

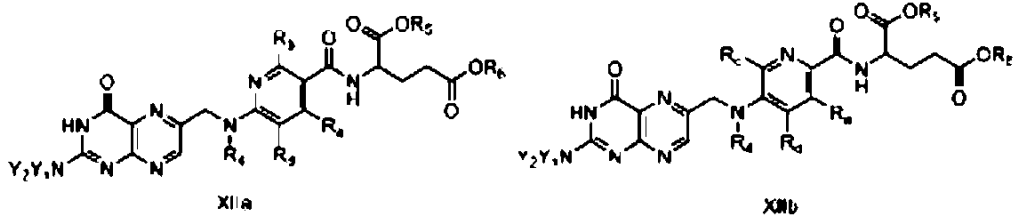
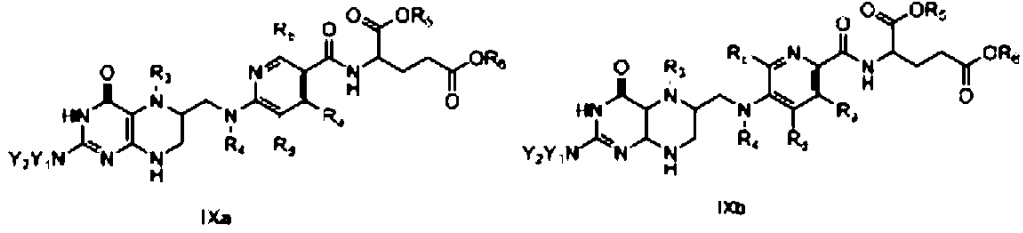
OZET**¹⁸F ETİKETLİ FOLAT/ANTİFOLAT ANALOGLARI**

- 5 Mevcut buluş, folat yapıları dahilindeki fenil grubunun bir ¹⁸F-heterosikle ile değiştirildiği yeni ¹⁸F-folat/antifolat analogu radyofarmasötiklerine, bunların öncülerine, bunların hazırlanmasına yönelik bir yöntem ve ayrıca bunların, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücreye veya hücre popülasyonuna tanı konulmasında ve
- 10 kanserin ve enflamatuar ve otoimmün hastalıkların ve bunların terapisinin izlenmesinde kullanılmalarına yöneliktir.

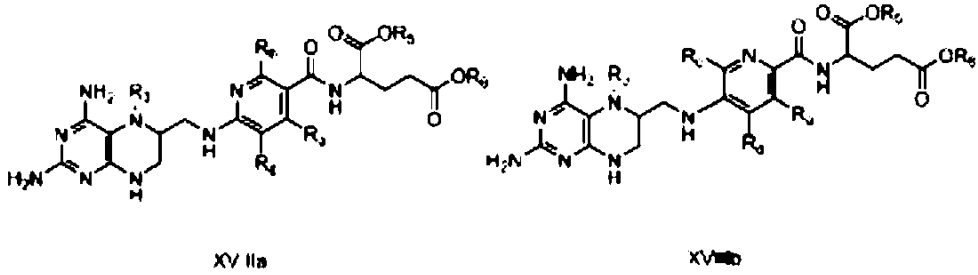
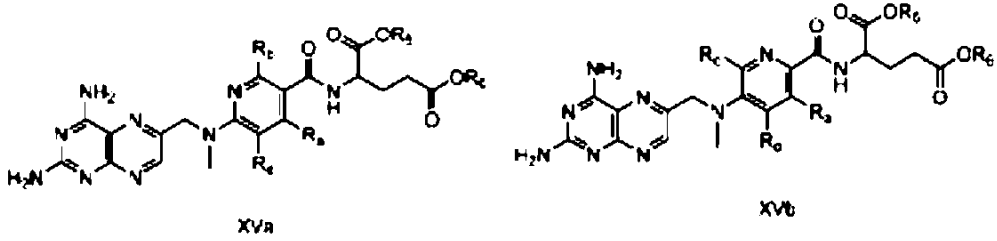
İSTEMLER

1. Formül IXa, IXb, XIIa, XIIb, XVa, XVb, XVIIIa, XVIIIb'ye ait bir bileşik,

5



10



15 burada

R_a, R_b, R_c, R_d , birbirinden bağımsız olarak H veya ^{18}F 'dir, ancak R_a, R_b, R_c, R_d 'den birinin ^{18}F olması gerekir,

R_3, R_4 , birbirinden bağımsız olarak H, formil, iminometil, nitroso, C1-C12 alkil, C1-C12 alkoksi, C1-C12 alkanol, halo-ikame edilmiş C1-C12 alkanoldir, ancak formül XVIIIa ve XVIIIb'de R_3, R_4 , birbirinden bağımsız olarak H, metil, formildir,

R_5, R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2 gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya C1-C6 alkildir,

Y_1, Y_2 , birbirinden bağımsız olarak H, formil, ikame edilmemiş veya CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkil arasından seçilir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2 gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya C1-C6 alkildir

veya bunun farmasötik açıdan edilebilir bir tuzu.

20

2. İstem 1'e uygun bileşik olup buradaki R_5, R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir.

3. İstem 1'e uygun bileşik olup buradaki R_5, R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir.

25

4. Önceki istemlerden herhangi birine uygun bileşik olup buradaki R_3 , R_4 birbirinden bağımsız olarak H, formil veya metildir.

5. Önceki istemlerden herhangi birine uygun bileşik olup buradaki Y_1 , Y_2 , birbirinden bağımsız olarak H, formil, ikame edilmemiş veya CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C_1 - C_{12} alkil arasından seçilir.

6. İstem 1 ile 5'e uygun bir bileşiğin üretilmesine yönelik, [^{18}F] florid ile doğrudan radyo-etiketleme adımını içeren bir yöntem.

7. Bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin veya hücre popülasyonunun in vitro veya in vivo tanısal görüntülenmesinde kullanılmaya yönelik, istem 1 ile 5'e uygun bileşik.

15

8. Tanısal görüntülenmeye ihtiyaç duyan bir süjeye elverişli ve etkili uygulamada kullanılmaya yönelik, istem 1 ile 5'e uygun bileşik.

9. Bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin veya hücre popülasyonunun tanısal görüntülenmesi amaçlı bir yöntemde kullanılmaya yönelik, istem 1 ile 5'e uygun bileşik; adı geçen yöntem, istem 1 ile 5'e uygun en az bir bileşiğin, bir tanısal görüntüleme miktarında uygulanması ve adı geçen hücrenin veya hücre popülasyonunun tanısal bir görüntüsünün elde edilmesi adımlarını içerir.

25

10. İstem 9'a göre kullanılmaya yönelik bileşik olup buradaki tanısal görüntüleme, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücre veya hücre popülasyonu üzerinde in vitro veya in vivo gerçekleştirilir.

5 **11.** Folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin bir doku örneği içinde in vitro saptanmasına yönelik, adı geçen doku örneğinin istem 1 ila 5'e uygun bir bileşik ile, bağlanmanın meydana gelmesi için etkili miktarlarda ve yeterli bir süre boyunca ve koşullarda temas ettirilmesini ve otoradyografi ve benzeri gibi görüntüleme teknikleri
10 ile bu bağlanmanın saptanmasını içeren yöntem.

12. Bir süjenin tanısal görüntülenmesi veya izlenmesi amaçlı, (i) istem 1 ila 5'e uygun en az bir bileşiğin, bir tanısal görüntüleme miktarında uygulanması ve (ii) adı geçen en az bir bileşikten gelen bir sinyal
15 saptanarak, PET kullanılarak tanısal görüntüleme yapılması adımlarını içeren bir yöntemde kullanılmaya yönelik, istem 1 ila 5'e uygun bileşik.

13. Bir süjede kanser veya enflamatuar ve otoimmün hastalık
20 terapisinin izlenmesi amaçlı, (i) buna ihtiyaç duyan bir süjeye istem 1 ila 5'e uygun en az bir bileşiğin, bir tanısal görüntüleme miktarında, terapötik açıdan aktif bir bileşik ile kombinasyon halinde uygulanması ve (ii) kanser veya enflamatuar ve oto-immün hastalık terapisinin seyrini izlemek amacıyla adı geçen en az bir bileşikten gelen bir sinyal
25 saptanarak, PET kullanılarak tanısal görüntüleme yapılması adımlarını içeren bir yöntemde kullanılmaya yönelik, istem 1 ila 5'e uygun bileşik.

14. İstem 12 ve 13'e göre kullanılmaya yönelik, kanser veya enflamatuar ve otoimmün hastalığın diğer tanı veya terapi yöntemleri ile kombinasyon halinde kullanılan bileşik.

5

10

15

20

25

25032

TARİFNAME

¹⁸F ETİKETLİ FOLAT/ANTİFOLAT ANALOGLARI

5

Buluşun Alanı

Mevcut buluş, bir folat yapısına sahip fenil grubunun bir ¹⁸F-heterosikle ile değiştirildiği yeni ¹⁸F-folat/antifolat analogu radyo-farmasötiklerine, bunların öncülerine, bunların hazırlanmasına yönelik bir yönteme ve ayrıca bunların, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücreye veya hücre popülasyonuna tanı konulmasında ve kanserin ve enflamatuvar ve oto-immün hastalıkların ve bunların terapisinin izlenmesinde kullanılmalarına yöneliktir.

15

Arka Plan

Tanıya yönelik veya terapötik ajanlar gibi efektör yarımların verilmesi için hücreye spesifik hedefleme, geniş kapsamlı araştırılan bir alandır ve invazif olmayan tanısal ve/veya terapötik tıbbi uygulamaların geliştirilmesine yol açmıştır. Özellikle γ -ışınları gibi elektromanyetik radyasyonlar yayan radyoaktif materyallerin veya radyasyon yayan partiküllerin kullanıldığı nükleer tıp prosedürleri ve tedavileri alanında bu radyoaktif materyallerin hedeflenen hücrelere veya dokulara seçici lokalizasyonu, spesifik dokuların görselleştirilmesi, bir hastalığın izlenmesi ve/veya terapötik tedavilerin etkilerinin değerlendirilmesi için yüksek sinyal yoğunluğuna veya diğer, örn. sağlıklı dokularda

radyasyon yaralanması/radyotoksisite riski olmadan belirli bir hastalık sahasına yeterli dozlarda iyonize edici radyasyonun verilmesi için yüksek radyasyon dozuna ulaşılması amacıyla gereklidir. Bu nedenle hücreye spesifik yapıların ve özellikle kanser (yani tümörler) veya enflamatuar ve otoimmün hastalıklar durumunda var olan yapıların, 5 örneğin ilgili biyolojik araçlarla spesifik olarak hedeflenebilecek reseptörlerin, antijenlerin, haptenlerin ve benzerlerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi çok büyük ilgi konusudur.

- 10 Folat reseptörü (FR), bu yapılardan birinde tanımlandı (Low, Acc Chem Res. 2008; 41:120-9). FR, yüksek afiniteli ($K_D < 10^{-9}$ M) membran bağlantılı bir proteindir. Normal dokularda ve organlarda FR ekspresyonu, sadece birkaç organ (örn., böbrek, akciğerler, koroids plexus ve plasenta) ile yüksek oranda kısıtlı iken epitelial 15 hücrelerin luminal yüzeyinde büyük oranda meydana gelir ve bu nedenle sirkülasyondaki folat için erişilebilir değildir. FR-alfa sıklıkla çok çeşitli spesifik hücre tiplerinde, örneğin epitelial tümörlerde (örn., yumurtalık, servikal, endometriyal, göğüs, kolorektal, böbrek, akciğer, bakınız örn., Parker ve arkadaşları, Anal. Biochem. 2005; 20 2:284-293) aşırı eksprese edilirken FR-beta sıklıkla lösemi hücrelerinde aşırı eksprese edilir (akut miyelojen lösemisinin (AML) yaklaşık %70'i FR-beta pozitifdir). Bu nedenle her ikisi de seçici tümör hedeflemesinde değerli bir tümör markeri olarak kullanılabilir (Elnakat ve Ratnam, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1067-84). Ek 25 olarak son zamanlarda romatoid artrit tanısı konulmuş hastalarda aktifleşmiş (ancak beklemedeki değil) sinoviyal makrofajların, fonksiyonel olarak aktif FR-beta'ya sahip olduğu keşfedildi (Nakashima-Matsushita ve arkadaşları, Arthritis & Rheumatism,

1999, 42(8): 1609-16). Bu nedenle aktifleşmiş makrofajlar, artritlik eklemlerde folat konjüгатları ile seçici şekilde hedeflenebilir, bu özellik ise romatoid artrit tanısı ve tedavisi için olasılıklar açar (Paulos ve arkadaşları, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1205-17). Folat reseptörü pozitif makrofajların yaygın şekilde zenginleştiği diğer enflamatuvar patolojiler arasında romatoid artrit, Crohn hastalığı, ateroskleroz, sarkoidoz, glomerülonefrit, osteoartrit, organ transplant reddi, ülseratif kolit, Sjogren sendromu, diyabet, iskemi/reperfüzyon yaralanması, darbe travması, mikrobiyal enfeksiyon, protez osteoliz, karaciğer steatozu ve multipl skleroz bulunur (Piscaer ve arkadaşları 2011, Arthritis & Rheumatism 63, 1898; Henne ve arkadaşları 2012, Mol Pharm, 9:1435-40; Ayala-Lopez ve arkadaşları 2010, J Nucl Med 51, 768). Folat hedefli terapötik ajanlar, aynı hastalıklar için oldukça güçlü, toksik olmayan tedavi modalitelerinin geliştirilmesinde oldukça umut vaadeder (Hansen M.J ve arkadaşları, Targeted Drug Strategies for Cancer and Inflammation, Springer Science+Business Media, 2011, 181-193). FR-beta ayrıca tümör ile bağlantılı makrofajlar (TAM'ler) üzerinde aşırı eksprese edilir. TAM'ler, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını, proliferasyonunu ve yayılmasını teşvik ederek büyük ölçüde pro-tümör fonksiyonlar gösterir. Klinik çalışmalar, bir dizi TAM ile diğerlerinin yanı sıra göğüs, prostat, yumurtalık, servikal, endometriyal, ezofajal, pankreatik, glioblastoma ve mesane kanserlerinin kötü prognozu arasında bir ilişki gösterdi (Kurahara H. ve arkadaşları, Ann Surg Oncol., 2012 Şubat 16, Nagai T. ve arkadaşları, Cancer Immunol Immunother (2009) 58:1577-1586, Puig-Kroeger A. ve arkadaşları Cancer Res 2009; 69 (24). 15 Aralık 2009, Turk M. J. ve arkadaşları, Cancer Letters 213 (2004) 165-172). Bu nedenle tümörle bağlantılı makrofajlar, folat konjüгатları ile seçici

şekilde hedeflenebilir. Bu, kanser tanısı ve tedavisi için olasılıklar açar.

Bu şekilde hücreye spesifik bir başka yapı, proton birleşmeli folat transporteridir (PCFT). PCFT, asidik pH'ta folat absorpsiyonuna aracılık ettiği proksimal ince bağırsakta (Qiu ve arkadaşları, Cell. 2006 Aralık 1; 127(5): 917-28) ve düşük pH koşulları yaşamayan karaciğer ve böbrek gibi dokularda (Zhao ve arkadaşları, Expert Rev Mol Med. 2009 Ocak 28;11:e4) eksprese edilir. Katı tümörlerin interstitiyal pH'ı sıklıkla asidiktir (Helmlinger ve arkadaşları, Nat Med. 1997 Şubat;3(2):177-82; Raghunand ve arkadaşları, Biochem Pharmacol. 1999 Şubat 1;57(3):309-12), bu da PCFT taşınmasına yarar. 32 katı insan tümör çizgisinin 29'unda öne çıkan bir düşük pH'lı taşıma yolu tanımlandı (Zhao ve arkadaşları, Clin Cancer Res. 2004 Ocak 15;10(2):718-27) ve yüksek düzeylerde insan PCFT (hPCFT) transkriptleri, çok çeşitli insan tümörlerinde bildirildi (Kugel Desmoulin ve arkadaşları, Am Assoc Cancer Res 51:1103). hPCFT'nin antifolat aktivitesinde ve tümör seçiciliğinde rolü hala değişmektedir. Klasik antifolatların PCFT tarafından taşınması daha önce tarif edilmişti (Zhao ve arkadaşları, Mol Pharmacol. 2008 Eylül; 74(3):854-62. Epub 2008 Haziran 4). Proton birleştirmeli folat transporterinin bir hedefleme ajanı, tümörlerin tanısı ve tedavisi için olasılıklar açar.

Folatlar ve türevleri böylelikle son 15 yıl içinde terapötik ve/veya tanı amaçlı ajanların folat reseptörlerini taşıyan hücre popülasyonlarına verilmesi, bu şekilde terapötik ve/veya tanı amaçlı ajanların normal

hücrelere göre bu hücreler içinde seçici şekilde birikmesini sağlamak için hedefleme ajanları olarak yoğun şekilde araştırılmaktadır.

Folat radyofarmasötikleri (Leamon ve Low, Drug Discov. Today 5 2001; 6:44-51 ve Jammaz ve arkadaşları, J. Label Compd. Radiopharm. 2006; 49:125-137; Müller & Schibli, 2011 J. Nucl. Med. 52, 1; Muller, Current Pharm Design, 2012), kemoterapötik ajanların folat konjüгатları (Leamon ve Reddy, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1127-41; Leamon ve arkadaşları, Bioconjugate Chem. 2005; 10 16:803-11), proteinler ve protein toksinleri (Ward ve arkadaşları, J. Drug Target. 2000; 8:119-23; Leamon ve arkadaşları, J. Biol. Chem. 1993; 268:24847-54; Leamon ve Low, J. Drug Target. 1994; 2:101-12), antisens oligonükleotitleri (Li ve arkadaşları, Pharm. Res. 1998; 15:1540-45; Zhao ve Lee, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1193-204), 15 lipozomlar (Lee ve Low, Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. 1995; 1233:134-44; Gabizon ve arkadaşları, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1177-92), hapten molekülleri (Paulos ve arkadaşları, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004; 56:1205-17), MRI kontrast ajanları (Konda ve arkadaşları, Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med. 2001; 12:104-13) vb. 20 dahil çeşitli sondalar, folik aside konjüğe edilmiş ve (ön)klinik değerlendirmesi yapılmıştır.

Folat radyofarmasötikleri, gelişmiş tanı ve kanser terapisi etkinliğinin değerlendirilmesi için özellikle çok faydalı olabilir. Bu, bir tedavi 25 tepkisinin değerlendirilmesini ve/veya kestirimini ve sonuç olarak radyasyon dozimetresinin geliştirilmesini içerebilir. Tipik bir görselleştirme tekniği, bir pozitron emisyon tomografisi (PET) olup burada pozitron yayan bir radyonüklid, bir süjeye uygulanır ve

radyoaktif bozulmaya uğrarken pozitron anilasyonundan kaynaklanan gamma ışınları, PET tarayıcısında saptanır. Yüksek hassaslığı ve iyi aydınlatılmış nicelendirme yöntemleri nedeniyle PET, beyinde ve diğer organlarda ligandların veya metabolik substratların bölgesel alımını ve afinitesini değerlendirmek için en sofistike fonksiyonel görüntüleme teknolojilerinden biri olarak kendini kanıtlamıştır ve böylelikle metabolik aktivite bazında görüntüleme ölçümleri sunar. PET için uygun radyofarmasötikler, metalin yakalanması için bir şelatlayıcı ile kombinasyon halinde bir metal izotopuna (örn., ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr) veya kovalent bağlı bir izotopa, tipik olarak kısa yarı ömürlere sahip pozitron yayan izotoplara, örneğin ^{11}C (ykl. 20 dak), ^{13}N (ykl. 10 dak), ^{15}O (ykl. 2 dak) ve ^{18}F 'ye (ykl. 110 dak) dayalı olabilir.

Son yıllarda şelat bazlı bir dizi folat radyofarmasötiği, özellikle ^{111}In -, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - ve $^{67/8}\text{Ga}$ -türevleri sentezlenmiş ve folat reseptörü pozitif tümörlerin SPECT veya PET kullanılarak görüntülenmesi için tanı ajanları olarak başarıyla değerlendirilmiştir (bakınız örn. Siegel ve arkadaşları, J. Nucl. Med. 2003, 44:700; Müller ve arkadaşları, J. Organomet. Chem. 2004, 689:4712; Mathias ve arkadaşları, Nucl. Med. Biol. 2003, 30(7):725; WO 2008/125618; Müller ve arkadaşları 2011, Nucl. Med. & Biol. 38, 715).

Daha yeni zamanlarda kovalent bağlı pozitron yayan bir ^{18}F nüklid taşıyan folat radyofarmasötikleri bildirilmiştir (bakınız örn., Bettio ve arkadaşları, J. Nucl. Med., 2006, 47(7), 1153; WO 2006/071754; WO 2008/098112; WO 2008/125613; WO 2008/125615; WO 2008/125617; WO 2010/040854; Ross VE arkadaşları 2010, J Nucl.

Med., 51, 1756; Fischer ve arkadaşları, 2012, Bioconjug. Chem.), ve yukarıda bahsedilen konuların tamamını karşılayacak mükemmel görüntüleme karakteristikleri nedeniyle PET görüntülemesi için en uygun olduğu gösterilmiştir.

5

Yine de bilinen ^{18}F folat radyofarmasötikleri umut veren sonuçlar göstermekle birlikte yüksek FR seçiciliği gösteren ve rutin klinik uygulamalar için uygun ve yine de yüksek radyo-kimyasal verimlerle etkili ve çeşitli yollardan elde edilebilen bileşiklere hala ihtiyaç vardır.

10

Başvuru sahipleri şimdi folat iskeletinin fenil grubunun bir heterosikle ile değiştirildiği folat türevlerinin, bir ^{18}F nüklid ile çeşitli ve verimli yollardan ve yüksek radyo-kimyasal verimlerle ikame edilebileceğini keşfettiler. Elde edilen ^{18}F -folat/antifolat analogu bileşikler, FR-
 15 pozitif doku için yüksek seçicilik gösterir ve böylelikle folat iskeletinde yapılan bu modifikasyonların folat reseptörü bağlanma afinitesi üzerinde olumsuz bir etki yapmadığı sonucuna varılabilir.

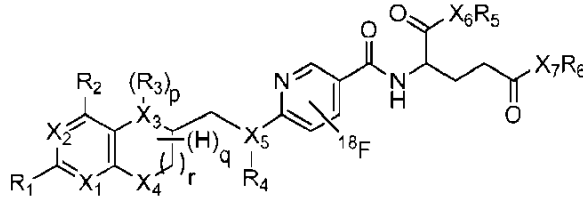
20

Böylelikle mevcut buluş, yoğunlaşmış pirimidin heterosikleyi uygun bağlayıcılar (örneğin bir pteridin heterosiklenin C6 pozisyonunda bir -
 20 $\text{CH}_2\text{-NH}$ -bağlayıcı) aracılığıyla folat yapıları içindeki amino asit kısmına bağlayan fenil grubunun, ^{18}F ile ikame edilmiş 6 elemanlı bir heterosikle ile değiştirildiği yeni ^{18}F -folat/antifolat analogu radyofarmasötiklerine, bunların öncülerine, bunların hazırlanmasına yönelik
 25 bir yöntem ve ayrıca bunların, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücreye veya hücre popülasyonuna tanı konulmasında ve kanserin ve enflamatuar ve oto-immün hastalıkların ve bunların terapisinin izlenmesinde kullanılmalarına yöneliktir.

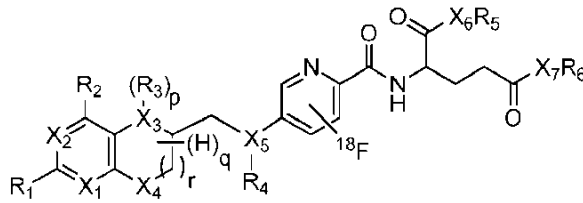
Buluşun Özeti

Mevcut buluş, bir birinci yönde yeni ^{18}F -folat/antifolat analogu radyofarmasötiklerine ve bunların öncülerine (bundan böyle ayrıca buluşa ait bileşikler olarak anılacaktır) yöneliktir, burada yoğunlaşmış pirimidin heterosikleyi amino asit kısmına bağlayan fenil grubu, ^{18}F ile ikame edilmiş 6 elemanlı bir heterosikle ile değiştirilmiştir.

Daha spesifik olarak mevcut buluş, formül IVa veya IVb'ye ait bileşiklere yöneliktir,



IVa



IVb

15

burada

X_1 ila X_5 , N'dir,

X_6 , X_7 , O'dur,

R_1 , -OH, -NH₂'dir

20 R_2 , -NR₈R₉'dur, buradaki R₈, R₉ birbirinden bağımsız olarak H, formil,

- ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO₂ ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkil arasından seçilir ve burada gömülü, komşu olmayan CH₂ gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-,
- 5 -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H, C1-C6 alkildir,
- R₃, R₄, birbirinden bağımsız olarak H, formil, iminometil, nitroso, C1-C12 alkil, C1-C12 alkoksi, C1-C12 alkanoil, halo-ikame edilmiş C1-C12 alkanoidir,
- R₅, R₆, birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en
- 10 az bir CN, Hal veya NO₂ ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH₂ gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H, C1-C6 alkildir,
- 15 p, 0, 1'dir,
- q, 1 ila 7 değerine sahiptir, ve
- r, 1'dir.

Bir başka yönde mevcut buluş, bunların hazırlanması amaçlı bir

20 yönetime yöneliktir. Tercih edilen bir düzenekte buluşa ait ¹⁸F-folat/antifolat analogu radyofarmasötikleri, uygun öncülerin doğrudan ¹⁸F ile radyo-etiketlenmesi (ve ardından koruma giderme adımları) ile elde edilir.

25 Bir başka yönde mevcut buluş, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücreye veya hücre popülasyonuna tanı konulmasında ve kanserin ve kanser terapisinin in vitro veya in vivo izlenmesinde veya romatoid

artrit gibi enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların ve bunların terapisinin izlenmesinde kullanıma yöneliktir.

Bir düzenekte mevcut buluş, buluşa ait ^{18}F -folat/antifolat analogu radyofarmasötiklerinin, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin veya hücre popülasyonunun tanısal görüntülenmesinde kullanımlarına yöneliktir.

Daha spesifik olarak mevcut buluş, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin veya hücre popülasyonunun tanısal görüntülenmesine yönelik yöntemler içerir, bu da örneğin folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin, örneğin bir tümör hücresinin veya aktifleşmiş bir makrofajın bir doku örneğinde in vitro saptanmasına yönelik yöntemler içerir. Bu yöntemler ayrıca in vivo gerçekleştirilebilir.

15

Böylelikle bir başka düzenekte mevcut buluş, buluşa ait ^{18}F -folat/antifolat analogu radyofarmasötiklerinin, tanısal görüntülemeye ve/veya kanserin veya enflamatuvar ve otoimmün hastalık terapisinin izlenmesine ihtiyaç duyan bir süjeye elverişli ve etkili şekilde uygulama için kullanımlarına yöneliktir. Mevcut buluşa ait yöntemlerin süjesi, tercihen bir memeli, örneğin bir hayvan veya bir insan, tercihen bir insandır.

Buluşa ait bu yöntemler, kanserin veya enflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tanısına veya terapisine yönelik başka bir yöntem, örneğin hali hazırda geliştirilmiş başka tanı amaçlı ve/veya terapötik ajanların kullanıldığı ve x-ışını bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), fonksiyonel manyetik rezonans

görüntüleme (fMRI), tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT), optik görüntüleme ve ultrasondan faydalanılan yöntemler ile kombinasyon halinde gerçekleştirilebilir.

- 5 Buluşun diğer özellikleri ve avantajları, bunun aşağıdaki detaylı tarifinden ve istemlerden açıkça anlaşılacaktır.

Şekillerin Kısa Açıklaması

- 10 Şekil 1A, 1B, 1C. Heterosikle olarak (X)_n-ikame edilmiş 6-aminonikotinik asit ile ¹⁸F ile ikame edilmiş 3'-aza-folik asidin hazırlanması için temsilci sentez şemaları. (X)_n, ¹⁸F, örn. Cl, Br, NO₂, F'nin sokulması için bir veya daha fazla elektron çeken ikame ediciyi temsil eder.
- 15 Şekil 2. A: insan kanı plazması, 4 h; B: insan glutatyon, 1 h; C: fare mikrozomları, 1 h; D: insan mikrozomları, 1 h içinde 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit stabilitesi.
- Şekil 3. HPLC ile saflaştırma sonrasında 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit kalite kontrolü.
- 20 Şekil 4. 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit metabolit çalışmaları, A: kalite kontrol, B: kan örneği, 5 dak p.i., C: kan örneği, 30 dak p.i., D: tümör, 30 dak p.i., E: idrar, 30 dak p.i., F: karaciğer, 30 dak p.i.'nin radyo-UPLC kromatogramları
- Şekil 5. 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit hücre alım çalışmalarının sonuçları: toplam alım (mavi), içselleştirilen fraksiyon (sarı) ve bloklama koşulları altında alım (kırmızı/görülebilir değil).
- 25 Şekil 6. KB tümör taşıyan farelerin, tek başına 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit enjeksiyonundan (A) ve fazla folik asit ve [¹⁸F]-3'-aza-folik asit

(B) enjeksiyonundan 120-150 dakika sonra PET görüntüleri (maksimal yoğunluk projeksiyonu).

Şekil 7. KB tümör taşıyan farelerin, tek başına (A) ve önceden enjekte edilmiş premetreksed ile kombinasyon halinde (B) 3'-aza-2'-
5 [18F]florofolik asit enjeksiyonundan 120-150 dakika sonra PET görüntüleri (maksimal yoğunluk projeksiyonu).

Buluşun Detaylı Tarifi

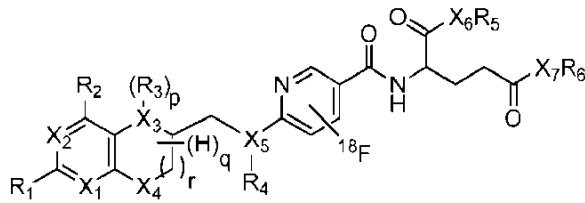
10 Mevcut buluş, bir birinci yönde yeni ¹⁸F-folat/antifolat analogu radyofarmasötiklerine (bundan böyle ayrıca buluşa ait bileşikler olarak anılacaktır) ve bunların öncülerine yöneliktir, burada folat iskeletinin fenil grubu, yani yoğunlaşmış pirimidin heterosikleyi amino asit (glutamik asit) kısmına bağlayan aminobenzoil grubunun fenil
15 grubu, bir N-heteroatom içeren, ¹⁸F ile ikame edilmiş 6 elemanlı bir heterosikliklik halka ile değiştirilmiştir.

Buradaki folat/antifolat yapıları için kullanılan heterosikle terimi, bir N atomu taşıyan doymamış bir heterosikleye, yani bir piridin
20 halkasına karşılık gelir. N-heterosikle, bir amino bağlayıcı aracılığıyla yoğunlaşmış pirimidin heterosikle ünitesine (veya bunun türevlerine) ve bir karbonil grubu aracılığıyla amino asit ünitesine (glutamik aside) 1,4 bağlanarak (veya para-pozisyon) buluşa uygun bir aza-folat ve bunun türevleri elde edilir. Burada kullanıldığı gibi bir "yoğunlaşmış
25 pirimidin heterosikle", başka bir 6 elemanlı heterosikle ile füzyonla birleşmiş bir pirimidin, yani bir pteridin bisikle içerir. Burada kullanıldığı gibi "amino asit" terimi, glutamik aside karşılık gelir.

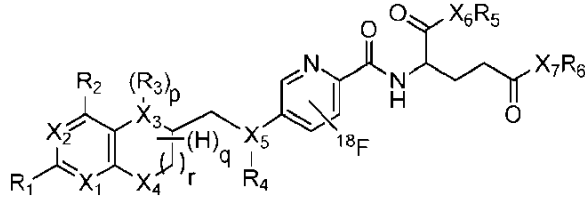
Buluşa ait bir ^{18}F -folat/antifolat bileşiğinin türevlerinin, örneğin bir dihidro-folat veya bir tetrahidro-folat gibi daha fazla indirgenmiş formlar elde etmek için pteridin halkasının farklı bir oksidasyon hali dahil olmak üzere pirimidin heterosikle ünitesinde ve ayrıca N5 ve/veya N10 pozisyonlarındaki bir karbon ikame edicinin tipinde, çeşitli ünitelerin ve diğer türevlerin ikame şablonunda başka varyasyonlar içerebileceği anlaşılır.

Yukarıda belirtildiği gibi 6 elemanlı bir heterosikle taşıyan buluşa ait ^{18}F -folat/antifolat bileşikler söz konusu olduğunda N-heterosikleler (ayrıca aza-folatlar olarak anılır) tercih edilir. Burada kullanıldığı gibi bu aza-folatların tercih edilen temsilcileri, bir aza-folat iskeletine, yani N-[4[[[(2-amino-1,4-dihidro-4-okso-6-pteridinil)metil]amino]-azaheterosikloil]-glutamik aside dayanır, buradaki azaheterosikloil, bunun 2'- veya 3'-piridinil türevlerine karşılık gelir ve isteğe bağlı olarak ikame edilmiş aza-folik asit, aza-folinik asit ve folat reseptörü bağlanma pteridinleri örneğin tetrahidropterinler, dihidro-aza-folatlar, tetrahidro-aza-folatlar içerir.

Belirli bir düzenekte yeni folat/antifolat analogu radyofarmasötikleri, IVa veya IVb'ye ait bileşiklerdir,



IVa



IVb

burada

X_1 ila X_5 , N'dir,

5 X_6 , X_7 , O'dur,

R_1 , -OH, -NH₂'dir

R_2 , -NR₈R₉'dur, buradaki R_8 , R_9 birbirinden bağımsız olarak H, formil, ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO₂ ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkil arasından seçilir ve burada

10 gömülü, komşu olmayan CH₂ gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H, C1-C6 alkildir,

R_3 , R_4 , birbirinden bağımsız olarak H, formil, iminometil, nitroso, C1-C12 alkil, C1-C12 alkoksi, C1-C12 alkanoil, halo-ikame edilmiş C1-

15 C12 alkanoildir,

R_5 , R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO₂ ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH₂ gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -

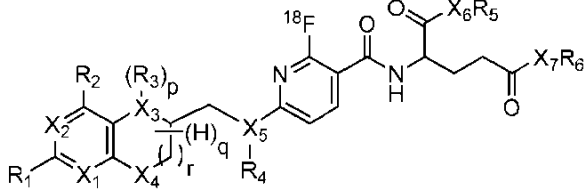
20 CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H, C1-C6 alkildir,

p, 0, 1'dir,

q, 1 ila 7 değerine sahiptir, ve

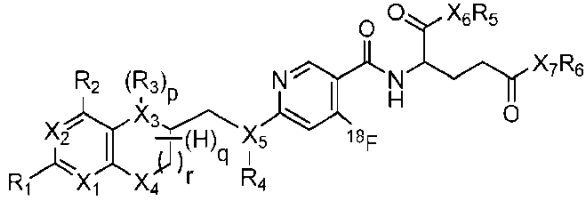
r, 1'dir.

Formül IVa ve IVb'ye ait bileşiklerin tercih edilen düzenekleri, formül IVc, IVd ve IVe'ye ait bileşikler içerir,

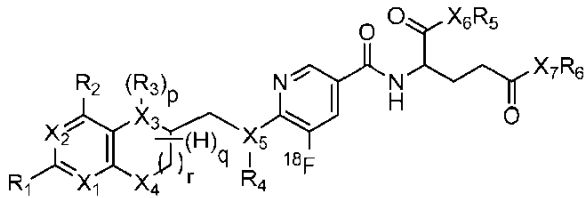


IVc

5



IVd



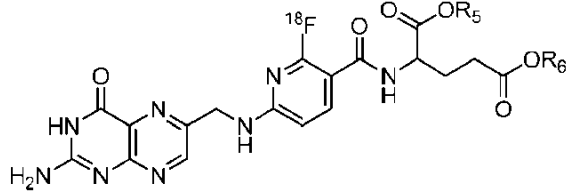
IVe

10 burada

X_1 ile X_7 , R_1 ile R_9 , R' , n , p , q ve r , yukarıda tanımlandığı gibidir.

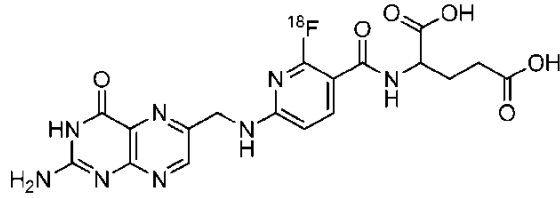
Formül IVa ile IVe'ye ait bileşiklerin özellikle tercih edilen düzenekleri, örn. X_1 ile X_5 'in N olduğu, R_1 'in NH_2 olduğu, R_2 'nin O olduğu, R_3 ve R_4 'ün her ikisinin H olduğu, p 'nin 0 olduğu ve q 'nın 1 olduğu bileşikler içerir.

Böylelikle başka bir spesifik düzenekte mevcut buluş, formül IVf ve IVg'ye ait bir bileşiğe yöneliktir



IVf

5



IVg

burada

R_5 , R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2 gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H, C1-C6 alkildir.

15

Başka spesifik düzeneklerde R_3 , R_4 grupları tercihen birbirinden bağımsız olarak H, formil, iminometil, nitroso, C1-C12 alkil, C1-C12 alkoksi, C1-C12 alkanoil, halo-ikame edilmiş C1-C12 alkanoil olabilir. Daha fazla tercihen R_3 , R_4 grupları birbirinden bağımsız olarak H, metil veya formildir.

20

Diğer spesifik düzeneklerde buluşa ait tüm bileşiklerde görülen R_5 , R_6 grupları tercihen birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C_1-C_{12} alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2 gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H, C_1-C_6 alkildir. Daha fazla tercihen R_5 , R_6 grupları birbirinden bağımsız olarak H, metil, etil veya tert.-butildir.

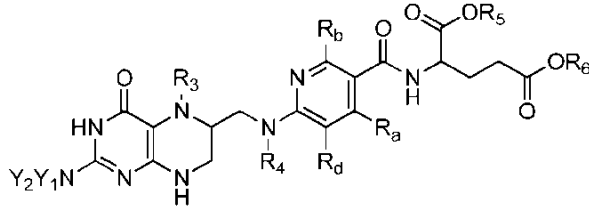
10 "N" ve "C" kısaltmalarının, tüm olası doyma derecelerini temsil ettiği anlaşılır, yani N, -NH- ve -N= bağlarını içerir ve C, -CH₂- ve -CH= bağlarını içerir.

Ayrıca $(H)_q$ 'nun, belirtilen halka üzerindeki tüm H ikame edicilerini temsil ettiği anlaşılır (yani X_3 üzerinde C_6 , C_7 ve X_4). Örneğin tamamen doymuş, ikame edilmemiş analog için $q = 5$ ($X_3 = X_4 = N$, $p = 0$) veya tamamen doymuş, ikame edilmemiş 5,8-dideaza analogu için $q = 7$ ($X_3 = X_4 = C$, $p = 0$) ve tamamen doymamış, $X_3 = X_4 = N$, $p = 0$ 'lı analog için $q = 1$.

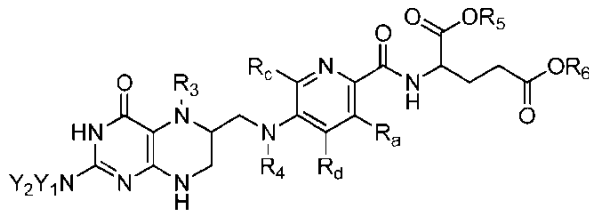
20

Buluşa ait bileşiklerin tercih edilen düzenekleri, örn. X_1 ila X_5 'in N olduğu, R_1 'in NY_1Y_2 olduğu, R_2 'nin O olduğu, p'nin 1 olduğu ve q'nun 3 olduğu bileşikler içerir.

25 Böylelikle başka bir spesifik düzenekte mevcut buluş, formül IXa, IXb'ye ait bir bileşiğe yöneliktir



IXa



IXb

5

burada

R_a , R_b , R_c , R_d , birbirinden bağımsız olarak ^{18}F veya H'dir, ancak R_a , R_b , R_c , R_d 'den birinin ^{18}F olması gerekir,

R_3 , R_4 , birbirinden bağımsız olarak H, formil, iminometil, nitroso, C1-C12 alkil, C1-C12 alkoksi, C1-C12 alkanoil, halo-ikame edilmiş C1-C12 alkanoildir,

R_5 , R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2 gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C $\equiv$ C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya C1-C6 alkildir, ve

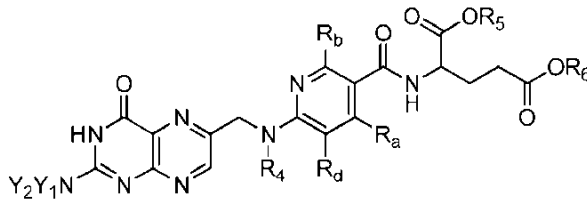
Y_1 , Y_2 , birbirinden bağımsız olarak H, formil, ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkil arasından seçilir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2

gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya C1-C6 alkildir.

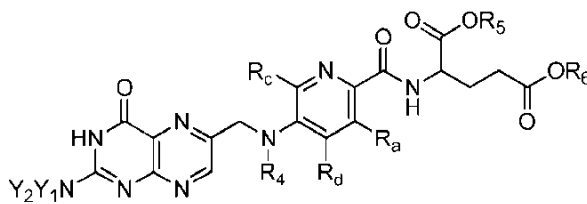
- 5 Buluşa ait bileşiklerin tercih edilen düzenekleri ayrıca örn. X₁ ila X₅'in N olduğu, R₁'in NY₁Y₂ olduğu, R₂'nin O olduğu, p'nin 0 olduğu ve q'nun 1 olduğu bileşikler içerir.

Böylelikle başka bir spesifik düzenekte mevcut buluş, formül XIIa,

- 10 XIIb'ye ait bir bileşiğe yöneliktir



XIIa



XIIb

15

burada

R_a, R_b, R_c, R_d, birbirinden bağımsız olarak ¹⁸F veya H'dir, ancak R_a, R_b, R_c, R_d'den birinin ¹⁸F olması gerekir,

R₃, R₄, birbirinden bağımsız olarak H, formil, iminometil, nitroso, C1-C12 alkil, C1-C12 alkoksi, C1-C12 alkanoil, halo-ikame edilmiş C1-C12 alkanoildir,

20

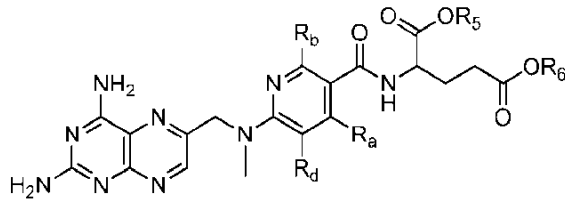
R₅, R₆, birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO₂ ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-C12 alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH₂ gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya C1-C6 alkildir, ve

Y₁, Y₂, birbirinden bağımsız olarak H, formil, ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO₂ ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C₁-C₁₂ alkil arasından seçilir ve burada gömülü, komşu olmayan CH₂ gruplarından biri veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya C1-C6 alkildir.

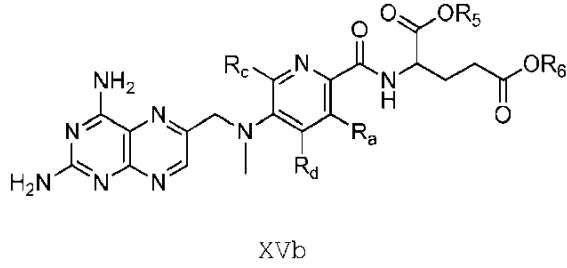
Diğer düzenekler, X₁ ila X₅'in N olduğu, R₁ ve R₂'nin NH₂ olduğu, R₃'ün H olduğu, R₄'ün CH₃ olduğu, p'nin 0 olduğu ve q'nun 1 olduğu buluşa ait bileşiklerdir.

Böylelikle başka bir spesifik düzenekte mevcut buluş, formül XVa, XVb'ye ait bir bileşiğe yöneliktir

20



XVa



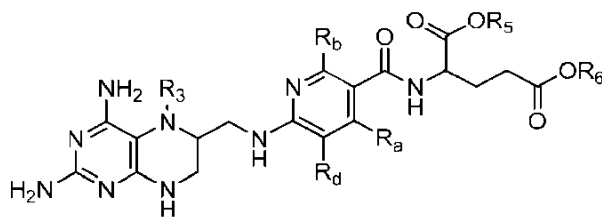
burada

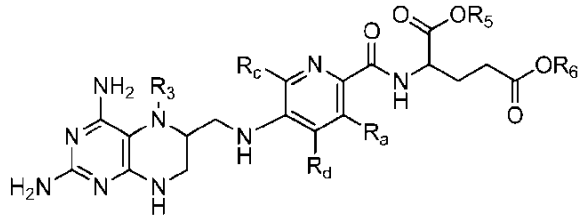
- R_a , R_b , R_c , R_d , birbirinden bağımsız olarak ^{18}F veya H'dir, ancak R_a ,
 5 R_b , R_c , R_d 'den birinin ^{18}F olması gerekir, ve

- R_5 , R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en
 az bir CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C1-
 C12 alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2 gruplarından biri
 veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -
 10 CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya
 C1-C6 alkildir.

- Diğer düzenekler, X_1 ila X_5 ve R_1 ve R_2 'nin N olduğu, $R_4 = R_5 =$
 R_6 'nın H olduğu, R_3 'ün CH_3 veya formil olduğu, p'nin 1 olduğu ve
 15 q'nun 4 olduğu buluşa ait bileşiklerdir.

Böylelikle başka bir spesifik düzenekte mevcut buluş, formül XVIIIa,
 XVIIIb'ye ait bir bileşiğe yöneliktir





XVIIIb

burada

R_a , R_b , R_c , R_d , birbirinden bağımsız olarak ^{18}F veya H'dir, ancak R_a ,

5 R_b , R_c , R_d 'den birinin ^{18}F olması gerekir,

R_3 , H, metil- veya formil-'dir, ve

R_5 , R_6 , birbirinden bağımsız olarak H veya ikame edilmemiş veya en az bir CN, Hal veya NO_2 ile ikame edilmiş düz zincirli veya dallı C_1 - C_{12} alkildir ve burada gömülü, komşu olmayan CH_2 gruplarından biri

10 veya daha fazlası birbirinden bağımsız olarak -O-, -CO-, -CO-O-, -CO-NR'-, -CH=CH-, -C≡C- ile değiştirilebilir, buradaki R', H veya C_1 - C_6 alkildir.

Tek başına veya kombinasyon halinde kullanıldığında "alkil" terimi,

15 belirtilen sayıda C-atomu ihtiva eden, tipik olarak 1 ila 12, tercihen 1 ila 8, daha fazla tercihen 1 ila 4 karbon atomu ihtiva eden, metil, etil, propil, izopropil, butil, sec-butil, izobutil, t-butil, pentil izopentil, neopentil, heksil ve benzeri gibi düz zincirli veya dallı alkil gruplarına karşılık gelir.

20

Burada kullanıldığı gibi, tek başına veya başka gruplarla kombinasyon halinde "alkenil" (yani en az bir ikili bağa sahip, yukarıda tanımlandığı gibi bir alkil grubu) terimi, 2 ila 12 karbon atomu ihtiva eden, metilen, etilen, propilen, izopropilen, butilen, t-butilen, sec-

butilen, izobutilen, amilen, izoamilen, pentilen, izo-pentilen, heksilen ve benzeri gibi düz zincirli veya dallı alkilen gruplarına karşılık gelir. Tercih edilen alkenil grupları, 2 ila 8 karbon atomu ihtiva eder.

- 5 Burada kullanıldığı gibi "alkinil" (yani en az bir üçlü bağa sahip, yukarıda tanımlandığı gibi bir alkil grubu) terimi, bir veya daha fazla karbon-karbon üçlü bağı ile lineer veya dallı bir karbon atomu zincirine karşılık gelir. Tercih edilen alkinil grupları, 2 ila 12, daha fazla tercihen 2 ila 8 karbon atomu ihtiva eder.

10

Burada kullanıldığı gibi "alkoksi" terimi, oksijen ile ikame edilmiş, metoksi, etoksi, propoksi, izopropoksi, butoksi, tert-butoksi ve benzeri gibi yukarıda tanımlandığı gibi bir alkile karşılık gelir.

- 15 Burada kullanıldığı gibi "alkanoil" terimi, bir karbonil ile terminal şekilde ikame edilmiş, asetil, propanoil, butanoil, pentanoil ve benzeri gibi, formile veya yukarıda tanımlandığı gibi bir alkile karşılık gelir.

- 20 Burada kullanıldığı gibi "alkilamino" terimi, nitrojen ile ikame edilmiş, hem monoalkilamino örneğin metilamino, etilamino, propilamino, tert-butilamino ve benzeri hem de dialkilamino örneğin dimetilamino, dietilamino, metilpropilamino ve benzeri dahil olmak üzere, yukarıda tanımlandığı gibi bir alkile karşılık gelir.

- 25 Burada kullanıldığı gibi "halo" terimi, bir Grup 17 elementine karşılık gelir ve floro, kloro, bromo, iyodo ve astatin(o) içerir.

"İsteğe bağlı olarak ikame edilmiş" ifadesi tercihen hidroksi, alkoksi,

(di)alkilamino, alkilsülfonil, alkilkarbonil, alkilkarboniloksi, alkoksikarbonil, karboksil, Hal, CN, NO₂ ile ikameyi içerir

5 Tercih edilen bir düzenekte R₁ ve R₂ birbirinden bağımsız olarak H, -OR", -NHR" 'dir, burada R", H, C1-C6 alkil, C1-C4 alkoksi, C1-C4 alkanoil, (C1-C4 alkoksi)karbonil ve (C1-C6 alkilamino)karbonildir, daha fazla tercihen R₁ ve R₂ birbirinden bağımsız olarak -OH, NH₂'dir.

10 Tercih edilen bir düzenekte R₃ ve R₄ birbirinden bağımsız olarak H, metil veya formildir.

Tercih edilen bir düzenekte R₅ ve R₆ birbirinden bağımsız olarak H, metil, etil veya tert.butildir.

15

Tercih edilen bir düzenekte R', H, metil veya etildir.

Tercih edilen bir düzenekte R₈, H, metil veya etildir.

20 Tercih edilen bir düzenekte Y₁ ve Y₂ birbirinden bağımsız olarak H, metil veya etildir.

Bir başka yönde mevcut buluş, buluşa ait bir bileşiğin sentezlenmesine yönelik bir yöntem sunar. Başvuru sahipleri, buluşa ait folat
25 radyofarmasötiklerinin, [¹⁸F]florid ile doğrudan radyo-etiketleme yoluyla elde edilebileceğini keşfettiler.

^{18}F nüklid genellikle elektrofilik $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ olarak ve burada genel olarak kullanıldığı gibi nükleofilik $[^{18}\text{F}]\text{florid}$ olarak temin edilir. $[^{18}\text{F}]\text{florid}$ formunda florin-18, daha verimli şekilde üretilebilir. Ek olarak bu, taşıyıcı ilave edilmemiş radyo-izleyicilerin yeterli şekilde hazırlanmasının tek yoludur.

Böylelikle spesifik bir düzenekte buluşa ait bir üretim yöntemi, bir $[^{18}\text{F}]\text{florid}$ ile ikame edilmeye açık bir ikame edici taşıyan bir azafolat olan bir öncünün sağlanması ve adı geçen öncünün, faz transfer katalizörleri örneğin tetrabutylamonyum karbonat veya potasyum karbonat veya oksalat ile kombinasyon halinde aminopolimerler (örn., Kryptofix® 2.2.2) ile aktive edilmiş $[^{18}\text{F}]\text{florid}$ ile reaksiyona sokularak buluşa ait bir bileşiğin oluşturulması adımlarını içerir.

Tipik olarak bir $[^{18}\text{F}]\text{florid}$ ile ikame edilmeye açık bir ikame edici, bir ayırma grubu görevi görebilen ve bu nedenle gelen bir $[^{18}\text{F}]\text{florid}$ ile değiştirilebilen veya başka şekilde bir $[^{18}\text{F}]\text{florid}$ in sokulması için aktive edici görevi görebilen bir elektron çeken gruptur. Uygun elektron çeken gruplar arasında $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{COOR}'$, $-\text{COR}'$, $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ bulunur. Tercih edilen bir düzenekte folat radyofarmasötikleri, nitro yerine ^{18}F veya kloro yerine ^{18}F alışverişine dayalı bir doğrudan etiketleme yönteminde elde edildi.

Tipik bir reaksiyonda öncü, uygun bir organik solvent içinde çözülür, kuru ^{18}F -Florid-kriptata ilave edildi. Elde edilen karışım, uygun bir sıcaklığa kadar ve uygun bir reaksiyon süresince, örn. yaklaşık 160°C 'ye 10 dakika süreyle ısıtıldı. Kısa kartuş saflaştırması sonrasında bazik veya asidik koşullar altında koruma giderme ve 10

dakika süreyle ısıtma yapıldı. Ham ürün çözeltisi nötralize edildi ve yarı-prep HPLC sistemine enjekte edildi. Radyoaktif ürün toplandı ve HPLC solventleri, başka bir katı faz özümlemesi ile veya nitrojen akışı, vakum ve nazik ısıtma yoluyla çıkarıldı. Formülasyon için kuru ürün, fizyolojik çözelti ile yeniden çözöldü ve bir steril filtre kullanılarak steril şişeye aktarıldı.

Bir diğér yönde mevcut buluş, buluşa ait folat radyofarmasötiklerinin, tanısal görüntölemeye ihtiyaç duyan bir süjeye elverişli ve etkili şekilde uygulama için kullanımlarına yöneliktir.

Böylelikle mevcut buluş, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin veya hücre popölasyonunun tanısal görüntülenmesine yönelik bir yöntem sunar; adı geöen yöntem, buluşa ait en az bir folat radyofarmasötığının bir tanısal görüntöleme miktarında uygulanması ve adı geöen hücrenin veya hücre popölasyonunun tanısal bir görüntüsünün elde edilmesi adımlarını içerir.

Bu görüntöleme, bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücre veya hücre popölasyonu üzerinde in vitro veya in vivo yapılabilir.

Böylelikle mevcut buluş, folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin bir doku örneğı içinde in vitro saptanmasına yönelik, adı geöen doku örneğinin buluşa ait en az bir folat radyofarmasötığının etkili miktarları ile bağlanmanın meydana gelmesi için yeterli bir süre boyunca ve koşullarda temas ettirilmesini ve otoradyografi ve benzeri gibi görüntöleme teknikleri ile bu bağlanmanın saptanmasını içeren bir yöntem sunar.

Bir başka düzenekte mevcut buluş, mevcut buluşa ait folat radyofarmasötiklerinin, tanısal görüntülemeye veya kanserin veya enflamatuvar ve otoimmün hastalık terapisinin izlenmesine ihtiyaç duyan bir süjeye elverişli ve etkili şekilde uygulama için kullanımlarını sunar.

Bir başka yönde mevcut buluş, eş zamanlı tanı ve terapiye yönelik, buna ihtiyaç duyan bir süjeye, terapötik bir aktif ile kombinasyon halinde tanısal açıdan etkili miktarda mevcut buluşa ait en az bir folat radyofarmasötiğinin uygulanması ve tedavi seyrini izlemek için adı geçen dokuların tanısal bir görüntüsünün alınması adımlarını içeren bir yöntem sunar.

Mevcut buluşa ait yöntemlerin süjesi, tercihen bir memeli, örneğin bir hayvan veya bir insan, tercihen bir insandır.

Dozaj, arzu edilen etkinin doğasına, örneğin tanı veya terapi formuna, tedavi türü ve sıklığına, tanı aletlerine, preparasyonun uygulama formuna ve alıcının yaşı, kilosuna, beslenmesi ve durumuna, varsa eşlik eden tedavinin türüne bağlıdır.

Bununla birlikte en fazla tercih edilen dozaj, gereksiz denemeler yapmak zorunda kalmadan bu konuda uzman bir kişi tarafından anlaşılacağı ve belirlenebileceği gibi ilgili süjeye göre ayarlanabilir. Bu tipik olarak standart bir dozun ayarlanmasını, örn., hasta düşük bir vücut ağırlığına sahipse dozun azaltılmasını içerir.

Tedavi, optimum miktarın altındaki daha küçük bir miktar ile başlayabilir ve optimum etkiyi sağlamak amacıyla arttırılabilir.

Mevcut buluşa ait folat radyofarmasötikleri, tekrarlı bir doz halinde veya tercihen tek bir doz halinde uygulanabilir. Örneğin bu buluşa ait folat radyofarmasötikleri, bir süjeye intravenöz bolus enjeksiyonu yoluyla uygulanabilir. Enjeksiyon için uygun formlar, mevcut buluşa ait yukarıda bahsedilen folat radyofarmasötiklerinin steril sulu çözeltilerini veya dispersiyonlarını içerir.

10

Enjekte edilecek bir çözelti için tercih edilen birim dozaj, yaklaşık 0.01 ml ile yaklaşık 10 ml'dir. Örn., intravenöz uygulamadan sonra organın veya tümörün in vivo görüntülenmesi arzu edilirse süjeye radyo-etiketli reaktif madde süjeye uygulandıktan 30 dakika ile 4 saat sonra yapılabilir. Tipik olarak uygulanan dozun yeterli bir miktarı, hedeflenen organda birikecektir.

15

Folat radyofarmasötikleri tercihen HPLC ile saflaştırılır. HPLC saflaştırması ile solventler çıkarıldıktan sonra ürünler tercihen %0.9 NaCl veya 0.15M fosfat tamponu çözeltisi gibi fizyolojik çözeltiler içinde çözülür, uygulamadan önce formüle edilmiş radyofarmasötik, steril bir filtre üzerinden steril bir şişeye aktarılır.

20

Buluşa ait folat radyofarmasötikleri ayrıca folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin, bir süjeden alınan bir doku biyopsisi içinde in vitro saptanması için kullanılabilir. Böylelikle başka bir düzenekte mevcut buluş, folat reseptörünü eksprese eden bir hücrenin, örn. bir tümör hücresinin veya aktiveleştirilmiş bir makrofajın, bir doku örneği içinde

25

in vitro saptanmasına yönelik, adı geçen doku örneğinin mevcut buluşa ait bir folat radyofarmasötiği ile bağlanmanın meydana gelmesi için etkili miktarlarda ve yeterli bir süre boyunca ve koşullarda temas ettirilmesini ve görüntüleme teknikleri ile bu bağlanmanın saptanmasını içeren bir yöntem sunar.

Örnekler, uzman kişilerce bilinen prosedürlerle, örn. bir doku biyopsisi veya bir vücut sıvısı toplanarak, trake veya pulmoner örnekler için aspirasyon ve benzeri yapılarak toplanabilir.

10

Test edilecek doku örnekleri arasında bir folat reseptörünü eksprese eden bir hücreyi ihtiva ettiğinden şüphelenilen herhangi bir doku, örneğin tümör hücreleri, epitelial hücreler, böbrekler, gastrointestinal veya hepatobiliyer sistem, aktifleşmiş makrofajlar, monositler ve diğerleri bulunur. Örnekler örn. bir mikrotom ile kesitlenerek mikroskopik inceleme ve gözlem sağlanabilir. Örnekler ayrıca örnek dokuların histolojik kalitesini geliştirmek amacıyla mevcut buluşa ait folat radyofarmasötiklerinden biri ile inkübe edilmeden önce veya bundan sonra uygun bir sabitleyici ile sabitlenebilir. Mevcut buluşa ait bir folat radyofarmasötiğinin hücre üzerindeki bir folat reseptörüne bağlanması için yeterli süre ve koşullar arasında standart doku kültürü koşulları bulunur, yani örnekler, in vitro kültürlenebilir ve mevcut buluşa ait bileşikler veya kompozisyonlardan biri ile fizyolojik ortam içinde inkübe edilebilir. Bu koşullar, uzman kişiler tarafından iyi bilinir. Alternatif olarak örnekler sabitlenebilir ve sonra mevcut buluşa ait bir folat radyofarmasötiği ile izotonik veya fizyolojik bir tampon içinde inkübe edilebilir.

25

Tüm uygulamalar için mevcut buluşa ait bileşiklerin veya kompozisyonların, kullanılacakları yerde veya bunun yakınında hazırlanması elverişlidir. Burada açıklanan ve istemde bulunulan bileşiklerin ve/veya yöntemlerin tamamı, mevcut açıklama ışığında gereksiz denemeler yapılmadan gerçekleştirilebilir ve yürütülebilir. Ekteki istemlerle tanımlanan buluş kapsamından ayrılmadan mevcut buluş üzerinde değişikliklerin uygulanabileceği bu konuda uzman kişiler için açık olacaktır. Burada sunulan Örneklerin açıklayıcı olması ve hariç bırakıcı olmaması amaçlanır; bu nedenle gösterilen Örnekler, buluşu bir şekilde sınırlayıcı olarak görülmemelidir (bakınız ayrıca Betzel ve arkadaşları Bioconj. Chem. 2013, 24: 205-214).

Örnekler

Genel: Reaktif maddeler ve solventler, başka bir şeyden bahsedilmemişse Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Acros Organics veya VWR International AG'den satın alındı. Tüm kimyasallar alındığı şekilde kullanıldı. İnsan ve fare (dişi CD-1) mikrozomları ve NADPH rejenerasyon sistemleri, BD biosciences'ten satın alındı.

20

Analitik Radyo-HPLC: Analitik radyo-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), bir GabiStar (Raytest) radyo-dedektör kolonu ile donatılmış, bir RP-18 kolonu, Luna PFP(2) C18, (5 µm, 250 × 4.6 mm, Phenomenex) ile bir solvent sisteminin ve şu şekilde gradyanın kullanıldığı bir Agilent 1100 serisi HPLC sistemi üzerinde yapıldı: elüent A, bir NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu (0.05 M, pH 7.4) idi ve elüent B, MeOH idi. 0 - 30 dakika %100 - %70 A'lık bir gradyan, 1 ml/dakika akış hızında kullanıldı. Spesifik aktivite, farklı

konsantrasyonlarda soğuk referans bileşikten elde edilen bir kalibrasyon eğrisinden belirlendi. Klorine edilmiş öncü (3'-aza-2'-kloro-folik asit) miktarını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda 3'-aza-2'-kloro-folik asitten elde edilen bir standart eğri kullanıldı.

5

Yarı preparatif Radyo-HPLC: Saflaştırma için radyo-HPLC, bir Smartline Pompa 1000, Smartline Manager 5000, Smartline UV dedektörü 2500 (Knauer) ve bir GabiStar radyo-dedektörü (Raytest) ile donatılmış bir yarı-preparatif HPLC sistemi üzerinde yapıldı. [¹⁸F]-
 10 3'-aza-2'-florofolik asit, bir RP-18 kolonu, Luna PFP(2) C18, (5 µm, 250 × 10 mm, Phenomenex) üzerinde şu şekilde bir solvent sistemi ile saflaştırıldı: elüent A, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu içinde %0.1 EtOH çözeltisi (0.05 M, pH 7.4) idi ve elüent B, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu içinde %40'lık bir EtOH çözeltisi (0.05 M, pH 7.4) idi. 0 - 10
 15 dak %100 - %85 A, 10 - 25 dak izokratik %85 A gradyanı, 4 ml/dak akış hızında kullanıldı.

Radyo-UPLC: Stabilite çalışmaları için bir Acquity UPLC BEH C18 kolonu (1.7 µm, 2.1×50 mm, Waters) ve bir çakışma dedektörü
 20 (FlowStar LB513, Berthold) ile donatılmış bir ultra-performanslı sıvı kromatografisi (UPLC™, Waters) sistemi, şu solvent sistemi ile kullanıldı: elüent A, bir NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu (0.05 M, pH 7.4) idi ve elüent B, asetonitrildi. 0 - 4.0 dak %100 - %40 A gradyanı, 0.6 ml/dakika akış hızında kullanıldı.

25

Taşıyıcı İlave Edilmemiş [¹⁸F]Floridin Üretimi: Taşıyıcı ilave edilmemiş [¹⁸F] florid, bir Siklon 18/9 siklotronunda (IBA) ¹⁸O(p,n)¹⁸F nükleer reaksiyon yoluyla üretildi. İzotopik olarak %97 oranında

zenginleştirilmiş ^{18}O -su, bir 18 MeV proton ışını ile 2.1 ml'lik bir hedef kullanılarak ışına tabi tutuldu. Hedef hacim (1.95 ml), bir helyum akışı kullanılarak sıcak hücreye aktarıldı. Taşıyıcı ilave edilmemiş [^{18}F]florid (40 - 80 GBq), sulu potasyum karbonat çözeltisi (0.5 M, 5 ml) ve su (10 ml) ile önceden koşullandırılmış bir anyon alışveriş kartuşu (Sep-Pak Light Accell Plus QMA, Waters) üzerinde yakalandı.

LogD'nin Belirlenmesi: Çalkalama-şişe yöntemi kullanılarak logD değeri belirlenmesi yapıldı, burada n-oktanol ile fosfat tamponlu tuz (PBS) arasındaki radyo-izleyici bölünme katsayısı belirlendi (Wilson ve arkadaşları. 2001 Applied Radiation and Isotopes). n-Oktanol (0.5 ml) ve PBS (0.5 ml), radyoaktif örnek (5-10 μl) ihtiva eden bir Eppendorf tüpü içinde karıştırıldı. Tüpler, bir üstten çalkalayıcı içinde 15 dakika süreyle oda sıcaklığında çalkalandı ve ardından santrifüjlendi (3 dak, 5000 rpm). Her Eppendorf tüpünden her fazdan 50 μl , bir γ sayacında sayılmak üzere küçük şişeye aktarıldı. Log D değeri, şu denkleme göre hesaplandı: $\log D_{7.4} = \log [\text{aktivite}(\text{oktanol fazı})/\text{aktivite PBS fazı}]$.

20

Hücre Kültürü: KB hücreleri (insan servikal karsinoma hücre çizgisi, HeLa alt klonu; ACC-136), Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonundan (DSMZ, Braunschweig, Almanya) satın alındı. Hücreler, %5 CO_2 ihtiva eden nemlendirilmiş bir atmosferde 37°C'de mono tabakalar halinde kültürlendi. Önemli şekilde hücreler, folatsız bir hücre kültürü ortamı, FFRPMI (modifiye edilmiş RPMI, folik asit, vitamin B_{12} ve kırmızı fenol olmadan; Cell Culture Technologies GmbH, Gravesano/Lugano, İsviçre) içinde kültürlendi. FFRPMI

25

ortamı, %10 ısı ile eylemsizleştirilmiş fetal buzağı serumu (FCS, tek folat kaynağı olarak), L-glutamin ve antibiyotikler (penisilin/streptomisin/fungizon) ile desteklendi. Rutin kültür işlemi, haftada iki kez EDTA (2.5 mmol/l) ile PBS içinde yapıldı.

5

Ornek 1: N²-asetil-3'-aza-2'-nitrofolik asit di-tert butil ester öncününün sentezi

(a) N-(6-amino-2-kloronikotinoil)-L-glutamik asit di-tert butilester sentezi

6-amino-2-kloronikotinik asit (6 g, 34.8 mmol, Anichem Inc.'den satın alındı), N,N-dimetilformamid (232 ml) içinde oda sıcaklığında çözüldü. Çözelti, 0°C'ye soğutuldu ve trietilamin (11 ml, 7.39 g, 73.0 mmol) ilave edildi. HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilüronyum heksaflorofosfat, 14.5 g, 38.2 mmol) ilave edildikten sonra karışım, 5 dakika süreyle 0°C'de karıştırıldı ve sonra di tert butil-L-glutamat hidroklorid (10.8 g, 36.5 mmol) ilave edildi. Soğutma banyosu çıkarıldı ve karışım, 18 saat süreyle karıştırıldı. - 20°C'ye soğutulduktan sonra katılar çekildi ve DMF (20 ml) ile yıkandı. Filtrat kuruyana kadar vakum altında buharlaştırıldı ve tortu, bir etilasetat (400 g) ve metil-tert butileter (200 g) karışımı içinde çözüldü. Çözelti, üç kez su (toplam 150 ml) ile, üç kez sulu bir 1 M NaHCO₃ çözeltisi (toplam 150 ml) ile ve üç kez sulu doymuş bir NaCl çözeltisi (toplam 150 ml) ile yıkandı. Organik tabaka, magnezyum sülfat (10 g) üzerinde kurutuldu ve kuruyana kadar vakum altında buharlaştırıldı. Tortu, kolon kromatografisi ile silika jel (n-heksan/etil asetat 7:3 ila 5:5) üzerinde saflaştırılarak N-(6-amino-2-

kloronikotinoil)-glutamik asit-di tert butilester soluk sarı bir katı halinde elde edildi. Verim: 6.8 g (36.5 mmol, %47.3). HR-MS (ESI, örnek CH₂Cl₂ içinde çözüldü) : m/z [MH]⁺ C₁₉H₂₉ClN₃O₅ için hesaplanan: 414.1790; bulunan: 414.1789 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ = 1.39 (s, 9H, OtBu), 1.41 (s, 9H, OtBu), 1.71-2.07 (m, 2H, C(β)H₂), 2.33 (t, 2H, C(γ)H₂), 4.18-4.29 (m, 1H, C_αH), 6.40 (d, 1H, 4'H_{arom}, J² = 8.3Hz), 6.69 (s, 2H, NH₂), 7.47 (d, 1H, 5'H_{arom}, J² = 8.3Hz), 8.36 (d, 1H, NH, J³ = 7.6 Hz) . ¹³C-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 26.6, 28.2, 31.6, 52.9, 80.2, 81.1, 106.3, 118.9, 140.1, 146.2, 160.6, 166.2, 171.2, 172.0.

(b) N²-asetil-3'-aza-2'-klorofolik asit di-tert butil ester sentezi

N-(6-amino-2-kloronikotinoil)-glutamik asit-di tert butilester (0.5 g, 1.27 mmol) ve N²-asetil-6-formilpterin (0.3 g, 1.21 mmol), asetik asit (30 ml) içinde çözüldü. Tetraetil ortosilikat (0.54 ml, 1.27 mmol) ilave edildikten sonra karışım, 55°C'de 6 saat süreyle karıştırıldı. Oda sıcaklığına bir gece süreyle soğutulduktan sonra sodyum triasetoksiborohidrid (0.27 g, 2.42 mmol) ilave edildi ve karışım, 1 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırıldı. n-heksan (18 g) ve su (8 g) ilave edildikten sonra organik tabaka ayrıldı ve sulu tabaka, kuruyana kadar vakum altında buharlaştırıldı. Tortu, bir su (9 g) ve asetonitril (1 g) karışımı içinde süspanse edildi. Katılar çekildi ve iki kez su (toplam 10 g) ile yıkanarak ham N²-asetil-3'-aza-2'-klorofolik asit di tert butilester (0.77 g) elde edildi. Ham ürün, %10'dan %25'e çıkarılan asetonitril yüzdesi ile su ve asetonitril karışımları içinde tekrarlı sindirim yoluyla saflaştırılarak N²-asetil-3'-aza-2'-klorofolik asit di tert butilester, portakal rengi bir katı halinde elde edildi. Verim: 0.61 g

(0.911 mmol, %75). HR-MS (ESI, örnek MeOH/CH₂Cl₂/1:1 içinde
 çözüldü) : m/z [MH]⁺ C₂₈H₃₅ClN₈NaO₇ için hesaplanan: 653.2209;
 bulunan: 653.2211 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ = 1.37 (s, 9H,
 OtBu), 1.39 (s, 9H, OtBu), 1.75-1.82 (m, 1H, C(β)H), 1.92-1.99 (m,
 5 1H, C(β)H'), 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.28-2.32 (m, 2H, C(γ)H₂), 4.21 (m,
 1H, C(α)H), 4.72 (d, 2H, C(6)CH₂, J = 5.8 Hz), 6.71 (s, 1H, 4'Harom),
 8.00 (bt, 1H, NH), 8.04 (s, 1H, 5'H_{arom}), 8.50 (d, 1H, NH(Glu), J = 7.5
 Hz), 8.83 (s, 1H, C(7)H), 11.9 (bs, 1H, NH), 12.3 (bs, 1H, NH). ¹³C-
 NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : 24.4, 26.5, 28.1, 28.2, 31.5, 44.5, 52.8,
 10 80.3, 81.1, 107.1, 119.6, 130.9, 139.7, 145.9, 149.7, 150.2, 152.4,
 154.9, 158.6, 159.7, 166.1, 171.1, 171.9, 174.6.

**(c) N-(6-amino-2-nitronikotinoil)-L-glutamik asit di tert-butilester
 sentezi**

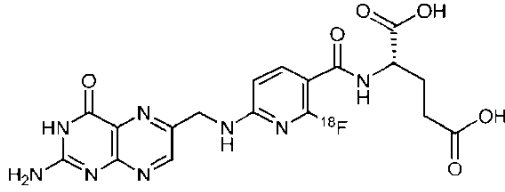
15

Sentez, Örnek 1a)'da tarif edilen prosedür uygulanarak, ancak 6-
 amino-2-kloro-nikotinik asit yerine 6-amino-2-nitronikotinik asit
 kullanılarak yapıldı.

20 **(d) N²-asetil-3'-aza-2'-nitrofolik asit di-tert butil ester sentezi**

Sentez, Örnek 1b)'de tarif edilen prosedür uygulanarak, ancak N-(6-
 amino-2-kloronikotinoil)-glutamik asit-di tert butilester yerine N-(6-
 amino-2-nitronikotinoil)-L-glutamik asit di tert-butilester kullanılarak
 25 yapıldı.

**Örnek 2: Taşıyıcı İlave Edilmemiş 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit
 sentezi**



- 5 Anyon alışveriş kartuşu üzerinde yakalanmış, taşıyıcı ilave edilmemiş [¹⁸F]florid, 5 ml'lik kapalı bir reaksiyon kabı içine, asetonitril (1.4 ml) ve su (0.6 ml) karışımı içinde kaezyum karbonat (2.8 mg) ve Kryptofix 2.2.2 (5 mg) ihtiva eden bir çözelti kullanılarak doğrudan elüte edildi. Solvent, 90°C'de vakum ve bir nitrojen akışı altında
- 10 çıkarıldı. Ardından kuru asetonitril (3 × 1 ml) ilave edildi ve kuruyana kadar buharlaştırıldı. Sonra 10 dakika süreyle 90°C'de sadece vakum uygulandı.

- Oncü, N²-asetil-3'-aza-2'-klorofolik asit di-tertbutil ester (2.50 mg, 3.96 µmol) veya alternatif olarak N²-asetil-3'-aza-2'-nitro-folik asit di-tert butil ester, dimetil sülfoksid (300 µl) içinde kuru [¹⁸F]florid-kriptat kompleksine ilave edildi. Karışım, 10 dakika süreyle 160°C'ye ısıtıldı. 10 dakika süreyle soğutulduktan ve su (5 ml) ilave edildikten sonra karışım, daha önce metanol (5 ml) ile koşullandırılmış ve su (10
- 20 ml) ile durulanmış, geri fazlı bir kartuş (Sep-Pak C18 Plus; Waters) içinden geçirildi. Yüklenen kartuş, su (3 × 8 ml) ile yıkandı. ¹⁸F etiketli, korunmuş ara madde, N²-asetil-3'-aza 2'-florofolik asit di-tertbutil ester, asetonitril (2 ml) ile başka bir 5 ml'lik kapalı reaksiyon kabı içine elüte edildi. Asetonitril hacmi, yaklaşık olarak 0.1 ml'ye
- 25 indirgenmiş basınç ve bir nitrojen akışı altında 90°C'de konsantre

edildi. Hidroliz için bir hidrojen klorid çözeltisi (4 M, 1.25 ml) ilave edildi ve karışım, 10 dakika süreyle 60°C'de ısıtıldı. 5 dakika soğutulduktan sonra bir sodyum hidroksid çözeltisi (5 M, 1.0 ml) ilave edilerek karışım nötralize edildi ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu (0.05 M, pH 7.4, 2.5 ml) ile toplam 5 ml hacme kadar seyreltildi. Çözelti, 5 yarı-preparatif radyo-HPLC sistemi içine enjekte edildi. %6 EtOH ihtiva eden, toplanan ürün fraksiyonu ($t_R = 21$ dakika), steril bir filtre üzerinden, ileri deneyler için (in vitro ve in vivo) kullanılmaya hazır, steril, pirojensiz bir şişe içine geçirildi.

10

Bozulma düzeltmeli radyokimyasal verim %5 - 15 (0.5 - 2.75 GBq) arasında değişiyordu. Kalite kontrolü, bir analitik radyo-HPLC üzerinde yapıldı (Şekil 2). Radyo-kimyasal saflık, %98'in üzerindeydi ve spesifik aktivite, 45 - 126.8 GBq/ μmol arasında değişiyordu. 15 Klorine olmuş yan ürün miktarı, 17 $\mu\text{g/mL}$ 'den az formüle edilen ürün çözeltisi (1 - 16.3 $\mu\text{mol/mL}$ aralık) idi. Toplam sentez süresi, yaklaşık 85 dakikaydı ve [^{18}F]-3'-aza-2'-florofolik asit kimliği, referans bileşik 3'-aza-2'-[^{19}F]florofolik asidin birlikte enjekte edilmesi ile teyit edildi. Radyo-etiketleme koşullarının bir özeti, Tablo 1'de gösterilir.

20

25

Tablo 1 3'-aza-2'-[¹⁸F] florofolik asit sentez koşulları:**Adım 1-Radyo-etiketleme**

Oncü	4.0 µmol (2.5 mg)
Solvent	300 µl DMSO
Sıcaklık	160 °C
Reaksiyon süresi	10 dak

Adım 2 - ¹⁸F-Etiketli Aza-Folatın Saflaştırılması

tC18 artı kartuş Reaksiyona girmemiş [¹⁸F]florid ve tuzlarının çıkarılması

Adım 3 - ¹⁸F-Etiketli Aza-Folatın Korumasının Giderilmesi

4 N HCl	1,25 ml
Sıcaklık	60 °C
Reaksiyon süresi	10 dak
5 N NaOH (nötralizasyon)	1,0 ml

Adım 4 - Nihai Radyo-İzleyicinin Saflaştırılması (5)

Radyo-kimyasal saflık	> %98
Radyo-kimyasal verim (bozulma düzeltmeli)	%5-15
Radyoaktivite	Maks. 2.75 GBq

- 5 Log D_{7.4} ölçümü: Lipofiliklik değerlendirmesi için [¹⁸F]-3'-aza-2'-floro- -folik asidin n-oktanol/PBS içinde bölünme katsayısı, -4.2±0.1 bulundu (n = 10), bu da [¹⁸F]-3'-aza-2'-floro--folik asidin çok hidrofilik özelliklerini gösterir.

10 **Örnek 3: 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asidin Modüler GMP-Radyo-sentezi**

- Radyo-izleyici 3'-aza-2'-[¹⁸F]floro-folik asidin GMP üretimi, otomatik bir sentez modülü üzerinde yapıldı. Taşıyıcı ilave edilmemiş
- 15 [¹⁸F]florid, bir anyon alışveriş kartuşu üzerinde yakalandı ve kaezyum

karbonat (0.35 ml H₂O içinde 2.8 mg) ve Kryptofix 2.2.2 (0.35 ml asetonitril içinde 6.5 mg) ihtiva eden bir karışım kullanılarak doğrudan reaktör içine elüte edildi. Solvent, 120°C'de indirgenmiş basınç ve bir nitrojen akışı altında çıkarıldı. Asetonitril (0,1 ml) ilave edildi ve kuruyana kadar buharlaştırıldı.

DMSO (400 µL) içinde N²-asetil-3'-aza-2'-klorofolik asit di-tertbutil ester (2.50 mg, 3.96 µmol) ihtiva eden öncü çözeltisi, kuru [¹⁸F]florid-kriptat kompleksine ilave edildi. Karışım, 17 dakika süreyle 150°C'ye ısıtıldı. Sonra 4 M HCl (1.0 ml) doğrudan reaktöre ilave edildi ve 60°C'de 10 dakika süreyle hidroliz yapıldı. Reaksiyon karışımı, H₂O (9 ml) ile seyreltildi ve aktifleştirilmiş bir MCX kartuşuna yüklendi ve H₂O (5 ml) ile yıkandı. Kartuş, 50 mM fosfat tamponu pH 7.4 (4 ml) içinde % 10 MeOH'den oluşan bir çözelti ile durulanarak radyo-izleyici elüte edildi. Elüent, yarı-preparatif bir radyo-HPLC sistemi içine enjekte edildi. Toplanan ürün fraksiyonu ($t_R = 21.1$ dak), 4 M HCl (0.5 ml) ile asitlendi ve başka bir MCX kartuşuna yüklendi. Kartuş, H₂O (5 ml) ile durulandıktan sonra radyo-izleyici, 50 mM fosfat tamponu pH 7.4 (5 mL) içinde %10 EtOH ile elüte edildi ve %0.9 sulu NaCl (9 mL) ile seyreltildi.

Sentezin sonunda bozulma düzeltmeli radyokimyasal verim %7 - 16 (2.4 - 6.0 GBq) arasında değişiyordu. Kalite kontrolü, bir analitik radyo-HPLC üzerinde yapıldı. Radyo-kimyasal saflık, %99'un üzerindeydi ve spesifik aktivite, 47 - 62 GBq/µmol arasında değişiyordu.

Klorine olmuş yan ürün miktarı, 0.1 µg/mL'den az formüle edilen

ürün çözeltisi idi. Toplam sentez süresi yaklaşık 75 dakikaydı. Radyo-etiketleme koşullarının bir özeti, Tablo 2'de gösterilir.

Tablo 2: Otomatik bir modül üzerinde 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit sentez koşulları.

Adım 1-Radyo-etiketleme

Oncü	4.0 µmol (2.5 mg)
Solvent	400 µl DMSO
Sıcaklık	150 °C
Reaksiyon süresi	17 dak

Adım 2 - ¹⁸F-Etiketli Aza-Folatın Korumasının Giderilmesi

4 M HCl	1,0 ml
Sıcaklık	60 °C
Reaksiyon süresi	10 dak
H ₂ O (seyreltme)	9,0 ml

Adım 3 - Nihai Radyo-İzleyicinin Saflaştırılması

MCX kartuşu (60 mg)	Radyo-izleyicinin yakalanması ve reaksiyona girmemiş [¹⁸ F]florid ve tuzlarının çıkarılması
Elüsyon	50 mM fosfat tamponu pH 7.4 içinde 4 mL %10 MeOH
HPLC	Luna PFP(2), 250×10 mm, 20 mM fosfat tamponu pH 7.4 içinde %7 MeOH
MCX kartuşu (30 mg)	HPLC ürün fraksiyonunun yakalanması, HPLC solventinin çıkarılması

Adım 4- Formülasyon

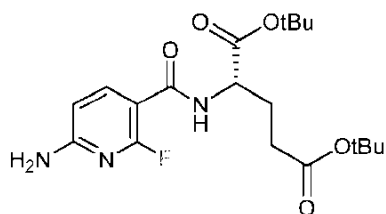
Elüsyon	50 mM fosfat tamponu pH 7.4 (5ml) içinde %10 EtOH ve %0.9 NaCl (9 mL)
Radyo-kimyasal saflık	> %99
Radyo-kimyasal verim (bozulma düzeltmeli)	%7-16
Radyoaktivite	maks. 6.0 GBq

Ornek 4: Taşıyıcı İlave Edilmemiş [^{18}F]-3',5'-diaz-2'-florofolik asit sentezi

Sentez, Ornek 1 ila 3'e benzer şekilde, ancak 6-amino-2-kloronikotinik asit yerine 2-amino-4-kloro-5-pirimidinkarboksilik asit (Abby Pharmatech, LLC'den satın alındı) kullanılarak yapıldı.

Ornek 5: [^{19}F]-Referans Bileşiklerin Sentezi

(a) N-(6-amino-2-floronikotinoil)-L-glutamik asit-di tert butilester sentezi

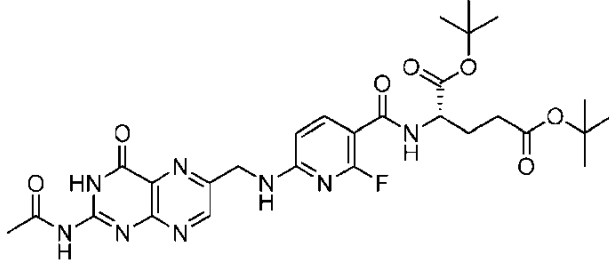


N,N-dimetilformamid (50 ml) içinde 6-amino-2-floronikotinik asit hidroklorid (5.72 g, 29.7 mmol, Anichem Inc.'den satın alındı) ihtiva eden bir çözeltiye, N-hidroksisukinimid (6.83 g, 59.3 mmol) ilave edildi. 0°C 'ye soğutulduktan sonra trietilamin (15.01 g, 148.3 mmol) damlalar halinde 10 dakika süreyle ilave edildi. Karışım, oda sıcaklığına ısıtıldı ve N,N-diizopropilkarbodiimid (6.9 ml, 44.5 mmol), 5 dakika içinde ilave edildi. 29 saat sonra N,N-dimetilformamid (114 ml) içinde glutamik asit di tert butilester hidroklorid (17.6 g, 59.3 mmol) ihtiva eden bir çözelti, 5 dakika içinde damlalar halinde ilave edildi. 21 saat sonra katılar çıkarıldı ve iki kez N,N-dimetilformamid (toplam 40 ml) ile yıkandı. Filtrat ve yıkama sıvıları birleştirildi ve etilasetat (500 ml) ve diizopropileter (500 ml)

ile seyreltildi. Çözelti, beş kez su (toplam 1000 ml) ile yıkandı. Organik tabaka, magnezyum sülfat (60 g) üzerinde ve alüminyum oksid (10g) üzerinde kurutuldu ve kuruyana kadar vakum içinde buharlaştırıldı. Tortuya asetonitril (57.9 g) ilave edildi ve katılar
5 çekildi ve asetonitril (toplam 20 g) ile yıkandı. Filtrat ve yıkama sıvıları birleştirildi ve 40°C'de vakum altında kuruyana kadar buharlaştırıldı. Tortu, kolon kromatografisi ile silika jel (n-heksan/etil asetat 7:3 ila 0:1, $R_f = 0.46$, n-heksan/etil asetat 7:3) üzerinde saflaştırılarak N-(6-amino-2-floronikotinoil)-L-glutamik asit-di tert
10 butilester, ürün fraksiyonlarının buharlaştırılmasının ardından kristalli bir katı halinde elde edildi. Verim: 2.27 g (5.7 mmol, %19).

HR-MS (ESI, örnek su/ CH₃CN / 1:1 içinde çözöldü): m/z [MH]⁺
C₁₉H₂₉FN₃O₅ için hesaplanan: 398.2086; bulunan: 398.2083
15 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ = 1.37 (s, 9H, OtBu), 1.41 (s, 9H, OtBu), 1.79-1.98 (m, 2H, C(β)H₂), 2.29 (t, 2H, C(γ)H₂), 4.33 (m, 1H, C(α)H), 6.36 (dd, 1H, 4' Harom, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁵J_{FH} = 2.2 Hz), 6.91 (bs, 2H, NH₂), 7.78-7.87 (m, 2H, NH, 5 'H_{arom}).
¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : 26.1, 27.6, 27.7, 31.1, 52.3, 79.7,
20 80.7, 101.6 (d, 2J_{CF}=27.4 Hz), 104.7 (d, ⁴J_{CF} = 2.8 Hz), 142.1 (d, ³J_{CF} = 3.0 Hz), 160.0 (d, ¹J_{CF} = 237.0 Hz), 160.7 (d, ³J_{CF} = 19.3 Hz), 162.9 (d, ³J_{CF} = 6.5 Hz), 170.8, 171.5.

(b) N²-Asetil-3'-aza-2'-florofolik asit di tert butilester sentezi



- N²-Asetil-6-formilpterin (1.17 g, 5.03 mmol), oda sıcaklığında asetik asit (25 ml) içinde süspanse edildi. Asetik asit (35 ml) içinde N-(6-amino-2-floronikotinoil)-L-glutamik asit-di tert butilester (1.00 g, 2.52 mmol) ihtiva eden bir çözelti, süspansiyona 30 dakika içinde damlalar halinde ilave edildi. Oda sıcaklığında 2 saat sonra berrak bir çözelti oluştu ve moleküler elek 4A (10 g) ilave edildi. Tekrar 2.5 saat sonra ikinci bir kısım moleküler elek 4A (10 g) ilave edildi. 2 saat sonra sodyum triasetoksiborohidrid (0.5 g, 2.39 mmol) ilave edildi ve tekrar bir saat sonra bir ikinci kısım sodyum triasetoksiborohidrid (0.5 g, 2.39 mmol) ilave edildi. Oda sıcaklığında 16 saat sonra bir üçüncü kısım sodyum triasetoksiborohidrid (0.53 g, 2.52 mmol) ilave edildi.
- Tekrar 2.5 saat sonra katılar, reaksiyon karışımından çıkarıldı ve asetik asit (30 ml) ile yıkandı. Filtrat, bir su (150 ml) ve asetonitril (30 ml) karışımına damlalar halinde ilave edildi. Sonra su (100 ml) damlalar halinde ilave edildi. Karışım, iki saat süreyle 4°C'ye soğutuldu ve çökelen ürün çıkarıldı. Ürün, dört kez su (toplam 40 g) içinde süspanse edildi ve sonra vakum içinde P₂O₅ üzerinde kurutularak N²-asetil-3'-aza-2'-florofolik asit di tert butilester, tam beyaz olmayan bir toz halinde elde edildi. Verim: 1.10 g (1.79 mmol, %71).

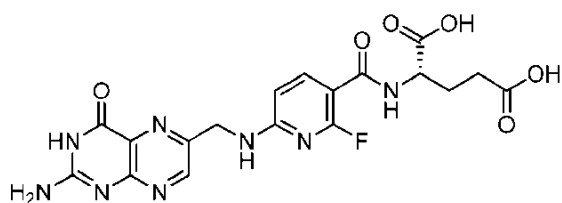
HR-MS (ESI, örnek su/ CH₃CN / 1:1 içinde çözüldü): m/z [MH]⁺

C₂₈H₃₆FN₈O₇ için hesaplanan: 615.2685; bulunan: 615.2677

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ = 1.37 (s, 9H, OtBu), 1.40 (s, 9H, OtBu), 1.80-2.07 (m, 2H, C(β)H₂), 2.21-2.32 (t, 2H, C(γ)H₂), 4.29 (m, 1H, C(α)H), 4.71 (d, 2H, C(6)CH₂); 6.56 (dd, 1H, 4'Harom, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁵J_{FH} = 2.2 Hz), 7.83 (dd, 1H, 4'Harom, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{FH} = 10.0 Hz), 7.91 (dd, 1H, NH(Glu), ³J_{HH} = 7.4 Hz, ⁴J_{HH} = 4.5 Hz), 8.29 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz), 8.88 (s, 1H, C(7)H), 11.94 (bs, 1H, N(3)H), 12.28 (bs, 1H, NHAc).

¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : 23.9, 26.1, 27.7, 27.6, 31.1, 44.1, 52.3, 79.7, 80.7, 102.5 (d, ²J_{CF} = 28.3 Hz), 105.4, 130.5, 141.7, 149.3, 149.4, 151.7, 154.5, 158.9 (d, ³J_{CF} = 17.8 Hz), 159.3, 159.8 (d, ¹J_{CF} = 237.6 Hz), 162.9 (d, ³J_{CF} = 6.5 Hz), 170.7, 171.5, 174.1.

15 (c) 3'-aza-2'-florofolik asit sentezi



N²-Asetil-3'-aza-2'-florofolik asit di tert butilester (0.6g, 1mmol), bir
 20 1M sulu hidroklorik asit (16ml) ve asetonitril (1.6ml) karışımı içinde
 süspanse edildi. Süspansiyon, 2 saat süreyle 60°C'ye ısıtıldı. 4°C'ye
 soğutulduktan sonra çökelen ürün çekildi, su (toplam 10 ml) ile
 yıkandı ve vakum içinde P₂O₅ üzerinde kurutularak ham 3'-aza-2'-
 florofolik asit, açık sarı bir toz halinde elde edildi. Verim: 0.4 g (0.9
 25 mmol, %88). Ham 3'-aza-2'-florofolik asit (0.27 g, 0.59 mmol), su (2

ml) ve 1M sulu sodyum hidroksid (1.2 ml) çözeltisi karışımı içinde
 5 çözöldü. Çözelti, kömür (0.027 g) ile 15 dakika süreyle 70°C'de
 işleme tabi tutuldu. Kömür çekildi ve filtrat, 0°C'ye soğutuldu. Ürün,
 sulu 2M hidroklorik asit (0.59 ml) ilave edilerek çökeltildi. Çökelti,
 santrifüj yoluyla izole edildi. Ana sıvı, katıdan boşaltıldı ve katı, üç
 kez su (toplam miktar: 14.2 ml) ile yıkandı. Katı tortu, vakum içinde
 20°C'de kurutularak 3'-aza-2'-florofolik asit, sarı bir toz halinde elde
 edildi. Verim: 78 mg (0.17 mmol, %29).

HR-MS (ESI, örnek, CH₂Cl₂ içinde matris olarak 3-hidroksipikolinik
 10 asit kullanılarak çözöldü): m/z [MH]⁺ C₁₈H₁₈FN₈O₆ için hesaplanan:
 461.1328; bulunan: 461.1328.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 1.88-1.96 (m, 1H, C(β)H), 2.03-2.10
 (m, 1H, C(β)H'), 2.14-2.24 (m, 2H, C(γ)H₂), 4.24-4.26 (m, 1H,
 C(α)H), 4.57 (s, 2H, C(6)CH₂), 6.47 (dd, 1H, 5'Harom, ³J_{HH} = 8.6 Hz,
 15 ⁵J_{FH} = 1.8 Hz), 7.85 (dd, 1H, 4'Harom, ³J_{HH} = 10.1 Hz, ⁴J_{FH} = 8.6 Hz),
 8.5 (s, 1H, C(7)H).

¹³C-NMR (500 MHz, D₂O): 23.4, 28.7, 34.1, 44.3, 55.8, 101.7, 101.9,
 105.9, 128.2, 142.2, 146.6, 147.4, 155.7, 159.4, 159.8, 164.2, 165.2,
 165.3, 173.2, 178.8, 181.5, 182.3.

20

(d) N-(2-amino-4-floropirimidin-5-karbonil)-L-glutamik asit-di tert butilester sentezi

Sentez, örnek 5a)'da tarif edilen prosedür uygulanarak, ancak 6-
 25 amino-2-floronikotinik asit yerine 2-amino-4-floro-5-
 pirimidinkarboksilik asit (Abby Pharmatech, LLC'den satın alındı)
 kullanılarak yapıldı.

(e) N²-Asetil-3',5'-diaz-2'-florofolik asit di tert butilester sentezi

Sentez, örnek 5b)'de tarif edilen prosedür uygulanarak, ancak N-(6-amino-2-floronikotinoil)-L-glutamik asit-di tert butilester yerine N-(2-amino-4-floropirimidin-5-karbonil)-L-glutamik asit di tert butilester
5 kullanılarak yapıldı.

(f) 3',5'-diaz-2'-florofolik asit sentezi

Sentez, örnek 5c)'de tarif edilen prosedür uygulanarak, ancak N²-Asetil-3'-aza-2'-florofolik asit di tert butilester yerine N²-Asetil-3',5'-diaz-2'-florofolik asit di tert butilester kullanılarak yapıldı.
10

Örnek 6: Bölünme katsayısı

15 Log D_{7.4} belirlemesi için bir fosfat tamponu, su (1000 ml) içinde KH₂PO₄ (1.743 g, 12.81 mmol) ve Na₂HPO₄·2H₂O (9.596 g, 53.91 mmol) ihtiva eden bir çözelti yapılarak hazırlandı. N-oktanol içinde doymuş bir fosfat tamponu çözeltisi ve fosfat tamponu içinde doymuş bir n-oktanol çözeltisi hazırlandı. PBS çözeltisi (500 µl) ve n-oktanol
20 çözeltisi (500 µl), bir Eppendorf tüpü içine pipetlendi ve radyo-izleyici (5-10 µl) ilave edildi. Eppendorf tüpü, 15 dakika süreyle oda sıcaklığında bir üstten çalkalayıcı içinde çalkalandı. 5000 rpm'de 3 dakika süreyle santrifüj yapılarak iki faz ayrıldı. Her fazdan bir parça (50 µl), boş bir Eppendorf tüpüne, bir γ sayacında (Wizard,
25 PerkinElmer) sayılmak üzere aktarıldı. N-oktanol ve PBS fazındaki sayımların oranının logaritması hesaplanarak log D_{7.4} değeri belirlendi. Değerler, iki bağımsız deneyden yapılan 10 belirlemenin ortalamasını temsil eder.

LogD_{7.4} belirlemesi, [¹⁸F]-2'-floro-3'-aza-folik asidin hidrofilik özelliklerini ortaya koyar ve -4.2 ± 0.1 değeri ile sonuçlanır.

Ornek 7: Stabilite Deneyleri

5

(a) İnsan plazması stabilitesi

Radyo-izleyici, 4 saat süreyle 37°C'de insan kanı plazması içindeki stabilitesi açısından test edildi. Formüle edilen ürün (200 µL), sodyum fosfat tamponu (100 µl) ile seyreltildi ve bir parça (60 µl, 15 MBq), 37°C'de önceden inkübe edilmiş insan plazmasına (500 µL) ilave edildi. Karışım, bir Thermomixer compact (Eppendorf) üzerinde 37°C ve 500 rpm'de çalkalandı. Birkaç zaman noktasından (0, 30, 60, 120, 150 ve 240 dakika) sonra izleyici ilavesi sonrası parçalar alındı. Her parça (70 µl), buzla soğutulan MeOH'ye (150 µl) ilave edilerek proteinler çökteldi. Süpernatanı çökteldiden ayırmak için süspansiyon, 10 dakika süreyle 13400 rpm'de (Eppendorf MiniSpin) oda sıcaklığında santrifüjlendi. Süpernatan, bir mikro-filtreden (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Minisart RC 25, 0.45 µm) geçirildi ve radyo- UPLC sistemi üzerinde analiz edildi.

(b) Karaciğer Mikrozomları Kullanılarak Stabilite Deneyleri

KH₂PO₄/K₂HPO₄ tamponu (pH 7.4, 0.5 M, 200 µl), NADPH rejenerasyon sistemi A (50 µl), NADPH rejenerasyon sistemi B (10 µl), bir parça [¹⁸F]-3'-aza-2'-florofolik asit (38 µl, yakl. 15 MBq) ihtiva eden bir karışıma su (677 µl) ilave edildi ve 975 µl hacme kadar dolduruldu ve 37°C'de ön inkübe edildi. Sonra fare veya insan

karaciğeri mikrozomları (20 mg/ml, 25 µl) ilave edildi ve 37°C'de inkübe edildi. Birçok zaman noktasından (0, 20, 40 ve 60 dakika) sonra parçalar (100 µl) çekildi ve çözelti, buz soğukunda metanol (200 µl) içine dökülerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Her örnek, 5 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu (pH 7.4, 0.05 M, 600 µl) ile seyreltilti. Her zaman noktası, üçlü tekrarlar halinde yapıldı ve bir radyo-UPLC sistemi üzerinde analiz edildi. Negatif kontrol olarak örnekler, mikrozomlar olmadan veya NADPH rejenerasyon sistemi olmadan inkübe edildi.

10

Bir pozitif kontrol deneyi olarak radyoaktif izleyici yerine testosteron, reaksiyon karışımı ile inkübe edildi.

(c) Karaciğer Glutatyon Kullanılarak Stabilite Deneyleri

15

Glutatyon (0.1 M, 100 µl), S9 fraksiyonu (20 mg/ml, 50 µl) ve KH₂PO₄/K₂HPO₄ tamponu (pH 7.4, 0.5 M, 200 µl), su (612 µl) ile 772 µl hacme kadar seyreltilti ve [¹⁸F]-3'-aza-2'-florofolik asit (38 µl, yaklaşık 15 MBq) ilave edildi. Karışım, 37°C'de inkübe edildi. Birçok 20 zaman noktasında parçalar (100 µl) çekildi ve çözelti, buz soğukunda metanol (200 µl) içine dökülerek reaksiyon durduruldu. Her örnek, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ tamponu (pH 7.4, 0.05 M, 600 µl) ile seyreltilti. Her zaman noktası, ikili tekrarlar halinde yapıldı ve bir radyo-UPLC sistemi üzerinde analiz edildi.

25

Özet olarak araştırılan tüm zaman noktalarında HPLC analizi (1 saatlik bir süre üzerinden), sadece bozulmamış ürünün saptanması ile sonuçlandı, bu da radyo-deflorinasyonun veya metabolik proseslerin

meydana gelmediğini ve 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asidin araştırılan tüm süre boyunca tamamen stabil olduğunu gösterir (Şekil 2).

Örnek 8: İn Vitro İçselleşme Çalışmaları

5

KB hücreleri, bir gece süreyle büyütülmek üzere 12 oyuklu plakalara tohumlandı (2 ml FFRPMI ortamı/oyuk içinde $\square$ 700,000 hücre). Her oyuğa [¹⁸F]-3'-aza-2'-florofolik asit (25 μ L, 170 kBq) ilave edildi. Bazı durumlarda hücreler, fazla folik asit (100 μ M) ile inkübe edilerek

- 10 KB hücrelerinin yüzeyi üzerindeki FR'ler bloke edildi. 37°C'de 1 saat veya 2 saat süreyle inkübe edildikten sonra hücreler, üç kez PBS ile yıkanarak 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asidin toplam hücre alımı belirlendi. İçselleşmiş 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit fraksiyonunu değerlendirmek için KB hücreleri, bir soyma tamponu (0.1 M asetik
- 15 asit ve 0.15 M NaCl içeren sulu çözelti, pH 3) ile yıkanarak FR bağlı radyo-izleyici, hücre yüzeyinden bırakıldı. Her oyuğa 1 ml NaOH 1N ilave edilerek hücre lizizi gerçekleştirildi. Hücre süspansiyonları, 4 ml'lik tüplere aktarıldı ve örnekler, bir γ sayacında sayıldı. Vorteks ile homojenize edildikten sonra proteinlerin konsantrasyonu, her örnek
- 20 için bir Micro BCA Protein Deney kiti ile belirlenerek ölçülen radyoaktivite, tek bir oyukta 0.3 mg proteinlik ortalama içeriğe standardize edildi. Radyo-ürünün hücre alım çalışmaları, spesifik bir alım ve içselleşme gösterdi, çünkü bu fazla folik asit ile bloke edilebiliyordu. İki saat süreyle inkübe edildikten sonra alım, toplam
- 25 hücre alımının yaklaşık %78.17'si idi ve içselleştirilen fraksiyon, %18.56'dan sorumluydu. Fazla folik asidin birlikte inkübasyonu, radyo-izleyici alımının %0.03'lük inhibisyonu ile sonuçlandı (Şekil 5).

Ornek 9: Ex Vivo Metabolit Çalışmaları

Radyo-metabolitlerin in vivo belirlenmesi için 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit (60-70 MBq), KB tümör taşıyan farelere (n = 2) intravenöz yoldan enjekte edildi. 5 dakika sonra karşı venden kan örnekleri alındı ve hayvanlar, radyo-izleyici enjeksiyonundan 30 dakika sonra öldürüldü. Tam kan, karaciğer, tümör ve idrar toplandı. Kan örnekleri, 5000 g'de 4°C'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi. Plazma örneklerinin proteinleri, aynı hacimde buzla soğutulmuş metanol ilave edilerek, ardından santrifüjlenerek çökteldi. Plazma ve idrar örneğinin süpernatantları, PBS tamponu ile seyreltildi ve radyo-UPLC ile analiz edildi. Karaciğer ve tümör dokusu, eşit hacimde PBS içinde bir PT 1200 C Polytron (Kinematica AG) kullanılarak ayrı ayrı homojenize edildi. Aynı hacimde buzla soğutulmuş MeOH ilave edildikten sonra karışım, 5000 g'de 5 dakika süreyle 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatant, geri kalan proteinlerden buzla soğutulmuş metanol ilave edilerek, ardından santrifüjlenerek temizlendi. Elde edilen süpernatant fraksiyonları, PBS tamponu ile seyreltildi ve radyo-UPLC ile analiz edildi.

20

Plazma örneklerinin (5 dak ve 30 dak) ve ayrıca idrar ve tümör örneklerinin analizi, saptanabilen miktarlarda metabolit göstermedi. Buna karşılık karaciğer örneğinin analizi, metabolizma belirtileri gösterdi (Şekil 4).

25

Ornek 10: Folat Reseptörü Bağlanma Afinitesi

Radyoaktif olmayan referans bileşik 3'-aza-2'-florofolik asit ile

bağlanma deneyleri, PBS pH 7.4 içinde süspanse edilmiş KB tümör hücreleri (7'000 hücre/240 µL, Eppendorf tüpü başına) ile yapıldı. Hücreler, üç tekrar halinde ³H-florofolik asit (10 µL, 0.84 nM) ve artan konsantrasyonlarda 3'-aza-2'-florofolik asit (5.0×10^{-7} ila 5.0×10^{-12} M, 250 µL PBS pH 7.4 içinde) ile 4°C'de 30 dakika süreyle bir 5 çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Spesifik olmayan bağlanma, fazla folik asit (10^{-4} M) varlığında belirlendi. İnkübasyondan sonra hücre süspansiyonlarını ihtiva eden Eppendorf tüpleri, 4°C'de 5 dakika süreyle santrifüjlendi ve süpernatant çıkarıldı. 0.5 ml NaOH 1 M ilave 10 edilerek hücre peletleri lize edildi ve 5 ml sintilasyon kokteyli (Ultima Gold; Perkin Elmer) ihtiva eden sintilasyon tüplerine aktarıldı. Bir sıvı sintilasyon analiz cihazı (Tri-Carb 1900 TR, Packard) kullanılarak radyoaktivite ölçüldü ve %50'lik bir inhibitör konsantrasyonu, GraphPad Prism (versiyon 5.01) yazılımı kullanılarak yer değiştirme 15 eğrilerinden belirlendi.

Radyoaktif olmayan referans bileşik 3'-aza-2'-florofolik asidin FR bağlanma afinitesinin belirlenmesi, 0.81 ± 0.18 nM'lik bir IC₅₀ değeri ile sonuçlandı. Bu değer, doğal folik asit için belirlenen IC₅₀ değeri 20 (~0.9 nM) ile aynı aralıktadır, bu da folik asit türevi 3'-aza-2'-florofolik asidin bağlanma afinitesinin büyük ölçüde korunduğunu gösterir.

Örnek 11: Biyo-dağılım Çalışmaları

25

İn vivo deneyler, lokal veterinerlik departmanı tarafından onaylandı ve İsviçre hayvan koruma kanunlarına göre yürütüldü. Altı ila sekiz haftalık dişi, atimik nude fareler (CD-1 Foxn-1/nu), Charles River

Laboratories (Sulzfeld, Almanya)'dan satın alındı. Tümör hücresinin inokülasyonundan 5 gün önce başlanarak hayvanlara folat eksik bir kemirgen diyeti uygulandı. Fareler, her omzun subkütisine KB hücreleri (100 µL PBS içinde 5×10^6 hücre) ile inoküle edildi. Hayvan deneyleri, tümör hücresi inoküle edildikten yaklaşık 14 gün sonra yapıldı. Biyo-dağılım çalışmaları, üç tekrar halinde yapıldı. [^{18}F]-3'-aza-2'-florofolik asit, PBS pH 7.4 içinde arzu edilen radyoaktivite konsantrasyonuna (fare başına ~ 5 MBq) kadar, bir lateral kuyruk veni üzerinden hemen uygulanmak üzere seyreltildi. Bloklama çalışmaları, fazla florofolik asidin (100 µL PBS içinde 100 µg), 3'-aza-2'-[^{18}F] florofolik asit uygulanmadan hemen önce enjekte edilmesi suretiyle yapıldı.

Radyofolat 3'-aza-2'-[^{18}F]florofolik asit uygulandıktan 30 dakika, 60 dakika ve 190 dakika sonra hayvanlar öldürüldü. Seçilen dokular ve organlar toplandı, tartıldı ve bir γ sayacında radyoaktivite açısından sayıldı. Sonuçlar, doku ağırlığı gramı başına enjekte edilen doz yüzdesi [% ID/g] şeklinde, aynı zamanda sayılan orijinal enjektatın kesin bir örneğinden referans sayımlar kullanılarak listelendi.

20

Elde edilen veriler, Tablo 2'de özetlenir ve üç veya dört hayvandan ortalaması alınan, doku gramı başına enjekte edilen yüzdeyi [%ID/g] temsil eder (Tablo 2).

25

Tablo 2 KB tümör ksenograftları taşıyan nude farelerde [^{18}F]-3'-aza-2'-florofolik asit ([^{18}F]-3) biyo-dağılım deneyleri

Organ veya doku	30 dak p.i. (n = 4)	60 dak p.i. (n = 4)	90 dak p.i. (n = 4)	60 dak p.i. bloklama* (n = 3)
Şunlar içinde %ID/g:				
Kan	1.2 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.3
Kalp	2.1 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2
Akciğerler	2.0 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.3
Dalak	1.3 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.2
Karaciğer	13.7 $\pm$ 2.9	10.6 $\pm$ 0.9	10.3 $\pm$ 2.4	10.9 $\pm$ 3.4
Safra kesesi	8.1 $\pm$ 2.9	8.4 $\pm$ 1.8	9.3 $\pm$ 0.6	15.8 $\pm$ 9.3
Böbrekler	54.8 $\pm$ 6.1	53.6 $\pm$ 3.2	57.3 $\pm$ 8.4	5.9 $\pm$ 4.5
Mide	2.8 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.3
Bağırsak	1.4 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.6
Dışkı	1.2 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 2.0	1.8 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 1.1
Tükürük bezleri	9.0 $\pm$ 1.3	15.0 $\pm$ 6.1	14.1 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.2
Kemik	2.1 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3
Kas	1.7 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.1
Tümör	11.7 $\pm$ 0.9	11.9 $\pm$ 1.7	12.6 $\pm$ 1.8	1.7 $\pm$ 0.4
Oranlar:				
Tümör/Karaciğer	0.9 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.1
Tümör/Böbrekler	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2
Tümör/Kan	11.1 $\pm$ 4.1	21.6 $\pm$ 2.3	23.8 $\pm$ 4.1	2.2 $\pm$ 0.3
*Bloklama grubunda her hayvan, radyo-izleyici enjeksiyonundan 10 dakika önce PBS içinde 100 μg folik asit aldı.				

5 Örnek 12: PET Görüntüleme Çalışmaları

PET deneyleri, bir eXplore VISTA PET/CT tomografi (GE) ile yapıldı. Tümör taşıyan farelere, 10-18 MBq 3'-aza-2'-[^{18}F]florofolik asit (enjeksiyon başına 100-150 μl) lateral kuyruk veni üzerinden enjekte edildi. Bloklama çalışmaları için hayvanlar, radyo-izleyici enjeksiyonundan 10 dakika önce intravenöz enjeksiyon yoluyla fazla folik asit (100 μl içinde 100 μg) aldı. Hayvanlara, bir hava/oksijen karışımı içinde izofluran ile anestezi uygulandı. PET taramaları, 120-

150 dak p.i.'den alındı. Alım sonrası PET verileri, kullanıcı tarafından tanımlanan zaman çerçevelerinde yeniden yapılandırıldı. PET ve CT'nin birleştirilen veri setleri, PMOD (versiyon 3.2) yazılımı ile analiz edildi.

5

Farelerin 1.5 - 90 dak p.i., 3'-aza-2'-[¹⁸F]florofolik asit ve 60 - 150 dak p.i. dinamik PET taramaları yapıldı. [¹⁸F]-2'3'-aza-folik asidin statik PET taramaları tipik olarak 120 - 150 dak p.i. tarama süresi ile yapıldı. Örnek sonuçlar, Şekil 6A/B ve 7'de gösterilir. Statik taban çizgisi taraması (120 - 150 dak p.i.), KB tümör ksenograftlarında yüksek (SUV 1.9) ve spesifik alım (%12.6±1.8 ID/g) gösterdi (Şekil 6A ve 7A). Hedef olmayan diğer organlarda alım göz ardı edilebilirdi, istisnalar, karaciğer, böbrekler ve tükürük bezleri idi. Birlikte enjekte edilen folik asit (120 - 150 dak p.i.) ile yapılan çalışmalar, tümör dokusunda ve böbreklerde azalan radyo-izleyici alımı gösterdi (Şekil 6B).

PBS (100 µl) içinde pemetreksed (400 µg, radyo-izleyiciden 60 dakika önce) ön enjeksiyonu, radyo-izleyicinin böbrek alımında azalma ve karaciğerde birikmede çok güçlü bir azalma gösterirken yüksek tümör alımı muhafaza edildi (Şekil 7B).

ŞEKİLLERDEKİ YAZILARIN ANLAMLARI

ŞEKİL 1A

A = 1.) dehidre edici ajan (örn. moleküler elekler veya $\text{Si}(\text{OEt})_4$

5 2. $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$

AcOH ve/veya CH_3CN

B = birleştirici reaktif madde

ŞEKİL 1B

10 C = 1.) dehidre edici ajan (örn. moleküler elekler veya $\text{Si}(\text{OEt})_4$

2. $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$

ŞEKİL 1C

D = $(\text{X})_n$ = elektron çeken grup, n = 1,2

15

ŞEKİL 2

E = yoğunluk/mV

F = kalite kontrol

G = Zaman / dakika

20 H = insan plazması, 4 saat

I = fare mikrozomları, 1 saat

J = insan glutatyon, 1 saat

K = insan mikrozomları, 1 saat

25 **ŞEKİL 3**

L = radyo

ŞEKİL 4

M = kan, 5 dak, p.i.

N = kan, 30 dak, p.i.

O = tümör, 30 dak, p.i.

P = idrar, 30 dak, p.i.

5 R = karaciğer, 30 dak, p.i.

ŞEKİL 5

S = Hücre alım %'si

0.3mg protein başına

10 T = saat

U = İnkübasyon süresi

V = Alım

Y = İçselleştirme

Z = Bloklama

15

20

25

TARİFNAME İÇERİSİNDE ATIF YAPILAN REFERANSLAR

Başvuru sahibi tarafından atıf yapılan referanslara ilişkin bu liste, yalnızca okuyucunun yardımı içindir ve Avrupa Patent Belgesinin bir kısmını oluşturmaz. Her ne kadar referansların derlenmesine büyük önem verilmiş olsa da, hatalar veya eksiklikler engellenememektedir ve EPO bu bağlamda hiçbir sorumluluk kabul etmemektedir.

Tarifname içerisinde atıfta bulunulan patent dökümanları:

- WO 2008125618 A [0008]
- WO 2006071754 A [0009]
- WO 2008098112 A [0009]
- WO 2008125613 A [0009]
- WO 2008125615 A [0009]
- WO 2008125617 A [0009]
- WO 2010040854 A [0009]

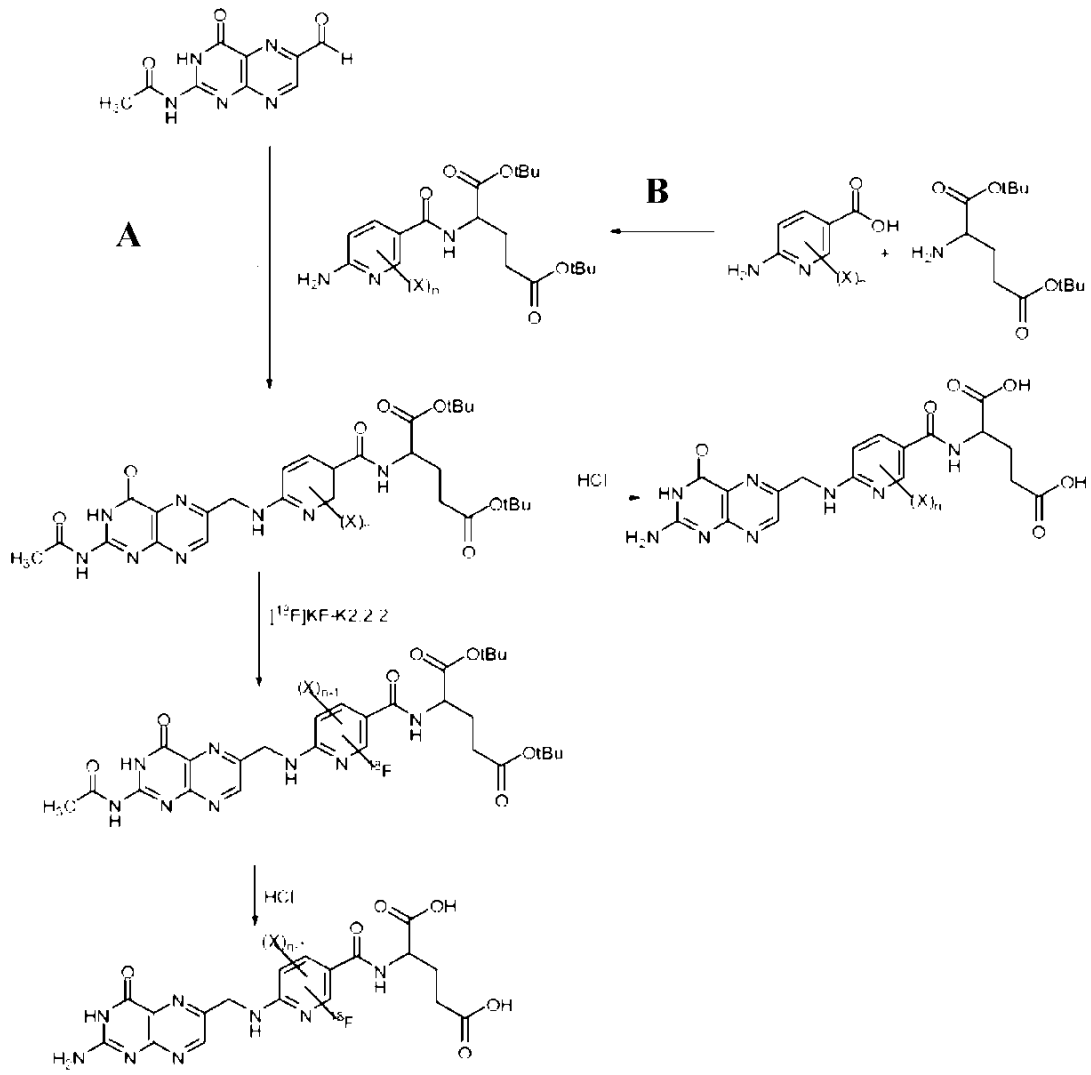
Tarifnamede belirtilen patentleştirilmemiş literatür:

10

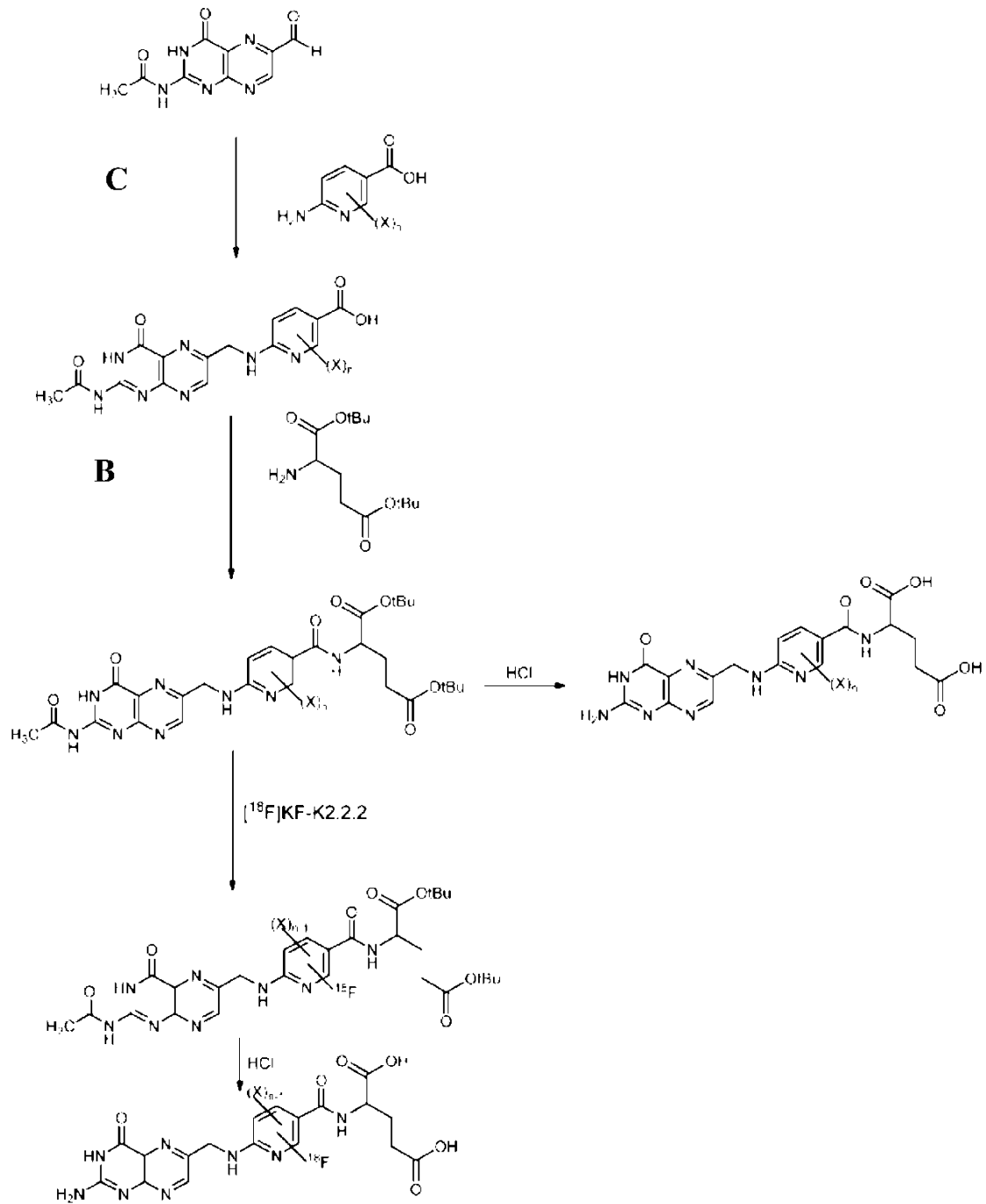
- **LOW.** Acc Chem Res., 2008, vol. 41, 120-9 [0003]
- **PARKER et al.** Anal. Biochem., 2005, vol. 2, 284-293 [0003]
- **ELNAKAT ; RATNAM.** Adv. Drug Deliv. Rev., 2004, vol. 56, 1067-84 [0003]
- **NAKASHIMA-MATSUSHITA et al.** Arthritis & Rheumatism, 1999, vol. 42 (8), 1609-16 [0003]
- **PAULOS et al.** Adv. Drug Deliv. Rev., 2004, vol. 56, 1205-17 [0003]
- **PISCAER et al.** Arthritis & Rheumatism, 2011, vol. 63, 1898 [0003]
- **HENNE et al.** Mol Pharm, 2012, vol. 9, 1435-40 [0003]
- **AYALA-LOPEZ et al.** J Nucl Med, 2010, vol. 51, 768 [0003]
- **HANSEN M.J et al.** Targeted Drug Strategies for Cancer and Inflammation. Springer Science + Business Media, 2011, 181-193 [0003]
- **KURAHARA H. et al.** Ann Surg
- **LEAMON; LOW.** Drug Discov. Today, 2001, vol. 6, 44-51 [0006]
- **JAMMAZ et al.** J. Label Compd. Radiopharm., 2006, vol. 49, 125-137 [0006]
- **MULLER ; SCHIBLI.** J. Nucl. Med., 2011, vol. 52, 1 [0006]
- **MULLER.** Current Pharm Design, 2012 [0006]
- **LEAMON; REDDY.** Adv. Drug Deliv. Rev., 2004, vol. 56, 1127-41 [0006]
- **LEAMON et al.** Bioconjugate Chem., 2005, vol. 16, 803-11 [0006]
- **WARD et al.** J. Drug Target., 2000, vol. 8, 119-23 [0006]
- **LEAMON et al.** J. Biol. Chem., 1993, vol. 268, 24847-54 [0006]
- **LEAMON; LOW.** J. Drug Target., 1994, vol. 2, 101-12 [0006]
- **LI et al.** Pharm. Res., 1998, vol. 15, 1540-45 [0006]
- **ZHAO; LEE.** Adv. Drug Deliv., 2004, vol. 56, 1193-204 [0006]
- **LEE; LOW.** Biochim. Biophys. Acta-

- Oncol., 16 February 2012 [0003]
- **NAGAI T. et al.** Cancer Immunol Immunother, 2009, 581577-1586 [0003]
 - **PUIG-KROEGER A. et al.** Cancer Res, 15 December 2009, vol. 69 (24) [0003]
 - **TURK M. J. et al.** Cancer Letters, 2004, vol. 213, 165-172 [0003]
 - **QIU et al.** Cell, 01 December 2006, vol. 127 (5), 917-28 [0004]
 - **ZHAO et al.** Expert Rev Mol Med., 28 January 2009, vol. 11, e4 [0004]
 - **HELMLINGER et al.** Nat Med., February 1997, vol. 3 (2), 177-82 [0004]
 - **RAGHUNAND et al.** Biochem Pharmacol., 01 February 1999, vol. 57 (3), 309-12 [0004]
 - **ZHAO et al.** Clin Cancer Res., 15 January 2004, vol.10 (2), 718-27 [0004]
 - **KUGEL DESMOULIN et al.** Am Assoc Cancer Res, vol. 51, 1103 [0004]
 - **ZHAO et al.** Mol Pharmacol., September 2008, vol. 74 (3), 854-62 [0004]
 - Biomembr., 1995, vol. 1233, 134-44 [0006]
 - **GABIZON et al.** Adv. Drug Deliv. Rev., 2004, vol. 56, 1177-92 [0006]
 - **KONDA et al.** Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med., 2001, vol. 12, 104-13 [0006]
 - **SIEGEL et al.** J. Nucl. Med., 2003, vol. 44, 700 [0008]
 - **MULLER et al.** J. Organomet. Chem., 2004, vol. 689, 4712 [0008]
 - **MATHIAS et al.** Nucl. Med. Biol., 2003, vol. 30 (7), 725 [0008]
 - **MULLER et al.** Nucl. Med. & Biol., 2011, vol. 38, 715 [0008]
 - **BETTIO et al.** J. Nucl. Med., 2006, vol. 47 (7), 1153 [0009]
 - **ROSS et al.** J Nucl. Med., 2010, vol. 51, 1756 [0009]
 - **FISCHER et al.** Bioconjug. Chem., 2012 [0009]
 - **BETZEL et al.** Bioconj. Chem., 2013, vol. 24, 205-214 [0078]

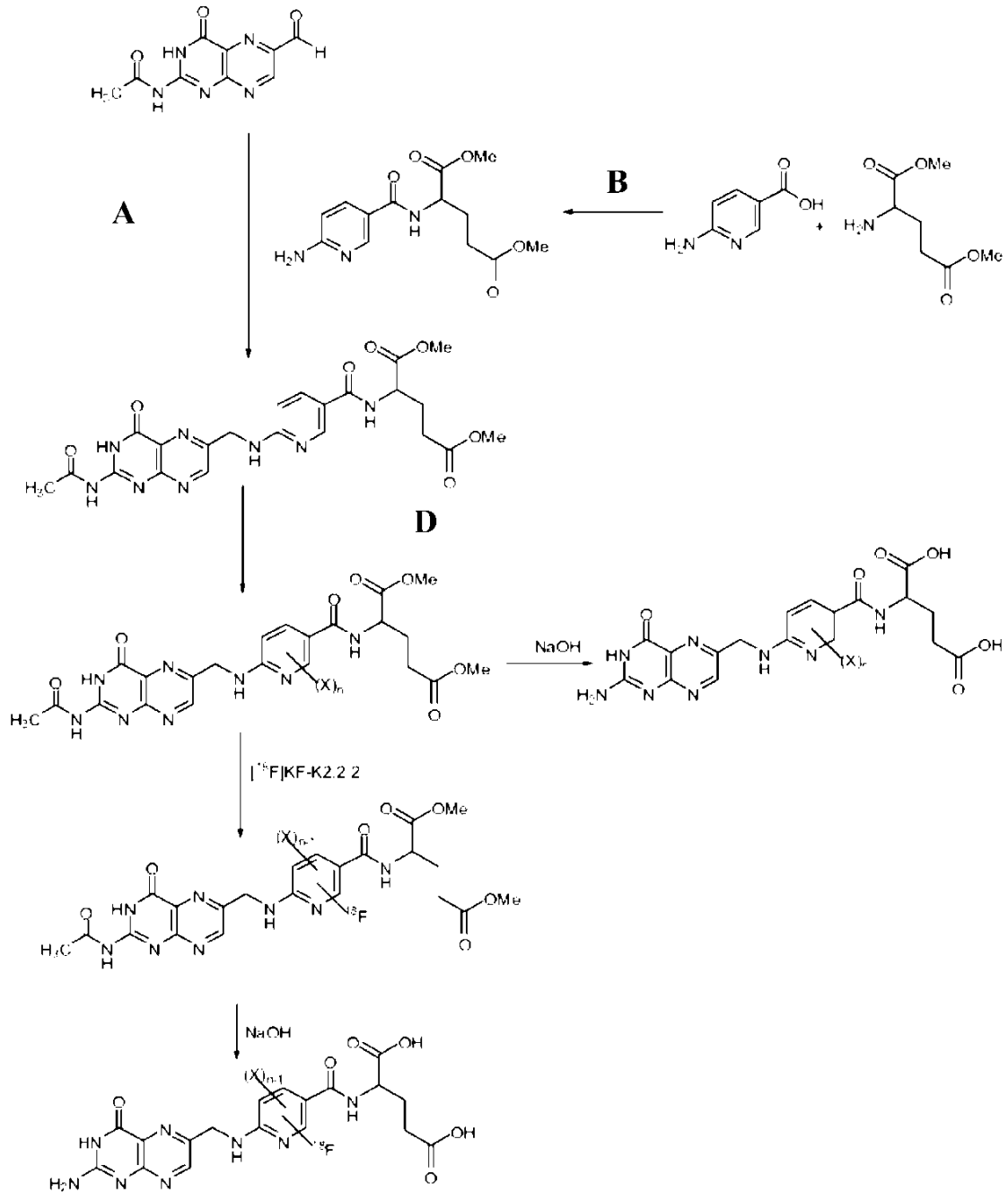
ŞEKİL 1A



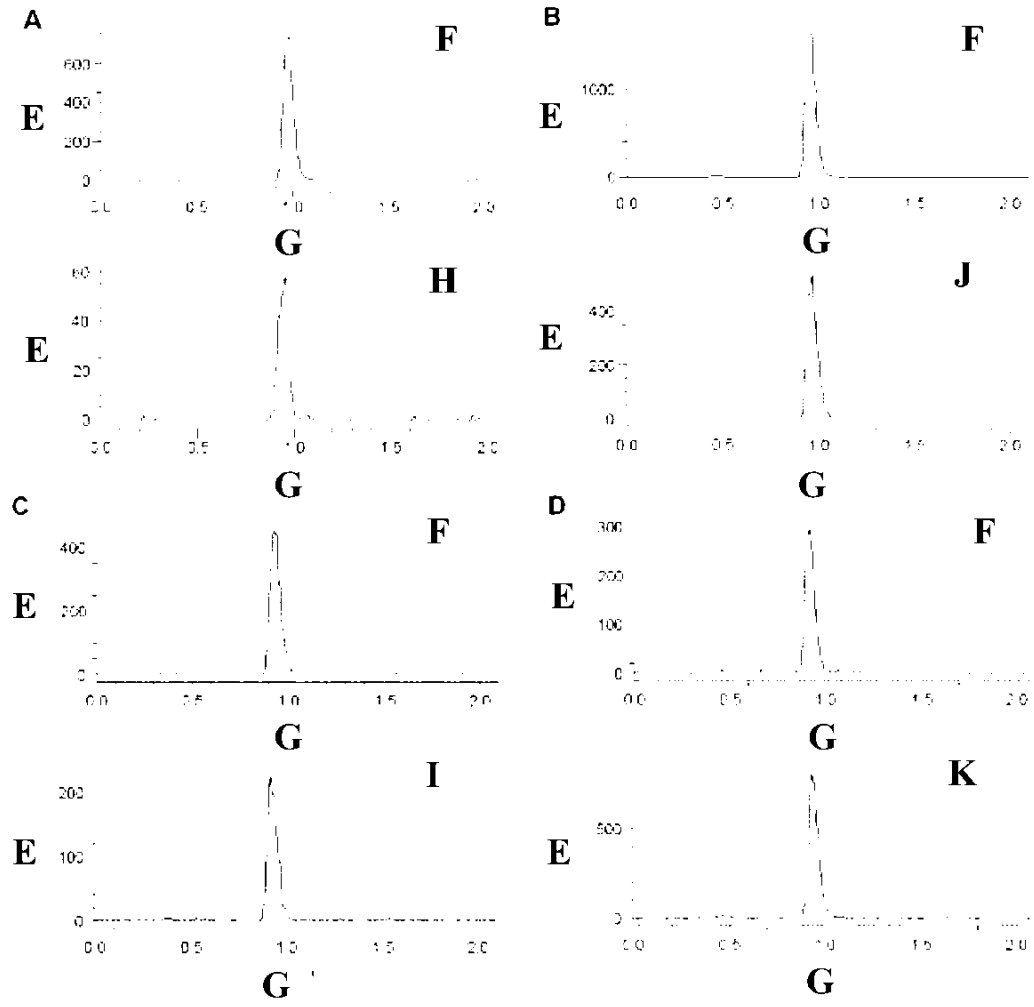
ŞEKİL 1B



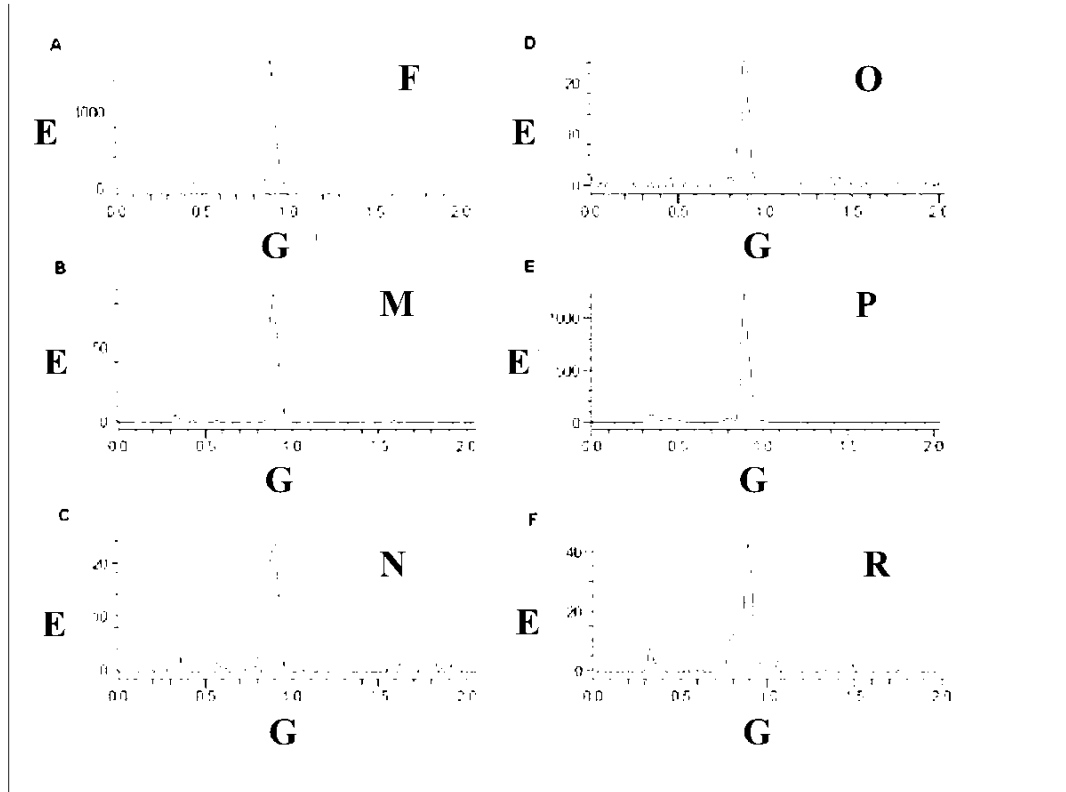
ŞEKİL 1C



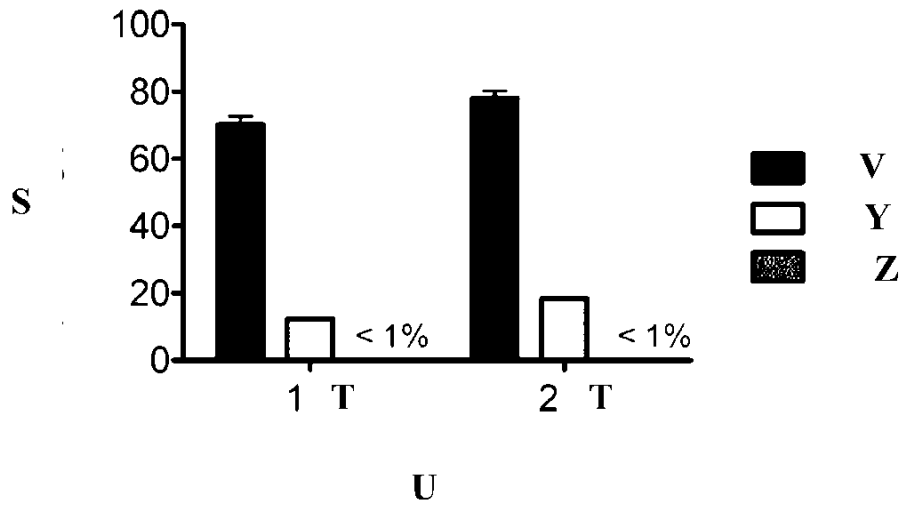
ŞEKİL 2



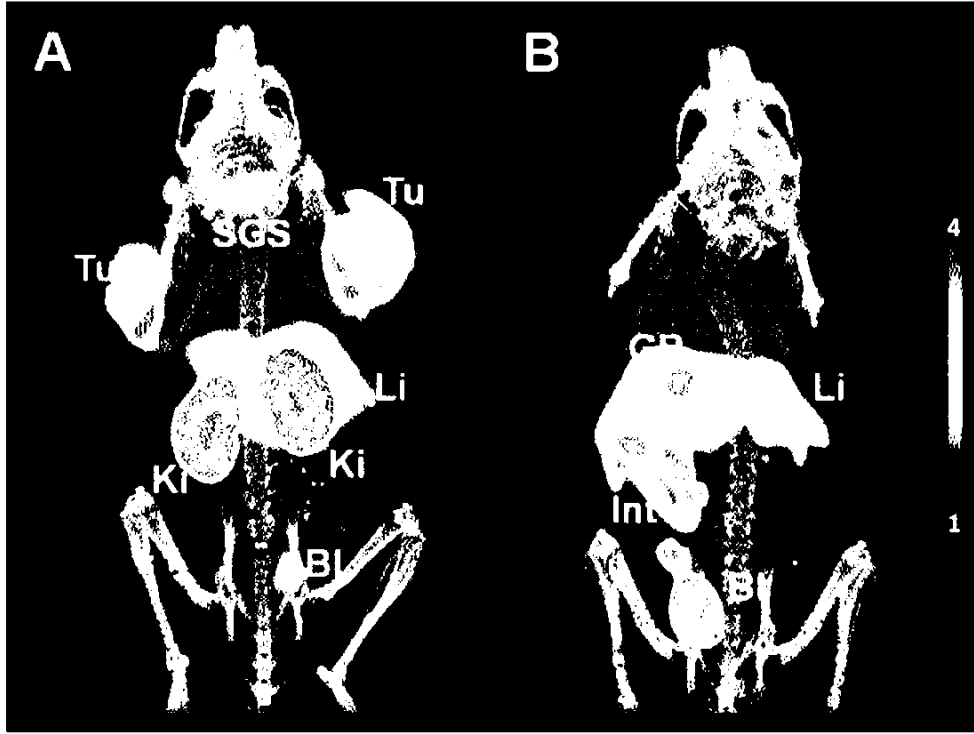
ŞEKİL 4



ŞEKİL 5



ŞEKİL 6



ŞEKİL 7

