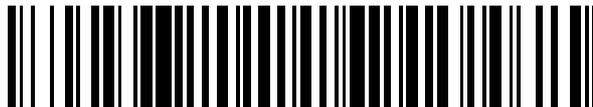


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 293**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2008 E 08831942 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2200658**

54 Título: **Sondas para tomografía de emisión de positrones para generación de imágenes de activación inmune y cánceres seleccionados**

30 Prioridad:

**19.09.2007 US 960183 P**  
**04.04.2008 US 64963**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.02.2015**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)**  
**1111 Franklin Street, 12th Floor**  
**Oakland, CA 94607 , US**

72 Inventor/es:

**RADU, CAIUS G.;**  
**WITTE, OWEN N.;**  
**NAIR-GILL, EVAN DAVID;**  
**SATYAMURTHY, NAGICHETTIAR;**  
**SHU, CHENGYI J. y**  
**CZERNIN, JOHANNES**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 529 293 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Sondas para tomografía de emisión de positrones para generación de imágenes de activación inmune y cánceres seleccionados.

Antecedentes de la invención

5 El advenimiento de las metodologías de imágenes moleculares tales como la Tomografía de Emisión de Positrones (PET) ha permitido medición de mecanismos moleculares y celulares a lo largo del cuerpo en disposiciones preclínicas y clínicas. Tales mediciones tienen una utilidad diagnóstica amplia y su uso para la evaluación de respuestas al tratamiento y para ayudar en el desarrollo de fármacos se está expandiendo rápidamente. Estudios recientes en ratones han documentado la factibilidad de utilizar PET para visualizar respuestas inmunes. Nosotros y otros hemos demostrado que la inmunidad de células T antitumorales pueden ser monitorizadas utilizando imágenes de genes reportadores en PET. Metodologías similares pueden permitir la evaluación del tráfico de células T expandiendo así su uso en pacientes que están experimentando inmunoterapia contra el cáncer. No obstante el desarrollo de sondas novedosas que permiten las mediciones directas de la función inmune ampliaría significativamente la utilidad de las imágenes por PET. Diversos receptores de la superficie celular y enzimas intracelulares pueden ser convertidos en imágenes potencialmente por PET utilizando sondas especializadas. Recientemente, en un modelo de ratón de desmielinización autoinmune, demostramos que una sonda para glicólisis denominada [<sup>18</sup>F]fluorodesoxiglucosa ([<sup>18</sup>F]FDG) permite la monitorización basada en PET de la aparición de enfermedades a través de la distribución de la sonda en órganos y de una terapia inmunosupresora. Sin embargo, la [<sup>18</sup>F]FDG se acumula en tejidos no linfoides incluyendo el corazón, el cerebro y el hígado. Esta invención se relaciona con el desarrollo de sondas novedosas como se define en las reivindicaciones.

Alauddin et al. (Nucl Med Biol., 2007, 34(3): 267-272; J Label Compd Radiopharm., 2003, 46: 805-814) divulga la síntesis de análogos de la adenina [18F]-FAA y [18F]-FXA y su uso como agentes para imágenes PET. Alauddin et al. (Label Compd Radiopharm., 20023, 45: 583-590; Label Compd Radiopharm., 2003, 46: 285-289) describe adicionalmente nucleósidos de uracilo, en particular nucleósidos sustituidos 2'-desoxi-2'-[18F]fluoro-1-β-D-arabinofuranosiluracil.

Visser et al. (Appl. Radiat Isot., 1986, 37(10): 1074-1076, Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part A; Eur J Nucl Med., 1986, 12: 137-140) divulga la síntesis de [18F]5-fluoro citosina, y su posible uso como sonda para PET.

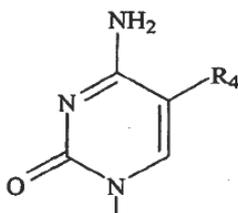
Resumen

30 En una realización de acuerdo con la invención, una sonda para PET incluye un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula IA y/o la Fórmula IB,



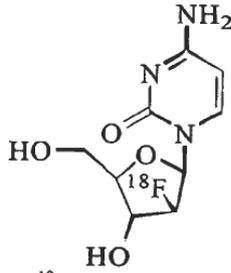
Fórmula IA

Fórmula IB.

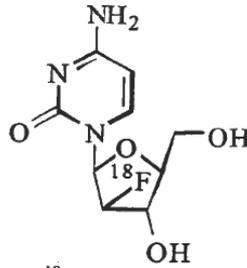


y R<sub>1</sub> puede ser OH o flúor, R<sub>2</sub> puede ser hidrógeno o flúor, R<sub>3</sub> puede ser flúor, R<sub>4</sub> puede ser H, F, Cl, Br, CH<sub>3</sub>, o C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, y uno o más de R<sub>1</sub>, y R<sub>3</sub> es <sup>18</sup>F, R<sub>6</sub> es H.

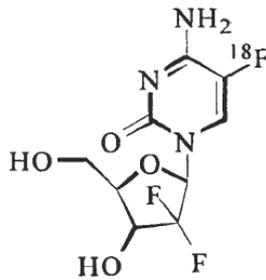
R<sub>2</sub> y R<sub>5</sub> pueden ser radioisótopos no diferentes a los que se encuentran en una proporción natural. Algunos ejemplos de sondas PET de acuerdo con la invención incluye los siguientes:



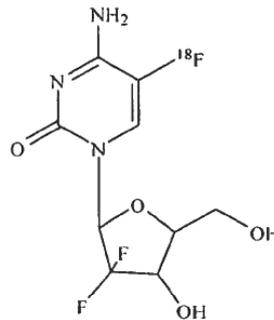
[<sup>18</sup>F]D-FAC  
 {D-<sup>18</sup>F-FAC; 2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -β-D-arabinofuranosilcitosina}



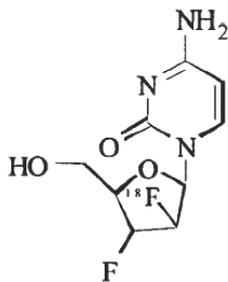
[<sup>18</sup>F]L-FAC  
 {L-<sup>18</sup>F-FAC; 2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -β-L-arabinofuranosilcitosina}



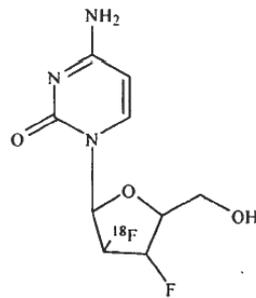
Compuesto D #5  
 {2',2'-desoxi-2',2'-difluoro  
 β-D-arabinofuranosil  
 -5-[<sup>18</sup>F] fluorocitosina;  
 isómero de 5-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -2',2'-difluorodesoxicitidina}



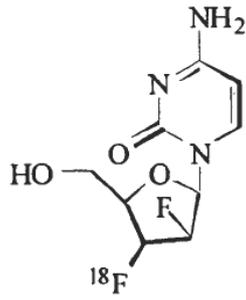
Compuesto L #5  
 {2',2'-desoxi-2',2'-difluoro  
 β-L-arabinofuranosil  
 -5-[<sup>18</sup>F] fluorocitosina;  
 isómero de 5-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -2',2'-difluorodesoxicitidina}



Compuesto D #6  
 {2',3'-difluoro-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -3'-fluoro-β-D-arabinofuranosilcitosina}

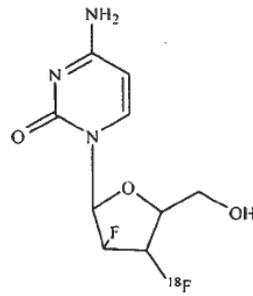


Compuesto L #6  
 {2',3'-difluoro-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -3'-fluoro-β-L-arabinofuranosilcitosina}



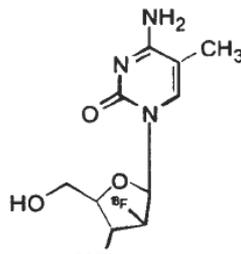
**Compuesto D #7**

{2',3'-didesoxi-2'-fluoro-3'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
-β-D-arabinofuranosilcitosina}



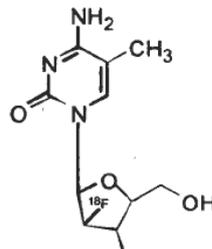
**Compuesto L #7**

{2',3'-didesoxi-2'-fluoro-3'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
-β-L-arabinofuranosilcitosina}



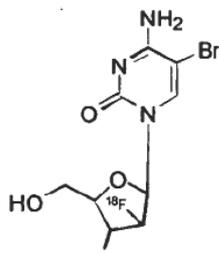
**D-<sup>18</sup>F-FMAC**

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-metil  
-β-D-arabinofuranosilcitosina}



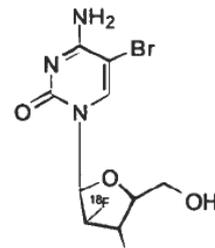
**L-<sup>18</sup>F-FMAC**

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-metil  
-β-L-arabinofuranosilcitosina}



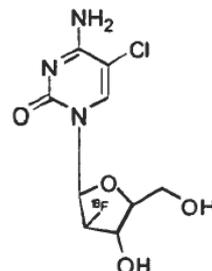
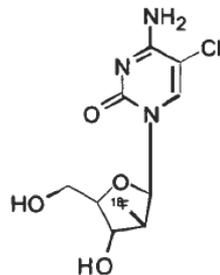
**D-<sup>18</sup>F-FBAC**

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-bromo  
-β-D-arabinofuranosilcitosina}



**L-<sup>18</sup>F-FBAC**

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-bromo  
-β-L-arabinofuranosilcitosina}



Como es evidente para una persona de experiencia en el arte, además del compuesto, la sonda de PET puede incluir uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Una persona de experiencia normal en la técnica será capaz de seleccionar vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados con base en una aplicación prevista.

5 Por ejemplo, la sonda para PET puede ser un sustrato de dCK. Por ejemplo, la sonda de PET puede ser resistente a la desaminación, por ejemplo, resistente a la desaminación por citidina desaminasa (CDA). Por ejemplo, la sonda para PET resistente a la desaminación puede ser [<sup>18</sup>F]L-FAC, [<sup>18</sup>F]L-FBAC, [<sup>18</sup>F]L-FCAC, [<sup>18</sup>F]L-FFAC, y [<sup>18</sup>F]L-FMAC.

10 Por ejemplo, la sonda para PET puede ser utilizada en el diagnóstico y tratamiento de una condición seleccionada del grupo consistente de artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes tipo I, EAE (encefalomielitis autoinmune experimental), esclerosis múltiple, aterosclerosis, un trastorno autoinmune, y cáncer. Por ejemplo, la sonda para PET puede ser utilizada para evaluar la eficacia en el tratamiento del cáncer de agentes anticáncer que son consumidos por las células a través de transportadores de nucleósidos y fosforilación mediada por desoxicitidina quinasa (dCK).

15 Un método para sintetizar una sonda para PET de acuerdo con la invención, puede incluir lo siguiente. 2-O-[(trifluorometil) sulfonil]-1,3,5-tri-O-benzoil-α-D-ribofuranosa (un isómero de 5-benzoiloximetil-4,2-benzoiloxi-3-trifluorometilsulfonatofuran) puede hacerse reaccionar con [<sup>18</sup>F]fluoride ion. 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1,3,5-tri-O-benzoil-α-D-arabinofuranosa (un isómero de 5-benzoiloximetil-4,2-benzoiloxi-3-[<sup>18</sup>F]fluorofuran) puede hacerse reaccionar con bromuro de hidrógeno. El 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-α-D-arabinofuranosil bromuro (un isómero de 5-benzoiloximetil-4-benzoiloxi-3-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-bromofuran) puede hacerse reaccionar con 4-N-(trimetilsilil)-2-O-(trimetilsilil)pirimidina-4-amina (esto es, N-(trimetilsilil)-2-((trimetilsilil)oxi)pirimidin-4-amina). Y, 1-(2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-β-D-arabinofuranosil) citosina (un isómero de 1-(4-benzoiloximetil-3-benzoiloxi-2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoroarabinofuranosil)citosina) puede hacerse reaccionar con un alcóxido para formar la sonda para PET. El alcóxido puede ser, por ejemplo, un metóxido alcalino, por ejemplo, metóxido de sodio.

25 Un método para sintetizar una sonda para PET de acuerdo con la invención puede incluir lo siguiente. 2-O-[(Trifluorometil) sulfonil]-1,3,5-tri-O-benzoil-α-L-ribofuranosa puede hacerse reaccionar con ión [<sup>18</sup>F]fluoruro para formar 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1,3,5-tri-O-benzoil-α-L-arabinofuranosa como un primer intermediario radiomarcado. El primer intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con bromuro de hidrógeno para formar 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-α-L-arabinofuranosil bromuro, como un segundo intermediario radiomarcado. El segundo intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con 4-N-(trimetilsilil)-2-O-(trimetilsilil) pirimidina-4-amina para formar 1-(2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-β-L-arabinofuranosil)citosina en forma de un tercer intermediario radiomarcado. El tercer intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con un alcóxido para formar la sonda para PET [<sup>18</sup>F]L-FAC.

35 La 2-O-[(Trifluorometil)sulfonil]-1,3,5-tri-O-benzoil-α-D-ribofuranosa puede hacerse reaccionar con el ión [<sup>18</sup>F]fluoruro para formar 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1,3,5-tri-O-benzoil-α-D-arabinofuranosa como un primer intermediario radiomarcado. El primer intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con bromuro de hidrógeno para formar 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-α-D-arabinofuranosil bromuro en forma de un segundo intermediario radiomarcado. El segundo intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con 5-(alquilo inferior)-4-N-(trimetilsilil)-2-O-(trimetilsilil)pirimidina-4-amina para formar 5-(alquilo inferior)-1-(2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-β-D-arabinofuranosil)citosina como un tercer intermediario radiomarcado. Y el tercer intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con un alcóxido para formar la sonda para PET [<sup>18</sup>F]D-FRAC 5-(alquilo inferior)-1-(2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-β-D-arabinofuranosil)citosina. Por ejemplo, un alquilo inferior puede ser un alquilo que tiene de 1 a 6 carbonos. Por ejemplo, el alquilo inferior puede ser metilo, de tal manera que la sonda para PET sintetizada es [<sup>18</sup>F]D-FMAC.

45 La 2-O-[(Trifluorometil)sulfonil]-1,3,5-tri-O-benzoil-α-L-ribofuranosa puede hacerse reaccionar con el ión [<sup>18</sup>F]fluoruro para formar la 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1,3,5-tri-O-benzoil-α-L-arabinofuranosa como un primer intermediario radiomarcado. El primer intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con bromuro de hidrógeno para formar 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-α-L-arabinofuranosil bromuro como un segundo intermediario radiomarcado. El segundo intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con 5-(alquilo inferior)-4-N-(trimetilsilil)-2-O-(trimetilsilil)pirimidina-4-amina para formar 5-(alquilo inferior)-1-(2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil-β-L-arabinofuranosil)citosina como un tercer intermediario radiomarcado. Y el tercer intermediario radiomarcado puede hacerse reaccionar con un alcóxido para formar la sonda para PET [<sup>18</sup>F]L-FRAC 5-(alquilo inferior)-1-(2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-β-L-arabinofuranosil) citosina. Por ejemplo, un alquilo inferior puede ser un alquilo que tiene de 1 a 6 carbonos. Por ejemplo, el alquilo inferior puede ser metilo, de tal manera que la sonda para PET sintetizada es [<sup>18</sup>F]L-FMAC.

Un método para imágenes puede incluir lo siguiente. Una sonda para PET puede ser puesta en contacto con material biológico. Las imágenes por PET pueden ser utilizadas para determinar una concentración local de la sonda de PET en el material biológico. Y la concentración local de la sonda de PET puede ser relacionada con una respuesta inmune local. La respuesta inmune local puede ser la acumulación de linfocitos T activados, y los linfocitos

T activados pueden consumir más sonda de PET por célula que los linfocitos T no activados. Una cantidad de una sonda para PET, por ejemplo, [<sup>18</sup>F]D-FAC puede ser administrada a un animal o humano. Por ejemplo, la sonda para PET puede ser un sustrato para dCK y/o resistente a la desaminación por una enzima, por ejemplo, citidina desaminasa (CDA).

5 Las imágenes por PET pueden ser utilizadas para determinar una concentración local de la sonda de PET en un animal o humano, y la concentración local de la sonda de PET puede ser relacionada con una respuesta inmune local o un tejido neoplástico. Por ejemplo, la concentración local de la sonda para PET puede ser relacionada con actividad anormal en un órgano o porción del sistema linfático, por ejemplo, un nódulo linfático o en el bazo. Por ejemplo, la concentración local de la sonda para PET puede ser correlacionada con una lesión por linfoma o con una enfermedad linfóide maligna. El animal o humano puede tener una condición tal como cáncer, linfadenopatía, melanoma, leucemia, glioma, un trastorno autoinmune, un trastorno del desarrollo, infección viral, infección bacteriana, infección por parásitos, infección, una enfermedad metabólica, inflamación, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes tipo I, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), esclerosis múltiple y/o aterosclerosis. La sonda para PET puede ser utilizada en el diagnóstico y/o tratamiento de tal condición. El animal o humano puede estar experimentando una terapia tal como inmunoterapia contra el cáncer, inmunoterapia, terapia por interferón, vacuna, terapia por radiación, quimioterapia y/o terapia con antibióticos. Por ejemplo, la concentración local de la sonda para PET puede ser utilizada para diagnosticar cáncer y/o monitorizar el tratamiento contra el cáncer.

20 Un método por imágenes puede incluir lo siguiente. Una sonda para PET que es un sustrato de dCK resistente a la desaminación puede ser puesta en contacto con un material biológico. Por ejemplo, la sonda para la PET puede ser un análogo de la citosina. Las imágenes por PET pueden ser utilizadas para determinar una concentración local de la sonda para PET en el material biológico. La concentración local de la sonda para PET puede ser correlacionada con una respuesta inmune local o un tejido neoplástico.

25 La sonda para PET puede ser utilizada para diagnosticar, tratar y/o monitorizar el tratamiento de una condición, tal como cáncer, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, diabetes tipo I, EAE, esclerosis múltiple, y aterosclerosis. La sonda para PET puede ser utilizada para evaluar la eficacia en el tratamiento del cáncer de un agente anticanceroso, por ejemplo, citarabina o 2'-difluorodesoxicitidina, que es tomada por las células a través de los transportadores de nucleósidos y la fosforilación mediada por desoxicitidina quinasa (dCK).

30 Un método para predecir la resistencia a un profármaco oncolítico puede incluir lo siguiente. Una sonda para PET, por ejemplo, [<sup>18</sup>F]D-FAC, [<sup>18</sup>F]L-FAC, [<sup>18</sup>F]D-FFAC, [<sup>18</sup>F]L-FFAC, [<sup>18</sup>F]D-FCAC, [<sup>18</sup>F]L-FCAC, [<sup>18</sup>F]D-FBAC, [<sup>18</sup>F]L-FBAC, [<sup>18</sup>F]DFMAC, [<sup>18</sup>F]L-FMAC, puede ser puesto en contacto con un neoplasma. Por ejemplo, las células en el neoplasma pueden ser células de leucemia, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, fase explosiva de leucemia mielocítica crónica, leucemia meningeal, cáncer de páncreas, cáncer de ovarios, cáncer de seno, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia de células vellosas, leucemia linfoblástica aguda reincidente, o leucemia linfoblástica aguda refractaria. Por ejemplo, las células neoplásticas representativas que expresan dCK pueden ser células de leucemia murínica L1210 y las células neoplásticas representativas que no expresan dCK pueden ser células de leucemia murínica L1210-10K. Las imágenes del PET pueden ser utilizadas para determinar una concentración local de la sonda para PET en el neoplasma. La concentración local de la sonda para PET puede ser comparada con un nivel de línea base. Una concentración local de la sonda para PET sustancialmente inferior al nivel de la línea base puede ser correlacionada con una expresión baja de dCK del neoplasma. Una expresión baja de dCK del neoplasma puede ser correlacionada con una resistencia análoga a nucleósidos oncolíticos. El nivel de línea base puede corresponder, por ejemplo, a la medida de la concentración de la sonda para PET en células neoplásticas representativas que expresan dCK y la concentración de la sonda para PET en células neoplásticas representativas que no expresan dCK. Por ejemplo, el profármaco oncolítico puede ser citosina arabinosido (Ara-C), fludarabina, cladribina, clofarabina, o gemcitabina.

En una realización de acuerdo con la invención, una sonda para PET es un sustrato de dCK resistente a la desaminación por un enzima, por ejemplo, la citidina desaminasa (CDA). Por ejemplo, la sonda para PET puede ser [<sup>18</sup>F]L-FAC, [<sup>18</sup>F]L-FBAC, [<sup>18</sup>F]LFCAC, [<sup>18</sup>F]L-FFAC, [<sup>18</sup>F]L-FMAC.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 es un diagrama que muestra la identificación de análogos de la desoxicitidina fluorados retenidos en linfocitos T activados versus ingenuos e incorporados en ADN. La figura 1A muestra la retención intracelular relativa de varios análogos de desoxicitidina; la figura 1B muestra la estructura química de los compuestos dFdC y D-FAC; la figura 1C muestra la retención de [<sup>3</sup>H]dFdC y [<sup>3</sup>H]D-FAC por las células CD8+T de ratón activadas; la figura 1D muestra el consumo de [<sup>3</sup>H]DFAC por células; y la figura 1E muestra la incorporación de [<sup>3</sup>H]D-FAC en el ADN de las células T proliferantes.

La figura 2A representa las estructuras químicas de 15 compuestos de acuerdo con las realizaciones de la invención.

Las figuras 2B, 2C, y 2D muestran barridos de microPET utilizando [<sup>18</sup>F]D-FAC.

La figura 3A presenta la síntesis radioquímica de 1-(2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoroarabinofuranosil)citosina (aquí, [<sup>18</sup>F]D-FAC).

5 Las figuras 4B a 4J presentan la síntesis radioquímica de [<sup>18</sup>F]L-FAC, [<sup>18</sup>F]D-FMAC, [<sup>18</sup>F]L-FMAC, [<sup>18</sup>F]D-FBAC, [<sup>18</sup>F]L-FBAC, [<sup>18</sup>F]D-FCAC, [<sup>18</sup>F]L-FCAC, [<sup>18</sup>F]D-FFAC, y [<sup>18</sup>F]L-FFAC.

La figura 5 muestra la selectividad de [<sup>18</sup>F]D-FAC para órganos linfoides. La figura 5A muestra una autorradiografía de cuerpo completo digital (DWBA); las figuras 5B y 5C muestran barridos de microPET/CT; la figura 5D muestra la retención de [<sup>18</sup>F]D-FAC en timocitos y esplenocitos; la figura 5E muestra la proporción de la retención de [<sup>18</sup>F]D-FAC por línea celular.

10 La figura 6 muestra la retención incrementada de [<sup>18</sup>F]D-FAC en bazo y nodos linfáticos en el pico de la respuesta inmune primaria antitumoral. La figura 6A muestra una imagen de microPET/CT; la figura 6B muestra la acumulación de [<sup>18</sup>F]D-FAC en el bazo y los nodos linfáticos; la figura 6C muestra la retención relativa de [<sup>18</sup>F]D-FAC en células CD8+T y citotóxicas T ingenuas; las figuras 6D y 6E muestran imágenes de microPET/CT que ilustran la acumulación de las sondas [<sup>18</sup>F]FDG y [<sup>18</sup>F]FLT.

15 La figura 7 muestra que la microPET/CT con [<sup>18</sup>F]D-FAC permite la visualización de masas linfoides incrementadas asociadas con autoinmunidad sistémica y puede ser utilizada para monitorizar intervenciones terapéuticas inmunosupresoras.

20 La figura 8 es un diagrama que muestra barridos de microPET llevados a cabo sobre ratones transgénicos con receptores de células T BDC-2.5 a los cuales se ha administrado [<sup>18</sup>F]D-FAC. La figura 8A muestra imágenes de microPET/CT; la figura 8B presenta la acumulación de [<sup>18</sup>F]D-FAC medida en muestras de tejido por necropsia.

La figura 9 muestra las estructuras químicas de algunas de los análogos de uridina, timidina y citidina fluorados discutidos en esta divulgación.

25 La figura 10 es un diagrama que muestra la biodistribución de [<sup>18</sup>F]D-FAC. La figura 10A muestra las curvas tiempo medio-actividad corregidas con respecto al decaimiento en diversos órganos de ratones normales inyectados con [<sup>18</sup>F]D-FAC determinada a partir de muestras de tejido por necropsia e indicativas de la acumulación de [<sup>18</sup>F]D-FAC. La figura 10B muestra la biodistribución de [<sup>18</sup>F]D-FAC medida en muestras de tejidos de necropsia 60 minutos después de la inyección.

La figura 11 es una imagen que muestra las rutas metabólicas potenciales para [<sup>18</sup>F]D-FAC.

30 La figura 12 muestra una imagen de microPET/CT de [<sup>18</sup>F]D-FAC de enfermedades malignas humanas y murínicas. La figura 12A muestra el resultado de inyectar ratones SCID con células Ba/F3; la figura 12B muestra el resultado de inyectar ratones NOD SCID con reserva retroviral; la figura 12C muestra el resultado de inyectar ratones C57BL/6 con células de melanoma B16; la figura 12D muestra el resultado de inyectar ratones SCID con células de glioma U87.

35 La figura 13 es una transferencia Western que muestra la expresión de la desoxicitidina quinasa (dCK) en las líneas celulares L1210. Las líneas celulares L1210 fueron sondeadas con anticuerpos anti dCK total.

La figura 14 muestra que la expresión de la desoxicitidina quinasa (dCK) produce la retención de D-FAC. La figura 14A muestra la retención de las sondas [<sup>3</sup>H]D-FAC y [<sup>3</sup>H]FLT líneas celulares L1210, L1210-10K, y L1210-10K con dCK reintroducida.

La figura 14B muestra la fosforilación en D-FAC en las líneas celulares.

40 La figura 15 muestra los resultados de un estudio *in vivo* que demuestra que D-FAC puede ser utilizado para predecir la resistencia a profármacos oncolíticos usados ampliamente como Gemcitabina y Ara-C. La figura 15A muestra la acumulación de [<sup>18</sup>F]FDG; la figura 15B muestra la acumulación de [<sup>18</sup>F]D-FAC.

La figura 16 muestra la biodistribución de [<sup>18</sup>F]D-FAC en un voluntario humano saludable a través de un barrido con microPET coronario 48 minutos después de la inyección de [<sup>18</sup>F]D-FAC.

45 La figura 17 demuestra que la acumulación intracelular (retención y fosforilación) de [<sup>18</sup>F]-CA y [<sup>18</sup>F]L-FAC requiere la expresión de la desoxicitidina quinasa (dCK). La figura 17A muestra la acumulación de las sondas [<sup>18</sup>F]D-FAC, [<sup>18</sup>F]L-FAC, y [<sup>18</sup>F]-CA en líneas celulares L1210-WT y L1210-10K; la figura 17B muestra el grado de fosforilación de las sondas en lisados celulares de L1210-WT y L1210-10K.

La figura 18 muestra los resultados de estudios de biodistribución de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC en ratones C57/BL6. La figura 18A muestra imágenes obtenidas con [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC; la figura 18C muestra imágenes obtenidas con [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC y microPET/CT.

5 La figura 19 ilustra que [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC es más resistente a la desaminación que [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC de acuerdo con estudios *in vivo* en ratones y datos utilizando plasma humano. Las figuras 19A y 19B muestran cromatografías de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC y [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC en plasma a 10 minutos y 45 minutos después de la inyección en un ratón; las figuras 19C y 19D muestran cromatografías de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC y [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC en plasma a 10 minutos y 45 minutos después de que la sonda haya sido incubada con plasma humano.

10 La figura 20 muestra imágenes de microPET con [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC de linfadenopatía en un modelo animal de autoinmunidad sistémica

La figura 21 muestra imágenes de microPET de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC de activación inmune durante una respuesta inmune antitumoral mediada por células T primaria.

La figura 22 ilustra que [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC puede ser utilizada para predecir la resistencia a la gemcitabina *in vivo*. La figura 22A muestra barridos de microPET/CT de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC; la figura 22B muestra barridos de microPET/CT de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG.

15 La figura 23 ilustra que la acumulación intracelular de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC requiere la expresión de desoxicitidina quinasa.

La figura 24A muestra los resultados de estudios de biodistribución de L-FAC, D-FAC, y L-FMAC. La figura 24B muestra la biodisponibilidad de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC en muestras de necropsia.

20 La figura 25 ilustra que [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC es resistente a la desaminación. La figura 25A muestra los resultados obtenidos con el estándar de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC; la figura 25B muestra los resultados para [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC en plasma recolectado 45 minutos después de la inyección.

La figura 26 muestra imágenes de microPET de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC de linfadenopatía en modelo animal de autoinmunidad sistémica.

La figura 26A muestra los resultados obtenidos con el ratón BL/6 tipo silvestre. La figura 26B muestra resultados obtenidos con el ratón autoinmune B6.MRL-*Fas*<sup>pr</sup>/J.

25 La figura 27 muestra las imágenes de microPET con [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC de activación inmune durante una respuesta inmune antitumoral mediada por células T primaria.

La figura 28 muestra imágenes de microPET de [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC de tumores de melanoma en ratones.

Las figuras 29A y 29B presentan las imágenes de PET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC de lesiones por linfoma en un humano.

30 La figura 30 presenta barridos de PET/CT de un macho humano de 56 años de edad con pancreatitis crónica. La figura 30A muestra una imagen obtenida con la sonda L-FAC; la figura 30B muestra una imagen obtenida con la sonda FDG

#### Descripción detallada

35 Las realizaciones de la invención son como se definen en las reivindicaciones. En la descripción de las realizaciones, se emplea terminología específica en busca de claridad. Sin embargo, la invención no pretende ser limitada a la terminología específica seleccionada de esta manera. Una persona experimentada en la técnica relevante reconocerá que pueden emplearse otras partes equivalentes.

40 Un objetivo del trabajo que lleva a la presente invención, del cual se presentan varias realizaciones en este texto, es el desarrollo de sondas para PET de moléculas pequeñas diferentes a 2- $^{18}\text{F}$ fluoro-2-desoxi-D-glucose (aquí FDG) y tales como, por ejemplo, 1-(2'-desoxi-2'- $^{18}\text{F}$ fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosil)citosina (aquí [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC), [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC, [ $^{18}\text{F}$ ]DFMAC, [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC, [ $^{18}\text{F}$ ]D-FBAC, [ $^{18}\text{F}$ ]L-FBAC, [ $^{18}\text{F}$ ]D-FCAC, [ $^{18}\text{F}$ ]L-FCAC, [ $^{18}\text{F}$ ]D-FFAC, [ $^{18}\text{F}$ ]L-FFAC que apuntan específicamente a genes expresados durante la activación de linfocitos T o durante la transformación maligna. Hemos identificado varios compuestos químicos que se acumulan específicamente en linfocitos T activados y que pueden ser marcados con el radioisótopo emisor de positrón [ $^{18}\text{F}$ ]flúor para generar sondas para PET para generación de imágenes de activación de linfocitos *in vitro* e *in vivo*. Estas sondas también permiten la generación de imágenes de cánceres seleccionados y pueden ser utilizadas para predecir la resistencia a ciertos análogos de nucleósidos oncolíticos.

45 En este texto, cuando se presenta un compuesto del cual se establece un sustituyente como radioisótopo específico o radioisótopos específicos, debe entenderse que una aglomeración de más de una molécula del compuesto que tenga una o más moléculas en las cuales el sustituyente es un radioisótopo diferente o un radioisótopo estable es

abarcado. Cuando se presente un compuesto del cual se establece un sustituyente como no radioisótopo, debe entenderse que una aglomeración de más de una molécula del compuesto que tiene una o más moléculas en las cuales un sustituyente es un radioisótopo, por ejemplo, un radioisótopo de origen natural que está representado en la aglomeración en una proporción encontrada en la naturaleza, es abarcado.

5 En este texto, cuando se discute un enantiómero, el enantiómero de orientación opuesta también está implicado, a menos que el contexto indique otra cosa.

En otro aspecto, la presente invención también se relaciona con métodos novedosos para sintetizar sondas para PET divulgadas aquí. En todavía otro aspecto, la presente invención se relaciona con sondas para PET para uso en el tratamiento de enfermedades y condiciones que involucran inflamación, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes tipo I, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), esclerosis múltiple, aterosclerosis y cáncer. Tal como se usa aquí, "tratamiento" comprende prevención, alivio parcial o cura de la condición o trastorno.

En otro aspecto, esta invención se relaciona con sondas para PET para uso en la evaluación de la eficacia del uso de clases particulares de agentes anticáncer en el tratamiento de cáncer tales como las que son consumidas por células a través de transportadores de nucleósidos y fosforilación mediada por desoxicitidina quinasa (dCK). La presente divulgación también se relaciona con métodos para diagnóstico y tratamiento de condiciones que impliquen células con alta actividad en la ruta de salvaguarda del desoxirribonucleósido, por ejemplo, linfocitos, células de médula ósea, y enterocitos intestinales. Adicionalmente, la presente divulgación se relaciona con composiciones que incorporan los compuestos divulgados aquí. Finalmente, también se divulgan kits que comprenden cualquier realización de la presente invención.

La monitorización de la función inmune a través del cuerpo utilizando imágenes moleculares puede impactar significativamente el diagnóstico y evaluación de tratamiento de trastornos inmunológicos. La tomografía por emisión de positrones (PET) es una modalidad de imágenes moleculares con aplicaciones numerosas en cáncer y otras enfermedades. Sin embargo, los estudios con PET de la función inmune han sido limitados por la carencia de sondas especializadas. Utilizando una estrategia de selección diferencial, identificamos sondas para PET para la ruta de salvaguarda de desoxirribonucleótidos. A manera de recordatorio, estas son sondas diferentes a 2-<sup>18</sup>F]fluoro-2-desoxi-D-glucose (aquí, FDG). Ejemplos de sondas usadas son 1-(2'-desoxi-2'-<sup>18</sup>F]fluoro-β-D-arabinofuranosil)citosina (aquí, [<sup>18</sup>F]DFAC), [<sup>18</sup>F]L-FAC, [<sup>18</sup>F]D-FMAC, [<sup>18</sup>F]L-FMAC, [<sup>18</sup>F]D-FBAC, [<sup>18</sup>F]L-FBAC, [<sup>18</sup>F]D-FCAC, [<sup>18</sup>F]L-FCAC, [<sup>18</sup>F]D-FFAC y [<sup>18</sup>F]L-FFAC.

Las sondas para PET divulgadas aquí permiten la visualización de órganos linfoides por microPET que son sensibles a la activación inmune localizada en modelos en ratón de inmunidad antitumoral. Las sondas para PET divulgadas aquí también detectaron cambios tempranos en una masa linfoide en autoinmunidad sistémica y permitieron la evaluación de terapia inmunosupresora. Estos datos soportan el uso de las sondas para PET divulgadas aquí para monitorización inmune y sugieren un amplio rango de aplicaciones clínicas, incluyendo la visualización del tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

Con el fin de identificar candidatos para las sondas para PET que pueden distinguirse entre células T activadas y células T ingenuas no activadas, llevamos a cabo un ensayo de consumo radioactivo, cuyo resultado se muestra en la figura 1. La figura 1A muestra los perfiles de retención para análogos de nucleósidos probados en células T activadas y quiescentes (ingenuas). Estas mediciones fueron llevadas a cabo después de incubar las células con compuestos radioactivos durante 1 hora y llevar a cabo lavados sucesivos para eliminar las sondas no incorporadas. Las estructuras y fórmulas químicas de los compuestos probados se muestran en la figura 9. Los nombres compuestos de las abreviaturas para los compuestos se proveen en la Tabla 1. La diferencia más grande en la retención de sonda por proliferación en comparación con células T ingenuas fue observada para la 2',2'-difluorodesoxicitidina (dFdC) y fue >20 veces (figura 1B). Los resultados mostrados en la figura 1 guiaron nuestro diseño de sondas para PET radiomarcadas con [<sup>18</sup>F]flúor análogas a la 2'-desoxicitidina. Por ejemplo, identificamos los compuestos #1 a #15 (véase figura 2A para las estructuras químicas) como candidatos para sondas para PET útiles para detectar células T activadas. La figura 2A presenta sustratos de dCK marcados con el radioisótopo emisor de positrones <sup>18</sup>F.

Tabla 1

ANÁLOGOS DE URIDINA	
2'-fluoro-2'-desoxi-5-fluorouracil-β-D-arabinofuranósido	FFAU
1-(2-desoxi-2-fluoro- β-D-arabinofuranosil)-uracil	FAU
2'-fluoro-2-desoxiuridina	2FdUrd

ANÁLOGOS DE URIDINA	
5-fluoro-2-desoxiuridina	5FdUrd
ANÁLOGOS DE TIMIDINA	
2'-fluoro-2'-desoxitimidina	2'FLT
1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -L-arabinofuranosil)-5-metiluracil L	L-FMAU
1-(2-desoxi-2-fluoro- $\beta$ -L-arabinofuranosil)-5-metiluracil	D-FMAU
3'-fluoro-3'-desoxitimidina	FLT
ANÁLOGOS DE CITIDINA	
5-fluoro-2'-desoxicitidina	5Fdc
2',2'-difluorodesoxicitidina	dFdC
5-fluoro-2,3-didesoxicitidina	5FddC
(-)- $\beta$ -2,3-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina	FTC
2,3-didesoxi-3-fluorocitidina	3FddC

5 La síntesis de la 1-(2'-desoxi-2'-[ $^{18}$ F]fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosil)citosina (aquí, [ $^{18}$ F]D-FAC) se ilustra en la figura 3A. La 2-O-[(Trifluorometil)sulfonyl]-1,3,5-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-ribofuranosa (1) puede hacerse reaccionar con ión [ $^{18}$ F]fluoruro para producir 2-desoxi-2-[ $^{18}$ F]fluoro-1,3,5-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-arabinofuranosa (2) el cual puede hacerse reaccionar con bromuro de hidrógeno a 2-desoxi-2-[ $^{18}$ F]fluoro-3,5-di-O-benzoil- $\alpha$ -D-arabinofuranosil bromuro (3). El compuesto 3 con bromo puede hacerse reaccionar con 4-N-(trimetilsilil)-2-O-(trimetilsilil)pirimidina-4-amina (4) para producir 1-(2'-desoxi-2'-[ $^{18}$ F]fluoro-3,5-di-O-benzoil- $\beta$ -D-arabinofuranosil)citosina (5). Los grupos benzoilo pueden ser removidos por reacción de 5 con metóxido de sodio para producir la sonda para PET, 1-(2'-desoxi-2'-[ $^{18}$ F]fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosil)citosina (6).

10 La síntesis de [ $^{18}$ F]L-FAC, [ $^{18}$ F]D-FMAC, [ $^{18}$ F]L-FMAC, [ $^{18}$ F]D-FBAC, [ $^{18}$ F]L-FBAC, [ $^{18}$ F]D-FCAC, [ $^{18}$ F]LFCAC, [ $^{18}$ F]D-FFAC, [ $^{18}$ F]L-FFAC se muestran en la figura 4B - J.

15 Las figuras 2B - 2D muestran las imágenes de microPET de [ $^{18}$ F]D-FAC de ratones normales y ratones que experimentan inactivación inmune sistémica. La figura 2B muestra un ratón BL6 ingenuo inyectado con [ $^{18}$ F]D-FAC 1 hora antes de realizar las imágenes; las imágenes de PET muestran acumulación en el bazo y en el timo, la última de las cuales fue predicha con base en la expresión elevada de dCK en ese tejido. En la figura 2C, un ratón BL6 fue inyectado con 100 microgramos de anticuerpo anti-CD3 24 horas antes de la realización de las imágenes de tal manera que pueda generarse una respuesta inmune sistémica. Después del consumo de 1 hora del [ $^{18}$ F]D-FAC, la sonda se acumuló en el bazo pero hubo menos acumulación en el timo debido a tratamiento con anticuerpos. En la figura 2D, el ratón estimulado con anti-CD3 es sometido a toma de imágenes 2 horas después de la inyección de [ $^{18}$ F]D-FAC y muestra que la sonda sale de los riñones de tal manera que es posible una visualización más clara del bazo.

20 Además de [ $^{18}$ F]D-FAC (Compuesto #1), [ $^{18}$ F]L-FAC, (Compuesto #2), [ $^{18}$ F]D-FMAC (Compuesto #8) y [ $^{18}$ F]L-FMAC, (Compuesto #9), pueden utilizarse varios otros compuestos para identificar células T activadas a través de el consumo asociado a desoxicitidina quinasa detectado por imágenes de PET; ejemplos de estos compuestos adicionales se muestran en la figura 2A y en la figura 4.

30 Así, la activación de linfocitos puede ser monitorizada de manera no invasiva sometiendo un sujeto animal o humano con una cantidad traza de una sonda para PET marcada con [ $^{18}$ F]flúor (por ejemplo, tal como en las figuras 2-4), mediante lo cual se espera que la sonda se acumule en sitios de activación inmune local y pueda ser monitorizada a un nivel de cuerpo completo utilizando un escáner de PET. La metodología de utilizar una sonda para PET marcada con [ $^{18}$ F]flúor para monitorizar la activación inmune es que esta sonda sería más específica y sensible que con una metodología que utilice FDG<sup>31</sup>. Una sonda para PET marcada con [ $^{18}$ F]flúor (como en las figuras 2 - 4) puede ser administrada a un animal o un humano para propósitos de diagnóstico de tal manera que se determine la presencia o el grado de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer, enfermedad autoinmune, trastorno del desarrollo, infección viral, infección bacteriana, infección por parásitos, otras infecciones, enfermedad metabólica o inflamación).

Por ejemplo, la sonda para PET marcada con [<sup>18</sup>F]flúor puede ser administrada para monitorizar el progreso del cáncer u otros tipos de inmunoterapia, terapia con interferones, vacunas, terapia por radiación y terapias con antibióticos basadas en enfermedades (nótese que tal como se utiliza aquí “trastorno en el desarrollo” incluye deficiencias inmunes. También como se usa aquí, “enfermedad metabólica” incluye defectos en la función de los macrófagos debidos a problemas en el almacenamiento de enzimas).

En el contexto de la investigación, las sondas para PET marcadas con [<sup>18</sup>F]flúor presentadas en las figuras 2, 3 y 4 pueden ser administradas a un animal para propósito de desarrollar una técnica de diagnóstico, una terapia, o para desarrollar un entendimiento básico de los mecanismos de la enfermedad o trastorno.

Describimos la identificación y validación de las nuevas sondas para PET para la ruta de salvaguarda de desoxirribonucleótido. Las imágenes de PET que utilizan sondas (diferentes FDG) tales como [<sup>18</sup>F]D-FAC permiten la visualización del timo y el bazo en ratones. Además, esta tecnología es capaz de monitorizar alteraciones en la masa linfóide y en el estado inmune bajo diversas condiciones experimentales. El trabajo con imágenes por PET actual en EAE muestra la utilidad de utilizar [<sup>18</sup>F]D-FAC para medir rutas metabólicas clave en células inmune. Mientras que estas sondas no son retenidas exclusivamente en líneas celulares inmunes, cambios en la acumulación de la sonda a lo largo del cuerpo pueden ser indicativos de “estados de enfermedad” y proveer biomarcadores tempranos para la eficacia del tratamiento. Adicionalmente, la acumulación de [<sup>18</sup>F]D-FAC en el timo y en el bazo así como las variaciones en la retención de la [<sup>18</sup>F]D-FAC en órganos linfoides durante respuestas inmunes puede reflejar un paquete crítico para la ruta de salvaguarda del desoxirribonucleósido (medida por dicha sonda) en el desarrollo y función de células T. A la vez que la función biológica de la dCK es actualmente desconocida, los ratones deficientes en la timidina quinasa 1 (TK1) del gen relacionado con dCK despliegan anomalías inmunológicas en histología y función. Modelos genéticos de ratón novedosos de deficiencia en dCK y las imágenes a través de PET con [<sup>18</sup>F]D-FAC pueden proveer herramientas únicas para diseccionar las funciones inmunológicas de la ruta de salvaguarda de desoxirribonucleótido.

El patrón de distribución exclusivo de [<sup>18</sup>F]D-FAC y otros análogos de FAC sugiere que la utilidad de estas sondas puede extenderse más allá del modelo Fas<sup>lpr</sup> a varios otros trastornos inmunes. La retención elevada de la sonda [<sup>18</sup>F]D-FAC en articulaciones y en el intestino por encima de los valores de consumo fisiológico puede reflejar la presencia de procesos inflamatorios activos que son característicos de la artritis reumatoide y de la enfermedad inflamatoria del intestino, respectivamente. El microPET con [<sup>18</sup>F]D-FAC puede también ser utilizado para detectar activación inmune autorreactiva manifiesta en un modelo de ratón BDC-2.5 que es propenso a diabetes tipo I (figura 8). En la figura 8A, las secciones de corona de 1 mm ilustran el patrón de acumulación de la sonda [<sup>18</sup>F]D-FAC en ratones BDC-2.5. (Abreviaturas: CV, LNs cervical; AX, LNs axilar; BR, LNs braquial; IN, LNs inguinal; THY, timo; GI, tracto gastrointestinal; H, corazón) En la figura 8B, la acumulación de [<sup>18</sup>F]D-FAC se mide en muestras de tejidos de necropsia de ratones BL/6, BALB/c, NOD LTJ, y BDC-2.5. Los datos indican que de estas cepas, el bazo y los nódulos linfáticos de los ratones BDC2.5 acumulan los niveles más altos de [<sup>18</sup>F]D-FAC.

La baja retención de [<sup>18</sup>F]D-FAC en el cerebro (figura 5) sugiere que esta sonda es superior a FDG para la detección de infiltrados inflamatorios que afectan el sistema nervioso central en EAE y esclerosis múltiple (MS). A la vez que no se sabe si [<sup>18</sup>F]D-FAC puede atravesar la barrera sangre-cerebro, la integridad de esta estructura es comprometida frecuentemente en EAE y en MS. Con respecto a la aterosclerosis, la FDDG ha demostrado permitir la visualización de placas en las carótidas pero su alta acumulación en el miocardio limita la generación de imágenes de lesiones de corona. Sin embargo, en este específico aspecto de [<sup>18</sup>F]D-FAC y en contraste con FDG, la carencia de la retención de [<sup>18</sup>F]D-FAC en el corazón provee la señal de fondo baja necesaria que pueda potenciar las imágenes de PET de macrófagos activados y otras células inmunes en lesiones ateroscleróticas de corona (figura 5).

Además de las enfermedades inmunes, [<sup>18</sup>F]D-FAC también puede ser utilizada para medir el metabolismo de nucleósidos desregulado en cáncer. Con este propósito, examinamos la utilidad de microPET [<sup>18</sup>F]D-FAC de modelos animales representativos de leucemia o linfoma, melanoma y tumores de glioma (figura 12), en donde las imágenes son secciones en corona de 1 mm de barridos de microPET/CT con [<sup>18</sup>F]D-FAC 1 hora después de la inyección de la sonda. En la figura 12A, ratones SCID fueron inyectados por vía intravenosa con células Ba/F3 que expresan p210 BCR-ABL y avanzaron en el desarrollo de una enfermedad agresiva con infiltración esplénica masiva que típicamente da como resultado la muerte al cabo de ~15 días (los ratones mostrados fueron sometidos a la toma de imágenes en el día 12). En la figura 12B, los ratones NOD SCID fueron trasplantados con células de médula ósea total tipo silvestre infectada con reservas de retrovirales de MSCV-GFP-IRES-P185 BCR-ABL y los ratones leucémicos fueron sometidos a la toma de imágenes 28 días después del trasplante. En la figura 12C, se inyectó C57BL/6 por vía subcutánea con  $1 \times 10^5$  de células de melanoma B16 y se tomaron las imágenes 7 días después. En la figura 12D los ratones SCID fueron inyectados por vía subcutánea con  $1 \times 10^6$  de células glioma U87 y se sometieron a imágenes 10 días después. (Abreviaturas: L, hígado; SP, bazo; GI, tracto gastrointestinal; BL, vejiga; Tu, tumor). La retención incrementada de [<sup>18</sup>F]D-FAC en el bazo fue observada en modelos de ratón de leucemia inducida por oncógenos utilizando células Ba/F3 que expresan Bcr-Abl y médula ósea transformada Bcr-Abl. El PET con [<sup>18</sup>F]D-FAC también detectó células B16 murínicas implantadas (representantes de melanomas malignos) y células humanas U87 (representativas de tumores de glioma). La [<sup>18</sup>F]DFAC también puede ser utilizada adicionalmente para producir respuestas tumorales a una clase particular de agentes anticáncer, los cuales incluyen

los profármacos ampliamente usados citarabina, (Ara-C) y 2',2'-difluorodeoxicitidina (dFdC, Gemcitabina). Estructuralmente, estos profármacos están cercanamente relacionados con FAC y requieren consumo celular a través de transportadores de nucleósidos y fosforilación mediada por dCK para la conversión en sus metabolitos farmacéuticamente activos. Sugerimos que la disponibilidad de un biomarcador para PET para medir la farmacología celular de Ara-C y dFdC puede ayudar en la estratificación de tumores susceptibles y resistentes llevando a un uso clínico más racional de estos importantes fármacos anticáncer.

Los resultados presentados aquí indican que las imágenes por PET con [<sup>18</sup>F]D-FAC y los otros compuestos de la invención ofrecen nuevas ventajas en diagnóstico y monitorización de tratamiento de un amplio rango de trastornos.

### Ejemplos

10 Consideramos la ruta de salvaguarda para la síntesis de ADN, en la cual los desoxirribonucleósidos son importados hacia las células mediante proteínas de transporte de nucleósidos especializadas que son convertidas en sus formas trifosfato a través de etapas de fosforilación consecutivas catalizadas por desoxirribonucleósido quinasas. A la vez que la mayoría de los tejidos normales utilizan la ruta de novo para la síntesis de desoxirribonucleótidos, cierto tejidos – incluyendo timo y bazo – se basan extensamente en la ruta de salvaguarda. Así, llevamos a cabo los siguientes estudios: (i) selección *in vitro* de análogos de nucleósidos para la retención en células T proliferantes y quiescentes e identificación de D-FAC, un nuevo candidato como sonda para PET; (ii) expresión genética y análisis bioquímico para investigar los mecanismos de la pretensión elevada de D-FAC en células T activadas; (iii) síntesis radioquímica de [<sup>18</sup>F]DFAC y estudios de biodistribución *in vivo*; (iv) comparación de [<sup>18</sup>F]D-FAC con otras sondas para PET utilizadas actualmente para medir el metabolismo de los nucleósidos y la glicólisis; y (v) evaluación de [<sup>18</sup>F]D-FAC en modelos de ratones para activación inmune. Los hallazgos a partir de estos estudios proveen impulso para las imágenes en PET traslacionales con [<sup>18</sup>F]D-FAC en un amplio rango de trastornos inmunológicos en pacientes. De acuerdo con la invención, la estrategia usada para identificar y evaluar [<sup>18</sup>F]D-FAC y sus análogos es ampliamente aplicable al desarrollo de nuevas sondas para PET con especificidad definida para diversas rutas bioquímicas y/o líneas celulares inmunes.

25 Los siguientes nucleósidos fueron adquiridos de Moravek Biochemicals (Brea, CA): 3'-Fluoro-3'-desoxitimidina (3'-FLT); 2'-Fluoro-2'-desoxitimidina (2'-FLT); 1-(2'-Desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5-metiluracil (D-FMAU); 1-(2'-Desoxi-2'-fluoro-β-L-arabinofuranosil)-5-metiluracil (L-FMAU); 2',3'-Didesoxi-3'-fluorocitidina (3'-FddC); (-)-β- 2',3'-Didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina (FTC); 5-Fluoro-2',3'-didesoxicitidina (5FddC); 2',2'-Difluorodesoxicitidina (dFdC); 5-Fluoro-2'-desoxicitidina (5FdC); 5-Fluoro-2'-desoxiuridina (5FdURD); 2'-Fluoro-2'-desoxiuridina (2FdUrd); 1-(2'-Desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-uracil (FAU); 2'-Fluoro-2'-desoxi-5-fluorouracil-β-D-arabinofuranósido (FFAU).

35 Los linfocitos T de ratones transgénicos con el receptor de células T pmel-1 (TCR) fueron estimulados *ex vivo* usando un antígeno para melanoma (hgp 100<sub>25-33</sub> 1 micromolar). Estas células fueron cultivadas entonces para consumo radioactivo y ensayos de quinasa que fueron ejecutados 72 horas después de la estimulación. En más detalle, se agregó 1 microCi de [<sup>3</sup>H]D-FAC o [<sup>3</sup>H]dFdC a un pozo que contenía 5 x 10<sup>4</sup> células en una placa para cultivo de tejidos de 96 pozos y se incubó durante 1 hora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. La placa fue lavada entonces 5 veces con medio que contenía 5% de suero de ternera fetal (FCS) utilizando el Millipore Vacuum Manifold (Billerica, MA); la cantidad de sonda incorporada fue medida por recuento de centelleo utilizando el PerkinElmer Microbeta (Waltham, MA).

40 Los ratones fueron mantenidos tibios, bajo anestesia con gas (isoflurano al 2%) e inyectados por vía intravenosa con 200 microCi de diversas sondas para PET; se dejó transcurrir 1 hora para el consumo. Los ratones fueron posicionados entonces usando una cámara para imágenes y se obtuvieron los datos usando los sistemas Siemens Preclinical Solutions (Knoxville, TN) microPET Focus 220 y MicroCAT II CT. Los datos de microPET fueron captados durante 10 minutos y luego reconstruidos a través de algoritmos de probabilidad estadística máxima a posteriori (MAP) en marcos múltiples<sup>3</sup>. La resolución espacial del PET es de aproximadamente 1.5 mm con 0.4 mm de tamaño de voxel. Las imágenes por CT proveen una adquisición con resolución de dosis baja (400 micrones) con 200 micrones de tamaño voxel. Las imágenes de microPET y CT fueron corregistradas utilizando un método previamente descrito y las regiones fueron dibujadas utilizando el software AMIDE (Andreas Loening, <http://amide.sourceforge.net/>, v0.8.16)<sup>4,5</sup>. La cuantificación fue llevada a cabo dibujando regiones 3D de interés (ROI).

50 Todos los ratones utilizados en estos estudios fueron alimentados y mantenidos de acuerdo con las guías del Department of Laboratory Animal Medicine (DLAM) en la Universidad de California, Los Angeles. Para el modelo de sarcoma inducido por oncorretrovirus, se trataron ratones C57/BL6 por vía intramuscular en los tríceps derechos con el complejo de virus de sarcoma murínico Moloney y leucemia (MoMSV) en un volumen de 100 uL de PBS como se describió previamente<sup>6</sup>. Los ratones B6-MRL-Fas<sup>lpr</sup>/J utilizados para estudios de autoinmunidad sistémica fueron comprados de Jackson Laboratory (número de almacenamiento 000482). Para monitorizar el tratamiento inmunosupresor, estos ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de dexametasona (DEX, 10 mg/kg) a intervalos de 24 horas y fueron sometidos a microPET/CT 24 horas después de la última inyección. Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 2%, inyectados por vía intravenosa con 200 microCi de [<sup>18</sup>F]D-FAC y luego sometidos a microPET/CT; los ratones fueron sacrificados inmediatamente después de la toma de imágenes; los

- órganos fueron seccionados rápidamente, pesados y se midió la radioactividad en un contador de pozo. Después de la corrección de decaimiento, los resultados fueron expresados como porcentajes de la dosis inyectada de actividad por gramo de tejido (%ID/g). Otros ratones fueron anestesiados con isoflurano al 2% e inyectados por vía intravenosa con 1 mCi de [<sup>18</sup>F]D-FAC. Después de 1 hora, los ratones fueron sometidos a eutanasia, embebidos en carboximetilcelulosa al 3% (CMC, Sigma) y congelados en etanol al 100% con hielo seco durante 45 minutos. Las secciones de 50 micrones fueron cortadas usando un crióstato de cuerpo completo, (PMV, Estocolmo, Suecia); las muestras fueron expuestas durante la noche en placas BAS-TR2025 (Fujifilm Life Science, Stamford, CT). Las placas con imágenes fueron leídas utilizando un lector de fosfoimágenes Fujibas-5000 (16 bit, resolución de 25 micrones; Fujifilm Life Science).
- El ARN total fue extraído de las células T CD8 ingenuas purificadas y 72 horas después de la activación de células T CD8 proliferantes de ratones transgénicos de pmel-1 TCR. El ARN fue reunido proveniente de 4 experimentos independientes e hibridado a arreglos Affymetrix Mouse Genome 430 2.0. Las células absolutas que describen si un conjunto de sondas está presente (P), marginalmente presentes (M), o ausente (A) fueron generadas utilizando el Affymetrix GeneChip Operating Software v1.3 (GCOS) y los valores de expresión fueron calculados utilizando el modelo de diferencias PM/MM de DNA-Chip (dChip)<sup>7</sup>. Los valores de expresión a través de las muestras fueron normalizados utilizando el método del conjunto no variable de Chip's. Como condiciones para la inclusión, un gen era considerado diferencialmente expresado si el conjunto de sondas correspondiente encajaba con los criterios siguientes: el resultado absoluto fue P en al menos la mitad de las muestras, cambio de pliegue >1.4 entre línea base (células T ingenuas CD8+) y experimentales (células T CD8+ activadas) utilizando el límite de confianza inferior de 90% del cambio tal como se define en dChip, y la diferencia de expresión entre la línea base y las muestras experimentales fue >100. Los genes involucrados en la biosíntesis de novo del nucleósido y las rutas de salvaguarda fueron tomadas de la base de datos KEGG (ruta ID 00230 y 00240, respectivamente) y los conjuntos de sondas correspondientes fueron extraídos manualmente de Affymetrix's NetAffx para asegurar un cubrimiento completo de todos los genes de la ruta de nucleósidos (conjunto de 239 sondas) más los transportadores SLC28 y SLC29 (conjuntos de 10 sondas)<sup>8,9</sup>.
- El ARN total fue purificado a partir de tejidos utilizando el kit Qiagen RNeasy Mini y 1.5 µg de este ARN fueron utilizados entonces para sintetizar ADNc utilizando el TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). Los ensayos TaqMan prediseñados fueron comprados de Applied Biosystems para dCK (ID del ensayo Mm00432794\_m1), Slc29a1 (ID del ensayo Mm00452176\_m1), y Slc28a3 (ID del ensayo Mm00627874\_m1). Los reactivos de beta-actina TaqMan (Applied Biosystems, Part: 4352341E) fueron utilizados como control endógeno para la cuantificación, las muestras fueron ejecutadas en un sistema StepOne Real-Time PCR de 48 pozos (Applied Biosystems) y fueron analizadas con el StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems) utilizando el método Ct comparativo (ΔΔCt). La mezcla de qPCR (20 µL) contenía 15 ng de ADNc, regulador TaqMan, y 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dATP, 200 mM dCTP, 200 mM dGTP, 400 mM dUTP, el ensayo TaqMan apropiado, 0.5 U de AmpliTaq Gold, y 0.2U de uracil-N-glycosilase (UNG). Cada ensayo incluyó una plantilla de ADNc en triplicados.
- Ratones de seis a 8 semanas de edad con inmunodeficiencia combinada severa (NOD SCID) fueron irradiados subletalmente (275 rads) un día antes de la reconstitución. La médula ósea completa fue aislada de las tibias y fémures de ratones silvestres de 4-8 semanas de edad e infectados con retrovirus de MSCV-GFP-IRES-P185 BCR-ABL. Tres horas después de la inyección las células de la médula ósea fueron inyectadas vía intravenosa en la vena de la cola en ratones NOD SCID de receptores. Los animales fueron monitorizados a diario en cuanto a señales de enfermedad durante un período de dos meses como se describió previamente<sup>10</sup>.
- Líneas celulares Ba/F3 transfectadas con p210 BCR-ABL fueron descritas previamente<sup>11</sup>. Las líneas celulares Ba/F3 fueron mantenidas en RPMI que contenía FCS al 10% en CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C (con la adición de medio condicional WEHI al 10% como fuente de IL-3 a la línea celular progenitora). La línea celular B16 (H-2<sup>b</sup>) de melanoma murínico gp100<sup>+</sup> espontánea y la línea celular de glioma U87 fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD).
- Las gráficas fueron construidas utilizando el software GraphPad Prism, version 4.02. Los valores P fueron calculados utilizando la prueba de Student y solamente los valores t de <0.05 fueron considerados como significativos. Los datos se presentan como medias ± de errores estándar de la media (SEM).
- En este texto (incluyendo figuras y otra información presentada), a menos que se especifique otra cosa, la presentación, mención o discusión de compuestos químicos quirales también implica la presentación, mención o discusión de cada uno de los enantiómeros de ese compuesto químico y sus mezclas racémicas. En este texto (incluyendo figuras y cualquier otra información presentada), a menos que se especifique otra cosa, la presentación, mención o discusión de un compuesto químico con una quiralidad específica dada también implica la presentación, mención o discusión del enantiómero de ese compuesto químico con quiralidad especificada y mezcla racémica de estos.

**Ejemplo 1:** Selección diferencial para identificar sondas para PET potenciales sensibles a cambios en el flujo de nucleósidos durante la activación y proliferación de células T.

Se uso un ensayo *in vitro* (figura 1) para medir la retención de análogos de nucleósidos marcados con  $^3\text{H}$  (NA) en células T primarias ingenuas y proliferativas. A los criterios de selección para las NA probadas se tuvieron en cuenta la propensión conocida de las sustituciones con flúor para cambiar significativamente las propiedades estereoelectrónicas y bioquímicas de los nucleósidos. Así, solamente los desoxirribonucleótidos que contienen sustituciones con átomos de flúor "frío" ( $^{19}\text{F}$ ) fueron probados (figura 9). La sustitución subsecuente del  $^{19}\text{F}$  con  $^{18}\text{F}$  para la síntesis radioquímica de sondas para PET disminuiría la masa nuclear en una unidad de masa atómica individual, lo cual es un cambio de consecuencias bioquímicas limitadas, si las hay. Adicionalmente, solamente las NA modificadas en las posiciones C-2' o 3' de la unidad estructural de azúcar o de la posición 5 de la nucleobase fueron seleccionadas puesto que la fluoración en C-4' sería incompatible con la síntesis radioquímica mientras que la fluoración en C-5' prevendría la fosforilación por las nucleósido quinasas.

La figura 1 identifica análogos de desoxicitidina fluorada retenidos en activadas versus linfocitos T ingenuos e incorporados en ADN. En la figura 1A, los linfocitos T del receptor de células T pmel-1 (TCR) de ratones transgénicos fueron estimulados *ex vivo* utilizando un antígeno melanocito/melanoma (hgp100<sub>25-33</sub>); después de 72 horas, las células T proliferantes fueron incubadas durante 1 hora con análogos de desoxirribonucleósidos marcados con  $^3\text{H}$  (1 microCi) (véase figura 9). Después de lavados sucesivos, la radioactividad intracelular fue medida por recuento de centelleo. Esta parte de la figura muestra los perfiles de retención para NA probadas en células T activadas e ingenuas y las diferencias notables reflejan probablemente una expresión diferencial de los transportadores de los nucleósidos y sensibles a quinasas a la estructura de nucleobases y a la sustituciones con flúor de los grupos hidrógeno e hidroxilo originales. En la figura 1B, la 1-(2'- desoxi-2'-fluoroarabinofuranosil) citosina (D-FAC) es un análogo de dFdC, propenso a la marcación con  $^{18}\text{F}$ . Aquí, la diferencia más grande (>20 veces) en retención fue observada para la 2',2'-difluorodesoxicitidina (dFdC) cuando se compararon células T proliferantes con células T ingenuas. La figura 1C muestra la retención de [ $^3\text{H}$ ]dFdC y [ $^3\text{H}$ ]D-FAC por las células T CD8+ de ratón; nótese que el análogo F-ara de 1-(2'- desoxi-2'-D-fluoroarabinofuranosil) citosina (D-FAC) recuerda bioquímicamente a la dFdC como se indica por su similar retención en las células T CD8+ T proliferantes. En la figura 1D, el consumo incrementado de [ $^3\text{H}$ ]D-FAC fue observado en fibroblastos NIH3T3 que fueron manipulados para sobreexpresar las nucleósido quinasas (dCK) y el transportados de nucleósidos SLC29A1. Nótese que [ $^3\text{H}$ ]FLT fue utilizada como control positivo para las células que expresan TK1.

Finalmente, en la figura 1E, [ $^3\text{H}$ ]D-FAC se incorpora en el ADN de las células T proliferantes.

#### **Ejemplo 2:** Mecanismos bioquímicos de la retención de D-FAC en células T proliferantes.

La retención incrementada de D-FAC en células T proliferantes en comparación con las células T ingenuas puede reflejar uno o una combinación de varios eventos bioquímicos: (i) sobrerregulación de transportadores de nucleósidos; (ii) fosforilación elevada de desoxinucleósido quinasas que lleva a atrapamiento intracelular de productos cargados; y (iii) incorporación incrementada en el ADN. Los análisis de expresión genética por microdisposición y qPCR fueron llevados a cabo en células T antes y después de la activación (a las 72 horas) para determinar el estado transcripcional de los transportadores de nucleósidos y quinasas específicos. En términos del contexto para el transporte de D-FAC, estudios previos que utilizaron análogos de 2'-deoxicitidina (dCyd) sugieren la participación de miembros de las familias de transportadores de soluto (SLC) SLC28 y SLC29. La expresión de SLC29A1 fue sobrerregulada aproximadamente 4 veces en células T proliferantes versus células T ingenuas mientras que otros dos transportadores potenciales de D-FAC (SLC28A1 y SLC28A3) no fueron expresados en estas células (datos no mostrados). La fosforilación de D-FAC puede llevarse a cabo por la desoxicitidina quinasa (dCK, Kcat/Km para dCyd =  $2 \times 10^5$ ) y timidina quinasa 2 (TK2, Kcat/Km para dCyd =  $3 \times 10^4$ ). Después de la activación de células T, los niveles de ARNm dCK se incrementaron  $\approx 2$  veces mientras que la expresión TK2 disminuyo en  $\sim 5$  veces (datos no mostrados). Colectivamente, estos datos sugieren que la retención de [ $^3\text{H}$ ]DFAC en células T proliferantes reflejan la sobrerregulación de SLC29A1 y que esto permite una disponibilidad incrementada del sustrato intracelular y/o de dCK, lo cual a su vez lleva una capacidad de fosforilación incrementada. (De manera notable, SLC29A1 y dCK fueron descritos ambos previamente como involucrados en el metabolismo de dFdC, un nucleósido relacionado con FAC<sup>12,13</sup>.)

**Ejemplo 3:** [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC tiene una especificidad mayor para órganos linfoides que las sondas para PET usadas actualmente para medir el metabolismo de nucleósidos y glicolisis.

La biodistribución, metabolismo y eliminación de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC fueron estudiados en ratones C57/BL6. Las curvas de actividad de tiempo medio corregidas por decaimiento obtenidas de barridos de microPET/CT dinámicos con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC sugieren que [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC es eliminada predominantemente a través del riñón (figura 10). El tiempo sobre el eje horizontal en la figura 10 está en unidades de segundos. Los datos de las imágenes fueron corroborados con mediciones de la radioactividad retenida en muestras de tejidos de necropsia (figura 10B) y con autorradiografías de cuerpo completo digitales (DWBA, figura 5). Una hora después de la inyección intravenosa de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC, la radioactividad acumulada fue detectada en el timo, bazo, intestino, hueso/médula ósea y, en un grado menor, en el hígado. Los estudios bioquímicos pueden determinar si la biodistribución de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC refleja el atrapamiento en tejidos por fosforilación mediada por dCK, conversión a metabolitos de uracilo a través de desaminación (figura 11), o ambos. Independientemente del mecanismo bioquímico específico para la retención, los datos de microPET y

DWBA con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC sugieren que esta sonda permite la visualización de células con alta actividad en rutas de salvaguarda de desoxirribonucleósidos tales como linfocitos, células de médula ósea, y enterocitos intestinales<sup>15</sup>.

La figura 11 muestra la ruta bioquímica potencial medida por [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC. Los transportadores putativos para D-FAC incluyen SLC28A1, SLC28A3 y SLC29A1; sin embargo, solamente se expresa el SLC29A1 en células ingenuas y proliferantes. Intracelularmente, el D-FAC es fosforilado por la desoxicitidina quinasa (dCK) y también puede ser convertido en sus metabolitos de uracilo D-FAU (1-(2'-desoxi-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosil)uracil) por citidina desaminasa (CDA), la cual puede ser inhibida por 3,4,5,6-tetrahidouridina (THU). El D-FAC monofosforilado (D-FAC-MP) es un sustrato potencial para el citidilato quinasa (CMPK) y el desoxicitidilato desaminasa (DCTD). El D-FAC difosforilado (D-FAC-DP), el cual es un sustrato potencial para las nucleósido difosfato quinazas (NME1, NME2, NME4, NME6, NME7), puede inhibir la ribonucleótido reductasa (RRM), el D-FAC trifosforilado (D-FAC-TP), DCTD, y la citidina trifosfato sintasa (CTPS). El D-FAC-TP puede ser incorporado en el ADN a través de ADN polimerasa. Los números de Enzyme Commission (EC) para las enzimas claves involucradas en la ruta de salvamiento de nucleósidos son como siguen: CDA (3.5.4.5); CMPK (2.7.4.14); CTPS (6.3.4.2); dCK (2.7.1.74); DCTD (3.5.4.12); NME1, NME2, NME4, NME6, y NME7 (2.7.4.6); NT5 (3.1.3.5); POL (2.7.7.7); RRM (1.17.4.1); y TK1 (2.7.1.21).

En la figura 5A, una autorradiografía de cuerpo entero digital con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC (DWBA) se muestra junto con la correspondiente sección de tejido. La orientación de las secciones sagital, de corona y transversa, de 1 mm de espesor para cada una, son representadas en la imagen en 3D microCT en la figura 5B. En las figuras 5B y 5C, un ratón inmunocompetente (C57/BL6) fue sometido a escáner por microPET/CT utilizando sondas para los segmentos dependientes de dCK y TK1 de la ruta de salvación de desoxirribonucleósidos (a saber, [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC, [ $^{18}\text{F}$ ]FLT, [ $^{18}\text{F}$ ]D-FMAU) y para glicolisis (a saber, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG). Se obtuvieron imágenes de los ratones 60 minutos después de la inyección intravenosa de las sondas. La comparación directa de [ $^{18}\text{F}$ ]FAC con las sondas para el metabolismo de nucleósidos [ $^{18}\text{F}$ ]FLT y [ $^{18}\text{F}$ ]D-FMAU y glicolisis [ $^{18}\text{F}$ ]FDG confirmó adicionalmente la capacidad de [ $^{18}\text{F}$ ]FAC para proveer datos de imágenes funcionales que no pueden ser obtenidos utilizando las sondas existentes<sup>16</sup> (figura 5C y Tabla1). En efecto, ni [ $^{18}\text{F}$ ]FLT ni [ $^{18}\text{F}$ ]D-FMAU mostraron acumulación detectable en el timo y bazo y la retención alta en el miocardio limita el uso de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG para visualizar el timo. Para ganar una visión adicional en la especificidad celular de la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en el timo y en el bazo, se aislaron tipos celulares inmunes en estos sitios a partir de ratones inyectados con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC, seleccionados por citometría de flujo, y contados en un contador de pozos. En la figura 5D, la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC por número de células en timocitos y esplenocitos se muestra; aquí, la retención más alta de la sonda radioactiva por número de células fue detectada en timocitos dobles negativos, reflejando presumiblemente una proliferación celular intensa en esta etapa del desarrollo de células T. En la figura 5E, es desplegada la proporción de la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC por línea celular por órgano linfóide, lo cual, en otras palabras, es la contribución fraccional de diversas poblaciones inmunes a la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en el timo y el bazo. Estos datos indican que, además de las células T y B, la [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC también marca las células mieloides CD 11b<sup>+</sup>. (Abreviaturas: B, hueso; BL, vejiga; BR, cerebro; GB, vesícula biliar; GI, tracto gastrointestinal; H, corazón; K, riñón; L, hígado; LU, pulmón; SP, bazo; Thy, timo; SC, columna espinal; % ID/g de tejido, la dosis de porcentaje inyectada por gramos). La Tabla 2 muestra que entre las sondas para PET para rutas metabólicas de nucleósidos y glicolisis, la [ $^{18}\text{F}$ ]FAC muestra mejor selectividad para el timo y el bazo que las sondas convencionales (los valores son %ID/g por órgano normalizados a %ID/g de músculo). La retención de la sonda [ $^{18}\text{F}$ ]FDG en el timo no podría ser medida debido al exceso de señal del corazón. El número de ratones fue de 3.

Tabla 2

	[ $^{18}\text{F}$ ]FAC	[ $^{18}\text{F}$ ]FLT	[ $^{18}\text{F}$ ]FMAU	[ $^{18}\text{F}$ ]FDG
Bazo	2.16 +/- 0.48	1.02 +/- 0.21	1.08 +/- 0.27	1.69 +/- 0.16
timo	3.29 +/- 0.48	1.22 +/- 0.23	1.33 +/- 0.24	N.D.

**Ejemplo 4:** La imagen de PET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC detecta cambios localizados en el estado inmune durante una primera respuesta inmune antitumoral.

Habían establecido que [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC permite la visualización de órganos linfoides en ratones ingenuos inmunológicamente, investigamos si esta zona también podría ser útil para monitorizar respuesta inmunes *in vivo* utilizando un modelo de tumor oncorretrovirus bien estudiado en el cual los ratones son sometidos a sarcoma murínico Moloney y al complejo viral de leucemia (MoMSV) que desarrollan sarcomas no metastásicos. En este modelo, las células T específicas del antígeno cebadas con epítomos inmunodominantes codificados por genes gag y env virales se expande rápidamente en el bazo y en nódulos linfáticos tumorales drenantes (DLN) y luego transitan la lesión tumoral la cual es rechazada durante un periodo de 2 - 5 semanas<sup>17,18</sup>. En efecto, la cinética de la respuesta de células T contra sarcomas inducidos por MoMSV han sido estudiadas extensamente utilizando metodologías *ex vivo* convencionales y nuestro grupo ha utilizado las imágenes del gen reportador de PET para visualizar el rechazo tumoral en este modelo<sup>17</sup>. Para analizar si las imágenes de microPET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC pueden detectar sitios de activación inmune localizados, los ratones fueron sometidos a escáner antes y después de

someterlos al virus. Los barridos con respecto a la línea base (día 1), el barrido adquirido en el pico de la respuesta inmune antitumoral (día 15) mostraron significativamente una acumulación de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC incrementada en el bazo y en los tumores DLN (figuras 6A y 6B). Para investigar adicionalmente la base celular de una retención elevada de la [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC, las células T CD8+ de bazo de ratones inyectadas con [ $^{18}\text{F}$ ]FAC fueron fraccionadas por citometría de flujo en poblaciones ingenuas (CD62LHIGH/CD44LOW) y poblaciones efectoras (CD62LLOW/CD44HIGH). Las mediciones de radioactividad mostraron que las células T efectoras CD8+ retienen ~4 veces más [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC que las células T citotóxicas ingenuas (figura 6C). Estos datos confirman nuestras observaciones iniciales que fueron obtenidas utilizando células T cultivadas ingenuas y activadas (figura 1).

Para determinar si [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC puede proveer información única con respecto a la activación inmune localizada a través del modelo antes mencionado, los ratones de los cuales se obtuvieron imágenes por [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC también fueron sometidos a escáner en los días consecutivos utilizando [ $^{18}\text{F}$ ]FDG y [ $^{18}\text{F}$ ]FLT. Como se mostró previamente, la acumulación elevada de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG fue detectada en el día 13 postsometimiento al virus no solamente en el tumor sino también en DLN del tumor y en el bazo (figura 6D). En particular, las lesiones tumorales acumularon altas cantidades de [ $^{18}\text{F}$ ]FDG, a saber  $8.2 \pm 4.2$  por ciento de la dosis inyectada de actividad por gramo de tejido de tumor (%ID/g) con respecto a la señal de fondo, lo cual fue definido como el tejido de músculo contralateral. En contraste, la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en el tumor fue significativamente inferior ( $1.9 \pm 0.3$  %ID/g de tumor con respecto a la línea base). La acumulación preferencial de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en el tumor DLN (a  $13 \pm 2.7$  %ID/g) en comparación con el tumor (a  $6.7 \pm 0.3$  %ID/g) sugiere que la [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC es una sonda más específica que [ $^{18}\text{F}$ ]FDG para la obtención de imágenes de inmunidad antitumoral en el modelo de oncorretrovirus (figuras 6A y 6D). Además, no se observó una acumulación detectable de [ $^{18}\text{F}$ ]FLT en los sitios en el día 14 de activación inmune que pudo ser visualizada claramente por [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC y [ $^{18}\text{F}$ ]FDG (figura 6D). La diferencia marcada entre estas sondas para PET de nucleósidos puede reflejar el alto nivel de timidina presente en el suero de roedores que compite con [ $^{18}\text{F}$ ]FLT y/o puede reflejar una mejor sensibilidad de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC para medir la rata de la ruta de salvaguarda de desoxirribonucleósidos en células inmunes.

**Ejemplo 5:** Evaluación de la enfermedad y tratamiento utilizando PET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en modelos animales de autoinmunidad.

También nos cuestionamos si [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC permite la monitorización de trastorno autoinmune sistémico tal como el síndrome Fas<sup>lpr</sup>, el cual es un modelo animal bien estudiado que recuerda el lupus eritematoso sistémico humano. En este síndrome, la apoptosis deficiente de linfocitos que portaban la mutación Fas<sup>lpr</sup> da como resultado una linfadenopatía, artritis, y glomerulonefrosis mediada por complejo inmune. Utilizamos ratones B6-MRL-Fas<sup>lpr</sup>/J puesto que muestran significativamente una progresión de enfermedad más lenta que la cepa original MRL/Mp-lpr/lpr. Los barridos de MicroPET/CT de ratones B6-MRL-Fas<sup>lpr</sup>/J de 2 – 3 meses de edad revelaron un incremento significativo en los números de LN axilares y braquiales positivas con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC con respecto a los controles C57BL/6J tipo silvestre de edad comparable (figura 7). Las imágenes fueron tomadas a 60 minutos después de la inyección intravenosa de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC y mostraron tres secciones de corona de 1mm de espesor de tipo silvestre (C57BL/6J) y B6-MRL-Fas<sup>lpr</sup>/J ambos antes y después del tratamiento con DEX (Abreviaturas: Thy, timo; LN, nódulos linfáticos; B, hueso. En resumen, las LN positivas con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC fueron detectadas solamente en 2 de 19 ratones tipo silvestre, mientras que los barridos de microPET de ratones Fas<sup>lpr</sup>/J mostraron la presencia de LN alargados en 9 de 13 ratones. Para determinar si el microPET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC permite la evaluación de intervenciones terapéuticas, se trataron ratones B6-MRL-Fas<sup>lpr</sup>/J con dexametasona (DEX), un glucocorticoide sintético que tiene efectos inmunosupresores pleiotrópicos potentes. Como se muestra en la figura 7, el tratamiento con DEX (2 - 7 días) redujo la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en el timo y en los LN periféricos hasta niveles indetectables. Estos hallazgos sugieren que las imágenes con microPET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC permiten la detección de linfadenopatías en etapas tempranas de autoinmunidad e indican la utilidad de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC como biomarcador para monitorizar los efectos de una terapia inmunosupresora.

La figura 8 presenta los resultados de imágenes de microPET/CT llevados a cabo en ratones transgénicos con receptores de células T BDC-2.5 con la sonda de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC. La sonda BDC-2.5 es un modelo animal bien establecido para diabetes tipo I (basada en autoinmunidad). En la figura 8A, las secciones de corona de 1 mm ilustran el patrón de la acumulación de la sonda [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en ratones BDC-2.5. (Abreviaturas: CV, LN cervical; AX, LN axilar; BR, LN braquial; IN, LN inguinal; THY, Timo; GI, tracto gastrointestinal; H, corazón). En la figura 8B, la acumulación de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC se mide en muestras de tejido de necropsia de ratones BL/6, BALB/c, NOD Ltj y BDC-2.5. Los datos indican que entre estas cepas, los ratones BDC-2.5 acumulan los niveles más altos de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en el bazo y en los nódulos linfáticos. La acumulación de la sonda de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en los órganos linfoides puede indicar el estado activado de los linfocitos T autorreactivos en el ratón.

Síntesis de compuestos

**Ejemplo 6:** Síntesis radioquímica de 1-(2'-Desoxi-2'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosil) citosina ([ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC).

La 2-O-[(Trifluorometil)sulfonyl]-1,3,5-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-ribofuranosa (1) (figura 3) fue preparada como se informa en la literatura<sup>27</sup>. La síntesis del análogo  $^{18}\text{F}$ -fluoro 2 fue llevada a cabo por modificación del método reportado por Mangner et al.<sup>2</sup>. El ión [ $^{18}\text{F}$ ]fluoruro sin portador agregado fue producido por el bombardeo con protones 11 MeV de

agua enriquecida al 98% con  $^{18}\text{O}$  en un cuerpo objetivo de plata usando un ciclotrón RDS-112. El ión  $^{18}\text{F}$ fluoruro acuoso fue tratado con una solución de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1 mg) y Kryptofix 2.2.2 (10 mg) disuelta en agua (0.04 mL) en mezcla con acetonitrilo (0.75 mL). La solución fue evaporada a  $115^\circ\text{C}$  con una corriente de gas nitrógeno. El residuo fue secado mediante la destilación azeotrópica con acetonitrilo (3 X 0.5 mL); específicamente, a una solución del triflato 1 (10 mg) en 0.7 mL de acetonitrilo fue agregada al residuo seco antes de que la mezcla de reacción fuera calentada a  $165^\circ\text{C}$  durante 15 minutos en un recipiente sellado. La solución fue enfriada entonces a temperatura ambiente y pasada a través de un cartucho pequeño de sílica gel, a partir del cual el producto fue eluido con 5 mL de acetato de etilo. A continuación, la solución en acetato de etilo fue evaporada hasta sequedad antes de agregar secuencialmente 0.1 mL de HBr al 30% en solución de ácido acético y luego 0.4 mL de dicloroetano. Esta nueva mezcla de reacción fue calentada a  $80^\circ\text{C}$  en un recipiente sellado durante 10 minutos y la solución fue concentrada a ~50% del volumen inicial. En la etapa siguiente, se agregaron 0.7 mL de tolueno y esta solución fue evaporada a  $110^\circ\text{C}$  para dar el derivado bromo (compuesto 3). Un derivado disililo recién preparado de citosina (4, 35 mg) fue disuelto en 1 mL de dicloroetano y agregado al compuesto bromo 3. La reacción de condensación fue llevada a cabo a  $160^\circ\text{C}$  en un recipiente sellado durante 30 minutos antes de que la mezcla de reacción fuera enfriada hasta temperatura ambiente y luego pasada a través de una pequeña columna de sílica gel. El producto fue eluido de la columna usando 5 mL de una mezcla en solución de 10% de metanol con 90% de diclorometano. Esta solución fue evaporada hasta sequedad a  $100^\circ\text{C}$  y luego tratada con 0.5 mL de una solución de metóxido de sodio 0.5 M en metanol. La mezcla de reacción fue calentada a  $100^\circ\text{C}$  durante 5 minutos en un recipiente sellado y, después de esto la mezcla de reacción básica fue neutralizada con 0.25 mL de HCl 1M en agua. Esta mezcla de reacción fue diluida hasta un volumen total de 3 mL con una mezcla de 1% de etanol con 99% de dihidrógeno fosfato de amonio 10 mM en agua e inyectada en una columna de HPLC semipreparativa (columna C-18 Phenomenex Gemini; 25 cm X 1 cm). La columna de HPLC fue eluida con una mezcla de solventes de 1% de etanol con 99% de dihidrógeno fosfato de amonio 10 mM a una rata de flujo de 5.0 mL/minuto. El efluente de la columna de HPLC fue monitorizado con un detector UV a 254 nm seguido por un detector gamma radioactivo. El  $^{18}\text{F}$ D-FAC química y radioquímicamente puro fue eluido de la columna con un tiempo de tensión de ~15 minutos y el rendimiento radioquímico varió de 20 - 30%.

Las purzas química y radioquímica del  $^{18}\text{F}$ D-FAC fueron determinadas por un método de HPLC analítico utilizando una columna Phenomenex Luna (25 cm X 0.46 cm, tamaño de partícula de 5 $\mu$ ). La columna fue eluida con 10% de etanol y 90% de acetato de amonio 50 mM a una rata de flujo de 1.0 mL/minuto. El efluente de la columna de HPLC fue pasada a través de un detector de UV ( $\lambda = 254$  nm) seguido con un detector de radioactividad gamma. Las purza química y radioquímica del  $^{18}\text{F}$ DFAC preparado como se describió anteriormente excedieron el 99%.

La HPLC analítica también fue utilizada para determinar la actividad específica del  $^{18}\text{F}$ D-FAC. Un rango de masa versus absorción UV a una longitud de onda de 254 nm para D-FAC no radiomarcado fue determinado utilizando el método de HPLC analítica descrito anteriormente y el conjunto de datos fue utilizado para construir una gráfica de calibración. Utilizando esta gráfica de calibración, se encontró que la actividad específica de la  $^{18}\text{F}$ DFAC era >1000 Ci/mmol.

#### **Ejemplo 7:** Síntesis radioquímica de 1-(2'-desoxi-2'- $^{18}\text{F}$ fluoro- $\beta$ -L-arabinofuranosil)citosina ( $^{18}\text{F}$ L-FAC).

El compuesto del título fue sintetizado a través del esquema de reacción mostrado anteriormente usando la 2-O-[(trifluorometil)sulfonil]-1,3,5-tri-O-benzoil- $\alpha$ -L-ribofuranosa en vez del isómero D (1) (figura 4B). Los productos 6 y 7 con tiempos de retención de 11-13 minutos fueron aislados así en rendimientos radioquímicos de 10-15%.

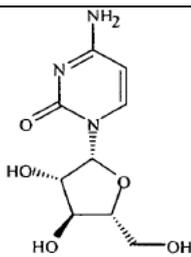
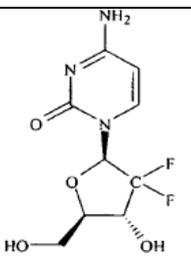
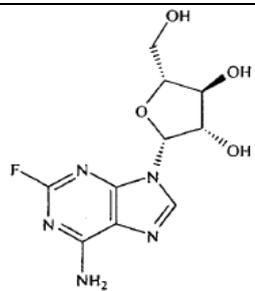
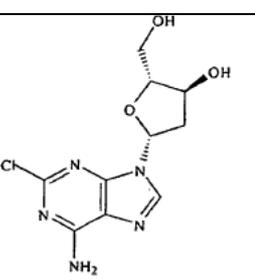
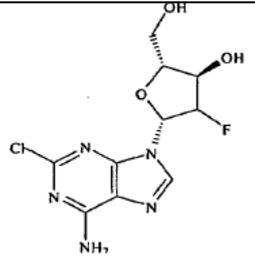
#### **Ejemplo 8:**

Síntesis radioquímica de  $^{18}\text{F}$ D-FRAC,  $^{18}\text{F}$ L-FRAC,  $^{18}\text{F}$ D-FMAC,  $^{18}\text{F}$ L-FMAC,  $^{18}\text{F}$ D-FXAC,  $^{18}\text{F}$ LFXAC,  $^{18}\text{F}$ D-FBAC,  $^{18}\text{F}$ L-FBAC,  $^{18}\text{F}$ D-FCAC,  $^{18}\text{F}$ L-FCAC,  $^{18}\text{F}$ D-FFAC,  $^{18}\text{F}$ L-FFAC siguieron las condiciones de reacción descritas anteriormente para  $^{18}\text{F}$ D-FAC y  $^{18}\text{F}$ L-FAC utilizando derivados de citosina sililada apropiadamente sustituidos como se muestra en las figuras 4C-J.

El PET con  $^{18}\text{F}$ D-FAC puede ser utilizado para determinar las razones para resistencia a fármacos de tumores a análogos nucleosídicos oncolíticos (NA). Los fármacos oncolíticos tales como gemcitabina (Gemzar) y Ara-C son utilizados ampliamente para tratar una variedad de enfermedades malignas hematológicas y tumores sólidos. Sin embargo, una resistencia primaria o adquirida a estos NA y otros profármacos relacionados representa un problema significativo en el tratamiento del cáncer (Tabla 3). La Tabla 3 presenta análogos de nucleósidos profármacos que requieren dCK (desoxicitidina quinasa) para activación y efectos farmacodinámicos. Estudios previos han demostrado que la deficiencia en dCK es un determinante clave de la resistencia a la gemcitabina y Ara-C<sup>19,20</sup>. Adicionalmente, estudios clínicos también han reportado una correlación significativa entre la expresión de dCK en pacientes con cáncer pancreático y su respuesta a tratamiento con gemcitabina, específicamente, pacientes con tumores que expresan bajos niveles de dCK tienen un tiempo de supervivencia disminuido en comparación con aquellos con tumores que expresan altos niveles de dCK<sup>21,22</sup>. Aunque la resistencia a la gemcitabina y Ara-C adquirida usualmente durante el trascurso del tratamiento a través de la selección de clones resistentes a fármacos, ha habido reportes de polimorfismos en el gen dCK que confieren resistencia inherente (primaria) a la gemcitabina<sup>25,26</sup>. La resistencia a fármacos de tumores también ha sido relacionada con la expresión disminuida de

5 trasportadores de nucleósidos (por ejemplo, SLC29A1/ENT1) y desoxicitidina quinasa (dCK); también, la sobrerregulación de la citidina desaminasa (CDA), citidilato desaminasa (DCTD), 5' nucleótidasas, y ribonucleósido reductasa han causado resistencia a los fármacos (véase la revisión<sup>23</sup>). A partir de estos mecanismos, la [<sup>18</sup>F]D-FAC y sus análogos pueden ser utilizados para estimar la resistencia a gemcitabina y Ara-C a través de la expresión disminuida de trasportadores de nucleósidos y/o dCK. Nos enfocamos en el último mecanismo puesto que la dCK representa la etapa limitadora de la velocidad de la activación del profármaco<sup>24</sup>.

Tabla 3

Fármaco	Estructura	Indicaciones
Citosina arabinosido (Ara-C)		Leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda y la fase de explosión de leucemia mielocítica crónica, profilaxis y tratamiento de leucemia meningeal.
Gemcitabina (Gemzar; Lilly)		Cánceres pancreático, de ovario, de seno y de células pulmonares no pequeñas
Fludarabina (Fludara; Berlex)		Leucemia linfocítica crónica de células B (CLL)
Cladribina (Leustatin; R.W. Johnson)		Leucemia de células vellosas
Clofarabina (Evoltra®/Clolar; Bioenvision, Genzyme)		Leucemia linfoblástica aguda reincidente o refractaria después de al menos dos regímenes previos

**Ejemplo 9** - Uso de el PET [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC para determinar la resistencia a análogos de nucleósidos oncolíticos

Para evaluar si el PET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC puede determinar la resistencia a la gemcitabina y a Ara-C, utilizamos un modelo experimental previamente descrito basado en células de leucemia murínica L1210 y sus derivados 10K resistentes a gemcitabina/Ara-C<sup>20</sup>. El defecto molecular responsable de la resistencia en las células L1210 10K es la pérdida de la expresión de dCK debido a una modificación genética del cromosoma 5 en la región 3' del gen dCK. La línea celular 10K fue derivada haciendo explotar las células L1210 para incrementar las concentraciones de gemcitabina<sup>20</sup>; antes de los experimentos, confirmamos que las células 10K de L1210 carecían de la expresión de dCK a nivel de proteína (figura 13). Así, para determinar si la retención de D-FAC se correlaciona con la resistencia a la gemcitabina en estas células, llevamos a cabo ensayos de consumo de trazador radioactivo utilizando [ $^3\text{H}$ ]D-FAC con [ $^3\text{H}$ ]FLT utilizada como control negativo. Observamos que la línea celular L1210-10K resistente a gemcitabina retuvo cantidades mucho menores de [ $^3\text{H}$ ]D-FAC en contraste con la línea celular progenitora L1210 sensible a gemcitabina (figura 14A). En efecto, el consumo de [ $^3\text{H}$ ]D-FAC fue 40 veces más alto en células dCK<sup>+</sup> en comparación con las células que carecen de actividad de dCK (dCK<sup>+</sup> = 1288 fmoles/1x10<sup>5</sup> células; dCK<sup>-</sup> = 34 fmoles/1x10<sup>5</sup> células; p<0.001). En contraste, el consumo de [ $^3\text{H}$ ]FLT fue indistinguible entre estas líneas celulares. La figura 14B presenta un ensayo con [ $^3\text{H}$ ]D-FAC quinasa con las líneas celulares L1210 utilizando [ $^3\text{H}$ ]D-FAC como sustrato (1 microgramo de proteína/reacción). En células dCK positivas mostradas en la figura 14B, la fosforilación de D-FAC fue 52 veces más alta que en células deficientes en dCK (dCK<sup>+</sup> = 62 fmoles; dCK<sup>-</sup> = 1.2 fmoles; p=0.028). La reintroducción de dCK en las células L1210-10K restauró el consumo y fosforilación de [ $^{18}\text{F}$ ]DFAC (figura 14), confirmando así el papel crítico de esta nucleósido quinasa en la regulación del metabolismo de D-FAC.

Al investigar si el PET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC puede distinguir las células cancerosas sensibles a gemcitabina de las células cancerosas resistentes *in vivo*, se inyectaron ratones con células L1210 tipo silvestre o 10K para establecer tumores subcutáneos. Los ratones fueron sometidos a PET con [ $^{18}\text{F}$ ]FDG para confirmar que las células implantadas eran viables y crecían *in vivo*, y los escáneres de PET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC fueron llevados a cabo para comparar la acumulación de D-FAC en células sensibles a gemcitabina contra las resistentes. Ambas células sensibles y resistentes a gemcitabina mostraron acumulación de FDG equivalente (figura 15A). En contraste, la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]DFAC fue detectable claramente en tumores positivos a dCK mientras que esta sonda no se acumuló en tumores deficientes en dCK (figura 15B). Estos datos indican que las mediciones en PET con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC de la actividad de dCK en tumores puede ser utilizada para predecir la resistencia a gemcitabina y profármacos relacionados; esto es, los barridos por PET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC puede distinguir los tumores sensibles y resistentes a gemcitabina *in vivo*. En cada uno de los paneles A y B de la figura 15, la imagen de la izquierda muestra ratones SCID inyectados subcutáneamente con L1210 WT, y la imagen de la derecha muestra ratones SCID inyectados subcutáneamente con L1210-10K. Los ratones fueron inyectados 4 días antes de generar las imágenes.

**Ejemplo 10** – Evaluación preliminar de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en humanos

La [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC fue evaluada en humanos hasta un grado preliminar, mediante el cual investigamos la biodistribución normal y la dosimetría de radiación de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en sujetos humanos (figura 16). Los datos de biodistribución fueron obtenidos a partir de barridos por PET de cuerpo completo corregidos por atenuación de 3 sujetos masculinos saludables después de una inyección de bolus de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC (8.6 ± 2.3 mCi). Los barridos de emisión fueron adquiridos 20, 48, y 76 minutos después de la inyección y los estimativos de dosimetría de radiación fueron calculados utilizando el software Olinda<sup>®</sup>. Los órganos con la acumulación más alta de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC fueron la vejiga, los riñones, el bazo, las glándulas salivares, y el corazón. Los órganos que recibieron las dosis absorbidas más altas fueron la pared de la vejiga urinaria (2.06E-01 rem/mCi), seguida por los riñones (1.06E-01 rem/mCi), bazo (7.36E-02 rem/mCi), células osteogénicas (6.69E-02 rem/mCi), la pared del corazón (5.92E-02 rem/mCi), y el intestino delgado (5.80E-02 rem/mCi) siendo la dosis efectiva global 5.08E-02 rem/mCi. Los estimativos de dosimetría de radiación muestran una alta concordancia con los resultados de dosimetría obtenidos de los estudios en ratones. Los órganos limitantes de la dosis fueron la pared de la vejiga urinaria y los riñones. El barrido con [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en humanos mostrado en la figura 16 recuerda ciertos aspectos de las imágenes de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC adquiridas en ratones, a saber que la sonda se acumula en el bazo y en un menor grado en la médula ósea de la columna vertebral. Sin embargo, en contraste con los ratones, la retención de [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC en el tracto GI es sustancialmente inferior en humanos.

**Ejemplo 11** – Desarrollo y evaluación de novedosos sustratos de dCK marcados con  $^{18}\text{F}$  con estabilidad y especificidad *in vivo* mejoradas

Se abordaron el desarrollo y evaluación de novedosos sustratos de dCK marcados con  $^{18}\text{F}$  con estabilidad y especificidad *in vivo* mejorada. Los sustratos de desoxicitidina quinasa (dCK) resistente a la desaminación son sondas para imágenes para PET potenciales como se muestran en las figuras 2A y 4.

Aunque en ratones la susceptibilidad de D-FAC a la desaminación no afecta su utilidad para imágenes de activación inmune y cáncer, se necesitan análogos de D-FAC resistentes a la desaminación. Los sustratos de dCK resistentes a la desaminación pueden tener varias ventajas sobre D-FAC, incluyendo especificidad, sensibilidad y estabilidad *in vivo* mejoradas. Así sintetizamos y evaluamos sondas potenciales para medir la actividad de dCK por PET (figuras 2A y 4). Por ejemplo, la [ $^{18}\text{F}$ ]L-FAC es un análogo no natural novedoso de D-FAC desarrollado con base en la

enantioselectividad diferencial de dCK y CDA con respecto a D- y L-nucleósidos (nótese que la dCK fosforila tanto enantiómeros D naturales como enantiómeros L no naturales, CDA tiene un requerimiento estricto por análogos de D-desoxicitidina). La [ $^{18}\text{F}$ ]-CA (figuras 2A) es un sustrato de dCK de purina resistente a la desaminación por adenosina desaminasa.

5 La observación de que la acumulación intracelular de [ $^{18}\text{F}$ ]-CA y [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC requiere la expresión de dCK está demostrado en la figura 17 que utiliza las células tipo silvestre L1210 y las células 10K deficientes en dCK. Cada tipo de célula fue incubada separadamente con cada uno de los siguientes: [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC, y [ $^{18}\text{F}$ ]-CA, y el control positivo [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC. Las células fueron incubadas con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC, [ $^{18}\text{F}$ ]-CA, y [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC durante 1 hora. Después de lavados sucesivos, la radioactividad intracelular fue medida por recuento de centelleo para obtener el resultado  
10 mostrado en la figura 17A. Al medir la radioactividad intracelular, se determinó que la retención y la fosforilación de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC y [ $^{18}\text{F}$ ]-CA requiere la expresión de dCK. La figura 17B muestra los resultados obtenidos a partir de la incubación de lisados de células L1210 WT y 10K con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC, [ $^{18}\text{F}$ ]-CA, y [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC; los productos fosforilados fueron medidos por recuento de centelleo.

15 Las imágenes de PET muestran estudios de biodistribución de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC y [ $^{18}\text{F}$ ]-CA en ratones (figura 18). La figura 18A presenta imágenes obtenidas con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC. Se sometieron ratones C57/BL6 a escáner con microPET/CT utilizando [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC (figura 18C). Se obtuvieron imágenes de los ratones 60 minutos después de la inyección intravenosa de las sondas. Las imágenes tienen cortes sagitales, de corona y transversos de 1 mm de espesor. El porcentaje de ID/g es el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido. Las etiquetas son como sigue: B, hueso/médula ósea; BL, vejiga; BR, cerebro; GB, vesícula biliar; GI, tracto gastrointestinal; H, corazón; K, riñón; L, hígado; LU, pulmón; SP, bazo; Thy, timo; ST, estómago. Los resultados de la figura 18 demuestran que la biodistribución de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC recuerda a la [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC. El compuesto de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC fue evaluado así adicionalmente en ratones C57/BL6 que fueron inyectados con las sondas.  
20

La cromatografía en la figura 19 indica que [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC es más resistente a la desaminación que [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC. La figura 19 presenta cromatografías de [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC (figura 19A) y [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC (figura 19B) en plasma a 10 minutos y 45 minutos después de la inyección intravenosa de la sonda a un ratón C57BL/6. La figura 19 presenta cromatografías de [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC (figura 19C) y [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC (figura 19D) en plasma 10 minutos y 45 minutos después de que la sonda fue incubada con plasma humano. Estudios *in vivo* en ratones y datos utilizando plasma humano muestran que [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC tiene una estabilidad mejorada con respecto a la [ $^{18}\text{F}$ ]-D-FAC. En la figura 20, las imágenes por microPET/CT utilizan [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC para mostrar la linfadenopatía en un modelo animal con autoinmunidad sistémica.  
30 Estos es se muestra una masa linfoide incrementada en autoinmunidad sistémica. Las imágenes son de 60 minutos después de la inyección intravenosa [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC y muestra tres secciones de corona de 1 mm de espesor de ratones. Las etiquetas son como sigue: Thy, timo; LN, nódulos linfáticos; BM, médula ósea/hueso. Los ratones que portan la mutación *Fas<sup>lpr</sup>* desarrollan linfadenopatía, artritis y glomerulonefrosis mediada por complejo inmune<sup>29</sup> debido a defectos en la apoptosis de linfocitos T y B. Para evaluar la capacidad del PET con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC para monitorizar un fenotipo inmune, utilizamos ratones *Fas<sup>lpr</sup>* sobre el fondo genético C57BL/6J. La imagen por PET con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC de activación inmune durante una respuesta inmune antitumoral mediada por células T primarias se muestra en la figura 21 (fue utilizado el modelo de oncorretrovirus de inmunidad mediada por células T antitumorales<sup>30</sup>). La figura 21 muestra imágenes de PET/CT de activación inmune localizada en el modelo de inmunidad antitumoral MSV. Los ratones fueron sometidos al oncorretrovirus MoMSV. Las imágenes son de 60 minutos después de la inyección intravenosa de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC y muestran tres secciones de corona de 1 mm de espesor de un ratón en el pico de la respuesta inmune. Las etiquetas son como sigue: B, médula ósea/hueso; BL, vejiga; GI, tracto gastrointestinal; H, corazón; SP, bazo; TU, tumor; LN, nódulo linfático. La figura 22 muestra que el microPET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC puede ser utilizado para visualizar células de leucemia que son positivas en dCK y así predecir la resistencia a la gemcitabina *in vivo* en un modelo de ratón SCID. Esto es, que el microPET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC permite la visualización de células de leucemia L1210 positivas en dCK, sensibles a gemcitabina, pero no la visualización de la sublínea L1210 10K negativa a dCK, negativa a gemcitabina. Los ratones SCID fueron inyectados por vía subcutánea con células L1210WT (izquierda) y L1210-10K (derecha) 4 días antes de las imágenes. La figura 22A muestra barridos de microPET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FAC; y la figura 22B muestra barridos de microPET/CT de [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG.  
45

Las figuras 23 - 28 demuestran hallazgos similares como los anteriores para [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC. La figura 23 muestra que la retención y la fosforilación de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC requiere la expresión dCK. Los lisados de células L1210 tipo silvestre (WT) y deficientes en dCK (10K) fueron incubados durante 20 minutos con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC; los productos fosforilados fueron medidos por recuento de centelleo. La figura 24A muestra la biodistribución de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC a partir de mediciones por PET; la figura 24B muestra la biodistribución de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC a partir de datos de necropsia. La figura 25 muestra que [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC es resistente a la desaminación en ratones. La figura 25A muestra resultados obtenidos con el estándar de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC; y la figura 25B muestra los resultados para [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC en plasma recolectado 45 minutos después de la inyección de la sonda en ratones.  
50  
55

La figura 26 muestra que el microPET/CT con [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC permite la visualización de masas linfoides incrementadas en autoinmunidad sistémica. La figura 26A muestra resultados obtenidos con el ratón BL/6 tipo silvestre. La figura 26B muestra resultados obtenidos con el ratón autoinmune B6.MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*/J. Las imágenes son de 60 minutos después de la inyección intravenosa de [ $^{18}\text{F}$ ]-L-FMAC y muestran tres secciones de corona de 1 mm  
60

de espesor de ratones. Las etiquetas son como sigue: Thy, timo; LN, nódulos linfáticos; BM, médula ósea/hueso; Bl, vejiga; GI, tracto gastrointestinal; GB, vesícula biliar; Sp, bazo; K, riñón; SC, columna vertebral.

5 La figura 27 muestra imágenes de PET/CT de activación inmune localizada en un modelo de inmunoterapia para cáncer. La figura 28 muestra los resultados de imágenes de microPET/CT con [<sup>18</sup>F]L-FMAC de tumores de melanoma B16. Las imágenes muestran secciones de corona de 2 mm de barridos de microPET/CT con [<sup>18</sup>F]L-FMAC 1 hora después de la inyección de la sonda. Los ratones C57BL/6 fueron inyectados por vía subcutánea con  $1 \times 10^5$  células de melanoma B16 y la imágenes se tomaron 7 después. Las etiquetas son como sigue: L, hígado; SP, bazo; GI, tracto gastrointestinal; BL, vejiga; Tu, tumor; SC, columna vertebral; K, riñón.

10 La figura 29 presenta imágenes de barrido por PET de un sujeto humano después de la inyección de [<sup>18</sup>F]D-FAC. La imagen de corona (figura 29B) muestra alta concentración de [<sup>18</sup>F]D-FAC en un nódulo linfático 294. La alta concentración de una sonda para PET, tal como [<sup>18</sup>F]D-FAC, en un órgano o porción del sistema linfático puede ser correlacionada con la actividad anormal en el órgano o porción. Por ejemplo, la alta concentración de [<sup>18</sup>F]D-FAC en el nódulo linfático 294 en la figura 29B puede ser correlacionada con una lesión por linfoma. Por ejemplo, una alta concentración de una sonda para PET, tal como [<sup>18</sup>F]D-FAC, puede ser correlacionada con una enfermedad linfóide maligna. El bazo 292 heterogéneo es visible.

20 La figura 30 presenta barridos de PET/CT de un humano masculino de 56 años de edad con pancreatitis crónica. La cabeza del páncreas 301 es visible. El examen microscópico de una muestra de biopsia mostró un infiltrado inflamatorio predominantemente linfocítico con ductos pequeños degenerativos asociados. La acumulación clara de L-FAC (figura 30A) en las lesiones inflamatorias pancreáticas indica que esta sonda para PET novedosa puede ser una mejor alternativa frente a FDG (figura 30B) para el diagnóstico y manejo de tales trastornos en humanos.

25 Los compuestos de sonda para PET discutidos aquí que son sustratos de dCK (desoxicitidina quinasa) pueden ser utilizados para predecir la resistencia de células cancerosas a ciertos profármacos oncolíticos. Como se discutió anteriormente, las células que son resistentes exhiben expresión subnormal de dCK (véanse figuras 14 y 15). Debido a la expresión subnormal de dCK, estas células resistentes exhiben bajo consumo de los compuestos sonda para PET que son sustratos de dCK (desoxicitidina quinasa). En contraste, las células cancerosas que no son resistentes expresan la dCK, y por lo tanto exhiben un consumo más alto de los compuestos sonda para PET que son sustratos de dCK (desoxicitidina quinasa). Así, la administración de los compuestos sonda para PET a un sujeto o paciente en conjunción con las imágenes de PET puede identificar células cancerosas resistentes a profármacos oncolíticos, facilitando el diseño de un trascurso de tratamiento apropiado.

30 El compuesto sonda para PET [<sup>18</sup>F]D-FAC discutido aquí exhibe baja retención en el cerebro y el miocardio. Esto está en contraste con la FDG de sonda para PET convencional la cual sustancialmente se acumula en el cerebro y en el miocardio. Por lo tanto, la [<sup>18</sup>F]D-FAC es superior a FDG para las imágenes de procesos biológicos y se establece en y cerca del cerebro y el corazón. La señal de fondo mucho más baja de [<sup>18</sup>F]D-FAC en el cerebro y en el corazón permite la visualización de los procesos biológicos y estados de interés. Por ejemplo, los procesos autoinmunes y/o inflamatorios tales como los que pueden ser asociados con esclerosis múltiple y aterosclerosis pueden ser examinados por imágenes con el uso de [<sup>18</sup>F]D-FAC.

40 Todos los ejemplos presentados son representativos y no limitantes. Por lo tanto debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones y sus equivalentes, la invención puede ser puesta en práctica de manera diferente a la descrita específicamente.

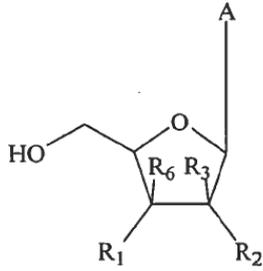
#### 40 Referencias

1. Hamacher, K., Coenen, H. H., & Stocklin, G. (1986) *J Nucl Med* 27, 235-238.
2. Mangner, T. J., Klecker, R. W., Anderson, L., & Shields, A. F. (2003) *Nuclear Medicine and Biology* 30, 215-224.
3. Qi, J., Leahy, R. M., Cherry, S. R., Chatziioannou, A., & Farquhar, T. H. (1998) *Phys Med Biol* 43, 1001-1013.
4. Chow, P. L., Stout, D. B., Komisopoulou, E., & Chatziioannou, A. F. (2006) *Phys Med Biol* 51, 379-390.
- 45 5. Loening, A. M. & Gambhir, S. S. (2003) *Mol Imaging* 2, 131-137.
6. Dubey, P., Su, H., Adonai, N., Du, S., Rosato, A., Braun, J., Gambhir, S. S., & Witte, O. N. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1232-1237.
7. Li, C. & Wong, W. H. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 31-36.
8. Kanehisa, M. & Goto, S. (2000) *Nucleic Acids Research* 28, 27-30.

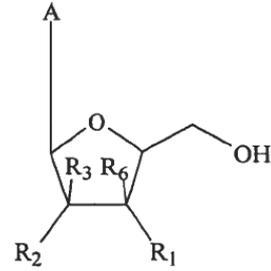
9. Liu, G., Loraine, A. E., Shigeta, R., Cline, M., Cheng, J., Valmeekam, V., Sun, S., Kulp, D., & Siani-Rose, M. A. (2003) *Nucleic Acids Research* 31, 82-86.
10. Afar, D. E., Han, L., McLaughlin, J., Wong, S., Dhaka, A., Parmar, K., Rosenberg, N., Witte, O. N., & Colicelli, J. (1997) *Immunity* 6, 773-782.
- 5 11. Ahmed, M., Dusanter-Fourt, I., Bernard, M., Mayeux, P., Hawley, R. G., Bennardo, T., Novault, S., Bonnet, M. L., Gisselbrecht, S., Varet, B., et al. (1998) *Oncogene* 16, 489-496.
12. Nakano, Y., Tanno, S., Koizumi, K., Nishikawa, T., Nakamura, K., Minoguchi, M., Izawa, T., Mizukami, Y., Okumura, T., & Kohgo, Y. (2007) *British Journal of Cancer* 96, 457-463.
- 10 13. van der Wilt, C. L., Kroep, J. R., Bergman, A. M., Loves, W. J., Alvarez, E., Talianidis, I., Eriksson, S., van Groeningen, C. J., Pinedo, H. M., & Peters, G. J. (2000) *Advances in experimental medicine and biology* 486, 287-290.
14. Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., & Eklund, H. (2002) *Cell Mol Life Sci* 59, 1327-1346.
15. Griffith, D. A. & Jarvis, S. M. (1996) *Biochimica et Biophysica Acta* 1286, 153-181.
- 15 16. Shields, A. F., Grierson, J. R., Dohmen, B. M., Machulla, H. J., Stayanoff, J. C., Lawhorn-Crews, J. M., Obradovich, J. E., Muzik, O., & Mangner, T. J. (1998) *Nature medicine* 4, 1334-1336.
17. Schepers, K., Toebes, M., Sotthewes, G., Vyth-Dreese, F. A., DelleMijn, T. A., Melief, C. J., Ossendorp, F., & Schumacher, T. N. (2002) *J Immunol* 169, 3191-3199.
18. Becker, S. & Haskill, S. (1981) *International Journal of Cancer* 27, 229-234.
19. Kroep, J.R., et al. (2002) *Mol Cancer Ther* 1, 371-376.
- 20 20. Jordheim, L.P., et al. (2004) *Clin Cancer Res* 10, 5614-5621.
21. Sebastiani, V., et al. (2006) *Clin Cancer Res* 12, 2492-2497.
22. Ueno, H., Kiyosawa, K. & Kaniwa, N. (2007) *Br J Cancer* 97, 145-151.
23. Jordheim, L.P. & Dumontet, C. (2007) *Biochimica et Biophysica Acta* 1776, 138-159.
24. Giovannetti, E., et al. (2007) *Pharmacol Res* 55, 343-349.
- 25 25. Shi, J.Y., et al. (2004) *Pharmacogenetics* 14, 759-768.
26. Lamba, J.K., et al. (2007) *J Pharmacol Exp Ther* 323, 935-945.
27. Tann, C.H., Brodfuehrer, P.R., Brundidge, S.P., Sapino, C.J. & Howell, H.G. (1985) *Journal of Organic Chemistry* 50, 3644-3647.
- 30 28. Pankiewicz, K.W., Krzeminski, J., Ciszewski, L.A., Ren, W.Y. & Watanabe, K.A. (1992) *Journal of Organic Chemistry* 57, 553-559.
29. Morse, H.C., 3rd, et al. (1982) *J Immunol* 129, 2612-2615.
30. Fefer, A., McCoy, J.L., Perk, K. & Glynn, J.P. (1968) *Cancer Research* 28, 1577-1585.
31. Radu, C.G. et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci* 104: 6, 1937-1942

REIVINDICACIONES

1. Una sonda para PET que comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula IA y/o IB

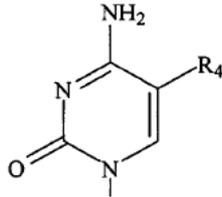


Fórmula IA



Fórmula IB

en donde A es



5

y

R<sub>1</sub> es OH o F,

R<sub>2</sub> es H o F,

R<sub>3</sub> es F,

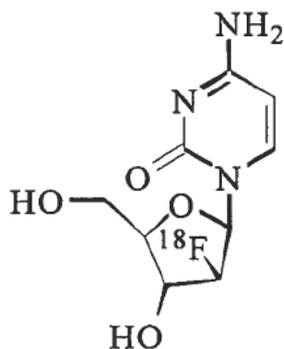
10 R<sub>4</sub> es H, F, Cl, Br, CH<sub>3</sub>, o C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>,

R<sub>6</sub> es H, y

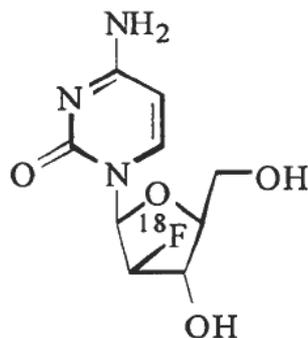
Al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>3</sub> es <sup>18</sup>F.

2. La sonda para PET de la reivindicación 1, en donde R<sub>4</sub> es Cl o Br.

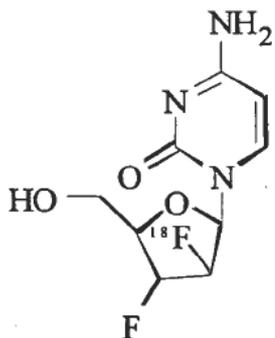
3. La sonda para PET de la reivindicación 1, en donde el compuesto comprende la fórmula general:



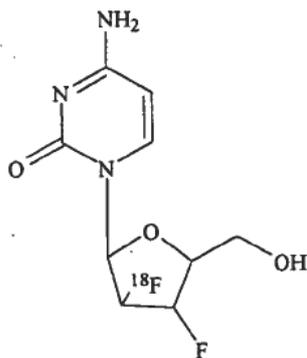
[<sup>18</sup>F]D-FAC  
 {D-<sup>18</sup>F-FAC; 2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -β-D-arabinofuranosilcitosina};



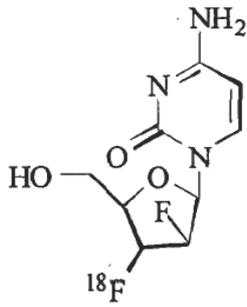
[<sup>18</sup>F]L-FAC  
 {L-<sup>18</sup>F-FAC; 2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -β-L-arabinofuranosilcitosina};



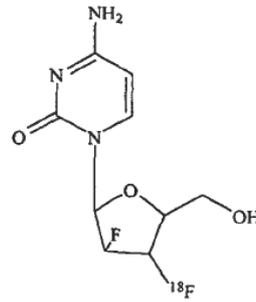
Compuesto D #6  
 {2',3'-dideoxy-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -3'-fluoro-β-D-arabinofuranosilcitosina};



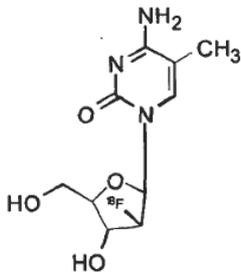
Compuesto L #6  
 {2',3'-dideoxy-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -3'-fluoro-β-L-arabinofuranosilcitosina};



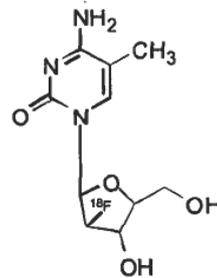
**Compuesto D #7**  
 {2',3'- dideoxi-2'-fluoro-3'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -β-D- arabinofuranosilcitosina};



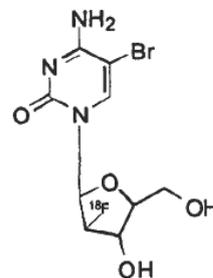
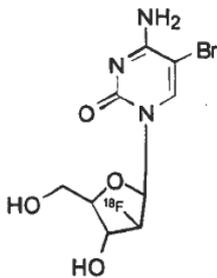
**Compuesto L #7**  
 {2',3'- dideoxi-2'-fluoro-3'-[<sup>18</sup>F]fluoro  
 -β-L- arabinofuranosilcitosina};



**D-<sup>18</sup>F-FMAC**  
 {2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-metil  
 -β-D- arabinofuranosilcitosina};

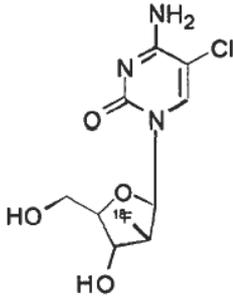


**L-<sup>18</sup>F-FMAC**  
 {2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-metil  
 -β-L- arabinofuranosilcitosina};



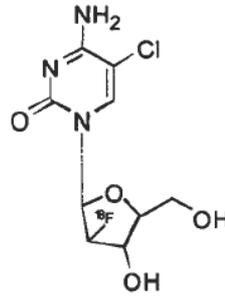
D-<sup>18</sup>F-FBAC

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-bromo  
-β-D-arabinofuranosilcitosina};



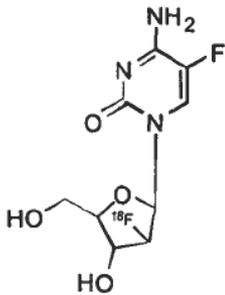
L-<sup>18</sup>F-FBAC

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-bromo  
-β-L-arabinofuranosilcitosina};



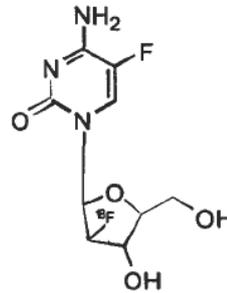
D-<sup>18</sup>F-FCAC

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-cloro  
-β-D-arabinofuranosilcitosina};



L-<sup>18</sup>F-FCAC

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-cloro  
-β-L-arabinofuranosilcitosina};



D-<sup>18</sup>F-FFAC

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-fluoro  
-β-D-arabinofuranosilcitosina};

4. La sonda para PET de la reivindicación 1, en donde:

el compuesto es un sustrato para dCK (desoxicitidina quinasa); o

el compuesto cuando se administra a un sujeto no se acumula en una concentración alta en el cerebro o miocardio.

5. La sonda para PET de la reivindicación 4 en donde:

L-<sup>18</sup>F-FFAC

{2'-desoxi-2'-[<sup>18</sup>F]fluoro-5-fluoro  
-β-L-arabinofuranosilcitosina};

el compuesto es resistente a la desaminación; o

el compuesto es resistente a la desaminación por citidina desaminasa (CDA); o

el compuesto es seleccionado del grupo consistente de [<sup>18</sup>F]L-FAC, [<sup>18</sup>F]L-FBAC, [<sup>18</sup>F]L-FCAC, [<sup>18</sup>F]L-FFAC, y [<sup>18</sup>F]L-FMAC.

5 6. Una sonda para PET de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de una condición seleccionada del grupo consistente de artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, diabetes tipo I, EAE (encefalomielitis autoinmune experimental), esclerosis múltiple, aterosclerosis, un trastorno autoinmune y cáncer.

10 7. La sonda para PET para uso de la reivindicación 6, en donde la sonda para PET es usada para evaluar la eficacia en el tratamiento de cáncer de un agente anticáncer que es consumido por las células a través de transportadores de nucleósidos y fosforilación mediada por la desoxicitidina quinasa (dCK).

8. Un método para sintetizar un compuesto sonda para PET, que comprende:

hacer reaccionar 2-O-[(trifluorometil)sulfonyl]-1,3,5-tri-O-benzoil- $\alpha$ -Q-ribofuranosa con ión [<sup>18</sup>F]fluoruro para formar 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-1,3,5-tri-O-benzoil- $\alpha$ -Q-arabinofuranosa como un primer intermediario radiomarcado;

15 hacer reaccionar el primer intermediario radiomarcado con bromuro de hidrógeno para formar 2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil- $\alpha$ -Q-arabinofuranosil bromuro como un segundo intermediario radiomarcado;

hacer reaccionar el segundo intermediario radiomarcado con 5-Z-4-N-(trimetilsilil)-2-O-(trimetilsilil)pirimidina-4-amina para formar 5-Z-1-(2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro-3,5-di-O-benzoil- $\beta$ -Q-arabinofuranosil)citosina como un tercer intermediario radiomarcado;

20 hacer reaccionar el tercer intermediario radiomarcado con un alcóxido para formar el compuesto sonda para PET 5-Z-1-(2-desoxi-2-[<sup>18</sup>F]fluoro- $\beta$ -Q-arabinofuranosil)citosina,

en donde Z es hidrógeno, halógeno, o alquilo inferior,

en donde alquilo inferior es un alquilo que tiene de 1 a 6 carbonos, y

en donde Q es D o L del sistema D, L para denominar enantiómeros.

9. El método de la reivindicación 8, en donde:

25 el alcóxido es seleccionado del grupo consistente de un metóxido de álcali y metóxido de sodio; o

Z es seleccionado del grupo consistente de hidrógeno, flúor, cloro, bromo y metilo.

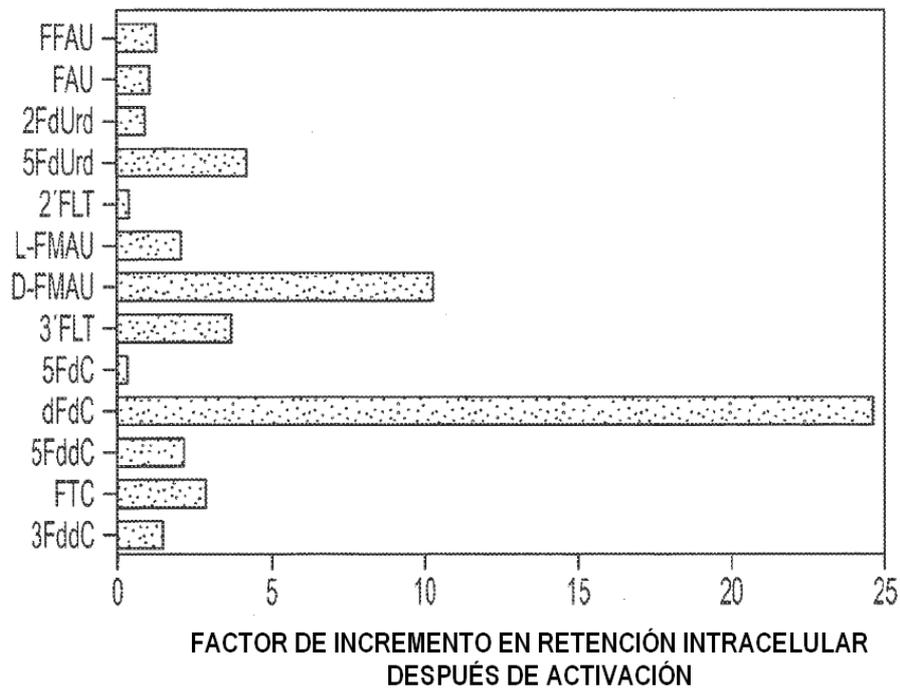


FIG. 1A

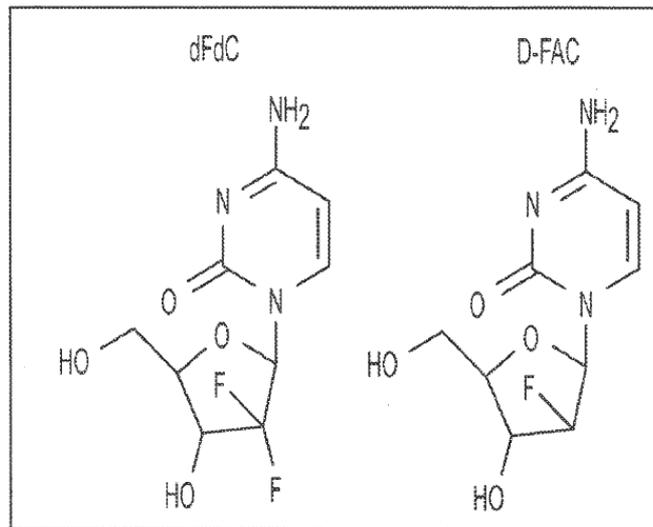


FIG. 1B

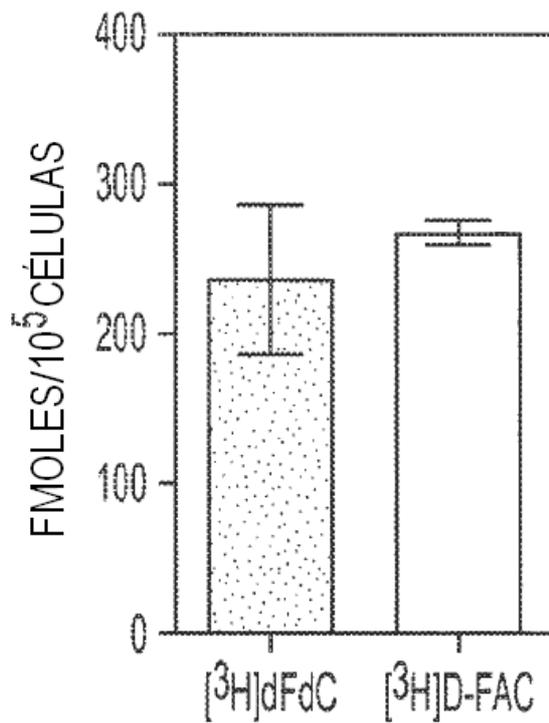


FIG. 1C

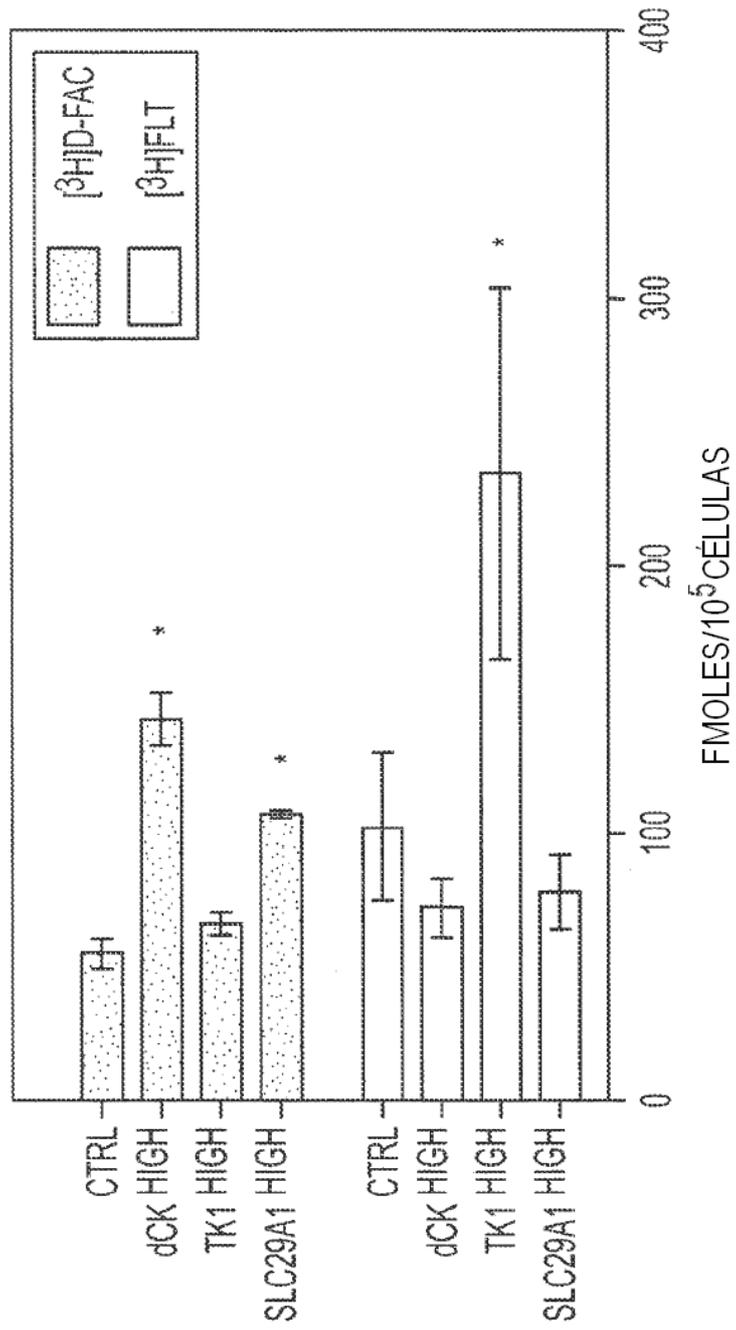


FIG. 1D

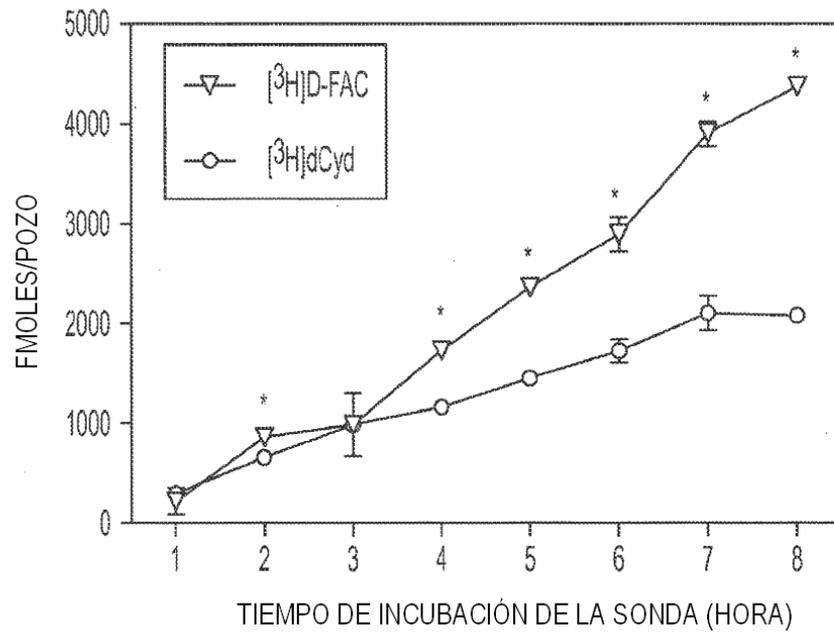


FIG. 1E

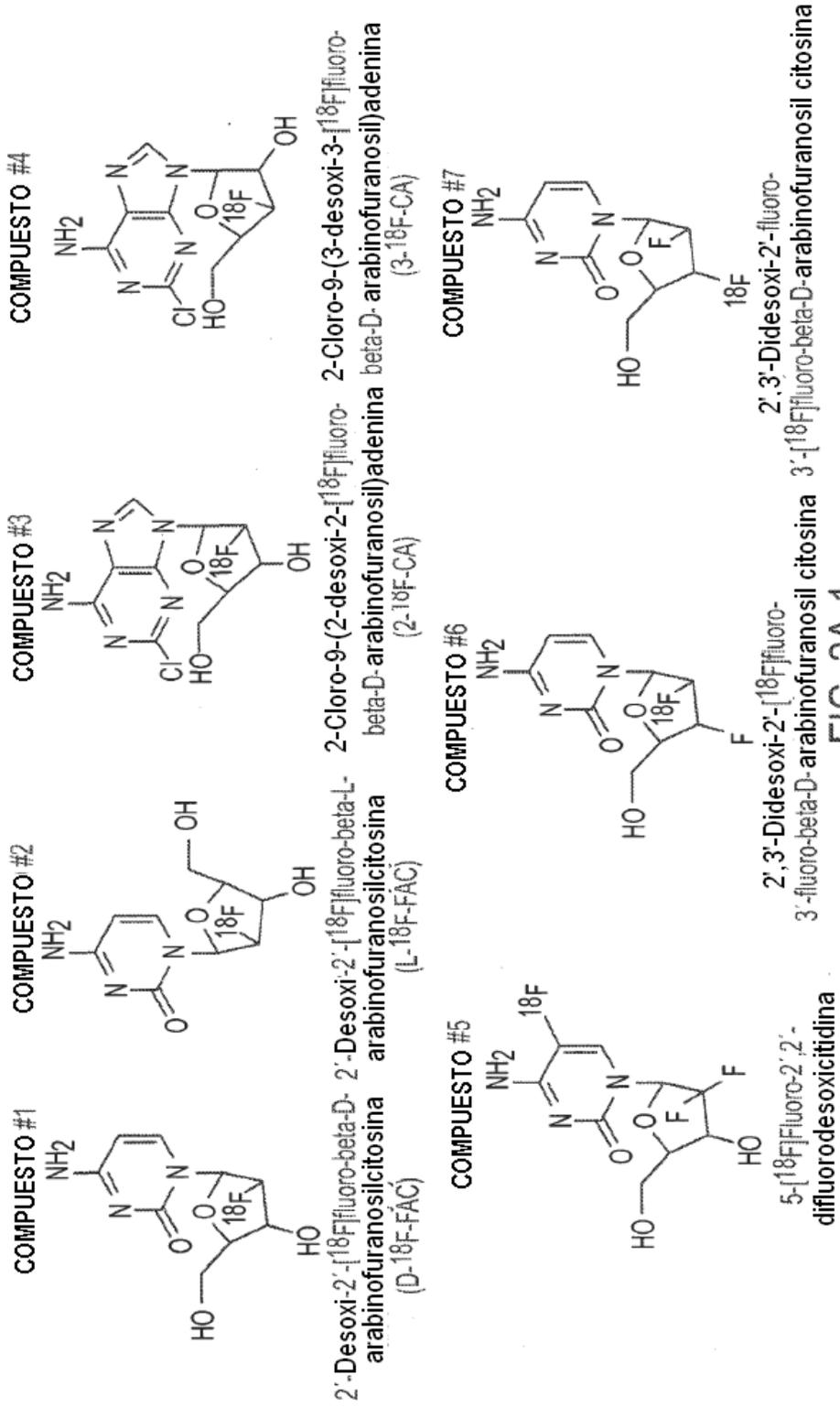


FIG. 2A-1

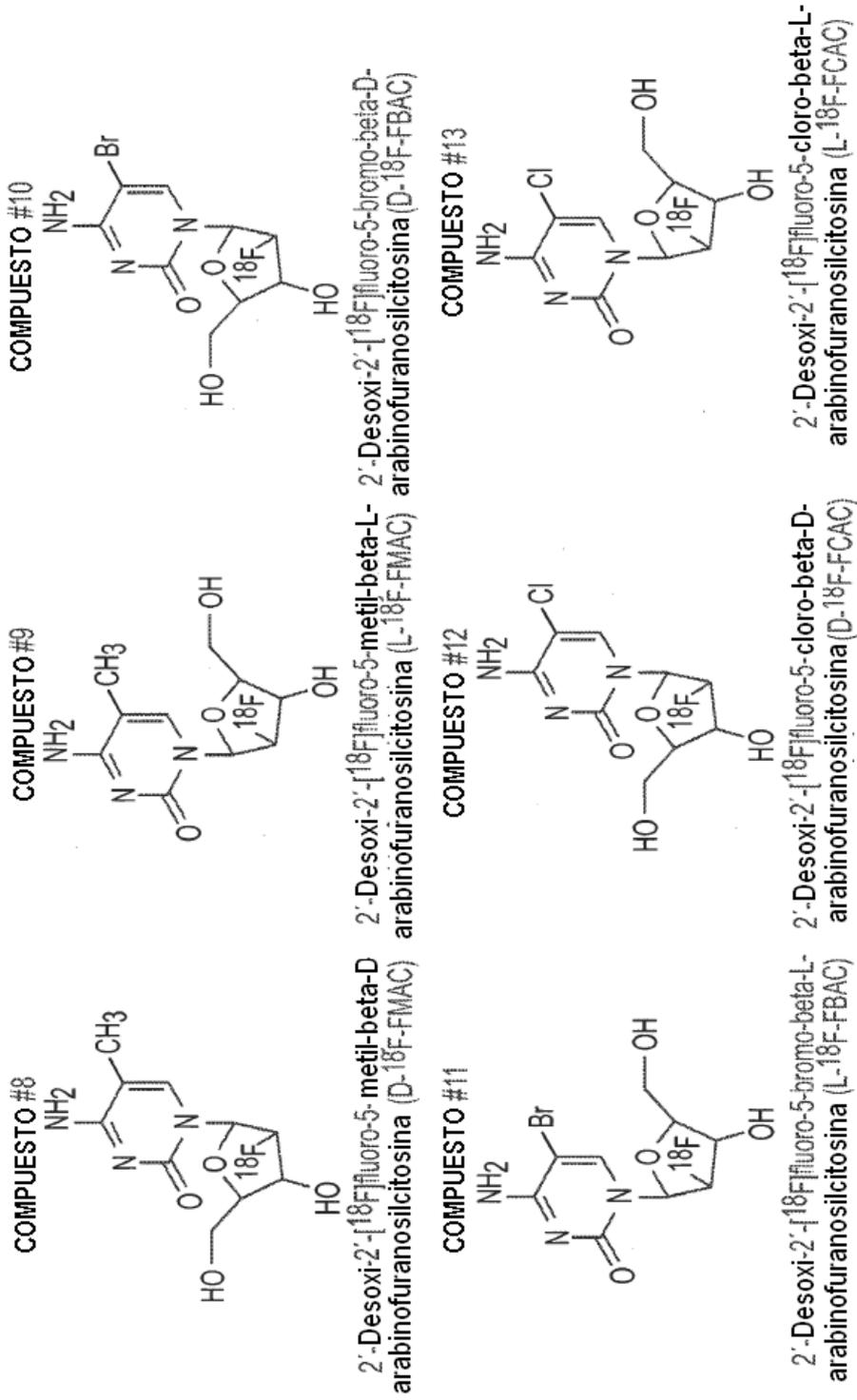


FIG. 2A-2

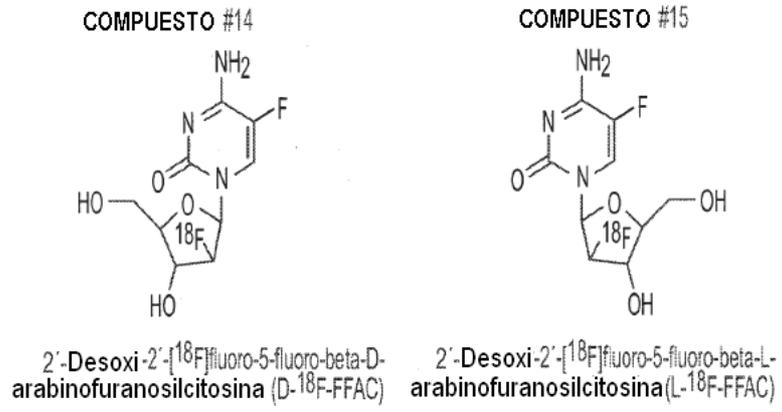


FIG. 2A-3

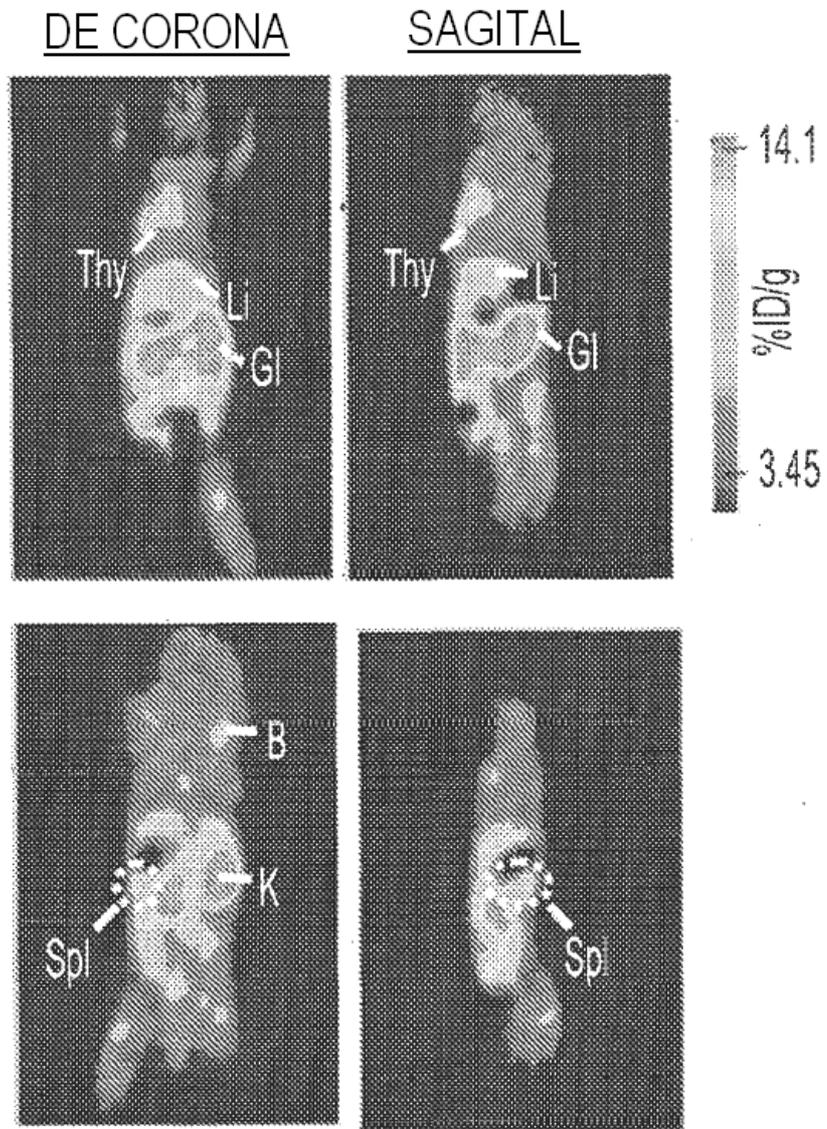


FIG. 2B

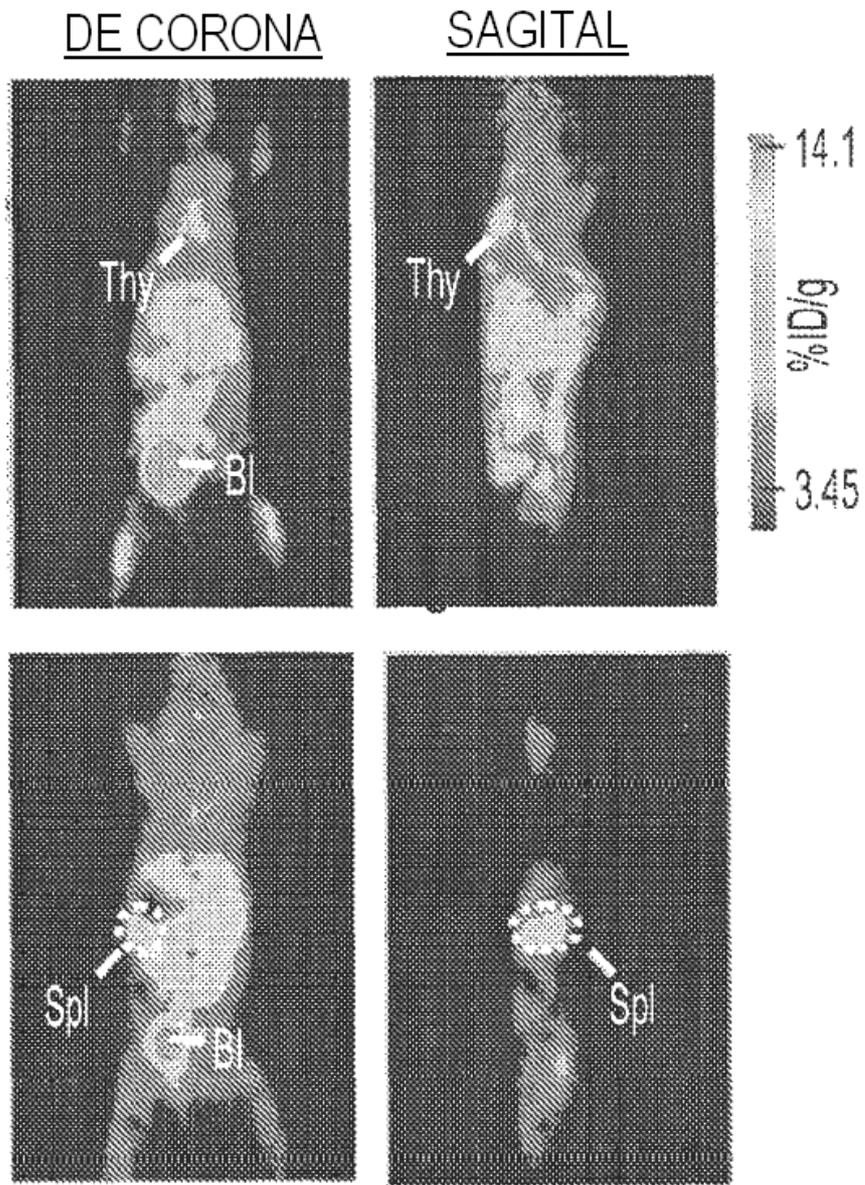


FIG. 2C

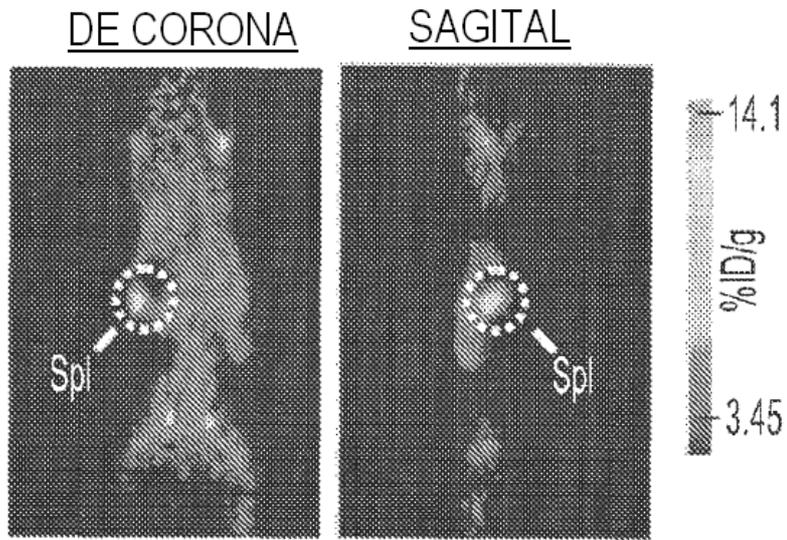


FIG. 2D

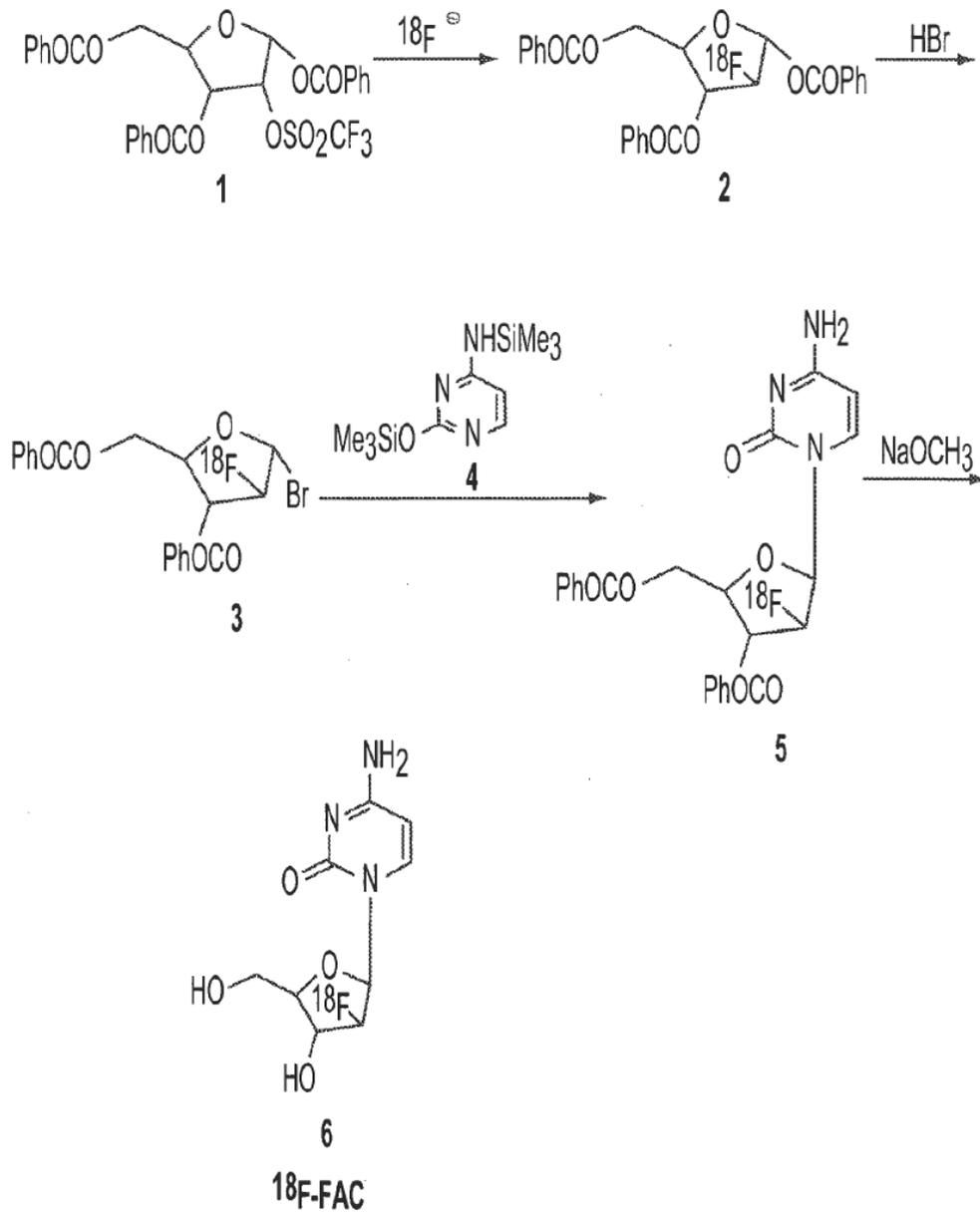


FIG. 3A

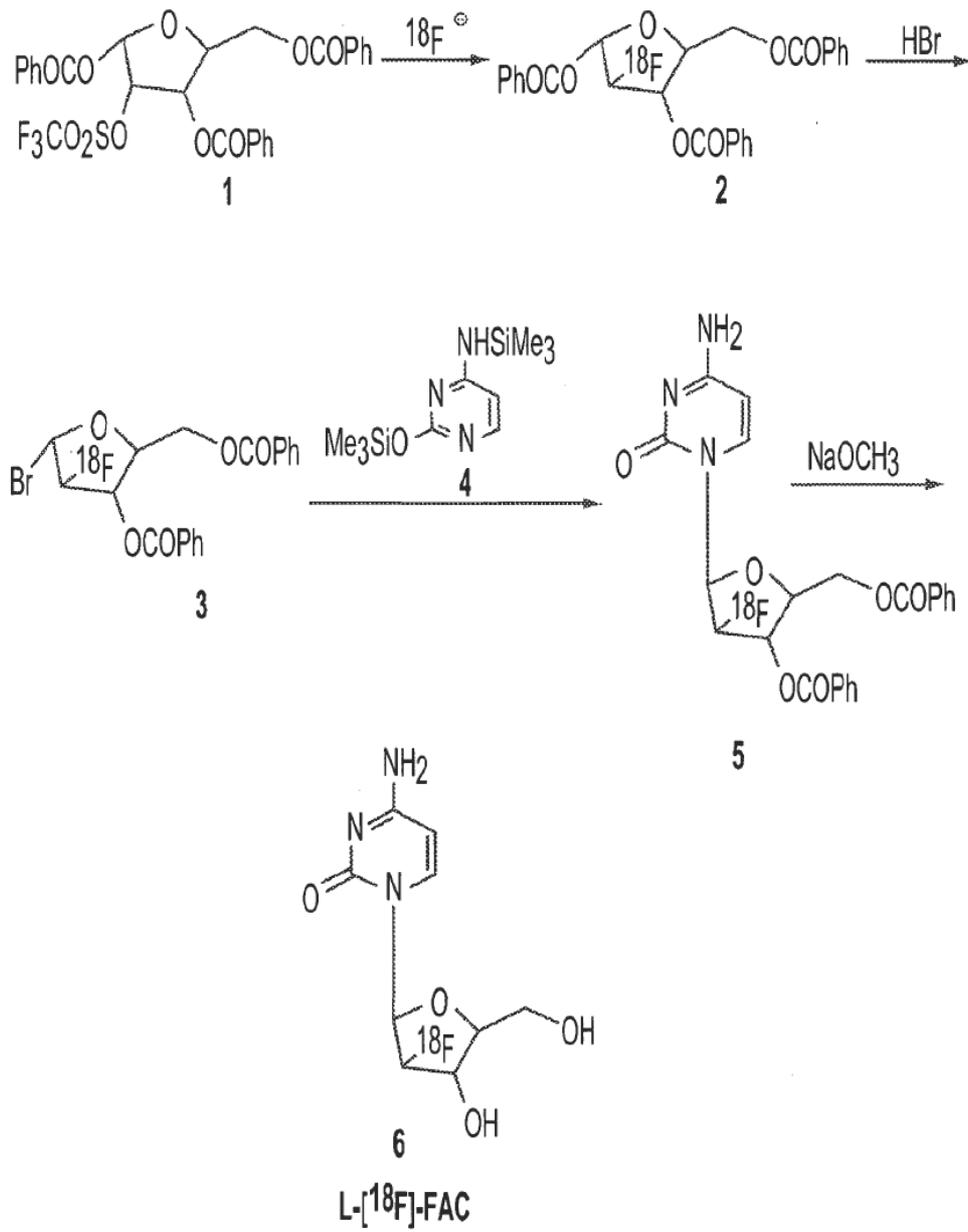


FIG. 4B

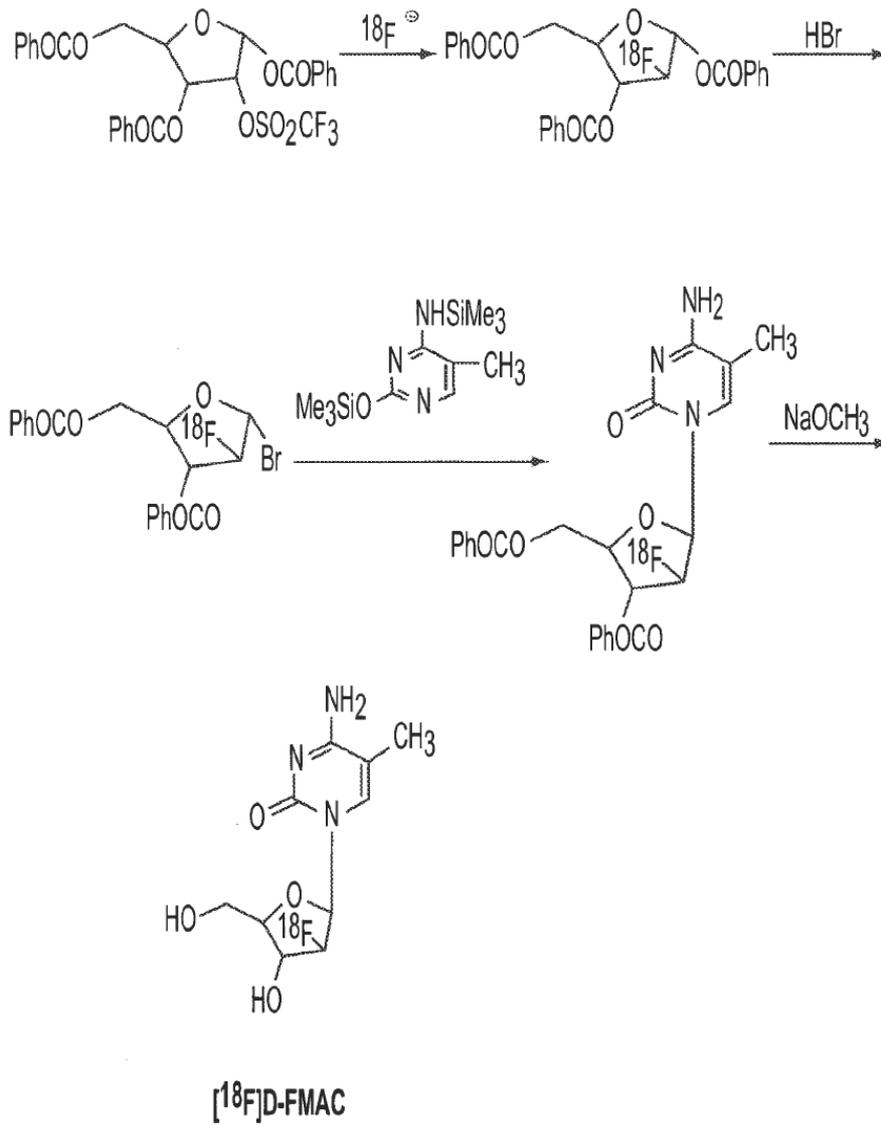


FIG. 4C

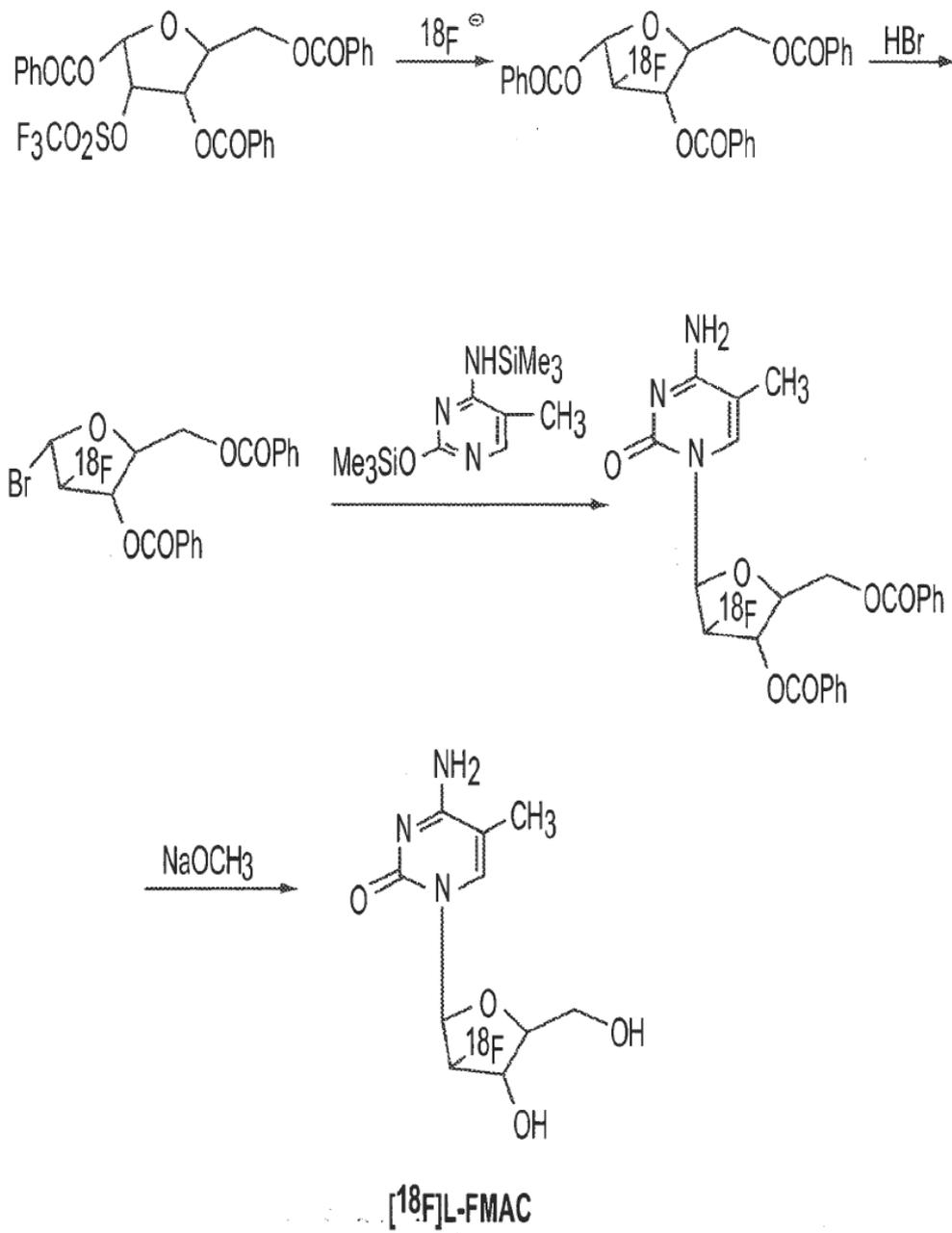
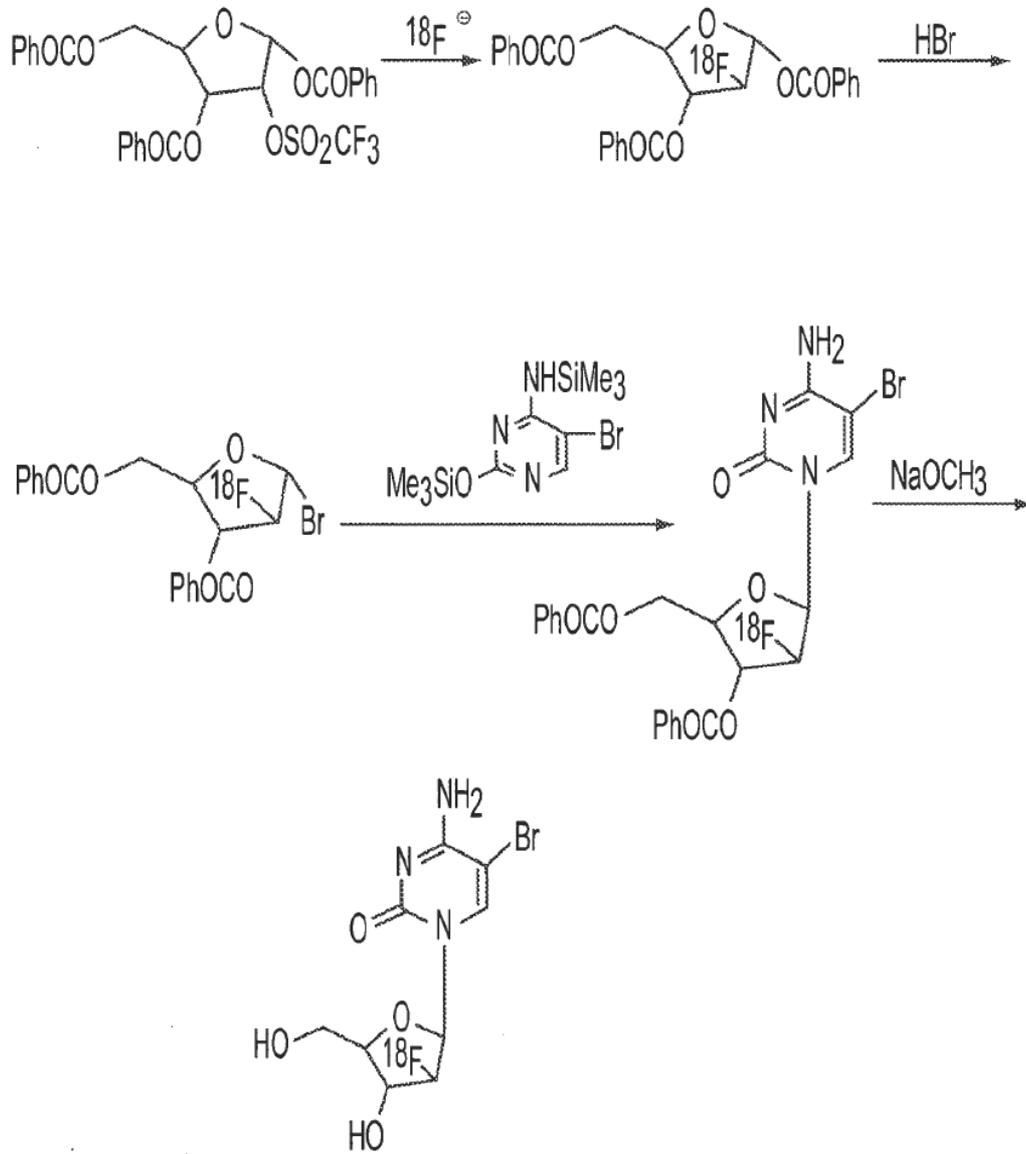


FIG. 4D



$[^{18}\text{F}]\text{D-FBAC}$

FIG. 4E

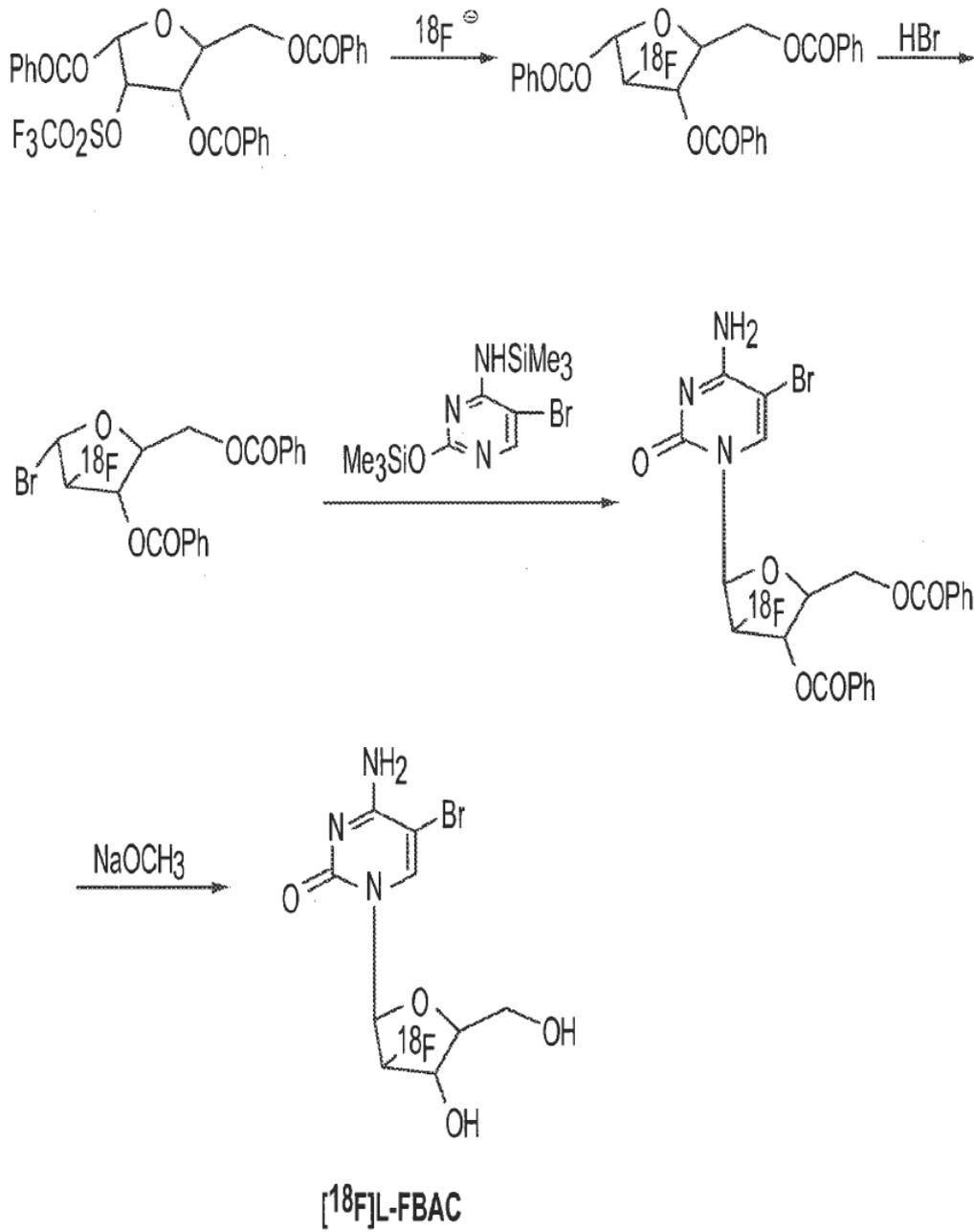


FIG. 4F

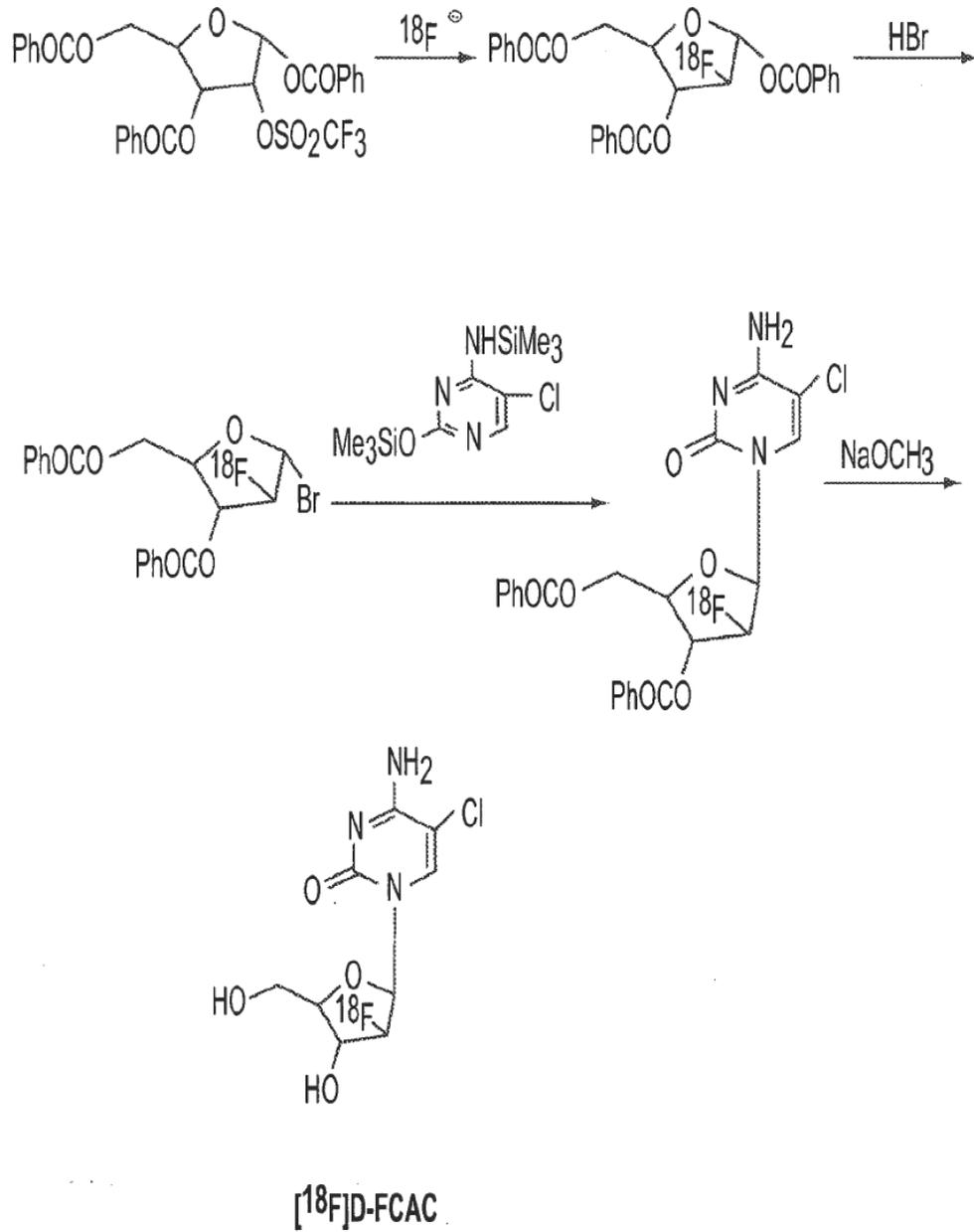


FIG. 4G

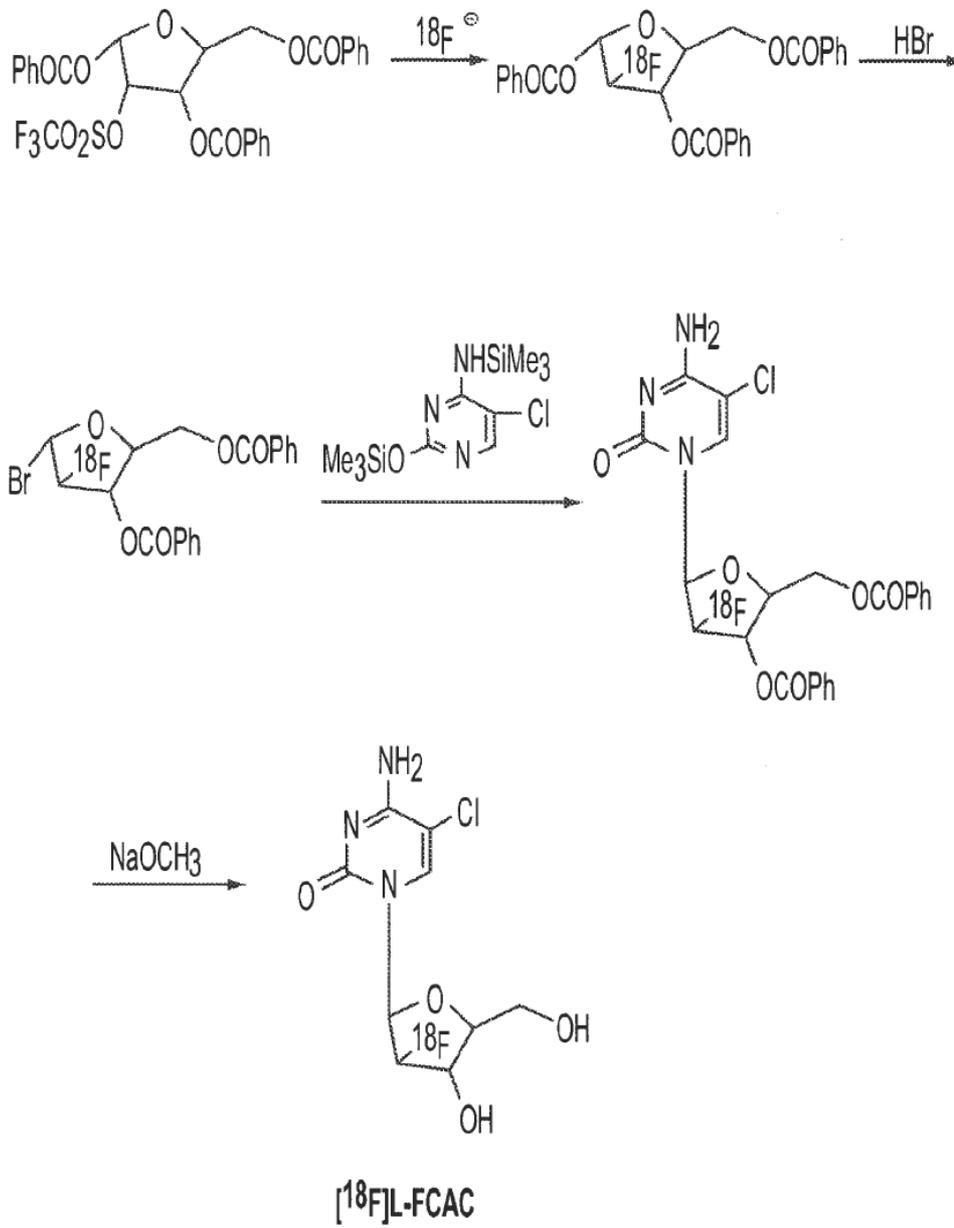


FIG. 4H

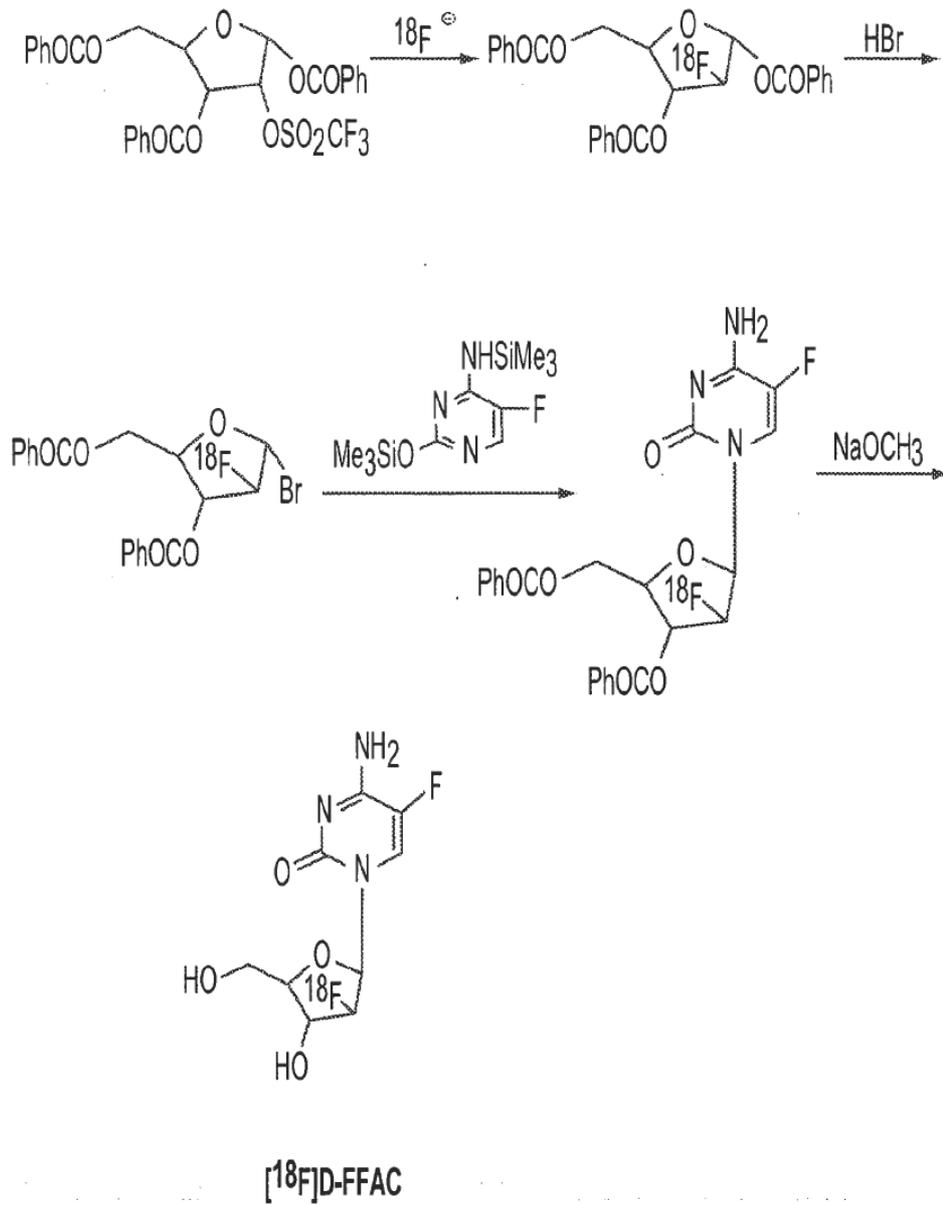


FIG. 4I



AUTORRADIOGRAFÍA DE CUERPO COMPLETO DIGITAL [ $^{18}\text{F}$ ]D-FAC (DWBA)

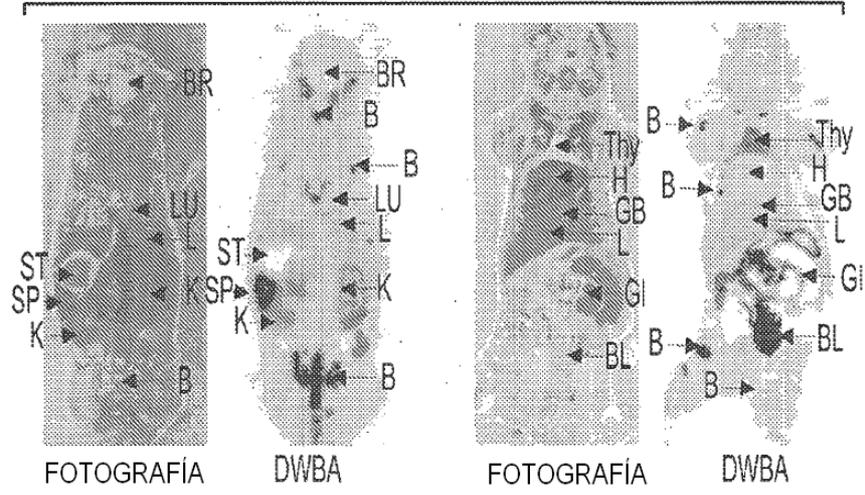


FIG. 5A

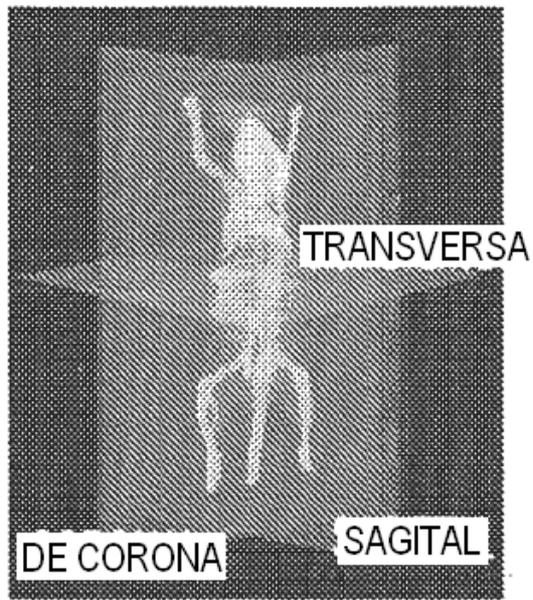


FIG. 5B

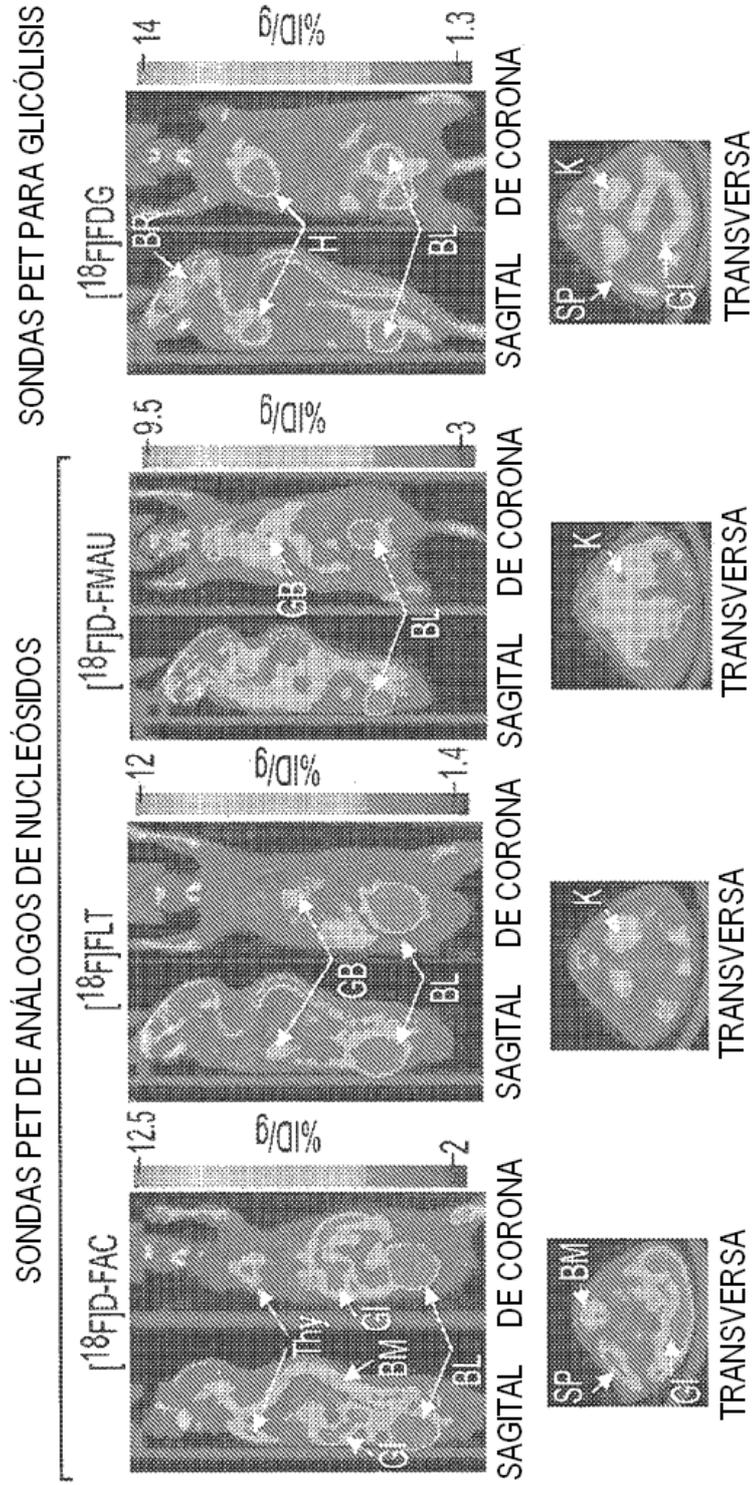


FIG. 5C

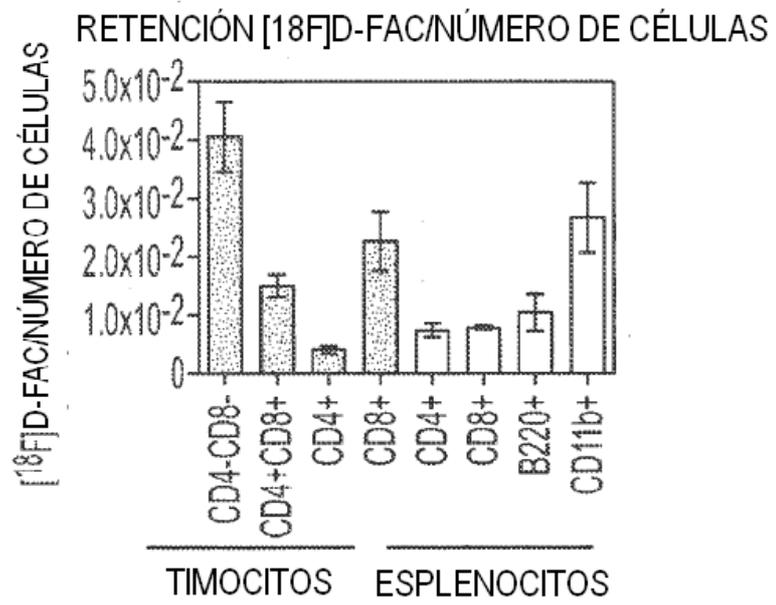


FIG. 5D

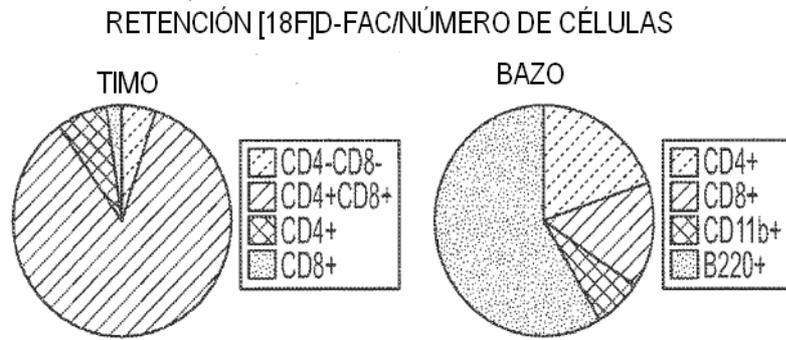


FIG. 5E

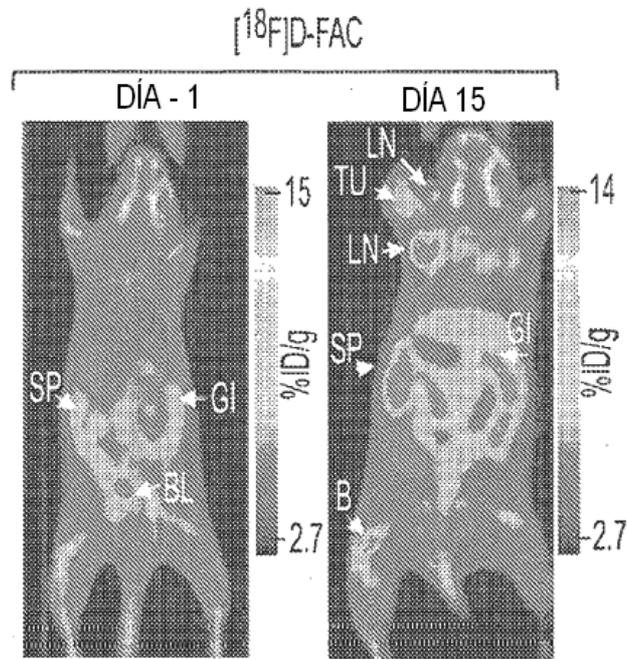


FIG. 6A

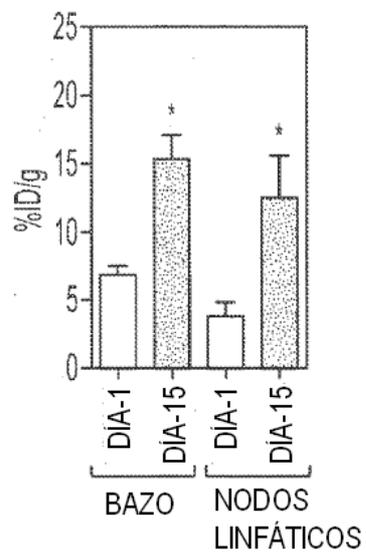


FIG. 6B

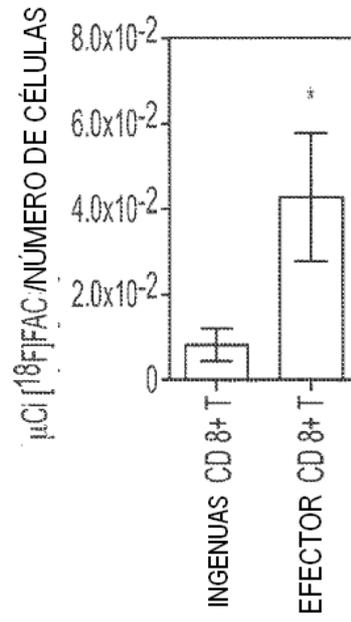


FIG. 6C

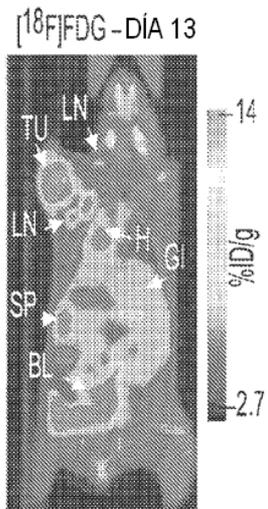


FIG. 6D

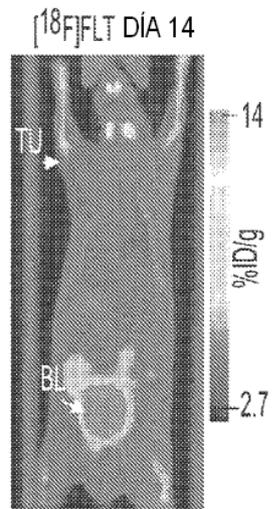


FIG. 6E

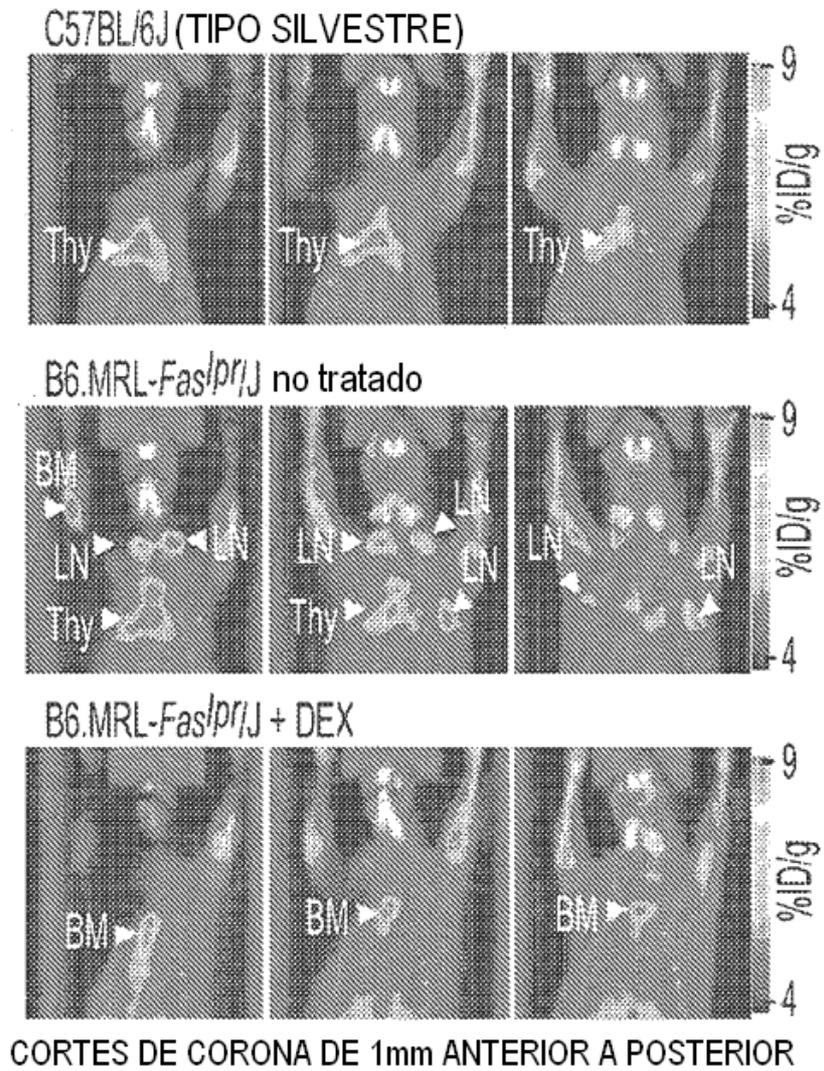


FIG. 7

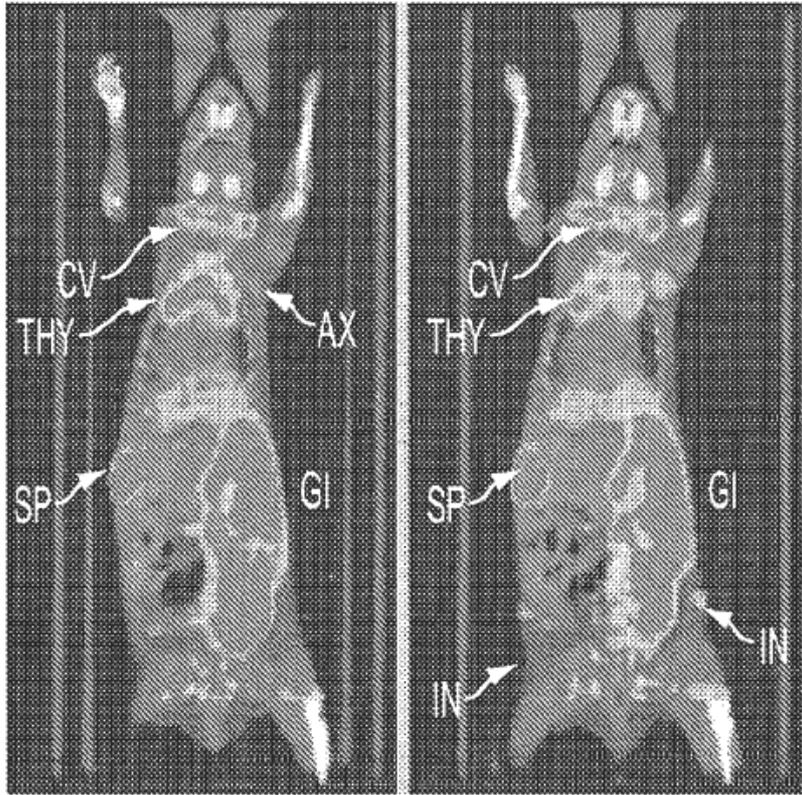


FIG. 8A

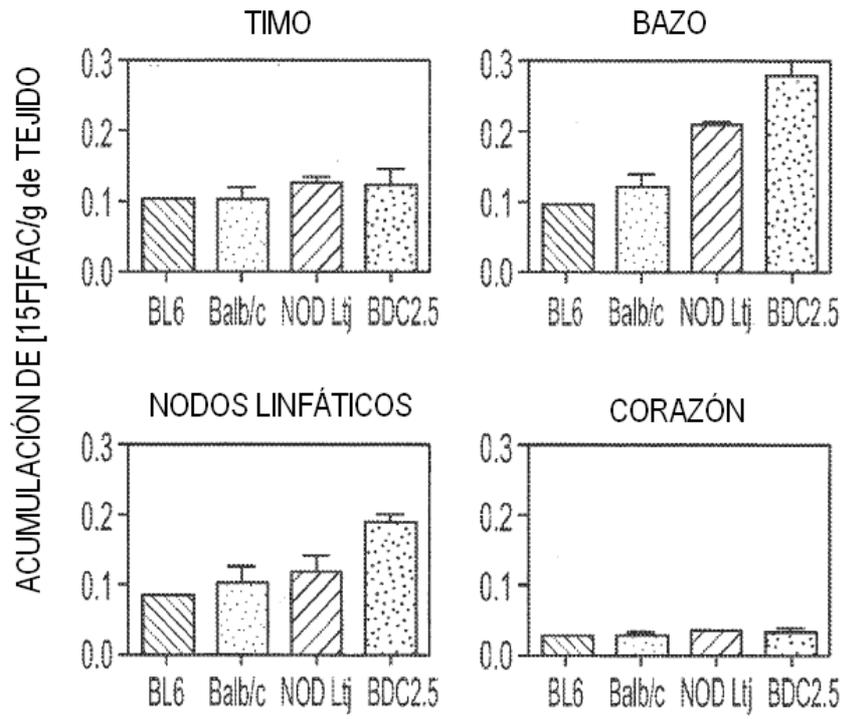


FIG. 8B

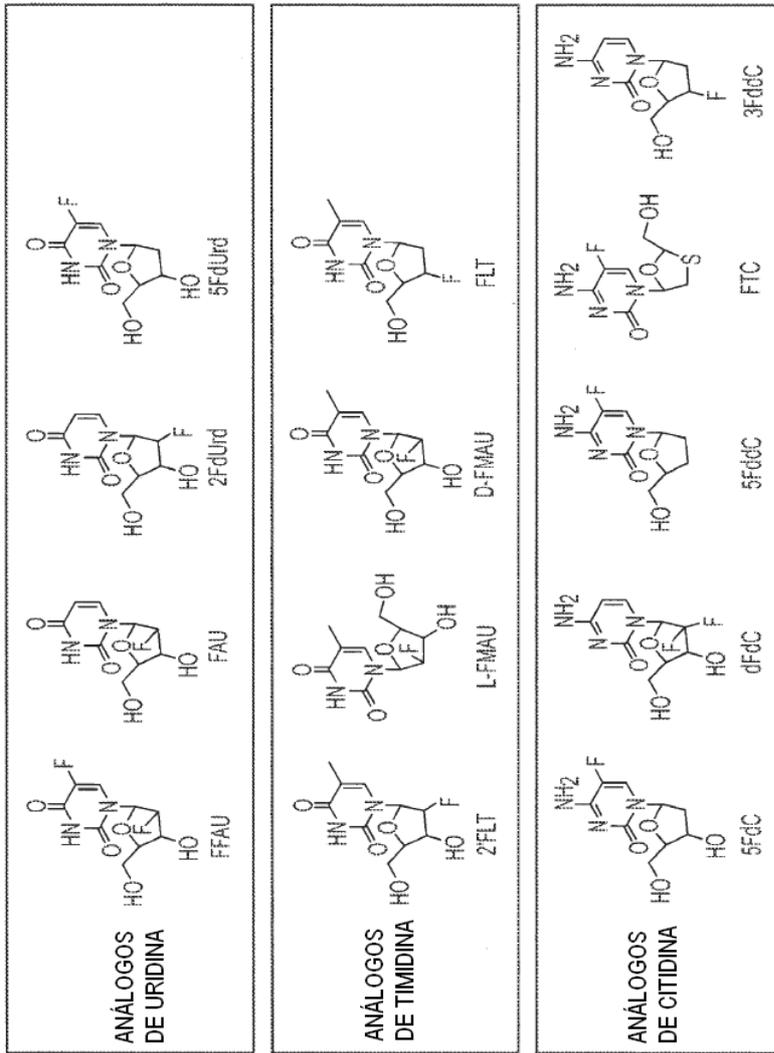


FIG. 9

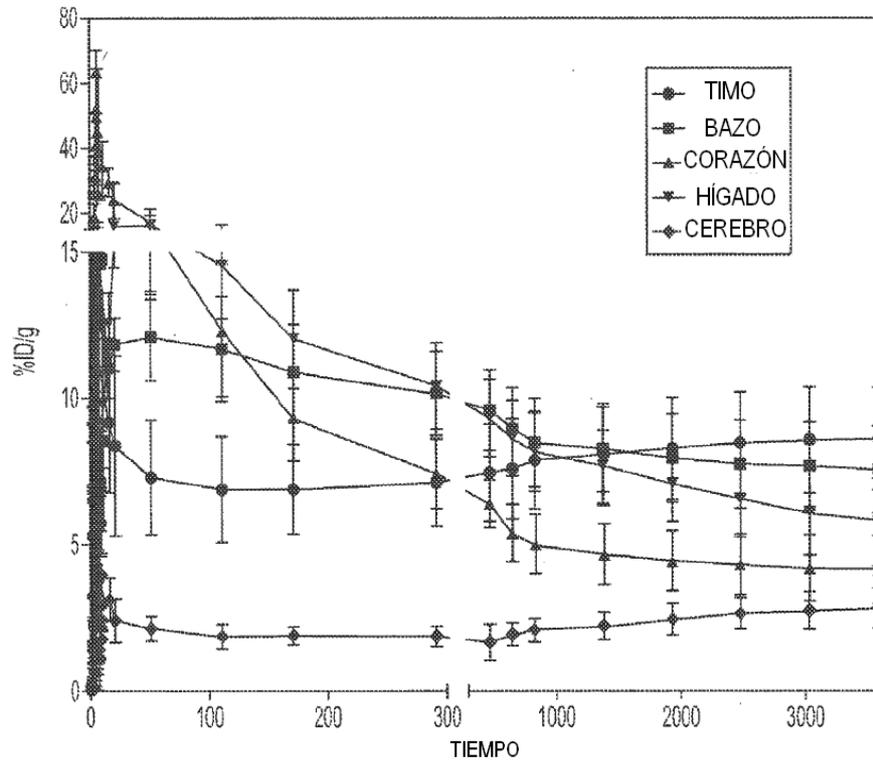


FIG. 10A

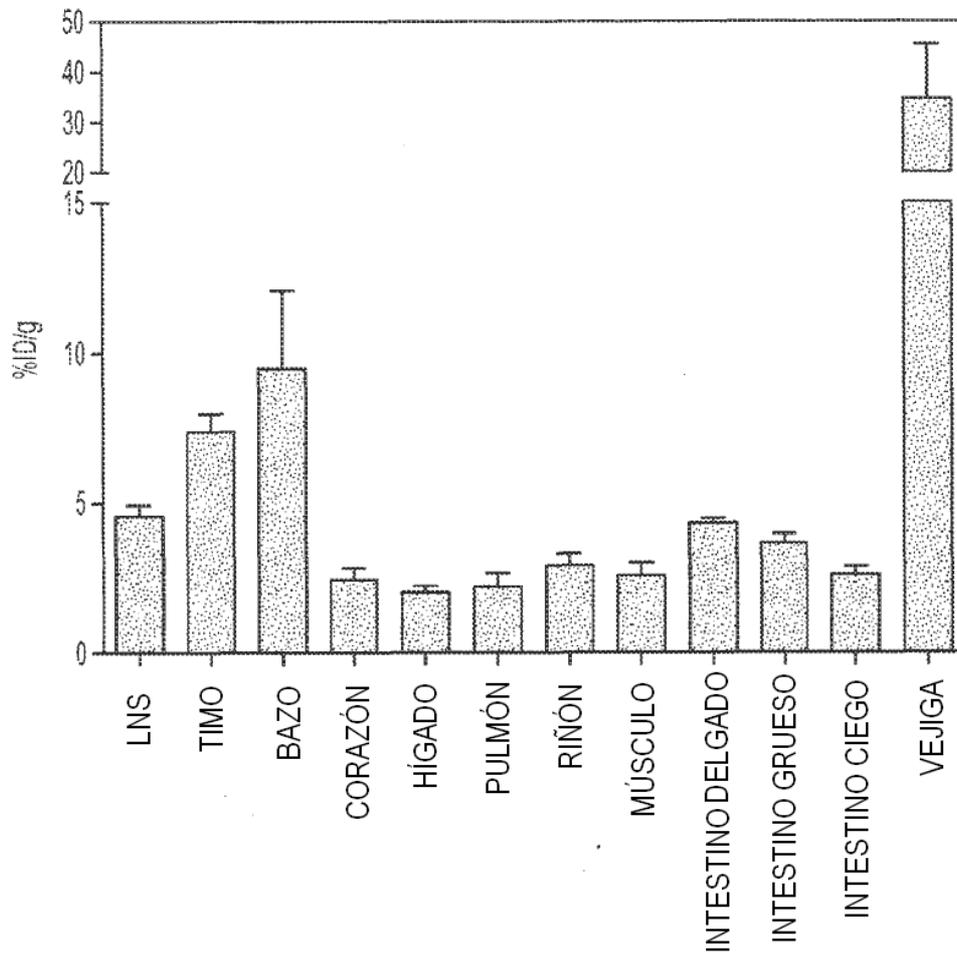


FIG. 10B

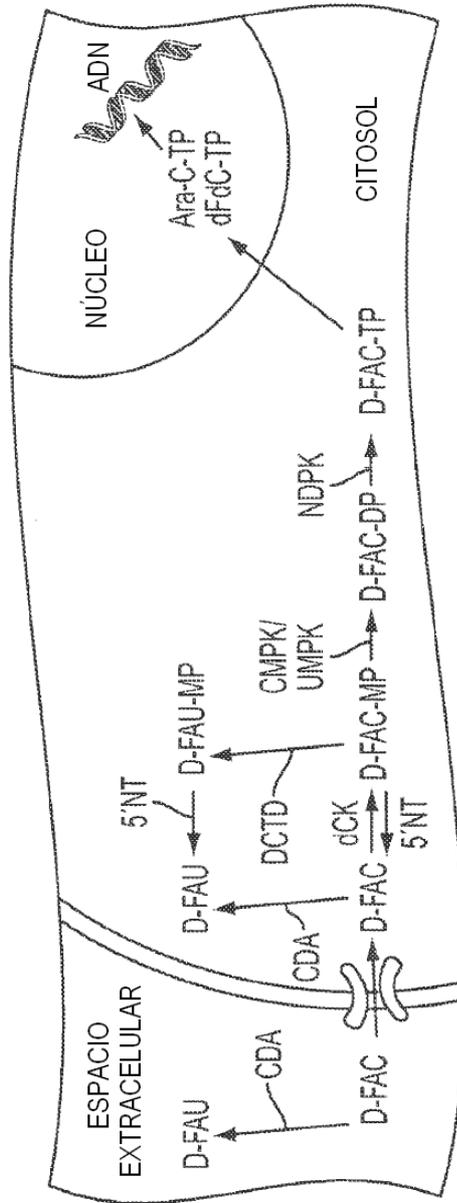


FIG. 11

Ba/F3-Bcr-Abl

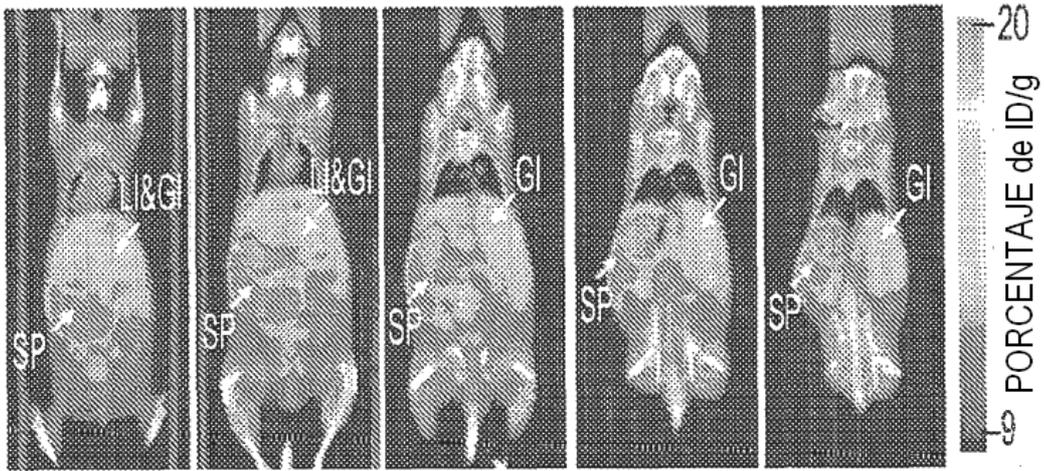


FIG. 12A

LEUCEMIA DE CÉLULAS B

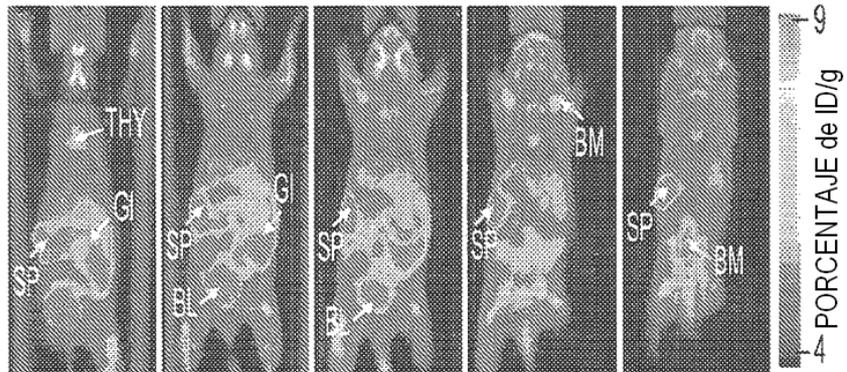


FIG. 12B

MELANOMA MURÍNICO (B16)

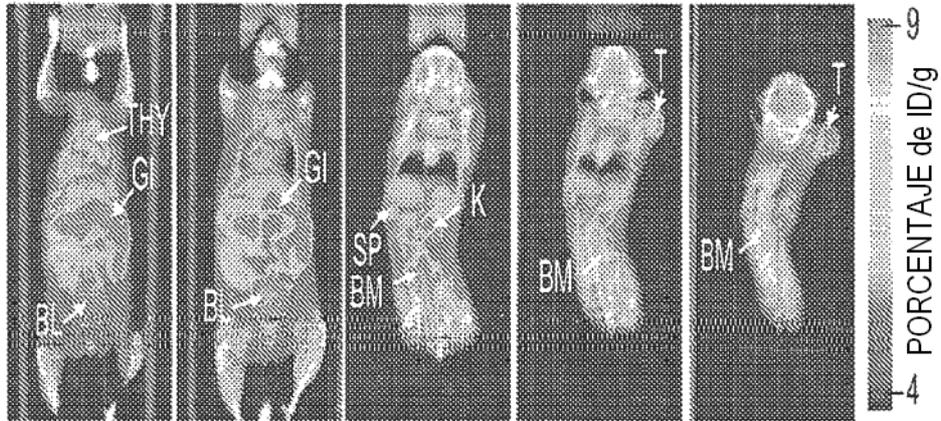


FIG. 12C

GLIOMA HUMANO (U87)

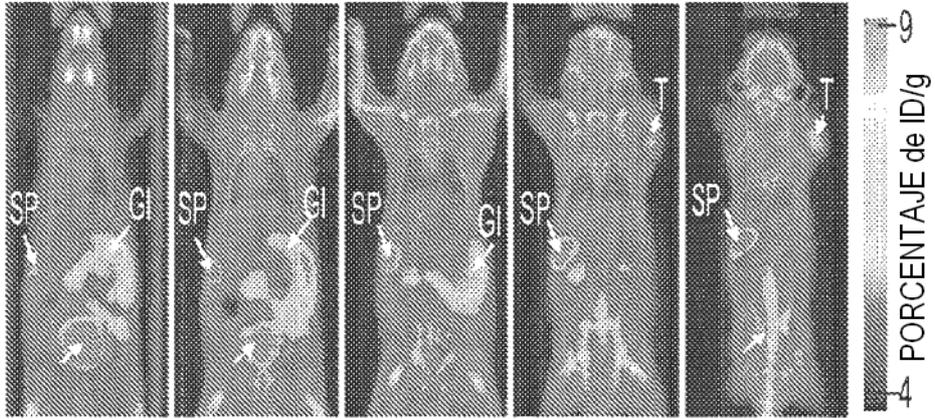


FIG. 12D

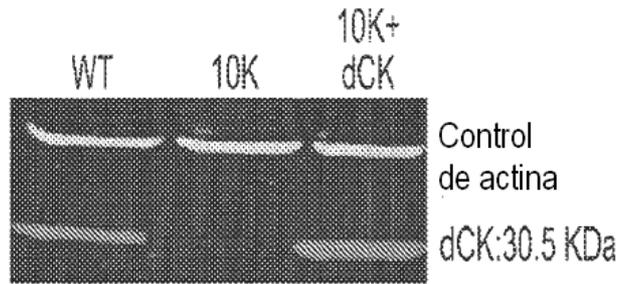


FIG. 13

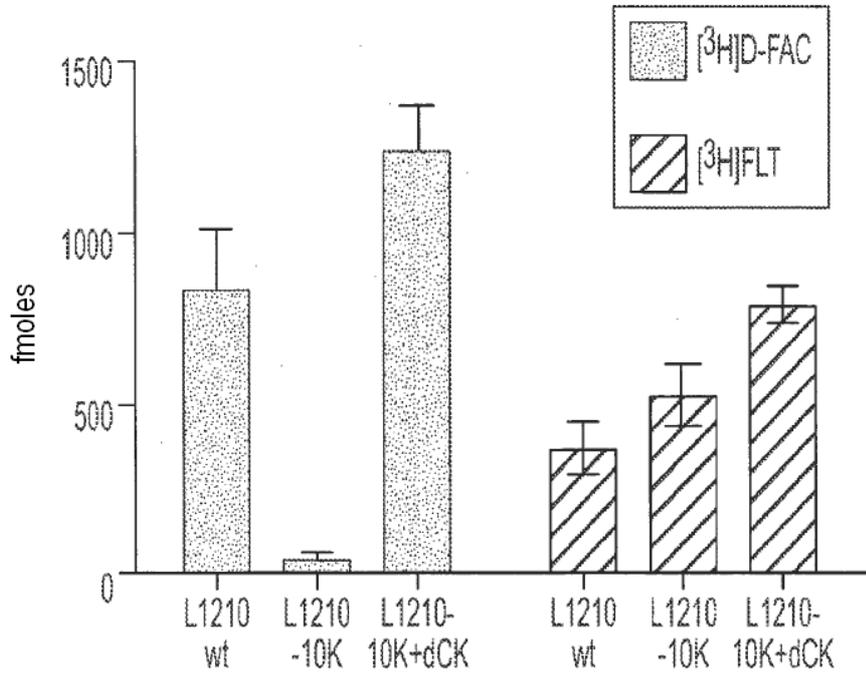


FIG. 14A

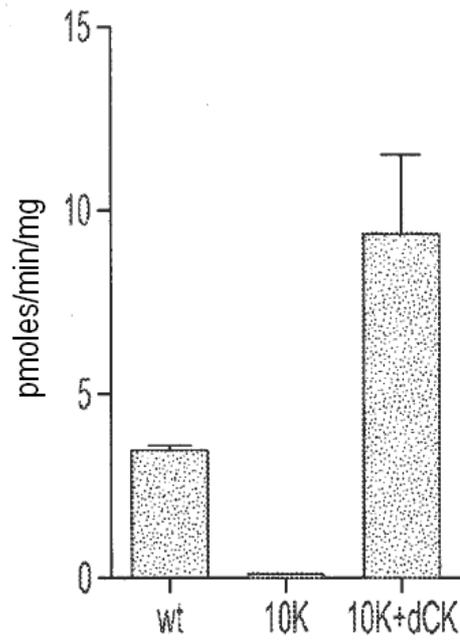


FIG. 14B

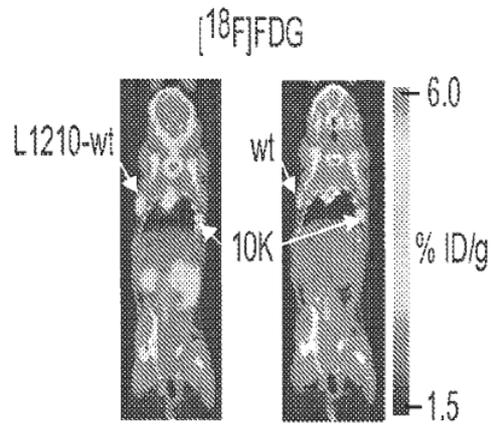


FIG. 15A

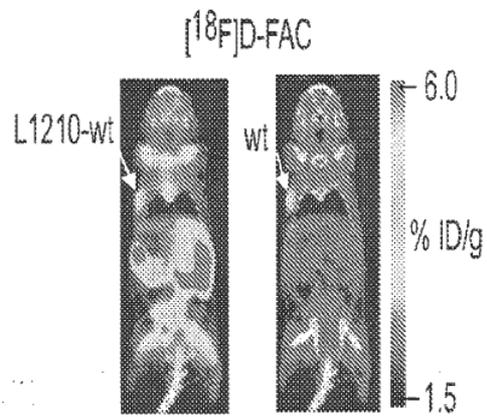


FIG. 15B

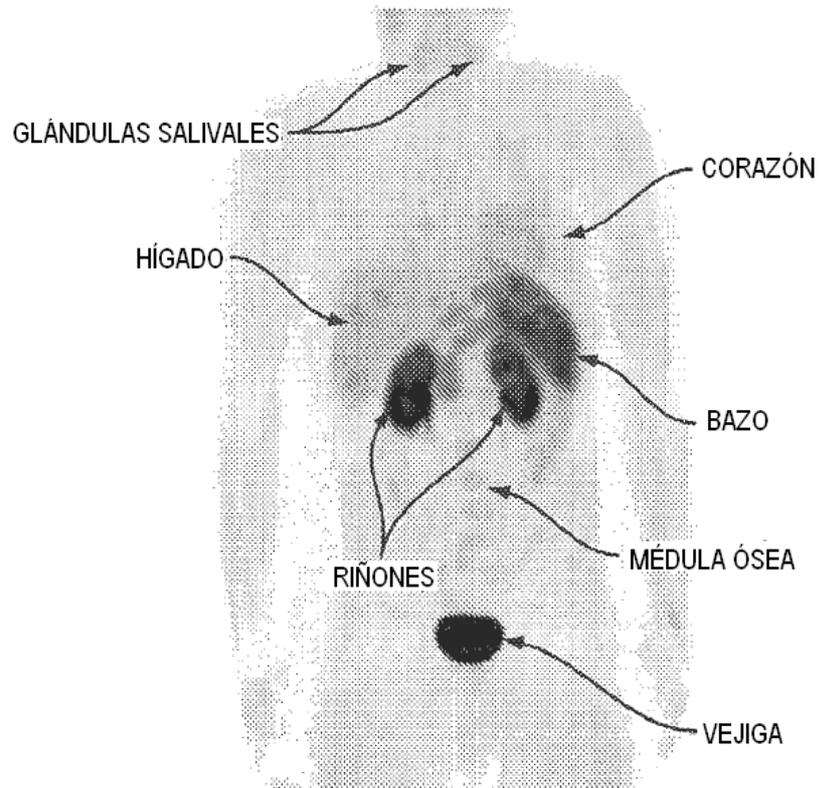


FIG. 16

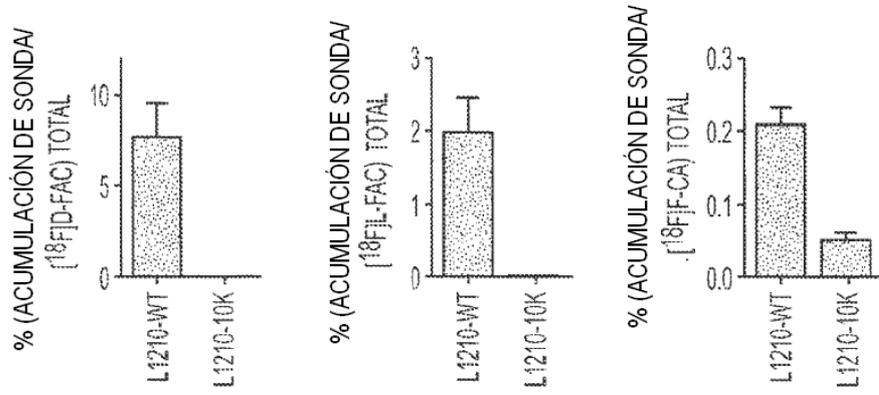


FIG. 17A

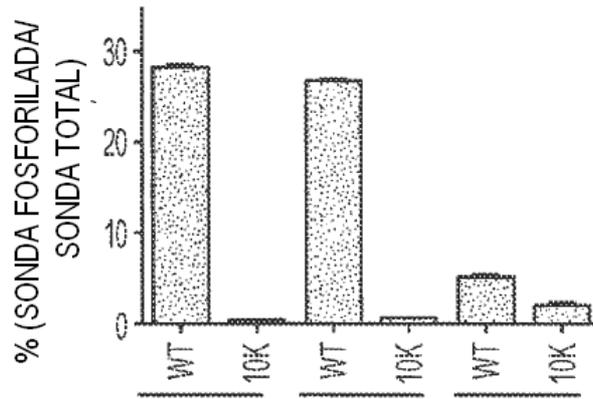
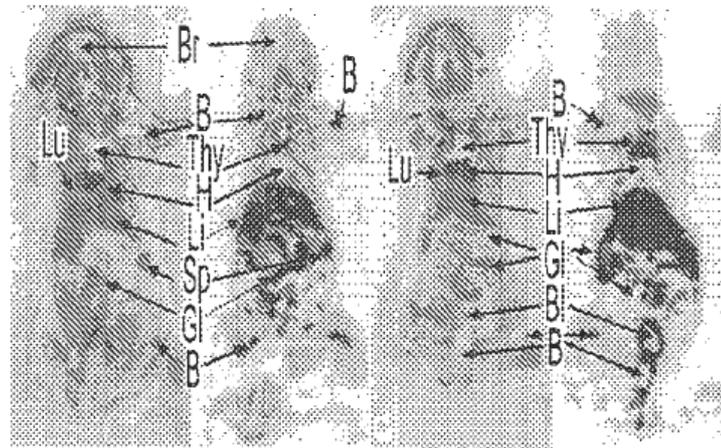


FIG. 17B



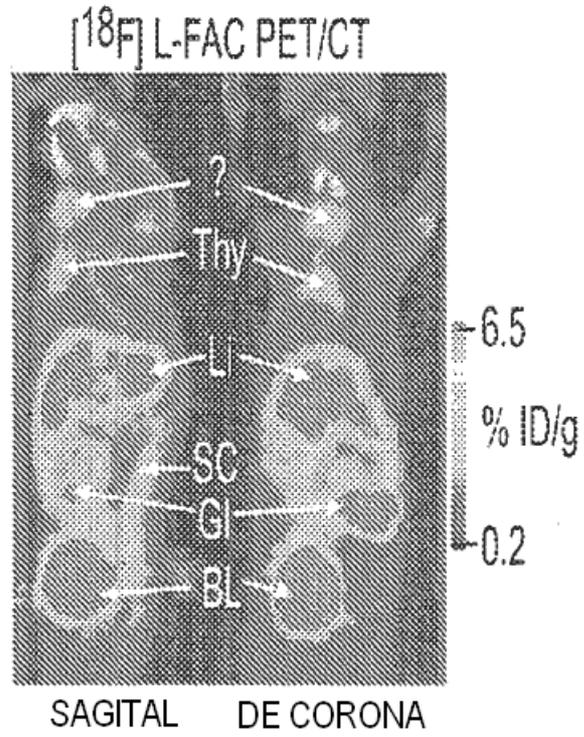
FOTOGRAFÍA

$[^{18}\text{F}]\text{-FAC}$   
DWBA

FOTOGRAFÍA

$[^{18}\text{F}]\text{-FAC}$   
DWBA

FIG. 18A



TRANSVERSA

FIG. 18C

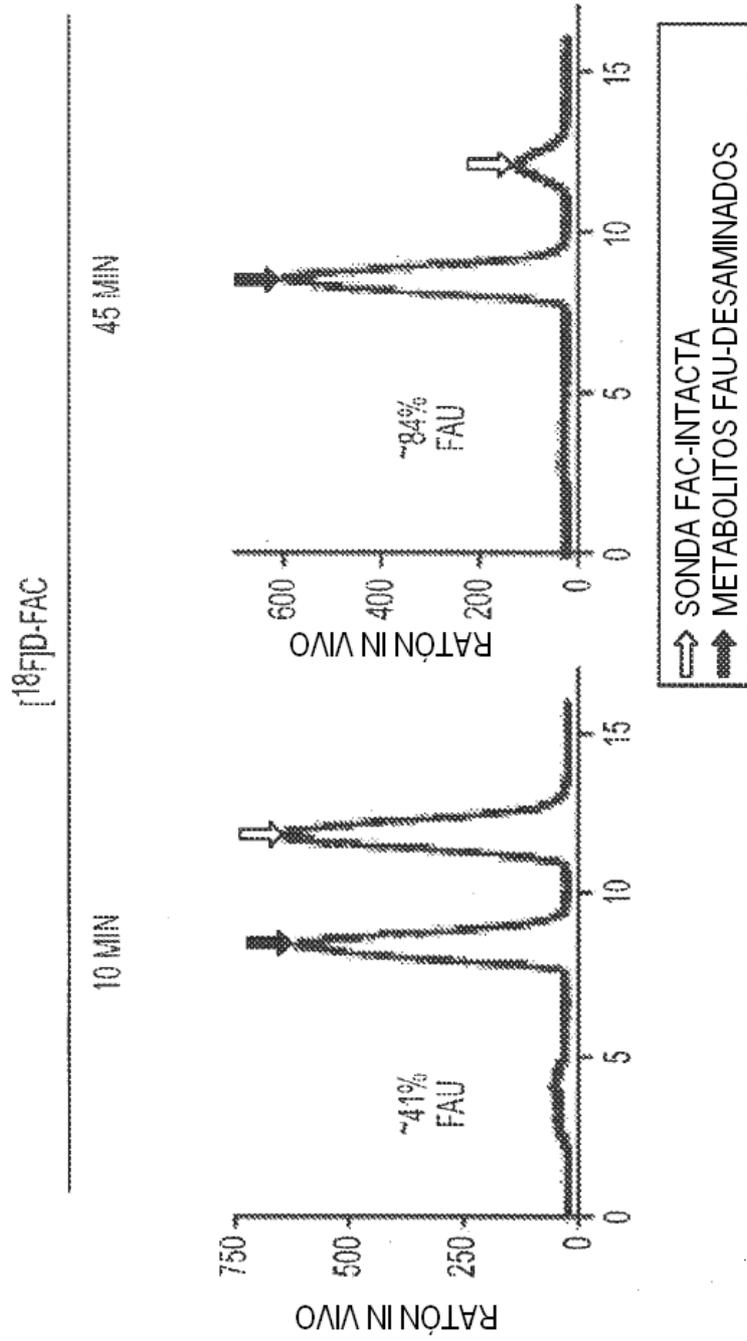


FIG. 19A

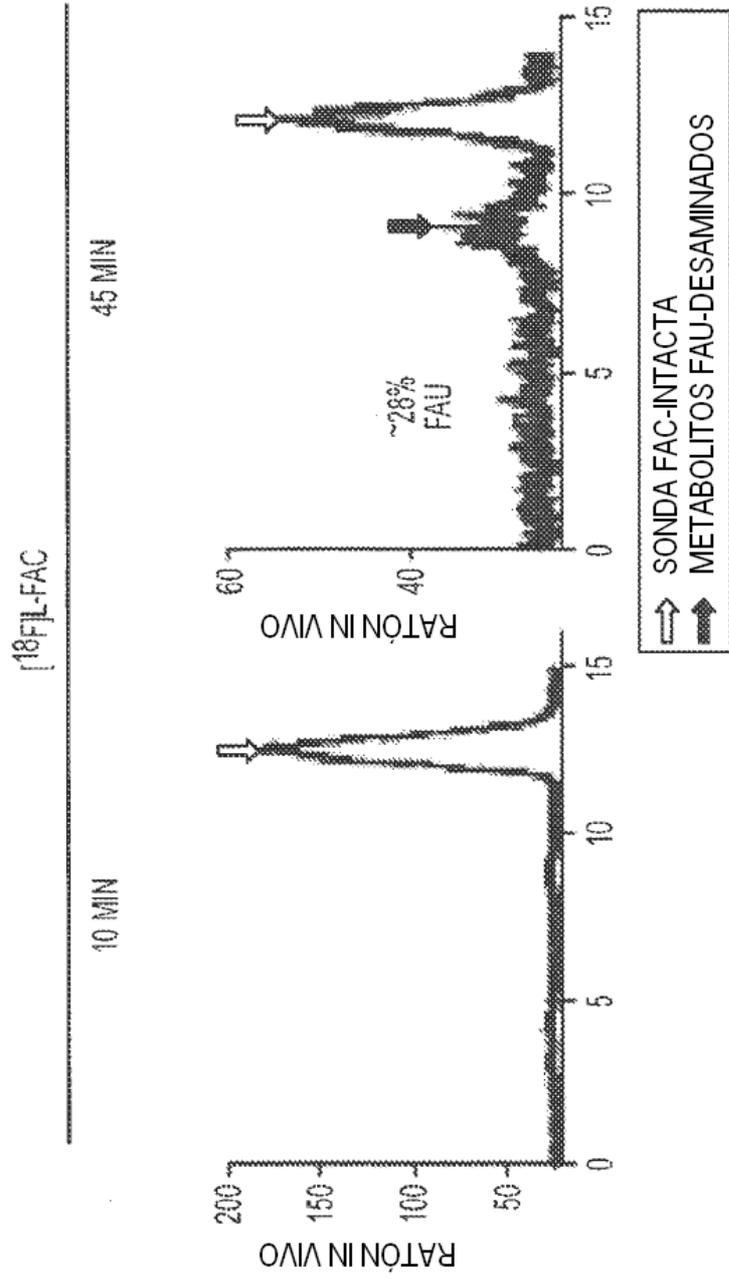


FIG. 19B

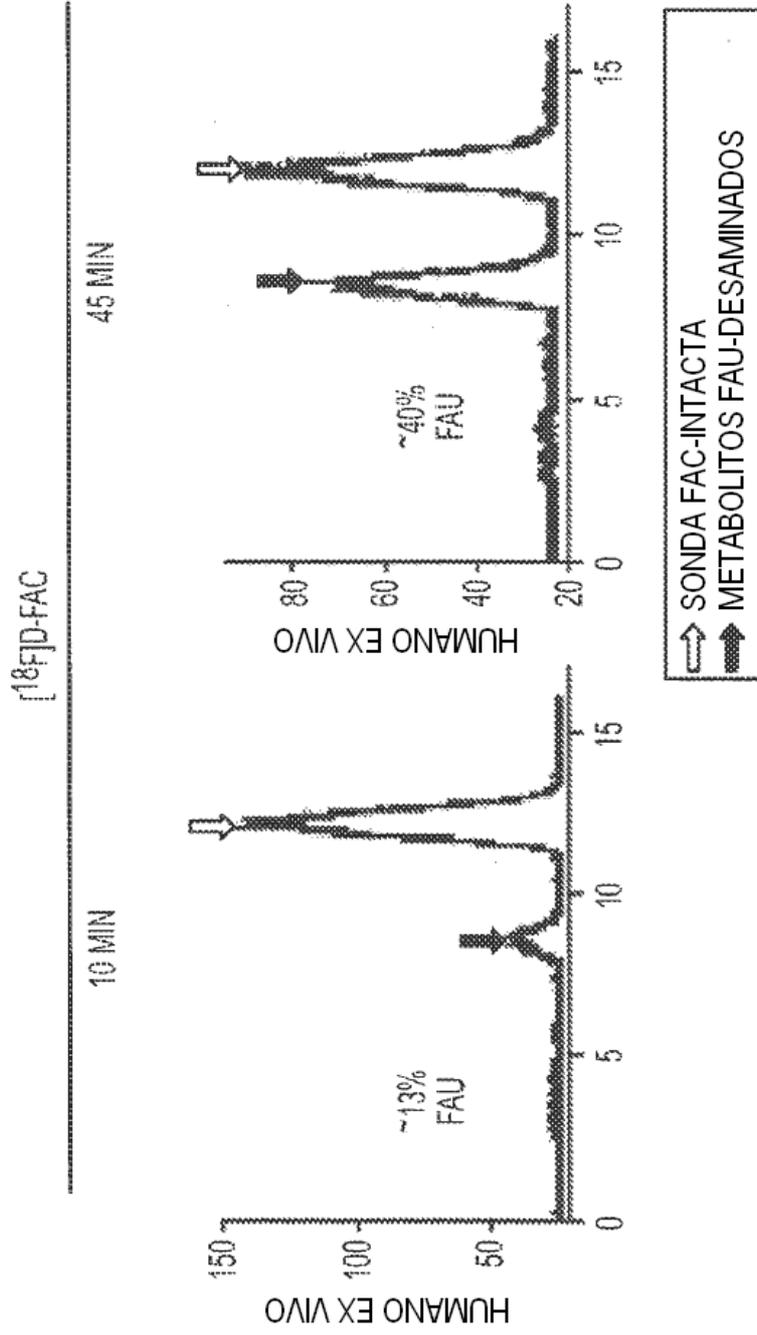


FIG. 19C

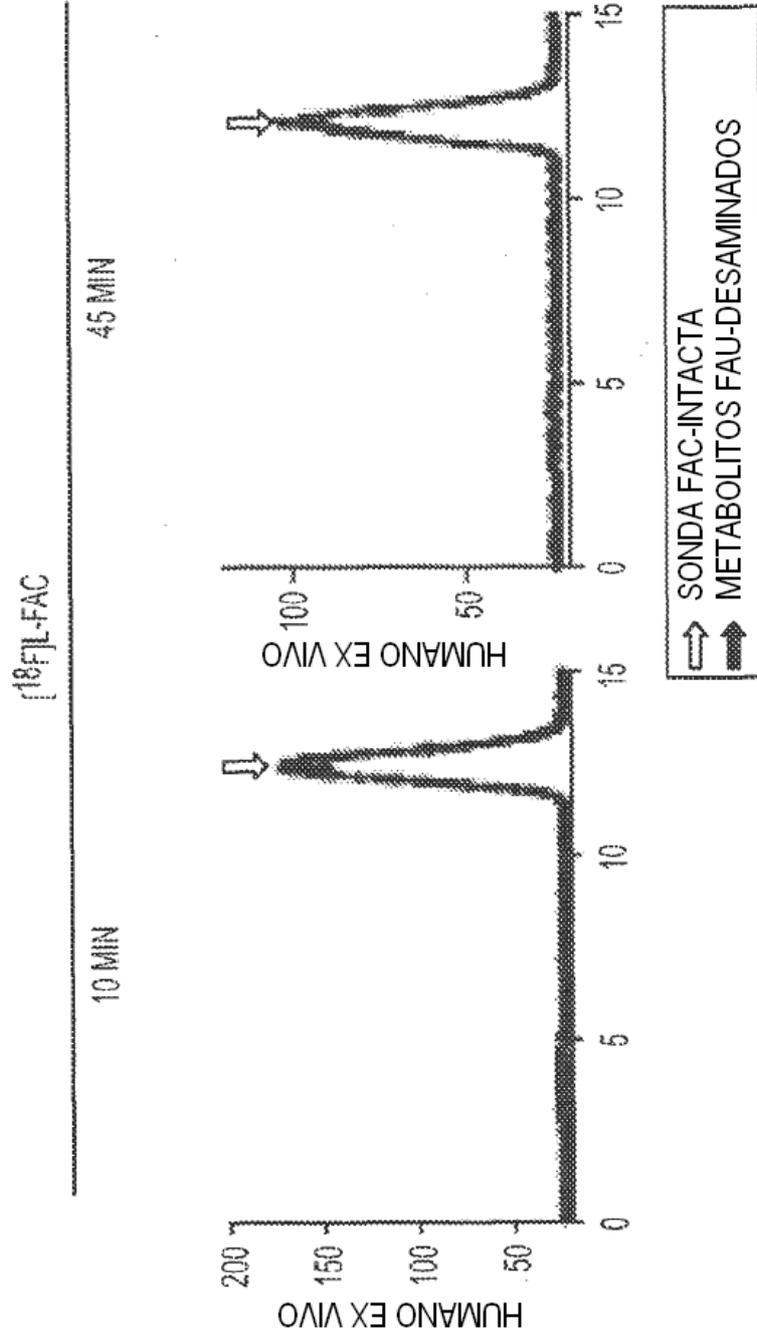


FIG. 19D

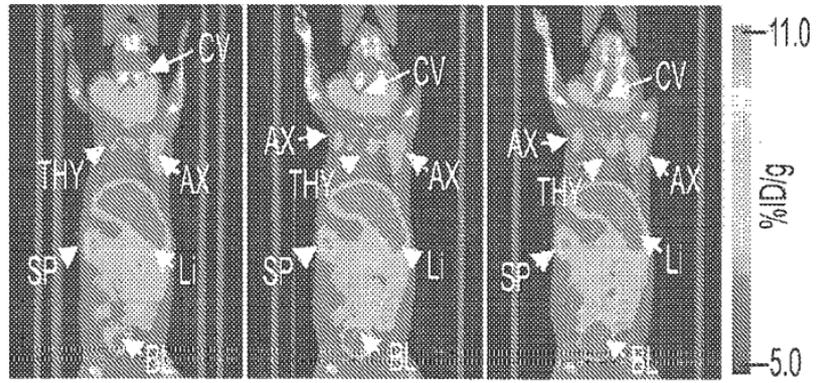


FIG. 20

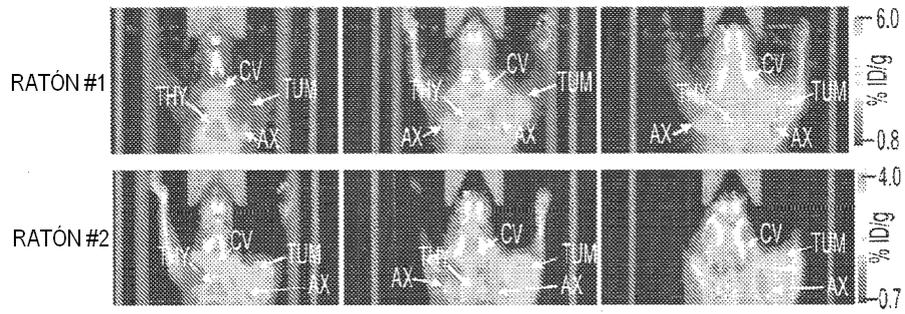


FIG. 21

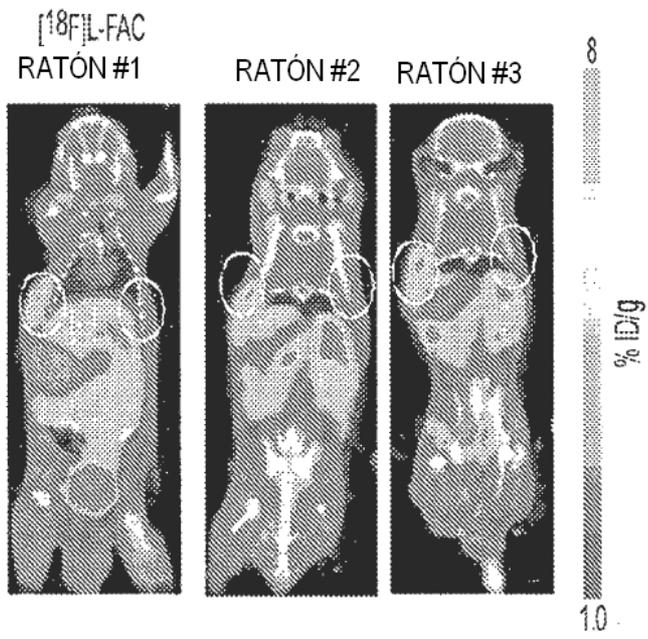


FIG. 22A

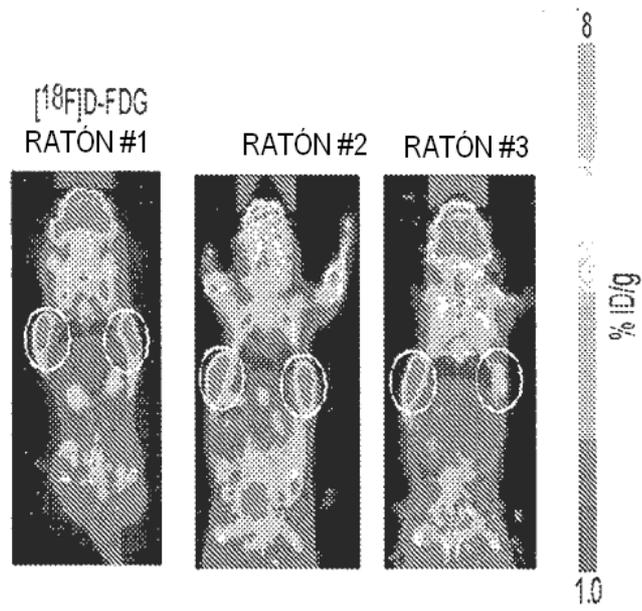


FIG. 22B

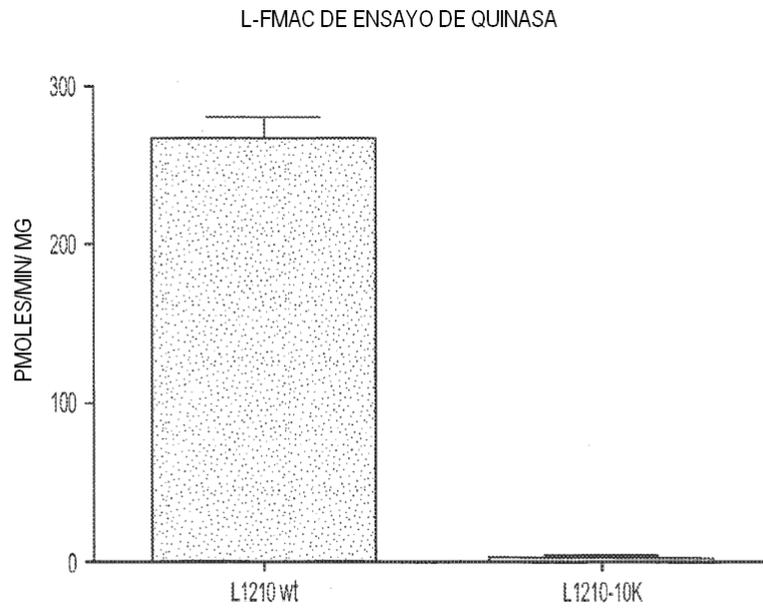


FIG. 23

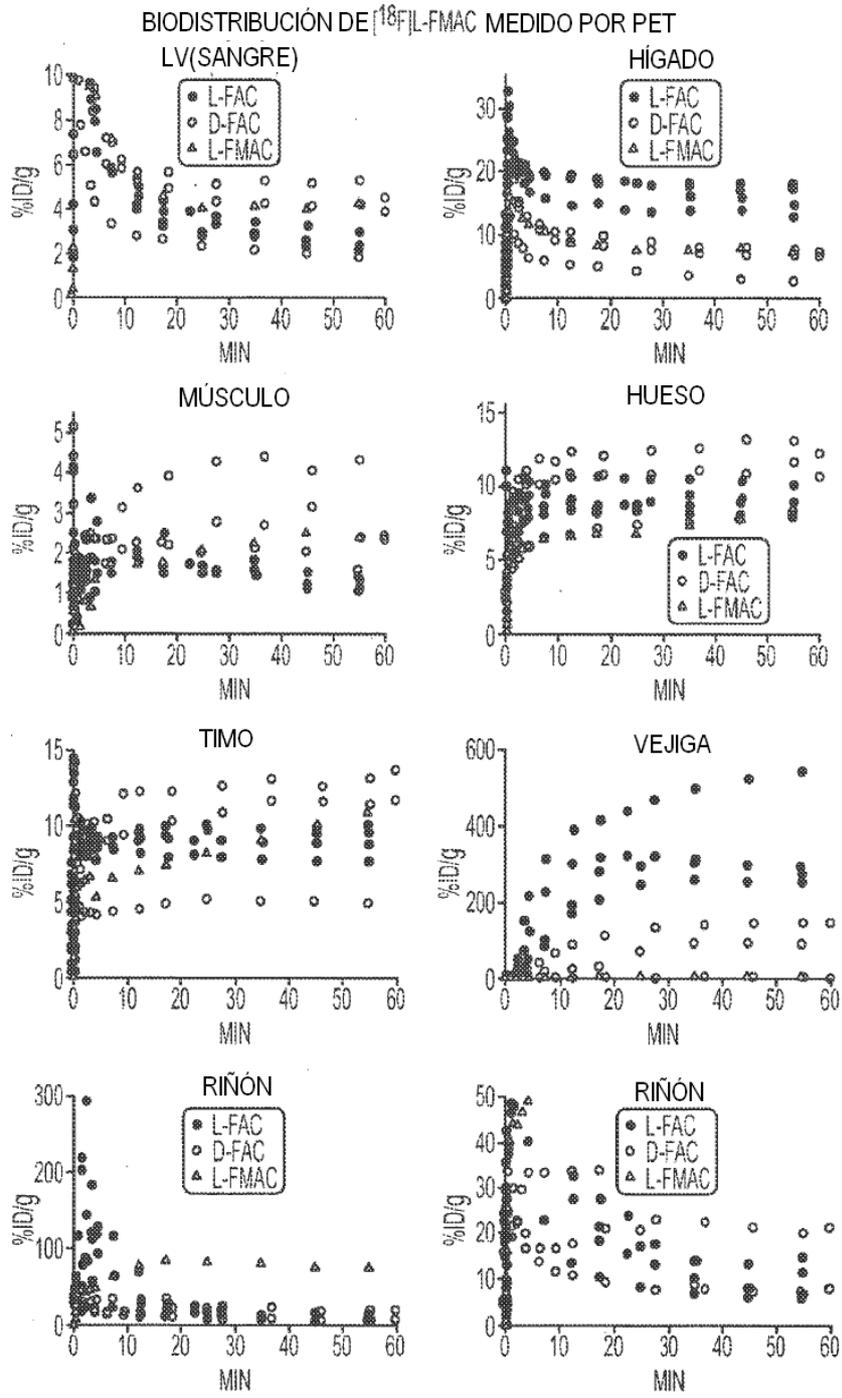


FIG. 24A

ACUMULACIÓN DE [ $^{18}\text{F}$ ]L-FMAC MEDIDO EN MUESTRAS DE TEJIDO DE NECROPSIA

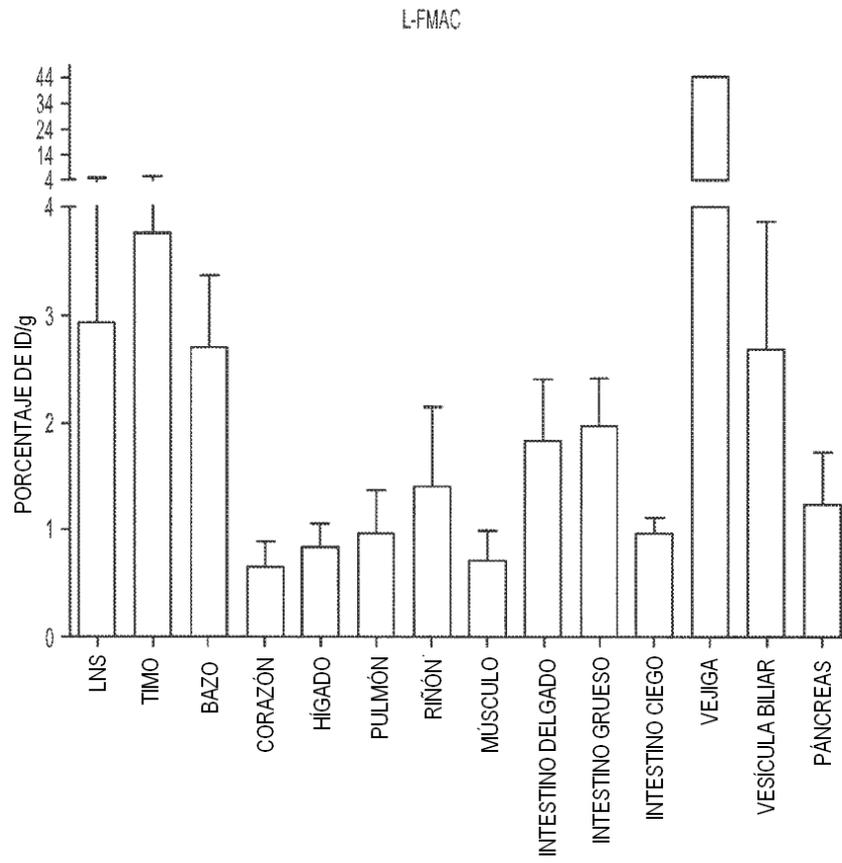


FIG. 24B

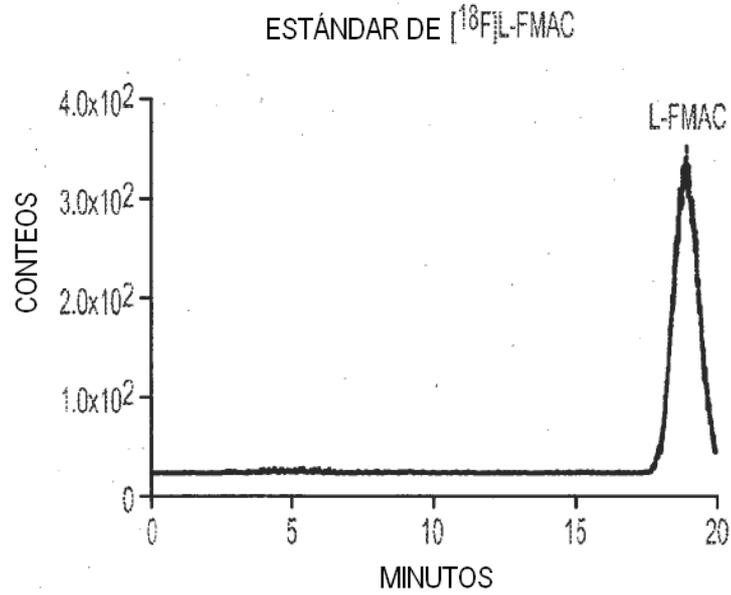


FIG. 25A

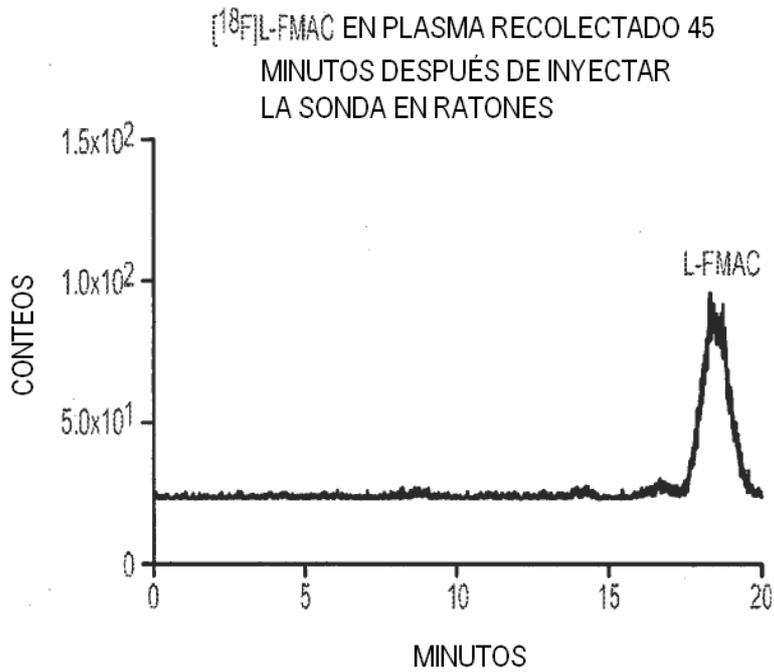


FIG. 25B

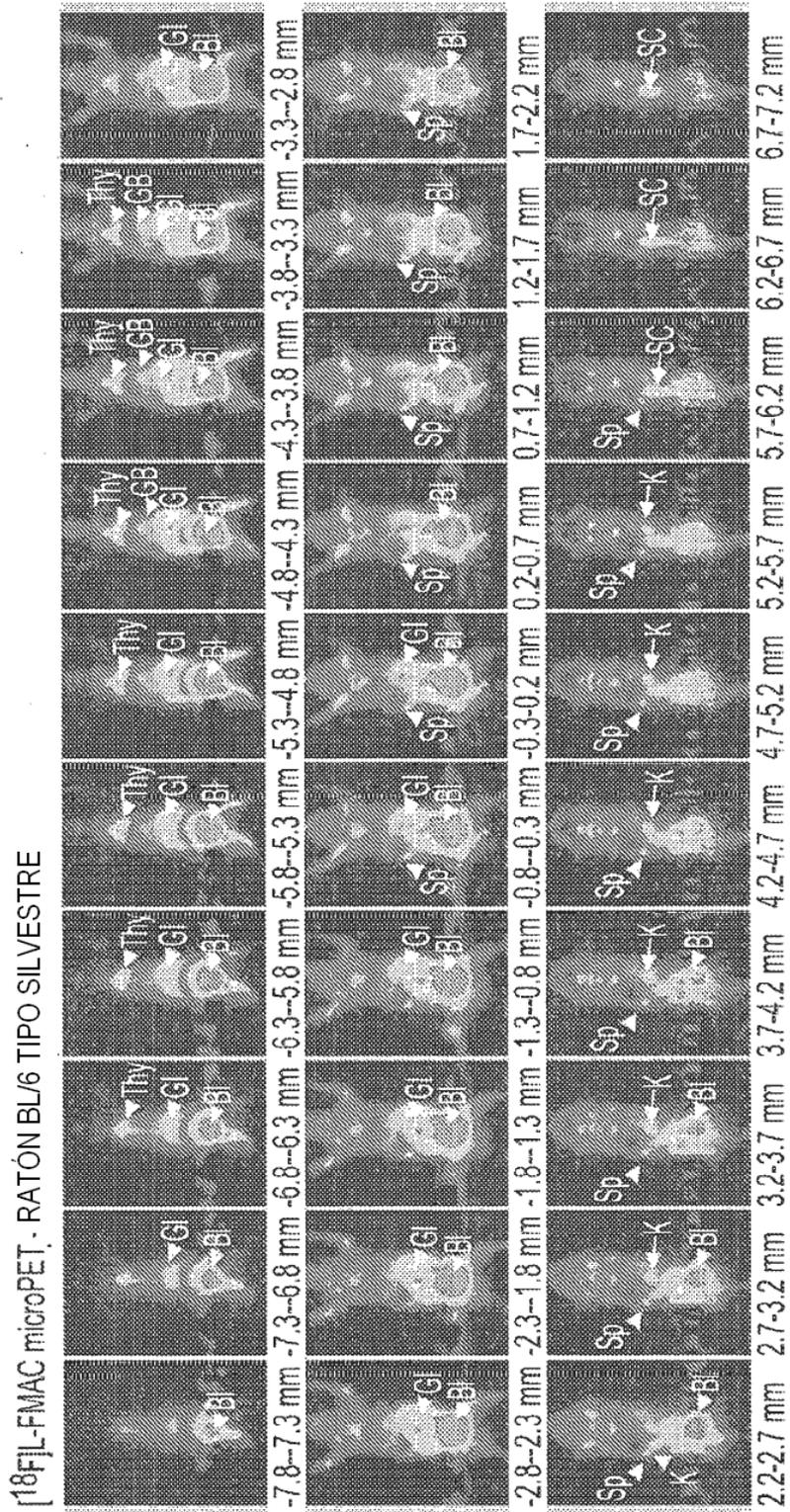


FIG. 26A

RATÓN AUTOINMUNE B6.MRL-Fas<sup>pr/j</sup>

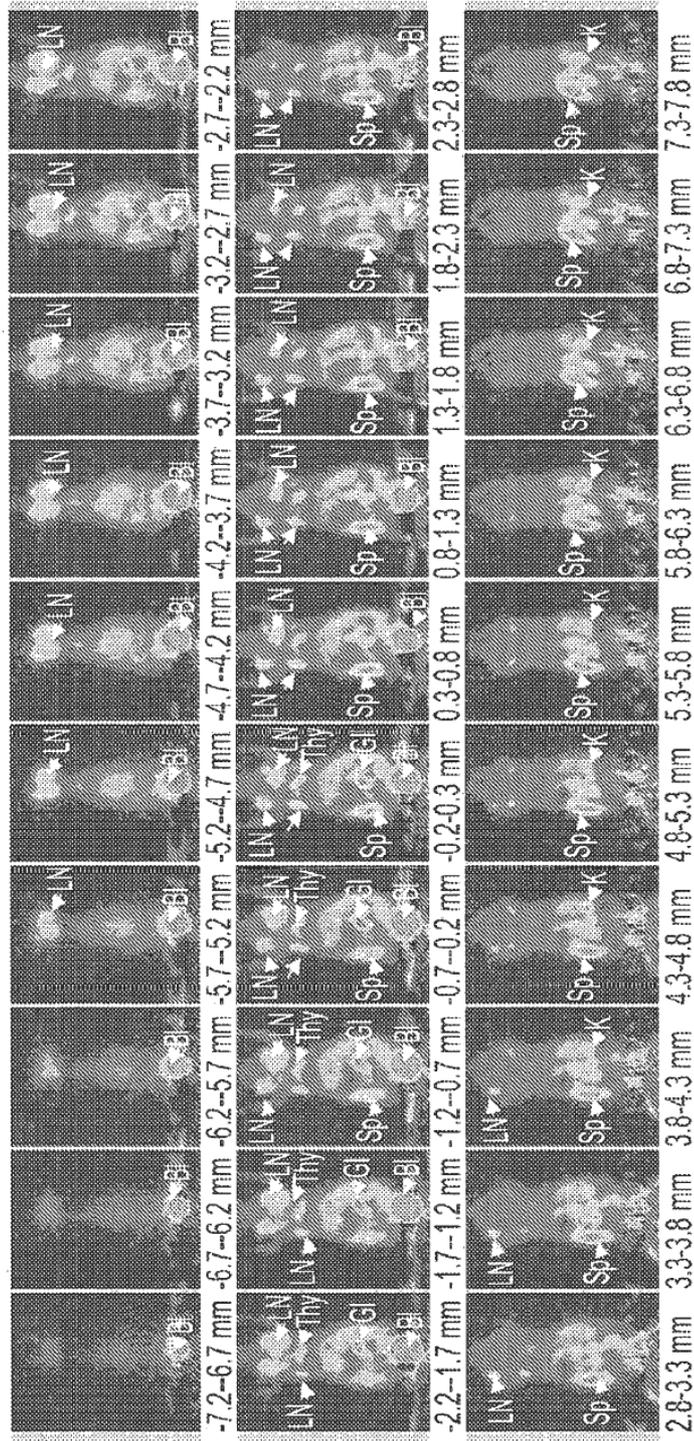


FIG. 26B



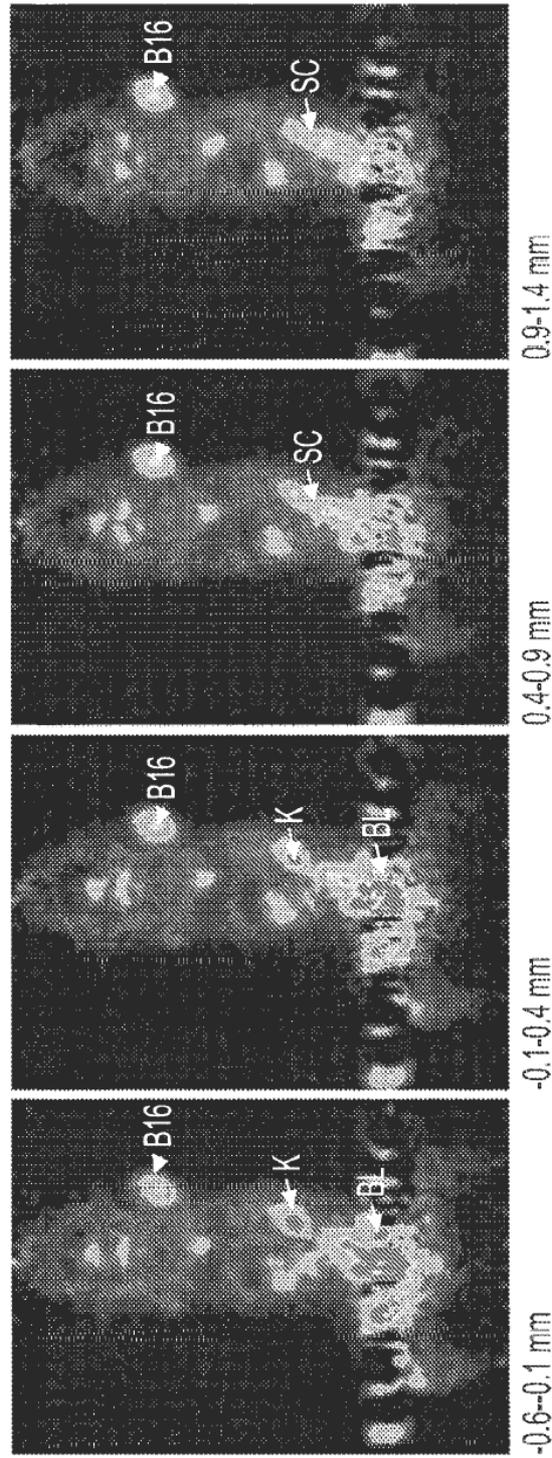


FIG. 28

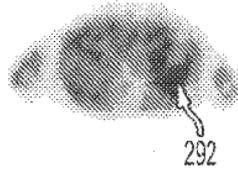


FIG. 29A

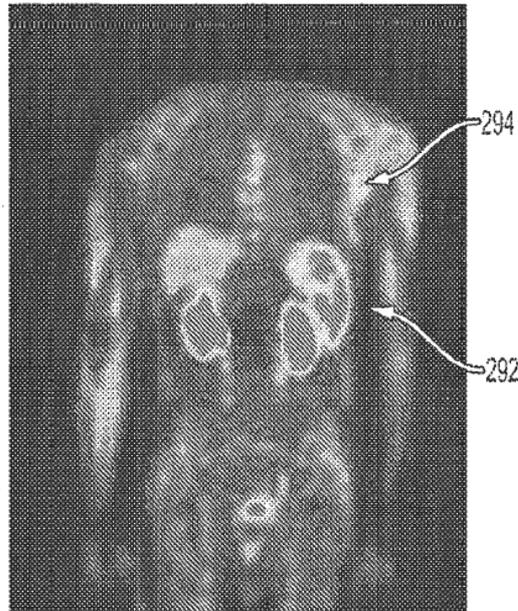


FIG. 29B

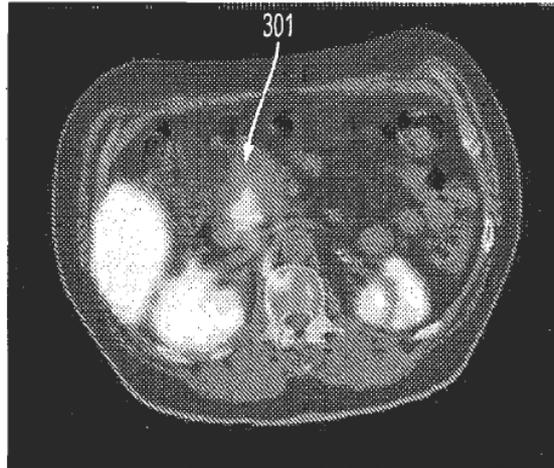


FIG. 30A

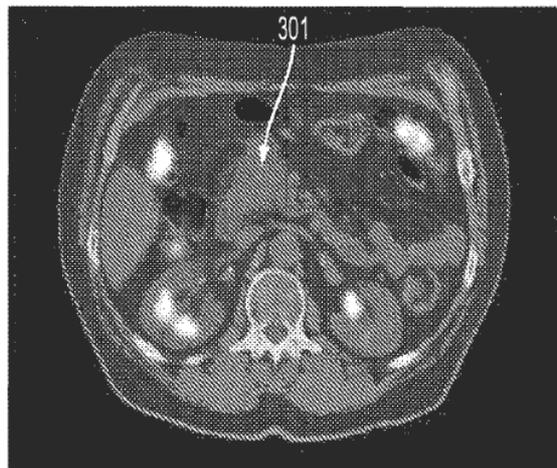


FIG. 30B