; zweite Stufe: Injektion einer radiomarkierten Sonde, die durch In-vivo-Ligation die Detektion und Visualisierung der ersten Verbindung ermöglicht).^[5] Um Probleme in Verbindung mit den relativ geringen Reaktionsgeschwindigkeiten der SPAAC-Ligation zu umgehen, wurde unabhängig von Fox et al. und Weissleder et al. die durch eine Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (inverse electron demand Diels–Alder, IEDDA) initiierte Konjugation von 1,2,4,5-Tetrazinen (Tz) und gespannten Cycloalkenen (z.B. trans-Cyclooctenen (TCO)) als effiziente bioorthogonale Ligation entwickelt.^[6] Diese Reaktion wurde seither im Zuge einer Vielzahl von biomedizinischen Applikationen verwendet, darunter die Entwicklung von bioorthogonalen Sonden für die molekulare Bildgebung, die effiziente Modifikation von Proteinen sowie die schnelle Synthese von radioaktiv markierten Substanzen.^[7] Zudem konnte IEDDA in Kombination mit SPAAC für die simultane Bildgebung zweier Zielsubstanzen (Targets) verwendet werden.^[8] Die Verknüpfung eines Tetrazins mit einem Bodipy-Fluorophor ermöglichte die Entwicklung von höchst effektiven fluorogenen bioorthogonalen Sonden, wie erst kürzlich von Carlson et al. beschrieben.^[9] Die Reaktionsgeschwindigkeit der IEDDA-Ligation konnte durch die Anwendung von substituierten Bicyclo[6.1.0]non-4-enen als deutlich reaktivere Dienophile (s-TCO, zusätzlich gespannte (strained) *trans*-Cyclooctene)) signifikant gesteigert werden, wodurch sich Reaktionsgeschwindigkeiten $> 20000 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (MeOH, 25°C) erreichen lassen.^[10] Um sterische Einflüsse auf das Biomolekül zu minimieren, wurden zusätzlich zu den etablierten Dienophilen (TCO und s-TCO)^[11] neuartige, stabilisierte Cyclopropene (CP) mit deutlich geringerem Raumbedarf entwickelt, die bereits für die molekulare Bildgebung in lebenden Zellen angewendet wurden.^[12]

Trotz einer Vielzahl von Anwendungen der IEDDA-Ligation im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie ist die Entwicklung von bioorthogonalen PET-Verfahren wegen des Mangels an radiomarkierten bioorthogonalen Sonden mit geeigneten Eigenschaften (homogene Biodistribution, schnelle In-vivo-Reaktion, hohe Stabilität, adäquate Ausscheidung) immer noch limitiert. Da die Radiosynthese von

[*] C. Denk, D. Svatunek, Dr. D. Lumpi, Prof. J. Fröhlich, Dr. H. Mikula
Institut für Angewandte Synthesechemie
Technische Universität Wien (TUW) (Österreich)
E-Mail: hannes.mikula@tuwien.ac.at

Dr. T. Filip, Dr. T. Wanek, Priv.-Doz. Dr. C. Kuntner
Health and Environment Department, Biomedical Systems
Austrian Institute of Technology (AIT)
Seibersdorf (Österreich)
E-Mail: claudia.kuntner@ait.ac.at

[**] Wir danken der Hochschuljubiläumsstiftung der Stadt Wien (H-2500/2012) für die Finanzierung und zudem Prof. Wolfgang Linert (TUW), Dr. Roland Müller (Seibersdorf Laboratories), Dominik Matscheko und Walter Kuba (beide TUW) für ihre Unterstützung dieser Arbeit.

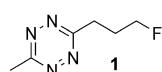
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404277> zu finden.

¹⁸F-Tetrazinen wegen deren geringer Stabilität unter den notwendigen Reaktionsbedingungen der direkten Fluorierung nicht realisiert werden konnte, wurde die ¹⁸F-Markierung von Dienophilen, wie TCO oder Norbornen, bislang bevorzugt.^[13] Der Nachteil bei diesem Verfahren ist jedoch, dass anstelle der leicht verfügbaren Cycloalkene eine Tetrazinmodifikation am Zielmolekül angebracht werden muss. Zudem könnte ein radiomarkiertes Tetrazin für die bioorthogonale Bildgebung unterschiedlicher Dienophile eingesetzt werden. Die erstmalige Radiosynthese eines ¹¹C-markierten Tetrazins wurde von Herth et al. vorgestellt,^[14] und metallische Radionuklide wie ⁶⁴Cu oder ⁸⁹Zr wurden mit Tetrazinen unter Verwendung von Chelatliganden verknüpft.^[15] Des Weiteren wurden Polymer-modifizierte Tetrazine entwickelt und bereits für zweistufige PET-Verfahren angewendet.^[16] In all diesen Fällen wurden jedoch relativ große und komplexe Sonden hergestellt und verwendet. Die Entwicklung von einfach verfügbaren oder herzustellenden radio-markierten Tetrazinsonden unter Verwendung des Radioisotops ¹⁸F ist daher von unveränderter Wichtigkeit, auch um wegen der hohen spezifischen Radioaktivität dieses Nuklids eine Verabreichung geringerer Mengen zu ermöglichen. Aus diesem Grund konzentrierten wir uns auf dieses spezielle Problem im Bereich der bioorthogonalen Bildgebung.

Hier berichten wir über unsere Resultate der Synthese und Charakterisierung eines niedermolekularen ¹⁸F-markierten Tetrazins mit vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften, das als vielseitige Sonde für die Entwicklung von zweistufigen bioorthogonalen PET-Verfahren unter Verwendung der IEDDA-Reaktion eingesetzt werden kann.

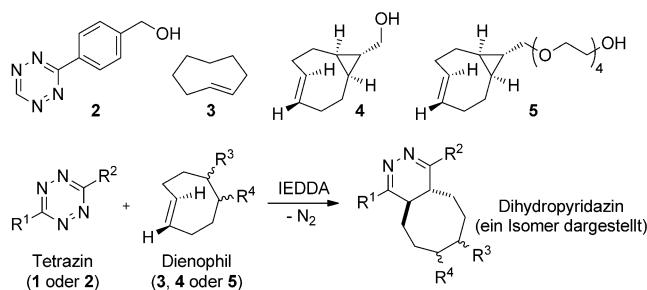
Im Zuge der Entwicklung optimierter Syntheseverfahren für die Herstellung von unterschiedlichen 1,2,4,5-Tetrazinen ergaben weitere Untersuchungen ein indirekt proportionales Verhältnis zwischen der Reaktivität und der Stabilität (in fetalem Kälberserum) dieser Verbindungen.^[17] Aufgrund dieser Befunde vermuteten wir, dass das Problem der geringen Stabilität bei der direkten Radiofluorierung durch die Verwendung von weniger reaktiven 3,6-Dialkyltetrazinen vermieden oder minimiert werden kann. Die Verfügbarkeit von physiologisch stabilen radiomarkierten Tetrazinen ist ausschlaggebend für die Entwicklung zuverlässiger PET-Verfahren. Zusätzlich zu diesem Kompromiss (Reaktivität gegenüber Stabilität) fokussierten wir uns zudem auf wasserlösliche und niedermolekulare Verbindungen, mit dem Ziel, optimale pharmakokinetische Eigenschaften zu erreichen.

Diese Überlegungen führten schließlich zu der chemischen Struktur des Tetrazins **1**, wobei beide Substituenten so klein wie möglich gewählt wurden. Ein Derivat mit Methylgruppe wurde einem unsubstituierten Tetrazin wegen der höheren Stabilität vorgezogen, und drei Methylengruppen zwischen dem Tetrazinring und dem Fluoratom wurden in Betracht gezogen, um einerseits eine hohe Reaktivität und dadurch geringere Stabilität einer entsprechenden Benzylvorstufe ($Tz-CH_2-X$) sowie mögliche Eliminierungsreaktionen ($Tz-CH_2CH_2-X \rightarrow Tz-CH=CH_2$) vermeiden zu können. Es wurden quantenchemische Rechnungen unter Anwendung von bereits beschriebenen Methoden



gefolgt von einer direkten Fluorierung des Intermediates **7** durch Reaktion mit DAST, führte zur Zielverbindung (Schema 1). Des Weiteren konnten wir eine deutlich gestiegerte Reaktionsgeschwindigkeit der Ligation von **1** mit dem wasserlöslichen s-TCO-Derivat **5** in humanem Plasma feststellen ($k > 8000 M^{-1} s^{-1}$, 37°C), und zwar in Übereinstimmung mit früheren Berichten über den Effekt von Wasser auf die IEDDA-Reaktionskinetik (Tabelle 1).^[22]

(DFT, M06-2X/6-31G(d,p), Gaussian 09)^[18] angewendet, um eine erste Abschätzung der Reaktionsgeschwindigkeit von **1** im Vergleich zu jener von Phenyl-substituierten Tetrazinen



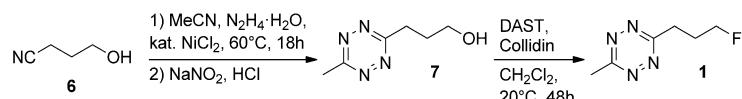
(z.B. **2**),^[19] die häufig in Kombination mit TCO verwendet werden,^[20] zu erhalten (Tabelle 1). Entsprechend den Erwartungen ergab die Modellierung der IEDDA-Reaktionen mit *trans*-Cycloocten (**3**) eine erhöhte freie Aktivierungsenthalpie

Tabelle 1: Untersuchung der Reaktionskinetik der IEDDA-Cycloaddition unter Anwendung von quantenchemischen Rechnungen (M06-2X/6-31G(d,p), Gaussian 09) und Stopped-Flow-Messungen.

| Tetrazin | DP ^[a] | Lösungsmittel | $\Delta G^{\ddagger}_{\text{ber.}}^{[b]}$ | $\Delta G^{\ddagger}_{\text{exp.}}^{[c]}$ | $k_2 [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]^{[d]}$ |
|----------|-------------------|---------------|---|---|---|
| 1 | 3 | 1,4-Dioxan | 18.7 | 17.5 | 1.49 ± 0.01 |
| 1 | 4 | 1,4-Dioxan | 15.3 | 15.0 | 85.5 ± 2.3 |
| 1 | 5 | Humanplasma | n.b. ^[e] | n.b. | 8200 ± 300 |
| 2 | 3 | 1,4-Dioxan | 15.0 | 15.1 | 79.2 ± 1.3 |

[a] DP = Dienophil. [b] Berechnete freie Aktivierungsenthalpien (kcal mol⁻¹; 25°C). [c] Freie Aktivierungsenthalpien, ermittelt durch Stopped-Flow-Messungen (kcal mol⁻¹; 25°C). [d] Geschwindigkeitskonstanten (Messungen bei 37°C). [e] n.b. = nicht berechnet.

pie für **1** (18.8 kcal mol⁻¹) gegenüber **2** (15.0 kcal mol⁻¹). Allerdings wird dieser Unterschied durch die Verwendung von s-TCO **4** für die Cycloaddition mit **1** (15.3 kcal mol⁻¹) kompensiert. Die Anwendung des bioorthogonalen Reaktantenpaars **1/4** sollte daher zu ausreichenden Reaktionsgeschwindigkeiten ähnlich jener der häufig angewendeten Liganden zwischen **2** und **3** führen. Diese Annahme wurde in weiterer Folge durch Stopped-Flow-Messungen bestätigt, wobei **1** zuvor ausgehend von 4-Hydroxypropannitril (**6**) hergestellt wurde. Eine metallkatalysierte Tetrazinsynthese, gefolgt von einer direkten Fluorierung des Intermediates **7** durch Reaktion mit DAST, führte zur Zielverbindung (Schema 1). Des Weiteren konnten wir eine deutlich gestiegerte Reaktionsgeschwindigkeit der Ligation von **1** mit dem wasserlöslichen s-TCO-Derivat **5** in humanem Plasma feststellen ($k > 8000 M^{-1} s^{-1}$, 37°C), und zwar in Übereinstimmung mit früheren Berichten über den Effekt von Wasser auf die IEDDA-Reaktionskinetik (Tabelle 1).^[22]



Schema 1. Synthese des Tetrazins **1** (DAST = Diethylaminoschwefeltrifluorid).

Im Zuge der Entwicklung einer optimierten Synthese des Intermediats **7** wurde zudem der Einfluss unterschiedlicher Reaktionsparameter, vorwiegend in Hinblick auf das zu verwendende Hydrazinreagens, untersucht. Schlussendlich konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Ausbeute der Synthese festgestellt werden, wenn Hydrazin-Monohydrat (18 % Ausbeute für **7**) anstelle von wasserfreiem Hydrazin (21 % Ausbeute für **7**) verwendet wurde. Letzteres wurde ursprünglich für die metallkatalysierte Synthese von 3,6-Dialkyltetrazinen eingesetzt,^[21] ist jedoch aufgrund der REACH-Verordnung der Europäischen Agentur für Chemikalien (European Chemicals Agency) seit 2011 nur eingeschränkt und erschwert verfügbar.^[23] Auch wenn kommerziell erhältliches Hydrazincyanurat für die sichere Herstellung von wasserfreiem Hydrazin mit hoher Reinheit verwendet werden kann,^[24] sind zuverlässige Methoden unter Anwendung des Monohydrats oder anderer Formen (z.B. Hydrazinsalze) vorteilhaft.

Die In-vitro-Stabilität von **1** in humanem Plasma wurde anhand von spektrophotometrischen Messungen und HPLC untersucht. Es konnte nahezu keine Zersetzung über einen Zeitraum von 12 h bei 37°C beobachtet werden (99 % Wiederfindung). Dies stützt die Annahme, dass es sich bei **1** um eine vielversprechende Struktur für die Entwicklung geeigneter radiomarkerter Tetrazine für die bioorthogonale Positronenemissionstomographie handelt. Zwar wurde eine ebenfalls exzellente Stabilität von **4** (keine Zersetzung in humanem Serum oder Lösungen von Butylamin in MeOH (30 mM) und Ethanithiol in MeOH (5 mM)) von Taylor et al. beschrieben,^[10] jedoch konnte auch eine erhöhte Isomerisierung (58 % nach 3.5 h) zum unreaktiven *cis*-Isomer bei hohen Konzentrationen von Ethanithiol (30 mM in MeOH) festgestellt werden. Zudem haben Rossin et al. kürzlich über die vermutete Isomerisierung von *trans*-Cyclooctenen durch Wechselwirkung mit kupferhaltigen Proteinen berichtet, aber auch Strategien zur Umgehung dieses Problems beschrieben.^[25] Die Stabilität von **5** wurde durch 24-stündige Inkubation in humanem Plasma bei 37°C untersucht und ergab eine Wiederfindung von über 80 %, die demnach deutlich höher ist, als es für reaktive Tetrazine beschrieben wurde.^[17] Demzufolge sollte die Kombination von radiomarkierten Tetrazinen als Sonden mit (s-)TCO-Dienophilen für die Markierung von (Bio-)Molekülen gegenüber inversen Strategien (Tetrazinmarkierung und Verwendung radiomarkerter Dienophile) vorteilhaft für die bioorthogonale In-vivo-Bildgebung mit PET sein.

Die Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ konnte (in radiochemischen Ausbeuten von bis zu 18 %) durch direkte Fluorierung des tosylierten Intermediats **8** ausgeführt werden (Abbildung 1). Die Cycloaddition von $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ mit s-TCO **4** zum Konjugat $[^{18}\text{F}]\text{-9}$, das langsam zu $[^{18}\text{F}]\text{-10}$ isomerisierte (beide Verbindungen als eine Mischung aus Regio- und Stereoisomeren) erfolgte vollständig innerhalb einer Reaktionszeit von 1 min.

In-vivo-Untersuchungen wurden in weiblichen BALB/c-Mäusen durchgeführt. $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ wurde appliziert und seine Verteilung mithilfe dynamischer PET- ($n=4$) sowie PET/MR-Messung ($n=2$) verfolgt (MR = Magnetresonanztomographie). Es konnte eine äußerst homogene Biodistribution von

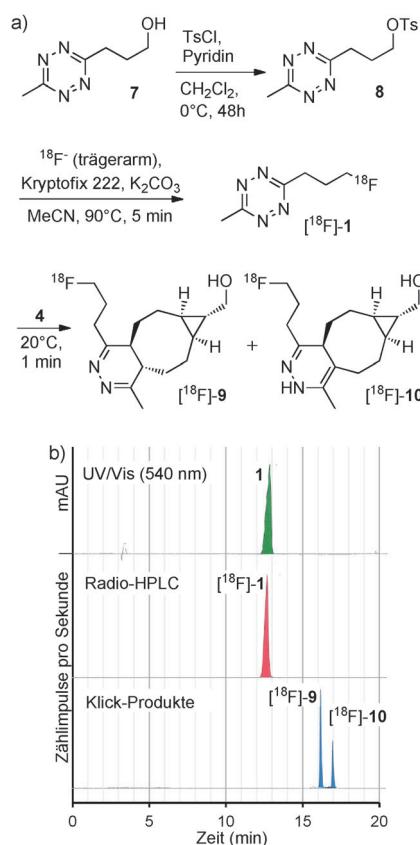


Abbildung 1. a) Radiosynthese von $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ und IEdda-Cycloaddition mit s-TCO **4** (jeweils nur ein Isomer von $[^{18}\text{F}]\text{-9}$ und $[^{18}\text{F}]\text{-10}$ dargestellt). b) HPLC von **1** (UV/Vis, 540 nm), Radio-HPLC von aufgereinigtem $[^{18}\text{F}]\text{-1}$ sowie der Klick-Produkte nach Reaktion mit s-TCO **4**. HPLC: Zorbax SB-Aq (Umkehrphase), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ Gradientenelution.

$[^{18}\text{F}]\text{-1}$ in allen Körperregionen einschließlich des Gehirns beobachtet werden, weshalb auf eine Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für die Tetrazinsonde rückgeschlossen werden kann (Abbildung 2). Die PET/MR-Untersuchung

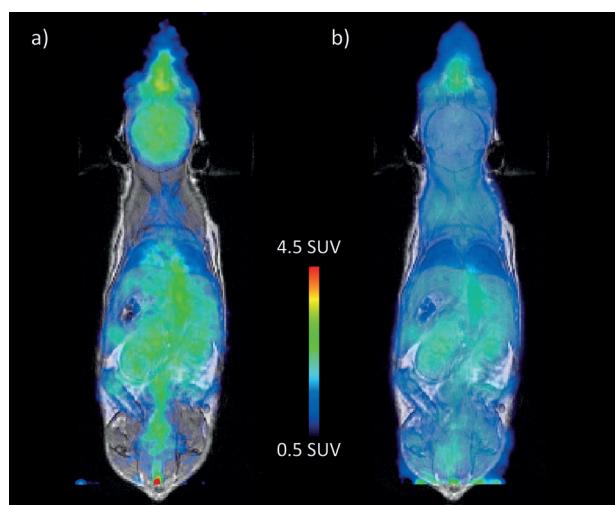


Abbildung 2. Horizontal aufsummierte PET/MR-Bilder: 0–5 min (a) und 5–120 min (b) nach Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{-1}$.

lieferte zudem keine signifikanten Hinweise auf eine In-vivo-Defluorierung von [¹⁸F]-**1**, da keine verstärkte Aufnahme von Radioaktivität im Knochengewebe beobachtet werden konnte.^[26] Zeit-Aktivitäts-Kurven zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf für alle untersuchten Organe mit Ausnahme der Harnblase (Abbildung 3a). Nach einer anfänglichen Perfusion direkt nach der intravenösen Injektion von [¹⁸F]-**1** wurde im gesamten Verlauf der PET-Messung eine einheitliche Abnahme der Aktivitätskonzentration von 2 auf 1.5 SUV (standardized uptake value) in allen Organen mit Ausnahme der Harnblase beobachtet. Bei Letzterer stieg die Aktivitätskonzentration von 2 auf 10 SUV, weshalb von einer schnellen renalen Ausscheidung von [¹⁸F]-**1** ausgegangen werden kann. Die Resultate der Ex-vivo-Untersuchungen, die direkt im Anschluss (120 min nach der Injektion von [¹⁸F]-**1**) durchgeführt wurden, zeigten Aktivitätskonzentrationen im Bereich von 1 bis 1.5 SUV (erneut mit Ausnahme der Harnblase; Abbildung 3b) und stimmen daher gut mit den Daten der PET-Messungen überein. Die In-vivo-Stabilität von [¹⁸F]-**1** wurde in weiterer Folge per Radio-Dünnschichtchromatographie (Radio-DC) von Mausplasma, das direkt nach den PET-Experimenten erhalten wurde (120 min nach Injektion), untersucht. Es konnte lediglich ein geringes Ausmaß an metabolischem Abbau festgestellt werden (ca. 15%), wobei die Bildung polarer Metaboliten beobachtet wurde. Auf Grundlage dieser Resultate wird eine enzymkatalysierte Oxidation der Methylgruppe von [¹⁸F]-**1** ähnlich zum xenobiotischen Metabolismus von Toluol und verwandten Verbindungen vermutet.^[27]

Die Biokonjugation von [¹⁸F]-**1** und dem wasserlöslichen Dienophil **5** wurde in vivo durchgeführt, um die Bioorthogonalität dieser Reaktion und somit des ¹⁸F-Tetrazins verifizieren zu können. [¹⁸F]-**1** wurde weiblichen BALB/c-Mäusen verabreicht ($n=4$). Nach einer anfänglichen Periode von 20 min, um eine homogene Verteilung von [¹⁸F]-**1** vor der In-vivo-Reaktion gewährleisten zu können, wurde **5** injiziert (inverse Vorgehensweise). Nach weiteren 5, 15 und 30 min wurde Blut durch Punktions des retroorbitalen Plexus entnommen und die IEDDA-Reaktion von [¹⁸F]-**1** durch Zugabe des reaktiveren Tetrazins **2** gestoppt. Murines Plasma wurde anschließend mithilfe von Radio-DC untersucht (Abbildung 4), wobei bereits nach 5 min ein Reaktionsumsatz von über 90% sowie eine vollständige In-vivo-Reaktion 30 min nach Verabreichung von **5** festgestellt wurden (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S4). Diese Befunde bestätigen eindeutig das große Potenzial von [¹⁸F]-**1** als vielseitige Sonde für zweistufige PET-Verfahren.

Zusammenfassend konnte eine schnelle und zuverlässige Methode für die Synthese eines niedermolekularen und wasserlöslichen radiomarkierten Tetrazins unter Anwendung direkter [¹⁸F]-Fluorierung entwickelt und dadurch die Notwendigkeit prothetischer Gruppen sowie weiterer Syntheseschritte vermieden werden. [¹⁸F]-**1** wurde zudem unter Verwendung von kommerziell erhältlichen und/oder leicht zugänglichen Reagentien hergestellt,

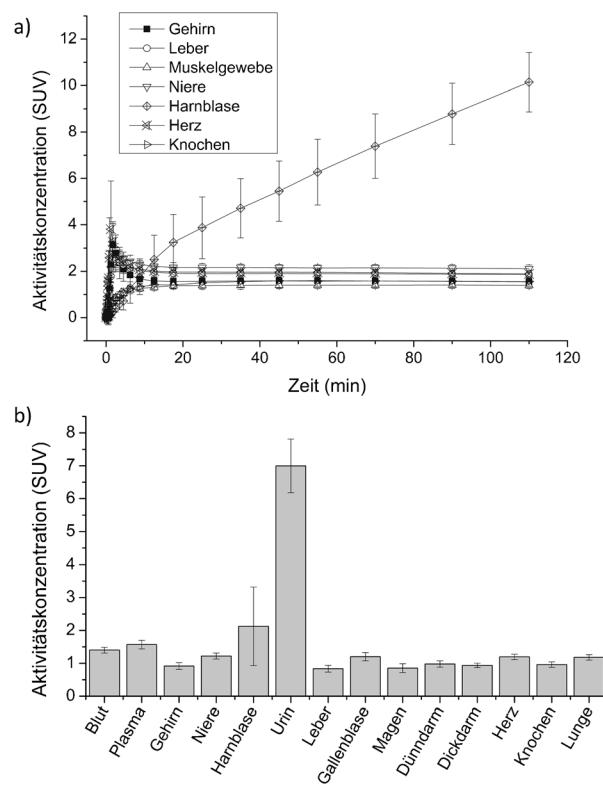


Abbildung 3. a) Durchschnittliche Aktivitätskonzentration in unterschiedlichen Organen von BALB/c-Mäusen ($n=6$; für Knochen $n=2$). b) Ex-vivo-Biodistribution von [¹⁸F]-**1** in den angeführten Organen 2 h nach der intravenösen Injektion ($n=6$). Durchschnittliche Aktivitätskonzentrationen sind jeweils als SUV \pm Standardabweichung dargestellt. Es wurde eine ähnliche Aktivität in allen Organen (mit Ausnahme der Harnblase) festgestellt.

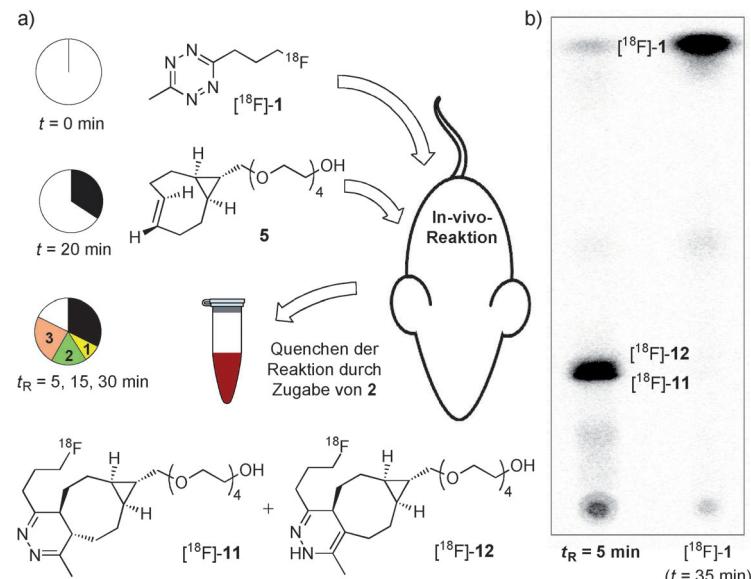


Abbildung 4. a) Bioorthogonale In-vivo-Reaktion von [¹⁸F]-**1** und Dienophil **5** unter Bildung der Ligationsprodukte [¹⁸F]-**11** und [¹⁸F]-**12** (ein Isomer dargestellt). b) Radio-Dünnschichtchromatogramm (SiO₂) einer Plasmaprobe nach einer Reaktionszeit von 5 min (links) sowie einer Blindprobe, die 35 min nach der Injektion von [¹⁸F]-**1** erhalten wurde (rechts).

wobei der Gebrauch von wasserfreiem Hydrazin umgangen werden konnte. Die neuartige Tetrazinsonde zeigte zudem hervorragende pharmakokinetische Eigenschaften und eine hohe Stabilität, wobei der genaue Metabolismus dieser Verbindung im Zuge weiterer Untersuchungen noch verifiziert werden muss. In-vivo-Versuche belegten eindeutig die Eignung von [¹⁸F]-1 als bioorthogonale Sonde für zweistufige PET-Verfahren. Die vielseitigen und vorteilhaften Eigenschaften dieses Tetrazins, das die In-vivo-Detektion von Dienophil-markierten (Bio-)Molekülen ermöglicht, sprechen für eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der bioorthogonalen Bildgebung sowie der biomedizinischen Forschung.

Eingegangen am 13. April 2014,
veränderte Fassung am 9. Mai 2014
Online veröffentlicht am 2. Juli 2014

Stichwörter: Bildgebende Verfahren · Bioorthogonale Chemie · Klick-Chemie · Reaktionskinetik · Tetrazine

- [1] a) L. Carroll, H. L. Evans, E. O. Aboagye, A. C. Spivey, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5772–5781; b) N. K. Devaraj, R. Weissleder, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 816–827; c) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [2] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797.
- [3] a) S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667; b) A. B. Neef, C. Schultz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1526–1529; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1498–1500; c) T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3964–3967; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878–3881; d) R. Xie, S. Hong, X. Chen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 747–752; e) J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279; f) J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688–3690.
- [4] G. deAlmeida, E. M. Sletten, H. Nakamura, K. K. Palaniappan, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2493–2497; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443–2447.
- [5] S. B. Lee, H. L. Kim, H.-J. Jeong, S. T. Lim, M.-H. Sohn, D. W. Kim, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10743–10746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10549–10552.
- [6] a) M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519; b) N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297–2299.
- [7] a) G. Budin, K. S. Yang, T. Reiner, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9550–9553; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9378–9381; b) K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298–304; c) K. S. Yang, G. Budin, T. Reiner, C. Vinegoni, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6702–6707; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6598–6603; d) D. S. Liu, A. Tangpeerachaikul, R. Selvaraj, M. T. Taylor, J. M. Fox, A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 792–795; e) J. L. Seitchik, J. C. Peeler, M. T. Taylor, M. L. Blackman, T. W. Rhoads, R. B. Cooley, C. Refakis, J. M. Fox, R. A. Mehl, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2898–2901; f) E. Kim, K. S. Yang, R. Weissleder, *PLoS One* **2013**, *8*, e81275; g) T. Reiner, E. J. Keliher, S. Earley, B. Marinelli, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1963–1966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1922–1925.
- [8] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 944–946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 920–922.
- [9] J. C. T. Carlson, L. G. Meimetis, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7055–7058; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6917–6920.
- [10] M. T. Taylor, M. L. Blackman, O. Dmitrenko, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9646–9649.
- [11] R. Selvaraj, J. M. Fox, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 753–760.
- [12] J. Yang, J. Šečkuté, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7594–7597; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479.
- [13] a) J. Šečkuté, N. K. Devaraj, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 761–767; b) Z. Li, H. Cai, M. Hassink, M. L. Blackman, R. C. D. Brown, P. S. Conti, J. M. Fox, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8043–8045; c) J. C. Knight, S. Richter, M. Wuest, J. D. Way, F. Wuest, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3817–3825.
- [14] M. M. Herth, V. L. Andersen, S. Lehel, J. Madsen, G. M. Knudsen, J. L. Kristensen, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3805–3807.
- [15] a) R. Rossin, P. R. Verkerk, S. M. van den Bosch, R. C. M. Vanders, I. Verel, J. Lub, M. S. Robillard, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3447–3450; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3375–3378; b) B. M. Zeglis, K. K. Sevak, T. Reiner, P. Mohindra, S. D. Carlin, P. Zanzonico, R. Weissleder, J. S. Lewis, *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 1389–1396.
- [16] N. K. Devaraj, G. M. Thurber, E. J. Keliher, B. Marinelli, R. Weissleder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4762–4767.
- [17] M. R. Karver, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2263–2270.
- [18] F. Liu, R. S. Paton, S. Kim, Y. Liang, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15642–15649.
- [19] S. A. Lang, B. D. Johnson, E. Cohen, *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12*, 1143–1153.
- [20] a) E. J. Keliher, T. Reiner, G. M. Thurber, R. Upadhyay, R. Weissleder, *ChemistryOpen* **2012**, *1*, 177–183; b) E. J. Keliher, T. Reiner, A. Turetsky, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Chem-MedChem* **2011**, *6*, 424–427; c) B. M. Zeglis, P. Mohindra, G. I. Weissmann, V. Divilov, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, J. S. Lewis, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2048–2059; d) H.-S. Han, N. K. Devaraj, J. Lee, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7838–7839; e) J. B. Haun, N. K. Devaraj, S. A. Hilderbrand, H. Lee, R. Weissleder, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 660–665.
- [21] J. Yang, M. R. Karver, W. Li, S. Sahu, N. K. Devaraj, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5312–5315; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5222–5225.
- [22] J. W. Wijnen, S. Zavarise, J. B. F. N. Engberts, M. Charton, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2001–2005.
- [23] Aufnahme von Substanzen mit hoher Gefahrenstufe in die Kandidatenliste (2011). ED/31/2011 veröffentlicht in Übereinstimmung mit Artikel 59(10) der Verordnung Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und Rates vom 18. Dezember 2006 betreffend die Registrierung, Einschätzung, Autorisierung und Beschränkung von Chemikalien (REACH).
- [24] E. Nachbaur, G. Leiseder, *Monatsh. Chem.* **1971**, *102*, 1718–1723.
- [25] R. Rossin, S. M. van den Bosch, W. ten Hoeve, M. Carvelli, R. M. Versteegen, J. Lub, M. S. Robillard, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1210–1217.
- [26] a) R. A. Hawkins, Y. Choi, S.-C. Huang, C. K. Hoh, M. Dahlbom, C. Schiepers, N. Satyamurthy, J. R. Barrio, M. E. Phelps, *Nucl. Med.* **1992**, *33*, 633–642; b) E. Even-Sapir, E. Mishani, G. Flusser, U. Metser, *Semin. Nucl. Med.* **2007**, *37*, 462–469.
- [27] D. E. Chapman, T. J. Moore, S. R. Michener, G. Powis, *Drug Metab. Dispos.* **1990**, *18*, 929–936.